



بررسی ویژگی‌های فیزیکومکانیکی، شیمیایی و آنتی‌اکسیدانی فیلم بر پایه کیتوزان حاوی نانولیپوزوم‌های حامل عصاره پوست سبز پسته

محمد برزگر قاسمی، تیوا کفیلی*

گروه علوم و صنایع غذایی، واحد بویین زهرا، دانشگاه آزاد اسلامی، بویین زهرا، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۵/۱۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۰۵

چکیده

سابقه و هدف: در دهه اخیر تولید فیلم‌های فعال زیستی حاوی ضایعات ارزان قیمت کشاورزی بدلائیل ملاحظات محیطی، اقتصادی و سلامتی مورد توجه محققان بسیاری قرار گرفته است. در این تحقیق ضمن تولید یک فیلم طبیعی زیست سازگار بر پایه کیتوزان، تأثیر دو شیوه متفاوت نشان دادن لیپوزم حاوی عصاره پوست سبز پسته بر ویژگی‌های فیزیکومکانیکی، شیمیایی و آنتی‌اکسیدانی و نحوه رهایش ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: ترکیبات فنلی پوست سبز پسته پس از استخراج و خالص‌سازی در لیپوزوم‌ها ریزپوشانی شدند. ده نمونه فیلم بر پایه کیتوزان حاوی درصدهای مختلف (۰، ۱، ۱/۵ و ۲) نانولیپوزوم حاوی ۱۰۰۰ ppm عصاره پوست سبز پسته تولید شد. نانولیپوزوم‌ها به دو صورت لایه‌ای و آمیخته در بافت فیلم تلقیح شدند. محتوای فنل تام عصاره، ابعاد لیپوزوم، کارایی ریزپوشانی، مقاومت مکانیکی، مدول الاستیسیته، ویژگی‌های نوری، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوری و نحوه رهایش عصاره پوست سبز پسته از نمونه‌های فیلم مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد با وجود مقاومت مکانیکی مطلوب نمونه فیلم‌های تولید شده، فیلم‌های دارای ۱/۵ و ۲ درصد لیپوزوم بویژه نوع تلقیح شده با لیپوزوم به‌روشن آمیخته، بطور معنی‌دار قدرت مکانیکی بالاتری داشتند. نتایج بررسی ظرفیت آنتی-اکسیدانی نشان داد که فیلم‌های حاوی ۱/۵ و ۲ درصد لیپوزوم دارای بالاترین قدرت آنتی‌اکسیدانی وابسته به غلظت بودند. بررسی و مقایسه طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوری نشان داد پیک‌های حاصله با پیک‌های اختصاصی ترکیبات سازنده فیلم مطابقت داشتند. همچنین پیوند الکتروستاتیک کیتوزان و کربوکسی متیل سلولز قابل تشخیص بود. مقایسه پیک فیلم‌های حاوی لیپوزوم و شاهد حاکی از عدم برهم‌کنش میان ترکیبات فیلم و لیپوزوم بود. تفاوت معنی‌داری در داده‌های نوری مشاهده نشد و با افزایش درصد لیپوزوم‌ها در بافت شفافیت فیلم کاهش نیافت. آزمون رهایش، تشابه نسبی کینتیک رهایش فیلم حاوی عصاره آزاد و فیلم دارای لیپوزوم‌های سطحی را نشان داد. این امر تأییدی بر رهایش بدون تأخیر ترکیبات فعال در بستر پلیمری بود.

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت با وجود این‌که نمونه فیلم حاوی ۲ درصد لیپوزوم تلقیح شده در هر دو روش لایه‌ای و آمیخته دارای بالاترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و مقاومت مکانیکی بودند، اما نمونه فیلم حاوی لیپوزوم‌های سطحی دارای کینتیک رهایش بدون تأخیر و کارآمدتر آنتی‌اکسیدان‌ها بود. بنابراین روش بررسی شده در این تحقیق می‌تواند برای تولید یک فیلم فعال زیست تخریب پذیر پیشنهاد و به‌کار گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: پوست سبز پسته، فیلم فعال، آنتی‌اکسیدان، ویژگی‌های مکانیکی، نانولیپوزوم

مقدمه

به کارگیری فیلم‌ها و پوشش‌های آنتی‌اکسیدانی خوراکی به‌عنوان یک تکنولوژی زیست‌سازگار با استفاده از ترکیبات با درجه غذایی و در شکل بسته‌بندی فعال در افزایش ماندگاری مواد مختلف غذایی و جلوگیری از خشک شدن و تندشدگی اکسایشی کاربرد دارد (۶). آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیبات فنولی طبیعی یا مصنوعی هستند که اغلب با اهدای هیدروژن از اکسیداسیون و تخریب مواد غذایی جلوگیری کرده و یا روند آن را آهسته کرده و باعث افزایش ماندگاری می‌شوند (۳۹). در حال حاضر استفاده از عصاره طبیعی برخی گیاهان و ضایعات کشاورزی به‌عنوان یک منبع طبیعی و ارزان قیمت آنتی‌اکسیدان به‌عنوان جایگزین آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی مورد توجه محققین دارویی و غذایی قرار گرفته است (۴۴، ۴۲، ۲۴، ۱۱، ۲، ۱). پسته یکی از محصولات ارزشمند کشاورزی است که در کشورهای محدودی مانند ترکیه، یونان، آمریکا و ایران تولید می‌شود. پوست سبز پسته از محصولات جانبی این فرآورده است که در مقادیر زیاد تولید شده و در حال حاضر مورد کاربری اقتصادی خاصی قرار ندارد (۱۴). مقدار قابل توجه ترکیبات فنولی با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و ضدسرطانی این فرآورده مانند اسیدگالیک^۱، اسید۴-هیدروکسی بنزوئیک اسید^۲، پروتوکاتشیک اسید^۳، گلوکوزید اریودیکتیول^۴، ایزورامنتین^۵، روتینوزید^۶، کوئرستین^۷، نارینجین^۸ و کاتشین^۹ مورد شناسایی قرار گرفته است (۳۱، ۱۳). اما

از محدودیت‌های کاربرد این عصاره غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان در حفاظت مواد غذایی، طعم بد این ترکیبات و تأثیر نامطلوب بر ویژگی‌های حسی مواد غذایی، برهمکنش با ترکیبات مواد غذایی، زیست-دسترسی زیستی پایین به دلیل آسیب‌پذیر بودن نسبت به عوامل محیطی و داخلی دستگاه گوارش و حلالیت پایین آنها است (۳۵). برای غلبه بر این محدودیت‌ها برخی محققان امکان ممزوج نمودن مقادیر اندک آن را در بسته‌بندی‌های زیست‌تخریب‌پذیر پیشنهاد نموده‌اند تا از مصرف مستقیم مقادیر زیاد آنتی‌اکسیدان اجتناب شود (۳۱، ۳۲). همچنین ریزپوشانی این ترکیبات برای رفع محدودیت‌های ذکر شده بویژه بالا بردن قابلیت زیستی و محافظت از شرایط محیطی توسط رفیعی و همکاران (۲۰۱۷) با موفقیت مورد آزمون قرار گرفته و گزارش شد (۳۲، ۳۱). نانوحامل‌ها به‌عنوان روش ریزپوشانی جدید یکی از بهترین راه‌های افزایش قابلیت زیستی ترکیبات فنولی و سایر ترکیبات زیست‌فعال مطرح شده‌اند (۳).

لیپوزوم‌ها در دو دهه اخیر مورد توجه بسیاری از محققین خصوصاً محققین دارویی قرار گرفته‌اند. چربی‌های قطبی در تماس با محیط آبی به‌طور خودبخودی یک محفظه بنام لیپوزوم را شکل می‌دهند که از لحاظ ترمودینامیکی پایدار بوده و عمدتاً دارای قطر ۲۰ نانومتر تا ۱۰ میکرومتر است. این ساختار دارای ویژگی بی‌نظیر حمل همزمان ترکیبات فعال آب‌گریز و آب‌دوست است. باردار بودن و ویژگی‌های سطحی لیپوزوم‌ها موجب پایداری آنها در حین نگهداری و آزادسازی کنترل شده ترکیبات فعال می‌شود. لستین به‌دلیل در دسترس بودن، قیمت مناسب و طبیعی بودن گزینه مناسبی برای تولید این ساختارها در مقیاس صنعتی و مصارف غذایی است (۲۹). تا کنون محققان ترکیبات فعال متنوعی را در لیپوزوم‌ها ریزپوشانی نموده و

1. Gallic acid
2. Hydroxyl benzoic acid
3. Protocatechuic acid
4. Eriodictol glucoside
5. Isorhamnetin
6. Rotinoside
7. Quercetin
8. Naringin
9. Catechin

قزوین برای استخراج عصاره فنلی آسیاب و غربال شد. پوست سبز پسته خشک شده قبل از انجام آزمون ابتدا در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. کلیه مواد شیمیایی از نمایندگی مرک آلمان خریداری شدند.

