مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

ارزیابی اثر ضد باکتریایی دی لیمونن نانوانکپسوله شده در نانواسفنج بتاسیکلودکسترین

عذرا صالحی[۱]، عاطفه رضایی[۲]، مسعود سامی[۳]*

۱-دانشجویدکترا بهداشت و ایمنی مواد غذایی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

۲-استادیار علوم و صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

۳-دانشیار بهداشت مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۲۴

کلمات کلیدی:

دی لیمونن،

ضد باکتری،

نانواسفنج بتاسیکلودکسترین،

انکپسولاسیون.

DOI: 10.22034/FSCT.19.132.355

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.132.26.9

* مسئول مکاتبات:

masoud_sami@nutr.mui.ac.ir

چکیده

با افزایش مقاومت باکتری ها به آنتی بیوتیک ها و افزایش آگاهی مردم از ارتباط بین غذا و سلامتی انسان، مطالعات و بررسی های متعددی جهت پیدا کردن ترکیبات آنتی باکتریال بالقوه صورت گرفته است. دی لیمونن یک ترکیب زیست فعال مایع و بدون رنگ از خانواده ترپنها است که فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی بالایی دارد. با این حال به دلیل فراریت بالا حلالیت پایین و حساسیت نسبت به نور کاربردهای آن در صنایع غذایی و دارویی محدود شده است. در این پژوهش، برای غلبه و رفع این محدودیت ها دی لیمونن در نانواسفنج بتاسیکلودکسترین نانوانکپسوله شد. به همین منظور، از نسبت مولی ۱:٤، ۱:٦و ۱:۸ بتاسیکلودکسترین به دی فنیل کربنات به عنوان اتصال دهنده عرضی و همچنین از نسبت های وزنی ۱:۲، ۱:٤و ۱:٦ دی لیمونن به نانواسفنج استفاده شد. نتایج نشان داد حلالیت دی لیمونپس از انکپسوله شدن در نانواسفنج بتاسیکلودکسترین ۱۵٤ برابر افزایش یافت. دی لیمونن انکپسوله شده فعالیت ضد باکتریایی بالاتری را در مقایسه بادی لیمونن آزاد نشان داد و حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) دی لیمونن پس از انکپسوله شدن در نانواسفنج به ترتیب ۳۲٤ و ٦٤۸ مرتبه کاهش یافت. نتایج نشان داد که نانواسفنج بتاسیکلودکسترینیک حامل مناسب برای ترکیبات آبگریز و حساس است وکمپلکس سنتز شده می تواند به عنوان یک ترکیب بالقوه به عنوان نگهدارنده با افزایش فعالیت ضد باکتریایی در برنامه های غذایی مورد استفاده قرار گیرد. توجه به این نکته ضروری است که نتایج این مطالعه در شرایط آزمایشگاهی به دست آمده است و مطالعات بیشتری در مورد سمیت آنها (in vivo) جهت تأیید کاربرد در حوزه صنایع غذایی مورد نیاز است.

