

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده کشاورزی

گروه علوم و صنایع غذایی

پایان نامه کارشناسی ارشد

تهیه فرمولاسیون نانوامولسیون و نانولیپوزوم اسانس مریم گلی سهندی با هدف

بررسی خواص فیزیکوشیمیایی و ضد میکروبی آنها

سازان قره‌نقده

اساتید راهنما

دکتر حمیدرضا صمدلوئی

دکتر محمود صوتی خیابانی

اساتید مشاور

دکتر حامد همیشه‌کار

دکتر رضا رضایی مکرم

بهمن ۹۴

## دانشگاه شاهرود

### دانشکده: کشاورزی

### گروه: باغبانی علوم و صنایع غذایی

پایان نامه کارشناسی ارشد آقای ..... به شماره دانشجویی: .....

تحت عنوان:

.....

در تاریخ ..... توسط کمیته تخصصی زیر جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد مورد ارزیابی و با درجه ..... مورد پذیرش قرار گرفت.

| امضاء | اساتید مشاور         | امضاء | اساتید راهنما        |
|-------|----------------------|-------|----------------------|
|       | نام و نام خانوادگی : |       | نام و نام خانوادگی:  |
|       | نام و نام خانوادگی : |       | نام و نام خانوادگی : |

| امضاء | نماینده تحصیلات تکمیلی | امضاء | اساتید داور          |
|-------|------------------------|-------|----------------------|
|       | نام و نام خانوادگی:    |       | نام و نام خانوادگی:  |
|       |                        |       | نام و نام خانوادگی   |
|       |                        |       | نام و نام خانوادگی:  |
|       |                        |       | نام و نام خانوادگی : |

## تقدیم

به:

تقدیم به پدر بزرگوارم، اسطوره ایستادگی و استقامت  
که درس مردانگی را به من آموخت، به یاد خوبی هایش  
و به یاد تعبیر عظیم و انسانیش از کلمه عشق، ایثار و  
از خود گذشتگی که وجودش در این سردترین  
روزگاران بهترین و محکمترین پشتیبان بود. تقدیم به  
مادر فداکارم، به پاس عاطفه سرشار و گرمای امید  
بخش وجودش که سرگردانی و ترس در پناهش به  
شجاعت می گراید، به پاس قلب بزرگش که فریادرس  
و بهترین حامی من است. تقدیم بر خواهر و برادرم که  
با هم آغاز کردیم، در کنار هم آموختیم و به امید هم به  
آینده چشم می دوزیم. قلبم لبریز از عشق به شماست و  
خوشبختی تان منتهای آرزویم

و تقدیم به همه عزیزانم که مرا در تدوین این پایان  
نامه یاری رساندند. به پاس محبت های بی دریغشان  
که هرگز فروکش نمی کند.

## "من لم يشكر المخلوق، لم يشكر الخالق"

### سپاس و قدردانی:

حمد و سپاس بیکران خداوند سبحان را که چون همیشه بر بنده خویش منت نهاد و توانایی و توفیق تحقیق در گوشه‌ای از میهن عزیز را بر او عنایت فرمود. در انجام این تحقیق خود را مدیون زحمات و مساعدت‌های عزیزان بسیاری می‌دانم که بی‌تردید، بدون یاری و همکاری ایشان، امکان به نتیجه رسیدن آن وجود نداشت. در اینجا بر خود لازم می‌دانم که زحمات‌شان را ارج نهاده و صمیمانه از همه آنها تشکر نمایم:

اساتید گرانقدر، جناب آقای دکتر حمیدرضا صمدلوئی و دکتر محمود صوتی خیابانی که راهنمایی این تحقیق را بر عهده داشتند. بزرگوارانی که با پشتکار و تلاش زایدالوصف، دلسوزانه و با خلوص نیت برای این مهم زحمت زیادی کشیدند و در تمام طول تحصیل از راهنمایی‌های ارزنده و بی‌دریغ ایشان بهره‌مند شدم. سپاس‌گذاری از ایشان را بر خود واجب می‌دانم.

از استاد گرانقدر آقای دکتر همیشه‌کار که در به نتیجه رسیدن این مطالعه نقش به سزایی داشتند و راهنمایی‌هایشان همیشه گره گشای کار ما بود نهایت تشکر و قدردانی را دارم.

آقایان دکتر احمد رجائی و دکتر کامبیز جهان بین به عنوان هیات داوران، که با قبول زحمت مطالب این تحقیق را کنترل نموده و با ارایه راهنمایی‌های ارزنده اینجانب را یاری نموده‌اند.

دوستان بسیار عزیز و گرامی‌ام، همکلاسی‌های خوبم و تمامی کسانی که امکان تشکر از تک تک ایشان در اینجا مقدور نیست، به خاطر کمک‌ها و همکاری‌های صمیمانه ایشان در طول دوران تحصیل تشکر و قدردانی می‌کنم.

در پایان ولی نه به عنوان کمترین از خانواده محترم، سرمایه وجودم، بویژه اولین آموزگار، مادر دلسوز و پدر بزرگوارم، همچنین خواهر و برادرم که همواره در طول مدت تحصیل پشتیبان و یاری رسانم بوده‌اند، خاضعانه سپاسگزارم.

## تعهد نامه

اینجانب ساسان قره نقده. دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته . مهندسی کشاورزی- علوم و مهندسی صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهرود نویسنده پایان نامه تهیه فرمولاسیون نانوامولسیون و نانولیپوزوم اسانس مریم گلی به هدف بررسی خواص فیزیکیوشیمیایی و ضد میکروبی آن‌ها تحت راهنمایی دکتر حمیدرضا صمدلوئی متعهد می شوم

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه شاهرود » و یا « Shahrood University » به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده ( یا بافتهای آنها ) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است

تاریخ ۱۳۹۴/۱۱/۲۵

امضای دانشجو

### مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه ای، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است ) متعلق به دانشگاه شاهرود می باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

### چکیده

متابولیت‌های ثانویه جدا شده از گونه‌های مریم‌گلی عمدتاً ترپنوئیدها و فلاونوئیدها هستند، که جز ترکیبات زیست فعال با اثرات سلامت بخشی بالا می‌باشند. ولی بسیاری از این مواد بعد از استخراج از گیاه، از لحاظ شیمیایی ناپایدار می‌شوند و هنگام مصرف اثر سلامت بخشی کمتر از حد لازم را نشان می‌دهند. این ترکیبات غذا-دارو (نوتریسیتیکال)، در داخل ماده غذایی با سایر اجزاء موجود اتصال می‌یابند و یا به دلیل پایداری و حلالیت پایین و طعم نامطلوب آن‌ها با محدودیت‌هایی همراه هستند. برای از بین بردن این مشکلات، می‌توان با استفاده از سیستم‌های حامل، آن‌ها را درون پوشانی کرد و خواص عملکردی مواد غذا-دارو را بهبود داد. بدین منظور، در این پژوهش نانومولسیون با استفاده از روش اولتراسوند با شدت بالا تهیه شد. سورفکتانت‌های تویین ۸۰ و اسپن ۸۰، اسانس مریم‌گلی سهندیکا به عنوان فاز روغنی و آب به عنوان اجزاء تشکیل دهنده نانومولسیون به کار رفت. همچنین، برای تولید نانولیپوزوم، از روش هیدراسیون لایه نازک استفاده شد و از فسفاتیدیل کولین با نسبت مولی ۱ به ۱ با اسانس مریم‌گلی استفاده شد. برای هیدراسیون هم از نسبت ۴ به ۶ گلیسرول و آب استفاده شد. در این پژوهش خواص آنتی‌اکسیدانی اسانس مریم‌گلی و نانو حامل‌ها با استفاده از رادیکال آزاد DPPH اندازه‌گیری شد. همچنین بررسی خواص ضد میکربی نانو حامل‌ها و اسانس مریم‌گلی با دو روش ماکرودایلوژن و میکرودایلوژن انجام گرفت. نتایج حاصل حاکی از بدست آمدن سایز ذرات و توزیع اندازه ذرات برای فرمولاسیون بهینه نانومولسیون به ترتیب  $0.41 \pm 89/45$  و  $0.01 \pm 0/38$  نانومتر و برای فرمولاسیون بهینه نانولیپوزوم  $1/53 \pm 82/87$  و  $0.01 \pm 0/42$  بود. کارایی درون پوشانی در نانومولسیون و نانولیپوزوم به ترتیب بالای ۶۹٪ و ۸۴٪ به دست آمد. خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس با نانوحامل‌ها تفاوت معنی‌داری نشان داد، به طوری که نانومولسیون حاوی اسانس دارای بیشترین و

اسانس در حالت آزاد دارای کمترین خاصیت آنتی اکسیدانی را نشان داد. نتایج حاصل از آزمایشهای میکروبی در روش میکرو دایلوژن و ماکرو دایلوژن نشان داد، تاثیر اسانس در دو حالت آزاد و کپسوله شده در حامل های لیپیدی در برابر باکتری گرم مثبت ( *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس* ) بیشتر از باکتری گرم منفی ( *شرشیاکلی* و *موراکسلا کاتارالیس* ) بود. خاصیت ضد میکروبی اسانس با نانوحامل ها تفاوت معنی داری نشان داد، به طوری که نانوامولسیون حاوی اسانس دارای بیشترین و اسانس در حالت آزاد دارای کمترین خاصیت ضد میکروبی را نشان داد. در حالت کلی نانوامولسیون نسبت به نانولیپوزوم خاصیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی بیشتری داشت. در نتیجه نانوامولسیون می تواند حامل مناسبی برای افزایش فعالیت ضد میکروبی اسانس مریم گلی باشد

**کلمات کلیدی:** نانوامولسیون، نانولیپوزوم، مریم گلی سهندیکا، ضد میکروبی

## لیست مقالات مستخرج از پایان نامه:

(۱) بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره استخراج شده از گیاه مریم گلی سهندیکا با روش حلال و اولتراسوند

(۲) استخراج اسانس از گیاه مریم گلی و تهیه نانولیپوزوم از آن با هدف بررسی خواص فیزیکوشیمیایی و آنتی اکسیدانی آن

(۳) فرمولاسیون نانوامولسیون از اسانس مریم گلی با هدف بررسی خواص ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی آن

(۴) انکپسولاسیون روشی نوین جهت افزایش پایداری اسانس گیاهان دارویی

.

## فهرست مطالب

| صفحه | عنوان                                                         |
|------|---------------------------------------------------------------|
| ۱    | مقدمه.....                                                    |
| ۳    | ۱- کلیات.....                                                 |
| ۴    | ۱-۱- اهمیت گیاهان دارویی.....                                 |
| ۴    | ۱-۱-۱- عصاره.....                                             |
| ۵    | ۱-۱-۱-۱- ارزیابی عصاره‌های گیاهی.....                         |
| ۵    | ۱-۱-۲- اسانسها.....                                           |
| ۵    | ۱-۱-۲-۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی اسانسها.....                |
| ۶    | ۱-۱-۲-۲- کاربرد اسانسها.....                                  |
| ۷    | ۱-۱-۲-۳- خواص بیولوژیکی اسانسها.....                          |
| ۷    | ۱-۱-۳-۲- خاصیت ضد میکروبی.....                                |
| ۷    | ۱-۱-۳-۲-۱- خاصیت ضد قارچی.....                                |
| ۸    | ۱-۱-۳-۲-۱-۱- خاصیت آنتی‌اکسیدانی.....                         |
| ۹    | ۱-۱-۴-۲- محدودیت استفاده از اسانسهای گیاهی در مواد غذایی..... |
| ۱۰   | ۱-۲- نانوتکنولوژی در صنایع غذایی.....                         |
| ۱۰   | ۱-۳- آنکپسولاسیون در صنایع غذایی.....                         |
| ۱۱   | ۱-۳-۱- نانوانکپسولاسیون در صنایع غذایی.....                   |
| ۱۳   | ۱-۴- سیستم‌های نانوحامل.....                                  |
| ۱۳   | ۱-۴-۱- نانوذرات لیپیدی جامد (SLNs).....                       |

- ۱-۴-۲- حامل‌های لیپیدی نانو ساختار (NLCs)..... ۱۴
- ۱-۴-۳- نانولیپوزومها ..... ۱۵
- ۱-۴-۳-۱- ساختار شیمیایی لیپوزومها ..... ۱۵
- ۱-۴-۳-۲- تولید لیپوزوم..... ۱۶
- ۱-۴-۳-۳- روشهای تهیه لیپوزومها بر پایه آگیری ..... ۱۸
- ۱-۴-۳-۳-۱- تکنیکهای بارگیری غیر فعال ..... ۱۸
- ۱-۴-۳-۳-۲- تکنیکهای بارگیری فعال ..... ۱۸
- ۱-۴-۳-۴- انواع لیپوزومها ..... ۱۹
- ۱-۴-۳-۵- روشهای تهیه نانولیپوزوم..... ۲۰
- ۱-۴-۳-۵-۱- روشهای سنتی تولید لیپوزوم ..... ۲۰
- ۱-۴-۳-۵-۲- روشهای نوین تولید لیپوزوم ..... ۲۱
- ۱-۴-۴- نانوامولسیونها..... ۲۲
- ۱-۴-۴-۱- تعریف و ساختار شیمیایی نانوامولسیونها ..... ۲۲
- ۱-۴-۴-۱-۱- HLB ..... ۲۳
- ۱-۴-۴-۲- انواع نانوامولسیونها..... ۲۴
- ۱-۴-۴-۳- مزیت نانوامولسیونها..... ۲۴
- ۱-۴-۴-۴- روشهای تولید نانوامولسیونها..... ۲۵
- ۱-۴-۴-۴-۱- روشهای پر انرژی ..... ۲۵
- ۱-۴-۴-۴-۲- روشهای کم انرژی ..... ۲۷
- ۱-۵- گیاه‌شناسی ..... ۳۰
- ۱-۵-۱- خانواده نعنائیان..... ۳۰
- ۱-۵-۲- جنس مریم گلی..... ۳۰

- ۳-۵-۱- گونه مریم گلی سهندیکا ..... ۳۱
- ۴-۵-۱- خواص بیولوژیکی و دارویی گونه *sahandica* ..... ۳۱
- ۲- بررسی منابع ..... ۳۳
- ۱-۲- انکپسوله کردن روغنهای اسانسی در لیپوزوم ..... ۳۵
- ۲-۲- انکپسوله کردن روغنهای اسانسی در نانوامولسیون ..... ۳۷
- ۳- مواد و روش ها ..... ۳۹
- ۳-۱- مواد مورد استفاده در این تحقیق ..... ۴۰
- ۳-۲- تجهیزات مورد استفاده ..... ۴۱
- ۳-۳- جمع آوری گیاه مریم گلی سهندیکا ..... ۴۲
- ۳-۴- روشها ..... ۴۲
- ۳-۴-۱- استخراج اسانس ..... ۴۲
- ۳-۴-۲- شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس ..... ۴۲
- ۳-۴-۳- تولید نانولیپوزوم ..... ۴۳
- ۳-۴-۴- تولید نانوامولسیون ..... ۴۴
- ۳-۵- آزمونها ..... ۴۵
- ۳-۵-۱- اندازه گیری ذرات نانولیپوزوم و نانوامولسیون حاوی مریم گلی ..... ۴۵
- ۳-۵-۲- کارایی درون پوشانی نانولیپوزوم و نانوامولسیون حاوی اسانس مریم گلی ..... ۴۶
- ۳-۵-۳- پایداری ذرات نانولیپوزوم و نانوامولسیون حاوی اسانس مریم گلی ..... ۴۷
- ۳-۵-۴- تعیین مورفولوژی نانوذرات با (SEM) ..... ۴۸
- ۳-۵-۵- تعیین خاصیت آنتی اکسیدانی ..... ۴۸
- ۳-۵-۶- بررسی اثرات ضد میکربی نانولیپوزوم و نانوامولسیون حاوی اسانس مریم گلی ..... ۴۹
- ۳-۵-۶-۱- آماده سازی نمونه های باکتری و قارچی ..... ۴۹

|    |                                                             |
|----|-------------------------------------------------------------|
| ۵۰ | ۳-۵-۶-۲-تهیه کدورت استاندارد نیم مک فارلند                  |
| ۵۰ | ۳-۵-۶-۳-تهیه سوسپانسیون باکتری                              |
| ۵۱ | ۳-۵-۶-۴-آزمایش های رقتی (MIC)                               |
| ۵۱ | ۳-۵-۶-۵-MBC                                                 |
| ۵۱ | ۳-۵-۶-۶-انجام تست MIC و MBC                                 |
| ۵۳ | ۳-۵-۶-۶-۱-روش میکرودايلوشن                                  |
| ۵۳ | ۳-۵-۶-۶-۲-روش ماکرودايلوشن                                  |
| ۵۴ | ۳-۶-محل انجام پروژه                                         |
| ۵۴ | ۳-۷-طرح آماری آزمایشها                                      |
| ۵۵ | ۴-نتایج و بحث                                               |
| ۵۶ | ۴-۱-استخراج اسانس گیاه مریم گلی ( <i>Salvia sahandica</i> ) |
| ۵۶ | ۴-۱-۱-طیف GC-MS اسانس مریم گلی                              |
| ۵۶ | ۴-۱-۲-آنالیز اسانس مریم گلی                                 |
| ۵۷ | ۴-۲-تعیین اندازه و توزیع اندازه ذرات                        |
| ۵۸ | ۴-۲-۱-تعیین اندازه و توزیع اندازه ذرات در نانولیپوزوم       |
| ۶۱ | ۴-۲-۲-تعیین اندازه و توزیع اندازه ذرات در نانومولسیونها     |
| ۶۳ | ۴-۳-تعیین کارایی کپسولاسیون                                 |
| ۶۳ | ۴-۳-۱-کارایی کپسولاسیون نانولیپوزومها                       |
| ۶۵ | ۴-۳-۲-کارایی کپسولاسیون نانومولسیونها                       |
| ۶۶ | ۴-۴-بررسی پایداری اندازه ذرات نانوحاملها                    |
| ۶۶ | ۴-۴-۱-بررسی پایداری اندازه ذرات نانولیپوزومها               |
| ۶۸ | ۴-۴-۲-بررسی پایداری نانو ذرات نانومولسیونها                 |

- ۴-۵- مورفولوژی نانو ذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی ..... ۶۹
- ۴-۶- محاسبه خاصیت آنتی اکسیدانی ..... ۷۰
- ۴-۶-۱- نتایج آنتی اکسیدانی اسانس مریم گلی سهندیکا ..... ۷۱
- ۴-۶-۲- نتایج آنتی اکسیدانی نانولیپوزوم حاوی اسانس مریم گلی سهندیکا ..... ۷۲
- ۴-۶-۳- نتایج آنتی اکسیدانی نانوامولسیون حاوی اسانس مریم گلی سهندیکا ..... ۷۳
- ۴-۷- بررسی خواص ضد میکروبی نانو حاملهای حاوی اسانس مریم گلی سهندیکا ..... ۷۶
- ۵- نتیجه گیری و پیشنهادات ..... ۸۱
- ۶- منابع و مآخذ ..... ۸۶

## فهرست جدول‌ها

صفحه

عنوان

---

|          |                                                                     |    |
|----------|---------------------------------------------------------------------|----|
| جدول ۱-۴ | شناسایی ترکیبات اسانس                                               | ۵۷ |
| جدول ۲-۴ | تأثیر تغییر غلظت لستین به کلسترول بر توزیع اندازه ذرات نانولیپوزومی | ۵۹ |
| جدول ۳-۴ | توزیع اندازه ذرات نانوامولسیون‌ها در HLBهای مختلف                   | ۶۱ |
| جدول ۴-۴ | نتایج حاصل از جذب و درصد بازدارندگی نمونه‌های اسانس مریم‌گلی        | ۷۱ |
| جدول ۵-۴ | نتایج حاصل از جذب و درصد بازدارندگی نمونه‌های نانولیپوزوم           | ۷۲ |
| جدول ۶-۴ | نتایج حاصل از جذب و درصد بازدارندگی نمونه‌های نانوامولسیون          | ۷۳ |
| جدول ۷-۴ | حداقل غلظت کشندگی و حداقل غلظت بازدارندگی نانوحامل‌ها               | ۷۶ |

## فهرست شکل‌ها

| عنوان                                                          | صفحه |
|----------------------------------------------------------------|------|
| شکل ۱-۱ نقش محافظتی کپسول از ماده زیست فعال .....              | ۱۲   |
| شکل ۲-۱ نمایی شماتیک از ساختار فسفولیپیدها .....               | ۱۶   |
| شکل ۳-۱ نمای شماتیک لیپوزوم .....                              | ۱۸   |
| شکل ۴-۱ نمایی از انکپسولاسیون ترکیبات آبدوست و چربی دوست ..... | ۱۹   |
| شکل ۵-۱ طرح شماتیکی نانوامولسیون .....                         | ۲۳   |
| شکل ۶-۱ انواع نانو امولسیون .....                              | ۲۴   |
| شکل ۷-۱ هموژنایزر فشار بالا .....                              | ۲۶   |
| شکل ۸-۱ میکروفلودایزر .....                                    | ۲۶   |
| شکل ۹-۱ پروب سونیکاتور .....                                   | ۲۷   |
| شکل ۱۰-۱ تولید خودبخودی امولسیون .....                         | ۲۸   |
| شکل ۱۱-۱ روش برگشت فاز دمایی .....                             | ۲۹   |
| شکل ۱۲-۱ روش کاتاستروفیک .....                                 | ۳۰   |
| شکل ۱۳-۱ تصویر <i>Salvia sahandica</i> .....                   | ۳۱   |
| شکل ۱-۳ تصویری از دستگاه کلونجر و اسانس مریم گلی .....         | ۴۲   |
| شکل ۲-۳ شمای تولید لیپوزوم به روش هیدراسیون لایه نازک .....    | ۴۴   |
| شکل ۳-۳ شمای تولید نانوامولسیون به روش از امواج فراصوت .....   | ۴۵   |
| شکل ۴-۳ دستگاه اندازه‌گیری اندازه ذرات .....                   | ۴۶   |
| شکل ۵-۳ دستگاه اسپکتروفتومتر نور مرئی .....                    | ۴۷   |
| شکل ۶-۳ دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) .....            | ۴۸   |

- شکل ۴-۱ کروماتوگرام GC-MS اسانس مریم گلی ..... ۵۶
- شکل ۴-۲ تأثیر تغییر غلظت لستین به کلسترول بر اندازه ذرات نانولیپوزومی ..... ۵۸
- شکل ۴-۳ اندازه ذره‌های نانوامولسیونها در HLB‌های مختلف ..... ۶۱
- شکل ۴-۴ منحنی استاندارد اسانس مریم گلی با اسپکتوفتومتری ..... ۶۳
- شکل ۴-۵ تأثیر تغییر غلظت لستین-کلسترول بر کارایی درون پوشانی ..... ۶۴
- شکل ۴-۶ تأثیر تغییر HLB‌های مختلف بر کارایی درون پوشانی ..... ۶۵
- شکل ۴-۷ تأثیر زمان نگهداری بر اندازه ذرات در غلظتهای مختلف ..... ۶۶
- شکل ۴-۸ تأثیر زمان نگهداری بر اندازه ذرات در HLB‌های مختلف ..... ۶۸
- شکل ۴-۹ تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از نانوامولسیون ..... ۷۰
- شکل ۴-۱۰ تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از نانولیپوزوم ..... ۷۰
- شکل ۴-۱۱ درصد بازدارندگی اسانس مریم گلی در غلظتهای مختلف ..... ۷۲
- شکل ۴-۱۲ درصد بازدارندگی نانولیپوزوم ..... ۷۳
- شکل ۴-۱۳ درصد بازدارندگی نانوامولسیون ..... ۷۴
- شکل ۴-۱۴ نتایج تست آنتی اکسیدانی ..... ۷۵

## مقدمه

متابولیت‌های ثانویه استخراج شده از گیاهان دارویی، جزء مهمترین ترکیبات زیست فعال هستند که می‌توانند در تولید مواد غذایی و نوشیدنی‌ها مورد استفاده قرار بگیرند. این ترکیبات بخش مهمی از رژیم غذایی انسان‌ها را تشکیل داده و باعث کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی، دیابت، پوکی استخوان و سرطان می‌شوند. امروزه به دلیل عوارض نگهدارنده‌های شیمیایی از جمله احتمال سرطانزایی، تمایل به سمت مصرف نگهدارنده‌های طبیعی افزایش یافته است. اسانس‌ها از متابولیت‌های ثانویه گیاهان بوده و یکی از مهمترین ترکیبات ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی هستند که می‌توانند در تولید مواد غذایی فراسودمند و یا جلوگیری از فساد، اکسیداسیون و افزایش ماندگاری مواد غذایی مورد استفاده قرار بگیرند. مریم‌گلی سهندیکا یکی از گیاهان دارویی بومی ایران است که در نواحی آذربایجان غربی به وفور یافت می‌شود اسانس آن دارای اثرات بیولوژیکی فراوان می‌باشد. وجود ترکیبات شیمیایی مختلف به خصوص ۱/۸ سینئول در اسانس آن باعث شده در درمان بیماری‌های مختلف (برطرف کننده‌ی علایم سرماخوردگی، خوشبوکننده دهان، آرامش بخش و تسکین دهنده‌ی دردهای عصبی، ضد نفخ، رفع دل پیچه، درد شکم) و همچنین به عنوان طعم دهنده و نگهدارنده در بسیاری از مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرند. اما استفاده از اسانس‌ها در مواد غذایی به علت پایداری و حلالیت پایین و طعم نامطلوب آن‌ها با محدودیت‌هایی همراه هستند. بنابراین تلاش‌های‌هایی برای یافتن روش‌های جدیدی که باعث کاهش مقدار اسانس مصرفی لازم به گونه‌ای که هم خواص بیولوژیکی (ضدمیکروبی، ضد قارچی، آنتی‌اکسیدانی) آن‌ها حفظ شود، هم طعم و مزه غذا مطلوب باشد صورت گرفته است از جمله این روش‌ها درون پوشانی (انکپسوله کردن) اسانس‌های روغنی و ترکیبات آن‌ها می‌باشد. انکپسولاسیون (درون پوشانی) فرآیند به دام انداختن اجزا زیست فعال درون یک ماده حامل است که در نتیجه باعث افزایش ثبات ماده هسته، جلوگیری از فرار و محافظت آن در برابر واکنش‌های تخریبی می‌شود. از انواع حامل‌های لیپیدی که برای درون‌پوشانی مواد زیست فعال و غذا-دارو استفاده می‌شود،

نانوامولسیون‌ها و نانولیپوزوم‌ها می‌باشد. نانوامولسیون‌ها سیستم‌های کلوئیدی با میانگین شعاع ذرات پراکنده nm ۱۰-۱۰۰ هستند. نانوامولسیون‌ها در مقایسه با امولسیون‌ها (ماکرو امولسیون‌ها) مزایای متعددی از جمله: دسترسی زیستی و حلالیت بالاتر به علت نسبت سطح به حجم بالاتر قطرات، شفافیت بالاتر به علت کوچکتر بودن اندازه ذرات از طول موج نور، پایداری فیزیکی و سنتیکی بالاتر به علت تفکیک گرانرش، انبوهش و هم‌امیختن کمتر قطرات دارند، که به واسطه این مزایا توانایی کپسوله کردن طیف وسیعی از ترکیبات چربی‌دوست و آب‌دوست را دارند. لیپوزوم‌ها نیز وزیکول‌های کلوئیدی متشکل از لیپیدهای قطبی به ویژه فسفولیپیدها بوده که در حضور مولکول‌های آب ساختارهای کروی دو لایه‌ای را ایجاد می‌کنند. این ترکیبات به دلیل خاصیت آمفی‌فیلیک توانایی کپسوله کردن طیف وسیعی از ترکیبات آب‌دوست، چربی‌دوست و آمفی‌فیل را دارند. لیپوزوم‌ها و نانولیپوزوم‌ها اگرچه خصوصیات ساختاری، شیمیایی و ترمودینامیک یکسان دارند اما نانولیپوزوم‌ها در مقایسه با لیپوزوم‌ها، به علت اندازه ذرات کوچکتر، ناحیه سطحی بیشتری را فراهم می‌کنند و باعث افزایش حلالیت، بهبود قابلیت دسترسی زیستی و رهایش کنترل شده و تحویل دقیق‌تر مواد انکپسوله شده به نواحی هدف می‌شوند همچنین دارای پایداری کلوئیدی بالاتر بوده و کدورت کمتری ایجاد می‌کنند.

با توجه به اهمیت اسانس‌های گیاهان دارویی در تولید مواد غذایی فراسودمند و گسترش محصولات مفید جدید در صنایع غذایی و ضمن اینکه بر اساس کار کتابخانه‌ای ما، تاکنون پژوهشی در زمینه تولید نانولیپوزوم و نانوامولسیون حاوی اسانس مریم‌گلی سهندیکا صورت نگرفته است، هدف از این پژوهش، تولید نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس مریم‌گلی به روش هیدراسیون لایه نازک-سونیکاسیون و نانوامولسیون حاوی اسانس به روش اولتراسوند با هدف بررسی خواص ضد میکروبی، فیزیکوشیمیایی و آنتی‌اکسیدانی آنها می‌باشد.

فصل اول

کلیات

## ۱-۱- اهمیت گیاهان دارویی

در سال‌های اخیر به علت سرعت و حجم زیاد مبادلات علمی، بر دانش و دانایی عمومی اضافه گردیده و توجه انسان‌ها به حفظ رعایت تندرستی و پیشگیری از بیماری‌ها در حال رشد است. بخشی از این رشد به جهت استفاده از روش‌های طب سنتی و تلفیق آن با طب مدرن است و در این راستا بیشتر نگاه‌ها متوجه مصرف گیاهان دارویی است. در نتیجه، تولید و مصرف داروهای با منشا گیاهی در سطح جهانی رو به افزایش است و بر سطح زیر کشت گیاهان دارویی سال به سال افزوده می‌گردد (متین، ۱۳۸۳). استفاده از گیاهان دارویی و فراورده‌های آن‌ها نه تنها در کشورهای در حال توسعه، بلکه در کشورهای پیشرفته نیز موارد استفاده فراوان دارند و روز به روز بر مصرف آن‌ها افزوده می‌شود (شمس اردکانی و همگاران، ۱۳۸۷).

در گیاهان ترکیبات شیمیایی زیادی مانند متابولیت‌های ثانویه وجود دارد که دارای خواص زیست فعالی و بیوشیمیایی بسیاری هستند که این ترکیبات ثانویه در صنایع مختلف دارویی، شیمیایی، آرایشی و بخصوص صنعت غذا کاربرد دارند (Gourine et al., 2010). وجود ترکیبات ضد میکروبی در عصاره و اسانس گیاهان دارویی، در سال‌های اخیر توجه ویژه‌ای را در تحقیقات به خود جلب کرده است. از سوی دیگر نگهداری غذا به صورت سالم و با کیفیت بالا در طول مراحل تولید، انبارداری و مصرف از جمله دغدغه‌های اصلی متخصصان صنایع غذایی و تغذیه می‌باشد. بنابراین می‌توان با پیوند دادن گیاهان دارویی و خواص سلامتی بخش آن‌ها با صنعت غذا نه تنها سلامت مصرف کننده را تضمین کرد؛ بلکه با وجود ترکیبات معطر در ترکیبات ثانویه گیاه، باعث بهبود عطر و طعم غذا و رضایتمندی مصرف کننده شد.