استخراج و خالص سازی عصاره: پوست سبز پسته خشک واریته فندق قزوین، آسیاب و با مش شماره ۱ (۲-۰/۵ mm) غربال شد. ۱ گرم پودر با ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر و به مدت ۸ ساعت در دمای محیط با همزن (شیمی آزما، ایران) مخلوط شد. سپس عصاره با کاغذ واتمن شماره ۱ فیلتر شد. جهت جداسازی قندها و پروتئین‌ها از عصاره طبق روش پیشنهادی رفیعی و همکاران (۲۰۱۷) از روش استخراج فاز جامد و کارتریج C18 Cep (اسپانیا) استفاده شد (۳۱).

تعیین محتوای تام فنلی: این روش به روش معادل اسیدگالیک نیز شهرت دارد و اساس آن احیا معرف فولین توسط ترکیبات فنلی در محیط قلیایی و ایجاد کمپلکس آبی رنگ با حداکثر جذب در طول موج ۷۶۰ نانومتر است. از آنجا که قندها و اسیدهای آلی می‌توانند با محلول فولین سیوکالتو واکنش نشان داده و در گزارش میزان ترکیبات فنولی اختلال ایجاد کنند، در این تحقیق از عصاره خالص استفاده شد. به‌طور خلاصه ۲۰ میکرولیتر از محلول عصاره با ۱/۱۶۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف مخلوط شدند. ۳۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم ۲۰ درصد پس از چند دقیقه اضافه شد و میزان جذب در ۷۶۰ نانومتر و با اسپکتروفتومتر UV-visible (Jenway، انگلیس) خوانده شد. منحنی استاندارد اسید گالیک تهیه شد و با قرار دادن میزان جذب خوانده شده در معادله خطی منحنی استاندارد مقدار فنل تام موجود در عصاره

حفاظت و افزایش عملکرد آنها را مورد بررسی قرار داده و گزارش نمودند. از این دسته مطالعات می‌توان به ریزپوشانی عصاره سیر توسط پینیلا و همکاران (۲۰۱۷)، ترکیبات فنلی پوست سبز پسته^۱ (PGHE) توسط رفیعی و همکاران (۲۰۱۷)، فلاونوئیدهای محلول در آب (پیکنوژنول‌ها) توسط ساترس و همکاران (۲۰۱۱) در لیپوزوم‌ها اشاره کرد که در تمامی موارد حفاظت و افزایش عملکرد ترکیبات موثره گزارش شد (۲۹، ۳۱، ۳۹). تولید و بررسی فیلم‌های فعال حاوی آنتی‌اکسیدان توسط کوید و شی (۲۰۰۷)، اوجاگ و همکاران (۲۰۱۰)، پراناتو و همکاران (۲۰۰۵) و تاجیک و همکاران (۲۰۱۳) نیز تاثیر بسزای این نوع بسته‌بندی در افزایش ماندگاری محصولات را نشان داد (۱۹، ۲۷، ۳۰ و ۴۰). اما برخی محققان به محدودیت‌های ریزپوشانی مواد فعال و آنتی‌اکسیدان‌ها در انواع پوشینه‌ها و نانولیپوزوم‌ها و درگیری آن‌ها در ماتریکس فیلم‌های پلیمری و تأخیر رهایش اشاره نمودند که موجب مختل شدن نقش حفاظت و افزایش ماندگاری آنها شده است (۱۶، ۲). با این حال ویژگی‌های انواع فیلم‌های پلیمری حاوی نانوحامل‌های ترکیبات زیستی و چگونگی رهایش ترکیبات آن‌چندان مورد مطالعات دقیق قرار نگرفته است (۳). هدف پژوهش حاضر تولید فیلم طبیعی برپایه کیتوزان حاوی نانولیپوزوم‌های حامل عصاره پوست سبز پسته و بررسی تاثیر دو روش متفاوت امتزاج لیپوزوم‌ها در فیلم (نشان دادن سطحی و روش آمیختن در بافت) بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، نوری، مکانیکی، طیف‌سنجی مادون قرمز فیلم و بویژه نحوه رهایش ترکیبات فعال فنلی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه: پوست سبز پسته خشک واریته فندق

1. Pistachio green hall extract

نشده، اندازه‌گیری و درصد ریزپوشانی محاسبه شد (۳۵).

تهیه نمونه‌های فیلم: ۱۰ نمونه فیلم بر پایه کیتوزان و کربوکسی متیل سلولز و گلیسرول به‌عنوان ریخت پذیر کننده با استفاده از معلقه ۲ درصد کیتوزان (وزنی/حجمی) در اسید استیک ۱ درصد (حجمی/حجمی) در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و بمدت ۲ ساعت در همزن مغناطیسی تهیه شد. معلقه حاصله از کاغذ واتمن شماره ۳ عبور داده شد تا ذرات حل نشده حذف شوند. گلیسرول به مقدار ۲۵ درصد (وزنی/وزنی) پودر کیتوزان اضافه شد و سپس معلقه مجدداً در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد. محلول در دمای اتاق خشک شد و سپس عصاره کپسوله شده و عصاره آزاد در غلظت‌های ۰، ۱، ۱/۵، ۲ درصد (حجمی/حجمی) در نمونه‌های فیلم اضافه شدند و با سرعت ۳۰۰ rpm به‌مدت ۱ ساعت توزیع شد. برای تهیه ضخامت یکسان فیلم‌ها مقدار ۴۰ میلی‌لیتر در پتری دیش با قطر ۱۰ سانتیمتر ریخته شده و به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد خشک شد. جهت تهیه فیلم حاوی لیپوزوم سطحی نیز بطور مشابه نمونه‌های فیلم بدون اضافه کردن لیپوزوم تهیه شد اما پس از ۴۸ ساعت و جامد شدن نسبی فیلم، غلظت ۰، ۱، ۱/۵ و ۲ درصد (حجمی/حجمی) لیپوزوم همراه ۱ میلی‌لیتر آب مقطر بصورت یکنواخت بر روی نمونه‌های فیلم و با استفاده از حرکات چرخشی پلیت پخش شد تا در طی ۲۴ ساعت کاملاً جذب سطح فیلم گردد. ضخامت فیلم‌های خشک شده با میکرومتر (Links 702-01, China) اندازه‌گیری شد. کلیه نمونه‌های فیلم قبل از انجام آزمایشات در ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در رطوبت نسبی ۵۰ درصد در محلول اشباع نیترات منیزیم شش‌آبه مشروط گردیدند.

محاسبه شد. داده‌ها بر اساس معادل میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم عصاره بیان شدند (۴۱).

تهیه نانولیپوزوم‌های حاوی مواد فعال: برای تهیه نانولیپوزوم‌های حامل عصاره از روش آبدهی لایه نازک و امواج فراصوت استفاده شد. ۲ گرم لیستین به ۵۰ میلی‌لیتر محلول دی‌کلرومتان:متانول (۱:۱) و در بالن ته گرد ۱۰۰ میلی‌لیتری اضافه و حل شد. حلال آلی در دستگاه تبخیرکننده چرخان تحت خلأ حذف شد تا یک لایه نازک بر دیواره بالن تشکیل شود. فیلم لیپیدی در ۳۸ میلی‌لیتر آب مقطر حاوی ۱۰۰۰ ppm عصاره حل و به‌مدت ۳۰ دقیقه در هم‌زن‌سایزر (T10-basic, IKA, Germany) مخلوط شد. سپس سوسپانسیون لیپوزومی بصورت ۵ سیکل یک دقیقه‌ای در سونیکاتور (Q 55 Sonicator, Germany) قرار داده شد (۴۴).

