



بررسی رهایش و خواص آنتی باکتریایی هیدروژل آلژینات حاوی نانوذرات بتاسیکلودکسترین

بارگذاری شده با اسانس آویشن دناپی

محمدعلی شب خیز^۱، میر خلیل پیروزی فرد^{۲*}، غلامرضا مهدوی نیا^۳، سجاد پیرسا^۲

۱- دانشجوی دکتری، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه ارومیه.

۲- دانشیار، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه ارومیه.

۳- استاد، دانشکده شیمی دانشگاه مراغه.

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۸/۱۱/۹۹

تاریخ پذیرش: ۲۵/۰۱/۱۴۰۰

کلمات کلیدی:

اسانس،

بتاسیکلودکسترین،

هیدروژل،

درونیوشانی،

رهایش.

DOI: 10.29252/fsct.18.06.05

* مسئول مکاتبات:

k.pirouzifard@yahoo.com

امروزه ترکیبات زیست فعال استخراج شده از گیاهان در توسعه و تجارت غذاهای فراسودمند حاوی غذا-دارو و مکمل غذایی رشد قابل توجهی پیدا کرده است. در این میان استفاده از اسانسها به دلیل خواص آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی و دارویی در صنایع غذایی مورد توجه قرار گرفته است. با این وجود از محدودیت های اسانسها می توان به فراریت، غیر محلول بودن در ماتریکس آبی و حساس بودن به شرایط محیطی اشاره کرد. لذا این پژوهش برای بررسی تکنیک درونیوشانی به عنوان روشی مناسب برای حفاظت از اسانس و بالا بردن کارایی آن انجام شده است. هدف اصلی این مطالعه، تولید هیدروژل های آلژیناتی حاوی اسانس آویشن دناپی بارگذاری شده در بتاسیکلودکسترین و بررسی ویژگی های فیزیکوشیمیایی شامل اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات، پتانسیل زتا، کارایی درونیوشانی، تورم هیدروژل ها و همچنین خواص ضد میکروبی و رهایش اسانس از هیدروژل ها می باشد. نتایج حاصل از آنالیز هیدروژل ها نشان داد که اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات به ترتیب کمتر از ۱۸۰ نانومتر و ۰/۳۱ و کارایی درونیوشانی بالای ۹۰ درصد بود. بیشترین تورم هیدروژل ها در دمای محیط ۶۱۰/۳ درصد بود. هیدروژل ها دارای اثر مهارکنندگی رشد بر روی دو سویه باکتری، استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی بودند. بررسی های میکروسکوپ الکترونی (FESEM)، نشان داد اندازه ذرات در محدوده نانومتر و ذرات کروی و همگن هستند. طیف های FTIR، پیوند جدیدی را بین اسانس، بتاسیکلودکسترین و آلژینات نشان نداد و بنابراین هیدروژل آلژینات یک ماده مناسب برای درونیوشانی کردن ترکیبات فعال می باشد. رهایش اسانس در دو دوره کوتاه مدت (شبه سازی شده دستگاه گوارش) و بلند مدت (سایر کاربرد ها) بررسی شد که نتایج نشان داد که سرعت رهایش ترکیبات زیست فعال را می توان با کپسوله کردن در بتاسیکلودکسترین و تولید هیدروژل آلژیناتی آن کاهش داد و بدین صورت می تواند به عنوان ابزار مناسبی برای کنترل رهایش در سیستم های غذایی و دارویی مورد استفاده قرار گیرد.

۱- مقدمه

اخیراً استفاده از محصولات غذایی فاقد نگهدارنده‌های شیمیایی و همچنین تحقیقات در زمینه تولید غذاهای فراسودمند حاوی ترکیبات زیست فعال برای پیشگیری و بهبود بیماری‌های مختلف توسعه پیدا کرده است [۱]. ترکیبات فنولیک یکی از مهم‌ترین زیست فعال در گیاهان معطر هستند و تاثیر آنها در پیشگیری از بیماری‌هایی مانند سرطان و بیماری‌های عصبی و سایر بیماری‌ها ثابت شده است. پلی فنل‌ها مواد حساسی هستند که به راحتی در معرض اکسیژن، نور و درجه حرارت متوسط تخریب می‌شوند و از طرفی زیست دسترسی کم این ترکیبات از دیگر محدودیت‌های مصرف این ترکیبات می‌باشد. به همین دلیل درونپوشانی این ترکیبات روش مناسبی برای رفع این محدودیت‌ها می‌باشد. برای دسترسی زیستی مواد فعال، می‌توان با استفاده از سیستم‌های حامل، آن‌ها را درون پوشانی کرد و خواص عملکردی آنها را بهبود بخشید [۲-۵].

آویشن دنیایی با نام علمی *(Thymus daenensis celak. Subsp. daenensis)* یک گیاه دارویی مهم متعلق به خانواده نعنائیان (*Lamiaceae*) است که در اغلب مناطق ایران رشد می‌کند. آویشن دنیایی حاوی ۰/۸ تا ۲/۶ درصد (معمولاً ۱ درصد) اسانس است که قسمت اعظم آن را فنل‌ها، هیدروکربن‌های مونوترپنی و الکل‌ها تشکیل می‌دهند. اسانس آویشن دنیایی دارای خواص دارویی مختلف از جمله ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد ویروس، آنتی‌اکسیدانی، ضد عفونی کننده، ضد اسپاسم، هضم کننده غذا، خلط آور، درمان رماتیسم و اختلالات پوستی و نگهدارنده طبیعی غذا می‌باشد. ترکیبات اصلی اسانس این گیاه، تیمول و کارواکرول می‌باشند این اجزاء نه تنها مسئول عطر و طعم آن هستند بلکه به اثرات بیولوژیکی آن کمک قابل توجهی می‌کند [۶-۸]. اسانس ارزشمند این گیاه به علت داشتن این ترکیبات (تیمول و کارواکرول) بیشتر در مقایسه با سایر گونه‌ها در صنایع مختلف غذایی، دارویی، بهداشتی و آرایشی کاربردهای فراوانی دارد [۹، ۱۰].

هیدروژل‌ها، ساختارهای شبکه‌ای سه‌بعدی از ترکیب زنجیره‌ی پلیمرهای خطی و قرارگرفتن پیوند عرضی بین مولکولی بین رشته‌های پلیمری بوجود می‌آیند و باعث اتصال مونومرهای

متعلق به مولکول‌های مختلف به هم می‌شوند. هیدروژل‌ها به دلیل وجود گروه‌های عاملی آبدوست در ساختار خود توانایی جذب و نگهداری مقدار زیادی آب یا سیالات زیستی را حتی زیر فشار دارند [۱۱]. اتصال‌های عرضی، عامل شبکه‌ای شدن هیدروژل‌ها بوده که موجب می‌شوند این پلیمرها در محیط آبی ضمن جذب آب متورم شده اما حل نمی‌شوند. در طول تورم، ساختمان منبسط می‌شود و مواد موثره می‌توانند به بیرون انتشار یابند [۱۲]. ریزذرات هیدروژل غذایی معمولاً هیدروژل پلیمرهای زیستی در قالب نانوکره (نانوژل) هستند که تاکنون استفاده از آنها در صنایع غذایی محدود بوده است، اما پتانسیل‌های زیادی در این صنعت در مواردی از جمله: استفاده در بسته بندی مواد غذایی [۱۳]، استفاده در تولید ماد غذایی مانند آبمیوه، سس سالاد، مایونز و آب نبات [۱۴]، کنترل احساس سیری، درون پوشانی مواد مغذی (کپسوله کردن مواد بیواکتیو حساس به محیط و پروبیوتیک‌ها)، کنترل بافت برای فرمولاسیون‌های سالم (به عنوان مثال کاهش چربی) و انتقال هدفمند در دستگاه گوارش دارا می‌باشند. ساده‌ترین مفهوم در دارورسانی از راه هیدروژل‌ها، روش کپسوله‌کردن است که دارو درون هیدروژل جاسازی یا به دام انداخته شده است. به طور کلی، توزیع همگن ملکول‌های دارو سرتاسر شبکه زله‌ای با پیوند عرضی محلول پلیمرها که دارو نیز در آن حل شده، به دست می‌آید. سپس مولکول‌های دارو در طول تشکیل ژل درون حفرات آن قرار می‌گیرند. در مقابل سیستم ماتریکسی، در سیستم‌های مخزنی دارو در بخش درونی ژل ذخیره شده و توسط سد زله‌ای ثانویه احاطه شده است. دارو رسانی با استفاده از میکرو و نانو-ذرات ویژگی‌های جذاب هردو سیستم را ترکیب می‌کند. ژل با ویژگی‌هایی مانند مقدار آب زیاد و انعطاف‌پذیری در نانوکامپوزیت‌ها شرکت می‌کند درحالی‌که نانوذرات ویژگی‌هایی مانند امکان و دسترسی در کنترل سرعت رهایش دارو، را با انتخاب ذرات با اندازه‌های مناسب به سیستم‌های دارورسانی اضافه می‌کنند [۱۵، ۱۶].

آلژینات یک پلیمر خطی و از پلی ساکاریدهای آنیونیک طبیعی محلول در آب است. ساختار آلژینات که از واحدهای α -D-مانورونیک اسید، β -L-گلورونیک اسید، که با پیوند α (۴ \leftarrow ۱) به همدیگر متصل شده است، ساخته شده است [۱۷]. آلژینات به دلیل غیر سمی بودن، زیست تخریب پذیری،

بتاسیکلودکسترین، موثرترین روش برای حفظ مواد معطر است. در این روش حفاظت بهتری در برابر فراریت در مقایسه با روشهای دیگر حاصل می‌شود [۲۳]. مهم‌ترین کاربردهایی که این نانوکپسول‌ها می‌توانند داشته‌باشد عبارتند از: پایدارسازی مواد حساس به نور یا اکسیژن، بهبود فعالیت شیمیایی مولکول مهمان، ثبات بخشیدن به مواد خیلی فرار، بهبود حلالیت مواد آبریز با حلالیت کم در آب، اصلاح مواد مایع به پودر، محافظت از مواد در برابر میکروارگانیسم‌ها، پوشاندن بو و مزه بد، پوشاندن رنگ‌دانه (پیگمنت)، فعالیت کاتالستی سیکلودکسترین با مواد مهمان، جداسازی یک ماده مشخص از مخلوط مواد برای مثال، سیکلودکسترین‌ها می‌توانند در صنعت داروسازی برای رهایش دارو و بهبود خواص دارو به طور گسترده استفاده شوند [۲۴-۲۷].

