ساخت و مشخصه یابی نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون-پلی اتیلن-گلایکول حاوی عصاره بابونه برای کاربرد ترمیم زخم

عادله قلی پور کنعانی*، فاطمه دهقان

گروه مهندسی نساجی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران، ۱۴۷۷۸۹۳۸۵۵
a.gholipour@srbiau.ac.ir

چکیده

نانوالیاف الکتروریسی‌شده به دلیل خواص قابل کنترل بستری مناسب برای بارگذاری انواع داروها و عصاره‌ها می‌باشند. در این پژوهش عصاره بابونه به عنوان یک عامل آنتی‌باکتریال در نانوالیاف پلی‌کاپرولاکتون-پلی‌اتیلن گلایکول بارگذاری شده‌است. به این منظور محلول‌های ترکیبی ۳:۲ ، ۱:۱ و ۲:۳ وزنی پلی‌کاپرولاکتون-پلی‌اتیلن‌گلایکول تهیه و عصاره بابونه (۷٪) به ترکیب بهینه افزوده و الکتروریسی شد. مورفولوژی، سلول سازگاری، عدم سمیت سلولی، رهایش عصاره و خاصیت ضد باکتری وب حاصله مورد بررسی قرار گرفت. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نشان دهنده یک مورفولوژی مناسب و بدون دانه تسبیحی برای وب نانولیفی PCL:PEG(۲:۳) حاوی عصاره با قطر متوسط ۲۱۱±۷۰ nm می‌باشد. برهمکنش‌های بین گروه‌های عاملی پلی‌کاپرولاکتون و پلی‌اتیلن‌گلایکول و عصاره بابونه در طیف های FTIR دیده می شود. نتایج آزمون کشت سلولی نشان دهنده رشد و تکثیر مناسب سلول‌های فیبروبلاست بر روی هر دو نمونه نانوالیاف بدون عصاره و حاوی عصاره می‌باشد. نتیجه آزمون MTT نیز اگرچه تایید کننده عدم سمیت هر دو نمونه بدون عصاره و حاوی عصاره می‌باشد، اما درصد زنده‌مانی سلولی بر روی نمونه حاوی عصاره بابونه بیشتر بوده است. نتایج تست ضد باکتری خاصیت ضد باکتری نانوالیاف پلی کاپرولاکتون-پلی اتیلن گلایکول حاوی عصاره بابونه را در برابر هر دو باکتری گرم مثبت و گرم منفی تایید می‌نماید.

واژگان کلیدی: پلی‌کاپرولاکتون، پلی‌اتیلن‌گلایکول، عصاره بابونه، نانوالیاف، فعالیت ضد باکتری

Fabrication and characterization of polycaprolactone-polyethylene glycol nanofibers containing chamomile extract for wound healing application

Adeleh Gholipour-Kanani*, Fatemeh Dehghan
Department of Textile Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, 1477893855, Tehran, Iran
a.gholipour@srbiau.ac.ir

Abstract

Electrospun nanofibers are a suitable substrate for loading a variety of drugs and extracts due to their controllable properties. In this study, chamomile extract was loaded as an antibacterial agent in polycaprolactone-polyethylene glycol nanofibers. For this purpose, 3: 2, 1: 1 and 2: 3 weight ratio of polycaprolactone-polyethylene glycol solutions were prepared and chamomile extract (7%) was added to the optimal composition and then electrospun. Morphology, cell compatibility, cytotoxicity, extract release and antibacterial properties of the resulting web were examined. Scanning electron microscopy (SEM) images show a suitable and bead-less morphology for nanofiber PCL: PEG (2: 3) containing an extract with an average diameter of 211 ±70 nm. Interactions between the functional groups of polycaprolactone and polyethylene glycol and chamomile extract are observed in the Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) spectra. The results of cell culture test indicate proper growth and proliferation of fibroblast cells on both chamomile extract loaded and non-loaded nanofibers. The results of MTT test, although confirming the non-toxicity of both extract loaded and non-loaded nanofibers, but the percentage of cell survival was higher on the sample containing chamomile extract. The results of antibacterial test confirm the antibacterial activities of polycaprolactone-polyethylene glycol nanofibers containing chamomile extract against both Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Keywords: Polycaprolactone, Polyethylene glycol, Chamomile extract, Nanofibers, Antibacterial activity.

۱- مقدمه

پوست به عنوان خارجی ترین لایه بدن نقش های حیاتی زیادی را ایفا می کند که مهمترین آن حفاظت از بافت های زیرین در برابر انواع عوامل خارجی فیزیکی، شیمیایی، مکانیکی و بیولوژیکی می باشد. از این رو همواره خطرات زیادی بافت پوست را تهدید می کند که شایع ترین آن ها شامل انواع زخم های پوستی از زخم های برشی و سوختگی سطحی تا تمام عمق می باشد. به دلیل نقش حفاظتی خاص پوست، تسریع و کیفیت ترمیم این بافت از اهمیت ویژه ای برخوردار است. این امر به ویژه زمانی که بدن فرد با بیماری هایی چون ضعف سیستم ایمنی به دلایل وراثتی، سنی و بیماری های زمینه ای چون دیابت روبه رو باشد بیشتر اهمیت می یابد[۱]. امروزه به منظور دستیابی به شرایط مطلوب تر در ترمیم زخم های پوستی از پزشکی بازساختی و مهندسی بافت کمک گرفته می شود. علاوه بر آن، با ظهور فناوری نانو در پزشکی، استفاده از مواد در مقیاس نانومتر به عنوان جزء قابل توجه در پوشش های ترمیم کننده مانند پانسمان های پیشرفته سبب پیشرفت قابل توجهی در این امر شده است[۲]. روش های متعددی برای تولید نانوالیاف مورد استفاده در کاربردهای پزشکی وجود دارد که از جمله آن می توان به روش های خودآرایی، جدایی فازی و الکتروریسی اشاره نمود که متداول ترین این روش ها، فرایند الکتروریسی می باشد[۳]. در این راستا پوشش های ساخته شده از نانوالیاف الکتروریسی شده برپایه مواد اولیه طبیعی و سنتزی بسیار مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است. یکی از مهترین دلایل این امر قابلیت شگفت انگیز ساختارهای نانولیفی در شبیه سازی میکروساختار فیبریلی ماتریس خارج سلولی پوست طبیعی می باشد[۴]. به این ترتیب نانوالیاف ساخته شده از پلیمرهای زیست سازگار با توجه نوع ساختار میکروسکوپی اش قابلیت بسیار مناسبی را در عبور سیگنال های بیوشیمیایی و جذب بیومولکول های طبیعی مورد نیاز برای ترمیم به سایت زخم دارد[۱, ۲]. علاوه بر آن، نانوالیاف خود به عنوان یک بستر بسیار مناسب برای انتقال دارو و بارگذاری مواد ضد باکتری شناخته می شود. از این رو مطالعات زیادی بر روی بارگذاری انواع دارو های شیمیایی و همچنین عوامل ضد میکروبی چون نانوذارت و عصاره های طبیعی در بستر نانوالیاف برای انواع مصارف به ویژه مصارف ترمیم بافت پوست انجام شده است[۵]. پلی کاپرولاکتون (PCL) به عنوان یک پلیمر زیست سازگار سنتزی با خواص فیزیکی و مکانیکی عالی یکی از متداول ترین گزینه های انتخابی در تولید داربست های نانولیفی برای انواع بافت ها به ویژه بافت پوست می باشد. این پلیمر یک پلی استرِ آلیفاتیک و نیمه بلوری بوده و دارای نقطه ذوب $^{\circ}C$ ۵۵-۶۳ (بسته به میزان بلورینگی آن) می‌باشد. پلی‌کاپرولاکتون دارای قابلیت حلالیت بالا در حلال‌های آلی بوده و یک پلیمر غیرسمی است[۶]. این پلیمر قابلیت هیدرولیز شدن در محیط طبیعی و در بدن انسان را دارد و داربست‌های الکتروریسی شده از آن ساختار سه بعدی و متخلخل دارند. اما باید به این نکته مهم اشاره نمود که استفاده از وب های الکتروریسی شده پلی کاپرو لاکتون به دلیل خاصیت آب‌گریزی بالا منجر به چسبندگی کم سلول به داربست می‌شود به این ترتیب کاربرد این نانوالیاف به صورت تکی در زمینه ترمیم بافت محدود می‌باشد[۷]. به منظور رفع

