تحقیقی

ارزیابی تجربی فرمولاسیون زیست سازگار فسفولیپیدی پگیله حاوی اسانس گیاه *آویشن* و تعیین خاصیت ضد قارچی سامانه نانویی

سمیرا نادری نژاد[۱]، شهره باباصفری[۲]، دکتر فاطمه حقیرالسادات*[۳]

۱- کارشناسی ارشد مهندسی بیوتکنولوژی، گروه مهندسی بیوتکنولوژی و داروسازی، دانشکده مهندسی شیمی، پردیس دانشکده‌های فنی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشگاه پیام‌نور تفت، تفت، ایران. ۳- دکتری نانوبیوتکنولوژی، استادیار گروه علوم و فنون نوین، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.

چکیده

زمینه و هدف : *اسانس آویشن به دلیل دارا بودن موادی نظیر فنلیک تیمول و کارواکرول دارای اثر ضدقارچی، ضدانگلی و ضدباکتریایی قوی است. به منظور افزایش حلالیت، حفاظت در مقابل اکسیداسیون و تبخیر و بهبود اثربخشی اسانس از درونگیری استفاده می‌شود. این مطالعه به منظور ارزیابی تجربی فرمولاسیون زیست سازگار فسفولیپیدی پگیله حاوی اسانس دو گونه گیاه آویشن شیرازی و دنایی و تعیین خاصیت ضدقارچی سامانه نانویی گونه آویشن شیرازی انجام شد.*

روش بررسی : *در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی لیپوزوم‌های حاوی اسانس دو گونه گیاه آویشن با روش هیدراتاسیون فیلم نازک تهیه شدند و بعد از کاهش اندازه، ذرات از نظر مورفولوژی، اندازه، پتانسیل زتا و برهمکنش شیمیایی مشخصه‌یابی شدند. اثر نوع فسفولیپید، اثر میزان کلسترول و نوع گونه آویشن بر روی بازده بارگذاری بررسی شد. در نهایت خاصیت ضدقارچی سامانه حاوی اسانس گونه آویشن شیرازی از نظر سه شاخص حداقل غلظت کشندگی، حداقل غلظت بازدارندگی و قطر هاله عدم رشد بر روی قارچ تریکوفیتون منتاگروفیتس مورد بررسی قرار گرفت.*

یافته ها : *اسانس آویشن با بازده بیش از ۸۰ درصد درون لیپوزوم بارگذاری شد. فرمولاسیون بهینه متشکل از ۱۰ درصد کلسترول و ۹۰درصد فسفولیپید فسفاتیدیل کولین سویا به همراه ۳ درصد پلی اتیلن گلیکول و اسانس آویشن با غلظت mg/ml ۰/۵ بود. ذرات، آنیونی و دارای ساختار کروی با اندازه کمتر از ۱۰۰ نانومتر بودند. هیچگونه فعل و انفعال شیمیایی بین لیپوزوم و اسانس یافت نشد. فرمولاسیون تهیه شده از نظر شیمیایی پایدار بوده و به طور کلی اسانس ماهیت خود را درون سامانه حفظ نمود. سامانه دارویی- نانویی گونه آویشن شیرازی در مهار رشد قارچ تریکوفیتون منتاگروفیتس موثر بود.*

نتیجه‌گیری : *تهیه فرمولاسیون بهینه لیپوزومی حاوی اسانس آویشن تحت تاثیر نوع و مقدار فسفولیپید و کاملاً مستقل از نوع گونه آویشن مورد استفاده بود. همچنین درونگیری باعث افزایش خاصیت ضدقارچی اسانس گونه آویشن شیرازی گردید.*

کلید واژه‌ها : *آویشن ، لیپوزوم ، فعالیت ضدقارچی ، تریکوفیتون منتاگروفیتس ، آهسته رهش ، پگیله*

* نویسنده مسؤول : دکتر فاطمه حقیرالسادات ، پست الکترونیکی **fhaghirosadat@ut.ac.ir**

نشانی: یزد، بلوار دانشجو، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، مجتمع آموزشی امام رضا، دانشکده پیراپزشکی، گروه علوم و فنون نوین

تلفن ۳٦٢٤٠٦٩١-۰۳۵، نمابر ۳٦٢۳۸٥٦۱

وصول مقاله : ۱۳۹٦/۲/۹ ، اصلاح نهایی : ۱۳۹٦/۱۱/۳۰ ، پذیرش مقاله : ۱۳۹٦/۱۲/٥

مقدمه

ایران با موقعیت خاص آب و هوایی، بیش از ۷۵۰۰ گونه گیاهی را در خود جای داده است که دو الی سه برابر کل پوشش گیاهی تمامی قاره اروپا است و پیش‌بینی می‌شود که بیش از ۷۵۰ گونه دارویی در پوشش گیاهی ایران وجود داشته باشد. از طرف دیگر تعداد کل داروهای گیاهی ثبت شده در کشور حدود ۱۰۰ نوع است که کمتر از ۴ درصد کل داروهای شیمیایی موجود در بازار است. در حالی که این نسبت در کشورهای اروپایی به بیش از ۳۵ درصد می‌رسد (۱).

گیاه *آویشن* با نام علمی *تیموس ولگاریس* یک گیاه علفی معطر دارویی متعلق به خانواده نعناعیان است (۲). اسانس گیاه *آویشن* مایعی زرد رنگ است که دارای اثر ضدقارچی، ضد انگلی و ضدباکتریایی قوی است و این خاصیت به دلیل وجود تیمول و کارواکرول در اسانس این گیاه است (۳و۴). ترکیبات فعال موجود

کد ارکید: سمیرا نادری نژاد: 0000-0002-0703-2334، شهره باباصفری: 0000-0001-8851-5479، دکتر فاطمه حقیرالسادات: 0000-0002-8655-2118

