



نانوالیاف حاصل از الکتروریسی زئین به عنوان نانوحامل اسانس اکالیپتوس:

بررسی ویژگیها و خاصیت ضد میکروبی

نازآفرین رحمتی نیا^۱، مهدی آران^۲، محمد امین میری^{۳*}، داریوش رمضان^۴

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران.

۲- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران.

۳- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران.

۴- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران.

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله :	<p>اکالیپتوس یکی از گیاهان دارویی معروف میباشد که از گذشته تاکنون از لحاظ دارا بودن خواص مختلف به ویژه اثر ضد میکروبی، مورد توجه بوده است. این تحقیق با هدف ساخت نانوالیاف به عنوان نانوحامل اسانس اکالیپتوس و بررسی ویژگیها و خاصیت ضد میکروبی نانوالیاف برای کنترل باکتریهای استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی انجام شد. بدین منظور اسانس اکالیپتوس در غلظتهای ۰، ۲/۵، ۵ و ۱۰ درصد با محلول زئین مخلوط و توسط فرآیند الکتروریسی، نانوالیاف تهیه شد. ترکیبات موثره اسانس با استفاده از گرماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی (GC-MS) شناسایی شدند. به منظور بررسی ویژگیهای نانوالیاف تهیه شده، آزمونهای تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، بررسی قطر نانوالیاف با استفاده از نرم افزار Image J، میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)، آنالیز پراش اشعه ایکس (XRD)، آنالیز حرارتی روبشی افتراقی (DSC)، و طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)، انجام شد. همچنین آزمون بررسی خاصیت ضد میکروبی نانوالیاف به روش انتشار دیسکانجم شد. نتایج نشان داد که با افزودن اسانس اکالیپتوس، قطر نانوالیاف از ۱۰۲ nm به ۱۹۳ نانومتر افزایش یافت. نتایج XRD بیانگر ساختار آمورف نانوالیاف زئین بود. نتایج حاصل از DSC وجود اسانس در نانوالیاف را اثبات نمود. نتایج حاصل از FTIR، نشان دهنده واکنش بین زئین و اسانس بود. نانوالیاف حامل اسانس اکالیپتوس برای دو باکتری گرم مثبت و گرم منفی مورد مطالعه دارای خاصیت مهارکنندگی بود. لذا، میتوان از نانوالیاف بارگذاری شده زئین با اسانس اکالیپتوس به عنوان بسته بندی فعال در طیف گستردهای از فرآوردههای غذایی استفاده کرد.</p>
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۰۳	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۰۳	
کلمات کلیدی:	
اسانس اکالیپتوس، نانوحامل، الکتروریسی	
DOI: 10.52547/fsct.18.121.7	
DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.121.1.5	
* مسئول مکاتبات: ma.miri@uoz.ac.ir	

۱- مقدمه

تحقیقات زیادی در زمینه اثرات بازدارندگی مواد طبیعی در برابر میکروارگانیسم ها صورت گرفته و در این رابطه استفاده از ترکیباتی که برای انسان غیرسمی بوده و اثرات جانبی نداشته باشد، ضروری می باشد. استفاده از عصاره ی گیاهان به عنوان افزودنی های ضد باکتریایی و آنتی اکسیدان یکی از روشهایی میباشد که مورد استفاده قرار میگیرد. تاکنون هزاران نوع عصاره گیاهی استخراج شده است که بعضی از آنها امروزه به دلیل خواص ضد میکروبی به عنوان افزودنی مواد غذایی مورد استفاده قرار می گیرند [۱].

اکالیپتوس با نام علمی *Eucalyptus globulus* و متعلق به خانواده Myrtle یکی از معروفترین گیاهان دارویی است که از دیرباز اثرات ضد میکروبی و خواص دیگر آن مورد توجه بوده است [۲]. این گیاه منبع غنی از پلی فنلها و ترپنوئیدهاست و ترکیب اصلی برگ آن اکالیپتول یاسینتول میباشد. از اکالیپتوس برای درمان بسیاری از بیماریها مانند آنفلونزا، تونسیلیت، اسهال خونی و بیماریهای پوستی استفاده میشود. عصاره برگ این گیاه دارای خواص ضد سرطانی، ضد التهابی، ضد درد، آنتی اکسیدان، ضد ازدیاد قند خون، ضد مالاریایی، ضد قارچی و ضد ویروسی است [۳]. همچنین اسانس اکالیپتوس روی طیف وسیعی از باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی نظیر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *شیگلا دیسانتری*، *سالمونلا پاراتیفی*، *اشریشیاکلی*، *باسیلوس سرئوس* و نیز قارچ *کاندیدا آلبیکنس* فعالیت ضد میکروبی از خود نشان داده است [۴، ۵].

در میان نانو ساختارهای مختلف، نانوالیاف تقریباً جدید هستند. نانوالیاف، رشته های نسبتاً کوتاه با قطر کمتر از ۱۰۰۰ نانومتر هستند که روی یک صفحه به صورت یک لایه ایجاد میشوند و هنگامی که قطر الیاف به نانومتر کاهش میابد، خصوصیات جالب توجهی در آن ظاهر میشود که از جمله آن میتوان به نسبت بسیار بالای سطح به حجم، تخلخل بالا، قابلیت انعطاف پذیری در گروههای عاملی سطح و عملکرد مکانیکی عالی (سختی و کشسانی) اشاره کرد [۶]. نانوالیاف به راحتی از پلیمرهای طبیعی و سنتزی مختلفی تهیه و تولید آنها قابل کنترل است به نحوی که خصوصیات عملکردی آنها طی تولید قادر به تغییر و دستکاری میباشد و میتوانند به عنوان سیستمهای حامل برای انتقال عوامل ضد میکروبی، داروها، رنگها، طعم دهنده ها، آنتی اکسیدانها و دیگر ترکیبات عملگر استفاده شوند.

معمولاً برای تولید نانو الیاف پلیمری از روش الکترورسی استفاده می شود. در این روش محلولهای پلیمری یا پلیمرهای مذاب را با اعمال کشش به الیاف و با استفاده از برق با ولتاژ بالا به شکل الیاف نانومتری در می آورند. برای ساخت نانوالیاف تخریب شونده از پلیمرهای تخریب شونده های همانند زئین، پلی لاکتیک اسید، پلی گلائیکولیک اسید، پلی اورتان، پلی کاپرولاکتون، آلژینات، ژلاتین، پلی وینیل الکل و غیره استفاده میشود [۷].

