

فرمولاسیون تولید نانوامولسیون اسانس روغنی زیره سیاه با استفاده از روش طرح مخلوط و بررسی خواص ضد میکروبی آن

امید احمدی^۱

۱- استادیار گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

[*o.ahmadi@uok.ac.ir](mailto:o.ahmadi@uok.ac.ir)

چکیده:

اسانس روغنی زیره سیاه از ترکیبات فرّار و با ارزش زیستی برخوردار بوده که این ترکیبات خواص ضدباکتریایی و ضدقارچی بالایی از خود نشان می‌دهند. نانوامولسیون‌ها با داشتن سطح تماس بالا میان فاز روغنی و فاز آبی ویژگی‌های زیستی اسانس را تقویت کرده و دسترسی به بافت‌های هدف را تسهیل می‌نمایند. تولید نانوامولسیون به روش آب مادون بحرانی می‌تواند به افزایش اثربخشی مواد فعال آن کمک کند. این مطالعه به فرمولاسیون نانوامولسیون اسانس روغنی زیره سیاه با استفاده از طرح مخلوط می‌پردازد. در پژوهش حاضر اسانس روغنی زیره سیاه با استفاده از دستگاه کلونجر استخراج گردید و میزان $3/6$ میلی‌لیتر بدست آمد. سپس بر اساس طراحی مخلوط، بهینه‌سازی فرمولاسیون با مقادیر اسانس روغنی زیره سیاه ($0/1-1/9$)، میلی‌لیتر، امولسیفایر توئین 80 ($1-4$) میلی‌لیتر و آب مقطر ($23/9-20/1$ میلی‌لیتر) تحت شرایط آب مادون بحرانی با درجه حرارت 150 سانتی‌گراد به مدت 90 دقیقه انجام شد. نتایج نشان داد بهترین فرمولاسیون برای مقادیر اسانس زیره سیاه، امولسیفایر و آب مقطر به ترتیب $0/62$ ، $2/75$ و $21/63$ میلی‌لیتر است که در این حالت آنالیز DLS نانوامولسیون، میانگین اندازه ذرات 156 نانومتر، شاخص پراکندگی $0/196$ و پتانسیل زتای $24/1$ - میلی ولت را نشان داد. کاربرد محصول تولیدشده در شرایط بهینه با خاصیت ضدقارچی به روش نفوذ سنجیده شد و مقدار مهارت کنندگی رشد قارچ پنی سیلینیوماکسپانسوم $68/78\%$ و خاصیت ضدباکتریایی آن در برابر دو گونه گرم منفی /شرشیاکولی و گرم مثبت /استافیلوکوکوس اورئوس و به ترتیب برابر با $1/4$ و $1/6$ سانتی‌متر بود.

واژه‌های کلیدی: اسانس زیره سیاه، طرح مخلوط، ضدقارچی، ضد باکتریایی، آب مادون بحرانی، فرمولاسیون نانوامولسیون

۱- مقدمه

در سال‌های اخیر، پژوهش‌های نانومقیاس در حوزه فرمولاسیون داروها و مواد مصرفی بهداشتی-دارویی به تولید نانومولسیون‌ها به‌سوی روشی کارآمد برای محافظت از اسانس‌های طبیعی متمایل شده است [۱]. اسانس روغنی زیره سیاه از ترکیبات فرّار و با ارزش زیستی برخوردار است که عمدتاً شامل تیموکینون، کاربانول و سایر ترکیبات ترپنوییدی است. این ترکیبات با دارا بودن خواص ضدباکتریایی و ضدقارچی، بهبود عملکرد دستگاه گوارش، تقویت پاسخ‌های ایمنی و اثرات ضد میکروبی از خود نشان می‌دهند [۲، ۳]. به‌دلیل میزان بالای فعالیت زیستی و قابلیت ترکیب با حامل‌های نانویی، اسانس زیره به‌عنوان یک منبع طبیعی با پتانسیل بالا برای مصرف‌های دارویی، آرایشی-بهداشتی و غذایی مطرح است. از منظر پایش ایمنی و پایداری نیز، استخراج و فرمولاسیون مناسب این اسانس می‌تواند کارایی بالا را با کاهش سمیت‌های محیطی و بهبود پخش‌پذیری در سیستم‌های آبی فراهم کند [۴].

نانومولسیون‌ها با داشتن سطح تماس بالا میان فاز روغنی و فاز آبی می‌توانند ویژگی‌های زیستی اسانس را تقویت کرده و دسترسی به بافت‌های هدف را تسهیل کنند [۵]. طراحی آزمایش و بهینه‌سازی با روش طرح مخلوط^۱ برای بهینه‌سازی ترکیب‌های سه‌گانه استفاده می‌شود. طرح مخلوط روشی آماری-کمی است که امکان پیش‌بینی پاسخ‌هایی مانند اندازه ذرات نانومولسیون، پایداری فازها و کارایی و کاربرد ضد میکروبی را فراهم می‌آورد و با حداقل تعداد آزمایش‌ها ترکیبات بهینه را مشخص می‌کند. این رویکرد در سه رکن فرمولاسیون یعنی فاز روغنی، فاز آبی و امولسیفایر امکان تعیین نسبت‌های بهینه را فراهم می‌کند تا به کمینه‌سازی اندازه ذرات و بهبود پایداری دست‌یافت [۶، ۷].

روش تولید نانومولسیون با استفاده از آب مادون بحرانی روشی متفاوت و مفیدتر از سایر روش‌ها بوده چراکه به کاهش مصرف سورفکتانت‌ها، کاهش انرژی مصرفی و کاهش تأثیرات زیست‌محیطی منجر می‌شود [۸]. در این دسته از سیستم‌ها سه بخش اصلی وجود دارد: فاز روغنی که اسانس را دربردارد، فاز آبی که در شرایط مادون بحرانی کنترل می‌شود و عامل سطحی که با کاهش انرژی سطحی و افزایش پایداری امولسیون به ایجاد سیستم‌های همگن در اندازه نانومتر کمک می‌کند. انتخاب کنترل‌کننده سطحی (امولسیفایرها) مناسب و مقدار مصرف آن‌ها همراه با نسبت‌های فاز روغنی و آبی با کمک طرح مخلوط بهینه می‌شود تا اندازه ذرات، پراکندگی کم و پایداری مطلوب به دست آید. مزیت اصلی این روش، کاهش انرژی لازم، کاهش سمیت ناخواسته و نیاز کمتر به مواد افزودنی است که به بهبود سازگاری زیستی و کارایی ضد میکروبی نانومولسیون‌های اسانس منجر می‌شود [۹].

یکی از نکات کلیدی کاربرد نانومولسیون‌ها، کارایی ضد میکروبی آنهاست [۱۰]. خواص ضد میکروبی به دودسته اصلی ضدباکتریایی و ضدقارچی تقسیم‌بندی شده و گستره وسیعی از میکروب‌ها را در برمی‌گیرد [۱۱]. اسانس زیره سیاه با ترکیبات فعال خود می‌تواند بر باکتری‌های گرم مثبت و منفی و همچنین برخی قارچ‌ها اثرگذار باشد، اما این اثر به نحوه فرمولاسیون، اندازه ذرات و پایداری امولسیون و حضور عوامل کمکی مانند سورفکتانت‌ها بستگی دارد. نانومولسیون‌های با اندازه‌های نانومتری و پایداری مناسب، دسترسی اسانس به سطح میکروب‌ها را افزایش داده و تماس سطحی با باکتری‌ها و قارچ‌ها را بهبود می‌بخشند. بنابراین، ارزیابی دقیق خواص ضد میکروبی شامل بررسی اثر ضدباکتریایی و بررسی اثر ضدقارچی ضروری بوده تا دامنه کاربردی این فرمولاسیون روشن گردد [۱۲].

