DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2016.106831

دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران

جلد ۳۲، شماره ۳، صفحه ۵۱۲-۵۰۱ (۱۳۹۵)

تأثیر نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss.) بر بازدارندگی از رشد عوامل بیماری‌زای قارچی *Alternaria solani*، *Rhizoctonia solani* و *Rhizopus stolonifer*

محبوبه ناصری[۱]، شیوا گل‌محمدزاده[۲*]، حسین آروئی[۳]، محمودرضا جعفری[۴] و حسین نعمتی[۳]

۱- دانشجوی دکترا، گروه علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه فارماسیوتیکس و مرکز تحقیقات نانوفناوری، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

پست الکترونیک: Golmohamadzadehsh@mums.ac.ir

۳- استادیار، گروه علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

۴- استاد، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۴ تاریخ اصلاح نهایی: شهریور ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۴

چکیده

به‌منظور مرتفع کردن مشکلات استفاده از اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss.) (ناپایداری، تبخیر و تجزیه در مقابل شرایط محیطی و شیمیایی (نور، اکسیژن، رطوبت، pH)) و افزایش کارایی آن در کنترل عوامل قارچی بیماری‌زای *Alternaria solani*، *Rhizoctonia solani* و *Rhizopus stolonifer* از سیستم حامل نانوذرات لیپیدی جامد (Solid Lipid Nanoparticle) استفاده شد. این تحقیق در مرکز تحقیقات نانوفناوری دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد و گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد در شرایط آزمایشگاهی اجرا شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار به روش اختلاط اسانس و نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس با محیط کشت دکستروز آگار (Potato dextrose agar) با چهار غلظت ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر بر لیتر بود. نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس با استفاده از روش امواج فراصوت تهیه شد. نتایج نشان داد که اندازه نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس کمتر از ۲۰۰ نانومتر، شاخص پراکندگی ۰/۴۸۳، پتانسیل زتا ۴۲/۶- میلی‌ولت و شکل ذرات نیز کروی بود. نتایج نشان داد که حداقل غلظت بازدارندگی (Minimum Inhibitory Concentration) برای فرم اسانس آزاد برای تمامی جدایه‌های قارچی مورد آزمایش ۲۰۰ (میکرولیتر بر لیتر) و حداقل غلظت بازدارندگی نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس برای گونه‌های *R. solani* و *Rh. stolonifer* ۵۰ میکرولیتر بر لیتر و برای *A. solani* ۱۰۰ میکرولیتر بر لیتر بود، که نشان‌دهنده تأثیر بهتر نانوذرات حاوی اسانس نسبت به فرم اسانس آزاد بر بازداری از رشد عوامل بیماری‌زای قارچی می‌باشد. نتایج این آزمایش نشان داد که نانوذرات لیپیدی جامد می‌توانند حامل‌های مناسبی برای اسانس آویشن شیرازی باشند.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات لیپیدی جامد، حداقل غلظت بازدارندگی، اسانس، عوامل بیماری‌زای قارچی.

مقدمه

آثار محافظت‌کنندگی بعضی اسانس‌های طبیعی از گذشته‌های دور شناخته شده‌است و به تازگی نیز به‌دلیل طبیعی بودن این مواد و آثار مثبت آنها در کاهش مواد شیمیایی سرطان‌زا مانند قارچ‌کش‌ها بسیار مورد توجه می‌باشد (Behdad *et al*., 2013). در همین راستا، تحقیقات نشان داده‌است که اسانس‌های گیاهی مزیت‌های چندی را مانند تجمع زیستی و سمّیت کمتر، تجزیه سریع و طیف فعالیت بسیار وسیع نسبت به قارچ‌کش‌ها و آفت‌کش‌های سنتز شده دارند، ضمن اینکه ترکیب‌های مؤثر جدیدی دارند که قارچ‌ها قادر به غیرفعال کردن آنها نیستند. با وجود مزایای ذکر شده، استفاده از اسانس گیاهان دارویی محدودیت‌هایی مانند ناپایداری، تبخیر و تجزیه در مقابل شرایط محیطی و شیمیایی (نور، اکسیژن، رطوبت، pH) دارد (Donsi *et al*., 2011). در همین ارتباط یکی از روش‌های مرتفع کردن مشکلات ناشی از فرّاریت و ناپایداری اسانس‌ها، کپسوله کردن اسانس در اندازه نانو (Nanoencapsulation) است (Namazi, 2015). در این روش ماده مؤثره در محفظه یا پوسته کوچک به اندازه نانو بسته‌بندی می‌گردد. این پوسته از سویی ترکیب شیمیایی را از آسیب عوامل خارجی محافظت می‌کند و از سوی دیگر کمک به افزایش حلالیت و نفوذ به بافت می‌کند. البته باز شدن این پوسته برای رهاسازی ترکیب مورد نظر از طریق تغییر شرایط خارجی مانند pH ممکن خواهد بود (Perez-de-Luque & Rubiales, 2009).

نانوکپسول‌ها علاوه‌بر اینکه محافظت خوب و مناسبی از اسانس گیاهان دارویی در مقابل عوامل تجزیه‌کننده و فرّاریت را باعث می‌شوند، تأثیر منفی بر فعالیت ضدمیکروبی آنها ندارند. همچنین سیستم‌های نانوکپسولاسیون به‌دلیل اندازه کوچکتر از سلول، ممکن است منجر به افزایش مکانیزم جذب غیرفعال سلولی شده، در نتیجه باعث کاهش مقاومت انتقال شده و فعالیت ضدمیکروبی را افزایش دهند. در همین ارتباط Wu و همکاران (۲۰۱۲) با استفاده از نانوذرات پروتئین گیاهی ذرت تیمول و کارواکرول را کپسوله کردند و توانستند خواص ضدمیکروبی این ترکیب‌ها را افزایش دهند.

