



ارزیابی اثر ضد باکتریایی دی لیمونن نانوانکپسوله شده در نانواسفنج بتاسیکلودکسترین

عذرا صالحی^۱، عاطفه رضایی^۲، مسعود سامی^{۳*}

۱- دانشجوی دکترا بهداشت و ایمنی مواد غذایی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
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.

چکیده

اطلاعات مقاله

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 تربنها 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 ۱:۴، ۱:۶ و ۱:۸ بتاسیکلودکسترین به دی فنیل کربنات به عنوان اتصال دهنده عرضی و همچنین از نسبت های وزنی ۱:۲، ۱:۴ و ۱:۶ دی لیمونن به نانواسفنج استفاده شد. نتایج نشان داد حلالیت دی لیمونن پس از انکپسوله شدن در نانواسفنج بتاسیکلودکسترین ۱۵۴ 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 ۳۲۴ و ۶۴۸ مرتبه کاهش یافت. نتایج نشان داد که نانواسفنج بتاسیکلودکسترینیک حامل مناسب برای ترکیبات آبرگیز و حساس است و کمپلکس 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.

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

۱- مقدمه

با افزایش مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها و افزایش آگاهی مردم از ارتباط بین غذا و سلامتی انسان، مطالعات و بررسی‌های متعددی جهت پیدا کردن عوامل آنتی‌باکتریال بالقوه صورت گرفته‌است. به همین منظور اخیراً ترکیبات طبیعی به‌ویژه اسانس‌های روغنی و عصاره‌های به دست آمده از گیاهان مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته‌اند. نتایج به دست آمده نشان داده‌است که ترکیبات ضد میکروبی جدا شده از ترکیبات طبیعی می‌توانند باعث افزایش کارایی آنتی‌بیوتیک‌ها، 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 می‌توان 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 [۲ و ۱]. این ترکیب در تاریکی و دمای اتاق، نسبتاً پایدار می‌باشد. اما در حضور نور، هوا، رطوبت و درجه حرارت بالا ناپایدار است [۳]. دی‌لیمونن به راحتی تحت تجزیه اکسیداتیو قرار می‌گیرد که در نهایت منجر به از دست رفتن عطر و طعم آن و ایجاد اپوکسید، کتون و الکل می‌شود [۴]. هم چنین این ماده دارای هیدروفوبیت^۱ بالایی باشد که این ویژگی باعث حلالیت ضعیف آن در فازهای مایع می‌شود. بنابراین امروزه محققان به دنبال استفاده از برخی از روش‌های جدید برای افزایش حلالیت و محافظت از این ترکیب فرار در طول فرایند هستند. یکی از روش‌های مهم که می‌توان در این زمینه به کار برد، استفاده از روش نانو انکپسولاسیون است [۵]. نانوانکپسوله کردن با حامل‌های هیدروفیل یکی از راهکارهای افزایش حلالیت و زیست‌دستیابی و همچنین محافظت از این ترکیبات می‌باشد. نانوانکپسوله کردن باعث محافظت از ترکیبات ناپایدار در مقابل شرایط نامناسب در حین فرآوری، نگهداری و انتقال شده و افزایش کیفیت، پایداری و افزایش زیست‌دستیابی آنها در بدن خواهد شد. نانواسفنج‌ها می‌توانند به‌طور بالقوه در صنایع غذایی کاربرد گسترده‌ای داشته باشند. نانواسفنج‌های