اندازه ذرات و اندازه‌گیری پتانسیل زتا و کارایی ریزپوشانی: اندازه متوسط ذرات، پتانسیل زتا یا بار سطحی لیپوزوم‌های حاوی ۱۰۰۰ ppm عصاره پوست سبز پسته با استفاده از روش پراکنندگی نور دینامیکی (Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern instruments, England) مورد بررسی قرار گرفت. لیپوزوم‌های تولید شده ابتدا با آب دیونیزه شده تا ۲۰ برابر رقیق شدند و اندازه‌گیری در سه تکرار و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. بر اساس نتایج مطالعه پیشین کوچکترین و پایدارترین لیپوزوم‌ها در این غلظت تولید شده است (۳۱). جهت تعیین کارایی ریزپوشانی و برای جداسازی عصاره ریزپوشانی نشده معلقه لیپوزوم به‌مدت ۱ ساعت در سانتریفوژ یخچال دار با دور ۶۵۰۰ g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و میزان ترکیبات فنلی با استفاده از روش فولین سیوکالتو در معلقه اولیه و روماندا^۱ بارگذاری

1. Supernatant

ترولوکس استاندارد نیز با غلظت ۱۵ میکرو مول تهیه شد. منحنی استاندارد با استفاده از ترولوکس استاندارد در غلظت بین ۷۵ و ۱۰۵۰ میکرومول رسم شد و با قرار دادن میزان جذب خوانده شده در معادله خطی منحنی استاندارد ظرفیت آنتی‌اکسیدانی فیلم برحسب میکرومول قدرت آنتی‌اکسیدانی معادل توروکس^۱ (TEAC) در گرم فیلم گزارش شد (۱۴).
طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه:
 اسپکتروسکوپی مادون قرمز برای مطالعه برهمکنش بین ترکیبات فیلم کاربرد دارد. آزمون در ۲۵ درجه سانتی‌گراد توسط اسپکتروفتومتر (Bruker, Germany) FTIR در محدوده عدد موجی $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ انجام شد.

رنگ سنجی: برای ارزیابی میزان شفافیت از دستگاه هانتربل در سه نقطه حاشیه و یک نقطه مرکز فیلم استفاده شد. ابتدا دستگاه با یک صفحه سفید کالیبره شد و سپس مقادیر L^* (میزان روشنایی)، a^* (تمایل به قرمزی) و b^* (تمایل به رنگ زرد) اندازه‌گیری شد. سایر پارامترها با استفاده از رابطه ۲ و ۳ تعیین گردیدند (۱).

$$\text{رابطه ۲. } WI = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}}$$

$$\text{رابطه ۳. } \Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

آزمون رهائش و تعیین میزان عصاره رها شده: برای ارزیابی رهائش عصاره آبی پوست سبز پسته از آب به عنوان محیط شبیه‌ساز استفاده شد. فیلم‌های کیتوزان حاوی بالاترین میزان غلظت عصاره ریزپوشانی شده در سطح فیلم و عصاره‌های ریزپوشانی شده ممزوج در فیلم برای مقایسه نحوه رهائش ماده موثره مورد آزمایش قرار داده شد. نمونه‌های فیلم در ابعاد 4×2 سانتی‌متر در لوله‌های آزمایش ۱۰ میلی‌لیتری کاملاً در آب غوطه‌ور و به مدت ۱۰ روز در تاریکی

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم: فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌ها با استفاده از دو روش شیمیایی DPPH و ABST تعیین شد (۲۶). بطور خلاصه ۱۰۰ میلی‌گرم از فیلم همگن شده با ۵ میلی‌لیتر اتانول به مدت ۵ دقیقه در ۱۱۰۰۰ دور هموژن و پس از سانتریفیوژ (Hettich, آلمان) در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰۰ g با کاغذ واتمن شماره ۱ فیلتر شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول یک دهم متانول با ۲/۹ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ میلی‌مولار DPPH (سیگما آلد ریچ، آمریکا) در اتانول اضافه شد. مخلوط کاملاً هم‌زده شد و در تاریکی به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. میزان جذب در ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد. آزمون سه بار تکرار شده و نتایج بصورت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی فیلم (درصد فعالیت جذب رادیکال بر میلی‌گرم از فیلم) گزارش شد. میزان درصد به‌دام اندازی رادیکال آزاد با استفاده از رابطه ۱ و تفاوت میزان جذب نمونه (Abs_{sample}) و جذب نمونه کنترل (Abs_{blank}) نسبت به جذب نمونه کنترل محاسبه شد: رابطه ۱.

$$\text{DPPH } (\%) = \frac{(\text{Abs}_{\text{blank}} - \text{Abs}_{\text{sample}}) / \text{Abs}_{\text{blank}}}{100}$$

محلول ذخیره رادیکال ABST نیز از برهمکنش محلول ABST ۷ میلی‌مولار با ۲/۴۵ میلی‌مولار پتاسیم پرسولفات تهیه شد که قبل از استفاده به مدت ۱۶-۱۲ ساعت در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری شده بودند. محلول ذخیره با اتانول ۹۶ درصد برای به‌دست آوردن میزان جذب 0.7 ± 0.3 در ناحیه ۷۳۴ نانومتر تنظیم شد. ۶۰ میکرولیتر از محلول رقیق شده ۰/۱ محلول اتانول حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم فیلم با ۲۹۴ میکرولیتر از محلول حاوی رادیکال ABST⁺ هم‌زده شد. میزان جذب پس از ۷ دقیقه توسط اسپکتروفتومتر مرئی-فرا بنفش خوانده شد. محلول

رفیعی و همکاران (۲۰۱۷) بود (۳۱). رجایی و همکاران در سال ۲۰۱۰ (۴۹/۳۲ GAE/mg) ماده خشک واریته احمد آقایی) و گلی در سال ۲۰۰۵ (۳۴/۷ GAE/mg) ماده خشک واریته فندقی) را گزارش نمودند (۳۲). تفاوت در اعداد گزارش شده را علاوه بر مقیاس متفاوت (وزن خشک یا وزن مرطوب) می‌توان ناشی از واریته، نوع حلال و نحوه انجام فرآیند استخراج، دما و زمان استخراج، زمان برداشت و ناحیه جغرافیایی دانست.

تعیین اندازه لیپوزوم و اندازه‌گیری پتانسیل زتا

و کارایی ریزپوشانی: قطر متوسط لیپوزوم‌های حاوی ۱۰۰۰ ppm عصاره پوست سبز پسته 2 ± 0 و $5/183$ نانومتر و میزان پتانسیل زتا $1/0 \pm 35/3$ میلی‌ولت اندازه‌گیری شد (شکل ۱). این نتیجه مشابه نتایج رفیعی و همکاران (۲۰۱۷) است که با مطالعه بین غلظت ترکیبات فنلی PGHE و فسفولیپیدها کوچکترین و در نتیجه پایدارترین لیپوزوم‌ها را در غلظت ۱۰۰۰ ppm و با قطر $3/175 \pm 0$ نانومتر تولید نمودند (۳۱). در پتانسیل زتا بالاتر از ۲۵- میلی‌ولت میزان دافعه کافی و در نتیجه پایداری مطلوب برای نانولیپوزوم‌ها فراهم خواهد شد (۴۳، ۱۰). همچنین رمضان زاده و همکاران (۲۰۱۷) اعلام نمودند قرارگیری لیپوزوم‌ها در ماتریکس کیتوزان می‌تواند موجب افزایش قابل توجه پتانسیل زتای نانوحامل‌ها شود (۳۴). بنابراین نانولیپوزوم‌های تولید شده در این مطالعه با توجه به میزان پتانسیل زتا و قرارگیری در ماتریکس کیتوزان دارای پایداری مطلوب خواهد بود. راندمان ریزپوشانی نیز $15/61 \pm 0$ درصد اندازه‌گیری شد. در تطابق با نتایج پژوهش حاضر، بر اساس یافته‌های کای و همکاران (۲۰۱۸) و نورونها و همکاران (۲۰۱۴) لیپوزوم‌های تولید شده با قطر کمتر از ۲۰۰ نانومتر می‌توانند دارای راندمان ریزپوشانی بالایی باشند (۱۰، ۳۱، ۲۶). در این پژوهش

و کاملاً غیرقابل نفوذ در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. لوله‌های آزمایش هر روز به‌طور دستی تکان داده می‌شد. پس از ۶، ۱۲، ۲۴، ۷۲، ۱۲۰، ۱۴۰ و ۱۶۰ ساعت میزان Mt (غلظت عصاره در زمان‌های ذکر شده) در طول موج ۷۶۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی - فرابنفش (Unico, 2100, USA) بر اساس معادله استاندارد تعیین شد. در نهایت نسبت غلظت عصاره به غلظت عصاره در زمان تعادل Mt/M_{∞} در برابر زمان رسم شد (۲).