۱-مقدمه

با افزایش مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها و افزایش آگاهی مردم از ارتباط بین غذا و سلامتی انسان، مطالعات و بررسی‌های متعددی جهت پیداکردن عوامل آنتی‌باکتریال بالقوه صورت گرفته‌است. به همین منظور اخیرا ترکیبات طبیعی به‌ویژه اسانس‌های روغنی و عصاره‌های به دست آمده از گیاهان مورد توجه ویژه‌ای قرارگرفته‌اند. نتایج به دست آمده نشان داده‌است که ترکیبات ضدمیکروبی جدا شده از ترکیبات طبیعی می‌توانند باعث افزایش کارایی آنتی بیوتیک‌ها، بهبود سازوکار آن‌ها و جلوگیری از انطباق میکروارگانیسم‌ها با شرایط طبیعی شوند. ترکیبات زیست‌فعال و مغذی کم‌محلول و نامحلول فراوانی وجود دارد که برای سلامتی انسان ضروری هستند. از جمله این ترکیبات می توان به ترپن‌ها اشاره کرد که به طور جداگانه و یا به صورت هم‌افزایی با دیگر ترکیبات به منظور بهبود کارایی ترکیبات زیست‌فعال عمل می‌کنند [۱]. دی‌لیمونن یک ترکیب زیست‌فعال مایع و بدون رنگاز خانواده مونوترپن‌ها است[۲و ۱]. این ترکیب در تاریکی و دمای اتاق، نسبتا پایدار می‌باشد. اما در حضور نور، هوا، رطوبت و درجه حرارت بالا ناپایدار است [۳]. دی لیمونن به راحتی تحت تجزیه اکسیداتیو قرار می گیرد که در نهایت منجر به از دست رفتن عطر و طعم آن و ایجاد اپوکسید، کتون و الکل می شود[٤]. هم چنین این ماده دارای هیدروفوبیت[1] بالامی باشد که این ویژگی باعث حلالیت ضعیف آن در فاز های مایع می شود. بنابراین امروزه محققان به دنبال استفاده از برخی از روش های جدید برای افزایش حلالیت و محافظت از این ترکیب فرار در طول فرایند هستند. یکی از روش های مهم که می توان در این زمینه به کار برد، استفاده از روش نانو انکپسولاسیون است [۵]. نانوانکپسوله‌کردن با حامل‌های هیدروفیل یکی از راهکارهای افزایش حلالیت و زیست‌دستیابی و همچنین محافظت از این ترکیبات می‌باشد. نانوانکپسوله‌کردن باعث محافظت از ترکیبات ناپایدار در مقابل شرایط نامناسب در حین فرآوری، نگهداری و انتقال‌شده و افزایش کیفیت، پایداری و افزایش زیست‌دستیابی آنها در بدن خواهد شد. نانواسفنج‌ها می‌توانند به‌طور بالقوه در صنایع‌غذایی کاربرد گسترده‌ای داشته باشند. نانواسفنج‌های سیکلودکسترین به‌دلیل داشتن حفرات آب‌گریز و پوسته‌ی آب‌دوست و همچنین کارایی بارگذاری بالا حامل‌های مناسبی برای ترکیبات کم‌محلول و نامحلول می‌باشند. از طرفی چون نانواسفنج‌ها به صورت جامد هستند کاربرد آنها در محصولات غذایی و دارویی راحت‌تر است. روش آسان تولید نانواسفنج‌ها و همچنین سهولت تولید در مقیاس صنعتی یکی دیگر از مزایای استفاده از نانواسفنج‌ها به عنوان نانوحامل ترکیبات کم‌محلول و نامحلول می‌باشد[٦]. در سال های اخیر تحقیقات گسترده ای با به کارگیری نانوانکپسولاسیون برای افزایش خاصیت ضدمیکروبی دی لیمونن انجام شده است. در پژوهشی اثر ترکیبی دو مونوترپن دی‌لیمونن و کارواکرول را بر روی بیماری لیشمانیا[2] مورد بررسی قرار دادند. نتایج به دست آمده نشان داد که اثر ترکیبی این دو می توانند به عنوان یک گزینه ی مناسب جهت نانو درمانی این بیماری باشند[۷]. در تحقیق دیگری اثر ضد باکتریایی دی لیمونن هنگام کمپلکس با بتا سیکلودکسترین و هنگامی که با یک آنتی بیوتیک همراه است مورد بررسی و مقایسه قرار داده شد. بر اساس نتایج به دست آمده، اثر ضدمیکروبی دی لیمونن هنگام کمپلکس با بتاسیکلودکسترین افزایش چندانی در برابر سویه های گرم مثبت و گرم منفی از خود نشان نداد و همچنین هنگامی که با نورفلوکساسین و ایمیپنم همراه بود، اثرات متضاد یا ناچیز در برابر سویه های باکتریایی نشان داد. لازم به ذکر است مادامی که دی لیمونن با جنتامایسین استفاده شد، اثر سینرژیستی[3] بر روی باکتری های باسیلوس سرئوس و ا.کلای از خود نشان داد[۱]. پژوهش دیگری نشان داد، صمغ عربی می تواند به طور قابل توجهی پایداری فیزیکی دی لیمونن را افزایش دهد و از اکسیداسیون آن حتی در دمای بالا (۵۵ درجه سانتیگراد) محافظت کند. از طرفی به خاصیت ضد میکروبی و تاثیر مثبت دی لیمونن بر کاهش و مهار رشد میکرواورگانیسم ها اشاره شد[٤]. همچنین مطالعات متعددی پیرامون انکپسوله کردن ترکیبات طبیعی حساس به نور، دما و حلالیت پایین با زیست دست پذیری پایین در نانواسفنج صورت گرفته است.در پژوهشی با انکپسوله کردن فلوتامید در نانواسفنج های بر پایه بتاسیکلودکسترین محققان موفق به بهبود انحلال پذیری آن شدند. فلوتامید یک داروی ضد

1. Hydrophobic

2. leishmania
3. synergic

سرطان در درمان پروستات است که زیست یابی آن از طریق مصرف خوراکی پایین است[۸]. همچنین در گزارشی آمده است، با تلفیق کردن ارلوتنیب در نانواسفنج های سیکلودکسترین حلالیت و پایداری آن افزایش یافت. ارلوتنیب یک داروی ضد سرطان است که به دلیل حلالیت پایین و ناپایداری در شرایط معده و روده زیست دستیابی ضعیفی دارد[۹]. در پژوهشی با انکپسوله کردن ملوکسیکام در نانواسفنج های سیکلودکسترین حلالیت، پایداری و همچنین رهایش کنترل شده ی آن افزایش یافت[۱۰].

