[DOI: 10.18502/ssu.v28i6.4155]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 13:35 IRST on Saturday December 5th 2020

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره بیست و هشتم، شماره شش، شهریور ۱۳۹۹
تاریخ دریافت:۱۳۹۸/۱۰/۰۹
تاریخ پذیرش:۱۳۹۹/۰۲/۲۱

سنتز و ارزیابی عملکرد نانوذرات پایه لیپیدحاوی عصاره زنجبیل علیه گونه‌های آسپرژیلوس

وحید یخچی[۱]، شبنم جهانی‌زاده[۲]، فاطمه یزدیان[۳]، حمیدراشدی*[۴]، بی‌بی‌فاطمه حقیرالسادات*[۵]

مقاله پژوهشی

مقدمه: بارگذاری مواد موثره گیاهان دارویی در نانوحامل‌های لیپیدی باعث کاهش واکنش ماده فعال گیاه با محیط اطراف مانند آب و اکسیژن شده و شدت انتقال یا تبخیر به محیط بیرون را تقلیل می‌دهد. در این مطالعه، به‌منظور ارتقاء اثرگذاری عصاره زنجبیل، بارگذاری این عصاره در نانولیپونیوزوم ساخته شده به‌روش هیدراتاسیون لایه نازک صورت گرفت و اثر ضد قارچی آن بر رشد قارچ‌های آسپرژیلوس‌فلاووس و آسپرژیلوس‌پارازیتیکوس مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی، استخراج عصاره با استفاده از روش سوکسله انجام شد. فعالیت ضد قارچ عصاره زنجبیل با روش‌های پخش دیسک و رقت ریزگردها بررسی شد. اثر مهاری عصاره بررسی شد. شاخص‌های فیزیکوشیمیایی و خصوصیات ساختاری نانوذرات از نظر بازده درون‌گیری، منحنی رهایش دارو، سایز نانوذرات، پتانسیل زتا، مورفولوژی سطح، طیف FTIR (Fourier-transform infrared spectroscopy)، DLS (Dynamic light scattering) و SEM (Scanning electron microscope) تعیین گردید.

نتایج: بررسی‌های FTIR نشان داد عصاره زنجبیل و نانولیپونیوزوم هیچ‌گونه تعامل شیمیایی که منجر به تغییر گروه‌های عاملی شود، نداشتند. تصاویر SEM مورفولوژی کروی ذرات و میانگین اندازهٔ ذرات nm ۷۳ را نشان داد. عصاره زنجبیل با بازده از ۷۱٪ ندرون نانولیپونیوزوم بارگذاری شد . هم‌چنین مشخص شد عصاره زنجبیل اثر ضد قارچی قوی‌تری نسبت به قارچ آسپرژیلوس فلاووس در برابر قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس دارد. در دو دمای ۳۷°C و ۴۳°C، میزان رهایش عصاره زنجبیل در pH ۴/۵ در مقایسه با pH ۷/۴ بالاتر بود.

نتیجه‌گیری: نانولیپونیوزوم حاوی عصاره زنجبیل با برخورداری از ویژگی‌های مناسب فیزیکوشیمیایی، افزایش پایداری دارو و کنترل خوب رهایش، می‌تواند یک عامل ضد قارچ امیدوار کننده با اثرات ضد قارچ بالا و عوارض جانبی کم باشد.

واژه‌های کلیدی: عصاره زنجبیل، نانولیپونیوزوم، آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس پارازیتیکوس، ضد قارچ

ارجاع: یخچی وحید، جهانی‌زاده شبنم، یزدیان فاطمه، راشدی حمید، حقیرالسادات بی‌بی‌فاطمه. **سنتز و ارزیابی عملکرد نانوذرات پایه لیپیدحاوی عصاره زنجبیل علیه گونه‌های آسپرژیلوس**. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۹؛ ۲۸ (۶): ۸۰-۲۷۶۶.

۱- مربی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.
۲- دکترای تخصصی، شیمی کاربردی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران.
۳-استادیار، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۴-دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۵- استادیار، مرکز نانوتکنولوژی و مهندسی بافت، پژوهشکده علوم تولیدمثل یزد، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۳۲۵۰۷۱۵۸، پست الکترونیکی: Fhaghirosadat@gmail.com، صندوق پستی :۱۹۳۹۵-۴۶۹۷

[DOI: 10.18502/ssu.v28i6.4155]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 13:35 IRST on Saturday December 5th 2020

مقدمه

قارچ‌ها از عوامـل بیولوژیـک مهـم دخیل در فساد مواد غذایی هستند و با تولید سموم مختلف، از عوامل تهدید کننده جدی سلامت انسان می باشند (۱،۲). آسپرژیلوس‌فلاووس و آسپرژیلوس‌پارازیتیکوس از جمله قارچ‌های رشته‌ای هستند که روی انواع کثیری از مواد آلی فاسدشدنی یافت می‌شوند (۳). ظهور گونه‌های قارچی مقاوم و نیز عوارض جانبی نسبتاً زیاد داروهای ضدقارچی، محققین را به گسترش روش‌های جدید درمانی بر ضد قارچ‌ها وادار کرده است (۴). داروهای گیاهی به‌علت داشتن منشاء طبیعی نسبت به داروهای شیمیایی دارای سازگاری بیشتری با ارگانیسم‌های زنده از جمله بدن انسان هستند (۵). استفاده از گیاهان دارویی و عصاره آن‌ها به‌دلیل عدم عوارض جانبی، در دسترس بودن آن‌ها و هم‌چنین قیمت نسبتا پایین آن‌ها در حال گسترش است. باتوجه به محدود بودن و گران بودن داروهای ضد قارچی موجود در بازار و اثرات سوء شیمیایی و هم‌چنین ایجاد مقاومت دارویی، می توان به‌عصاره گیاهان به‌عنوان داروی موثر ضد قارچی اعتماد داشت. از آنجایی که مصرف عصاره‌های گیاهی هیچگونه تاثیر منفی به جای نمی‌گذارد، می‌توان شرایط آزمایشگاهی برون تن را به‌شرایط بدن یا درون تن تعمیم داد (۶). طی تحقیقات مختلف گزارش شده عصاره‌ها و پودرهای انواع مختلف گیاهان دارویی و روغن‌های استخراج شده از آن‌ها، دارای فعالیت ضد قارچی هستند و استفاده از آن‌ها به‌عنوان ترکیبات سودمند در جوامع کنونی مورد استقبال قرار گرفته است (۷). خواص ضد قارچی متعددی در خصوص اثرات ضدقارچی عصاره‌های آبی شوید Anethum graveolens، آویشن Coriandrum ، گشنیز Thymus vulgaris و گل محمدی Rosa damascena روی برخی از گیاهان مانند عصاره کلاله زعفران، گیاه خرزهره، اکالیپتوس، پیاز، دارچین، زردچوبه، مریم گلی، نعناع و همیشه بهار به اثبات رسیده است (۸). موثرترین ترکیبات ضدقارچی به‌ترتیب شامل عصاره‌های آبی شوید، آویشن، گشنیز و در نهایت گل محمدی بودند. منیره و همکاران طی مطالعه‌ای نشان دادند که اسانس روغنی پونه توانایی بالایی در کنترل رشد قارچ‌های آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس و تولید سم توسط آن‌ها دارد (۹). محمدی و همکاران، خاصیت ضد قارچی عصاره گیاه رزماری و تاثیر آن در بیان ژن آفلاتوکسین قارچ آسپرژیلوس فلاووس با استفاده از روش PCR Time-Real را ارزیابی کردند. طبق نتایج به‌دست آمده، عصاره رزماری می‌تواند رشد قارچ‌ها را مختل نماید و تاثیر مهارکنندگی بر بیان ژن و تولید آفلاتوکسین در قارچ آسپرژیلوس فلاووس دارد (۱۰). زنجبیل نیز جزء گیاهان دارویی مهم می‌باشد که از شاخه کورکومین است و از ریشه گیاهان Zingiber officinale می‌باشد. جنس زنجبیل سرده‌ای از تیره زنجبیلیان علفی ایستاده چندساله با حدود ۷۰ گونه بومی آسیای جنوب شرقی است با ساقه باریک و نی‌مانند و برگ‌های سرنیزه‌ای سبز براق که از زمین‌ساقه‌ای غده‌ای می‌رویند؛ گل‌های آن‌ها سبز مایل به زرد با لبه‌ای ارغوانی و لکه‌های کرم‌رنگ و گل‌آذین مخروطی و کوچک و سنبله‌ای متراکم است که در تابستان از زمین ساقه بیرون می‌زند (۱۱). اگرچه از زنجبیل به‌عنوان ریشه آن گیاه نام برده می‌شود اما در اصل قسمت مورد استفاده گیاه، ساقه متورم شده زیرزمینی آن (ریزوم) است (۱۲). ریزوم خشک زنجبیل واجد۶۰-۴۰٪ نشاسته، ۱۰٪ پروتئین، ۱۰٪ چربی، ۵٪ فیبر، ۶٪ مواد معدنی، ۴-۱٪ روغن فرار، ۸-۵٪ ماده رزینی و موسیلاژ است. زنجبیل اثرآنتی اکسیدانی داشته هم‌چنین دارای خاصیت ضد دردی و ضد باکتریایی بوده و در درمان استفراغ، نفخ، سوء هاضمه، کولیک، درد شکم، اسهال، اسپاسم و دیگر اختلالات عضلات صاف، سرماخوردگی، آنفلونزا و به‌عنوان ضدالتهاب در رماتیسم استفاده می‌شود (۱۳). شعاعی و همکاران اثر ضد قارچی عصاره های مریم نخودی و زنجبیل را بررسی کردند. نتایج این مطالعه نشان داد، عصاره گیاه زنجبیل در مقایسه با مریم نخودی دارای اثر ضد قارچی بیشتری است (۱۴). با وجود تمامی این مزایا، کاربرد ترکیبات گیاهی با چالش‌های جدی از جمله، اثرگذاری نامطلوب بر ارگان‌های غیرهدف و اکسید شدن برخی از مواد موثره روبرو است. در این میان فناوری نانو با ساخت و تهیه نانو حامل‌های دارویی از جمله لیپوزوم و نیوزوم توانسته بسیاری از