در اسانس *آویشن* شامل فلاونوئیدها، ترپن‌ها، ساپونین، ترکیبات تند، تلخ و فنلی مانند پاراسمین، لینالول، سینئول، ترپنوئید، گلیکوزید، کافئیک و رزمارینیک هستند. ترکیبات فنلی مسؤول خواص ضدمیکروبی و ضدقارچی ترکیبات گیاهی هستند (۵). فعالیت ضدقارچی *آویشن* بر روی ایزوله‌های *کاندیدا آلبیکنس* ثابت شده است. به همین دلیل در صنایع غذایی از *آویشن* به عنوان نگهدارنده به صورت ادویه در سبزیجات کنسرو شده و فرآورده‌های گوشتی استفاده می‌شود. در واقع اثر اسانس به‌دست آمده از بخش‌های هوایی *آویشن* بر رشد *کاندیدا البیکنس*، *کاندیدا ترووپیکالیس* و *ساکارومایسس سرویسیه* تایید شده است (۶). عواملی مانند اکسیژن به عنوان عامل اکسیدکننده الکل‌ها و آلدئیدها، تابش نور و همچنین آب نقش مهمی در هیدرولیز استر و اتر موجود در اسانس ایفا می‌کنند. بارگذاری اسانس در نانو ذره به منظور افزایش حلالیت آن در پلاسما، حفاظت از آن در مقابل اکسیداسیون و هیدرولیز، کنترل رهایش و در نتیجه بهبود اثربخشی آن استفاده می‌شود (۷). بسیاری از ترکیبات فعال بیولوژیکی اسانس مانند فلاونوئیدها، تانن‌ها و ترپنوئیدها محلول در آب به‌دلیل عبور از غشای چربی سلول هستند. علاوه بر این در صورت بالا بودن بیش‌ازحد اندازه مولکولی، جذب ملکولی اسانس ضعیف بوده و در نتیجه موجب کاهش فراهمی زیستی و اثربخشی آن می‌شود. به‌خاطر این موانع، کاربرد بالینی برخی عصاره‌ها و اسانس‌ها با محدودیت مواجه است. لذا همراه‌سازی طب گیاهی با فناوری نانو به‌طور گسترده پیشنهاد شده؛ زیرا سبب باعث بهبود عملکرد عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی و کاهش دوز موثر می‌شود (۸).

در سیستم‌های مختلف کلوئیدی مانند میکروکپسول، نانوکره، نانو امولسیون و لیپوزوم‌ها، برای حفاظت از اسانس‌ها کپسوله‌سازی انجام می‌گیرد. از مزایای بارگذاری اسانس می‌توان به افزایش فراهمی زیستی، رهایش کنترل شده و حفاظت از تنش‌های محیطی اشاره نمود (۹).

لیپوزوم‌ها یکی از مهم‌ترین سیستم‌های رسانش هستند که خواص آنها به‌طور قابل توجهی با فرمولاسیون لیپیدی، بار سطحی، اندازه و روش آماده‌سازی در ارتباط است (۱۰). پیش از این، بررسی بهینه‌سازی شرایط تهیه لیپوزوم‌های حاوی اسانس روغنی *آویشن شیرازی* با روشی معروف به روش مظفری صورت گرفت. در این روش اجزای فرمولاسیون لیپوزومی به همراه اسانس *آویشن* به وسیله آب دیونیزه و گلیسرول هیدراته گردیدند و پس از آن با استفاده از همزن با سرعت ۱۰۰۰ دور بر دقیقه همه اجزا با یکدیگر مخلوط شدند. مقایسه فعالیت ضدباکتریایی آن با اسانس آزاد صورت گرفت و اثر متغیرهای فرآیند بر درصد ریزپوشانی لیپوزوم‌های حاوی اسانس روغنی *آویشن شیرازی* بررسی شد (۱۱). این مطالعه به منظور ارزیابی تجربی فرمولاسیون زیست سازگار فسفولیپیدی پگیله حاوی اسانس دو گونه گیاه *آویشن دنایی* و *شیرازی* و تعیین خاصیت ضد قارچی سامانه نانویی انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی در پژوهشکده نانو ساختار دانشگاه پیام نور یزد و شرکت ریز زیست فناوران فردا نگر در سال ۱۳۹۵ انجام شد.

مواد: کلسترول (CHOL) از شرکت Sigma-Aldrich آمریکا تهیه شد. فسفولیپید دی پالمیتویل فسفاتیدیل کولین (DPPC)، فسفولیپید فسفاتیدیل کولین سویا ۸۰درصد (SPC80) و پلی اتیلن گلیکول (PEG2000) از شرکت Lipoid-GmbH آلمان تهیه شدند. گیاه *آویشن* کوهی با گونه *دنایی* (*Thymus daenensis Celak*) و *آویشن شیرازی* (*Zataria multiflora*) پس از تهیه، توسط دانشکده منابع طبیعی و کویرشناسی دانشگاه یزد و سازمان جهاد کشاورزی استان یزد (شماره هرباریوم *آویشن شیرازی* ۱۵۰۱۲، شماره هرباریوم *آویشن دنایی* ۱۵۸۹۲) مورد تایید قرار گرفت.

استخراج اسانس: استخراج اسانس از گیاه *آویشن* با روش تقطیر و به وسیله کلونجر صورت گرفت. در این روش پس از توزین گیاه *آویشن* و خرد کردن آن، آب و گیاه با نسبت ۱:۴ در بالن ته گرد با یکدیگر مخلوط شدند. سپس طی حرارت‌دهی بر روی هیتر و تبخیر و میعان پی‌درپی اسانس‌گیری انجام گرفت. پس از یک ساعت از شروع فرآیند، اسانس مورد نظر از گیاه استخراج گردید (۱۲).

تهیه فرمولاسیون لیپوزومی حاوی اسانس *آویشن*: فرمولاسیون‌های مورد بررسی در جدول یک آمده است.

جدول ۱ : فرمولاسیون‌های مختلف لیپوزومی حاوی اسانس آویشن شیرازی و دنایی

کد فرمول	نام گونه	DPPC	SPC 80	CHOL
۱	*شیرازی*	۸۰	–	۲۰
۲	*شیرازی*	–	۸۰	۲۰
۳	*دنایی*	۸۰	–	۲۰
٤	*دنایی*	–	۸۰	۲۰
٥	*شیرازی*	۹۰	–	۱۰
٦	*شیرازی*	–	۹۰	۱۰
۷	*دنایی*	۹۰	–	۱۰
۸	*دنایی*	–	۹۰	۱۰

فسفولیپید در کلروفرم حل شد و به همراه کلسترول و پلی‌اتیلن گلیکول به بالن ته گرد منتقل گردید. ۱/۵ سی‌سی اسانس *آویشن* رقیق شده در متانول به بالن ته‌گرد اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه تبخیر کننده دوار قرار گرفت تا حلال آلی تبخیر شد و فیلم خشک یکنواختی در بالن ایجاد شد. فرآیند هیدراتاسیون فیلم خشک تشکیل شده به مدت ۳۰ دقیقه با مقدار ۳/۳ سی‌سی آب استریل تزریقی انجام شد که منجر به تشکیل