غلامیان و همکاران (۲۰۲۱) بیدهای هیدروژل آلزینات کلسیم پر شده با اسانس زیره سنتز کرده‌اند و رهایش اسانس را در شرایط شبیه سازی روده و معده بررسی نمودند. نتایج نشان داد استفاده از هیدروژل آلزینات می‌تواند ابزار مناسبی برای کنترل رهایش در سیستمهای غذایی باشد. استفاده از هیدروژل‌ها برای کپسوله سازی ترکیبات زیست فعال به عنوان یک عامل تحویل کارآمد در سیستم غذایی، آرایشی و بهداشتی و دارویی مطالعه شده است [۲۸]. در سال ۲۰۱۸، انکپسولاسیون عصاره بلوبری و ذرت بنفش در ذرات هیدروژل آلزینات-پکتین انجام شد و اثر فرایند و پارامترهای انبارداری را روی کارایی انکپسولاسیون بررسی کردند که هدف افزایش ماندگاری و عدم تخریب آنتوسیانین‌های عصاره بود. نتایج نشان داد انکپسولاسیون در هیدروژل آلزینات-پکتین بطور فراینده ای باعث کاهش تخریب آنتوسیانین‌ها و افزایش ده برابری زمان ماندگاری آنتوسیانین‌ها در مقایسه با آنتوسیانین‌های موجود در عصاره شد. بنابراین تولید هیدروژل حاوی آنتوسیانین-ها و متعاقب شرایط انبارداری خوب می‌تواند در انتقال آنتوسیانین‌ها به بدن انسان با استفاده از نوشیدنی‌ها با pH پایین همانند آبمیوه‌ها به عنوان وسیله انتقال مفید واقع شود [۲۹].

با توجه به اهمیت و توسعه استفاده از هیدروژل‌ها در صنایع غذایی و استفاده از اسانس‌ها به دلیل خواص آنتی اکسیدانی و آنتی میکروبی بالا، مهمترین هدف از این مطالعه بررسی خواص ضد میکروبی و رهایش اسانس آویشن دنیایی از هیدروژل‌ها در

سازگاری و قیمت پایین مورد توجه زیادی است. در اقلام دارویی از ماتریکس آلزینات برای ریز پوشینه دار کردن مواد، انتقال و تحویل آنها استفاده می‌شود. علاوه بر کاربرد های دارویی، آلزینات در صنعت غذا هم کاربرد های زیادی دارد و به عنوان یک تثبیت کننده و قوام دهنده در تعداد زیادی از محصولات استفاده می‌شود. همچنین برای ریز پوشینه دار کردن ترکیبات عملکردی مانند ویتامین‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها و غیره استفاده می‌شود [۱۸]. آلزینات به عنوان یک ماده پوشش دهنده توسط سازمان غذا و داروی ایالات متحده آمریکا و مقامات ایمنی مواد غذایی اروپا تأیید شده است. یکی از مزایای ریز پوشینه دار کردن در هیدروژل آلزینات این است که این ماده هیچ اثر منفی بر روی مواد ریز پوشینه دار شده ندارد [۱۹].

سیکلودکسترین‌ها که گاهی سیکلوآمیلوز، سیکلومالتوز یا دکسترین‌های شارترینگر نامیده می‌شوند، نانوکپسول‌های طبیعی تشکیل شده از واحدهای گلوکوزی هستند این واحدها با پیوندهای ۱-۴-۶-آلفا-گلوکوپیرانوزی به یکدیگر متصل شده‌اند، پرکاربردترین اولیگوساکاریدهای طبیعی آلفا-سیکلودکسترین، بتا-سیکلودکسترین (سیکلوهپتامیلوز، سیکلومالتوهپتاز) و گاما-سیکلودکسترین (به ترتیب شامل ۶، ۷ و ۸ واحد گلوکز) هستند. یکی از مهم‌ترین خصوصیت‌های سیکلودکسترین‌ها ایجاد کمپلکس‌های درهم‌جای با مولکول‌های مهمان آبریز در نانو حفره‌های خود است. بتاسیکلودکسترین‌ها با حفرات نانو (با قطر داخلی ۰.۶ نانومتر) و ابعاد نانو بیش‌ترین کاربرد را در صنعت و پژوهش به خود اختصاص داده‌اند. این مولکول در روده کور و روده بزرگ توسط باکتری مورد متابولیسم قرار می‌گیرد [۲۰، ۲۱]. بخش خارجی مولکول بتا سیکلودکسترین آبدوست و بخش داخلی آن آبریز است. مولکولهای غیر قطبی می‌توانند از طریق برهم‌کنشهای هیدروفوب داخل حفره غیرقطبی داخلی به دام بیفتند. در حفره داخلی امکان دربرگیری روغنهای اسانسی فراهم است و می‌تواند یک یا چند مولکول فرار عطر و طعمی را در بر بگیرد [۲۲]. باتوجه به ساختار منحصر به فرد این مولکول طبیعی، همچنین قیمت مناسب آن و زیست‌سازگاری، در سال‌های اخیر به طور گسترده در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی و صنعت از آن‌ها استفاده شده است. در بین روشهای درونپوشانی، روش دربرگیری مولکولی ترکیبات عطر و طعمی فرار در مولکولهای

شرایط شبیه سازی شده دستگاه گوارش در شرایط آزمایشگاهی می باشد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد

گیاه آویشن دناپی برای استخراج اسانس مورد نیاز در این پژوهش، از گلخانه دانشگاه مراغه تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. سدیم آلزینات و اتانول از شرکت نوین شیمیاری و داروسازی لقمان حکیم تهران- ایران، بتاسیکلودکستین و محیط کشت مولر هیتون آگار از شرکت سیگما آلد ریچ آمریکا، دی پتاسیم هیدروژن فسفات، اسید کلریدیک، کلرید سدیم، هیدروکسید سدیم از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. باکتری های اشرشیاکلی (ATCC 8739) و استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) از کلکسیون میکروبی دانشگاه مراغه تهیه گردید.

۲-۲- استخراج اسانس آویشن دناپی

برای استخراج اسانس آویشن دناپی (Td-EO) از دستگاه کلونجر (مدل فارماکوپه بریتانیا) استفاده شد. بدین منظور، مقدار ۱۰۰ گرم از نمونه گیاه خشک شده آویشن دناپی درون بالن یک لیتری قرار گرفت و با آب مقطر به حجم ۷۰۰ میلی لیتر رسید و پس از نصب دستگاه کلونجر روی بالن، دمای هیتر در حدود ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد و عمل استخراج به مدت ۳ ساعت ادامه پیدا کرد. سپس اسانس های استخراج شده با سولفات سدیم خشک آگیری و داخل ویال شیشه ای در دمای ۴ درجه سانتی گراد تا زمان انجام آزمایشات بعدی نگهداری گردید [۳۰].

۲-۳- شناسایی ترکیبات اسانس

برای آنالیز ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن دناپی از دستگاه Gas Chromatograph-Mass Spectrometer, (GC-Ms) مدل Agilent 5977A ساخت کشور آمریکا، با ستون HP-5 MS استفاده گردید. در برنامه ریزی دمایی آن، ابتدا دما در عرض ۵ دقیقه به ۶۰ درجه سانتی گراد رسیده سپس به تدریج دما با سرعت ۳ درجه سانتی گراد بر دقیقه افزایش یافت تا به دمای ۲۴۰ درجه سانتی گراد رسید. بعد از آن به مدت ۲۰ دقیقه در این دما نگهداری شد. هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت

جریان یک میلی لیتر بر دقیقه استفاده شد. ولتاژ یونیزاسیون mV ۷۰، روش یونیزاسیون EI و دمای یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سانتی گراد بود. محفظه تزریق در حالت تقسیم (نسبت تقسیم ۱:۳۰) تنظیم شده بود و محدوده جذب جرمی از ۴۰ تا ۴۰۰ m/z بود. به منظور محاسبه شاخص بازداری پیک ها، مخلوطی از هیدروکربن های آلیفاتیک (C8-C40) تحت شرایط تحلیلی بالا به داخل سیستم GC تزریق شد. برای جداسازی ترکیبات از دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل Agilent 7990B ساخت کشور آمریکا با آشکارساز یونیزاسیون شعله ای (FID) و ستون VF-5MS استفاده شد. دمای تزریق و آشکارساز به ترتیب روی ۲۳۰ و ۲۴۰ سانتی گراد تنظیم شده بودند. گاز هلیوم با سرعت جریان یک میلی لیتر بر دقیقه و نسبت تقسیم ۱:۲۴ استفاده شده بود. نمونه های اسانس به نسبت ۱:۱۰۰ در هگزان رقیق سازی و به میزان ۱ میکرو لیتر تزریق شدند [۳۱].

۲-۴- درونپوشانی اسانس آویشن دناپی و تولید

هیدروژل از آن

برای تولید هیدروژل، ابتدا ۰/۱ گرم بتاسیکلودکستین، در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر به وسیله همزن مغناطیسی با سرعت rpm ۴۰۰ و در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه حل گردید. سپس مقدار معینی از اسانس آویشن دناپی (در دو فرمولاسیون ۲% F2 و ۱% F1) بر روی محلول آماده شده به آهستگی در زیر التراسوند پروب دار (Ultrasonic Prob, Bandelin, D- 12217,50 kHz, V220w, Germany) (۴ سیکل یک دقیقه ای) اضافه گردید. در ادامه ۱ گرم از پودر آلزینات سدیم در ۴۰ میلی لیتر آب مقطر بوسیله همزن مغناطیسی (rpm ۴۰۰) در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ دقیقه تهیه شد. بتاسیکلودکستین بارگذاری شده با اسانس به محلول آلزینات در روی همزن مغناطیسی (rpm ۶۰۰) اضافه شد و برای همگن شدن به مدت ۱ ساعت همزده شد. برای تولید بیدهای هیدروژل، محلول سدیم آلزینات حاوی اسانس بوسیله سرنگ قطره قطره به محلول کلرید کلسیم (۲% w/w) در حال همزدن اضافه گردید (شکل ۲). پس از اتمام کار مدت زمان ۱۵ دقیقه محلول حاوی بیدها هم زده شدند و در نهایت از صافی عبور داده شد و سپس

بیدها با آب مقطر شستشو شدند و برای انجام آزمون‌های مربوطه

در ظرف در بسته در یخچال قرار داده شدند.

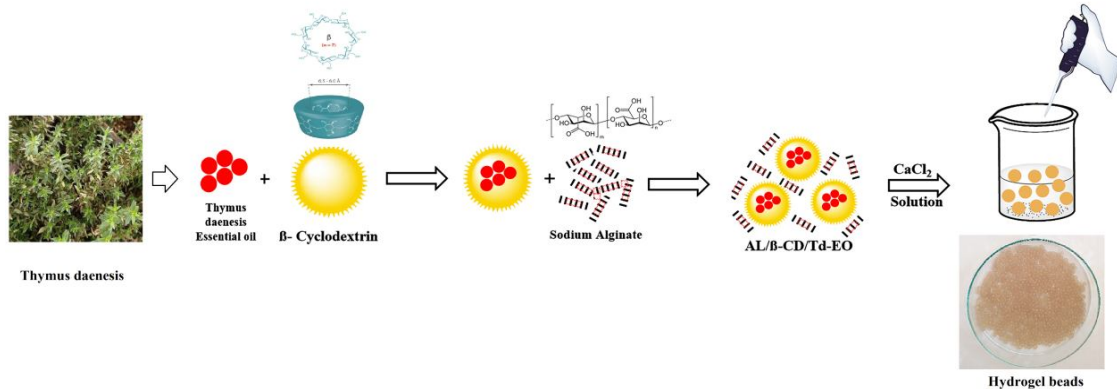


Fig 1 Schematic Hydrogel particle production process.