سیکلودکسترین به دلیل 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 [۶]. در سال‌های اخیر تحقیقات گسترده‌ای با به کارگیری نانوانکپسولاسیون برای افزایش خاصیت ضد میکروبی دی‌لیمونن انجام شده است. در پژوهشی اثر ترکیبی دو مونوترپن دی‌لیمونن و کارواکرول را بر روی بیماری لیشمانیا^۲ مورد بررسی قرار دادند. نتایج به دست آمده نشان داد که اثر ترکیبی این دو می‌تواند به عنوان یک گزینه‌ی مناسب جهت نانو درمانی این بیماری باشد [۷]. در تحقیق دیگری اثر ضد باکتریایی دی‌لیمونن هنگام کمپلکس با بتا سیکلودکسترین و هنگامی که با یک آنتی‌بیوتیک همراه است مورد بررسی و مقایسه قرار داده شد. بر اساس نتایج به دست آمده، اثر ضد میکروبی دی‌لیمونن هنگام کمپلکس با بتا سیکلودکسترین افزایش چندانی در برابر سویه‌های گرم مثبت و گرم منفی از خود نشان نداد و همچنین هنگامی که با نورفلوکساسین و ایمپنم همراه بود، اثرات متضاد یا ناچیز در برابر سویه‌های باکتریایی نشان داد. لازم به ذکر است مادامی که دی‌لیمونن با جنتامایسین استفاده شد، اثر سینرژستی^۳ بر روی باکتری‌های باسیلوس سرئوس و ا.کلای از خود نشان داد [۱]. پژوهش دیگری نشان داد، صمغ عربی می‌تواند به طور قابل توجهی پایداری فیزیکی دی‌لیمونن 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 دی‌لیمونن بر کاهش و مهار رشد میکروارگانیسم‌ها اشاره شد [۴]. 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 نانواسفنج‌های بر پایه بتا سیکلودکسترین محققان موفق به بهبود انحلال پذیری آن شدند. فلوتامید یک داروی ضد

2. leishmania
3. synergic

1. Hydrophobic

و حلالیت آن صورت نگرفته است لذا در این پژوهش بر آن شده ایم تا نانواسفنج های بتاسیکلودکسترین حاوی دی‌لیمون که یک ترکیب زیست فعال 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 روش ها

۲-۱- مواد شیمیایی

بتاسیکلودکسترین و دی فنیل کرینات از شرکت سیگما آلدریچ^۴ ایالت متحده آمریکا و اسانس دی‌لیمون از شرکت مرک آلمان و محیط کشت های تریپتون سوی براث (TSB)^۵، مولر هیتون آگار (MHA)^۶ و مولر هیتون براث (MHB)^۷ از کیولب^۸ کانادا

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

سرطان در درمان پروستات است که زیست یابی آن از طریق مصرف خوراکی پایین است [۸]. همچنین در گزارشی آمده است، با تلفیق کردن ارلوتینیب در نانواسفنج های سیکلودکسترین حلالیت و پایداری آن افزایش یافت. ارلوتینیب 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 اسفنج های 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 بسته بندی 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 ضد میکروبی آن و همچنین پایش تغییرات رنگی و میزان آنتی اکسیدان های آب انار در مدت زمان مشخص، به این نتیجه رسیدند که خاصیت ضد میکروبی 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 نانواسفنج بتاسیکلودکسترین علاوه بر ایجادیک سیستم آزادسازی کنترل شده پایدار، فعالیت ضد میکروبی آن در برابر پاتوژن های 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 ضد میکروبی می تواند ارایه گردد [۱۳]. از آنجا که تاکنون پژوهشی جهت نانوانکپسوله کردن دی‌لیمون در نانواسفنج بتاسیکلودکسترین جهت افزایش پایداری

ماده رویی^۹ در دمای ۴۰- درجه سانتی گراد در دستگاه خشک کن انجام دادی^{۱۰} خشک شد [۱۵].

۲-۳-۱- کارایی آنکپسولاسیون

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 دی لیمون نانوآنکپسوله شده در نانوآسفنج به ترتیب با استفاده از معادله ۱ و ۲ محاسبه شد [۱۵].

(۱)

$$100 \times \frac{\text{وزن دی لیمون بارگذاری شده در نانو آسفنج}}{\text{وزن نانو آسفنج کل}} = \text{میزان بارگذاری}$$

(۲)

$$100 \times \frac{\text{وزن اسانس بارگذاری شده در نانو آسفنج}}{\text{وزن آنکپسولاسیون}} = \text{میزان بارگذاری}$$

۲-۳-۲- حلالیت

بدین منظور، ۱۰ میلی گرم از کمپلکس در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر پراکنده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق هم زده شد. سپس نمونه ها با ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه سانتریفوژ (Mpw nstrument - لهستان) قرار گرفتند، در مرحله ی بعد میزان جذب مواد رویی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری UV در طول موج ۲۳۱ نانومتر خوانده شد [۵].

