

ORIGINAL ARTICLE

Investigating the performance of liposomal formulations containing clove essential oil made by thin layer and heat method in temperature and pH conditions similar to the mouth in order to be used in the research of oral and dental diseases

Maryam Zarehzadeh-Mehrizi¹, Mohammad Majdizadeh², Mahboubeh Zarezadeh-Mehrizi¹, Alireza Afshoun³, Mahtab Zhian-Mehrizi³, Bibi Fatemeh Haghirsadat^{4,5*}

¹Faculty of Dentistry, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

²Nano-Biotech Foresight Company Biotechnology Campus, Science & Technology Park of Yazd, Yazd, Iran.

³Department of Advanced Medical Sciences and Technologies, School of Paramedicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

⁴Medical nanotechnology & tissue engineering research center, Yazd reproductive sciences institute, shahid sadoughi university of medical sciences, Yazd, Iran.

⁵Department of Advanced Medical Sciences and Technologies, School of Paramedicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

Correspondence

Bibi Fatemeh Haghirsadat
Email: Fhaghirsadat@gmail.com

How to cite

Zarehzadeh-Mehrizi, M., Majdizadeh, M., Zarezadeh-Mehrizi, M., Afshoun, A., Zhian-Mehrizi, M., & Haghirsadat, F.B. (2023). Investigating the performance of liposomal formulations containing clove essential oil made by thin layer and heat method in temperature and pH conditions similar to the mouth in order to be used in the research of oral and dental diseases. *Experimental Animal Biology*, 12(46), 15-26.

ABSTRACT

Considering the problems of using medicinal plants in the treatment of diseases such as high volatility and non-targeted effects, and the role of nanotechnology in reducing these challenges, the present research was conducted with the aim of obtaining a nano formulation containing *Clove* essential oil for use in dental research. 4 liposomal formulations containing *Clove* essential oil were prepared using phosphatidylcholine and cholesterol by thin layer and heat methods separately. The encapsulation efficiency, size, polydispersity-index and zeta potential of nanoparticle (by zeta-sizer) were measured. In each of the manufacturing methods, a formulation that had suitable physicochemical parameters was selected in order to check the essential oil release pattern and the morphology of nanoparticles (by SEM). Also, the toxicity of nano-liposomes obtained from selected formulations was measured by MTT method on human fibroblast(HFF) cell line. The encapsulation efficiency, particle size and zeta potential for the selected formulation obtained from the thin layer method were 50.57%, 123.3nm and -18.6mV, respectively, and for the heat method, they were 55.43%, 121.4nm respectively and -19/2mV. The release of essential oil from the selected formulations was slow and continuous and dependent on pH. Nano-liposomes made by heat method caused less toxicity to HFF cell line compared to thin layer method. Considering the suitable physicochemical characteristics of nano-liposomes containing *Clove* essential oil and very low toxicity of nano-liposomes made by heat method for healthy HFF cells, these nano-liposomes can be suggested to further research in the field of oral and dental health.

KEYWORDS

Nano-Liposome, *Syzygium aromaticum*(Clove), Dental, Thin layer method, Heat method.

نشریه علمی

زیست‌شناسی جانوری تجربی

«مقاله پژوهشی»

بررسی عملکرد فرمولاسیون‌های لیپوزومی حاوی اسانس میخک ساخته‌شده به روش لایه نازک و گرمایی در شرایط دمایی و pH مشابه دهان به منظور کاربرد در تحقیقات بیماریهای دهان و دندان

مریم زارع‌زاده مهریزی^۱، محمد مجدی‌زاده^۲، محبوبه زارع‌زاده مهریزی^۱، علیرضا افشون^۳، مهتاب ژیان مهریزی^۳، بی‌بی فاطمه حقیرالسادات^{۴*}

چکیده

با توجه به مشکلات استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری‌ها از جمله فراربت و اثرگذاری غیر هدفمند و نقش فناوری نانو در کاهش این چالش‌ها، پژوهش حاضر با هدف دستیابی به فرمولاسیون نانویی حاوی اسانس میخک به منظور استفاده در تحقیقات دندانپزشکی انجام شد. چهار فرمولاسیون لیپوزومی حاوی اسانس میخک با استفاده از فسفاتیدیل کولین و کلسترول به روش لایه نازک و گرمایی به صورت جداگانه تهیه شد. بازده بارگذاری، اندازه، شاخص پراکندگی و پتانسیل زتا نانوذرت (با استفاده از زتا سایزر) سنجیده شد. در هر کدام از روش‌های ساخت، فرمولاسیونی که شاخصه‌های فیزیکوشیمیایی مناسبی داشت به منظور بررسی الگوی رهایش اسانس و شکل ظاهری نانوذرات (با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی)، انتخاب گردید. همچنین سمیت نانولیپوزوم‌های حاصل از فرمولاسیون‌های منتخب، به روش MTT بر رده سلولی فیبروبلاست انسانی (HFF) سنجیده شد. بازده بارگذاری، اندازه ذرات و پتانسیل زتا برای فرمولاسیون منتخب حاصل از روش لایه نازک به ترتیب ۵۰/۵۷٪، ۱۲۳/۳nm و ۱۸/۶mV- بود و برای روش گرمایی به ترتیب ۵۵/۴۳٪، ۱۲۱/۴nm و ۱۹/۲mV- بود. رهایش اسانس از فرمولاسیون‌های منتخب آهسته و پیوسته و وابسته به pH بود. نانولیپوزوم‌های ساخته شده به روش گرمایی نسبت به روش لایه نازک سمیت کمتری برای رده سلولی HFF ایجاد نمودند. با توجه ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مناسب نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس میخک و سمیت بسیار کم نانولیپوزوم‌های ساخته شده به روش گرمایی برای سلول‌های سالم HFF، می‌توان این نانو لیپوزوم‌ها را برای انجام تحقیقات بیشتر در حوزه بهداشت دهان و دندان پیشنهاد نمود.

واژه‌های کلیدی

نانو لیپوزوم، میخک، دندانپزشکی، روش لایه نازک، روش گرمایی.

^۱دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.
^۲گروه زیست‌فناوری، شرکت دانش‌بنیان ریز زیست‌فناوران فردانگر، پارک علم و فناوری، یزد، ایران.
^۳گروه علوم و فنون نوین پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی یزد، ایران.
^۴گروه علوم و فنون نوین پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی یزد، ایران.
^۵مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، پژوهشکده علوم تولیدمثل، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، ایران.

نویسنده مسئول:

بی‌بی فاطمه حقیرالسادات

رایانامه: Fhaghirosadat@gmail.com

استناد به این مقاله:

زارع‌زاده مهریزی، مریم، مجدی‌زاده، محمد، زارع‌زاده مهریزی، محبوبه، افشون، علیرضا، ژیان مهریزی، مهتاب و حقیرالسادات، بی‌بی فاطمه (۱۴۰۲). بررسی عملکرد فرمولاسیون‌های لیپوزومی حاوی اسانس میخک ساخته شده به روش لایه نازک و گرمایی در شرایط دمایی و pH مشابه دهان به منظور کاربرد در تحقیقات بیماریهای دهان و دندان. فصلنامه زیست‌شناسی جانوری تجربی، ۱۲ (۴۶) ۱۵-۲۶.