استفاده از نانو حاملهای پروتئینی گیاهی، رویکرد جدیدی در صنایع غذایی و دارورسانی است [۸]. پروتئینهای گیاهی به فراوانی در دسترس بوده و بسیار ارزانه تر از پروتئینهای حیوانی هستند [۹]. از پروتئینهای گیاهی که تاکنون به عنوان حامل دارویی مورد بررسی قرار گرفته است، میتوان گلیدین، گلوتن، گلوتمین گندم، گلاسیسین سویا و زئین ذرت را نام برد [۱۰].

زئین حدود ۵۰-۴۵ درصد محتوای پروتئینی ذرت را تشکیل میدهد [۱۱]. از آنجائی که زئین یک پروتئین طبیعی بوده و زیست تخریب پذیری مناسبی دارد، عموماً به عنوان یک ماده غذایی ایمن جهت استفاده در صنایع غذایی و دارویی شناخته شده است. زئین به واسطه جذب کم آب، مقاومت حرارتی بالا و خواص ممانعت کنندگی بالا در برابر اکسیژن، و ویژگی های مناسب دیگر، امروزه به عنوان پوشش زیست تخریب پذیر در غذاها و داروها استفاده میشود [۱۲]. زئین در صنعت داروسازی برای پوشش کپسولها، ایجاد حفاظت، آزادسازی کنترل شده و پنهان کردن طعم و بوی دارو استفاده شده است [۱۳].

اکالیپتوس سرشار از متابولیت های ثانویه میباشد و اسانس این گیاه دارای اثرات ضد باکتریایی است. اما از آنجا که اسانس بسیار ترکیبی ناپایدار و در مقابل عوامل دما، نور و اکسیژن ناپایدار است، لذا استفاده از تکنولوژی نانو برای محافظت اسانس اکالیپتوس لازم و ضروری می باشد. این تحقیق با هدف تولید نانوالیاف زئین حاوی اسانس اکالیپتوس به روش الکترورسی و بررسی ویژگیها و خواص ضد میکروبی نانوالیاف حاصل، انجام شد. در این تحقیق، آزمون های میکروسکوپ الکترونی روبشی، میکروسکوپ نیروی اتمی، آنالیز پراش اشعه ایکس، آنالیز حرارتی روبشی افتراقی، و طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز، انجام شد. همچنین آزمون بررسی خاصیت ضد میکروبی نانوالیاف به روش انتشار دیسک انجام شد.

۲- مواد و روشها

۲-۱- مواد اولیه

ژئین ذرت (گرید Z3625) از شرکت سیگما-آلدريج (مادرید، اسپانیا) خریداری گردید و به محض دریافت بدون تخلیص بیشتر مورد استفاده قرار گرفت. اسید استیک گلاسیال با خلوص ۹۹/۷ درصد و هگزان از شرکت مرک (آلمان) تأمین شد. آب مقطر از آزمایشگاه دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل تهیه شد.

۲-۲- تهیه اسانس اکالیپتوس با استفاده از دستگاه عصاره گیر آزمایشگاهی

برای تهیه اسانس، برگ اکالیپتوس از پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل تهیه و در دمای اتاق، به مدت دو هفته خشک و به وسیله دستگاه آسیاب برقی آسیاب شد. به مقدار ۳۰ گرم از پودر را وزن کرده و به همراه مقداری آب مقطر در داخل بالن ریخته شد. اسانس به وسیله دستگاه عصاره گیر آزمایشگاهی به روش استخراج تقطیر با بخار آب استخراج و در ظروف کوچک درب دار تیره رنگ دور از نور و در یخچال نگهداری گردید [۲].

۲-۳- آزمون کروماتوگرافی گازی- طیف

سنجی (GC-MS):

از GC-MS برای شناسایی و تعیین مقدار ترکیبات موثره اسانس اکالیپتوس استفاده شد. بدین منظور از GC مدل Agilent 7890A متصل به یک آشکارساز جرمی (Mass detector) مدل Agilent 5975C با یک ستون HP-5MS (طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵mm و ضخامت فیلم ۰/۲۵ μm) استفاده شد. از هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت ۱ mL/min استفاده شد. دمای اولیه GC، ۳۵ درجه سانتیگراد بود که به مدت ۳ دقیقه در این دما نگهداشته، سپس با سرعت ۵ درجه در دقیقه، دما به ۲۲۵ درجه سانتیگراد افزایش یافت.

۲-۴- تهیه محلول الکترورسی

محلول ژئین از طریق حل کردن پودر ژئین به مقدار ۱/۳۵ گرم در اسید استیک گلاسیال (۵ cc) تهیه شد. اسانس اکالیپتوس در چهار سطح ۰، ۲/۵، ۵ و ۱۰ درصد (حجمی/حجمی)، از طریق حل نمودن مقادیر مشخصی اسانس اکالیپتوس در محلول

پلیمری ژئین، تهیه شد [۱۲]. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت تا انحلال آن کامل گردد و بصورت محلول یکنواخت و همگنی درآید.

۲-۵- فرآیند الکترورسی

از دستگاه الکترورسی مجهز به یک منبع انرژی با ولتاژ بالا در دامنه ۰ تا ۳۵ کیلوولت ساخت شرکت فناوران نانو مقیاس مدل ES1000 تک محوره (تهران، ایران) استفاده شد (شکل ۱). آند دستگاه به یک سوزن فولادی ضدزنگ با قطر ۰/۹ میلی متر متصل بود که این سوزن به محلول های بیوپلیمری که درون سرنگ های پلاستیکی ۵ میلی لیتری نگهداری می شدند، ارتباط می یافت. سرنگ در وضعیت افقی روی یک پمپ سرنگ دارای کنترل دیجیتالی قرار می گرفت، طوری که سوزن مستقیماً به شکل عمودی و رو به قسمت جمع کننده بود. سوزن به الکتروود ناشر دارای قطبیت مثبت و منبع انرژی ولتاژ بالا متصل می شد. از مخروط تیولوریک فواره از محلول پلی مری با بار مثبت شکل گرفت که در فاصله هوایی جابجا می شد و در روی جمع کننده می نشست. نانوالیاف بر روی ورق فویل آلومینیومی که به غلتک مورد استفاده به عنوان جمع کننده وصل می شد، تجمع می یافتند. تمام آزمایشات الکترورسی در دمای اتاق انجام گرفت و زمان انجام هر آزمایش ۳۰ دقیقه بود [۱۲].