۲-۵- طیف نگاره فروسرخ تبدیل فوریه (اسپکتروسکوپی)

به منظور بررسی نوع برهم‌کنش‌های موجود در هیدروژل‌ها و تشکیل یا عدم تشکیل پیوندهای شیمیایی جدید، آزمون FT-IR^۱ با استفاده از دستگاه (TENSOR 27, Bruker, Germany) انجام شد. برای آماده‌سازی نمونه، هرکدام از نمونه‌ها با نسبت ۲:۲۰ با برومید پتاسیم مخلوط شده و در دستگاه پرس هیدرولیکی به شکل قرص درآمدند و در ادامه، طیف نمونه‌ها، در محدوده 4000 cm^{-1} تا 400 cm^{-1} با قدرت تفکیک پذیری 4 cm^{-1} مورد آنالیز قرار گرفت [۳۲، ۳۳].

۲-۶- تعیین اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات و پتانسیل زتا

اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات و پتانسیل زتای نمونه‌ها (بعد از رقیق شدن با آب دیونیزه) توسط دستگاه پراکنده‌گی نور دینامیکی (Microtrac Instruments, model: Nanotrac Wave) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد آنالیز شدند. این آزمون‌ها در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفتند [۳۴].

۲-۷- تعیین کارایی درونپوشانی و ظرفیت بارگذاری

برای اندازه‌گیری کارایی درون‌پوشانی^۲ و ظرفیت بارگذاری^۳ اسانس آویشن دناپی در نانوحامل‌ها، از روش سانتی‌فیوژ با کمی اصلاحات استفاده شد [۳۵، ۳۶]. بدین منظور ابتدا غلظت‌های مناسبی از اسانس با اتانول تهیه شد و جذب نمونه‌ها در طول موج دارای بیشترین جذب، ۲۷۴ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu, model UV-1800, Tokyo, Japan) خوانده شد و سپس منحنی کالیبراسیون رسم گردید و معادله آنها تعیین گردید (شکل ۲). جهت تعیین کارایی و ظرفیت بارگذاری، ابتدا بیدهای هیدروژل تخریب شدند بدین منظور مقدار معینی از کپسول‌ها در داخل فالكون‌ها توزین شدند و ۱۰ میلی‌لیتر محلول سترات سدیم (۵٪ W/V) به آنها اضافه گردید. سپس فالكون‌ها بوسیله همزن مغناطیسی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت همزده شدند تا کپسول‌ها باز شدند [۳۶، ۳۷، ۳۸]. در ادامه ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد به فالكون‌ها اضافه شد و سوسپانسیون در سانتی‌فیوژ با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. از محلول بالایی نمونه برداری شد و جذب نمونه در ۲۷۴ نانومتر خوانده شد که نشان دهنده اسانس درونپوشانی شده است. در نهایت کارایی درونپوشانی و ظرفیت بارگذاری با معادله‌های ۱ و ۲ محاسبه شد این آزمون در سه تکرار انجام شد

$$EE\% = \frac{W_T - W_f}{W_T} \times 100 \quad (1) \text{ معادله (۱)}$$

2. Entrapment Efficiency (EE%)
3. Loading Capacity (LC%)

1. Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR)

$$M = M_B / W_S \times 100 \quad \text{معادله (۳)}$$

که در آن M درصد رطوبت هیدروژل، M_B اختلاف وزن نهایی و اولیه ظرف و W_S وزن نمونه دانسیته نسبت جرم یک ماده به حجم را مشخص می کند. برای اندازه گیری این فاکتور از استوانه مدرج استفاده شد. حجم کپسول های بدست آمده را با ریختن آن ها در استوانه بدست آورده و سپس با تعیین وزن همان کپسول ها، با استفاده از معادله (۴) دانسیته محاسبه گردید [۴۰]. این آزمایشات در سه تکرار انجام شد.

$$d = W_S / V_S \quad \text{معادله (۴)}$$

که در آن d دانسیته هیدروژل، W_S وزن نمونه و V_S حجم نمونه

۲-۱۰-آزمون تورم هیدروژل

آزمون بررسی میزان تورم هیدروژل ها با توجه به روش های گزارش شده پژوهشگران انجام شد [۴۱، ۴۲]. تورم در مایع شبیه سازی سازی شده روده (SGF, pH = 1.2)، مایع شبیه سازی شده معده (SIF, pH = 7.4) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و مایع شبیه سازی شده مواد غذایی (pH = 3.5) و آب مقطر در دمای محیط بررسی شد. بدین صورت که ابتدا ۱ گرم از بیدهای هیدروژل خشک شده توزین گردید و در ۲۰ میلی لیتر از محلول-ها با pH های مشخص شده غوطه ور شد و بعد از ۲۴ ساعت وزن بید های متورم شده تعیین گردید و میزان تورم با استفاده از معادله (۵) زیر محاسبه شد.

$$DS = \frac{W_s - W_d}{W_d} \quad \text{معادله (۵)}$$

در این رابطه W_s و W_d به ترتیب وزن نمونه ی هیدروژل متورم و خشک است.

۲-۱۱-ارزیابی رهائش اسانس آویشن دنیایی

رهائش اسانس آویشن دنیایی در دو دوره کوتاه مدت (سیستم گوارشی pH=1.2, 7.4) و بلند مدت (سایر کاربرد ها pH=1.2, 3.5, 7.4) بررسی گردید. به این صورت که مقدار یک گرم از هیدروژل ها حاوی ترکیبات فعال به ترتیب در ۱۵ میلی لیتر از مایع شبیه سازی شده معده (Simulated Gastrointestinal Fluid, SGF) و مایع شبیه سازی شده

که در آن: EE%: کارایی درون پوشانی، LC%: ظرفیت بارگذاری، W_T : مقدار کل اسانس آویشن دنیایی درون پوشانی شده در فرمولاسیون، W_F : مقدار اسانس آویشن دنیایی درون پوشانی نشده (اسانس آزاد در محلول کلرید کلسیم)، W_L : وزن بیدهای هیدروژل آلزینات.

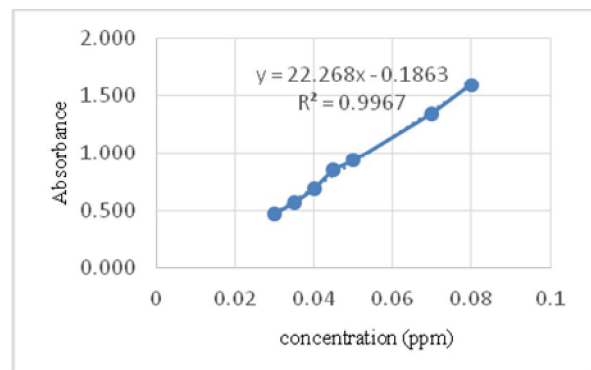


Fig 2 Calibration curve for encapsulation efficiency of Td-EO.

۲-۸- میکروسکوپ پوشش الکترونی

(FESEM)

مرفولوژی سطح نمونه ها توسط دستگاه FESEM⁴ مدل (MIRA III, FESEM, TE-SCAN, Czech Republic) بررسی شدند. ابتدا هیدروژل های بید شده با خشک کن انجمادی، خشک و به صورت پودر درآمدند و در ادامه آماده سازی نمونه ها بعد از رقیق سازی توسط آب مقطر و قرارگیری روی لام و خشک کردن آن در هوا و در دمای محیط انجام گرفت و در سپس نمونه ها با طلا در اتمسفر آرگون پوشش داده شدند و تصویربرداری صورت گرفت [۳۸].

۲-۹-اندازه گیری درصد رطوبت و دانسیته

توده ای هیدروژل ها

برای اندازه گیری رطوبت هیدروژل ها ابتدا مقدار ۲ گرم از کپسول ها به دقت در یک پلیت تمیز که قبلاً توزین شده بود ریخته شد. و در آن در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد خشک شد. و پس از رسیدن به وزن ثابت از آن خارج و در دسیکاتور قرار داده شد. ظرف حاوی نمونه خشک شده توزین شد و با محاسبه تفاوت وزن اولیه ظرف و نمونه با وزن حاوی نمونه خشک شده، درصد رطوبت نمونه با معادله (۳) محاسبه شد. [۳۹].

4. Field Emission Scanning Electron Microscopy (FE-SEM)

همچنین خاصیت ضد میکروبی هیدروژل‌ها به عنوان متغیرهای وابسته در نظر گرفته شد.

۳- بحث و نتایج

۳-۱- ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن دنايي

آنالیز شیمیایی مربوط به ترکیبات موجود در اسانس آویشن دنايي با استفاده از GC-MS انجام شد. کروماتوگرام ترکیبات موجود (شکل ۳) و ۳۳ نوع ترکیب فعال شناسایی شده در جدول شماره (۱) آمده است. بیشترین میزان ماده فعال اسانس ترکیبی به نام کارواکرول^۱ است که حدود ۶۱/۵ درصد از کل اسانس را تشکیل می‌دهد. بقیه ترکیبات عمده شامل Benzene (۱۵/۹)، γ -Terpinene (۵/۹) و Thymol (۴/۸) درصد می‌باشد که این نتایج با یافته‌های امیری (۲۰۱۲) که اعلام کردند حدود ۵۲/۳ درصد از اسانس آویشن دنايي را کارواکرول تشکیل می‌دهد، مطابقت دارد [۴۶]. کارواکرول و تیمول از ترکیبات اصلی اسانس روغنی بدست آمده از گونه‌های مختلف آویشن هستند که در آب نامحلول می‌باشند ولی در الکل و اتر حل می‌شوند. کارواکرول یک ترکیب فنولی مونوترپنیک است که ساختار آن به صورت ۵-ایزوپروپیل -۲- متیل فنول و فرمول شیمیایی آن به صورت C₁₀H₁₄O است [۳۹].

