



# Design of a Polymer-Grafted Graphene Oxide Based Drug Delivery System for Curcumin: Optimization using RSM and Cytotoxicity Study

Elham Daneshmoghlanlou <sup>1</sup>, Mahsasdat Miralinaghi <sup>2\*</sup>, Elham Moniri <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Ph. D., School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Islamic Azad University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor, Department of Chemistry, Faculty of Science, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Professor, Department of Chemistry, Faculty of Science, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Tehran, Iran

\*Corresponding Author's Email: [m\\_miralinaghi@iauvaramin.ac.ir](mailto:m_miralinaghi@iauvaramin.ac.ir) (M. Miralinaghi)

## Paper History:

Received: 2023-02-19

Revised in revised form: 2023-04-14

Scientific Accepted: 2023-09-05

## Keywords:

Polymer Composite,  
Central Composite Design,  
Cell Viability,  
Targeted Drug Delivery

**Abstract** In the present research, a polymer, derived from the natural cellulose, grafted graphene oxide (CCG) bio-nanocomposite was prepared, and its efficiency as a targeted carrier was measured for loading curcumin, i.e., an anti-cancer drug. The structural and surface properties of CCG were examined using FESEM, BET, and FTIR techniques. In this research, Response Surface Method (RSM) along with the central composite design was employed to optimize the parameters such as the pH, contact time, and initial drug concentration, all affecting the drug adsorption on the composite. The central composite design results indicated that a second-order equation can properly fit the experimental data with a coefficient of determination of 0.9845 and  $p < 0.0001$ . The maximum adsorption (70 %) was achieved at pH = 6, contact time of 60 min, and initial concentration of 20 mg L<sup>-1</sup>. The drug release from the CUR@CCG nanocarrier at pH = 5.6 was significantly higher than that at pH = 7.4, demonstrating the effectiveness of the system in the cancer cell environment. The MTT assay was conducted to assess the cytotoxicity of CUR, CCG, and CUR@CCG on two cell lines including the normal (MCF 10A) and breast cancer (MDA-MB 231). The cytotoxicity of CUR@CCG at the concentration of 96 µg mL<sup>-1</sup> for 24 h on MDA-MB 231 was almost 45 %, slightly lower than the free CUR (50 %). According to these results, the CCG bio-nanocomposite can be utilized as a biocompatible nanocarrier for targeted delivery of the CUR anti-cancer agent.



<https://doi.org/10.30501/jamt.2023.384889.1268>

URL: [https://www.jamt.ir/article\\_180303.html](https://www.jamt.ir/article_180303.html)

## 1. INTRODUCTION

Application of carbon-based materials such as graphite (three-dimensional), graphene (two-dimensional), nanotubes, nanowires, and fullerenes (zero-dimensional) has significantly increased over the past two decades in various fields such as tissue engineering, optics, biosensors, and carriers in the delivery of genes and drugs, to name a few. Due to their versatility and diversity, graphene and its derivatives are a decent candidate for biomedical applications among carbon-based materials [1].

Nevertheless, graphene-based nanomaterials have several drawbacks such as poor water dispersibility, limited biocompatibility, insufficient biodistribution in living tissues, and quick excretion from the body. In this regard, carbohydrate polymers play a significant role in pharmaceutical applications owing to their high stability, biodegradability, biocompatibility, drug-loading capacity, and safety as well as their negligible toxicity and controllable features. In order to improve their water solubility and bioavailability while reducing their toxicity and immune system activities, graphene-based materials have been conjugated with a variety of polysaccharides like hyaluronic acid, cellulose, chitosan, starch, and alginate. Graphene-based bio-

nanocomposites enjoy higher drug/gene loading capability than pure graphene. Stimuli-responsive polymers also provide a proper drug-delivery platform with high bioactivity that ensures sustained drug delivery at a controlled rate. In the last decades, stimuli-responsive or smart polymers have gained considerable deal of attention [2, 3].

This research aims to measure the efficiency of a magnetic bio-nanocomposite (CCG) including GO, cobalt ferrite, and carboxymethyl cellulose (CMC) as an advanced drug delivery system. To this end, CUR was loaded on the composite as a therapeutic agent in the treatment of breast cancer. The effective variables of drug loading namely the pH, contact time, and initial drug concentration were optimized based on the statistical Response Surface Method (RSM) and Central Composite Design (CCD) using the design of experiment software. The RSM was employed to select the effective parameters for the drug loading process and simultaneously evaluate their interaction effects with a minimum number of experiments. The sensitivity of the carrier to pH was assessed by measuring the drug release profile of the carrier at two different pH levels (7.4 and 5.6, corresponding to physiological and tumor media, respectively). Finally, the cytotoxicity levels of the CCG composite, free CUR, and CUR@CCG systems on both

Please cite this article as: Daneshmoghlanlou, E., Miralinaghi, M., Moniri, E., "Design of a polymer-grafted graphene oxide based drug delivery system for curcumin: Optimization using RSM and cytotoxicity study", *Journal of Advanced Materials and Technologies (JAMT)*, Vol. 12, No. 2, (2023), 13-28. (<https://doi.org/10.30501/jamt.2023.384889.1268>).



normal (MCF 10A) and breast cancer (MDA-MB 231) cells were compared in-vitro.

## 2. MATERIALS AND METHODS

All the applied chemicals, except for CUR, were purchased from Sigma Aldrich while CUR ( $C_{21}H_{20}O_6$ ), with the molecular weight of  $368.38 \text{ g mol}^{-1}$ , was supplied by Exir Nano Sina Co. A magnetic CCG composite was prepared by cross-linking magnetic graphene oxide to a bio-polymer.

Loading of CUR on the CCG composite was evaluated by the surface adsorption method in a discontinuous manner at ambient temperature with the adsorbent dose of 10 mg. The experiments were designed to optimize the loading process using RSM-CCD as implemented in Design Expert software (12.0 version). Three independent variables include the pH range of 4-8 (A), contact time range of 10-60 min (B), and initial drug concentration range of 5-35  $\text{mg L}^{-1}$  (C). Three levels of +1, 0, and -1 were defined for each of the mentioned variables. The adsorption percentage was then considered the response. Based on the CCD method, 20 tests were designed and conducted under the proposed conditions. Drug release was evaluated in phosphate-buffered saline (PBS, pH of 7.4 or 5.6) at the concentration of  $0.9 \text{ g L}^{-1}$  at  $37^\circ\text{C}$ . The MTT assay was also carried out to evaluate the cytotoxicity of various concentrations ( $6\text{--}96 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) of CUR, CCG, and CUR@CCG at  $37^\circ\text{C}$  on breast adenocarcinoma (MDA-MB 231) and normal breast cells (MCF 10A).

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

Based on the FE-SEM images, formation of a CMC polymeric layer on the MGO enhanced the layer thickness and surface roughness. Based on the BET results, the values of specific surface area, total pore volume, and mean pore diameter of MGO at 77 K were equal to  $77.241 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ ,  $0.184 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$ , and  $9.510 \text{ nm}$ , respectively. After the formation of CM layers around the MGO nanosheets, the total pore volume and specific surface area decreased by  $18.585 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$  and  $0.118$

$\text{cm}^3\text{g}^{-1}$ , respectively. The mean diameter of the CCG pores, however, increased up to  $25.44 \text{ nm}$ . The drug loading also showed an increment with an increase in the pore diameter.

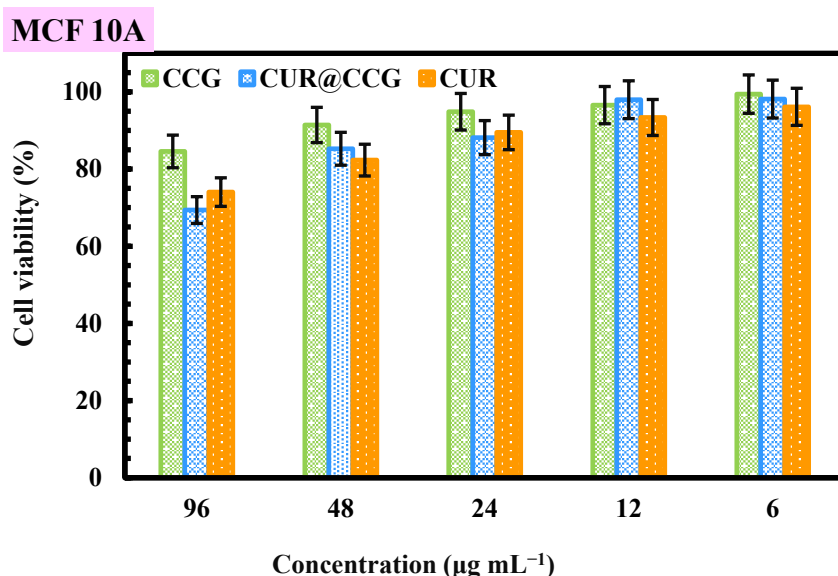
The Design Expert-CCD data for loading CUR from CCG were fitted with a second-order polynomial. Eq. 1 shows the optimal model for predicting the adsorption percentage based on the text variables.

$$\text{Adsorption efficiency (\%)} = +73.35 + 0.9 A + 7.20 B + 2C + 1.5 AB + 0.5 AC - 4 BC - 12.12 A^2 - 3.62 B^2 - 7.62 C^2 \quad (1)$$

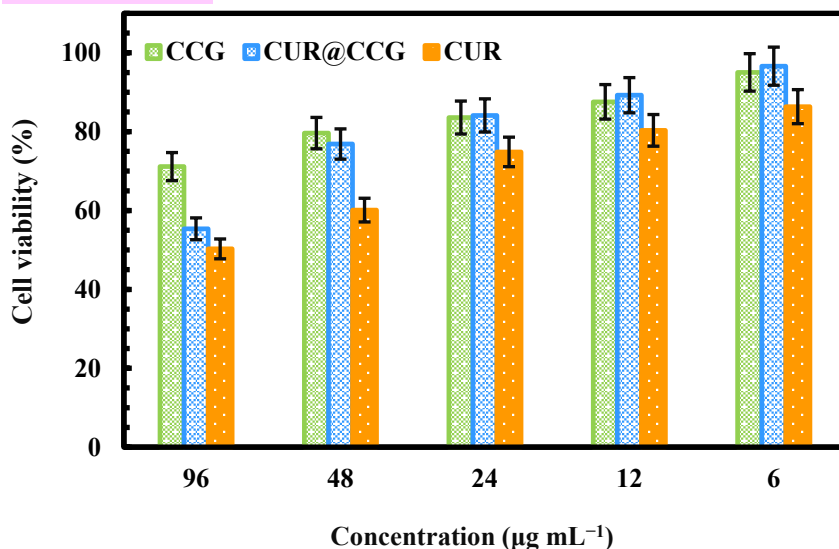
Moreover, plotting the model-predicted adsorption efficiency versus the experimentally obtained values showed a straight line with a high correlation (0.981), confirming the satisfactory results of the model. At  $\text{pH} = 6$ , contact time of 60 minutes, and initial concentration of  $20 \text{ mg L}^{-1}$ , the maximum CUR adsorption percentage was obtained.

