

## *Enhancement of Skin Absorption of Propolis Extract through Niosomal Nanovesicle Formulation: Design and Optimization Using the Box-Behnken Method*

Hossein Asgarirad<sup>1,2</sup>,  
Maryam Aghababaei<sup>3,2</sup>,  
Shervin Amirkhanloo<sup>4</sup>,  
Seyedeh Melika Ahmadi<sup>5,6</sup>,  
Hossein Ebrahimi<sup>3,2</sup>,  
Ali Davoodi<sup>7,8</sup>,  
Pedram Ebrahimnejad<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Associate Professor, Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>2</sup> Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>3</sup> Pharm D, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>4</sup> PhD Student in Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>5</sup> Assistant Professor, Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

<sup>6</sup> Pharmaceutical Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

<sup>7</sup> Assistant Professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>8</sup> Medicinal Plants Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received April 13, 2024; Accepted November 16, 2024)

### **Abstract**

**Background and purpose:** Herbal medicines have gained significant attention due to their notable therapeutic efficacy and lower incidence of side effects compared to chemical drugs. Propolis, a natural product rich in flavonoid compounds, exhibits a range of therapeutic properties. This study aimed to design and develop novel formulations for the transdermal delivery of propolis extract.

**Materials and methods:** Niosomal nanoparticles containing propolis extract were prepared using the thin-film hydration method. To achieve an optimal formulation, varying amounts of cholesterol and surfactants (Span 60 and Tween 60) were adjusted based on changes in the hydrophilic-lipophilic balance (HLB). The cholesterol content, HLB, and surfactant ratios were evaluated and optimized using the Box-Behnken design of experiments, leading to the selection of an appropriate formulation for skin absorption studies. UV spectrophotometry was employed to identify and measure the concentration of flavonoid compounds in the nanoparticles. To assess skin absorption, the diffusion of simple propolis gel and niosomal propolis gel was compared under laboratory conditions using a Franz diffusion cell.

**Results:** A formulation containing 300 mg of cholesterol and 353.9 mg of Span 60 and Tween 60, with an HLB of 11.5, showed the best results in terms of particle size (201.3 nm), dispersion stability, zeta potential, and loading efficiency. These nanoparticles, with their small and optimal size, demonstrated effective penetration into skin layers and significantly enhanced the local absorption of the drug. The results indicated that the niosomal formulation exhibited greater permeability and bioavailability compared to simple propolis gel.

**Conclusion:** This study showed that cholesterol content, surfactant type and ratio, and HLB significantly affect the physicochemical properties and loading capacity of niosomes. Additionally, niosomes substantially enhance the permeability and skin absorption of propolis, demonstrating the high potential of this system in improving skin absorption, solubility, and drug metabolism. Therefore, niosomes can serve as effective carriers for transdermal delivery of herbal extracts.

**Keywords:** propolis, flavonoids, nanoparticles, niosomes, skin absorption

J Mazandaran Univ Med Sci 2024; 34 (239): 42-57 (Persian).

**Corresponding Author:** Pedram Ebrahimnejad - Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: p\_ebrahimnejad@yahoo.com)

# بهبود جذب پوستی عصاره پروپولیس از طریق فرمولاسیون نانوزیکول نیوزومی؛ طراحی و بهینه‌سازی با استفاده از روش باکس بنکن

حسین عسگری راد<sup>۲۰۱</sup>مریم آقابابائی<sup>۲۰۳</sup>شروین امیرخانلو<sup>۴</sup>سیده ملیکا احمدی<sup>۶۰۵</sup>حسین ابراهیمی<sup>۲۰۳</sup>علی داوودی<sup>۸۰۷</sup>پدرام ابراهیم نژاد<sup>۲۰۱</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** داروهای گیاهی به دلیل اثربخشی درمانی بالا و عوارض جانبی کم‌تر نسبت به داروهای شیمیایی، توجه فراوانی را به خود جلب کرده‌اند. پروپولیس به عنوان یک محصول طبیعی غنی از ترکیبات فلاوونوئیدی دارای خواص درمانی متعدد است. هدف از این پژوهش، طراحی و توسعه فرمولاسیون‌های نوین برای دارورسانی پوستی عصاره پروپولیس است.

**مواد و روش‌ها:** نانوذرات نیوزومی حاوی عصاره پروپولیس با استفاده از روش هیدراتاسیون فیلم نازک تهیه شدند. برای دستیابی به فرمولاسیون بهینه، مقادیر مختلف کلسترول و سورفاکتانت‌ها (اسپان ۶۰ و توئین ۶) براساس تغییرات HLB تنظیم شدند. پارامترهای کلسترول، HLB و نسبت سورفاکتانت‌ها با استفاده از روش طراحی آزمایش باکس-بنکن ارزیابی و بهینه‌سازی شدند و فرمولاسیون مناسب برای مطالعات جذب پوستی انتخاب شد. شناسایی و اندازه‌گیری غلظت ترکیبات فلاوونوئیدی در نانوذرات نیوزومی با استفاده از اسپکتروفتومتر UV انجام شد. برای ارزیابی جذب پوستی، نفوذ ژل‌های ساده و نیوزومی پروپولیس با استفاده از سل انتشاری فرانز در شرایط آزمایشگاهی مقایسه گردید.

**یافته‌ها:** فرمولاسیونی حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم کلسترول و ۳۵۳٫۹ میلی‌گرم از اسپان ۶۰ و توئین ۶۰ با HLB معادل ۱۱/۵، بهترین نتایج را از نظر اندازه ذره (۲۰۱/۳ نانومتر)، فاکتور پراکندگی مناسب، پتانسیل زتا و درصد بارگذاری نشان داد. این نانوذرات با اندازه کوچک و مناسب، قابلیت نفوذ مؤثر در لایه‌های پوستی را دارند و جذب موضعی دارو را به طور چشمگیری افزایش می‌دهند. نتایج نشان داد که فرمولاسیون نیوزومی نسبت به ژل ساده پروپولیس، نفوذپذیری و فراهمی زیستی بیش‌تری دارد.

**استنتاج:** این مطالعه نشان داد که مقادیر کلسترول، نوع و نسبت سورفاکتانت‌ها و HLB به طور معنی‌داری بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و میزان بارگذاری نانوذرات نیوزومی تأثیر می‌گذارند. هم‌چنین، نیوزوم‌ها نفوذ و جذب پوستی پروپولیس را افزایش داده و نشان‌دهنده‌ی پتانسیل بالای این سیستم در بهبود جذب پوستی، افزایش حلالیت و بهینه‌سازی متابولیسم دارو هستند. بنابراین، نیوزوم‌ها می‌توانند برای دارورسانی پوستی عصاره‌های گیاهی مورد استفاده قرار گیرند.

**واژه‌های کلیدی:** پروپولیس، فلاوونوئید، نانوذرات، نیوزوم، جذب پوستی

E-mail: p\_ebrahimnejad@yahoo.com

**مؤلف مسئول:** پدرام ابراهیم نژاد - ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مرکز تحقیقات دارویی

۱. دانشیار، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. دکتری حرفه‌ای داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. دانشجوی دکتری تخصصی فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۵. استادیار، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
۶. مرکز تحقیقات دارویی، پژوهشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
۷. استادیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۸. مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱/۲۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۳/۲/۲۶ تاریخ تصویب: ۱۴۰۳/۸/۲۶

## مقدمه

پروپولیس ماده‌ای طبیعی است که به وسیله زنبور عسل به منظور حفظ کندو در برابر بلایای طبیعی، سرما و میکروب‌ها، ساخته می‌شود (۱). مواد اولیه مورد نیاز برای ساخت پروپولیس از گیاهان اطراف کندو، توسط زنبورها جمع‌آوری می‌شود. با توجه به تنوع گیاهان مناطق مختلف، پروپولیس مناطق مختلف دارای ترکیبات متفاوتی است (۲). پروپولیس از منابع گیاهی متنوع و ترکیبات شیمیایی پیچیده‌ای مانند فلاونوئیدها، اسیدهای فنولیک، ترپن‌ها، قندها، هیدروکربن‌ها و عناصر معدنی تشکیل شده است. این ترکیبات به پروپولیس امکان انجام طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های دارویی را می‌دهند (۳). از جمله خواص پروپولیس می‌توان به خواص آنتی‌اکسیدانتی آن به دلیل وجود پلی‌فنول‌ها اشاره کرد (۴). پلی‌فنول‌ها با اهدای الکترون یا اتم هیدروژن و محافظت در برابر ROS (reactive oxygen species)، خواص آنتی‌اکسیدانتی خود را در احیای زخم ایفا می‌کنند (۵). پروپولیس دارای خواص تسکین‌دهنده درد و ضد میکروبی است و با تقویت گرانولاسیون به محدود شدن زخم و بازسازی پوست کمک می‌کند (۷)؛ هم‌چنین با افزایش تجمع کلاژن نوع I و III در ماتریکس آسیب‌دیده، فرآیند ترمیم زخم را تحریک می‌کند؛ کلاژن نوع I برای مهاجرت کراتینوسیت‌ها و اپیتلیزاسیون مجدد ضروری است، در حالی که کلاژن نوع III روند بهبود را تسریع می‌کند (۸). در بسیاری از مواقع هدف درمانی، دارو رسانی پوستی است؛ با این حال خود پوست به عنوان مهم‌ترین مانع انتقال داروها محسوب می‌شود. مانع اصلی در دارورسانی پوستی، لایه بالایی اپیدرم (stratum corneum) است. ویژگی‌هایی مانند وزن مولکولی کم، لیپوفیل بودن و بارگیری در دوزهای بالا برای انتقال دارو از طریق پوست مؤثرند. با توجه به حلالیت پایین فلاونوئیدهای موجود در پروپولیس جذب پوستی آن مطلوب نیست (۹). سیستم‌های نوین انتقال دارو با کاهش اندازه ذره‌ای مانند

