

# بهینه‌سازی نانو کپسولاسیون کارواکرول و تیمول در پلیمر کیتوسان به روش

## سطح پاسخ (RSM)

فاطمه صداقت<sup>۱</sup>، مرتضی یوسف‌زادی<sup>۲\*</sup>، آرش قادری<sup>۳</sup>، فاطمه شایسته<sup>۴</sup>

۱- گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده‌ی علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه قم، قم، ایران

۳- گروه شیمی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

۴- گروه شیلات، دانشکده‌ی علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

Morteza 110110@gmail.com

دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۲۲

پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۲

### چکیده

فراریت اسانس‌ها و ناپایداری آن‌ها در برابر عوامل محیطی، موجب محدودیت استفاده از آن‌ها می‌شود. با این وجود، کپسوله کردن در نانوذرات پلیمری می‌تواند به‌طور قابل توجهی نیمه عمر این ترکیبات را افزایش دهد و استفاده از آن‌ها را به مدت طولانی‌تری، امکان‌پذیر کند. در میان انواع پلیمرهای مورد استفاده در کپسولاسیون اسانس‌ها، پلیمر زیست‌تخریب‌پذیر کیتوسان به دلیل سمیت پایین و رهایش کنترل شده بسیار مورد توجه است. از این رو، پژوهش حاضر با هدف نانو کپسولاسیون کارواکرول و تیمول در کیتوسان با تکنیک ژل‌سازی یونی انجام شد. این پژوهش، با در نظر گرفتن سه متغیر غلظت کیتوسان (۰/۱-۰/۳ در صد)، غلظت TPP (۰/۱-۰/۲ در صد) و غلظت اسانس (۰/۱-۰/۲ در صد)، متوسط اندازه‌ی نانوذرات با استفاده از روش سطح پاسخ و طرح مرکب مرکزی بهینه‌سازی شد. توزیع اندازه‌ی ذرات و شاخص پراکندگی (PDI) نانوفرمولاسیون‌های آماده‌سازی شده به کمک آنالیز DLS، تأیید بارگیری اسانس با آنالیز FTIR و بازدهی کپسولاسیون به روش اسپکتروفتومتری تعیین شد. در ادامه، نتایج حاصل از بهینه‌سازی سنتز نانوذرات مورد بررسی قرار گرفت که بر این اساس، شرایط بهینه‌ی سنتز نانوذرات کیتوسان-تیمول و دستیابی به سایز ۱۰۱ نانومتر و بازدهی کپسولاسیون ۷۲ در صد، غلظت ۰/۱۱ در صد کیتوسان، ۰/۱۹ در صد TPP و ۰/۱۴ در صد تیمول تعیین شد. در مورد نانوذرات کیتوسان-کارواکرول، غلظت ۰/۱۳ در صد کیتوسان، ۰/۱۹ در صد TPP و ۰/۱۵ در صد کارواکرول منجر به تشکیل نانوذراتی با سایز ۹۵ نانومتر و بازدهی کپسولاسیون ۶۵ درصد شد. به طور کلی، نتایج این مطالعه توانایی روش سطح پاسخ برای پیش‌بینی اندازه و پراکندگی ذرات نانوفرمولاسیون‌های کیتوسان حاوی کارواکرول و تیمول را نشان داد.

کلید واژگان: نانو کپسولاسیون، تیمول، کارواکرول، کیتوسان، روش سطح پاسخ

اسپری درای یا ژل‌سازی یونی انجام شده است. پژوهش‌های اخیر، بارگیری ترکیبات زیست‌فعال -حساس مانند داروهای چربی‌دوست، ویتامین‌ها، مواد مغذی، پروتئین‌ها و ترکیبات فنولی چون کارواکرول و تیمول را در نانوذرات کیتوسان به روش ژل‌سازی یونی نشان می‌دهند. این روش که بر پایه‌ی برهمکنش الکترواستاتیک بین گروه‌های آمین آزاد کیتوسان و گروه‌های پلی‌آنیون تری‌پلی‌فسفات است، باعث تشکیل هیدروژلی از میکروذرات یا نانوذرات می‌شود که می‌تواند برای کپسوله کردن و یا رهایش کنترل شده‌ی داروها و ترکیبات مختلف استفاده شوند [۸ و ۹].

کارواکرول، یک مونوترپن فنولی<sup>۱</sup> مایع با فرمول ساختاری ۵- ایزوپروپیل -۲- متیل فنول<sup>۲</sup> و فرمول شیمیایی  $C_{10}H_{14}O$  می‌باشد که در آب نامحلول بوده اما در اتانول، استون و دی‌اتیل‌اتر بسیار محلول می‌باشد. این ترکیب، از اجزاء اصلی اسانس گیاه مرزنجوش<sup>۳</sup> است و شکل تجاری آن به وسیله‌ی روش‌های شیمیایی و زیستی سنتز می‌شود [۱۰].

تیمول که با نام هیدروکسی سایمن<sup>۴</sup> نیز شناخته می‌شود، همانند کارواکرول یک ترکیب فنولی مونوترپن است که حلالیت بسیار پایینی در آب دارد. فرمول شیمیایی تیمول مشابه با کارواکرول است و تنها تفاوت آن در جایگاه گروه هیدروکسیل می‌باشد. در مطالعات مختلف، خواص متنوع زیستی و دارویی مانند ضدقارچ، ضدحشره، ضدباکتری، ضدبیوفیلم، ضدالتهاب، ضدسرطان، آنتی‌اکسیدان و غیره برای این ترکیبات گزارش شده است [۱۱ و ۱۲].

علی‌رغم قابلیت‌های بسیار، استفاده از تیمول و کارواکرول به دلیل ماهیت لیپوفیلی (که حل کردن آن‌ها را در محلول‌های آبی مشکل می‌سازد)، همچنین، فراریت و ناپایداری (که منجر به تبخیر و تجزیه‌ی آن‌ها می‌شود)، با

نانوذرات پلیمری به دلیل خصوصیات عملکردی مناسب، توجه زیادی را در تمامی حوزه‌ها (صنایع داروسازی، آرایشی-بهداشتی، غذایی و زیست‌پزشکی) به خود معطوف کرده‌اند [۱]. این نانوذرات، به‌عنوان یک پوشش یا پوسته، برای محافظت از ترکیبات زیست‌فعال بارگذاری شده در مقابل نور، گرما و اکسیژن استفاده می‌شوند [۲]. علاوه بر این، به‌عنوان یک حامل برای رساندن ترکیبات زیستی به اندام‌های هدف و به‌طور همزمان کنترل رهایش ترکیبات برای دستیابی به یک سطح درمانی مؤثر طولانی‌مدت عمل می‌کنند. از دیگر عملکردهای نانوذرات پلیمری می‌توان به افزایش فراهمی زیستی ترکیبات آب‌گریز اشاره کرد [۳].

گستره‌ی وسیعی از پلیمرهای طبیعی و سنتزی برای کپسولاسیون ترکیبات زیست‌فعال مورد استفاده قرار گرفته‌اند، که در این میان، پلیمر کیتوسان در مقایسه با سایرین بسیار مورد توجه است [۴]. کیتوسان با نام علمی پلی  $\beta$ -(۱,۴)-۲- آمینو-۲- داکسی- D- گلوکوپیرانوز، کو پلیمری از  $\beta$ -(۱,۴)-۲- آمینو-۲- داکسی- D-  $\beta$ - گلوکان و  $\beta$ -(۱,۴)-۲- آمینو-۲- داکسی- D-  $\beta$ - گلوکان می‌باشد که از فرایند استیل‌زدایی کیتین (فراوان‌ترین پلی ساکارید طبیعی بعد از سلولز) حاصل می‌شود. این پلیمر در هر حلقه گلوکز، یک گروه آمین آزاد و دو گروه هیدروکسی آزاد دارد [۵]. کیتوسان به‌دلیل زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری، غیر سمی بودن، هزینه‌ی پایین و فعالیت ضد باکتری به وفور در توسعه‌ی سیستم‌های دارورسانی استفاده می‌شود [۶].

تاکنون، روش‌های مختلفی برای کپسوله کردن ترکیبات زیستی در نانوذرات کیتوسان توسعه یافته است [۷]، اما جست و جو در بانک‌های اطلاعاتی نشان می‌دهد که در اکثر گزارشات موجود، کپسولاسیون با استفاده از دو روش

<sup>3</sup> *Origanum vulgare*

<sup>4</sup> Hydroxy cymene

<sup>1</sup> Phenolic monoterpeneoid

<sup>2</sup> 5- isopropyl- 2- methylphenol

## ۱-۲ بهینه‌سازی

برای بهینه‌سازی سنتز نانوذرات از روش سطح پاسخ استفاده شد. برای این کار، طرح مرکب مرکزی با نرم‌افزار Design expert 11.1.0.1، با سه سطح و در قالب ۲۰ آزمایش به کار گرفته شد. سه متغیر مستقل غلظت کیتوسان (A:CS)، غلظت تری‌پلی‌فسفات (B:TPP) و غلظت اسانس (C: EO) به‌عنوان مهم‌ترین متغیرها انتخاب و با توجه به مطالعات پیشین، محدوده‌ی این متغیرها تعیین شد.

محدودیت‌هایی روبه‌رو است. کپسوله کردن در نانوذرات پلیمری می‌تواند روشی مؤثر برای غلبه بر این محدودیت‌ها برای افزایش عمر مفید و حفظ خصوصیات عملکردی این ترکیبات باشد. آزادسازی مؤثر کارواکرول و تیمول نیز با کپسولاسیون انتظار می‌رود [۱۵-۱۳]. از این‌رو، در پژوهش حاضر ساخت و بهینه‌سازی نانوذرات کیتوسان حاوی کارواکرول و تیمول با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM)<sup>۵</sup> و طرح مرکب مرکزی (CCD)<sup>۶</sup> بررسی شد.

## ۲- مواد و روش‌ها

جدول ۱ مقادیر متغیرهای مستقل و چیدمان آزمایش‌های طراحی شده به روش سطح پاسخ

پاسخ	فاکتور ۳	فاکتور ۲	فاکتور ۱	Run
Size	C: EO	B: TPP	A:CS	
nm	%	%	%	
	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۱
	۰/۱۵	۰/۲	۰/۲	۲
	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۲	۳
	۰/۱	۰/۱	۰/۳	۴
	۰/۲	۰/۱۵	۰/۲	۵
	۰/۲	۰/۱	۰/۱	۶
	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۲	۷
	۰/۱	۰/۱۵	۰/۲	۸
	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۲	۹
	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۲	۱۰
	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱	۱۱
	۰/۱	۰/۲	۰/۱	۱۲
	۰/۲	۰/۲	۰/۳	۱۳
	۰/۲	۰/۱	۰/۳	۱۴
	۰/۲	۰/۲	۰/۱	۱۵
	۰/۱	۰/۲	۰/۳	۱۶
	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۲	۱۷
	۰/۱۵	۰/۱	۰/۲	۱۸
	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۳	۱۹
	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۲	۲۰

<sup>6</sup> Central Composite Design (CCD)

<sup>5</sup> Response Surface Methodology (RSM)

برای تعیین اندازه و پراکندگی ذرات<sup>۷</sup> نانوفرمولاسیون‌های آماده‌سازی شده از دستگاه DLS (Nano Partica SZ-100, Horiba, Japan)<sup>۸</sup> استفاده شد.