برای کپسوله کردن ترکیب‌های اسانس گیاهان دارویی روش‌های مختلفی وجود دارد که یکی از مهمترین آنها سیستم حاملی به نام نانوذرات لیپیدی جامد (Solid Lipid Nanoparticle (SLN)) می‌باشد. نانوذرات لیپیدی جامد (SLN) سیستم‌های حامل کلوئیدی‌اند که مشابه نانو امولسیون‌ها می‌باشند ولی در نوع لیپید تفاوت عمده‌ای دارند، به‌طوری که در نانو امولسیون از لیپید مایع اما در نانوذرات لیپیدی جامد از لیپیدهای جامد مانند تری گلیسرید، اسید چرب (اسید استئاریک–اسید پالمیتیک)، استروئید (کلسترول) و موم (ستیل پالمیتیک) استفاده می‌کنند (Ekambaram *et al*., 2011). نانوذرات لیپیدی جامد در سال ۱۹۹۱ جایگزین دیگر حامل‌های کلوئیدی رایج مانند امولسیون، لیپوزوم و میکرو پلیمرها شدند. اندازه آنها بین ۵۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر است. نانوذرات لیپیدی جامد قادرند پایداری و حلالیت اسانس را در آب افزایش دهند (Shi *et al*., 2012). در همین راستا، Li و همکاران (۲۰۱۲) کاهش فرّاریت و تبخیر اسانس آرتمیزیا (*Artemisia arborescens* L.) را با استفاده از SLNها گزارش کردند. به‌طور کلی بکارگیری نانوذرات لیپیدی جامد به‌عنوان سیستم حامل اسانس گیاه دارویی دارای مزایایی مانند حفاظت اسانس محصور شده در مقابل فرّاریت و تبخیر، دارا بودن خصوصیات فیزیکی– شیمیایی مناسب، قابلیت رهایش اسانس به‌صورت تدریجی و کنترل شده، افزایش خواص ضدمیکروبی اسانس، زیست تجزیه‌پذیر بودن اجزاء لیپیدی آن، افزایش دسترسی زیستی (Bioavailable) ترکیب‌های زیست فعال (Bioactive) و عدم سمّیت برای موجودات زنده می‌باشد که اهمیت استفاده از این ترکیب را آشکارتر می‌کند (Fathi *et al*., 2012؛ Ekambaram *et al*., 2011؛ Li *et al*., 2012).

در بین ترکیب‌های موجود در اسانس گیاهان دارویی تیمول و کارواکرول دو ترکیبی هستند که دارای فعالیت ضدقارچی و ضدباکتریایی قوی می‌باشند (Bacchella *et al*, 2009؛ Burt, 2004). در همین ارتباط آویشن شیرازی گیاهی معطر از تیره نعناع است که در بین

ترکیب‌های شناسایی شده آن تیمول و کارواکرول دو ماده مهم و عمده آن می‌باشد، به‌طوری که تا ۷۸٪ نیز مقدار این دو ماده در اسانس آویشن شیرازی گزارش شده‌است (Shafiee & Javidnia, 1997).

تحقیقات انجام شده در ایران و جهان در جهت انکپسوله کردن اسانس گیاهان دارویی با اهدافی مانند داروسازی، صنایع غذایی، بهداشتی و غیره بوده‌است (Wu *et al*., 2012؛ Golmohammadzadeh *et al*., 2012) و پژوهش‌های اندکی در زمینه تأثیر نانوذرات لیپیدی جامد بر عوامل بیماری‌زای گیاهی انجام شده‌است. در همین راستا، این تحقیق با هدف انجام مطالعات پایه‌ای، امکان مرتفع کردن ناپایداری اسانس گیاه دارویی آویشن و افزایش کارایی آن با استفاده از سیستم حامل نانوذارت لیپیدی جامد در کنترل عوامل بیماری‌زای قارچی *Alternaria solani*، *Rhizoctonia solani* و *Rhizopus stolonifer* انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه و شناسایی ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس‌ها

اسانس آویشن شیرازی از شرکت داروسازی باریج اسانس تهیه شد. سپس ترکیبات اسانس با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی (Gas Chromatography (GC)) شناسایی شد.

تهیه جدایه‌های قارچ

جدایه‌های قارچ‌های *Alternaria solani*، *Rhizoctonia solani* و *Rhizopus stolonifer* از بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی تهیه شد.

سنتز نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس آویشن شیرازی

تهیه نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس به روش امواج فراصوت (Ultrasound) انجام شد. برای تهیه نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس آویشن شیرازی به این روش، به دو فاز لیپیدی و آبی نیاز است. فاز چربی فرمولاسیون شامل گلیسیریل منواستئارات (Glyceril monostearate) و پرسیرول (Precirol) است که پس از دستیابی به فرمولاسیون نهایی اسانس نیز وارد همین فاز می‌شود، زیرا اسانس‌ها محلول در چربی می‌باشند. فاز آبی شامل توئین۸۰ (Toween 80) یا پولوکسامر۱۸۸ (Poloxamer 188) به همراه آب می‌باشد. بعد از توزین مواد مورد نیاز فرمولاسیون (لیپید، آب و امولسیفایر) با درصدهای مشخص (جدول ۱)، فاز لیپیدی و آبی هر یک به‌طور جداگانه در دو فالکون مجزا داخل بن‌ماری قرارداده شد؛ بن‌ماری روی دمای $80^{\circ}C$ تنظیم شده و دو فالکون حاوی دو فاز داخل آن قرار داده شده تا فاز چربی ذوب شده و دو فاز هم‌دما شوند. یک بشر محتوای آب‌مقطر نیز در بن‌ماری قرار داده شد تا بعداً به‌عنوان حمام آب گرم از آن استفاده شود. در این مرحله ابتدا اسانس به فاز چربی اضافه شده و پس از یک دقیقه دو فاز را از بن‌ماری خارج کرده و فاز آبی به‌سرعت و به‌طور ناگهانی به فاز چربی اضافه شد. اگر فاز چربی در این فاصله اندکی سرد شود دوباره به حالت جامد در می‌آید. از این‌رو مرحله مخلوط کردن دو فاز باید در بن‌ماری انجام شود. بشر حاوی مخلوط را داخل بشر حمام آب گرم گذاشته تا دمای آن پایین نیاید. در این مرحله امولسیون سفید رنگی تشکیل شد (در هر بار حجمی برابر۲۰ سی‌سی نمونه تهیه شد) و بعد با هموژنایزر (DIAX900) به مدت ۵ دقیقه یکنواخت شد. بعد از هموژناسیون، ترکیب به دستگاه پروب سونیکتور (prob sonicator) (۳ سیکل و هر سیکل ۳۰ ثانیه) منتقل شد. سپس مخلوط در دمای محیط قرار داده شد تا کاملاً سرد شده و با محیط هم‌دما شود تا نانو ذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس آویشن شیرازی تشکیل شود (Golmohammadzadeh *et al*., 2012).