این مشکل از ترکیب کردن پلیمرهای آب دوست، سرامیک-های زیست فعال و یا سایر افزودنی‌ها با پلی کاپرولاکتون، یک کامپوزیت از مواد بیولوژیکی هیبریدی با خواص مکانیکی قابل قبول، میزان تخریب قابل کنترل و زیست سازگاری بیشتر حاصل می‌شود که در مهندسی بافت بسیار کاربردی خواهد بود[۷, ۸]. یکی از انواع مواد قابل استفاده برای افزایش خواص بیولوژیکی پلی کاپرولاکتون، پلی اتیلن گلایکول (PEG) می باشد. این پلیمر از خانواده پلیمرهای خطی سنتزی و محلول درآب هستند که در ساختار شیمیایی آنها گروه‌های هیدروکسیل نوع اول در انتهای زنجیره پلیمر خطی و گروه های تکرار شونده اکسی‌اتیلینی متعدد وجود دارد[۹]. پلی‌اتیلن گلایکول، در وزن های مولکولی بسیار متنوعی تولید می شود و استفاده از وزن مولکولی پایین این پلیمر در صنعت دارو سازی به عنوان حامل و روان کننده بسیار متداول است[۱۰]. از این رو در این پژوهش، از پلی اتلین گلایکول به عنوان جزء ترکیب شونده با پلی کاپرولاکتون استفاده شده است. تا کنون مطالعاتی بر روی ساخت داربست نانولیفی ترکیبی بر پایه پلی کاپرولاکتون-پلی اتیلن گلایکول انجام شده است. در یک مطالعه، اسکافارو[۱۱] و همکاران نانوالیاف ترکیبی از پلی کاپرولاکتون (PCL) و گرافن اکساید گرافت شده پلی تیلن گلایکول (GO-PEG) را به روش الکتروریسی تهیه کردند و خواص مورفولوژیکی، مکانیکی و آبدوستی وب حاصله را بررسی کردند. آن ها گزارش کردند که قطر متوسط نانوالیاف و همچنین آبدوستی وب حاصله با افزوده شدن مقدار GO-PEG افزایش یافته است. در یک کار تحقیقاتی رپاناس [۱۲] و همکاران نانوالیاف الکتررسی شده PCL/PEG را برای کاربرد انتقال کنترل شده داروی دیپیریداموال (DPA) تهیه کردند. آن ها نشان دادند که نسبت ۳:۱ (PCL:PEG) یک موفولوژی یکنواخت و بهینه را ایجاد کرده است. مطالعات رهایش دارو نشان می دهد که رهایش تجمعی دارو با یک پدیده انفجار اولیه و سپس رهایش آهسته تر همراه می باشد. استفاده از عصاره های گیاهی به عنوان داروهای طبیعی با خواص بیولوژیکی مناسب و عدم سمیت زایی قابل توجه و همچنین با عوارض جانبی کم و قابل کنترل بسیار مورد توجه دانشمندان علم بیولوژی قرار گرفته است. در این راستا در یک پژوهش دیگر راویکومار[۱۳] و همکارانش موفق به ساخت نانوالیاف PCL-PEG حاوی کورکومین شدند و کاربرد آن را به عنوان یک پچ پوستی برای انتقال دارو مورد توجه قرار دادند. بر اساس نتایج گزارش شده نانوالیاف بهینه از الکتروریسی محلول مخلوط با نسبت ۲:۱ (PCL:PEG) با بارگذاری ۷و۸٪ وزنی کورکومین بدست آمد. یکی از انواع بسیار کارآمد عصاره های طبیعی، عصاره گیاه بابونه می باشد که یکی از قدیمی ترین گیاهان دارویی شناخته شده توسط انسان است و قدمت استفاده از آن به یونان باستان می رسد. این گیاه خوراکی بوده و به صورت جوشانده نیز مورد استفاده قرار می گیرد و دارای خواص متعددی از جمله ضد عفونی کنندگی و آنتی اکسیدانی بوده و برای کاهش درد و تب و اسپاسم مورد استفاده قرار می گیرد. عصاره روغنی این گیاه سرشار از فلاونوئیدهایی مانند آلفا بیزابولول، لوتئولین، کورستین و آپیجنین می باشد که سبب ویژگی های درمانی و ضدالتهابی و ضد میکروبی آن می گردد [۱۴]. در یک کار پژهشی مطیع اله[۱۵] و همکاران به بررسی بارگذاری عصاره

بابونه در نانوالیاف پلی کاپرولاکتون/پلی استایرن (PCL/PS) پرداختند. آن ها نشان دادند که محلول با نسبت ۳۵ / ۶۵ حاوی ۱۵٪ وزنی عصاره بابونه تحت شرایط الکتروریسی ولتاژ ۱۸kV و فاصله ۱۵/۵ cm منجر به تولید نانوالیاف با قطر متوسط حدود ۱۷۵nm شده است. نتایج رهایش عصاره نشان داد که تا ۴۸ ساعت اول رهایش تدریجی تا حدود ۷۰٪ انجام شده است. همچنین حضور عصاره سبب ایجاد خواص آنتی باکتریایی عالی شده است. نتایج مطالعات حیوانی بر مدل موش صحرایی نیز موید ان امر بود که زخم درمان شده با نمونه وب حاوی عصاره بابونه در مدت ۱۴ روز پس از عمل جراحی بیش از ۹۹٪ ترمیم یافته است. هدف اصلی در این پژوهش، تلفیق ویژگی های منحصربه فرد نانو الیاف با خواص فیزیکی و بیولوژیکی مناسب پلی کاپرولاکتون و پلی اتیلن گلایکول، و همچنین خواص عالی آنتی باکتریایی عصاره بابونه به منظور ایجاد یک پوشش مناسب با پتانسیل استفاده در ترمیم زخم می باشد. ویژگی های فیزیکی و شیمیایی وب های الکتروریسی شده در هر دو حالت بدون عصاره بابونه و حاوی عصاره بابونه مورد ارزیابی قرار می گیرد. همچنین ویژگی های سلول سازگاری، رهایش عصاره و خاصیت ضد باکتریایی داربست های نانولیفی حاصله بررسی می گردد و درنهایت قابلیت کاربرد آن به عنوان یک پانسمان ضدمیکروب مورد ارزیابی قرار می گیرد.

۲- تجربیات

۲-۱ مواد اولیه

در این پژوهش پلی کاپرولاکتون (PCL با وزن مولکولی ۸۰۰۰۰ دالتون) و پلی اتیلن گلایکول (PEG با وزن مولکولی ۱۰۰۰۰ دالتون) در گرید آزمایشگاهی از شرکت سیگما-آلدریچ خریداری شد. حلال های دی کلرومتان (DCM) و دی متیل فرمامید (DMF) در گرید آزمایشگاهی از شرکت مرک خریداری شد. عصاره بابونه از شرکت زردبند (ساخت ایران) خریداری شد.