## ۲-۳ تعیین در صد کارواکرویل و تیمول بارگذاری شده در نانوذرات کیتوسان

برای تعیین بازدهی کپسولاسیون (EE%)<sup>۹</sup> فرمولاسیون منتخب، مقدار اسانس آزاد بارگیری نشده با استفاده از فرایند سانتیفریوژ ارزیابی شد. به این منظور، نمونه‌ها در میکروتیوپ دو میلی‌لیتری ریخته شده و در سانتیفریوژ یخچال‌دار با دور ۱۸۰۰۰ rpm و دمای چهار درجه سانتی‌گراد، به مدت ۲۰ دقیقه سانتیفریوژ شدند. سپس، فاز رویی برداشته شد و جذب آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ماکزیمم به‌دست آمده برای کارواکرویل و تیمول (۲۷۴ نانومتر) قرائت شد. درنهایت، برای تعیین مقدار اسانس موجود در فاز رویی، عدد جذب نمونه‌ی مجهول در معادله‌ی رگرسیون به‌دست آمده از منحنی استاندارد اسانس موردنظر قرار داده شد و مقدار EE% از رابطه ۱ محاسبه شد [۱۶ و ۱۷].

رابطه ۱:

= درصد اسانس بارگیری شده  
 $100 \times \text{مقدار اسانس اولیه} / \text{مقدار اسانس آزاد-مقدار اسانس اولیه}$

## ۲-۴ تصدیق بارگیری اسانس درون نانوذرات کیتوسان با آنالیز FTIR

برای بررسی ساختار شیمیایی نانوذرات سنتز شده و همچنین تصدیق بارگیری اسانس در نانوفرمولاسیون منتخب از آنالیز FTIR استفاده شد. به این منظور، طیف جذبی نانوفرمولاسیون منتخب، فرمولاسیون بدون اسانس و همچنین اسانس در گستره‌ی عدد موج  $4000 - \text{cm}^{-1}$  بررسی شد.

## ۳- نتایج

طرح مرکب مرکزی در طراحی آزمون شامل شش تکرار در نقطه‌ی مرکزی (برای تخمین خطای آزمایش)، یک نقطه‌ی فاکتوریل و یک نقطه‌ی محوری بوده و برای هر نقطه، متوسط اندازه‌ی نانوذرات پلیمری (Size) به‌عنوان پاسخ در نظر گرفته شد. معنی‌دار بودن ضرایب مدل‌های ارائه شده توسط نرم‌افزار، از طریق بررسی p-value و کیفیت مدل‌های مناسب از طریق بررسی ضریب همبستگی ( $R^2$ ) و ضریب همبستگی تنظیم شده ( $R^2_{\text{adjusted}}$ ) بررسی شد. همچنین، برای بررسی تصویری و گرافیکی تأثیرات متغیرهای مستقل، از طرح‌های دو بعدی و سه بعدی استفاده شد. در جدول ۱، مقادیر متغیرهای مستقل و چیدمان آزمایش‌های طراحی شده نشان داده شده است.

## ۲-۲ نانوکپسولاسیون کارواکرویل و تیمول درون کیتوسان

برای آماده‌سازی نانوذرات، از روش ژل‌سازی یونی با اندکی تغییر استفاده شد. بدین منظور، ابتدا محلول کیتوسان با انحلال پودر کیتوسان در محلول آبی استیک اسید (یک درصد (حجمی/حجمی)) تهیه و با دور ۱۸۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه سانتیفریوژ شد. سپس، به فاز رویی محلول حاصل، توئین ۸۰ اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از سرد شدن، کارواکرویل و تیمول در غلظت‌های مشخص به محلول در حال استیرا اضافه شد و عمل هم‌زدن به مدت ۲۰ دقیقه ادامه یافت. در ادامه، برای تشکیل نانوذرات، محلول آبی TPP به‌صورت قطره-قطره به امولسیون روغن در آب حاصل اضافه شد و به مدت یک ساعت دیگر با همزن مغناطیسی هم‌زده شد [۱۳].

## بررسی اندازه و شاخص پراکندگی نانوفرمولاسیون‌های آماده‌سازی شده

<sup>۹</sup> Encapsulation efficiency

<sup>۷</sup> Polydispersity index

<sup>۸</sup> Dynamic light scattering

۳-۱ بررسی آماری نتایج به دست آمده توسط نرم افزار آزمایشات طراحی شده برای نانوکبسولاسیون تیمول و کارواکرول درون کیتوسان به همراه پاسخ به دست آمده (سایز نانوذرات) به ترتیب در جدول ۲ و ۳ آورده شده

است. مطابق با نتایج، سایز نانوذرات در تیمارهای مختلف تفاوت‌های آشکاری را نشان داد، به طوری که در نانوذرات کیتوسان-تیمول از ۱۱۸ تا ۴۹۰ نانومتر و در نانوذرات کیتوسان-کارواکرول از ۱۱۵ تا ۵۱۴ نانومتر متفاوت بود.

جدول ۲ تیمارهای به کار گرفته شده در سنتز نانوذرات کیتوسان- تیمول به همراه پاسخ به دست آمده

پاسخ	فاکتور ۳	فاکتور ۲	فاکتور ۱
Size	C: EO	B: TPP	A: CS
nm	%	%	%
۲۵۰/۵	۰/۲	۰/۱۵	۰/۲
۱۹۶/۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۲
۲۰۱/۷	۰/۱	۰/۱۵	۰/۲
۳۵۵	۰/۱	۰/۱	۰/۳
۱۴۳/۸	۰/۱۵	۰/۲	۰/۲
۱۲۲/۹	۰/۱	۰/۲	۰/۱
۲۳۷/۶	۰/۱	۰/۲	۰/۳
۱۹۱/۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۲
۴۹۰	۰/۲	۰/۱	۰/۳
۲۱۵/۱	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۲
۲۹۷/۶	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۳
۱۵۷/۱	۰/۲	۰/۱	۰/۱
۳۱۷/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۳
۱۹۱/۸	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۲
۲۰۰/۲	۰/۱۵	۰/۱	۰/۲
۲۲۰	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۲
۱۱۸/۸	۰/۱	۰/۱	۰/۱
۲۰۰/۸	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۲
۱۳۶/۷	۰/۲	۰/۲	۰/۱
۱۲۵/۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱

برای به دست آوردن مدل‌های تجربی برای پیش‌بینی پاسخ، رابطه‌های خطی و چندجمله‌ای درجه‌ی دوم بر داده‌های به دست آمده از آزمایش‌ها برازش شدند. سپس، این مدل‌ها مورد آنالیز آماری قرار گرفته تا مدل مناسب انتخاب شود. به طور کلی، از نظر آماری مدلی مناسب است که آزمون ضعف برازش<sup>۱۰</sup> آن معنی دار نبوده و دارای بالاترین مقدار

$R^2_{adjusted}$  و  $R^2_{predicted}$  باشد. مطابق با جدول ۴ و ۵، آزمون ضعف برازش مربوط به مدل چند جمله‌ای درجه دوم (Quadratic) بر پاسخ به دست آمده معنی دار نمی‌باشد و این مدل در مقایسه با سایر مدل‌ها دارای مقدار  $R^2_{adjusted}$  و  $R^2_{predicted}$  بالاتری است. بنابراین، در ادامه برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از این مدل استفاده شد.

<sup>10</sup> Lack of fit

جدول ۳ تیمارهای به کار گرفته شده در سنتز نانوذرات کیتوسان-کارواکریل به همراه پاسخ به دست آمده

پاسخ	فاکتور ۳	فاکتور ۲	فاکتور ۱	
Size	C: EO	B: TPP	A: CS	Run
nm	%	%	%	
۱۱۵	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۱
۱۳۰	۰/۱۵	۰/۲	۰/۲	۲
۱۵۲/۷	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۲	۳
۳۳۴/۶	۰/۱	۰/۱	۰/۳	۴
۱۸۰	۰/۲	۰/۱۵	۰/۲	۵
۲۸۰	۰/۲	۰/۱	۰/۱	۶
۱۳۰/۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۲	۷
۱۵۴/۱	۰/۱	۰/۱۵	۰/۲	۸
۱۵۲/۷	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۲	۹
۱۷۰/۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۲	۱۰
۱۱۸	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱	۱۱
۱۲۱/۴	۰/۱	۰/۲	۰/۱	۱۲
۲۷۳	۰/۲	۰/۲	۰/۳	۱۳
۵۱۴	۰/۲	۰/۱	۰/۳	۱۴
۱۲۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۱	۱۵
۲۱۳/۲	۰/۱	۰/۲	۰/۳	۱۶
۱۵۲/۱	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۲	۱۷
۲۰۰	۰/۱۵	۰/۱	۰/۲	۱۸
۲۸۹/۴	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۳	۱۹
۱۵۰/۶	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۲	۲۰

جدول ۴ آزمون ضعف برازش مدل‌های مختلف بر ساین نانوذرات کیتوسان-تیمول

مدل	Sequential p-value	Lack of Fit p-value	Adjusted R <sup>2</sup>	Predicted R <sup>2</sup>	
Linear	< 0.0001	0.0037	0.8038	0.6610	
2FI	0.0193	0.0111	0.8844	0.5375	
Quadratic	<b>0.0009</b>	<b>0.1758</b>	<b>0.9692</b>	<b>0.9067</b>	<b>Suggested</b>
Cubic	0.3640	0.0972	0.9726	-3.8306	Aliased

جدول ۵ آزمون ضعف برازش مدل‌های مختلف بر سایز نانوذرات کیتوسان-کارواکرون

مدل	Sequential p-value	Lack of Fit p-value	Adjusted R <sup>2</sup>	Predicted R <sup>2</sup>	
Linear	0.0002	0.0007	0.6349	0.4013	
2FI	0.2064	0.0008	0.6798	-0.5652	
Quadratic	<b>&lt; 0.0001</b>	<b>0.0520</b>	<b>0.9508</b>	<b>0.8060</b>	<b>Suggested</b>
Cubic	0.0219	0.5076	0.9848	0.4507	Aliased

جدول ۶ آنالیز واریانس (ANOVA) مدل درجه‌ی دوم بر سایز نانوذرات کیتوسان- تیمول

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	1.538E+05	9	17090.47	67.35	<b>&lt; 0.0001</b>	significant
A-CS	1.074E+05	1	1.074E+05	423.23	<b>&lt; 0.0001</b>	
B-TPP	13176.90	1	13176.90	51.93	<b>&lt; 0.0001</b>	
C-EO	9947.72	1	9947.72	39.20	<b>&lt; 0.0001</b>	
AB	9370.80	1	9370.80	36.93	<b>0.0001</b>	
AC	3304.85	1	3304.85	13.02	<b>0.0048</b>	
BC	796.01	1	796.01	3.14	0.1070	
A <sup>2</sup>	1401.20	1	1401.20	5.52	<b>0.0406</b>	
B <sup>2</sup>	792.63	1	792.63	3.12	0.1076	
C <sup>2</sup>	3789.77	1	3789.77	14.94	<b>0.0031</b>	
Residual	2537.46	10	253.75			
Lack of Fit	1798.15	5	359.63	2.43	<b>0.1758</b>	not significant
Pure Error	739.31	5	147.86			
Cor Total	1.564E+05	19				

فاکتورهای غلظت کیتوسان- غلظت TPP (AB)، غلظت TPP- غلظت اسانس (BC) و توان دوم غلظت کیتوسان ( $A^2$ ) بر سایز نانوذرات معنادار می‌باشد ( $p < 0.05$ ) (جدول ۷). سایر پارامترهای درجه‌ی دوم و اثرات متقابل تأثیر معناداری نداشتند ( $p > 0.05$ ) و بنابراین از معادلات حذف شدند. همچنین  $R^2$  (ضریب تشخیص) برابر با ۰/۹۸ و ۰/۹۷ به ترتیب برای نانوذرات کیتوسان- تیمول و کیتوسان- کارواکول در معادلات به‌دست آمده، نشان‌دهنده‌ی هم‌پوشانی مناسب داده‌های آزمایشگاهی و مقادیر پیش‌بینی شده توسط مدل ارائه شده برای بهینه‌سازی سنتز نانوذرات می‌باشد (جدول ۸ و ۹).