جدول ۱- اجزاء فرمولاسیون برای سنتز نانوذرات لیپیدی جامد به روش امواج فراصوت

فاز	اجزاء فرمولاسیون	مقادیر (وزنی- حجمی) (٪)
فاز چربی	پرسیرول (۳۰٪) + گلیسریل منواستئارات (۷۰٪) + اسانس آویشن شیرازی	۵
فاز آبی	توئین ۸۰ + پولوکسامر۱۸۸	۱/۲۵+۱/۲۵
	آب	تا ۱۰۰

تعیین اندازه ذره‌ای (Particle size) و پتانسیل زتا (Zeta potential)

برای بررسی اندازه ذره‌ای و قابلیت زتا از دستگاه آنالیز اندازه ذرات (Particle size analyzer) استفاده شد. قابلیت زتا در پایداری سیستم‌های ذره‌ای اهمیت دارد. این قابلیت میزان دامنه بین ذرات مجاور با بار مشابه را تعیین می‌کند. اگر قابلیت زتا از حد خاصی پایین‌تر باشد نیروهای جاذبه بر دافعه غلبه کرده و ذرات با هم تجمع می‌یابند. اهمیت اندازه‌گیری پتانسیل زتا به این دلیل است که مقدار آن نقش مهمی در پایداری نانوذرات لیپیدی جامد در برابر تجمع، الحاق و تداخل بین لیپیدها و مواد باردار دارد. برای اندازه‌گیری اندازه ذره و پتانسیل زتا ۱۰ میکرولیتر از نمونه تازه تهیه شده و سرد شده در یک میکروتیوب با حجم ۱/۵ میلی لیتر ریخته و با ۹۹۰ میکرولیتر فاز بیرونی یعنی آب دیونیزه رقیق شد (۱ به ۱۰۰). دستگاه، اندازه ذره‌ای را برحسب تعداد (Number)، حجم (Volume) و شدت (Intensity) بیان می‌کند (Mader & Mehnert, 2005).

بررسی مورفولوژی نانوذرات لیپیدی جامد به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی (Transmission Electron Microscopy (TEM))

برای عکس‌برداری و بررسی مورفولوژی نانوذرات لیپیدی جامد از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) (واقع در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی مشهد) استفاده شد. نمونه حدود ۵۰ برابر با آب‌مقطر رقیق شده، سپس ۲۰ میکرولیتر از نمونه روی گریدز با کربن پوشش داده شده قرار گرفت و پس از ۳۰ ثانیه به‌وسیله فیلتر کاغذی خشک شد. ۲۰ میکرولیتر از اورانیل استات ۲٪ در آب، روی گریدز قرار گرفته و پس از ۳۰ ثانیه با فیلتر کاغذی خشک شد. پس از خشک شدن، نمونه زیر میکروسکوپ الکترونی مشاهده شد (Jores *et al*., 2004).

بررسی فعالیت ضدقارچی نانو ذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس آویشن در شرایط آزمایشگاهی

به‌منظور ارزیابی اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس آویشن در ممانعت از رشد جدایه‌های *A. solani*، *R. solani* و *Rh. stolonifer* آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در شرایط آزمایشگاهی به‌روش اختلاط با محیط کشت دکستروز آگار (PDA) اجرا شد. فاکتورهای آزمایش شامل دو نوع فرمولاسیون، فرم آزاد اسانس آویشن شیرازی و فرم نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس آویشن شیرازی و فاکتور دوم غلظت‌های ۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر بر لیتر اسانس آویشن شیرازی بود. فلاسک‌های حاوی محیط کشت به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو (دمای ۱۲۱°C و فشار ۱/۵ اتمسفر) استریل شد. غلظت‌های مختلف اسانس آویشن و نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس آویشن (۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میکرولیتر در لیتر اسانس در محیط کشت PDA) به فلاسک‌های حاوی محیط PDA در دمای ۴۵°C-۴۲ اضافه و به هم زده شد تا امولسیون یکنواخت به وجود آید. محیط‌های حاصل بلافاصله درون ظرف پتری به قطر ۹ سانتی‌متری توزیع و اجازه داده شد تا محیط کشت جامد گردد. بعد از آن، با

استفاده از یک چوب‌پنبه سوراخ‌کن دیسک‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر از میسیلیوم‌های قارچ کشت ۱۰ روزه را برداشته و در روی محیط کشت قرار داده شد. بلافاصله بعد از اینکه قارچ کشت شد دور پتری پارافیلم کشیده شد. قطر پرگنه قارچ‌ها در زمانی که تیمار شاهد سطح پتری‌دیش را به‌طور کامل پر کرد یادداشت شد، که این زمان برای قارچ‌های *A. solani*، *R. solani* و *Rh. stolonifer* به‌ترتیب ۸، ۶ و ۷ روز بود. درصد ممانعت از رشد میسیلیوم قارچ‌های مورد نظر در هر یک از غلظت‌های آزمایشی با استفاده از معادله ۱ محاسبه شد (Özden & Bayindirli, 2002).