مقدمه

بیماری‌های دهان و دندان یکی از چالش‌های نظام سلامت در جهان است که علاوه بر مشکلات جسمی به سبب درمان‌های پر هزینه بار اقتصادی زیادی را بر دوش دولت‌ها و مردم می‌گذارد (Peres *et al.*, 2019). پوسیدگی دندان و بیماری‌های پرودنتال از رایج‌ترین بیماری‌های این بخش از بدن است که معمولاً برای درمان آن از آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شود (Taghian *et al.*, 2011; Amoian *et al.*, 2019). در سالیان اخیر به سبب مصرف بی‌رویه و غیرمنطقی از آنتی‌بیوتیک‌ها و از سوی دیگر دسترسی آسان مردم به آنها مقاومت عوامل عفونی به ویژه باکتری‌ها ترکیبات پادزیست (Antibiotic) رشد قابل توجهی داشته است (Hiwandika *et al.*, 2021). لذا استفاده از ترکیبات طبیعی مانند ترکیبات گیاهی به جای آنتی‌بیوتیک‌های رایج امری ضروری است (Hiwandika *et al.*, 2021). امروزه میزان مراجعه به گیاهان دارویی افزایش یافته است به گونه‌ای که در حال حاضر، حدود ۸۰ درصد از ساکنان جهان به داروهای سنتی به عنوان شکل اصلی مراقبت‌های بهداشتی اولیه خود متکی هستند (Bernela *et al.*, 2023; El-Saber *et al.*, 2020). تحقیقات نشان می‌دهد که گیاهان دارویی دارای ترکیبات زیست‌فعال متنوعی هستند که می‌تواند نقش حیاتی در مبارزه با میکروبه‌ها و حتی تومورها داشته باشد (Majdizadeh *et al.*, 2021; Vaou *et al.*, 2018). گیاه میخک با نام علمی *Syzygium aromaticum*، متعلق به خانواده *Myrtaceae* است که از گذشته دور تا به امروز در درمان بیماری‌های مختلف استفاده می‌شود. از این گیاه معطر در طب سنتی به منظور درمان سوختگی و زخم مسکن مراقبت‌های دهان و دندان و غیره و در صنعت به منظور تولید عطر و صابون استفاده می‌شود (El-Saber *et al.*, 2020). گیاه میخک دارای ترکیبات فنولی نظیر اوژنول، اسیدهای بنزوئیک، فلاونوئیدها، مشتقات گالیک اسید، سالیسیلیک اسید و کوئرستین است که می‌تواند نقش این گیاه را در درمان بسیاری از بیماری‌ها برجسته نماید (El-Saber *et al.*, 2020). همچنین اسانس حاصل از این گیاه با برخورداری از ترکیبات زیست‌فعال نظیر اوژنول، بتا کاربوفیلین و آلفا هومولن است دارای اثرات ضد ویروسی و ضد قارچی قابل قبولی است (El-Saber *et al.*, 2020). پژوهش‌ها نشان می‌دهد که اسانس میخک دارای اثرات ضد ویروس هپاتیت C و هرپس سیمپلکس است (El-Saber *et al.*, 2020) و می‌تواند رشد باکتری‌هایی

مانند ای‌کلای، استافیلوکوکوس اورئوس و استرپتوکوکوس موتانس را به صورت قابل توجهی کاهش دهد (Ramadhani *et al.*, 2020; Sukohar *et al.*, 2022; El-Saber *et al.*, 2020). به عنوان مثال، Sukohar و همکاران در ۲۰۲۲ گزارش نمودند که اسانس استخراج شده از برگ گیاه میخک می‌تواند رشد باکتری استرپتوکوکوس موتانس و قارچ کاندیدا آلبیکنز را بصورت موثری کاهش دهد (Sukohar *et al.*, 2022). همچنین زاده و نورافکن در ۲۰۲۰، گزارش نمودند که اسانس میخک دارای اثرات ضد میکروبی بر باکتری‌هایی نظیر استافیلوکوکوس اورئوس و استرپتوکوکوس موتانس است (Dadazadeh & Nourafcan, 2022). استفاده از اسانس‌های گیاهی همواره با چالش‌های فراوانی از جمله فراربت و اکسیدپذیری بالا همراه است، بنابراین استفاده از روش‌های جدید به منظور رسانش این ترکیبات به موضع هدف ضروری است.

یکی از روش‌های کاهش مشکلات پیش روی رسانش ترکیبات گیاهی، کپسوله کردن است (Yang *et al.*, 2020). در واقع کپسوله کردن ترکیبات گیاهی می‌تواند با افزایش فراهمی زیستی، رهايش کنترل شده و حتی در مواردی با کاهش سمیت، باعث بهبود کیفیت رسانش ترکیبات گیاهی شود (Mudalip *et al.*, 2020; Sugiharto & Ayasan, 2023; Yang *et al.*, 2021). یکی از ترکیباتی که امروزه به منظور کپسوله سازی ترکیبات از جمله ترکیبات گیاهی استفاده میشود، لیپوزوم است. لیپوزوم‌ها ذرات کلوئیدی با دو یا چند لایه غشای فسفولیپیدی هستند که به دلیل اهمیت بالای آنها به عنوان حامل دارو در سیستم‌های نوین دارورسانی، امکان مهندسی طیف وسیعی از آنها با اندازه‌ها، ترکیبات فسفولیپیدی و ویژگی‌های سطح متفاوت، ایجاد شده است. این وزیکول‌ها از مولکول‌های لیپیدی خودآرایی تشکیل شده‌اند که بخشی از فاز آبی که در آن پراکنده شده‌اند را در بر می‌گیرند. لیپوزوم‌ها با داشتن قسمت‌های آب دوست و آبگریز توانایی حمل و تحویل انواع داروهای آب دوست و آبگریز را دارند. زیست سازگار، زیست تخریب پذیر و غیر سمی بودن از جمله ویژگی‌هایی است که لیپوزوم را به یک سیستم محبوب در دارورسانی تبدیل کرده است (Maja *et al.*, 2020; Filipczak *et al.*, 2018). هرچند قبل از پژوهش حاضر، در پژوهش‌های دیگر سامانه لیپوزومی حاوی اسانس میخک تولید شده و در اثرات ضد میکروبی و لاروکشی آن سنجیده شده است، ولی تولید این نانو لیپوزوم با هدف کاربرد در دهان (مطابق با دما و اسیدیته دهان) و مقایسه ویژگی‌های

تعیین حداکثر طول موج جذب و رسم نمودار استاندارد

اسانس میخک در ایزوپروپیل و بافر فسفات سالین^۱

برای تعیین حداکثر طول موج جذب اسانس میخک و رسم نمودار استاندارد از اسپکتروفتومتری استفاده شد. در این روش محلول استوک اسانس با غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر در PBS (شرکت مرک آلمان) و ایزوپروپیل (شرکت مرک آلمان) تهیه شد. سپس با استفاده از محلول استوک، غلظت‌های مختلف اسانس در حلال‌های PBS و ایزوپروپیل تهیه گردید. پس از آن، طیف جذب توسط اسپکتروفتومتر (Epoch, ایالات متحده آمریکا) در محدوده ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر برای تمام غلظت‌ها خوانده شد. طول موجی که در آن حداکثر جذب در تمام غلظت‌ها اتفاق افتاد به عنوان حداکثر طول موج جذب (طول موج ماکزیمم) در نظر گرفته شد. سپس با استفاده از طیف جذب به‌دست‌آمده از غلظت‌های مختلف در حداکثر طول موج جذب، منحنی اسانس اسانس در بافر PBS و ایزوپروپیل ترسیم شد و معادله نرمال شده خط در PBS و ایزوپروپیل با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد. آزمایشات در این مرحله سه بار تکرار شد (Taebpour et al., 2022).

ساخت لیپوزوم‌های حاوی اسانس میخک

در این پژوهش لیپوزوم‌های حاوی اسانس به دو روش لایه نازک و گرمایی (مظفری) با استفاده از کلسترول (شرکت سیگما آلدریج ایالات متحده آمریکا) و فسفاتیدیل کولین سویا (SPC) (شرکت سیگما آلدریج ایالات متحده آمریکا) با نسبت‌های مولی جدول ۱ تهیه شدند که خلاصه آن به شرح زیر است:

(الف) روش لایه نازک: ابتدا فسفاتیدیل کولین سویا، کلسترول و اسانس میخک در حلال کلروفرم (شرکت مرک آلمان) و در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد بر روی روتاری (هایدولف، آلمان) حل شده و تحت شرایط خلأ، فیلم نازک خشک تهیه گردید. سپس عمل هیدراته کردن با افزودن آب مقطر استریل طی مدت یک ساعت و در دمای ۵۵ °C انجام گردید. سپس نانوذرات تهیه شده، با استفاده از سونیکیت حمامی برای مدت ۴۰ دقیقه کاهش سایز داده شد.