[DOI: 10.18502/ssu.v28i6.4155]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 13:35 IRST on Saturday December 5th 2020

مشکلات یاد شده را کاهش داده و یا برطرف نماید (۱۵). ترکیبات زیست فعال و فرار موجود در زنجبیل مانند جینجرول و شوگاول در برابر نور، حرارت و اکسیداسیون حساس بوده و از بین می‌روند، بنابراین برای حفاظت بیشتر از این ترکیبات و کنترل رهایش ترکیبات زیست فعال از نانوحامل‌های لیپیدی مانند لیپوزوم و نیوزوم به‌منظور انکپسوله کردن مواد زیست‌فعال استفاده می‌شود. لیپوزوم‌ها ساختارهای کروی هستند که از دولایه فسفولیپیدی ساخته شده‌اند که در هسته مرکزی خود یک فضای آبی را احاطه نموده‌اند. شباهت لیپوزوم با غشای سلول، سمیت سلولی پایین، تنوع و سهولت روش‌های تولید آن، لیپوزوم را به سامان‌های مطلوب در دارورسانی تبدیل کرده است. لیپوزوم‌ها توانایی به‌دام‌اندازی داروهای هیدروفیل در فضای مایی و هیدروفوب در میان دو لایه لیپیدی خود را دارند (۱۶و۱۷). نیوزوم‌ها ذرات کلوئیدی می‌باشند که از تجمع سورفاکتانت غیریونی در محیط آبی تشکیل می شوند و ایجاد ساختاری لایه لایه با خاصیت آب‌دوستی و آب‌گریزی می‌کنند بنابراین نیوزوم ها، ظرفیت به دام انداختن ترکیبات با حلالیت متفاوت را دارند (۱۸). نیوزوم‌ها زیست تخریب‌پذیر، زیست‌سازگار و غیر سمی هستند و قادر به محصور کردن مقدار زیادی از مواد در حجم نسبتاً کمتری از وزیکول‌های دیگر را دارند (۱۹). طراحی آسان، غیر ایمونوژن بودن، انعطاف‌پذیری بالا، آهسته رهش بودن و غیره، بخشی از مزایای نیوزوم‌ها است که آن را به یکی از مهم‌ترین سیستم‌های دارورسان مبدل کرده است (۲۰). به‌کارگیری روش‌های نوین در هدفمند ساختن داروها و اثرگذاری آن‌ها بر بخش‌های مشخص اهمیت فراوان دارد. انتقال هدفمند دارو و رهایش آن از کاربردهای لیپوزوم‌ها است. لیپوزوم‌ها در انتقال داروهای ضدسرطان، ضدقارچ‌ها، باکتری‌کش‌ها، ضدویروس‌ها، آنزیم‌ها و واکسن‌ها استفاده شده‌اند (۲۱). در این زمینه، عباسی و همکاران اثر ضد قارچی گیاهان بابونه و زنجبیل علیه گونه‌های کاندیدا را بررسی کردند. نتایج این تحقیق نشان داد، استفاده از اسانس زنجبیل جهت مهار رشد قارچ مورد مطالعه موجه به نظر می‌رسد. هم‌چنین با توجه به مزایای عصاره و اسانس‌های گیاهی از جمله عوارض کمتر، عدم ایجاد مقاومت، طعم مطبوع تر و استفاده راحت‌تر، جهت استفاده از عصاره‌های بابونه و زنجبیل نیاز به استفاده از غلظتی بیشتر از این عصاره ها نسبت به نیستاتین می باشد (۲۲) قدرتی و همکاران اثرات ضدسرطانی نانوذرات ساماریوم سنتز شده به کمک عصاره زنجبیل روی سلول‌های سرطانی را بررسی کردند. نتایج این تحقیق نشان داد نانوذرات ساماریوم سنتز شده به کمک عصاره زنجبیل می‌تواند به‌عنوان دارویی جدید در درمان سرطان کولورکتال در آینده‌ای نزدیک استفاده شود (۲۳). با توجه به خواص متعدد گیاه زنجبیل، بررسی اثر این گیاه بر رشد قارچ آسپرژیلوس و توانایی تولید سم آن‌ها، جهت اثبات اثر و متعاقباً گسترش استفاده از این گیاهان در کنترل آلودگی مواد غذایی به این قارچ و سم مهلک آن و ممانعت از بروز مسمومیت‌های غذایی ضرورت دارد. پژوهش حاضر با هدف سنتز نانوحامل نوین لیپونیوزوم حاوی عصاره زنجبیل و بررسی اثرات ضدقارچی آن انجام گرفته است. در طی آن، فرمولاسیون اولیه از نقطه نظر الگوی رهایش دارو بررسی شده است.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی، سوش استاندارد قارچ‌های آسپرژیلوس فلاووس (PTCC 5006) و آسپرژیلوس پارازیتیکوس (PTCC 5018) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. ایزوپروپانول، فسفولیپید DPPC، کلسترول، اسپن-۶۰، اتانول مطلق ۹۹٪، بافر با PH ۷/۴ ، محیط کشت براثBHI و سرم فیزیولوژی (PBS) به صورت خالص از شرکت مرک آلمان تهیه شده است. دستگاه طیف سنجی تبدیل فوریه مادون‌قرمز (FT-IR) مدل۱۰.۰۳.۰۶، ساخت شرکت PerkinElmer Spectrum، میکروسکوپ الکترونی روبشی مدلKYKY_EM۳۲۰۰ برای بررسی مورفولوژی نانوکامپوزیت، اسپکتروفوتومتر مدل PG Instrument، دستگاه تفرق نوردینامیک و زتاپتانسیل مدل Nano zetasizerساخت شرکت Malvern Instrument برای اندازه‌گیری متوسط اندازه ذرات نانوکامپوزیت و اندازه بار ذرات و اسپکتروفوتومتر مدل PG Instrument و دستگاه گریز از مرکز

[DOI: 10.18502/ssu.v28i6.4155]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 13:35 IRST on Saturday December 5th 2020

مدل Sigma جهت سانتریفوژ کردن ذرات نانوکامپوزیت، مورد استفاده قرار گرفت. **عصاره‌گیری به روش سوکسله**: ابتدا ریزوم گیاه زنجبیل تهیه شده توسط متخصص گیاه‌شناس مورد شناسایی علمی قرار گرفت. ۵۰۰gr ریزوم گیاه ابتدا به‌قطعات کوچکی به‌ضخامت ۳mm درآورده و بعد آن را در سایه قرار داده تا کاملاً خشک شود. پس از خشک شدن توسط آسیاب برقی ریزوم به‌صورت پودر در آمد. پودر ریزوم به‌مدت ۱۲ روز در الکل ۸۰٪ قرار داده شد تا تمام مواد موثره آن در الکل حل و خارج گردد. پس از گذشت زمان فوق محتویات ظرف به‌وسیله کاغذ صافی واتمن ۴۲ میکرون صاف گردید و محلول به‌دست آمده توسط دستگاه روتاری و در دمای ۵۰°C و ۶۰rpm تغلیظ شد. عصاره گیاه در شیشه های در بسته اتوکلاو شده ریخته و اطراف شیشه ها فویل آلومینیومی پیچیده شد و در دمای ۴°C نگهداری گردید (۲۴).

سنتز لیپونیوزوم حاوی عصاره زنجبیل

لیپونیوزوم حاوی عصاره زنجبیل به روش آب‌پوشانی لایه نازک و با نسبت مولی (DPPC%، کلسترول٪، اسپن-۶۰) ۲۰:۱۶:۶۴ تهیه گردید، که خلاصه بدین شرح است: ابتدا فسفولیپید DPPC، کلسترول، اسپن-۶۰ و عصاره زنجبیل در حلال کلروفرم و در دمای ۵۰°C روی روتاری حل شده و تحت شرایط خلاء، فیلم نازک خشک تهیه گردید. سپس عمل هیدراته کردن با افزودن مقدار مشخصی آب مقطر استریل، طی مدت ۴۵ دقیقه و دمای ۶۰°C انجام گردید. سپس نانوذرات تهیه شده توسط سونیکیت حمامی با فرکانس ۵٪ KHz ±۲۸ به مدت ۶۰ دقیقه کاهش سایز داده شد. برای جداسازی ذرات بزرگتر از کوچکتر از فرایند فیلتراسیون محلول استفاده می‌شود (۲۵).