تهیه نانو داروها روشی موثر برای مقابله با این محدودیت هاست (۱۰). در طول دهه‌ی گذشته، فرمولاسیون وزیکول‌ها به عنوان ابزاری برای بهبود انتقال دارو علاقه زیادی را در میان دانشمندانی که در زمینه سیستم‌های داروسانی کار می‌کنند ایجاد کرده است؛ به طوری که در درمان سرطان‌های مختلف از قبیل سرطان پستان، استفاده از نانوذرات موجب از بین رفتن سلول‌های سرطانی می‌گردد (۱۱). سیستم‌های وزیکولی مانند لیپوزوم‌ها، نیوزوم‌ها، ترانس‌فروزوم‌ها، فارماکوزوم‌ها و اتوزوم‌ها جایگزینی برای بهبود انتقال دارو ارائه می‌کنند (۱۲). نیوزوم‌ها ساختارهای نانومقیاس هستند که از قرارگیری خودبه‌خودی سورفکتانت‌های غیریونی تشکیل می‌شوند و با افزودن کلسترول به عنوان عامل پایدارکننده، خواص فیزیکی‌شیمیایی خود را بهبود می‌بخشند (۱۲). این سیستم‌ها با توانایی تنظیم کنترل شده در بارگذاری دارو و بهبود پایداری آن در دارورسانی و توسعه فرمولاسیون‌های پوستی کاربرد گسترده‌ای یافته‌اند. افزودن اجزای اضافی مانند دی‌سیتیل فسفات نیز برای تغییر خواص سطحی و تقویت پایداری و کارایی نیوزوم‌ها توصیه شده است (۱۳، ۱۴). اخیراً تحقیقات نشان داده‌اند که تنظیم دقیق پارامترهای فرمولاسیون مانند اندازه ذرات، پتانسیل زتا، شاخص پراکندگی ذرات (polydispersity index) PDI و درصد بارگذاری ماده فعال، نقش کلیدی در بهبود پایداری و نفوذپذیری نیوزوم‌ها به لایه‌های عمقی پوست ایفا می‌کند (۱۵). روش‌های آماری طراحی آزمایش، از جمله روش باکس-بنکن، به‌طور گسترده‌ای برای بهینه‌سازی فرمولاسیون‌ها و دستیابی به مشخصات فیزیکی‌شیمیایی مطلوب مورد استفاده قرار گرفته‌اند و اثربخشی این روش‌ها در تنظیم دقیق پارامترها و بهبود توزیع یکنواخت اندازه ذرات در پژوهش‌های اخیر تأیید شده است (۱۶، ۱۷). هدف از این مطالعه دستیابی به یک سیستم دارورسانی کارآمد برای افزایش نفوذپذیری عصاره پروپولیس در لایه‌های پوستی است. بنابراین

فرمولاسیون مناسب از ژل نیوزومی پروپولیس تهیه و جذب پوستی آن مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه، عصاره اتانولی پروپولیس با غلظت ۲۰۰ میلی گرم از زنبورداری‌های نکا در استان مازندران و به روش ماسراسیون تهیه شد. سورفکتانت‌های اسپان ۶۰ (Merck، آلمان) و توئین ۶۰ (Scharlau، اسپانیا) به عنوان عوامل پایدارکننده استفاده گردیدند و کلسترول مورد استفاده از شرکت سولاریبو (Solarbio، چین) تأمین شد. تمامی این ترکیبات در فرمولاسیون‌های مختلف و به منظور دستیابی به فرمولاسیون بهینه نانوزیکول‌های نیوزومی به صورت دقیق و با مقادیر مشخص به کار برده شدند. اتانول (Merck، آلمان) برای حل کردن عصاره پروپولیس و کلروفرم (Scharlau، اسپانیا) برای حل کردن سورفکتانت‌ها و کلسترول به کار برده شدند. برای هیدراتاسیون فیلم تشکیل شده از مواد، از آب مقطر با دمای ۶۰ درجه سانتی گراد استفاده شد.

### دستیابی به فرمولاسیون بهینه

در این مطالعه، به منظور دستیابی به یک فرمولاسیون بهینه نانونیوزوم، از عصاره اتانولی پروپولیس که به روش ماسراسیون تهیه شده بود، به میزان ۲۰۰ میلی گرم در تمامی فرمولاسیون‌ها استفاده شد. در اولین مرحله، مقدار تعیین شده از پروپولیس به طور کامل در ۵ میلی لیتر اتانول درون بشر اولیه حل شد. در بشر دیگری، مقادیر مشخصی از سورفکتانت‌های اسپان ۶۰، توئین ۶۰ (محصول شارلو-اسپانیا)، و کلسترول در ۷ میلی لیتر کلروفرم حل شده و سپس به بشر حاوی پروپولیس منتقل گردید تا ترکیبی یک دست حاصل شود.

محلول ترکیبی به بالن ته گرد منتقل شد و به دستگاه روتاری متصل شد. طی این فرآیند، حلال‌ها به کمک پمپ خلا به مدت ۱۵ دقیقه تبخیر شدند و یک

لایه نازک فیلم روی دیواره بالن ایجاد شد. برای مرحله هیدراتاسیون، ۳۰ میلی لیتر آب با دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به بالن افزوده شد. ترکیب حاصله به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد و با سرعت ۲۱۰ دور در دقیقه در دستگاه روتاری تحت فرآیند امولسیون‌سازی قرار گرفت. در مرحله بعد، به منظور یکنواخت‌سازی ساختار نیوزوم‌ها، محلول با استفاده از دستگاه پروب سونیکاتور، به مدت ۱۵ دقیقه و با دامنه ۲۰ درصد سونیکه شد تا توزیع ذرات به صورت همگن انجام پذیرد.

در ادامه، نیوزوم‌های حاصل از نظر مشخصات اندازه ذرات، شاخص پراکندگی ذرات (PDI)، و پتانسیل زتا مورد ارزیابی قرار گرفتند. اندازه گیری ذرات نانوزیکول‌ها با استفاده از روش پراکندگی نور دینامیکی (dynamic light scatterin) انجام شد. در مرحله نهایی، برای دستیابی به فرمولاسیون بهینه، پارامترهای کلسترول، مقدار HLB (Hydrophilic-lipophilic balance)، و میزان سورفکتانت‌ها به عنوان سطوح مورد بررسی انتخاب گردیدند و با بهره گیری از روش آماری باکس-بنکن و نرم افزار دیزاین اکسپرت، ۱۳ ترکیب مختلف به طور آماری ارزیابی شدند. فرمولاسیونی که دارای کوچک ترین اندازه ذره، پتانسیل زتای منفی تر، کم ترین مقدار PDI و بالاترین بارگیری فلاونوئیدی بود به عنوان فرمولاسیون بهینه تعیین شد.

### رسم منحنی کوئرستین

برای رسم منحنی استاندارد کوئرستین، جهت استاندارد سازی فلاونوئیدهای موجود در نیوزوم، ابتدا استوک اولیه با غلظت ۲۰۰ میلی گرم/لیتر در بالن ژورژه حاوی اتانول تهیه گردید. سپس، با تقسیم و رقیق کردن استوک اولیه، غلظت‌های ۶.۲۵، ۱۲.۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم/لیتر به دست آمدند. به منظور رسم منحنی استاندارد، از دستگاه اسپکترومتر UV استفاده شد و جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر به صورت سه بار متوالی اندازه گیری گردید. در مرحله بعدی، جهت

محاسبه درصد فلاوونوئید موجود در عصاره پروپولیس، ابتدا عصاره پروپولیس با غلظت ۱ میلی گرم بر لیتر در اتانول تهیه شد؛ سپس جذب اسپکتروفتومتری UV در طول موج ۴۱۵ نانومتر اندازه گیری شد و با استفاده از منحنی استاندارد کوئرستین و معادله ۱، میزان فلاوونوئید موجود در عصاره پروپولیس محاسبه گردید که به شرح زیر می باشد (۱۸):

معادل شماره ۱:

$$\times 100 \frac{\text{مقدار فلاوونوئید موجود در نمونه}}{\text{مقدار پروپولیس در هر فرمول}}$$

معادله شماره ۱ محاسبه میزان فلاوونوئید موجود در عصاره پروپولیس می باشد.

این روند موجب اندازه گیری میزان فلاوونوئید موجود در عصاره پروپولیس شد و نتایج به دقت گزارش گردید.

#### میزان بارگیری

برای بررسی میزان بارگیری داروی محصور شده، فرمولاسیون های F1 تا F16 به وسیله دستگاه التراسانتزیفیوژ به مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد و با دور ۲۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتزیفیوژ شدند. میزان داروی بارگیری شده از طریق جداگانه قرار دادن سوپرناتانت (مایع شفاف بالای رسوب) و رسوب حاصل از سانتزیفیوژ تعیین شد.