(ب) روش گرمایی (مظفری)، ابتدا فسفولیپید SPC و کلسترول با ۵۰ میلی‌لیتر از بافر فسفات به صورت جداگانه با استفاده از شیکرانکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، هیدراته شد. کلسترول در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد و زیر همزدن به طور کامل ذوب گردید. اسانس با فسفولیپید و کلسترول هیدراته

فیزیکوشیمیایی آنها با توجه به روش تولیدشان از جمله نوآوری‌ها پژوهش حاضر است. بنابراین با توجه به اهمیت بالای بیماری‌های ناحیه دهان و دندان، افزایش مقاومت دارویی عوامل میکروبی، نقش اهمیت ترکیبات گیاه میخک در مبارزه با بیماری‌های دهان و دندان و نقش پررنگ نانولیپوزوم‌ها به عنوان عامل کپسوله سازی در بهبود کیفیت رسانش داروها به مواضع هدف، هدف از پژوهش حاضر استفاده از روش‌های لایه نازک و گرمایی (مظفری) به منظور دستیابی به فرمولاسیون مناسب نانو لیپوزومی حاوی اسانس میخک با بازده بالا در شرایط دمایی و اسیدیته مشابه دهان و سنجش سمیت آن بر رده سلولی سالم HFF است.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی مورد استفاده

فسفاتیدیل کولین، کلسترول، دی متیل سولفاکسید (DMSO) و tetrazolium bromide (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl and MTT) متعلق به شرکت سیگما آلدریج ایالات متحده آمریکا، کلروفرم، بافر فسفات سالین و ایزوپروپیل متعلق به شرکت مرک آلمان و رده سلولی HFF از انستیتو پاستور ایران خریداری شد.

اسانس‌گیری

ابتدا جوانه‌های میخک از بازار گیاهان دارویی تهران تهیه و در محیطی گرم، خشک و دور از نور خورشید قرار داده شد. سپس جوانه‌های خشک شده را پودر نموده و با استفاده از دستگاه کلونجر و به روش تقطیر با آب، عمل اسانس‌گیری انجام شد. برای این منظور بخش‌های خشک شده گیاه را نرم نموده و در هر نوبت حدود ۲۵ گرم از آن را به همراه ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر، وارد بالن ۵۰۰ میلی‌لیتر نموده و بالن محتوی آب و اجزای خشک گیاه را، به دستگاه کلونجر متصل می‌کنیم. بالن متصل به دستگاه کلونجر را درون Heater (هیتر) قرار داده تا اسانس از اجزای گیاه خارج شده و به همراه آب تبخیر گردد. عمل اسانس‌گیری به مدت ۳ ساعت به طول انجامید و در پایان، اسانس تولید شده، از دستگاه کلونجر خارج و درون میکروتیوب جای داده شد و تا انجام مراحل بعدی در یخچال نگهداری شد (Majdizadeh et al., 2018).

۲۵ درجه سانتی‌گراد، زاویه ۹۰ درجه و در طول موج ۶۵۷ نانومتر استفاده شد.

انتخاب فرمولاسیون مناسب جهت انجام آزمایشات بعدی از بین ۴ فرمولاسیون اولیه ساخته شده به روش لایه نازک و از بین ۴ فرمولاسیون تهیه شده به روش گرمایی (مظفری)، بصورت جداگانه فرمولاسیونی که اندازه ذرات، شاخص پراکندگی، پتانسیل زتا و بازده بارگذاری اسانس مناسب‌تری داشت و با در نظر گرفتن درصد کلسترول موجود در ساختار آن (با توجه به نقش کلسترول در پایداری نانو لیپوزوم)، به منظور انجام سایر مراحل پژوهش (آزمایش‌های بعدی) انتخاب شد.

بررسی الگوی رهائش اسانس از نانو لیپوزوم‌های حاصل از فرمولاسیون منتخب

به منظور بررسی نحوه رهائش اسانس از فرمولاسیون‌های منتخب، از روش کیسه دیالیز استفاده شد. در این روش به منظور نزدیک شدن به شرایط درون تنی از بافر فسفات سالین استفاده شد. در این روش ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر از نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس درون کیسه دیالیز ریخته شد و در آن بسته شد. کیسه دیالیز به فالكون استریل حاوی بافر فسفات سالین با شرایط دمایی و اسیدیته مشابه حفره دهان (۳۷ درجه سانتی‌گراد= دما و pH=۷) منتقل شد و استیرر گردید. سپس در فواصل زمانی ۰/۵، ۱، ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۲۴ ساعت، با برداشت از بافر فسفات سالین داخل فالكون، میزان جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر، بررسی شد. در پایان با استفاده از نمودار استاندارد اسانس میخک در بافر فسفات سالین، میزان رهائش سنجیده شده و نمودار رهائش اسانس طی ۲۴ ساعت رسم گردید. همچنین به منظور بررسی چگونگی رهائش اسانس در اسیدیته‌های دیگر (با توجه به امکان تغییر pH دهان تحت تاثیر مواد غذایی یا ترشحات عوامل میکروبی)، رهائش اسانس از نانولیپوزوم‌ها در pH=۶ و pH=۵ نیز ارزیابی شد. تمامی آزمایش‌های این مرحله به صورت ۳ بار تکرار می‌باشد (Shahi et al., 2019; Mirzaei et al., 2021).

بررسی شکل ظاهری نانو لیپوزوم‌های حاوی اسانس حاصل از فرمولاسیون منتخب

در پژوهش حاضر به منظور بررسی صحت تشکیل نانولیپوزوم و بررسی شکل ظاهری آنها از میکروسکوپ الکترونی روبشی (EM 3200, KYKY Technology Development Ltd,)

شده، در بشر مقاوم به حرارت ریخته و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد با دور rpm ۱۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه همزده شد. فرمولاسیون تولید شده به منظور پایداری، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و بعد در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه داری شد (Tizchang et al., 2013; Ziaee et al., 2015; Mozafari et al., 2005).

در پایان به منظور همگن شدن، لیپوزوم‌های تولید شده در هر دو روش، از فیلتر ۰/۴ میکرومتر و ۰/۲ میکرومتر عبور داده شد.

جدول ۱. درصد مولی ترکیبات به کار رفته در فرمولاسیون‌های

مختلف برای ساخت نانو لیپوزوم‌های حاوی اسانس میخک

نسبت لیپید به دارو	کلسترول %	فسفاتیدیل کولین %	نام فرمولاسیون
۱۰	۵	۹۵	F1
۱۰	۱۰	۹۰	F2
۱۰	۱۵	۸۵	F3
۱۰	۲۰	۸۰	F4

محاسبه بازده بارگذاری اسانس در نانو لیپوزوم‌های حاوی اسانس

به منظور محاسبه میزان بارگذاری اسانس درون نانو لیپوزوم‌ها ابتدا به نانو لیپوزوم‌ها به مدت یک ساعت درون بشری با ۴۵۰ سی سی آب مقطر و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا اسانس آزاد و بارگذاری نشده حذف گردد. سپس لیپوزوم‌های ساخته شده را با نسبت ۱ به ۲۰ با ایزوپروپیل مخلوط کرده تا دیواره لیپیدی اطراف اسانس شکسته شود و اسانس آزاد گردد. در مرحله‌ی بعد میزان جذب اسانس بارگذاری شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ماکزیمم اسانس میخک محاسبه شد. در پایان با استفاده از نمودار استاندارد اسانس میخک در ایزوپروپیل، و رابطه‌ی (۱)، درصد بارگذاری اسانس در لیپوزوم محاسبه گردید. تمامی آزمایش‌های این مرحله به صورت ۳ بار تکرار می‌باشد (Majdizadeh et al., 2018).