### ۱-۱-۱- عصاره

عصاره از دیدگاه علم داروسازی، شامل اجزای فعال دارویی جدا شده از گیاه یا بافت جانوری، به وسیله حلال مناسب طی یک فرایند استخراج استاندارد است. عصاره‌ها که به کمک حلال مناسب طی

عملیات خیساندن، پرکولاسیون و یا عملیات مناسب دیگر تهیه می‌شوند یا خودشان به تنهایی به عنوان دارو مصرف می‌شوند یا این که بخشی از یک دارو را تشکیل می‌دهند (مومنی و همکاران، ۱۳۷۹).

### ۱-۱-۱- ارزیابی عصاره‌های گیاهی

عصاره باید شفاف، عاری از ذرات خارجی، بدون کدورت و رسوب باشد. رنگ عصاره باید متناسب با گیاه و مواد موجود در آن باشد. برای مثال می‌توان رنگ قرمز برای کاروتنوئیدها هویج را نام برد. بوی استنشام شده از عصاره باید مشابه بوی گیاه مربوطه باشد (مومنی و همکاران، ۱۳۷۹).

### ۱-۱-۲- اسانس‌ها

اسانس‌ها ترکیباتی فرار، معطر و پیچیده‌ای هستند که با بوی قوی و معطرشان شناخته می‌شوند. اسانس‌ها متابولیت‌های ثانویه گیاهان هستند که شامل مخلوط پیچیده‌ای از مواد شیمیایی آلی مثل ترپینوئیدها، آلدئیدها، الکل‌ها، استرها، ستن‌ها و غیره می‌باشند. برای اولین بار در اواسط قرون وسطی توسط اعراب از طریق بخار یا تقطیر با آب بدست آمده‌اند. آن‌ها از اسانس‌ها به عنوان ضد عفونی کننده (به عنوان مثال عوامل ضد قارچ، ضد باکتری و ضد ویروس)، برای خوشبو کردن اجساد در مومیایی کردن، ضد درد، ضد اسپاسم و آرام بخش استفاده می‌کردند. تا به امروز در این ویژگی‌های اسانس‌ها تغییر ایجاد نشده است، فقط مکانیسم عمل برخی شناخته شده است. اسانس‌ها توسط اندام‌های مختلف یک گیاه می‌تواند بدست آید. بوی آن‌ها بدلیل ترکیبات مشخص هر گیاه بسیار متفاوت می‌باشد و به طور محسوسی در معرض هوا تغییر می‌کند. روش‌های مختلفی برای استخراج اسانس وجود دارد مانند استفاده از دی‌اکسید کربن مایع یا امواج مایکروویو، ولی عمدتاً به کارگیری از روش تقطیر با آب جوش یا بخار داغ در فشار بالا یا پایین تهیه می‌شوند (Bakkali et al., 2008).

### ۱-۱-۲-۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی اسانس‌ها

اسانس‌ها به طور کلی مایعات فرار، شبیه روغن‌ها با عطری کاملاً اختصاصی هستند و در بسیاری از گیاهان تولیدات فرعی متابولیسم ثانوی را تشکیل می‌دهند، که از نظر شیمیایی حاوی حلقه‌های

آروماتیک یا بنزنی و به طور عمده متشکل از مواد فنلی یا اکسیژن دار می‌باشند. به علت تبخیر در مجاورت هوا در حرارت عادی، آن‌ها را روغن‌های فرار یا اتری یا اسانس‌های روغنی می‌نامند. اسانس‌ها در الکل محلول و به میزان کمی در آب حل می‌شوند. ساختمان شیمیایی آن‌ها مخلوطی از استرها، آلدئیدها، الکل‌ها، ستن‌ها و ترپنوئیدها می‌باشند. اگر چه ترکیب شیمیایی اسانس‌ها ممکن است متفاوت باشند اما در برخی از خواص فیزیکی مشترک می‌باشند، اسانس‌ها دارای بوی مشخص و ضریب شکست قوی بوده و اغلب بر روی نور پلاریزه موثر می‌باشند، بسته به قدرتی که در چرخاندن نور پلاریزه دارند می‌توان آن‌ها را شناسایی کرد. به رغم پیچیدگی ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها که در غالب موارد به ده‌ها جزء می‌رسد (بقائیان و همکاران ۱۳۷۹). ترپن‌ها با فرمول  $(C_5H_8)_n$  ترکیب غالب یا ماده موثره اکثر اسانس‌های گیاهی می‌باشند. ترپن‌ها خود به چندین گروه مونوترپن‌ها ( $C_{10}H_{16}$ )، سزکوئی ترپن‌ها ( $C_{15}H_{24}$ )، دی ترپن‌ها ( $C_{20}H_{32}$ )، تری ترپن‌ها ( $C_{30}H_{48}$ )، تترا ترپن‌ها ( $C_{40}H_{64}$ ) تقسیم می‌شوند. ترکیبات مهمی چون تیمول و کارواکرول و منتول جزء فنول‌های مونوترپنی محسوب می‌شوند. ساختمان شیمیایی ترکیبات اخیر مرکب از ۱۰ کربن و ماهیت ضد میکروبی آن‌ها به سبب وجود گروه‌های هیدروکسیل در ساختمان شیمیایی آن‌هاست. در خصوص ترکیبات غیر فنولی مانند لیمونن و سیترال فعالیت‌های ضد میکروبی آن‌ها به سبب وجود گروه آلکیل<sup>۱</sup> است (بقائیان و همکاران ۱۳۷۹).

### ۱-۲-۲- کاربرد اسانس‌ها

بیشتر اسانس‌ها به طور مستقیم به عنوان مواد اولیه در تولید ترکیب‌های طعم دار و خوشبو کننده‌ها استفاده می‌شوند. اسانس‌ها و ترکیب‌های آن‌ها به طور مستقل در صنایع مختلف، از جمله در صنعت عطرسازی، صنایع بهداشتی، صنایع چرم‌سازی، لاستیک سازی، خوشبوکننده‌های صنعتی، لوازم التحریر و از همه مهم‌تر در صنعت داروسازی و غذایی کاربرد دارند (بقائیان و همکاران ۱۳۷۹).

<sup>1</sup> Alkyl

### ۱-۲-۳- خواص بیولوژیکی اسانس‌ها

#### ۱-۲-۳-۱- خاصیت ضد میکروبی

اسانس‌ها به علت تجمعی از ترکیبات ضد میکروبی مهم در آنها ضد میکروب‌های قوی هستند. حتی ترکیبات با مقدار ناچیز نیز می‌توانند نقش مهمی در خاصیت ضد میکروبی داشته باشند (Apak, et al., 2007). اسانس‌ها و ترکیبات آنها به طور گسترده به عنوان عوامل ضد میکروبی شهرت دارند و برای هدف‌های گوناگونی مانند نگهداری غذاها، مکمل‌های دارویی و درمان مورد استفاده قرار می‌گیرند (Arvouet, et al., 1994). گیاهان معطر همچنین ممانعتی در برابر باکتری، قارچ و مخمر نشان می‌دهند و بسیاری از خواص آنها به خاطر اسانسی است که به وسیله متابولیت‌های ثانویه آنها تولید می‌شود. اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهان گونه‌های گوناگون قادر به کنترل میکروارگانیسم‌هایی در رابطه با پوست، پوسیدگی دندان و ضایعات غذایی شامل باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی هستند (Awuah, et al., 1989). خاصیت ضد میکروبی اسانس‌ها، با به کارگیری میکروارگانیسم‌های مختلف از جمله میکروارگانیسم‌های مسموم کننده غذایی، قارچ‌ها، مخمرها و ویروس‌های گیاهی و جانوری اثبات شده است (محمودی و همکاران، ۱۳۸۱). تحقیقات زیادی انجام شده تا معلوم شود کدام یک از گروه‌های عاملی یا ساختار فضایی ترکیبات سازنده اسانس‌ها، مسئول خاصیت زیست‌کشی آنها هستند. در سری-های همولوگ ترکیبات آلیفاتیک، طول زنجیره در تعیین میزان فعالیت ضد میکروبی نقش دارد. با وجود اطلاعات زیادی که درباره میزان فعالیت گروه‌های عاملی وجود دارد، درباره مکانیسم عمل ترکیب آنها اطلاعات چندانی در دست نیست (Buckle, et al., 2003).

#### ۱-۲-۳-۱- خاصیت ضد قارچی

بررسی‌ها نشان دادند که تعداد زیادی از اسانس‌ها دارای خاصیت ضد قارچی هستند (Berker, et al., 2007). گیاهان منبع وسیعی از مولکول‌های زیست فعال با پتانسیل درمانی می‌باشند. اگرچه داروهای مؤثری در مقابل مخمرها و قارچ‌های پوستی وجود دارند، عصاره‌های گیاهی و همچنین اسانس‌ها

به علت خاصیت ضد قارچی آن‌ها مورد توجه هستند (Dipasqua, et al., 2005). بعضی از اسانس‌ها در غلظت بسیار کم، قادرند از رشد قارچ‌ها در محیط کشت جلوگیری نمایند (Buckle, et al., 2003). توان قارچ کشی اسانس‌ها تحت تأثیر عواملی نظیر دما و غلظت ماده تزریقی قرار نمی‌گیرد (Dube, et al., 1989).

### ۱-۱-۲-۳- خاصیت آنتی‌اکسیدانی

به سه دلیل علاقه در حال رشدی برای جستجو و استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی وجود دارد، (۱) مطالعات کلینیکی متعددی نشان می‌دهند که مصرف میوه‌ها و سبزیجات باعث کاهش ریسک مبتلا شدن به بیماری‌هایی نظیر سرطان، اختلالات قلبی-عروقی و دیابت می‌شوند، (۲) تأثیرات مضر آنتی-اکسیدان‌های سنتزی در غذاها و نوشیدنی‌ها، (۳) درک عمومی این موضوع که آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مربوط به رژیم غذایی، سالم‌تر از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی می‌باشند. در نتیجه علاقه زیادی برای استفاده از چاشنی‌ها و گیاهان دارویی معطر به عنوان منبعی از آنتی‌اکسیدان‌های قابل جایگزین با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی وجود دارد. یک ماده موجود در گیاهان معطر و چاشنی‌ها که ممکن است به عنوان آنتی-اکسیدان عمل کند، اسانس می‌باشد. در کل اسانس‌ها از بیش از ۷۰ ترکیب ساخته شده‌اند که عمده این ترکیبات عبارتند از پلی فنل‌ها، ترپن‌ها و آلدئیدها (Gören, et al., 2002). گزارش شده که خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان معطر به علت حضور گروه‌های هیدروکسیل در ترکیبات فنلی آن‌هاست (Houlihan, et al., 1985). از قدیم الایام برای جلوگیری از تخریب مواد غذایی که به دلیل اکسیداسیون چربی‌های غیر اشباع و سایر عوامل روی می‌دهد، آنتی‌اکسیدان‌ها را به مواد غذایی می‌افزوده‌اند. امروزه تمایل بر این است که به جای آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی، از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی نظیر اسانس‌ها که جزء اصلی سازنده شان مواد فنلی می‌باشد استفاده شود، نظیر اسانس مریم گلی، آویشن، مرزه و غیره (Hubschmann et al., 2000).

#### ۱-۱-۲-۴- محدودیت استفاده از اسانس‌های گیاهی در مواد غذایی

در صنایع غذایی، ترکیبات زیست فعال در ایجاد عطر و طعم و ارزش تغذیه ای محصولات غذایی حائز اهمیت هستند، یکی از این ترکیبات زیست فعال اسانس‌های روغنی و ترکیبات آن‌ها می‌باشد، به طور ویژه برخی از اسانس‌ها فعالیت ضد میکروبی و ضد قارچی دارند که اساس کاربرد آن‌ها به عنوان یک افزودنی ضد میکروبی طبیعی در تولید مواد غذایی و حفظ گسترش عمر مفید محصولات غذایی شکل گرفته است. اما محدودیت‌هایی نیز در استفاده از اسانس‌ها وجود دارد. در حالی که خیلی از غذاها فاز آبی دارند، روغن‌های اسانسی و ترکیبات آن‌ها هیدروفوبیک هستند، بنابراین وقتی در سیستم‌های غذایی از آن‌ها استفاده می‌شود اثر کم‌تری نسبت به زمانی که از آن‌ها در محیط کشت آزمایشگاه استفاده می‌شوند، دارند. چون این روغن‌ها اساساً ترکیبات هیدروفوبیک هستند استفاده از آن‌ها به عنوان نگهدارنده محدود به تولیدات غذایی چرب می‌شود. به دلیل اینکه میکروارگانیسم‌ها در فاز آبی سیستم‌های غذایی قرار دارند، سرعت انتقال جرم ترکیبات فعال به میکروارگانیسم‌ها کم است و گفته می‌شود که این مسئله دلیلی بر فعالیت پایین این ترکیبات در مواد غذایی می‌باشد و می‌تواند کاربرد موثر اسانس را در غذا محدود کند. در هر حال بنا به دلایلی که ذکر شد، غلظت‌های بالاتری از اسانس‌ها نسبت به مقدار اسانس مصرفی در محیط کشت لازم است تا مانع رشد میکروارگانیسم‌های پاتوژن در مواد غذایی شوند. غلظت‌های بالای اسانس در مواد غذایی باعث کاهش مقبولیت غذا از لحاظ طعم و مزه می‌شوند و یک عامل محدود کننده مهم در سر راه استفاده از اسانس به عنوان ضد میکروبی می‌باشند. بنابراین تلاش‌هایی برای یافتن روش‌های جدیدی که باعث کاهش مقدار اسانس مصرفی لازم به گونه‌ای که هم خواص ضد میکروبی آن‌ها حفظ شود، هم طعم و مزه غذا مطلوب باشد صورت گرفته است از جمله این روش‌ها انکپسوله کردن اسانس‌های روغنی و ترکیبات آن‌ها در بازداری از رشد میکروارگانیسم‌ها می‌باشد

(Fadaei et al., 2010).

## ۱-۲- نانوتکنولوژی در صنایع غذایی

نانوتکنولوژی یک پدیده تکنولوژیکی است که باعث ایجاد دگرگونی بسیاری از صنایع در جهان شده است. این تکنولوژی با تولید، فرایند و کاربرد مواد در اندازه‌های کمتر از ۱۰۰ نانومتر سروکار دارد. کاهش اندازه ذرات به محدوده نانو باعث افزایش نسبت سطح به حجم می‌شود که در نتیجه، باعث فعال شدن بیشتر ذرات و تغییرات مکانیکی، الکتریکی و نوری می‌شود. این تغییرات و خصوصیات، کاربردهای جدیدی را در زمینه‌های مختلف پیشنهاد می‌کند. نانوتکنولوژی در مواد غذایی می‌تواند از مرحله کشت تا مصرف به کار رود. همچنین در تولید محصولات جدید، فرایند و نگهداری و کاربرد آن‌ها دارد. با استفاده از این تکنولوژی، خصوصیات نظیر انحلال‌پذیری در آب، مقاومت حرارتی و کارایی زیستی، و پایداری میکروبی ترکیبات را می‌توان بهبود بخشید (Ezhilarasi et al., 2013, Huang et al., 2010).

در حال حاضر، کاربرد عمده نانوتکنولوژی در صنعت غذا را می‌توان در سه دسته زیر قرار داد:

- ✓ تولید نانوکامپوزیت‌ها و بسته بندی‌های فعال در صنعت بسته بندی؛
- ✓ نانوانکپسولاسیون (درون‌پوشانی) اجزای زیست‌فعال به منظور تولید فرآورده‌های غذایی جدید و فراسودمند؛
- ✓ تولید نانوبیوسنسورها به منظور افزایش ایمنی مواد غذایی (Ezhilarasi et al., 2013).

## ۱-۳- انکپسولاسیون در صنایع غذایی

انکپسولاسیون فرآیندی است که عوامل فعال زیستی را درون ذرات ریز به دام می‌اندازد و دارای مزایای مختلف زیر در صنایع غذایی و تغذیه است:

- ایجاد تغییرات و تنوع طعم و بو در محصولات غذایی؛
- پوشش دادن بوهای بد و ناخوشایند و جلوگیری از بدطعمی و بدبویی؛
- افزایش حلالیت مواد زیست‌فعال آبگریز در مواد غذایی آبکی؛

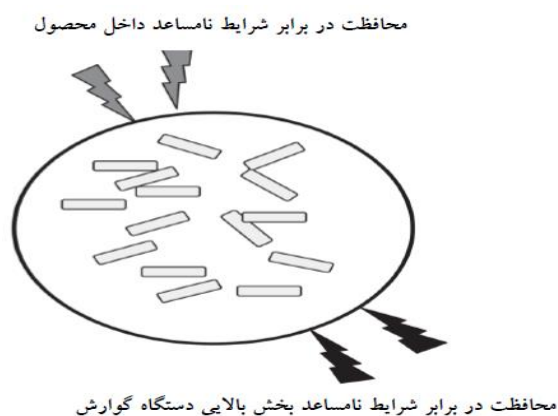
- افزایش پایداری مواد حساس در برابر عوامل محیطی (حرارت، اسید، قلیا، آنزیم‌ها، اکسیژن، فلزات سنگین)؛
- افزایش جذب و فعالیت زیستی؛
- رهایش کنترل شده اجزای فعال در مواد غذایی و دستگاه گوارش؛
- تبدیل فرمولاسیون‌های مایع به جامد و در نتیجه راحتی کار و حمل و نقل؛
- تثبیت آنزیم‌ها یا سلول‌های مورد استفاده در تولید مواد غذایی (Nedovic et al., 2011).

### ۱-۳-۱ نانوانکپسولاسیون در صنایع غذایی

نانوتکنولوژی به تولید و به‌کارگیری مواد، دستگاه‌ها و سیستم‌ها در مقیاس نانو (کوچک‌تر از ۱۰۰ نانومتر) گفته می‌شود. در سال‌های اخیر نانوتکنولوژی در صنایع غذایی کاربردهای فراوانی پیدا کرده است (Fathi and Mohebbi, 2010). از کاربردهای این تکنولوژی، نانوانکپسولاسیون و تحویل و حمل ترکیبات زیست‌فعال در صنایع غذایی، داروسازی و لوازم آرایشی-بهداشتی است (Sagalowicz and Leser., 2010, Farokhzad and Langer., 2009, Müller et al., 2007, Liu et al., 2007). سیستم‌های تحویلی سیستم‌هایی هستند که مواد زیست‌فعال، جهت کنترل رهایش ماده زیست‌فعال، داخل آن به دام می‌افتد. نانوحامل‌ها از ترکیبات زیست‌فعال در برابر عوامل نامساعد محیطی مثل اکسیداسیون، احیای آنزیمی و pH محافظت می‌کنند (Ghosh et al., 2009). نانو انکپسولاسیون، تکنولوژی کپسوله کردن ذرات زیست‌فعال در اندازه‌هایی با مقیاس نانو می‌باشد (Lopez-Rubio et al., 2006). نانوحامل‌ها باعث افزایش سطح، حلالیت و دسترسی زیستی ترکیبات زیست‌فعال شده و در مقایسه با حامل‌های در سطح میکرو، رهایش و رسیدن به نقطه هدف اجزاء غذایی انکپسوله شده را بهتر کنترل می‌کند (Weiss et al., 2008). معمولاً، سیستم‌های نانوحامل غذایی بر پایه کربوهیدرات، پروتئین یا لیپید هستند. نانوحامل‌های بر پایه لیپید قابلیت تولید صنعتی دارند، ارزان هستند و کارایی

انکپسولاسیون بالاتر و سمیت کمتری دارند. از جمله مزایای نانوانکپسولاسیون نسبت به میکروانکپسولاسیون می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

- پخش یکنواخت‌تر ذرات در ماتریکس غذایی؛
- افزایش بیشتر دسترسی زیستی و جذب مواد زیست‌فعال؛
- افزایش پایداری کلوئیدی سیستم‌های حامل مختلف؛
- حلالیت بالاتر در مواد غذایی آبی،
- تشکیل محلول‌های شفاف زیست‌فعال به علت شکست کمتر نور.



شکل ۱-۱ نقش محافظتی کپسول از ماده زیست‌فعال در برابر شرایط نامساعد محصول غذایی سیستم

گوارشی (de Vos et al., 2010).

## ۱-۴- سیستم‌های نانو حامل

سیستم‌های حامل بسیار متفاوتی برای انتقال و حفظ مواد زیست‌فعال وجود دارد که مهمترین آنها نانو حامل‌های لیپیدی هستند که شامل نانو ذرات لیپیدی جامد (SLNs)<sup>۱</sup>، حامل‌های لیپیدی نانو ساختاری (NLCs)<sup>۲</sup>، نانوامولسیون‌ها<sup>۳</sup> و همچنین نانولیپوزوم<sup>۴</sup> می‌باشند (Fathi et al, 2012).

### ۱-۴-۱- نانو ذرات لیپیدی جامد (SLNs)

این ساختارها دارای حالت جامد می‌باشند و از کریستالیزاسیون امولسیون‌های روغن در آب در سطح نانو و میکرو حاصل می‌شوند. این ذرات یک بستر لیپیدی تشکیل می‌دهند که حاوی هسته لیپیدی جامد و ترکیبات زیست‌فعال می‌باشد. ترکیباتی مثل تری‌گلیسریدها، اسیدهای چرب، موم‌ها، استروئیدها به تنهایی یا با ترکیب چند لیپید باهم در ساخت این نانوذرات استفاده می‌شوند. این ساختارها به وسیله یک یا چند سورفاکتانت تثبیت می‌شوند (Weiss et al., 2008). از محدودیت‌های آن می‌توان به محدودیت بارگذاری به علت حل شدن مواد دارویی در لیپید جامد و پدیده دفع دارو موقع نگهداری (زمانی که لیپید به شکل  $\beta$  کریستاله می‌شود) اشاره کرد. همچنین تغلیظ ذرات در دیسپرسیون‌های ۱٪ تا ۳۰٪ انجام می‌گیرد. نانوذرات لیپیدی جامد، ذرات دارای پوسته لیپیدی جامدی هستند و در مقایسه با نانوامولسیون‌ها و لیپوزوم‌ها دارای مزایایی هستند (Saupe et al., 2006, Mehnert and Mäder., 2001, Müller and Dingler., 1998) که می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

- پایداری فیزیکی بالا؛
- کارایی انکپسولاسیون بالا؛

<sup>۱</sup> Solid Lipid Nanoparticles

<sup>۲</sup> Nanostructured Lipid Carriers

<sup>۳</sup> Nanoemulsion

<sup>۴</sup> Nanoliposomes

- عدم استفاده از حلال‌های آلی در تولید آن؛
- امکان تولید در مقیاس بالا و استریلیزاسیون؛
- ایجاد انعطاف بالا در کنترل پروفایل رهایش به دلیل ماتریکس جامد؛
- تحلیل ساختاری آهسته‌تر و در نتیجه افزایش زمان رهایش مواد زیست‌فعال؛
- محافظت از مواد زیست‌فعال حساس به نور، مواد شیمیایی و اکسیداسیون.

#### ۱-۴-۲- حامل‌های لیپیدی نانو ساختار (NLCs)

NLC ها در سال ۱۹۹۰ جهت رفع محدودیت‌های SLN ها تولید شده‌اند و استفاده از لیپید مایع در آنها، از پیشرفت کریستالیزاسیون به سمت تولید کریستال‌های کاملی که باعث دفع و آزادسازی مواد غذا-دارو می‌شوند جلوگیری می‌کنند. برخلاف SLN، NLC ها از ماتریکس جامدی تشکیل یافته‌اند که ذرات چربی در مقیاس نانو لیپید مایع را در داخل خود جای داده‌اند، ولی از لحاظ روش‌های تولید، فرمولاسیون و کاربرد همانند SLN ها می‌باشند. NLC، احتمالاً<sup>۱</sup> برای انتقال مواد زیست‌فعال چربی‌دوست (با پایداری شیمیایی کم و دسترسی زیستی پایین) و مواد چربی‌دوست دیگر داخل مواد غذایی و یا بر پایه آب و نوشیدنی‌های شفاف مفید خواهند بود و متشکل از فاز لیپیدی جامد (چربی)، فاز لیپیدی مایع (روغن)، عوامل فعال سطحی<sup>۱</sup> و آب می‌باشند که در آن لیپید جامد، لیپید مایع را در بر می‌گیرد. وجود روغن در شبکه چربی NLC، باعث افزایش ظرفیت بارگیری ماده فعال می‌شود و از آنجایی که ذرات روغن در داخل ماتریکس چربی قرار گرفته‌اند امکان کنترل رهایش را نیز فراهم می‌کنند (Varshosaz et al., 2010). NLC ها کارایی انکپسولاسیون، بارگیری و پایداری فیزیکی را افزایش می‌دهند و همچنین انتخاب ارزشمندی برای بهبود پایداری شیمیایی، زیست‌فراهمی و رهاسازی کنترل

<sup>۱</sup> - Surfactants

شده ترکیبات عملگرای چربی دوست<sup>۱</sup> در مواد غذایی هستند (Tamjidi et al., 2013). NLC ها دارای ساختار نیمه آمورف- نیمه کریستالی بوده و ممکن است حاوی روغن زیاد یا کم باشند. این حامل ها در مقایسه با سایر حامل ها مزایایی دارند که مهمترین آنها عبارتند از:

- پایداری کلونیدی در برابر تفکیک گرانشی به علت چگالی بالاتر لیپیدهای جامد؛
- پایداری شیمیایی بالاتر به علت پایداری بالاتر لیپیدهای جامد؛
- امکان استریلیزاسیون؛
- سرعت رهایش کمتر ماده فعال به علت ساختار فشرده تر؛
- عدم استفاده از حلال های آلی در تولید آن (برخلاف برخی از لیپوزوم ها و امولسیون ها)؛
- کریستالیزاسیون کمتر نسبت به SLN و در نتیجه حفظ بهتر ماده فعال؛
- بالا بودن ظرفیت بارگذاری (کارایی انکپسولاسیون) بهبود تحویل مواد مورد نظر در نقطه هدف به علت دوفازه بودن NLC (Gonnet et al., 2010, Fathi et al., 2012).

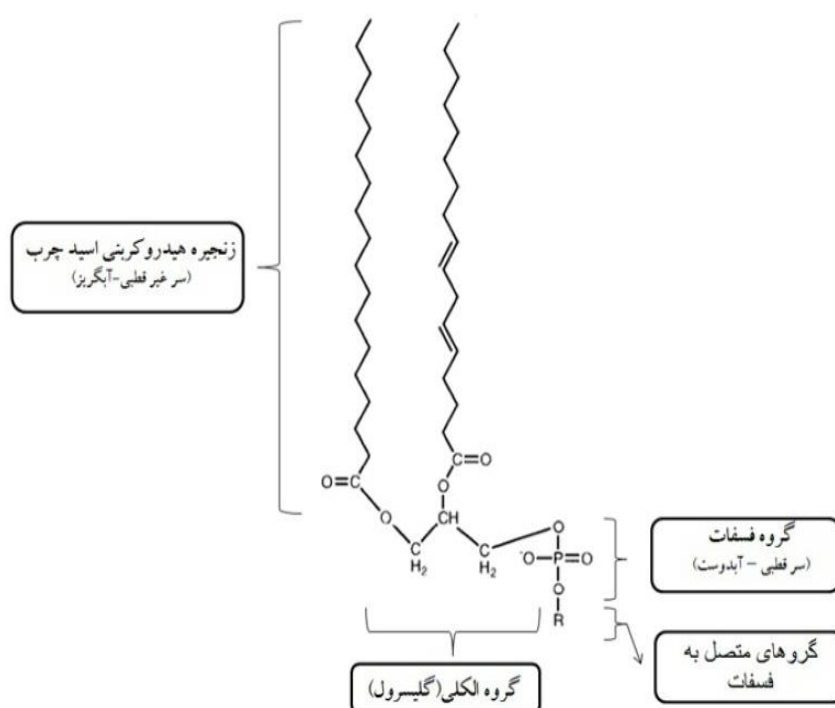
#### ۱-۴-۳- نانولیپوزوم ها

##### ۱-۴-۳-۱- ساختار شیمیایی لیپوزوم ها

منظور از لیپوزوم، وزیکول های میکروسکوپی شامل دو لایه فسفولیپیدی است که آب را داخل ساختار خود به دام می اندازد. ضخامت این لیپید دو لایه بطور معمول بین ۳-۶ میلی متر می باشد و لیپوزوم های تشکیل شده از آنها ممکن است قطری بین ۱-۱۰۰ نانومتر داشته باشند (Zasadzinski et al., 2011). لیپوزوم ها به علت ساختار آمفی پاتیک خود می توانند در کپسولاسیون ترکیبات هیدروفیل، هیدروفوب و آمفی فیل مورد استفاده قرار بگیرند. ویژگی هایی نظیر سمیت پایین و زیست تخریب پذیری باعث شده

<sup>۱</sup>- Lipophyl

لیپوزوم‌ها به عنوان حامل‌های مناسب در سیستم‌های غذایی مورد استفاده باشند. لیپوزوم‌ها از مولکول‌های آمفی‌پاتیک تشکیل شده که دارای یک سر آبدوست و یک سر آبگریز می‌باشند. ساختار فسفولیپیدها متشکل از یک گروه الکلی (گلیسرول)، دو مولکول اسید چرب، گروه فسفات و گروه‌های متصل به آن می‌باشد. وزیکول‌های فسفولیپیدی یا لیپوزوم‌ها از اجتماع فسفولیپیدها در محیط آبی به وجود می‌آیند. البته در اکثر موارد، کلسترول نیز جهت حفظ سیالیت غشا مورد استفاده قرار می‌گیرد (Kirby et al., 1980).