نتایج حاصل از آنالیز واریانس مدل درجه‌ی دوم بر سایز نانوذرات کیتوسان- تیمول در جدول ۶ قابل مشاهده است. نتایج، بیانگر تأثیر معنادار هر سه متغیر مستقل مورد بررسی بر سایز نانوذرات می‌باشد ( $p < 0.05$ ). مطابق با نتایج به دست آمده، اثرات متقابل فاکتورهای مورد بررسی غلظت کیتوسان- غلظت TPP (AB)، غلظت کیتوسان- غلظت اسانس (AC)، توان دوم غلظت کیتوسان ( $A^2$ ) و توان دوم غلظت اسانس ( $C^2$ ) نیز بر سایز نانوذرات معنی‌دار است که نشان‌دهنده‌ی اهمیت این فاکتورها در سنتز نانوذرات می‌باشد. بررسی آماری نتایج مربوط به نانوذرات کیتوسان- کارواکول نیز نشان می‌دهد که تأثیر هر سه متغیر مستقل مورد بررسی و همچنین اثرات متقابل

جدول ۷ آنالیز واریانس (ANOVA) مدل درجه‌ی دوم بر سایز نانوذرات کیتوسان- کارواکول

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	1.805E+05	9	20056.75	41.83	< 0.0001	significant
A-CS	75620.42	1	75620.42	157.72	< 0.0001	
B-TPP	34316.16	1	34316.16	71.57	< 0.0001	
C-EO	18395.52	1	18395.52	38.37	0.0001	
AB	5460.13	1	5460.13	11.39	0.0071	
AC	710.65	1	710.65	1.48	0.2514	
BC	10210.21	1	10210.21	21.30	0.0010	
$A^2$	8987.55	1	8987.55	18.75	0.0015	
$B^2$	937.95	1	937.95	1.96	0.1921	
$C^2$	1157.74	1	1157.74	2.41	0.1513	
Residual	4794.51	10	479.45			
Lack of Fit	3988.46	5	797.69	4.95	0.0520	not significant
Pure Error	806.05	5	161.21			
Cor Total	1.853E+05	19				

جدول ۸ خلاصه نتایج آماری بررسی اثر متغیرها بر سایز نانوذرات کیتوسان- تیمول

Std. Dev.	15.93	$R^2$	0.9838
Mean	218.52	Adjusted $R^2$	0.9692
C.V. %	7.29	Predicted $R^2$	0.9067
		Adeq Precision	31.9405



جدول ۹ خلاصه نتایج آماری بررسی اثر متغیرها بر سایز نانوذرات کیتوسان-کارواکرول

Std. Dev.	21.90	R <sup>2</sup>	0.9741
Mean	197.60	Adjusted R <sup>2</sup>	0.9508
C.V. %	11.08	Predicted R <sup>2</sup>	0.8060
		Adeq Precision	25.5745

متغیرهای آزمایش به صورت کد شده (۲ و ۴) و واقعی (۳) و (۵) است، به دست آمد:

۲-۳ معادلات نهایی بر اساس پارامترهای واقعی و پارامترهای کد شده

در ادامه با به کارگیری روش سطح پاسخ، معادلات زیر که نشان‌دهنده‌ی ارتباط تجربی میان سایز نانوذرات و

نانوذرات کیتوسان- تیمول

$$\text{Size} = 195.04 + 103.63A - 36.30B + 31.54C - 34.22AB + 20.33AC + 16.21A^2 + 30.76C^2 \quad (۲)$$

$$\text{Size} = 195.04 + 103.36CS - 36.30TPP + 31.54EO - 34.22 CS * TPP + 20.33CS * EO + 16.21CS^2 + 30.76EO^2 \quad (۳)$$

نانوذرات کیتوسان- کارواکرول

$$\text{Size} = 157.32 + 86.96A - 58.58B + 42.89C - 26.13AB - 35.73BC + 80.56A^2 \quad (۴)$$

$$\text{Size} = 157.32 + 86.96 CS - 58.58TPP + 42.89EO - 26.13CS * TPP - 35.73TPP * EO + 80.56 EO^2 \quad (۵)$$

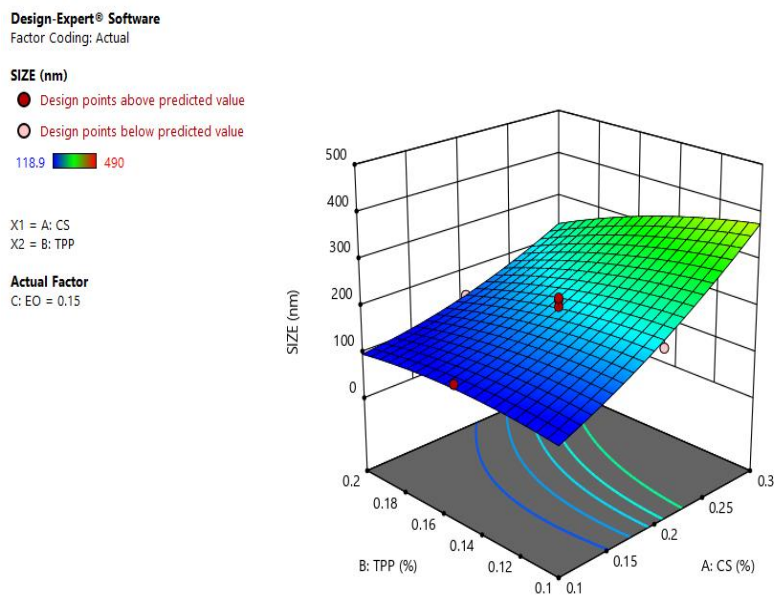
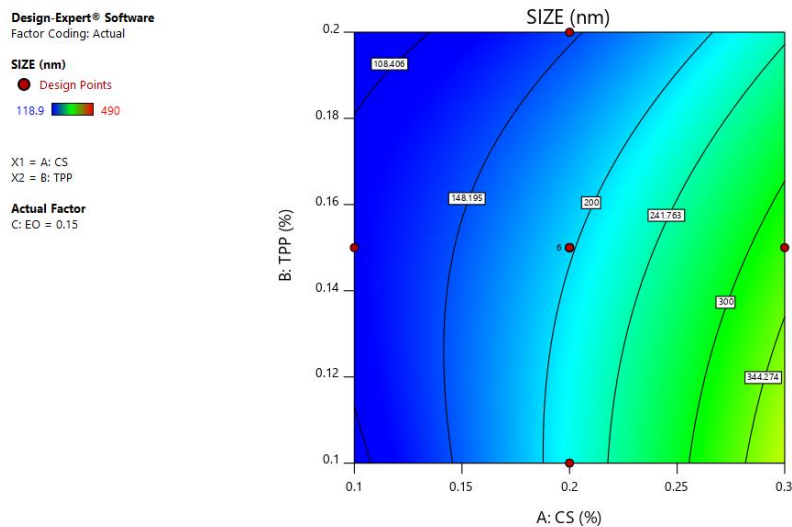
۱-۶). نتایج به و ضوح نشان می‌دهد که غلظت کیتوسان تأثیر محسوسی بر سایز نانوذرات دارد، به طوری که، در غلظت‌های بیش‌تر کیتوسان افزایش سایز نانوذرات قابل مشاهده است (شکل ۱، ۲، ۴، ۵). بررسی برهمکنش کیتوسان با تیمول و کارواکرول نیز نشان می‌دهد که در غلظت‌های بالاتر این دو متغیر، سایز نانوذرات به میزان قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد (شکل ۲ و ۵). اثرات متقابل غلظت کیتوسان و غلظت TPP نیز در نمودارهای ۱ و ۴ نمایش داده شده است. همان‌طور که از نتایج برمی‌آید، نانوذرات با سایز کوچک‌تر در غلظت‌های پایین‌تر کیتوسان و غلظت‌های بالاتر TPP قابل دستیابی می‌باشند.

۳-۳ بررسی نمودارهای دو بعدی<sup>۱۱</sup> و سه بعدی<sup>۱۲</sup>

برای بررسی اثر متغیرهای مستقل بر پاسخ، ارائه نمودارهای دو بعدی و سه بعدی بسیار حائز اهمیت است. برای ترسیم این نمودارها، دو متغیر مستقل و یک متغیر وابسته درحالی که سومین متغیر مستقل در نقطه‌ی مرکزی خود ثابت نگه داشته شده است، به تصویر کشیده می‌شوند. براساس نتایج به دست آمده، سایز نانوذرات کیتوسان-تیمول و کیتوسان-کارواکرول متأثر از هر سه فاکتور مورد بررسی یعنی غلظت کیتوسان، غلظت TPP و غلظت اسانس بوده که میزان این تغییرات با توجه به مقادیر متغیرهای مستقل در ادامه آورده شده است (شکل

<sup>12</sup> 3-D Surface

<sup>11</sup> Contour



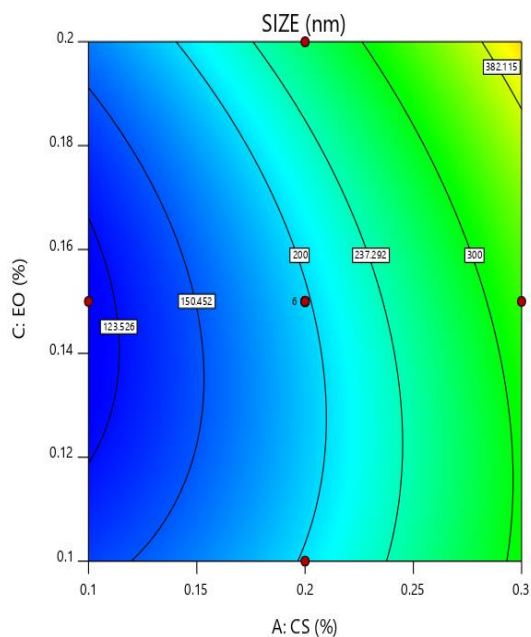
شکل ۱ نمایش دو بعدی و سه بعدی بررسی اثر دو متغیر غلظت کیتوسان- غلظت TPP بر سایز نانوذرات کیتوسان- تیمول

Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual

SIZE (nm)  
● Design Points  
118.9 490

X1 = A: CS  
X2 = C: EO

Actual Factor  
B: TPP = 0.15

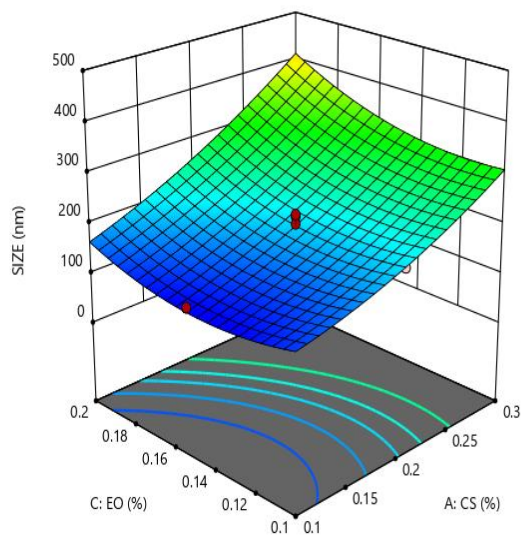


Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual

SIZE (nm)  
● Design points above predicted value  
○ Design points below predicted value  
118.9 490

X1 = A: CS  
X2 = C: EO

Actual Factor  
B: TPP = 0.15



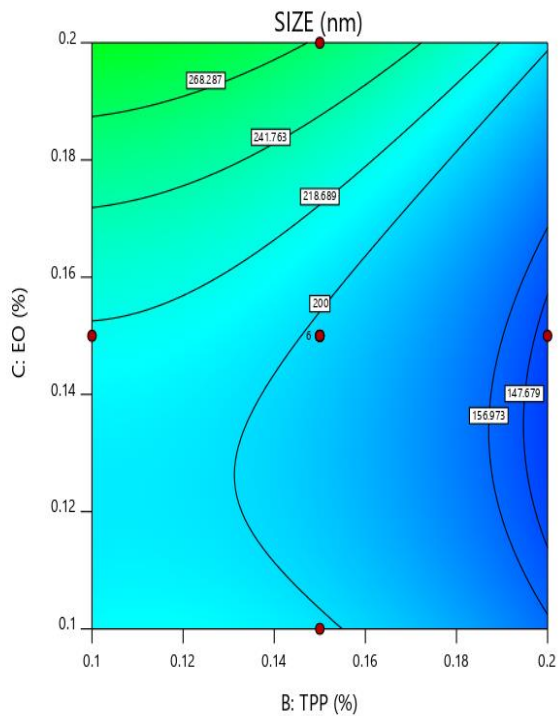
شکل ۲. نمایش دو بعدی و سه بعدی بررسی اثر دو متغیر غلظت کیتوسان-غلظت تیمول بر سایز نانوذرات

Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual

SIZE (nm)  
● Design Points  
118.9 490

X1 = B: TPP  
X2 = C: EO

Actual Factor  
A: CS = 0.2

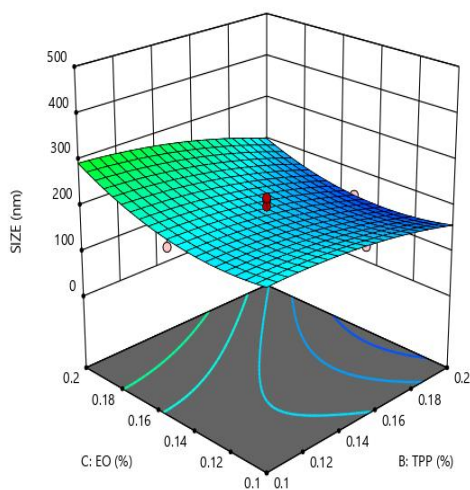


Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual

SIZE (nm)  
● Design points above predicted value  
○ Design points below predicted value  
118.9 490

X1 = B: TPP  
X2 = C: EO

Actual Factor  
A: CS = 0.2



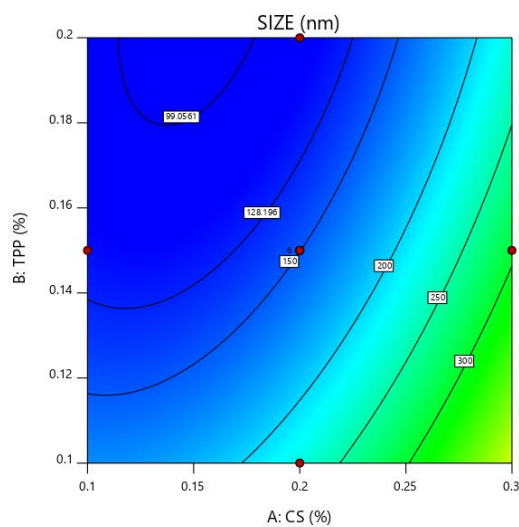
شکل ۳ نمایش دو بعدی و سه بعدی بررسی اثر دو متغیر غلظت تیمول-غلظت TPP بر سایز نانوذرات

Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual

SIZE (nm)  
● Design Points  
115 514

X1 = A: CS  
X2 = B: TPP

Actual Factor  
C: EO = 0.15

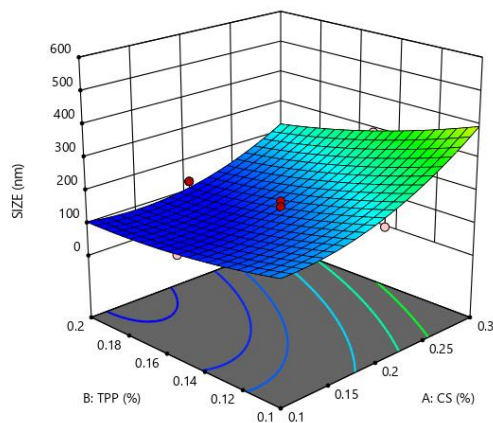


Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual

SIZE (nm)  
● Design points above predicted value  
○ Design points below predicted value  
115 514

X1 = A: CS  
X2 = B: TPP

Actual Factor  
C: EO = 0.15



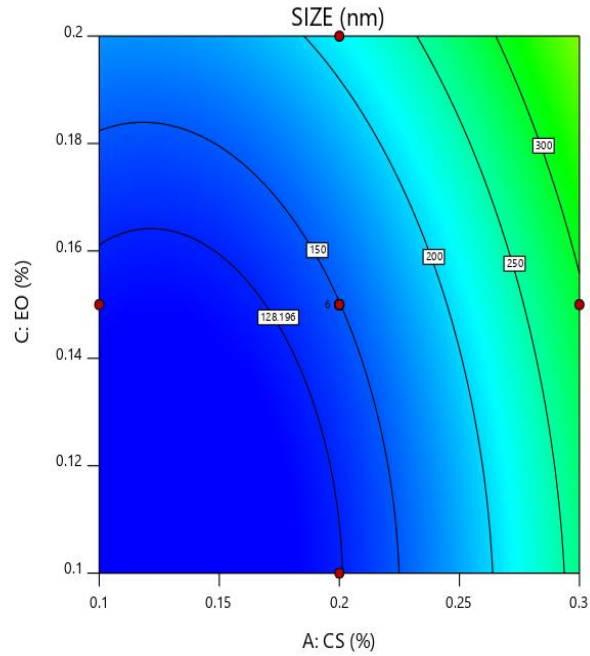
شکل ۴ نمایش دو بعدی و سه بعدی بررسی اثر دو متغیر غلظت کیتوسان-غلظت TPP بر سایز نانوذرات کیتوسان-کارواکرول

Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual

SIZE (nm)  
● Design Points  
115 514

X1 = A: CS  
X2 = C: EO

Actual Factor  
B: TPP = 0.15

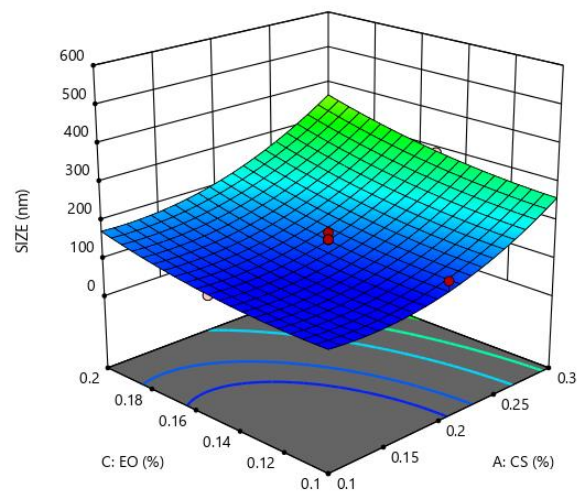


Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual

SIZE (nm)  
● Design points above predicted value  
○ Design points below predicted value  
115 514

X1 = A: CS  
X2 = C: EO

Actual Factor  
B: TPP = 0.15



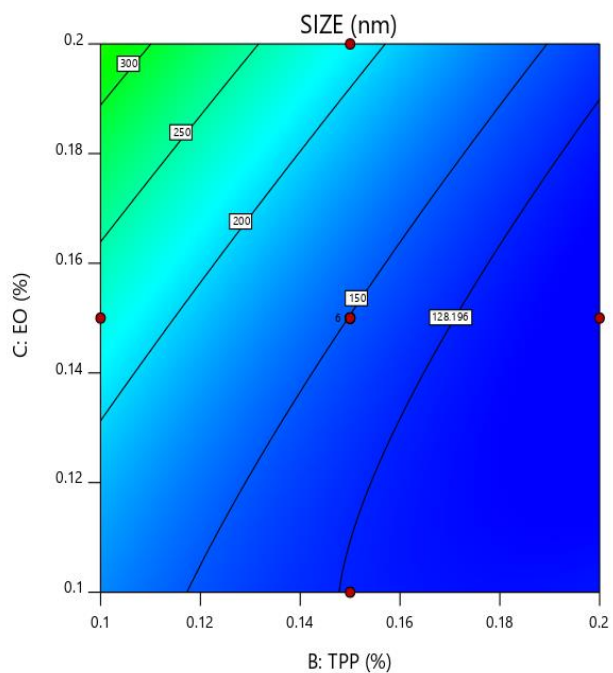
شکل ۵ نمایش دو بعدی و سه بعدی بررسی اثر دو متغیر غلظت کیتوسان-غلظت کارواکرول بر سایز نانوذرات

Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual

SIZE (nm)  
● Design Points  
115 514

X1 = B: TPP  
X2 = C: EO

Actual Factor  
A: CS = 0.2

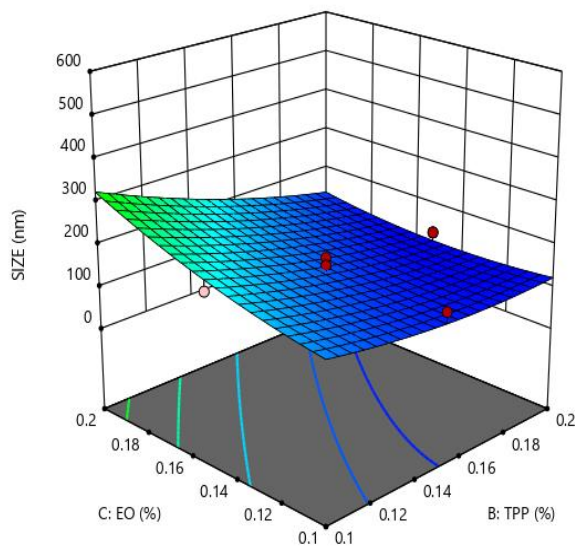


Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual

SIZE (nm)  
● Design points above predicted value  
○ Design points below predicted value  
115 514

X1 = B: TPP  
X2 = C: EO

Actual Factor  
A: CS = 0.2



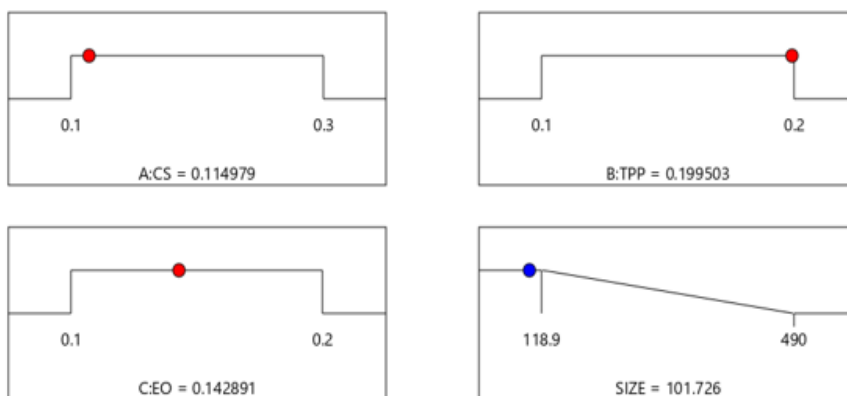
شکل ۶ نمایش دو بعدی و سه بعدی بررسی اثر دو متغیر غلظت کرواکرول-غلظت TPP بر سایز نانوذرات



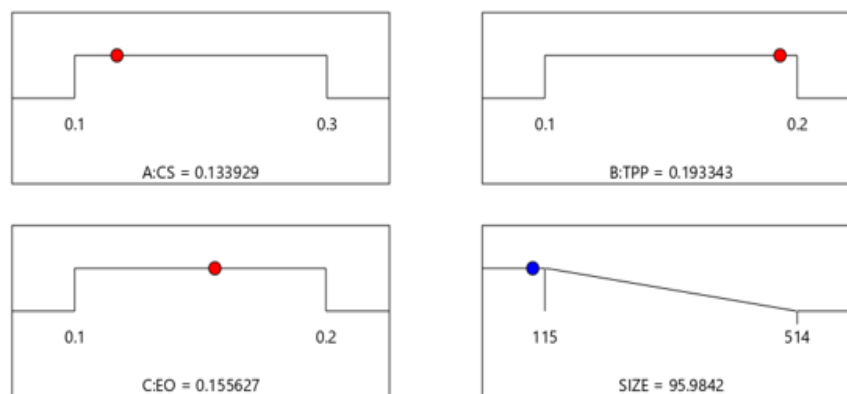
### ۳-۴ شرایط عملیاتی بهینه برای سنتز نانوذرات

در پژوهش حاضر، هدف از بهینه‌سازی به حداقل رساندن سایز نانوذرات بود. به این منظور، شرایط عملیاتی بهینه برای سنتز نانوذرات با استفاده از تکنیک بهینه‌سازی عددی<sup>۱۳</sup> در نرم‌افزار Design expert 11.1.0.1 جست‌وجو شد. برای بهینه‌سازی، ابتدا باید اهداف بهینه‌سازی مشخص و سپس سطوح پاسخ و متغیرهای مستقل تنظیم شود. بر این اساس، شرایط بهینه‌ی سنتز نانوذرات کیتوسان-تیمول

و دستیابی به سایز ۱۰۱ نانومتر، غلظت ۰/۱۱ درصد کیتوسان، غلظت ۰/۱۹ درصد TPP و غلظت ۰/۱۴ درصد تیمول تعیین شد (شکل ۷). شرایط عملیاتی بهینه برای نانوکپسولاسیون کارواکرول درون کیتوسان نیز در شکل ۸ نشان داده شده است. همان‌طور که از نتایج مشخص است، غلظت ۰/۱۳ درصد کیتوسان، غلظت ۰/۱۹ درصد TPP و غلظت ۰/۱۵ درصد کارواکرول منجر به تشکیل نانوذراتی با سایز ۹۵ نانومتر شد. مطلوبیت<sup>۱۴</sup> در هر دو حالت برابر با یک می‌باشد.



شکل ۷ شرایط عملیاتی بهینه برای نانوکپسولاسیون تیمول درون کیتوسان



شکل ۸ شرایط عملیاتی بهینه برای نانوکپسولاسیون کارواکرول درون کیتوسان

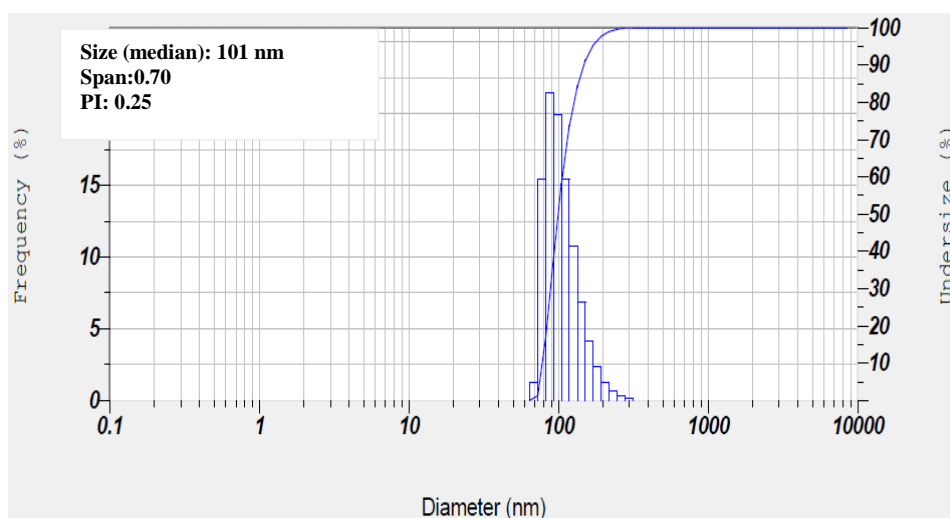
<sup>14</sup> Desirability

<sup>13</sup> Numerical optimization

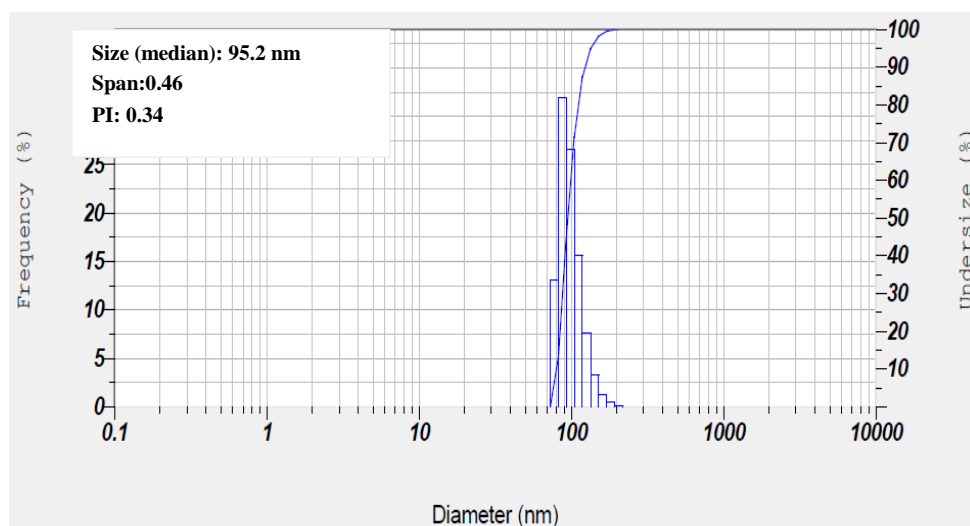


۳-۵ بررسی اندازه نانوفرمولاسیون‌های آماده‌سازی شده  
 بررسی اندازه نانوفرمولاسیون‌های سنتز شده به کمک آنالیز  
 DLS انجام شد، که نتایج مربوط به نانوفرمولاسیون‌های  
 منتخب در شکل ۹ و ۱۰ نشان داده شده است.  
 ۳-۶ تعیین درصد کارواکرول و تیمول بارگذاری شده  
 در نانوذرات کیتوسان

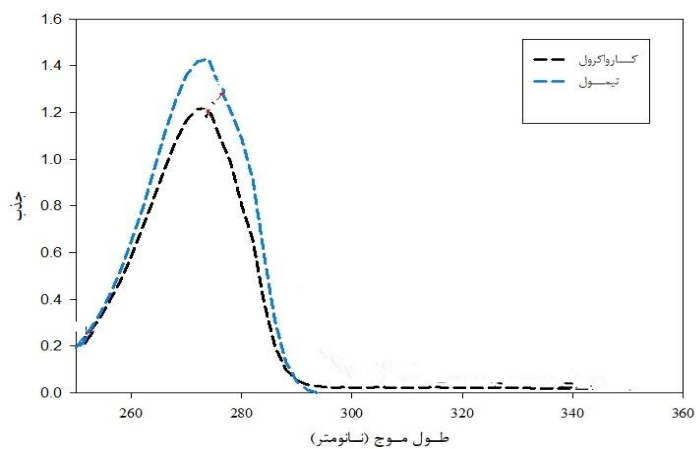
۳-۶-۱ تعیین طول موج ماکزیمم و ترسیم منحنی  
 استاندارد  
 با توجه به طیف‌های به‌دست آمده از دستگاه اسپکتروفتومتر،  
 حداکثر جذب کارواکرول و تیمول در طول موج ۲۷۴  
 نانومتر به‌دست آمد (شکل ۱۱). بر این اساس، منحنی  
 کالیبراسیون در طول موج ذکر شده ترسیم شد (شکل ۱۲).