$$\text{رابطه ۱)} \quad \text{مقدار اسانس محصور شده} \times 100 = \frac{\text{مقدار اسانس اولیه}}{\text{راندمان بارگذاری میخک}}$$

بررسی اندازه ذرات، شاخص پراکندگی ذرات و

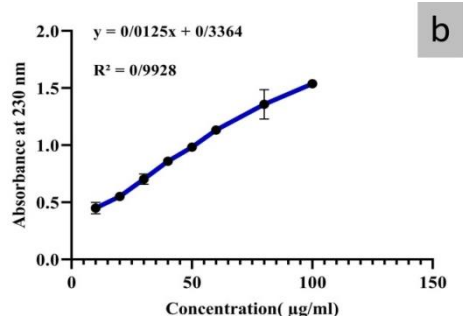
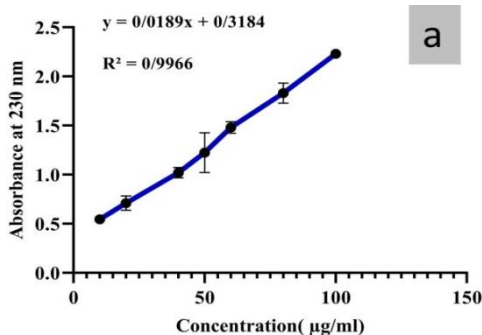
پتانسیل زتای نانو لیپوزوم‌ها حاوی اسانس

به منظور اندازه‌گیری اندازه، شاخص پراکندگی و پتانسیل زتا نانو لیپوزوم‌ها از دستگاه تفرق دینامیکی نور (مدل Horiba) در دمای

نتایج

بازده بارگذاری اسانس

نتایج حاصل از دستگاه اسپکتروفتومتر نشان داد که طول موج ماکزیمم برای اسانس میخک در بازه ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر، ۲۳۰ نانومتر بود. نمودارهای استاندارد اسانس میخک در شکل ۱ نشان داده شده است. بر اساس شکل a۱، نمودار استاندارد اسانس میخک در حلال ایزوپروپیل دارای معادله خط $Y = 0.0189X + 0.3184$ و ضریب رگرسیون $R^2 = 0.9966$ است. همچنین نمودار استاندارد اسانس میخک در حلال فسفات سالیین در شکل b۱ نشان داده شده است که دارای معادله خط $Y = 0.0125X + 0.3364$ و ضریب رگرسیون $R^2 = 0.9928$ است با استاندارد نمودار استاندارد اسانس میخک در ایزوپروپیل میزان بارگذاری اسانس در فرمولاسیون‌های مختلف تهیه شده با روش لایه نازک و گرمایی محاسبه و در جدول ۲ و ۳ گزارش گردید.



شکل ۱. نمودار استاندارد اسانس میخک.

(a) در حلال ایزوپروپیل، (b) در حلال فسفات سالیین

بر اساس جدول ۲، نانو لیپوزوم‌های حاصل از روش لایه نازک در فرمولاسیون F1 دارای بیشترین بازده بارگذاری اسانس و در فرمولاسیون F4 دارای کمترین بازده بارگذاری اسانس بود. همچنین اختلاف بین بیشترین میزان بارگذاری اسانس و کمترین میزان بارگذاری اسانس ۶/۵۱ درصد بود. بر اساس جدول ۳، نانو لیپوزوم‌های

(Beijing, China) استفاده شد. برای این منظور از نمونه با غلظت ۱ mg/ml /۰ یک قطره روی لام ریخته و زمان داده شد تا خشک شود. اپراتور دستگاه روی نمونه را پوشش طلا داده و تصویر تهیه نمونه تهیه گردید.

کشت سلول و بررسی سمیت نانو لیپوزوم‌های حاوی

اسانس حاصل از فرمولاسیون منتخب به روش MTT

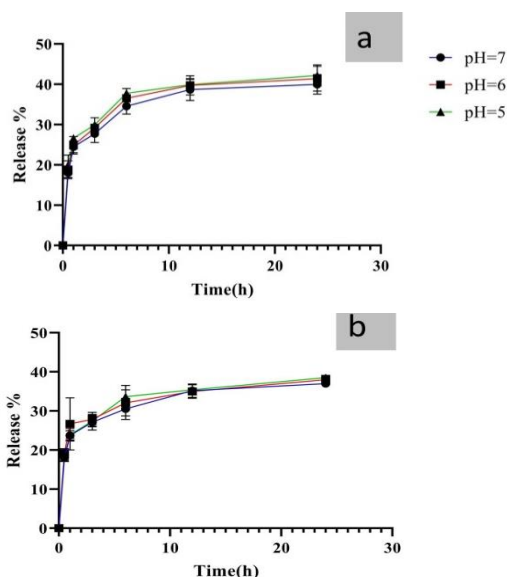
یکی از شرایط مهم و اصلی در استفاده از نانوحامل‌ها برخورداری از عدم سمیت یا داشتن حداقل سمیت برای سلول‌های سالم و نرمال است. با توجه به اینکه هدف نهایی از نانوحامل‌های طراحی شده در پژوهش حاضر، استفاده در تحقیقات بهداشت دهان و دندان است، و از آنجا که این نانو حامل ممکن است در مجاورت سلول‌های سالم حفره دهانی قرار گیرد، در این مرحله از آزمایش سمیت نانوحامل‌های حاوی اسانس میخک بر رده سلولی نرمال HFF به روش MTT سنجیده شد. ابتدا رده سلولی سالم HFF از انستیتو پاستور ایران تهیه و در فلاسک‌های استریل با محیط DMEM حاوی ۱۰٪ FBS به همراه آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین و استرپتومایسین در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵٪ دی اکسید کربن کشت شد. سپس به منظور انجام تست MTT، ابتدا سلول‌های HFF، با غلظت 10^4 در هر چاهک، در پلیتهای ۹۶ خانه ای برای ۴۸ ساعت کشت داده شد. در مرحله بعد سلول‌های HFF، با غلظتهای ۶/۲۵، ۱۲، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانو لیپوزوم‌های حاوی اسانس برای ۲۴ ساعت تیمار شد. پس از گذشت زمان تیمار، ۲۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. بعد از آن مایع رویی خارج شد و به منظور حل شدن کریستال‌های فورمازون، ۱۵۰ میکرولیتر DMSO اضافه گردید. جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از توسط دستگاه الایزا ریدر ثبت و در نهایت با توجه به رابطه ۲ درصد زنده‌مانی سلول‌ها محاسبه شد (Taebpour *et al.*, 2021).

نرم افزارهای آماری مورد استفاده

در این پژوهش از نرم افزار آماری اکسل (Excel) ۲۰۱۰ به منظور محاسبه میانگین و انحراف معیار و از نرم افزار گراف پد پریسم (GraphPad Prism) برای رسم نمودارها و محاسبه معناداری داده‌ها (آزمون آنوا دوطرفه) استفاده شد.