معادله ۱: $IP=dc-dt\times100/dc$

که در این معادله: IP= درصد بازدارندگی، dc= قطر پرگنه قارچ‌ها در تیمار شاهد و dt= قطر پرگنه قارچ‌ها در تیمار اسانس بود.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری با نرم‌افزار MSTATC و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام شد. شکل‌ها نیز با نرم‌افزار Excel رسم شدند.

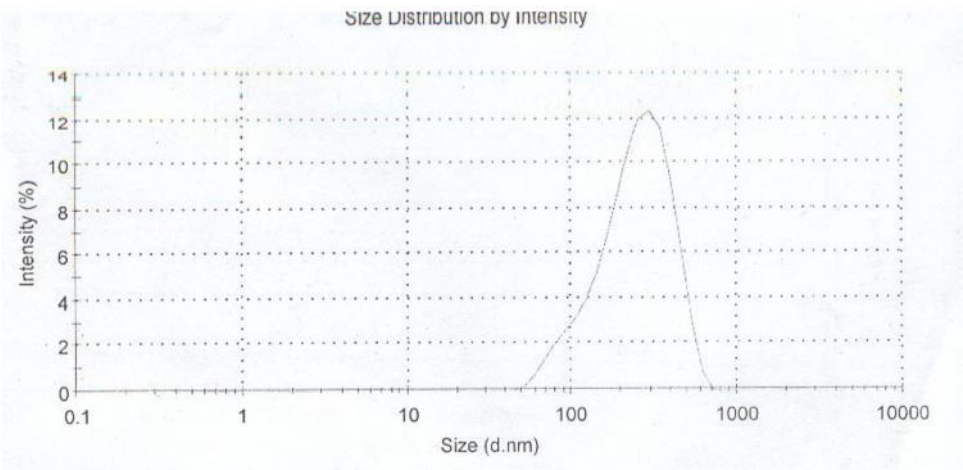
نتایج

ترکیب‌های موجود در اسانس

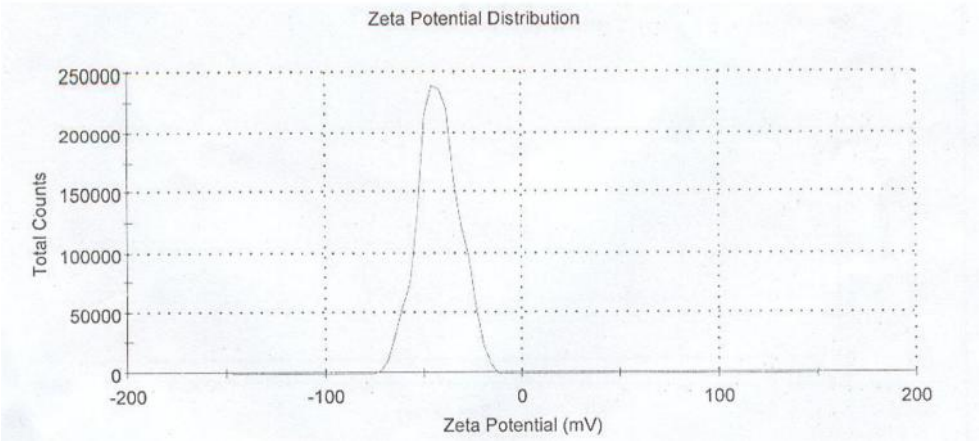
با بررسی طیف‌های GC و GC/MS و محاسبه اندیس‌های بازداری و مقایسه طیف‌های جرمی ترکیب‌ها با ترکیب‌های استاندارد، ۲۱ ترکیب مختلف در اسانس آویشن شیرازی شناسایی شد که ترکیب‌های عمده آن به‌ترتیب تیمول (۳۵/۳٪)؛ کارواکرول (۳۳/۹٪)؛ پارا-سیمین (۹/۹٪)؛ گاما-ترپینن (۵/۹٪) و آلفا-پینن (۴/۲٪) بودند.

بررسی اندازه، شاخص پراکندگی (polydispersity index (pdi)) و پتانسیل زتا نانوذرات لیپیدی حاوی اسانس آویشن شیرازی

میانگین اندازه ذره و توزیع آن اغلب یکی از مهمترین پارامترهای مرتبط با کیفیت است که سایر خواص ماکروسکوپی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. اندازه ذره‌ای نانوذرات لیپیدی به‌وسیله پارامترهای مختلفی مانند ترکیب فرمولاسیون، روش‌های تولید و شرایط محیط (مانند زمان، حرارت، فشار، تعداد سیکل، تجهیزات) تحت تأثیر قرار می‌گیرد. در این آزمایش اندازه ذره‌ای براساس Z-average ۲۸۴ نانومتر، شاخص پراکندگی ۰/۴۸۳ و پتانسیل زتا ۴۲/۶- میلی‌ولت بود (شکل ۱ و ۲).



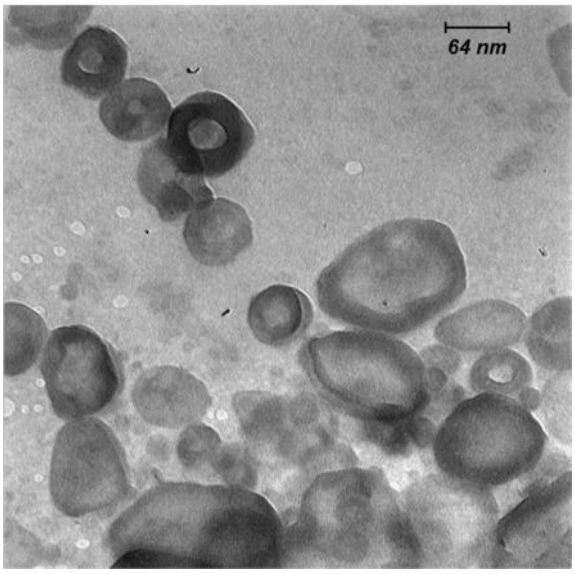
شکل ۱- توزیع اندازه نانوذرات لیپیدی جامد براساس شاخص شدت فرمولاسیون تهیه شده با ۵٪ لیپید (گلیسیرین منواستئارات و پرسیرول) و ۲/۵٪ سورفکتانت (توئین ۸۰ پولوکسامر۱۸۸)