مقادیر فلاوونوئیدها در نمونه های عصاره های گیاهی با استفاده از روش پورمراد و همکاران (۱۹) اندازه گیری شدند. در لوله آمایش اول ۰/۱ میلی لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد با ۰/۱ میلی لیتر استات پتاسیم یک مولار مخلوط شده و به مخلوط حاصل ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر دو بار تقطیر اضافه شد. در لوله آزمایش دوم ۰/۵ میلی لیتر از مایع شفاف حاصل از سانتزیفیوژ با ۱/۵ میلی لیتر اتانول مخلوط گردید؛ سپس مخلوط موجود در لوله اول به لوله دوم اضافه شد. مخلوط نهایی حاصل به مدت

۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد و با استفاده از اسپکتروفتومتری UV جذب نوری در طول موج ۴۱۵ نانومتر ثبت شد. با استفاده از منحنی استاندارد درصد داروی محصور شده با استفاده از معادله ۲ محاسبه گردید.

معادل شماره ۲:

$$\times 100 \frac{\text{میزان داروی آزاد-میزان تام دارو}}{\text{میزان تام دارو}} = \text{درصد داروی محصور شده}$$

معادله شماره ۲ تعیین میزان بارگیری فلاوونوئید محصور شده به روش اسپکتروفتومتری UV می باشد.

#### بررسی پایداری

برای بررسی پایداری، مقدار معینی از نیوزوم های حاوی عصاره پروپولیس در دو شرایط دمایی مختلف، شامل دمای اتاق و یخچال، نگهداری شد. این نمونه ها طی یک دوره شش ماهه از نظر تغییرات ظاهری، پایداری فیزیکی و تشکیل یا عدم تشکیل رسوب به طور منظم ارزیابی شدند (۲۰).

#### جذب پوستی

در این مطالعه از ۶ سر موش صحرایی نر با وزن تقریبی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم استفاده شد. ابتدا یوتازی در محفظه با دی اکسید کربن انجام گرفت و موش ها کشته شدند و سپس موهای ناحیه شکم کوتاه شد؛ در ادامه پوست از ناحیه شکم جدا شد و چربی ها و بافت های اضافی حذف گردیدند. نمونه پوست های آماده شده در سرم فیزیولوژیک به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شدند. بعد از آماده سازی پوست، ۱ گرم از ژل نیوزومی ۶ درصد حاوی عصاره پروپولیس به روی پوست قرار گرفت و محیط انحلال حاوی ۳۳ میلی لیتر آب دیونیزه اضافه شد. نمونه برداری از محیط انحلال در زمان های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۲۴ ساعت پس از تنظیم سل فرانس انجام شد. بعد از هر بار نمونه برداری، ۵ میلی لیتر آب دیونیزه به محیط انحلال افزوده می شد تا حجم

ثابت بماند. مقدار داروی جذب شده به وسیله اسپکتروفتومتر UV در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. هم‌چنین ژل ساده حاوی عصاره پروپولیس به عنوان کنترل مثبت در این آزمایش استفاده شد و مورد ارزیابی آماری قرار گرفت (۲۰، ۲۱).

#### ریخت شناسی نانوذرات

برای بررسی ریخت‌شناسی نانوزیکول‌ها، از تکنیک‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی میدان- انتقالی (FE-SEM) (Field emission scanning electron microscopy) و میکروسکوپ الکترونی عبوری TEM (Transmission electron microscopy) استفاده شد. ابتدا، نانوزیکول‌ها با یک لایه نازک طلا جهت افزایش وضوح تصاویر پوشش داده شدند و با FE-SEM مدل MIRA III برای مشاهده شکل سطحی بررسی شدند. سپس برای مطالعه دقیق‌تر ساختار داخلی و لایه‌بندی نانوزیکول‌ها از TEM مدل CM120 استفاده گردید. ترکیب این دو تکنیک میکروسکوپی پیشرفته اطلاعات جامع‌تری از ریخت‌شناسی، یکدستی ساختاری و پایداری فیزیکی نانوزیکول‌ها ارائه داد (۲۲، ۲۳).

#### آنالیز آماری

برای آنالیز آماری داده‌ها، از نرم‌افزارهای Design Expert نسخه ۱۳ و ۲۰۱۳ Excel برای ویندوز، استفاده گردید. داده‌های به‌دست آمده از طراحی باکس-بنکن تحت آنالیز رگرسیون خطی قرار گرفتند و یک مدل ریاضی جهت پیش‌بینی و محاسبه اندازه ذره‌ای بر اساس متغیرهای مستقل مورد آزمایش به دست آمد. برای مقایسه داده‌ها و مدل‌سازی از آزمون‌های آماری نظیر تحلیل واریانس (ANOVA) به همراه آزمون‌های آماری T-Test و F-Test استفاده شد. در تمامی آزمون‌ها، مقدار P کم‌تر از ۰/۰۵ به عنوان اختلاف آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. برای ارزیابی

اندازه ذرات، پتانسیل زتا و میزان بارگیری فلاونوئیدها، با استفاده از مدل رگرسیون پیشنهادی، تعدادی آزمایش تکمیلی در محدوده متغیرهای مورد بررسی اجرا شد تا مطابقت نتایج مشاهده شده با نتایج پیش‌بینی شده توسط مدل ارزیابی شود. از میان حالات محاسبه شده ۱۶ حالت برای ارزیابی میزان بارگذاری مدل مورد آزمایش قرار گرفت. در این مطالعه، متغیرهای کلیدی شامل مقدار کلسترول (بین ۱۰۰ تا ۳۰۰ میلی‌گرم)، HLB (بین ۶ تا ۱۲)، و مجموع مقادیر سورفکتانت‌ها (بین ۳۰۰ تا ۸۰۰ میلی‌گرم) بودند.

### یافته‌ها

#### نتایج حاصل از ارزیابی اولیه نانوزیکول‌ها

پس از تهیه فرمولاسیون‌های مورد نظر و انجام آزمایش‌ها با سه بار تکرار برای هر فرمولاسیون، میانگین اندازه ذره‌ای، پتانسیل زتا و شاخص پراکندگی (PDI) به‌دست آمده از روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS) و هم‌چنین میزان بارگیری محاسبه‌شده با استفاده از معادله ۲ در جدول شماره ۱ گزارش گردید.

#### فرمولاسیون‌های پیشنهادی و بررسی صحت آن‌ها

داده‌های جدول شماره ۱ وارد نرم‌افزار Design Expert شدند، و فرمولاسیونی که دارای کم‌ترین اندازه ذره‌ای، منفی‌ترین پتانسیل زتا، کم‌ترین شاخص پراکندگی (PDI) و بالاترین میزان بارگیری بود به عنوان فرمولاسیون بهینه انتخاب گردید. در نتیجه، فرمولاسیون‌های پیشنهادی زیر به‌عنوان فرمولاسیون‌های بهینه با استفاده از روش باکس-بنکن مشخص و پیشنهاد شدند.

برای بررسی صحت فرمولاسیون‌های پیشنهادی، هر یک از فرمولاسیون‌ها تهیه و مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج به‌دست آمده از این آزمایش‌ها در جدول شماره ۲ گزارش شده است.

مقایسه و بررسی صحت فرمولاسیون‌های پیشنهادی باکس بنکن

برای ارزیابی صحت فرمولاسیون‌های پیشنهادی، مقادیر حاصل از دو جدول شماره ۲ و ۳ با استفاده از آزمون t-test در برنامه اکسل تحلیل شدند. مقادیر  $P(T \leq t)$  دوطرفه به صورت ذکر شده گزارش شد:

براساس جدول شماره ۴، مقدار P-value در همه موارد بالاتر از ۰/۰۵ است. این نتایج نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین داده‌های دو جداول شماره ۲ و ۳ وجود ندارد و فرمولاسیون‌های پیشنهادی باکس-بنکن از نظر آماری قابل استناد و معتبر هستند.