در طی پژوهشی، محققان با انکپسوله کردن اسانس دارچین در نانو اسفنج‌های سیکلودکسترین و ارزیابی فعالیت ضد میکروبی آن‌ها در برابر عوامل بیماری‌زای مواد غذایی بیان کردند که کمپلکس تولید شده نه تنها باعث محافظت از اسانس می شود بلکه عملکرد ضدباکتریایی اسانس را بهبود می دهد و این ترکیبات را به عنوان عوامل محصور کننده برای کاربردهای بسته‌بندی فعال مواد غذایی معرفی کردند[۱۱]. همچنین محققان با انکپسوله کردن اسید فرولیک در نانواسفنج بتاسیکلودکسترین و کاربرد آن در نوشیدنی آب انار و بررسی اثر ضدمیکروبی آن و همچنین پایش تغییرات رنگی و میزان آنتی اکسیدان های آب انار در مدت زمان مشخص، به این نتیجه رسیدند که خاصیت ضدمیکروبی فرولیک اسید پس از انکپسولاسیون افزایش و همین طور سبب حفظ ترکیبات آنتی اکسیدانی آب انار و حفظ رنگ آن می شود. با توجه به نتایج به دست آمده، آن ها چنین اذعان داشتن که فرولیک اسید انکپسوله شده در نانواسفنج بتاسیکلودکسترین به صورت بالقوه می تواند در آب میوه های حاوی آنتوسیانین برای بهبود پایداری آنها در طول ذخیره سازی مورد استفاده قرار گیرد[۱۲]. در پژوهشی دیگر، محققان با انکپسوله کردن اسانس گشنیز در نانوااسفنج بتاسیکلودکسترین علاوه بر ایجادیک سیستم آزادسازی کنترل‌شده پایدار، فعالیت ضد میکروبی آن در برابر پاتوژن‌های موجود در مواد غذایی را بهبود بخشیدند و بیان کردند که این ترکیب به عنوان یک استراتژی جدید و بالقوه برای غلبه بر اثر ضعیف بسته بندی مواد غذایی فعلی از نظر خاصیت ضدمیکروبی می تواند ارایه گردد[۱۳]. از آنجا که تاکنون پژوهشی جهت نانوانکپسوله کردن دی‌لیمونن در نانواسفنج بتاسیکلودکسترین جهت افزایش پایداری و حلالیت آن صورت نگرفته‌است لذا در این پژوهش بر آن شده‌ایم تا نانواسفنج‌های بتاسیکلودکسترین حاوی دی‌لیمونن که یک ترکیب زیست‌فعال است را تولید کرده و تغییرات میزان انحلال پذیری، کارایی انکپسولاسیون، ارزیابی خصوصیات ضد باکتریایی به روش انتشار از چاهک، تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی آن را مورد بررسی قرار دهیم. لازم به ذکر است که کنترل کیفیت و ایمنی مواد غذایی نقش حیاتی در سلامت انسان دارد و همواره یک رکن اساسی در تغذیه صحیح می باشد که به موازات آن کنترل ایمنی دقیق و مناسب در فرآیند تولید تا مصرف نیز، حائز اهمیت می باشد. غذا و هر آنچه در تولید غذا مورد استفاده قرار می گیرد در صورتی می تواند برای انسان مفید باشد و نیازش را برطرف کند که عاری از هر گونه خطری باشد، در غیر این صورت از جنبه های مختلف ضررهای جبران ناپذیری به فرد و جامعه تحمیل می کند. از آنجایی که تاکنون استاندارد و قوانینی پیرامون نانواسفنج های بتاسیکلودکسترین توسط سازمان استاندارد ایران و همچنین سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) وضع نشده است و با توجه به این نکته که ممکن در طی فرآیند سنتز کمپلکس اندازه ذرات در حد نانو درآیند یا دارای سمیت باشند، بنابراین کاربرد آن ها در فرمولاسیون مواد غذایی نیازمند انجام آزمونهای توکسیستی از جمله MTT، بررسی میزان آپوپتوز و نکروز احتمالی آن ها بر روی رده های سلولی مختلف و همچنین به کارگیری مدل های حیوانی با هدف عاری بودن خطرات سمی و ایمن بودن می باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد شیمیایی

بتاسیکلودکسترین و دی‌فنیل کربنات از شرکت سیگما آلدریچ[4] ایالت متحده آمریکا و اسانس دی‌لیمونن از شرکت مرک آلمان و محیط کشت‌های تریپتون سوی براث(TSB)[5]، مولر هینتون آگار(MHA)[6] و مولر هینتون براث(MHB)[7] از کیولب[8] کانادا

4. Sigma-Aldrich
5. Tryptone Soy Broth
6. Mueller Hinton Agar
7. Muller Hinton Broth
8. QUELAB

خریداری شد. سویه‌های باکتریایی اشرشیاکلای (ATCC:۳۵۱۵۰)، شیگلادیسانتری (ATCC:۱۲۰۲۲)، استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC:۲۵۹۲۳)، انتروکوکوس (ATCC (:۲۹۲۱۲ از انستیتو پاستور ایران تهیه شد.

۲-۲-تولید نانواسفنج بتادکسترین با استفاده از روش مذاب

جهت تولید نانواسفنج بتاسیکلودکسترین از روش مذاب استفاده شد. بدین منظور از بتاسیکلودکسترین و دی‌فنیل‌کربنات به عنوان عامل اتصال‌دهنده عرضی با نسبت‌های مولی مختلف ترکیب نانواسفنج: اتصال‌دهنده ۱:٤، ۱:٦و ۱:۸ استفاده شد. ابتدا دی‌فنیل کربنات به عنوان عامل ایجاد پیوند عرضی درون یک بشر ریخته و ذوب شد، سپس مقدار مشخصی از بتاسیکلودکسترین به آرامی به آن اضافه و به مدت ۵ ساعت در دمای۱۰۰-۹۰ درجه سانتی‌گراد توسط هم‌زن مغناطیسی همزده شد. پس از اتما مواکنش، ماده سفید رنگی به دست آمد که به منظور حذف مواد واکنش نداده، با آب (حذف سیکلودکسترین) و اتانول (حذف دی‌فنیل‌کربنات) با استفاده از کاغذ صافی شست‌وشو داده شد. سپس نمونه‌ها در آون در دمای ٤٥ درجه سانتی‌گراد خشک و ذخیره شدند[١٤].

۲-۳- انکپسوله کردن دی‌لیموننددرنانواسفنج بتاسیکلودکسترین

ابتدا نانواسفنج بتاسیکلودکسترین در۱۰ سی‌سی آب حل شد و بر روی هم‌زن مغناطیسی قرارگرفت. سپس نسبت‌های وزنی مختلف از دی‌لیمونن: نانواسفنج ۱:۲، ۱:٤و ۱:٦به محلول اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه به منظور ریزتر شدن اندازه ذرات اولتراسونیک شد. سپس محلول مورد نظر به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بر روی هم‌زن مغناطیسی همزده شد. به‌منظور جلوگیری از تابش نور، دور بشر محلول با فویل آلومینیومی پوشانده شد. پس از صرف زمان مورد نظر، سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۲۰۰۰ به منظور جدا کردن دی‌لیمونن بارگذاری شده و دی‌لیمونن بارگذاری نشده در نانواسفنج سانتریفوژ (Mpw nstrument - لهستان) شد. سپس مادەرویی[9] در دمای ٤٠- درجه سانتی‌گراد در دستگاه خشک‌کن انجمادی[10] خشک شد[۱۵].

۲-۳-۱- کارایی انکپسولاسیون

۱۰ میلی گرم از نمونه در ۱۰ میلی لیتر اتانول پراکنده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفوژ (Mpw nstrument - لهستان) با ۲۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت، پس از آن جذب مواد رویی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV در طول موج ۲۳۱ نانومتر خوانده شد. ظرفیت بارگذاری دی‌لیمونن نانوانکپسوله شده در نانواسفنج به ترتیب با استفاده از معادله ۱ و ۲ محاسبه شد[۱۵].