Fig 1 Electrospinning device used in this study

۲-۶- هدایت الکتریکی (EC)

برای انجام این آزمایش از دستگاه EC متر مدل CON 510 (SPW، آمریکا) استفاده شد. اسانس اکالیپتوس در چهار سطح ۰، ۲/۵، ۵ و ۱۰ درصد (حجمی/حجمی)، از طریق حل نمودن

این آزمایش برای بررسی حالت کریستالی یا آمورف بودن اجزای فرمولاسیون قبل و بعد از تشکیل نانوالیاف و سازگاری اسانس و پلیمر زئین انجام شد. آنالیز حرارتی با روش DSC88220, Mettler Toledo, (مدل دستگاه: Switzerland) بر روی نانوالیاف حاوی اسانس و فاقد اسانس انجام خواهد شد. بدین صورت که نمونه درون ظرف آلومینیومی قرار داده شد و درب ظرف روی آن پانچ گردید. سپس درب آنرا با سوزن سوراخ کرده تا مانع از ترکیدن ظرف تحت دمای بالا شود. نمونه درون دستگاه متصل به گاز نیتروژن (40 ml/min) قرار داده شد. آزمون DSC در دامنه دمایی °C ۲۵-۲۵۰ و با سرعت افزایش دمای °C/min ۱۰ انجام شد [۱۳].

۲-۱۱- طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)

به منظور شناسایی گروههای عاملی و تعیین نوع واکنش یا پیوندهای برقرار شده بین زئین و اسانس اکالیپتوس در نانوالیاف الکتروریسی شده، طیف سنجی مادون قرمز انجام گرفت. برای اینکار لایه ای از الیاف در خروجی دستگاه قرار گرفت. تمامی آزمایشها توسط اسپکترومتر NicoletThermo مدل AVATAR 370 FTIR، در محدوده طول موج $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ با شفافیت 4 cm^{-1} انجام شد. آزمون برای پنج نمونه شامل الیاف زئین، نمونه اسانس اکالیپتوس و نمونه های بارگذاری شده در سطوح ۱۰، ۵، ۲/۵، انجام گرفت [۱۶].

۲-۱۲- آزمونهای میکروبی غشا نانوالیاف:

برای تعیین فعالیت ضد میکروبی غشا نانوالیاف شاهد و حامل اسانس روی دو گونه باکتریایی شامل استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC1189) و اشریشیا کلی (ATCC 10708) از روش انتشار دیسک^۱ استفاده میگردد. فعالسازی اولیه سویه های میکروبی در محیط کشت مولر هینتون آگار (Mueller Hinton agar) تا رسیدن به بار میکروبی 10^8 cfu/ml ظرف مدت ۲۴ ساعت با استفاده از روش کدورت سنجی (نیم مک فارلند^۲) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انجام گردید. نانوالیاف تولید شده به دیسکهایی به قطر ۱۰ میلیمتر تبدیل میشوند. دیسکها در شرایط استریل روی محیط کشت مولر هینتون آگار

مقادیر مشخصی اسانس اکالیپتوس در محلول پلیمری زئین، تهیه شد [۱۲]. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت تا انحلال آن کامل گردد و بصورت محلول یکنواخت و همگنی درآید. سپس هدایت الکتریکی محلولها اندازه گیری شد.

۲-۷- تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

شکل الیاف الکتروریسی شده پس از بمباران اتمی با مخلوط طلا و پالادیوم درخلا، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (مدل LEO 1450 VP) در بزرگنمایی ۲۰۰۰، ۱۰۰۰ و ۵۰۰۰ بررسی شد. تمام بررسی های SEM در ولتاژ ۰/۸ کیلوولت انجام شد. الیاف به منظور آماده سازی برای SEM به قطعات یک در یک سانتیمتر مربعی درآورده شد. قطر الیاف الکتروریسی با استفاده از نرم افزار Image J از روی نانوالیاف SEM با اندازه گیری ۵۰ فیبر از هر تصویر تعیین شد. میانگین این داده ها به عنوان میانگین قطر الیاف آن تصویر در نظر گرفته شد [۱۳].

۲-۸- میکروسکوپ نیرو اتمی (AFM)

در این طرح از میکروسکوپ نیرو اتمی (مدل ARA-AFM) برای نشان دادن ساختار سه بعدی الیاف استفاده شد [۱۴] از دستگاه AFM موجود در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی مشهد استفاده گردید.

۲-۹- آزمون پراش اشعه ایکس (XRD)

به منظور بررسی نحوه اختلاط و پراکنش ترکیبات مختلف و تعیین وضعیت فیزیکی اسانس اکالیپتوس در الیاف ریسیده شده زئین، از آزمون پراش اشعه ایکس استفاده گردید. آزمون برای چهار نمونه که عبارتند از نمونه هایی که در سطوح ۰، ۲/۵، ۵ و ۱۰ درصد بارگذاری شده اند انجام شد. در این آزمون نمونه ها با استفاده از دستگاه XRD analyzer unisantis,xmd-300 با پرتوی $\text{cuk } \alpha$ با طول موج $\lambda=1/5418$ آنگستروم و زاویه برخورد از ۴ تا ۴۰ درجه، در دمای محیط اسکن شده و طیف پراش پرتو ایکس آنها مقایسه گردید [۱۵].

۲-۱۰- آزمون حرارتی روبشی افتراقی (DSC)

1. Agar disc fusioin method
2. Mac Farland

در این مطالعه ترکیب شیمیایی اسانس اکالیپتوس با تجزیه و تحلیل GC-MS تعیین شد. ترکیبات اصلی در جدول ۱ ذکر شده است. با توجه به نتایج بدست آمده، از آنجایی که سینتول و آلفاین جزو اصلترین و مهمترین ترکیبات ضد میکروبی اکالیپتوس میباشند بنابراین میتوان خاصیت ضد میکروبی اکالیپتوس را به این دو ترکیب نسبت داد. مطالعات مختلفی در این باره صورت گرفته است که دارای اختلافات کمیت و کیفیت اجزاء شناسایی شده میباشد که ناشی از اختلافات ژنتیکی، شرایط فصلی، نوع چگونگی اسانسگیری و حلال مورد نظر، سن گیاه و نوع برداشت میباشد.

قرار داده میشوند. پلیتها سپس در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شده و قطر هاله های تشکیل شده با استفاده از کولیس با دقت ۰/۰۲ میلیمتر اندازه گیری شد [۱۷].

۲-۱۳- طرح آماری

مطالعات آماری با استفاده از طرح کاملا تصادفی انجام شد و از جدول آنالیز واریانس (ANOVA) معنی دار بودن اثرات در سطح ۵٪ بررسی گردید. آزمایشات با سه تکرار انجام شد.