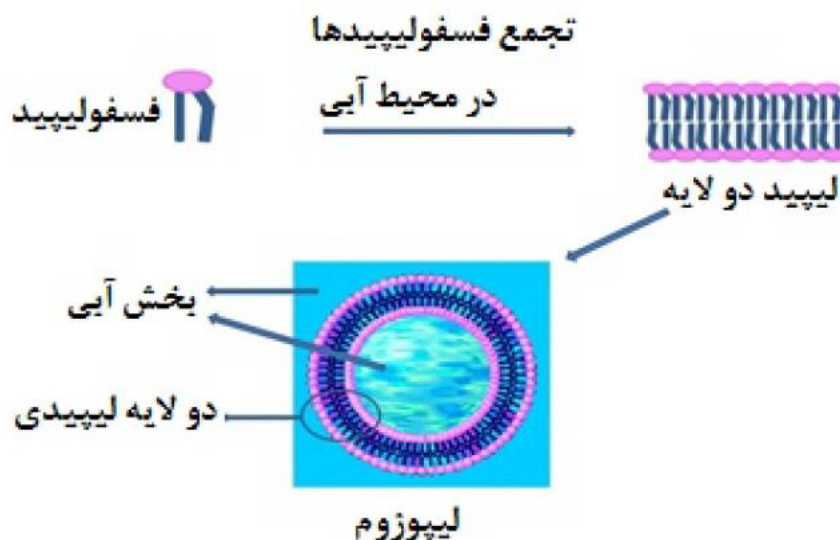
شکل ۱-۲ نمایی شماتیک از ساختار فسفولیپیدها

#### ۱-۴-۳-۲- تولید لیپوزوم

زمانی که مولکول‌های آمفی‌پاتیک نظیر فسفولیپیدها در یک محیط آبی قرار می‌گیرند، ساختارهای دو لایه‌ای را ایجاد می‌کنند که در آن، قسمت‌های غیرقطبی دور از دسترس آب بوده ولی قسمت‌های قطبی در تماس با مولکول‌های آب هستند. طی این فرآیند، لیپوزوم‌ها می‌توانند ترکیبات آبدوست موجود در محیط آبی را به دام بیندازند. مولکول‌های لیپوفیل نظیر ویتامین‌های چربی دوست، ترکیبات مغذی و داروها را می‌توان از طریق حل کردن آن‌ها با لیپیدها در ساختار لیپوزوم کپسوله کرد. راه دیگر این

است که ابتدا این ترکیبات را با سیکلودکسترین‌ها کمپلکس کرده و سپس در محیط آبی لیپوزوم، انکپسوله نمود. هم اکنون امکان مهندسی طیف گسترده‌ای از اندازه، ترکیب فسفولیپیدی و ویژگیهای سطحی لیپوزوم‌ها وجود دارد. سطح لیپوزوم‌ها را می‌توان با انتخاب لیپیدهای دولایه و همچنین با تلفیق و پیوند کووالانسی با پروتئین‌ها (همچون آنتی‌بادی و پروتئین‌های متصل به قندها مانند لکترین) و گلیکوپروتئین‌ها و پروتئین‌های سنتزی اصلاح نمود (Jones et al., 1995). بطور کلی در سیستم‌های انتقال لیپوزومی، دو هدف مهم مورد توجه است. یکی سنتز لیپوزوم‌های مورد نظر و دیگری بارگیری مناسب و بالای ترکیب فعال در ساختار لیپوزوم‌ها. روش‌های بسیار متنوعی در تولید لیپوزوم‌ها ابداع شده، اما تعدادی معدودی از آن‌ها قادر به دام انداختن مقادیر زیاد ترکیبات آبدوست هستند. بهترین روش تولید لیپوزوم، روشی است که از یک طرف، ذراتی با اندازه مد مورد نظر تولید کند و از طرف دیگر، راندمان بارگیری مناسبی داشته باشد. انتخاب صحیح روش تولید لیپوزوم به پارامترهای زیر وابسته است:

- ویژگی‌های شیمیایی ترکیبات کپسوله و اجزای مورد استفاده در تهیه لیپوزوم؛
- ماهیت محیطی که وزیکول‌های لیپیدی در آن پراکنده شده‌اند؛
- غلظت مؤثر مواد به دام افتاده و سمیت بالقوه آن‌ها؛
- اندازه ذرات و پراکندگی آن‌ها و مدت ماندگاری بهینه وزیکول‌ها.



شکل ۳-۱ نمای شماتیک لیپوزوم

#### ۱-۳-۳-۴-۳ روش‌های تهیه لیپوزوم‌ها بر پایه آبگیری

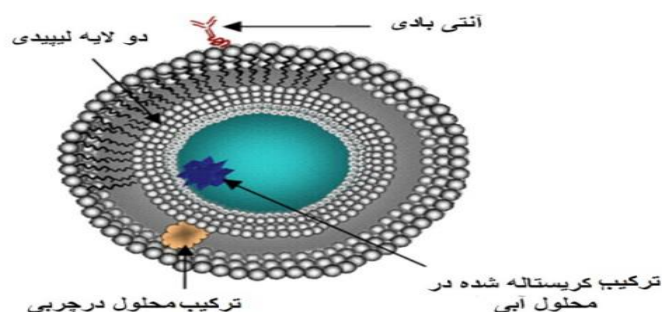
##### ۱-۳-۳-۴-۱ تکنیک‌های بارگیری غیر فعال

در این شیوه، به دام انداختن ترکیب فعال قبل از تولید و یا حین تولید لیپوزوم‌ها انجام می‌گیرد. در این تکنیک، ترکیبات آبدوست در محیط آبی درون لیپوزوم انکپسوله شده، در حالی که ترکیبات آبگریز بین دو لایه فسفولیپیدی محصور می‌شوند. هنگامی که ترکیبات آبدوست در لیپوزوم محصور شوند، تغییری در خصوصیات فیزیکی لیپوزوم ایجاد نمی‌کنند و تأثیر متقابلی بین ترکیب فعال و لیپوزوم وجود ندارد. ولی هنگامی که ترکیبات چربی‌دوست در غشای لیپوزوم قرار می‌گیرند، تغییرات قابل ملاحظه‌ای در خواص فیزیکی و زیکول‌ها، نظیر دمای تغییر فاز (Tc) ایجاد می‌شود.

##### ۱-۳-۳-۴-۲ تکنیک‌های بارگیری فعال

این تکنیک به نوع خاصی از ترکیبات با گروه‌های یونیزه شونده و یا ترکیبات آمفی‌پاتیک مربوط است که پس از تشکیل لیپوزوم، می‌توانند به داخل ساختار آن نفوذ کنند. باید توجه داشت که در تکنیک بارگیری غیرفعال، ترکیبات فعال، قبل یا حین تشکیل لیپوزوم‌ها درون آن‌ها به دام می‌افتند و پس از

تشکیل، قابلیت نفوذ به ساختار لیپوزومی را ندارند. بنابراین تکنیک‌های بارگیری فعال، منحصر به ترکیبات خاصی هستند (Maherani et al., 2011).



شکل ۴-۱ نمایی از انکپسولاسیون ترکیبات آبدوست و چربی دوست

#### ۴-۳-۴-۱ انواع لیپوزوم‌ها

طبقه‌بندی لیپوزوم‌ها بر اساس تک‌لایه یا چندلایه بودن و اندازه ذرات صورت می‌گیرد که شامل موارد زیر می‌باشند:

- وزیکول‌های یونی لاملار که دارای پوسته غشایی دولایه‌ای بوده و به انواع بزرگ و کوچک تقسیم می‌شوند؛
- وزیکول‌های مولتی لاملار دارای غشاهای چندلایه‌ای متعدد در یک ساختار هم‌مرکز می‌باشند؛
- وزیکول‌های مولتی وزیکولار در قسمت داخلی خود دارای وزیکول‌های دیگری هم هستند (Keller et al., 2001).

نانولیپوزوم‌ها از انواع لیپوزوم‌ها در مقیاس نانو و یکی از سیستم‌های انکپسولاسیون و رهایش کنترل شده مواد هستند. لیپوزوم‌ها و نانولیپوزوم‌ها خصوصیات ساختاری، شیمیایی و ترمودینامیک یکسان دارند. در مقایسه با لیپوزوم‌ها، نانولیپوزوم‌ها ناحیه سطحی بیشتری را فراهم می‌کنند و باعث افزایش حلالیت، تقویت قابلیت دسترسی زیستی، بهبود رهایش کنترل شده و تحویل دقیق‌تر مواد انکپسوله شده به نواحی هدف می‌شوند (Mozafari et al., 2005).

### ۱-۴-۳-۵- روش‌های تهیه نانولیپوزوم

روش‌های تهیه لیپوزوم به دو دسته روش‌های سنتی و نوین تقسیم‌بندی می‌شوند. روش‌های سنتی شامل روش بانگهام، دفع دترژن، تزریق اتر/ اتانول و تبخیر فاز معکوس می‌باشند (Meure et al, 2008). در تمامی این روش‌ها، نیاز به ترکیب شدن با فاز آبی وجود دارد. در روش‌های سنتی، محلول لیپیدی قبل از پراکندگی در فاز آبی، با استفاده از یک حلال آلی تولید می‌شود. استفاده از حلال آلی در ساختار شیمیایی ترکیب انکپسوله، سمیت و پایداری لیپوزوم مؤثر است (Mozafari et al., 2005)

#### ۱-۴-۳-۵-۱ روش‌های سنتی تولید لیپوزوم

○ **روش بانگهام:** این روش که هیدراسیون لایه نازک هم نامیده می‌شود، یکی از گسترده‌ترین روش‌های مورد استفاده در تولید لیپوزوم است که در آن با حل نمودن لیپید در یک حلال آلی و سپس حذف حلال از طریق تبخیر، فیلم لیپیدی تشکیل می‌شود. حذف حلال، تحت شرایط خلأ در چندین ساعت انجام می‌گیرد، بنابراین امری زمان‌بر است. مرحله نهایی شامل هیدراسیون فیلم لیپیدی با یک فاز آبی است. لیپوزوم‌های تولید شده به این روش دارای ابعادی در اندازه میکرون هستند. روش بانگهام، با وجود سهولت دارای معایبی است که شامل کارآیی پایین انکپسولاسیون، مشکلات حذف حلال، هموژنیزاسیون و تولید در مقیاس کم می‌باشند (Meure et al., 2008).

○ **روش دفع دترژنت:** این روش فرآیند ملایمی برای تولید وزیکول‌های مختلف با یکنواختی بالاست که بر اساس تولید میسل‌های دترژنت-لیپید استوار است، سپس جهت تولید لیپوزوم، دترژنت حذف می‌گردد. نقش دترژنت پیوستن به لیپید و جلوگیری از ارتباط بین قسمت‌های هیدروفوب و فاز آبی است، بنابراین بیشتر میسل ایجاد می‌شود تا وزیکول. حذف دترژنت با رقیق‌سازی ۱۰ به ۱۰۰، دیالیز، کروماتوگرافی ستونی و یا جذب انجام می‌شود. روش رقیق‌سازی با وجود سهولت، دارای معایبی است که عمدتاً شامل کم بودن غلظت نهایی لیپوزوم در محلول و پایین بودن احتمال به دام انداختن ترکیبات هیدروفوب می‌باشد. بعلاوه دترژنت در فرمولاسیون باقی مانده و بایستی توسط

روش‌های دیگر حذف شود. اندازه و یکنواختی لیپوزوم‌های تولیدی بدین روش، به سرعت حذف دترژنت و نسبت اولیه دترژنت به فسفولیپید وابسته است. این روش بسیار زمان‌بر بوده و تعادل میسل‌ها به آهستگی صورت می‌پذیرد. از معایب دیگر روش این است که هنگام حذف دترژنت، ممکن است برخی از ترکیبات هیدروفیل نیز حذف شوند (Meure et al., 2008).

○ **روش تزریق:** در روش‌های تزریق اتانول و اتر، مراحل تولید لیپوزوم شامل حل کردن لیپید در فاز آلی و سپس تزریق محلول لیپیدی در محیط آبی است. روش تزریق اتانول، ساده بوده ولی برخی از لیپیدها به میزان کمی در اتانول حل می‌شوند، بعلاوه در صورت عدم اختلاط بطور کافی، لیپوزوم‌های غیرهمگنی تولید خواهد شد. از آنجایی که اتانول بطور مستقیم به داخل محیط آبی تزریق می‌شود، حلال باقی‌مانده مشکل ایجاد نموده و بایستی حذف شود. تزریق اتر متفاوت از تزریق اتانول است زیرا اتر با فاز آبی، غیرقابل اختلاط بوده، همچنین در اثر حرارت از محصول لیپوزومی حذف می‌شود. محلول اتر-لیپید به آهستگی به محیط آبی تزریق شده و در نتیجه وزیکول‌های بزرگ تک‌لایه تشکیل می‌شوند. یکی از مزایای این روش نسبت به روش تزریق اتانول این است که حذف حلال باعث تولید محصول لیپوزومی با کارایی بالا می‌شود. هرچند که آهسته بودن تزریق، نشانگر کندی روش است (Meure et al., 2008).

○ **تبخیر فاز معکوس:** اساس این روش، تولید قطرات آب پوشش یافته با لیپید است که در حلال‌های آلی پراکنده شده‌اند که از آن‌ها به عنوان میسل‌های معکوس، یاد می‌شود. مراحل فرآیند به ترتیب شامل حل کردن لیپید در یک حلال آلی، افزودن میزان کمی از فاز آبی و در نهایت سونیکاسیون محلول می‌باشد. حلال آلی توسط اوپراتور چرخشی تبخیر شده و ژل ویسکوزی تشکیل می‌شود. زمانی که حلال به میزان کافی حذف شود، ژل شکسته شده و سوسپانسیون آبی وزیکول‌ها شکل می‌گیرد. این روش برای ترکیبات حساس و شکننده نظیر پپتیدها نامناسب است، زیرا ترکیب مورد نظر در تماس مستقیم با حلال آلی قرار می‌گیرد (Meure et al., 2008).

### ۱-۴-۳-۲- روش‌های نوین تولید لیپوزوم

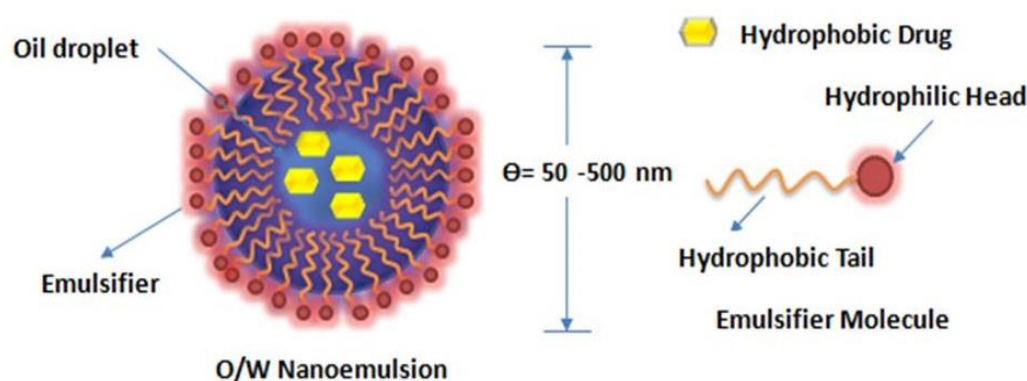
○ **روش حرارتی:** اکثر تکنیک‌های ساخت نانولیپوزوم‌ها شامل بکارگیری حلال‌های سمی (کلرفرم، متانول، دی اتیل اتر و استون) و یا نیروهای برشی بالا می‌باشند. باقیماندن حلال‌های سمی در فرمولاسیون نهایی لیپوزوم‌ها و نانولیپوزوم‌ها، باعث سمیت در محصول شده و بر پایداری و زیکول‌های لیپیدی تاثیر می‌گذارد. اگرچه روش‌هایی (فیلتراسیون، دیالیز و خلأ) برای کاهش غلظت حلال‌های باقی مانده در لیپوزوم‌ها موجود می‌باشند، اما دشوار و زمان‌بر هستند. بنابراین بهتر است از بکارگیری چنین حلال‌هایی در فرمولاسیون نانولیپوزوم‌ها جلوگیری شود. استفاده از روش حرارتی روش مناسبی بوده که در آن از حلال‌های سمی استفاده نمی‌شود و همچنین جایگزین مناسبی برای روش‌هایی با کاربرد فشار و نیروهای برشی بالا هستند (Mozafari., 2010).

### ۱-۴-۴-۱- نانوامولسیون‌ها

#### ۱-۴-۴-۱- تعریف و ساختار شیمیایی نانوامولسیون‌ها

نانوامولسیون نوعی امولسیون است که در آن اندازه ذرات فاز پراکنده بین ۱۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر تعریف شده اند، البته برخی این محدوده را بین ۱۰ تا ۵۰۰ نانومتر می‌دانند (Delmas et al., 2011). نانو-امولسیون را می‌توان یک سیستم شامل فاز آبی، فاز روغنی و سورفکتانت‌هایی دانست که از نظر ترمودینامیکی پایدار هستند. یک فاز در فاز دیگر به کمک سورفکتانت‌ها پخش می‌شود. به فاز پراکنده فاز داخلی و به فاز در برگیرنده فاز بیرونی گویند. نانو امولسیون‌ها می‌توانند محلول آب در روغن یا روغن در آب باشند. این به خصوصیات روغن و سورفکتانت استفاده شده و فشردگی هندسی سر قطبی و دم هیدروکربنی مولکول‌های سورفکتانت بستگی دارد (Shah et al., 2010). امولسیون‌ها کاربرد گسترده‌ای در صنعت مواد غذایی، لوازم آرایشی و بهداشتی و داروسازی دارند. به همین علت پایداری امولسیون‌ها در درجه بالایی از اهمیت قرار دارد، این در حالی است که امولسیون‌ها از لحاظ ترمودینامیکی ناپایدارند و با گذشت زمان با کاهش کشش بین سطحی فازها به صورت خود به خودی ناپایدار می‌شوند. نانوامولسیون‌ها کشش سطحی بیشتری نسبت به ماکروامولسیون‌ها دارند و این تمایل در آن‌ها بیشتر

است. از طرفی نانوامولسیون‌ها به واسطه اندازه ذرات کوچکشان تمایل کمتری به جدایی فاز دارند و از لحاظ سینتیکی پایدارترند. اصولاً نانوامولسیون‌ها، به واسطه اندازه ویژه، ظاهری شفاف یا نیمه شفاف دارند و به توزیع اندازه قطرات از پایداری سینتیکی بالا، گرانروی کم، پایداری بالا در برابر پدیده‌هایی ترسیب، خامه‌ای شدن، به هم پیوستن و لخته شدن برخوردارند و به همین دلایل امروزه برای کاربردهای صنعتی فراوانی مورد توجه قرار گرفته‌اند (Gutiérrez et al., 2007).



شکل ۱-۵ طرح شماتیکی نانوامولسیون

$$HLB^1 = 1-1-4-4-1$$

یکی از خصوصیات مهم که بر اساس آن امولسیفایرها را تقسیم بندی می‌کنند بر اساس خصوصیت انحلال آن‌ها و یا به اصطلاح HLB می‌باشد، که نسبت آب دوستی و چربی دوستی امولسیفایرها را نشان می‌دهد. بنابراین، براساس HLB، به هر ترکیب یک عدد از صفر تا ۲۰ اختصاص داده می‌شود. به ترکیبات محلول در روغن اعداد پایین و اعداد بالاتر به ترکیباتی که تمایل بیشتری به حلالیت در آب دارند اختصاص داده می‌شوند. وقتی ترکیبی صد در صد آب دوست است HLB آن حدود ۲۰ و اگر صد درصد چربی دوست باشد عدد ۱ به آن تعلق می‌گیرد (Schmidts et al., 2010).

<sup>۱</sup> Hydrophilic-lipophilic balance

### ۱-۴-۲- انواع نانوامولسیون‌ها

الف) آب در روغن (w/o): قطرات آب در فاز روغن پراکنده است.

ب) روغن در آب (o/w): قطرات روغن در فاز آبی پراکنده است.

اخیرا امولسیون‌های نوع w/o/w یا پراکندگی آب در قطرات روغن از نوع امولسیون O/w و نوع دیگر

امولسیون o/w/o که مخالف نوع قبل است، گسترش یافته است (Maali et al., 2013).



شکل ۱-۶ انواع نانو امولسیون (Blanco et al., 2014).

### ۱-۴-۳- مزیت نانوامولسیون‌ها

نانوامولسیون‌ها به خاطر اندازه ذرات کوچکتری که نسبت به امولسیون‌های معمولی دارند سطح بیشتری دارند و در فرآیندهای انتقالی موثرترند. همچنین اندازه بسیار کوچک ذرات در نانوامولسیون‌ها باعث می‌شود نیروی جاذبه به طور قابل توجهی کاهش پیدا کند و حرکت براونی بتواند به طرز کارآمدی بر این نیرو غلبه کند که این مسئله باعث می‌شود جدایی فاز در نانوامولسیون‌ها کمتر از امولسیون‌های معمولی اتفاق بیفتد (Blanco et al., 2014). نانوامولسیون‌ها غیر سمی و غیر محرک‌اند، از این رو می‌توانند برای پوست و غشای موکوزی استفاده شوند. همین طور چون برای سلامت انسان و حیوان مضر نیستند، می‌توان از آن‌ها برای هدف‌های درمانی در انسان و حیوان استفاده کرد. همچنین نانوامولسیون‌ها به واسطه خیلی ریز بودن قطرات، سطح ویژه زیادی دارند به همین دلیل قابلیت نفوذ خیلی بالایی دارند که این ویژگی آن‌ها را به یک سامانه انتقالی موثر تبدیل کرده است. ضمناً، برخلاف

ماکرومولسیون‌ها که به غلظت بالایی از سورفکتانت نیاز دارند، نانوامولسیون‌ها در حضور غلظت پایینتری از این مواد تشکیل می‌شوند (Shah et al., 2010).

#### ۱-۴-۴-۴-۴ روش‌های تولید نانوامولسیون‌ها

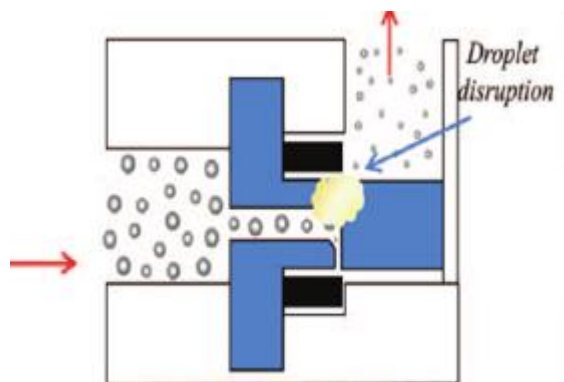
از روش‌های مختلفی برای تولید نانوامولسیون‌ها استفاده می‌شود، که به طور کلی می‌توان به انواع روش‌های کم انرژی و پر انرژی تقسیم بندی نمود.

##### ۱-۴-۴-۴-۱ روش‌های پر انرژی

در این روش‌ها از تجهیزات مکانیکی که قادر به تولید نیروهای شدیدی هستند، استفاده می‌شود که موجب انحلال مخلوط روغن، آب و امولسیفایر و تشکیل قطرات کوچک فاز پراکنده در داخل فاز پیوسته می‌شوند (McClements et al., 2012). تولید نانوامولسیون با روش‌های پر انرژی به وسیله ترکیب انتخاب شده (مانند سورفکتانت و ترکیبات عملکردی) و مقدار انرژی به کار برده شده کنترل می‌شود (Silva et al., 2011). برخی از روش‌های پر انرژی شامل روش‌های زیر هستند:

##### ○ هموژنیزاسیون فشار بالا

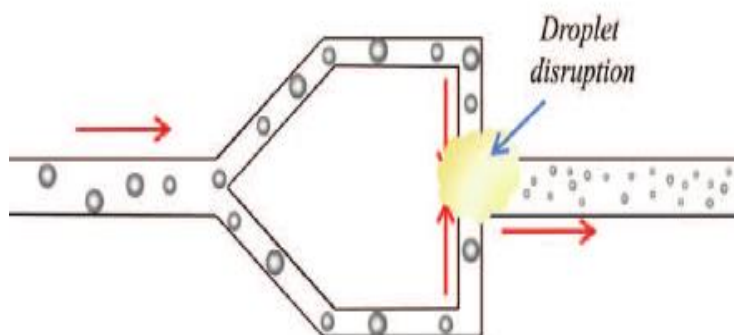
مخلوط تحت فشار خیلی بالا از طریق یک دریچه‌ی محدود کننده پمپ می‌شود. فشار برشی بسیار بالا، کاویتاسیون و جریان متلاطم موجب تولید قطرات خیلی ریز می‌شود (Jafaria et al., 2008 ; Silva et al., 2011). انتخاب نوع هموژنایزر و شرایط مورد استفاده، به خصوصیات ماده‌ای که هموژنیزه می‌شود (ویسکوزیته، کشش بین سطحی و حساسیت به تنش برشی) و نیز ویژگی‌های امولسیون نهایی (غلظت، اندازه قطرات و ویسکوزیته) بستگی دارد (Yuan et al., 2008 ; McClements et al., 2011).



شکل ۱-۷ هموژنایزر فشار بالا (McClements et al., 2011).

### ○ میکروفلودایزر

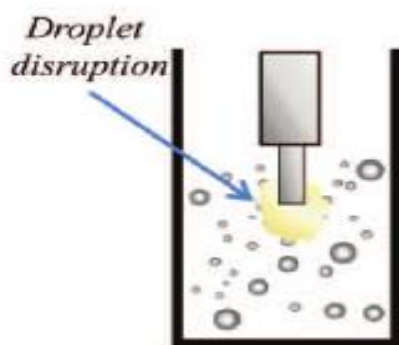
ماکرومولسیون توسط پمپ فشار قوی وارد یک محفظه می‌شود، در این محفظه دو جریان از ماکرومولسیون از دو کانال مخالف با سرعت بالا به هم برخورد می‌کنند و با ایجاد یک نیروی برشی بسیار قوی، قطرات ریز امولسیون را تولید می‌کنند. طراحی آن مشابه هموژنایزر فشار بالا می‌باشد (Jafaria et al., 2008 ; McClements et al., 2011).



شکل ۱-۸ میکروفلودایزر (McClements et al., 2011).

### ○ امواج فراصوت

زمانی که دو مایع غیر قابل امتزاج (آب و روغن) در حضور یک سورفکتانت، در معرض امواج فراصوت با فرکانس بالا قرار می‌گیرند، در نتیجه آشفتگی بین سطحی قطراتی از روغن وارد فاز آبی می‌شود. سپس در اثر تشکیل حباب‌های بخار و در نتیجه پدیده کاویتاسیون، قطرات روغن درون فاز آبی می‌شکنند و قطراتی با اندازه نانو را تولید می‌کند (Kentish et al., 2008). اگرچه اولتراسوند یک نیروی برشی بالا را برای شکستن قطرات بکار می‌برد، سرعت انعقاد قطرات به وسیله فعالیت سطحی و غلظت سورفکتانت و ویسکوزیته فازهای روغن و آب تعیین می‌شود. کاربرد این روش در مقیاس صنعتی به طرز کارآمد ثابت نشده است (Li et al., 2012).



شکل ۹-۱ پروب سونیکاتور (McClements et al., 2011)

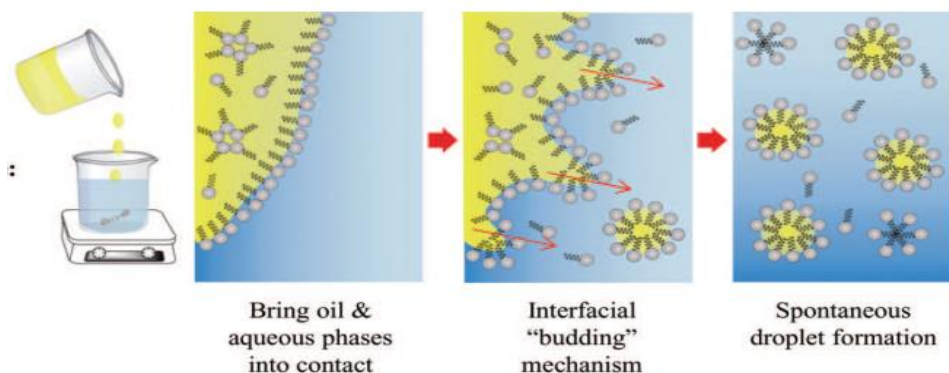
#### ۱-۴-۲- روش‌های کم انرژی (متکی بر تغییر فاز)

در این روش قطرات روغن به طور خود بخودی در داخل مخلوط روغن-آب-امولسیفایر، زمانی که شرایط مخلوط و یا شرایط محیطی تغییر کند، تشکیل می‌شوند. (McClements et al., 2012). در این روش‌ها از پتانسیل شیمیایی ترکیبات برای تولید نانو قطره‌ها استفاده می‌شود (Sadumi et al., 2005). برخی از تکنیک‌های کم انرژی شامل روش‌های زیر هستند:

#### ○ تولید خود به خودی امولسیون

شامل تیتراسیون فاز آلی متشکل از روغن، سورفکتانت هیدروفیل و حلال آلی قابل امتزاج با آب در فاز آبی و یا برعکس می‌باشد. مولکول‌های امولسیفایر با مهاجرت از فاز روغن به فاز آبی در سطح بین

دو فاز قرار می گیرند و موجب افزایش مساحت سطحی و آشفستگی بین سطحی می شوند. در نتیجه موجب وارد شدن قطرات روغن به فاز آبی و تولید خود به خودی قطرات می شود. با تغییر دادن ترکیب فازها، شرایط محیطی و شرایط همزدن اندازه قطرات کنترل می شود (McClements et al., 2011).



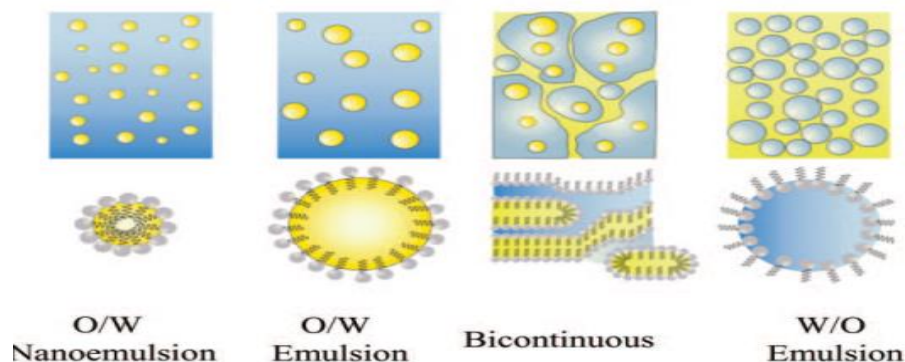
شکل ۱-۱۰ تولید خودبخودی امولسیون (McClements et al., 2011).

#### ○ روش برگشت فاز انتقالی یا دمایی (روش PIT)<sup>۱</sup>

این روش بر اساس تغییر در حلالیت سورفکتانت های غیر یونی با تغییر دما و تغییر انحنای لایه سورفکتانت و در نتیجه برگشت از حالت آب در روغن به حالت روغن در آب (یا برعکس) در دمای معکوس شدن فاز (PIT) می باشد. با افزایش دمای ماکروامولسیون روغن در آب در اثر دهیدراته شدن سرهای قطبی، حلالیت مولکول های سورفکتانت غیر یونی در آب کاهش می یابد. در دمای معکوس شدن فاز، امولسیون می شکند و قطرات با هم ادغام می شوند و سیستم حاوی روغن اضافه، آب اضافه و فاز سوم که شامل مخلوطی از مولکول های سورفکتانت، روغن و آب است و میکروامولسیون یا فاز پیوسته دوگانه نامیده می شود، تولید می شود برای تولید نانوامولسیون باید فقط فاز سوم تشکیل شود. با ادامه افزایش دما تا دمای بالای PIT، امولسیون آب در روغن تولید می شود. خنک کردن سریع سیستم آب در روغن تا زیر دمای معکوس شدن فاز، موجب تغییر انحنای مولکول های سورفکتانت و مهاجرت سریع

<sup>۱</sup> phase inversion temperature

آنها از فاز روغن به آبی می‌شود، که موجب ایجاد آشفتگی بین سطحی و تولید قطرات ریز روغن و در نتیجه تولید نانوامولسیون روغن در آب می‌شود (McClements et al., 2011).