(۱)

$$\text{میزان بارگذاری} = \frac{\text{وزن دی لیمونن بارگذاری شده درنانو اسفنج}}{\text{وزن نانواسفنج کل} - \text{وزن کل دی لیمونن}} \times 100$$

(۲)

$$\text{کارایی انکپسولاسیون} = \frac{\text{وزن اسانس بارگذاری شده در نانواسفنج}}{\text{وزن اولیه‌لیمونن مورد براستفاده بارگذاری}} \times ۱۰۰$$

۲-۳-۲- حلالیت

بدین‌منظور، ۱۰ میلی گرم از کمپلکس در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر پراکنده و به مدت ٢٤ ساعت در دمای اتاق همزده شد.سپس نمونه‌ها با ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ (Mpw nstrument - لهستان) قرار گرفتند، در مرحله ی بعد میزان جذب موادرویی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری UV در طول موج ۲۳۱ نانومتر خوانده شد[۵].

۲-٤- ارزیابی ویژگی های ضد میکروبی

۲-٤-۱- آماده سازی باکتریهای استاندارد

ابتدا باکتری‌های مورد آزمایش از فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد خارج و به محیط TSB منتقل و به مدت ٢٤-۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. در مرحله بعد باکتری‌ها از محیط TSB به محیط MHA منتقل و به صورت خطی کشت داده شدند و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. پلیت‌های حاوی باکتری‌ها جهت استفاده در طول آزمایشات مختلف دردمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

9. supernatant
10. Freez dryer

۲-٤-۲- روش انتشار از چاهک در آگار

جهت اندازه‌گیری خاصیت ضدمیکروبی دی‌لیمونن به‌تنهایی و دی‌لیمونن انکپسوله‌شده در نانواسفنج بتاسیکلودکسترین از روش انتشار از چاهک در آگار استفاده شد. به همین جهت باکتری‌های مورد آزمایش با رقت نیم‌مک‌فارلند[11] توسط سواپ استریل به روش سطحی بر روی محیط کشت MHA کشت داده‌شدند. در هر پلیت پنج چاهک به قطر ٦ میلی‌متر به وسیله کرک‌بورر[12] ایجاد شد. در مرحله ی بعد غلظت های ۱/۵٦، ۳/۱۲، ٦/۲۵، ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از دی‌لیمونن به تنهایی ودی‌لیمونن انکپسوله شده در نانواسفنج تهیه شد. سپس در چاهک مربوط به هر باکتری، ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت ریخته‌شد و پلیت‌ها به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. پس از گذشت حداکثر ۲٤ ساعت قطر هاله‌ی عدم رشد باکتری با کولیس‌ورنیه با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. در این آزمون ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بیوتیک مروپنم (با رقت۱٦ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و پنی‌سیلین (با رقت ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به ترتیب برای باکتری‌های گرم‌منفی و گرم‌مثبت به عنوان کنترل مثبت در چاهک وسط استفاده شد. تمامی آزمایش‌های مربوط به ارزیابی قطر هاله‌ی عدم رشد باکتری‌ها در مورد هر نمونه و هر باکتری با سه بار تکرار صورت پذیرفت[١٦].

۲-٤-۳- تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)[13] و حداقل غلظت کشندگی رشد باکتری ها (MBC)[14]

حداقل مقدار ماده ضد میکروبی که رشد قابل مشاهده میکروارگانیسم را مهار می‌کند، به عنوان MICشناخته می‌شود. جهت تعیین حداقل غلظت بازدارنده‌ی رشد دی‌لیمونن به‌تنهایی و دی‌لیمونن انکپسوله شده در نانواسفنج از روش میکرودایلوشن‌براث استفاده شد.جهت انجام این آزمایش ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت MHB به هر کدام از چاهک‌های پلیت ۹٦ خانه‌ای اضافه شد. سپس در ستون اول هر ردیف، به‌ترتیب ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت(۵۰ v/v) ٤۲۰ و ۱/۳ میلی گرم بر میلی لیتر برای دی‌لیمونن و دی‌لیمونن انکپسوله شده اضافه شد. سپس رقت‌های دو-دویی مختلف ضمن مخلوط شدن نمونه‌ها با محیط کشت MHB تا رسیدن به غلظت‌های (۵۰ -۰/۰۹۷ v/v) و ٤۲۰-۰/۸۲ و ۰/۰۰۲۵- ۱/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دی‌لیمونن و دی‌لیمونن انکپسوله‌شده به‌ترتیب در میکروپلیت‌ها تهیه گردید. در مرحله‌ی بعد ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون هر باکتری با رقت 10^{7}CFU/ml (معادل رقت 5×10^{5} CFU/ml) به هر کدام از چاهک‌های حاوی MHB و دی‌لیمونن به‌تنهایی و یا دی‌لیمونن انکپسوله شده اضافه شد. سپس میکروپلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت اگرمخانه گذاری شدند. تراکم نوری۱۵ (OD) میکروپلیت‌ها قبل و بعد از گرمخانه‌گذاری درطول موج ٦۳۰ نانومتر در دستگاه Microplate Reader(Biotek -آمریکا) تعیین شد. مقایسه میزان کدورت‌های اندازه‌گیری شده در هر دو مرحله به‌عنوان حداقل غلظت مهار رشد باکتری‌ها تعیین شد. در این آزمایش، برای کنترل منفی از محیط کشت و برای کنترل رشد از محیط کشت و باکتری استفاده‌گردید. برای کنترل مثبت نیز از نانواسفنج به‌تنهایی استفاده شد.پس از تعیینMIC، از هر یک از چاهک‌های پلیت ۹٦ خانه‌ای که کدورت ظاهری حاصل از رشد باکتری‌ها را نشان نداده بودند ، با لوپ[16] استریل نمونه برداشته و بر سطح محیط کشت MHA کشت داده‌شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند.حداقل غلظتی از دی‌لیمونن به‌تنهایی و دی‌لیمونن نانو انکپسوله شده که سبب مهار رشد ۹۹/۹ درصد باکتری‌ها بر روی پلیت شد، به عنوان MBC گزارش شد. تمامی آزمایش‌های مربوط به تعیین MBC در مورد هر نمونه و هر باکتری با سه بار تکرار صورت پذیرفت[١٦].