بررسی و شناسایی سامانه‌ی لیپونیوزومی حاوی عصاره زنجبیل

بررسی گروه‌های عاملی و تعامل بالقوه میان سامانه لیپونیوزومی و عصاره زنجبیل توسط طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز در دمای اتاق انجام گرفت. برای این منظور حامل‌های لیپونیوزومی با سانتریفیوژ از سوسپانسیون جدا شده و محلول اضافی تبخیر گردید. طیف FT-IR از لیپونیوزوم فاقد عصاره زنجبیل و لیپونیوزومی حاوی عصاره زنجبیل بر روی نمونه‌های لیوفیلیزه با استفاده از دستگاه طیف سنج ثبت شد. یک میلی‌گرم از هر نمونه در یک هاون همراه با پتاسیم برمید پودر شد و با ضخامت ۰/۱ سانتی‌متر روی صفحه قرار گرفت. طیف در محدوده ۴۰۰-۴۵۰۰Cm^{-1} مشاهده شد. ویژگی‌های مورفولوژی سطح نانولیپونیوزوم با استفاده از میکروسکوپ الکترونی رویشی مشخص شد. به این‌منظور، مقدار ۲۵ µl از نمونه لیپونیوزومی بر روی یک لام ریخته و محلول در مجاورت هوا خشک شد. نمونه‌ها چند ثانیه با طلا پوشش داده شده تا رسانا شوند. سپس مورفولوژی سطح نانوحامل‌ها (زبری، شکل، صافی و توده‌ای شدن) با استفاده از دستگاه SEM با قدرت ۱۰۰ Watt بررسی گردید. بارسطحی، پتانسیل زتای نانولیپونیوزوم‌های حامل عصاره، شاخص پراکندگی و سایز آن‌ها، با استفاده از دستگاه زتا سایزر شرکت Brookhaven Instruments Corp اندازه‌گیری گردید. اندازه‌گیری DLS لیپونیوزوم در زاویه پراکندگی ۹۰° و تابش نور لیزر با طول موج ۶۵۷ nm در دمای ۲۵°C صورت گرفت. نمونه مورد استفاده به صورت رقیق شده در غلظت ۰/۱mg/ml آماده گردید و بلافاصله پس از آماده‌سازی اندازه‌گیری صورت گرفت. برای تعیین بار سطحی به ۱۵۰۰ µl با غلظت ۰/۱ mg/ml نیاز است (۲۶).

تعیین مقدار بارگذاری زنجبیل در نانولیپونیوزوم

جهت تعیین مقدار زنجبیل بارگذاری شده در نانولیپونیوزوم، ابتدا جداسازی عصاره انکپسوله نشده انجام گرفت، برای این منظور نانولیپونیوزوم را بعد از کاهش سایز وارد کیسه دیالیز نموده و در بشر حاوی ۲۰۰ برابر حجم لیپونیوزوم مدت ۱ ساعت در دمای ۴°C روی استیرر تنظیم گردید. سپس نانولیپونیوزوم‌های ساخته شده را با نسبتهای حجمی ۱:۱۰، ۱:۵۰، ۱:۱۰۰ و۱:۲۰۰ با ایزوپروپیل مخلوط کرده تا دیواره لیپیدی اطراف زنجبیل شکسته شود و عصاره آزاد گردد، سپس با استفاده از روش طیف‌سنجی نوری در طول موج ۲۳۵nm غلظت زنجبیل انکپسوله شده تعیین گردید. برای تعیین درصد بارگذاری زنجبیل در نانولیپونیوزوم از منحنی استاندارد زنجبیل و رابطه زیر استفاده شد (۲۷).

$$\text{عصاره بارگذاری ده (\%)} = \frac{\text{مقدار عصاره زنجبیل محصور شده}}{\text{مقدار عصاره زنجبیل اولیه}} \times 100$$

[DOI: 10.18502/ssu.v28i6.4155]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 13:35 IRST on Saturday December 5th 2020

تهیه بذر میکروبی

هر دوگونه آسپرژیلوس در محیط کشت اختصاصی سابرو دکستروز آگار (Potato Dextrose Agar (PDA به صورت انبوه کشت شد و از محیط کشت عصاره گیری شده و با روش HPLC و اسپکتوفتومتری (جذب نوری۴۵۰nm) تولید توکسین سنجیده شد (۲۸). برای فعال سازی مجدد و اسپورزایی سویه استاندارد هر دو قارچ، در شرایط استریل زیر هود و در کنار شعله قارچ‌ها روی محیط کشت سابرو دکستروز آگار به اضافه کلرامفنیکل کشت داده شدند. محیط کشت مدت ۷ روز در دمای C ۲۸° انکوبه شد تا به مقدار کافی اسپورزایی انجام گیرد. بعد از رشد انبوه و اسپورزایی قارچ ها، با افزودن ۰/۹gr سدیم‌کلراید به ۱ لیتر آب مقطر، سرم فیزیولوژی حاصل به‌همراه توئین ۸۰ به محیط کشت اضافه شد و با ایجاد خراش در شرایط استریل روی محیط کشت سوسپانسون قارچ ها به دست آمد. سوسپانسیون از کاغذ صافی برای جلوگیری از عبور مسیلیوم‌های قارچ عبور داده شد و توسط لام نئوبار و زیر میکروسکوپ شمارش اسپورها انجام گردید.

بررسی فعالیت ضد قارچی

به‌منظور بررسی فعالیت ضد قارچی عصاره خالص زنجبیل استخراج شده توسط حلال‌های مختلف و نانولیپونیوزوم حاوی عصاره، از روش انتشار دیسک Agar Plate Diffusion استفاده گردید (۲۹). غلظت‌های ۰، ۲، ۲۰، ۲۰۰، ۲۰۰۰ میکرولیتر بر ۲۰ میلی‌لیتر از عصاره‌ها به محیط کشت مذاب که حرارت آن در داخل پلیت‌ها به C °۷۰-۶۰ رسیده بود اضافه گردید و سپس مخلوط شدند. بعد از جامد شدن محیط‌های کشت، پلاک‌هایی از قارچ‌های کشت داده شده از سویه‌های استاندارد در مرکز هر پلیت مربوط به غلظت‌های مختلف عصاره، به صورت نقطه‌ای قرار داده شد و کشت‌ها به‌مدت ۷ روز در دمای C ° ۲۸ ، انکوبه شدند. برای هر یک از تیمارها، ۳ تکرار گذاشته شد. در پایان روز هفتم، میزان رشد شعاعی قارچ‌ها بر حسب سانتیمتر گزارش گردید و داده ها در هر تیمار مورد آنالیز قرارگرفت. مهار رشد قارچی باتوجه به رابطه ۲ مورد تحلیل قرار گرفت (۳۰).

$$\text{میزان مهار رشد قارچ} = \frac{\text{قطر کلنی تیمارشده} - \text{قطرکلنی کنترل}}{\text{قطرکلنی کنترل}} \times ۱۰۰$$

اثر نانولیپونیوزوم حاوی غلظت‌های مختلف عصاره زنجبیل، غلظت‌های مختلف عصاره خالص و غلظت‌های مختلف آمفوتریسین B بر مهار رشد قارچ‌های آسپرژیلوس‌فلاووس و آسپرژیلوس‌پارازیتیکوس با یکدیگر مقایسه شده است.

تعیین حداقل غلظت مهارکننده (MIC)

بر اساس پروتکل مرجع CLSI روش میکروپلیت دایلوشن و پلیت ۹۶ خانه جهت تعیینMIC نانولیپونیوزوم حاوی عصاره زنجبیل و عصاره خالص زنجبیل استفاده شد. کشت ۷ روزه قارچ درمحیط کشت اختصاصی سابرو دکستروز آگار در دمای C ° ۲۸ و ۱۵۰rpm تهیه شد. به‌منظور تعیینMIC نانولیپونیوزوم حاوی عصاره زنجبیل، به همه ۹۶ خانه ۱۰۰ µl محیط کشت سابرو دکستروز آگار حاوی سوسپانسیون قارچ معادل غلظت نیم مک فارلند تهیه شده اضافه شد، سپس به چاهک اول ۱۰۰µl نانولیپونیوزوم حاوی عصاره اضافه و کاملا سمپلینگ گردید و از آن ۱۰۰µl برداشته به چاهک بعدی اضافه شد. کار به همین ترتیب تا شماره۱۰ ادامه یافت. شماره ۱۱ آمفوتریسین B به‌عنوان کنترل مثبت و ۱۰۰ µl محیط کشت دارای اسپور قارچ و شماره ۱۲ (شاهد) حاوی ۱۰۰µl عصاره خالص برای مشاهده جذب نوری عصاره بود. سپس پلیت ۹۶ چاهکی مدت ۴۸ ساعت در C °۳۷ انکوبه شد. هم‌چنین برای عصاره خالص زنجبیل این مراحل نیز انجام شد. در پایان MIC نانولیپونیوزوم حاوی عصاره زنجبیل و MIC عصاره زنجبیل خالص با MIC آمفوتریسینB مقایسه گردید. جذب نوری تمامی میکروپلیت ها در طول موج ۵۴۵nm دستگاه الایزاریدر خوانده شد (۷).