فرمولاسیون نانومولسیون اسانس روغنی زیره سیاه با استفاده از روش طرح مخلوط و تولید با آب مادون بحرانی، رویکردی نوین و دارای پتانسیل بالا برای بهبود کارایی ضد میکروبی، پایداری و کاهش تأثیرات زیست‌محیطی است. با به‌کارگیری طرح مخلوط، می‌توان نسبت‌های فاز روغنی، فاز آبی و حامل سطحی را به روشی کارآمد و با کمترین میزان آزمایش مشخص کرد تا اندازه ذرات مناسب و پایداری مطلوب به دست آید [۱۳]. ارزیابی‌های ضد میکروبی می‌تواند دامنه کاربردی فرمولاسیون را روشن کند و با ارائه داده‌های کمینه‌کننده و پاسخ‌های بدست آمده در برابر باکتری‌ها و قارچ‌های منتخب، امکان تصمیم‌گیری برای

¹Mixture Design

کاربردهای دارویی یا صنعتی را فراهم سازد [۱۴]. در تحقیق حاضر به منظور بهینه‌سازی و کاهش تعداد آزمایش‌ها، از نرم‌افزار تحلیل آماری جهت طراحی آزمایش استفاده شد. روش مورد استفاده طراحی آزمایش مخلوط بوده و جهت بهینه‌سازی فرمولاسیون تولید نانوامولسیون اسانس روغنی زیره سیاه استفاده شد که پس از تولید محصول مورد نظر، خاصیت ضدباکتریایی و ضد قارچی آن مورد ارزیابی قرار گرفت. در ادامه مقاله، جزئیات مواد، روش‌های دقیق طراحی و نتایج تجربی ارائه خواهد شد تا بتوان تحلیل عمیقی از کارایی فرمولاسیون و پتانسیل‌های بهبود آن به دست آورد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

ماده اولیه و اصلی مورد استفاده در تحقیق حاضر گیاه زیره سیاه بوده که از بازارهای محلی شهرستان کرمان سفارش داده و خریداری شد. از امولسیفایر توپین ۸۰ (خریداری شده از شرکت مرک) استفاده شد جهت ایجاد پلی بین فاز آبی و روغنی که منجر به پایداری امولسیون می‌گردد. از آب مقطر تهیه شده از شرکت مروارید جهت اسانس‌گیری به‌عنوان حلال و همچنین فاز پایه آبی در فرمولاسیون نهایی نانوامولسیون اسانس زیره سیاه استفاده شد. جهت بررسی خواص ضدقارچی نانوامولسیون با خواص بهینه، از قارچ پنی سیلینیوم/اکسیانوسوم (PTCC 89046) و برای اندازه‌گیری خاصیت ضدباکتریایی از دو گونه باکتریایی گرم مثبت/استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1112) و گرم منفی/شرشیاکولی (PTCC 1270) استفاده شد. محیط کشت^۱ PDA و^۲ PCA جهت بررسی خواص ضد قارچی و ضدباکتریایی از شرکت Oxoid (انگلستان) تهیه گردید.

۲-۲- روش‌ها

۲-۲-۱- آماده‌سازی اسانس روغنی زیره سیاه

اسانس‌گیری از زیره سیاه بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از پژوهش‌ها و تحقیقات مرتبط با استفاده از دستگاه کلونجر مشابه پژوهش احمدی و جعفری‌زاده‌المیری در سال‌های ۲۰۲۰ و ۲۰۲۱ به‌صورت زیر انجام گرفت [۱۷-۱۵]. پس از پاک‌سازی گیاه از گردوغبار و ذرات مزاحم، گیاه به قطعات کوچک و سپس به حالت پودر درآورده شد. مقدار ۱۰۰ گرم از پودر تهیه شده، به‌طور جداگانه با حدود ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر در دستگاه کلونجر وارد شده و فرایند استخراج با روش تقطیر با آب و بخار آب به مدت زمان ۲ ساعت انجام گرفت. نتیجه این عملیات، به‌دست آمدن حدود ۳/۶ میلی‌لیتر اسانس روغنی بود. با توجه به نیاز پژوهش حاضر به مقدار حداقل ۶/۵ میلی‌لیتر از اسانس، این فرایند دوباره تکرار شد تا در مجموع تقریباً ۷/۱ میلی‌لیتر اسانس روغنی زیره سیاه به‌دست آمد. این مقدار می‌تواند بسته به شدت خشک‌سازی، کیفیت ماده خام و شرایط دقیق عملیاتی تغییر کند، پس از اتمام فرآیند استخراج، جهت جلوگیری از تخریب اسانس استخراج شده در ظرف کدر درب دار در دمای یخچال (۴) درجه سانتی‌گراد) تا هنگام انجام آزمایش‌های بعدی نگهداری شد.

۲-۲-۲- طراحی آزمایش و آنالیز آماری داده‌ها

در هدف اصلی این پژوهش، بهینه‌سازی فرمولاسیون و یافتن ترکیب بهینه نسبت فاز آبی (آب مقطر)، فاز روغنی (اسانس روغنی زیره سیاه) و عامل امولسیون‌کننده (توئین ۸۰) مدنظر است تا اثرات اصلی و تعامل بین متغیرهای انتخاب شده بررسی گردیده و به نتیجه مطلوب دست‌یافت. از این رو، طراحی آزمایش و روش آماری به‌کاررفته، طراحی مخلوط است؛ روشی جمعی از تکنیک‌های آماری که برای بهبود فرایندهایی به کار می‌رود که پاسخ آن‌ها تحت تأثیر چند عامل است. با به‌کارگیری این طرح و تحلیل‌های آماری، تعداد آزمایش‌ها کاهش می‌یابد و می‌توان کلیه ضرایب مدل رگرسیون درجه دوم و تعامل‌های بین فاکتورهای فرمولاسیون را برآورد کرد. محققان متعددی نیز از این رویکرد برای بهینه‌سازی مقادیر و کاهش تعداد آزمایش‌ها استفاده کرده‌اند تا با کارآمدی بیشتری به نتایج قابل تکرار دست یابند [۲۱-۱۸].

¹ Potato Dextrose Agar

² Plate Count Agar

جهت تعیین ویژگی نهایی نانوامولسیون تولیدشده با فرمولاسیون انجام گردیده دو پارامتر میانگین اندازه نانوذرات و پتانسیل زتا^۱ بررسی و تحلیل شد. به منظور بهینه‌سازی فرمولاسیون انجام گرفته با روش طرح مخلوط با سیستم غیرکد شده، ۱۵ آزمایش انجام گرفت که در نقطه مرکزی برای تخمین خطای آزمایش نقطه مرکزی سه بار تکرار شد تا دقت زیاد حاصل گردد. مزیت سه بار تکرار آزمایش نقطه مرکزی، افزایش تکرارپذیری و دستیابی به نتیجه‌ای قطعی در آزمایش است. برای طراحی آزمایش به روش طراحی مخلوط استفاده گردید که در این روش ضرایب به صورت یک رابطه ریاضی نگارش شده و پاسخ‌های مختلف پیش‌بینی خواهد شد. معادله کلی که در آن Y_i پاسخ یا متغیر وابسته (میانگین اندازه نانوذرات و پتانسیل زتا) به صورت رابطه (۱) بوده و مقادیر X مربوط به متغیرهای مستقل با حالت مقدار حجمی و واحد میلی‌لیتر (X_1 : اسانس زیره سیاه، X_2 : امولسیفایر توئین ۸۰ و X_3 : آب مقطر) می‌باشد.

$$Y_i = a_1 X_1 + a_2 X_2 + a_3 X_3 + a_{12} X_1 X_2 + a_{13} X_1 X_3 + a_{23} X_2 X_3 + a_{123} X_1 X_2 X_3 \quad (1)$$

در معادله (۱)، ضرایب a_1, a_2, a_3 اثرات خطی (درجه اول) و a_{12}, a_{13}, a_{23} اثرات متقابل یا برهمکنش دوتایی (درجه دوم) متغیرهای انتخاب شده می‌باشد.

به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از روش آنالیز واریانس^۲ (ANOVA) و از روش آماری t-test جهت مقایسه داده‌ها استفاده گردید. در این مدل $P < 0.05$ به عنوان مقادیر آماری معنی‌دار در نظر گرفته می‌شود و جملات با $P > 0.05$ به عنوان نتایج غیر اثرگذار و بی معنی در نظر گرفته شدند. اندازه $P < 0.05$ بدین معنا بوده که مدل ارائه شده با احتمال ۹۵٪ قابل پذیرفته می‌باشد. مقدار ضریب تاثیر (R^2) نیز معیار خوبی برای ارزیابی ارزشمند و مناسب بودن یک مدل بوده که مقدار عددی آن هرچه به یک نزدیک‌تر باشد دلالت بر دقیق بودن مدل در پیش‌بینی رفتار متغیرهای مستقل بر روی متغیرهای وابسته دارد. نتایج حاصل از هر کدام از آزمایشات انجام گرفته، تحلیل گردیده و همچنین اثر پارامترها و متغیرهای انتخاب شده (مقادیر حجمی سه ماده اصلی در تهیه و تولید نانوامولسیون زیره سیاه) بر روی دو متغیر وابسته (پاسخ) در بخش بحث و نتایج گزارش شده است. در پژوهش حاضر بهینه‌سازی فرمولاسیون و طراحی آزمایش جهت بدست آوردن کمترین میانگین اندازه ذرات و بالاترین پتانسیل زتا (بدون توجه به علامت آن) انجام گرفت.