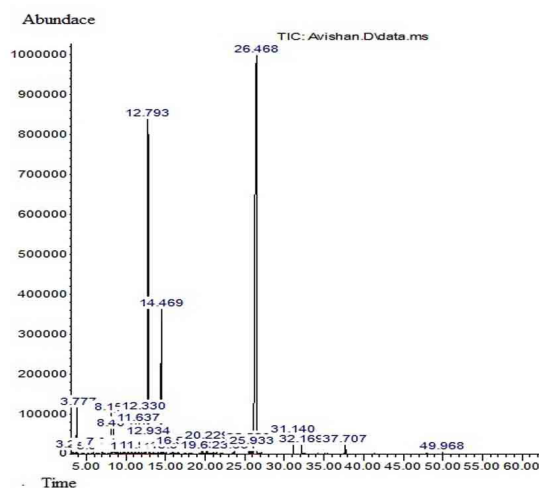


Fig 3 GC-MS chromatogram of *Thymus daenensis* essential oil (47)

روده (Simulated Intestinal Fluid, SIF) غوطه ور شد و در آن شیکر دار به سرعت ۵۰ دور در دقیقه به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد [۴۳، ۳۶]. مایع شبیه سازی شده معده اسید کلریدریک ۰/۱ مولار بود که pH آن با هیدروکسید سدیم به ۱/۲ رسید. مایع شبیه سازی شده روده محلول بافر فسفات که pH آن با هیدروکسید سدیم در ۷/۴ تنظیم شده بود. در ادامه اسانس آزاد شده در بافرها با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر تعیین گردید. درصد رهائش عصاره با معادله (۶) محاسبه شد.

$$\text{معادله (۶)} \quad (\%) = (Mc/Me) \times 100$$

Mc مقدار اسانس آزاد شده و Me مقدار اسانس کپسوله شده در هیدروژل‌ها پس از تخریب مقدار مشخص از هیدروژل‌ها در محلول ۵ درصد سیترات.

۲-۱۲- آزمایش بررسی ویژگی ضد باکتریایی هیدروژل‌ها

برای این منظور محیط کشت مولر هیتون آگار^۲ تهیه و سپس غلظت مشخصی (1.4×10^8 CFU/ml) از باکتری‌های اشرشیاکلی (ATCC 8739, Gram-negative) و استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923, Gram-positive) در شرایطی کاملاً استریل کشت داده شدند سپس بر روی هر کدام از پتری دیش‌های حاوی باکتری، بیدهای سنتز شده با هر کدام از بسترها (دارای اسانس و بدون اسانس) قرار داده شد و در دمای ۳۷ °C به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور گذاشته شد. خواص ضد میکروبی بیدهای هیدروژل با اندازه گیری اندازه منطقه عدم رشد "شفاف" در اطراف بیدهای مورد بررسی قرار گرفت [۴۵، ۴۴].

۲-۱۳- محاسبات آماری

آزمون‌های فیزیکی و شیمیایی بر اساس طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون چند دامنه ای دانکن از نرم افزار آماری SPSS 19 در سطح احتمال ۹۵ درصد ($P < 0.05$) برای تایید وجود اختلاف بین میانگین‌ها استفاده شد. در این مطالعه، غلظت اسانس در هیدروژل‌ها به عنوان متغیر مستقل و خواص فیزیکوشیمیایی هیدروژل‌ها (اندازه ذرات، کارایی درون‌پوشانی، تورم و...) و

6. Carvacrol

5. Mueller Hinton (MH) agar

Table 1 GC-MS analysis indicating phytochemical compounds of *Thymus daenensis* essential oils

No.	Compound	Concentration (peak area %)	Retention time (min)
1	2-Aminooxazole	0.0689	3.2528
2	Octane	0.8792	3.7792
3	Undecane	0.0352	5.9249
4	Nonane	0.2118	7.0293
5	α -Thujene	1.3333	8.1508
6	α -Pinene	0.8684	8.4083
7	Nitrous acid	0.0789	8.7916
8	Camphene	0.0837	9.0377
9	Nonane	0.1040	9.7815
10	Tetradecane	0.0680	9.9074
11	Nonane	0.1619	10.2107
12	β -pinene	0.1485	10.3366
13	1-Octen	0.1914	10.6513
14	3-Heptene	0.0994	10.7829
15	β -Myrcene	1.1800	11.1949
16	Decane	0.2224	11.6355
17	Δ -3-Carene	0.0715	11.9902
18	α -Terpinene	0.5295	12.3278
19	Benzene	15.9714	12.7913
20	β -phyllandrene	0.5984	12.9343
21	γ -Terpinene	5.9209	14.4678
22	Linalool	2.1251	14.8226
23	Cyclohexen	0.1273	15.8983
24	Undecane	0.2523	16.5964
25	2-Isopropylfuran	0.0762	19.629
26	4-Terpineol	0.6741	20.2298
27	2-Cyclohexen	0.1031	23.663
28	Thymol	4.8386	25.5284
29	Carvacrol	61.5581	25.9347
30	trans-Caryophyllene	0.6834	31.1416
31	1,2-Benzenediol	0.3235	32.1659
32	Caryophyllene oxide	0.3173	37.7047
33	Tricyclo	0.0483	49.9669
Identification Components (%)		99.8466	

۳-۲-طیف نگاره فروسرخ تبدیل فوری

بررسی گروه‌های عاملی و پیوندهای موجود در ترکیبات اولیه و همچنین گروه‌های عاملی و پیوندهای تشکیل شده در بین مواد سنتزی با استفاده از روش طیف سنجی فروسرخ تبدیل فوری (FT-IR) انجام شد. ترکیبات اولیه و هیدروژل‌های سنتز شده در این تحقیق توسط این روش طیف سنجی مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴). طیف FT-IR سدیم آلزینات نشان می‌دهد که گروه‌های عاملی موجود در این ترکیب با گروه‌های $\text{C}-\text{OH}$ ، $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ ، $\text{OH}=\text{C}$ می‌باشد. ارتعاشات کششی OH به صورت

باند پهنی در محدوده $3500-3200 \text{ cm}^{-1}$ مشاهده می‌شود. پیک ناحیه 2926 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی CH_2 می‌باشد. پیک ناحیه $1641-1425 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاشات کششی متقارن و نامتقارن گروه‌های کربوکسیلات $\text{C}=\text{OH}$ می‌باشد. پیک دو شاخه و پهن موجود در حوالی ناحیه 1084 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی پیوند $\text{C}-\text{O}$ می‌باشد و باند ناحیه 614 cm^{-1} مربوط به ارتعاش خمشی OH می‌باشد. در طیف FT-IR بتاسکلودکسترین، گروه‌های عاملی موجود در این ترکیب گروه OH ، پیوندهای $\text{C}-\text{O}$ ، $\text{C}-\text{C}$ ، $\text{C}-\text{H}$ می‌باشند. پیک بسیار پهن و قوی موجود در حدود 3387 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات

الکترواستاتیکی می‌باشد. این نوع اتصالات فیزیکی، ماهیت ترکیبات زیست فعال ترکیبات کپسوله شده را حفظ می‌کند و می‌تواند سرعت رهایش آنها را افزایش دهند.

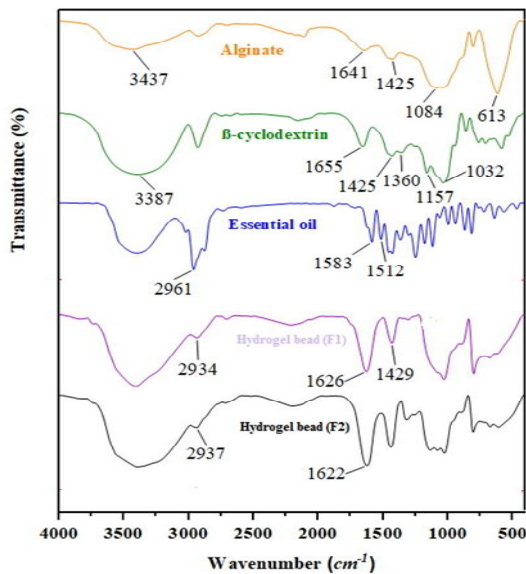


Fig 4 FT-IR Spectra of Alginate, β -CD, Td-EO and hydrogel beads (F1, F2)

۳-۳- اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات و پتانسیل

زتا

میانگین اندازه ذرات در هیدروژل‌ها در محدوده ۱۶۷-۱۸۰ نانومتر متفاوت بود (جدول ۲). تاثیر غلظت اسانس بر روی اندازه ذرات معنی‌دار ($P < 0.05$) می‌باشد به طوریکه در مقایسه دو فرمولاسیون، با افزایش میزان اسانس اندازه ذرات کاهش پیدا کرد. که احتمالاً به دلیل خصوصیات فیزیکوشیمیایی ترکیبات فعال، حلالیت، قطبیت آنها می‌باشد. این نتایج با یافته‌های Zou و همکارانش (۲۰۱۵) گزارش داده بودند که میانگین ذرات قطر امولسیون هنگام افزایش ذرات کلئیدی کمپلکس زئین / اسید تانیک کاهش می‌یابد مطابقت می‌کند [۴۹]. همچنین در پژوهش دیگری که توسط Qiu و همکارانش در سال ۲۰۱۸ صورت گرفت نتایج مشابهی بدست آمد بطوریکه آنها گزارش کرده بودند متوسط اندازه ذرات در MOF های مبتنی بر سیکلودکسترین و اسید گلیسیریزیک (CD-MOF / GA) که با افزایش نسبت فاز پراکنده به کل امولسیون (CD-MOF / GA) از ۱:۲ به ۱:۳ قطر نانوکپسول‌ها کاهش پیدا می‌کرد [۵۰]. توزیع اندازه ذرات

کششی گروه‌های OH ترکیب بتاسیکلودکسترین است. پیک موجود در ناحیه 2927 cm^{-1} مربوط به پیوندهای C-H و پیک موجود در ناحیه 1654 cm^{-1} مربوط به گروه‌های کربونیل $=\text{C}$ موجود در ترکیب می‌باشد. پیک‌های موجود در نواحی $1450-1350 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاشات خمشی پیوندهای C-C, C-H هستند. پیک موجود در ناحیه 1158 cm^{-1} نشان دهنده ارتعاشات کششی پیوندهای گلیکوزیدی C-O-C می‌باشد. و پیک ناحیه 1031 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی پیوندهای C-O-H می‌باشد. در طیف مربوط به اسانس، پیک موجود در حوالی 3397 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی گروه‌های OH می‌باشد. بدلیل زوج شدن ارتعاشی گروه‌های متیلنی موجود در ترکیب اسانس دو باند جذبی در نواحی 2879 cm^{-1} و 2837 cm^{-1} و 2960 cm^{-1} خواهیم داشت. پیک ناحیه 1512 cm^{-1} و 1583 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات اسکلتی حلقه می‌باشد. پیک دو شاخه نواحی 1426 cm^{-1} و 1453 cm^{-1} حاصل همپوشانی ارتعاش خمشی متیلن و ارتعاش خمشی متیل ترکیب می‌باشد. پیک ناحیه 1362 cm^{-1} ارتعاش خمشی متیلن را نشان می‌دهد و پیک موجود در ناحیه 1246 cm^{-1} ارتعاشات کششی OH فنولی را نشان می‌دهد. در بررسی طیف‌های FTIR هیدروژل‌ها این نتیجه حاصل شد که، هر چقدر طول موج یک پیوند یا گروه عاملی کم و فرکانس آن زیاد باشد، آن پیوند یا گروه‌های عاملی قوی‌تر است. گروه -OH از سایر پیوندها و گروه‌ها قوی‌تر بود. همچنین پراکنش^۷ و مساحت زیر پیک در طیف‌ها هر قدر زیاد باشد، نشان دهنده این است که ترکیب پیوند محکمی برقرار نموده است. ضمناً در طیف‌ها، دامنه پیک هر پیوند یا گروه، هر قدر بزرگتر باشد، نشان می‌دهد که آن دارای پیوند قوی‌تری است. با مقایسه طیف‌های هیدروژل‌ها و طیف هریک از اجزای تشکیل دهنده آنها، نشان داد که پیک جدیدی در آنها ایجاد نشده است لذا می‌توان نتیجه گرفت که پیوند شیمیایی جدیدی بین مواد دیواره و ترکیبات اسانس تشکیل نشده است [۲۸]. به این ترتیب تشکیل کمپلکس به جای واکنش‌های شیمیایی، توسط برهم‌کنش‌های الکترواستاتیکی صورت گرفته است. بنابراین برهم‌کنش بین اسانس، بتاسیکلودکسترین و آلژینات از نوع نیروی