تعیین حداقل غلظت کشندگی قارچ minimum (MFC) fungicidal *concentration*

برای محاسبه MFC نانولیپونیوزوم حاوی غلظت‌های مختلف عصاره و عصاره خالص، از پلیت ۳ خانه استفاده شد. زیر هود در شرایط استریل، از چاهک MIC به قبل حدود ۱۰µl از محتویات داخل چاهک‌ها بر روی محیط Sabrouraud dextrose agar SC که در داخل پلیت ۳ خانه تقسیم شده است، ریخته شد. دور

[DOI: 10.18502/ssu.v28i6.4155]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 13:35 IRST on Saturday December 5th 2020

پلیت‌ها با پارافیلم پوشیده و به مدت ۷۲ ساعت در دمای C ۳۵° انکوبه شد. کمترین غلظتی از نانولیپونیوزوم حاوی عصاره و عصاره خالص که رشد قارچی را نشان ندهد به‌عنوان MFC گزارش شد. در پایان MFC نانولیپونیوزوم حاوی عصاره زنجبیل و MFC عصاره زنجبیل خالص با MFC آمفوتریسین B مقایسه گردید.

بررسی روند رهایش عصاره زنجبیل

تعیین میزان رهایش عصاره زنجبیل از نانولیپونیوزوم با تکنیک انتشار انجام شد. برای این منظور از محلول PBS و دو دمای C ۳۷° و C ۴۳° استفاده شد. ابتدا مقدار ۱ml از محلول نانولیپونیوزومی حاوی ۱٪ عصاره (فرمولاسیون بهینه نانولیپونیوزوم) درون کیسه دیالیز قرار گرفت. سپس با قرار دادن کیسه دیالیز درون محیط ایزوله (فالکون استریل و بسته) حاوی ۱۰ml بافر با دو pH مختلف (pHهای ۷/۴ و ۵) در حمام آب C ° ۳۷ و C ۴۳° استیرر شد. بررسی رهایش عصاره در ۱۱ دوره زمانی صورت گرفت. در این فواصل زمانی، ۱ml از محیط اطراف کیسه دیالیز نمونه‌برداری شده و با حجم معادل از محیط بافر PBS تازه جایگزین شد. سپس غلظت‌های آزاد شده عصاره توسط طیف‌سنجی نوری در طول موج nm ۲۳۵ تعیین گردید. با بهره‌گیری از معادله کالیبراسیون عصاره در بافر PBS، درصد رهایش عصاره زنجبیل به‌دست آمد (۲۵،۲۷).

نتایج

مشخصه‌یابی نانولیپونیوزوم حاوی عصاره زنجبیل

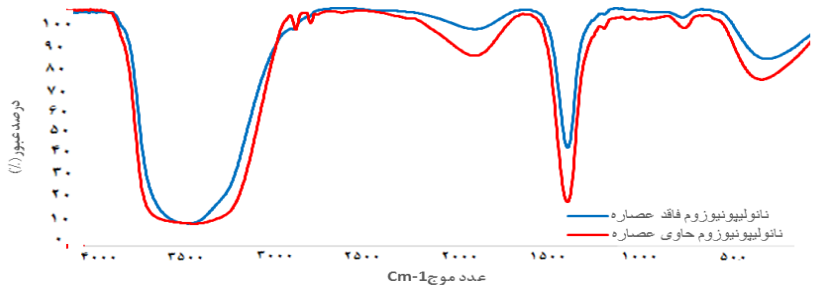
اسپکتروسکوپی تبدیل فوریه مادون قرمز

طیف FT-IR نانولیپونیوزوم فاقد زنجبیل و نانولیپونیوزوم حاوی ۱٪ زنجبیل (فرمولاسیون بهینه) در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل مشخص است، طیف دارای پیک‌های شاخص زیادی از جمله Cm^{-1}۶۹۵/۱۴، ۱۰۹۶/۵۵، ۱۶۳۸/۵۵ و۳۴۲۶/۹۳ می‌باشد که به‌ترتیب نمایانگر گروه‌های شیمیایی C-H، C-O، Ar C-C و OH است. هم‌چنین بررسی طیف FT-IR نانولیپونیوزوم فاقدعصاره و دارای عصاره زنجبیل نشان می‌دهد که با انکپسوله شدن عصاره‌زنجبیل درون نانولیپونیوزوم، پیک‌های Cm^{-1}۶۹۵/۱۴، ۱۰۹۶/۵۵، ۱۶۳۸/۵۵، ۲۰۷۵/۰۵ در سامانه فاقد نانولیپونیوزوم به‌ترتیب با پیک‌های Cm^{-1}۷۲۲/۰۹، ۱۰۸۷/۳۰ و ۱۶۳۹/۴۶، ۲۰۷۷/۵۳ جایگزین شده است که این تغییرات (شیفت) نشان از کپسوله شدن عصاره زنجبیل درون نانوسامانه است. طبق مطالعه نصیرزاده و همکاران در بررسی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی نانونیوزوم‌های حامل عصاره زنجبیل، طیف‌سنج FTIR روی نانونیوزوم حاوی عصاره نشان داد که هیچ پیوند شیمیایی بین نانوحامل نیوزوم و عصاره زنجبیل رخ نداده و پیوند تنها پیوند فیزیکی می‌باشد (۳۱).

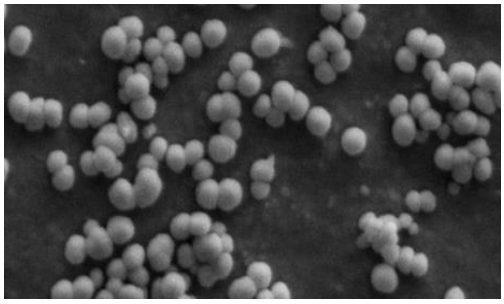
بررسی تصویر میکروسکوپ SEM نانولیپونیوزوم حاوی عصاره زنجبیل

شکل۲، نانولیپونیوزوم فاقد عصاره زنجبیل و شکل ۳ نانولیپونیوزوم حاوی ۱٪عصاره زنجبیل (فرمولاسیون بهینه) دارای سطحی صاف و هموار را نشان می‌دهد که از ویژگی ظاهری مطلوبی برخوردار است و با برخورداری از مورفولوژی کروی، دارای توزیع مناسب است. در مطالعه‌ای مشابه، ویژگی‌های کلوئیدی و آنتی‌اکسیدانی نانونیوزوم‌های حامل عصاره زنجبیل بررسی شد وتصاویر میکروسکوپ SEM تشکیل ذرات کروی در اندازه نانو را تایید کرد (۳۱).

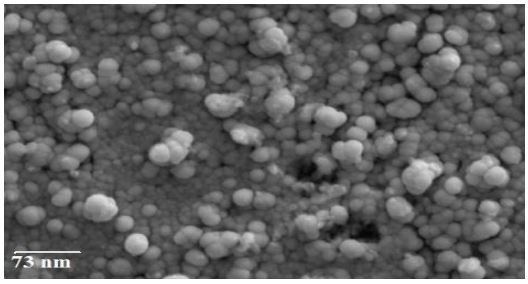
[DOI: 10.18502/ssu.v28i6.4155]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 13:35 IRST on Saturday December 5th 2020



شکل ۱: نمودار FTIR نانولیپونیوزوم فاقد عصاره و نانولیپونیوزوم حاوی ٪۱عصاره زنجبیل



شکل۲: تصویر SEM با مورفولوژی کروی شکل و توده‌ای از نانولیپونیوزوم فاقد عصاره زنجبیل



شکل۳: تصویر SEM با مورفولوژی کروی شکل و دارای ساختار متراکم جامد از نانولیپونیوزوم حاوی ٪۱عصاره زنجبیل

اندازه، شاخص پراکندگی ذرات و پتانسیل زتا

اندازه نانولیپونیوزوم حاوی ٪۱عصاره زنجبیل با استفاده از DLS تعیین شد. میانگین (سه تکرار) اندازه ذرات ۱۲۷ nm و میزان شاخص پراکندگی ذرات (PDI) ۰/۳۱۸ به‌دست آمد. DLS، اندازه‌گیری شعاع هیدرودینامیکی در محلول را نشان می‌دهد (۳۲). میزان شارژ سطحی (پتانسیل زتا) برای نانولیپونیوزوم حاوی عصاره، ۸/۹۰ mV- می‌باشد که با توجه به این مقدار شارژ سطحی آنیونی است. حقیرالسادات و همکاران در سال ۲۰۱۷ نانوذرات لیپیدی حاوی عصاره زنیان تهیه نمودند که اندازه نانوذرات حاوی عصاره ۱۸۶/۱ nm بوده و پتانسیل زتای نانوذرات بین ۱- تا ۶/۷ – گزارش شده است (۱۷).