۲-۲-۳- تولید نانوامولسیون اسانس روغنی زیره سیاه

برای فرمولاسیون سه مؤلفه کلیدی یعنی فاز آبی (آب مقطر)، فاز روغنی (اسانس روغنی زیره سیاه) و امولسیفایر (توئین ۸۰)، به عنوان حجم کلی در نظر گرفته شده برای مخلوط تهیه شده از سه ماده ۲۵ میلی‌لیتر در نظر گرفته شد که مقادیر گوناگونی در بازه‌های مشخص تعیین شد. برای فاز روغنی مقدار اسانس زیره سیاه از ۰/۱ تا ۰/۹ میلی‌لیتر، برای امولسیفایر توئین ۸۰، مقدار ۱ الی ۴ میلی‌لیتر و برای فاز آبی میزان آب مقطر از ۲۰/۱ تا ۲۳/۹ میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. در هر مرحله اسانس زیره سیاه و امولسیفایر توئین ۸۰ با یکدیگر ترکیب شده و به تدریج آب مقطر به مخلوط اضافه شد تا امولسیون نهایی تشکیل گردد. مخلوط به دست آمده در مخزن تفلونی مقاوم به خوردگی انتقال یافته و سپس این مخزن به داخل اتوکلاو هیدروترمال منتقل شد تا تحت فشار متناسب با دمای اعمال شده (بیشتر از ۱ بار) قرار گیرد. بر این اساس، تمامی ترکیب‌ها و فرمولاسیون‌های انجام گرفته در شرایط کنترل شده دمایی و زمانی معین در دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه حرارت دهی شد.

¹Zeta Potential

² Analysis of Variance

۲-۳- آنالیزها و بررسی خواص

جهت تعیین پتانسیل زتا، میانگین اندازه نانوذرات و شاخص پراکندگی از تجزیه پراکندگی نور پویایی DLS که روشی غیرمخرب و فیزیکی می‌باشد با دستگاه Malvern ساخت انگلستان استفاده گردید. به منظور بررسی خواص نانوامولسیون تولیدشده در نقطه فرمولاسیون بهینه، خواص ضد میکروبی که شامل خاصیت ضدباکتریایی با روش چاهک و خاصیت ضدقارچی با روش نفوذ بر اساس روش شرح داده شده در پژوهش‌های میرزاخانی و همکاران در سال ۲۰۲۴، الشهرانی و همکاران در سال ۲۰۲۲ و احمدی در سال ۲۰۲۴ انجام گرفت [۲۲-۲۴].

۳- نتایج و بحث

در راستای بهینه‌سازی فرمولاسیون نانوامولسیون اسانس روغنی زیره سیاه و بررسی خواص آن در نقطه بهینه، نتایج طراحی آزمایش و پاسخ‌های هرکدام از عوامل گزارش شده و تأثیر مقادیر مصرفی فازهای انتخاب شده در بخش‌های گوناگون موارد انجام گرفته توضیح داده شده است.

۳-۱- مدل طراحی مخلوط

باتوجه به توضیحات ارائه شده در بخش طراحی آزمایش و بر اساس روش طرح مرکب مرکزی (CCD) و طراحی مخلوط تعداد آزمایش‌های در نظر گرفته شده ۱۵ آزمایش بوده که دو پاسخ میانگین اندازه ذرات و پتانسیل زتا هر نمونه در نظر گرفته شد که در جدول (۱) آزمایش‌ها و نتایج مربوط به هرکدام گزارش شده است. در بخش‌های بعد تأثیر متغیرهای مستقل (مقدار حجمی انتخاب شده در فرمولاسیون) بر روی متغیرهای وابسته (میانگین اندازه ذرات و پتانسیل زتا) به طور کامل شرح داده خواهد شد.

جدول ۱- طراحی مرکب مرکزی و متغیرهای پاسخ برای تولید نانوامولسیون روغن در آب زیره سیاه

Table 1. Central composite design and response variables for production of *Carum Carvi*O/W nanoemulsions

| متغیرهای وابسته (پاسخ‌ها) Dependent variables (Response) | | | | متغیرهای مستقل (مقادیر مواد بر حسب میلی لیتر) Independent variables Amount of Materials (mL) | | | |
|---|-------------------------|----------------------------|-------------------------|---|------------------------|--|-----------------------------------|
| پیش بینی (مدل) Predicted | | آزمایشگاهی Experimental | | آب مقطر Water | | اسانس زیره سیاه Essential Oil (<i>Carum Carvi</i>) | |
| Zeta Potential (mV) | Mean Particle Size (nm) | Zeta Potential (mV) | Mean Particle Size (nm) | توئین ۸۰ Emulsifier (Tween 80) | امولسیفایر توئین ۸۰ | توئین ۸۰ Emulsifier (Tween 80) | توئین ۸۰ Emulsifier (Tween 80) |
| -13.44 | 228.1 | -13.2 | 226 | 23.90 | 1.00 | 0.1 | 1 |
| -21.10 | 189.3 | -20.9 | 181 | 22.55 | 1.75 | 0.7 | 2 |
| -17.98 | 165.8 | -17.5 | 176 | 20.50 | 4.00 | 0.5 | 3 |
| -21.45 | 255.3 | -21.4 | 264 | 23.10 | 1.00 | 0.9 | 4 |
| -17.80 | 195.2 | -18.1 | 194 | 23.50 | 1.00 | 0.5 | 5 |
| -22.75 | 197.8 | -22.9 | 199 | 20.10 | 4.00 | 0.9 | 6 |
| -16.63 | 175.0 | -17.1 | 186 | 21.45 | 3.25 | 0.3 | 7 |
| -16.82 | 182.8 | -17.3 | 178 | 22.95 | 1.75 | 0.3 | 8 |
| -21.47 | 167.6 | -21.8 | 159 | 21.05 | 3.25 | 0.7 | 9 |
| -23.71 | 208.6 | -23.7 | 206 | 21.60 | 2.50 | 0.9 | 10 |
| -12.51 | 226.7 | -12.6 | 213 | 20.90 | 4.00 | 0.1 | 11 |
| -14.58 | 209.5 | -14.4 | 221 | 22.40 | 2.50 | 0.1 | 12 |
| -19.50 | 162.6 | -18.9 | 162 | 22.00 | 2.50 | 0.5 | 13 |
| -19.50 | 162.6 | -18.8 | 161 | 22.00 | 2.50 | 0.5 | 14 |
| -19.50 | 162.6 | -18.8 | 162 | 22.00 | 2.50 | 0.5 | 15 |

جهت اعتبارسنجی متغیرهای مستقل در نظر گرفته شده مورداستفاده در طراحی آزمایش از اصطلاح p-value استفاده خواهد شد که مطابق با توضیحات ارائه شده در بخش طراحی آزمایش، این مقدار ۰/۰۵ در نظر گرفته شده است، که نتایج نشان داده شده

در جدول (۲) نشان می‌دهد برای متغیرهای دوتایی مابین (فاز روغنی و امولسیفایر، فاز روغنی و فاز آبی، امولسیفایر و فاز آبی) این عبارت برای متغیر وابسته میانگین اندازه ذرات به ترتیب برابر است با ۰/۰۰۰، ۰/۰۰۰ و ۰/۰۰۳۶ و برای متغیر وابسته پتانسیل زتا به ترتیب برابر با ۰/۰، ۰/۰۶۲/۰۴۳ و ۰/۰۰۰۱ بدست آمده است. اعداد بدست آمده بدین معنی است که متغیرهای مربوط به فرمولاسیون در نظر گرفته شده به طور دوتایی اثرگذاری‌های خاص خود را بر روی خواص نهایی نانوامولسیون ایجاد می‌نمایند. همچنین نتایج حاصل از F-value نیز در جدول (۲) گزارش شده است که هرچقدر مقدار بیشتری داشته باشند، اثرگذاری بالاتری بر روی متغیر وابسته از خود نشان می‌دهد.

جدول ۲- احتمال معناداری (مقدار t و p) ضرایب برهم‌کنش در مدل‌های چندجمله‌ای کاهش یافته

Table 2. The significance probability (p value, t value) of interaction coefficients in final reduced polynomial models

| Linear effects | X_1X_2 | X_1X_3 | X_2X_3 |
|-------------------------------|----------|----------|----------|
| میانگین اندازه ذرات (نانومتر) | | | |
| Mean Particle Size (nm) | | | |
| P-Value | 0.000 | 0.000 | 0.036 |
| F-Value | 54.27 | 44.99 | 6.72 |
| پتانسیل زتا (میلی ولت) | | | |
| Zeta Potential (mV) | | | |
| P-Value | 0.043 | 0.062 | 0.001 |
| F-Value | 4.82 | 3.98 | 30.67 |

در جدول (۳) نیز ضرایب رگرسیون مربوط به هر کدام از متغیرهای وابسته میانگین اندازه ذرات و پتانسیل گزارش شده است که با جایگذاری در رابطه (۱) می‌توان به پیش‌بینی نتایج و بدست آوردن و محاسبه خروجی هر کدام از مقادیر فرمولاسیون انتخاب شده پرداخت. در جدول (۳) همچنین میزان R^2 برای هر دو متغیر گزارش شده است که به ترتیب برای میانگین اندازه ذرات و پتانسیل مقادیر ۰/۹۶/۰۷ و ۰/۹۵/۱۰ بدست آمد که نشان از اطمینان بالا به مدل گزارش شده است.