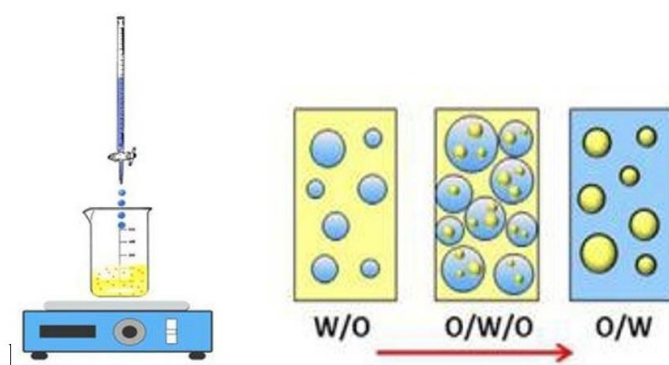


شکل ۱-۱۱ روش برگشت فاز دمایی (McClements et al., 2011).

### ○ روش کاتاستروفیک (روش EIP)<sup>۱</sup>

در این روش برخلاف روش‌های قبلی (معکوس شدن انتقالی) خصوصیات سورفکتانت ثابت است و نسبت آب به روغن در دمای ثابت تغییر داده می‌شود. بنابراین با افزودن تدریجی آب یا روغن نانوامولسیون‌های پایدار سینتیکی تشکیل می‌شوند. به عنوان مثال با افزودن آب به امولسیون آب در روغن، غلظت آب به مقدار بحرانی رسیده و در غلظت‌های بالای نقطه برگشت امولسیون (PIT) قطرات آب بیشتر از قطرات روغن باهم ادغام می‌شوند بنابراین معکوس شدن فاز اتفاق می‌افتد و به نانوامولسیون روغن در آب تبدیل می‌شود (Lin Ee et al., 2008).

<sup>۱</sup>Phase Inversion Emulsification



شکل ۱-۱۲ روش کاتاستروفیک (Ostertag et al., 2012).

## ۵-۱- گیاه‌شناسی

### ۱-۵-۱- خانواده نعنائیان<sup>۱</sup>

این تیره در ایران ۴۶ جنس و ۴۱۰ گونه و زیر گونه دارد. تیره نعناع به جهت داشتن صفات و اختصاصات مهم دارویی و غذایی جزو اولین تیره‌هایی است که توسط گیاه‌شناسان شناسایی شده است (زرگری و همکاران، ۱۳۷۲). گیاهان این تیره در سراسر جهان پراکنده‌اند، اما به طور خاصی در مناطق مدیترانه‌ای تجمع دارند. این تیره دارای ۱۸۷ جنس و حدود ۳۰۰۰ گونه است (قهرمان، ۱۳۷۳). گیاهان خانواده نعنائیان از قرن‌ها پیش در اکثر کشورها به عنوان چاشنی یا ادویه غذاها و هم چنین به عنوان دارو برای هضم غذا و مقابله با بیماری‌های ویروسی استفاده می‌شده‌اند.

### ۱-۵-۲- جنس مریم‌گلی<sup>۲</sup>

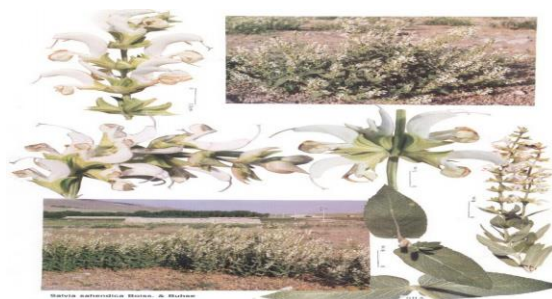
دارای ۹۰۰ گونه با پراکندگی جهانی می‌باشد. این جنس در ایران ۵۸ گونهٔ علفی یک ساله و چند ساله دارد که در سراسر کشور پراکنده‌اند که ۱۷ گونه آن بومزاد ایران است (مظفریان، ۱۳۷۵).

<sup>۱</sup> Lamiaceae

<sup>۲</sup> Salvia

### ۱-۵-۳ - گونه مریم گلی سهندیکا<sup>۱</sup>

گیاه پایا به ارتفاع ۳۰-۴۰ سانتی متر، دارای بن ضخیم، محکم، کم و بیش انبوه، به رنگ سبز متمایل به خاکستری یا سفید. ساقه: متعدد، خیزان یا ایستاده، از قاعده منشعب، دارای شاخه‌های ایستاده، غالباً ساده و یا کمی منشعب، منتهی به خوش‌های ساده، در قاعده پوشیده از کرک‌های نرم و کوتاه و غیر غده پوش. برگ: معطر، به طور منظم پهن دراز-سرنیزه‌ای، به ابعاد  $۱/۵-۴/۲ \times ۳/۵-۱۰$  سانتی‌متر، زبر، کنگره دار، در سطح رو سبز و بدون کرک، در سطح پشتی سبز خاکستری، پوشیده از کرک‌های متراکم غیر غده‌ای. گل: سفید یا لب پایینی جام زرد رنگ، مجتمع در گل آذین ساده یا به ندرت منشعب، هر چرخه‌ی گل در گل آذین دارای ۲-۶ گل. میوه: فندقه (نوکل)، تخم مرغی، صاف و قهوه‌ای رنگ. موسم گل: خرداد، تیر. انتشار جغرافیایی: این گیاه از گونه‌های انحصاری ایران است و منطقه‌ی رویش آن محدود به دامنه‌های کوه سهند در آذربایجان شرقی می‌شود. مناطق جمع‌آوری این گیاه که در فلور ایرانیکا به آن اشاره شده عبارتند از: تبریز، تبریز به طرف میانه، تبریز به طرف شبلی، یاسمج، کندوجان (جم‌زاد و همکاران، ۱۳۹۱).



شکل ۱-۱۳ تصویر *Salvia sahandica*

### ۱-۵-۴ - خواص بیولوژیکی و دارویی گونه *sahandica*

مریم گلی سهندی گونه‌ی اندمیک منطقه سهند آذربایجان است که توسط مردم بومی این منطقه جهت درمان عفونتهای باکتریایی، قارچی و رفع سوء هاضمه مورد استفاده قرار می‌گیرد. فعالیت‌های آنتی

<sup>۱</sup> *Salvia Sahandica*

اکسیدانی ضد باکتریایی و ضد التهابی این گونه به اثبات رسیده است (Esmaeili et al., 2010). خواص ضد باکتریایی بسیار خوبی از عصاره‌های این گیاه در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های موجود در بازار دیده شده است. فعالیت آنتی اکسیدانی قوی مشاهده شده از این گونه را نیز به ترکیبات فنولی موجود در آن نسبت داده‌اند که با افزایش قطبیت عصاره‌ها این خاصیت فزونی می‌یابد (Kia et al., 2015). فعالیت های ضد التهابی خوبی نیز از این گیاه مشاهده شده است. عصاره‌ی متانولی این گیاه اثر محافظت کنندگی قابل توجهی بر روی سلولهای عصبی PC-12 داشته است و می‌تواند به عنوان یک کاندید در بهبود بیماری آلزایمر مطرح شود (Shaerzadeh et al., 2011). ترکیبات جدا شده از ریشه‌ی این گیاه ضد قارچ بوده و همچنین انتظار می‌رود که مانند دیگر ترکیبات جدا شده از ریشه‌های مریم گلی‌های دیگر فعالیت‌های ضد سرطانی از خود نشان دهند (Jassbi et al., 2006).

فصل دوم

بررسی منابع

طی سال‌های طولانی مطالعات زیادی روی اثرات سلامت‌بخشی، ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی اسانس مریم گلی انجام شده است.

▪ الوبلن و همکاران (۱۹۹۴)، مشاهده کردند ترکیبات مختلف موجود در عصاره استونی گیاه *S. sclarea* شامل اسانس و دی‌ترپن‌ها روی *استافیلوکوکوس اورئوس*، *کاندیدا آلبیکنز* و *پروتئوس میرابلیس* اثر ضد میکروبی داشتند (Ulubelen et al., 1994).

▪ پینا و همکاران (۱۹۹۹)، ترکیبات شیمیایی اسانس‌های *S. slarea* و *S. desoleana* را توسط آنالیز GC و GC-MS مطالعه کردند. نتایج نشان داد این اسانس‌ها که به ترتیب دارای بالاترین درصد مونوترپن‌های استری و مونوترپن‌های الکی می‌باشند، به شکل فرآورده‌های موضعی، در حیوانات آزمایشگاهی اثر ضد میکروبی بهتری روی عفونت‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیس*، *اشرشیاکلی* و *کاندیدا آلبیکنس* دارند (Peana et al., 1999).

▪ تزاگو و همکاران (۲۰۰۰)، ترکیبات شیمیایی اسانس *S. ringens* را توسط آنالیز GC و GC-MS مطالعه کردند. ۷۵ ترکیب شیمیایی برای این گیاه گزارش شد. اسانس این گونه اثرات ضد میکروبی قابل توجهی روی ۶ سوش میکروبی معمول و ۳ سوش قارچ بیماری‌زا نشان داد. اثرات ضد میکروبی و ضد قارچی را می‌توان به وجود درصد بالایی از ترکیبات آلفا-پینن و ۱/۸ سینئول در این گونه نسبت داد (Tzakou et al., 2000).

▪ هزندوگلو و همکاران (۲۰۰۱)، ترکیبات شیمیایی اسانس *S. tomentosa* را توسط آنالیز GC و GC-MS مطالعه کردند. از ۷۲ پیک بدست آمده ۴۴ ترکیب شناسایی شد. اسانس این گونه اثرات مهار رشد قابل توجهی روی باکتری‌های معمول گرم مثبت و گرم منفی غیر از *سودوموناس آئروزیینوزا* نشان داد. اثرات ضد میکروبی را می‌توان به وجود درصد بالایی از ترکیب ۱/۸ سینئول (۱۷٪) و در این گونه نسبت داد (Haznedaroglu et al., 2001).

- تپه و همکاران (۲۰۰۴)، فعالیت اسانس و عصاره متانولی *S. multicaulis* علیه باکتری *استافیلوکوکوس/اورئوس* و *استرپتوکوکوس پنومونیا* را بررسی کردند و مشاهده نمودند اسانس و فراکشن‌های غیر قطبی از عصاره متانولی این گونه اثرات ضد باکتریایی مثبتی از خود نشان می‌دهند. اثرات ضد باکتریایی را می‌توان به وجود ترکیبات آلفا-پینن، بورنئول، ۱/۸ سینئول و کامفور در این گونه نسبت داد (Tepe et al., 2004).
- تنوره و همکاران (۲۰۱۱)، ترکیبات شیمیایی و خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانتی اسانس *S. lanigera* رشد یافته در کشور قبرس را مطالعه کردند. نتایج حاصل نشان داد اسانس این گونه اثرات ضد میکروبی بیشتری بر روی باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی و مخمرها دارد. همچنین مشاهده شد خاصیت آنتی‌اکسیدانتی آن بالاتر از سه استاندارد آنتی‌اکسیدانتی اسید آسکوربیک، ترشری بوتیل-۴-هیدروکسی تولوئن و اسید گالیک است (Tenore et al., 2011).
- سپهوند و همکاران (۲۰۱۴)، ترکیبات شیمیایی، خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانتی اسانس *S. sclareoides* مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که اسانس این گونه شامل نسبت بالایی از ترکیبات سزکوئی‌ترین‌ها و غیر ترپنوئیدی و خواص آنتی‌اکسیدانتی و ضد میکروبی خوبی است (Sepahvand et al., 2014).

## ۲-۱- انکپسوله کردن روغن‌های اسانسی در لیپوزوم

- والنٹی و همکاران (۲۰۰۱)، نشان دادند که روغن اسانسی *Santolina insularis* می‌تواند در مقادیر زیاد در لیپوزوم‌ها الحاق شده و از تخریب حفاظت شود. دیسپرسیون لیپوزوم‌ها برای حداقل یک سال پایدار بوده و نشت روغن و تغییر اندازه ذره در طول این دوره رخ نداد (Valenti et al., 2001).
- سینیکو و همکاران (۲۰۰۵)، مشاهده کردند فعالیت آنتی‌هرپتیک روغن اسانسی *Artemisia arborescens* با الحاق آن داخل لیپوزوم‌های MLV افزایش می‌یابد، اگرچه تفاوت معنی‌داری بین

فعالیت ضد ویروسی روغن غیر انکپسوله و روغن کپسوله شده در داخل SUVها نیست (Sinico et al., 2005).

▪ گورتزی و همکاران (۲۰۰۷)، فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی اجزای تشکیل دهنده اسانس لیموترش (Limonene,  $\beta$ -pinene,  $\gamma$ -terpinene, neral,  $\alpha$ -terpineol) قبل و بعد از انکپسوله شدن در لیپوزوم را مورد بررسی قرار دادند. خواص ضد میکروبی اسانس با استفاده از روش انتشار دیسک در برابر چهار باکتری گرم مثبت و گرم منفی و سه قارچ بیماریزای انسان هم چنین لیستریا مونوسیژنوز بررسی شد. نتایج نشان داد که تمام ترکیبات پس از انکپسوله کردن در لیپوزوم فعالیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی بالاتری از حالت آزاد نشان دادند (Gortzi et al., 2007).

▪ لیولیوس و همکاران (۲۰۰۹)، اجزای اصلی روغن‌های اسانسی بدست آمده از *Oaiganum dictamnus* را شناسایی کرده (p-cymene, thymol, carvacrol, c-terpinene) و آن‌ها را داخل لیپوزوم‌های با پایه فسفاتیدیل کولین انکپسوله کردند و نشان دادند که فعالیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی این ترکیبات بعد از انکپسولاسیون نسبت به ترکیبات خالص افزایش یافت (Liolios et al., 2009).

▪ وارونا و همکاران (۲۰۱۱)، پایداری لیپوزوم‌های تهیه شده توسط روش لایه نازک و نیز فرایند خشک کردن محلول‌های اشباع از گاز (PGSS) را برای الحاق روغن اسانس *Lavandin* بررسی کردند. لیپوزوم‌های تهیه شده افزایش معنی‌داری در اندازه در ۱۰ روز اول نگهداری در ۵°C نشان دادند و بعد از آن برای مدت ۱ ماه پایدار باقی ماندند که تایید کننده این است که اتصال و شکست ویزیکول‌ها بعد از ۱۰ روز اول رخ نداد. در این بررسی کارایی پایی بین ۳ تا ۱۴/۵٪ با بکارگیری فرآیند PGSS در مقایسه با روش لایه نازک (۶۶٪) بدست آمد (Varona et al., 2011).

▪ جیولن و همکاران (۲۰۱۵)، به منظور افزایش ثبات ضد میکروبی فیلم ژلاتین حاوی اسانس دارچین از نانولیپوزوم اسانس به روش لایه نازک استفاده کردند. نتایج نشان داد افزایش ثبات ضد میکروبی

فیلم حاوی نانولیپوزوم اسانس دارچین به علت کاهش سرعت آزاد شدن اسانس از کپسول است (Jiulin et al., 2015).

- چوی و همکاران (۲۰۱۶)، جهت افزایش فعالیت ضد میکروبی اسانس مریم گلی از نانولیپوزوم استفاده کردند. مشاهده شد استفاده از انکپسولایون سبب ثبات و همچنین اثر ضد میکروبی بیشتری نسبت به حالت اسانس آزاد در برابر بیوفیلم / ستافیلوکوکوس / اورئوس در ظروف شیر می شود (Cui et al., 2016).

## ۲-۲- انکپسوله کردن روغن های اسانسی در نانوامولسیون

- سالویا-تروجر و همکاران (۲۰۱۳)، از روش میکروفلوئیدیزاسیون برای تهیه نانوامولسیون های روغن اسانسی *Lemongrass* استفاده کردند. نانوامولسیون های تهیه شده در ۱۵۰ MPa برای ۱۰ سیکل حداقل اندازه متوسط قطر ۶nm را نشان دادند. نتایج بدست آمده در این بررسی نشان داد که میکروفلوئیدیزاسیون می تواند به عنوان یک روش مناسب برای تهیه نانوامولسیون های روغن های اسانسی بکار رود.

- افشان و همکاران (۲۰۱۲)، با بررسی خواص ضد میکروبی اسانس و نانوامولسیون دارچین به این نتیجه رسیدند که خاصیت ضد میکروبی نانوامولسیون نسبت به اسانس در محیط *in vitro* بیشتر است. که علت آن می تواند به این دلیل باشد که نانوامولسیون ها توانایی انتقال ترکیب آنتی میکروبی از عرض غشا را دارد که در این صورت ترکیب می تواند داخل غشا شده و از داخل روی غشا اثر بگذارد، همچنین نانوامولسیون به عنوان حاملی عمل می کند که می تواند غلظت مد نظر ترکیب را داخل فاز آبی به میکروارگانیسم برساند (Afshan et al., 2012).

- مقیعی و همکاران (۲۰۱۵)، از روش اولتراسوند با شدت بالا برای تهیه نانوامولسیون های روغن های اسانسی *Thymus daenensis* استفاده کردند. در این تحقیق فعالیت اسانس خالص و اسانس

نانوامولسیون شده در برابر باکتری /شرشیا کلی با روش‌های اندازه‌گیری پتاسیم، پروتئین، نشت اسید نوکلئیک از سلول‌ها و میکروسکوپ الکترونی بررسی شد. نتایج حاصل از بررسی سینتیک غیر فعال کردن باکتری نشان داد که تمامی باکتری‌ها در ۵ دقیقه اول در حالت نانوامولسیون از بین رفته در حالی که تنها یک کاهش یک لگاریتمی برای حالت اسانس خالص صورت گرفت، که علت این امر بدلیل تقویت فعالیت ضدباکتری اسانس در حالت انکپسوله شده از طریق افزایش توانایی آن در مختل کردن یکپارچگی غشا سلولی است (Moghim et al., 2015).

- شهاوی و همکاران (۲۰۱۵)، از روش امواج فراصوت برای تهیه نانوامولسیون‌های روغن اسانسی میخک استفاده کردند. نانوامولسیون‌های تهیه شده با شدت  $208 \text{ W/cm}^2$  و سیکل ۷۵٪ و زمان ۳۰۰ ثانیه اندازه متوسط قطرک  $43 \text{ nm}$  را نشان دادند که اندازه ذرات بعد از ۶ ماه  $100 \text{ nm}$  بود. نتایج بدست آمده در این بررسی نشان داد که امواج فراصوت می‌تواند به عنوان یک روش مناسب برای تهیه نانوامولسیون‌های روغن‌های اسانسی بکار رود (Shahavi et al., 2015).

فصل سوم

مواد و روش ها

در این فصل مواد و تجهیزات مورد استفاده در تولید نانولیپوزوم و نانوامولسیون، مواد و روش‌های استفاده شده در بررسی اثر ضدباکتریایی این نانوحامل‌ها و همچنین چگونگی بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و پایداری آن‌ها شرح داده شده است.

### ۳-۱- مواد مورد استفاده در این تحقیق

فسفولیپید (بتا استیل- وای -او - آلکیل - ال - آلفا- فسفاتیدیل کولین) به‌دست آمده از لستین گاوی به صورت پودر لیوفیلیزه با درجه خلوص بیشتر از ۹۹٪ با نام (Lipoid) (Sigma، آلمان).

کلسترول<sup>۱</sup> (با درجه خلوص ۹۵٪، شرکت Merck آلمان).

کلروفرم، متانول (شرکت Merck آلمان).

آب مقطر استریل و یخ.

سورفکتانت‌های توپین ۸۰<sup>۲</sup> و اسپن ۸۰<sup>۳</sup> (شرکت Merck آلمان).

محیط‌های کشت مولر هینتون آگار<sup>۴</sup> و مولر هینتون براث<sup>۵</sup> (شرکت Merck آلمان).

محیط‌های کشت نوترینت آگار<sup>۶</sup> و نوترینت براث<sup>۷</sup> (شرکت Merck آلمان).

۱و۲-دی فنیل-۱- پیکریل-هیدرازیل<sup>۸</sup> (DPPH) (شرکت Sigma آمریکا).

---

<sup>۱</sup> Cholesterol

<sup>۲</sup> Tween 80

<sup>۳</sup> Span 80

<sup>۴</sup> Mueller Hinton Agar

<sup>۵</sup> Mueller Hinton Broth

<sup>۶</sup> Nutrient Agar

<sup>۷</sup> Nutrient Broth

<sup>۸</sup> 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

### ۳-۲- تجهیزات مورد استفاده

- همزن مغناطیسی (Jenwey، انگلستان).
- ترازوی دیجیتالی مدل BL310، با دقت ۰/۰۱، (Sartorius، آلمان).
- ترازوی حساس مدل HR-200 با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم (A&D، آلمان).
- دستگاه اندازه‌گیری اندازه ذرات (DLS) مدل Nanophox Sympatec GmbH ، (Shimadzo، ژاپن).
- میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) (مدل LEO440i، انگلستان).
- دستگاه GC مدل ۷۸۹۰A (Agilent Technologies، آمریکا).
- دستگاه GC-MS مدل Trace (Termo Finnigan، هلند).
- دستگاه هموژنیزاتور (Heidolph، آلمان).
- سانتریفوژ مدل 3-18 K (Sigma، آلمان).
- دستگاه اسپکتوفوتومتر نور مرئی مدل Ultrospec 2000 (Pulverhaus، آلمان).
- دستگاه پروب سونیکاتور (Sonics & Materials vibracell، انگلستان).
- دستگاه پروب سونیکاتور (مدل MPI، سوئیس).
- اتوکلاو.
- انکوباتور.
- هود استریل.
- لوازم و تجهیزات شیشه ای مانند: دماسنج، بشر، بالن ژوژه، ارلن، بورت، پیپت، پلیت، استوانه مدرج، پیپت، اسپاتول، مگنت و غیره.

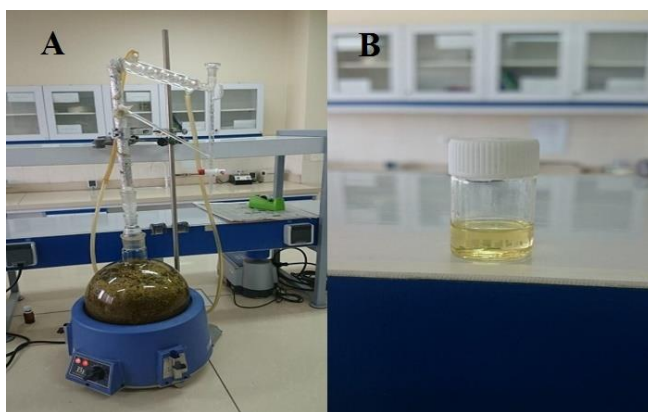
### ۳-۳- جمع آوری گیاه مریم گلی سهندیکا

گیاه *Salvia sahendica* از دامنه‌های کوه سهند واقع در اطراف تبریز (تبریز به سمت بستان آباد)، در فصل گل دهی آن یعنی خرداد ماه ۱۳۹۴ جمع آوری شد و توسط گروه گیاه‌شناسی پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی مورد شناسایی قرار گرفت.

### ۳-۴- روش‌ها

#### ۳-۴-۱- استخراج اسانس

ابتدا گیاه مذکور خرد شده، و اسانس گیری از آن با روش تقطیر با بخار آب به وسیله دستگاه کلونجر صورت گرفت (European Pharmacopoeia et, 2008). آب گیری از اسانس به وسیله افزودن اندکی سولفات سدیم انجام شد. اسانس بدون آب در ظرف تیره در یخچال در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  نگهداری شد (Gulluce et al., 2007).



شکل ۳-۱ تصویری از دستگاه کلونجر و اسانس مریم گلی

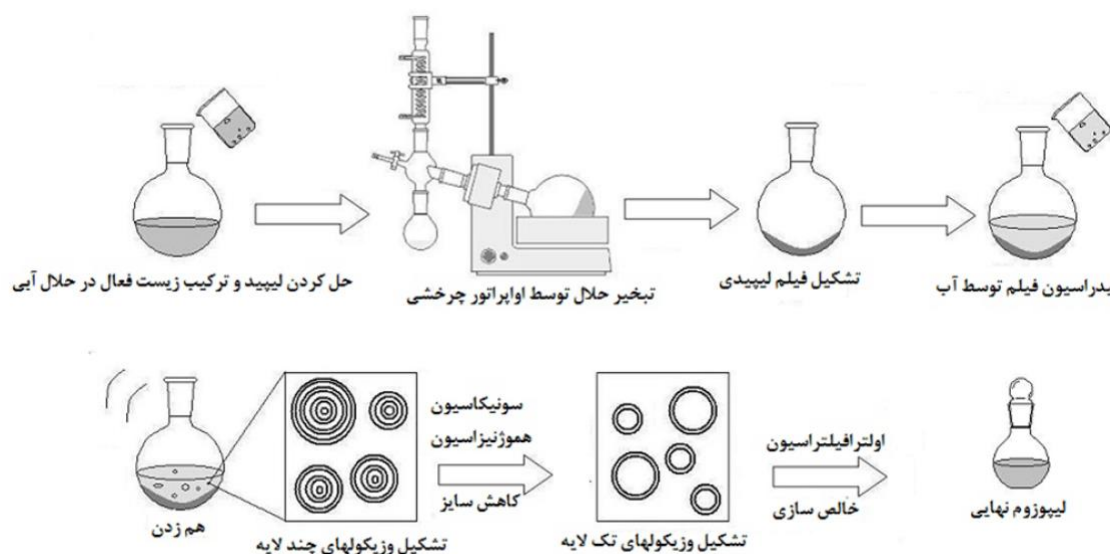
#### ۳-۴-۲- شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس

از دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) برای جداسازی و تعیین درصد هر یک از اجزای اسانس و از دستگاه کروماتوگرافی گازی کوپل شده با طیف سنج جرمی (GC-MS) برای شناسایی ترکیبات اسانس استفاده شد. شناسایی اجزای اسانس با استفاده از بانک اطلاعات جرمی، زمان بازداری، محاسبه‌ی

شاخص بازداري کواتس، مطالعه‌ی طیف‌های جرمی و مقایسه‌ی آنها با ترکیبات استاندارد انجام شد. جهت محاسبه‌ی شاخص کواتس از هیدروکربن‌های خطی اشباع به عنوان استاندارد استفاده شد. سپس درصد نسبی هر یک از ترکیبات تشکیل دهنده‌ی اسانس، با توجه به سطح زیر منحنی آن در کروماتوگرام دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) به روش نرمال کردن سطح و نادیده گرفتن ضرایب پاسخ بدست آمد (Gulluce et al., 2007).

### ۳-۴-۳ تولید نانولیپوزوم

برای تولید نانولیپوزوم از روش لایه نازک با اعمال تغییراتی در آن، استفاده شد (Fry et al., 1978). جهت تهیه نانولیپوزوم‌ها از نسبت‌های مختلف لستین-کلیسترو (۷۰-۲۰، ۸۰-۱۰، ۹۰-۱۰ mg) و اسانس مریم‌گلی استفاده گردید. بدین منظور برای تهیه نانولیپوزوم مریم‌گلی به روش لایه نازک غلظت‌های مختلف لستین و کلیسترو در ترکیبی از کلرفرم-متانول با نسبت ۲ به ۱ به طور کامل حل شد. محلول شفاف حاصل داخل بالن اواپراتور ریخته شد و به اواپراتور چرخشی تحت خلا وصل شد. تشکیل لایه در دمای °C ۴۵، خلا ۱۱۰، دور ۱۴۰ rpm و زمان ۶۰ دقیقه انجام گرفت. بعد از این مرحله حلال تبخیر شد و لایه نازکی در بالن تشکیل شد. ۶۰ μl از اسانس مریم‌گلی در این مرحله به لایه تشکیل شده اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه داخل اواپراتور چرخشی با دمای °C ۷۰ و با دور ۲۷۰ rpm مخلوط شد. برای هیدراسیون هم مخلوط آب مقطر- گلیسرول به نسبت ۶ به ۴ به بالن افزوده شد و دوباره در دمای °C ۷۰ به مدت ۲۵ دقیقه عمل هیدراسیون انجام گرفت. در این مرحله میکرونانولیپوزوم تشکیل شد. سپس برای کاهش اندازه آنها، لیپوزوم‌های تولیدی به مدت ۱۵ دقیقه در هموژنایزر با سرعت برشی بالا (۲۰۰۰۰ rpm) و دمای حدود °C ۶۰-۵۰ قرار گرفت. در مرحله آخر هم عمل پروب سونیکاسیون به اندازه ۱۰ سیکل ۱ دقیقه‌ای و فواصل زمانی استراحت ۱ دقیقه‌ای اعمال شد.



شکل ۳-۲ شمای تولید لیپوزوم به روش هیدراسیون لایه نازک

### ۳-۴-۴ تولید نانوامولسیون

به منظور تهیه نانوامولسیون از توپین ۸۰ و اسپن ۸۰ استفاده شد. نانوامولسیون حاوی ۲٪ وزنی سورفکتانت، ۹۶٪ وزنی آب و ۲٪ وزنی اسانس بود. به منظور تهیه HLBهای مختلف نسبت‌های جرمی متفاوت از دو سورفکتانت رابطه زیر محاسبه گردید (Shahavi et al., 2015).