فرمولاسیون بهینه

فرمولاسیون بهینه شامل ۳۰۰ میلی‌گرم کلسترول، مقدار HLB برابر با ۱۱/۵۸۰ و مجموع سورفاکتانت معادل ۳۵۳/۹۲۵ میلی‌گرم می‌باشد. این فرمولاسیون، با بهترین و مناسب‌ترین مشخصات از جمله اندازه ذره‌ای، شاخص پراکندگی، پتانسیل زتا و میزان بارگیری فلاونوئید دست یافته است. اندازه ذره‌ای متوسط در این فرمولاسیون حدود  $200 \pm 23$  نانومتر است که نشان‌دهنده قابلیت عبور نانوذرات نیوزومی از لایه‌های پوست و افزایش جذب موضعی دارو است. میانگین شاخص پراکندگی در این فرمولاسیون برابر با  $0.12 \pm 0.02$

جدول شماره ۱: نتایج اولیه حاصل از ارزیابی اندازه ذره‌ای، شاخص پراکندگی (PDI)، پتانسیل زتا و میزان بارگیری دارو با استفاده از روش‌های UV و DLS

شماره	فاکتور ۱ کلسترول (mg)	فاکتور ۲ HLB	فاکتور ۳ سورفاکتانت (mg)	پاسخ ۱ اندازه ذره ای (nm)	پاسخ ۲ شاخص پراکندگی	پاسخ ۳ پتانسیل زتا (mV)	پاسخ ۴ بارگیری (درصد)
۱	۱۰۰	۶	۵۵۰	۳۲۶۵	۴۲۷/۰	-۲۲/۲	۳/۴۷
۲	۳۰۰	۶	۵۵۰	۲/۱۴۲	۴۳۵/۰	-۱۳/۲	۰۳/۲۱
۳	۱۰۰	۱۲	۵۵۰	۲/۱۶۴	۳۳۱/۰	-۴/۹	۵۹/۵۶
۴	۳۰۰	۱۲	۵۵۰	۲/۱۹۷	۳۷۵/۰	-۲/۷	۴/۶۸
۵	۱۰۰	۹	۳۰۰	۱/۲۶۱	۳۹۶/۰	-۹/۲	۷۶/۷۸
۶	۳۰۰	۹	۳۰۰	۹/۲۰۱	۲۶۷/۰	-۰/۱/۴	۲۷/۷۹
۷	۱۰۰	۹	۸۰۰	۴/۳۰۳	۴۰۱/۰	-۵۲/۶	۰۹/۶۳
۸	۳۰۰	۹	۸۰۰	۳/۲۷۴	۴۷۸/۰	-۸/۷	۷۸/۶۸
۹	۲۰۰	۶	۳۰۰	۵/۱۸۰	۳۹۵/۰	-۰۳/۱	۹/۳۳
۱۰	۲۰۰	۱۲	۳۰۰	۲/۱۷۲	۲۹۸/۰	-۴/۷	۲/۲۱
۱۱	۲۰۰	۶	۸۰۰	۶/۲۳۳	۴۲۶/۰	-۹۴/۱	۴/۱۵
۱۲	۲۰۰	۱۲	۸۰۰	۳/۲۳۱	۴۵۱/۰	-۶/۱۰	۹۷/۱۵
۱۳	۲۰۰	۹	۵۵۰	۳/۳۱۰	۴۱۵/۰	-۸/۳	۸/۶۴
۱۴	۲۰۰	۹	۵۵۰	۳/۳۲۳	۳۸۲/۰	-۸/۲	۱/۶۰
۱۵	۲۰۰	۹	۵۵۰	۱/۳۰۵	۳۹۱/۰	-۱/۳	۷/۶۵
۱۶	۲۰۰	۹	۵۵۰	۴/۲۹۸	۳۹۹/۰	-۵/۳	۳/۵۸

جدول شماره ۲: فرمولاسیون‌های پیشنهادی توسط روش باکس-بنکن برای بهینه‌سازی اندازه ذره‌ای، پتانسیل زتا و بارگیری دارو

شماره	کلسترول (mg)	HLB	سورفاکتانت (mg)	اندازه ذره ای (nm)	شاخص پراکندگی	پتانسیل زتا (mV)	بارگیری (درصد)	مطلوب بودن
۱	۳۰۰	۵۸/۱۱	۹۲۵/۳۵۳	۶۹۰/۱۹۸	۲۶۷/۰	-۱۲۴/۷	۱۱۲/۶۵	۷۴۳/۰
۲	۳۰۰	۶۷۵/۱۱	۱۸۱/۳۵۷	۶۶۷/۱۹۵	۲۶۷/۰	-۲۳۰/۷	۴۳۵/۶۳	۷۴۳/۰
۳	۳۰۰	۴۶۸/۱۱	۴۵/۳۵۰	۰۳۵/۲۰۰۲	۲۶۷/۰	-۹۹۹/۶	۶۵۱/۶۶	۷۴۳/۰
۴	۳۰۰	۵۹۸/۱۱	۷۸۵/۳۵۸	۵۰۸/۱۹۸	۲۶۹/۰	-۱۴۴/۷	۰۵۹/۶۵	۷۴۳/۰
۵	۹۹۸/۲۹۹	۷۱۳/۱۱	۴۲۶/۳۵۸	۴۳۷/۱۹۴	۲۶۷/۰	-۲۷۲/۷	۱۷۷/۶۳	۷۴۳/۰

جدول شماره ۳: بررسی صحت فرمولاسیون‌های پیشنهادی از نظر اندازه ذره‌ای، شاخص پراکندگی (PDI)، پتانسیل زتا و میزان بارگیری دارو

شماره	کلسترول (mg)	HLB	سورفاکتانت (mg)	اندازه ذره ای (nm)	شاخص پراکندگی	پتانسیل زتا (mV)	بارگیری (درصد)
۱	۳۰۰	۵۸/۱۱	۹۲۵/۳۵۳	۲۰۱/۳۵۳	۲۹۳/۰	-۹۸۷/۷	۵۶۳/۷۲
۲	۳۰۰	۶۷۵/۱۱	۱۸۱/۳۵۷	۱۹۰/۸۲۵	۲۵۳/۰	-۸۳۸/۷	۵۵۲/۶۵
۳	۳۰۰	۴۶۸/۱۱	۴۵/۳۵۰	۸۵۲/۲۰۵	۳۷۲/۰	-۲۸/۶	۲۵۶/۷۰
۴	۳۰۰	۵۹۸/۱۱	۷۸۵/۳۵۸	۲۵/۱۸۰	۲۸۳/۰	-۸۳۲/۷	۲۱۸/۶۰
۵	۹۹۸/۲۹۹	۷۱۳/۱۱	۴۲۶/۳۵۸	۳۳۰/۱۹۰	۲۹۸/۰	-۶۵۲/۷	۸۴۵/۶۲

جدول شماره ۴: مقادیر P آزمون t مستقل دوطرفه (P(T<=t) two-tail)

برای بررسی اختلاف میان مقادیر تجربی و پیش‌بینی شده در پارامترهای اندازه ذره‌ای، شاخص پراکندگی (PDI)، پتانسیل زتا و میزان بارگیری

سطح معنی داری	بارگیری	پتانسیل زتا	شاخص پراکندگی	اندازه ذره ای
۰/۰۰۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰۰۰

است که به توزیع یکنواخت اندازه نانوذرات در نیوزوم اشاره دارد و به حفظ ثبات و یکدستی این سیستم کمک می‌کند. هم‌چنین، میانگین پتانسیل زتا در این فرمولاسیون بهینه برابر با  $7 \pm 0/12$  میلی‌ولت است که نشان‌دهنده پایداری کلوئیدی بالای نیوزوم‌ها بوده و از تجمع ذرات جلوگیری می‌کند. براساس این نتایج، این ترکیب به‌عنوان فرمولاسیون بهینه در این مطالعه انتخاب شده است و قابلیت استفاده در بهبود دارورسانی موضعی را دارا می‌باشد.

#### تحلیل‌های آماری اندازه ذره‌ای

با توجه به اهمیت بالایی اندازه ذره‌ای در ساخت نیوزوم‌ها، تست‌های آماری زیر برای ساینز ذرات فرمولاسیون‌ها ارائه شد. تست ANOVA: در جدول شماره ۵ نتایج حاصل از تست ANOVA برای ساینز ذره‌ای ذکر شده است. Lack of fit که میزان انحراف در پیش‌بینی داده‌ها را بیان می‌کند، بیش‌تر از ۰/۰۵ شده است که به عنوان عامل منفی در نظر گرفته می‌شود؛ این موضوع نشان می‌دهد که اندازه‌ی ذرات مدل پیشنهادی مطلوب است.

#### جدول شماره ۵: جدول تست ANOVA

Analysis of variance table (Partial sum of squares-Type III)					
سطح معنی داری	F Value	Mean Square	df	Sum of Squares	Source
۰/۰۰۰۰۰	۶۷/۲۲	۷۳/۵۲۱۹	۹	۶۱/۴۶۹۷۷	Model
۰/۰۰۰۰	۲۸/۱۷	۳۲/۳۹۷۸	۱	۳۲/۳۹۷۸	A-Cholestrol
۷۷۰/۵۰	۰/۹۳	۴۵/۲۱	۱	۴۵/۲۱	B-HLB
۰/۰۰۰۰	۲۴/۱۸	۸۶/۴۱۹۹	۱	۸۶/۴۱۹۹	C-surfactant
۰/۰۰۰۰	۴۶/۲۶	۸۰/۶۰۹۱	۱	۸۰/۶۰۹۱	AB
۳۵۹/۰	۹/۸۰	۵/۲۲۶	۱	۵/۲۲۶	AC
۴۶۱/۰	۵۳/۱	۴۴/۳۵۳	۱	۴۴/۳۵۳	BC
۰/۰۰۰۰	۶۲/۲۲	۲۳/۵۲۰۹	۱	۲۳/۵۲۰۹	A <sup>2</sup>
<۰/۰۰۰۰	۶۷/۱۱۳	۷۱/۲۶۲۱۹	۱	۷۱/۲۶۲۱۹	B <sup>2</sup>
۱۳۷/۰	۹۴/۲	۳۰/۶۷۷	۱	۳۰/۶۷۷	C <sup>2</sup>
		۲۷/۲۳۰	۶	۶۱/۱۳۸۱	Residual
۱۸۶/۰	۱۴/۳	۳۹/۳۴۹	۳	۱۶/۱۰۴۸	Lack of Fit
		۱۵/۱۱۱	۳	۴۵/۳۳۳	Pure Error
			۱۵	۲۲/۴۸۳۵۹	Cor Total

Lack of fit: not significant

Model: significant

تحلیل‌های آماری پتانسیل زتا و میزان بارگیری دارو به‌منظور ارزیابی صحت و دقت فرمولاسیون‌های پیشنهادی، تحلیل‌های آماری بر روی پارامترهای کلیدی از جمله پتانسیل زتا و میزان بارگیری دارو نیز انجام شد. نتایج این تحلیل‌ها در جدول‌های مرتبط گزارش گردیده و برای مقایسه مقادیر تجربی با پیش‌بینی‌های مدل از آزمون t مستقل استفاده شده است.