جدول ۳- ضرایب رگرسیون، مقدار R^2 و مقادیر احتمال برای مدل‌های کاهش یافته

Table 3. Regression coefficients, R^2 , adjusted R^2 and probability values for the final reduced models

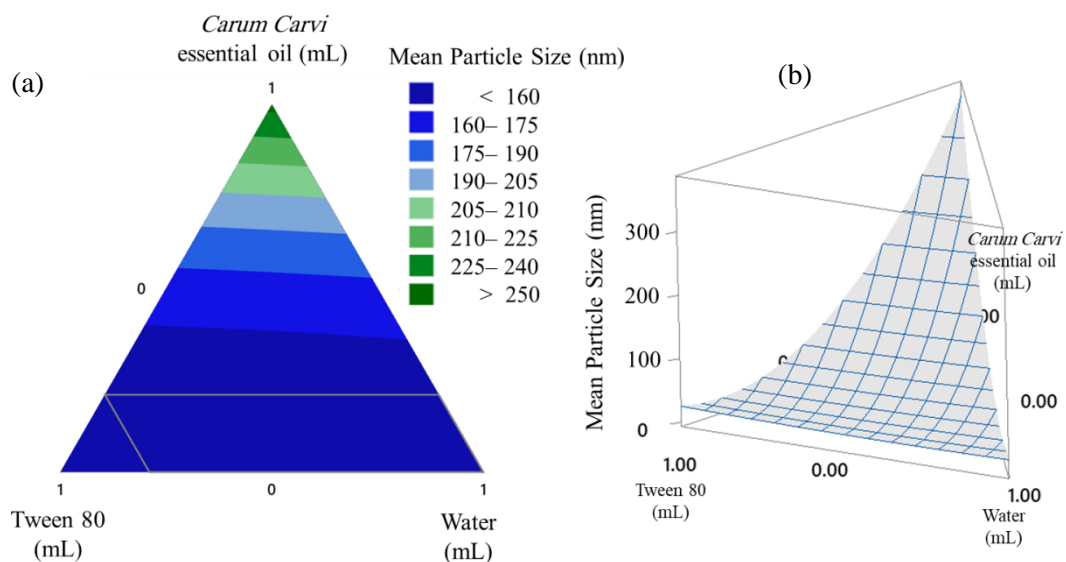
| ضرایب برازش Regression Coefficients | میانگین اندازه ذرات (نانومتر) Mean Particle Size (nm) | پتانسیل زتا (میلی ولت) Zeta Potential (mV) |
|--|--|---|
| | Y_1 | Y_2 |
| a_1 | 703.52 | 43.56 |
| a_2 | 17.26 | 14.26 |
| a_3 | 1.12 | -0.39 |
| a_{12} | -32.15 | -3.85 |
| a_{13} | -29.02 | -2.20 |
| a_{23} | -0.79 | -0.71 |
| R-square (%) | 96.07 | 95.10 |

۳-۱- تأثیر فرمولاسیون انتخاب شده در تولید نانوامولسیون اسانس روغنی زیره سیاه بر پاسخ میانگین اندازه ذرات و پتانسیل زتا

پس از بدست آمدن نقاط و بازه‌های تأثیرگذار و یافتن ضریب تأثیر هر کدام به صورت جداگانه، نمودارهای خروجی مختلف شامل متغیرهای تعیین شده در طراحی آزمایش به صورت جداگانه و دوبه دو رسم شد و در ادامه به توضیحات آن‌ها پرداخته شد.

• **اثرات فرمولاسیون بر روی میانگین اندازه ذرات نانومولسیون اسانس روغنی زیره سیاه**

در شکل ۱ (a و b) نمودارهای دوبعدی و سه‌بعدی اثر ترکیبات موجود در فرمولاسیون انجام گرفته جهت تولید نانومولسیون اسانس روغنی زیره سیاه بر میانگین اندازه ذرات گزارش شده است. همان‌طور که در شکل ۱ (a) مشاهده می‌شود، کمترین میانگین اندازه ذرات (کمتر از ۱۶۰ نانومتر) با رنگ آبی پررنگ (سورمه‌ای) بازه کوچکی را در بر گرفته که مربوط به مقادیر متوسط استفاده از اسانس روغنی زیره سیاه می‌باشد، در نقطه مقابل آن بیشترین میانگین اندازه ذرات (بیشتر از ۲۵۰ نانومتر) با رنگ سبز پررنگ مربوط به مقادیری می‌باشد که در بیشترین (۰/۹ میلی لیتر) یا کمترین (۰/۱ میلی لیتر) اسانس استخراج شده استفاده شده است به طور علمی، اندازه ذرات نانومولسیون به تعامل بین فاز روغنی (اسانس)، فاز آبی و عامل سطحی وابسته است؛ اما افزایش بیش از حد روغن سبب تشکیل قطره‌های روغنی بزرگ‌تر و ناهمگونی بیشتری در فاز پیوسته (فاز آبی) می‌شود که در نهایت منجر به افزایش اندازه ذرات می‌شود. بالعکس، با کاهش مقدار اسانس و ثابت نگه داشتن و حتی کاهش نسبت فاز روغنی به فاز آبی، اندازه ذرات کمتر می‌شود تا زمانی که هم‌زمان کارایی پوشش سطحی و پایداری امولسیون نیز حفظ گردد. بنابراین در نقطه بهینه کاهش اندازه ذرات به دست می‌آید چراکه نسبت‌های فازی مطلوب بین فاز روغنی و فاز آبی و حضور اندازه مناسب حامل سطحی، فرآیند تشکیل نانومولسیون را به سمت قطرات ریزتر هدایت می‌کند. در بازه‌های با بیشترین کمترین مقدار اسانس، به دلیل تغییر نسبت فازها و انرژی سطحی مرتبط با تشکیل قطرات، نتایج اندازه ذرات به ترتیب به سمت قطرات بزرگ‌تر یا کوچک‌تر گرایش می‌کند. شکل ۳ (b) به صورت سه‌بعدی تغییرات افزایش یا کاهش هر کدام از مواد موجود در نانومولسیون را نشان می‌دهد. با توجه به مقادیر p-value بدست آمده در جدول ۲ نتایج نشان می‌دهد اثرات اسانس و امولسیفایر، اسانس و آب، تأثیرگذاری بیشتری نسبت به امولسیفایر و آب دارد.



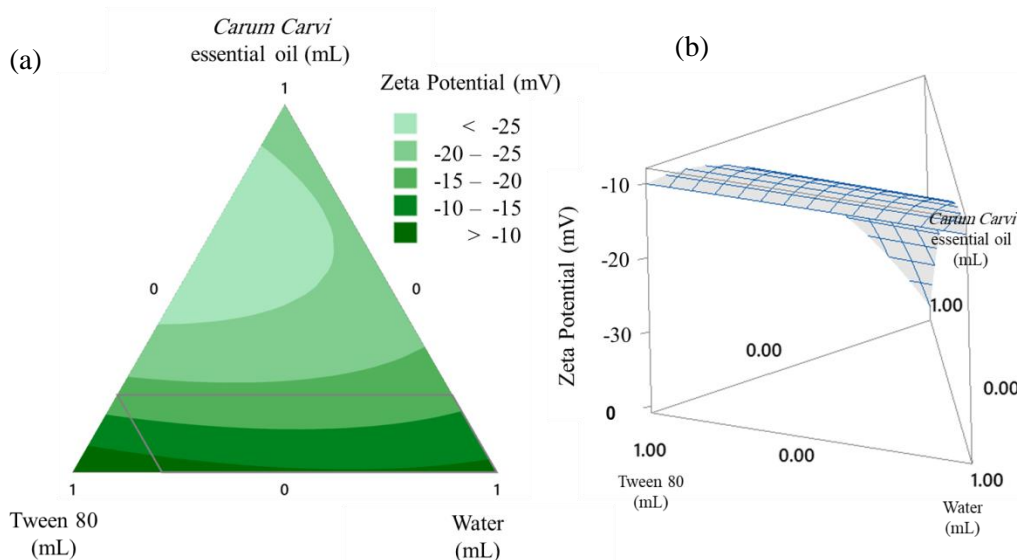
شکل ۱- نمودار دوبعدی (a) و سه‌بعدی (b) میانگین اندازه ذرات (نانومتر) به عنوان تابعی از اجزای مواد استفاده شده پیش‌بینی شده توسط مدل

Fig 1. Contour plot (a) and Surface plot (b) of estimated Mean Particle Size (nm) as a function of used material components according to the model

• **اثرات فرمولاسیون بر روی پتانسیل زتای نانومولسیون اسانس روغنی زیره سیاه**

شکل ۲ (a و b) نمودارهای دوبعدی و سه‌بعدی اثر ترکیبات انتخاب شده موجود در محلول سه‌جزئی (اسانس، امولسیفایر و آب) جهت تولید نانومولسیون اسانس روغنی زیره سیاه بر پتانسیل زتا را نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل ۲ (a) نشان داده شده