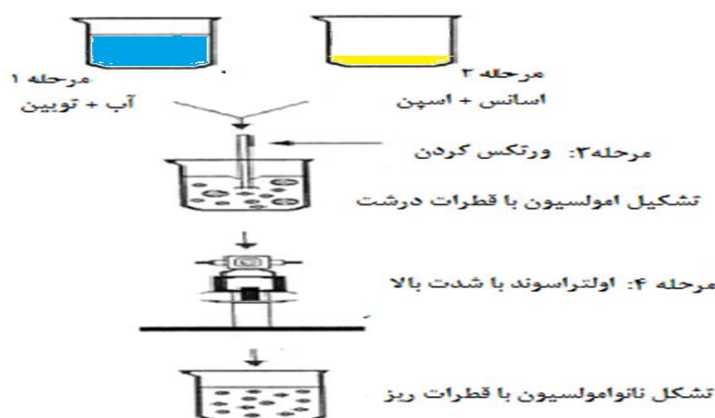
$$\text{HLB} = \frac{m_A \times \text{HLB}_A + m_B \times \text{HLB}_B}{m_A + m_B} \times 100 \quad \text{معادله ۳-۱}$$

$m_A$  و  $m_B$ : به ترتیب نسبت جرمی سورفکتانت A و B

$\text{HLB}_A$  و  $\text{HLB}_B$ : به ترتیب HLB سورفکتانت A و B

ابتدا توپین، اسپن، آب و اسانس به صورت جداگانه وزن شده و در ویال‌های شیشه‌ای جداگانه ریخته شدند، سپس آب روی توپین، و اسانس روی اسپن ریخته شد. پس از آن مخلوط اسانس و اسپن، به آب و توپین اضافه شد. در نهایت مخلوط حاصل ۱ دقیقه همزده شد و بعد از آن به مدت ۱۵ دقیقه توسط یک سونیکاتور آزمایشگاهی (مدل MPI، ساخت کشور سوئیس) با توان ۴۰۰ وات و فرکانس ۲۰/۵ کیلوهرتز تحت تاثیر امواج فراصوت قرار گرفت. برای انتقال امواج از ترانسدیوسر به نمونه از سونوترو

استوانه‌ای شکلی از جنس تیتانیوم به قطر ۸ mm که تا عمق ۱ cm زیر سطح مایع غوطه‌ور می‌شد، استفاده گردید (Shahavi et al., 2015).



شکل ۳-۳ شمای تولید نانوامولسیون به روش از امواج فراصوت

### ۳-۵- آزمون‌ها

#### ۳-۵-۱- آزمون اندازه‌گیری اندازه ذرات نانولیپوزوم و نانوامولسیون حاوی مریم‌گلی

از جمله عوامل موثر در تعیین ویژگی‌های سیستم‌های کلوئیدی اندازه و توزیع اندازه ذرات است. برای اندازه‌گیری اندازه ذرات، هر یک از سیستم‌های نانوحامل با آب مقطر ۲۰ برابر رقیق شدند و اندازه ذرات به وسیله دستگاه آنالیز اندازه ذرات (Nanophox Sympatec GmbH، ساخت آلمان) بر اساس روش تفرق نور لیزر اندازه‌گیری شدند. متوسط اندازه ذرات بر مبنای میانگین قطر حجمی محاسبه شدند (Marsanasco et al., 2011).

$$\bar{D}[4,3] = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad \text{معادله ۳-۲:}$$

توزیع اندازه ذرات نیز با استفاده از معادله زیر محاسبه شد (Teeranachaideekul et al., 2007):

معادله ۳-۳:

$$\text{Span} = \frac{D(90\%) - D(10\%)}{D(50\%)}$$

$D(90\%)$ : قطری است که حجم ذرات کوچکتر از آن، ۹۰٪ حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد.

$D(10\%)$ : قطری است که حجم ذرات کوچکتر از آن، ۱۰٪ حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد.

$D(50\%)$ : قطری است که حجم ذرات کوچکتر از آن، ۵۰٪ حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد (قطر میانه).



شکل ۳-۴ دستگاه اندازه‌گیری اندازه ذرات مدل Nanophox برای اندازه‌گیری قطر متوسط ذرات.

### ۳-۵-۲- تعیین کارایی درون‌پوشانی نانولیپوزوم و نانوامولسیون حاوی اسانس مریم‌گلی

برای تعیین کارایی درون‌پوشانی ابتدا منحنی کالیبراسیون توسط غلظت‌های مختلف اسانس مریم-

گلی و طی مراحل زیر رسم شد.

ابتدا غلظت مناسبی از اسانس مریم‌گلی با متانول تهیه و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر

(Ultraspec 2000، ساخت انگلیس) اسکن شد و طول موج ماکزیمم اسانس جهت انجام مراحل بعدی

اندازه‌گیری شد. در مرحله بعد با استفاده از متانول غلظت‌های مختلفی از اسانس مریم گلی تهیه شد. جذب‌ها در طول موج ۲۶۰ nm خوانده شد و منحنی کالیبراسیون با نرم‌افزار Excel 2013 رسم شد.

برای اندازه‌گیری کارایی درون‌پوشانی مقدار ۰/۵ cc از نانوحامل‌ها با ۳/۵ cc اتانول ۵۰٪ رقیق شد. این نمونه‌ها درون فیلتر آمیکون ریخته شد و سپس در سانتریفوژ با دور ۴۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت و جذب نمونه فیلتر شده در ۲۶۰ nm خوانده شد و در نهایت کارایی انکپسولاسیون با فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{معادله ۳-۴:} \quad \text{کارایی درون‌پوشانی} = \frac{\text{مقدار اسانس آزاد} - \text{مقدار کل اسانس اضافه شده}}{\text{مقدار کل اسانس اضافه شده}}$$



شکل ۳-۵ دستگاه اسپکتروفتومتر نور مرئی مدل Ultrospec 2000 ساخت انگلیس.

### ۳-۵-۳ - بررسی پایداری اندازه ذرات نانولیپوزوم و نانوامولسیون حاوی اسانس مریم گلی

پایداری بلند مدت نانوحامل‌های تولید شده با اندازه‌گیری تغییرات در اندازه قطره‌های آن و همچنین ظاهر آن‌ها در طی نگهداری در دمای آزمایشگاه (تقریباً ۲۵°C) به مدت ۳۰ روز بررسی شد. برای تعیین پایداری سیستم‌های نانوحامل، اندازه ذرات در روز اول، روز پنزدهم و روز سی‌ام با دستگاه اندازه‌گیری اندازه گرفته شد (Chanda et al., 2011).

### ۳-۵-۴- تعیین مورفولوژی نانوذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)<sup>۱</sup>

به منظور بررسی مورفولوژی نانوحامل‌ها، تأیید اندازه و پایداری آن‌ها طی مدت زمان نگهداری در مقیاس نانو (کوچکتر از ۱۰۰ نانو متر)، یک قطره از نمونه سوسپانسیونی از نانو حامل‌ها بر روی یک لایه از طلا قرار داده شده و پس از خشک شدن آن در دمای آزمایشگاه با استفاده از دستگاه الکترونی روبشی (SEM) (مدل LEO440i، ساخت انگلستان) تصویر برداری شد.



شکل ۳-۶ دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، به منظور بررسی مورفولوژی نانوحامل‌ها

### ۳-۵-۵- تعیین خاصیت آنتی‌اکسیدانی

توانایی از دست دادن اتم هیدروژن توسط ترکیبات آنتی‌اکسیدان با میزان بی‌رنگ کردن محلول بنفش ۲و۲-دی فنیل-۱-پیکریل-هیدرازیل (DPPH) در متانول مورد سنجش قرار می‌گیرد. این آزمایش با اعمال تغییراتی در مورد حامل‌های موجود انجام گردید (Akowuah et al, 2005). در این تست از DPPH به عنوان ترکیب رادیکالی پایدار استفاده گردید. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس قبل و بعد از کپسولاسیون ارزیابی شد. ابتدا محلول ۰/۰۰۸٪ DPPH با متانول تهیه شد. رقت‌های مختلف

<sup>۱</sup> Scanning electron microscope

نانولیپوزوم، نانوامولسیون و اسانس هم با متانول تهیه شد و جذب نوری نمونه‌ها پس از ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری در دمای اتاق، در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد.

درصد احیاکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH توسط رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{معادله: ۳-۵} = \frac{\text{جذب نمونه‌ها} - \text{جذب نمونه کنترل}}{\text{کنترل نمونه جذب}} \times 100 = \text{بازدارندگی درصد}$$

### ۳-۵-۶- بررسی اثرات ضد میکروبی نانولیپوزوم و نانوامولسیون حاوی اسانس مریم گلی

در این مطالعه که بصورت آزمایشگاهی انجام گرفت، به منظور بررسی مقایسه ضد میکروبی نانولیپوزوم و نانوامولسیون حاوی اسانس مریم گلی از طریق تعیین MIC (minimum inhibitory concentration) انجام گرفت. سه روش برای مشخص کردن MIC وجود دارد که شامل:

Disk diffusion

Broth micro dilution

E-test

روش دوم معتبر بوده و معمولاً از این روش استفاده می‌شود (Agarwal et al, 2001).

در روش ماکرو و میکرو دایلوژن، اثر رقت‌های متوالی از نانولیپوزوم و نانوامولسیون حاوی اسانس مریم گلی بر سوسپانسیون باکتری‌های مختلف به غلظت ۰/۵ مک فارلند ( $10^8 \times 1/5$ ) بررسی گردید.

### ۳-۵-۶-۱- آماده سازی نمونه های باکتری و قارچی:

باکتری‌های مورد مطالعه شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923، *اشرشیا کولی* ATCC 25922، *باسیلوس سرئوس* ATCC 11778، *موراکسلا کاتاهاریس* ATCC 25238 و نمونه قارچی شامل *کاندیدا آلبیکنس* بودند. نمونه‌های باکتریایی و قارچی از بانک میکروبی مرکز تحقیقات دارویی تبریز تهیه شدند. باکتری‌های اخذ شده از کلکسیون برای اطمینان یک بار روی محیط نوترینت آگار کشت داده شده و تک کلنی انتخاب گردید. سپس تک کلنی به صورت نقطه ای روی مولر هینتون آگار در تشتک پتری کشت شده و پس از رشد تا زمان استفاده جهت آزمون‌های بعدی در یخچال نگهداری

گردیدند. جهت انجام آزمون کلنی‌ها از کشت جامد به وسیله لوپ به محیط کشت MHA منتقل شده و به مدت ۲۴ ساعت تحت انکوباسیون با دمای  $37^{\circ}\text{C}$  قرار گرفتند.

### ۳-۵-۶-۲- تهیه کدورت استاندارد نیم مک فارلند

۰/۵ میلی‌لیتر از محلول ۰/۰۴۸ مولار  $\text{BaCl}_2$  به ۹۹/۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۰/۳۶ نرمال اضافه شد، به طور مداوم به هم زده شد تا محلول همگنی بدست آید، سپس OD محلول در طول موج ۶۲۵ نانومتر بررسی شد که باید بین ۰/۰۸ - ۰/۱ باشد. سپس از این محلول، نمونه‌های ۴-۶ میلی‌لیتری در لوله‌های آزمایش با درپوش محکم ریخته و پس از پوشاندن لوله با کاغذ آلومینیومی، در دمای اتاق در محل تاریک نگهداری شد (Mahon and Manuselis., 1995).

### ۳-۵-۶-۳- تهیه سوسپانسیون باکتری

یک روش برای تهیه سوسپانسیون باکتری این است که کلونی‌های ایزوله در محیط کشت ۱۸-۲۴ ساعته را به طور مستقیم در لوله‌های حاوی نرمال سالین تلقیح کرده تا کدورت معادل نیم مک فارلند ایجاد شود. این روش Direct Colony Suspension Method نامیده می‌شود.

سوسپانسیون باکتری با کدورت نیم مک فارلند حاوی  $10^6 \text{ CFU/ml}$  باکتری می‌باشد در صورتی که در تست‌های میکروبی، هر لوله یا چاهکی باید حاوی  $5 \times 10^5 \text{ CFU/ml}$  باکتری باشد. بدین منظور سوسپانسیون باید به نسبت ۱ به ۱۰۰ با محیط کشت مربوطه رقیق شود. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آن به هر لوله یا چاهک اضافه شود (Mahon and Manuselis., 1995).

---

<sup>۱</sup> Colony Forming Units

### ۳-۵-۶-۴ - آزمایش‌های رقتی (MIC)<sup>۱</sup>

MIC به معنی کمترین غلظت از یک ترکیب است که تحت شرایط استاندارد، از رشد قابل رویت ارگانیزم مورد آزمایش جلوگیری می‌کند، به بیان دیگر، این روش اندازه‌گیری کمی، در جهت انتخاب دوز آنتی‌بیوتیک استفاده می‌شود. این آزمایش به عنوان تست مرجع و استاندارد می‌باشد. این غلظت برای ترکیب ضد میکروبی، معمولاً بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای اسانس و عصاره بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیان می‌شود. استفاده از محیط کشت مایع به دو روش Macrobroth dilution و Microbroth dilution است که در اولی از لوله‌های آزمایش و حجم در حد میلی‌لیتر و در دومی از میکروپلیت‌ها و حجم در حد میکرولیتر استفاده می‌شود. معمولاً برای کارهای میکروبیولوژی از میکرو-پلیت‌ها استفاده می‌شود (Wood., 1995).

### ۳-۵-۶-۵ - MBC<sup>۲</sup>

MBC توانایی عامل آنتی‌بیوتیکی را در مهار تکثیر ارگانیزم بررسی می‌کند، لذا جهت ارزیابی توانایی یک آنتی‌بیوتیک برای کشتن میکروارگانیزم‌های بیماریزا تست فعالیت باکتریسیدال (Bactericidal activity test) انجام می‌شود که همان تعیین MBC است (Mahon and Manuselis., 1995).

### ۳-۵-۶-۶ - روش‌های انجام تست MIC و MBC

#### ۳-۵-۶-۶-۱ - روش میکرودايلوشن

از روش رقت سازی (میکرودايلوشن براث) برای تعیین MIC باکتری‌های /استافیلوکوکوس/ اورئوس و باسیلوس سرئوس استفاده شد.

○ تعیین کم‌ترین غلظت مهار کننده‌ی رشد (MIC)

<sup>۱</sup> Minimum Inhibitory Concentration

<sup>۲</sup> Minimum Bactericidal Concentration

برای تعیین این غلظت از روش رقت‌سازی در پلیت ۹۶ خانه استفاده شد. محیط کشت مورد استفاده، مولر هینتون براث و مراحل انجام کار به شرح زیر بود:

محلول استوک اولیه با غلظت  $2000 \mu\text{g/ml}$  با استفاده از محیط کشت NB (نوترینت براث) تهیه شد.

سری رقتی از ماده‌ی مورد بررسی (نانو حامل‌ها و اسانس)، در نوترینت براث تهیه شد (از  $1/95$  –  $1000 \mu\text{g/ml}$  با حجم نهایی  $100 \mu\text{l}$ ). سوسپانسیونی از کشت تازه ( $18-20$  ساعته) باکتری در نرمال سالین تهیه و کدورت آن با لوله‌ی نیم مک‌فارلند تنظیم شد. این سوسپانسیون به نسبت  $1:100$  با مولر نوترینت براث رقیق شد و سپس  $100 \mu\text{l}$  از آن به هر چاهک اضافه گردید. به این ترتیب در هر چاهک  $10^6 \times 1 - 0.5$  باکتری مورد سنجش وجود داشت. با اضافه شدن سوسپانسیون باکتری، غلظت نهایی ماده‌ی مورد بررسی در هر چاهک نصف می‌شد. پس از گرماگذاری، چاهک‌ها از لحاظ داشتن کدورت بررسی شده و کم‌ترین غلظت مهار کننده‌ی رشد، تعیین شده و بر اساس  $\mu\text{g/ml}$  ثبت می‌شد. در مورد موادی که پس از حل شدن در محیط کشت باعث ایجاد کدورت می‌شدند از معرف Resazurine برای تمیز چاهک‌های دارای رشد از چاهک‌های بدون رشد استفاده شد. محلول ذخیره‌ای از معرف، با غلظت نهایی  $4 \text{ mg/ml}$  در آب مقطر تهیه شده و با فیلتر  $0.2 \mu\text{m}$  استریل شد. از این محلول  $5 \mu\text{l}$  به هر چاهک و چاهک کنترل مثبت اضافه شده و پلیت بر روی شیکر قرار داده می‌شد. به محض تغییر رنگ چاهک کنترل مثبت (بنفش به سرخابی یا صورتی پر رنگ)، MIC تعیین و ثبت شد. برای همه‌ی آزمایش‌های تعیین MIC سه تکرار انجام گردید.

#### ○ کنترل کیفی غلظت آزمایش‌های تعیین (MIC)

کنترل‌ها شامل کنترل منفی (چاهکی که تنها حاوی  $200 \mu\text{l}$  محیط کشت مایع بود)، کنترل مثبت (چاهکی که حاوی  $100 \mu\text{l}$  محیط کشت و  $100 \mu\text{l}$  سوسپانسیون رقیق شده‌ی باکتری) بوده و همچنین تعداد CFU واقعی موجود در چاهک کنترل مثبت تعیین می‌گردید. بدین منظور پس از تمام شدن

مراحل تهیه‌ی سری رقت و اضافه شدن باکتری به چاهک‌ها و درست پیش از گرماگذاری پلیت‌ها، رقت ۱:۱۰۰۰ از محتویات چاهک کنترل مثبت در سالین نرمال<sup>۱</sup> تهیه شده و ۱۰۰ میکرولیتر از آن بر روی محیط کشت جامد مناسب (نوترینت آگار) کشت داده می‌شد. پس از گرماگذاری به مدت ۲۴ ساعت، کلنی‌ها شمارش می‌شدند. در صورتی که سوسپانسیون باکتری مورد استفاده، حاوی تعداد صحیحی از سلول‌های فعال می‌بود تعداد کلنی‌ها ۵۰-۱۰۰ عدد می‌شد.

### ○ تعیین کمترین غلظت کشندگی (MBC)

MBC به معنای غلظتی از ماده‌ی مورد بررسی است که سبب از بین رفتن % ۹۹/۹ از تعداد باکتری مورد بررسی می‌گردد. برای تعیین این غلظت، ۱۰۰ µl از محتویات هر چاهک بدون رشد، پس از هم‌زدن، بر روی یک پلیت نوترینت آگار پخش شده و به شکل چمنی کشت داده می‌شد. گرماگذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای مناسب انجام شده و کم‌ترین غلظتی که سبب از بین رفتن % ۹۹/۹ از تعداد شمارش اولیه‌ی باکتری شده بود، به عنوان MBC ثبت می‌گردید. تعداد باکتری‌ها با توجه به نتایج کنترل کیفی آزمایش‌های تعیین MIC مشخص می‌شد. به عنوان مثال در صورتی که شمارش اولیه باکتری در مرحله‌ی کنترل کیفی، ۷۰ عدد می‌بود، غلظت متناظر اولین پلیتی که حاوی کم‌تر از ۷ کلنی بود به عنوان MBC ثبت می‌شد.

### ۳-۵-۶-۲- روش ماکرودایلوشن

از روش رقت سازی (میکرودایلوشن براث) برای تعیین MIC اشرشیاکلی، موراکسلا کاتارالیس و قارچ کاندیدا آلبیکنس استفاده شد.

محلول استوک اولیه با غلظت ۱۰۰۰۰ µg/ml با استفاده از محیط کشت NB (نوترینت براث) تهیه شد.

سایر غلظت‌ها، با روش serial dilution از محلول استوک اولیه بدست آمد. به این ترتیب که با انتقال حجم مشخصی از محلول استوک به حجمی برابر از حلال (محیط کشت) حجم دو برابر شده و غلظت محلول حاصل، نصف غلظت محلول استوک شد. تمامی غلظت‌ها به همین روش تهیه شدند. در مرحله بعد، هم حجم غلظت تهیه شده، سوسپانسیون باکتریایی اضافه شد و نمونه‌ها، به مدت ۲۴ ساعت در  $37^{\circ}\text{C}$  انکوبه شد. بعد از ۲۴ ساعت، در لوله‌هایی که باکتری رشد کرده بود کدروت مشاهده شد. بعد از انکوباسیون، هر یک از این غلظت‌ها در محیط کشت جامد نوترینت آگار کشت داده شدند و دوباره به مدت ۲۴ ساعت در  $37^{\circ}\text{C}$  انکوبه شدند. در نهایت بعد از این زمان، رشد و یا عدم رشد باکتری‌ها در غلظت‌های مختلف عصاره و نانوحامل بررسی شد.

سایر مراحل مطابق روش‌های ذکر شده برای میکرودايلوشن انجام گرفت.

### ۳-۶- محل انجام پروژه

محل انجام پروژه، آزمایشگاه‌های گروه فرمولاسیون دارویی و آزمایشگاه میکروبی مرکز تحقیقات کاربردی - دارویی (ساختمان پشمینه) تبریز بود.

### ۳-۷- طرح آماری آزمایش‌ها

آزمون‌های فیزیکی و شیمیایی بر اساس طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در هریک از سیستم‌های نانو حامل انجام پذیرفت. برای تحلیل داده‌ها از آزمون واریانس یک طرفه و آزمون مقایسه میانگین - های دانکن در سطح ۵٪ استفاده شد. نرم افزار آماری SPSS ۱۶ در تحلیل داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

فصل پہلے ہمارم

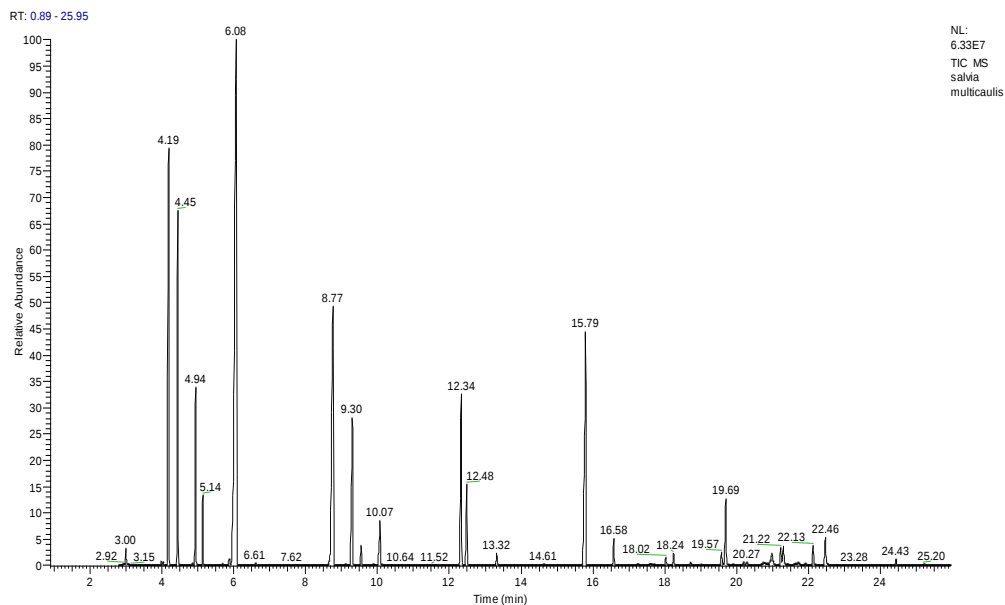
نتائج و بحث

#### ۴-۱- استخراج اسانس گیاه مریم گلی (*Salvia sahandica*)

استخراج اسانس گیاه مریم گلی به وسیله‌ی دستگاه کلونجر صورت گرفت. این گیاه دارای ۵/۰٪ وزنی- وزنی اسانس بود. اسانس استخراج شده در دمای ۴۰°C و به دور از نور نگهداری شد. ترکیبات اسانس با کمک دستگاه GC-MS شناسایی شد.

#### ۴-۱-۱- طیف GC-MS اسانس مریم گلی

کروماتوگرام GC-MS این گیاه در شکل ۴-۱ قابل مشاهده می باشد. نام، شاخص بازداری، درصد و روش شناسایی این اجزا به ترتیب خروج در جدول ۴-۱ آورده شده اند.



شکل ۴-۱ کروماتوگرام GC-MS اسانس مریم گلی

#### ۴-۱-۲- آنالیز اسانس مریم گلی

آنالیز اسانس گیاه مریم گلی به کمک دستگاه GC-MS نشان داد که ترکیبات ۱/۸ سینئول با ۲۹/۶۷٪، آلفا پینن با ۱۴/۶۷٪، آلکانفور با ۱۲/۶۱٪، کامفن با ۸/۶۳٪، کاریوفیلین با ۸/۴۶٪ و بورنیل استات با ۵/۵۹٪ بیشترین ترکیبات اسانس را تشکیل می‌دهند. در مجموع ۲۲ ترکیب از اسانس گیاه مریم گلی شناسایی شد که در جدول ۴-۱ قابل مشاهده است.

جدول ۴-۱ شناسایی ترکیبات اسانس

| ردیف | نام ترکیب           | شاخص بازداری | درصد  | روش شناسایی |
|------|---------------------|--------------|-------|-------------|
| ۱    | $\alpha$ -Pinene    | ۹۳۴          | ۱۴/۶۷ | RI-MS       |
| ۲    | Camphene            | ۹۴۹          | ۸/۶۳  | RI-MS       |
| ۳    | $\beta$ -Pinene     | ۹۷۷          | ۳/۹۱  | RI-MS       |
| ۴    | $\beta$ -Myrcene    | ۹۸۸          | ۱/۲۴  | RI-MS       |
| ۵    | p-Cymene            | ۱۰۲۴         | ۰/۱۹  | RI-MS       |
| ۶    | 1.8 Cineol          | ۱۰۳۳         | ۲۹/۶۷ | RI-MS       |
| ۷    | Alcanfor            | ۱۱۵۰         | ۱۲/۶۱ | RI-MS       |
| ۸    | Borneol             | ۱۱۷۱         | ۵/۰۸  | RI-MS       |
| ۹    | 4-Terpineol         | ۱۱۸۱         | ۰/۴۵  | RI-MS       |
| ۱۰   | Myrtenol            | ۱۲۰۳         | ۱/۴۷  | RI-MS       |
| ۱۱   | Bornyl acetate      | ۱۲۸۸         | ۵/۵۹  | RI-MS       |
| ۱۲   | Sabinyol acetate    | ۱۲۹۴         | ۲/۲۳  | RI-MS       |
| ۱۳   | Myrtenyl acetate    | ۱۳۲۶         | ۰/۳۱  | RI-MS       |
| ۱۴   | Caryophyllene       | ۱۴۲۴         | ۸/۴۶  | RI-MS       |
| ۱۵   | Humulene            | ۱۴۵۷         | ۰/۶۷  | RI-MS       |
| ۱۶   | $\delta$ -Amorphene | ۱۵۱۶         | ۰/۲۴  | RI-MS       |
| ۱۷   | $\delta$ -Cadinene  | ۱۵۲۶         | ۰/۳۲  | RI-MS       |
| ۱۸   | Spathulenol         | ۱۵۸۲         | ۰/۴   | RI-MS       |
| ۱۹   | Caryophyllene oxide | ۱۵۸۸         | ۲/۱۲  | RI-MS       |
| ۲۰   | $\beta$ -Eudesmol   | ۱۵۵۶         | ۰/۵۴  | RI-MS       |
| ۲۱   | $\alpha$ -Eudesmol  | ۱۶۵۹         | ۰/۶۳  | RI-MS       |
| ۲۲   | Shyobunol           | ۱۶۹۶         | ۰/۵۹  | RI-MS       |

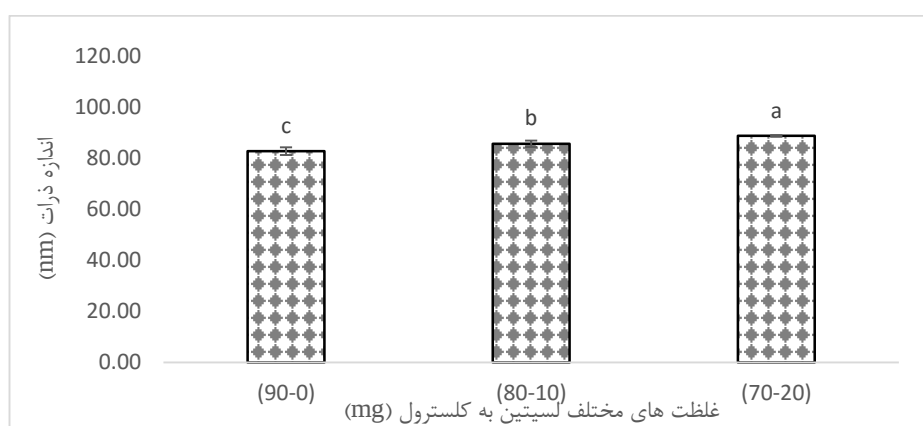
#### ۴-۲- تعیین اندازه و توزیع اندازه ذرات

اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات سیستمهای کلونیدی مانند نانولیپوزومها و نانوامولسیونها اهمیت ویژه‌ای در تعیین خصوصیات آنها دارد. هر چه اندازه ذرات کوچکتر باشد، نسبت سطح به حجم بالاتر است. این دو عامل رابطه معکوس با هم دارند، به طوریکه کاهش ۱۰ برابری اندازه ذرات باعث افزایش

۱۰ برابری سطح ویژه ذرات می‌شود. بنابراین برای موادی که دسترسی زیستی پایینی دارند (به علت کم محلولی)، کاهش ۱۰ برابری اندازه، افزایش ۱۰ برابری حلالیت و دسترسی زیستی را در پی دارد (Schott.,1985). از طرف دیگر، اندازه ذرات کوچکتر باعث بالاتر شدن کارایی کپسولاسیون می‌شود. همچنین ثابت ماندن این دو پارامتر در طی یک دوره زمانی نشان دهنده پایداری کلئیدی آن سیستم است. ماهیت حامل، ماهیت ماده زیست‌فعال، فرمولاسیون، روش تولید، نسبت حامل به ماده فعال، حلال مورد استفاده و شرایط محیطی مانند دما از جمله پارامترهای مؤثر بر اندازه ذرات وزیکول‌ها می‌باشند (Heurtault et al., 2003).

#### ۴-۲-۱- تعیین اندازه و توزیع اندازه ذرات در نانولیپوزوم

نتایج متوسط قطر حجمی و توزیع اندازه ذرات نانولیپوزوم‌ها به ترتیب در شکل و جدول ۴-۲ ارائه شده است.



شکل ۴-۲ تأثیر تغییر غلظت لستین به کلسترول بر اندازه ذرات نانولیپوزومی (حروف غیر مشابه نشاندهنده وجود اختلاف در سطح ۵٪ در آزمون دانکن است).