بارگذاری عصاره زنجبیل

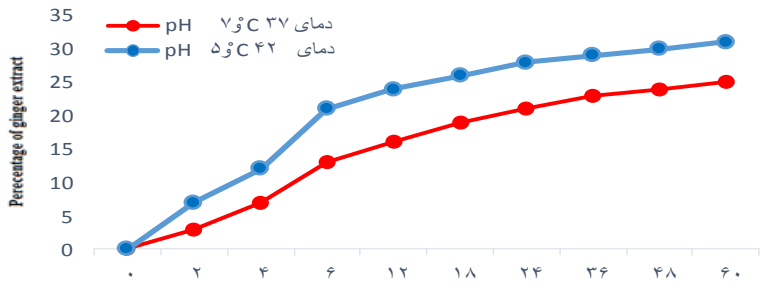
جهت به‌دست آوردن بازده بارگذاری عصاره در نانولیپونیوزوم حاوی ٪۱عصاره زنجبیل درصد داروی انکپسوله شده به‌دست آمد. نتایج بررسی‌ها حاکی از این است که مقدار عصاره بارگذاری شده حدود ٪۷۱ است.

بررسی رهایش عصاره زنجبیل

میزان رهایش عصاره زنجبیل از نانولیپونیوزوم حاوی ٪۱عصاره، به روش دیالیز در بافر PBS در نمودار شکل۴ نشان

[DOI: 10.18502/ssu.v28i6.4155]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 13:35 IRST on Saturday December 5th 2020

داده شده است. همان‌طور که مشخص است، نمودار دارای دو فاز نمایی است، که در فاز اول، با توجه به شیب غلظت ایجاد شده بین عصاره زنجبیل درون لیپونیوزوم و بافر، شاهد یک رهایش نسبتا سریع هستیم و در فاز دوم شیب نمودار رهایش عصاره کاهش می‌یابد. داده‌های حاصل از بررسی الگوی رهایش عصاره نشان داد در ۶ ساعت اول، بالاترین میزان رهایش عصاره مشاهده شد و در ادامه با رهایش آهسته‌تر عصاره، میزان رهایش ثابت شده و با شیب آهسته پیش رفت. رهایش بالاتر عصاره زنجبیل در دمای ۴۲° C و pH ۵ نشان می‌دهد میزان رهایش در pH ۷/۴ کمتر و سامانه‌ی لیپونیوزومی پایداری بیشتری نسبت به محیط بافری با pH ۵ دارد. در مطالعه‌ای مشابه نانوسامانه نیوزومی حاوی عصاره زنجبیل در pH اسیدی پایدارتر از pH خنثی گزارش شد (۳۱). طبق نمودار فوق نتیجه می‌گیریم با افزایش دما میزان رهایش عصاره زنجبیل نیز افزایش می‌یابد، زیرا با افزایش دما فسفولیپیدهای موجود در غشا از یکدیگر فاصله گرفته و عصاره بیشتری آزاد می‌گردد، در نتیجه پایداری لیپونیوزوم کاهش می‌یابد. در سال ۲۰۱۸ ساسانی و همکاران طی مطالعه‌ای نوین در سنتز و بهینه‌سازی نانوحامل‌های لیپونیوزوم حاوی کورکومین به‌منظور کاربرد در شیمی درمانی سرطان، ضمن بررسی پروفایل رهایش در محیط های شبیه سازی شده دریافتند، با افزایش دما از ۳۷° C به ۴۲° C حداکثر رهایش دارو از ٪۱۹/۰۲ به ٪۲۴/۸۸ افزایش می یابد (۳۳).



شکل۴: نمودار رهایش عصاره زنجبیل از نانولیپونیوزوم در دو بافر مختلف (pH ۷/۴ و pH ۵) در pH ۵ میزان رهایش نسبت به pH ۷/۴ بالاتر است

بررسی فعالیت ضد قارچی

جدول ۱ نتایج بررسی اثر غلظت‌های متفاوت نانولیپونیوزوم حاوی عصاره، عصاره خالص زنجبیل وآمفوتریسین B با روش انتشار دیسک بر قارچ آسپرژیلوس‌فلاوس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس را ارائه می‌دهد. نتایج برای قارچ آسپرژیلوس فلاووس نشان می‌دهد، عصاره ٪۱ زنجبیل هاله‌ای با قطر mm ۹، عصاره ٪۲ زنجبیل هاله‌ای با قطرmm ۲۱ و عصاره ٪۱۰ هاله‌ای با قطرmm ۲۸ ایجاد نموده است. بررسی اثر غلظت‌های متفاوت عصاره زنجبیل با روش انتشار دیسک بر قارچ آسپرژیلوس‌پارازیتیکوس نیز نشان می‌دهد که عصاره ٪۱ زنجبیل هاله‌ای با قطر ۹mm، عصاره ٪۲ هاله‌ای با قطر ۱۸mm و عصاره ٪۱۰ هاله‌ای با قطرmm ۲۵ ایجاد نموده است. نتایج جدول ۱ نشان می‌دهد قطر هاله ممانعت از رشد نانولیپونیوزوم حاوی عصاره و عصاره خالص زنجبیل بر قارچ آسپرژیلوس‌فلاووس در روش دیسک دیفیوژن در سه غلظت ۱، ۲۰ و ۱۰ درصد، سیر افزایشی داشته و با افزایش غلظت نانولیپونیوزوم حاوی عصاره و عصاره خالص زنجبیل قطر هاله ممانعت از رشد افزایش می‌یابد. با مقایسه نتایج جدول ۱ مشخص می‌شود قطر هاله ممانعت از رشد نانولیپونیوزوم حاوی عصاره و عصاره خالص زنجبیل برای هر دو قارچ آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس‌پارازیتیکوس با بالا رفتن غلظت عصاره افزایش یافته، اما این افزایش در مورد قارچ آسپرژیلوس‌فلاووس کمی بیشتر از قارچ آسپرژیلوس‌پارازیتیکوس است. قطر هاله ممانعت از رشد آمفوتریسینB کمتر از نانولیپونیوزوم حاوی

[DOI: 10.18502/ssu.v28i6.4155]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 13:35 IRST on Saturday December 5th 2020

عصاره و عصاره خالص زنجبیل است. در مطالعات مشابهی خاصیت ضدقارچی چند گیاه دارویی بر قارچ های آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس نشان داده که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. مریم صدرنیا در بررسی و مطالعات خود دریافت عصاره آبی دو گیاه مرزه و پونه سبب کاهش رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس و هم‌چنین ممانعت از تولید سم می‌باشند (۷).

تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC)

MIC به‌عنوان حداقل غلظتی‌است که نانولیپونیوزوم بارگذاری شده با عصاره زنجبیل قادراست به‌طور کامل رشد قارچ مورد آزمایش را مهار کند. حداقل غلظت بازدارندگی رشد نانولیپونیوزوم حاوی عصاره و عصاره خالص زنجبیل و آمفوتریسین B بر حسب mg/ml در غلظتهای مختلف (۱، ۲ و ۱۰ درصد) به روش میکروپلیت دایلوشن برای قارچ‌های آسپرژیلوس‌فلاووس و آسپرژیلوس‌پارازیتیکوس تعیین گردید. با توجه به جدول ۲، نانولیپونیوزوم حاوی عصاره ۱ و ۲ درصد زنجبیل در MIC برابر ۰/۰۲۶ mg/ml مانع رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس و عصاره ٪۱۰زنجبیل درMIC برابر mg/ml ۰/۱۷۲ مانع رشد قارچ شده است. نتایج MIC عصاره خالص زنجبیل در سه غلظت ۱، ۲ و۱۰ درصد بر قارچ آسپرژیلوس‌فلاووس به ترتیب برابر mg/ml ۰/۱۰۱، ۰/۱۲ و ۰/۸۱ به‌دست آمد. نتایج بررسیMIC عصاره زنجبیل بر قارچ آسپرژیلوس‌پارازیتیکوس نشان می‌دهد که نانولیپونیوزوم حاوی عصاره در غلظت ٪۱ دارای MIC برابر ۰/۰۴۳mg/ml، غلظت ٪۲ MIC برابر ۰/۰۵۵ mg/ml، و عصاره در غلظت ٪۱۰ MIC برابر ۰/۱۸۱mg/ml می‌باشد. نتایج MIC عصاره خالص زنجبیل در سه غلظت ۱، ۲ و۱۰ درصد بر قارچ آسپرژیلوس‌پارازیتیکوس به ترتیب برابر mg/ml ۰/۲۳، ۰/۲۷۴ و ۰/۸۹ به‌دست آمد. MICغلظت‌های مختلف آمفوتریسینB نیز در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج MIC حاصل از بررسی اثر نانولیپونیوزوم حاوی عصاره زنجبیل در سه غلظت ۱، ۲ و ۱۰ درصد بر قارچ آسپرژیلوس‌فلاووس نشان می دهد هر دو غلظت ۱، ۲ درصد دارای MIC برابر و یکسان بوده، اما عصاره ٪۱۰، MIC بالاتری داشته که نشان از اثربخشی کمتر آن است. هم‌چنین MIC حاصل از بررسی اثر نانولیپونیوزوم حاوی عصاره در سه غلظت ۱، ۲ و۱۰ درصد بر قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس نشان می‌دهد عصاره ٪۱ MIC کمتری نسبت به عصاره ۲ و ۱۰ درصد بوده و عصاره ٪۲ نیز دارای MIC کمتری نسبت به عصاره ٪۱۰ می‌باشد، بدین معنی که با افزایش غلظت عصاره MIC بالا می‌رود، بود. بررسی نتایج نشان می‌دهد، حداقل غلظت مهارکنندگی رشد قارچ‌های آسپرژیلوس‌فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس درغلظت‌های مختلف عصاره خالص (mg/ml) نسبت به نانولیپونیوزوم حاوی عصاره بیشتر است، هم‌چنین MIC قارچ آسپرژیلوس‌فلاووس در گروه آمفوتریسین B و نانولیپونیوزوم حاوی عصاره تقریبا برابر بوده ولی MIC قارچ آسپرژیلوس‌پارازیتیکوس در گروه آمفوتریسین B نسبت به نانولیپونیوزوم حاوی عصاره کمتر است.