رهایش اسانس از فرمولاسیون‌های منتخب (فرمولاسیون F2، در روش لایه نازک و گرمایی)

با استناد به نمودار استاندارد اسانس در فسفات سالین، میزان رهایش اسانس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و $\text{pH}=7$ (مشابه شرایط دمایی و اسیدیته حفره دهان)، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و $\text{pH}=6$ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و $\text{pH}=5$ ارزیابی و نمودار رهایش هر کدام از فرمولاسیون‌های منتخب (F2) در شرایط ذکر شده رسم گردید (نمودار ۱). با استناد به نمودار ۱، رهایش اسانس از نانو لیپوزم‌های حاصل از فرمولاسیون منتخب (F2) در هر دو روش لایه نازک و گرمایی، آهسته و پیوسته بوده است. در چند ساعت ابتدایی، رهایش اسانس از نانو لیپوزوم‌ها انفجاری بوده و سپس از شیب نمودار رهایش کاسته شده است. همچنین میزان رهایش اسانس از لیپوزوم‌های حاصل از هر دو روش ساخت، با کاهش pH افزایش یافته است، به گونه‌ای که کمترین میزان رهایش طی ۲۴ ساعت مربوط به $\text{pH}=7$ و بیشترین رهایش اسانس مربوط به $\text{pH}=5$ می‌باشد. بیشترین میزان رهایش اسانس طی ۲۴ ساعت، برای نانو لیپوزوم‌های حاصل از فرمولاسیون F2 که به روش لایه نازک تهیه شده بودند، $42/2 \pm 2/64$ درصد در $\text{pH}=5$ و برای نانو لیپوزوم‌های حاصل از فرمولاسیون F2 که به روش گرمایی تهیه شده بودند، $38/52 \pm 0/76$ درصد در $\text{pH}=5$ می‌باشد.



نمودار ۱. الگوی رهایش اسانس میخک از نانو لیپوزوم‌های

فرمولاسیون منتخب (F2)، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و $\text{pH}=7$ ، $\text{pH}=6$ و $\text{pH}=5$.

(a) نانو لیپوزوم‌های ساخته شده به روش لایه نازک،
(b) نانو لیپوزوم‌های ساخته شده به روش گرمایی

حاصل از روش لایه نازک در فرمولاسیون F1 دارای بیشترین بازده بارگذاری اسانس و در فرمولاسیون F4 دارای کمترین بازده بارگذاری اسانس بود. همچنین اختلاف بین بیشترین میزان بارگذاری اسانس و کمترین میزان بارگذاری اسانس ۱۰/۵۹ درصد بود.

جدول ۲. بازده بارگذاری اسانس، اندازه ذرات، شاخص پراکندگی و

پتانسیل زتا فرمولاسیون‌های حاصل از روش لایه نازک

پتانسیل زتا (mV)	شاخص پراکندگی	اندازه ذرات (nm)	بازده بارگذاری %	نام فرمولاسیون
-۱۸/۳	۰/۱۳	۱۲۲/۸	۵۱/۷۴±۳/۲۱	F1
-۱۸/۶	۰/۱۳۸	۱۲۳/۳	۵۰/۵۷±۲/۴۳	F2
-۱۷/۲	۰/۱۴۱	۱۲۴/۹	۴۷/۱۱۲±۳/۹۳	F3
-۱۶/۴	۰/۲۱	۱۲۶	۴۵/۲۳±۳/۶۷	F4

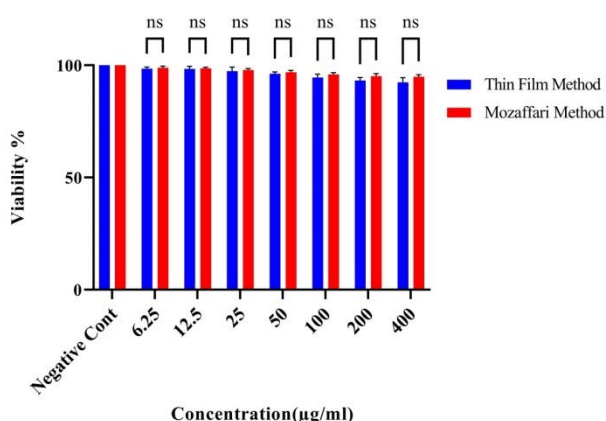
جدول ۳. بازده بارگذاری اسانس، اندازه ذرات، شاخص پراکندگی و

پتانسیل زتا فرمولاسیون‌های حاصل از روش گرمایی

پتانسیل زتا (mV)	شاخص پراکندگی	اندازه ذرات (nm)	بازده بارگذاری %	نام فرمولاسیون
-۲۰/۲	۰/۱۳۹	۱۱۹/۷	۵۸/۹۸±۲/۰۱	F1
-۱۹/۲	۰/۱۴	۱۲۱/۴	۵۵/۴۳±۱/۶۱	F2
-۱۸/۵	۰/۱۴۳	۱۲۳/۶	۵۲/۰۵±۱/۰۸	F3
-۱۸/۱	۰/۱۸	۱۲۵/۸	۵۰/۱۳±۱/۸	F4

اندازه، شاخص پراکندگی و پتانسیل زتا نانو لیپوزوم‌ها و انتخاب فرمولاسیون مناسب

اندازه، شاخص پراکندگی و پتانسیل زتا نانو لیپوزوم‌های حاصل از فرمولاسیون‌های مختلف آماده شده به روش لایه نازک و گرمایی در جدول ۲ و ۳ گزارش شده است. مطابق جدول ۲ و ۳، فرمولاسیون F1 در روش لایه نازک و روش گرمایی دارای منفی‌ترین میزان پتانسیل زتا و کم‌ترین شاخص پراکندگی و اندازه ذرات بوده و فرمولاسیون F4 در هر دو روش ساخت، بیش‌ترین میزان اندازه و شاخص پراکندگی و مثبت‌ترین میزان پتانسیل زتا بوده است. همچنین نانو لیپوزوم‌های حاصل از روش گرمایی نسبت به لایه نازک در در تمامی فرمولاسیون‌ها از اندازه ذرات و شاخص پراکندگی پائین‌تر و پتانسیل زتا منفی‌تری برخوردار بودند. با توجه به نتایج گزارش شده در جدول ۲ و ۳ و مقایسه بازده بارگذاری اسانس، اندازه، شاخص پراکندگی و پتانسیل زتا و با در نظر گرفتن تاثیر حضور کلسترول در افزایش پایداری نانو لیپوزوم‌ها، فرمولاسیون F2 جهت انجام مراحل بعدی پژوهش در هر دو روش ساخت انتخاب گردید.



نمودار ۲. مقایسه سمیت نانو لیپوزوم‌های ساخته شده به روش لایه نازک و گرمایی بر رده سلولی HFF (عدم معناداری=ns)

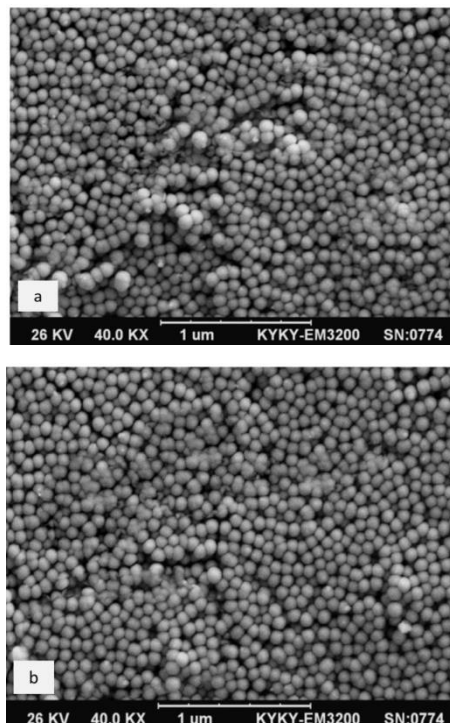
بحث و نتیجه‌گیری

فناوری نانو پتانسیل بالایی در ایجاد سامانه‌هایی برای رسانش دارو به سلول‌های هدف دارد و در سالیان اخیر به منظور غلبه بر مشکلات پیش روی رسانش دارو به شکل گسترده مورد استفاده قرار گرفته است (Suri et al., 2007). پژوهش حاضر منتهی به ساخت فرمولایون نانو لیپوزومی حاوی اسانس میخک شد که ضمن داشتن ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مناسب، از بازده عملکردی بالایی در دما و اسیدیته مشابه دهان در شرایط آزمایشگاهی برخوردار بود.