7. Transmittance

و شاخص مهمی برای تعیین وضعیت الکتریکی سطح ذرات است. زیرا نشان دهنده میزان تجمع بار در لایه غیرمتحرک و شدت جذب یون‌های مخالف بر روی سطح ذره است. پتانسیل زتای بالا بیانگر نقش نیروی دافعه‌ی الکترواستاتیک در پایداری فیزیکی و پراکندگی نانوکپسول‌ها و جلوگیری از تجمع آنها در طول زمان است زیرا زمانی که بار کلی روی قطرات افزایش می‌یابد ذرات یکدیگر را دفع کرده و بر توده‌ای شدن و رسوب نانوحامل‌ها غلبه می‌کنند و در واقع حضور پتانسیل زتا بر روی سطح نانوذرات بعنوان مانع الکتریکی باعث دافعه و پایداری فیزیکی و پراکندگی ذرات را به همراه دارد [۵۳]. پتانسیل زتا در فرمولاسیون (۱)، $33/9 +$ است و با افزایش میزان اسانس در فرمولاسیون (۲) به $38/7 +$ افزایش یافت. پتانسیل زتای بالای $30 \text{ mV} \pm$ نشان دهنده پایداری مناسب نانوکپسول‌ها می‌باشد. در این تحقیق پتانسیل زتا در هر دو فرمولاسیون بیشتر از 30 بود (جدول ۲) در نتیجه نانوکپسول‌ها از پایداری خوبی برخوردار بودند.

(PDI) دارای یک اثر مهم در پایداری فیزیکی نانوکپسول‌ها است و تا آنجا که ممکن است باید برای ثبات دراز مدت نانوکپسول‌ها توزیع اندازه ذرات کم باشد. توزیع اندازه ذرات در کمتر از 0.3 توزیع اندازه باریک و توزیع اندازه ذرات بیش از 0.5 نشان دهنده یک توزیع گسترده می‌باشد و در حقیقت توزیع اندازه ذرات کمتر از 0.3 نمونه‌ها نشان می‌دهد، سیستم همگن و یکنواخت می‌باشد [۵۱، ۵۲]. شاخص توزیع اندازه ذرات تا اندازه‌ای به روش تولید نانوکپسول‌ها بستگی دارد و با روش‌های تولید نانوکپسول‌ها، توزیع اندازه ذرات متفاوتی هم برای یک نوع سیستم، گزارش می‌شود. شاخص پراکندگی اندازه ذرات برای فرمولاسیون (۱) $0/05 \pm 0/25$ و برای فرمولاسیون (۲) برابر $0/03 \pm 0/31$ متغیر بود (جدول ۲) که نشان دهنده یک توزیع نسبتاً باریک دارد که دلیل آن نیز احتمالاً به علت استفاده از پروب سونیکاتور می‌باشد.

روش معمول برای تعیین خصوصیات الکترواستاتیک نانوحامل‌ها، تعیین پتانسیل زتا می‌باشد که بار کلی ذره در یک محیط مایع یا اختلاف پتانسیل بین لایه یونی متحرک و لایه غیرمتحرک می‌باشد

Table 2 particle size, PDI, zeta potential, encapsulation efficiency, and loading capacity for hydrogel beads

Hydrogel beads no.	The average size of Particle (nm)	PDI	Zeta potential (mv)	EE %	LC %
F1	$3.95^b \pm 180$	$0.01^a \pm 0.25$	$0.8^a \pm 33.9$	$1.31^a \pm 93.12$	$0.4^b \pm 2.38$
F2	$2.80^a \pm 167$	$0.02^b \pm 0.31$	$1.1^b \pm 38.7$	$2.70^b \pm 90.29$	$0.54^a \pm 1.15$

Results are the average and standard deviations (SD) from three individual experiments

فرار اسانس را نداشتند. در تحقیق رچمادی و همکاران (۲۰۱۵)، انکپسولاسیون کورکومین و سیلیمارین برای تهیه نانوامولسیون به روش التراسونیک انجام شد، نتایج نشان داد که با افزایش ترکیبات فعال در تهیه نانوامولسیون کارایی درون‌پوشانی کاهش پیدا می‌کند به طوری که افزایش مقدار این دو ماده از 5 به 35 میلی‌گرم در هر گرم روغن، کارایی درون‌پوشانی کورکومین از 99 درصد به 75 درصد و حدود 80 درصد برای سیلیمارین با کاهش همراه بود [۵۴]. ظرفیت بارگذاری در فرمولاسیون ۱ و ۲ به ترتیب $0/4 \pm 2/38$ و $0/54 \pm 1/15$ بود و در واقع با افزایش میزان اسانس در ساختمان هیدروژل‌ها، ظرفیت بارگذاری کاهش یافت. این نتایج با یافته‌های غلامیان و همکاران (۲۰۲۱)، که

۳-۴- کارایی درون‌پوشانی و ظرفیت بارگذاری

کارایی درون‌پوشانی یکی از فاکتورهای مهم برای ارزیابی ظرفیت نانوحامل‌ها جهت رهایش ترکیبات فعال است. این ویژگی تحت تاثیر فرایند تهیه، حجم نمونه و خصوصیات سطحی نمونه قرار دارد. نتایج حاصله از آنالیز واریانس و مقایسه بین میانگین تیمارها نشان داد نسبت فاز پراکنده به کل نانوامولسیون به طور معنی داری ($P < 0.05$) بر روی کارایی درون‌پوشانی اثرگذار بود. چنانچه در جدول شماره (۲) مشاهده می‌شود با افزایش نسبت فاز پراکنده (اسانس) به کل سیستم، کارایی درون‌پوشانی روند نزولی پیدا کرده است که این حالت نشان می‌دهد که با افزایش درصد اسانس در فرمولاسیون (۲)، مولکولهای بتاسیکلو دکسترین و آلژینات توانایی کامل برای به دام اندازی مولکولهای

اندازه ذرات در محدوده نانومتر است و ذرات گرد و همگن هستند و به نظر می‌رسد شکل کروی نانو ذرات در نتیجه پوشش بوسیله بیو پلیمر آلژینات می‌باشد [۵۵]. پوشش با آلژینات علاوه بر محافظت از ترکیبات فعال، با کروی کردن نانو ذرات سبب افزایش توانایی نانو ذرات در کنترل رهایش آنها می‌گردد. چراکه کروی بودن و شکل صاف سطح سبب افزایش سطح مخصوص می‌شود که برای واکنش‌های شیمیایی مطلوب و بیشترین مسیر برای حرکت ترکیبات محبوس شده به سطح نانو ذرات در مقایسه با سایر اشکال را دارد [۵۶].

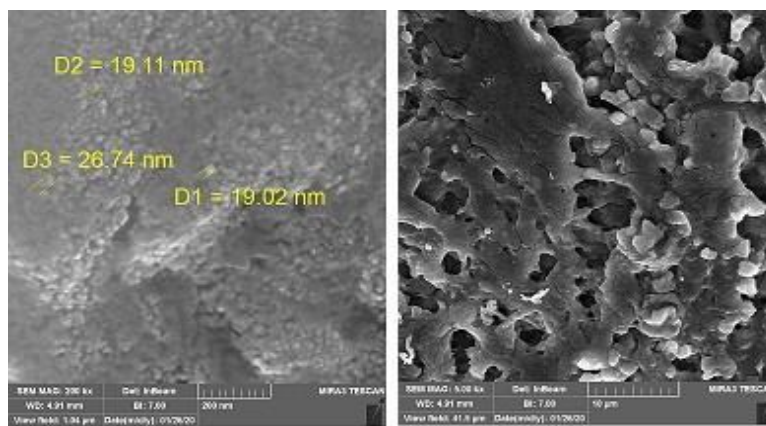


Fig 5 FE-SEM images of alginate-hydrogel beads (F2)

(۲۰۰۸) رطوبت کپسول‌های حاصل از کمپلکس آلژینات را ۹۸/۳۸ درصد اعلام کردند [۳۹]. نجفی و همکاران (۲۰۱۶) با بررسی خصوصیات فیزیکی هیدروژل‌ها تولید شده، رطوبت، فعالیت آبی، دانسیته و قطر هیدروژل‌ها را به ترتیب 0.37 ± 0.1 ، $97/81 \pm 0.005$ ، 98 ± 0.015 ، 0.76 ± 0.1 گرم بر میلی‌لیتر و $3/4 \pm 0.1$ میلی‌متر اعلام کردند [۳۶]. نتایج پژوهش‌های قبلی با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

۳-۷- تورم هیدروژل‌ها

تورم نتیجه جذب مایعات توسط هیدروژل است و با اندازه گیری جرم هیدروژل محاسبه می‌شود. میزان تورم هر یک از هیدروژل‌ها با اندازه گیری حداکثر مقدار آب جذب شده توسط آنها در pHهای مختلف برآورد شد. درجه‌ی تورم هیدروژل‌های یونی حساس به pH با درجه‌ی یونیزاسیون، تراکم پیوندهای عرضی و مقدار گروه‌های عاملی حساس در آنها تعیین می‌شود [۴۲]. نتایج نشان داد (جدول ۳) تورم هیدروژل‌ها علاوه بر اینکه با pH در

اسانس زیره را در بیدهای هیدروژل آلژینات کپسوله کرده بودند مطابقت دارد [۲۸].