Drug release showed a significant enhancement at  $\text{pH} = 5.6$ , compared to that at  $\text{pH} = 7.4$ ; therefore, about 79 % of the drug was released from CUR@CCG. Such an enhancement in the release of CUR drug in the simulated medium of cancer cells suggests the successful design of the pH-responsive nanocarrier due to the presence of CMC.

The viability of normal MCF 10A cells was above 84 % even at high bio-nanocomposite contents ( $96 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Figure 1). Negligible cytotoxicity of CCG on the normal cells can be assigned to the biocompatible CMC coating. However, CCG, especially at the concentration of  $96 \mu\text{g mL}^{-1}$ , showed relatively high cytotoxicity on the MDA-MB 231 cancer cell line such that the viability of these cells decreased by 71 % upon exposure to CCG. Moreover, CUR@CCG exhibited cytotoxicity on MDA-MB 231 at all concentrations despite its lower cytotoxicity than that of free CUR. For instance, the cytotoxicity percentages of CUR@CCG and free CUR ( $96 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) were 45 and 50 %, respectively. The lower cytotoxicity of CUR@CCG can be attributed to the slower release of CUR from the bio-nanocomposite during the MTT assay time (24 h).



## MDA-MB 231



**Figure 1.** The viability (%) of (a) MCF 10A and (b) MDA-MB 231 cells incubated with CCG, CUR@CCG, and CUR under concentration of 6–96 µg mL<sup>-1</sup> for 24 h at 37 °C

#### 4. CONCLUSION

A CCG bio-nanocomposite was successfully synthesized for the delivery of the CUR drug. CCD was a suitable method for the optimization of the conditions of drug loading on CCG to achieve the highest CUR adsorption efficiency. Under optimal conditions, the adsorption percentage reached 70 %. Furthermore, CUR release from the CUR@CCG nanocarrier was significantly higher in the vicinity of the cancer cells when compared to the normal cells (7.4). Cytotoxicity assessments indicated the negligible toxicity of CCG on normal MCF 10A cells, suggesting the high biocompatibility of CCG. The cytotoxicity of CUR@CCG on the breast adenocarcinoma (MAD-MB 231) cells was remarkable. Therefore, CUR@CCG can be considered a drug nanocarrier with acceptable anti-cancer activities for the targeted delivery of CUR.

#### 5. ACKNOWLEDGEMENT

We would like to thank Dr. Niloufar Torabi-fard for his assistance in completing the modeling portion of this research.

#### REFERENCES

1. Makvandi, P., Ghomi, M., Ashrafizadeh, M., Tafazoli, A., Agarwal, T., Delfi, M., Akhtari, J., Zare, E. N., Padil, V. V. T., Zarrabi, A., Pourreza, N., Milyk, W., Maiti, T. K., "A review on advances in graphene-derivative/polysaccharide bionanocomposites: Therapeutics, pharmacogenomics and toxicity", *Carbohydrate Polymers*, Vol. 250, (2020), 116952. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2020.116952>
2. Priya James, H., John, R., Alex, A., Anoop, K. R., "Smart polymers for the controlled delivery of drugs – A concise overview", *Acta Pharmaceutica Sinica B*, Vol. 4, No. 2, (2014), 120-127. <https://doi.org/10.1016/J.APSB.2014.02.005>
3. Ashuri, A., Miralinaghi, M., Moniri, E., "Evaluation of folic acid-conjugated chitosan grafted Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/graphene oxide as a pH- and magnetic field-responsive system for adsorption and controlled release of gemcitabine", *Korean Journal of Chemical Engineering*, Vol. 39, No. 7, (2022), 1880-1890. <https://doi.org/10.1007/S11814-022-1104-5>



مقاله کامل پژوهشی

## طراحی یک سامانه دارورسان مبتنی بر گرافن اکسید پیوندخورده با پلیمر برای کورکومین: بهینه‌سازی با RSM و مطالعه سمیت سلولی

الهام دانش مغانلو<sup>۱</sup>، مهساسادات میرعلینقی<sup>۲\*</sup>، الهام منیری<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup>دکتری داروسازی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی، تهران، ایران  
<sup>۲</sup>دانشیار، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، تهران، ایران  
<sup>۳</sup>استاد، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، تهران، ایران

### تاریخچه مقاله:

ثبت اولیه: ۱۴۰۱/۱۱/۳۰

دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۴۰۲/۰۲/۲۵

پذیرش علمی: ۱۴۰۲/۰۳/۱۰

### کلیدواژه‌ها:

کامپوزیت پلیمری،  
طرح مرکب مرکزی،  
بقای سلولی،  
دارورسانی هدفمند

**چکیده** در این پژوهش، بیونانوکامپوزیت گرافن اکسید پیوندخورده با یک پلیمر مشتق از سلولز طبیعی (CCG) تهیه شد و کارایی آن به‌عنوان حاملی هدفمند برای بارگذاری داروی ضدسرطان کورکومین مطالعه شد. همچنین، ویژگی‌های سطحی و ساختاری CCG با آنالیزهای BET، FESEM و FTIR بررسی شد. روش سطح پاسخ (RSM) و طرح کامپوزیت مرکزی برای بهینه‌سازی عوامل مؤثر شامل pH، زمان تماس و غلظت اولیه دارو بر درصد جذب دارو روی کامپوزیت استفاده شد. نتایج حاصل از طراحی کامپوزیت مرکزی نشان داد که مدلی درجه دوم با ضریب تعیین  $0.9845$  و  $p < 0.0001$  برای برازش داده‌های تجربی مناسب است و بیشینه جذب (۷۰ درصد) در شرایط  $\text{pH} = 6$ ، زمان تماس ۶۰ دقیقه و غلظت اولیه ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر پیش‌بینی شد. درصد رهایش دارو از نانوحامل CUR@CCG در  $\text{pH} = 5/6$  به میزان چشمگیری بیش از  $\text{pH} = 7/4$  بود که اثربخشی سامانه در محیط سلول سرطانی را نشان می‌دهد. اثر سمیت سلولی CUR، CCG و CUR@CCG روی دو رده سلولی سالم (MCF 10A) و سرطانی (MDA-MB 231) پستان به روش MTT بررسی شد. اثر سمیت سلولی CUR@CCG در غلظت ۹۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در زمان ۲۴ ساعت بر سلول‌های MDA-MB 231 در حدود ۴۵ درصد و کمی کمتر از CUR آزاد (۵۰ درصد) بود. براساس نتایج، بیونانوکامپوزیت CCG می‌تواند به‌عنوان نانوحاملی زیست‌سازگار و هدفمند در داروی ضدسرطان CUR استفاده شود.



<https://doi.org/10.30501/jamt.2023.384889.1268> URL: [https://www.jamt.ir/article\\_180303.html](https://www.jamt.ir/article_180303.html)

### ۱- مقدمه

زیست‌پزشکی هستند [۱].  
باین‌حال، نانومواد برپایه گرافن ویژگی‌های نامطلوبی نظیر پراکندگی ضعیف در آب، زیست‌سازگاری پایین، توزیع زیستی ناکافی در بافت زنده و حذف سریع از بدن دارند که این نقاط ضعف، در صورت اصلاح با پلیمرهای کربوهیدراتی، قابل‌رفع هستند. پلیمرهای کربوهیدراتی به‌دلیل پایداری، زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری، ایمنی و سمیت ناچیز، ظرفیت زیاد بارگیری دارو و خواص کنترل‌پذیر خود در

کاربرد مواد برپایه کربن از قبیل گرافیت (سه‌بعدی)، گرافن (دو‌بعدی)، نانوسیم‌ها (یک‌بعدی)، نانولوله‌ها (یک‌بعدی) و فولرن‌ها (صفر‌بعدی)، در دو دهه گذشته، در حوزه‌های گوناگون مانند اپتیک، مهندسی بافت، حسگرهای زیستی، حامل‌های تحویل دارو و ژن به‌شکل قابل‌ملاحظه‌ای رو به افزایش است. از بین مواد برپایه کربن، گرافن و مشتقات آن، به‌دلیل تنوع و کاربردپذیری، گزینه مناسبی برای کاربردهای

\*عهده دار مکاتبات: مهساسادات میرعلینقی

نشانی: ایران، تهران، ورامین، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین - پیشوا، دانشکده علوم پایه، گروه شیمی، تلفن: ۰۲۱-۳۶۷۲۵۰۱۱، دورنگار: -

پیام‌نگار: [m\\_miralinaghi@iauvaramin.ac.ir](mailto:m_miralinaghi@iauvaramin.ac.ir)

قرارگیری  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  روی نانوصفحات گرافن اکسید می‌تواند سیستم دارویی هوشمندی را طراحی کرد که از طریق راندن مؤثر حامل دارو به داخل بافت تومور، تحت میدان مغناطیسی هدایتگر، تأثیر درمانی دارو روی بافت هدف را به حداکثر برساند [۶].

کورکومین (CUR) ماده فعال زیستی زردچوبه است که از ریزوم گیاه زردچوبه با نام علمی *curcuma longa* به دست می‌آید. پتانسیل ضدسرطانی CUR در برابر انواع گوناگونی از سرطان‌ها از جمله سرطان‌های دستگاه گوارش، خون، پستان، تخمدان، پروستات، ریه، کولون، سارکوما و تومورهای مغزی نشان داده شده است. سازوکارهایی که CUR از طریق آن‌ها موجب مهار تشکیل یا گسترش تومور می‌شود ترکیبی از خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضدگژیایی، مهار سلولی و پروآپتوتیک هستند [۷]. CUR را می‌توان روی نانوکامپوزیت‌های پلیمری پاسخ‌گو به pH بارگذاری کرد.