است، بهترین حالت قدر مطلق پتانسیل زتا (کمتر از ۲۵- میلی ولت) که با رنگ سبز کم‌رنگ در راهنمای شکل مشخص شده است مربوط به مقادیر بالایی از اسانس روغنی زیره سیاه (۰/۹ میلی لیتر) بوده و کمترین مقدار قدر مطلق پتانسیل زتا (بیشتر از ۱۰- میلی ولت) مربوط به حالتی بوده که کمترین اسانس (مقدار ۰/۱ میلی لیتر) در مخلوط تهیه شده وجود دارد که در شکل با رنگ سبز پررنگ نشان داده شده است. به طور علمی، اندازه‌گیری قدر مطلق پتانسیل زتا نشان‌دهنده پایداری الکتروستاتیک نانوامولسیون بوده که افزایش مقدار اسانس روغنی در مخلوط باعث افزایش نسبت فاز روغنی به آبی و کاهش پایداری فضایی می‌گردد، که به نوبه خود باعث کاهش بار سطحی و کاهش حرکت یون‌ها می‌شود. این امر منجر به افزایش منفی یا کاهش دامنه پتانسیل زتا می‌شود که نشان‌دهنده پایداری بیشتر می‌باشد. تغییر نسبت فاز روغنی به آبی و حضور یک حامل سطحی مانند امولسیفایر، موجب تغییر انرژی سطحی و بار روی سطح قطرات می‌شود و برای مخلوط‌هایی با مقادیر بالای اسانس، شرایط بهینه برای پایداری با پتانسیل زتا بالا و در نتیجه علامت منفی یا نسبتاً قوی‌تر به دست می‌آید. شکل ۲ (b) به صورت سه‌بعدی تغییرات افزایشی یا کاهش هر کدام از مواد موجود در نانوامولسیون و اثرگذاری آن‌ها بر پتانسیل زتا را نشان می‌دهد.

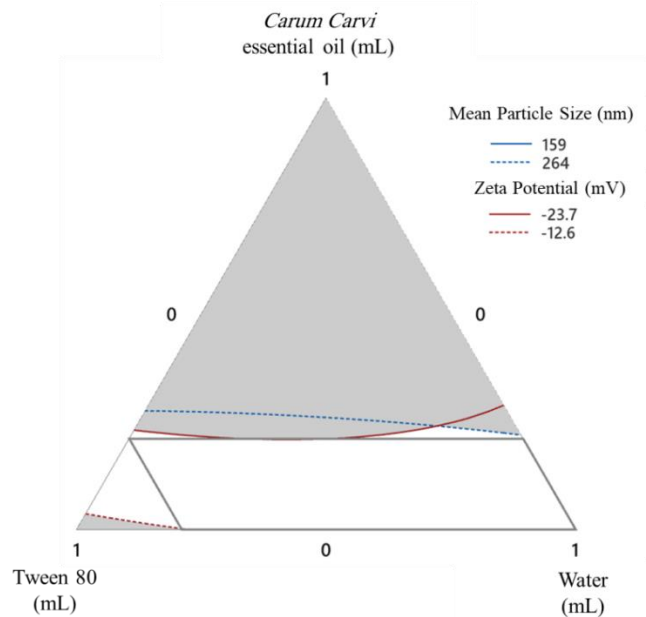


شکل ۲- نمودار دوبعدی (a) و سه‌بعدی (b) پتانسیل زتا (میلی ولت) به‌عنوان تابعی از اجزای مواد استفاده شده پیش‌بینی شده توسط مدل

Fig 2. Contour plot (a) and Surface plot (b) of estimated Zeta Potential (mV) as a function of used material components according to the model

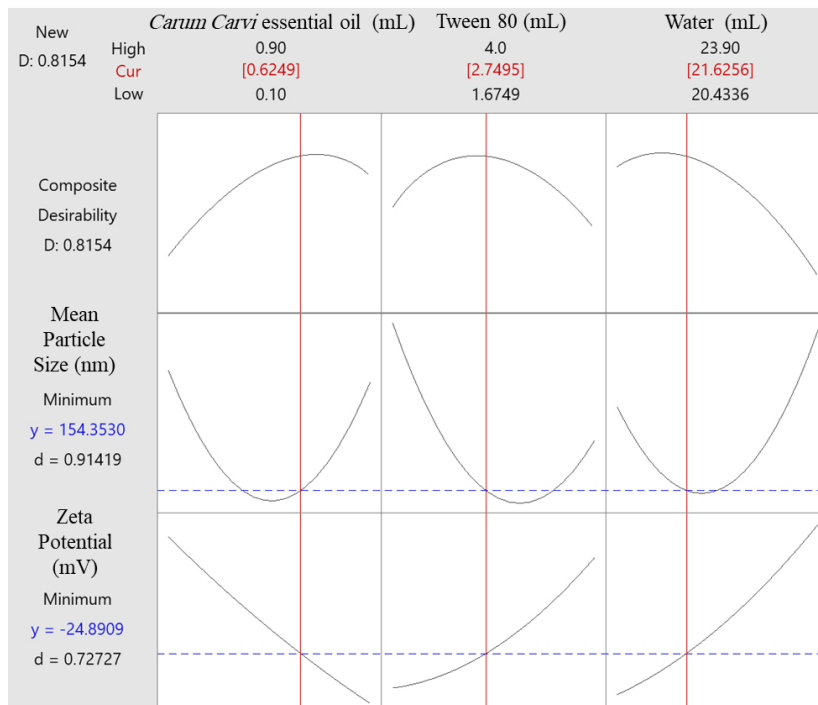
۳-۲- بهینه‌سازی نتایج حاصل از طراحی آزمایش

پس از انجام طراحی آزمایش، بررسی‌های آماری و تحلیل‌های مربوط به اثرات متغیرهای فرمولاسیون نانوامولسیون اسانس زیره سیاه بر دو پاسخ اصلی، یعنی میانگین اندازه ذرات و پتانسیل زتا، به صورت دو حالت بهینه‌سازی انجام شد: گرافیکی و عددی، که به ترتیب در شکل‌های (۳) و (۴) ارائه گردیده است. شکل (۳) بازه بهینه تولید نانوامولسیون را نشان می‌دهد، به طوری که کوچک‌ترین میانگین اندازه ذرات و بیشترین دامنه پتانسیل زتا در آن دیده می‌شود. همان‌گونه که در خطوط راهنما مشخص است، خطوط با حالت نقطه‌چین، نامناسب‌ترین نقاط را نشان داده و خطوط پیوسته، بهترین بازه‌های اندازه ذرات و پتانسیل زتا را نمایش می‌دهد. از تقاطع این خطوط مناسب، می‌توان انتظار داشت که به کمترین اندازه ذرات و بهترین پتانسیل زتا دست‌یافت. با توجه به اینکه بازه مشخص شده در شکل (۳) بازه گسترده‌ای را پوشش می‌دهد، لازم است بهینه‌سازی با دقت بیشتر و در بازه‌های دقیق‌تر انجام گیرد تا به نقطه‌ای رسید که ترکیب بهینه‌ای از خواص را ارائه دهد. در نتیجه، بهینه‌سازی عددی در شکل (۴) گزارش شده است تا نقطه‌ای به دست آمده آید که بیشترین پایداری و مناسب بودن فرمولاسیون را تأیید نماید.



شکل ۳- بهینه‌سازی گرافیکی و برآیند نمودارهای دوبعدی جهت دستیابی به مطلوب‌ترین نانوامولسیون اسانس روغنی زیره سیاه
Fig 3. Plot of overlaid contour of material components to get the most desirable *Carum Carvi* essential oil nanoemulsion

همان‌طور که در شکل (۴) نشان داده شده است، نقطه بهینه بدست آمده از طراحی آزمایش مذکور مربوط به فرمولاسیون انجام‌گرفته جهت تولید نانوامولسیون به صورت ۰/۶۲ میلی‌لیتر اسانس روغنی زیره سیاه، ۲/۷۴ میلی‌لیتر امولسیفایر توئین ۸۰ و ۲۱/۶۲ میلی‌لیتر آب مقطر می‌باشد که در این حالت اگر نانوامولسیون اسانس روغنی زیره سیاه با روش آب مادون بحرانی تولید گردد، منجر به خواصی برابر با میانگین اندازه ذرات تقریبی ۱۵۴ نانومتر با پتانسیل زتای ۲۴/۸۹- میلی ولت خواهد شد که بایستی این نتایج راستی آزمایی شده و صحت سنجی شوند، در بخش بعد این موارد به تفصیل گزارش شده است.