۳-۵- میکروسکوپ الکترونی FE-SEM

FE-SEM روشی مناسب برای بدست آوردن اطلاعات در مورد مورفولوژی نانو کپسول‌ها است. در واقع با اسکن سطح مواد، تصویری از آن ارائه می‌دهد که به منظور ریخت‌شناسی سطح مواد و بررسی اندازه نانو ذرات حبس شده در زمینه مواد مورد استفاده قرار می‌گیرد. شکل (۵) تصاویر FE-SEM از بیدهای فریز درایر شده را نشان می‌دهد. همانطور که مشخص است

۳-۶- مقدار رطوبت و دانسیته

هیدروژل‌های تولید شده به شکل بیدهای گرد و به رنگ کرمی روشن بودند. مقدار رطوبت هیدروژل‌ها $96/19 \pm 0.31$ ٪ و دانسیته حجمی 0.2 ± 0.084 گرم بر میلی‌لیتر بود. به طور کلی، ظرفیت بالای جذب آب آلژینات منجر به تشکیل یک شبکه سه بعدی با محتوای رطوبت بالا می‌شود. علاوه بر این، وجود منافذ زیاد در ماتریس آلژینات باعث ایجاد تراکم کم هیدروژل‌ها می‌شود [۳۶، ۲۸]. بناویدس و همکاران (۲۰۱۶) گزارش دادند میزان رطوبت و چگالی هیدروژل‌ها تحت تأثیر ماهیت ماده اصلی قرار می‌گیرند. هسته روغنی (اسانس) باعث کاهش رطوبت و چگالی بیدهای آلژینات می‌شود [۵۷]. کوردوبا و همکاران (۲۰۱۳) خصوصیات فیزیکی هیدروژل آلژینات کلسیم را مورد بررسی قرار دادند که مقدار رطوبت، دانسیته و قطر بیدهای را به ترتیب $96/66$ درصد، دانسیته را 0.78 گرم بر میلی‌لیتر و قطر بیدها را $3/88$ میلی‌متر گزارش دادند [۴۰]. دلادینو و همکاران

همچنین نتایج نشان داد با افزایش میزان اسانس در ساختمان هیدروژل‌ها، تورم بیدها تحت تاثیر قرار گرفته و کاهش پیدا می‌کند به طوری که درجه تورم در هر سه pH مورد آزمایش در فرمولاسیون (۱) در سطح معنی دار ($P < 0.05$) بیشتر از فرمولاسیون (۲) بود. بیشترین درجه تورم در فرمولاسیون شماره (۱) و در آب مقطر اتفاق افتاد که حدود 61.03 ± 1.03 درصد) بود. قابل ذکر است که تورم بیدها در $pH = 7/4$ ، بدلیل تخریب هیدروژل‌ها بعد از ۲ ساعت، اتفاق نیافتاد.

ارتباط است به ترکیبات فعال درونپوشانی شده در هیدروژل‌ها نیز وابسته است. تورم زیاد دانه های هیدروژل در آب مقطر ۵/۵ pH= را می توان با توجه به مقدار pKa گروه های کربوکسیلات بر روی اسکلت آلزینات ($pKa \sim 4.5$) توضیح داد [۵۷]. در حقیقت، قسمت اصلی گروههای کربوکسیلات در حالت تفکیک ($-CO_2^-$) است و دافعه اجباری باعث تورم زیاد بیدهای هیدروژل می‌شود. تورم بیدها در pH های ۳/۵ و ۱/۲، با توجه به اینکه محیط کاتیونی می‌تواند به عنوان شبکه‌ساز عمل کند، مانع از تورم و جذب آب توسط بیدهای هیدروژل می‌شود.

Table 3 Swelling ration of different hydrogel beads, and Td-Essential Oil released (%) in simulated fluids

Hydrogel beads formulation	Swelling ration of different hydrogel beads		Td-Essential Oil released (%) in simulated fluids		
	pH=1.2	pH=3.5	Distilled water	SGF	SIF
F1	$0.210^b \pm 1.574$	$0.350^b \pm 2.120$	$0.440^a \pm 6.103$	$0.33^b \pm 3.61$	$0.35^a \pm 8$
F2	$0.340^a \pm 1.32$	$0.240^a \pm 1.780$	$0.320^b \pm 3.650$	$0.52^a \pm 7.79$	$0.56^b \pm 18.2$

Reported values were measured in triplicate and correspond to the mean \pm SD

آلزینات منجر به افزایش اندازه منافذ دانه های هیدروژل می شود و در نتیجه اسانس می توانند به راحتی در محیط آزاد شود. Corstens و همکاران (2017)، گزارش کردند که pH و نیروی یونی محیط، تاثیرات قابل توجهی بر خصوصیات فیزیکی بید های آلزینات دارند [۵۹]. در این راستا، با وجود اینکه ثبات عالی بیدهای آلزینات در SGF قابل دستیابی است، اما تورم و متلاشی شدن بیدها در SIF و نیروی یونی بالا اجتناب ناپذیر است [۶۰]. تحقیقات قبلی نشان داد که بید ها تحت شرایط محیطی SGF تورم کمی دارند، در حالی که تورم و متلاشی شدن بید های آلزینات در انتهای فاز روده رخ می دهد [۶۱، ۵۹]. با توجه به وابستگی رهایش اسانس به pH از بیدهای آلزینات می تواند به عنوان یک گزینه امیدوار کننده در طراحی حامل دارویی هوشمند با فعالیت رهایش در روده در نظر گرفته شود. در بررسی رهایش بلند مدت (در فیلم‌ها و پوشش‌های غذایی و...) همانطور که ذکر شد هدف در این حالت، این است که همواره غلظت مناسبی از ترکیبات فعال با خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی در ماده غذایی وجود داشته باشد که بتواند عمر ماندگاری ماده غذایی را افزایش دهد. بررسی رهایش در دوره بلند مدت در pH های ۷/۴، ۳/۵ و ۱/۲، به مدت ۱۰ روز انجام شد همانطور که در نمودار ها (شکل ۶) مشخص است میزان درصد رهایش اسانس در $pH = 1/2$ نسبت به دو pH دیگر

۳-۸- رهایش در کوتاه مدت

در مورد انجام آزمون رهایش، رهایش کنترل شده و تدریجی همواره باید مورد توجه قرار گیرد. در مورد غذا-دارو (دوره کوتاه مدت) رهایش کمتر ترکیبات فعال در طول مدت زمان نگهداری مد نظر است. در این حالت ترکیبات موثره به صورت کامل وارد بدن شده و در محل مناسب رهایش می‌یابند. در مورد مواد ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی که هدف از افزودن آنها افزایش عمر ماندگاری مواد غذایی است (بلند مدت)، هدف رهایش تدریجی ماده فعال می‌باشد. در این حالت، همواره غلظت مناسبی از ترکیبات فعال با خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی در ماده غذایی وجود خواهد داشت و در طول نگهداری از مواد غذایی از آن محافظت خواهد کرد. بدین منظور، آزمون رهایش در مدل‌های غذایی و رهایش در مدت زمانی نگهداری مورد بررسی قرار گرفتند. رهایش ترکیبات فعال از بیدهای آلزینات در محیط مورد نظر، با درجه تورم بید در ارتباط است. رهایش اسانس از بید های آلزینات در (SGF (pH 1.2 و SIF (pH 7.4) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت، بررسی شد (جدول ۳). نتایج نشان داد در محیط SIF، میزان رهایش اسانس نسبت به محیط SGF بیشتر بود. رهایش زیاد عوامل فعال از بیدها با میزان تورم زیاد بیدها در SIF مطابقت دارد. درواقع، نیروهای دافعه بین گروه های کربوکسیلات آنیونی

۳-۹-ویژگی ضد باکتریایی هیدروژل‌ها

فعالیت ضد میکروبی بیدهای هیدروژل غنی شده با نسبت‌های مختلف از اسانس در برابر اشرشیاکلی (ATCC 8739, Gram-negative) و استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923, Gram-positive) بررسی گردید. فعالیت ضد باکتری با اندازه گیری هاله عدم رشد "شفاف" در اطراف بیدهای هیدروژل آزمایش شده، ارزیابی شد (شکل ۷). نتایج نشان داد در اطراف بیدهای بدون اسانس (blank) که به عنوان نمونه شاهد استفاده شد، هاله‌ای مشاهده نشد ولی در اطراف بیدهای هیدروژل با غلظت‌های مختلف اسانس در سطح معنی داری ($p < 0.05$) اثر مهارتی بیدهای هیدروژل در برابر دو سویه باکتری مشاهده گردید (جدول ۴). با افزایش میزان اسانس در بیدها فعالیت مهارتی بیشتری ایجاد شد به طوریکه در بیدهای هیدروژل حاوی ۲ درصد اسانس قطر هاله برای استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی به ترتیب 18 ± 2.01 و 11 ± 1.80 بود. اثر مهارکنندگی رشد هیدروژل‌ها بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به مراتب بیشتر از اشرشیاکلی می‌باشد که ممکن است به دلیل تفاوت غشای خارجی بین باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت باشد و در واقع غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی مانند اشرشیاکلی به طور غالب از لیپوپلی‌ساکارید مستحکم شده‌اند که سد مقاومی در برابر عوامل ضد میکروبی محسوب می‌شود. یافته‌های پژوهشگران قبلی نشان می‌دهد که باکتری‌های گرم منفی نسبت به گرم مثبت‌ها در برابر اسانس‌های روغنی مقاومتر هستند [۶۲، ۶۳، ۶۴]، که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد.

کمتر است و در واقع با افزایش pH میزان ره‌ایش اسانس افزایش پیدا می‌کند. این به وابستگی ره‌ایش اسانس به pH از بیدهای آلزینات که با تورم هیدروژل‌ها در محیط‌ها، با pHهای مختلف در ارتباط است، قابل توجه می‌باشد.

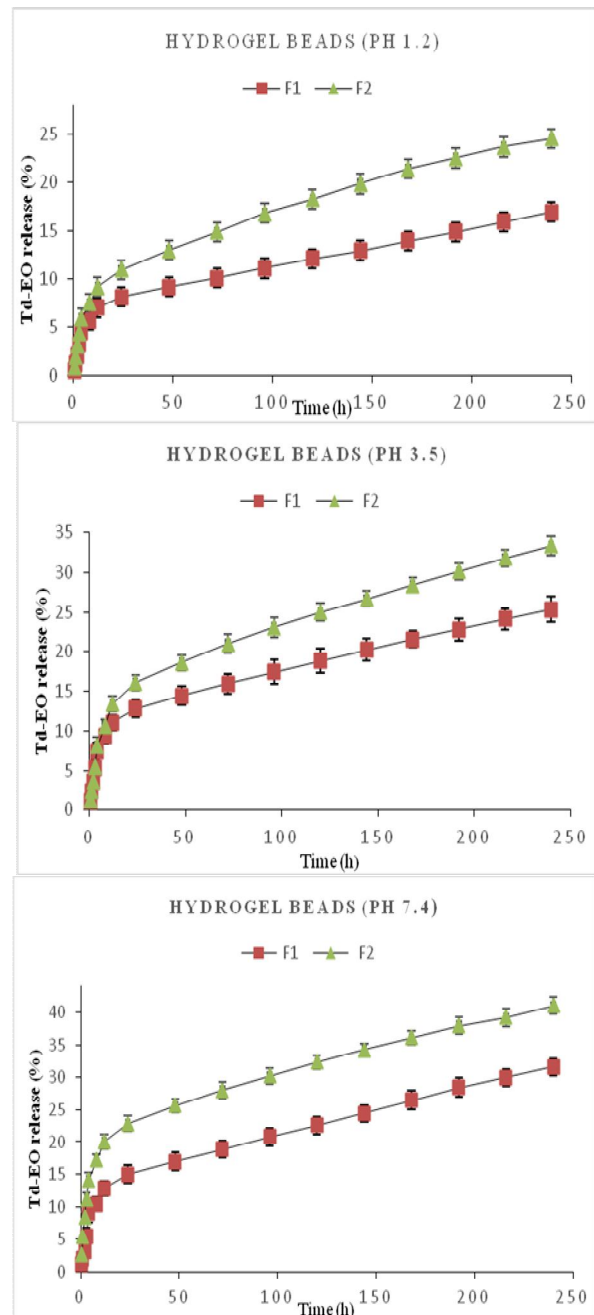
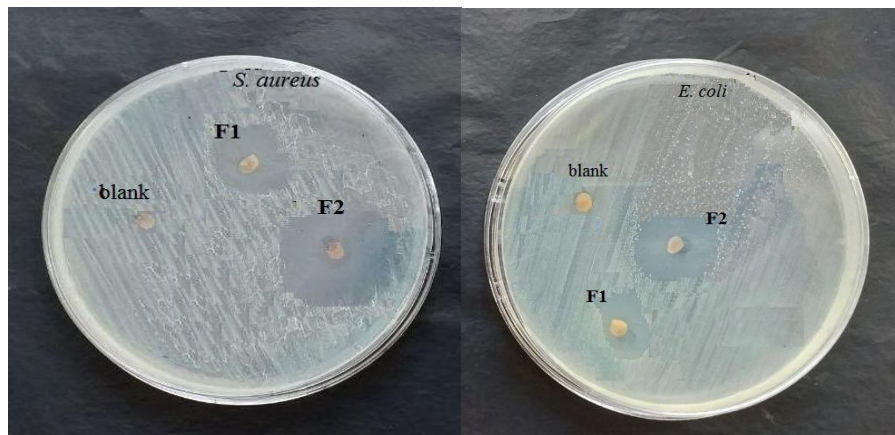