هدف از این مطالعه ارزیابی کارایی نوعی بیونانوکامپوزیت مغناطیسی (CCG) شامل GO، کبالت فریت و CMC به‌عنوان سامانه پیشرفته دارورسانی است. بدین منظور، CUR به‌عنوان عامل درمانی سرطان پستان روی کامپوزیت بارگذاری شد. متغیرهای مؤثر در میزان بارگذاری دارو شامل pH، زمان تماس و غلظت اولیه دارو براساس روش آماری سطح پاسخ (RSM)<sup>۱</sup> هستند - طرح مرکب مرکزی (CCD)<sup>۲</sup> با استفاده از نرم‌افزار طراحی آزمایش بهینه‌سازی شد. هدف از روش سطح پاسخ انتخاب پارامترهای مؤثر در فرایند بارگذاری و ارزیابی اثر متقابل آن‌ها هم‌زمان با حداقل تعداد آزمایش است. همچنین، به‌منظور بررسی حساسیت حامل به محرک pH، پروفایل رهایش دارو از حامل در دو pH متفاوت، pH برابر ۷/۴ (محیط فیزیولوژی بدن) و pH برابر ۵/۶ (محیط تومور) اندازه‌گیری شد. درنهایت، سمیت سلولی کامپوزیت (CCG)، دارو (CUR) به‌تنهایی و سامانه حامل دارو (CUR@CCG) در شرایط برون - تنی روی رده‌های سلولی سالم (MCF-10A) و سرطانی (MDA-MB 231) پستان مقایسه شدند.

## ۲- مواد و روش تحقیق

کاربردهای دارویی بسیار مهم هستند. اصلاح مواد برپایه گرافن با پلی‌ساکاریدها (مانند هیالورونیک اسید، سلولز، کیتوسان، نشاسته و آلژینات) می‌تواند به بهبود انحلال‌پذیری در آب و فراهمی زیستی آن‌ها منجر شود. همچنین، نانوکامپوزیت‌های زیستی برپایه گرافن، در مقایسه با گرافن خالص، ظرفیت بیشتری برای بارگذاری بالاتر دارو/ژن دارند.

امروزه، سامانه‌های هوشمند رهایش دارو جایگزین شیمی‌درمانی به روش سنتی در نظر گرفته می‌شوند. در این سامانه‌های هوشمند از پلیمرهای حساس به محرک استفاده می‌شود که به یک یا چند محرک محیطی از خود واکنش نشان می‌دهند. پلیمرهای حساس به محرک براساس عامل تحریک‌کننده، که موجب واکنش می‌شود، طبقه‌بندی می‌شوند. برای مثال، تغییرات نور، دما و pH بسته به نوع پلیمر و گروه‌های عاملی آن می‌تواند موجب بروز تغییر یا واکنش در زنجیره پلیمری شوند [۲ و ۳].

کیتوسان، آلژینات، پلی‌آکرلیک اسید و کربوکسی‌متیل سلولز نمونه‌هایی از پلیمرهای پاسخ‌گو به محرک pH هستند که بسته به pH محیط (اسیدی یا بازی) ممکن است متورم یا متلاشی شوند و به تغییرات pH پاسخ دهند. کربوکسی‌متیل سلولز (CMC) پلی‌ساکارید آنیونی محلول در آبی است که از سلولز طبیعی مشتق می‌شود و با جایگزینی گروه‌های هیدروکسیل سلولز با گروه‌های  $\text{CH}_2\text{COOH}$  - به دست می‌آید. این ماده، به دلیل آب‌دوستی، زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری و سمیت اندک، کاربرد وسیعی در تهیه حامل‌های دارویی پاسخ‌گو به pH دارد [۴]. با وجود این، کاربرد CMC در سامانه‌های دارورسانی کنترل‌شده محدود است؛ زیرا، با توجه به استحکام پایین مکانیکی آن، احتمال رهایش دارو به صورت ناگهانی وجود دارد. ادغام CMC با مواد معدنی مانند GO و اکسیدهای فلزی، علاوه بر استحکام مکانیکی، پایداری آن را نیز بهبود می‌بخشد [۵].

نانوذرات کبالت فریت کاربردهای زیست‌پزشکی متنوعی در دارورسانی، تصویربرداری رزونانسی مغناطیسی (MRI) و تشخیص بیماری‌ها دارند؛ زیرا این نانوذرات خاصیت انیزوتروپی مغناطیسی بالا و مغناطیس‌پذیری متوسطی دارند. با

<sup>2</sup> Central Composite Design

<sup>1</sup> Response Surface Methodology

## ۱-۲- مواد شیمیایی

۲۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل و به سوسپانسیون قبلی افزوده شد. مخلوط حاصل به مدت ۶۰ دقیقه روی همزن مغناطیسی همزده شد. سپس، ۰/۱ گرم ADH، به‌عنوان عامل اتصال‌دهنده عرضی، به آن افزوده و ۲۴ ساعت در دمای اتاق همزده شد تا با واکنش میان گروه‌های کربوکسیلیک اسید GO و آمین ADH پیوند آمیدی تشکیل شود. گرافن اکسید مغناطیسی اصلاح شده با ADH با آب مقطر و اتانول شسته و خشک شد [۱۰].

در مرحله آخر، ۰/۲ گرم گرافن اکسید مغناطیسی اصلاح‌شده با ADH در ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر پراکنده و به مدت ۶۰ دقیقه در دستگاه فراصوت تا تشکیل سوسپانسیون کلوییدی همزده شد. سپس، ۰/۶ گرم CMC، ۰/۱۵ گرم EDC.HCl و ۰/۴۵ گرم از NHS در ۶۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه پراکنده و به سوسپانسیون قبلی اضافه شد و همزدن یک شبانه‌روز ادامه یافت تا گروه‌های آمین انتهایی ADH با گروه‌های کربوکسیلیک اسید CMC تشکیل پیوند آمیدی دهند. درنهایت، بیونانوکامپوزیت مغناطیسی حاصل (CCG) جداسازی، با آب مقطر شسته و در آون تحت خلأ خشک شد [۵].

## ۲-۳- دستگاه‌های مورد استفاده

ویژگی‌های شکل و سطح کامپوزیت CCG با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری نشر میدان (FE-SEM، مدل MIRA 3، شرکت TESCAN، چک) روی نمونه‌های پوشیده از طلا بررسی شد. به‌منظور بررسی مساحت سطح، میانگین قطر و حجم حفرات کامپوزیت مغناطیسی از سنجشگر تداخل‌خل و سطح ویژه (BET، Microtrac Bel، مدل BELSORP-mini II، آلمان) استفاده شد. ساختار شیمیایی و نوع گروه‌های عاملی با استفاده از طیف‌سنج تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR، شرکت Avatar، مدل Thermo، امریکا) مشخص شد. جذب محلول‌های CUR با استفاده از دستگاه طیف‌سنج فرابنفش - مرئی (مدل UV، ۲۱۰۰، چین) در طول موج بیشینه CUR (۴۲۴ nm) اندازه‌گیری شد. pH محلول‌ها با استفاده از pH متر (مدل HANNA-HI083141، ایتالیا) اندازه‌گیری و تنظیم شد.

## ۲-۴- آزمایش‌های بارگذاری CUR روی کامپوزیت CCG

آزمایش‌های بارگذاری داروی CUR روی کامپوزیت CCG به‌روش جذب سطحی به‌صورت ناپیوسته در دمای محیط

کورکومین (CUR) با فرمول بسته  $C_{21}H_{20}O_6$  و وزن مولکولی  $338/38 \text{ g mol}^{-1}$  از شرکت اکسیرنانوسینا تهیه شد. سایر مواد مورد استفاده در این پژوهش شامل گرافیت، پلی‌وینیل پیرولیدون، کربوکسی‌متیل سلولز (CMC)، آهن (III) کلرید شش‌آبه، کبالت (II) کلرید شش‌آبه، آدیپیک اسید دی‌هیدرازید (ADH)، نمک ۱-اتیل-۳-۳-دی‌متیل‌آمینوپروپیل) کربوآیمید هیدروکلرید (EDCH.HCl) و N-هیدروکسیل سوکسین‌ایمید (NHS) از شرکت سیگما خریداری شدند. همچنین، در سنتز کامپوزیت، آزمایش‌های بارگذاری و رهایش از آب دوبار تقطیر استفاده شد. محلول‌های دارو با غلظت‌های متفاوت از محلول ذخیره اولیه آن در اتانول آبی (۹۶ درصد حجمی - حجمی) با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تهیه شدند.

## ۲-۲- سنتز بیونانوکامپوزیت مغناطیسی (CCG)

در مرحله نخست، GO از اکسایش گرافیت پودری به‌روش هامر سنتز شد [۸]. در مرحله دوم، ۰/۵ گرم گرافن اکسید به ۱۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای محیط تحت امواج فراصوت قرار گرفت تا کاملاً در آب پراکنده شود. سپس، با هدف ایجاد خاصیت مغناطیسی، به آن ۲/۸ گرم آهن (III) کلرید شش‌آبه و ۱/۲۵ گرم کبالت (II) کلرید شش‌آبه و ۰/۶۵ گرم پلی‌وینیل پیرولیدون اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه همزن فراصوت با دمای ۸۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از یکنواخت شدن، مخلوط به یک بالون ته‌گرد منتقل شد. سپس، مقدار معینی آمونیاک ۲۵ درصد در شرایط رفلاکس، با دمای ۸۰ درجه سلسیوس و همزدن مداوم و سریع، به محتویات بالون اضافه شد تا pH سوسپانسیون به ۱۰/۵ برسد. پس از آن، رفلاکس ۱۲۰ دقیقه دیگر در همان دما ادامه یافت. در تمام مدت رفلاکس، از گاز نیتروژن برای اکسیژن‌زدایی واکنش استفاده شد. گرافن اکسید مغناطیسی (MGO)، پس از جداسازی از محلول، با آب مقطر و اتانول شست‌وشو داده شد و درنهایت درون آون خشک شد [۹].