۲-۴- ارزیابی ویژگی های ضد میکروبی

۲-۴-۱- آماده سازی باکتریهای استاندارد

ابتدا باکتری های مورد آزمایش از فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد خارج و به محیط TSB منتقل و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت گرمخانه گذاری شدند. در مرحله بعد باکتری ها از محیط TSB به محیط MHA منتقل و به صورت خطی کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. پلیت های حاوی باکتری ها جهت استفاده در طول آزمایشات مختلف در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

خریداری شد. سویه های باکتریایی اشرشیاکلاهی (ATCC:۳۵۱۵۰)، شیگلا دیسانتری (ATCC:۱۲۰۲۲)، استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC:۲۵۹۲۳)، اتروکوکوس (ATCC:۲۹۲۱۲) از انستیتو پاستور ایران تهیه شد.

۲-۲- تولید نانوآسفنج بتادکسترین با استفاده از

روش مذاب

جهت تولید نانوآسفنج بتاسیکلودکسترین از روش مذاب استفاده شد. بدین منظور از بتاسیکلودکسترین و دی فنیل کربنات به عنوان عامل اتصال دهنده عرضی با نسبت های مولی مختلف ترکیب نانوآسفنج: اتصال دهنده ۱:۴، ۱:۶ و ۱:۸ استفاده شد. ابتدا دی فنیل 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 دمای ۱۰۰-۹۰ درجه سانتی گراد توسط همزن مغناطیسی هم زده شد. پس از اتمام واکنش، ماده سفید رنگی به دست آمد که به منظور حذف مواد واکنش نداده، با آب (حذف سیکلودکسترین) و اتانول (حذف دی فنیل کربنات) با استفاده از کاغذ صافی شست و شو داده شد. سپس نمونه ها در آن در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد خشک و ذخیره شدند [۱۴].

۲-۳- آنکپسوله کردن دی لیمون در نانوآسفنج

بتاسیکلودکسترین

ابتدا نانوآسفنج بتاسیکلودکسترین در ۱۰ سی سی آب حل شد و بر روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. سپس نسبت های وزنی مختلف از دی لیمون: نانوآسفنج ۱:۲، ۱:۴، ۱:۶ و ۱:۸ به محلول اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه به منظور ریزتر شدن اندازه ذرات اولتراسونیک شد. سپس محلول مورد نظر به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد بر روی همزن مغناطیسی هم زده شد. به منظور 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 ۲۰۰۰ rpm به منظور جدا کردن دی لیمون بارگذاری شده و دی لیمون بارگذاری نشده در نانوآسفنج سانتریفوژ (Mpw nstrument - لهستان) شد. سپس

9. supernatant
10. Freez dryer

۲-۴-۲- روش انتشار از چاهک در آگار

جهت اندازه‌گیری خاصیت ضد میکروبی دی‌لیمون به‌تنهایی و دی‌لیمون انکپسوله‌شده در نانواسفنج بتاسیکلودکستین از روش انتشار از چاهک در آگار استفاده شد. به همین جهت باکتری‌های مورد آزمایش با رقت نیم‌مک‌فارلند^{۱۱} توسط سوپ استریل به روش سطحی بر روی محیط کشت MHA کشت داده شدند. در هر پلیت پنج چاهک به قطر ۶ میلی‌متر به وسیله کرک‌بورر^{۱۲} ایجاد شد. در مرحله ی بعد غلظت های ۱/۵۶، ۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از دی‌لیمون به تنهایی و دی‌لیمون انکپسوله شده در نانواسفنج تهیه شد. سپس در چاهک مربوط به هر باکتری، ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت ریخته‌شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. پس از گذشت حداکثر ۲۴ ساعت قطر هاله‌ی عدم رشد باکتری با کولیس‌ورنیه با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. در این آزمون ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بیوتیک مروپنم (با رقت ۱۶ 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 [۱۶].