در مورد پتانسیل زتا، مقدار P برابر با ۰/۵۵۳ به‌دست آمد. این مقدار نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار میان داده‌های تجربی و پیش‌بینی شده برای پتانسیل زتا است که حاکی از دقت بالای مدل پیشنهادی در پیش‌بینی این پارامتر مهم است. پتانسیل زتا در فرمولاسیون‌های دارورسانی اهمیت زیادی دارد، زیرا نقش مهمی در پایداری کلوئیدی و جلوگیری از تجمع ذرات ایفا می‌کند.

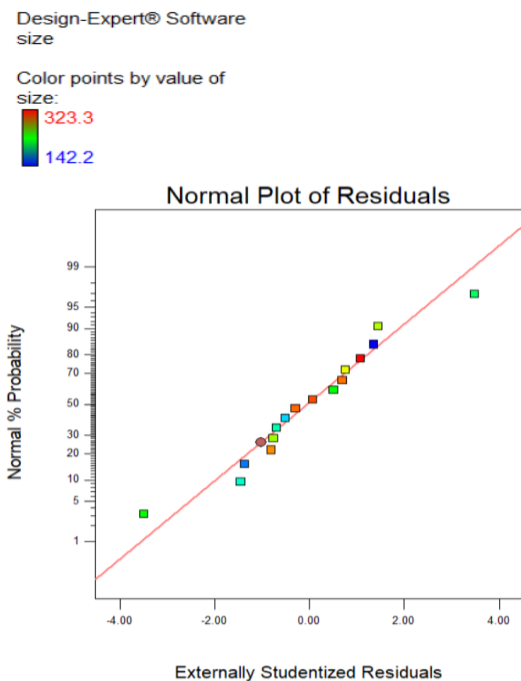
برای میزان بارگیری دارو نیز مقدار P برابر با ۰/۵۱۷ به‌دست آمد که نشان می‌دهد تفاوت معنی‌داری بین داده‌های تجربی و پیش‌بینی شده برای این پارامتر وجود ندارد. این نتیجه تأیید می‌کند که مدل باکس-بنکن به‌طور مؤثری قادر به پیش‌بینی میزان بارگیری دارو در فرمولاسیون است. به‌طور کلی، این تحلیل‌های آماری نشان می‌دهند که مدل پیشنهادی با دقت بالایی توانسته است تمامی پارامترهای کلیدی از جمله اندازه ذره‌ای، پتانسیل زتا و میزان بارگیری دارو را پیش‌بینی نماید. این نتایج، انتخاب فرمولاسیون بهینه را از نظر علمی و دارورسانی موضعی است.

Model graph: نمودار شماره ۱ نشان می‌دهد که فرمولاسیون در یک محدوده مشخصی از مقادیر کلسترول و سورفکتانت به حداکثر اندازه ذرات می‌رسد و ساختار آن حالت گنبدی به خود می‌گیرد. این ساختار گنبدی بیانگر بهینه‌سازی توزیع ذرات و تنظیم تعادل میان پایداری کلوئیدی و یکنواختی فرمولاسیون است.

جدول شماره ۶: پیش بینی مدل ها برای سایز ذره ای

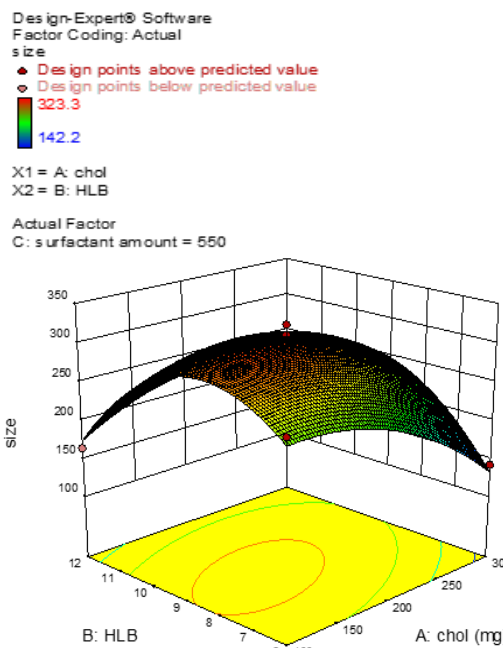
نتیجه	فن آماری
۹۷۱/۴۰	R-Squared
۹۲۸/۶۰	Adj R-Squared
۶۴۱/۰	Pred R-Square
۷۳۲/۱۴	Adeq Preciosior
۴۷/۱۴۴	BIC
۷۴/۱۸۰	AICc
۱۷/۱۵	Std. Dev.
۲۴/۲۴۴	Mean
۲۱/۶	C.V. %
۳۲/۱۷۳۶۳	PRESS
۷۴/۱۱۶	-2 Log Likeliho

Normal plot: نمودار شماره ۲ نرمال بودن توزیع باقیمانده‌ها را بر اساس مدل باکس-بنکن نشان می‌دهد. نقاط داده نزدیک به خط نرمال قرار گرفته‌اند که این موضوع نشان‌دهنده تطابق مدل رگرسیون با داده‌های تجربی و اعتبار آن برای پیش‌بینی اندازه ذرات است. این توزیع نرمال حاکی از آن است که مدل با دقت بالایی تغییرات اندازه ذرات را با توجه به پارامترهای فرمولاسیون پیش‌بینی می‌کند و قابلیت اعتماد برای استفاده در تحلیل‌های بیشتر را دارد.



نمودار شماره ۴: نمودار نرمال باقیمانده‌ها برای ارزیابی مدل پیش‌بینی اندازه ذرات فرمولاسیون

این نمودار نشان می‌دهد که با افزایش مقدار کلسترول اندازه ذرات به دلیل تثبیت بیش تر غشاها کاهش می‌یابد، اما پس از عبور از حد مشخصی تجمع ذرات و تغییر ساختار به وجود می‌آید که منجر به افزایش اندازه ذرات می‌شود. هم‌چنین، تغییرات مقدار سورفکتانت در مقادیر بالاتر از یک حد معین موجب افزایش اندازه ذرات و تغییر شکل ساختار از حالت یکنواخت به حالت توده‌ای می‌شود. این رفتارها نشان می‌دهند که بهینه‌سازی فرمولاسیون در محدوده‌ای از مقادیر کلسترول و سورفکتانت قابل دستیابی است که ساختار ذرات حفظ شده و از تجمع جلوگیری می‌شود. قرارگیری داده‌ها در این نمودار به شکل گنبدی و با توزیع یکنواخت نشان می‌دهد که این فرمولاسیون توانسته است در محدوده بهینه از پایداری و اندازه ذرات بهره‌مند شود.



نمودار شماره ۱: تأثیر متغیرهای کلسترول و سورفکتانت بر اندازه ذرات فرمولاسیون نیوزومی

پیش‌بینی مدل‌ها: در جدول شماره ۶، R-Squared بالاتر از ۰/۷ و نزدیک به ۱ به تایید رگرسیون حاصل از مدل باکس بنکن می‌پردازد.