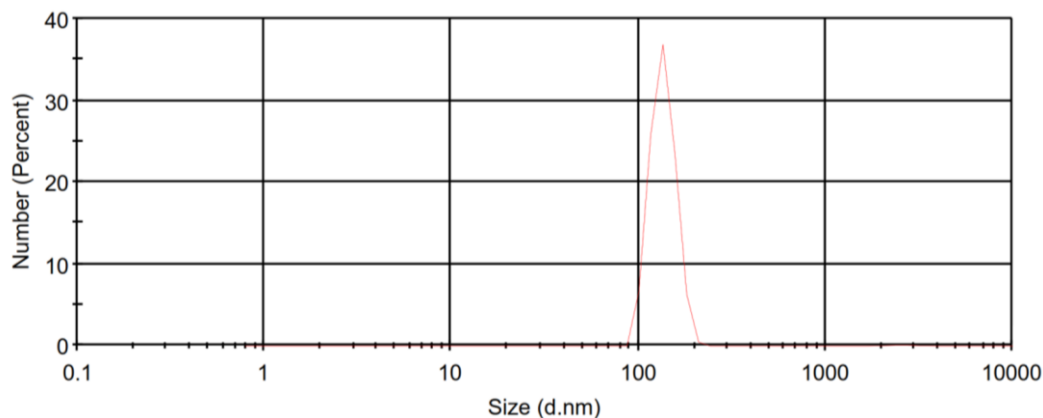


شکل ۴- مقادیر بهینه (بهینه‌سازی عددی) تولید نانوامولسیون اسانس زیره سیاه بر اساس طراحی آزمایش به روش مخلوط
Fig 4. Optimum values (numerical optimization) *Carum Carvi* essential oil nanoemulsion based on experimental design using mixed design method

۳-۳- صحت سنجی نتایج حاصل از بهینه‌سازی فرمولاسیون نانوامولسیون اسانس روغنی زیره سیاه

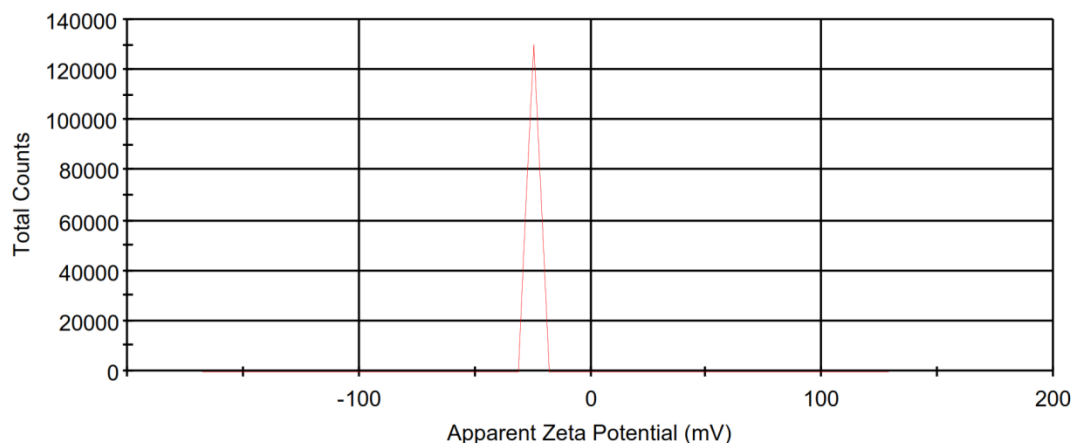
۳-۳-۱- آنالیز میانگین اندازه ذرات و پتانسیل زتا

با یافتن نقاط بهینه بدست آمده از بهینه‌سازی عددی، در شرایط بدست آمده از طراحی آزمایش صحت سنجی نتایج بدست آمده باید انجام شود که در بخش حاضر، تولید نانوامولسیون اسانس روغنی زیره سیاه انجام شده و میانگین اندازه ذرات و پتانسیل زتای آن مورد تحلیل و ارزیابی قرار گرفت. پس از انجام آزمایشات مربوط به صحت سنجی طراحی آزمایش، نتایج حاکی از آن بود که محصول تولیدشده در نقطه بهینه دارای میانگین اندازه ذرات ۱۵۶ نانومتر با پتانسیل زتای ۲۴/۱- میلی ولت می باشد، که در مقایسه با نتایج پیش‌بینی شده (۱۵۴ نانومتر و پتانسیل زتای ۲۴/۸۹- میلی ولت) اختلاف کمی بین داده‌های مدل پیش‌بینی با نتایج آزمایشگاهی وجود داشت و مدل‌های گزارش آمده قابل تأیید بوده، چراکه به درستی توانسته‌اند اثرات متغیرهای مستقل فرمولاسیون (مقادیر حجمی مواد) را بر روی متغیرهای وابسته (میانگین اندازه نانوذرات و شاخص پراکندگی) در محدوده مورد مطالعه مشخص نمایند. در شکل (۵) و (۶) به ترتیب نتیجه آنالیز میانگین اندازه ذرات به صورت توزیع اندازه ذرات در نقطه بهینه و پتانسیل زتا گزارش شده است. لازم به ذکر است در نقطه بهینه فرمولاسیون تولید نانوامولسیون اسانس روغنی زیره سیاه، شاخص پراکندگی^۱ نیز مورد بررسی قرار گرفت که مقدار عددی ۰/۱۹۶ بدست آمد. عدد حاضر شاخصی بین ۰ الی ۱ بوده که هرچه مقدار کمتری داشته باشد، نشان‌دهنده یکدست بودن و هم‌اندازه بودن ذرات می‌باشد [۲۵]. نتیجه حاصل گردیده با توجه به مقدار عددی پایین آن (کمتر از ۰/۳) نشان‌دهنده یکدست بودن و یکنواخت بودن اندازه قطرات تشکیل شده اسانس در محلول نانوامولسیون می‌باشد.



شکل ۵- توزیع اندازه ذرات نانوامولسیون اسانس روغنی زیره سیاه تولیدشده در شرایط بهینه اختلاط مواد

Fig 5. Particle size distribution of the produced *Carum Carvi* essential oil nanoemulsion at obtained optimum of material components



¹Polydispersity Index

شکل ۶- پتانسیل زتا نانوامولسیون اسانس روغنی زیره سیاه تولیدشده در شرایط بهینه اختلاط مواد

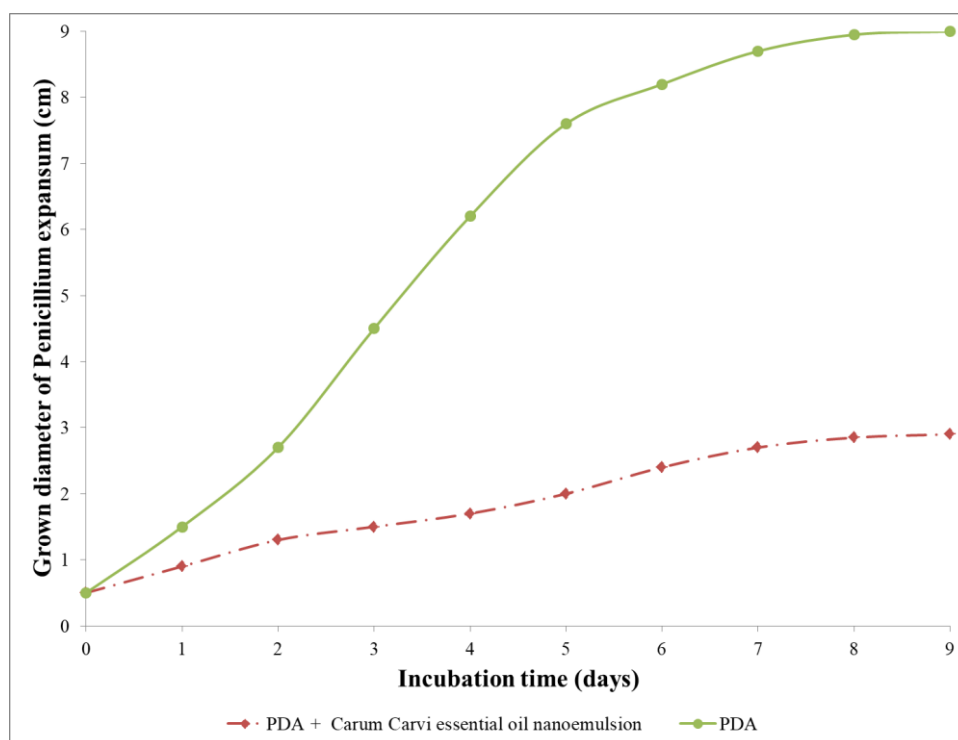
Fig 6. Zeta potential of the produced *Carum Carvi* essential oil nanoemulsion at obtained optimum of material components

۳-۴- بررسی کاربرد نانوامولسیون اسانس روغنی زیره سیاه تولیدشده در بهینه فرمولاسیون

پس از یافتن نقطه بهینه فرمولاسیون فازهای آبی، روغنی و امولسیفایر جهت تولید نانوامولسیون اسانس زیره سیاه، کاربرد ضد میکروبی نانوامولسیون اسانس روغنی سیاه در دو حالت خاصیت ضدقارچی و ضدباکتریایی بررسی گردید که در بخش‌های زیر به آن اشاره گردیده است.