۲-۴-۳- تعیین حداقل غلظت بازدارندگی^{۱۳} (MIC) وحداقل غلظت کشندگی رشد باکتری‌ها (MBC)^{۱۴}

حداقل مقدار ماده ضد میکروبی که رشد قابل مشاهده میکروارگانیسم را مهار می‌کند، به عنوان MIC شناخته می‌شود. جهت تعیین حداقل غلظت بازدارنده‌ی رشد دی‌لیمون به‌تنهایی و دی‌لیمون 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 ۹۶ خانه‌ای اضافه شد. سپس در ستون اول هر ردیف، به ترتیب ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت (۵۰ v/v) ۴۲۰ و ۱/۳ میلی‌گرم

بر میلی‌لیتر برای دی‌لیمون و دی‌لیمون 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) (۵۰ - ۰/۸۲) و (۰/۰۲۵ - ۱/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) دی‌لیمون و دی‌لیمون انکپسوله‌شده به ترتیب در میکروپلیت‌ها تهیه گردید. در مرحله‌ی بعد ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون هر باکتری با رقت ۱۰^۶CFU/ml (معادل رقت ۵×۱۰^۶ CFU/ml) به هر کدام از چاهک‌های حاوی MHB و دی‌لیمون به‌تنهایی و یا دی‌لیمون انکپسوله شده اضافه شد. سپس میکروپلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت اگرمنخانه گذاری شدند. تراکم نوری ۱۵ (OD) میکروپلیت‌ها قبل و بعد از گرمخانه‌گذاری در طول موج ۶۳۰ 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 استفاده گردید. برای کنترل مثبت نیز از نانواسفنج به‌تنهایی استفاده شد. پس از تعیین MIC، از هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای که کدورت ظاهری حاصل از رشد باکتری‌ها را نشان نداده بودند، با لوپ^{۱۶} استریل نمونه برداشته و بر سطح محیط کشت MHA کشت داده‌شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. حداقل غلظتی از دی‌لیمون به‌تنهایی و دی‌لیمون 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 [۱۶].

۲-۴-۴- 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 متغیرهای پارامتری) و ویلکاکسون (برای متغیرهای 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

که پس از انکپسولاسیون ۱۵۴ برابر افزایش یافت که این افزایش نشان می‌دهد دی لیمونن به خوبی در نانواسفنج انکپسوله شده است. لازم به ذکر است که دیگر محققان نتایجی مبنی بر افزایش حلالیت ترکیبات کم محلول در نانواسفنج‌ها به دست آورده‌اند. بیشترین میزان بارگذاری و کارایی انکپسولاسیون در نسبت ۱:۲ مشاهده شد. احتمالاً 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 (۱-۳) آورده شده است. با استناد به نتایج به دست آمده از میزان حلالیت، میزان بارگذاری و کارایی انکپسولاسیون نسبت مولی ۱:۴ (نانواسفنج به اتصال‌دهنده) و نسبت وزنی ۱:۲ (دی لیمونن به نانواسفنج) به عنوان نمونه بهینه جهت انجام آزمایشات بعدی انتخاب و مورد استفاده قرار گرفت. [۹، ۱۵، ۲۰-۱۷]. در گزارشاتی آمده است، محققان با انکپسوله کردن ترکیبات زیست فعالی همچون فلوتامید، دارچین و ارلوتیب در نانواسفنج بتاسیکلودکسترین موفق به بهبود انحلال پذیری آن‌ها شدند [۱۷ و ۹ و ۸].

انکپسولاسیون استفاده شد. لازم به ذکر است که در این مطالعه میزان معنی داری در سطح $P \leq 0.05$ در نظر گرفته شد.