جدول ۲-۴ تأثیر تغییر غلظت لستین به کلسترول بر توزیع اندازه ذرات نانولیپوزومی (حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف در سطح ۵٪ در آزمون دانکن است).

| غلظت‌های لستین-<br>کلسترول | توزیع اندازه ذرات |
|----------------------------|-------------------|
| ۹۰-۰                       | $0.42 \pm 0.20^a$ |
| ۸۰-۱۰                      | $0.39 \pm 0.15^a$ |
| ۷۰-۲۰                      | $0.40 \pm 0.05^a$ |

متوسط قطر حجمی و توزیع اندازه ذرات (اسپن) به ترتیب در محدوده ۸۳ تا ۸۹ نانومتر و ۰/۳۹ تا ۰/۴۲ قرار دارند. نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف لستین-کلسترول بر توزیع اندازه ذرات معنی‌دار نبود اما تیمارهای مختلف از لحاظ اندازه با یکدیگر اختلاف معنی‌داری دارند ( $p < 0.05$ ). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین اندازه ذرات متعلق به تیمار حاوی ۲۰ mg کلسترول (۲۰-۷۰) و کمترین آن مربوط به تیمار فاقد کلسترول (۰-۹۰) می‌باشد. در غشاهای لیپوزومی که غنی از فسفاتیدیل کولین هستند، به دلیل حضور گروه‌های قطبی بزرگ در سر فسفولیپید، فضاهای خالی در ساختار ایجاد می‌شود که در این شرایط گروه‌های آسیل که در دم قرار دارند، طوری جهت‌گیری می‌کنند که هم فضاهای خالی ایجاد شده را کمتر کنند و هم بیشترین تماس را با هم داشته باشند. حضور کلسترول، ساختار قرار گیری لیپید و جهت‌گیری زنجیره‌های آسیل در دو لایه لیپیدی را تغییر می‌دهد. به این صورت که گروه‌های هیدروکسیل کلسترول با ایجاد پیوند هیدروژنی با گروه‌های کربونیل استری، زنجیره‌های آسیلی که به یک سمت کج شده‌اند را به صورت مستقیم و مرتب نگه می‌دارد و فضاهای ایجاد شده بین آنها را پر می‌کند (Nagle and Tristram-Nagle., 2000). قرار گرفتن کلسترول در ساختار دولایه‌ای منجر به افزایش تراکم چیدمان مولکول‌های فسفولیپیدی می‌شود. گزارش‌های مختلف و متضادی در مورد اثر کلسترول بر اندازه لیپوزوم‌ها ارائه شده‌اند. در پژوهشی افزودن کلسترول منجر به سفتی ساختار لیپوزومی و افزایش اندازه

ذرات شد (Tseng et al., 2007). در مطالعه‌ای که به منظور بررسی خواص فیزیکی و شیمیایی نانولیپوزوم‌های حاوی گاما اوریزانول انجام شد، مشاهده گردید افزودن کلسترول به لستین سبب کاهش اندازه ذرات از ۷۲ به ۶۳ نانومتر شد (Viriyaroj et al., 2009). در این تحقیق افزودن کلسترول سبب تغییر مشخصی در اندازه ویزیکول‌ها ایجاد کرده است که می‌تواند به این دلیل باشد که قرارگیری کلسترول در ساختار لیپوزومی باعث افزایش تراکم مولکول‌های فسفولیپید و سفتی ساختار لیپوزومی و در نتیجه افزایش اندازه ذرات شده است (Chong and Choate 1989). در تطابق با پژوهش جاری، مالهیروس و همکاران با کپسوله کردن ناپسین و ماده‌ی شبه باکتریوسین بنام p34 در لیپوزوم مشاهده کردند که افزودن کلسترول تاثیری بر توزیع اندازه ذرات نداشت اما باعث افزایش قطر ویزیکول‌ها گردید (Malheiros et al., 2012). فریسکن و همکاران نیز از روش اکستروژن برای تولید ویزیکول‌های لیپوزومی متشکله از دی‌پالمیتوئیل فسفاتیدیل کولین استفاده کرده و گزارش کردند که افزودن کلسترول منجر به افزایش اندازه ذرات شد ولی تغییری در توزیع اندازه ذرات ایجاد نکرد (Friskien et al., 2000).

توزیع اندازه ذرات یکی از عوامل مهم در پایداری فیزیکی نانوحامل‌هاست. محدوده ۰/۱ – ۰/۲۵ توزیع اندازه ذرات بسیار باریک را نشان می‌دهد. محدوده اندازه ذرات بالاتر از ۰/۵ نشان دهنده پهن بودن توزیع اندازه ذرات است (Lakshmi & Kumar., 2010). توزیع اندازه ذرات در این مطالعه برای هر سه تیمار کمتر از ۰/۵ و باریک بود. از عواملی که در این نتیجه اثر گذار بود می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

• یکنواخت بودن لایه تولیدی در تولید نانولیپوزوم؛

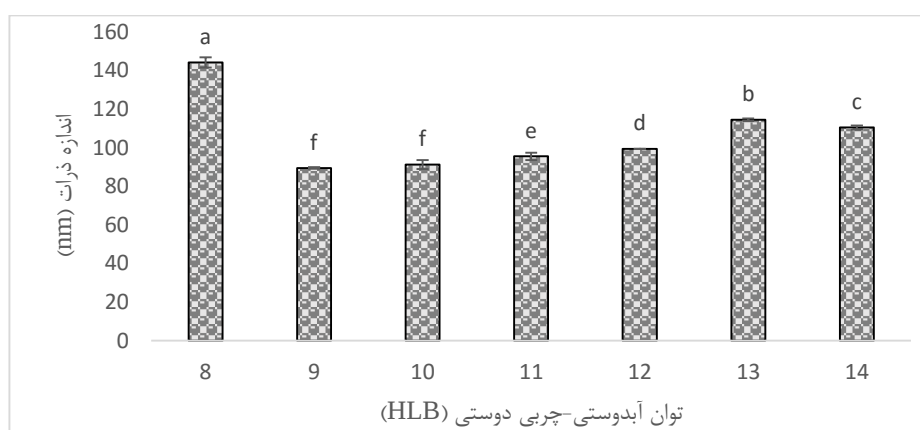
• روش درست هموژنیزاسیون و پروب سونیکاسیون.

در روش لایه نازک، لایه تولید شده در مرحله اولیه یکنواخت و نازک بود در مرحله هیدراسیون، ذرات یکنواخت‌تری از نظر اندازه و توزیع اندازه ذرات تولید شد. در واقع از تمام قسمت‌ها لایه فسفولیپیدی به یک اندازه و مقدار، با اسانس مریم‌گلی برهم‌کنش انجام داد. در مرحله پروب

سونیکاسیون هم پروب در نزدیکی سطح و در وسط مایع قرار گرفت که باعث باریک شدن محدوده اندازه ذرات شد.

#### ۴-۲-۲- تعیین اندازه و توزیع اندازه ذرات در نانوامولسیون‌ها

نتایج متوسط قطر حجمی و توزیع اندازه ذرات نانوامولسیون‌ها به ترتیب در شکل و جدول ۳-۴ ارائه شده است.



شکل ۳-۴ اندازه ذره‌ای نانوامولسیون‌ها در HLBهای مختلف (حروف غیر مشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف در سطح ۵٪ در آزمون دانکن است).

جدول ۳-۴ توزیع اندازه ذرات نانوامولسیون‌ها در HLBهای مختلف (حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود

اختلاف در سطح ۵٪ در آزمون دانکن است).

| اسپین              | توان آبدوستی-چربی دوستی (HLB) |
|--------------------|-------------------------------|
| $0.36 \pm 0.047^a$ | ۸                             |
| $0.38 \pm 0.017^a$ | ۹                             |
| $0.40 \pm 0.02^a$  | ۱۰                            |
| $0.40 \pm 0.03^a$  | ۱۱                            |
| $0.41 \pm 0.015^a$ | ۱۲                            |
| $0.39 \pm 0.050^a$ | ۱۳                            |
| $0.39 \pm 0.015^a$ | ۱۴                            |

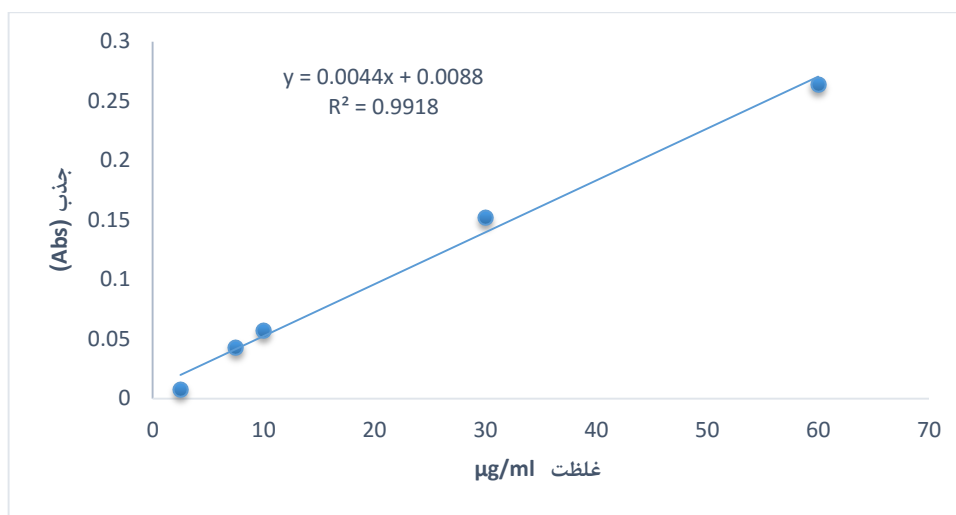
متوسط قطر حجمی و توزیع اندازه ذرات (اسپن) به ترتیب در محدوده ۱۴۴ - ۸۹ و ۰/۴۱ - ۰/۳۶ نانومتر قرار دارند. نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که اثر HLBهای مختلف بر توزیع اندازه ذرات معنی دار نبود اما تیمارهای مختلف از لحاظ اندازه با یکدیگر اختلاف معنی داری دارند ( $p < 0.05$ ). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین اندازه ذرات متعلق به تیمار با HLB ۸ و کمترین آن مربوط به تیمار HLBهای ۹ و ۱۰ می باشد. توزیع اندازه ذرات در مورد نانوامولسیون ها همانند نانولیپوزوم ها کمتر از ۰/۵ و باریک بود.

برای تهیه نانوامولسیون با اندازه قطرات پایدار استفاده از سورفاکتانت ضروری است. توپین ۸۰ و اسپن ۸۰ معمولاً به دلیل درجه بالایی از سازگاری با اجزای دیگر و سمیت پایین به عنوان سورفاکتانت های بی خطر مورد استفاده قرار می گیرند. اسپن ۸۰ یک سورفاکتانت ویسکوز، چربی دوست و یک معرف امولسیون کننده است. توپین ۸۰ یک مشتقی از اسپن ۸۰ است که به طور طبیعی آب دوست است، و در آب حلالیت بیشتری نسبت به روغن دارد. برای داشتن یک نانوامولسیون پایدار یکی از شرایط برقراری توازن بین ویژگی های آب دوستی و چربی دوستی است. بنابراین از مخلوط اسپن ۸۰ و توپین ۸۰ استفاده می شود. این سورفاکتانت های غیر یونی که مولکول های بدون بار می باشند به عنوان محصولاتی بی خطر و زیست سازگار شناخته می شوند که تحت تاثیر تغییرات pH مخلوط قرار نمی گیرند (Shahavi et al., 2015).

طبق مطالعات گذشته برای نانوامولسیون ها، محدوده اندازه بسیار متفاوتی از جمله کمتر از ۱۰۰ ، ۱۰۰-۱۰۰ ، ۵۰۰-۱۰۰ و ۶۰۰-۱۰۰ نانومتر گزارش شده است، ولی اندازه کوچکتر از ۱۰۰ نانومتر برای به دست آوردن ویژگی های بهتری نسبت به امولسیون های معمول مناسب تر است (Shakeel and Ramadan., 2010, McClements and Li., 2010). در نتیجه از بین نمونه های مختلف آن هایی که اندازه کمتر از ۱۰۰ نانومتر را داشتند برای ادامه کار انتخاب شدند.

### ۴-۳- تعیین کارایی کپسولاسیون

در این پژوهش، جهت ارزیابی کارایی کپسولاسیون، میزان اسانس کل بر حسب میلی گرم بر گرم نمونه، قبل و بعد از کپسولاسیون اندازه گیری شد. شکل ۴-۴ نشانگر منحنی استاندارد اسانس مریم گلی است که از روی آن کپسولاسیون نانوحامل ها محاسبه شده است.

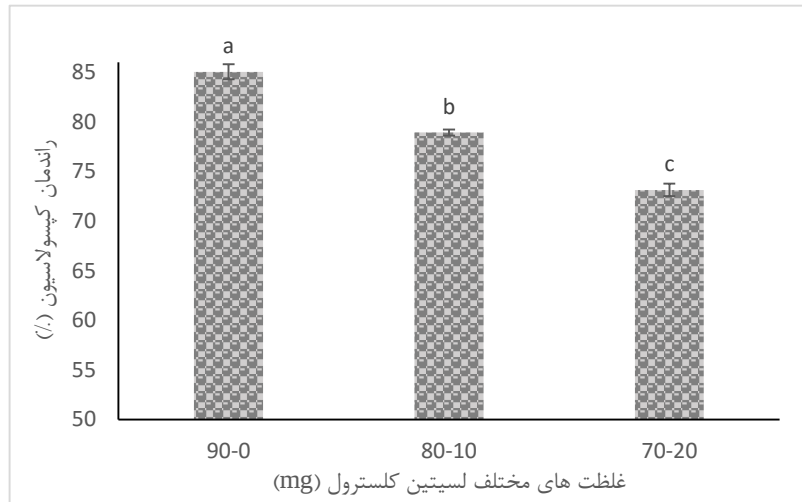


شکل ۴-۴ منحنی استاندارد اسانس مریم گلی با اسپکتوفتومتری

### ۴-۳-۱ کارایی کپسولاسیون نانولیپوزوم ها

کارایی کپسولاسیون به ماهیت ماده فعال (لیپوفیل بودن یا هیدروفیل بودن) و تمایل آن به برهمکنش با ساختار دولایه ای غشا، ماهیت فسفولیپید (خالص یا مخلوط بودن و نوع اسید چرب)، نسبت فسفولیپید به ماده فعال، مواد تشکیل دهنده دو لایه فسفولیپیدی، روش تولید لیپوزوم، غلظت و نوع پایدارکننده و همچنین شرایط محیطی (pH، درجه حرارت) بستگی دارد.

شکل ۴-۵، کارایی کپسولاسیون ۳ غلظت مختلف لستین-کستروول را نشان می دهد. کارایی کپسولاسیون نمونه ها در محدوده ۷۳-۸۵ قرار داشت.



شکل ۴-۵ تأثیر تغییر غلظت لستین-کلسترول بر کارایی درون پوشانی  
(حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ می باشد).

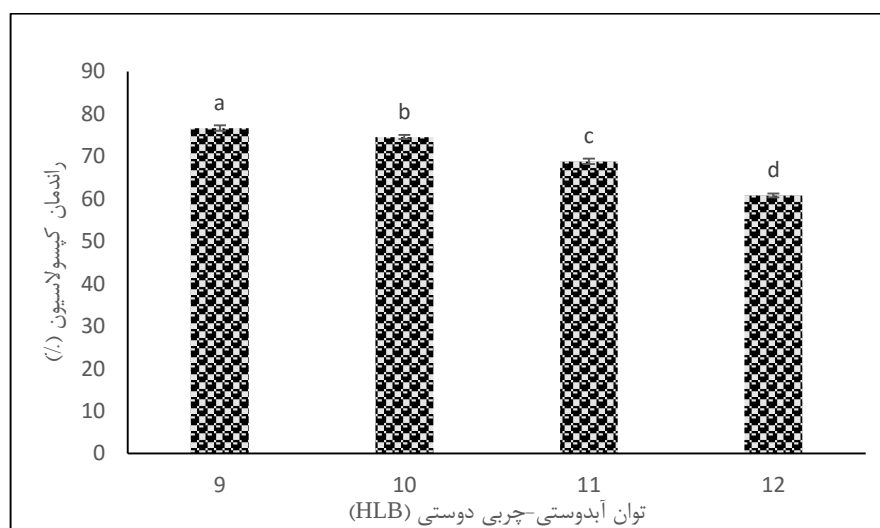
طبق نتایج اثر غلظت های مختلف لستین-کلسترول بر کارایی درون پوشانی نمونه های لیپوزومی معنی دار بود ( $p < 0.05$ ). بیشترین میزان کارایی درون پوشانی مربوط به تیمار فاقد کلسترول و حاوی ۹۰mg لستین بود که مقدار آن  $85.0 \pm 0.75\%$  درصد بدست آمد و افزایش غلظت کلسترول باعث کاهش کارایی کپسولاسیون گردید و کمترین میزان کارایی مربوط به تیمار حاوی ۷۰mg لستین و ۲۰mg کلسترول بود که مقدار آن به ۷۳٪ رسید. بنابراین در نانولیپوزوم تیمار حاوی ۹۰mg لستین به عنوان شرایط بهینه کپسولاسیون در نظر گرفته شده است. از آنجایی که فسفولیپیدها، ساختمان اصلی لیپوزوم را تشکیل می دهند، لذا احتمالاً هر چه میزان غلظت فسفولیپید بالاتر باشد، میزان ترکیب فعال بیشتری کپسوله خواهد شد. افزایش آگریزی سطحی توسط کلسترول، تمایل اتصال مواد فعال آبدوست به سطح لیپوزوم را کاهش می دهد. نتایج این پژوهش با نتایج Malheiros و همکاران (۲۰۱۲) مطابقت داشت، بطوری که افزودن کلسترول در لیپوزوم های حاوی نایسین باعث کاهش کارایی کپسولاسیون شد.

نتایج Liu و Park (۲۰۱۰) نشان داد که در نسبت ۶۰ به ۴۰ فسفاتیدیل کولین به کلسترول، حداکثر بارگذاری ویتامین C در لیپوزوم های پوشش داده شده با کیتوزان و تهیه شده با تزریق حلال اتانول

مشاهده می‌شود و در مقادیر بالاتر و کمتر از آن نسبت کارایی کاهش می‌یابد. در مطالعه دیگری، محمد و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند، افزایش غلظت کلسترول تا  $4\mu\text{mol}$  تأثیر معنی‌داری روی درصد کپسولاسیون ایبوپروفن نداشت اما افزایش غلظت آن به  $8\mu\text{mol}$  و  $16\mu\text{mol}$  باعث کاهش عمده درصد کپسولاسیون شد. این محققین دلیل این مسئله را به دو صورت متناقض بیان کردند: اول اینکه با افزایش میزان کلسترول، میزان هیدروفوب بودن و پایداری افزایش و میزان نفوذپذیری لیپوزوم‌ها کاهش می‌یابد در نتیجه حین تشکیل لیپوزوم، ایبوپروفن بطور کارآمدی کپسوله خواهد شد. از طرف دیگر غلظت‌های بالای کلسترول با ایبوپروفن در کیپ کردن فضای لایه‌های لیپوزومی رقابت کرده و باعث می‌شود دارو به صورت ترکیبات آمفی‌فیل به لیپوزوم‌ها اتصال یابد (Mohammed et al., 2004).

#### ۴-۳-۲- کارایی کپسولاسیون نانوامولسیون‌ها

شکل ۴-۶ کارایی کپسولاسیون ۴ HLB مختلف نانوامولسیون را نشان می‌دهد. کارایی کپسولاسیون نمونه‌ها در محدوده ۷۶-۶۰٪ قرار داشت.



شکل ۴-۶ تأثیر تغییر HLBهای مختلف بر کارایی درون پوشانی

(حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد).

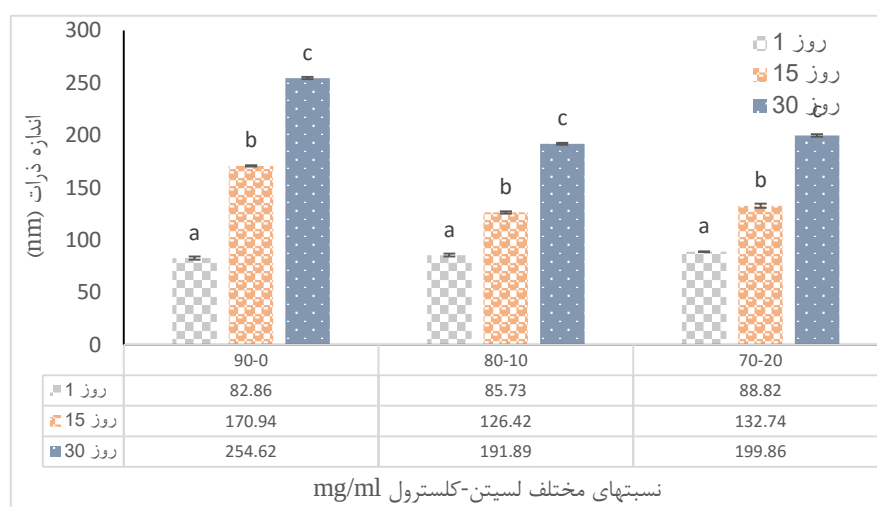
طبق نتایج اثر HLBهای مختلف بر کارایی درون پوشانی نمونه‌های نانوامولسیون معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). بیشترین میزان کارایی درون پوشانی مربوط به تیمار با HLB 9 که مقدار آن  $76.67 \pm 0.65$  بود.

درصد بدست آمد و افزایش توپین باعث کاهش کارایی کپسولاسیون گردید و کمترین میزان کارایی مربوط به تیمار با HLB 12 که مقدار آن به ۶۰٪ رسید. بنابراین در نانوامولسیون تیمار با HLB 9 به عنوان شرایط بهینه کپسولاسیون در نظر گرفته شده است.

#### ۴-۴- بررسی پایداری اندازه ذرات نانوحاملها

##### ۴-۴-۱- بررسی پایداری اندازه ذرات نانولیپوزومها

با توجه به شکل ۴-۷ اندازه ذرات نانولیپوزومها پس از یک ماه نگهداری پایداری خوبی نشان دادند، به طوریکه این افزایش در اندازه ذرات طبیعی در نظر گرفته می‌شود. همان طوری که ملاحظه می‌شود، اندازه ذرات تمامی فرمولاسیونها در طی زمان اختلاف معنی‌داری نشان داد.



شکل ۴-۷ تأثیر زمان نگهداری بر اندازه ذرات در غلظتهای مختلف لستین به کلسترول (A): ۹۰-۰، (B): ۸۰-۲۰ و (C): ۷۰-۳۰ (حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف در سطح ۵٪ در آزمون دانکن است).

یکی از معیارهای پایداری سیستمهای کلئیدی از جمله لیپوزومها، پایداری اندازه ذرات با گذشت زمان می‌باشد. افزایش اندازه ذرات به بیش از یک میکرومتر و کاهش در تعداد ذرات در طول زمان می‌تواند

نشانگر ناپایداری فیزیکی باشد. به علت اینکه چگالی لیپیدهای قطبی (ماده اصلی تشکیل دهنده لیپوزوم-ها) به چگالی آب نزدیک است پدیده تفکیک گرانشی که عامل مهمی در ناپایداری فیزیکی نانوامولسیون-ها به شمار می‌آیند، در لیپوزوم‌ها کمتر دیده می‌شود. پدیده انبوهش<sup>۱</sup> و هم‌آمیختگی<sup>۲</sup> مکانیسم‌های اصلی ناپایداری در لیپوزوم‌ها محسوب می‌گردند. انبوهش فرایندی است که به موجب آن دو یا چند قطره گرد هم می‌آیند تا تجمعی را تشکیل دهند که در آن تجمع هر یک از قطرات تمامیت منحصر به فرد خود را حفظ می‌کنند. انبوهش از طریق فرآیندهای مختلف که باعث افزایش نیروهای جاذبه یا کاهش نیروهای دافعه می‌شود اتفاق می‌افتد. هم‌آمیختگی نیز فرایندی است که در آن دو یا چند قطره در اثر تماس با هم ادغام می‌شوند و تشکیل یک قطره بزرگ را می‌دهند.

نیروهای جذبی بین ذرات باعث چسبیدن آنها به هم و تشکیل ساختارهای بزرگتر می‌شود. انبوهش منجر به تشکیل واحدهای بزرگتر می‌شود که از لیپوزوم‌های تکی تشکیل یافته‌اند. در واقع این فرآیند با وارد کردن نیروهای ملایم برگشت پذیر است. در کل منشأ وزیکول‌های توده‌ای شده، نیروهای واندروالس است. در صورت پیشرفت فرآیند انبوهش، لیپوزوم‌ها با هم آمیخته شده (کوالسنس) و لیپوزوم-های بزرگتر را ایجاد می‌نمایند (Heurtault et al., 2003). در این پژوهش، به منظور افزایش پایداری سیستم از کلسترول استفاده شد. همانطور که گفته شد کلسترول باعث افزایش دافعه الکترواستاتیک شده و از انبوهش جلوگیری می‌کند و از طرف دیگر با افزایش سفتی غشا از فرآیند به هم آمیخته شدن (کوالسنس) جلوگیری می‌کند. در تطابق با پژوهش حاضر محمدی و همکاران با کپسوله کردن ویتامین D<sub>3</sub> در نانولیپوزوم مشاهده کردند که نمونه‌های حاوی کلسترول پایداری بیشتری در طول زمان نسبت به نمونه‌های فاقد کلسترول دارند (Mohammadi et al., 2014).

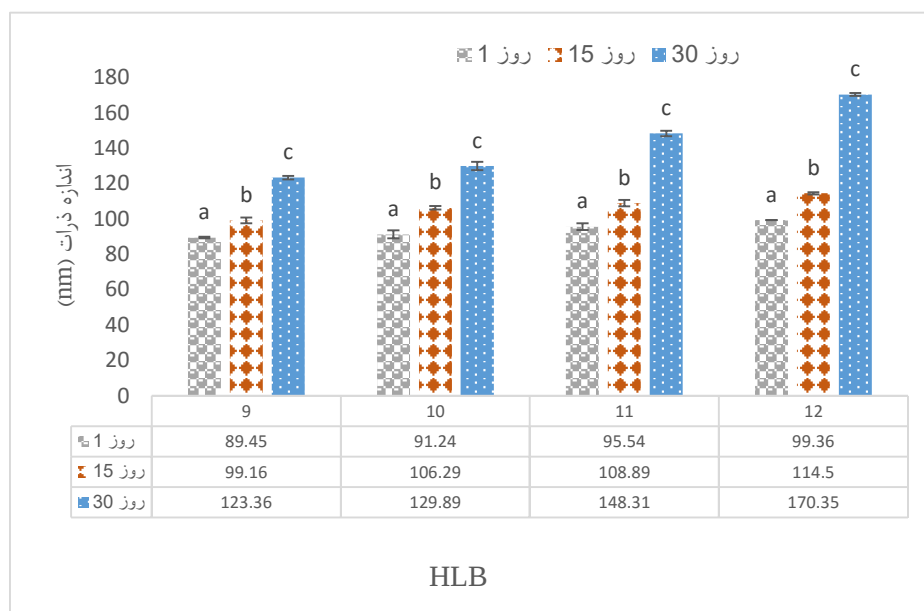
---

<sup>۱</sup> Flocculation

<sup>۲</sup> Coalescence

#### ۴-۴-۲- بررسی پایداری نانو ذرات نانوامولسیون‌ها

شکل ۴-۸ اندازه ذرات نانوامولسیون‌ها پس از یک ماه نگهداری در دمای اتاق را نشان می‌دهد.



شکل ۴-۸ تأثیر زمان نگهداری بر اندازه ذرات در HLBهای مختلف (A): 9 HLB، (B): 10 HLB، (C): 11 HLB و (D): 12 HLB (حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف در سطح ۵٪ در آزمون دانکن است).

همان طوری که ملاحظه می‌شود، اندازه ذرات تمامی فرمولاسیون‌ها در طی زمان اختلاف معنی‌داری نشان داد، اندازه‌ی همه تیمارها پس از یک ماه کمتر از ۲۰۰ nm بود که نشان دهنده پایداری خوب تیمارها است، به طوری که این افزایش اندازه طبیعی در نظر گرفته می‌شود.

نانو امولسیون‌های O/W قطرات پراکنده‌ی روغن در آب هستند که ماهیت آنها ناپایدار است و در واقع انرژی آزاد گیبس طی تشکیل نانو امولسیون مثبت است. مواد فعال در سطح با کاهش کشش بین سطحی در فصل مشترک آب و روغن باعث کاهش این انرژی شده و کمک به تشکیل نانو امولسیون‌ها می‌کنند (Ghosh et al., 2013). بی تردید واضح ترین شرط برای پایداری نانو امولسیون‌ها کافی بودن مقدار سورفکتانت برای تشکیل دست کم یک تک لایه روی قطرات فاز پراکنده است به گونه‌ای که

می‌توان پایدار ترین امولسیون‌ها را با کاهش پی در پی مقدار ماده‌ی امولسیون کننده پایدار کرد (Wilkinson et al., 1994). حداقل غلظت لازم سورفکتانت برای تشکیل امولسیون غلظت بحرانی میسلی شدن (CMC) نامیده می‌شود. در غلظت‌های بالاتر از CMC سورفکتانت‌ها هم به طور آزاد در محلول وجود دارند و هم به طور خود به خودی تشکیل میسل می‌دهند. این مسئله یک تعامل دو گانه است زیرا از یک سو هر جا که خطر شکسته شدن لایه‌ی مواد فعال سطحی دور قطرات روغن باشد، سورفکتانت‌های آزاد به صورت امولسیون کننده‌های یدکی استفاده شده و به ترمیم فصل مشترک کمک می‌کنند و همین طور وجود میسل‌ها و سورفکتانت‌های آزاد باعث افزایش گرانیوی فاز پیوسته و در نتیجه پایداری بیشتر امولسیون می‌شود. از سوی دیگر در مواردی که یکی از اجزای فاز روغنی محلولیت نسبتاً بالایی در فاز پیوسته داشته باشد، میسل‌های آزاد حاوی آب با لایه‌ی سطحی نانوامولسیون‌ها جوش خورده و باعث افزایش سایز ذره‌ای می‌شوند.

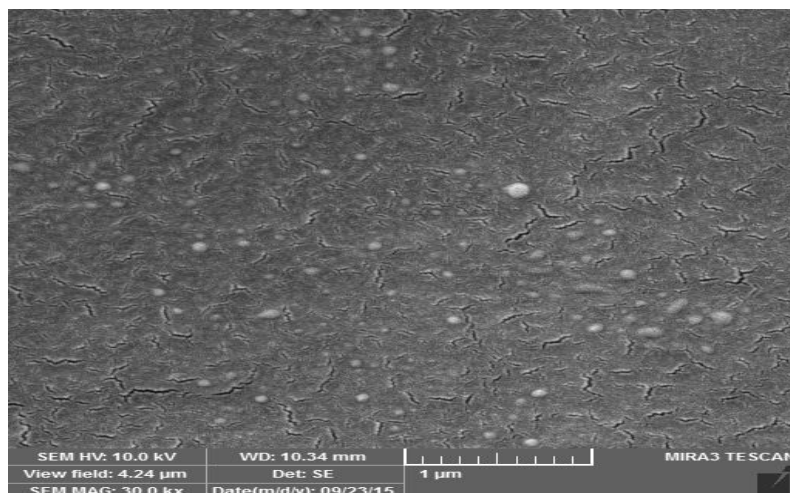
Duarte و همکاران نانوامولسیونی حاوی اسانس رزماری با استفاده از روش کم انرژی تهیه کردند که به مدت یک ماه پایدار بود، اندازه ذرات بعد از یک ماه کمتر از ۲۰۰nm بود که با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد (Duarte et al., 2015).