۳-۴-۱- خاصیت ضدقارچی

جهت مقایسه اثر و کارایی نانوامولسیون تولیدشده با نمونه محیط کشت بدون محصول، نتایج به صورت نموداری ارائه شد. بررسی دقیق خاصیت ضدقارچی نانوامولسیون به مدت ۹ روز انجام شد. بر اساس شکل (۷)، محیط کشت حاوی اسانس روغنی زیره سیاه پس از ۹ روز رشد نسبی نشان می‌دهد که از رشد قارچ پنی سیلینیوم/اکسیانسوم تا حدودی جلوگیری شده است، درحالی که محیط کشت PDA بدون نانوامولسیون در همان بازه زمانی کاملاً پوشش‌دهی شده و رشد کامل را نشان می‌دهد. با توجه به قطر کل پلیت برابر با ۹ سانتی‌متر و بیشترین رشد قارچ روی محیط کشت حاوی نانوامولسیون اسانس زیره سیاه با قطر تقریبی ۲/۹ سانتی‌متر، بازده ضدقارچی نانوامولسیون در این پژوهش حدود ۶۷/۷۸٪ برآورد می‌شود. انتشار یکنواخت اسانس روغنی در فاز آبی نانوامولسیون، باعث افزایش سطح تماس اسانس با دیواره سلولی قارچ می‌شود و در نتیجه نفوذ ترکیبات فعال به سلول‌های قارچی و اختلال در غشاء سلولی و تنظیم ناقل‌های یونی را تسریع می‌کند؛ اندازه نانویی ذرات و پایداری بالای نانوامولسیون، که سطح تماس فعال را بهینه کرده و جذب مواد فعال را تسریع کرده و در نهایت عامل ضدقارچی می‌باشد.



شکل ۷- خاصیت ضدقارچی نانوامولسیون اسانس روغنی زیره سیاه در شرایط بهینه فرمولاسیون

(میزان رشد قارچ پنی سیلینیوم/اکسیانسوم در دو حالت، حضور نانوامولسیون و عدم حضور آن)

Figure 7. Antifungal properties *Carum Carvi* essential oil nanoemulsion in optimal formulation conditions (Growth rate of *Penicillium expansum* in two conditions, presence and absence of nanoemulsion)

۳-۴-۱- خاصیت ضدباکتریایی

از دیگر خواص کاربردی نانومولسیون اسانس روغنی زیره سیاه تولیدشده در شرایط بهینه فرمولاسیون کاربرد آن در مهار رشد باکتری‌ها اشاره کرد که در برابر باکتری گرم منفی *اشرشیا کولی* و گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت و نتایج آن در جدول ۴ گزارش شده است.

جدول ۴- خاصیت ضدباکتریایی نانومولسیون اسانس روغنی زیره سیاه در شرایط بهینه فرمولاسیون

(بررسی اثر نانومولسیون تولیدشده بر روی دو گونه باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و گرم منفی *اشرشیا کولی*)

Table 4- Antibacterial properties of *Carum Carvi* essential oil nanoemulsion under optimal formulation conditions (Investigation of the effect of the produced nanoemulsion on two species of gram-positive bacteria, *Staphylococcus aureus* and gram-negative *Escherichia coli*)

| هاله تشکیل شده در اطراف چاهک ایجادشده (سانتی‌متر) | | |
|--|--|-----------------------------------|
| Diameter of created clear zones around the wholes (cm) | | |
| نام باکتری Name of Bacteria | نانومولسیون اسانس روغنی | |
| | زیره سیاه <i>Carum Carvi</i> essential oil nanoemulsion | توئین ۸۰ و آب Tween 80 + Water |
| 1 <i>اشرشیا کولی</i> <i>E. Coli</i> | 1.4 | 0.5 |
| 2 <i>استافیلوکوکوس اورئوس</i> <i>S. Aureus</i> | 1.6 | 0.6 |

نتایج قطره‌های ایجادشده در چاهک‌ها نشان می‌دهد که نانومولسیون اسانس روغنی زیره سیاه در مقایسه با مخلوط توئین و آب اثر ضدباکتریایی بسیار قوی‌تری داشته که حدوداً ۳ برابر می‌باشد. دلیل این امر در ابتدا حضور اسانس روغنی زیره سیاه و همچنین تبدیل شدن آن به نانوقطرات می‌باشد. این بهبود به دو عامل اصلی برمی‌گردد: (۱) تبدیل اسانس خام به نانوذرات و توزیع یکنواخت آن در فاز آبی نانومولسیون که منجر به افزایش سطح تماس فعال با سلول‌های باکتری و نفوذ سریع‌تر ترکیبات فعال به غشاء می‌شود؛ (۲) پایداری بالای نانومولسیون و جلوگیری از تجمع قطرات بزرگ که به ثبات اثرات ضدباکتریایی و توزیع یکنواخت‌تر مواد فعال در محیط کشت می‌انجامد.

در مورد تفاوت اثر نانومولسیون بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، باید به تفاوت‌های ساختاری غشایی و دیواره سلولی توجه کرد. باکتری‌های گرم مثبت دارای دیواره پلی‌پپتیدوگلیکانی ضخیم بوده اما غشای خارجی ندارند، این ساختار به ترکیبات فعال در نانومولسیون اجازه می‌دهد تا به راحتی به غشای داخلی و پروتئین‌های سطحی دسترسی پیدا کنند. این امر منجر به نفوذ بهتر و اثر ضدباکتریایی قوی‌تر نانومولسیون در باکتری گرم مثبت می‌شود. در مقابل، باکتری‌های گرم منفی دارای دیواره لیپوپپتیدی ضخیم همراه با یک غشای خارجی لیپوپروتئینی هستند که نفوذ برخی ترکیبات را دشوار می‌کند؛ اگرچه نانومولسیون با انتشار یکنواخت اسانس و افزایش تماس سطحی می‌تواند نفوذ را تحت تأثیر قرار دهد، اما در کل دسترسی ترکیبات فعال به باکتری گرم منفی محدودتر است و لذا اثر کمتری نسبت به گرم مثبت از خود نشان می‌دهد. با وجود این، نانومولسیون همچنان نسبت به اسانس خام و همچنین مخلوط آب و توئین ۸۰ کارایی بهتری داشته چراکه قطرات نانویی زمینه را برای تماس مداوم و گسترده‌تر با باکتری فراهم می‌کنند و افزایش پخش و یکنواختی مقدار فعال را در محیط تسهیل می‌کنند.

۴- نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر با به‌کارگیری طراحی مخلوط برای فرمولاسیون بهینه جهت نانومولسیون اسانس روغنی زیره سیاه، نشان داد که توزیع یکنواخت و پایدار ترکیبات فعال در فاز آبی نانومولسیون، و حضور امولسیفایر مناسب، نقش کلیدی در کارایی ضدقارچی و ضدباکتریایی ایفا می‌کند. به‌کارگیری روش‌های آماری و تحلیل‌های طراحی مخلوط امکان استخراج روابط بین ترکیبات مصرفی و پاسخ‌های کیفی مانند پایداری نانومولسیون و اندازه ذرات را فراهم آورد و نشان داد که بهینه‌سازی‌های گرافیکی و عددی می‌توانند به نقاطی با خواص مطلوب رسیده و ثبات فرمولاسیون را تضمین کنند. همچنین بررسی کاربرد نانومولسیون نشان

داد که تبدیل اسانس به نانوذرات و کاهش انرژی سطحی منجر به تماس بیشتر با سلول‌های میکروارگانسیم‌ها و افزایش اثربخشی می‌شود. اثر حضور اسانس زیره سیاه در قالب نانوامولسیون، پایداری و دسترسی ترکیبات فعال را تقویت کرده و در نتیجه کارایی کلی فرمولاسیون را بهبود می‌بخشد. پیشنهاد برای سایر پژوهشگران در تحقیقات آینده، بررسی دقیق‌تر نرخ‌های کاهش رشد و مقادیر حساسیت هر سویه با استفاده از مدل‌های تک‌متغیره و چندمتغیره تا نتیجه‌گیری‌های مقایسه‌ای با شفافیت بیشتر و به‌کارگیری دقیق در کاربردهای صنعتی یا بالینی روشن‌تر شود.

۵- تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه کردستان با شماره اعتبار ۰۳/۹/۲۳۶۹۸ و به‌ویژه از آزمایشگاه تحقیقاتی نانوبیوتکنولوژی غذایی به دلیل حمایت مالی از این پژوهش و در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می‌شود.