Fig 6 Release rate of Td-Essential Oil from hydrogel beads in three different pH

Table 4 Antimicrobial activity of hydrogel beads

Hydrogel beads formulation	Zone of growth inhibition (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
blank	Not Detected	Not Detected
F1	1.12 ^a ± 10	0.19 ^b ± 6
F2	2.01 ^b ± 18	1.80 ^a ± 11

Reported values were measured in triplicate and correspond to the mean ± SD

**Fig 7** The antibacterial activity of hydrogel beads

رساندن ترکیبات زیست فعال به بدن انسان به عنوان وسیله انتقال باشند.

۴- نتیجه گیری

در این مطالعه، اسانس آویشن دناپی در بتاسیکلودکستین بارگذاری و در تولید هیدروژل آلژینات به کار برده شد. سپس پارامترهای فیزیکوشیمیایی هیدروژلها، خواص ضد میکروبی و رهایش اسانس در دو دوره کوتاه مدت و بلند مدت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که کارایی درونپوشانی بالای ۹۰ درصد بود. داده های FTIR، هیچ تعاملی بین ترکیبات اسانس و مواد تشکیل دهنده دیواره هیدروژلها نشان نداد. هیدروژل های تولید شده دارای خواص ضد میکروبی بر روی دو سویه میکروبی اشرفیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط آزمایشگاهی بودند. میزان رهایش اسانس در مایعات شبیه سازی شده روده، بیشتر از مایعات شبیه سازی شده معده بود و بدین صورت می تواند به عنوان ابزار مناسبی در طراحی دارویی هوشمند با فعالیت رهایش کنترل شده در روده و همچنین در سیستمهای غذایی مورد استفاده قرار گیرد. از طرفی، گنجاندن هیدروژل ها در محصولات غذایی مانند نوشیدنی ها، ژله ها، آب نبات ها، سس سالاد و سس مایونز می تواند وسیله ای برای

۵- منابع

- [1] Shahidi, F. (2009). Nutraceuticals and functional foods: whole versus processed foods. *Journal of Food Science and Technology*, 20, 376-387.
- [2] Zhavah, S., Mohsenifar, A., Beiki, M., Khalili, S. T., Abdollahi, A., Rahmani-Cherati, T., Tabatabaei, M. (2015). Encapsulation of Cuminum cyminum essential oils in chitosan-caffeic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *Industrial Crops and Products*, 6, 251-256.
- [3] Rahman, A. U., Choudhary, M. I., Farooq, A., Ahmed, A., Iqbal, M. Z., Demirci, B., Demirci, F., Baser, K. H. C. (2000). Antifungal activities and essential oil constituents of some species from Pakistan. *J. Chem. Soc. Pak.* 22, 60-65.
- [4] Ghamari, M., Amiri, A., Rezazadeh-Bari, M., Rezazad-Bari, L., (2021) Physical,

- matrices containing a soluble drug. *Journal of Controlled Release*, Vol: 61 pp: 83–91
- [13] Shewan, H.M., Stokes J.R. (2013). Review of techniques to manufacture micro-hydrogel particles for the food industry and their applications. *Journal of Food Engineering*, 119, 781-792.
- [14] Pourjafar, H., Noori, N., Gandomi, H., Basti, A. A., & Ansari, F. (2020). Viability of microencapsulated and non-microencapsulated *Lactobacilli* in a commercial beverage. *Biotechnology Reports*, 25, e00432. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00432>.
- [15] Peppas, N. A., Hilt, J. Z., Khademhosseini, A., Langer, R. (2006). Hydrogels in biology and medicine: From molecular principles to bionanotechnology,” *Adv. Mater.*, vol. 18, no. 11, pp. 1345–1360.
- [16] Jahanbakhsh, A., Pirsā, S., Bahram, M., (2017) Synthesis and characterization of magnetic nanocomposites based on Hydrogel-Fe 3O 4 and application to remove of organic dye from waste water. *Main Group Chemistry* 16 (2), 85-94.
- [17] Sargus-Patino, C. (2013). Alginate hydrogel as a three-dimensional extracellular matrix for in vitro models of development. A dissertation. University of Nebraska, Lincoln.
- [18] Paques, J. P., E. van der Linden, C. J. van Rijn and L. M. Sagis. (2013). Alginate submicron beads prepared through w/o emulsification and gelation with CaCl₂ nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 31, 428-434.
- [19] Petzold, G., M. P. Gianelli, G. Bugueno, R. Clelan, C. Pavez and P. Orellana. (2014). Encapsulation of liquid smoke flavoring in calcium-alginate and calcium-alginate-chitosan beads. *Food Sci. Technol.* 51: 183-190.
- [20] Jozwiakowski, M. J., Connors, K.I. (1985). Aqueous solubility behavior of three cyclodextrins,” *Carbohydr. Res.*, vol. 143, no. C, pp. 51–59.
- [21] Frank, D. W., Gray, J. E. and Weaver, R. N. (2004). *Constructing Place: Mind and the Matter of Place-Making*, p. 352.
- [22] Desai, K. G. H., Park, H. J. (2005). Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology: An International Journal*, 23 (7), 1361- 1394.
- mechanical, and antimicrobial properties of active edible film based on milk proteins incorporated with *Nigella sativa* essential oil. *Polymer Bulletin*. Published online: 30 January 2021.
- [5] Pirsā, S., Karimi Sani, I., Pirouzifard, M.K. and Erfani, A. (2020). Smart film based on chitosan/*Melissa officinalis* essences/pomegranate peel extract to detect cream cheeses spoilage. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 37(4), pp.634-648.
- [6] Malik, M.S, Sattar, A., and Khan, S.A. (1987). Essential oils of the species of labiatae. Part III. Studies on the essential oil of *Zataria multiflora*. *Pakistan, J. Sci. Ind. Res*, 30, 751-3.
- [7] Bistgani, Z. E., Siadat, S. A., Bakhshandeh, A., Pirbalouti, A. G., Hashemi, M., Maggi, F., & Morshedloo, M. R. (2018). Application of combined fertilizers improves biomass, essential oil yield, aroma profile, and antioxidant properties of *Thymus daenensis* Celak. *Industrial crops and products*, 121, 434-440.
- [8] Abousaber, M., Khanavi, M., Khoshchehre, M., Hajiakhoondi, A., Shams Ardekani, M.R., and Shafiee. A. (2012). Composition of the Essential Oils of *Thymus deanensis* Celak Var. *deanensis* from Different Regions of Iran. *Journal of Medicinal Plants*. Vol. 11, No. 41, pp: 34-39.
- [9] Nickavar, B., Mojab, F., & Dolat-Abadi, R. (2005). Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran. *Food Chemistry*, 90(4), 609-611.
- [10] Golparvar, A. R., Hadipanah, A., Mehras Mehrabi, A. (2015). Effect of phenological stage on yield, essential oil and thymol percentage of *Thymus daenensis* grown in Iran. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*, 5(1), 2903-2910.
- [11] Hou, X., Bish, D. L., Wang, S. L., Johnston, C. T. and Kirkpatrick, R. J. (2003). Hydration, expansion, structure, and dynamics of layered double hydroxides, *Am. Mineral.*, vol. 88, no. 1, pp. 167–179.
- [12] Colombo, P., Bettini, R., Peppas, N., (1999). Observation of swelling process and diffusion front position during swelling in hydroxypropyl methyl cellulose (HPMC)