با توجه به این که هدف اصلی این پژوهش بررسی خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی نانوحامل‌های تهیه شده از اسانس مریم گلی می‌باشد لذا با توجه به نتایج بدست آمده از آزمون‌های انجام شده بهینه هر کدام از نانوحامل‌ها انتخاب و برای ادامه کار استفاده شدند. در مورد نانولیپوزوم تیمار فاقد کلسترول به دلیل سایز کم آن، کارایی کپسولاسیون بالا و همچنین رهایش سریع اسانس و برای نانوامولسیون نیز HLB<sup>۹</sup> به علت پایین بودن سایز، پایداری بیشتر و کارایی بالاتر آن انتخاب شد.

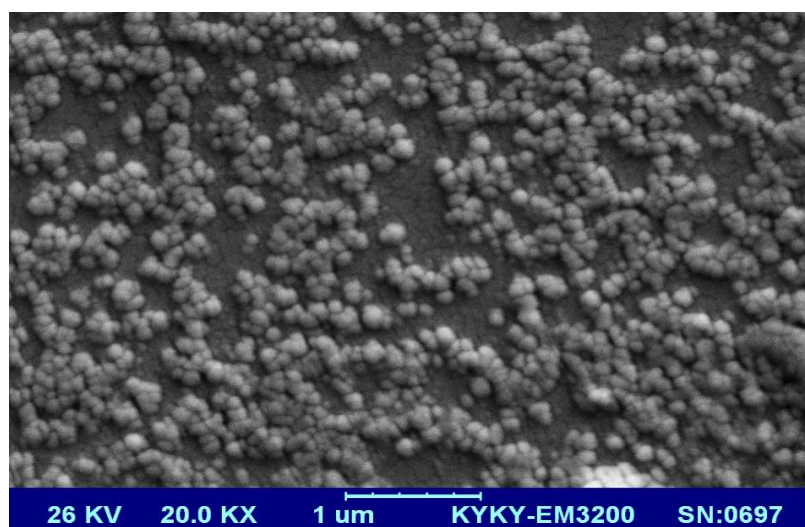
#### ۴-۵- مورفولوژی نانوذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی

به منظور ارزیابی شکل نانولیپوزوم و نانوامولسیون حاوی اسانس مریم گلی، تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی تهیه گردید. تصویر مربوطه، وجود ذرات کروی و تقریباً بیضوی و هموزن را نشان داد.

توزیع ذره ای مناسب و یکنواخت تاکید بر اندازه گیری به روش پراکندگی نور بود که در تطابق با نتایج بیبی و همکاران بود (Bibi et al., 2011).



شکل ۴-۹ تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از نانوامولسیون تثبیت شده بر روی طلا



شکل ۴-۱۰ تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از نانولیپوزوم تثبیت شده بر روی طلا

#### ۴-۶- محاسبه خاصیت آنتی اکسیدانی

روش های مختلف برای انجام تست آنتی اکسیدانی بصورت *in vitro* و *in vivo* توسط Alam و همکارانش در سال ۲۰۱۳ مورد مطالعه قرار گرفت. این محققان با مقایسه روش های مختلف استفاده از معرف DPPH را به عنوان یک روش بسیار ساده و از نظر اقتصادی روشی ارزان با هزینه اندک معرفی

کرده‌اند. بنابراین این روش بعنوان یک روش بسیار متداول برای بررسی‌های فعالیت آنتی‌اکسیدانی در بسیاری از کارهای علمی است (Alam et al., 2013). در تحقیق حاضر نیز از این روش برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس مریم گلی سهندیکا در حالت آزاد و کپسوله شده استفاده شده است.

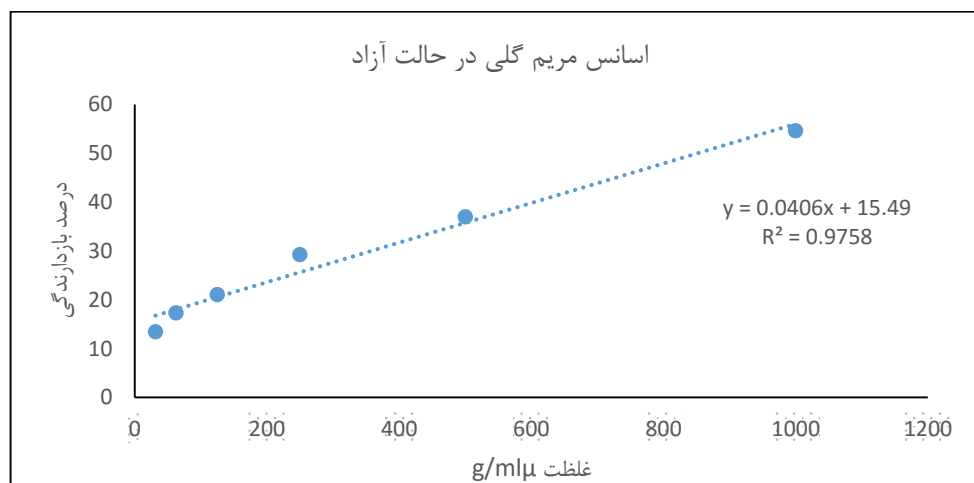
#### ۴-۶-۱- نتایج آنتی‌اکسیدانی اسانس مریم گلی سهندیکا

نتایج حاصل از جذب نمونه‌ها و درصد بازدارندگی نمونه‌ها با توجه به فرمول ذکر شده در فصل ۳ محاسبه و در جدول ۴-۴ گزارش شده است.

جدول ۴-۴ نتایج حاصل از جذب و درصد بازدارندگی نمونه‌های اسانس مریم گلی

| درصد بازدارندگی | میانگین | تکرار ۳ | تکرار ۲ | تکرار ۱ | غلظت (µg/ml) |
|-----------------|---------|---------|---------|---------|--------------|
| ۱۳/۴۹           | ۱/۳۶    | ۱/۳۶۰   | ۱/۳۶۱   | ۱/۳۶۹   | ۳۱/۲۵        |
| ۱۷/۳۶           | ۱/۳۰    | ۱/۳۰۵   | ۱/۲۹۹   | ۱/۳۰۳   | ۶۲/۵         |
| ۲۱/۰۸           | ۱/۲۴    | ۱/۲۴۹   | ۱/۲۴۱   | ۱/۲۴۱   | ۱۲۵          |
| ۲۹/۲۷           | ۱/۱۱    | ۱/۱۱۸   | ۱/۱۱۶   | ۱/۱۱۰   | ۲۵۰          |
| ۳۶/۹۹           | ۰/۹۹    | ۰/۹۹۴   | ۰/۹۹۴   | ۰/۹۹۱   | ۵۰۰          |
| ۵۴/۶۵           | ۰/۷۱    | ۰/۷۱۲   | ۰/۷۱۲   | ۰/۷۲۱   | ۱۰۰۰         |
|                 | ۱/۵۷    |         |         |         | Blank        |

با رسم منحنی درصد مهار رادیکال آزاد DPPH نسبت به غلظت ماده موثره،  $IC_{50}$  را که برابر با غلظتی از نمونه است که ۵۰ درصد DPPH را مهار می‌کند بدست آمد (شکل ۴-۱۱).



شکل ۴-۱۱ درصد بازدارندگی اسانس مریم گلی در غلظت‌های مختلف

$$IC_{50}: 50 = 0.0406X + 15.49$$

$$IC_{50} = 850 \mu g/ml$$

#### ۴-۶-۲ نتایج آنتی‌اکسیدانی نانولیپوزوم حاوی اسانس مریم گلی سهندیکا

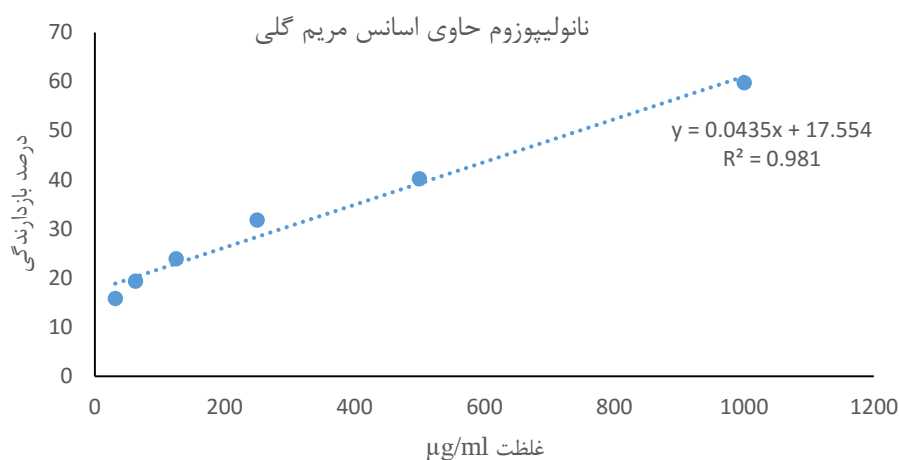
نتایج حاصل از جذب نمونه‌ها و درصد بازدارندگی نمونه‌ها در جدول ۴-۵ گزارش شده است.

جدول ۴-۵ نتایج حاصل از جذب و درصد بازدارندگی نمونه‌های نانولیپوزوم حاوی اسانس مریم گلی

| غلظت (μg/ml) | تکرار ۱ | تکرار ۲ | تکرار ۳ | میانگین | درصد بازدارندگی |
|--------------|---------|---------|---------|---------|-----------------|
| ۳۱/۲۵        | ۱/۱۷۴   | ۱/۱۷۰   | ۱/۱۷۷   | ۱/۱۷۴   | ۱۵/۸۴           |
| ۶۲/۵         | ۱/۱۲۵   | ۱/۱۱۹   | ۱/۱۲۹   | ۱/۱۲۴   | ۱۹/۳۵           |
| ۱۲۵          | ۱/۰۶۱   | ۱/۰۵۸   | ۱/۰۶۴   | ۱/۰۶۱   | ۲۳/۹۴           |
| ۲۵۰          | ۰/۹۵۱   | ۰/۹۵۵   | ۰/۹۵۷   | ۰/۹۵۴   | ۳۱/۸۲           |
| ۵۰۰          | ۰/۸۳۴   | ۰/۸۳۹   | ۰/۸۳۸   | ۰/۸۳۷   | ۴۰/۲۱           |
| ۱۰۰۰         | ۰/۵۶۱   | ۰/۵۶۹   | ۰/۵۶۳   | ۰/۵۶۴   | ۵۹/۷۸           |
| Blank        |         |         |         | ۱/۳۹۵   |                 |

برای بدست آوردن  $IC_{50}$  نانولیپوزوم حاوی اسانس مریم گلی نیز درصد مهار رادیکال آزاد DPPH

نسبت به غلظت ماده موثره را رسم کردیم. شکل ۴-۱۲ این نتایج را نشان می‌دهد:



شکل ۴-۱۲ درصد بازدارندگی نانولیپوزوم حاوی اسانس مریم گلی در غلظت‌های مختلف

$$\text{IC}_{50}: 50 = 0.0435 + 17.554$$

$$\text{IC}_{50} = 745 \mu\text{g/ml}$$

#### ۴-۶-۳ نتایج آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون حاوی اسانس مریم گلی سهندیکا

نتایج حاصل از جذب نمونه‌ها و درصد بازدارندگی نمونه‌های نانوامولسیون حاوی مریم گلی در جدول

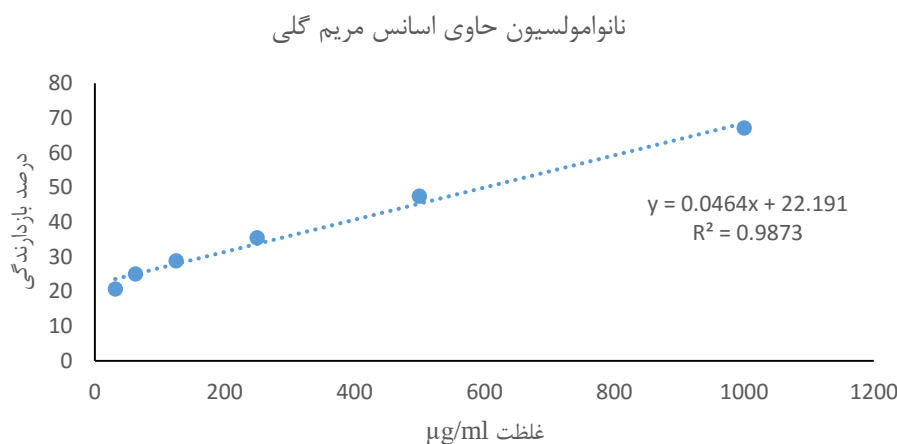
۴-۶ آورده شده است.

جدول ۴-۶ نتایج حاصل از جذب و درصد بازدارندگی نمونه‌های نانوامولسیون حاوی اسانس مریم گلی

| درصد بازدارندگی | میانگین | تکرار ۳ | تکرار ۲ | تکرار ۱ | غلظت ( $\mu\text{g/ml}$ ) |
|-----------------|---------|---------|---------|---------|---------------------------|
| ۲۰/۵۰           | ۱/۲۸۲   | ۱/۲۸۴   | ۱/۲۸۳   | ۱/۲۸۰   | ۳۱/۲۵                     |
| ۲۴/۶۹           | ۱/۲۱۵   | ۱/۲۱۵   | ۱/۲۱۹   | ۱/۲۱۰   | ۶۲/۵                      |
| ۲۹/۰۱           | ۱/۱۴۵   | ۱/۱۴۲   | ۱/۱۴۴   | ۱/۱۴۹   | ۱۲۵                       |
| ۳۵/۷۰           | ۱/۳۰۷   | ۱/۰۳۴   | ۱/۰۳۶   | ۱/۰۴۱   | ۲۵۰                       |
| ۴۷/۳۶           | ۰/۸۴۹   | ۰/۸۵۱   | ۰/۸۴۹   | ۰/۸۴۷   | ۵۰۰                       |
| ۶۶/۷۰           | ۰/۵۳۷   | ۰/۵۴۱   | ۰/۵۳۹   | ۰/۵۳۱   | ۱۰۰۰                      |
|                 | ۱/۶۱۳   |         |         |         | Blank                     |

در نهایت نیز با رسم منحنی درصد مهار رادیکال آزاد DPPH نسبت به غلظت ماده موثره  $IC_{50}$

نانوامولسیون حاوی اسانس مریم گلی را حساب کردیم. شکل ۴-۱۳ این نتایج را نشان می دهد:

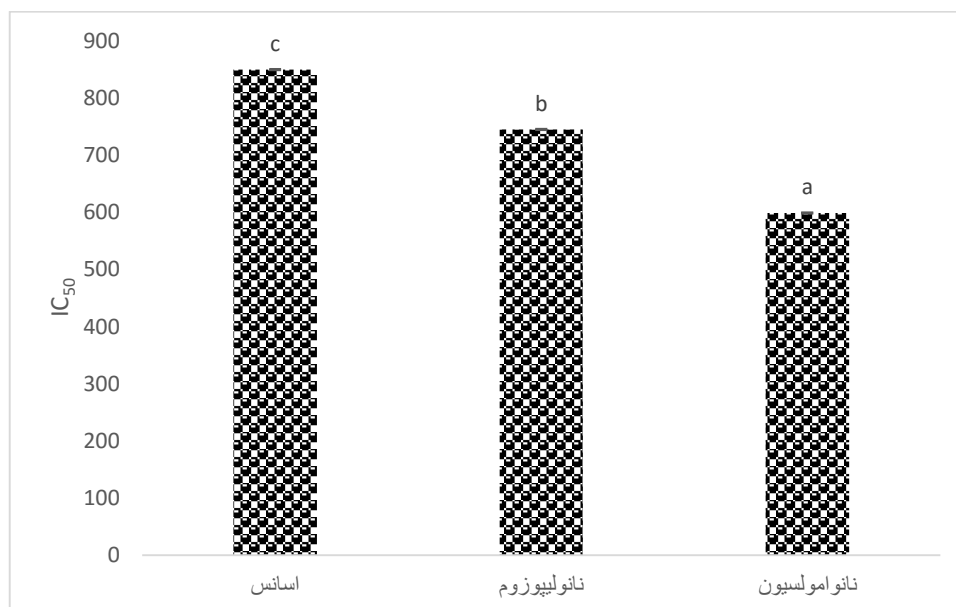


شکل ۴-۱۳ درصد بازدارندگی نانوامولسیون حاوی اسانس مریم گلی در غلظت‌های مختلف

$$IC_{50}: 50 = 0.0464x + 22.191$$

$$IC_{50} = 599 \mu\text{g/ml}$$

در این مطالعه، همانگونه که در شکل ۴-۱۴ نشان داده شده است اثرات آنتی‌اکسیدانی نانوحامل‌ها بیشتر از اسانس مریم گلی بدون درون‌پوشانی بود. نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که اثر آنتی-اکسیدانی تیمارها در سطح ۵٪ معنی‌دار بود، به طوری که بیشترین اثر آنتی‌اکسیدانی مربوط به نانوامولسیون و کمترین آن مربوط به اسانس در حالت آزاد بود. در حالت کلی اثر آنتی‌اکسیدانی نانوحامل‌ها بیشتر از اسانس بدون درون‌پوشانی بود. لسیتین به کار رفته در نانولیپوزوم و پراکندگی بسیار بالای اسانس در نانوامولسیون باعث بیشتر بودن اثر بازدارنده نانوحامل‌ها نسبت به اسانس بدون درون‌پوشانی شد.



شکل ۴-۱۴ نتایج تست آنتی اکسیدانی

از طرفی اثر بیشتر آنتی اکسیدانی نانوامولسیون نسبت به نانولیپوزوم را می توان چنین بیان کرد:

(۱) در لیپوزوم به دلیل اینکه اسانس در داخل کپسول های لستین قرار گرفته در نتیجه کمتر می تواند با رادیکال های آزاد واکنش دهد ولی چون در نانوامولسیون اسانس به صورت ذرات ریز در فاز آبی پخش شده است و از طرفی حلالیت اسانس نیز افزایش یافته در نتیجه با رادیکال های آزاد بیشتری می تواند واکنش دهد.

(۲) سرعت رهایش اسانس در نانوامولسیون به مراتب بیشتر از نانولیپوزوم می باشد در نتیجه، فنل های موجود در اسانس نسبت به نانولیپوزوم، سریع تر در معرض رادیکال های آزاد DPPH قرار می گیرند و عمل خنثی سازی را انجام می دهند.

در مطالعه ای که توسط مایتی و همکاران (۲۰۰۷) انجام شد، این نتیجه حاصل شد که کمپلکس کورکومین-فسفولیپید به دلیل خواص آنتی اکسیدانی بالاتر نسبت به کورکومین آزاد، اثر محافظتی و ضد اکسیداتیو بیشتری در موش ها دارد (Maiti et al., 2007). در پژوهش حاضر، در مورد نانولیپوزوم می توان گفت که فسفولیپید شرکت کننده در ساختار آن، تمایل به واکنش با رادیکال آزاد را دارد و بنابراین، اسانس به مقدار کمتری نسبت به اسانس خالص، تحت تاثیر رادیکال آزاد قرار گرفت، در واقع

گروه‌های فسفات باعث احیای رادیکال آزاد DPPH شدند و در نتیجه تاثیر رادیکال بر خود اسانس کمتر از اسانس بدون درون پوشانی بود. در مورد نانوامولسیون هم می‌توان چنین گفت که ریز بودن اندازه ذرات، حلالیت بالا و بهبود نفوذ اسانس باعث شده بیشتر از اسانس آزاد، تحت تاثیر رادیکال آزاد قرار بگیرد. Gortzi و همکاران (۲۰۰۷)، خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره مرزنجوش را قبل و بعد از کپسولاسیون در لیپوزوم بررسی کردند که نتایج نشان داد خاصیت آنتی‌اکسیدانی در حالت کپسوله بیشتر از حالت آزاد است. در مطالعه‌ای، نانوامولسیون حاوی لیکوپن را تولید و اثرات آنتی‌اکسیدانی آن‌ها را بررسی و چنین مشاهده کردند، اثر آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون حاوی لیکوپن بیشتر از ماده فعال خالص بود و این تاثیر را ناشی از پراکندگی بسیار بالای لیکوپن در نانوامولسیون و واکنش سریع آن با رادیکال‌های آزاد ربط دادند (Ha et al., 2015). این نتایج با نتایج ما مطابقت داشت.

#### ۷-۴ - بررسی خواص ضد میکروبی نانو حامل‌های حاوی اسانس مریم گلی سهندیکا

حداقل غلظت کشندگی و حداقل غلظت بازدارندگی نانوحامل‌ها و اسانس مریم سهندیکا گلی در برابر باکتریهای مورد آزمون در جدول ۷-۴ آورده شده است.

جدول ۷-۴ حداقل غلظت کشندگی و حداقل غلظت بازدارندگی نانوحامل‌ها و اسانس مریم گلی

| نام باکتری<br>ماده |  | <i>Escherichia coli</i><br>ATCC 25922 |             | <i>Moraxella Catarrhalis</i><br>ATCC 25238 |             | <i>Staphylococcus aureus</i><br>ATCC 25923 |             | <i>Bacillus cereus</i><br>ATCC 11778 |             | <i>Candida albicans</i> |             |
|--------------------|--|---------------------------------------|-------------|--------------------------------------------|-------------|--------------------------------------------|-------------|--------------------------------------|-------------|-------------------------|-------------|
|                    |  | MBC (µg/ml)                           | MIC (µg/ml) | MBC (µg/ml)                                | MIC (µg/ml) | MBC (µg/ml)                                | MIC (µg/ml) | MBC (µg/ml)                          | MIC (µg/ml) | MBC (µg/ml)             | MIC (µg/ml) |
| اسانس              |  | ۵۰۰۰                                  | ۱۲۵۰        | -                                          | ۱۰۰۰        | ۶۲۵                                        | ۶۲۵         | ۶۲۵                                  | ۶۲۵         | ۵۰۰۰                    | ۵۰۰۰        |
| نانوامولسیون       |  | ۳۱۲/۵                                 | ۳۱۲/۵       | -                                          | ۱۲۵۰        | ۷۸/۱۲۵                                     | ۳۱۲/۵       | ۶۲۵                                  | ۳۱۲/۵       | ۶۲۵                     | ۶۲۵         |
| نانولیپوزوم        |  | ۱۲۵۰                                  | ۶۲۵         | -                                          | ۵۰۰۰        | ۱۵۶/۲۵                                     | ۳۱۲/۵       | ۳۱۲/۵                                | ۳۱۲/۵       | ۱۲۵۰                    | ۱۲۵۰        |

اسانس مریم گلی اثرات ضد میکروبی قابل توجهی دارد. *Salvia eremophila* اولین گونه‌ای از جنس *Salvia* است که خواص ضد میکروبی برای آن گزارش شده است، در سال‌های اخیر برخی دیگر از

جنس‌های آن نیز مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج ضد میکروبی مشابهی گزارش شدند بخصوص خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی آن‌ها مورد مطالعه‌ی محققین بسیاری قرار گرفته و بطور گسترده‌ای به اثبات رسیده است (Ebrahimabadi et al., 2010). از جمله‌ی این تحقیقات می‌توان مطالعه‌ی Tenore و همکارانش (۲۰۱۱) را نام برد که در آن اسانس مریم گلی، ۲۰ میکروارگانیزم از جمله *اشرشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *کاندیدا آلبیکنس* و *باسیلوس سرئوس* را مهار کرده است (Tenore et al., 2011). در حالت کلی تاثیر اسانس‌های گیاهی و ترکیبات آن‌ها بر روی باکتری‌های گرم مثبت، قدری بیشتر از تاثیر آن‌ها بر روی باکتری‌های گرم منفی است. به عبارت دیگر گرم مثبت‌ها، نسبت به اثر ضد میکروبی اسانس‌ها حساسیت بیشتری نشان دادند (Morris et al., 1979). دلیل حساسیت بالای باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی می‌تواند به علت عدم وجود دیواره سلولی لیپو پلی‌ساکاریدی باشد که این دیواره در باکتری‌های گرم منفی ممکن است از ورود ترکیبات فعال به غشای سیتوپلاسمی جلوگیری به عمل آورد. به دلیل وجود غشاهای خارجی احاطه کننده دیواره سلولی در باکتری‌های گرم منفی منطقی به نظر می‌رسد که این باکتری‌ها در برابر اثرات ضد باکتریایی اسانس‌ها و ترکیبات آن‌ها حساسیت کمتری از خود نشان دهند. غشاء خارجی باکتری‌های گرم منفی، انتشار مواد چربی‌دوست از میان لایه پوشاننده لیپو پلی‌ساکاریدی را محدود می‌کند. در باکتری‌های گرم مثبت، تماس مستقیم ترکیبات هیدروفوب اسانس‌ها، با این فسفولیپید دو لایه‌ای صورت می‌گیرد. این محل تماس جایی است که این ترکیبات اثر خود را برجای می‌گذارند. این اثر یا به صورت افزایش نفوذپذیری یون‌ها و یا نشت ترکیبات حیاتی سلول رخ می‌دهد و یا اینکه به صورت ناتوانی سیستم آنزیمی باکتریایی بروز می‌کند (Sandri et al., 2007).

Yousefzadi و همکاران (۲۰۰۷)، اثر بیشتر اسانس *S. multicaulis* بر روی باکتری‌های گرم مثبت (*باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدس*) در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی (*اشرشیاکلی*، *کلبسیا پنومونیا* و *سودوموناس آئروژینوزا*) را گزارش کردند. با توجه به نتایج قابل قبول اسانس مریم گلی و تمایل به تولید مواد نگهدارنده طبیعی، تلاش برای افزایش اثرات اسانس

مریم گلی به شیوه های گوناگونی دیده می شود. در مطالعه‌ی حاضر نیز اثر حامل‌های لیپیدی نانولیپوزوم و نانومولسیون حاوی اسانس مریم گلی بر روی باکتری‌های (*استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کولی*، *باسیلوس سرئوس*، *موراکسلا کاتارالیس*) و مخمر *کاندیدا آلبیکنس* در مقایسه با اسانس آزاد از طریق تعیین MIC و MBC ارزیابی گردید. میانگین MIC نانوحامل‌ها و اسانس در برابر میکروب‌های مورد مطالعه در جدول ۴-۷ ارائه شده است. میانگین MIC نانوحامل‌ها و اسانس در سه بار تکرار آزمایش برای باکتری *موراکسلا کاتارالیس* و *اشرشیا کولی* بیشتر از *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* به دست آمد نمونه قارچی *کاندیدا آلبیکنز* نیز از نظر MCI بین باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی قرار داشت. بنابراین می‌توان گفت که تاثیر اسانس در دو حالت آزاد و کپسوله شده در حامل‌های لیپیدی در برابر باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از نمونه قارچی *کاندیدا آلبیکنز* و آن هم بیشتر از باکتری‌های گرم منفی می باشد. همچنین میزان بازداري نانومولسیون و نانولیپوزوم در مقایسه با اسانس آزاد در همه باکتری‌ها بالاتر بود. بنابراین می‌توان نتیجه گیری کرد که نانومولسیون و نانولیپوزوم حاوی اسانس مریم گلی در مقایسه با اسانس در حالت آزاد، MIC پایین‌تری را کسب کرد. در بین باکتری‌ها *موراکسلا کاتارالیس* بیشترین مقاومت را در برابر اسانس از خود نشان داد به طوری که تا غلظت  $30000 \mu\text{g/ml}$  اثر کشندگی برای آن مشاهده نشد.

همچنین در تمام طول مطالعه از نانومولسیون و نانولیپوزوم بدون اسانس به عنوان کنترل استفاده شد. با توجه به اینکه تمام باکتری‌ها در آن رشد داشتند، می‌توان نتیجه گرفت که اثر ضد باکتریایی نانومولسیون و نانولیپوزوم مربوط به خود اسانس می باشد و لستین در نانولیپوزوم و توپین ۸۰ و اسپن ۸۰ در نانومولسیون نقش بازدارنده‌ای بر رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها نداشتند.

از جمله عوامل موثر در نتایج آزمون میکربی می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

- اندازه نانوذرات؛
- مقدار درون پوشانی؛
- سرعت رهایش.

در سطح غشای باکتری‌ها حفراتی وجود دارد که محل ورود و خروج مواد می‌باشد، هرچه نانوذرات تولیدی کوچکتر باشد راحت‌تر می‌توانند به این حفرات وارد شده و ماده زیست فعال خود را آزاد سازند. علاوه بر این، به دلیل اینکه جنس نانولیپوزوم از فسفولیپید بود، سیالیت غشایی بیشتری داشته در نتیجه اسانس راحت‌تر می‌تواند از غشای باکتریایی به داخل سلول نفوذ کند که این سیالیت در نانوامولسیون کمتر بود. از عوامل موثر دیگر بر خواص ضد میکربی نانوحامل‌ها سرعت رهایش ماده ضد میکرب از داخل آن‌هاست که در این پژوهش سرعت رهایش نانوامولسیون بیشتر از نانولیپوزوم بود. نتیجه‌ای که میتوان گرفت این است که هریک از این موارد که غالب شود نتیجه اثر ضد میکربی را تعیین خواهد کرد. در این مطالعه تاثیر نانوامولسیون بیشتر از نانولیپوزوم بود

Gaysinskay و همکاران (۲۰۰۰) اوژنول و کارواکرول درون میسل‌های سورفاکتانت نانومتري (نانو امولسیون‌ها) انکپسوله کردند. نتایج حاصل از تحقیقات آن‌ها افزایش فعالیت ضد میکروبی این ترکیبات را نشان داد، که به علت افزایش انحلال پذیری اجزای اسانس در فاز آبی به دلیل حضور مواد فعال سطحی و همچنین بهبود برهمکنش آنتی بیوتیک‌ها با میکروارگانیسم‌ها بود. با این حال زمانی که اوژنول کپسوله شده به شیر اضافه شد منجر به کاهش یا به عنوان یک بازدارنده در برابر پاتوژن‌های مورد نظر عمل کرد. Gortiz و همکاران (۲۰۰۷) فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی اجزای تشکیل دهنده اسانس لیموترش ( $\alpha$ -terpineol,  $\gamma$ -terpinene,  $\beta$ -pinene, Limonene) را قبل و بعد از انکپسوله شدن در لیپوزوم را مورد بررسی قرار دادند. خواص ضد میکروبی اسانس با استفاده از روش انتشار دیسک در برابر چهار باکتری گرم مثبت و گرم منفی و سه قارچ بیماریزای انسان هم چنین لیستریا مونوسیتوزنز بررسی شد. نتایج نشان داد که تمام ترکیبات پس از انکپسوله کردن در لیپوزوم فعالیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی بالاتری از حالت آزاد نشان دادند. در تحقیق دیگری که توسط Liolios و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی اجزای اصلی تشکیل دهنده عصاره مرزنجوش (کارواکرول، تیمول و پی سیمین و  $\gamma$ -ترپنین) قبل و بعد از انکپسوله شدن در لیپوزوم (فسفاتیدیل کولین و کلسترول) ارزیابی شد. نتایج نشان داد که تمام ترکیبات پس از

انکپسولاسیون در لیپوزوم فعالیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی بالاتری از حالت آزاد نشان دادند. در تحقیق دیگری Afshan و همکاران (۲۰۱۲)، با بررسی خواص ضد میکروبی اسانس و نانو امولسیون دارچین به این نتیجه رسیدند که خاصیت ضد میکروبی نانوامولسیون نسبت به اسانس در محیط *in vitro* بیشتر است که علت آن می‌تواند به این دلیل باشد که نانوامولسیون‌ها توانایی انتقال ترکیب آنتی‌میکروبی از عرض غشا را دارد که در این صورت ترکیب می‌تواند داخل غشا شده و از داخل روی غشا اثر بگذارد، همچنین نانوامولسیون به عنوان حاملی عمل می‌کند که می‌تواند غلظت مورد نظر ترکیب را داخل فاز آبی به میکروارگانیسم برساند (Afshan et al., 2012). در مطالعه‌ای که توسط Cui و همکاران (۲۰۱۶)، انجام شد، جهت افزایش فعالیت ضد میکروبی اسانس مریم‌گلی از نانولیپوزوم استفاده شد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که استفاده از انکپسولایون سبب ثبات و همچنین اثر ضد-میکروبی بیشتری نسبت به حالت اسانس آزاد در برابر بیوفیلم/ستافیلوکوکوس/ورئوس در ظروف شیر می‌شود (Cui et al., 2016). نتایج حاصل از تحقیق این محققان با نتایج حاصل از تحقیقات ما مطابقت دارد. این عمل مبتنی بر افزایش فعالیت ضد میکروبی سیستم‌های حامل در مقیاس نانو در مقایسه با حالت آزاد می‌باشد.