وزیکول‌های تک لایه و چند لایه در بالن گردید و محلول شیری رنگی به‌دست آمد. بالن داخل دستگاه سونیکیت در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت قرار داده شد تا لیپوزوم‌های چند لایه به فرم تک لایه درآمده و اندازه ذرات کاهش یابد. در ادامه سوسپانسیون از فیلتر ۰/۲ میکرومتری عبور داده شد و برای جداسازی اسانس آزاد از کیسه دیالیز استفاده گردید. تعیین درصد بارگذاری اسانس در لایه چربی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ماکزیمم (λmax) اسانس *آویشن* و پس از تهیه محلولی از لیپوزوم و ایزوپروپانول انجام گرفت (۱۳). برای بررسی الگوی رهایش اسانس *آویشن* از غشای لیپوزومی، محیطی مشابه شرایط فیزیولوژیک (بافر PBS در pH خنثی ۷/۴ و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد) برای قرار دادن لیپوزوم‌ها تهیه گردید. سپس حجم مشخصی از لیپوزوم حاوی اسانس *آویشن* داخل کیسه دیالیز ریخته شد و در مقدار ۱۰ سی‌سی از محیط، تحت شرایط لرزش ملایم غوطه‌ور شد و در زمان‌های مشخص نمونه‌برداری انجام گردید. با توجه به منحنی استاندارد اسانس *آویشن* در بافر PBS، میزان غلظت دارو در زمان‌های مختلف اندازه‌گیری شد. در بررسی قطر نانوذره و پتانسیل زتا از دستگاه زتا سایزر (Zeta-Sizer instrument, DLS, Malvern Zatasizer Nano-ZS, Worcestershire, UK) استفاده شد. بررسی مورفولوژی ذرات توسط دستگاه میکروسکوب الکترونی روبشی (KYKY-EM3200-30KV, China) انجام گردید (۱۴).

فعالیت ضدقارچی: پس از احیاء و کنترل خالص بودن محیط سابورو دکستروز آگار، برای تهیه کشت تازه و فعال، تریکوفیتون منتاگروفیتس بر روی سابورو دکستروز آگار کشت داده شد و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. برای به‌دست آوردن سوسپانسیون‌های همگن از غلظت‌های قارچی، از معیار کدورت‌سنجی استاندارد نیم‌مکفارلند استفاده شد (۱۵).

الف) تعیین قطر هاله عدم رشد: سوش قارچی *تریکوفیتون منتاگروفیتس* تهیه شده یک هفته قبل از آزمایش در غلظت قارچ $۱/۵\times۱۰^{۶}$ روی محیط سابورو دکستروز آگار کشت داده شد و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد در شرایط هوازی گرمخانه‌گذاری شدند. سپس با استفاده از سری رقت از سوسپانسیون و با استفاده از سوآپ استریل بر روی محیط سابورو دکستروز آگار کشت شد و اجازه داده شد تا میکروارگانیسم جذب محیط کشت شود. سپس با استفاده از قسمت انتهایی یک پیپت پاستور استریل حفره‌های یکسانی روی محیط ایجاد شد و در هر چاهک یک قطره از محیط کشت مذاب ریخته شد تا حفره‌ها مسدود شود. سپس در چاهک‌ها یک دیسک خالی قرار داده شد و مقدار ۱۰ میکرولیتر از اسانس *آویشن* و ۱۰۰ میکرولیتر از اسانس *آویشن* لیپوزومه در چاهک‌های مربوطه اضافه گردید. غلظت محلول لیپوزومی معادل یک دهم غلظت اسانس بود. پلیت به مدت یک ساعت در یخچال قرار داده شد تا مواد ضد قارچی قبل از رشد و تکثیر قارچ‌ها فرصت انتشار در محیط را نداشته باشند. در ادامه پلیت‌ها به مدت ۲۰ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند و قطر هاله عدم رشد برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد (۱۵و۱۶).

ب) تعیین حداقل غلظت کشندگی و حداقل غلظت بازدارندگی: برای تست حداقل غلظت کشندگی (Minimum Fungicidal Concentration, MFC) و حداقل غلظت بازدارندگی (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) اسانس آزاد *آویشن* و اسانس لیپوزومی *آویشن*، به اولین چاهک مربوط به اسانس آزاد مقدار ۱۹۰ میکرولیتر محیط کشت سابارودکستروز براث و ۱۰ میکرولیتر اسانس *آویشن* اضافه گردید. در حالی که به اولین چاهک برای اسانس لیپوزومی مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت و ۱۰۰ میکرولیتر اسانس لیپوزومه اضافه شد. بعد از همگن سازی چاهک‌ها، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک‌های اول برداشته و به چاهک دوم که حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت بود؛ اضافه شد. این روند تا چاهک دهم ادامه یافت. چاهک کنترل مثبت حاوی قارچ مورد نظر و محیط کشت و چاهک کنترل منفی حاوی اسانس و محیط کشت بود. سپس به هر چاهک به استثنای چاهک کنترل منفی مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچ اضافه گردید و سطح میکروتیتر پلیت با پارافیلم پوشانده شد و درب آن بسته شد. میکروتیتر پلیت قارچی در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. بعد از این مدت، اولین خانه که در آن عدم رشد دیده شد به عنوان MIC گزارش شد و سپس از چاهک‌هایی که فاقد کدورت بودند؛ مقدار ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و بر روی محیط کشت سابارو دکستروز آگار برای قارچ‌ها کشت داده شد و در دمای مربوطه گرمخانه‌گذاری شد و از نظر تشکیل کلنی و یا عدم آن جهت تعیین MFC بررسی شدند (۱۷).

آزمون آماری: آزمایش‌ها به صورت سه بارتکرار انجام گرفتند. نوار خطا برای بررسی تکرارپذیری نتایج محاسبه گردید. نتایج مطالعه حاضر با میانگین، انحراف معیار و درصد توصیف شدند. ضریب تعیین (R2) نماینده میزان نزدیکی داده‌های تجربی و برازش بود. به طوری که هرچقدر بیشتر به یک نزدیک می شد؛ نزدیک بودن داده تجربی و خط برازش کننده را نشان می‌داد. در فرآیند بهینه‌سازی، متغیرهای مستقل شامل نوع فسفولیپید، نسبت فسفولیپید به کلسترول، گونه اسانس *آویشن* و حضور و عدم حضور زنجیره پلی‌اتیلن گلیکول بودند. درصد بارگذاری اسانس متغیر وابسته بود. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 7 و آزمون ANOVA یک‌طرفه در سطح معنی‌داری کمتر ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

طول موج ماکزیمم طیف مادون قرمز گونه *آویشن شیرازی* و گونه *آویشن دنایی* به ترتیب ۲۲۶/۲ و ۲۲۱ نانومتر تعیین شدند.

روابط ۱ و ۲ به ترتیب نمودار استاندارد اسانس *آویشن شیرازی* و *دنایی* در ایزوپروپانول را گزارش نمود.