شکل ۲- توزیع پتانسیل زتا در نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس آویشن شیرازی تهیه شده با ۵٪ لیپید (گلیسیرین منواستئارات و پرسیرول) و ۲/۵٪ سورفکتانت (توئین۸۰ و پولوکسامر۱۸۸)

بررسی مورفولوژی نانوذرات لیپیدی جامد به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی

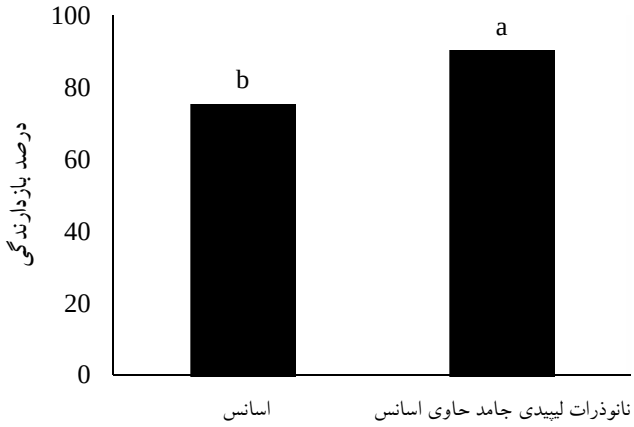
نتایج حاصل از عکس‌های میکروسکوپ الکترونی نشان داد اندازه ذره‌ای ذرات کمتر از ۲۰۰nm بوده و شکل ذرات تقریباً کروی است (شکل ۳). کروی بودن نانوذرات لیپیدی جامد باعث می‌شود که این ذرات بیشترین توانایی را برای آزادسازی کنترل شده و محافظت از اسانس احتباس یافته داشته باشند. زیرا شکل کروی دارای طولانی‌ترین مسیر برای حرکت اسانس محبوس در نانو ذره و همچنین کمترین سطح تماس با محیط آبی فاز پراکنده، نسبت به سایر شکلهای نانوذرات می‌باشد (Bunjes, 2005).



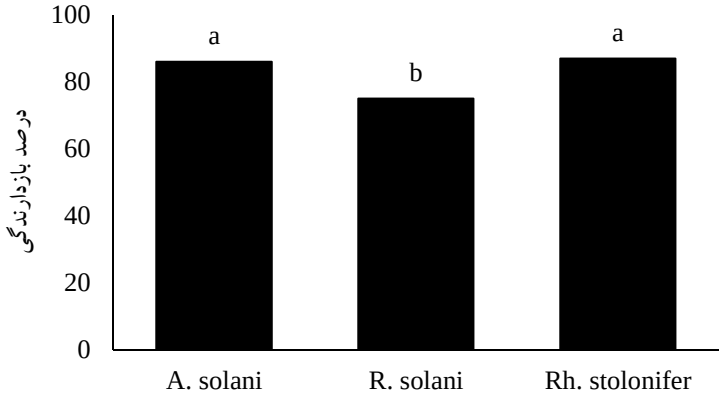
شکل ۳- عکس میکروسکوپ الکترونی TEM از نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس آویشن شیرازی

بازدارندگی رشد کلنی عوامل بیماری‌زای قارچی مورد آزمایش

براساس نتایج آزمایش، تأثیر نوع فرمولاسیون اسانس (فرم آزاد اسانس و فرم نانوذرات لیپیدی حاوی اسانس) بر درصد بازدارندگی از رشد قارچ‌های مورد آزمایش معنی‌دار ($P\leq0.01$) بود، به‌طوری که فرم آزاد اسانس به‌طور میانگین ۷۵٪ بازدارندگی و نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس ۸۹٪ بازدارندگی را بر روی رشد قارچ‌های آزمایش داشتند (شکل ۴).



شکل ۴- مقایسه تأثیر نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس و اسانس آزاد بر درصد بازدارندگی از رشد عوامل بیماری‌زای قارچی *A. solani*، *R. solani* و *Rh. stolonifer*



شکل ۵- تأثیر نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس و فرم اسانس آزاد آویشن شیرازی بر بازدارندگی از رشد گونه‌های قارچی *A. solani*، *R. solani* و *Rh. stolonifer*

اثر اسانس و نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس آویشن شیرازی بر عوامل بیماری‌زای قارچی معنی‌دار بود ($P\leq0.01$)، به‌طوری که اسانس و نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس بر قارچ‌های *Rh. stolonifer* و *A. solani* (۸۷٪) از بیشترین بازدارندگی و بر قارچ *R. solani* از کمترین بازدارندگی (۷۶٪) برخوردار بود (شکل ۵). ترکیب‌های مربوط به اسانس‌های مشابه می‌توانند در مقابل طیف گسترده‌ای از گونه‌های میکروارگانیسم فعالیت کنند اما درجه این فعالیت بستگی به نوع گونه میکروبی و اسانس مورد استفاده متفاوت است. با توجه به تنوع قارچ‌های مورد

مطالعه، سازوکارهای دفاعی آنها نیز متفاوت بوده، در نتیجه می‌توان انتظار داشت که آستانه تأثیرپذیری هر قارچ نسبت به مواد ضدقارچی و شیب تغییرات رشد نسبت به مقدار ماده مؤثره متفاوت باشد.