۲-۲- تهیه داربست نانولیفی پلی کاپرولاکتون- پلی اتیلن گلیکول

به منظور تولید داربست پلیمری پلی کاپرولاکتون/ پلی اتیلن گلیکول (PCL/PEG)، ابتدا مقدار ۰/۳ گرم PCL در ۵ سی سی از حلال دی کلرومتان-دی متیل فرمامید (DCM/DMF (۹/۱)) برای مدت ۱ تحت همزن مغناطیسی ساعت همزده شد تا محلول شفافی حاصل شود. سپس برای تهیه نسبت ۳:۲ ، ۱:۱ و ۲:۳ (PCL:PEG) به ترتیب مقدار ۰/۲گرم و یا ۰/۳ گرم و یا ۰/۴۵ گرم PEG به محلول PCL اضافه کرده برای مدت یک ساعت دیگر در همان شرایط قبل همزده می شود. محلول های ترکیبی حاصله تحت شرایط مختلف ولتاژ (kV ۱۸ و ۲۰) و فاصله نازل تا جمع کننده (۱۵cmو۲۰) الکتروریسی شدند. به منظور تعیین ترکیب بهینه از نظر نسبت پلیمرها و شرایط الکتروریسی، وب های الکتروریسی شده حاصله تحت آزمون های بررسی مورفولوژیکی توسط میکروسکوپ الکترونی (SEM، ساخت شرکت Philips آمریکا مدلXL-30) قرار گرفتند.

۲-۳- تهیه داربست نانولیفی پلی کاپرولاکتون-پلی اتیلن گلایکول- عصاره بابونه

به منظور تهیه داربست حاوی عصاره، محلول بهینه پلی کاپرولاکتون-پلی اتیلن گلایکول (نسبت ۲:۳ PCL:PEG) انتخاب شد و عصاره پایه روغنی بابونه به میزان ۷٪ وزنی

نسبت به وزن خشک پلیمرها به ترکیب افزوده شد و به مدت ۱ ساعت در دمای محیط بر روی استیرر هم زده شد. میزان عصاره بر اساس مقدار دوز بهینه مطالعه شده توسط میرنظامی و همکاران [۱۶] تعیین گردید. سپس محلول ترکیب پلیمری حاوی عصاره بابونه تحت فرایند الکتروریسی در شرایط ولتاژ و فاصله های مختلف قرار گرفت.

۴-۲- مشخصه یابی موفولوژیکی و شیمیایی

برای بررسی مورفولوژی نانوالیاف حاصله از میکروسکوپ الکترونی (SEM، ساخت شرکت Philips آمریکا مدلXL-30) استفاده شده است. همچنین به منظور بررسی ساختار شیمیایی و ارزیابی برهمکنش های احتمالی بین اجزای داربست از آنالیز طیف سنجی مادون قرمز (FTIR مدل Nexus 870) در محدوده عدد موجی cm^{-1} ۴۰۰۰-۴۰۰ استفاده شده است.

۵-۲- مشخصه یابی‌های فیزیکی و بیولوژیکی (برون‌تنی)

آزمون کشت سلولی توسط سلول‌های فیبروبلاست L929 دُم موش مطابق با استاندارد ASTM- F813 انجام شد. این سلول ها پیش از کشت سلولی در محیط رشد RPMI-1640 به همراه پنی سیلین، IU/ml ۱۰۰ استرپتوسین و ۱۰ ٪ سرم جنینی گوساله(FCS) نگهداری شدند. نمونه ها پس از استرلیزاسیون، در درون پلیت کشت سلولی از جنس پلی استایرن قرار داده شد و در هر خانه ml ۱ از سوسپانسیون سلولی شامل ۹۰۰۰۰ سلول ریخته شد. یک خانه از آن نیز به عنوان شاهد منفی (بدون نمونه) نگه داشته شد. پلیت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور (مدل NB-203L ساخت شرکت N-BioTek, INC)، تحت شرایط ۵٪ دی‌اکسیدکربن، رطوبت ۹۵٪ و دمای $37^{o}C$ قرار داده شدند. پس از آن محلول سوسپانسیونی از درون تک تک خانه های پلیت خارج شد و نمونه ها به ترتیب در الکل‌های ۵۰٪، ۷۰٪، ۸۰٪ و ۹۶٪ هر کدام به مدت ۱۰ دقیقه نگه داشته شدند تا سلولها فیکس شوند و مورد تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی قرار گیرند[۱۷].

آزمون MTT (میکروکالچر نمک تترازولیوم) به منظور بررسی میزان زنده مانی سلول ها و عدم سمیت سلولی انجام شده. به این منظور، سلول‌های قرار گرفته بر وب‌های حاصله در محیط کشت بدون سرم مورد لکه‌گذاری با MTT (۱۵۰ میکرولیتر محلول ٪۲۰) قرار می‌گیرند و در انکوباتور. به‌عبارت دیگر، تعداد سلول‌های زنده با استفاده از روش رنگ سنجی در MTT تعیین می‌شود. مکانیزم این روش بدین گونه است که سلول-های فعال از نظر متابولیکی با نمک تترازولیوم واکنش می-دهند تا یک رنگ محلول فرمازون را تولید نمایند و جذب آن توسط یک صفحه خوان اسپکتروفوتومتری (الایزا ریدر مدل STAT FAX 2100, USA) در طول موج ۵۷۰nm خوانده می شود.

به منظور بررسی روند رهایش عصاره بابونه از داربست ناولیف پلی کاپرولاکتون-پلی اتیلن گلایکول-عصاره بابونه، سه عدد برش مربعی به ابعاد ۱/۵cm ×۱/۵cm از داربست نانولیفی تهیه شد و هر کدام در بازه‌های زمانی ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت به طور جداگانه در ۴ سی سی محلول فسفات بافر سالین (PBS) قرار گرفتند. در هر زمان مشخص شده میزان ۱ سی سی از آن محلول نمونه

گیری می شد و به همان میزان PBS تازه به ظرف حاوی داربست اضافه می شد[۱۷]. نمونه ها در دستگاه اسپکتروفتومتر جذبی قرار گرفته و میزان رهایش در طول موج جذب عصاره در ۲۵۶ nm (طول موج ماکزیمم جذب عصاره بابونه) اندازه‌گیری شد. نتایج بدست آمده حاصل ۳ بار تکرار می باشد.

برای ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی داربست حاوی عصاره بابونه، آزمون کشت باکتری با دو دسته باکتری گرم مثبت استافیلوکوک اورئوس و باکتری گرم منفی سودومنازآروجینوزا در محیط کشت سویاآگار و مطابق روش استاندارد مک فارلند انجام شد. به این منظور برای تهیه محیط کشت ، میزان ۲۰g از محیط کشت سویا آگار تریپتیکیس به ۵۰۰ml آب مقطر افزوده شد. محیط کشت جوشانده شد تا کاملا شفاف شود و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۰℃ اتوکلاو شد. باکتری های در محیط کشت آماده شده به مدت ۲۴ ساعت کشت شدند. یک سوسپانسیون از هر باکتری بر اساس کدورت نیم مک فارلند (تعداد باکتری های موجود در هر میلی لیتر از سوسپانسیون برابر با $۱/۵\times ۱۰^{۸}$) آماده شد. از هر نمونه وب اندازه ۱cm× ۱cm جدا شد و پس از استریل شدن در محیط سرم مناسب قرار داده شد و میزان یک میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری به آن اضافه شد و پس از ۲۴ ساعت تعداد باکتری های زنده محاسبه شد تا میزان درصد کاهش کلونی و قابلیت ضدباکتریایی داربست ها ارزیابی شود[۱۷].