یکی از ویژگی‌های نانو حامل‌ها که در پژوهش ما بررسی شد، بازده بارگذاری اسانس می‌باشد که به عوامل مختلفی مانند نوع و ماهیت ماده بارگذاری شده، ترکیبات به کار رفته در ساخت سامانه لیپوزومی و روش ساخت نانو لیپوزوم وابسته است (Mirzaei et al., 2021). در پژوهش حاضر با توجه به ثابت بودن نوع ترکیبات استفاده شده در ساختار نانو لیپوزوم و ماهیت ماده بارگذاری شده در تمامی فرمولاسیون‌ها، به نظر می‌رسد که میزان بارگذاری اسانس در سامانه‌های لیپوزومی صرفاً تحت تاثیر درصد ترکیبات سازنده لیپوزوم و روش ساخت باشد. به گونه‌ای که با کاهش میزان کلسترول در ساختار لیپوزوم، میزان بارگذاری اسانس افزایش یافته است. این پدیده با توجه به موقعیت قرار گیری اسانس و کلسترول در ساختمان لیپوزوم قابل توجیه است. اسانس به دلیل ماهیت آبگریز معمولاً در بین دو لایه فسفولیپیدی سامانه لیپوزومی و در مجاورت دم‌های آبگریز قرار می‌گیرد. از سوی دیگر، کلسترول نیز در ساختار سامانه‌های غشایی معمولاً در مجاورت دم‌های آبگریز فسفولیپیدها قرار می‌گیرد که باعث اشغال فضای قرار گیری اسانس شده و در نتیجه منجر به کاهش بازده بارگذاری می‌گردد (Abdelbary & El-Gendy,

بررسی شکل ظاهری نانو لیپوزوم‌ها حاصل از فرمولاسیون منتخب (F2)

نتایج تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان می‌دهد که نانو لیپوزوم‌های تولید شده در هر دو روش دارای سطحی صاف و ظاهری کروی بوده‌اند. همچنین در تصویر میکروسکوپ الکترونی عدم آگلومره شدن و تجمع غیر معمول نانو لیپوزوم‌های تولید شده با هر دو روش قابل مشاهده است (شکل ۲).



شکل ۲. تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از نانو لیپوزوم‌ها ساخته شده به روش لایه نازک و گرمایی. (a) تصویر نانو لیپوزوم‌های حاصل از روش لایه نازک، (b) تصویر نانو لیپوزوم‌های روش گرمایی

سمیت سامانه‌های منتخب (F2)

نتایج سمیت نانو لیپوزوم‌های حاوی اسانس میخک بر رده سلولی HFF نشان داد که نانو لیپوزوم‌های حاصل از هر دو روش سمیت بسیار کمی را برای رده سلولی HFF کرده‌اند. مطابق نمودار ۲، در تمامی غلظت‌ها، سمیت لیپوزوم‌های ساخته شده به روش گرمایی کمتر از روش لایه نازک بود که این تفاوت، در غلظت‌های بیشتر از ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشهودتر بود. همچنین نتایج سمیت نشان داد که نانو لیپوزوم‌های حاصل از هر دو روش سمیت وابسته به غلظت داشته‌اند به گونه‌ای که بیشترین سمیت مربوط به غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

(Malay, 2022)، به نظر می‌رسد که لیپوزوم‌های پژوهش حاضر با توجه به نزدیک بودن پتانسیل زتای آنها به عدد ۳۰- میلی‌ولت از پایداری نسبتاً قابل قبولی برخوردار باشند، هرچند این ادعا نیازمند تحقیقات بیش‌تر است. (Bahrani-Banan et al., 2019)، (Moosavizadeh et al., 2019)، (Sasani et al., 2020) و (Parnian et al., 2020)، هر کدام در پژوهش‌های خود برای سامانه‌های لیپیدی حاوی دارو، پتانسیل زتای منفی را گزارش نموده‌اند که با نتایج پژوهش حاضر همسو می‌باشد. همچنین با توجه به اینکه نانو لیپوزوم‌های با اندازه بین ۵۰ تا ۲۰۰ نانومتر برای دارورسانی مناسب هستند (Andra et al., 2022)، به نظر می‌رسد اندازه ذرات لیپوزوم در تمامی فرمولاسیون‌ها برای دارورسانی (اسانس) مناسب باشد. بررسی سمیت نانو لیپوزوم‌های حاوی اسانس حاصل از فرمولاسیون‌های منتخب نشان داد که نانو لیپوزوم‌های تولید شده با هر دو روش گرمایی و لایه نازک در تمامی غلظت‌ها از سمیت کمی بر رده سلولی HFF برخوردار می‌باشد. نتایج پژوهش حاضر با نتایج Siyatpanah et al. (2023) و نتایج Taebpour et al. (2021) همسو می‌باشد. همچنین تست سمیت نشان داد که نانو لیپوزوم‌های تولید شده به روش گرمایی نسبت به لایه نازک از سمیت پائین‌تری بر رده سلولی HFF برخوردار بودند. این نتیجه با توجه به اینکه در روش گرمایی بر خلاف روش لایه نازک از هیچ حلال آلی استفاده نمی‌شود قابل توجیه است (Maleki et al., 2023). پژوهش ما مانند بسیاری از پژوهش‌ها دارای کاستیهایی است. بررسی رهایش اسانس در دماهای بیش‌تر، افزایش ساعات بررسی رهایش، بررسی اثر سامانه بر میکرو ارگانیزم‌های حفره دهان در شرایط آزمایشگاهی و بررسی برهمکنش اسانس و سامانه لیپوزومی از جمله کاستی‌های پژوهش حاضر است که بر طرف نمودن و انجام آنها را به پژوهشگران بعدی پیشنهاد می‌شود.

پژوهش‌های فراوانی وجود ترکیبات شیمیایی با اثر گذاری بالا در توقف رشد میکرو ارگانیزم‌ها را در گیاه میخک اثبات نموده‌اند، ولی استفاده از ترکیبات گیاهی با چالش‌هایی روبرو است که به نظر می‌رسد فناوری نانو در بر طرف نمودن آنها موفق بوده است. پژوهش حاضر منجر به دستیابی به فرمولاسیون نانو لیپوزومی حساس به pH حاوی اسانس میخک شد که دارای پتانسیل بالا در شرایط دمایی و اسیدیته مشابه حفره دهان است. با توجه به نتایج پژوهش حاضر میتوان فرمولاسیون منتخب (F2) حاصل از روش گرمایی را جهت انجام تحقیقات بیش‌تر به پژوهشگران حوزه سلامت و بهداشت دهان و دندان پیشنهاد نمود.