۲-٤-٤- تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش و پس از جمع‌آوری وارد نرم افزار SPSS 20 شدند. برای تعیین اختلاف معنی داری از آزمون های T.test زوجی (برای متغییرهای پارامتری)و ویلکاکسون (برای متغییرهای ناپارامتری) برای مقایسه ی پارامترهای قبل و بعد از

11. 0.5 McFarland (108 CFU/ml)
12.Cork borer
13. Minimum Inhibitory Concentration
14. Minimum Bactericidal Concentration

15. Optical density
16. Loop

انکپسولاسیون استفاده شد. لازم به ذکر است که در این مطالعه میزان معنی داری در سطح P≤۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

۳- نتایج

۳-۱- کارایی انکپسولاسیون، میزان بار گذاری و میزان حلالیت

در این پژوهش از نسب‌های مولی مختلف دی‌فنیل‌کربنات به نانواسفنج (۱:٤ ، ۱:٦ ، ۱:۸) و نسبت‌های وزنی مختلف دی‌لیمونن به نانواسفنج (۱:۲ ، ۱:٤ ، ۱:٦) برای به‌دست آوردن بهترین نسبت انکپسولاسیون دی‌لیمونن استفاده شد. همان‌طور که در جدول (۳-۱) مشاهده می‌شود، حلالیت دی‌لیمونن در آب پس از انکپسولاسیون در نانواسفنج در تمامی نسبت‌ها به دلیل به دام افتادن دی‌لیمونن در حفره‌های آب‌گریز نانواسفنج افزایش یافته‌است. البته میزان حلالیت با افزایش نسبت دی‌لیمونن بهنانواسفنج (از ۱:۲ به ۱:٦) کاهش یافت که احتمالاً به دلیل حلالیت اشباع دی‌لیمونن در نانواسفنج در نسبت‌های بالاتر می‌باشد. همچنین اتصال‌دهنده‌ها می‌توانند نانوکانال‌های پیچیده‌ای را تشکیل دهند و از انکپسولاسیون دی‌لیمونن جلوگیری کنند. لازم به ذکر است که حلالیت دی لیمونن آزاد ۷/۵ میلی‌گرم است که پس از انکپسولاسیون ۱٥٤ برابر افزایش یافت که این افزایش نشان می‌دهد دی‌لیمونن به خوبی در نانواسفنج انکپسوله شده‌است. لازم به‌ذکر است که دیگر محققان نتایجی مبنی بر افزایش حلالیت ترکیبات کم‌محلول در نانواسفنج‌ها به دست آورده‌اند. بیشترین میزان بارگذاری و کارایی انکپسولاسیون در نسبت ۱:۲ مشاهده شد. احتمالا همان‌طور که در مورد حلالیت بیان شد، افزایش نسبت اتصال‌دهنده به نانواسفنج سبب کاهش میزان کارایی انکپسولاسیون و کارایی بارگذاری شده است. نتایج مربوط میزان بارگذاری و کارایی انکپسولاسیون در جدول (۳-۱) آورده شده است. با استناد به نتایج به دست آمده از میزان حلالیت، میزان بارگذاری و کارایی انکپسولاسیون نسبت مولی ۱:٤ (نانواسفنج به اتصال دهنده) و نسبت وزنی ۱:۲ (دی لیمونن به نانواسفنج) به عنوان نمونه بهینه جهت انجام آزمایشات بعدی انتخاب و مورد استفاده قرار گرفت. [۱۷-۲۰، ۱٥، ۹]. در گزارشاتی آمده است، محققان با انکپسوله کردن ترکیبات زیست فعالی همچون فلوتامید، دارچین و ارلوتنیب در نانواسفنج بتاسیکلودکسترین موفق به بهبود انحلال پذیری آن ها شدند [۱۷و ۹و ۸].

Table 1 Encapsulation efficiency, Loading capacity and solubilityof limonene loaded nanosponge(L-NS).

Proportion of CD[a]:DPC[b] (molar ratio)	Proportion of L[c]:NS[d] (weight ratio)	Encapsulation efficiency of L (%)	Loading capacity of L (%)	Solubility of L-NS
1:4	1:2	52.95 ± 1.16	26.4 ± 0.10	1161.60
	1:4	15.65 ± 0.46	3.9 ± 0.04	362.58
	1:6	11.36 ± 0.74	1.8 ± 0.06	312.73
1:6	1:2	10.74 ± 0.35	5.37 ± 0.08	217.12
	1:4	12.24 ± 0.44	3.06 ± 0.05	254.96
	1:6	8.96 ± 0.21	1.4 ± 0.03	915.46
1:8	1:2	13.12 ± 0.80	6.56 ± 0.07	381.26
	1:4	11.46 ± 0. 65	2.8 ± 0.05	366.08
	1:6	8.4 ± 0.30	1.3 ± 0.03	141.43

β-cyclodextrin (a), Diphenyl carbonate (b), limonene(c), nanosponge(d)

۳-۲- انتشار از چاهک در آگار[17]