۳- نتایج

۳-۱- کارایی انکپسولاسیون، میزان بارگذاری و میزان حلالیت

در این پژوهش از نسب‌های مولی مختلف دی فنیل کربنات به نانواسفنج (۱:۴، ۱:۶، ۱:۸) و نسبت‌های وزنی مختلف دی لیمونن به نانواسفنج (۱:۲، ۱:۴، ۱:۶) برای به دست آوردن بهترین نسبت انکپسولاسیون دی لیمونن استفاده شد. همان‌طور که در جدول (۱-۳) مشاهده می‌شود، حلالیت دی لیمونن در آب پس از انکپسولاسیون در نانواسفنج در تمامی نسبت‌ها به دلیل به دام افتادن دی لیمونن در حفره‌های آب‌گریز نانواسفنج افزایش یافته است. البته میزان حلالیت با افزایش نسبت دی لیمونن به نانواسفنج (از ۱:۲ به ۱:۶) کاهش یافت که احتمالاً به دلیل حلالیت اشباع دی لیمونن در نانواسفنج در نسبت‌های بالاتر می‌باشد. همچنین اتصال‌دهنده‌ها می‌توانند نانوکانال‌های پیچیده‌ای را تشکیل دهند و از انکپسولاسیون دی لیمونن جلوگیری کنند. لازم به ذکر است که حلالیت دی لیمونن آزاد ۷/۵ میلی گرم است

Table 1 Encapsulation efficiency, Loading capacity and solubility of 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
	1:2	52.95 ± 1.16	26.4 ± 0.10	1161.60
1:4	1:4	15.65 ± 0.46	3.9 ± 0.04	362.58
	1:6	11.36 ± 0.74	1.8 ± 0.06	312.73
	1:2	10.74 ± 0.35	5.37 ± 0.08	217.12
1:6	1:4	12.24 ± 0.44	3.06 ± 0.05	254.96
	1:6	8.96 ± 0.21	1.4 ± 0.03	915.46
	1:2	13.12 ± 0.80	6.56 ± 0.07	381.26
1:8	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)

میلی گرم بر میلی لیتر به ترتیب برای باکتری اشرشیاکالی ۰، ۱۰/۵، ۱۴، ۱۵/۵ میلی متر، برای شیگلادیسانتری ۰، ۱۰، ۱۳ و ۱۵ میلی متر، برای انتروکوکوس ۰، ۰، ۱۲/۵ و ۱۴ میلی متر و برای استفیلوکوکوس اورئوس ۰، ۰، ۱۲ و ۱۳ میلی متر بوده است. همچنین قطر مهاری دی لیمونن بارگذاری شده در نانواسفنج در غلظت‌های ۱/۵۶، ۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر به

۳-۲- انتشار از چاهک در آگار^{۱۷}

نتایج روش انتشار از چاهک در آگار برای دی لیمونن در فرم آزاد و نانوانکپسوله شده در جدول ۲ ارائه شده است. قطر هاله‌ی عدم رشد دی لیمونن در غلظت‌های ۱/۵۶، ۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵

17. Agar well diffusion

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 ضد میکروبی آن شدند [۱۳].

ترتیب برای باکتری *اشرشیاکلاهی* 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 *استافیلوکوکوس اورئوس* ۱۲/۵، ۱۷/۵، ۱۹ و ۲۱/۵ میلی‌متر بوده است. براساس نتایج به دست آمده، دی‌لیمونن 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 ($P \leq 0.05$). پژوهشگران دیگر با

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
<i>Escherichia coli</i>	12.50		15.50 ± 0.5		20.50 ± 0.5	0.001 ^a
	6.25		14.00 ± 0		19.50 ± 0.5	0.000 ^b
	3.12	28.00 ± 0	10.50 ± 0.5	27.00 ± 0.5	13.00 ± 1	0.000 ^b
	1.56		-		11.50 ± 0.5	0.000 ^a
<i>Shigella flexneri</i>	12.50		15.00 ± 1		26.50 ± 0.5	0.000 ^a
	6.25		13.00 ± 0		23.50 ± 0.5	0.000 ^a
	3.12	34.00 ± 1	10.00 ± 0	37.00 ± 1	19.00 ± 1	0.000 ^b
	1.56		-		17.00 ± 1	0.000 ^a
<i>Staphylococcus aureus</i>	12.50		14.00 ± 0		21.50 ± 0.5	0.000 ^a
	6.25	40.00 ± 1	12.50 ± 0.5	42.00 ± 1	19.00 ± 1	0.000 ^a
	3.12		-		17.50 ± 0.5	0.000 ^b
	1.56		-		12.50 ± 0.5	0.000 ^b
<i>Enterococcus</i>	12.50		13.00 ± 0		16.50 ± 0.5	0.000 ^b
	6.25	39.00 ± 0.5	12.00 ± 0	38.00 ± 0.5	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)