رابطه (۱): y=۰/۰۲۰۹x+۰/۰۱۵۹ ،R2=۰/۹۹۷۴

رابطه (۲): y=۰/۰۲x+۰/۰۰۱۳ ،R2=۰/۹۹۹۴

نمودار استاندارد و همچنین طول موج ماکزیمم هر دو اسانس نزدیک به یکدیگر بودند.

نتایج راندمان بارگذاری فرمولاسیون‌های مختلف لیپوزومی حاوی اسانس *آویشن* در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲ : درصد بارگذاری اسانس گونه شیرازی و دنایی در فرمول‌های مختلف

کد فرمول	بازده بارگذاری اسانس
۱	۳۳/۵۵
۲	۸۰/۴۵
۳	۲۱
٤	۸۵/۹۵
٥	۳۹/۲۵
٦	۸۳/۹۵
۷	۲۷/۷
۸	۸۸/۰۵

در فرمول‌های کد ۱ و ۲ اثر نوع فسفولیپید بر روی *آویشن شیرازی* و فرمول‌های کد ۳ و ۴ اثر نوع فسفولیپید بر روی *آویشن دنایی* بررسی شد. در این فرمول‌ها مقدار کلسترول و فسفولیپید برابر بوده و تفاوت در نوع فسفولیپید مورد استفاده است. براساس نتایج، در فرمولاسیون سنتز شده با فسفولیپید SPC80 میزان بازده بارگذاری اسانس به میزان معنی‌داری بالاتر بود (P<۰/۰۵). این روند برای فرمول‌های ۵،۶، ۷ و ۸ نیز تکرار شده است. در فرمول‌های کد ۱ و ۵ و همچنین فرمول‌های با کد ۲ و ۶ اثر درصد کلسترول بر روی راندمان بارگذاری *آویشن شیرازی* مقایسه شده است. بر طبق نتایج افزایش ده درصدی کلسترول باعث کاهش معنی‌دار راندمان بارگذاری اسانس گردید (P<۰/۰۵). نتایج مشابه برای *آویشن دنایی* نیز مشاهده شد. فرمول‌های یکسان که با دو گونه متفاوت اسانس *آویشن* (فرمول ۱و ۳ یا ۲ و ۴ یا ۵ و ۷ و یا ۶ و ۸) بارگذاری شدند؛ نشان داد که راندمان بارگذاری اسانس وابسته به گونه *آویشن* نیست و تغییر نوع گونه *آویشن* اثر معنی‌داری بر روی راندمان بارگذاری اسانس ندارد.

پگیلاسیون: با توجه به جدول ۲ و مقایسه بازده بارگذاری بر اساس تغییر میزان کلسترول و نوع فسفولیپید، فرمولاسیون ۶ و ۸ حاوی فسفولیپید SPC80، ۱۰ درصد کلسترول و بارگذاری شده به ترتیب با اسانس آویشن *گونه شیرازی* و *دنایی* به عنوان فرمولاسیون بهینه انتخاب شد. سپس سطح لیپوزوم‌های تهیه شده با فرمول‌های مذکور با ۳ درصد پلی اتیلن گلیول پوشش‌دهی شد. راندمان بارگذاری پس از پوشش‌دار شدن در جدول ۳ گزارش شد.

میزان بازده بارگذاری اسانس *آویشن شیرازی* ۸۵/۲۵±۴/۷۵ درصد (فرمول ۹) و میزان بازده بارگذاری اسانس *آویشن دنایی* در لیپوزوم ۹۳/۱±۴/۴ درصد (فرمول ۱۰) تعیین شد.

جدول ۳ : اثر پوشش‌دار شدن وزیکول‌های لیپوزومی حاوی اسانس آویشن با پلی‌اتیلن گلیکول

متغیرها	فرمول ۹	فرمول ۱۰
نام گونه	شیرازی	دنایی
DSPE-mPEG 2000	۳	۳
SPC 80	۹۰	۹۰
CHOL	۱۰	۱۰
بازده بارگذاری اسانس	۸۵/۲۵±٤/۷۵	۹۳/۱±٤/٤

اندازه ذرات و پتانسیل زتا: اندازه و پتانسیل زتا لیپوزوم های درون گیری شده با اسانس *آویشن* با استفاده از دستگاه نانوسایزر (DLS) به صورت سه بار تکرار اندازه گیری گردید. مقدار پتانسیل زتای لیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس *آویشن دنایی* بین ۳۱/۲۲- الی ۳۶/۱۹- میلی‌ولت و پتانسیل زتای لیپوزوم‌های بارگذاری شده با اسانس *آویشن شیرازی* بین ۲۶/۳۰- الی ۲۶/۷۳- میلی‌ولت متغیر بود. همچنین توزیع اندازه نانو ذرات ساخته شده یکنواخت گزارش شد و اندازه ذرات برای اسانس *آویشن شیرازی* و دنایی به ترتیب ۵۶/۵۷ و ۷۳/۵۱ نانومتر در مود حجمی بود.

پروفایل رهایش اسانس: معادلات ۳ و ۴ به ترتیب معادله استاندارد اسانس *آویشن شیرازی* و *دنایی* را در بافر PBS نشان داده است.

رابطه (۳): y=۰/۰۰۵۲ x+۰/۰۱۷۸ ،R2=۰/۹۹۷۵

رابطه (۴): y=۰/۰۰۵۴x +۰/۰۲۹۸ ،R2=۰/۹۹۶۲

درصد رهایش هر دو گونه مشابه بود و در ۱۶۸ ساعت میزان رهایش به ۶۲ درصد رسید. با توجه به میزان رهایش دو گونه، می‌توان ادعا کرد رهایش وابسته به گونه *آویشن* نیست. رهایش اسانس از وزیکول آهسته است و پس از ۱۶۸ ساعت به میزان ثابتی رسید.

مورفولوژی: نانوذرات سنتز شده به صورت همگن، یکنواخت و کروی شکل بودند (شکل یک).

شکل ۱ : مورفولوژی سطحی ذرات با استفاده از دستگاه میکروسکوب الکترونی روبشی

برهمکنش شیمیایی: در ارزیابی طیف‌سنجی مادون قرمز، هیچ فعل و انفعال شیمیایی بین لیپوزوم و اسانس برقرار نشد و لیپوزوم‌ها به صورت فیزیکی در ساختار قرار گرفتند. فرمولاسیون تهیه شده از نظر شیمیایی پایدار بود و به‌طور کلی اسانس‌ها ماهیت خود را درون وزیکول حفظ کردند.