نتایج روش انتشار از چاهک در آگار برای دی‌لیمونن در فرم آزاد و نانوانکپسوله شده در جدول۲ ارائه شده است. قطر هاله‌ی عدم رشد دی‌لیمونن در غلظت‌های ۱/٥٦، ۳/۱۲، ٦/۲٥، ۱۲/٥ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب برای باکتری *اشرشیاکلای* ۰، ۱۰/٥، ۱٤، ۱٥/٥ میلی‌متر، برای *شیگلادیسانتری* ۰، ۱۰، ۱۳ و ۱٥ میلی متر، برای *انتروکوکوس* ۰، ۰، ۱۲/٥ و ۱٤ میلی متر و برای *استافیلوکوکوس اورئوس* ۰، ۰، ۱۲ و ۱۳ میلی‌متر بوده است. همچنین قطر مهاری دی‌لیمونن بارگذاری شده در نانواسفنج در غلظت‌های ۱/٥٦، ۳/۱۲، ٦/۲٥، ۱۲/٥ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر به

17. Agar well diffution

ترتیب برای باکتری *اشرشیاکلای* ۱۱/۵، ۱۳، ۱۹/۵ و ۲۰/۵ میلی‌متر، برای *شیگلادیسانتری*۱۷، ۱۹، ۲۳/۵ و ۲۶/۵ میلی‌لیتر، برای *انتروکوکوس* ۱۲/۵، ۱۲/۵، ۱۶/۵ میلی‌لیتر و برای *استافیلوکوکوس‌اورئوس* ۱۲/۵، ۱۷/۵، ۱۹ و ۲۱/۵ میلی‌متر بوده است. براساس نتایج به دست آمده، دی لیمونن در فرم آزاد و انکپسوله شده از رشد سویه های گرم مثبت و گرم منفی ذکر شده جلوگیری می کند که در دی‌لیمونن انکپسوله شده تاثیر چشم‌گیرتری مشاهده شد ($P\leq$۰/۰۵). پژوهشگران دیگر با انکپسوله کردن اسانس آویشن در نانواسفنج بتاسیکلودکسترین موفق به کاهش مقدار MIC این اسانس نسبت به فرم آزاد آن شدند[۲۱]. همچنین دیگر محققان با انکپسوله کردن اسانس هایی مانند دارچین در نانواسفنج بتاسیکلودکسترین موفق به بهبود فعالیت ضدباکتریایی اسانس مورد نظر شدند [۱۷]. همچنین پژوهشگران با انکپسوله کردن اسانس روغنی گشنیز در نانواسفنج بتاسیکلودکسترین موفق به افزایش خاصیت ضدمیکروبی آن شدند[۱۳].

Table 2 Mean and standard deviation of the inhibition zone of limonene(L) and limonene loaded in nanosponge (L-NS)

Bacterium	Concentration (mg/ml)	Inhibition zone of positive control in plates containing L (mm)	Inhibition zone of free L (mm)	Inhibition zone of positive control in plates containing L-NS (mm)	Inhibition zone of L-NS (mm)	p.value
Escherichia coli	12.50	28.00 ± 0	15.50 ± 0.5	27.00 ± 0.5	20.50 ± 0.5	0.001[a]
	6.25		14.00 ± 0		19.50 ± 0.5	0.000[b]
	3.12		10.50 ± 0.5		13.00 ± 1	0.000[b]
	1.56		-		11.50 ± 0.5	0.000[a]
Shigella flexneri	12.50	34.00 ± 1	15.00 ± 1	37.00 ± 1	26.50 ± 0.5	0.000[a]
	6.25		13.00 ± 0		23.50 ± 0.5	0.000[a]
	3.12		10.00 ± 0		19.00 ± 1	0.000[b]
	1.56		-		17.00 ± 1	0.000[a]
Staphylococcus aureus	12.50	40.00 ± 1	14.00 ± 0	42.00 ± 1	21.50 ± 0.5	0.000[a]
	6.25		12.50 ± 0.5		19.00 ± 1	0.000[a]
	3.12		-		17.50 ± 0.5	0.000[b]
	1.56		-		12.50 ± 0.5	0.000[b]
Enterococcus	12.50	39.00 ± 0.5	13.00 ± 0	38.00 ± 0.5	16.50 ± 0.5	0.000[b]
	6.25		12.00 ± 0		12.50 ± 0.5	0.122[a]
	3.12		-		12.50 ± 0.5	0.000[a]
	1.56		-		10.00 ± 0	0.000[a]

[a] paired samples T.test
[b] Wilcoxon test
(P-value < 0.05)

۳-۳- نتایج حداقل غلظت بازدارندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی

نتایج حداقل غلظت بازدارندگی رشد(MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) دی‌لیمونن آزاد و دی‌لیمونن نانوانکپسوله شده در جدول ۳ و ٤ ارائه شده است. نتایج نشان داد MIC دی‌لیمونن در فرم آزاد برای باکتری‌های *اشرشیاکلای* و *شیگلادیسانتری* ۲۶/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای *استافیلوکوکوس‌اورئوس* و *استرپتوکوکوس* برابر با ۵۲/۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است. درحالی که MIC دی‌لیمونن انکپسوله‌شده برای باکتری‌های *اشرشیاکلای* و *شیگلادیسانتری* به ترتیب برابر با ۰/۱۶۲ و ۰/۰۸۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای *استافیلوکوکوس‌اورئوس* و *استرپتوکوکوس* به ترتیب برابر با ۰/۶۵۰ میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر بوده است. این مقادیر نشان دهنده ی کاهش چشم گیر MIC دی‌لیمونن انکپسوله‌شده در مقایسه با فرم آزاد آن می‌باشد. نتایج آزمایش MBC دی‌لیمونن در فرم آزاد برای *اشریشیاکلای*، *شیگلادیسانتری*، *استافیلوکوکوس‌اورئوس* و *انتروکوکوس* به ترتیب برابربا ۲۶/۲۵، ۵۲/۵۰، ۲۱۰، ٤۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. پس از انکپسوله کردن دی‌لیمونن در نانواسفنج مقادیر MBC برای *اشریشیاکلای* و *شیگلادیسانتری* به ترتیب برابر با ۰/۱۶۲ و ۰/۰۸۱ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر، و برای *استافیلوکوکوس‌اورئوس* و *انتروکوکوس* مقدار