۳-نتایج و بحث

۳-۱- ترکیب شیمیایی اسانس اکالیپتوس

Table 1 Major chemical components of Eucalyptus essential oil using GC-MS chromatography

Number	Components	RT	Area	Area sum%	Width	Height	Base peak
1	<i>1,8-cineole</i>	14.863	81094538	42.13	0.33	9403277	93.1
2	<i>α-pinene</i>	18.416	18527511	9.62	0.203	3456384	71
3	<i>Isopentyl isovalerate</i>	15.673	13392144	6.96	0.169	4029114	121
4	<i>Phellanderene-</i>	10.570	12090429	6.28	0.206	4365910	93
5	<i>spathullenol</i>	12.539	69800881	3.63	0.209	1520477	93
6	<i>limonene</i>	29.144	56760721	2.95	0.212	1093369	109.1
7	<i>transpinocarveole</i>	12.931	40909590	2.13	0.209	7787532	93
8	<i>borneol</i>	21.823	30540071	1.59	0.186	1174025	134.9
9	<i>terpinolene</i>	29.961	21116201	1.1	0.112	7676188	149

تراکم کمتر بارهای الکتریکی، کشش فواره را کاهش می دهد که به نوبه خود باعث افزایش قطر نانوالیاف میشود [۱۸-۲۰].

به جز نانوالیاف دارای گویچه و فاقد گویچه، الکترورسی قادر به تولید سایر انواع نانوالیاف با ساختار میلهای^۳ شکل، شاخهای^۴ و غیرهمی باشد [۱۸]. تصاویر AFM اسانس اکالیپتوس بارگذاری شده در نانوالیاف الکترورسی شده زئین در شکل ۳ نشان داده شده است که نشان دهنده حالت میلهای شکل نانوالیاف میباشد. نتایج حاضر مطابق با نتایج [۱۲] میباشد. همچنین تصاویر AFM در مقایسه با SEM نشان دهنده حالت سه بعدی نانوالیاف میباشد.

1. Tubular
2. Branched

۳-۲- تأثیر بارگذاری اسانس اکالیپتوس بر

شکل و قطر نانوالیاف

شکل ۲، میکروگرافهای SEM اسانس اکالیپتوس بارگذاری شده در نانوالیاف الکترورسی شده را نشان میدهد. همانطور که مشخص است، نانوالیاف صاف و بدون گویچه تشکیل شدهاند. بنابراین میتوان نتیجه گرفت که افزودن اسانس اکالیپتوس بر قابلیت الکترورسی محلول زئین و شکل نانوالیاف تأثیر نمیکند. با افزایش اسانس اکالیپتوس از ۰ به ۱۰٪ در محلول، قطر نانوالیاف زئین از ۱۰۳nm به ۱۹۳nm افزایش یافت (جدول ۲) که می توان آن را به هدایت الکتریکی محلول نسبت داد. با افزایش غلظت اسانس اکالیپتوس بار الکتریکی محلول کاهش مییابد. به طور کلی، با کاهش هدایت الکتریکی محلول، تراکم بار الکتریکی در فواره حاصل از محلول بیوپلمر برای الکترورسی کاهش مییابد.

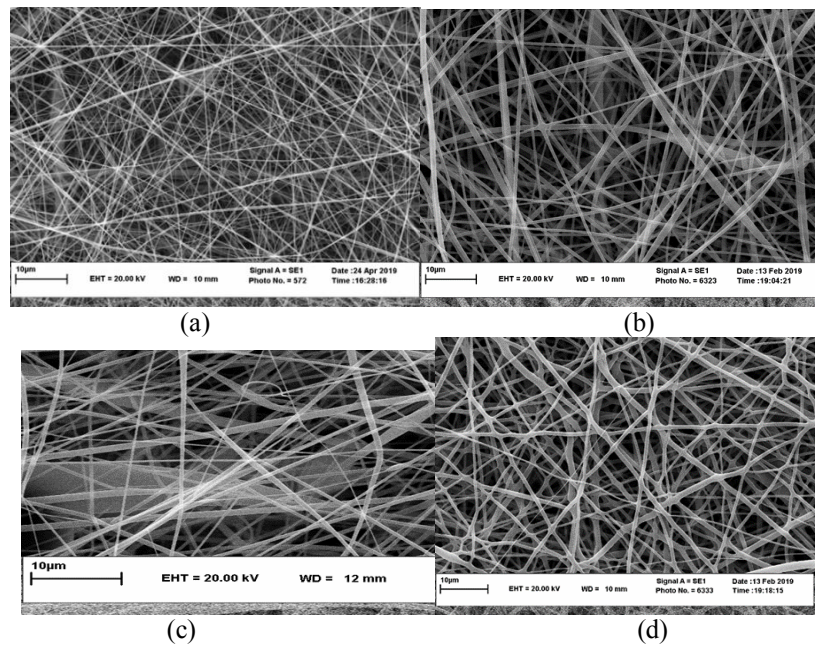


Fig 2 SEM images of Eucalyptus essential oil loaded electrospun zein nanofibers at different levels (a) 0%, (b) 2.5% v/v, (c) 5% v/v, and (d) 10% v/v.

Table 2 Electrical conductivity and average electrospun zein nanofiber diameter of Eucalyptus loaded zein solutions. *

Eucalyptus essential oil content (v/v, %)	Electrical conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Average fiber diameter (nm)	Morphology
0	25.8 ± 0.032	103.7 ± 19.3^a	Fibers free of beads
2.5	20.64 ± 0.1	104.6 ± 19.3^a	Fibers free of beads
5	18.34 ± 0.5	153.6 ± 19.3^b	Fibers free of beads
10	15.8 ± 0.87	193.9 ± 19.3^c	Fibers free of beads

*Means bearing different superscripts are significantly different ($p < 0.05$). Results are presented as mean \pm SD (n=3).

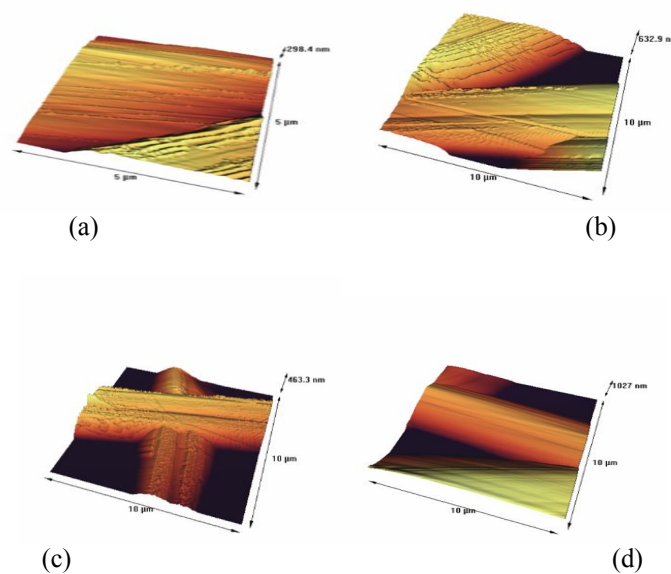


Fig 3 AFM 3D-topograph images of Eucalyptus essential oil loaded electrospun zein nanofibers at different levels (a) 0%, (b) 2.5% v/v, (c) 5% v/v, (d) 10% v/v.