مقاومت مکانیکی فیلم: جهت آزمون مقاومت کششی، مدول الاستیسیته و میزان افزایش طول قبل از گسیختگی فیلم از دستگاه آنالیز بافت (یونیورسال TA-XT2، آمریکا) و طبق استاندارد جهانی ASTM D882 (۲۰۰۱) استفاده شد (۳۸). فیلم‌ها در ابعاد $2/5$ در ۱۰ سانتی‌متر بریده شده و با اندازه‌گیری ضخامت و داده‌های منحنی نیرو-فاصله و در سه تکرار مدول الاستیسیته و میزان افزایش طول قبل از گسیختگی محاسبه و گزارش شد. سرعت دستگاه کشش تا زمان گسیخته شدن ۵۰ میلی‌متر بر دقیقه بود (۳۸).

طرح آماری: آزمون‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و در حداقل سه تکرار انجام شد. آنالیز بر اساس طرح فاکتوریل و آنالیز واریانس یکطرفه صورت گرفت. تحلیل اطلاعات با استفاده از SPSS 16 و شاخص حداقل اختلاف معنی‌دار^۱ (LSD) برای تأیید وجود اختلاف بین میانگین‌ها در سطح معنی‌دار $P \leq 0/05$ انجام گرفت.

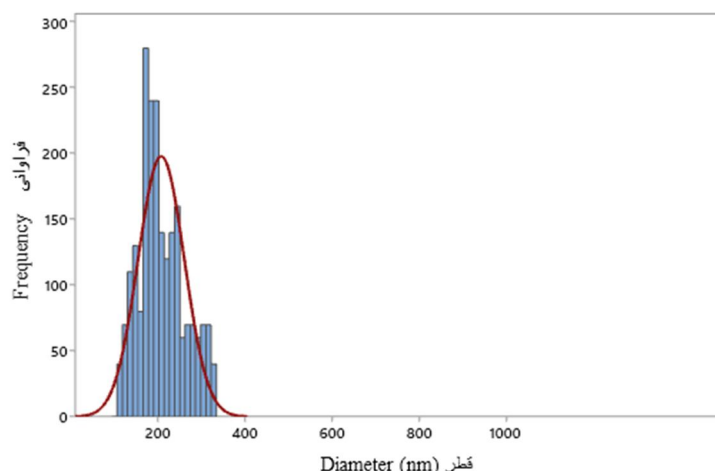
نتایج و بحث

محتوای تام فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی PGHE: میزان محتوای تام فنلی عصاره خالص شده mg $417/81$ GAE/gfw محاسبه شد. این میزان کمتر از مقدار گزارش شده (۶۱۴/۹۱ mg GAE/gfw) توسط

1. Least significant difference
2. Gallic acid equivalent

آزمون‌های بعدی انتخاب شدند.

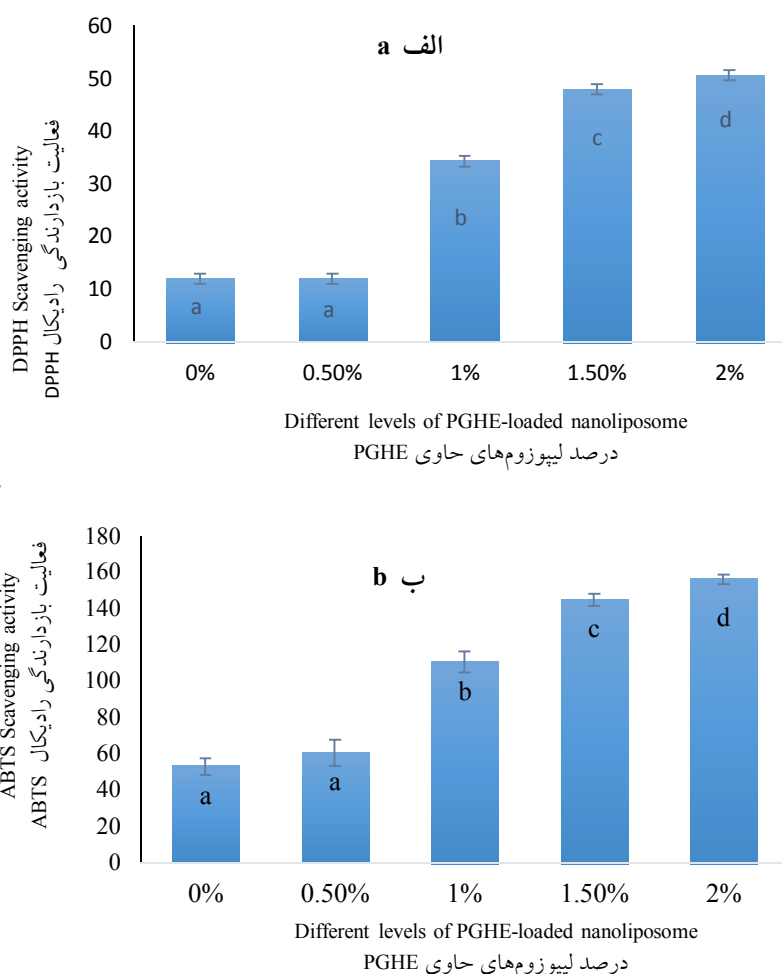
لیپوزوم تولید شده با اندازه کوچک، پتانسیل زتا و راندمان ریزپوشانی بالا برای مراحل و



شکل ۱- منحنی توزیع فراوانی قطر نانولیپوزوم‌ها به روش پراکنده‌گی نور دینامیکی
Figure 1. Nanoliposome size distribution by dynamic light scattering (DLS)

غلظت‌های بیشتر لیپوزوم حاوی آنتی‌اکسیدان به نسبت غلظت‌های کمتر دارای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری بودند. روند نسبتاً مشابهی در افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس بازدارندگی رادیکال ABTS مشاهده شد. افزایش بیشتر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس بازدارندگی رادیکال DPPH و ABTS در فیلم حاوی نانولیپوزوم در غلظت‌های بالاتر (۱/۵ و ۲ درصد) نسبت به غلظت‌های پایین‌تر احتمالاً به دلیل اثر هم‌افزایی کاهندگی کیتوزان و عصاره پوست سبز پسته است. نورونها و همکاران (۲۰۱۴) نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی در فیلم‌های خوراکی متناسب با میزان آنتی‌اکسیدان افزوده شده گزارش کرد (۲۶). بر خلاف نتایج بدست آمده، مرادی و همکاران (۲۰۱۰) تفاوت معنی‌داری در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی فیلم با افزودن عصاره هسته انگور مشاهده نکردند (۲۲).

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی فیلم: در شکل ۲ فعالیت بازدارندگی رادیکال‌های DPPH و ABTS (ظرفیت آنتی‌اکسیدانی) در فیلم با درصدهای مختلف لیپوزوم حاوی PGHE (صرفنظر از نحوه بارگذاری که با توجه به شرایط تهیه نمونه تأثیری در نتایج نخواهد داشت) و شاهد نشان داده شده است. بر اساس نتایج شکل ۲ فیلم عاری از لیپوزوم بارگذاری شده نیز ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی از خود نشان داده است که علت آن می‌تواند مربوط به فعالیت آنتی‌اکسیدانی ذاتی ترکیب فیلم خوراکی باشد (۴۵). آرژنت و همکاران (۲۰۱۶) و مرادی و همکاران (۲۰۱۰) نیز ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی کیتوزان را گزارش نموده و آن را به قابلیت برهم‌کنش آمین‌های آزاد کیتوزان با رادیکال‌های آزاد درشت مولکول‌ها نسبت دادند (۴، ۲۲). همچنین دیده می‌شود در آزمون درصد فعالیت بازدارندگی رادیکال DPPH، فیلم‌های حاوی