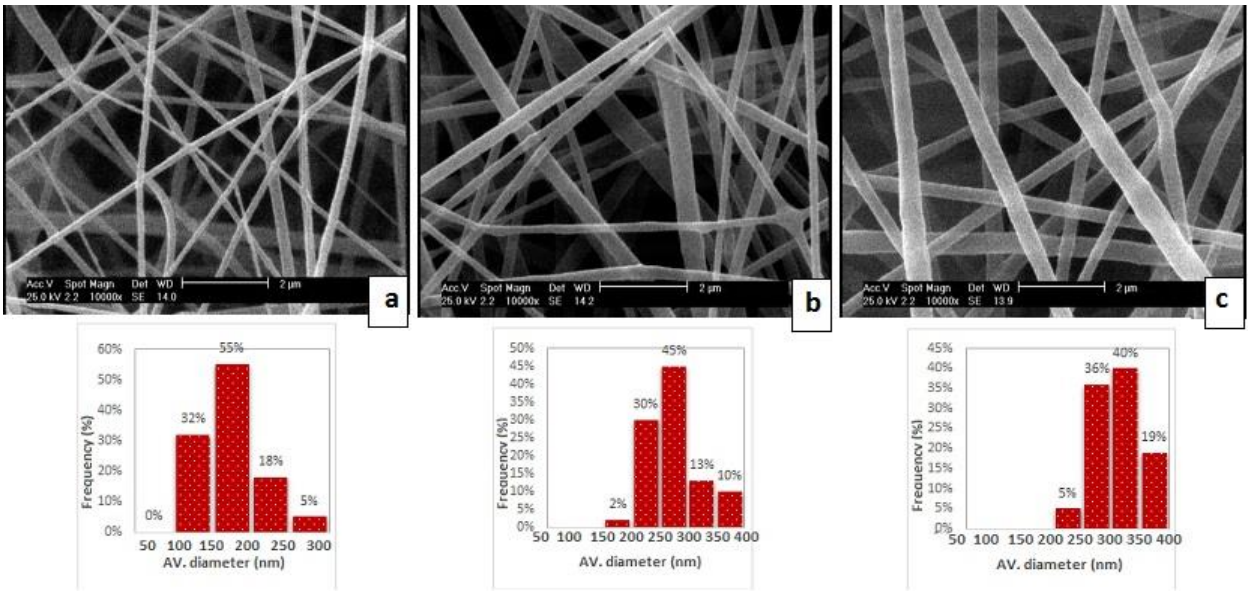
۳- نتایج و بحث

۳-۱- مورفولوژی داربست پلی کاپرولاکتون-پلی اتیلن گلایکول

به منظور بررسی اثر نسبت PCL:PEG تصاویر SEM داربست های حاصله در سه نسبت ۳:۲، ۱:۱ و ۲:۳ الکتروریسی شده تحت شرایط ولتاژ ۲۰kV و فاصله ۱۵ cm در شکل ۱ مورد بررسی قرار گرفتند. همانطور که با افزایش میزان پلی کاپرولاکتون در ترکیب قطر متوسط نانوالیاف به ترتیب از ۱۶۸±۴۴ nm در نسبت ۲:۳ به ۲۹۶±۸۱ nm در نسبت ۱:۱ و سپس به ۳۳۲±۵۰ nm در نسبت ۳:۲ رسیده است. این افزایش در قطر با افزایش نسبت پلی کاپرولاکتون به دلیل بالاتر بودن وزن مولکولی پلی کاپرولاکتون نسبت به پلی اتیلن گلایکول می باشد[۱۲]. در نتیجه هرچه میزان پلی اتیلن گلایکول کمتر و میزان پلی کاپرولاکتون بیشتر باشد گران روی محلول پلیمری بیشتر و در نتیجه در یک ولتاژ و فاصله یکسان غلبه میدان الکتریکی بر کشش سطحی قطره پلیمری کمتر بوده و در نهایت جت پلیمری، سخت تر تحت کشش قرار گرفته و نانوالیاف ضخیم تری بر روی صفحه جمع کننده جمع آوری می شوند[۱۳].

بر اساس نتایج بدست آمده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی (شکل ۱) و همچنین خاصیت بیولوژیکی بسیار عالی و قابلیت روان کننده گی بالای پلی اتیلن گلایکول که سبب اثرات مناسب در انتقال دارو و عصاره می گردد، وب نانولیفی PCL:PEG با نسبت ۲:۳ که میزان پلی اتیلن گلایکول در آن بیشتر بوده و قطر متوسط ظریف تر با موفولوژی یکنواخت

تری را ایجاد کرده است به عنوان نسبت بهینه برای ادامه مطالعات انتخاب شد.



شکل ۱- تصاویر میکروسکوپ الکترونی وب PCL:PEG در نسبت های a) ۲:۳، b) ۱:۱ و c) ۳:۲ الکتروریسی شده در شرایط ولتاژ ۲۰kV و فاصله ۱۵ cm با بزرگنمایی ۱۰۰۰۰x.

جت پلیمری در مسیر پرواز خود باشد. نتایج حاصله با نتایج بدست آمده توسط اسکافارو[۱۱] و همکارانش همخوانی دارد. همچنین در هر دو ولتاژ، با افزایش فاصله از ۱۵cm به ۲۰cm قطر متوسط تا حدودی افزایش داشته است و توزیع قطری پهن تر شده است. این امر می تواند به دلیل کاهش قدرت میدان الکتریکی با افزایش فاصله در یک ولتاژ مشخص رخ دهد.

به منظور بررسی اثر ولتاژ و فاصله وب های الکتروریسی شده PCL:PEG با نسبت ۲:۳ تحت شرایط ولتاژ های ۱۸ kV و ۲۰kV و فاصله های ۱۵ cm و ۲۰ cm مورد بررسی قرار گرفتند نتایج در جدول۱ مشخص شده است. همانطور که در جدول دیده می شود، به صورت کلی با افزایش ولتاژ در فاصله ثابت، قطر متوسط نانوالیاف کاهش یافته است که این امر می تواند به دلیل افزایش قدرت میدان الکتریکی و کشش بیشتر

جدول۱-تغییرات قطر متوسط نانوالیاف (۲:۳) PCL:PEG در شرایط ولتاژ و فاصله مختلف.

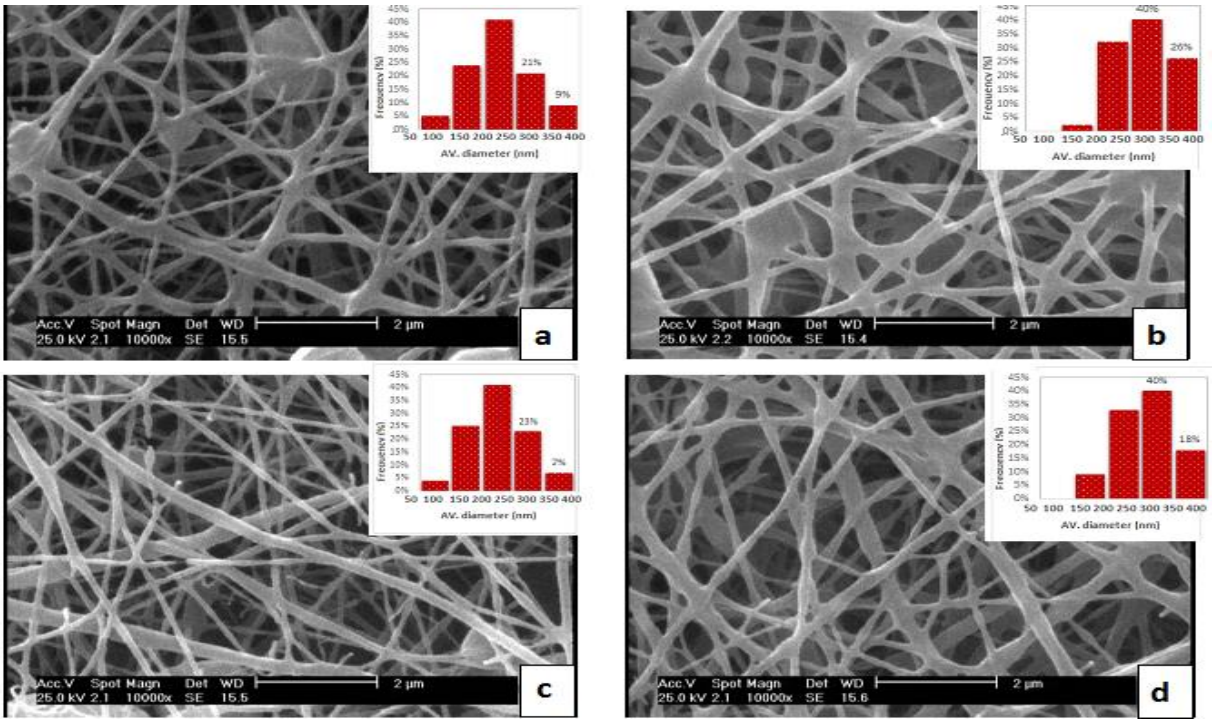
ولتاژ / فاصله	۱۸ kV	۲۰ kV
۱۵ cm	۱۸۳±۳۷ nm	۱۶۸±۴۴ nm
۲۰ cm	۱۹۴±۵۴ nm	۱۷۷±۶۱ nm