مراجع

1. Ahmadi, O. and Jafarizadeh-Malmiri, H. (2021). Intensification and optimization of the process for thyme oil in water nanoemulsions preparation using subcritical water and xanthan gum. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*. 235(5): 629-648.
2. Kmiecik, D., Siger, A., and Kuraszyk, K. (2025). Black Cumin Essential Oil as an Active Stabilization Component of Rapeseed Oil During Deep-Fat Model Heating. *Foods*. 14(13): 2238.
3. Assaggaf, H., Jeddi, M., Mrabti, H.N., Ez-Zoubi, A., Qasem, A., Attar, A., Goh, B.H., Tan, S.L., Bouyahya, A., and Goh, K.W. (2024). Design of three-component essential oil extract mixture from *Cymbopogon flexuosus*, *Carum carvi*, and *Acorus calamus* with enhanced antioxidant activity. *Scientific reports*. 14(1): 9195.
4. Pourmand, Z., Kazemipoor, R., Kakoolaki, S., Khajerahimi, A., and Ghorbanzadeh. (2025). Effects of encapsulated garlic (*Alium sativum*), black seed (*Nigella sativa*), and black caraway (*Carum carvi*) essential oils on hematological and immunological parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 24(1): 39-55.
5. Garcia, C.R., Malik, M.H., Biswas, S., Tam, V.H., Rumbaugh, K.P., Li, W., and Liu, X. (2022). Nanoemulsion delivery systems for enhanced efficacy of antimicrobials and essential oils. *Biomaterials Science*. 10(3): 633-653.
6. Jusril, N.A., Abu Bakar, S.I., Khalil, K.A., Md Saad, W.M., Wen, N.K., and Adenan, M.I. (2022). Development and Optimization of Nanoemulsion from Ethanolic Extract of *Centella asiatica* (NanoSECA) Using D- Optimal Mixture Design to Improve Blood- Brain Barrier Permeability. *Evidence- Based Complementary Alternative Medicine*. 2022(1): 3483511.
7. Rafya, M., Hafidi, A., Zehhar, N., and Benkhalti, F. (2023). Optimization of three-component essential oil-loaded nanoemulsions in combination using D-optimal mixture design. *South African Journal of Botany*. 159: 472-481.
8. Nasiri, S., Jafarizadeh, H., and Ahmadi, O. (2024). Simulation of the Operation Conditions for Saponin Green Extraction from Chubak Using Subcritical Water and Evaluation of Their Characteristics. *Iranian Chemical Engineering Journal*. 23(136): 118-130. (In Persian)
9. Ahmadi, O. and Jafarizadeh-Malmiri, H. (2021). Intensification process in thyme essential oil nanoemulsion preparation based on subcritical water as green solvent and six different emulsifiers. *Green Processing and Synthesis*. 10(1): 430-439.

10. Hassan, M., Alijaniha, M., Jafari, S., and Ghafari, A. (2025). Physicochemical properties and antimicrobial efficacy of eugenol nanoemulsion formed by spontaneous emulsification. *Chemical Papers*. 79(2): 1155-1163.
11. Ahmadi, O., Sayyar, Z., and Jafarizadeh Malmiri, H. (2023). Optimization of Processing Time, Temperature, and Stirring Rate to Synthesize the Ag Nanoparticles Using Oregano Extract. *Iran. J. Chem. Chem. Eng.* 42(10).
12. Pachaiappan, R., Nagasathiya, K., Singh, P.K., Gopalakrishnan, A.V., Velusamy, P., Ramasamy, K., Velmurugan, D., Kandasamy, R., Ramasamy, P., and Gopinath, S.C. (2023). Phytochemical profile of black cumin (*Nigella sativa* L.) seed oil: identification of bioactive anti-pathogenic compounds for traditional Siddha formulation. *Biomass Conversion Biorefinery*. 13(16): 14683-14695.
13. Jamir, Y., Kumari, S.R., Das, S., Bhushan, M., P, M.A., Ghatak, S., Puro, A., Sen, A., and Singh, L.R. (2025). Enhanced synergistic antioxidant and antibacterial effects of stable nanoemulsions prepared from blends of thyme, black pepper, cinnamon, and garlic essential oils. *BioNanoScience*. 15(1): 70.
14. Abu-Hussien, S.H., Nasry, A.R., Samy, Z., El-Sayed, S.M., Bakry, A., Ebeed, N., Elhariry, H., and ElNoby, T.J.A.E. (2025). Synergistic antimicrobial activity of essential oils mixture of *Moringa oleifera*, *Cinnamomum verum* and *Nigella sativa* against *Staphylococcus aureus* using L-optimal mixture design. 15(1): 15.
15. Ahmadi, O. and Jafarizadeh-Malmiri, H. (2020). Mass Transfer Modeling in the Process of Thyme Essential Oil Extraction and Evaluation of Physico-Chemical Properties. *Iranian Chemical Engineering Journal*. 19(109): 27-36. (In Persian)
16. Ahmadi, O. and Jafarizadeh-Malmiri, H. (2021). Simulation of the Preparation of Thyme Essential Oil Nanoemulsion Process Using Sub-critical Water and Evaluation of Its Properties. *Iranian Journal of Biosystems Engineering*. 51(4): 705-714. (In Persian)
17. Ahmadi, O. and Jafarizadeh-Malmiri, H. (2020). Effectiveness of soluble oxygen in preparation of thyme oil nanoemulsion-simulation and characterization. *Iranian Chemical Engineering Journal*. 19(110): 42-53. (In Persian)
18. Jafarizadeh-Malmiri, H., Anarjan, N., and Berenjian, A. (2022). Developing three-component ginger-cinnamon-cardamom composite essential oil nanoemulsion as natural food preservatives. *Environmental Research*. 204: 112133.
19. Yeddes, W., Djebali, K., Wannas, W.A., Horchani-Naifer, K., Hammami, M., Younes, I., and Tounsi, M.S. (2020). Gelatin-chitosan-pectin films incorporated with rosemary essential oil: Optimized formulation using mixture design and response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*. 154: 92-103.
20. Shayan, S., Hajihajikolai, D., Ghazale, F., Gharahdaghigharhtappeh, F., Faghih, A., Ahmadi, O., and Behbudi, G. (2024). Optimization of green synthesis formulation of selenium nanoparticles (SeNPs) using Peach tree leaf extract and investigating its properties and stability. *Iranian Journal of Biotechnology*. 22(3): e3786.
21. Beigzadeh, R. and Ahmadi, O. (2025). Comparison of modeling with fuzzy logic method and mixture design in predicting the formulation of ziziphora essential oil nanoemulsion production. *Innovative Food Technologies*. 12(2): 114-135. (In Persian)
22. Mirzakhani, L., Jafarizadeh-Malmiri, H., and Ahmadi, O. (2024). Three accelerated methods based on microwave, hydrothermal and conventional heating in the green synthesis of selenium nanoparticles using garlic aqueous extract: Screening and characterization. *Nano-Structures Nano-Objects*. 38: 101162.
23. Hamoud Alshahrani, S., Alameri, A.A., Zabibah, R.S., Turki Jalil, A., Ahmadi, O., and Behbudi, G. (2022). Screening method synthesis of AgNPs using *Petroselinum crispum* (parsley) leaf: Spectral analysis of the particles and antibacterial study. *Journal of the Mexican Chemical Society*. 66(4): 480-487.
24. Ahmadi, O. (2024). Nanoemulsion of cinnamon essential oil: production by subcritical water method and evaluation of its antifungal and antioxidant properties. *Green chemistry and sustainable technologies*. 19(3): 1-12. (In Persian)

25. Khalilnejad, A., Lashkari, R., Iravani, M., and Ahmadi, O. *Application of synthesized silver nanofluid for reduction of oil-water interfacial tension*. in *Saint Petersburg 2020*. 2020. European Association of Geoscientists & Engineers.

Formulation of a *Carum Carvi* essential oil nanoemulsion using the mixture design method and investigation of its antimicrobial properties

Omid Ahmadi ^{1*}

1- Assistant Professor, Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

*Corresponding Author Email: o.ahmadi@uok.ac.ir

Abstract

The *Carum carvi* essential oil contains volatile constituents with noteworthy biological value. These compounds exhibit strong antibacterial and antifungal properties. Nanoemulsions, by increasing the interfacial area between the oil and aqueous phases, enhance the bioactivity of the essential oil and facilitate its access to target tissues. Production of nanoemulsions via subcritical water methods can contribute to improved efficacy of the active materials. This study focuses on the formulation of a *Carum carvi* essential oil nanoemulsion using a mixture design. In the present work, *Carum carvi* essential oil was extracted using a Clevenger apparatus, yielding 3.6 mL. Based on a mixture design, the nanoemulsion formulation of the essential oil was optimized within these ranges: essential oil 0.1–0.9 mL, Tween 80 as emulsifier 1–4 mL, and distilled water 20.1–23.9 mL, under subcritical water conditions at 150 °C for 90 minutes.

The results indicate the optimal formulation for oil, emulsifier, and water contents as: 0.62 mL essential oil, 2.75 mL emulsifier, and 21.63 mL water. Dynamic light scattering (DLS) analysis of this formulation showed a mean particle size of 156 nm, polydispersity index (PDI) of 0.196, and zeta potential of –24.1 mV. The application of the product prepared under the optimal

conditions, with antifungal activity assessed by diffusion (permeation) method, demonstrated an inhibition of growth of *Penicillium expansum* by 68.78% and antibacterial activity against the Gram-positive *Staphylococcus aureus* and the Gram-negative *Escherichia coli*, with inhibition zone diameters of 1.6 cm and 1.4 cm, respectively.

Keywords: *Carum Carvi* essential oil, Mixture Design, Antifungal, Antibacterial, Subcritical water, Formulation, Nanoemulsion