خاصیت ضد قارچی

الف) قطر هاله عدم رشد: قطر هاله عدم رشد مربوط به اثرگذاری اسانس آزاد *آویشن شیرازی* ۴۰ میلی‌متر و اسانس لیپوزومه *آویشن شیرازی* ۲۰ میلی‌متر تعیین گردید. در غلظت یکسان (۱۰ میکروگرم) قطر هاله عدم رشد مربوط به اسانس *آویشن* دوبرابر اسانس لیپوزومه *آویشن* بود. همچنین خاصیت ضدقارچی اسانس *آویشن* طی بارگذاری از بین نرفت.

ب) حداقل غلظت کشندگی و حداقل غلظت بازدارندگی: حداقل غلظت بازدارندگی اسانس آویشن و لیپوزوم اسانس *آویشن شیرازی* به ترتیب ۳/۱۲۵ و ۱/۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شدند. حداقل غلظت کشندگی اسانس آویشن و لیپوزوم اسانس *آویشن شیرازی* به ترتیب ۶/۲۵ و ۳/۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شدند. خاصیت ضد قارچی اسانس *آویشن* محصور شده حفظ شده و بهبود یافت. حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی مربوط به اسانس *آویشن* در اثر محصورسازی هر دو به میزان دوبرابر کاهش یافت.

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه، اسانس آویشن با بازده بیش از ۸۰ درصد درون لیپوزوم بارگذاری شد. هیچگونه فعل و انفعال شیمیایی بین لیپوزوم و اسانس یافت نشد. فرمولاسیون تهیه شده از نظر شیمیایی پایدار بوده و به طور کلی اسانس ماهیت خود را درون سامانه حفظ نمود. سامانه دارویی- نانویی در مهار رشد قارچ موثر بود.

گیاه *آویشن* به‌خاطر داشتن ساختار فنلی دارای خاصیت ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی قوی است (۱۸). از آنجا که اسانس این گیاه بسیار فرار و ناپایدار است؛ برای افزایش خواص درمانی و پایدار شدن آن، طی چندین مرحله اسانس *آویشن* درون نانو ذره لیپوزومی درون‌گیری شد.

نانوذرات پلیمری سیستم‌های کلوئیدی هستند که از آنها برای کنترل رهایش دارو و رسانش هدفمند دارو به سمت مکان‌های خاص استفاده می‌شود. نانوذرات پلیمری می‌توانند موجب افزایش حلالیت ترکیبات، کاهش دوز درمانی و بهبود جذب ترکیبات فعال شوند. علاوه بر این، نانوذرات دارای خواص پایداری، عدم سمیت، غیرالتهابی و اجتناب از سیستم رتیکولواندوتلیال بوده و برای استفاده در خون سودمند هستند (۸). در مطالعه Munin و Edwards-Lévy درون‌گیری ترکیبات طبیعی پلی‌فنلی ارزیابی شد. بارگذاری اسانس به‌طور قابل توجهی از اسانس در برابر شرایطی مانند اکسیداسیون و تخریب حرارتی حفاظت نمود و نتیجه گیری شد که به افزایش عمر مفید مواد فعال محصور شده کمک می‌کند (۱۹).

بهبود فعالیت اسانس، کاهش فراریت و اکسیدشوندگی اسانس طی بارگذاری نیز فرضیه اصلی پژوهش حاضر بود که طی آزمایش‌های رهایش و فعالیت ضدقارچی ثابت گردید و مطالعه Asprea و همکاران (۲۰) را تایید نمود. در بررسی روش سنتز نانو ذره، اهمیت کلسترول و فسفولیپید پژوهش‌هایی انجام شده است. در مطالعه Nallamothu و همکاران انجام شده بر روی سیستم تحویل هدفمند لیپوزومی کمبرتاستاتین A4، ترکیب چربی وزیکول‌های غشاء به‌خصوص فسفولیپیدها و کلسترول، نسبت مولی اسانس به لیپید، روش آماده‌سازی و نوع اسانس در اندازه لیپوزوم و درصد بارگذاری اسانس اثرگذار بود (۲۱). افزایش غلظت لیپید باعث افزایش سطح داروی لیپوزومی گردید و این افزایش به دو علت نسبت داده شد. اول این که با افزایش غلظت چربی، تعداد لیپوزوم در هر میلی‌لیتر فرمولاسیون افزایش می‌یابد و در نتیجه داروی بیشتر در هر میلی‌لیتر فرمولاسیون بارگذاری می‌شود. دوم، دسته‌بندی دولایه داروی چربی دوست نیز با افزایش غلظت چربی و تعداد لیپوزوم افزایش می‌یابد. افزایش کلسترول در فرمول لیپوزومی باعث افزایش احتباس اسانس و کاهش بی‌ثباتی می‌شود؛ اما به‌کاربردن زیاد آن، سبب پر شدن فضای دو لایه توسط کلسترول و کاهش بارگذاری داروهای چربی دوست در لایه‌های لیپوزومی می‌شود. به صورتی که کلسترول و دارو برای پرکردن فضای بین لایه‌ای با یکدیگر رقابت می‌کنند. علاوه بر این رقابت، در طول شکل‌گیری وزیکول کاهش سیالیت غشا نیز باعث کاهش بارگذاری دارو در لایه‌ها می‌شود. بارگذاری داروهای چربی دوست عمدتاً از طریق تقسیم‌بندی لایه‌ها اتفاق می‌افتد. زمانی که میزان کلسترول کم باشد؛ غشاء لیپوزومی ساختار سخت و محکمی ندارد و تمایل به نشت دارو دارد (۲۱). به‌طور مشابه در مطالعه حاضر نیز مشخص گردید کلسترول می‌تواند عامل تعیین کننده برای درصد بارگذاری بالا باشد. کلسترول برای ساخت لیپوزوم لازم است زیرا باعث افزایش استحکام لایه‌های لیپوزومی می‌شود. همچنین می‌توان گفت حضور کلسترول در مقدار زیادتر باعث پرشدن فضا بین دو لایه لیپوزوم شده و باعث می‌شود فضای کافی برای قرار گرفتن اسانس وجود نداشته باشد. به‌طوری که با ۱۰ درصد کاهش کلسترول، تنها تا حدودی درصد بارگذاری افزایش یافته است. در نتیجه مقدار مشخص و مناسب کلسترول در این تحقیق نسبت به فسفولیپید ۱۰/۹۰ بوده است. در این مقدار، کلسترول باعث ایجاد ساختاری با استحکام کافی و توانایی بارگذاری بالا شده است. در مطالعه انجام شده Majeed و همکاران بر روی روش‌های بارگذاری اسانس، بازده بارگذاری، اندازه ذرات و پایداری فیزیکی دارو محصور شده در سیستم‌های کلوئیدی به نوع روش، غلظت، میزان مواد امولسیفیر

استفاده شده بستگی داشت (۹). در مطالعه Mourtas و همکاران لیپوزوم متشکل از فسفاتیدیل کولین یا دیستریول گلیسرو فسفاتیدیل کولین همراه با کلسترول و آمیخته شده با کالسین توسط روش هیدراتاسیون فیلم نازک تهیه گردید و سختی غشاء لیپوزومی هنگام رهایش با مقایسه دو لیپید مختلف مورد بررسی قرار گرفت. رهایش کلسین از لیپوزوم دیستریول گلیسرو فسفاتیدیل کولین نسبت به فرم لیپوزومی فسفاتیدیل کولین به‌طور قابل توجهی آهسته‌تر گزارش شد (۲۲).