۳-۳- حالت فیزیکی اسانس اکالیپتوس در

نانوالیاف

به منظور بررسی حالت فیزیکی اسانس اکالیپتوس در نانوالیاف، مطالعه XRD انجام شد. الگوهای XRD نانوالیاف زئین و

نانوالیاف بارگذاری شده در شکل ۴ نشان داده شده است. الگوهای XRD نشان دهنده یک الگو با دو هاله پراش هستند، که یک حالت آمورف را نشان می دهد [۲۱].

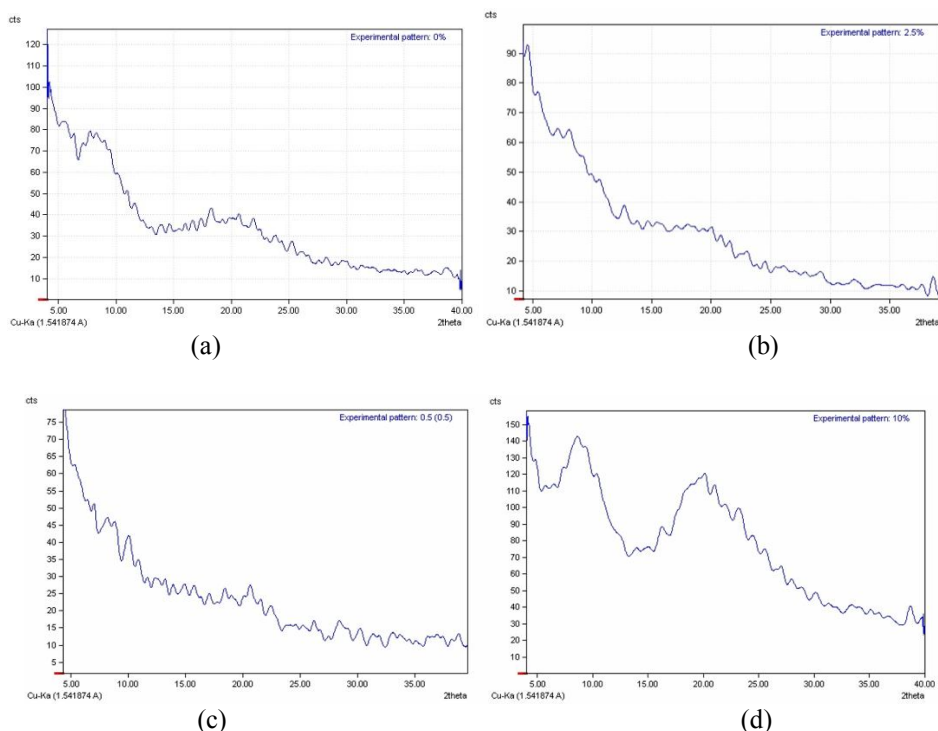


Fig 4 X-ray diffraction patterns of different samples: (a) Zein, (b) Zein-Eucalyptus essential oil 2.5% v/v, (c) Zein-Eucalyptus essential oil 5% v/v, (d) Zein-Eucalyptus essential oil 10% v/v.

دیگری وجود ندارد که این امر نشان دهنده سازش بین اسانس و پلیمر زئین میباشد. Lou و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که اینکاهش نشانگر تمایل کمتر پلیمر با آب به دلیل محصور کردن مولکولهای آبگیر است. همچنین حضور گروههای آبگیر میتواند محتوای آب پیوسته را کاهش دهد [۲۳]. پائولا و همکاران (۲۰۱۱) اسانس لیپا را در الیاف کیتوزان بارگذاری نمودند. نتایج حاصل نشان داد که بارگذاری اسانس در کیتوزان باعث شد تا پیک اندوترمیک به علت برهمکنش کم پلیمر با اسانس به دمای پایبتری تغییر یابد. بنابراین، نتایج آزمون DSC نشان میدهد که اسانس اکالیپتوس با موفقیت در نانوالیاف الکترورسی زئین کپسوله شده است [۲۴].

۳-۴- آنالیز حرارتی روبشی افتراقی (DSC)

ویژگیهای حرارتی نانو الیاف زئین به وسیله DSC بررسی شد. همانطور که در شکل ۵ مشخص شده است. ترموگرام DSC برای نانوالیاف فاقد اسانس یک پیک اندوترمیک در دمای ۹۱،۹۰ درجه سانتیگراد نشان داده است که به علت تبخیر اجزای فرار مولکولها است [۲۲]. ترموگرامهای DSC برای نانوالیاف دارای اسانس، پیک اندوترمیک در دمای ۷۵-۸۲ درجه سانتیگراد نشان میدهد. علت کاهش پیک اندوترمیک از دمای ۹۱،۹۰ به ۷۵ درجه سانتیگراد ممکن است بدلیل وجود مواد فرار در اسانس اکالیپتوس باشد که در این محدوده دما ذوب میشوند. در سایر قسمتهای نمودار پیک