دهنده تصاویر SEM داربست حاوی عصاره بابونه در شرایط مختلف الکتروریسی می باشد. به صورت کلی با افزایش عصاره پایه روغنی بابونه به ترکیب PCL:PEG اگرچه قطر متوسط نانوالیاف نسبت به نمونه های بدون عصاره با تغییرات اندکی افزایش داشته است اما توزیع قطری نانوالیاف به صورت چشمگیری تغییر کرده است و در نمونه های حاوی عصاره توزیع پهن تری دیده می شود. به عنوان نمونه، در شرایط الکتروریسی یکسان تحت ولتاژ ۲۰kV و فاصله ۱۵cm، قطر متوسط نانوالیاف در وب (۲:۳)PCL:PEG بدون عصاره nm ۱۶۸±۴۴بوده که با افزایش عصاره به nm ۱۸۱±۸۵ رسیده است. همچنین به دلیل حضور عصاره در ترکیب سه جزئی، نایکنواختی های قطری در طول نانوالیاف دیده می شود.

نتایج نشان می دهند که وب (۲:۳) PCL:PEG الکتروریسی شده تحت شرایط شرایط ولتاژ ۲۰kV و فاصله‌های cm ۱۵ نمونه بهینه از نظر مورفولوژیکی و همچنین قطر متوسط نانوالیاف حاصله می باشد.

۳-۲ بررسی موفولوژی داربست سه جزئی PCL:PEG حاوی عصاره بابونه

به منظور بررسی شرایط بهینه الکتروریسی، محلول (۲:۳) PCL:PEG حاوی ۷٪ وزنی عصاره بابونه، تحت شرایط ولتاژ های kV ۱۸ و ۲۰kV و فاصله های cm ۱۵ و cm ۲۰ الکتروریسی شده و وب های سه جزئی حاصله مورد تصویر برداری میکروسکوپ الکترونی قرار گرفتند. شکل۲ نشان



شکل۲- تصاویر SEM داربست های PCL:PEG حاوی عصاره بابونه الکتروریسی شده تحت شرایط: a) ولتاژ kV ۱۸ و فاصله cm ۱۵، b) ولتاژ kV ۱۸ و فاصله cm ۲۰، c) ولتاژ ۲۰kV و فاصله cm ۱۵ و d) ولتاژ ۲۰kV و فاصله cm ۲۰

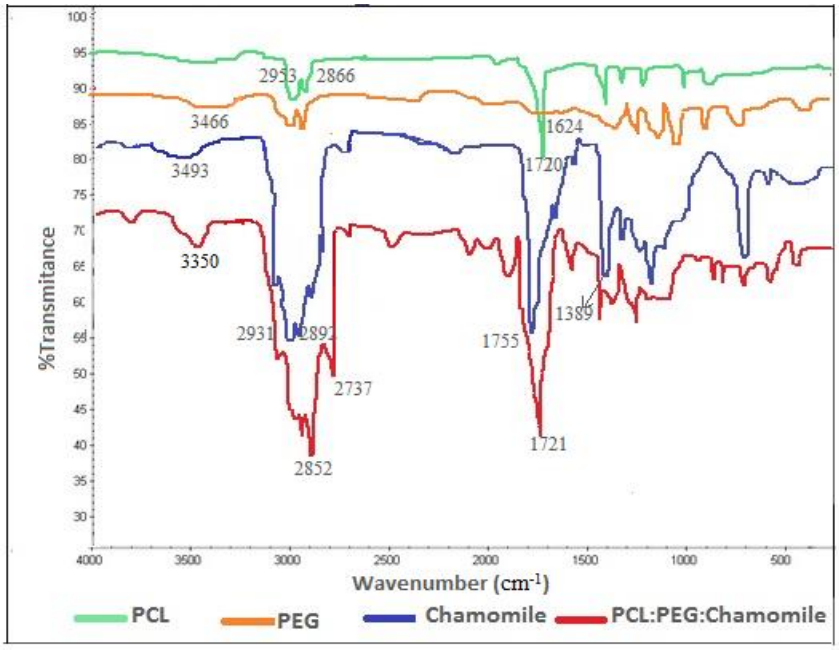
در فاصله های ثابت cm ۱۵ و ۲۰cm، با افزایش ولتاژ از ۱۸kV به kv ۲۰، قطر متوسط نانوالیاف به ترتیب از nm ۱۸۹±۸۰ به nm ۱۸۱±۸۵ و از nm ۲۲۰±۵۳ به nm ۲۱۱±۷۰ رسیده است. نتایج بررسی های اثر تغییر ولتاژ در فاصله ثابت نشان می دهد که کاهش محسوسی در اندازه قطر متوسط نانوالیاف دیده نمی شود. همانطور که می دانیم به صورت کلی افزایش ولتاژ در فاصله ثابت می تواند ایجاد کننده دو اثر متضاد به صورت همزمان باشد اول اینکه سبب افزایش قدرت میدان الکتریکی و کشش بیشتر جت و نازک شدن الیاف می شود و دوم اینکه می تواند سبب کشیده شدن حجم بیشتری از قطره پلیمری به درون جت گردد و به این ترتیب جت قطورتر نانوالیافی با قطر بیشتر ایجاد می کند که اثر دوم وقتی ویسکوزیته نزدیک حد ماکزیمم بحرانی است بیشتر نمود پیدا می کند[۱۷]. به نظر می رسد که با افزایش عصاره

به ترکیب گران روی محلول سه جزئی بیشتر شده و قدرت هر دو اثر افزایش ولتاژ در فاصله ثابت به یک اندازه بوده و هیچ کدام بر دیگری غلبه نکرده اند. به این ترتیب قطر متوسط نانوالیاف تغییر چشمگیری با افزایش فاصله ندارد. همچنین بر اساس نتایج بدست آمده، افزایش فاصله درولتاژ ثابت سبب کاهش قدرت میدان الکتریکی و در نتیجه افزایش قطر متوسط نانوالیاف شده است. از طرفی با افزایش فاصله مورفولوژی از حالت با دانه تسبیحی به بدون دانه تسبیحی تغییر کرده است که این امر می تواند به دلیل افزایش فاصله و زمان پرواز جت پلیمری باشد به طوریکه فرصت بیشتری جهت کشش یکنواخت تر داشته و مورفولوژی بدون دانه تسبیحی ایجاد شده است.