## میزان جذب پوستی پروپولیس

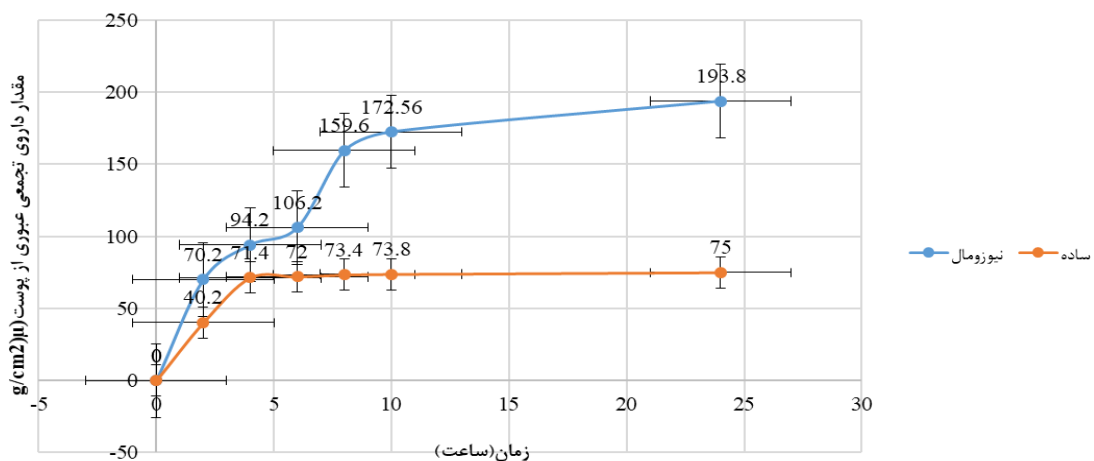
نمودار شماره ۳ مقدار داروی عبور کرده به صورت تجمعی بر حسب میکروگرم بر سانتی متر مربع از ژل نیوزومی و ژل ساده عصاره پروپولیس در طول ۲۴ ساعت را نشان می دهد. هم چنین نمودار شماره ۴ مقدار داروی تجمع یافته در پوست و مقدار داروی عبوری از پوست را بر حسب میکروگرم بر سانتی متر مربع پس از ۲۴ ساعت نشان می دهد. بر اساس نتایج به دست آمده، ژل نیوزومی در مقایسه با ژل ساده پروپولیس پس از ۲۴ ساعت عملکرد بهتری در جذب و عبور پوستی نشان داد. مقدار تجمع یافته پروپولیس در پوست برای ژل نیوزومی برابر با ۳۴۰/۵ میکروگرم بر سانتی متر مربع و برای ژل ساده ۷۳/۲ میکروگرم بر سانتی متر مربع بود. هم چنین، مقدار داروی عبور کرده از پوست برای ژل نیوزومی ۱۹۳/۸ میکروگرم بر سانتی متر مربع و برای ژل ساده ۷۵ میکروگرم بر سانتی متر مربع اندازه گیری شد. مقدار P برابر با ۰/۰۳۷۵ محاسبه شد که کم تر از ۰/۰۵ است و نشان دهنده اختلاف معنی دار بین عملکرد این دو نوع ژل است. نمودار تجمعی عبور دارو نشان داد که ژل نیوزومی طی ۱۰ ساعت ابتدایی به حداکثر عملکرد خود رسیده و پس از آن در حالت ثابتی قرار گرفته است.

## محاسبه درصد فلاونوئید موجود در عصاره پروپولیس بر اساس منحنی استاندارد

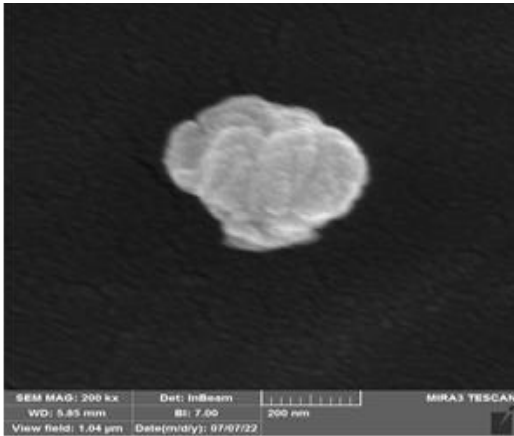
درصد فلاونوئید موجود در عصاره پروپولیس ۲/۲۷۵ درصد محاسبه شد که این درصد بر اساس اندازه گیری های جذب نوری در طول موج ۴۱۵ نانومتر و تطبیق با منحنی استاندارد کوئرستین به دست آمد (معادله شماره ۲). این نتیجه نشان دهنده حضور سطح قابل توجهی از ترکیبات فعال فلاونوئیدی در عصاره پروپولیس بوده و بر اساس استانداردهای موجود می تواند معیار خوبی برای ارزیابی کیفیت و کارایی عصاره باشد.

## بررسی پایداری

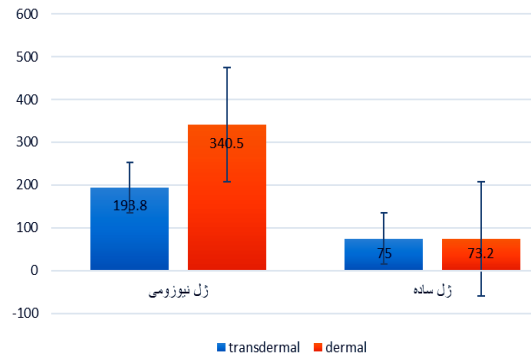
هر دو نمونه نیوزوم چه در یخچال و چه در دمای محیط، پس از ۶ ماه نگهداری بدون تغییر رنگ و تشکیل رسوب باقی ماندند و بررسی های میکروسکوپی ثبات اندازه و شکل ذرات را تأیید نمود. پتانسیل زتا در محدوده مطلوبی باقی ماند و از تجمع ذرات جلوگیری کرد که نشان دهنده پایداری کلوئیدی مناسب بوده است. هم چنین، میزان بارگذاری فلاونوئیدها طی دوره آزمایش ثابت ماند و تغییری در راندمان بارگیری مشاهده نشد. اندازه ذرات و شاخص پلی دیسپرسیته (PDI) نیز در محدوده مطلوبی قرار داشتند، که یکنواختی و ثبات ذرات را نشان می دهد.



نمودار شماره ۳، مقدار داروی عبور کرده به صورت تجمعی بر حسب میکروگرم بر سانتی متر مربع از ژل نیوزومی و ساده عصاره پروپولیس در طول ۲۴ ساعت



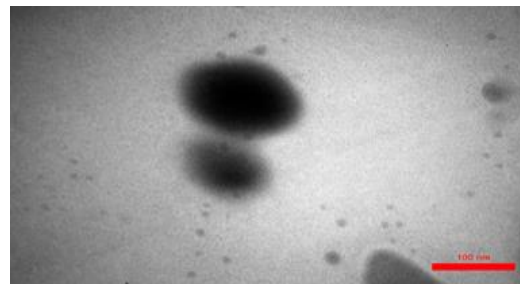
تصویر شماره ۲: تصویر میکروسکوپ الکترونی FE-SEM



نمودار شماره ۴: نمودار مقدار داروی تجمع یافته در پوست و مقدار عبوری از پوست بر حسب میکروگرم بر سانتی متر مربع پس از ۲۴ ساعت

### عکس میکروسکوپ الکترونی عبوری TEM

تصویر شماره ۱ نمای از نانوذرات پروپولیس را نشان می‌دهد که توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) تصویربرداری شده‌اند.



تصویر شماره ۱: عکس میکروسکوپ الکترونی TEM

### عکس میکروسکوپ الکترونی روبشی FE-SEM

تصویر شماره ۲ نمای از نانوذرات پروپولیس را توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FE-SEM) نشان می‌دهد. این تصویر ساختار سطحی و مورفولوژی نانوذرات (سطح یکنواخت و ساختار کروی) را با جزئیات بالا به نمایش می‌گذارد. بررسی‌های میکروسکوپی انجام شده نشان داد که نانوذرات نیوزومی عصاره پروپولیس دارای اشکال کروی بودند و حالت لایه لایه بودن وزیکول‌ها هم مشخص می‌باشد. هم‌چنین تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد که نانوذرات نیوزومی عصاره پروپولیس دارای اشکال کروی بوده‌اند.

## بحث

هدف از این مطالعه بررسی و افزایش جذب پوستی پروپولیس با استفاده از فرمولاسیون نیوزومی بوده است. نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از سیستم نیوزومی برای پروپولیس موجب بهبود جذب پوستی آن می‌شود. این سیستم از نظر اندازه وزیکول، جذب و پتانسیل زتا ویژگی‌های مطلوبی دارد. همچنین مقادیر سورفاکتانت و کلسترول به‌طور قابل توجهی بر اندازه و جذب وزیکول‌ها تأثیر می‌گذارند که این موضوع کارایی سیستم تحویل نیوزومی را در افزایش جذب و عملکرد پروپولیس تأیید می‌کند (۲۵).

در این مطالعه از روش آماری باکس-بنکن برای بهینه‌سازی فرمولاسیون استفاده شد و داده‌ها در سه سطح HLB، میزان سورفاکتانت و مقدار کلسترول مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که افزایش غلظت کلسترول از ۱۰۰ به ۳۰۰ میلی‌گرم، به دلیل نقش کلسترول در تثبیت ساختار غشایی منجر به بهبود ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نیوزوم‌ها شده و باعث افزایش پایداری آن‌ها می‌گردد. علاوه بر این، تحقیقات پیشین نشان داده‌اند که افزایش کلسترول و پیوند آن با اسپان ۶۰، موجب کاهش انعطاف‌پذیری غشا و استحکام ساختار وزیکول‌ها می‌شود؛ این امر به کاهش اندازه ذرات و یکنواختی بیش‌تر در ابعاد نهایی نیوزوم‌ها منجر می‌گردد.

که بهبود قابل توجهی در عملکرد دارورسانی و نفوذپذیری آن‌ها ایجاد می‌کند. هم‌چنین، کاهش اندازه ذرات در نیوزوم‌ها می‌تواند به جذب بهتر در بافت‌های هدف کمک کند و پتانسیل آن‌ها را برای استفاده در دارورسانی افزایش دهد (۲۶). با این حال، افزایش بیش‌تر در اندازه وزیکول با افزایش مقدار بیش‌تر کلاسترول ممکن است به دلیل ارتباط احتمالی گروه 3OH کلاسترول با ترکیبات پروپولیس و افزایش ضخامت دو لایه باشد (۲۷). اندازه‌های نیوزوم‌های تشکیل شده در محدوده نانو بهینه بودند و با نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) تطابق داشتند. شاخص پلی پراکندگی (PDI) نیز نشان داد که ذرات همگن بوده و ویسکوزیته آن‌ها برای کاربرد موضعی مناسب است (۲۸).