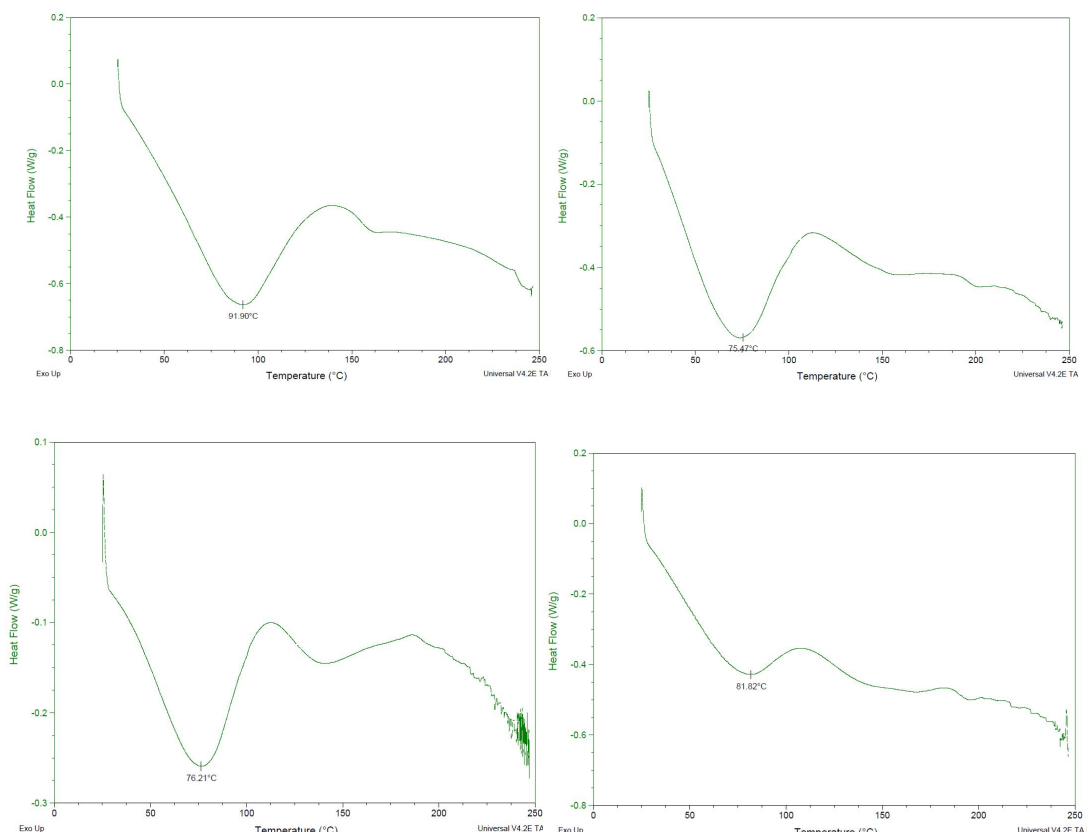


Fig 5 DSC thermograms of different samples: (a) Zein, (b) Zein–Eucalyptus essential oil 2.5% v/v, (c) Zein–Eucalyptus essential oil 5% v/v, (d) Zein– Eucalyptus essential oil 10% v/v.

1677 cm^{-1} مربوط به پیوند کششی $C=C$ اسانس است. پیکهای 1288 cm^{-1} و 1225 cm^{-1} مختص گروه آلدهید هستند. پیک 1155 cm^{-1} به دلیل گروه الکلی و پیک 811 cm^{-1} مربوط به باند $C-H$ است.

پیوند کششی آمید I نانوالیاف زئین فاقد اسانس که در پیک 1624 cm^{-1} ظاهر شده برای الیاف زئین حاوی ۵، ۲/۵، و ۱۰ درصد اسانس اکالیپتوس به ترتیب به 1642 cm^{-1} ، 1653 cm^{-1} و 1655 cm^{-1} تغییر یافت. در حالی که، باند آمید II زئین در 1534 cm^{-1} کاهش یافته و برای نانوالیاف حاوی اسانس به 1524 cm^{-1} ، 1533 cm^{-1} و 1525 cm^{-1} تغییر یافت. تغییراتو جابجایی ها در پیکهای زئین واکنش بین زئین و اسانس اکالیپتوس را نشان میدهد. از آنجایی که زئین و اسانس اکالیپتوس مولکولهای آبگریزی هستند، ممکن است واکنش آبگریز رخ دهد [۲۳، ۲۵].

و Torres-Ginner & LimMoomand (۲۰۱۵) و همکاران (۲۰۰۸) بیان کردند که شدت پیک آمید I به شدت تحت تأثیر طول ساختار ماریچج آلفا قرار میگیرد. هرچه طول ساختار ماریچج کمتر باشد، پیک آمید I به طول موجهای بالاتر

۳-۵- مطالعه واکنش شیمیایی اسانس

اکالیپتوس و زئین

شکل ۶ نتایج بدست آمده با FTIR برای اسانس خالص، نانوالیاف زئین فاقد اسانس و بارگذاری شده با اسانس را نشان می‌دهد. این آزمایش اثر متقابل اسانس اکالیپتوس و پروتئین زئین را نشان میدهد. شکل ۶، پیک نانوالیاف زئین فاقد اسانس را در 3416 cm^{-1} نشان میدهد که متعلق به گروه آمین (NH) است. پیک 2927 cm^{-1} نشان دهنده نوارهای کششی جذبی $C-H$ از گروههای عملکردی CH_2 و CH_3 است. پیکها در 1624 cm^{-1} و 1534 cm^{-1} نشانگر آمید I و آمید II است. پیک آمید I نشان دهنده پیوند $C=O$ گروههای پپتیدی است. پیک آمید II به پیوند $C-N$ و همچنین به گروه NH اشاره دارد [۱۵].

پیک اسانس اکالیپتوس خالص در طول موج 3461 cm^{-1} مربوط به کشش گروههای هیدروکسیل ترکیبات فنلی موجود در روغن اسانس اکالیپتوس است. پیک 2954 cm^{-1} به دلیل وجود گروههای CH_2 و CH_3 در اسانس است. پیک 1737 cm^{-1} مربوط به گروه کربونیل ($C=O$) ترپنوئیدها میباشد. پیک

(*E. coli*) دارند. با افزایش غلظت اسانس قطر هاله‌ی عدم رشد باکتری نیز افزایش می‌یابد. نانوالیاف زئین با غلظتهای ۰، ۲/۵، ۵، و ۱۰ درصد اسانس اکالیپتوس در آزمون میکروبی در برابر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب دارای ۰، ۲، ۲/۶ و ۴/۳ میلی متر قطر هاله‌ی عدم رشد می‌باشد. همچنین، در برابر باکتری *اشریشیا کلی* به ترتیب دارای ۱۰، ۱۱/۷، ۱۲/۴، ۱۴/۵ میلی‌متر قطر هاله‌ی عدم رشد می‌باشد. مطالعه‌ی دیگری که توسط دباغ مقدم و همکاران (۲۰۱۹) صورت گرفت، نشان می‌دهد که نانوالیاف زئین بارگذاری شده با ۳٪ اسانس آویشن شیرازی در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* با قطر هاله عدم رشد ۲/۲۵ mm، فعالیت ضد باکتریایی نشان می‌دهند [۲۷].

نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش غلظت اسانس اکالیپتوس از ۰ به ۱۰ (v/v)٪ قطر هاله عدم رشد افزایش یافت (جدول ۳). فعالیت ضد میکروبی اسانس اکالیپتوس احتمالاً به مقدار زیاد سینئول (۴۲٪) و آلفا-پینن (۹/۶٪) نسبت داده می‌شود. در کل سازوکار اسانسها در برابر میکروارگانیسمها میتواند بواسطه تخریب دیواره سلول، واکنش با پروتئین های غشا، تخریب غشای سیتوپلاسمی افزایش نفوذپذیری سلول، نشت محتوای سلول باشد [۲۸-۳۰]. بر طبق نتایج مربوط به فعالیت ضد باکتریایی در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* میتوان از نانوالیاف بارگذاری شده زئین به وسیله اسانس اکالیپتوس به عنوان بسته بندی فعال در طیف گسترده‌ای از فرآورده های غذایی استفاده کرد، از جمله برای بسته بندی فرآورده های لبنی و گوشتی، زیرا این باکتریها در این محصولات شیوع بالایی دارند.

Table 3 Average diameter of bacteria inhibition zone for zein fibrous mats with different contents of Eucalyptus essential oil.