تعیین حداقل غلظت کشندگی قارچ (MFC)

نتایج حداقل غلظت کشندگی قارچ نانولیپونیوزوم حاوی عصاره، عصاره خالص و آمفوتریسینB بر حسب mg/ml در غلظت‌های مختلف برای دو قارچ آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس‌پارازیتیکوس در جدول ۳ آمده است. مطابق جدول ۳، بررسی حداقل غلظت کشندگی قارچ برای قارچ آسپرژیلوس فلاووس نشان می‌دهد که عصاره زنجبیل ۱و ۲ درصد در غلظت mg/ml ۰/۱۱ رشد قارچ آسپرژیلوس‌فلاووس را نشان نمی‌دهد و عصاره ٪۱۰ زنجبیل در غلظت mg/ml ۰/۲۷ رشد قارچ را نشان نمی‌دهد. نتایج در مورد قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس نشان می‌دهد عصاره زنجبیل در غلظت ٪۱ دارای MFC برابر ۰/۲۳mg/ml، غلظت ٪۲ MFC برابر mg/ml ۰/۲۹و عصاره در غلظت ٪۱۰MFC برابر mg/ml ۰/۴۷می‌باشد. نتایج MFC دو قارچ آسپرژیلوس‌فلاووس و آسپرژیلوس‌پارازیتیکوس نشان می‌دهد، عصاره زنجبیل در غلظت ٪۱ دارای بیشترین اثرکشندگی قارچ، عصاره ٪۲ دارای اثر متوسط و عصاره ٪۱۰ دارای کمترین اثر بوده است. طبق نتایج ، حداقل غلظت کشندگی قارچ‌های آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس‌پارازیتیکوس در غلظت‌های مختلف

[DOI: 10.18502/ssu.v28i6.4155]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 13:35 IRST on Saturday December 5th 2020

عصاره خالص (mg/ml) نسبت به نانولیپونیوزوم حاوی عصاره بیشتر است، به‌عبارتی عصاره خالص زنجبیل در مقایسه با نانولیپونیوزوم حاوی عصاره دارای اثرکشندگی بسیار پایین است، هم‌چنین MFC قارچ‌های آسپرژیلوس‌فلاووس و آسپرژیلوس‌پارازیتیکوس در گروه آمفوتریسین B نسبت به نانولیپونیوزوم حاوی عصاره کمتر است.

جدول ۱: بررسی اثر نانولیپونیوزوم حاوی عصاره زنجبیل، عصاره خالص و آمفوتریسینB بر مهار رشد قارچ‌های آسپرژیلوس‌فلاووس و آسپرژیلوس‌پارازیتیکوس در روش انتشار دیسک

	آسپرژیلوس‌فلاووس			آسپرژیلوس‌پارازیتیکوس		
غلظت (٪) نانولیپونیوزوم حاوی عصاره	عصاره خالص	آمفوتریسین B		نانولیپونیوزوم حاوی عصاره	عصاره خالص	آمفوتریسین B
۱	۹(mm)	۱۶ (mm)	۷ (mm)	۹ (mm)	۱۶ (mm)	۷ (mm)
۲	۲۱ (mm)	۴۰ (mm)	۷ (mm)	۱۸ (mm)	۴۰ (mm)	۷ (mm)
۱۰	۲۸ (mm)	۵۹ (mm)	۹ (mm)	۲۵ (mm)	۵۳ (mm)	۹ (mm)

جدول ۲: مقایسه حداقل غلظت مهارکنندگی رشد قارچ‌های آسپرژیلوس‌فلاووس و آسپرژیلوس‌پارازیتیکوس درغلظتهای مختلف از نانولیپونیوزوم حاوی عصاره و عصاره خالص و آمفوتریسین B (mg/ml)

	آسپرژیلوس‌فلاووس			آسپرژیلوس‌پارازیتیکوس		
غلظت: (٪) نانولیپونیوزوم حاوی عصاره	عصاره خالص	آمفوتریسینB		نانولیپونیوزوم حاوی عصاره	عصاره خالص	آمفوتریسینB
۱	۰/۰۲۶	۰/۱۰۱	۰/۰۲۵	۰/۰۴۳	۰/۲۳	۰/۰۲۹
۲	۰/۰۲۶	۰/۱۲	۰/۰۲۵	۰/۰۵۵	۰/۲۷۴	۰/۰۳۵
۱۰	۰/۱۶۹	۰/۸۱	۰/۱۶۵	۰/۱۸۱	۰/۸۹	۰/۱۱

جدول۳: مقایسه حداقل غلظت کشندگی قارچ‌های آسپرژیلوس‌فلاوس و آسپرژیلوس‌پارازیتیکوس درغلظتهای مختلف نانولیپونیوزوم حاوی عصاره و عصاره خالص و آمفوتریسین B (mg/ml)

	قارچ آسپرژیلوس‌فلاووس			آسپرژیلوس‌پارازیتیکوس		
غلظت (٪) نانولیپونیوزوم حاوی عصاره	عصاره خالص	آمفوتریسینB		نانولیپونیوزوم حاوی عصاره	عصاره خالص	آمفوتریسینB
۱	۰/۱۱	۰/۵۳	۰/۰۹	۰/۲۳	۰/۸۹	۰/۱۲
۲	۰/۱۱	۰/۵۳	۰/۰۹	۰/۲۹	۰/۹۷	۰/۱۲
۱۰	۰/۲۷	۰/۸۷	۰/۲۳	۰/۴۷	۲/۱	۰/۲۹

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه، عصاره زنجبیل با بازده٪۷۱ درون نانولیپونیوزوم بارگذاری شد. هیچگونه تعامل شیمیایی بین عصاره زنجبیل و نانولیپونیوزوم عصاره یافت نشد. نتایج بررسی اثر عصاره زنجبیل بر مهار رشد آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس‌پارازیتیکوس در روش انتشار دیسک نشان می‌دهد، قطر هاله مانعت از رشد نانولیپونیوزوم حاوی عصاره و عصاره خالص برای هر دو قارچ با بالا رفتن غلظت عصاره افزایش یافته، اما این افزایش در مورد قارچ آسپرژیلوس فلاووس کمی بیشتر از قارچ آسپرژیلوس‌پارازیتیکوس است. نتایج MIC حاصل از بررسی اثر نانولیپونیوزوم حاوی عصاره در سه غلظت ۱، ۲ و ۱۰ درصد بر قارچ آسپرژیلوس فلاووس و قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس به‌روش میکروپلیت دایلوشن نشان می‌دهد، نانولیپونیوزوم حاوی عصاره زنجبیل در غلظت ٪۱ عصاره دارای بیشترین اثر بازدارندگی بر رشد قارچ، عصاره ٪۲ دارای اثر متوسط و عصاره ٪۱۰ دارای کمترین اثر بوده است. به‌نظر می‌رسد علت اثر کمتر بازدارندگی رشد قارچ عصاره ٪۱۰ زنجبیل نسبت به عصاره‌های ۱ و ۲ درصد ، غلظت بالای ذرات

[DOI: 10.18502/ssu.v28i6.4155]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 13:35 IRST on Saturday December 5th 2020