در مرحله سوم، ۰/۱ گرم از MGO در ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر پراکنده و به مدت ۱۲۰ دقیقه در دمای اتاق در حمام فراصوت قرار گرفت تا سوسپانسیون کلوییدی یکنواختی به دست آید. مقدار ۰/۰۵ گرم از EDC.HCl و ۰/۱۵ گرم NHS در

و با دوز جذب ۱۰ میلی‌گرم انجام شد. طراحی آزمایش‌ها برای بهینه‌سازی فرایند بارگذاری به روش آماری سطح پاسخ - طرح مرکب مرکزی با استفاده از نرم‌افزار طراحی آزمایش (نسخه ۱۲/۰) اجرا شد. سه متغیر مستقل شامل pH در محدوده ۴ تا ۸ (A)، زمان تماس در بازه ۶۰-۱۰ دقیقه (B) و غلظت اولیه در محدوده ۵-۳۵ میلی‌گرم بر لیتر (C) تعیین شدند (جدول ۱). برای هر متغیر، سه سطح +۱، ۰ و -۱ تعریف شد. درصد جذب پاسخ در طراحی آزمایش‌ها در نظر گرفته شد. براساس روش CCD، ۲۰ آزمایش طراحی و در شرایط پیشنهادی (جدول ۲) اجرا شد.

و با دوز جذب ۱۰ میلی‌گرم انجام شد. طراحی آزمایش‌ها برای بهینه‌سازی فرایند بارگذاری به روش آماری سطح پاسخ - طرح مرکب مرکزی با استفاده از نرم‌افزار طراحی آزمایش (نسخه ۱۲/۰) اجرا شد. سه متغیر مستقل شامل pH در محدوده ۴ تا ۸ (A)، زمان تماس در بازه ۶۰-۱۰ دقیقه (B) و غلظت اولیه در محدوده ۵-۳۵ میلی‌گرم بر لیتر (C) تعیین شدند (جدول ۱). برای هر متغیر، سه سطح +۱، ۰ و -۱ تعریف شد. درصد جذب پاسخ در طراحی آزمایش‌ها در نظر گرفته شد. براساس روش CCD، ۲۰ آزمایش طراحی و در شرایط پیشنهادی (جدول ۲) اجرا شد.

جدول ۱. متغیرهای مستقل و مقادیر انتخابی آن‌ها با روش CCD برای بارگذاری داروی CUR

سطوح			کد	متغیرهای مستقل
+۱	۰	-۱		
۸	۶	۴	A	pH
۶۰	۳۵	۱۰	B	زمان تماس (دقیقه)
۳۵	۲۰	۵	C	غلظت اولیه دارو (میلی‌گرم بر لیتر)

جدول ۲. ماتریس طراحی آزمایش‌های CCD و پاسخ‌های مربوطه برای بارگذاری داروی CUR

درصد جذب		شرایط آزمایش			شماره اجرا
پیش‌بینی شده	تجربی	غلظت اولیه دارو (میلی‌گرم بر لیتر)	زمان تماس (دقیقه)	pH	
۷۲/۸۷	۷۰/۴۳	۲۰	۳۵	۶	۱
۷۲/۸۷	۷۲/۱۲	۲۰	۳۵	۶	۲
۴۸	۴۷/۲۲	۳۵	۱۰	۸	۳
۶۰/۴۰	۶۰/۰۴	۵	۶۰	۸	۴
۵۰/۶۰	۴۹/۴۴	۳۵	۶۰	۴	۵
۳۷/۲۰	۳۵/۳۲	۵	۱۰	۴	۶
۵۰/۲۰	۴۹/۳۹	۳۵	۱۰	۴	۷
۷۲/۸۷	۷۴/۰۶	۲۰	۳۵	۶	۸
۵۸/۶۰	۵۸/۱۱	۵	۶۰	۴	۹
۵۹/۴۰	۶۰/۴۰	۳۵	۶۰	۸	۱۰
۷۲/۸۷	۷۴/۱۷	۲۰	۳۵	۶	۱۱
۲۸	۲۸/۲۱	۵	۱۰	۸	۱۲
۶۸/۱۰	۷۰/۲۹	۳۵	۳۵	۶	۱۳
۶۲/۱۰	۶۴/۴۴	۵	۳۵	۶	۱۴
۶۰/۷۰	۶۵/۱۱	۲۰	۳۵	۴	۱۵
۷۲/۸۷	۷۰/۱۷	۲۰	۳۵	۶	۱۶
۷۷/۳۰	۷۸/۳۶	۲۰	۶۰	۶	۱۷
۶۰/۵۰	۶۰/۵۱	۲۰	۳۵	۸	۱۸
۶۰/۹۰	۶۴/۱۶	۲۰	۱۰	۶	۱۹
۷۲/۸۷	۷۵/۲۲	۲۰	۳۵	۶	۲۰

## ۲-۶- آزمایش‌های سمیت سلولی

سنجش MTT برای ارزیابی سمیت مواد تهیه‌شده انجام شد. سلول‌های آدنوکارسینوم پستان (MDA-MB 231) و سلول‌های طبیعی پستان (MCF 10A) در پلیت‌های ۹۶ چاهکی کشت داده و با غلظت‌های متفاوت (۶-۹۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از ماده موردنظر (CUR، CCG، یا CUR@CCG) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در انکوباتور CO<sub>2</sub> انکوبه شدند. چاهک‌های سه‌گانه برای هر غلظت آنالیز شد و بافر شست‌وشو به‌عنوان کنترل استفاده شد. سپس، ۲۰۰ میکرولیتر MTT تازه تهیه‌شده با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در PBS به هر چاهک اضافه شد. پس از ۴ ساعت انکوباسیون، محیط کشت حاوی MTT با ۲۰۰ میکرولیتر DMSO جایگزین شد تا بلورهای نامحلول فورمازان حل شوند. جذب محلول در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از خوانشگر الیزا اندازه‌گیری و درصد سمیت سلولی محاسبه شد.

## ۳- نتایج و بحث

### ۳-۱- ویژگی‌های ساختاری کامپوزیت سنتزی

#### ۳-۱-۱- تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نشر میدان (FE-SEM)

ریخت‌شناسی سطح MGO و CCG با میکروسکوپ الکترونی عبوری نشر میدان (FE-SEM) بررسی شد. در شکل ۱ (الف)، نانوذرات کبالت فریت مشاهده می‌شوند که به‌شکل غیریکنواخت در سطح ورقه‌های چین‌خورده GO پراکنده شده‌اند. دانگ<sup>۱</sup> و همکارانش نانوکامپوزیت گرافن اکسید کاهش‌یافته/کبالت فریت را سنتز کردند. تصاویر FE-SEM ماده سنتزی نشان‌دهنده سطح زبر و ناهموار ورقه‌های GO کاهش‌یافته به دلیل قرارگیری نانوذرات مغناطیسی کبالت فریت بود [۱۲]. در شکل ۱ (ب)، تشکیل لایه پلیمری CMC روی سطح MGO موجب افزایش قطر لایه‌ها و ناهمواری سطح آن شده است.

### ۳-۱-۲- سنجش تخلخل و سطح ویژه (BET)

نمودارهای جذب و واجذب گاز نیتروژن نمونه‌های

درصد جذب تجربی CUR (Adsorption efficiency (%))

از محلول با معادله (۱) محاسبه شد.

$$\text{Adsorption efficiency (\%)} = \frac{(C_0 - C_t)}{C_0} \times 100 \quad (1)$$

در معادله فوق، C<sub>0</sub> غلظت اولیه CUR (میلی‌گرم بر لیتر)

و C<sub>t</sub> غلظت آن در لحظه t (میلی‌گرم بر لیتر) است.

## ۲-۵- آزمایش‌های رهایش دارو

برای تهیه حامل دارو، ۰/۲ گرم کامپوزیت CCG در ۵۰ میلی‌لیتر محلول CUR در اتانول آبی با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پراکنده شد. pH سوسپانسیون حاصل روی مقدار بهینه (۶/۰) تنظیم و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق با سرعت ۳۰۰ دور بر دقیقه همزده شد. سپس، سامانه حامل دارو (CUR@CCG) با آهن‌ربا جدا و شسته شد تا داروی بارگذاری‌نشده خارج شود. میزان CUR آزاد در مایع رویی با استفاده از طیف‌سنج فرابنفش - مرئی آنالیز شد.

برای مطالعه رهایش دارو در شرایط آزمایشگاهی، CCG

بارگذاری‌شده با CUR (CUR@CCG)، که از مرحله قبل به دست آمد، همراه ۵ میلی‌لیتر بافر به یک کیسه دیالیز با وزن مولکولی ۱۴ کیلو دالتون منتقل شد. کیسه کاملاً بسته و در بشری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین (PBS؛ pH برابر ۷/۴ یا ۵/۶) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس شناور شد. در بازه‌های زمانی از پیش تعیین شده، ۳ میلی‌لیتر از محلول داخل بشر به‌عنوان نمونه خارج و به همان میزان محلول بافر تازه جایگزین شد تا حجم محلول ثابت بماند. آزمایش رهایش سه بار تکرار شد. میزان CUR موجود در محلول نمونه با استفاده از طیف‌سنج فرابنفش - مرئی آنالیز و درصد داروی رهایشده در زمان t با استفاده از معادله (۲) تعیین شد [۱۱].

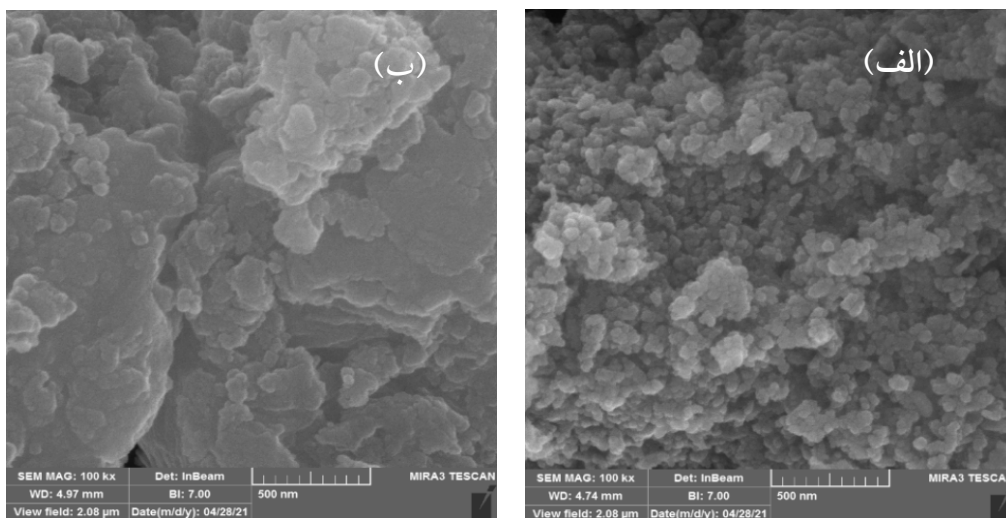
$$\frac{M_t}{M_\infty} (\%) = \frac{C_t}{C_0} \times 100 \quad (2)$$

که در آن M<sub>t</sub> و M<sub>∞</sub> به ترتیب نشان‌دهنده داروی رهایشده در زمان t و کل داروی بارگیری‌شده هستند. C<sub>t</sub> و C<sub>0</sub> به ترتیب مقدار داروی رهایشده و بارگیری‌شده در زمان t هستند.