- [31] Morshedloo, M. R., Maggi, F., Neko, H. T., Aghdam, M. S. (2018). Sumac (*Rhus coriaria* L.) fruit: essential oil variability in iranian populations. *Industrial Crops and Products*, 111, 1-7.
- [32] Fathi M., Varshosaz J., Mohebbi M., Shahidi F. (2013) Hesperetin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructure Lipid Carriers for Food Fortification: Preparation, Characterization, and Modeling. *Food Bioprocess Technol.* V(6) pp:1464–1475.
- [33] Karimi Sani, I., Ardebilchi Marand, S., Alizadeh, M., Amiri, S., Asdagh, A., (2020) Thermal, Mechanical, Microstructural and Inhibitory Characteristics of Sodium Caseinate Based Bioactive Films Reinforced by ZnONPs/Encapsulated *Melissa officinalis* Essential Oil. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*. Published online: 09 October 2020.
- [34] Hadiana, Z., Malekia, m., Abdib, K., Atyabic, F., Mohammadia, A., Khaksar, R. (2018). Preparation and Characterization of Nanoparticle β -Cyclodextrin:Geraniol Inclusion Complexes. *Iranian Journal of pharmaceutical Research*, 17 (1): 39-51.
- [35] Criado P., Frascini C., Jamshidian M., Salmieri S., Desjardins N., Sahraoui A., Lacroix M. (2019). Effect of cellulose nanocrystals on thyme essential oil release from alginate beads: study of antimicrobial activity against *Listeria innocua* and ground meat shelf life in combination with gamma irradiation. Published online: 15 may 2019, Springer.
- [36] Najafi-Soulari, S., Shekarchizadeh, H., & Kadivar, M. (2016). Encapsulation optimization of lemon balm antioxidants in calcium alginate hydrogels. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, 27(16), 1631–1644.
- [37] Paris, M.J., Ramírez-Corona N., Palou E., Lopez-Malo A.. (2020). Modelling release mechanisms of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil encapsulated in alginate beads during vapor-phase application. *Journal of Food Engineering*. 282. 110024.
- [23] Madene, A. Jacquot, M. Scher, J., Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science & Technology*. 41 (1), 1–21.
- [24] Namazi, H., Bahrami, S., Entezami, A. (2005). patible Prodrugs of β -Cyclodextrin Linked with PEG Containing Ibuprofen or,” vol. 14, no. 10, pp. 921–927.
- [25] Zhang, xu., Zhang, Xi., Wu, Z., Gao, X., Cheng, C., Wang, Z., Li, C. (2011). A hydrotropic β -cyclodextrin grafted hyperbranched polyglycerol co-polymer for hydrophobic drug delivery. *Acta Biomater.* vol. 7, no. 2, pp. 585–592.
- [26] Wani, T. A., Shah, A. G., Wani, S. M., Wani, I. A., Masoodi, F. A., Nissar, N., Shagoo, M. A. (2016). Suitability of different food grade materials for the encapsulation of some functional foods well reported for their advantages and susceptibility. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(15), 2431-2454.
- [27] Zandi, M., Dardmeh, N., Pirsar, S., Almasi, H., (2017) Identification of cardamom encapsulated alginate–whey protein concentrates microcapsule release kinetics and mechanism during storage, stew process and oral consumption. *Journal of Food Process Engineering* 40 (1), e12314.
- [28] Gholamian,S., Nourani, M., Bakhshi, N. (2021). Formation and characterization of calcium alginate hydrogel beads filled with cumin seeds essential oil. *Food Chemistry* 338 , PP: 128143
- [29] Guo, J., Giusti, M., Kaletun, G. (2018). Encapsulation of purple corn and blueberry extracts in alginate-pectin hydrogel particles: Impact of processing and storage parameters on encapsulation efficiency. *Food Research International*, 107.pp, 414–422.
- [30] Morshedloo, M. R., Craker, L. E., Salami, A., Nazeri, V., Sang, H., Maggi, F. (2017). Effect of prolonged water stress on essential oil content, compositions and gene expression patterns of mono-and sesquiterpene synthesis in two oregano (*Origanum vulgare* L.) subspecies. *Plant physiology and biochemistry*, 111, 119-128.

- [48] White, S.B. (2011). Antibacterial efficacy of phosvitin, carvacrol, or nisin alone or combined against foodborne human enteric pathogens. Theses and Dissertations. 2011.
- [49] Zou, Y., Guo, J., Yin, S. W., Wang, J. M., & Yang, X. Q. (2015). Pickering emulsion 466 gels prepared by hydrogen-bonded zein/tannic acid complex colloidal particles. *J. Agric. Food Chem.* 63, 7405–7414.
- [50] Qiu, C., Wang, J., Qin, Y., Xu, x., and Jin, z., (2018). Characterization and mechanisms of novel emulsions and nano-emulsion gels stabilized by edible cyclodextrin-based MOFs and glycyrrhizic acid. *J. Agric. Food Chem.* Publication Date (Web): 11 Dec 2018.
- [51] Lakshmi, P., & Kumar, G. A. (2010). Nanosuspension technology: A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2(4), 35-40.
- [52] Rafiee, Z., Barzegar, M., Sahari, M, A., Maherani, B. (2017). Nanoliposomal carriers for improvement the bioavailability of high – valued phenolic compounds of pistachio green hull extract. *Food Chemistry*. 215, 157–164.
- [53] Patil, G. B., Patil, N. D., Deshmukh, P. K., Patil, P. O., & Bari, S. B. (2016). Nanostructured lipid carriers as a potential vehicle for Carvedilol delivery: Application of factorial design approach. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44(1), 12-19.
- [54] Rachmadi, UW., Permatasari, D., Rahma, A., Rachmawati, H. (2015). Self-Nanoemulsion Containing Combination of Curcumin and Silymarin: Formulation and Characterization. *Research and Development on Nanotechnology in Indonesia* 2(1): 37- 48.
- [55] Bernela M., Ahuja M., Thakur R. (2016). Enhancement of anti-inflammatory activity of glycyrrhizic acid by encapsulation in chitosan-katira gum nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 105, pp: 141–147.
- [56] Burey, P., Bhandari, B. R., Howes, T., Gidley, M. J. (2008). Hydrocolloid gel particles: Formation, characterization, and application. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(5), 361–377.
- [57] Benavides, S., Cortes, P., Parada, J., & Franco, W. (2016). Development of alginate microspheres containing thyme essential oil
- [38] Rashidzadeh, B., Shokri, E., Mahdavinia, G.R., Moradi, R., Mohamadi-Aghdam, S., Abdi, S. (2020). reparation and characterization of antibacterial magnetic-/pH-sensitive alginate/Ag/Fe₃O₄ hydrogel beads for controlled drug release. *International Journal of Biological Macromolecules*. V (154), 134-141
- [39] Deladino, L., Anbinder, P. S., Navarro, A. S., Martino, M. N. (2008). Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohyd. Polym.* 71: 126-134.
- [40] Cordoba, A. L., Deladino, L., Martino, M. (2013). Effect of starch filler on calcium-alginate hydrogels loaded with yerba mate antioxidants. *Carbohyd. Polym.* 95: 315-323.
- [41] Farhoudian, S., Yadollahi, M., Namazi, H. (2016) Facile synthesis of antibacterial chitosan/CuO bio-nanocomposite hydrogel beads, *International journal of biological macromolecules*, 82 ,pp: 837-843.
- [42] Omidian, H., Park, K. (2008). Swelling agents and devices in oral drug delivery, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 18, no. 2, pp. 83–93.
- [43] Cordoba AL, Deladino L, Martino M. (2013). Effect of starch filler on calcium-alginate hydrogels loaded with yerba mate antioxidants. *Carbohyd. Polym.*;95: 315-323.
- [44] Pirsā, S., Farshchi, E., Roufegarinejad, L., (2020) Antioxidant/antimicrobial film based on carboxymethyl cellulose/gelatin/TiO₂-Ag nano-composite. *Journal of Polymers and the Environment* 28 (12), 3154-3163.
- [45] Asdagh, A., Sani, IK., Pirsā, S., Amiri, S., Shariatifar, N., (2021). Production and characterization of nanocomposite film based on whey protein isolated/copper oxide nanoparticles containing coconut essential oil and paprika extract. *Journal of Polymers and the Environment* 29 (1), 335-349.
- [46] Amiri, H. (2012). Essential oils composition and antioxidant properties of three thymus species. *Hindawi Publishing Corporation, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Vol 2012, pp:1-8.
- [47] Heidari Z, Salehzadeh A, Sadat Shandiz SA, Tajdoost S. (2018). Anti-cancer and Antioxidant properties of ethanolic leaf extract of *Thymus vulgaris* and its bio-functionalized silver nanoparticles. *3 Biotech* 8: 177.

- controlled intestinal protein delivery: Effect of chitosan and barium counter-ions on entrapment and release. *J. Microencapsul.* 2005, 22, 91–100.
- [62] Ramos, O. L., Santos, A. C., Leao, M. V., Pereira, J. O., Silva, S. I., Fernandes, J. C., Franco, M. I., Pintado, M. E., Malcata, F. X. (2012). Antimicrobial activity of edible coatings prepared from whey protein isolate and formulated with various antimicrobial agents. *Int. Dairy J.* 25, 132–141.
- [63] Smith-Palmer, A.; Stewart, J.; Fyfe, L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* 1998, 26, 118–122.
- [64] Almasi, H., Azizi, A., Amjadi, S. (2020). Development and characterization of pectin films activated by nanoemulsion and Pickering emulsion stabilized marjoram (*Origanum majorana* L.) essential oil. *Food Hydrocolloids* 99 (2020) 105338.
- using ionic gelation. *Food Chemistry*, 204, 77–83.
- [58] Abasalizadeh, F., Moghaddam, S., Alizadeh, E., akbari, E., Kashani, E., Fazljou, S., Torbati, M., Akbarzadeh, A. (2020). Review: Alginate-based hydrogels as drug delivery vehicles in cancer treatment and their applications in wound dressing and 3D bioprinting. *Journal of Biological Engineering.* 14:8.
- [59] Corstens, M.N., Berton-Carabin, C.C., Elichiry-Ortiz, P.T., Hol, K., Troost, F.J., Masclee, A.A., Schroën, K. (2017). Emulsion-alginate beads designed to control in vitro intestinal lipolysis: Towards appetite control. *J. Funct. Foods*, 34, 319–328.
- [60] Seeli, D.S., Dhivya, S., Selvamurugan, N., Prabakaran, M. (2016). Guar gum succinate-sodium alginate beads as a pH-sensitive carrier for colon-specific drug delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* 91, 45–50.
- [61] Bhopatkar, D., Anal, A.K., Stevens, W.F. (2005). Ionotropic alginate beads for



Evaluation of release and antibacterial properties of alginate hydrogel containing beta-cyclodextrin nanoparticles loaded with *Thymus daenensis* essential oil

Shabkhiz, M. A. ¹, Piruzifard, M. Kh. ^{2*}, Mahdavinia, G. R. ³, Pirsa, S. ²

1. Ph.D. Student of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran.
2. Associated Professor of the Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran.
3. Professor of Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Maragheh, Maragheh, Iran.

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article History:

Received 2021/02/06

Accepted 2021/04/14

Keywords:

Essential oil,
β-Cyclodextrin,
Hydrogel,
Encapsulation,
Release.

DOI: 10.29252/fsct.18.06.05

*Corresponding Author E-Mail:
k.piruzifard@yahoo.com

Because of antioxidant, antimicrobial, and medical properties, bioactive compounds extracted from plants have grown significantly in the development and trade of functional foods containing food-medicine and dietary supplements. However, the volatility, insolubility in the aqueous matrix, and sensitivity to environmental conditions such as temperature, oxygen, and light limit the use of essential oils. Therefore, this study was conducted to investigate the encapsulation technique as a suitable method to protect the essential oil and increase its efficiency. The main purpose of this study was to produce alginate hydrogels containing *Thymus daenensis* essential oil (Td-EO) loaded with beta-cyclodextrin. The structural properties and antimicrobial features of alginate hydrogel beads incorporated with Td-EO active ingredients were evaluated. The results of hydrogel analysis showed that the particle size and particle size distribution were less than 180 nm and 0.31, respectively, and the encapsulation efficiency of Td-EO for the hydrogel beads was about 90%. A maximum swelling capacity of ~610.3 % was obtained for alginate beads. FESEM, showed that the particle sizes were in the nanometer range and the particles were homogeneous and spherical shapes. FTIR analysis indicated no significant interaction between essential oil, beta-cyclodextrin and alginate, so alginate hydrogel is a suitable material for encapsulating active compounds. Hydrogels had an inhibitory effect on the growth of two strains of bacteria, *S. aureus* and *E. coli*. The release of Td-EO from alginate beads in two short-term and long-term periods were studied. The release rate of bioactive compounds can be reduced by encapsulating in β-cyclodextrin and producing its alginate hydrogel, and thus can be used as a suitable tool to control release in food and pharmaceutical systems.