۰/٦٥ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد. با استناد به مقادیر ذکر شده می‌توان نتیجه گرفت که دی‌لیمونن به خوبی در نانواسفنج انکپسوله شده است. لازم به ذکر است که بیشترین حساسیت را باکتری *شیگلادیسانتری* نشان داد که مقدار MIC و MBC آن نسبت به فرم آزاد دی‌لیمونن به ترتیب ۳۲٤ و ٦٤٨ مرتبه کاهش یافت. دراین آزمایش نانواسفنج به تنهایی خصوصیت ضدمیکروبی از خود نشان نداد. همچنین در بررسی های دیگری که بر روی فرولیک اسید انکپسوله در نانواسفنج بتاسیکلودکسترین صورت گرفته است، مشاهده شد میزان MIC فرولیک اسید پس از انکپسوله شدن نسبت به فرم آزاد آن کاهش یافت[۲۲]. در پژوهشی دیگر، محققان با انکپسوله کردن اسانس آویشن در نانواسفنج بتاسیکلودکسترین موفق به کاهش میزان MIC و MBC آن نسبت به فرم آزاد آن شدند[۲۱].

Table 3 Minimal inhibitory concentration (MIC) of L and L-NS

MIC			Bacterium
P-value	L-NS	L	
0.00 *	0.162	26.25	*Escherichia coli*
0.00 *	0.081	26.25	*Shigella flexneri*
0.00 *	0.65	52.5	*Staphylococcus aureus*
0.00 *	0.65	52.5	*Enterococcus*

*(P-value < 0.05)

Table 4 Minimal bactericidal concentration (MBC) of L and L-NS

MBC			Bacterium
P-value	L-NS	L	
0.00 *	0.162	26.25	*Escherichia coli*
0.00 *	0.081	52.5	*Shigella flexneri*
0.00 *	0.65	210	*Staphylococcus aureus*
0.00 *	0.65	420	*Enterococcus*

* (P-value < 0.05)

٤- نتیجه گیری

در این مطالعه، نانوانکپسوله کردن دی‌لیمونن درون نانواسفنج‌های مبتنی بر بتاسیکلودکسترین با موفقیت انجام شد. نتایج ما نشان داد که حلالیت دی‌لیمونن پس از انکپسوله شدن نسبت به فرم آزاد آن ١٥٤ برابر افزایش یافت که احتمالا به دلیل کاهش بلورینگی دی‌لیمونن و به دام افتادن آن درون ماتریس‌های نانو اسفنج است. مطالعه خواص ضد میکروبی نشان داد دی‌لیمونن به تنهایی و به صورت انکپسوله‌شده دارای فعالیت ضدمیکروبی در برابر سویه‌های اشرشیاکلای، شیگلادیسانتری، استافیلوکوکوس‌اورئوس و انتروکوکوس هست که دی‌لیمونن انکپسوله شده خاصیت ضدمیکروبی چشم‌گیرتری از خود نشان داد. باید اضافه کرد که نانواسفنج به تنهایی فعالیت ضدباکتریایی در برابر سویه‌های آزمایش شده نشان نداد. بدین ترتیب نتایج ما نشان می دهد که نانواسفنج بتاسیکلودکسترینیک حامل مناسب برای ترکیبات آب‌گریز و حساس است و کمپلکس سنتز شده می‌تواند به عنوان یک ترکیب بالقوه به عنوان نگهدارنده یا در فرمولاسیون‌های غذایی با افزایش فعالیت ضدباکتریایی در برنامه‌های غذایی مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به این نکته که ممکن در طی فرآیند سنتز کمپلکس اندازه ذرات در حد نانو درآیند یا دارای سمیت باشند، بنابراین کاربرد آن ها در فرمولاسیون مواد غذایی نیازمند انجام آزمونهای توکسیستی از جمله MTT، بررسی میزان آپوپتوز و نکروز احتمالی آن ها بر روی رده های سلولی مختلف و همچنین به کار گیری مدل های حیوانی با هدف عاری بودن خطرات سمی و ایمن بودن می باشد.

٥-منابع

[1] Costa MDS, Rocha JE, Campina FF, Silva ARP, Da Cruz RP, Pereira RLS, et al. Comparative analysis of the antibacterial and drug-modulatory effect of d-limonene alone and complexed with β-cyclodextrin. European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences. 2019;128:158-61.

[2] Aissou M, Chemat-Djenni Z, Yara-Varón E, Fabiano-Tixier A-S, Chemat F. Limonene as an agro-chemical building block for the synthesis and extraction of bioactive compounds. Comptes Rendus Chimie. 2017;20(4):346-58.

[3] Ghasemi S, Jafari S, Assadpour E, Khomeiri M. Nanoencapsulation of d-limonene within