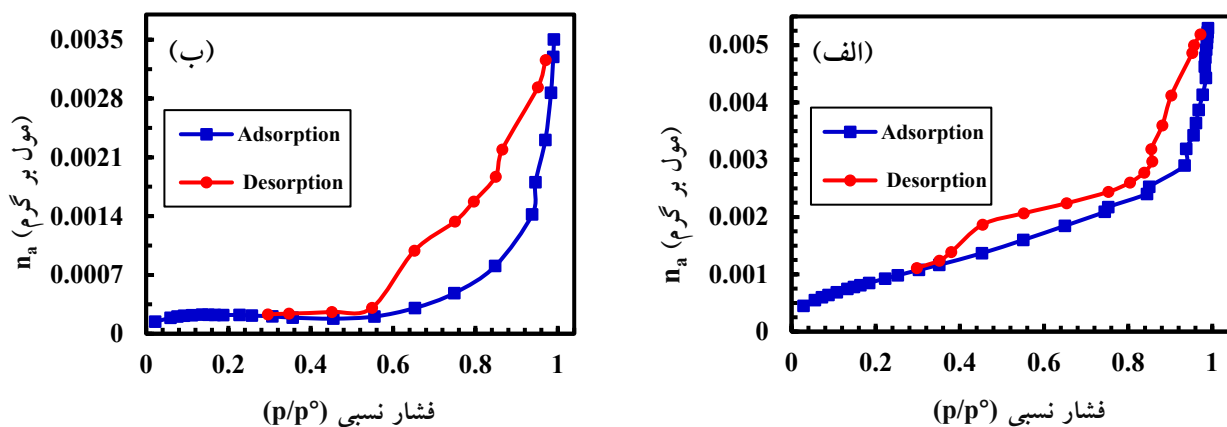


MGO، در دمای ۷۷ کلوین، دارای سطح ویژه ۷۷/۲۴۱ مترمربع بر گرم، حجم کلی حفرات ۰/۱۸۴ سانتی‌مترمکعب بر گرم و متوسط قطر حفرات ۹/۵۱۰ نانومتر است. پس از تشکیل لایه پلیمری CMC پیرامون نانورقه‌های مغناطیسی MGO، حجم کلی و مساحت سطح ویژه به ترتیب به ۱۸/۵۸۵ مترمربع بر گرم و ۰/۱۱۸ سانتی‌مترمکعب بر گرم کاهش می‌یابد، هرچند متوسط قطر حفرات CCG به ۲۵/۴۴ نانومتر افزایش می‌یابد. میزان بارگذاری دارو روی جاذب با افزایش قطر حفرات زیاد می‌شود.

MGO و CCG به ترتیب در شکل ۲ (الف) و (ب) نشان داده شده‌اند. براساس طبقه‌بندی آیوپاک، هم‌دمای جذب و واجذب این دو نمونه با الگوی نوع IV مطابقت دارد. به‌علاوه، در فشارهای نسبی میان ۰/۳ تا ۰/۹، افزایش فشار موجب افزایش جذب با شیب تند می‌شود که دلیل آن تراکم ماده متخلخل در ساختار میان‌حفره است. مساحت سطح ویژه و توزیع حجم حفرات MGO و CCG سنتزی در جدول ۳ آورده شده و با سایر نانوجاذب‌های مشابه مقایسه شده است. نتایج نشان می‌دهند که



شکل ۱. تصاویر FE-SEM (الف) MGO و (ب) CCG



شکل ۲. نمودار هم‌دمای جذب - واجذب نیتروژن برای (الف) MGO و (ب) CCG

جدول ۳. مقایسه ویژگی‌های تخلخلی MGO و CCG سنتز شده با سایر جاذب‌ها

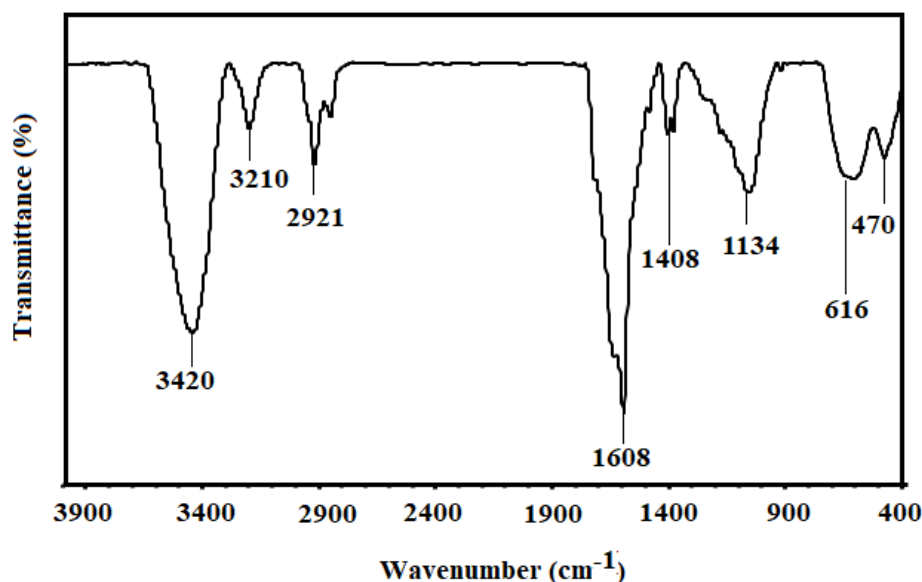
مرجع	میانگین حجم حفرات (cm <sup>3</sup> /g)	میانگین قطر حفرات (nm)	مساحت سطح (m <sup>2</sup> /g)	ماده
[۱۳]	۰/۰۲	۹/۷۹	۹/۰۱	GO
[۱۴]	-	۵/۱	۹/۲	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /CMC
[۱۵]	۱/۲۸	۳/۱۴۶	۱/۰۲۳	Cellulose

[۱۵]	۴/۰۹۴	۴/۷۵۷	۶/۰۴۲	GO-cellulose
مطالعه حاضر	۰/۱۸۳۶	۹/۵۰۹۶	۷۷/۲۴۱	MGO
مطالعه حاضر	۰/۱۱۸۲	۲۵/۴۴۳	۱۸/۵۸۵	CCG

### ۳-۱-۳- طیف FTIR

N-H در ADH هستند [۱۶ و ۱۷]. قله ظاهر شده در  $1408 \text{ cm}^{-1}$  به ارتعاش C-O-H گروه‌های فنلی CMC تعلق دارد [۱۸]. دو نوار جذبی واقع در  $2921 \text{ cm}^{-1}$  و  $1134 \text{ cm}^{-1}$  به ترتیب ناشی از ارتعاشات کششی و خمشی CH هستند. ارتعاشات کششی پیوند Fe-O در نانوذره مغناطیسی در محدوده  $470 \text{ cm}^{-1}$  و  $616 \text{ cm}^{-1}$  دیده می‌شوند [۱۹].

شکل ۳ طیف FTIR مربوط به CCG را در ناحیه  $4000-400 \text{ cm}^{-1}$  نشان می‌دهد. نوارهای جذبی مشاهده شده در  $3420 \text{ cm}^{-1}$  و  $3210 \text{ cm}^{-1}$  به پیوند آمیدی، ارتعاشات کششی OH در GO و CMC و ارتعاشات کششی



شکل ۳. طیف FTIR برای CCG

مقادیر پیش‌بینی شده درصد جذب براساس معادله (۳) در جدول ۲ ارائه شده‌اند. مطابق جدول، حداکثر درصد جذب CUR در pH برابر با ۶، زمان تماس ۶۰ دقیقه و غلظت اولیه ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد.

### ۳-۲-۱- بررسی ANOVA

برای بررسی اعتبار مدل درجه دوم، دقت آن و میزان اهمیت ضرایب مدل، تحلیل واریانس (ANOVA) انجام شد. اهمیت آماری و معنی‌دار بودن مدل با استفاده از آزمون عدم برازش (LOF)، ضریب تعیین ( $R^2$ ) و ضریب تعیین تعدیل یافته ( $R^2_{adj}$ ) میان مقادیر تجربی و پیش‌بینی شده ارزیابی شد. نتایج حاصل برای جذب دارو در جدول ۴ ارائه شده است.

### ۳-۲-۲- بهینه‌سازی و مدل‌سازی با روش سطح پاسخ

روش طراحی آزمایش (طرح مرکب مرکزی)، برای بارگذاری داروی CUR روی CCG، به منظور دستیابی به بهترین پاسخ با انجام کمترین تعداد آزمایش و نیز ارزیابی هم‌زمان پارامترهای مؤثر در پاسخ به کار رفت. نتایج در جدول ۲ ارائه شده است. داده‌های حاصل برای درصد جذب با معادله چندجمله‌ای درجه دوم انطباق داده شدند. معادله (۳) مدل بهینه برای پیش‌بینی درصد جذب برحسب متغیرهای آزمایش (جدول ۱) را نشان می‌دهد.