پتانسیل زتا، بار موجود در سطح وزیکول و دافعه بین وزیکول‌ها را نشان می‌دهد و از تجمع وزیکول‌ها جلوگیری می‌کند (۲۹). با اینکه پروپولیس عصاره‌ای تام بوده و بار سطحی هریک از ذرات آن متفاوت است (۳۰)، مقادیر پتانسیل زتا برای نیوزوم‌های تهیه شده نشان داد که ایجاد نیوزوم از عصاره پروپولیس باعث پایداری ذرات شده و از تجمع درون وزیکول‌ها جلوگیری می‌کند. تجزیه و تحلیل با میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) نیز شکل و اندازه کروی نیوزوم‌ها را تأیید کرد. هیچ تغییر قابل توجهی در اندازه متوسط وزیکول‌ها و علائم تجمع یا ته‌نشینی مشاهده نشد و پراکندگی نیوزومی پایدار باقی ماند.

در این پژوهش، میزان عصاره پروپولیس در فرمولاسیون‌ها ثابت نگه داشته شد. نتایج نشان داد که میزان بارگیری نیوزوم‌ها به طور مستقیم با غلظت اسپان ۶۰ رابطه دارد؛ به طوری که با افزایش خطی غلظت سورفکتانت، میزان به دام افتادن پروپولیس به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. این افزایش در بارگیری به دلیل افزایش ماتریکس موجود برای پروپولیس است که با افزایش غلظت اسپان ۶۰ در داخل دو لایه توزیع می‌شود (۲۷). کلاسترول نیز بر پایداری و نفوذپذیری

وزیکول تأثیر می‌گذارد که متعاقباً میزان بارگیری دارو را افزایش می‌دهد (۳۱). با این حال، اگر غلظت کلاسترول از حد معینی بیشتر شود درصد بارگیری داروی محصور شده کاهش می‌یابد. افزایش مقدار کلاسترول و رقابتی که بین کلاسترول و عصاره پروپولیس برای جایگاه در بین دو لایه ایجاد می‌شود باعث می‌شود که کلاسترول در میانه دو لایه قرار گیرد و مقدار عصاره پروپولیس در سطح وزیکول‌ها کاهش یابد که این امر منجر به کاهش درصد بارگیری داروی محصور شده می‌شود (۳۲). نتایج بارگذاری نانو ذرات حاوی عصاره پروپولیس نشان‌دهنده حضور مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فعال فلاوونوئیدی است که به کیفیت بالای عصاره و پتانسیل درمانی مؤثر آن اشاره دارد. این فلاوونوئیدها نقش مهمی در ارائه خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی ایفا می‌کنند که این دو ویژگی به بهبود روندهای بازسازی و محافظت سلولی کمک می‌کنند. مکانیسم اثر این ترکیبات عمدتاً از طریق مهار رادیکال‌های آزاد و کاهش واکنش‌های التهابی در سلول‌ها انجام می‌شود که منجر به کاهش استرس اکسیداتیو و حفاظت از بافت‌ها در برابر آسیب می‌شود. افزایش غلظت فلاوونوئیدها در نانو ذرات، با کاهش سرعت تجزیه این ترکیبات در محیط و بهبود نفوذ و جذب موضعی در لایه‌های پوستی همراه است. این فرآیند به ویژه از طریق بهینه‌سازی خواص فیزیکی-شیمیایی مانند اندازه کوچک ذرات و پتانسیل زتا که مانع از تجمع ذرات می‌شود بهبود می‌یابد. مطالعات پیشین نیز نشان داده‌اند که بارگذاری فلاوونوئیدها در حامل‌های نانویی می‌تواند کارایی آن‌ها را افزایش داده و متابولیسم سلولی را بهبود بخشد، که با نتایج این مطالعه هم‌خوانی دارد.

تعیین میزان نفوذ ترکیبات فلاوونوئیدی در پوست و مقدار باقیمانده آن در این عملیات حائز اهمیت است، زیرا این اطلاعات مشخص می‌کنند کدام فرمولاسیون‌ها برای استفاده در کاربردهای نفوذ و عبور از پوست مناسب‌تر هستند (۳۳). به منظور بررسی این موضوع، از

پوست موش صحرایی نر به عنوان مدل پوستی استفاده شد تا بارگیری ژل نیوزومی و ژل ساده عصاره پروپولیس مورد مقایسه قرار گیرد. مقادیر داروی تجمعی عبور شده از پوست و مقدار تجمع یافته در پوست به عنوان تابعی از زمان در نمودار ۳ نشان داده شده است. حداکثر مقدار تجمعی ترکیبات فلاونوئیدی اندازه گیری شده در محفظه گیرنده سلول انتشاری فرانز (مقدار عبور از پوست) برای فرمولاسیون ساده ژل عصاره پروپولیس (۸/۱۹۳ میکروگرم بر سانتی متر مربع) و برای فرمولاسیون نیوزومی (۷۵ میکروگرم بر سانتی متر مربع) بوده است. این نتایج نشان می دهند که فرمولاسیون نیوزومی ژل عصاره پروپولیس دارای جذب پوستی بالاتری نسبت به ژل ساده می باشد. در یک پژوهش دیگر که توسط Zaveri و همکاران انجام شد، نشان داده شد که جذب پوستی ماده مؤثره گیاهی کورکومین به صورت نیوزوم نسبت به فرآورده خالص گیاهی ۶۰ درصد افزایش می یابد و اثرات بالینی بهتری را به دنبال دارد (۳۴).

هم چنین، Gupta و Dixit گزارش کردند که با افزایش مقدار عصاره گیاهی کورکومین تغییری در جذب پوستی آن ایجاد نشده است، درحالی که با استفاده از سیستم نیوزومی و مقدار کمتری از کورکومین جذب پوستی افزایش و اثرات بالینی بهبود یافته است (۳۵). حداکثر مقدار تجمعی ترکیبات فلاونوئیدی باقیمانده در پوست پس از ۲۴ ساعت برای فرمولاسیون ساده پروپولیس (۵/۳۴۰ میکروگرم بر سانتی متر مربع) و برای فرمولاسیون نیوزومی (۲/۷۳ میکروگرم بر سانتی متر مربع) مشخص شد. فرمولاسیون نیوزومی نسبت به فرمولاسیون ساده دارای مقدار بیش تری از ترکیبات فلاونوئیدی تجمع یافته در پوست بوده است که این امر ناشی از نفوذپذیری بیش تر پروپولیس با فرمولاسیون نیوزومی است (۳۶). به طور کلی، این نتایج نشان می دهند که با استفاده از فرمولاسیون نیوزومی، جذب پوستی و به تبع آن اثرات بالینی پروپولیس را در فرآورده های

موضعی به صورت چشمگیری می توان بهبود بخشید و در حوزه درمان مشکلات پوستی به کار گرفت (۳۷،۱۰).

نتایج تحقیقات نشان می دهد بارگیری و جذب پوستی نانوذرات پروپولیس با توجه به مقادیر کلسترول، سورفاکتانت، و HLB تغییر می کند و به طور کلی نیوزوم سازی پروپولیس می تواند در جذب پوستی و متابولیسم داروها تغییر مطلوبی ایجاد کند (۳۸). هم چنین نتایج مطالعات پایداری تأیید می کند که فرمولاسیون نیوزومی پروپولیس از پایداری بالایی برخوردار است و می تواند به طور مؤثری در کاربردهای طولانی مدت داروسازی مورد استفاده قرار گیرد، بدون این که کیفیت یا کارایی آن کاهش یابد. این مطالعه با مطالعات مشابه در زمینه پایداری نانوذرات مطابقت دارد؛ به طور کلی این نتایج حاکی از آن است که استفاده از نانوذرات حاوی فلاونوئید می تواند اثربخشی درمانی را افزایش دهد، زیرا این نانوذرات با رهاسازی کنترل شده ی ترکیبات فعال در بافت هدف و کاهش سرعت دفع آن ها از محل جذب اثرات طولانی مدت تری ایجاد می کنند (۳۹). این مکانیسم ها با افزایش نفوذ پوستی و اثرات سیستمیک مطلوب می توانند در طراحی محصولات دارویی و درمان های موضعی نوین به کار گرفته شوند (۴۰).

آزمایشات انجام شده بر روی موجود زنده با رعایت کامل اصول اخلاقی صورت گرفت و کد اخلاق به شماره IR.MAZUMS.ACE.1401.022 از سوی کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران به تصویب رسیده است.

## سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه دکتری حرفه ای خانم مریم آقابابائی در دانشگاه علوم پزشکی مازندران است. بدین وسیله از تمامی افرادی که در پیشبرد این پژوهش ما را یاری نمودند، صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایم.