نتایج این بررسی بیانگر آن است که با کپسوله کردن اسانس مریم‌گلی در نانوامولسیون و نانولیپوزوم، هم می‌توان اسانس را در برابر تخریب و اکسیداسیون محافظت کرد و هم می‌توان با افزایش نسبت سطح به حجم (زیر ۱۰۰ نانومتر)، غلظت اسانس را در مناطق آبی مواد غذایی جایی که میکروارگانیسم‌ها حضور دارند را افزایش داد و به MIC کمتری در برابر میکروب دست یافت. که این امر باعث می‌شود که رقت موثره‌ی کمتری برای کنترل میکروب ملزوم باشد. در نهایت عوارض ناشی از غلظت بالای اسانس در مواد غذایی از جمله کاهش مقبولیت غذا از لحاظ طعم و مزه به حداقل ممکن برسد.

فصل پنجم

نتیجہ گیری و پیشہنادات

- \* اسانس حاصل از گیاه مریم گلی سهندیکا به رنگ زرد و دارای بویی نافذ بود. بازده اسانس حاصله با روش تقطیر با آب و دستگاه کلونجر، ۰/۵٪ به دست آمد.
- \* در مجموع ۲۲ ترکیب از اسانس مریم گلی سهندیکا به کمک دستگاه GC-MS شناسایی شد که ترکیبات ۱/۸ سینئول با ۲۹/۶۷٪، آلفا پینن با ۱۴/۶۷٪، آلکانفور با ۱۲/۶۱٪، کامفن با ۸/۶۳٪ و کاریوفیلن با ۸/۴۶٪ بیشترین ترکیبات اسانس را تشکیل می‌دهند.
- \* نانوامولسیون و نانولیپوزوم حاوی اسانس مریم گلی به ترتیب با اندازه ذرات حدود ۸۹ nm و ۸۲ nm تولید شدند.
- \* کارایی درون‌پوشانی برای نانوامولسیون و نانولیپوزوم به ترتیب در حدود ۷۶٪ و ۸۴٪ به دست آمد.
- \* اندازه ذرات تمامی فرمولاسیون‌ها در طی زمان اختلاف معنی‌داری نشان دادند، اندازه ذرات نانوامولسیون‌ها نسبت به نانولیپوزوم‌ها تفاوت کمی داشت، اما در حالت کلی همه نمونه‌ها پایدار بودند به طوری که تغییر اندازه ذرات پس از گذشت ۳۰ روز قابل قبول بود.
- \* اثرات آنتی‌اکسیدانی نانوحامل‌ها بیشتر از اسانس مریم گلی بدون درون‌پوشانی بود. نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که اثر آنتی‌اکسیدانی تیمارها در سطح ۵٪ معنی‌دار بود، به طوری که بیشترین اثر آنتی‌اکسیدانی مربوط به نانوامولسیون و کمترین آن مربوط به اسانس در حالت آزاد بود.
- \* در آزمون اثرات ضد میکربی، تاثیر اسانس در دو حالت آزاد و کپسوله شده در حامل‌های لیپیدی در برابر باکتری گرم مثبت بیشتر از باکتری گرم منفی بود، همچنین میزان بازداري نانوامولسیون و نانولیپوزوم در مقایسه با اسانس آزاد در همه باکتری‌ها (استافیلوکوکوس

\* /رورئوس، باسیلوس سرئوس، اشرشیا کلی، موراکسلا کارالیس) و قارچ کاندیدا آلبیکنس بالاتر

بود. نانوامولسیون نیز در مقایسه با نانولیپوزوم اثرات ضدمیکروبی بیشتری داشت.

### پیشنهادهای

✓ اسپری نانولیپوزوم و نانوامولسیون اسانس مریم‌گلی در نگهداری محصولات غذایی فسادپذیر

مثل گوشت ماهی؛

✓ افزودن نانوحامل‌ها در نوشیدنی‌های آبی و تولید محصولات غذایی عملگرا؛

✓ مطالعه اثر این نانوحامل‌ها روی باکتری‌های پاتوژن و مولد فساد دیگر.

✓ تهیه نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس مریم‌گلی به روشهای دیگری مثل هموژنیزاسیون فشار بالا

و مقایسه آن با روش استفاده شده در این مطالعه

✓ تهیه نانوامولسیون‌های حاوی اسانس مریم‌گلی به روشهای دیگری مثل روش خود به خودی و

مقایسه آن با روش استفاده شده در این مطالب



فصل ششم

منابع و مآخذ

۱. افشان، ا. رفعتی، ح. (۱۳۹۱). فرمولاسیون نانوامولسیون اسانس و عصاره گیاه *Cinnamomum* با هدف بررسی خواص ضد میکروبی آن. پایان نامه کارشناسی ارشد، گروه فیتوشیمی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی.
۲. بقائیان، ب. نقدی بادی، ح. (۱۳۷۹). گیاهان اسانس دار. انتشارات اندرز.
۳. جمزاد، ر. بابا خانلو، پ. معصومی، ع. مظفریان، و. (۱۳۹۱). فلور ایران: تیره نعنا (*Lamiaceae*). موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع.
۴. زرگری، ع. (۱۳۷۶). گیاهان دارویی. انتشارات دانشگاه تهران، جلد چهارم.
۵. شمس اردکانی، م.، آموزگار، ز.، محققزاده، ع. (۱۳۸۸). فرهنگ گیاهان دارویی، انتشارات صهبای دانش.
۶. قهرمان، ا. (۱۳۷۳). کورموفیت های ایران (سیستماتیک گیاهی)، انتشارات دانشگاه تهران، جلد سوم.
۷. محمودی، ب. (۱۳۸۱). آشنایی با اسانس های معطر گیاهی و اثرات شفابخش آنها. انتشارات نور دانش.
۸. مومنی، ت.، اغصانی، پ.، روحانی، ن. (۱۳۷۹). عصاره های گیاهی. انتشارات شهید فرهاد رضا.
۹. مظفریان، و. (۱۳۷۵). فرهنگ نام های گیاهان ایران، انتشارات فرهنگ معاصر.
10. Agarwal, M; Wail, s; Dhingra, s. Khambay & B.P. (2001). Insect growth inhibition, antifeedant and antifungal activity of compounds isolated/derived from zingiber officinale Roscoe (ginger) rhizomes. Pest Manag Sci.
11. Akowuah, G.A., Ismail, Z., Norhayati, I. & Sadikun, A. (2005). The effects of different extraction solvents of varying polarities of polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. Food Chemistry, 93 : 311- 317.

12. Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152.
13. Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Esin Çelik, S., Bektaşoğlu, B., Berker, K. I., & Özyurt, D. (2007). Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecule*, 12, 1496-1547.
14. Arvouet-Grand, A., Vennnat, B., pourrat, A. & Legret, P. (1994). Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. *Journal de pharmacie de Belgique*, 49, 462-468.
15. Awuah, R. T. Fungitoxic effects of extracts from some West African plants. (1989). *Annals of Applied Biology*, 115, 451-454.
16. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
17. Berker, K.I. Guclu, K. Tor, I. & Apak, R. (2007). Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*. 72(3), 1157-1165.
18. Bibi, S., Kaur, R., Henriksen-Lacey, M., McNeil, S. E., Wilkhu, J., Lattmann, E., & Perrie, Y. (2011). Microscopy imaging of liposomes: from coverslips to environmental SEM. *International journal of pharmaceutics*, 417(1), 138-150.
19. Blanco-Padilla, A., Soto, K. M., Hernández Iturriaga, M., & Mendoza, S. (2014). Food antimicrobials nanocarriers. *The Scientific World Journal*, 2014.
20. Brandl, M. (2001). Liposomes as drug carriers: a technological approach. *Biotechnology annual review*, 7, 59-85.
21. Buckle, J. (2003). *Aromatherapy: Essential oils in Practice* (2nd Ed). Arnold. Churchill Livingstone.
22. Chanda, H., Das, P., Chakraborty, R. & Ghosh, A. (2011). Development and evaluation of liposomes of fluconazole. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 5, 1-9.

23. Chong, P. L., & Choate, D. (1989). Calorimetric studies of the effects of cholesterol on the phase transition of C (18): C (10) phosphatidylcholine. *Biophysical journal*, 55, 551-556.
24. Cui, H., Zhou, H., & Lin, L. (2016). The specific antibacterial effect of the Salvia oil nanoliposomes against *Staphylococcus aureus* biofilms on milk container. *Food Control*, 61, 92-98.
25. Delmas, T., Piraux, H., Couffin, A. C., Texier, I., Vinet, F., Poulin, P., & Bibette, J. (2011). How to prepare and stabilize very small nanoemulsions. *Langmuir*, 27(5), 1683-1692.
26. Devos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M. & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20, 292- 302.
27. Dipasqua, R. Defeo, V. Villani, F. & Mauriello, G. (2005). In vitro antimicrobial activity of essential oils from Mediterranean Apiaceae, Verbenaceae and Lamiaceae against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Annals of Microbiology*, 55 (2), 139-143
28. Duarte, J. L., Amado, J. R., Oliveira, A. E., Cruz, R. A., Ferreira, A. M., Souto, R. N., & Fernandes, C. P. (2015). Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* essential oil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25(2), 189-192.
29. Dube, S. Upadhyay, P. D. & Tripathi, S. C. (1989). Antifungal, physicochemical and insect-repelling activity of the essential oil of *Ocimum basilicum*. *Canadian Journal of Botany*, 67, 2085-2087.
30. Ebrahimabadi, A. H., Mazoochi, A., Kashi, F. J., Djafari-Bidgoli, Z., & Batooli, H. (2010). Essential oil composition and antioxidant and antimicrobial properties of the aerial parts of *Salvia eremophila* Boiss. from Iran. *Food and chemical toxicology*, 48(5), 1371-1376.
31. Esmaeili, M. A., Kanani, M., Sonboli, A., Sadeghi, H., & Karimianpour, N. (2010). Evaluation of the effect of *Salvia sahendica* on tissue damages induced by alcohol in oxidative stress conditions in the rat: Effect on liver and kidney oxidative parameters. 15(4), 315-322

32. European Pharmacopoeia 6.0. (2008). Determination of essential oils in herbal drugs. 2.8.12, pp. 251–252.
33. Ezhilarasi, P., Karthik, P., Chhanwal, N. & Anandharamakrishnan, C. (2013). Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: a review. Food and Bioprocess Technology, 6, 628-647.
34. Fadaei, S., Abroumand, A. P., Sharifan, A., & Larijani, K. (2011). Evaluation of antimicrobial activity of Mentha piperita L. essential oil and its comparison with sodium benzoate.
35. Farokhzad, O. C. & Langer, R. (2009). Impact of nanotechnology on drug delivery. ACS Nano, 3, 16-20.
36. Fathi, M. & Mohebbi, M. (2010). Increasing food safety using nanotechnology. Magazine of Nanotechnology Initiative Council, 143, 16-18.
37. Frisken, B., Asman, C. & Patty, P. (2000). *Studies of vesicle extrusion. Langmuir*, 16, 928-933.
38. Gaysinsky, S., Davidson, P. M., Bruce, B. D., & Weiss, J. (2005). Growth inhibition of Escherichia coli O157: H7 and Listeria monocytogenes by carvacrol and eugenol encapsulated in surfactant micelles. Journal of Food Protection, 68(12), 2559-2566.
39. Ghosh, A., Mandal, A. K., Sarkar, S., Panda, S. & Das, N. (2009). Nanoencapsulation of quercetin enhances its dietary efficacy in combating arsenic-induced oxidative damage in liver and brain of rats. Life Sciences, 84, 75-80.
40. Gonnet, M., Lethuaut, L. & Boury, F. (2010). New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. Journal of Controlled Release, 146: 276-290.
41. Gören, N., Arda, N., & Çaliskan Z., (2002). Chemical characterization and biological activities of the genus *Tanacetum* (Compositae). Natural Product Chemistry, 27(8), 547-658.
42. Gortiz, O., Lalas, S., Tsknis, j., & Chinou, I. (2007). Enhanced bioactivity of Citrus limon (Lemon Greek cultivar) extracts, essential oil and isolated compounds before and after encapsulation in liposomes. Planta Med. 73: P-18.

43. Gortzi, O., Lala, S., Chinou, I., & Tsaknis, J. (2007). Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of *Origanum dictamnus* extracts before and after encapsulation in liposomes. *Molecules*, 12(5), 932-945.
44. Gourine, N., M. Yousfi, I. Bombarda, B. Nadjemi, P. Stocker, & E. M. Gaydou. (2010). Antioxidant activities and chemical composition of essential oil of *Pistacia atlantica* from Algeria." *Industrial Crops and Products* 31, no. 2 203-208.
45. Gulluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., & Ozkan, H. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food chemistry*, 103(4), 1449-1456.
46. Gutiérrez, J. M., González, C., Maestro, A., Sole, I., Pey, C. M., & Nolla, J. (2008). Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 13(4), 245-251.
47. Ha, T. V. A., Kim, S., Choi, Y., Kwak, H. S., Lee, S. J., Wen, J., & Ko, S. (2015). Antioxidant activity and bioaccessibility of size-different nanoemulsions for lycopene-enriched tomato extract. *Food chemistry*, 178, 115-121.
48. Haznedaroglu, M. Z., Karabay, N. U., & Zeybek, U. (2001). Antibacterial activity of *Salvia tomentosa* essential oil. *Fitoterapia*, 72(7), 829-831.
49. Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.E. and Benoit, J.P. (2003). Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*, 24, 4283-4300.
50. Houlihan, C. M. Ho, C. T. & Chang, S. S. (1985). The structure of rosmariquinone – a new antioxidant isolated from *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 62, 96-98.
51. Huang, Q., Yu, H. & Ru, Q. (2010). Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. *Journal of Food Science*, 75(1): 50-57.
52. Hubschmann, H. J. (2000). *Hand Book of GC-MS: Fundamentals and Applications*, VCH Verlagsgesellschaft.
53. Jassbi, A. R., Mehrdad, M., Eghtesadi, F., Ebrahimi, S. N., & Baldwin, I. T. (2006). Novel rearranged abietane diterpenoids from the roots of *Salvia sahendica*. *Chemistry & biodiversity*, 3(8), 916-922.

54. Jaworska, M., Sikora, E., Zielina, M., & Ogonowski, J. (2013). Studies on the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsification method, suitable for cosmeceutical applications. *Acta Biochimica Polonica*, 60(4), 779-782.
55. Jiulin, W. Liu, H., Ge, S., Wang, S., Qin, Z., Chen, L., & Zhang, Q. (2015). The preparation, characterization, antimicrobial stability and in vitro release evaluation of fish gelatin films incorporated with *cinnamon* essential oil nanoliposomes. *Food Hydrocolloids*, 43, 427-435
56. Jones, M. N. (1995). The surface properties of phospholipid liposome systems and their characterisation. *Advances in colloid and interface science*, 54, 93-128.
57. Keller, B. C. (2001). Liposomes in nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 12, 25-31.
58. Kentish, S., Wooster, T. J., Ashokkumar, M., Balachandran, S., Mawson, R., & Simons, L. (2008). The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 170-175.
59. Kia, H. D., Farhadi, R., Dehghan, G., & Ashrafi, I. (2015). Effect of salvia Sahendica ethanol Extract on Microscopic and Lipid Peroxidation Parameters of Freeze-Thawed Holstein Bull Sperm. 6(12), 79-86.
60. Kirby, C., Clarke, J., & Gregoriadis, G. (1980). Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability in vivo and in vitro. *Biochemical Journal*, 186(2), 591-598.
61. Li, P. H., & Chiang, B. H. (2012). Process optimization and stability of D-limonene-in-water nanoemulsions prepared by ultrasonic emulsification using response surface methodology. *Ultrasonics sonochemistry*, 19(1), 192-197.
62. Lin Ee, S. L., Duan, X., Liew, J., & Nguyen, Q. D. (2008). Droplet size and stability of nano-emulsions produced by the temperature phase inversion method. *Chemical Engineering Journal*, 140(1), 626-631.
63. Liolios, C. C., Gortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J., & Chinou, I. (2009). Liposomal incorporation of *carvacrol* and *thymol* isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. *Food chemistry*, 112(1), 77-83.
64. Liu, J., Hu, W., Chen, H., Ni, Q., Xu, H. & Yang, X. (2007). Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 328, 191-195

65. Lopez rubio, A., Gavara, R. & Lagaron, J. M. (2006). Bioactive packaging: turning foods into healthier foods through biomaterials. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 567-575.
66. Maali, A., & Mosavian, H., (2013). Preparation and application of nanoemulsions in the last decade (2000–2010). *Journal of Dispersion Science and Technology* 34 (1), 92-105.
67. Maherani, B., Arab-Tehrany, E., R Mozafari, M., Gaiani, C. & Linder, M. (2011). Liposomes: a review of manufacturing techniques and targeting strategies. *Current Nanoscience*, 7, 436-452.
68. Mahon, C. R., Manuselis Jr, G. (1995). *Diagnostic microbiology*. Philadelphia: WB Saunders Co.
69. Maiti, K., Mukherjee, K., Gantait, A., Ahamed, H. N., Saha, B. P. & Mukherjee, P. K. (2005). Enhanced therapeutic benefit of quercetin-phospholipid complex in carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats: a comparative study. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics*, 4, 84- 90.
70. Malheiros, P. D. S., Sant'anna, V., Barbosa, M. D. S., Brandelli, A. & Franco, B. D. G. D. M. 2012. Effect of liposome-encapsulated nisin and bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* growth in Minas frescal cheese. *International journal of food microbiology*, 156, 272-277.
71. Marsanasco, M., Márquez, A. L., Wagner, J. R., Del V Alonso, S. & Chiaramoni, N. S. (2011). Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment. *Food Research International*, 44, 3039-3046.
72. McClements, D. J. & Li, Y. (2010). Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Advances in Colloid and Interface Science*, 159, 213-228 .
73. McClements, D. J. (2012). Crystals and crystallization in oil-in-water emulsions: Implications for emulsion-based delivery systems. *Advances in colloid and interface science*, 174, 1-30.

74. McClements, D. J., & Rao, J. (2011). Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51(4), 285-330.
75. Mehnert, W., & Mader, K. (2001). Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47, 165-196.
76. Meure, L. A., Foster, N. R. & Dehghani, F. (2008). Conventional and dense gas techniques for the production of liposomes: a review. *Aaps Pharmscitech*, 9, 798-809.
77. Moghimi, R., Ghaderi, L., Rafati, H., Aliahmadi, A., & McClements, D. J. (2016). Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. *Food chemistry*, 194, 410-415.
78. Mohammed, A., Weston, N., Coombes, A., Fitzgerald, M. & Perrie, Y. (2004). Liposome formulation of poorly water soluble drugs: optimisation of drug loading and ESEM analysis of stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 285, 23-34.
79. Mohammadi, M., Ghanbarzadeh, B., Mokarram, R. R., Hoseini, M. Y., & Hamishehkar, H. (2014). Study of Stability, Zeta-potential, and Steady Rheological Properties of Nanoliposomes Containing Vitamin D3. *Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services*, 36(4), 102-111.
80. Morris, J., Khettry, A. & Seitz, E. (1979). Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56, 595-603.
81. Mozafari, M. (2010). *Nanoliposomes: preparation and analysis*. Liposomes. Springer.
82. Mozafari, M. R. (2005). Liposomes: an overview of manufacturing techniques. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 10, 711
83. Muller, R., Dingler, A. (1998). The next generation after the liposomes: solid lipid nanoparticles (SLN, Lipopearls) as dermal carrier in cosmetics. *Eurocosmetics*, 7, 19-26.

84. Muller, R., Petersen, R., Hommoss, A. & Pardeike, J. (2007). Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 522-530.
85. Nagle, J. F., & Tristram-Nagle, S. (2000). Structure of lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1469(3), 159-195.
86. Nedovic, V., Kalusevic, A., Manjlovic, V., Levic, S. & Bugaski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1, 1806-1815.
87. Peana, A. T., Moretti, M. D., & Juliano, C. (1999). Chemical composition and antimicrobial action of the essential oils of *Salvia desoleana* and *S. sclarea*. *Planta medica*, 65(8), 752-754.
88. Sagalowicz, L. & Leser, M. E. (2010). Delivery systems for liquid food products. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15, 61-72.
89. Salvia-Trujillo, L., Qian, C., Martín-Belloso, O., & McClements, D. J. (2013). Modulating  $\beta$ -carotene bioaccessibility by controlling oil composition and concentration in edible nanoemulsions. *Food chemistry*, 139(1), 878-884.
90. Sandri, I., Zacaria, J., Fracaro, F., Delamare, A. & Echeverrigaray, S. (2007). Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus *Cunila* against foodborne pathogens and spoiling bacteria. *Food Chemistry*, 103, 823-828.
91. Saupe, A., Gordon, K. C. & Rades, T. (2006). Structural investigations on nanoemulsions, solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers by cryo-field emission scanning electron microscopy and Raman spectroscopy. *International Journal of Pharmaceutics*, 314, 56-62.
92. Schmidts, T., Dobler, D., Guldan, A. C., Paulus, N., & Runkel, F. (2010). Multiple W/O/W emulsions Using the required HLB for emulsifier evaluation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 372(1), 48-54.
93. Sepahvand, R., Delfan, B., Ghanbarzadeh, S., Rashidipour, M., Veiskarami, G. H., & Ghasemian-Yadegari, J. (2014). Chemical composition, antioxidant activity

- and antibacterial effect of essential oil of the aerial parts of *Salvia sclareoides*. Asian Pacific journal of tropical medicine, 7, S491-S496.
94. Shaerzadeh, F., Ahmadiani, A., Esmaeili, M. A., Ansari, N., Asadi, S., Tusi, S. K., & Khodagholi, F. (2011). Antioxidant and antiglycating activities of *Salvia sahendica* and its protective effect against oxidative stress in neuron-like PC12 cells. Journal of natural medicines, 65(3-4), 455-465.
  95. Shah, P., Bhalodia, D., & Shelat, P., (2010). Nanoemulsion: A pharmaceutical review. Systematic Reviews in Pharmacy 1 (1), 24.
  96. Shahavi, M. H., Hosseini, M., Jahanshahi, M., Meyer, R. L., & Darzi, G. N. (2015). Evaluation of critical parameters for preparation of stable *clove oil* nanoemulsion. Arabian Journal of Chemistry.
  97. Shakeel, F. & Ramadan, W. (2010). Transdermal delivery of anticancer drug caffeine from water-in-oil nanoemulsions. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 75, 356-362.
  98. Silva, H. D., Cerqueira, M. Â., & Vicente, A. A. (2012). Nanoemulsions for food applications: development and characterization. Food and Bioprocess Technology, 5(3), 854-867.
  99. Sinico, C., De Logu, A., Lai, F., Valenti, D., Manconi, M., Loy, G., & Fadda, A. M. (2005). Liposomal incorporation of *Artemisia arborescens* L. essential oil and in vitro antiviral activity. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 59(1), 161-168.
  100. Tamjidi, F., Shahedi, M., Varshosaz, J. & Nasirpour, A. (2013). Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 19, 29-43.
  101. Teeranachaideekul, V., Souto, E. B., Junyaprasert, V. B. & Müller, R. H. (2007). Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of Coenzyme Q sub & sub– Development, physicochemical characterization and in vitro release studies. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 67, 141-148.
  102. Tenore, G. C., Ciampaglia, R., Arnold, N. A., Piozzi, F., Napolitano, F., Rigano, D., & Senatore, F. (2011). Antimicrobial and antioxidant properties of the

- essential oil of *Salvia lanigera* from Cyprus. Food and Chemical Toxicology, 49(1), 238-243.
103. Tepe, B., Donmez, E., Unlu, M., Candan, F., Daferera, D., Vardar-Unlu, G., ... & Sokmen, A. (2004). Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). Food chemistry, 84(4), 519-525.
  104. Tseng, L., Liang, H., Chung, T., Huang, Y., & Liu, D. (2007). Liposomes incorporated with cholesterol for drug release triggered by magnetic field. Journal of Medical and Biological Engineering, 27(1), 29.
  105. Tzakou, O., Pitarokili, D., Chinou, I. B., & Harvala, C. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Salvia ringens*. Planta Medica, 67(1), 81-83.
  106. Ulubelen, A., Topcu, G., Eri, C., Sönmez, U., Kartal, M., Kurucu, S., & Bozok-Johansson, C. (1994). Terpenoids from *Salvia sclarea*. Phytochemistry, 36(4), 971-974.
  107. Valenti, D., De Logu, A., Loy, G., Sinico, C., Bonsignore, L., Cottiglia, F., & Fadda, A. M. (2001). Liposome-incorporated *Santolina insularis* essential oil: preparation, characterization and in vitro antiviral activity. Journal of liposome research, 11(1), 73-90.
  108. Varona, S., Martín, Á., & Cocero, M. J. (2011). Liposomal incorporation of *lavandin* essential oil by a thin-film hydration method and by particles from gas-saturated solutions. Industrial & Engineering Chemistry Research, 50(4), 2088-2097.
  109. Varshosaz, J., Minayian, M. & Moazen, E. (2010). Enhancement of oral bioavailability of pentoxifylline by solid lipid nanoparticles. Journal of Liposome Research, 20, 115-123.
  110. Viriyaroj, A., Ngawhirunpat, T., Sukma, M., Akkaramongkolporn, P., Ruktanonchai, U., & Opanasopit, P. (2009). Physicochemical properties and antioxidant activity of gamma-oryzanol-loaded liposome formulations for topical use. Pharmaceutical development and technology, 14(6), 665-671.

111. Weiss, J., Decker, E. A., McClements, D. J., Kristbergsson, K., Helgason, T. & Awad, T. (2008). Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bioactive food components. *Food Biophysics*, 3, 146-154.
112. Wilkinson, J.B., (1994). *Harry's Cosmetology*. 7 ed: Longman Scientific and Technical.
113. Woods, G.L., (1995). A. Antimicrobial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In Murray, P.R (ed). *Manual of clinical microbiology*. 6th ed. ASM press Washington.
114. Yuan, Y., Gao, Y., Zhao, J., & Mao, L. (2008). Characterization and stability evaluation of  $\beta$ -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. *Food Research International*, 41(1), 61-68.
115. Zalba, S., Navarro, I., Trocóniz, I. F., de Ilarduya, C. T., & Garrido, M. J. (2012). Application of different methods to formulate PEG-liposomes of oxaliplatin: evaluation in vitro and in vivo. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 81(2), 273-280.
116. Zasadzinski, J. A., Wong, B., Forbes, N., Braun, G. & Wu, G. (2011). Novel methods of enhanced retention in and rapid, targeted release from liposomes. *Current opinion in colloid & interface science*, 16, 203-214.

## Abstract

Second metabolites isolated from salvia spices mostly are terpenoids and flavonoids, which are bioactive compounds with high healthy effects. But most of this materials after extraction from plant, are chemically unstable and when consumed has shown lower healthy effects. This food-drug (Nutraceuticals) compounds have act with other materials in food materials or due to stability and low solubility and their unpleasant flavor have limited. For eliminate this problems, we can use carrier systems to encapsulate and improve functional properties of food-drug materials. So, in this study nanoemulsion was prepared by using high intensity ultrasound method. Tween 80 and spin 80 surfactants, *salvia Sahandica* essential oil was used as oily phase and water as nanoemulsion compound separator. Also, for nanoliposome preparation, the thin layer hydration method was used, and phosphatidylcholine as a molar ratio of 1 to 1 with *saliva* essential oil, was used. For hydration, the ratio of 4 to 6 glycerol and water were used. In this study, the antioxidant properties of essential oils of s. *Sahandica* and nanocarriers were measured using DPPH radical. The antimicrobial properties of nano-carriers and salvia sahandica essential oil was done by two methods, microdilution and macrodilution. The results indicate that we achieve optimum particle size and particle size distribution for nano-emulsion formulations, respectively was  $0.38 \pm .0.01$  and  $89.45 \pm 0.41$  and  $01.0 \ 1.53 \pm 82.87$  nm and optimal formulation Nanoliposome was respectively  $0.42 \pm 0.01$  and  $82.87 \pm 1.53$ . The encapsulation efficiency for nanoemulsion and nanoliposome was of 69% and 84% respectively. Antioxidant effect of essential oil and nanocarriers showed significant differences, so that the nanoemulsion containing the oil and free oil represented the highest and the lowest antioxidant properties, respectively. The results of microbial experiments on micro-dilution and macro dilution method showed that, the impact of the oil in both free and encapsulated in lipid carriers state against Gram-positive bacteria (*staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) were higher than on Gram-negative bacteria (*E.coli* and *Moraxella catarrhalis*). Antimicrobial activity of essential oils and nanocarriers showed significant differences, so that the nanoemulsion containing essential oil and free essential oil had the highest and lowest antimicrobial activity, respectively. In general, antimicrobial and antioxidant activities of nanoemulsion were higher than nanoliposome. As a result nanoemulsion can be usefull carrier for increasing of antimicrobial and antioxidant activities of s. *sahandica* essential oil.

Keyword: Nanoemulsion, Nanoliposome, Salvia sahandica, Antimicrobial



Shahrood University Technology

Faculty of Agricultural Science

Department of Food Science and Technology

**nanoemulsions and nano liposome formulation of Salvia Sahendica in order  
to investigate physicochemical and antimicrobial activities**

Sasan Gharenaghadeh

Supervisors

Dr. Hamidreza Samadlouie

Dr. Mahmood Sowti

Advisors

Dr. Hamed Hamishehkar

Dr. Reza Rezaei Mokaram

Researcher

February 2016