روغنی عصاره در حلال آب و در نتیجه بروز پدیده عدم نفوذ کافی این ذرات از دیواره سلول قارچ به درون سلول‌ها می‌باشد (۷،۳۴). در مطالعه‌ای توسط آقایان و همکاران، تاثیر رقت‌های مختلف عصاره زنجبیل بر میزان رشد کلونی اکتینومایسس نیوزلندی بررسی شد و میزان MIC عصاره زنجبیل mg/ml ۰/۰۲ به‌دست آمد که نسبت به تحقیق حاضر، کمتر است (۳۵). هم‌چنین اثر ضد قارچی عصاره‌های مریم نخودی و زنجبیل روی کاندیدا مطالعه و بررسی شد، میزان MIC عصاره‌های مریم نخـودی و زنجبیل بر سویه کاندیدا به ترتیب ۱۰۰۰µg/ml و ۶۲/۲۵ به‌دست آمد کـه تفـاوت معنی‌داری را نـشان داد. می‌توان نتیجه گرفت عصاره گیاه زنجبیل در مقایسه با مریم نخودی دارای اثر ضدقارچی بیشتری علیه کاندیدا آلبیکنس است (۳۶). هم‌چنین در تحقیق مریم صدرنیاMIC عصاره آبی مرزه و پونه به‌ترتیب mg/ml ۰/۰۳۱ و ۰/۰۶۱ و اسانس ٪۱ مرزه و پونه به‌ترتیب mg/ml۰/۰۳۹ و ۰/۰۷۸ بدست آمد (۷). طباطبایی یزدی و همکاران در تحقیق خود، شناسایی ترکیبات شیمیایی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، میزان فنل و ارزیابی اثر مهارکنندگی و کشندگی اسانس زنجبیل بر تعدادی از سویه‌های میکروبی بیماریزا در شرایط برون‌تنی را بررسی کردند. در این تحقیق حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس زنجبیل برای سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا، سالمونلا تیفی، اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوا، باسیلوس سرئوس، کاندیدا آلبیکنس و آسپرژیلوس نایجر به ترتیب برابر با 50، 50 ، 25 ، 25/6 ، 12/ 5 ، 25/6 و 25/6 میلی‌گرم برمیلی‌لیتر به‌دست آمد، که نسبت به تحقیق حاضر مقادیرMIC بیشتر است. حداقل غلظت کشندگی اسانس، بالاتر از حداقل غلظت مهارکنندگی بود. نتایج این مطالعه نشان داد اسانس زنجبیل بر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به‌باکتری‌های گرم منفی، مؤثرتر است (۳۷). هم‌چنین در مطالعه مینوییان و همکاران، فعالیت ضد قارچی و قدرت مهارکنندگی و کشندگی سه اسانس زیره سبز، کاکوتی و سیاه دانه روی قارچ‌های آسپرژیلوس‌فلاووس و آسپرژیلوس‌پارازیتیکوس بررسی شد و میزان MIC وMFC تعیین گردید. نتایج نشان داد اسانس این سه گیاه دارای اثر ضد قارچی بوده و فعالیت ضد قارچی و قدرت مهارکنندگی و کشندگی اسانس سه گیاه روی هر دو گونه قارچ آسپرژیلوس‌فلاووس و آسپرژیلوس‌پارازیتیکوس، به‌ترتیب شامل اسانس زیره سبز، کاکوتی و سیاه دانه بود (۳۸). در مطالعه آقازاده و همکاران، اثرات آنتی بیوتیکی و ضدمیکروبی گیاه زنجبیل بررسی شد. یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد عصاره زنجبیل از نظر اثر ضد قارچی خوبی در برابر قارچ‌های C. albicans و C. Krusei داشته و مناسب است. غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی لیتر بالاترین اثر ضد قارچی را نشان داد. شاید استفاده از عصاره‌های گیاهی مانند زنجبیل عصر جدیدی را برای درمان ضد میکروبی پس از ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی در میکروب ها نشان دهد (۳۹). نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که نانولیپونیوزوم حاوی عصاره زنجبیل در غلظت‌های پایین دارای اثرضد قارچی خوبی برعلیه قارچ آسپرژیلوس فلاووس و قارچ آسپرژیلوس‌پارازیتیکوس می‌باشد.

نتیجه گیری

نانولیپونیوزوم حاوی عصاره زنجبیل با برخورداری از ویژگی‌های مناسب فیزیکوشیمیایی، افزایش پایداری دارو و کنترل خوب رهایش، می‌تواند یک عامل ضد قارچ امیدوار کننده با اثرات ضد قارچ بالا و عوارض جانبی کم باشد.

سپاس‌گزاری

مطالعه حاضر حاصل طرح تحقیقاتی تصویب و اجرا شده در دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد می باشد و هیچگونه حمایت مالی نداشته است.

حامی مالی: ندارد.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

[DOI: 10.18502/ssu.v28i6.4155]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 13:35 IRST on Saturday December 5th 2020

References:

1-Sun K, Li Y, Guo L, Wang Y, Liu P, Zhu W. ***Indole Diterpenoids and Isocoumarin from the Fungus, Aspergillus Flavus, Isolated from the Prawn, Penaeus Vannamei.*** Mar Drugs 2014; 12(7): 3970-81.

2-Esper RH, Gonçalez E, Marques MO, Felicio RC, Felicio JD. ***Potential of Essential Oils for Protection of Grains Contaminated by Aflatoxin Produced by Aspergillus Flavus.*** Frontiers Microbiol 2014; 5: 269-78.

3-Moosavian M, Darvishnia M, Khosravinia HA. ***Comparison of Growth of Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus in Different Conditions of Temperature, Moisture and pH.*** J App Res Plant Protection 2017; 6(2): 37-47.

4-Naseri A, Arj P, Najaf MJ, Rakhshandehzadeh H. ***Antifungal Effects of Methanolic and Aquatic Extract of Leaf and Walnut Peel on Candidate Species, Scientific.*** J Birjand Univ Med Sci 2015; 22(2): 115-24. [Persian]

5-Toyang NJ, Verpoorte R. ***A Review of the Medicinal Potentials of Plants of the Genus Vernonia (Asteraceae).*** J Ethnopharmacol 2013; 146(3): 681-723.

6-Salem MZM, Zidan YE, Mansour MMA, Hadidi Nesrin MNE, Elgat Wael AAA. ***Antifungal Activities of Two Essential Oils Used in the Treatment of Three Commercial Woods Deteriorated by Five Common Mold Fungi.*** Int Biodeterior Biodegred 2016; 106: 88-96.

7-Sadrnia M. ***Effects of Aqueous Extracts and Essential Oils of Mentha and Satureja on the Aflatoxin B1 Production by Aspergillus Flavus.*** Arak Med Univ J 2018; 21: 63-73. [Persian]

8-Behbehani A, Tabatabaei Yazdi F, Shahidi F, Mohebbi M. ***Antifungal Effect of Aqueous and Methanolic Avicennia Marina Leaves Extracts on Alternaria Alternataand Penicillium Citrinum***. J Rafsanjan Univ Med Sci 2013; 12(12): 1015-24.

9-Al-Gahtani Munirah F, AlOthman Monira R, Mahmoudand Mohamed A, AbdEl-Aziz Abeer R. M. ***Anti-Aflatoxigenic Effect of Essential Oils on Aspergillusspp. Isolated from Pistachio in Saudi Arabia.*** African J Microbiol Res 2013; 7(25): 3151-59.

10-Mohammadi M, Hashemi SJ, Rezaie S, Bayat M**.** ***Assessment of Antifungal Activity of Rosemary Oil Extract and Its Effect on AFL1 Gene Expression in Aspergillus Flavus by Real-Time PCR.*** J Microbial World 2018; 11(34): 88-100.

11-Bone ME, Wilkinson DJ, Young JR, McNeil J, Charlton S. ***Ginger Root--A New Antiemetic. The Effect of Ginger Root on Postoperative Nausea and Vomiting after Major Gynecological Surgery***. Anaesthesia 1990; 45(8): 669-71.

12-Abdallah WE, Abdallah EM. ***Antibacterial Activity of Ginger (Zingiber Officinale Rosc.) Rhizome: A Mini Review.*** Int J Pharmacognosy Chin Med (IPCM) 2018; 2(4):1-8.

13-Dbald M, Bourgeois S, Andrieu V, Fessi H. ***Ophthalmic Drug Delivery Systems for Antibiotherapy-A Review.*** Pharmaceutics 2018; 10(1): 10.

[DOI: 10.18502/ssu.v28i6.4155]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 13:35 IRST on Saturday December 5th 2020

14- Shoaie N, Mohammadi P, Roudbar Mohammadi SH. ***Antifungal Effect of Teucrium polium and Zingiber officinale extracts on Clinical isolates of Candida Species***. Armaghane-Danesh, Yasuj Uni Med Sci 2012; 17(5): 416-22.

15- Tabassum Khan N. ***Therapeutic Potentials of Zingier officinal.*** J Tradit Med Clin Naturo 2019; 8: 1-2.

16- 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 (noisome, solid lipid, liposome) Nanoparticles:A Comprehensive Review.*** Int J Poly Mater Poly Biomat 2018; 67(6): 383-400.

17- Haghiralsadat F, Amouabedini G, Naderinezhad S, Sheikhha MH, Malaei-balasi Z, Akbarzadeh A, et al. ***An Evaluation of the Transmembrane Ammonium Sulfate Gradients Method In Lipid System to Improve Trapping Capacity of Amphipathic Weak.*** NCMBJ 2017; 7(28): 49-60.

18- Naderinezhad S, Haghiralsadat F, Amoabediny G, Najafabadi SR, Akbarzade A. ***Synthesis of Sustained-Release Niosomal Doxorubicin and Investigation of Effective Drug Dose in Nano-Formula Against Bone Marrow Cancer.*** New Cellular Molecul Biotech J 2017; 8(30): 17-24.