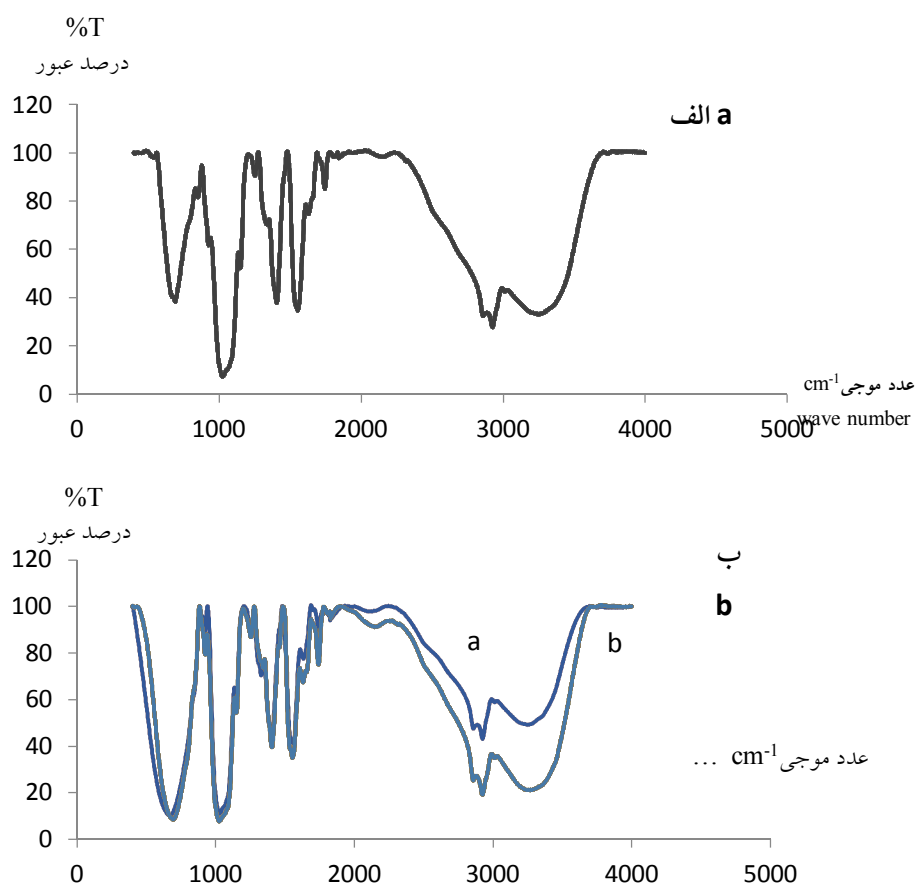
شکل ۲- (الف) فعالیت بازدارندگی رادیکال DPPH (درصد) و (ب) بازدارندگی رادیکال ABTS فیلم‌های حاوی درصد‌های مختلف لیپوزوم حامل PGHE. حروف مختلف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است.

Figure 2. (a) DPPH (a) and ABTS (b) free radical scavenging activity of film samples incorporated with different levels of PGHE-loaded nanoliposome. Different letters indicate statistically significant differences

بدلیل برهمکنش بین پلیمرهای ناهمگون، طیف حاصل وابسته به طیف اختصاصی ترکیبات مختلف پلیمرها است (۲۸). در این مطالعه جهت بررسی برهمکنش بین لیپوزوم و کیتوزان و پلیمر کربوکسی متیل سلولوز از طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه استفاده شده است. طیف FTIR فیلم عاری از نانولیپوزوم (شکل ۳- الف) و فیلم دارای ۲ درصد لیپوزوم سطحی حاوی عصاره و فیلم دارای ۲ درصد لیپوزوم ممزوج شده حاوی عصاره (شکل ۳- ب) نشان داده شده است.

فعالیت بالای آنتی‌اکسیدانی DPPH با افزودن آلفاتوکوفرول در ۱۰۰ میلی‌گرم بیوفیلیم مورد تحقیق برابر ۹۰/۴۳ درصد (نورون‌ها و همکاران، ۲۰۱۴) و ۹۷/۷۱ درصد (مارتینز و همکاران، ۲۰۱۲) گزارش شد. این تفاوت در قدرت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌های خوراکی می‌تواند به نوع و میزان ماده آنتی‌اکسیدان مورد استفاده و نیز ویژگی آنتی‌اکسیدانی ذاتی ترکیبات فیلم مربوط باشد (۲۱، ۲۶).

تحلیل آزمون تبدیل فوریه مادون قرمز: طیف FTIR بطور گسترده‌ای برای بررسی برهم‌کنش بین ترکیبات بویژه پیوندهای هیدروژنی استفاده می‌شود.



شکل ۳- طیف FTIR نمونه فیلم شاهد فاقد عصاره (الف) و مقایسه طیف فیلم‌های شاهد و فیلم دارای ۲ درصد لیپوزوم حاوی

عصاره و فیلم دارای ۲ درصد سطحی در فیلم (ب) ۲ درصد لیپوزوم آمیخته در فیلم (ب)

Figure 3. FTIR spectra of film sample without extract (control). Comparison of FTIR spectra of control film containing 2% surfaced liposome (a) and film sample containing 2% dispersed liposome (b)

کربوکسیل (۱۶۵۳ به ۱۶۲۹) می‌تواند مربوط به پیوند الکتروستاتیک بین مولکول‌های کیتوزان با بار مثبت و بار منفی کربوکسی‌متیل سلولوز باشد. چنین نتایج مشابهی توسط چاندراروی و همکاران (۲۰۱۸) گزارش شده است (۸). تشکیل پیک جدید در ناحیه ۲۹۲۴ می‌تواند به دلیل تشکیل پیوند آمیدی جدید بین NH_2 کیتوزان و گروه کربوکسیل اسیداستیک (اسید مورد استفاده برای انحلال کیتوزان) باشد (۸). در شکل ۳-ب آنالیز FTIR فیلم‌های دارای ۲ درصد (بیشترین غلظت) نانولیپوزوم حاوی ۱۰۰۰ ppm عصاره خالص PGHE شده ممزوج شده داخل فیلم و لایه گذاری شده در سطح فیلم مقایسه شده است.

در شکل ۳-الف پیک‌های ظاهر شده با پیک‌های اختصاصی ترکیبات مورد استفاده در فرمولاسیون فیلم مطابقت دارد. برای مثال پیک‌های جذبی مربوط به فیلم کیتوزان شامل یک پیک عریض cm^{-1} ۳۰۰۰- ۳۵۰۰ به ترتیب مربوط به پیوندهای ارتعاشی کششی N-H^1 و پیوند هیدروژنی بین مولکولی $\text{OH}\cdots\text{O}$ مولکول‌های کیتوزان است. جابجایی‌های دیده شده در برخی پیک‌ها نشان‌دهنده برهم‌کنش‌های احتمالی بود. برای مثال تغییرات مربوط به کاهش عدد موجی مربوط به عامل آمین (۱۵۶۰ به ۱۵۵۳) و گروه

1. Stretching vibration

(جدول ۱) نشان داد هیچ تغییر معنی‌داری بین میانگین نتایج شاخص‌های نوری وجود ندارد. این نتیجه با مشاهدات مرادی و همکاران (۲۰۱۰) پیرامون کاهش شفافیت فیلم با تزریق عصاره خام دانه انگور مطابقت ندارد (۲۲). این مسأله می‌تواند بدلیل استفاده از عصاره خالص و حذف ترکیبات رنگی و استفاده از عصاره خام حاوی ترکیبات رنگی در سایر مطالعات باشد. همچنین سایر محققین نیز در غلظت‌های بالاتر از ۱۰ درصد فسفولیپید کاهش شفافیت فیلم را گزارش نمودند (۲۹). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت افزودن عصاره خالص شده و غلظت کم فسفولیپید اضافه شده (۲ درصد) تغییری در شاخص‌ها و ویژگی‌های نوری فیلم ایجاد نکرد.

چنانچه دیده می‌شود پیک‌ها عمدتاً بدون تغییر و با جابجایی ناچیز در عدد موجی ظاهر شده‌اند. عدم ظهور پیک‌های اختصاصی مربوط به PGHE (۱۶۱۰) و (۱۵۰۸، ۱۰۲۹) می‌تواند نشان دهنده بارگذاری این ترکیبات در داخل لیپوزوم باشد. رفیعی و همکاران (۲۰۱۷) نیز نتایج مشابهی را گزارش و چنین تفسیری را ارائه نمودند (۳۱). همچنین ثابت بودن تقریبی طیف می‌تواند نشان دهنده فقدان برهم‌کنش بین نانولیپوزوم‌ها و ماتریکس فیلم در هر دو روش تزریق لیپوزوم (آمیخته و پخش لایه‌ای) باشد. این آزمون برای غلظت‌های کمتر لیپوزوم تکرار نشد. اندازه‌گیری رنگ: نتایج حاصل از بررسی‌های آماری

جدول ۱- شاخص‌های رنگی نمونه‌های فیلم. S: سطحی، D: آمیخته

Table 1. Color index / optical data in film samples. S: surfaced D: Dispersed

تغییرات کلی رنگ ΔE	شاخص سفیدی WI	درصد لیپوزوم حاوی عصاره
Total color changes	Whiteness index	The percentage of loaded liposome
68.55±1.54	62.75± 2.34	عاری از لیپوزوم (کنترل) (Control)
68.66 ±1.04	60.93±1.12	سطحی S 1%
69.79±1.61	61.02±1.07	1.5 S %
67.39±1.28	62.56±0.93	2 S %
67.29±2.20	63.02±1.06	1 D % آمیخته Dispersed
69.05±0.94	62.59±2.00	1.5 D %
67.40±1.54	60.55 ±1.54	2 D %

در هیچ ستونی اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.05$) دیده نشد.