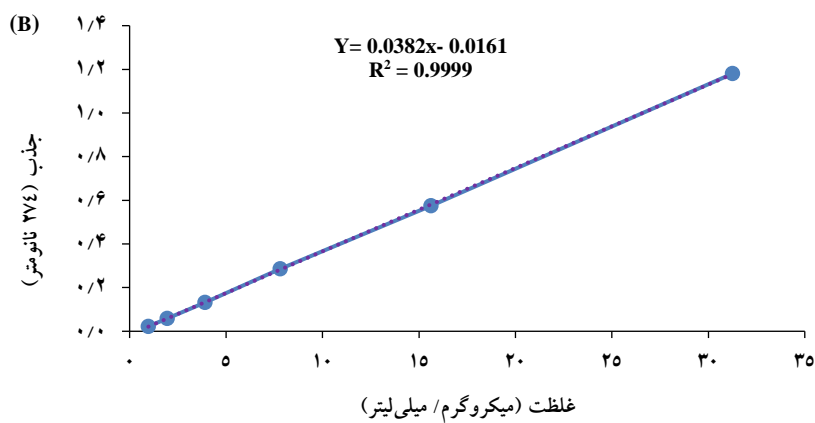
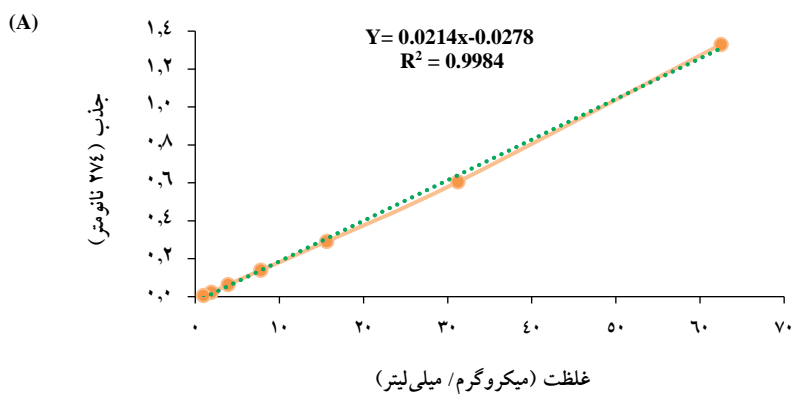
شکل ۹ آنالیز DLS نانوذرات کیتوسان- تیمول



شکل ۱۰ آنالیز DLS نانوذرات کیتوسان- کارواکرول



شکل ۱۱ طول موج ماکزیمم کارواکروول و تیمول



شکل ۱۲ منحنی استاندارد کارواکروول (A) و تیمول (B)

### ۳-۶-۲ بازدهی کپسولاسیون

بازدهی کپسولاسیون دو فرمولاسیون منتخب در جدول ۱۰ آورده شده است. همان‌طور که از نتایج مشخص است، میزان بازدهی مذکور برای نانوذرات کیتوسان- تیمول، ۷۲ درصد و برای نانوذرات کیتوسان- کارواکرول، ۶۵ درصد به‌دست آمد.

### ۳-۶-۳ تصدیق بارگیری اسانس درون نانوذرات

#### کیتوسان به کمک آنالیز FTIR

تصدیق کیفی وجود اسانس در فرمولاسیون‌های منتخب و ساختار شیمیایی نمونه‌ها به کمک آنالیز FTIR بررسی شد. برای انجام آنالیز، فرمولاسیون نهایی سانتریفیوژ شد و رسوب حاصل پس از خشک شدن آنالیز شد. فرم خالص کارواکرول، تیمول و همچنین فرمولاسیون بدون اسانس نیز به صورت نمونه‌های مجزا آنالیز شد.

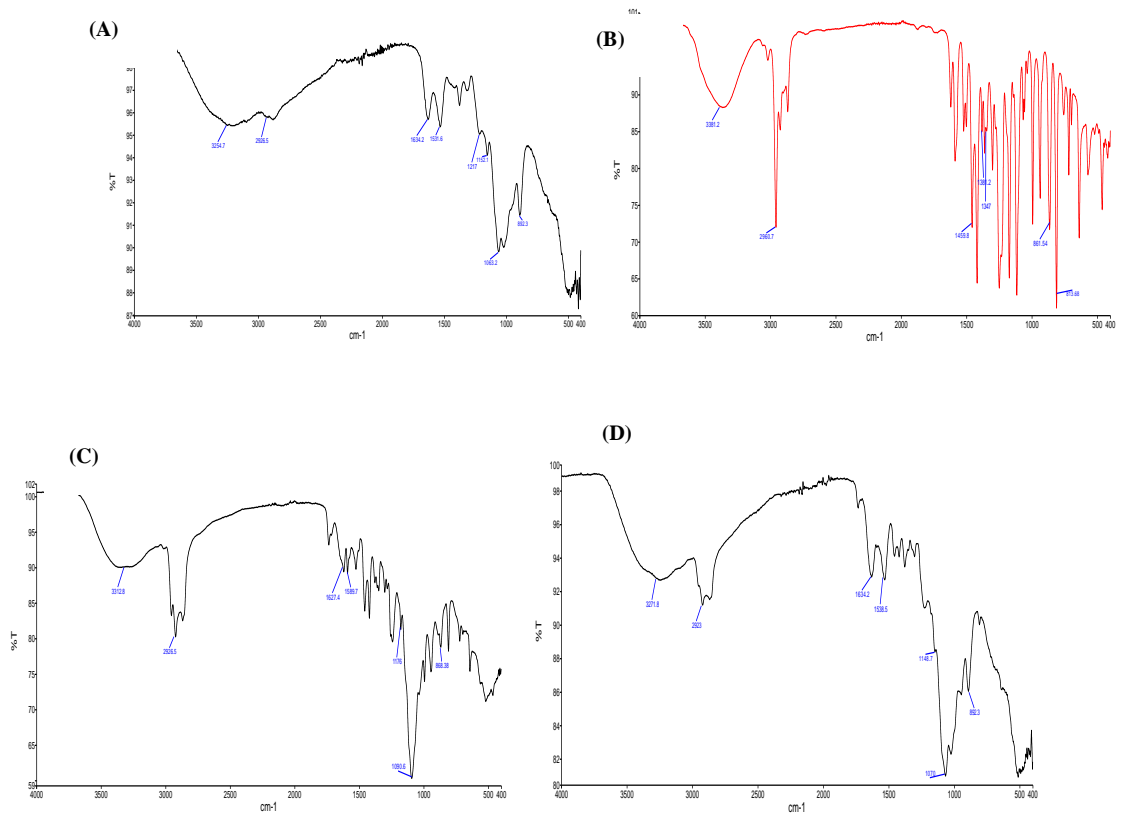
همان‌طور که در شکل (A) نشان داده شده است، به‌طور کلی، کارواکرول پیک‌های شاخصی در  $1-3378\text{cm}^{-1}$  (مربوط به گروه OH)،  $1-2960\text{cm}^{-1}$  (مربوط به باند کششی C-H)،  $1-866$  و  $812$  (مربوط به حلقه‌ی آروماتیک) و همچنین، باندهای جذبی در محدوده‌ی  $1-1346$ ،  $1382$  و  $1459$  (مربوط به CH deformation) نشان داد [۱]. برای تیمول نیز پیک‌های شاخصی در  $1-3229\text{cm}^{-1}$  (مربوط

به باند کششی OH فنولی) و  $1-1620\text{cm}^{-1}$  (مربوط به باند کششی C=C حلقه بنزنی) مشاهده شد (A) (۱۸). پیک‌های شاخص مشاهده شده برای نانوذرات کیتوسان نیز در شکل‌های (B)  $1314$  نشان داده شده است. از جمله‌ی این پیک‌ها می‌توان به پیک در ناحیه‌ی  $\text{cm}^{-1} 3500-3250$  (مربوط به نوار کششی پیوند OH)،  $1-2927$  (مربوط به نوار کششی C-H)،  $1-1634\text{cm}^{-1}$  (مربوط به امید نوع I)،  $1-1539\text{cm}^{-1}$  (مربوط به امید نوع II)،  $1-11551$  (مربوط به گروه عاملی P=O)،  $1-1072$  (مربوط به گروه عاملی COC) و  $1-891\text{cm}^{-1}$  (مربوط به حلقه‌ی پیرانوز) اشاره کرد [۱].

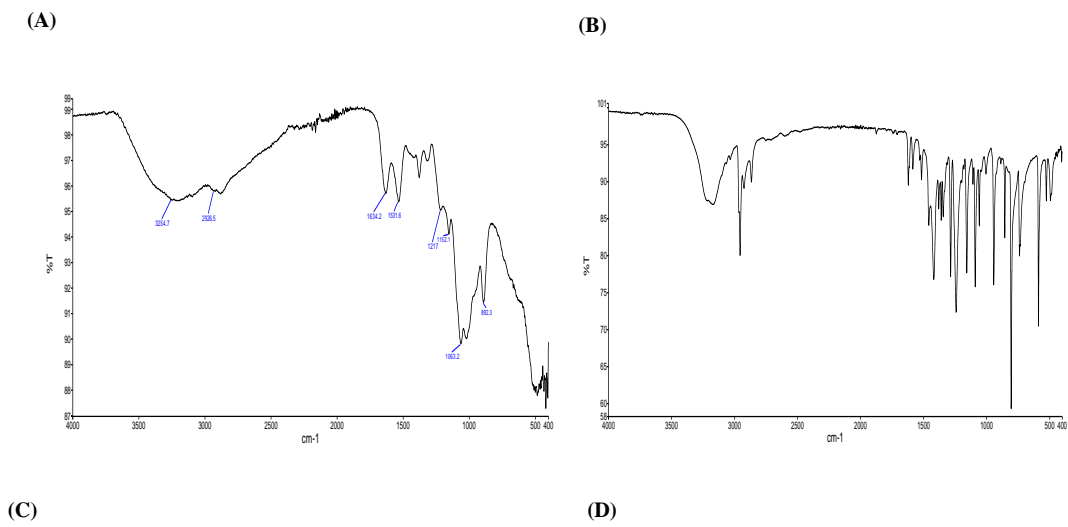
طیف FTIR نانوذرات کیتوسان حاوی کارواکرول در شکل (C, D)  $13$ ، و نانوذرات کیتوسان حاوی تیمول در شکل (C, D)  $14$  آورده شده است. همان‌طور که در تصاویر مشخص است، اگرچه طیف FTIR به‌دست آمده برای نانوذرات کیتوسان حاوی اسانس، مشابه با طیف به‌دست آمده برای نانوذرات کیتوسان فاقد اسانس می‌باشد، اما شدت پیک کششی C-H در محدوده‌ی  $2870-2959$  با افزایش مقدار اولیه‌ی اسانس از  $0/1$  به  $0/2$  به‌طور قابل توجهی افزایش یافته است، که این موضوع می‌تواند منعکس‌کننده‌ی وجود کارواکرول و تیمول در ماتریس کیتوسان باشد [۱، ۱۹].