nanocarriers produced by pectin-whey protein complexes. Food Hydrocolloids. 2017;77.
[4] Su J, Guo Q, Mao L, Gao Y, Yuan F. Effect of gum arabic on the storage stability and antibacterial ability of β-lactoglobulin stabilized d-limonene emulsion. Food Hydrocolloids. 2018;84:75-83.
[5] Ghasemi S, Jafari SM, Assadpour E, Khomeiri M. Nanoencapsulation of d-limonene within nanocarriers produced by pectin-whey protein complexes. Food Hydrocolloids. 2018;77:152-62.
[6] Shringirishi M, Prajapati SK, Mahor A, Alok S, Yadav P, Verma A. Nanosponges: a potential nanocarrier for novel drug delivery-a review. Asian Pacific Journal of Tropical Disease. 2014;4:S519-S26.
[7] Carvalho RdCVd, Sousa VCd, Santos LP, Santos ILd, Diniz RC, Rodrigues RRL, et al. Limonene-carvacrol: A combination of monoterpenes with enhanced antileishmanial activity. Toxicology in Vitro. 2021;74:105158.
[8] Allahyari S, Esmailnezhad N, Valizadeh H, Ghorbani M, Jelvehgari M, Ghazi F, et al. In-vitro characterization and cytotoxicity study of flutamide loaded cyclodextrin nanosponges. Journal of Drug Delivery Science and Technology. 2021;61:102275.
[9] Dora CP, Trotta F,Kushwah V, Devasari N, Singh C, Suresh S, et al. Potential of erlotinib cyclodextrin nanosponge complex to enhance solubility, dissolution rate, in vitro cytotoxicity and oral bioavailability. Carbohydr Polym. 2016;137:339-49.
[10] Shende PK, Gaud RS, Bakal R, Patil D. Effect of inclusion complexation of meloxicam with β-cyclodextrin- and β-cyclodextrin-based nanosponges on solubility, in vitro release and stability studies. Colloids and surfaces B, Biointerfaces. 2015;136:105-10.
[11] Simionato I, Domingues F, Nerín C, Silva F. Encapsulation of cinnamon oil in cyclodextrin nanosponges and their potential use for antimicrobial food packaging. Food and Chemical Toxicology. 2019;132:110647.
[12] Amani F, Rezaei A, Kharazmi M, Jafari S. Loading ferulic acid into β-cyclodextrin nanosponges; antibacterial activity, controlled release and application in pomegranate juice as a copigment agent. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2022;649:129454.
[13] Silva F, Caldera F, Trotta F, NerínC, Domingues FC. Encapsulation of coriander essential oil in cyclodextrin nanosponges: A new strategy to promote its use in controlled-release active packaging. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2019;56:102177.
[14] Tejashri G, Amrita B, Darshana J. Cyclodextrin based nanosponges for pharmaceutical use: a review. Acta pharmaceutica (Zagreb, Croatia). 2013;63(3):335-58.
[15] Rezaei A, Varshosaz J, Fesharaki M, Farhang A, Jafari SM. Improving the solubility and in vitro cytotoxicity (anticancer activity) of ferulic acid by loading it into cyclodextrin nanosponges. International journal of nanomedicine. 2019;14:4589-99.
[16] Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis. 2016;6(2):71-9.
[17] Simionato I, Domingues FC, Nerín C, Silva F. Encapsulation of cinnamon oil in cyclodextrin nanosponges and their potential use for antimicrobial food packaging. Food and Chemical Toxicology. 2019;132:110647.
[18] Ansari KA, Vavia PR, Trotta F, Cavalli R. Cyclodextrin-based nanosponges for delivery of resveratrol: in vitro characterisation, stability, cytotoxicity and permeation study. AAPS PharmSciTech. 2011;12(1):279-86.
[19] Pushpalatha R, Selvamuthukumar S, Kilimozhi D.Cross-linked, cyclodextrin-based nanosponges for curcumin delivery - Physicochemical characterization, drug release, stability and cytotoxicity. Journal of Drug Delivery Science and Technology. 2018;45:45-53.
[20] Torne S, Darandale S, Vavia P, Trotta F, Cavalli R. Cyclodextrin-based nanosponges: effective nanocarrier for tamoxifen delivery. Pharmaceutical development and technology. 2013;18(3):619-25.
[21] Rezaei A, Khavari S, Sami M. Incorporation of thyme essential oil into the β-cyclodextrin nanosponges: Preparation, characterization and antibacterial activity. Journal of Molecular Structure. 2021;1241:130610.
[22] Rezaei A. Encapsulation of ferulic acid into cyclodextrin nanosponges:antibacterial activity and controlled release2021.

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Evaluation of the antibacterial activity of encapsulated d-limonene inβ-cyclodextrin-based nanosponge

Salehi, A. [1], Rezaei, A. [2], Sami, M. [3*]

1. Ph.D. student ofHealth and Food Safety, Department of Food Hygiene and Quality Control, School of Nutrition and Food Sciences Nutrition Research Center, Food Security Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
2. Assistant Professor of Food Science and Technology, Department of Food Science and Technology, School of Nutrition and Food Science, Food Security Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
3. Associate Professor of Food Hygiene, Department of Food Science and Technology, School of Nutrition and Food Science, Food Security Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

ABSTRACT

Following the increasing resistance of bacteria to antibiotics and increasing public awareness of the relationship between food and human health, several studies have been conducted to find potential antimicrobial agents. D-limonene(L) is a liquid and a colorless bioactive compound of the terpene family that has high antioxidant and antimicrobial activity. Due to its low solubility, high volatility, and sensitivity to light, its applications in the food and pharmaceutical industries are limited. In this study, L was incorporated in β-cyclodextrin nanosponges (CD-NS) to overcome these limitations. For the preparation of L-NS, different molar ratios of β-CD and Diphenyl carbonate (DPC) as cross-linker (1:4, 1:6, and 1:8 of CD:DPC) and different ratios (w/w) of L: NS (1:2, 1:4, and 1:6) were prepared. The results showed the solubility of L increased after encapsulation in the nanosponges. Encapsulated L showed higher antibacterial activity compared to free L and minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration of L decreased 324 and 648 times after encapsulation. Our results propose that CD-NS is a suitable carrier for hydrophobic and sensitive compounds and L-NS can be used as a potential preservative with enhanced antibacterial activity in food applications. It is important to note that the results of this study were obtained in vitro and further studies related to their toxicity (in vivo) are needed for confirmation of their application in the era of nutrition and genomics.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2022/ 11/ 10
Accepted 2022/ 12/ 15

Keywords:

D-limonene,
Antibacterial,
β-cyclodextrin nanosponge,
encapsulation.

DOI: 10.22034/FSCT.19.132.355
DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.132.26.9

*Corresponding Author E-Mail:
masoud_sami@nutr.mui.ac.ir