## References

1. Scully C. Propolis: a background. *Br Dent J* 2006; 200(7): 359-360.
2. Bonvehí JS, Coll FV, Jordà RE. The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. *J Am Oil Chem Soc* 1994; 71: 529-532.
3. Cao X-P, Chen Y-F, Zhang J-L, You M-M, Wang K, Hu F-L. Mechanisms underlying the wound healing potential of propolis based on its in vitro antioxidant activity. *Phytomedicine* 2017; 34: 76-84. PMID: 28899513.
4. Martinotti S, Ranzato E. Propolis: a new frontier for wound healing? *Burns Trauma* 2015; 3: 9. PMID: 27574655
5. Guimarães I, Baptista-Silva S, Pintado M, L. Oliveira A. Polyphenols: A Promising Avenue in Therapeutic Solutions for Wound Care. *Appl Sci* 2021; 11(3): 1230.
6. Farmoudeh A, Shokoohi A, Ebrahimnejad P. Preparation and evaluation of the antibacterial effect of chitosan nanoparticles containing ginger extract tailored by central composite design. *Adv Pharm Bull* 2020; 11(4): 643-650. PMID: 34888211.
7. Yang J, Pi A, Yan L, Li J, Nan S, Zhang J, et al. Research progress on therapeutic effect and mechanism of propolis on wound healing. *Evid Based Complement Alternat Med* 2022; 2022: 5798941. PMID: 35911156.
8. Rajera R, Nagpal K, Singh SK, Mishra DN. Niosomes: a controlled and novel drug delivery system. *Biol Pharm Bull* 2011; 34(7): 945-953. PMID: 21719996.
9. Permana AD, Utami RN, Courtenay AJ, Manggau MA, Donnelly RF, Rahman L. Phytosomal nanocarriers as platforms for improved delivery of natural antioxidant and photoprotective compounds in propolis: An approach for enhanced both dissolution behaviour in biorelevant media and skin retention profiles. *J Photochem Photobiol B* 2020; 205: 111846. PMID: 32151785.
10. Shirsand S, Para M, Nagendrakumar D, Kanani K, Keerthy D. Formulation and evaluation of Ketoconazole niosomal gel drug delivery system. *Int J Pharm Investig* 2012; 2(4): 201-207. PMID: 23580936.
11. Ahmadi F, Akbari J, Saeedi M, Seyedabadi M, Ebrahimnejad P, Ghasemi S, et al. Efficient synergistic combination effect of curcumin with piperine by polymeric magnetic nanoparticles for breast cancer treatment. *J Drug Deliv Technol* 2023; 86: 104624.
12. Batur E, Özdemir S, Durgun ME, Özsoy Y. Vesicular Drug Delivery Systems: Promising Approaches in Ocular Drug Delivery. *Pharmaceuticals* 2024; 17(4): 511. PMID: 38675470.
13. Hemmati J, Chiani M, Asghari B, Roshanaei G, Soleimani Asl S, Shafiei M, et al. Antibacterial and antibiofilm potentials of vancomycin-loaded niosomal drug delivery system against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections. *BMC Biotechnol* 2024; 24(1): 47. PMID: 38978013.
14. Asgarirad H, Ebrahimnejad P, Mahjoub MA, Jalalian M, Morad H, Ataei R, et al. A promising technology for wound healing; in-vitro and in-vivo evaluation of chitosan nanobiocomposite films containing gentamicin. *J Microencapsul* 2021; 38(2): 100-107.
15. Barbe C, Bartlett J, Kong L, Finnie K, Lin HQ, Larkin M, et al. Silica particles: a novel drug-delivery system. *Advanced materials*

- 2004; 16(21): 1959-1966.
16. Sadeghi-Ghadi Z, Behjou N, Ebrahimnejad P, Mahkam M, Goli HR, Lam M, et al. Improving antibacterial efficiency of curcumin in magnetic polymeric nanocomposites. *J Pharm Innov* 2023; 18(1): 13-28.
  17. El-Sheekh M, Alwaleed EA, Kassem WM, Saber H. Optimizing the fucoïdan extraction using Box-Behnken Design and its potential bioactivity. *Int J Biol Macromol* 2024; 277(3): 134490. PMID: 39111494.
  18. Mantashlo J, Deljoo A, Piri K. The study of flavonoids and antioxidant power of etanolic, metanolic, hydroalcoholic and etylacetatic extracts of branch and stem bark of *Salix Alba*. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)* 2017; 30(3): 295-303 (Persian).
  19. Pourmorad F, Hosseinimehr S, Shahabimajid N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *Afr J Biotechnol* 2006; 5(11): 1142-1145.
  20. Saadat E, Dinarvand R, Ebrahimnejad P. Encapsulation of nystatin in nanoliposomal formulation: characterization, stability study and antifungal activity against *Candida albicans*. *Pharm Biomed Res* 2016; 2(1): 44-54 (persian).
  21. Ebrahimnejad P, Dinarvand R, Sajadi A, Jafari MR, Movaghari F, Atyabi F. Development and validation of an ion-pair HPLC chromatography for simultaneous determination of lactone and carboxylate forms of SN-38 in nanoparticles. *Journal of Food and Drug Analysis* 2009; 17(4): 246-256.
  22. Amaral VA, Santana VL, Lisboa ES, Martins FS, Chaud MV, de Albuquerque-Júnior RL, et al. Chitosan membranes incorporating *Aloe vera* glycolic extract with joint synthesis of silver nanoparticles for the treatment of skin lesions. *Drug Deliv Transl Res* 2024: 1-17. PMID: 39080213.
  23. Mir M, Ebrahimnejad P. Preparation and characterization of bifunctional nanoparticles of vitamin E TPGS-emulsified PLGA-PEG-FOL containing deferasirox. *Nanoscience & Nanotechnology-Asia* 2014; 4(2): 80-87.
  24. Jafari M, Heidari D, Ebrahimnejad P. Synthesizing and characterizing functionalized short multiwall carbon nanotubes with folate, magnetite and polyethylene glycol as multi-targeted nanocarrier of anti-cancer drugs. *Iran J Pharm Res* 2016; 15(2): 449-456. PMID: 27642315.
  25. Patel J, Ketkar S, Patil S, Fearnley J, Mahadik KR, Paradkar AR. Potentiating antimicrobial efficacy of propolis through niosomal-based system for administration. *Integr Med Res* 2015; 4(2): 94-101. PMID: 28664114.
  26. Patela J, Ketkara S, Patila S, Fearnleyb J, Mahadika KR, Paradkarc AR. Potentiating antimicrobial efficacy of propolis through niosomal-based system for administration. *Integr Med Res* 2015; 4(2): 94-101. PMID: 28664114.
  27. Nasserì B. Effect of cholesterol and temperature on the elastic properties of niosomal membranes. *Int J Pharm* 2005; 300(1-2): 95-101. PMID: 16006080.
  28. Arafa MG, Ghalwash D, El-Kersh DM, Elmazar MM. Propolis-based niosomes as oromuco-adhesive films: A randomized clinical trial of a therapeutic drug delivery platform for the treatment of oral recurrent aphthous ulcers. *Sci Rep* 2018; 8(1): 18056. PMID: 30575794.
  29. Faisal S, Jan H, Shah SA, Shah S, Khan A, Akbar MT, et al. green synthesis of zinc

- oxide (ZnO) nanoparticles using aqueous fruit extracts of *Myristica fragrans*: their characterizations and biological and environmental applications. *ACS Omega* 2021; 6(14): 9709-9722. PMID: 33869951
30. Sforcin JM, Bankova V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol* 2011; 133(2): 253-260. PMID: 20970490.
31. Rushmi ZT, Akter N, Mow RJ, Afroz M, Kazi M, de Matas M, et al. The impact of formulation attributes and process parameters on black seed oil loaded liposomes and their performance in animal models of analgesia. *Saudi Pharm J* 2017; 25(3): 404-412. PMID: 28344496.
32. Moghtaderi M, Mirzaie A, Zabet N, Moammeri A, Mansoori-Kermani A, Akbarzadeh I, et al. Enhanced Antibacterial Activity of *Echinacea angustifolia* Extract against Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* through Niosome Encapsulation. *Nanomaterials* 2021; 11(6): 1573. PMID: 34203811.
33. Brown MB, Martin GP, Jones SA, Akomeah FK. Dermal and transdermal drug delivery systems: current and future prospects. *Drug Deliv* 2006; 13(3): 175-187. PMID: 16556569.
34. Zaveri M, Gajjar H, Kanaki N, Patel S. Preparation and evaluation of drug phospholipid complex for increasing transdermal penetration of phytoconstituents. *International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences* 2011; 1(3): 80-93.
35. Gupta NK, Dixit V. Development and evaluation of vesicular system for curcumin delivery. *Arch Dermatol Res* 2011; 303(2): 89-101. PMID: 21085975.
36. Kustiawan PM, Syaifie PH, Al Khairy Siregar KA, Ibadillah D, Mardiyati E. New insights of propolis nanoformulation and its therapeutic potential in human diseases. *ADMET DMPK* 2024 12(1): 1-26. PMID: 38560717.
37. Manosroi A, Wongtrakul P, Manosroi J, Sakai H, Sugawara F, Yuasa M, et al. Characterization of vesicles prepared with various non-ionic surfactants mixed with cholesterol. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2003; 30(1-2): 129-138.
38. Silva GC, Rodrigues RA, Bottoli CB. In vitro diffusion of plant phenolics through the skin: A review update. *Int J Cosmet Sci* 2024; 46(2): 239-261.
39. Mohammadi E, Amini SM. Green synthesis of stable and biocompatible silver nanoparticles with natural flavonoid apigenin. *Nano-Struct Nano- Objects* 2024; 38: 101175.
40. Lee WH, Kim W. Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles for the topical treatment of inflammatory skin diseases: Beyond drug carriers. *J Control Release* 2024; 366: 114-127. PMID: 38145664.