19- Gao W, Chen Y, Zhang Y, Zhang Q, Zhang L. ***Nanoparticle-Based Local Antimicrobial Drug Delivery.*** Adv Drug Deliver Rev 2018; 127: 46-57.

20- Abdel-Hadi A, Schmidt-Heydt M, Parra R, Geisen R, Magan N. ***A Systems Approach to Model the Relationship between Aflatoxin Gene Cluster Expression, Environmental Factors, Growth and Toxin Production by Aspergillus Flavus.*** J R Soc Interface 2012; 9(69): 757-67.

21- Zasadzinski JA, Wong B, Forbes N, Braun G, Wu G. ***Novel Methods of Enhanced Retention in and Rapid, Targeted Release from Liposomes.*** Curr Opin Colloid Interfac Sci 2011; 16(3): 203-14.

22- Abbasi R, Kouhsoltani M, Lotfipour F, Asgharian P. ***Evaluating Antifungal Effect of Matrica And Zingiber on Oral Candida Albicans Species Isolated from Denture Stomatitis Outpatients Referring to Dental Faculty of Tabriz University of Medical Sciences (In Vitro)*** [dessertation]. Iran: Tabriz Uni Med Sci; 2018.

23- Ghodrati Z, Divsalar A, Ayrian S, Saeidifar M. ***Evaluation of The Anticancer Effects of Samarium Nanoparticles Synthesized by Extract of Ginger on HCT116 Colorectal Cancer Cells***. J Cell Tissue (JCT) 2020; 10(4): 202-13. [Persian]

24- Johari H, Sharifi E, Delirnasab F, Hemayatkhah V, Kargar H, Nikpoor M. ***The Effect of Hydro-Alcoholic Extracts of Ginger on Lead Detoxification of Kidney in the Immature Wistar Rats.*** J Rafsanjan Univ Med Sci 2013; 12: 417-24.

25- Haghiralsadat F, Amoabediny G, Sheikhha MH, Forouzanfar T, Helder MN, Zandieh-doulabi BA. ***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: 55-65.

26- Noorani B, Tabandeh F, Yazdian F, Soheili ZS, Shakibaie M, Rahmani Sh. ***Thin Natural Gelatin/Chitosan Nanofibrous Scaffolds for Retinal***

[DOI: 10.18502/ssu.v28i6.4155]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 13:35 IRST on Saturday December 5th 2020

Pigment Epithelium Cells. Int J Polymeric Mater 2018; 67(12): 754-63

27-Majdizadeh M, Rezaei Zarchi S, Movahedpour AA, Shahi Malmir H, Sasani E, Haghiralsadat BF. ***A New Strategy in Improving Therapeutic Indexes of Medicinal Herbs: Preparation and Characterization of Nano-Liposomes Containing Mentha Piperita Essential Oil***. J Shaeed Sdoughi Univ Med Sci Yazd 2018;25(11):853-64.

28-Garcia D, Ramos AJ, Sanchis V, MarÌn S. ***Modeling Kinetics of Aflatoxin Production by Aspergillus Favus in Maize-Based Medium and Maize Grain.*** Int J Food Microbial 2013; 162(2): 182-89.

29-Coopoosamy RM, Magwa ML. ***Traditional Use, Antibacterial Activity and Antifungal Activity of Crude Extract of Aloe Excelsa.*** African J Biotech (AJB) 2007; 6(20):2406-10.

30-Jasso de Rodriguez D, Hernández-Castillo D, Rodriguez-Gracia R, Angulo-Sanchez JL. ***Antifungal Activity in Vitro of Aloe Vera Pulp and Liquid Fraction against Plant Pathogenic Fungi.*** Indust Crops Produc 2005; 21: 81-7.

31-Nasirzadeh R, Ghanbarzadeh B. ***Investigation of Colloidal and antioxidant Characteristics of Nano-niosome Containing Ginger Extract*** [dissertation]**.** Iran: Tabriz Uni; 2016.

32-Jahanizadeh Sh, Yazdian F, Marjani A, Omidi M, Rashedi H. ***Curcumin- loaded Chitosan/ Carboxymethyl Starch/ Montmorillonite bio-nanocomposite for reduction of dental bacterial biofilm formation.*** Int J Biolog Macromol 2017; 105(Pt1): 757-63.

33-Sasani E, Shahi Malmir H, Daneshmand F, Majdizadeh M , Haghiralsadat F. ***A New Study on Synthesize and Optimization of Pegylated Liponiosomal Nanocarriers Containing Curcumin for Use in Cancer Chemotherapy.*** J Shahid Sadoughi Univ Medic Sci 2018; 26(6): 528-41. [Persian]

34-Kelidari HR, Akbari J, Saeedi M. ***Application and Characterization of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers as Drug Delivery Systems***. J Mazand Univ Med Sci 2013; 23(98): 387-403. [Persian]

35-Aghayan Sh, Zaker S, Shahla'I M. ***Study of the Effect of Different Gingerbread Extract on the Growth Rate of Actinomyces New Zealand's Clonal Growth***. J Res Dentis 2017; 14(1): 27-33.

36-Shoaie N, Mohammadi P, Rudbar Mohammadi Sh. ***Antifungal Effects of Pomegranate and Ginger Bilberry Extracts on Candida Clinical Isolates.*** Armaghan Danesh 2012; 17(5): 416-23.

37-Tabatabaei Yazdi F, Falah F, Alizadeh Behbahani B, Vasiee A.R, Mortazavi SA. ***Identification of Chemical Compounds, Antioxidant Potential, Phenolic Content and Evaluation of Inhibitory and Bactericidal/Fungicidal Effects of Ginger Essential Oil on Some Pathogenic Microorganisms in Vitro***. Qom Univ Med Sci J 2019; 13(3): 50-62. [Persian]

38-Minooian Haghighi MH. ***Inhibition and Destruction of Cumin, Cacto and Black Cumin Essences on Aspergillus Cells.*** J Babol Univ Med Sci 2013; 15(6): 25-35.

39-Aghazadeh M, Zahedi Bialvaei A, Aghazadeh M, Kabiri F. ***Survey of the Antibiofilm and Antimicrobial Effects of Zingiber officinale (in Vitro Study)***. Jundishapur J Microbial. 2016; 9(2): e30167.

[DOI: 10.18502/ssu.v28i6.4155]

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 13:35 IRST on Saturday December 5th 2020

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences **Received: 30 Dec 2019**

Vol 28| NO 6 | Sep 2020 **Accepted: 10 May 2020**

Synthesis and Evaluation of Lipid-based Nanoparticle Containing Ginger Extract against *Aspergillus* Species

Vahid Yakhchi[1], Shabnam Jahanizadeh[2], Fatemeh Yazdian[3], Hamid Rashedi[*4], Bibi Fatemeh Haghiralsadat[†5]

Original Article

Introduction: Loading the active ingredients of medicinal plants in lipid nanoparticles reduces the reaction of the active substance with the surrounding environment, such as water and oxygen, and reduces the intensity of transmission or evaporation to the external environment. In this study, intended to enhance efficacy of ginger extract, encapsulation in nanoliponiosome synthesized by thin-film hydration method were done and their antifungal effect on the growth of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* were studied.

Methods: In this experimental laboratory study, derivation was done using Soxhlet extractor method. Antifungal activity of ginger extract was specific by disc diffusion and microplate dilution methods. The inhibitory effect of extract was investigated. Physiochemical characteristics and structural characterization of nanoparticle were evaluated from the perspective of in vitro efficiency, drug release, nanoparticle size, zeta potential, surface morphology and FTIR (Fourier-transform infrared spectroscopy), DLS (Dynamic light scattering) and finally SEM (Scanning electron microscope) spectra.

Results: FTIR investigations showed ginger extract and nanoliponiosome had no chemical interaction leading to change the functional groups. SEM microscope showed the spherical mprphology of particles and average particles size of 73nm. Ginger extract was loaded into the nanoliponiosome with a yield of 71%. It was also found out that ginger extract had a stronger antifungal effect against *Aspergillus flavus* fungus compared to the *Aspergillus parasiticus* fungus. At both 37°C and 42°C, the release of ginger extract was higher at pH of 4.5 compared to neutral pH (7.4).

Conclusion: Nanoliponiosomes containing ginger extract with good physicochemical properties, increased drug stability and good release control can be promising antifungal agents with high antifungal effects and low side effects.

Keywords: Ginger extract, Nano Liponiosome, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, Antifungal

Citation: yakhchi V, Jahanizadeh SH, Yazdian F, Rashedi H, Haghiralsadat F. **Synthesis and Evaluation of Lipid-based Nanoparticle Containing Ginger Extract against *Aspergillus* Species** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci,2020; 28(6): 2766-80.

1Department of Biology, Payam Noor University, Tehran, ,Iran

2Applied Chemistry, Young Researchers and Elite Club, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran

3Department of Life Science Engineering, Faculty of New Science and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran

4Department of Biotechnology, School of Chemical Engineering, College of Engineering, University of Tehran, Tehran, Iran

[5]Medical Nanotechnology & Tissue Engineering Research Center, Yazd Reproductive Sciences Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

***Corresponding author: Tel:** 09132507158, **email:** Fhaghirosadat@gmail.com