به صورت کلی بر اساس نتایج حاصل از شکل ۲، داربست نانولیفی (۲:۳) PCL:PEG حاوی عصاره بابونه الکتروریسی شده تحت شرایط ولتاژ ۲۰ kV و فاصله ۲۰ cm به عنوان داربست سه جزئی بهینه تعیین شد.

۳-۳-نتایج طیف سنجی FTIR

به منظور شناسایی گروه‌های عاملی و بررسی برهمکنش های احتمالی بین اجزای ترکیب از روش طیف سنجی مادون قرمز استفاده شد. بدین منظور طیف‌های FTIR عصاره بابونه، پلی کاپرولاکتون، پلی اتیلن گلایکول و وب های نانولیفیPCL:PEG حاوی عصاره بابونه و بدون عصاره در شکل ۳ مورد بررسی قرار گرفتند. طیف FTIR، PCL شامل پیک‌های شاخص $۲۹۵۳cm^{-1}$ و $۲۸۶۶cm^{-1}$ (کشش گروه C-H) ، $۱۷۲۰\ cm^{-1}$ (C=O کششی)، $۱۲۹۲\ cm^{-1}$ (C-O,C-C کششی) و $۱۲۳۹\ cm^{-1}$ (C-O-C کششی) می‌باشد. طیف مربوط به نمونه PCl پیک قابل مشاهده در عدد موج cm^{-1} ۳۴۶۱ مربوط به ارتعاش کششی پیوندهای O-H می باشد که می تواند ناشی از آب جذب سطحی شده به سطح نمونه یا وجود گروه هیدروکسیل در انتهای زنجیره PCl باشد[۱۲]. در طیف مربوط به نمونه PEG، پیک های جذبی پدیدار شده در عدد موج های cm^{-1} ۳۴۶۶ و cm^{-1} ۱۶۲۴ به ترتیب مربوط به ارتعاش کششی پیوندهای O-H و C-O-H می باشد. پیک های قابل مشاهده در عدد موج های cm^{-1} ۱۲۷۷ و cm^{-1} ۱۳۵۵ ناشی از ارتعاش خمشی پیوندهای C-H در ساختارهای متیلی و متیلنی است[۱۳]. در طیف FTIR عصاره بابونه، پیک های شاخصی در $۳۴۹۳\ cm^{-1}$ (گروه های هیدروکسیل O-H)، $۲۹۳۱\ cm^{-1}$ و ۲۸۹۲ (ارتعاشات کششی پیوند C-H)، $۱۷۵۵\ cm^{-1}$ (گروه کربونیل استری) و همچنین در$۱۳۸۹\ cm^{-1}$ (پیک کششی–C N آمین نوع اول) دیده می شود[۱۵, ۱۸].



شکل ۳- نتایج FTIR پلی کاپرولاکتون (PCL)، پلی اتیلن گلایکول(PEG)، عصاره بابونه (Chamomile) و وب الکتروریسی شده ترکیب پلی کاپرولاکتون-پلی اتیلن گلایکول-عصاره بابونه (PCL:PEG:Chamomile).

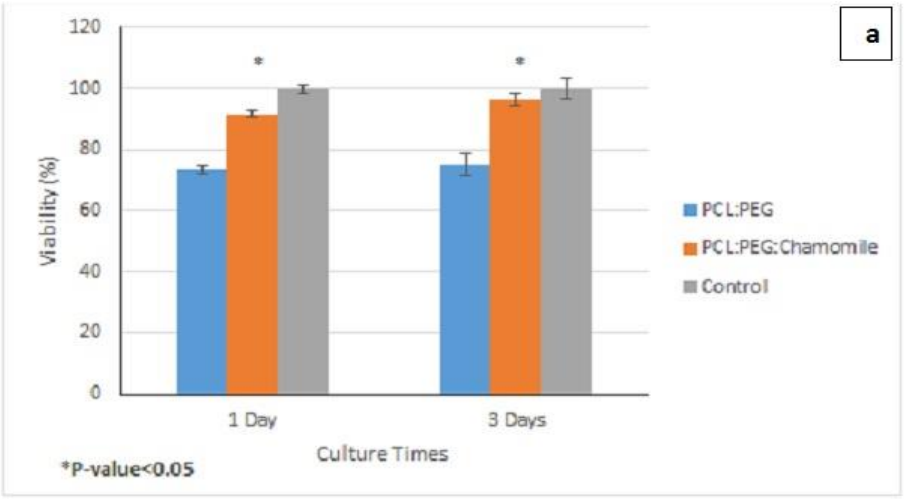
نتایج طیف سنجی وب نانولیفی پلی کاپرولاکتون-پلی اتیلن گلایکول عصاره بابونه نشان دهنده حضور تمامی پیک های شاخص هر سه جزء ترکیب می باشد. برای مثال حضور پیک cm^{-1} ۱۷۲۱ نشان دهنده گروه کربوکسیل PCL و عصاره بابونه در ترکیب می باشد. به صورت کلی تغییر مکان های کوچک ایجاد شده در پیک ها نشان دهنده برقراری پیوندهای هیدروژنی بین گروه های مختلف اجزای اصلی ترکیب مانند گروه های کربوکسیل در پلی کاپرولاکتون و عصاره بابونه با گروه های هیدروکسیل پلی اتیلم گلایکول و عصاره می باشد.

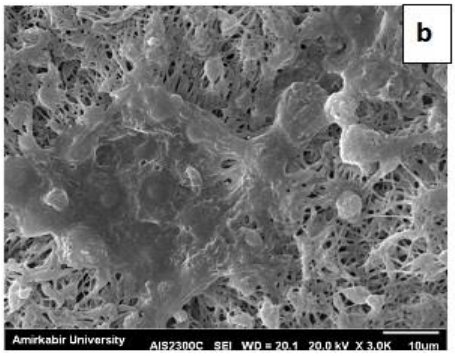
۳-۴-نتایج آزمون های بیولوژیکی برون تنی

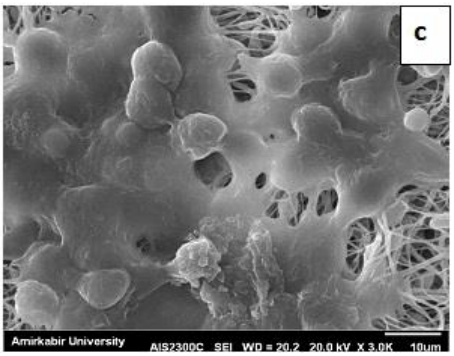
نتایج بررسی های سمیت سنجی سلولی (آزمون MTT) و کشت سلول های فیبروبلاست بر روی داربست های نانولیفی پلی‌کاپرولاکتون: پلی‌اتیلن‌گلایکول و پلی‌کاپرولاکتون: پلی-اتیلن‌گلایکول:عصاره بابونه و نمونه کنترل (پلیت کشت سلول) در شکل ۴ دیده می شود. همانطور که در شکل ۴a دیده می شود زنده مانی سلول بر هر دو نمونه داربست نانولیفی قابل توجه می باشد، اگرچه به ویژه پس از گذشت ۳ روز از کشت درصد زنده مانی بر نمونه نانولیفی حاوب عصاره بابونه بیشتر و بسیار نزدیک به نمونه کنترل می باشد. نتایج حاصله با نتایج بدست آمده توسط راویکومار [۱۳]و همکاران مطابقت دارد. آن ها گزارش کردند که اگرچه داربست PCL/PEG سمیتی ایجاد نمی کند اما نمونه حاوی کورکومین خواص بیولوژیکی بهتری دارد. به صورت کلی عدم سمت زایی هر دو داربست به دلیل خواص بیولوژیکی قابل قبول پلیمرهای مورد استفاده می باشد و اثر بیولوژیکی مناسب و خواص ضدعفونی کنندگی بابونه سبب ارتقای میزان زنده مانی سلولی (تا بیش از ۹۸٪) در روز سوم کشت می باشد. به صورت کلی نتایج نشان می-دهد که توانایی داربست نانو لیفی برای هر دو نمونه از نظر عدم سمیت، عدم سمیت سلولی مناسبی را نشان می‌دهد و

همچنین درصد زنده مانی سلول در هر دو نمونه نسبت به نمونه کنترل در ۲۴ ساعت و ۷۲ ساعت بسیار قابل مقایسه است و کشت در هر دو مورد به خوبی جواب داده است.