حداقل غلظت بازدارندگی (Minimum Inhibitory Concentration (MIC))، حداقل غلظتی است که یک عامل ضدقارچی از رشد قارچ جلوگیری کند. در همین ارتباط نتایج این آزمایش نشان داد (جدول ۲) که حداقل غلظت بازدارندگی اسانس برای تمامی قارچ های مورد آزمایش ۲۰۰ میکرولیتر بر لیتر و حداقل غلظت بازدارندگی نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس برای قارچ‌های *R. solani* و *Rh. Stolonifer*، ۵۰ میکرولیتر بر لیتر و برای قارچ *A. solani*، ۱۰۰ میکرولیتر بر لیتر بود (جدول ۳). البته حداقل غلظت بازدارندگی با توجه به گونه یا جنس عامل بیماری‌زا متفاوت است. از طرف دیگر، اسانس‌های مختلف و یا اجزاء اسانس که از گونه‌های یک جنس حاصل شده‌اند برای کنترل یک عامل یکسان حداقل غلظت بازدارنده متفاوتی داشته‌اند. در این آزمایش نیز اختلاف بین حداقل غلظت بازدارندگی در گونه‌های سه عامل بیماری‌زای مشاهده شد. در این آزمایش نانوذرات لیپیدی جامد با برهم‌کنش بهتر با قارچ ها نسبت به فرم اسانس آزاد توانسته است حداقل غلظت بازدارندگی را برای عوامل بیماری‌زای مورد آزمایش در غلظت‌های بسیار کمتر فراهم کند.

جدول ۲- نتایج مقایسه میانگین تأثیر غلظت‌های مختلف (میکرولیتر بر لیتر) بر درصد بازدارندگی از رشد گونه‌های قارچی *A. solani*، *R. solani* و *Rh. stolonifer*

نوع فرمولاسیون	غلظت (میکرولیتر بر لیتر)	*A. solani*	*R. solani*	*Rh. stolonifer*
فرم اسانس آزاد	۲۰	۷۷ d	۲۲ h	۶۹ e
	۵۰	۸۳ c	۴۴ g	۶۷ e
	۱۰۰	۸۳ c	۶۵ e	۸۹ b
	۲۰۰	۱۰۰ a	۱۰۰ a	۱۰۰ a
نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس	۲۰	۵۴ f	۶۷ e	۷۰ e
	۵۰	۸۷ bc	۱۰۰ a	۱۰۰ a
	۱۰۰	۱۰۰ a	۱۰۰ a	۱۰۰ a
	۲۰۰	۱۰۰ a	۱۰۰ a	۱۰۰ a

جدول ۳- حداقل غلظت بازدارندگی (میکرولیتر بر لیتر) فرم آزاد اسانس و نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس آویشن شیرازی بر درصد بازدارندگی از رشد عوامل بیماری‌زای قارچی *A. solani*، *R. solani* و *Rh. stolonifer*

گونه قارچی	*A. solani*	*R. solani*	*Rh. stolonifer*
حداقل غلظت بازدارندگی (**MIC**) فرم آزاد اسانس (میکرولیتر برلیتر)	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰
حداقل غلظت بازدارندگی (**MIC**) نانوذرات لیپیدی حاوی اسانس (میکرولیتر برلیتر)	۱۰۰	۵۰	۵۰

بحث

براساس نتایج این تحقیق، نانوذرات لیپیدی جامد به‌عنوان یک حامل، تأثیر بسزایی بر اثربخشی اسانس دارند، به‌نحوی که نتایج حاصل از نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس تفاوت معنی‌داری با فرم آزاد اسانس دارند. در توجیه استفاده از حامل‌های کلوئیدی در اندازه ذره‌ای نانومتر، می‌توان به برهم‌کنش بهتر این سامانه‌ها با قارچ‌ها اشاره کرد. در ساخت این حامل‌ها از لیپیدهای جامد استفاده می‌شود که با تکنیک‌های خاصی تهیه می‌شوند. به این نوع حامل‌ها، نسل اول نانوذرات لیپیدی می‌گویند. از مزایای این حامل‌ها، آزادسازی آهسته ماده مؤثره، خاصیت مسدودکنندگی و خاصیت فیلم فورمینگ است (Wissing & Muller, 2002). در ضمن ماده مؤثره قرارگرفته در داخل خود را نیز از تخریب محافظت می‌کند (Teeranachaideekul *et al*., 2007). در مطالعاتی که انجام شده است، مشاهده شده که استفاده از گلیسرین مونو استئارات در فاز لیپیدی موجب افزایش احتباس ماده مؤثره می‌شود (Vivek *et al*., 2007). در این مطالعه نیز از گلیسرین مونو استئارات به‌عنوان لیپید استفاده شد. یکی از علل انتخاب پرسیرول به‌عنوان لیپید جامد در نانوذرات لیپیدی حاوی اسانس در این مطالعه، این است که پرسیرول، یک دی گلیسرید با دو اسید چرب مختلف ($C_{۱۸}$ و $C_{۱۶}$) می‌باشد، که شبکه لیپیدی نامنظمی ایجاد می‌کند و میزان احتباس اسانس در آن افزایش می‌یابد (Hamdani *et al*., 2003) (جدول ۱). امولسیفایر مورد استفاده در ترکیب نانوذرات لیپیدی جامد، به نوع لیپید بستگی دارد (Gualbert *et al*., 2003). با توجه به مطالعاتی که در تهیه نانوذرات لیپیدی جامد از گلیسرین مونو استئارات به‌عنوان لیپید استفاده شده‌است، امولسیفایر توئین۸۰، ذراتی با بهترین اندازه ذره‌ای و کمترین پراکنش را فراهم می‌آورد. پس در این طرح از گلیسرین مونو استئارات به‌عنوان فاز لیپیدی و از توئین ۸۰ به‌عنوان امولسیفایر استفاده شد، چون از نظر اندازه ذره‌ای و پراکنش بهترین حالت را ایجاد کردند. برای افزایش هموژنسیته و کاهش سایز ذرات از دستگاه هموژنایزر دیاکس استفاده شد (Gualbert *et al*., 2003).