(2008; Kulkarni et al., 1995). مطالعه‌ای در ۲۰۱۸ ضمن تهیه لیپوزوم‌های حاوی اسانس نعناع فلفلی، میزان بارگذاری اسانس را ۶۱/۳۸ درصد گزارش نمودند (Majdizadeh et al., 2018) که با نتایج پژوهش ما همسو می‌باشد. همچنین مطالعه‌ی دیگری در ۲۰۲۱ ضمن تهیه لیپوزوم‌های حاوی اسانس زنیان، میزان بارگذاری اسانس را ۴۰/۱۲ درصد گزارش نمودند (Mirzaei et al., 2021) که با نتایج پژوهش ما همسو نمی‌باشد. به نظر می‌رسد که این تفاوت در میزان بارگذاری اسانس، می‌تواند ناشی از تفاوت در میزان استفاده از کلسترول در دو پژوهش باشد. به گونه‌ای که در پژوهش یادشده، درصد استفاده از کلسترول ۳۰ می‌باشد که نسبت به فرمولاسیون منتخب در پژوهش حاضر، بیشتر بوده که باعث کاهش بازده بارگذاری اسانس در آن پژوهش نسبت به پژوهش حاضر شده است. ویژگی فیزیکوشیمیایی دیگری که در پژوهش حاضر مورد بررسی قرار گرفته و از اهمیت بالایی در رسانش دارو برخوردار است، الگو و میزان رهایش دارو می‌باشد. در پژوهش حاضر با توجه به اینکه دمای دهان حدود ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH آن حدود ۷ می‌باشد و از سوی دیگر با توجه به نقش مواد غذایی و میکروارگانیسم‌ها در تغییر اسیدیته حفره دهان، رهایش اسانس از فرمولاسیون‌های منتخب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH=۵، pH=۶، pH=۷ و بررسی شد. الگوی رهایش اسانس آهسته و پیوسته می‌باشد و با کاهش pH بر میزان رهایش افزوده شد. در ۶ ساعت اولیه پس از رهایش، شیب نمودار رهایش تند بوده ولی با افزایش زمان از شیب این نمودار و میزان رهایش اسان کاسته شد. (Shahi et al., 2018) (Sasani et al., 2019) (Karimi-Moghaddam et al., 2019) (Rabani et al., 2020)، هر کدام در پژوهش‌های خود ضمن تولید نانو لیپوزوم‌های حاوی ترکیبات گیاهی و یا غیر گیاهی، رهایش آهسته، پیوسته و وابسته به pH را برای سامانه‌های لیپوزومی گزارش نموده‌اند که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. در پژوهش حاضر پتانسیل زتا که معیاری برای سنجش بار سطحی نانوذرات لیپوزومی است، در تمامی فرمولاسیون‌ها منفی می‌باشد که با توجه به بار منفی سر فسفولیپیدها (به عنوان جزء اصلی ساختار لیپوزوم) قابل توجیه هست. میزان پتانسیل زتا تابع عوامل مختلفی از جمله ترکیبات به کار رفته در ساختمان لیپوزوم‌ها و دما است که که افزایش میزان آن، رابطه مستقیمی با پایداری و عدم تجمع لیپوزوم‌ها دارد (Taebpour et al., 2021; Bondar et al., 2011; Honary et al., 2012; Zhao et al., 2013). با توجه به اینکه نانوذرات با پتانسیل زتای منفی تر از ۳۰- و مثبت تر از ۳۰+ میلی‌ولت از پایداری بالایی برخوردار هستند (Punamjyoti &

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از تمامی کسانی که ما را در انجام این پژوهش یاری رساندند قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافی توسط نویسندگان وجود ندارد.

References

- Abdelbary, G., El-Gendy, N. (2008). Niosome-encapsulated gentamicin for ophthalmic controlled delivery. *AAPS PharmSciTech*; 9(3), 740-7. doi: 10.1208/s12249-008-9105-1. Epub 2008 Jun 18. PMID: 18563578; PMCID: PMC2977028.
- Amoabediny, G., Haghirsadat, F., Naderinezhad, S., Helder, MN., Akhoundi Kharanaghi, E., Mohammadnejad Arough, J., & Zandieh-Doulabi, B. (2018). Overview of preparation methods of polymeric and lipid-based (niosome, solid lipid, liposome) nanoparticles: A comprehensive review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*;67(6), 383-400. <https://doi.org/10.1080/00914037.2017.1332623>
- Amoian, B., Moghadamnia, A., Vadiati, B., & Mehrani, J. (2011). Local Application of Antibiotics in Periodontal Pockets. *J Babol Univ Med Sci*; 13(1), 82-89. <http://dorl.net/dor/20.1001.1.15614107.1389.13.1.11.6>
- Andra, V.V.S.N., Pammi, S.V.N., Bhatraju, L.V.K.P., & Ruddaraju, L.K. (2022). A Comprehensive Review on Novel Liposomal Methodologies, Commercial Formulations, Clinical Trials and Patents. *BioNanoSci*; 12(1), 274-291 <https://doi.org/10.1007/s12668-022-00941-x>
- Bahrani-Banan, F., Sheikhha, MH., Ghasemi, N., Majdizadeh, M., & Haghirsadat, BF. (2018). Preparation and Study of Nano-Niosomes Containing Doxorubicin and Evaluation of its Toxicity on Acute Myeloblastic Leukemia Cell Line KG-1. *payavard*; 12 (4),309-323 <http://payavard.tums.ac.ir/article-1-6592-en.html>
- Bernela, M., Seth, M., Kaur, N., Sharma, S., Pati, PK. (2023). Harnessing the potential of nanobiotechnology in medicinal plants. *Industrial Crops and Products*; 194:116266. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116266>
- Bondar, OV., Saifullina, DV., Shakhmaeva, II., Mavlyutova, II., & Abdullin, TI. (2012). Monitoring of the Zeta Potential of Human Cells upon Reduction in Their Viability and Interaction with Polymers. *Acta Naturae*;4(1), 78-81. PMID: 22708066; PMCID: PMC3372997.
- Dadazadeh, A., & Nourafcan, H. (2022). Determination of clove (*Eugenia caryophyllata*) essential oil and comparison of its antibacterial properties with some conventional antibiotics. *FSCT*; 18 (119),47-59 <http://dx.doi.org/10.52547/fsct.18.119.47>
- El-Saber-Batiha, G., Alkazmi, LM., Wasef, LG., Beshbishy, AM., Nadwa, EH., Rashwan, EK. (2020). *Syzygium aromaticum* L.(Myrtaceae), traditional uses, bioactive chemical constituents, pharmacological and toxicological activities. *Biomolecules*; 10(2), 1-16. <http://dx.doi.org/10.3390/biom10020202>.
- Filipczak, N., Pan, J., Yalamarty, SS., & Torchilin, VP. (2020). Recent advancements in liposome technology. *Advanced drug delivery reviews*; 156:4-22. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.022>
- Hiwandika, N., Sudrajat, SE., & Rahayu, I. Antibacterial and antifungal activity of clove extract (*Syzygium Aromaticum*). *Eureka Herba Indonesia*; 2(2), 86-94. <https://doi.org/10.37275/ehi.v2i2.18>
- Honary, S., & Zahir, F. (2013). Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 2). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*;12(2), 265-73. <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.19>
- Karimi Moghaddam, A., Nikounahad-Lotfabadi, N., Haghirsadat, BF., Majdizadeh, M. (2019). Investigating the effect of lipid nanoparticles containing silibinin anti-cancer drug on the growth of breast cancer MCF-7 cell line. *Journal title*; 6 (4),1-12. <http://jms.thums.ac.ir/article-1-563-en.html>
- Kulkarni, SB., Betageri, GV., & Singh, M. (1995). Factors affecting microencapsulation of drugs in liposomes. *J Microencapsul*;12(3), 229-46. doi: 10.3109/02652049509010292. PMID: 7650588.
- Maja, L., Željko, K., & Mateja, P. (2020). Sustainable technologies for liposome preparation. *The Journal of Supercritical Fluids*.,165(1), 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104984>
- Majdizadeh, M., Rezaei Zarchi, S., Movahedpour, AA., Shahi Malmir, H., Sasani, E., & Haghirsadat, BF. (2018). A new strategy in improving therapeutic indexes of medicinal herbs: preparation and characterization of nano-liposomes containing *Mentha piperita* essential oil. *JSSU*; 25 (11), 853-864