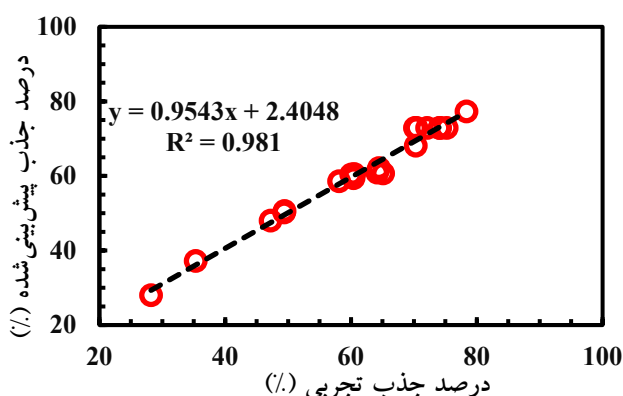
$$\begin{aligned} \text{Adsorption efficiency (\%)} = & + 73.35 + 0.9 A \\ & + 7.20 B + 2C + 1.5 AB + 0.5 AC - 4 BC - \\ & 12.12 A^2 - 3.62 B^2 - 7.62 C^2 \end{aligned} \quad (3)$$

مقدار بالای F و مقدار p کمتر از ۰/۰۵ بیانگر معنادار بودن مدل از نظر آماری در سطح اطمینان ۹۵ درصد است. در این مدل، پارامترهایی که مقدار p آن‌ها کمتر از ۰/۰۵ است دارای اثر بیشتری بر متغیر پاسخ هستند. برطبق جدول ۵، در میان متغیرهای مؤثر بر فرایند بارگذاری، زمان تماس بیشترین تأثیر را بر پاسخ آزمایش داشته است، غلظت اولیه دارو در جایگاه دوم قرار دارد و pH، در مقایسه با دو متغیر دیگر، اثر کمتری بر درصد جذب داشته است. مقادیر  $R^2$  و  $R^2_{adj}$  مدل به ترتیب

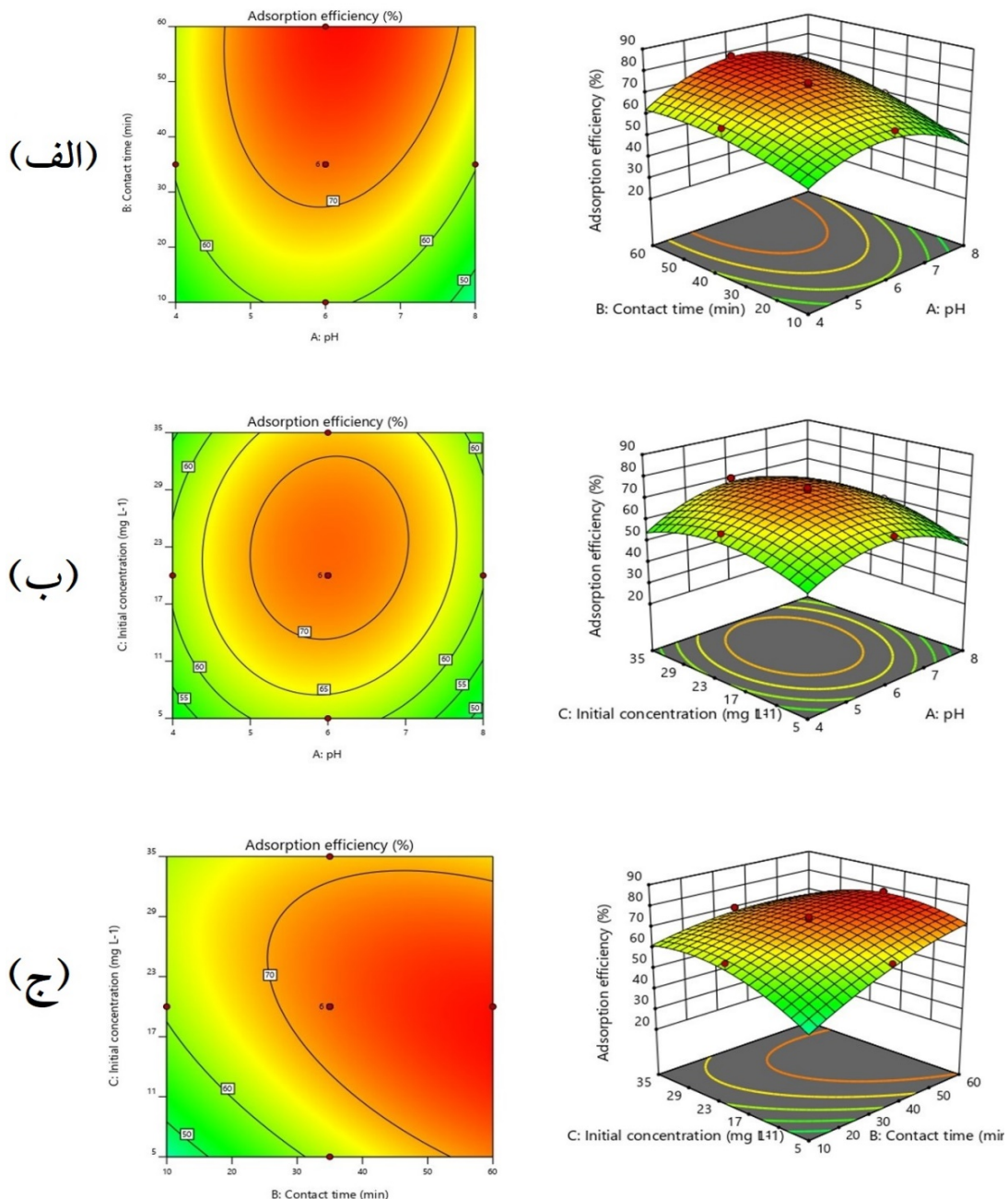
۰/۹۸۴۵ و ۰/۹۶۷۰ به دست آمدند. نزدیک بودن این مقادیر به ۱ نشان می‌دهد که مدل ارائه شده می‌تواند مقدار پاسخ (درصد جذب) را با دقت خوبی پیش‌بینی کند. همچنین، از رسم نمودار درصد جذب پیش‌بینی شده با استفاده از مدل برحسب درصد جذب تجربی (شکل ۴)، یک خط راست با ضریب هم‌بستگی بالا (۰/۹۸۱) به دست آمد که نشان‌دهنده رضایت‌بخش بودن مدل است.

جدول ۴. نتایج تحلیل واریانس برای ارزیابی مدل ارائه شده در روش سطح پاسخ-CCD

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	مقدار p
Block	۶۸۹/۹۷	۲	۳۴۴/۹۸		
مدل	۲۷۴۸/۴۲	۹	۳۰۵/۳۸	۵۶/۲۸	< ۰/۰۰۰۱
pH (A)	۱۰۰۰/۰	۱	۰/۱۰۰۰	۰/۰۱۸۴	۰/۸۹۵۴
زمان تماس (B)	۶۷۲/۴۰	۱	۶۷۲/۴۰	۱۲۳/۹۱	< ۰/۰۰۰۱
غلظت اولیه (C)	۹۰/۰۰	۱	۹۰/۰۰	۱۶/۵۹	۰/۰۰۳۶
AB	۶۰/۵۰	۱	۶۰/۵۰	۱۱/۱۵	۰/۰۱۰۲
AC	۲۴/۵۰	۱	۲۴/۵۰	۴/۵۱	۰/۰۶۶۳
BC	۲۲۰/۵۰	۱	۲۲۰/۵۰	۴۰/۶۳	۰/۰۰۲
A <sup>2</sup>	۴۰۴/۴۱	۱	۴۰۴/۴۱	۷۴/۵۳	< ۰/۰۰۰۱
B <sup>2</sup>	۳۸/۲۴	۱	۳۸/۲۴	۷/۰۵	۰/۰۲۹۰
C <sup>2</sup>	۱۶۲/۲۴	۱	۱۶۲/۲۴	۲۹/۹۰	۰/۰۰۰۶
خطای باقی مانده	۴۳/۴۱	۸	۵/۴۳		
عدم برازش	۲۸/۹۱	۵	۵/۷۸	۱/۲۰	۰/۴۷۰۷
خطای خالص	۱۴/۵۰	۳	۴/۸۳		
مجموع (Cor Total)	۳۴۸۱/۸۰	۱۹			
R <sup>2</sup>					۰/۹۸۴۵
R <sup>2</sup> adj					۰/۹۶۷۰



شکل ۴. مقایسه نتایج تجربی و پیش‌بینی شده توسط مدل برای جذب داروی CUR روی CCG



شکل ۵. (الف) اثر متقابل pH و زمان تماس، (ب) اثر متقابل pH و غلظت اولیه و (ج) اثر متقابل زمان تماس و غلظت اولیه بر درصد جذب

داروی CUR روی CCG

ثابت برابر با ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر در نظر گرفته شده است. همان‌گونه که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، افزایش زمان تماس تا ۶۰ دقیقه و افزایش pH تا ۶ موجب افزایش چشمگیر درصد جذب (۷۰ درصد) شده است. روند تغییرات pH با توجه به برقراری جاذبه الکتروستاتیکی میان داروی پروتونه‌شده و سطح دارای بار منفی CCG در pH برابر ۶ قابل توجیه است. همچنین، با افزایش زمان تماس از ۱۰ به ۶۰ دقیقه، درصد جذب به دلیل در دسترس بودن مکان‌های فعال خالی بسیار در سطح نانوجاذب افزایش یافت. پس از ۶۰ دقیقه، از تعداد مکان‌های فعال موجود

۳-۲-۲- اثر هم‌زمان عوامل مؤثر بر فرایند بارگذاری دارو با استفاده از مدل پیشنهاد شده برای توصیف فرایند بارگذاری دارو به روش جذب سطحی توسط CCD، نمودارهای سه‌بعدی رویه سطح و دوبعدی کانتور رسم شدند (شکل ۵) و برای بررسی تأثیر هم‌زمان سه عامل pH، زمان تماس و غلظت اولیه بر درصد جذب دارو استفاده شدند.

در شکل ۵ (الف)، اثر هم‌زمان pH و زمان تماس نشان داده شده است. در این نمودار، pH محلول دارو در بازه ۴ تا ۸ و زمان تماس در بازه ۱۰-۶۰ دقیقه و غلظت اولیه دارو مقداری

ثابت ۶ در نظر گرفته شده است. مطابق شکل ۵ (ج)، درصد جذب CUR در pH برابر ۶، زمان تماس ۶۰ دقیقه و غلظت اولیه ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر به بیشترین میزان (۷۰ درصد) رسید.