No significant difference was found.

ویژگی‌های رهایش ماده موثره تعیین شود. هر سه فیلم دارای بیشترین مقدار (۲ درصد عصاره) بوده و آزمون در دمای محیط ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سینتیک رهایش عصاره در محلول شبیه‌سازی شده هر سه نوع فیلم کاملاً متفاوت است (شکل ۲). لیپوزوم‌های ممزوج شده در سوسپانسیون فیلم به‌ویژه در ابتدای زمان آزمون ترکیبات فعال کمتری رها کردند. این پدیده احتمالاً بدلیل درگیر شدن لیپوزوم‌ها در ماتریکس فیلم کیتوزان و کربوکسی متیل

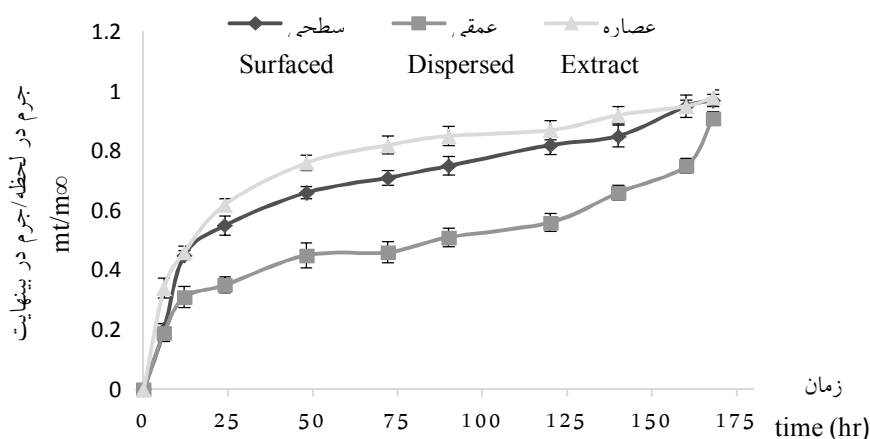
آزمون رهایش: با توجه به اینکه در تولید بیوفیلم‌ها از عصاره آبی پوست سبزی پسته (ترکیباتی هیدروفیل و آب‌دوست) استفاده شد، از مدل محیط آبی به‌عنوان محیط مشابه استفاده شد. در این آزمون سه نمونه فیلم حاوی عصاره و فیلم حاوی عصاره ریزپوشانی شده در لیپوزوم که بطور لایه‌ای بر روی فیلم پخش شده است و فیلم حاوی لیپوزوم‌های بارگذاری و ممزوج شده مورد آزمون رهایش قرار گرفتند تا تأثیر نحوه تهیه فیلم بر

آنتی‌اکسیدانی بدون تأخیر و درگیری در رشته‌های پلیمری رخ داده است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت روش پیشنهاد شده در این تحقیق بطور موفقیت آمیزی بر محدودیت ذکر شده غلبه نموده است.

مقاومت مکانیکی فیلم: در جدول ۲ مقادیر مدول الاستیسیته و درصد افزایش طول قبل از پاره شدن و حداکثر نیروی قابل تحمل برای انواع فیلم‌های تولید شده حاوی غلظت‌های مختلف لیپوزوم (بصورت آمیخته و نشانده شده بر سطح فیلم) نشان داده شده است. نمونه فیلم‌های تولید شده با استفاده از پلیمرهای کیتوزان و کربوکسی‌متیل سلولز و ریخت‌پذیر کننده گلیسرول، دارای حداکثر تحمل بار قبل از گسیخته شدن (۴/۳۸-۵) کیلوگرم نیرو) افزایش طول (۷۱-۵۹ درصد) و مدول الاستیسیته (۳۳۳۱-۲۳۰۹ کیلونیوتن بر مترمربع) بودند (جدول ۲). در مقایسه با نتایج سایر محققین فیلم‌های مذکور استحکام و مقاومت کششی بالاتری داشتند.

سلولز رخ داده است. نتایج مشابهی توسط سیلواویس و همکاران (۲۰۱۸) گزارش شد که با بررسی رهایش ترکیبات فلاونولی از فیلم کربوکسی‌متیل سلولز، انتشار سریع‌تر ترکیبات آزاد را نسبت به ترکیبات ریزپوشانی شده در لیپوزوم مشاهده نمودند (۳۶). پراویلیک و همکاران (۲۰۱۵) نیز اعلام نمودند پلی‌فنل‌های عصاره آویشن ریزپوشانی شده با تأخیر بیشتری نسبت به ترکیبات آزاد از غشای استات سلولز آزاد می‌شوند (۲۸).

تأخیر رهایش ترکیبات فعال با وجود اثرات مفیدی چون رهایش کنترل شده ممکن است بر ویژگی‌های محافظت‌کنندگی فیلم تاثیر منفی داشته باشد. این پدیده به عنوان یکی از محدودیت‌های ریزپوشانی ترکیبات فعال شناخته می‌شود (۱۶، ۲). نمونه فیلمی که لیپوزوم‌ها بر سطح آن نشانده شده است (شکل ۲) کینتیک رهایش نسبتاً مشابه رفتار عصاره ریزپوشانی نشده داشته و آزادی ترکیبات



شکل ۲- کینتیک رهایش PGHE از فیلم دارای عصاره ریزپوشانی نشده، ریزپوشانی سطحی، ریزپوشانی آمیخته در بافت فیلم.
Figure 2. Release kinetics of free PGHE on the surface of film, and encapsulated and layered PGHE into film matrix

همکاران (۲۰۱۸) نیز گزارش کردند فیلم کیتوزان خالص دارای مقاومت مکانیکی ضعیفی است که در نتیجه‌ی استفاده از ریخت‌پذیرکننده‌ها بویژه گلیسرول و گلیسرین و عسل، میزان افزایش طول قبل از

جیمه و همکاران (۲۰۱۴) محدوده درصد افزایش طول را بین ۲-۸ درصد، نوروها و همکاران (۲۰۱۲) میزان کشش فیلم خوراکی متیل سلولز را ۱۷-۳۰ درصد گزارش نمودند (۲۶، ۱۸). اسکارسگا و

تعیین کردند (۱۲). علت نتایج متفاوت گزارشات ناشی از نوع کیتوزان، نوع اسید مورد استفاده در تهیه فیلم، شرایط تهیه و میزان و نوع ریخت پذیرکننده مورد استفاده می‌باشد (۳۸، ۲۰، ۱۲).

گسیختگی فیلم بهبود می‌یابد. اسکارگا و همکاران (۲۰۱۸) بیشترین میزان افزایش طول قبل از گسیخته شدن فیلم کیتوزان را با استفاده از گلیسرول ۳۲/۶۵ درصد و با استفاده از عسل ۵۹/۵۸ درصد و مدول الاستیسیته را به ترتیب ۱۹۱۷/۷۶ و ۲/۵۶ مگاپاسکال

جدول ۲- مدول الاستیسیته و درصد افزایش طول قبل از گسیختگی و حداکثر نیروی قابل تحمل در فیلم‌های حاوی غلظت‌های مختلف لیپوزوم بصورت آمیخته (D) و نشاندن سطحی (S). حروف متفاوت (a,b,c,..) در هرستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در سطح $p < 0.05$ است.

Table 2. Elastic modulus, elongation before break, and the maximum force resistance of films containing different liposome concentration incorporated into matrix by dispersed (D) and surfaced (S) forms.

افزایش طول (%) Percentage of Elongation	مدول الاستیسیته Elastic modulus (KN/m ²)	حداکثر تحمل بار Maximum force resistance(kgf)	ضخامت Thickness μ (m)	نمونه فیلم‌ها Film samples
59.12 ± 0.52 ^d	2309 ± 56 ^c	4.38	85 ± 3 ^b	0% (Control)
64.25 ± 0.16 ^c	2510 ± 4 ^c	4.76	86 ± 6 ^b	% 1 S
64.75 ± 0.15 ^c	2571 ± 58 ^c	4.87	89 ± 4 ^b	% 1.5 S
66.54 ± 0.19 ^b	2829 ± 22 ^b	5.00	89 ± 6 ^b	% 2 S
63.09 ± 0.58 ^c	2415 ± 73 ^c	4.85	86 ± 2 ^b	% 1 D
65.45 ± 0.15 ^b	2862 ± 70 ^b	5.22	88 ± 3 ^b	% 1.5 D
71.25 ± 0.61 ^a	3331 ± 85 ^a	6.00	103 ± 3 ^a	% 2 D

حروف متفاوت (c,b,a) در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در سطح $P < 0.05$ است.