ترتیب برابر با ۰/۱۶۲ و ۰/۰۸۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استرپتوکوکوس* به ترتیب برابر با ۰/۶۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است. این مقادیر نشان دهنده ی کاهش چشم گیر MIC دی‌لیمونن انکپسوله شده در مقایسه با فرم آزاد آن می‌باشد. نتایج آزمایش MBC دی‌لیمونن در فرم آزاد برای *اشرشیاکلاهی*، *شیگلادیسانتری*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *انتروکوکوس* به ترتیب برابر با ۲۶/۲۵، ۵۲/۵۰، ۲۱۰، ۴۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. پس از انکپسوله کردن دی‌لیمونن در نانواسفنج مقادیر MBC برای *اشرشیاکلاهی* و *شیگلادیسانتری* به ترتیب برابر با ۰/۱۶۲ و ۰/۰۸۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، و برای *استافیلوکوکوس اورئوس* و *انتروکوکوس* مقدار

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 ۴ ارائه شده است. نتایج نشان داد MIC دی‌لیمونن در فرم آزاد برای باکتری‌های *اشرشیاکلاهی* و *شیگلادیسانتری* ۲۶/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استرپتوکوکوس* برابر با ۵۲/۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است. درحالی که MIC دی‌لیمونن انکپسوله شده برای باکتری‌های *اشرشیاکلاهی* و *شیگلادیسانتری* به

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].

۰/۶۵ میلی گرم در میلی لیتر به دست آمد. با استناد به مقادیر ذکر شده می توان نتیجه گرفت که دی لیمونن به خوبی در نانواسفنج انکپسوله شده است. لازم به ذکر است که بیشترین حساسیت را باکتری شیگلادیسانتیری نشان داد که مقدار MIC و MBC آن نسبت به فرم آزاد دی لیمونن به ترتیب ۳۲۴ و ۶۴۸ مرتبه کاهش یافت. در این آزمایش نانواسفنج به تنهایی خصوصیت ضد میکروبی از خود نشان نداد. همچنین در بررسی های دیگری

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

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

*(P-value < 0.05)

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

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

*(P-value < 0.05)

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.

۵- 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

۴- نتیجه گیری

در این مطالعه، نانوانکپسوله کردن دی لیمونن درون نانواسفنج های مبتنی بر بتاسیکلودکسترین با موفقیت انجام شد. نتایج ما نشان داد که حلالیت دی لیمونن پس از انکپسوله شدن نسبت به فرم آزاد آن ۱۵۴ برابر افزایش یافت که احتمالاً به دلیل کاهش بلورینگی دی لیمونن و به دام افتادن آن درون ماتریس های نانو اسفنج است. مطالعه خواص ضد میکروبی نشان داد دی لیمونن به تنهایی و به صورت انکپسوله شده دارای فعالیت ضد میکروبی در برابر سویه های اشرشیاکلائی، شیگلادیسانتیری، استافیلوکوکوس اورئوس و انتروکوکوس هست که دی لیمونن انکپسوله شده خاصیت ضد میکروبی چشم گیری از خود نشان داد. باید اضافه کرد که نانواسفنج به تنهایی فعالیت ضد باکتریایی در برابر سویه های آزمایش شده نشان نداد. بدین ترتیب نتایج ما نشان می دهد که نانواسفنج بتاسیکلودکسترینیک حامل مناسب برای ترکیبات آب گریز و حساس است و کمپلکس سنتز شده می تواند به عنوان یک ترکیب بالقوه به عنوان نگهدارنده یا در فرمولاسیون های غذایی با افزایش فعالیت ضد باکتریایی در برنامه های غذایی مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به این نکته که ممکن در طی فرآیند

- [13] Silva F, Caldera F, Trotta F, Nerin C, 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] Balouri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2016;6(2):71-9.
- [17] Simionato I, Domingues FC, Nerin 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 release 2021. 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, Nerin 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.



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

Salehi, A. ¹, Rezaei, A. ², Sami, M. ^{3*}

1. Ph.D. student of Health 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