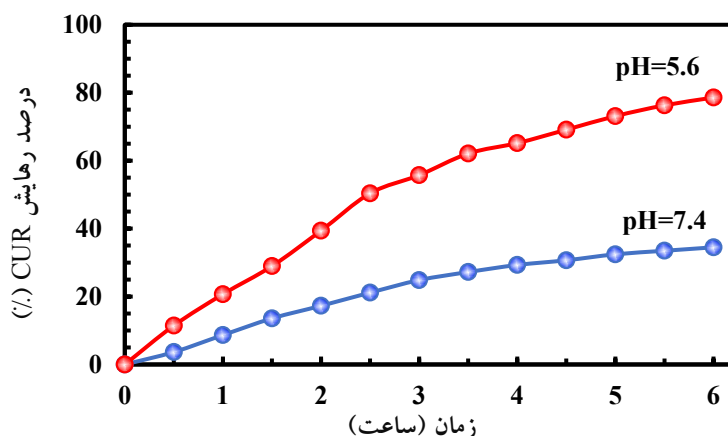
### ۳-۳- رهایش برون - تنی CUR

رهایش برون - تنی داروی CUR از نانوحامل CUR@CCG در pH فیزیولوژیک بدن (۷/۴) و همچنین محیط سلول‌های سرطانی (۵/۶) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس طی ۶ ساعت بررسی و نتایج در شکل ۶ نمایش داده شد. در pH ۷/۴، پس از یک ساعت، فقط حدود ۹ درصد از داروی CUR از نانوحامل آزاد شد و با گذشت زمان تا ۶ ساعت این مقدار به ۲۱ درصد رسید. رهایش دارو در pH برابر ۵/۶ در مقایسه با pH برابر ۷/۴ افزایش چشم‌گیری داشت، به گونه‌ای که در مدت ۶ ساعت حدود ۷۹ درصد دارو از CUR@CCG آزاد شد. افزایش میزان رهایش CUR در محیط شبیه‌سازی شده سلول‌های سرطانی نشان‌دهنده طراحی موفق نانوحامل دارورسانی پاسخ‌گوبه‌محرك pH به‌دلیل حضور پلیمر CMC است.

در سطح نانوجاذب کاسته شد و فرایند جذب به حالت تعادل رسید [۲۰].

غلظت اولیه دارو نیز عامل مهمی در فرایند جذب است [۲۱]. شکل ۵ (ب) تأثیر هم‌زمان pH و غلظت اولیه دارو را نشان می‌دهد. در این نمودار، pH محلول دارو در بازه ۴ تا ۸ و غلظت اولیه در بازه ۵-۳۵ میلی‌گرم بر لیتر و زمان تماس ثابت و برابر با ۳۵ دقیقه در نظر گرفته شده است. مطابق شکل ۵ (ب)، درصد جذب با افزایش غلظت اولیه تا ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر و افزایش pH تا ۶ زیاد شده است. غلظت‌های اولیه بالاتر دارو، تا ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر، نیروی محرکه بیشتری برای غلبه بر مقاومت انتقال جرم دارو میان فازهای محلول و فازهای جامد فراهم می‌سازد که به برخوردهای بیشتر مولکول‌های CUR و مکان‌های فعال نانوجاذب منجر می‌شود. اشباع مکان‌های فعال نانوجاذب در غلظت اولیه بیش از ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر موجب کاهش درصد جذب می‌شود [۲۲].

در شکل ۵ (ج)، تأثیر متقابل غلظت اولیه و زمان تماس نشان داده شده است. در این نمودار، غلظت اولیه در بازه ۵-۳۵ میلی‌گرم بر لیتر و زمان تماس در بازه ۶۰-۱۰ دقیقه و مقدار



شکل ۶. رهایش تجمعی دارو (%) از نانوحامل CUR@CCG در pH برابر با ۵/۶ و ۷/۴ در دمای ۳۷ درجه سلسیوس

جمع‌شدگی (انقباض) CMC می‌شود. این فرایند رهایش CUR از CUR@CCG را تسهیل می‌کند. در شرایط بازی (pH برابر ۷/۴)، گروه‌های کربوکسیلیک اسید CMC پروتون‌های خود را از دست می‌دهند. دافعه الکترواستاتیکی میان گروه‌های کربوکسیل دارای بار منفی موجب تورم پلیمر و، در پی آن، کاهش سرعت رهایش دارو می‌شود.

همان‌طور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود، نانوحامل سنتز شده در مطالعه حاضر (CUR@CCG)، به دلیل اصلاح با پلیمر حساس به pH کربوکسی‌متیل سلولز، در مقایسه با حامل‌های دیگر، رهایش چشم‌گیری را نشان می‌دهد. در شرایط اسیدی (pH برابر ۵/۶)، گروه‌های کربوکسیل CMC پروتونه می‌شوند. این عامل موجب تشکیل پیوند هیدروژنی میان گروه‌های کربوکسیل و هیدروکسیل CMC و در نتیجه

جدول ۵. مقایسه رهایش CUR از CUR@CCG با سایر حامل‌ها

منبع	درصد رهایش (%)	زمان رهایش (ساعت)	pH	حامل
[۲۳]	۲۵	۶	۵	CUR@CS/rGO
[۲۴]	۴۰	۶	۵/۵	لیپوزوم‌های CUR پوشش‌یافته با CSSH
[۲۵]	۱۱	۶	۵	CS/CUR
[۲۵]	۲۱	۶	۵	CS/CUR@GQDs@MIL-88(Fe)
مطالعه حاضر	۷۹	۶	۵/۶	CUR@CCG

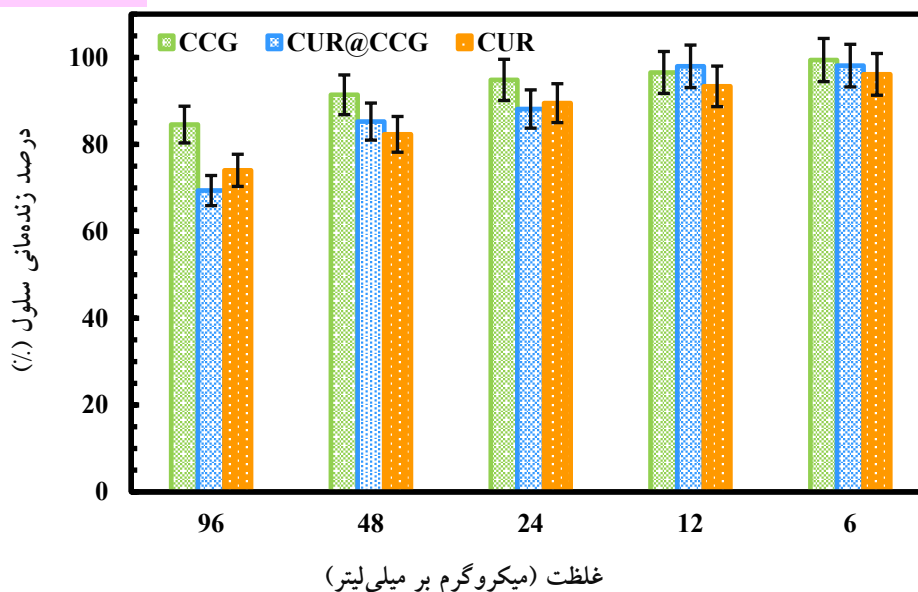
CS: کیتوسان، rGO: گرافن اکسید کاهش یافته، CSSH: کیتوسان دارای گروه عاملی تیول، GQD: نقاط کوانتومی گرافن

### ۳-۴- بررسی سمیت سلولی

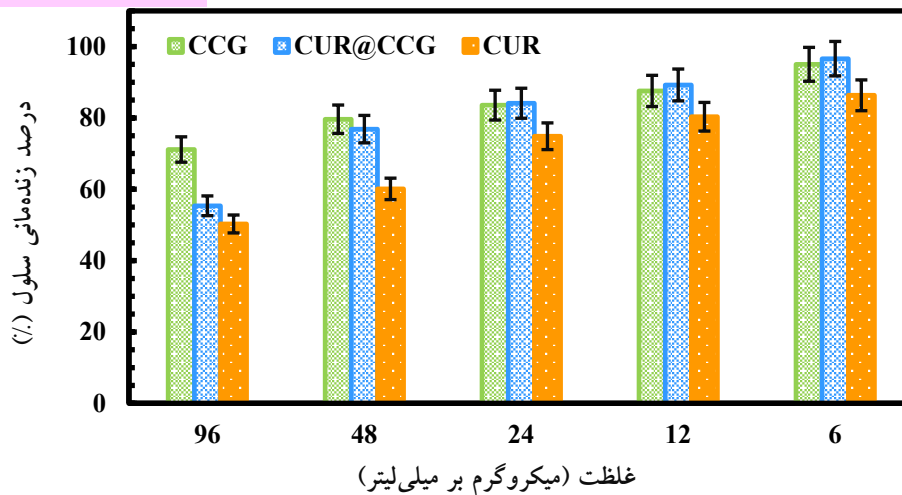
برای ارزیابی درصد بقای سلولی، آزمون MTT با انکوباسیون سلول‌های سالم پستان (رده MCF 10A) و سلول‌های سرطانی پستان (رده MDA-MB 231) به مدت ۲۴ ساعت در مقابل غلظت‌های متفاوتی (۶-۹۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از CUR آزاد و CUR@CCG انجام و نتایج در شکل (۷) ارائه شد. مطابق شکل (۷)، درصد بقای سلول‌های سالم MCF 10A حتی در غلظت بالای بیونانوکامپوزیت CCG (۹۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بیش از ۸۴ درصد بود. سمیت ناچیز CCG بر سلول‌های سالم می‌تواند ناشی از پوشش پلیمری زیست‌سازگار CMC باشد. با وجود این، CCG، به‌ویژه در

غلظت ۹۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر، سمیت نسبتاً بالایی در سلول‌های سرطانی MDA-MB 231 داشت، به‌گونه‌ای که درصد بقای این سلول‌ها با فرارگرفتن در برابر CCG به ۷۱ درصد کاهش یافت. به‌علاوه، CUR@CCG، در تمام غلظت‌های مورد مطالعه، اثر سمیت در سلول‌های MDA-MB 231 را نشان داد، هرچند سمیت نسبتاً کمتری از CUR آزاد داشت. برای مثال، میزان کُشندگی CUR@CCG و CUR آزاد در غلظت ۹۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر، به ترتیب، ۴۵ درصد و ۵۰ درصد بود. سمیت کمتر CUR@CCG را می‌توان به رهایش آهسته CUR از بیونانوکامپوزیت در مدت آزمون MTT (۲۴ ساعت) مرتبط دانست.