Different letters (a,b,c,..) in each column indicate significant difference between treatments ($P < 0.05$).

فیلم‌هایی که دارای لیپوزوم بارگذاری شده در سطح بودند، دارای انحراف استاندارد بالاتری بودند که می‌تواند به دلیل عدم پخش یکنواخت لایه لیپوزومی باشد. این موضوع ضرورت در نظر گرفتن تمهیدی برای نشاندن یکنواخت تر لیپوزوم‌ها به صورت لایه‌ای را نشان می‌دهد. بطور کلی با وجود مقاومت مکانیکی بالای کلیه نمونه‌های فیلم، بیشترین میزان انعطاف، تحمل وزنه، مدول الاستیسیته (۳۳۳۱/۸۵ مگاپاسکال) و درصد افزایش طول (۷۱/۲۵ درصد) در فیلمی با بالاترین درصد لیپوزوم و تهیه شده بصورت آمیخته مشاهده شد. در مغایرت با پژوهش حاضر، جیمنه و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند با اضافه کردن لیپوزوم به ماتریکس فیلم مقاومت مکانیکی و قابلیت کششی کاهش یافت (۱۸). بررسی پیشینه نتایج مربوط به افزودن مواد فعال مانند عصاره گیاهان بصورت آزاد و

در این تحقیق فیلم شاهد با وجود میزان قابل قبول مقاومت مکانیکی، دارای کمترین ضخامت، مقدار مدول الاستیسیته و ماکزیمم نیروی قابل تحمل و درصد افزایش طول (۵۹ درصد) نسبت به سایر نمونه‌های فیلم بود (جدول ۲). در فیلم‌هایی که حاوی لیپوزوم بصورت لایه‌ای بودند میزان انعطاف بیشتر و قابلیت افزایش طول پیش از گسیختگی بالاتر و معنی‌داری نسبت به فیلم شاهد دیده شد. این نتیجه می‌تواند به دلیل اثر احتمالی پلاستی‌سایزری (ریخت پذیرکنندگی) لیپوزوم و یا مربوط به افزایش ضخامت فیلم باشد. افزایش ضخامت معنی‌دار تنها در نمونه فیلم حاوی ۲ درصد لیپوزوم آمیخته شده دیده شد. کورالس و همکاران (۲۰۰۹) نیز افزایش ضخامت معنی‌داری را در فیلم دارای ۱ درصد عصاره دانه انگور گزارش نمودند (۹). همچنین ضخامت

نتیجه گیری کلی

به طور کلی مطالعه ویژگی‌های مکانیکی، نوری و آنتی‌اکسیدانی و نحوه رهایش مواد فعال فیلم تهیه شده در این تحقیق نشان داد که نمونه‌های فیلم تهیه شده دارای ویژگی‌های نوری، مکانیکی و مقاومت کششی قابل قبولی بودند که با افزایش میزان درصد لیپوزوم‌های تزریق شده در بافت فیلم ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی از خود نشان می‌دادند. بر اساس داده‌های مربوط به طیف سنجی مادون قرمز هیچ‌گونه جابجایی در پیک‌ها مشاهده نشد که بیانگر عدم برهم‌کنش میان لیپوزوم و ترکیبات فیلم بود. افزودن لیپوزوم در هر دو روش لایه‌ای و آمیخته در ماتریکس فیلم به‌عنوان ریخت‌پذیر کننده عمل کرده و تا میزان ۲ درصد موجب بیشتر شدن میزان افزایش طول پیش از گسیختگی و نیز افزایش مدول الاستیسیته فیلم گردیده است. همچنین می‌توان نتیجه گرفت نشان دادن لیپوزوم بصورت لایه‌ای بر روی فیلم بدون تأثیر نامطلوب بر سایر ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی فیلم موجب رهایش کارآمدتر آنتی‌اکسیدان‌ها شده و از درگیر شدن لیپوزوم‌ها در شبکه پلیمری فیلم و تأخیر رهاسازی آنها جلوگیری نموده است.

منابع

- Alópez-Mata, M., Ruiz-Cruz, S., Silva, N., Ornelas-Paz, J., Zamudio-Flores, P. and Burruel-Ibarra, N. 2013. Physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with carvacrol. *Molecule*. 18: 11.3735-3753.
- Almasi, H., Zandi, M., Beigzadeh, S., Haghju, S. and Mehrnow, N. 2016. Chitosan films incorporated with nettle (*Urtica Dioica* L.) extract-loaded nanoliposomes: II. Antioxidant activity

یا ریزپوشانی شده در داخل لیپوزوم بر مقاومت و استحکام فیلم نتایج متناقضی را در بردارد (۱۷). نوروها و همکاران (۲۰۱۴) در بررسی مقاومت کششی فیلم (بیشینه قدرت یک فیلم در برابر استرس اعمال شده) با افزایش درصد نانوکپسول‌های حاوی توکوفرول نشان دادند با افزایش درصد نانوکپسول‌ها مدول الاستیسیته از ۵۲ مگاپاسکال به ۲۳/۱۹ کاهش یافت (۲۶). مارتین و ویسنت (۲۰۱۲) نیز کاهش معنی‌دار مقاومت کششی را با افزودن آلفاتوکوفرول گزارش نمودند (۲۱). نوراجیت (۲۰۱۰) نیز با افزودن عصاره جینسینگ در مقایسه با فیلم کنترل کاهش مقاومت کششی را گزارش نمود (۲۵). این روند همچنین در مورد کاهش معنی‌دار مدول الاستیک با افزایش غلظت نانوکپسول‌های آلفا توکوفرول و عصاره جینسینگ مشاهده شد. از طرفی سیرپی‌تراوان و هارت (۲۰۱۰) با افزودن عصاره چای سبز در فیلم خوراکی بر پایه کیتوزان میزان افزایش طول معنی‌داری مشاهده نمودند (۳۷). مرادی و همکاران نیز مقاومت مکانیکی فیلم را به درصد عصاره اضافه شده مرتبط دانستند؛ به طوری که در غلظت ۰/۵ درصد کاهش مقاومت و در غلظت بالاتر از ۲ درصد افزایش مقاومت مکانیکی را گزارش نمودند (۲۲).

- and release properties. *J. of Microencapsulation*. 4: 2.1-11.
- Araiza-Calahorra, A., Akhtar, M. and Sarkar, A. 2018. Recent advances in emulsion-based delivery approaches for curcumin: from encapsulation to bioaccessibility. *Trends in Food Science & Technology* 71: 1.155-169.
 - Argente, T., Trifkovic, K., Nedovic, V. and Gonzalez-Martinez, C. 2016. Antioxidant edible films based on chitosan and starch containing polyphenols from thyme extracts. *Carbohydrate Polymers*. 15: 7.1-10.