همانطورکه در شکل b,c ۴ دیده می شود چسبندگی و تکثیر سلولی مناسبی بر هر دو داربست ایجاد شده است. این امر علاوه بر خواص بیولوژیکی و زیست سازگاری مناسب پلی کاپرولاکتون و پلی اتیلن گلایکول می تواند به دلیل ویژگی های منحصربه فرد نانوالیاف و حضور تخلخل و ساختار نانو فیبریلی در آن نیز می باشد. با توجه به شکل ۴c ، حضور عصاره بابونه در ترکیب نانولیفی سبب ارتقای میزان چسبندگی و پهن شوندگی سلول ها شده است به طوریکه سلول‌ها با حفظ مرفولوژی طبیعی خود توانسته اند به خوبی بر روی سطح داربست نانو لیفی گسترده شوند. این نتایج با نتایج گزارش شده توسط مطیع اله [۱۵] و همکاران در یک راستا می باشد. آن ها گزارش کردند که حضور عصاره بابونه در نانوالیاف پلی کاپرولاکتون/پلی استایرن سبب ارتقای قابل توجه میزان چسبندگی و تکثیر سلولی بر روی داربست نانولیفی است.





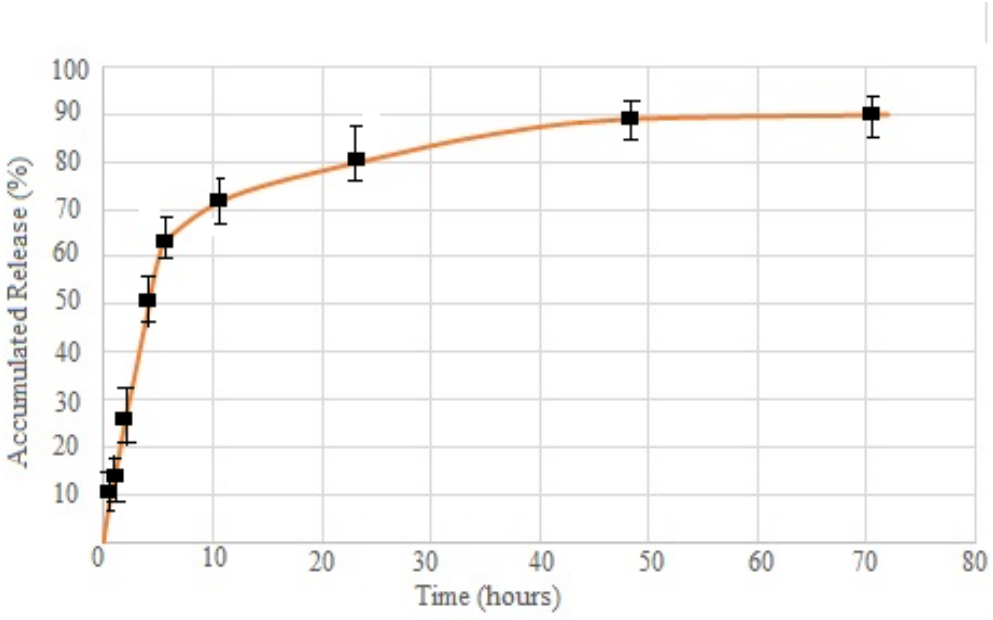


شکل۴: a) نتایج آزمون MTT برای بررسی درصد زنده مانی فیبروبلاست ها بر روی داربست های نانولیفی پس از گذشت یک روز و سه روز پس از کشت. تصاویر SEM رشد و چسبندگی فیبروبلاست ها پس از سه روز بر روی داربست نانولیفی b) پلی کاپرولاکتون:پلی اتیلن گایکول (PCL:PEG) و c) پلی کاپرولاکتون:پلی اتیلن گایکول: عصاره بابونه (PCL:PEG: Chamomile)

۳-۵- نتایج رهایش عصاره بابونه از وب نانولیفی

شکل ۵ درصد تجمعی رهایش عصاره بابونه را در بازه زمانی صفر تا ۷۲ ساعت از داربست نانولیفی حاوی عصاره نشان می-دهد. همانطور که در پروفایل رهایش دیده می شود عصاره بابونه طی ۶ ساعت اولیه با شیب تندی رهایش یافته است و میزان رهایش در ساعات اولیه به حدود ۶۵٪ می رسد این امر با توجه به خاصیت آنتی باکتریالیتی مناسب عصاره بابونه می تواند اثرات بسیار موثری را در بازدارندگی رشد باکتری و کنترل عفونت حاصل از آن در بستر زخم ایجاد کند. پس از آن نرخ رهایش تا ۳۰ ساعت اولیه با کاهش قابل توجه شیب روبرو بوده است به طوریکه در این زمان به حدود ۸۲٪ رهایش رسیده است.

پس از آن تا پایان بازه زمانی مورد آزمایش رهایش تقریبا یکنواخت و کنترل شده ای دیده می شود. این روند رهایش مستمر به اثرات بسیار مطلوبی را در جلوگیری از ایجاد عفونت در بستر زخم خواهد داشت. روند رهایش تقریبا مشابه روند رهایش کورکومین از نانوالیاف پلی کاپرولاکتون-پلی اتیلن گلایکول در کار تحقیقاتی راویکومار[۱۳] و همکاران می باشد. همچنین در مطالعه مطیع اله[۱۵] و همکاران، رهایش عصاره بابونه از نانوالیاف پلی کاپرولاکتون/پلی استایرن به صورت تدریجی تا ۴۸ ساعت اولیه به ۷۰٪ رسیده بود و به نظر می رسد که در پژوهش حاضر حضور پلی اتیلن گلایکول در ترکیب با پلی کاپرولاکتون نقش موثری را در رهایش عصاره ایفا کرده است.



شکل ۵- منحنی رهایش عصاره بابونه از داربست نانولیفی PCL:PEG:Chamomile در زمان های مختلف.

۳-۶- نتایج بررسی خاصیت ضد باکتریایی

خاصیت ضد باکتریایی داربست نانولیفی حاوی عصاره و بدون عصاره (به عنوان نمونه کنترل) در برابر دو باکتری گرم مثبت (استفیلوکوک اورئوس) و گرم منفی (سودومنازآروجینوزا) مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور مطالعه دقیق خاصیت ضدباکتریایی، درصد کاهش کلونی برای هر دو نوع باکتری بر روی هر دونوع داربست حاوی عصاره بابونه و بدون عصاره تعیین شد که در جدول ۲ نتایج حاصله دیده می شود. محاسبات کاهش کلونی بر اساس کم شدن جمعیت باکتری

ها با توجه به میزان باکتری بارگذاری شده اولیه ($۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ باکتری زنده در یک میلی لیتر سوسپانسیون) انجام می شود.