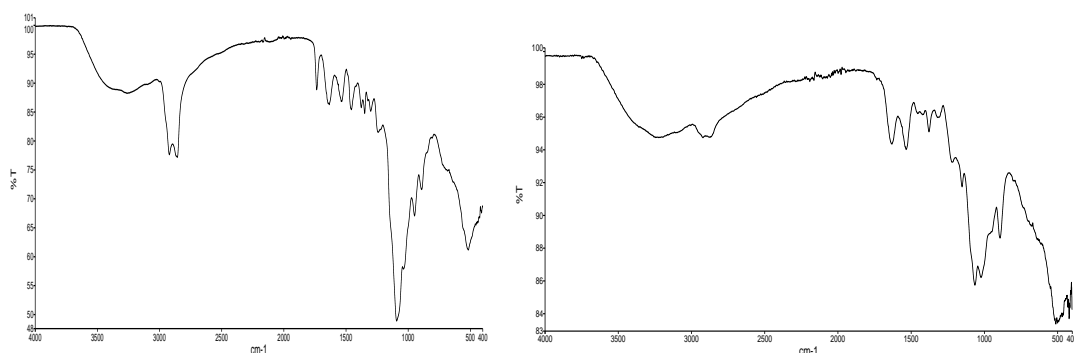
جدول ۱۰ اجزای تشکیل دهنده‌ی فرمولاسیون‌های بهینه و بازدهی کپسولاسیون آن‌ها

فرمولاسیون	کیتوسان (%)	اسانس (%)	TPP (%)	EE (%)
کیتوسان- تیمول	۰/۱۱	۰/۱۴	۰/۱۹	$72/28 \pm 0/92$
کیتوسان- کارواکرول	۰/۱۳	۰/۱۵	۰/۱۹	$65/38 \pm 1/2$



شکل ۱۳ طیف FTIR کارواکرول (A)، نانوذرات کیتوسان فاقد کارواکرول (B)، نانوذرات کیتوسان حاوی ۰/۱ درصد کارواکرول (C) و نانوذرات کیتوسان حاوی ۰/۲ درصد کارواکرول (D)





شکل ۱۴ طیف FTIR تیمول (A)، نانوذرات کیتوسان فاقد تیمول (B)، نانوذرات کیتوسان حاوی ۰/۱ درصد تیمول (C) و نانوذرات کیتوسان حاوی ۰/۲ درصد تیمول (D)

#### ۴- بحث و نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر، بهینه‌سازی به روش سطح پاسخ با هدف انجام کم‌ترین تعداد آزمایش و صرفه‌جویی در زمان و هزینه، مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است [۲۰]. این روش آماری برای تجزیه و تحلیل مسائلی که پاسخ مورد نظر تحت تاثیر چند متغیر مختلف قرار دارد، مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲۱]. طرح مرکب مرکزی از متداول‌ترین طرح‌های مورد استفاده در روش سطح پاسخ است که در مقایسه با سایر روش‌های طراحی آزمایش، توانایی بالاتری در پیش‌بینی پاسخ‌ها و بهینه‌سازی آن‌ها دارد و برای مطالعه فضای آزمایش بسیار کاربردی می‌باشد [۲۲]. از این رو، در پژوهش حاضر برای غلبه بر مشکلات روش‌های قدیمی بهینه‌سازی، از این روش آماری چند متغیره استفاده شد.

برای این هدف، روش سنتز مورد استفاده با توجه به دامنه‌ی عامل‌های مؤثر یعنی غلظت کیتوسان، غلظت اسانس و غلظت TPP بهینه شد. برای تحقق این امر، از روش ژل‌سازی یونی استفاده شد. این روش در میان انواع روش‌های توسعه یافته برای بارگذاری ترکیبات زیست‌فعال درون کیتوسان، بسیار مورد توجه است که دلیل این موضوع ساده بودن، عدم استفاده از حلال‌های آلی و غیرسمی بودن آن می‌باشد [۸ و ۹].

Bulmer و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که غلظت کیتوسان، غلظت TPP و نسبت وزنی کیتوسان به TPP تاثیر مهمی بر آماده‌سازی نانوذرات دارند [۸]. حل شدن، توده‌ای شدن و تشکیل سوسپانسیون شیری‌رنگ، سه پدیده قابل مشاهده در حین تشکیل نانوذرات می‌باشند. تنها در غلظت معینی از کیتوسان و TPP رنگ محلول واکنش نیمه شفاف و شیری‌رنگ می‌شود که نشان‌دهنده تولید نانوذرات با ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مناسب است. سایر غلظت‌ها یا منجر به تشکیل رسوب شده، یا رنگ محلول شفاف باقی می‌ماند [۲۳].

به‌طور کلی، با افزایش نسبت وزنی کیتوسان به TPP، ویسکوزیته محلول افزایش و چگالی ماده‌ی ایجادکننده‌ی پیوندهای عرضی کاهش می‌یابد. با افزایش ویسکوزیته و در نتیجه، افزایش تعداد مولکول‌های کیتوسان با بار مثبت، پیوندهای درون‌زنجیره‌ای هیدروژنی قوی موجود بین مولکول‌های کیتوسان منجر به تمایل کم‌تر این مولکول‌ها به برقراری پیوندهای عرضی با TPP می‌شود. به دنبال کاهش پیوندهای عرضی، اندازه‌ی نانوذرات افزایش می‌یابد. در مقابل، با کاهش نسبت وزنی کیتوسان به TPP، چگالی ماده‌ی ایجادکننده‌ی پیوندهای عرضی در محلول افزایش می‌یابد و یون‌های TPP می‌توانند به آسانی با گروه‌های آمین کیتوسان پیوند عرضی برقرار کنند. این امر

مطابق با نتایج آزمون DLS، متوسط عددی اندازه‌ی ذرات برای نانوذرات کیتوسان-کارواکرول در محدوده‌ی ۱۱۵ تا ۵۱۴ نانومتر و سایز بهینه‌ی ۹۵ نانومتر و نانوذرات کیتوسان-تیمول در محدوده‌ی ۱۱۸ تا ۴۹۰ نانومتر و سایز بهینه‌ی ۱۰۱ نانومتر به دست آمد.

در پژوهش انجام گرفته توسط Keawchaoon و Yoksan (۲۰۱۱)، میانگین قطر هیدرودینامیکی نانوذرات کیتوسان-کارواکرول در محدوده‌ی ۵۳۲ تا ۷۱۶ نانومتر به دست آمد، که در مقایسه با یافته‌های به دست آمده در پژوهش حاضر بالاتر بود. در پژوهش مذکور، برای سنتز نانوذرات، از کیتوسان با غلظت ۱/۲ در صد استفاده شده است که این غلظت بالا می‌تواند توضیحی برای بالاتر بودن سایز مشاهده شده در مقایسه با مطالعه‌ی پیش رو باشد [۱].

سنتز نانوذرات کیتوسان-تیمول در پژوهش Medina و همکاران (۲۰۱۹) مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش غلظت ۳ میلی‌گرم/میلی‌لیتر کیتوسان و نسبت وزنی ۰/۳۳:۱ کیتوسان به TPP، منجر به تشکیل نانوذراتی با سایز ۲۹۳ نانومتر و ضریب پراکندگی ۰/۵ شد که در مقایسه با سایز بهینه و همچنین ضریب پراکندگی به دست آمده در پژوهش حاضر بالاتر می‌باشد [۳۱].

در پژوهش پیش رو، برای محاسبه‌ی بازدهی کپسولاسیون از روش غیرمستقیم استفاده شد. بدین منظور، نانوفرمولاسیون منتخب سانتریفیوژ شد و نانوذرات به صورت پلاک در انتهای فالكون رسوب داده شدند. با تعیین مقدار اسانس موجود در فاز رویی، مقدار اسانس کپسوله شده در نانوذرات کیتوسان محاسبه شد. مطابق با یافته‌های به دست آمده، بازدهی کپسولاسیون برای نانوذرات کیتوسان-تیمول، ۷۲ درصد به دست آمد (جدول ۱۰)، که این میزان بالاتر از مقدار گزارش شده توسط Medina و همکاران (۲۰۱۹) (بازدهی کپسولاسیون ۶۶ درصد) می‌باشد [۳۱].

باعث می‌شود که در مولکول‌های کیتوسان پیوندهای عرضی به طور کامل ایجاد شده و اندازه‌ی ذرات کاهش یابد [۲۴]. قابل ذکر است که کاهش نسبت وزنی کیتوسان به TPP تا مقدار مشخصی امکان‌پذیر است. کاهش بیش از حد، منجر به تجمع ذرات و توده‌ای شدن آن‌ها می‌شود و در نهایت، افزایش اندازه‌ی ذرات را به دنبال خواهد داشت. بنابراین، تغییرات نسبت وزنی کیتوسان به TPP از پارامترهای کلیدی برای کاهش اندازه‌ی نانوذرات تولیدی می‌باشد [۲۵].

مطابق با نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر، شرایط بهینه برای نانوکپسولاسیون کارواکرول و تیمول درون کیتوسان در غلظت ۰/۱ درصد کیتوسان و غلظت ۰/۱۹ در صد TPP با نسبت وزنی ۵:۲ (کیتوسان: TPP) مشاهده شد که منجر به تشکیل نانوذراتی با سایز کم‌تر از ۲۰۰ نانومتر و ضریب پراکندگی کم‌تر از یک شد. ضریب پراکندگی عامل بسیار مهمی محسوب می‌شود، زیرا با کاهش این عدد پایداری فرمولاسیون [۲۶]، کارایی و نیز ظرفیت بارگیری به طرز محسوسی بهبود می‌یابد [۲۷ و ۲۸]. در پژوهش انجام گرفته توسط Huang و همکاران (۲۰۰۹) نیز نسبت وزنی ۵:۲ (کیتوسان: TPP) برای دستیابی به سایز، ضریب پراکندگی و اتصال عرضی مناسب پیشنهاد شده است [۲۹].

در پژوهش دیگری که توسط Mohammadi و همکاران (۲۰۱۵) برای نانوکپسولاسیون اسانس آویشن درون کیتوسان انجام گرفت، غلظت ۰/۳ درصد کیتوسان و TPP با نسبت وزنی ۵:۲ منجر به تشکیل نانوذراتی با سایز کم‌تر از ۲۰۰ نانومتر شد [۳۰].

نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر همچنین نشان داد که در غلظت‌های بالاتر کیتوسان و اسانس (کارواکرول و تیمول)، سایز نانوذرات به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد که مشابه با این یافته در پژوهش‌های دیگر نیز گزارش شده است [۱].

[2] Jang, K.I., Lee, H.G (2008) Stability of chitosan nanoparticles for L-ascorbic acid during heat treatment in aqueous solution. *J. agric. food. Chem.* 56 (6), pp.1936-1941.

[3] Manjunath, K., Venkateswarlu, V (2005) Pharmacokinetics, tissue distribution and bioavailability of clozapine solid lipid nanoparticles after intravenous and intraduodenal administration. *J. Contro Release.* 107 (2), pp.215-228.

[4] Tajeddin, B., (2020) Chitosan nanoparticles: production methods and application in food. *Donyayenano.* 59, pp. 32-43.

[5] Venugopal, V., (2008) Marine products for healthcare: Functional and bioactive nutraceutical compounds from the ocean. New York: CRC Press, p. 552.

[6] Muzzarelli, R.A., (2010) Chitins and chitosans as immunoadjuvants and non-allergenic drug carriers. *Mar. drugs.* 8 (2), pp.292-312.