با توجه به اثرات بارز و ویژه اسانس‌ها بر روی عوامل بیماری‌زای قارچی گیاهی، اسانس‌ها می توانند جایگزین‌های مناسبی برای قارچ‌کش‌ها به‌منظور کاهش مواد شیمیایی باشند. مشکل اصلی در استفاده از اسانس‌ها ناپایداری آنها در مقابل نور، هوا، رطوبت و دمای بالاست که می‌تواند منجر به تبخیر سریع آنها شده و کارایی آنها را کاهش دهد (Lertsatitthanakorn *et al*., 2008). از این‌رو قرارگیری اسانس‌های روغنی درون فرآورده‌های نانوامولسیون از طریق افزایش طول عمر اسانس و همچنین افزایش سطح تماس اسانس با میکروب منجر به افزایش فعالیت ضدمیکروبی آنها می‌شود (Sao Pedro *et al*., 2013). البته نحوه اثر سیستم‌های نانوامولسیونی بر روی فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌ها با بررسی حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) مشخص می‌شود (Sao Pedro *et al*., 2013). نتایج MIC فرمولاسیون حاوی گلیسرین مونواستئارات، توئین، آب و اسانس نسبت به فرم آزاد اسانس نشان می‌دهد که MIC علیه *R. solani* و *R. stolonifer* به میزان ۱۵۰ میکرولیتر بر لیتر و علیه قارچ *A. solani* ۱۰۰ میکرولیتر بر لیتر کاهش یافته است. در توجیه اثربخشی نسبتاً بهتر فرمولاسیون‌های محتوی اسانس انکپسوله شده نسبت به فرم آزاد اسانس، می توان به سطح نانوذرات لیپیدی جامد در تماس با میکروب‌ها اشاره کرد. در حقیقت، نانوذرات لیپیدی جامد با توجه به اندازه بزرگتری که نسبت به میکروب‌ها دارند، می‌توانند به خوبی سطح آنها را پوشش دهند و کاملاً میکروب را احاطه کنند. از طرفی نانوذرات لیپیدی جامد مانع از تبخیر اسانس می‌شوند، زیرا اسانس درون این سیستم‌های کلوییدی انکپسوله شده، از این‌رو سرعت تبخیر آن کاهش پیدا می‌کند، بنابراین فرصت بیشتری برای تماس با میکروب‌ها دارد، از این‌رو می‌تواند اثر بهتری نسبت به فرم آزاد از خود بروز دهد.

براساس مطالعه Li و همکاران (۲۰۱۲) فرمولاسیون نانوذرات انکپسوله شده حاوی تیمول علیه اشرشیاکلی (*Escherichia coli*) و سالمونلا (*Salmonella*)، فعالیت مناسب آنتی‌باکتریایی مشاهده شده‌است. در مطالعه انجام شده توسط Wattanasatcha و همکاران (۲۰۱۲) نانوذرات حاوی تیمول، فعالیت آنتی‌باکتریایی مناسبی علیه باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس (*Staphylococcus aureus*)، سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeroginosa*) و اشرشیاکلی داشته است (Gomes *et al*., 2011؛ Li *et al*., 2012؛ Wattanasatcha *et al*., 2012). همچنین Wu و همکاران (۲۰۱۲) با استفاده از نانوذرات پروتئین گیاهی ذرت، تیمول و کارواکرول را کپسوله کردند و توانستند خواص ضدمیکروبی این ترکیب‌ها را افزایش دهند.

به‌طور کلی نانوذرات لیپیدی جامد به‌دلیل اندازه کوچکتر از سلول، ممکن است منجر به افزایش مکانیزم جذب غیرفعال سلولی شده، در نتیجه باعث کاهش مقاومت انتقال شده و فعالیت ضدمیکروبی را افزایش دهند. از طرف دیگر، نانوذرات لیپیدی جامد اسانس را در مقابل عوامل محیطی مانند اکسیژن، نور، رطوبت و اسیدیته محافظت می‌کنند، همچنین حامل‌های به اندازه نانو سطح بیشتری را ایجاد کرده و به‌راحتی حلالیت و دسترسی زیستی اسانس را افزایش داده و آزادسازی کنترل شده اسانس را بهبود می‌دهند (Donis *et al*., 2011).

منابع مورد استفاده

- Bacchella, R., Testoni, A. and Lo Scalzo, A., 2009. Influence of genetic and environmental factors on chemical profile and antioxidant potential of 84 commercial Strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duchesne). Electronical Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry, 8(4): 230-242.
- Behdad, M., Etemadi, N.A., Behdad, E. and Zeinali, H., 2013. Antifungal effects of three plant essential oils against *Rhizopus stolonifer*, the cause of soft rot on strawberry fruit. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 29(2): 399-411.
- Bunjes, H., 2005. Characterization of solid lipid nano- and microparticles: 41-66. In: Nastruzzi, C., (Ed.). Lipospheres in Drug Targets and Delivery: Approaches, Methods, and Applications. CRC Press, 184p.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. International Journal of Food Microbiology, 94(3): 223-253.
- Donsi, F., Annunziata, M., Sessa, M. and Ferrari, G., 2011. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. LWT-Food Science and Technology, 44(9): 1908-1914.
- Ekambaram, P., Abdul Hasan Sathali, A. and Priyanka, K., 2011. Solid lipid nanoparticles: a review. Scientific Reviews and Chemical Communications Journal, 2(1):80-102.
- Fathi, M., Mozafari, M.R. and Mohebbi, M., 2012. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. Trends in Food Science and Technology, 23: 13-27.
- Golmohammadzadeh, Sh., Mokhtari, M. and Jaafari, M.R., 2012. Preparation, characterization and evaluation of moisturizing and UV protecting effects of topical solid lipid nanoparticles. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 48(4): 683-690.
- Gomes, C., Moreira, R.G. and Castell-Perez, E., 2011. Poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles with entrapped trans-cinnamaldehyde and eugenol for antimicrobial delivery applications. Journal Food Science, 76(2): 16-24.
- Gualbert, J., Shahgaldian, P. and Coleman, A.W., 2003. Interactions of amphiphilic calyxarene-based solid lipid nanoparticles with bovine serum albumin. International Journal of Pharmaceutics, 257: 69-73.
- Hamdani, J., Moes, A.J. and Amighi, K., 2003. Physical and thermal chracterisation of precirol and compritol as lipophilic glycerides used for preparation of controlled-release matrix pellets. International Journal of Pharmaceutics, 260: 47-57.
- Jores, K., Mehnerta, W., Drechslerb, M., Bunjesc, H., Johannd, C. and Mäder, K., 2004. Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy. Journal of Controlled Release, 95(2): 217-227.
- Lertsatitthanakorn, P., Taweechaisupapong, S., Aromdee, C. and Khunkitti, W., 2008. Antibacterial activity of citronella oil solid lipid particles in oleogel against *Propionibacterium acnes* and its chemical stability. International Journal of Essential Oil Therapeutics, 2: 167-171.