### MCF 10A



## MDA-MB 231



شکل ۷. درصد بقای سلول‌های سالم MCF 10A و سرطانی MDA-MB 231 پس از قرارگرفتن در برابر CCG، CUR@CCG و CUR در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت

## مراجع

- Makvandi, P., Ghomi, M., Ashrafizadeh, M., Tafazoli, A., Agarwal, T., Delfi, M., Akhtari, J., Zare, E. N., Padil, V. V. T., Zarrabi, A., Pourreza, N., Milyk, W., Maiti, T. K., "A review on advances in graphene-derivative/polysaccharide bionanocomposites: Therapeutics, pharmacogenomics and toxicity", *Carbohydrate Polymers*, Vol. 250, (2020), 116952. <https://doi.org/10.1016/J.CARPOL.2020.116952>
- Priya James, H., John, R., Alex, A., Anoop, K. R., "Smart polymers for the controlled delivery of drugs – A concise overview", *Acta Pharmaceutica Sinica B*, Vol. 4, No. 2, (2014), 120-127. <https://doi.org/10.1016/J.APSB.2014.02.005>
- Ashuri, A., Miralinaghi, M., Moniri, E., "Evaluation of folic acid-conjugated chitosan grafted Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/graphene oxide as a pH- and magnetic field-responsive system for adsorption and controlled release of gemcitabine", *Korean Journal of Chemical Engineering*, Vol. 39, No. 7, (2022), 1880-1890. <https://doi.org/10.1007/S11814-022-1104-5>
- Thennakoon, T. M., Ching, Y. C., Chuah, C. H., Rahman, N. A., Nai-Shang, L., "pH-responsive poly(lactic acid)/sodium carboxymethyl cellulose film for enhanced delivery of curcumin in vitro", *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, Vol. 58, (2020), 101787. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2020.101787>
- Daneshmoghlanlou, E., Miralinaghi, M., Moniri, E., Sadjady, S. K., "Fabrication of a pH-responsive magnetic nanocarrier based on carboxymethyl cellulose-aminated graphene oxide for loading and in-Vitro release of curcumin", *Journal of Polymers and the Environment*, Vol. 30, (2022), 37183736. <https://doi.org/10.1007/S10924-022-02467-5>
- Morshedi, F., Moniri, E., Heydarinasab, A., Miralinaghi, M., "In-Vitro release of the anticancer agent chlorogenic acid using  $\beta$ -cyclodextrin/folic acid functionalized magnetic CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/SWCNT as magnetic targeted delivery carrier: Central composite design optimization study", *Journal of Polymers and the Environment*, Vol. 31, No. 1, (2023), 221-237. <https://doi.org/10.1007/S10924-022-02601-3/METRICS>
- Anirudhan, T. S., Manjusha, V., Chithra Sekhar, V., "A new biodegradable nano cellulose-based drug delivery system for pH-controlled delivery of curcumin", *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 183, (2021), 2044-2054. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.06.010>
- Hummers, W. S., Offeman, R. E., "Preparation of graphitic oxide", *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 80, (1958), No. 6, 1339-1339. <https://doi.org/10.1021/ja01539a017>

## ۴- نتیجه‌گیری

بیونانوکامپوزیت CCG برای تحویل داروی CUR با موفقیت سنتز شد. روش مناسبی برای بهینه‌سازی شرایط مؤثر در فرایند بارگذاری دارو روی CCG و دستیابی به بیشترین درصد جذب CUR بود. در شرایط بهینه، درصد جذب برابر با ۷۰ درصد به دست آمد. همچنین، رهایش CUR از نانوحامل CUR@CCG در محیط سلول‌های سرطانی به میزان چشم‌گیری بیش از محیط فیزیولوژیک بدن انسان انجام شد. نتایج حاصل از آزمایش سمیت سلولی نشان داد که سمیت CCG روی سلول‌های سالم MCF 10A ناچیز است و به دلیل پوشش پلیمری CMC، زیست‌سازگاری بالایی نشان می‌دهد. در مقابل، تأثیر کشندگی CUR@CCG روی سلول‌های آدنوکارسینوم پستان (MDA-MB 231jh) قابل ملاحظه است. بنابراین، CUR@CCG می‌تواند به‌عنوان نانوحاملی هدفمند با فعالیت ضدسرطانی قابل قبول برای تحویل داروی CUR به کار رود.

## ۵- سپاسگزاری

بدین وسیله از سرکار خانم دکتر نیلوفر ترابی‌فرد، که ما را در تکمیل بخش بهینه‌سازی این پژوهش همراهی کردند، تشکر و قدردانی می‌کنیم.

18. Gholamali, I., Yadollahi, M., "Doxorubicin-loaded carboxymethyl cellulose/starch/ZnO nanocomposite hydrogel beads as an anticancer drug carrier agent", *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 160, (2020), 724-735. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.05.232>
19. Abdi, Z., Malek Khachatourian, A., Nemati, A., "Studying the effect of calcination on the optical and magnetic properties of NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@ZnO:Ti nanoparticles", *Advanced Ceramics Progress*, Vol. 8, No. 3, (2022), 1-7. <https://doi.org/10.30501/ACP.2022.363261.1101>
20. Yadav, S., Asthana, A., Singh, A. K., Chakraborty, R., Vidya, S. S., Susan, M. A. B. H., Carabineiro, S. A. C., "Adsorption of cationic dyes, drugs and metal from aqueous solutions using a polymer composite of magnetic/ $\beta$ -cyclodextrin/activated charcoal/Na alginate: Isotherm, kinetics and regeneration studies", *Journal of Hazardous Materials*, Vol. 409, (2021), 124840. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2020.124840>
21. Asemaneh, H. R., Rajabi, L., Dabirian, F., Rostami, N., Derakhshan, A. A., Davarnejad, R., "Functionalized graphene oxide/polyacrylonitrile nanofibrous composite: Pb<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> cations adsorption", *International Journal of Engineering*, Vol. 33, No. 6, (2020), 1048-1053. <https://doi.org/10.5829/IJE.2020.33.06C.01>
22. Karimidost, S., Moniri, E., Miralinaghi, M., "Thermodynamic and kinetic studies sorption of 5-fluorouracil onto single walled carbon nanotubes modified by chitosan", *Korean Journal of Chemical Engineering*, Vol. 36, No. 7, (2019), 1115-1123. <https://doi.org/10.1007/s11814-019-0292-0>
23. Dhanavel, S., Revathy, T. A., Sivaranjani, T., Sivakumar, K., Palani, P., Narayanan, V., Stephen, A., "5-Fluorouracil and curcumin co-encapsulated chitosan/reduced graphene oxide nanocomposites against human colon cancer cell lines", *Polymer Bulletin*, Vol. 77, No. 1, (2019), 213-233. <https://doi.org/10.1007/S00289-019-02734-X>
24. Li, R., Deng, L., Cai, Z., Zhang, S., Wang, K., Li, L., Ding, S., Zhou, C., "Liposomes coated with thiolated chitosan as drug carriers of curcumin", *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 80, (2017), 156-164. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2017.05.136>
25. Pooresmaeil, M., Namazi, H., "Facile preparation of pH-sensitive chitosan microspheres for delivery of curcumin: Characterization, drug release kinetics and evaluation of anticancer activity", *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 162, (2020), 501-511. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.06.183>
9. Rokni, S. E. S. E., Haji Seyed Mohammad Shirazi, R., Miralinaghi, M., Moniri, E., "Efficient adsorption of anionic dyes onto magnetic graphene oxide coated with polyethylenimine: Kinetic, isotherm, and thermodynamic studies", *Research on Chemical Intermediates*, Vol. 46, No. 4, (2020), 2247-2274. <https://doi.org/10.1007/s11164-020-04090-2>
10. Rao, Z., Ge, H., Liu, L., Zhu, C., Min, L., Liu, M., Fan, L., Li, D., "Carboxymethyl cellulose modified graphene oxide as pH-sensitive drug delivery system", *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 107, No. Part A, (2018), 1184-1192. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.09.096>
11. Ezami, F., Miralinaghi, M., Heydarinasab, A., Moniri, E., "pH-sensitive folic acid/poly(vinyl pyrrolidone) functionalized MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/single-walled carbon nanotubes for release of a natural anticancer agent: Chlorogenic acid", *Polymers for Advanced Technologies*, Vol. 33, No. 12, (2022), 4084-4097. <https://doi.org/10.1002/PAT.5839>
12. Dong, Y. Z., Choi, H. J., "Synthesis of reduced graphene oxide/cobalt ferrite composite particles and their magnetorheological characteristics", *AIP Advances*, Vol. 11, No. 1, (2021), 015129. <https://doi.org/10.1063/9.0000149>
13. Torabi Fard, N., Tadayon, F., Ahmad Panahi, H., Moniri, E., "Synthesize, characterization and application of a novel three-dimensional magnetic graphene oxide decorated with polyester dendrimers for detection of donepezil hydrochloride in pharmaceutical formulation and biological fluid", *Synthetic Metals*, Vol. 290, (2022), 117141. <https://doi.org/10.1016/J.SYNTHMET.2022.117141>
14. Liu, L., Chang, S., Wang, Y., Zhao, H., Wang, S., Zheng, C., Ding, Y., Ren, S., Zhang, J., Guo, Y. R., "Facile fabrication of ion-imprinted Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/carboxymethyl cellulose magnetic biosorbent: Removal and recovery properties for trivalent La ions", *RSC Advances*, Vol. 11, No. 41, (2021), 25258-25265. <https://doi.org/10.1039/D1RA03647E>
15. Kumar, N., Kumar, B., Gupta, H., Kumar, A., "Development and evaluation of cellulose/graphene-oxide based composite for removing phenol from aqueous solutions", *Polymers*, Vol. 15, No. 3, (2023), 572. <https://doi.org/10.3390/POLYM15030572>
16. Rasoulzadeh, M., Namazi, H., "Carboxymethyl cellulose/graphene oxide bio-nanocomposite hydrogel beads as anticancer drug carrier agent", *Carbohydrate Polymers*, Vol. 168, (2017), 320-326. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2017.03.014>
17. Azizi, M., Kalantar, M., "Evaluation of microstructural and antibacterial properties of graphene oxide synthesized by green method", *Journal of Advanced Materials and Technologies (JAMT)*, Vol. 9, No. 3, (2020), 51-61. <https://doi.org/10.30501/JAMT.2020.221997.1075>