[7] Anand, M., Maruthupandy, M., Kalaivani, R., Suresh, S., Kumaraguru, A. (2014) Larvicidal activity of chitosan nanoparticles synthesized from crab and squilla species against *Aedes aegypti*. *J. Colloid Sci. Biotechnol.* 3,188-193.

[8] Bulmer, C., Margaritis, A., Xenocostas, A. (2012) Production and characterization of novel chitosan nanoparticles for controlled release of rHu-Erythropoietin. *Biochem. Eng. J.* 68, pp.61-69.

[9] Shahbazi, M.A., Hamidi, M., Mohammadi-Samani, S. (2013) Preparation, optimization, and in-vitro/in-vivo/ex-vivo characterization of chitosan-heparin nanoparticles: drug-induced gelation. *J. Pharm. Pharmacol.* 65 (8), pp.1118-1133.

[10] Sharifi- Rad, M., Varoni, E.M., Iriti, M., Martorell, M., Setzer, W.N., del Mar Contreras, M., Salehi, B., Soltani- Nejad, A., Rajabi, S., Tajbakhsh, M., Sharifi- Rad, J. (2018) Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytother. Res.* 32 (9), pp. 1675-1687.

[11] de Sousa, J.P., de Azerêdo, G.A., de Araújo Torres, R., da Silva Vasconcelos, M.A., da Conceição, M.L., de Souza, E.L. (2012) Synergies of carvacrol and 1, 8-cineole to inhibit bacteria associated with minimally processed vegetables. *Int. J. Food Microbiol.* 154 (3), pp.145-151.

[12] Suntres, Z.E., Coccimiglio, J., Alipour, M. (2015) The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 55 (3), pp.304-318.

[13] Martínez-Hernández, G.B., Amodio, M.L., Colelli, G. (2017) Carvacrol-loaded chitosan nanoparticles maintain quality of fresh-cut carrots. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 41, pp.56-63.

[14] Wu, H., Ramachandran, C., Weiner, N.D. Roessler, B.J. (2001) Topical transport of

برای نانوذرات کیتوسان-کارواکرول بازدهی کپسولاسیون ۶۵ درصد تعیین شد (جدول ۱۰). در پژوهش انجام گرفته تو سط Keawchaon و Yoksan در سال ۲۰۱۱، بازدهی کپسولاسیون کارواکرول در محدوده‌ی ۱۳ تا ۳۱ درصد به دست آمد که در مقایسه با پژوهش حاضر به میزان قابل توجهی کم تر می باشد. نتایج این پژوهش نشان داد که با افزایش غلظت اسانس، بازدهی کپسولاسیون افزایش می یابد، به طوری که بیشترین بازده در نسبت وزنی ۱:۱ کیتوسان به کارواکرول به دست آمد [۱].

کپسولاسیون کارواکرول در پژوهش Satelo- Boyas و همکاران (۲۰۱۷) نیز بررسی شد. در این پژوهش برای محاسبه‌ی بازدهی کپسولاسیون از آنالیز HPLC استفاده شد. مطابق با نتایج به دست آمده، بازدهی کپسولاسیون کارواکرول ۶۸ درصد محاسبه شد که در محدوده‌ی بازدهی به دست آمده در مطالعه‌ی پیش رو می باشد [۳۲]. تفاوت در بازدهی کپسولاسیون می تواند به دلیل نسبت های وزنی متفاوت کیتوسان-TPP، کیتوسان-اسانس و مقدار اولیه‌ی اسانس باشد [۳۱].

در پژوهش حاضر، هدف از بهینه کردن روش سنتز، بررسی اثرات متقابل بین متغیرها برای دستیابی به نانوذرات کیتوسان با اندازه‌ی ذرات کوچک تر و پراکندگی مناسب بود که در مطالعات پیشین، این اثرات متقابل بررسی نشده است. هم پوشانی مناسب داده های آزمایشگاهی و مقادیر پیش بینی شده توسط مدل ارائه شده، بوسیله‌ی ضریب تشخیص ۰/۹۸ و ۰/۹۷ به ترتیب برای نانوذرات کیتوسان- تیمول و کیتوسان- کارواکرول تایید شد، که نشان می دهد استفاده از روش سطح پاسخ برای تخمین میانگین اندازه ذرات نانوذرات کیتوسان کپسوله شده با اسانس روشی قوی و قابل اعتماد است.

#### ۵- منابع

[1] Keawchaon, L., Yoksan, R (2011) Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 84 (1), 163-171.

- [24] Asghari, S.M., Ebrahimi Samani, S., Seraj, Z., Khajeh, Kh., Hosseinkhani, S (2013) optimization of chitosan nanoparticles synthesis. *JMBS*. 4 (2), pp. 65-73.
- [25] Kaloti, M., Bohidar, H.B (2010) Kinetics of coacervation transition versus nanoparticle formation in chitosan-sodium tripolyphosphate solutions. *Colloids Surf. B*. 81 (1), pp.165-173.
- [26] Esmaeilzadeh-Gharehdaghi, E., Faramarzi, M.A., Amini, M.A., Moazeni, E. Amani, A. (2014) Processing/formulation parameters determining dispersity of chitosan particles: an ANNs study. *J. microencapsul.* 31 (1), pp. 77-85.
- [27] Cui, H., Feng, Y., Ren, W., Zeng, T., Lv, H., Pan, Y. (2009) Strategies of large-scale synthesis of monodisperse nanoparticles. *Recent Pat. Nanotechnol.* 3 (1), pp.32-41.
- [28] Akbarzadeh, A., Samiei, M., Davaran, S. (2012) Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Res. Lett.* 7 (1), pp. 1-13.
- [29] Huang, K.S., Sheu, Y.R., Chao, I.C. (2009) Preparation and properties of nano-chitosan. *Polym. Plast. Technol. Eng.* 48 (12), pp. 1239-1243.
- [30] Mohammadi, A., Hashemi, M., Hosseini, S.M. (2015) Nanoencapsulation of *Zataria multiflora* essential oil preparation and characterization with enhanced antifungal activity for controlling *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mould disease. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 28, pp. 73-80.
- [31] Medina, E., Caro, N., Abugoch, L., Gamboa, A., Díaz-Dosque, M., Tapia, C. (2019) Chitosan thymol nanoparticles improve the antimicrobial effect and the water vapour barrier of chitosan-quinoa protein films. *J. Food Eng.* 240, pp. 191-198.
- [32] Sotelo-Boyás, M., Correa-Pacheco, Z., Bautista-Baños, S., y Gómez, Y.G. (2017) Release study and inhibitory activity of thyme essential oil-loaded chitosan nanoparticles and nanocapsules against foodborne bacteria. *Int. J. Biol. Macromol.* 103, pp. 409-414.
- hydrophilic compounds using water-in-oil nanoemulsions. *Int. J. Pharm.* 220 (1-2), pp.63-75.
- [15] Anjali, C.H., Sharma, Y., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. (2012) Neem oil (*Azadirachta indica*) nanoemulsion—a potent larvicidal agent against *Culex quinquefasciatus*. *Pest Manag. Sci.* 68 (2), pp.158-163.
- [16] Jamil, B., Abbasi, R., Abbasi, S., Imran, M., Khan, S.U., Ihsan, A., Javed, S., Bokhari, H. (2016) Encapsulation of cardamom essential oil in chitosan nano-composites: In-vitro efficacy on antibiotic-resistant bacterial pathogens and cytotoxicity studies. *Front. Microbiol.* 7, p.1580.
- [17] Abreu, F.O., Oliveira, E.F., Paula, H.C., de Paula, R.C. (2012) Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. *Carbohydr. Polym.* 89 (4), pp. 1277-1282.
- [18] Zamani, Z., Alipour, D., Moghimi, H.R., Mortazavi, S.A.R., Saffary, M. (2015) Development and evaluation of thymol microparticles using cellulose derivatives as controlled release dosage form. *Iran. J. Pharm. Res.* 14 (4), p.1031.
- [19] Woranuch, S., Yoksan, R (2013) Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: I. Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. *Carbohydr. Polym.* 96 (2), pp. 578-585.
- [20] Jamali, H., Dindarloo, K., Nikpey, A (2015) Optimization of metal working fluids treatment using ferric chloride by application of response surface methodology (RSM). *J. Prevent. Med.* 2 (1), pp.10-20.
- [21] Muthuvelayudham, R., Viruthagiri, T (2010) Application of central composite design-based response surface methodology in parameter optimization and on cellulase production using agricultural waste. *Int. J. Chem. Biol. Eng.* 3 (2), pp. 97-104.
- [22] Khuri, A.I., Mukhopadhyay, S (2010) Response surface methodology. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.* 2 (2), pp. 128-149.
- [23] Hirano, S., Yoshida, S., Takabuchi, N. (1993) N-[13C O] Acetylchitosan and its digestibility by silkworms. *Carbohydr. Polym.* 22 (2), pp.137-140.



# Optimization of nanoencapsulation of carvacrol and thymol in chitosan polymer by response surface methodology (RSM)

Fatemeh Sedaghat<sup>1</sup>, Morteza Yousefzadi<sup>2\*</sup>, Arash Ghaderi<sup>3</sup>, Fatemeh Shayesteh<sup>4</sup>

1- Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

2- Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Qom, Qom, Iran.

3- Department of Chemistry, College of Sciences, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

4- Department of Fisheries Science, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

Morteza 110110@gmail.com

Receipt: 2022/12/13

Accepted: 2023/03/13

## Abstract

The volatility of essential oils and their instability against environmental factors limit their use. However, encapsulating these compounds in polymeric nanoparticles can significantly increase their half-life and make their use possible for longer periods. Chitosan, a biodegradable polymer with controlled release and low toxicity, is one of the polymers utilized in the encapsulation of essential oils. As a result, the present study was carried out with the aim of nanoencapsulation of carvacrol and thymol in chitosan using ionic gelation method and the concentration of chitosan (0.1-0.3%), TPP concentration (0.2-0.1%) and concentration of essential oil (0.1-0.2%) as three variables. The mean particle size of chitosan nanoparticles was optimized using response surface methodology and central composite design. The size and polydispersity index (PDI) were determined by DLS, essential oil loading confirmation was evaluated by FTIR, and the spectrophotometric method was used to measure the encapsulation efficiency. Then, the results of the optimization of nanoparticle synthesis were investigated. The optimum conditions for the synthesis of chitosan-thymol nanoparticles and achieving a size of 101 nm and encapsulation efficiency of 72%, a concentration of 0.11% chitosan, 0.19% TPP and 0.14% thymol were determined. In the case of chitosan-carvacrol nanoparticles, a concentration of 0.13% chitosan, 0.19% TPP and 0.15% carvacrol resulted in the formation of nanoparticles with a size of 95 nm and an encapsulation efficiency of 65%. In general, the results demonstrated the ability of the response surface methodology to predict the particle size and PDI of chitosan nano-formulations containing carvacrol and thymol.

**Keywords:** Nanocapsulation, Thymol, Carvacrol, Chitosan, Response surface methodology