- Shafiee, A. and Javidnia, K., 1997. Composition of essential oil of *Zataria multiflora*. Planta Medica, 65: 371-372.
- Shi, F., Zhao, J.H., Liu, Y., Wang, Z., Zhang, Y.T. and Feng, N.P., 2012. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with frankincense and myrrh oil. International Journal of Nanomedicine, 7: 2033-2043.
- Teeranachaideekul, V., Souto, E.B., Junyaprasert, V.B. and Muller, R.H. 2007 Cetylpalmitate-based NLC for topical delivery of coenzyme Q_{10}: development, physicochemical characterization and *in vitro* releasestudies. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 67: 141-148.
- Vivek, K., Reddy, H. and Murthy, R.S.R., 2007. Investigations of the effect of the lipid matrix on drug entrapment, *in vitro* release, and physical stability of olanzapine-loaded solid lipid nanoparticles. AAPS. Pharmscitech, 8: 16-24.
- Wattanasatcha, A., Rengpipat, S. and Wanichwecharungruang, S., 2012. Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent. International Journal of Pharmaceutics, 434: 360-365.
- Wissing, S.A. and Muller, R.H. 2002. The influence of the crystallinity of lipid nanoparticles on their occlusive properties. International Journal of Pharmaceutics, 242: 377-379.
- Wu, Y., Luo, Y. and Wang, Q., 2012. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid-liquid dispersion method. LWT-Food Science and Technology, 48: 283-290.
- Li, K.K., Yin, S.W., Yang, X.Q., Tang, C.H. and Wei, Z.H., 2012. Fabrication and characterization of novel antimicrobial films derived from thymol-loaded zein-sodium caseinate (SC) nanoparticles. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60(46): 11592-11600.
- Mader, K. and Mehnert, W., 2005. Solid lipid nanoparticles-concepts, procedures and physicochemical aspects: 1-22. In: Nastruzzi, C., (Ed.). Lipospheres in Drug Targets and Delivery: Approaches, Methods, and Applications. CRC Press, 184p.
- Namazi, N., 2015. Preparation, characterization and evaluation of antimicrobial effect of solid lipid nanoparticles (SLN) containing essential oil of clove plants (*Eugenia caryophyllata*). PhrmD Thesis, School of Pharmacy Nanotechnology Research Center, Mashhad University of Medical Science.
- Özden, Ç. and Bayindirli, L., 2002. Effects of combinational use of controlled atmosphere, cold storage and edible coating applications on shelf life and quality attributes of green peppers. European Food Research and Technology, 214(4): 320-326.
- Perez-de-Luque, A. and Rubiales, D., 2009. Nanotechnology for parasitic plant control. pest Management Science, 65(5): 540-545.
- Sao Pedro, A., Espirito Santo, I., Silva, C.V., Detoni, C. and Albuquerque, E., 2013. The use of nanotechnology as an approach for essential oil-based formulations with antimicrobial activity: 1364-1374. In: Mendes Vilas, A., (Ed.). Microbial Pathogens and Strategies for combating them: Science, Technology and Education. Formatex Research Center, 2008p.

Effects of solid lipid nanoparticle (SLN) containing *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on the inhibitory growth of *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani* and *Rhizopus Stolonifer*

M. Nasseri[1], Sh. Golmohammadzadeh[2*], H. Aroiee[3], M.R. Jaafari[4] and H. Neamati[3]

1- Ph.D. Student of Horticulture Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2*- Corresponding author, Biotechnology Research Center, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran, E-mail: Golmohamadzadehsh@mums.ac.ir
3- Department of Horticulture Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
4- Nanotechnology Research Center, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Received: June 2015 Revised: September 2015 Accepted: September 2015

Abstract

In the present study, solid lipid nanoparticles (SLNs) were used as carriers of essential oil to overcome the problem of essential oil use (evaporation and degradation of some active components in the presence of air, light, moisture, and high temperatures) and increase the essential oil efficiency for controlling *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani* and *Rhizopus stolonifer*. This experiment was tested *in vitro* on PDA in Nanotechnology Research Center, School of Pharmacy, University of Medical Sciences of Mashhad and Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad. The study was conducted in a completely randomized design (CRD) whit three replications. Solid lipid nanoparticles containing essential oil at four concentrations of 20, 50, 100, and 200 ml per liter were applied on the potato dextrose agar medium. SLN containing *Zataria multiflora* Boiss. essential oil (ZM-SLN) were prepared by high shear homogenization and ultra sound method. The size of SLNs containing essential oil was less than 200 nm, and PdI and ZP were calculated to be 0.483 and -42.6 mv, respectively. The SLNs were spherical in shape. According to the obtained results, the minimum inhibitory concentration of the essential oil for all three fungi was 200 μlL^{-1}. However, the minimum inhibitory concentration of SLN-ZM for *Rh. stolonifer* and *R. solani* was 50μlL^{-1}, and for *A. solani*, it was calculated to be 100μlL^{-1}. Our results clearly showed that SLNs could be suitable carriers for the *Zataria multiflora* essential oil.

Keywords: Solid lipid nanoparticle, minimum inhibitory, essential oil, fungal pathogens.