Diameter of inhibition zone (mm)		Eucalyptus essential oil content (v/v, %)
<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	
00.0 ± 0.0 ^d	00.0 ± 0.0 ^d	0
1.7 ± 0.0 ^c	2.0 ± 0.0 ^c	2.5
2.4 ± 0.6 ^b	2.6 ± 0.8 ^b	5
4.5 ± 0.3 ^a	4.3 ± 1.6 ^a	10

* Means bearing different superscripts are significantly different ($p < 0.05$). Results are presented as mean ± SD (n=3).

افزایش قطر به علت کاهش هدایت الکتریکی بود. تصاویر تهیه شده AFM نشان داد که نانوالیاف الکترورسی شده، میله‌هایی شکل می‌باشد. نتایج بدست آمده از آنالیز حرارتی DSC نشان دهنده این بود که اسانس اکالیپتوس با موفقیت در نانوالیاف

شیفت پیدا میکند. بنابراین، افزایش طول موج مشاهده شده با افزودن اسانس اکالیپتوس، نشان دهنده طول مارپیچ آلفا کوتاهاست. بنابراین میتوان نتیجه گرفت که افزودن اسانس اکالیپتوس، ساختار دوم پروتئین زئین را تحت تأثیر قرار داده است [۱۴، ۲۶].

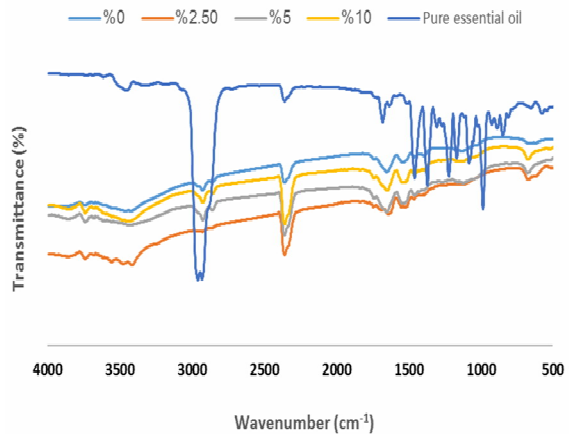


Fig 6 FTIR spectra of electrospun zein nanofibers loaded with 0% v/v, 2.5% v/v, 5% v/v, and 10% v/v, Eucalyptus essential oil and Pure Eucalyptus essential oil.

۶-۳- فعالیت ضد میکروبی

فعالیت ضد میکروبی الیاف الکترورسی شده نقش مهمی در کاربردهای غذایی آنها دارد. بنابراین فعالیت ضد میکروبی اسانس اکالیپتوس بارگذاری شده در نانوالیاف الکترورسی شده در برابر، *S. aureus* (ATCC 29737), *E. coli* (ATCC 25922) ارزیابی شد. قطر هاله عدم رشد در جدول ۳ نشان داده می‌شود. نتایج نشان می‌دهد که نانوالیاف بارگذاری شده با اسانس اکالیپتوس فعالیت ضد میکروبی قوی در برابر باکتری گرم مثبت (*S. aureus*) و باکتری گرم منفی

۴- نتیجه گیری

طبق نتایج بدست آمده از تصاویر SEM تمامی الیاف الکترورسی شده زئین یکدست و فاقد گویچه می‌باشد و با افزایش میزان اسانس قطر الیاف نیز افزایش یافته است که این

- [6] Reneker, D., and Chun, I. 1996. Nanometer diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology*, 7, 3, 216-223.
- [7] Miri, M. A., Ghorani, B., Miri, H. R. Electroencapsulation: Fundamentals and applications in food industry. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 89(16), 1-21.
- [8] Elzoghby, A.O., Samy, W.M., and Elgindy, N. A. 2012. Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 161(1):38-49.
- [9] Peng, Y. Y., Glattauer, V., Ramshaw, J. A and Werkmeister, J. A. 2010. Evaluation of the immunogenicity and cell compatibility of avian collagen for biomedical applications. *Journal of Biomedical Materials Research*, 93(4):1235-44.
- [10] Chen, L., Remondetto, G. E., and Subirade, M. 2006. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science and Technology*, 17(5):272-83.
- [11] Shukla, R., and Cheryan, M. 2001. Zein: The industrial protein from corn. *Industrial Crops and Products*, 13, 171-192.
- [12] Miri M. A, Habibi-Najafi M. B., Movaffagh, J., Najafi, M., Ghorani, B., Koocheki, A. 2016. Optimization of Electrospinning Process of Zein Using Central Composite Design. *Fibers and Polymers*, 17(5): 769-777.
- [13] Movaffagh, J., Amiri, N., Ebrahimi, S., Kalalinia, B. F., Fazli Bazaz, B. S., Azzadeh, M., Arabzadeh, S., Miri, M. A. 2018. Electrospun zein nanofibers as nanocarrier of vancomycin: Characterization, release and antibacterial properties. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 80(15): 199-212.
- [14] Torres-Giner, S., Gimenez, E., and Lagaron, J. M. 2008. Characterization of the morphology and thermal properties of Zein Prolamine nanostructures obtained by electrospinning. *Food Hydrocolloids*, 22(4), 601-614.
- [15] Miri, M. A., Habibi-Najafi, M. B., Movaffagh, J., and Ghorani, B. 2020. Encapsulation of Ascorbyl Palmitate in Zein by Electrospinning Technique. *Journal of Polymers and the Environment*, 5. <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01954-x>
- الکترورسی زئین کپسوله شده است. الگوهای XRD بدست آمده از نانوالیاف الکترورسی شده نشان دهنده یک حالت آمورف است. آزمایش FTIR نانوالیاف با غلظت‌های مختلف اسانس نشان دهنده واکنش بین زئین و اسانس اکالیپتوس بود. نتایج نشان داد که ترکیبات عمده اسانس اکالیپتوس، سینئول و آلفا پینن بود که این ترکیبات دارای خواص ضد میکروبی هستند. نتایج آزمون میکروبی نشان داد که نانوالیاف زئین حاوی اسانس اکالیپتوس دارای خاصیت ضد میکروبی علیه دو باکتری *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* میباشد که این امر با افزایش میزان اسانس، افزایش میابد. لذا، میتوان از نانوالیاف حاوی اسانس در کنترل فساد میکروبی استفاده کرد.

۵- قدرانی

نویسندگان از دانشگاه زابل به خاطر حمایت مالی (IR-UOZ-GR-4249) در اجرای این پروژه تشکر و قدرانی می نمایند.