گرچه پژوهشی به‌طور مستقیم به مقایسه دو فسفولیپید SPC80 و DPPC در بارگذاری اسانس نپرداخته است؛ ولی با توجه به مطالعه قبلی (۲۳) و نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر می‌توان گفت تا حدودی در راستای یکدیگر هستند. به‌طور کلی در مقایسه میان دو فسفولیپید SPC80 و DPPC بخش آبدوست دو فسفولیپید مشابه است. در حالی که بخش آبگریز (مسؤول بارگذاری اسانس) در SPC80 کمی بزرگ‌تر از DPPC بوده و شاید این مسأله دلیلی بر ترکیب SPC80 با اسانس و افزایش درصد بارگذاری لیپوزوم تهیه شده با SPC80 باشد. به‌عبارت دیگر SPC80 دارای باند دوگانه است و این امر می‌تواند در پیوندها تحریک ایجاد کرده و در تشکیل وزیکول‌ها (در مرحله هیدراته) و درون‌گیری اسانس اثر زیادی داشته باشد. یکی دیگر از عوامل مورد نظر دمای انتقال فاز دو فسفولیپید است که این دما برای SPC خیلی کمتر از DPPC بود و این امر باعث می‌شود که در دمای پایین هیدراتاسیون، ساختار لیپوزوم حاوی SPC80 به راحتی باز شود و اسانس در میان زنجیره‌ها قرار گیرد. DPPC دمای انتقال فاز بالاتری دارد و ممکن است در دمای پایین به خوبی حل نشود و توانایی آن در ترکیب با کلسترول و اسانس کم است. در نتیجه مقدار و نوع فسفولیپید می‌تواند به عنوان عامل اصلی اثرگذار در بارگذاری اسانس بیان شود. نتیجه ارایه شده در این مطالعه در تضاد با نتیجه مطالعه قبلی ما است که در بررسی اثر فسفولیپید در بارگذاری داروی آبدوست دوکسوروبیسین ارایه شد (۱۴). احتمالاً دلیل این تضاد، تفاوت در جایگاه قرارگیری اسانس و داروی آبدوست درون لیپوزوم است. همچنین به‌طور مشابه Sherry و همکاران به مطالعه روی اسانس محصور شده در لیپوزوم پرداختند و به این نتیجه رسیدند که مونوترپن با وادار کردن وزیکول فسفاتیدیل سویا برای افزایش انحنای سطح آن، قادر به کاهش اندازه لیپوزوم‌ها هستند (۷). این افزایش انحنا سبب افزایش بارگذاری اسانس نیز می‌شود. پلی‌اتیلن گلیکول در آخرین مرحله بهینه‌سازی لیپوزوم به دو فرمول بهینه اضافه گردید. پگیله کردن زمان گردش لیپوزوم در جریان خون را تمدید می‌کند و نیمه عمر سیستم دارورسانی را افزایش می‌دهد همچنین سامانه را پایدار می‌سازد و میزان بارگذاری اسانس در سامانه را افزایش می‌دهد (۱۴). با مقایسه درصد بارگذاری اساس دوگونه درون لیپوزوم می‌توان نتیجه گرفت که میزان بارگذاری مستقل از نوع گونه آویشن است و درون‌گیری موفق اسانس گونه‌های مختلف آویشن در فرمولاسیون بهینه گزارش شده امکان‌پذیراست.

مطالعه انجام شده اکبری روی اثر ضد قارچی عصاره‌های گیاهی *آویشن و مرزنجوش* علیه ایزوله‌های بالینی *کاندیدا آلبیکنس* مقاوم و حساس به *فلوکونازول* با روش رقیق‌سازی در محیط مایع در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که اسانس و عصاره از هر دو نوع گیاه وابسته به غلظت، قادر به مهار رشد ایزوله‌های حساس به قارچ *فلوکونازول* هستند. در این میان ابتدا عصاره تام متانولی *آویشن* (در محدوده ۱۲۵ mg/ml–۰/۴۹) بیشترین اثرات ضد قارچی را نشان داد (۶). در مطالعه‌ای محمدی غلامی و صنائی به بررسی خواص ضدقارچی و شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه *آویشن کوهی* پرداختند. فعالیت ضدقارچی اسانس آویشن کوهی علیه گونه‌های قارچی *کاندیدا آلبیکنس*، *کروزهای* و *گالبراتا* تعیین شد. به‌طوری‌که حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی قارچ‌ها به ترتیب در محدوده ۰/۵–۰/۲۵ و ۱–۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین شد (۲۴). در مطالعه ای معماریان و همکاران اثر ضدقارچی اسانس سه گیاه دارویی *آویشن*، *پونه* و *مرزه* بر روی مهار رشد اسپور و تشکیل آن و رشد سلولی قارچ *آسپرژیلوس* نایجر را بررسی کردند. MIC به دست آمده از اسانس *آویشن* و *مرزه* در مهار رشد قارچ *آسپرژیلوس* نایجر ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و *پونه* به‌طور معنی‌داری اثر کمتری نشان داد. *آویشن* و *مرزه* بر روی رشد *میسلیوم* و کنیدی‌زایی با MIC برابر با ۱/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر بهتری نسبت به *پونه* نشان دادند (۲۵).