جدول ۲- درصد کاهش کلونی باکتری بر روی داربست نانولیفی حاوی عصاره و نمونه کنترل (داربست نانولیفی بدون عصاره)

نوع باکتری	نوع نمونه	تعداد باکتری های زنده	فعالیت ضدباکتری (کاهش کلونی)(٪)
استفیلوکوک اورئوس	داربست حاوی عصاره بابونه	$۱/۴ \times ۱۰^{۴}$	۹۹
	کنترل	$۱/۵۱ \times ۱۰^{۸}$	---
سودومنازآروجینوزا	داربست حاوی عصاره بابونه	$۳/۲ \times ۱۰^{۴}$	۹۷/۸
	کنترل	$۱/۵۴ \times ۱۰^{۸}$	---

بر اساس نتایج محاسبات که در جدول ۲ آمده است، داربست بدون عصاره هیچ گونه فعالیت ضدباکتریایی را نسبت به دو نوع باکتری نشان نمی دهد. در حالیکه داربست حاوی عصاره بابونه میزان قابل توجهی کاهش تعداد باکتری های زنده را نشان می دهد و قابلیت ضد باکتریایی آن نسبت به باکتری گرم مثبت حدود ۹۹ درصد و نسبت به باکتری گرم منفی بیش از ۹۷ درصد می باشد. نتایج بدست آمده از مطالعات رحمتی[۱۴] و همکاران و مطیع اله[۱۵] و همکاران موید نتایج آنتی باکتریایی پژوهش حاضر است. این امر نشان دهنده قابلیت بسیار مناسب داربست حاوی عصاره به عنوان یک پانسمان ضدمیکروب مناسب می باشد.

۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش داربست نانولیفی از ترکیب پلی کاپرولاکتون- پلی اتیلن گلایکول- عصاره بابونه به روش الکتروریسی تهیه شد. نتایج میکروسکوپی نشان دهنده دستیابی به یک موفولوژی مناسب و بدون دانه تسبیحی در نسبت ۲:۳ پلیمر ها با افزودن ۷٪ عصاره بابونه به ترکیب و الکتروریسی تحت شرایط ولتاژ ۲۰ kV و فاصله ۲۰ cm با قطر متوسط نانوالیاف ۲۱۱±۷۰ nm می باشد. نتایج طیف سنجی نشان می دهد که پیک های شاخص هر دو پلیمر و عصاره بابونه در ترکیب دیده می شود و برهمکنش هیدروژنی بین آنها ایجاد شده است. منحنی رهایش برای نمونه‌ی حاوی ۷٪ عصاره نیز نشان-دهنده‌ی یک رهایش انفجاری تا حدود ۶۵٪ در ۶ ساعت اولیه می باشد و پس از آن یک روند افزایش میزان رهایش با گذشت زمان با نرخ کمتر و نسبتا پایدار دیده می شود. نتایج کشت سلولی نشان دهنده رشد و تکثیر بسیار عالی سلول های فیبروبلاست بر روی هر دو داربست، به ویژه داربست حاوی عصاره بابونه می باشد. همچنین نتیجه آزمون MTT نیز نشان می دهد که در مدت زمان آزمون درصد زنده مانی سلول های فیبروبلاست بر روی نمونه حاوی عصاره بیشتر بوده و تفاوت معناداری با تعداد سلول های زنده بر نمونه کنترل مثبت ندارد. نتایج تست آنتی باکتریال در برابر دو باکتری گرم مثبت و گرم منفی، نشان دهنده خاصیت آنتی باکتریایی بسیار مناسب داربست حاوی عصاره بابونه می باشد. به صورت کلی می توان نتیجه گرفت داربست نانولیفی پلی کاپرولاکتون-پلی اتیلن گلایکول- عصاره بابونه با قابلیت ضدمیکروبی مناسب و خواص بیولوژیکی عالی می تواند یک پوشش مناسب برای ترمیم زخم های پوستی باشد.

مراجع

۱. قلی پور کنعانی، ع. اصول ترمیم زخم و پانسمان های پیشرفته Vol. 1. 1399, .تهران: جهاد دانشگاهی واحد دانشگاه صنعتی امیرکبیر. ۲۴۰.

2. Rivero, G., et al., *Chapter 17 - Nanofibrous scaffolds for skin tissue engineering and wound healing applications*, in *Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers (Third Edition)*, A.R. Boccaccini, P.X. Ma, and L. Liverani, Editors. 2022, Woodhead Publishing. p. 645-681.
3. Ghajarieh, A., S. Habibi, and A. Talebian, *Biomedical Applications of Nanofibers.* Russian Journal of Applied Chemistry, 2021. **94**(7): p. 847-872.
4. Ghajarieh, A., S. Habibi, and A. Talebian, *A review on the medical application of electrospun nanofibers.* Journal of Textile Science and Technology, 2019. **8**(1): p. 31-44.
5. Singh, B., K. Kim, and M.-H. Park, *On-Demand Drug Delivery Systems Using Nanofibers.* Nanomaterials, 2021. **11**(12): p. 3411.
6. Carter, P., S.M. Rahman, and N. Bhattarai, *Facile fabrication of aloe vera containing PCL nanofibers for barrier membrane application.* Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2016. **27**(7): p. 692-708.
7. Mochane, M.J., et al., *Morphology and Properties of Electrospun PCL and Its Composites for Medical Applications: A Mini Review.* Applied Sciences, 2019. **9**(11): p. 2205.
8. Al-Baadani, M.A., et al., *Co-electrospinning polycaprolactone/gelatin membrane as a tunable drug delivery system for bone tissue regeneration.* Materials & Design, 2021. **209**: p. 109962.
9. Hoang Thi, T.T., et al., *The Importance of Poly(ethylene glycol) Alternatives for Overcoming PEG Immunogenicity in Drug Delivery and Bioconjugation.* Polymers, 2020. **12**(2): p. 298.
10. D'souza, A.A. and R. Shegokar, *Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications.* Expert opinion on drug delivery, 2016. **13**(9): p. 1257-1275.
11. Scaffaro, R., et al., *Electrospun PCL/GO-g-PEG structures: Processing-morphology-properties relationships.* Composites Part A: Applied Science and Manufacturing, 2017. **92**: p. 97-107.
12. Repanas, A., et al. *Pcl/Peg Electrospun Fibers as Drug Carriers for the Controlled Delivery of Dipyridamole*. 2015.
13. Ravikumar, R., et al., *Tetrahydro curcumin loaded PCL-PEG electrospun transdermal nanofiber patch: Preparation, characterization, and in vitro diffusion evaluations.* Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2018. **44**: p. 342-348.
14. Rahmati, N., N. Eslahi, and A. Rashidi, *Antibacterial finishing of cotton with silk hydrogel and chamomile extract.* Journal of Textile Science and Technology, 2022: p. -.
15. Motealleh, B., et al., *Morphology, drug release, antibacterial, cell proliferation, and histology studies of chamomile-loaded wound dressing mats based on electrospun nanofibrous poly(ε-caprolactone)/polystyrene blends.* J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2014. **102**(5): p. 977-87.
16. Mirnezami, M., et al., *Investigation on the Effect of 7% Chamomile Extract on Cutaneous Side Effects of Minoxidil in Treatment of Male Androgenetic Alopecia.* Journal of Arak University of Medical Sciences, 2019. **22**(5): p. 124-135.
17. Najafi, S., et al., *Study on release of cardamom extract as an antibacterial agent from electrospun scaffold based on sodium alginate.* The Journal of The Textile Institute, 2021. **112**(9): p. 1482-1490.
18. Parlinska-Wojtan, M., et al., *Green synthesis and antibacterial effects of aqueous colloidal solutions of silver nanoparticles using camomile terpenoids as a combined reducing and capping agent.* Bioprocess and biosystems engineering, 2016. **39**(8): p. 1213-1223.