۶- منابع

- [1] Rezaei, M., Aran, M., Amani, A. M., Miri, M. A., and Ramezan, D. 2021. Use of electrospun chitosan nanofibers as nanocarriers of *Artemisia sieberi* extract: Evaluation of properties and antimicrobial effects. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 18(112), 323-334.
- [2] Hafsa, J., Smach, M. A, Khedher, M. R. B., Charfeddine, B., Limem, K., Majdoub, H., and Rouatbi, S. 2016. Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing *Eucalyptus globulus* essential oil. *LWT - Food Science and Technology*.
- [3] Siddiqui, B., and Sultana, I. 2004. Triterpenoidal constituents from *Eucalyptus camaldulensis* var. *Obtusa* leaves. *Phytochem*, 54: 861-865
- [4] Srinivasan, D., Nathan, S. and Suresh, T. 2001. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *Journal of Ethnopharmacol*, 74: 217-220.
- [5] Adebola, O., Olusegun, E. and Olayide, N. 1999. Antimicrobial activity of the essential oils of five *Eucalyptus* species growing in Nigeria. *Fitotera*, 70: 526-528.

- vitro controlled release study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85(2), 145–152.
- [24] Paula, H., Sombra, F., Cavalcante, R., Abreu, F., Paula, R. 2011. Preparation and characterization of chitosan/cashew gum beads loaded with *Lippia sidoides* essential oil. *Materials Science and Engineering: C*. 31. 173-178.
- [25] Chen, H. 2014. Fabrication of Zein Nanoparticle-Biopolymer Complexes to Deliver Essential Oils in Aqueous Dispersions. University of Tennessee.
- [26] Moomand, K., and Lim, L. T. 2015. Effects of solvent and n-3 rich fish oil on physicochemical properties of electrospun zein fibres. *Food Hydrocolloids*, 46, 191–200.
- [27] Dabbagh Moghaddam, A., Kazemi, M., Jebrael, M., Sharifan, A. 2019. Design of Zein Electrospinning Nanofiber Packaging Containing "Zataria Multiflora" Essential Oil to Preserve the Ration Food. *Food Technology and Nutrition (Iran)*. 2019 (16) 3: 91-103.
- [28] Rieger, K. A., and Schiffman, J. D. 2014. Electrospinning an essential oil: Cinnamaldehyde enhances the antimicrobial efficacy of chitosan/poly(ethylene oxide) nanofibers. *Carbohydrate Polymers*, 113, 561–568.
- [29] Rojas, E. R., Billings, G., Odermatt, P. D., Auer, G. K., Zhu, L., Miguel, A., Chang, F., Weibel, D. B., Theriot, J. A., and Huang, K. C. 2018. The outer membrane is an essential load-bearing element in Gram-negative bacteria. *Nature*, 559,7715, 617–621.
- [30] Nohynek, L. J., Alakomi, H. L., Kähkönen, M. P., Heinonen, M., Helander, I. M., Oksman-Caldentey, K. M., and Puupponen-Pimiä, R. H. 2006. Berry phenolics: Antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutrition and Cancer*, 54, 1,18–32.
- [16] Brahatheeswaran, D., Mathew, A., Aswathy, R. G., Nagaoka, Y., Venugopal, K., Yoshida, Y., Maekawa, T., and Sakthikumar, D. 2012. Hybrid fluorescent curcumin loaded zein electrospun nanofibrous scaffold for biomedical applications. *Biomedical Materials*, 7: 045001.
- [17] Seydim, A.C., and Sarikus, G. 2006. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International*, 39(5): 639-644.
- [18] Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W., Lim, T., Ma, Z. 2005. An Introduction to Electrospinning and Nanofibers. World Scientific Publishing Co. Singapore.
- [19] Tan, S. H., Inai, R., Kotaki, M., and Ramakrishna, S. 2005. Systematic parameter study for ultra-fine fiber fabrication via electrospinning process. *Polymer*, 46(16), 6128–6134.
- [20] Nayak, R., Padhye, R., Kyratzis, I. L., Truong, Y. B., and Arnold, L. 2013. Effect of viscosity and electrical conductivity on the morphology and fiber diameter in melt electrospinning of polypropylene. *Textile Research Journal*, 83(6), 606–617.
- [21] Huang, W., Zou, T., Li, S., Jing, J., Xia, X., and Liu, X. 2013. "Drug-loaded zein nanofibers prepared using a modified coaxial electrospinning process," *AAPS PharmSciTech*, 14, 2, 675–681.
- [22] Neo, Y. P., Ray, S., Jin, J., Nikolaidis, M. G, Nieuwoudt, M. K., Liu, D., Quek, S. Y. 2013. Encapsulation of food grade antioxidant in natural biopolymer by electrospinning technique: a physicochemical study based on zein-gallic acid system. *Food Chemistry*, 136,1013–1021.
- [23] Luo, Y., Zhang, B., Whent, M., Yu, L. L., and Wang, Q. 2011. Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of α -tocopherol, and its in



Electrospun zein nanofibers as a nanocarrier of Eucalyptus essential oil: Characterization, and antimicrobial properties

Rahmatinia, N. ¹, Aran, M. ², Miri, M. A. ^{3*}, Ramezan, D. ⁴

1. Former M.Sc. student, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.
3. Department of Food Science and Technology, Zabol University, Zabol, Iran.
4. Assistant Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article History:

Received 2021 07/ 25

Accepted 2021/ 10/ 25

Keywords:

Eucalyptus essential oil,
Nano carrier,
Electrospinning.

DOI: 10.52547/fsct.18.121.7

DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.121.1.5

*Corresponding Author E-Mail:
ma.miri@uoz.ac.ir

Eucalyptus is an important medicinal plant that is widely used for its antimicrobial properties. The aim of this research was to fabricate electrospun nanofibers as nano carrier of eucalyptus essential oil, and to characterize them, and to study the antimicrobial properties of nanofibers against *S. aureus* and *E. coli*. Eucalyptus essential oil was mixed at different concentrations of 0%, 2.5%, 5%, and 10% in zein solution and electrospun zein nanofibers prepared by electrospinning process. GC-MS analysis was done to identify the components of the Eucalyptus essential oil. The electrospun zein nanofibers containing Eucalyptus essential oil were characterized by Scanning electron microscopy (SEM), Image J, Atomic force microscopy (AFM), X-ray diffraction (XRD), Differential scanning calorimetric (DSC), and Fourier transform infrared (FTIR). Disc diffusion method was used to study the antimicrobial properties of nanofibers. Results indicated that diameters of electrospun zein nanofibers increased with increasing concentration of essential oil from 102 nm to 193 nm. XRD results determined that zein nanofibers were in amorphous structure. DSC results verified the existence of Eucalyptus essential oil in nanofibers. FTIR results indicated the interaction between Eucalyptus essential oil and zein. Antimicrobial results showed that the Eucalyptus essential oil loaded nanofibers were effective against both studied gram positive and gram negative bacteria. Therefore, Eucalyptus essential oil loaded nanofibers could be used as active packaging for variety of foods.