گرچه گونه‌های قارچی و گونه گیاهان مورد بررسی در مطالعات قبلی و مطالعه حاضر متفاوت است؛ ولی همگی خاصیت ضدقارچی اسانس *آویشن* را تایید می‌کنند. همچنین تاکنون پژوهشی بر روی مقایسه خاصیت ضدقارچی (*تریکوفیتون منتاگروفیتس*) اسانس آزاد *آویشن* و اسانس لیپوزومه آن آنجام نگرفته است. با این حال نتایج تست ضدقارچی مطالعه حاضر بر روی قارچ *تریکوفیتون منتاگروفیتس* تایید کرد که خاصیت ضدقارچی اسانس *آویشن* در اثر محصور سازی بهبود یافته است. این مسأله احتمالاً به دلیل آهسته رهش بودن سامانه است که از تبخیر اسانس جلوگیری کرده و رهایش تدریجی اسانس موجب افزایش خاصیت کشندگی بر روی قارچ شده است. با توجه به آهسته رهش بودن سامانه حاصل (۶۰ درصد طی ۷ روز) و مدت زمان کمتر از یک روز برای تست هاله عدم رشد، توجیه کننده کمتر بودن هاله عدم رشد اسانس لیپوزومه در مقایسه با اسانس آزاد است. این مسأله را اینگونه می‌توان توضیح داد که بر طبق پروفایل رهایش طی مدت زمان ۲۰ ساعت در حدود ۵۰ درصد از اسانس رهایش می‌یابد که بسیار کمتر از مصرف اسانس آزاد است. بنابراین همان‌طور که در تست حداقل

غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی نشان داده شده است؛ با گذر زمان قابلیت ضدقارچی اسانس لیپوزومه بیشتر خواهد بود.

همچنین پوشش‌دار کردن اسانس با لیپید مانع اکسید شدن اسانس گردید که همین موضوع باعث حفظ خاصیت دارویی اسانس شده است. پوشش‌دار کردن اسانس با لیپوزوم هم از نظر زیست سازگار بودن و هم از نظر مصرف کمتر اسانس حایز اهمیت است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که فرمولاسیون بهینه دارای کلسترول و فسفولیپید فسفاتیدیل کولین سویا ۸۰ درصد با نسبت ۱۰- ۹۰ به همراه ۳ درصد پلی‌اتیلن گلیکول بود که در آن اسانس *آویشن* با مقدار نزدیک به ۸۰ درصد بارگذاری گردید. رهایش اسانس طی ۷ روز ۶۲ درصد بود. بررسی مورفولوژی سطحی لیپوزوم‌ها نشان داد که ذرات کروی و با مرز مشخص هستند و قطر ذرات کمتر از ۱۰۰ نانومتر است. نتایج به‌دست آمده از بررسی برهمکنش اسانس و لیپوزوم نیز نشان می‌دهد که اسانس و وزیکول‌های لیپوزومی پیوند شیمیایی با یکدیگر ندارند. براساس نتایج ضدقارچی یافت می‌شود فرمولاسیون تهیه شده خاصیت ضدقارچی دارد که می‌تواند برای تهیه یک داروی ضدقارچی توسعه داده شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت شرکت ریز زیست فناوران فردانگر- یزد به‌انجام رسید که صمیمانه از آن شرکت دانش‌بنیان سپاسگزاری می‌گردد. همچنین از خانم الهام ساسانی و آقای هاشم شاهی مالمیر به‌خاطر راهنمایی‌های علمی قدردانی می‌شود. از پژوهشکده نانوساختار دانشگاه پیام نور به دلیل فراهم‌سازی امکانات آزمایشی مطالعه حاضر قدردانی می‌گردد. از خانم عالیه شاهمحمدی نیز به‌خاطر فراهم‌سازی و تعیین گونه گیاه آویشن تشکر می‌نماییم.

References

1. Mavourian SM, Ahmadi Kaliji S, Aminravan M. [Determining the export target markets for medicinal plants in Iran]. Iranian Journal of Agrcultural Economics and Develpment Research. 2016; 46(4): 729-37. doi:10.22059/IJAEDR.2016.58027 [Article in Persian]

2. Silva NCC, Fernandes Júnior A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2010; 16(3): 402-13. http://dx.doi.org/10.1590/S1678-91992010000300006

3. Nikolić M, Glamočlija J, Ferreira ICFR, Calhelha RC, Fernandes Â, Marković T, et al. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of Thymus serpyllum L., Thymus algeriensis Boiss. and Reut and Thymus vulgaris L. essential oils. Ind Crops Prod. 2014; 52: 183-90. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.10.006

4. Abdollahzadeh E, Rezaei M, Hosseini H. Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control Listeria monocytogenes inoculated in minced fish meat. Food Control. 2014; 35(1): 177-83. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.004

5. Imelouane B, Amhamdi H, Wathelet JP, Ankit M, Khedid K, El Bachiri A. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thyme (Thymus vulgaris) from Eastern Morocco. Int J Agric Biol. 2009; 11(2): 205-8.

6. Akbari S. [Antifungal Activity of Thymus vulgaris L. and Origanum vulgare L. Against Fluconazol-Resistant and Susceptible Candida albicans Isolates]. J Med Plants. 2007; 1(S3): 53-62. [Article in Persian]

7. Sherry M, Charcosset C, Fessi H, Greige-Gerges H. Essential oils encapsulated in liposomes: a review. J Liposome Res. 2013 Dec; 23(4): 268-75. doi:10.3109/08982104.2013.819888

8. Bonifácio BV, Silva PB, Ramos MA, Negri KM, Bauab TM, Chorilli M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. Int J Nanomedicine. 2014; 9: 1-15. doi:10.2147/IJN.S52634

9. Majeed H, Bian YY, Ali B, Jamil A, Majeed U, Khan QF, et al. Essential oil encapsulations: uses, procedures, and trends. RSC Adv. 2015; 5: 58449-63. doi:10.1039/C5RA06556A

10. Amoabediny G, Haghiralsadat F, Naderinezhad S, Helder MN, Akhoundi Kharanaghi E, Mohammadnejad Arough J, et al. Overview of preparation methods of polymeric and lipid-based (niosome, solid lipid, liposome) nanoparticles: a comprehensive review. Int J Polym Mater Po. 2018; 67(6): 383-400. https://doi.org/10.1080/00914037.2017.1332623

11. Ebrahimi Khosfi M, Khosravi Darani K, Hosseini H, Arabi Sh, Komili Fenode R, Kohi Kamali P. [Production of nanoliposomes containing essential oil of Boiss Zatariamultiflora by response surface method]. Nano Meghyas. 2014; 1(2): 119-28. [Article in Persian]

12. Alimi M, Jahantigh S. [Effect of some extracts of medicinal plants on control of citrus blast disease]. Journal of Iranian Plant Ecophysiological Research (Plant Sciences Research). 2013; 7(28): 57-66. [Article in Persian]

13. Haghiralsadat F, Amoabediny G, Sheikhha MH, Forouzanfar T, Helder MN, Zandieh-doulabi B. A novel approach on drug delivery: Investigation of new nano-formulation of liposomal doxorubicin and biological evaluation of entrapped doxorubicin on various osteosarcomas cell lines. Cell J. 2017; 19(Suppl 1): 55-65. doi:10.22074/cellj.2017.4502

14. Haghiralsadat F, Amoabediny G, Sheikhha MH, Zandieh-Doulabi B, Naderinezhad S, Helder MN, et al. New liposomal doxorubicin nanoformulation for osteosarcoma: Drug release kinetic study based on thermo and pH sensitivity. Chem Biol Drug Des. 2017 Sep; 90(3): 368-79. doi:10.1111/cbdd.12953

15. Guarro J, Pujol I, Aguilar C, Llop C, Fernández-Ballart J. Inoculum preparation for in-vitro susceptibility testing of filamentous fungi. J Antimicrob Chemother. 1998;42(3):385-87.