- Maleki, G., Bahrami, Z., Woltering, E.J., Khorasani, S., & Mozafari, MR. (2023). A Review of Patents on "Mozafari Method" as a Green Technology for Manufacturing Bioactive Carriers. *Biointerface Research in Applied Chemistry*; 13(1), 1-15 <https://doi.org/10.33263/BRIAC131.034>
- Mirzaei, F., Majdizadeh, M., Fatahi-Bafghi, AL., Ehsani, R., & Haghirsadat, BF. (2021). Fabrication and characterization of liposomal nano-carriers containing essential oils of *Trachyspermum ammi* to counteract *Trichomonas vaginalis*. *Koomesh*; 23(2), 283-290. <http://dx.doi.org/10.52547/koomesh.23.2.283>
- Moosavizadeh, S., Baghiani, M., Majdizadeh, M., Haghirsadat, F., & Moosavizadeh, S. (2019). Experimental study: experimental evaluation of phospholipid system containing doxorubicin HCL for use in chemotherapy. *JSSU*; 26 (11),945-956 <http://jssu.ssu.ac.ir/article-1-4719-en.html>
- Mozafari, MR. (2005). Liposomes: an overview of manufacturing techniques. *Cellular and molecular biology letters*; 10(4), 711-19.
- Mudalip, SA., Khatiman, MN., Hashim, NA., Man, RC., & Arshad, ZI. (2021). A short review on encapsulation of bioactive compounds using different drying techniques. *Materials Today: Proceedings*. 2021 Jan 1;42:288-96. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.01.543>
- Parnian, F., Hekmati-Moghadam, SH., Majdizadeh, M., Jebali, A., & Haghirsadat, BF. (2020). Fabrication of niosomal nano-carriers containing aqueous extract of *hedera helix* and comparison of toxicity of free extract and niosome extract on HT29 colorectal cancer cell line. *Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences*; 15(3), 31-45.
- Peres, MA., Macpherson, LMD., Weyant, RJ., Daly, B., Venturelli, R., Mathur, MR., Listl, S., Celeste, RK., Guarnizo-Herreño, CC., Kearns, C; Benzan, H., Allison, P., & Watt, RG. (2019). Oral diseases: a global public health challenge. *Lancet*; 394(10194), 249-260. doi: 10.1016/S0140-6736(19)31146-8. Erratum in: *Lancet*. 2019 Sep 21; 394(10203), 1010. PMID: 31327369.
- Punamjyoti, Das., & Malay K, Das. (2022). Chapter 4-Production and physicochemical characterization of nanocosmeceuticals. *Nanocosmeceuticals*. Academic Press:95-138. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91077-4.00006-5>
- Rabani, E., Behzadi, R., Majdizadeh, M., & Haghirsadat, BF. (2022). Fabrication of liposomal formulation containing paclitaxel and comparison of its toxicity with non-liposomal paclitaxel on MCF-7 breast cancer cell line. *Pars Journal of Medical Sciences*; 18(2), 26-40. doi: 10.52547/jmj.18.2.26
- Ramadhani, A., Saadah, S., & Sogandi, S. (2020). Efek Antibakteri Ekstrak Daun Cengkeh (*Syzygium aromaticum*) Terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia (JBBI)*; 7(2), 203-14. <http://orcid.org/0000-0002-7280-5399>
- Sasani, E., Shahi Malmir, H., Daneshmand, F., Majdizadeh, M., & Haghirsadat, B. F. (2020). Synthesis and physicochemical characterizing of Liponiosomal hybrid nano-carriers as carriers for Doxorubicin HCl anti-cancer drug. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences*; 27(1), 35-47. https://jsums.medsab.ac.ir/article_1269.html?lang=en
- Sasani, E., Shahi Malmir, H., Daneshmand, F., Majdizadeh, M., Haghirsadat, B F. (2018). A new study on synthesise and optimization of PEGylated LipoNiosomal nanocarriers containing curcumin for use in cancer chemotherapy . *JSSU*; 26 (6),528-541. <http://jssu.ssu.ac.ir/article-1-4567-en.html>
- Shahi Malmir, H., Kalantar, SM., Sasani, E., Asgari, M., Majdizadeh, M., & Haghirsadat, BF. (2019). Synthesis and optimization of niosomal carriers containing doxorubicin in order to achieve a final formulation with high potential in cancer cells temperature and acidity. *JSSU*; 26 (10),879-894. <http://dx.doi.org/10.18502/ssu.v26i10.479>
- Siyadatpanah, A., Norouzi, R., Mirzaei, F., Haghrosadat, BF., Nissapatorn, V., Mitsuwan, W., Nawaz, M., Pereira, ML., Hosseini, SA.; Montazeri, M., & Majdizadeh., M. (2023). Green synthesis of nano-liposomes containing *Bunium persicum* and *Trachyspermum ammi* essential oils against *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*;56(1), 150-62. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2022.06.006>
- Sugiharto, S., & Ayasan, T. (2023). Encapsulation as a way to improve the phytogetic effects of herbal additives in broilers—an overview. *Annals of Animal Science*; 23(1), 53-68. <https://doi.org/10.2478/aoas-2022-0045>
- Sukohar, A., Armadany, FI., Bakede, NA., Malaka, MH., Ramdini, DA., & Adjeng, AN. (2022). Antimicrobial Activity of *Syzygium aromaticum* L. Leaves Essential Oil against *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. *Research Journal of Pharmacy and Technology*; 15(12), 5672-6. 10.52711/0974-360X.2022.00956

- Suri, SS., Fenniri, H., & Singh, B. (2007). Nanotechnology-based drug delivery systems. *Journal of occupational medicine and toxicology*;2(1), 1-6. <https://doi.org/10.1186/1745-6673-2-16>
- Taebpour, M., Akhlaghi, M., Shahriyari, S., Hajihosseini, S., Haghirsadat, B. F., Oroojalian, F., & Tofighi, D. (2022). Synthesis, physicochemical characterization and pharmaceutical function of niosomal nanoparticles-encapsulated bioactive compound for osteosarcoma treatment. *Nanomedicine Journal*; 9(3), 205-215. doi: 10.22038/nmj.2022.63770.1665
- Taebpour, M., Majdizadeh, M., & Haghirsadat, BF. (2021). Fabrication and characterization of liposomal nanoparticles containing hydroalcoholic extract of *Artemisia absintium* and its toxicity on MCF-7 breast cancer cell line. *ijbd*; 14 (1), 64-77 <http://dx.doi.org/10.30699/ijbd.14.1.64>
- Taebpour, M., Majdizadeh, M., Haghirsadat, BF., & Akhlaghi, M. (2021). Fabrication of liposomal nanoparticles containing hydroalcoholic extract of *Silybum marianum* and evaluation of its toxicity on human osteosarcoma cancer cell line (SAOS-2) and evaluation effect of free hydroalcoholic extract of *Silybum marianum* and empty liposomes on healthy human fibroblast cell (HFF). *Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences*; 16(1), 61-73. <http://dx.doi.org/10.1234/knh.v0i0.391>
- Taghian, M., Sadri, L., Hali, H., Moosazadeh, M., & Zareyan-Jahromi, A. (2019). Association Between Maternal Sense of Coherence and Oral Health-related Quality of Life in 3 to 5-Year-Old Children Referring to Touba Clinic in Sari. Iran. *Journal of Mashhad Dental School*; 43(4), 378-386. doi: 10.22038/jmds.2019.14311
- Tizchang, S., Sowti-Khiabani, M., Rezay-Mokaram, R., Ghanbarzadeh, B., & Javadzadeh, Y. (2013). Optimization and Study of physical properties of liposomes containing nisin. *Innovative Food Technologies*;1(2), 59-68. <http://dx.doi.org/10.22104/jift.2013.29>
- Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C., Tsigalou, C., & Bezirtzoglou, E. (2021). Towards advances in medicinal plant antimicrobial activity: A review study on challenges and future perspectives. *Microorganisms*. 27;9(10), 2041. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116266>
- Yang, S., Liu, L., Han, J., & Tang, Y. (2020). Encapsulating plant ingredients for dermocosmetic application: An updated review of delivery systems and characterization techniques. *International journal of cosmetic science*; 42(1), 16-28. <https://doi.org/10.1111/ics.12592>
- Zhao, W., & Song Zhuang, X-RQ. (2011). Comparative study of the in vitro and in vivo characteristics of cationic and neutral liposomes. *International journal of nanomedicine*. Dove Press;6:3087. <https://doi.org/10.2147/IJN.S25399>
- Ziaee, M., Sowti-Khiabani, M., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H., Rezay-Mokaram, R., & Tizchang, S. (2015). Production and evaluation of nanoliposomes containing nisin and natamycin by Mozaffari method. *Innovative Food Technologies*;3(1), 11-21. <https://doi.org/10.22104/jift.2015.226>