16. Watts JL, Institute C and LS. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals: approved standard. National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2008.

17. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference Methods for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast. M27-A2. Approved Standard. 2nd ed. 2002. Vol 22. No 15.

18. Hamdy Roby MH, Sarhan MA, Selim KA-H, Khalel KI. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (Thymus vulgaris L.), sage (Salvia officinalis L.), and marjoram (Origanum majorana L.) extracts. Ind Crops Prod. 2013; 43: 827-31. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.08.029

19. Munin A, Edwards-Lévy F. Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. Pharmaceutics. 2011 Nov; 3(4): 793-829. doi:10.3390/pharmaceutics3040793

20. Asprea M, Leto I, Bergonzi MC, Bilia AR. Thyme essential oil loaded in nanocochleates: Encapsulation efficiency, in vitro release study and antioxidant activity. LWT. 2017 Apr; 77: 497-502. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.006

21. Nallamothu R, Wood GC, Kiani MF, Moore BM, Horton FP, Thoma LA. A targeted liposome delivery system for combretastatin A4: formulation optimization through drug loading and in vitro release studies. PDA J Pharm Sci Technol. 2006 May-Jun; 60(3): 144-55.

22. Mourtas S, Fotopoulou S, Duraj S, Sfika V, Tsakiroglou C, Antimisiaris SG. Liposomal drugs dispersed in hydrogels. Effect of liposome, drug and gel properties on drug release kinetics. Colloids Surf B Biointerfaces. 2007 Apr; 55(2): 212-21. doi:10.1016/j.colsurfb.2006.12.005

23. Naderinezhad S, Amoabediny Gh, Haghiralsadatb F. Co-delivery of hydrophilic and hydrophobic anticancer drugs using biocompatible pH-sensitive lipid-based nano-carriers for multidrug-resistant cancers. RSC Advances. 2017; 48(7): 30008-19. doi:10.1039/C7RA01736G

24. Mohammadigholami A, Sanaie Z. [Study of antifungal properties and chemical composition of essential oil of Thymus kotscuyanus Boiss. & Hohen]. Iranian Journal of Plant Physiology and Biochemistry. 2016; 1(2): 52-62. [Article in Persian]

25. Memarian M, Malekzadeh F, Razavi MR, Dahili M. [Evaluation of antifungal effects of essential oil of three medicinal plants of Thymus vulgaris, Pune and Sour on the inhibition of spore growth and its formation and cell growth of Aspergillus niger fungus]. Journal Management System. 2011; 7(3): 1-9. [Article in Persian]

Original Paper

Experimental evaluation of biocompatible pegylated phospholipid formulation containing *Thyme* essential oils and evaluation of anti-fungal activity of nanoscale system

Samira Naderinezhad (M.Sc)[1], Shohre Babasafari (M.Sc)[2], Fateme Haghiralsadat (Ph.D)*[3]

[1]M.Sc in Biotechnology, Department of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, School of Engineering, University of Tehran, Tehran, Iran. [2]M.Sc in Biochemistry, Department of Biology, Payame Noor University, Yazd, Taft, Iran. [3]Ph.D in Nanobiotechnology, Assistant Professor, Department of Advanced Medical Sciences and Technologies, School of Paramedicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

Abstract

Background and Objective: *Thyme* essential oil is strong antifungal, anti-parasitic and antibacterial due to presence phenolic thymol and carvacrol. Encapsulation is used in order to increase the solubility, protection against oxidation and evaporation and also to improve the effectiveness of essential oils. This study was performed in order to loading *Thymus* essential oil (*Thymus daenensis Celak* and *Zataria multiflora* species) into liposomal vesicles and evaluation of antifungal activity of *Zataria multiflora* specie encapsulated with nano-systems.

Methods: In this descriptive – laboratory study, liposomes containing *Thymus* essential oil- were prepared using thin film hydration method. After size reduction, nano-particle was characterized in term of morphology, size, zeta potential and chemical interactions. Effect of phospholipids types, cholesterol content and species of *Thymus* were investigated on encapsulation efficiency. Finally, the antifungal activity of essential oil of *Zataria multiflora* specie loaded liposome was evaluated the minimum fungicidal concentration, minimum inhibitory concentration and zone of inhibition against *Trichophyton mentagrophytes*.

Results: *Thymus* essential oil loaded into liposome with over 80% efficiency. Optimal formulation contained of 10% cholesterol, 90% soybean phosphatidylcholine phospholipid with 3% of polyethylene glycol and also *Thymus* essential oil with concentration of 0.5 mg/ml. Nanoparticles were anionic with spherical shape and size less than 100 nm. There was no chemical interaction between liposomes and essential oil. Prepared formulation was chemically stable and the essential oil had not retained during encapsulation. Medicinal-nano system of *Zataria multiflora* specie was effective in inhibition of the growth of *Trichophyton mentagrophytes.*

Conclusion: The preparation of optimal liposomal formulation containing *Thymus* essential oil is affected by the type and amount of phospholipid, and it was completely independent of the species of *Thymus*. Also, Encapsulation increases the anti-fungal activity of essential oil of *Zataria multiflora*.

Keywords: *Thyme*, Liposome, Anti-fungal activity, *Trichophyton mentagrophytes*, Sustained-release, Pegylated

*** Corresponding Author: Haghiralsadat F (Ph.D), E-mail: fhaghirosadat@ut.ac.ir**

Received 29 Apr 2017 **Revised** 19 Feb 2018 **Accepted** 24 Feb 2018

Cite this article as: Naderinezhad S, Babasafari Sh, Haghiralsadat F. [Experimental evaluation of biocompatible pegylated phospholipid formulation containing *Thyme* essential oils and evaluation of anti-fungal activity of nanoscale system]. J Gorgan Univ Med Sci. 2018 Autumn; 20 (3): 90-98. [Article in Persian]

Orcid id: Samira Naderinezhad: 0000-0002-0703-2334, Shohre Babasafari: 0000-0001-8851-5479, Fateme Haghiralsadat: 0000-0002-8655-2118