5. Bamidele, O.P. and Fasogbon, M.B. 2017. Chemical and antioxidant properties of snake tomato (*Trichosanthes cucumerina*) juice and Pineapple (*Ananas comosus*) juice blends and their changes during storage. *Food Chemistry*. 2: 20.184-189.
6. Banker, G.S. 1966. Film Coating Theory and Practice. *J. of Pharmaceutical Sciences*. 55: 1.81-89.
7. Boeing, J.S., Ribeiro, D., Chisté, R.C., Visentainer, J.V., Costa, V.M. and Freitas, M. 2017. Chemical characterization and protective effect of the *Bactris setosa* Mart. fruit against oxidative/nitrosative stress. *Food Chemistry*. 22: 3.427-437.
8. Chandra Roy, J., Ferri, A., Giraud, S., Jinping, G. and Salaün, F. 2018. Chitosan – Carboxymethylcellulose-Based polyelectrolyte complexation and microcapsule shell formulation. *international J. of Molecular Science*. 12: 2.154-159.
9. Corrales, M., Han, J.H. and Tauscher, B. 2009. Antimicrobial properties of grape seed extracts and their effectiveness after incorporation into pea starch films. *International J. of Food Science & Technology*. 44: 2.425-433.
10. Cui, H., Lu, Y., and Lin, L. 2018. Novel chitosan film embedded with liposome-encapsulated phage for biocontrol of *Escherichia coli O157:H7* in beef. *Carbohydrate polymer*. Accepted.
11. Daudt, R.M., Sinrod, A.J.G., Avena-Bustillos, R.J., Kulkamp-Guerreiro, I. C., Marczak, L. and McHugh, T.H. 2017. Development of edible films based on Brazilian pine seed (*Araucaria angustifolia*) flour reinforced with husk powder. *Food Hydrocolloids*. 71: 2.60-67.
12. Escárcega-Galaz, A.A., Sánchez-Machado, D.I., López-Cervantes, J., Sanches-Silva, A., Madera-Santana, T.J. and Paseiro-Losada, P. 2018. Mechanical, structural and physical aspects of chitosan-based films as antimicrobial dressings. *International J. of Biological Macromolecules*. 116: 4. 72-81.
13. Geravand, F., Madadlou, A. and Moini, S. 2017. Determination of phenolic profile and antioxidant activity of pistachio hull using high-performance liquid chromatography–diode array detector–electro-spray ionization–mass spectrometry as affected by ultrasound and microwave. *International J. of food properties*. 20: 1.19-29.
14. Goli, A.H, Barzegar, M. and Sahari, M.A. 2005. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry*. 92: 3.521-525.
15. Gómez-Ruiz, J.Á., Leake, D.S. and Ames, J.M. 2007. In vitro antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites. *J. of Agricultural and Food Chemistry*. 55:17.6962-6969.
16. Granato, D., Nunes, D.S. and Barba, F.J. 2017. An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: A proposal. *Trends in Food Science & Technology*. 62: 13-22.
17. Hu, Y., Zhang, J., Kong, W., Zhao, G. and Yang, M. 2017. Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*. *Food Chemistry*. 220: 1-8.
18. Jiménez, A., Sánchez-González, L., Desobry, S., Chiralt, A. and Tehrani, E.A. 2014. Influence of nanoliposomes incorporation on properties of film forming dispersions and films based on corn starch and sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*. 35: 159-69.
19. Koide, S., and Shi, J. 2007. Microbial and quality evaluation of green peppers stored in biodegradable film packaging. *Food Control*. 18: 9.1121-1125.
20. Lago, M., Sendón, R., de Quirós AR-B., Sanches-Silva, A., Costa, H., and Sánchez-Machado, D. 2014. Preparation and characterization of antimicrobial films based on chitosan for active food packaging applications. *Food and bioprocess technology*. 7: 10.2932-2941.
21. Martins, J., Cerqueira, M. and Vicente, A. 2012. Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-

- based films. *Food Hydrocolloids*. 27: 1.220-227.
22. Moradi, M., Tajik, H., Razavi Rohani, S.M., Oromiehie, A., Malekinejad, H. and Ghasemmahdi, H. 2012. Development and evaluation of antioxidant chitosan film incorporated with grape seed extract. *J. of Medicinal Plants*. 2: 42.43-52.
 23. Moradi, M., Tajik, H., Razavi R. and Ghasemi, S. 2010. Potential inherent properties of chitosan and its applications in preserving muscle food. *J. of Chitin and Chitosan*. 15: 35-45.
 24. Nibir, Y.M., Sumit, A.F., Akhand, A., Ahsan, N. and Hossain, M.S. 2017. Comparative assessment of total polyphenols, antioxidant and antimicrobial activity of different tea varieties of Bangladesh. *Asian Pacific J. of Tropical Biomedicine*. 7: 4.352-357.
 25. Norajit, K., Kim, K.M. and Ryu, G.H. 2010. Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. *J. of Food Engineering*. 98: 3.377-384.
 26. Noronha, C.M., de Carvalho, S.M., Lino, R.C. and Barreto, P.L.M. 2014. Characterization of antioxidant methylcellulose film incorporated with α -tocopherol nanocapsules. *Food Chemistry*. 15: 9.529-535.
 27. Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H. and Hosseini, S.M.H. 2010. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry*. 122: 1.161-166.
 28. Pravičević, R., Radunović, V., Bošković-Vragolović, N., Bugarski, B., and Pjanović, R. 2015. The influence of membrane composition on the release of polyphenols from liposomes. *Hemijka Industrija*. 69: 4.347-353.
 29. Pinilla, C.M.B, Noreña, C.P.Z. and Brandelli, A. 2017. Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles, containing garlic extract, with antilisterial activity in milk. *Food Chemistry*. 2: 20.470-476.
 30. Pranoto, Y., Salokhe, V.M. and Rakshit, S.K. 2005. Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. *Food research international*. 38: 3.267-272.
 31. Rafiee, Z., Barzegar, M., Sahari, M.A. and Maherani, B. 2017. Nanoliposomal carriers for improvement the bioavailability of high-valued phenolic compounds of pistachio green hull extract. *Food chemistry*. 2: 20.115-122.
 32. Rajaei, A., Barzegar, M., Mobarez, A.M., Sahari, M.A. and Esfahani, H. 2010. Antioxidant, anti-microbial and antimutagenicity activities of pistachio (*Pistachia vera*) green hull extract. *Food and Chemical Toxicology*. 48: 1.107-112.
 33. Rajan, V.K. and Muraleedharan, K. 2017. A computational investigation on the structure, global parameters and antioxidant capacity of a polyphenol, Gallic acid. *Food Chemistry*. 2: 20.93-99.
 34. Ramezanzade, L., Hosseini, S.F. and Nikkhah, M. 2017. Biopolymer-coated nanoliposomes as carriers of rainbow trout skin-derived antioxidant peptides. *Food Chemistry*. 23: 4.220-229.
 35. Roostae, M., Barzegar, M., Sahari, M.A. and Rafiee, Z. 2017. The enhancement of pistachio green hull extract functionality via nanoliposomal formulation: studying in soybean oil. *J. of food science and technology*. 54: 11. 3620-3629.
 36. Silva-Weiss, A., Quilaqueo, M., Venegas, O., Ahumada, M., Silva, W., Osorio, F. and Giménez, B. 2018. Design of dipalmitoyl lecithin liposomes loaded with quercetin and rutin and their release kinetics from carboxymethyl cellulose edible films. *J. of Food Engineering*. 36: 20.236-241.
 37. Siripatrawan, U. and Harte, B.R. 2010. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*. 24: 8.770-775.
 38. Srinivasa, P., Ramesh, M. and Tharanathan, R. 2007. Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. *Food hydrocolloids*. 21: 7.1113-1122.

39. Suntres, Z.E. 2011. Liposomal Antioxidants for Protection against Oxidant-Induced Damage. *J. of Toxicology*. 11: 15.24-27.
40. Tajik, S., Maghsoudlou, Y., Khodaiyan, F., Jafari, S.M., Ghasemlou, M. and Aalami, M. 2013. Soluble soybean polysaccharide: A new carbohydrate to make a biodegradable film for sustainable green packaging. *Carbohydrate polymers*. 97: 2.817-824.
41. Tian, Y., Liimatainen, J., Alanne, A.L., Lindstedt, A., Liu, P. and Sinkkonen, J. 2017. Phenolic compounds extracted by acidic aqueous ethanol from berries and leaves of different berry plants. *Food Chemistry*. 20: 266-281.
42. Tohidi, B., Rahimmalek, M., and Arzani, A. 2017. Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of *Thymus* species collected from different regions of Iran. *Food Chemistry*. 220: 1.53-161.
43. Wang, H., Zhao, P., Liang, X., Gong, X., Song, T., Niu, R. and Chang, J. 2010. Folate-PEG coated cationic modified chitosan-cholesterol liposomes for tumor-targeted drug delivery. *Biomaterials*. 31:14. 4129-4138.
44. Xu, S., Chen, X., and Sun, D.W. 2001. Preservation of kiwifruit coated with an edible film at ambient temperature. *J. of Food Engineering*. 50: 4.211-216.
45. Yen, M.T., Yang, J.H. and Mau, J.L. 2008. Antioxidant properties of chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*. 74: 4.840-844.

Characterization of physico-mechanical, chemical and antioxidant properties of chitosan based film incorporated with pistachio green hall extract nanoliposome

M. Barzegar Ghasemi, T. Kafili*

Department of Food Science & Engineering, Buinzahra Branch, Islamic Azad University, Buinzahra, Iran.

Received: 2019/08/03; Accepted: 2020/11/25

Abstract

Background and objective: In the last decade, the production of natural biodegradable films carrying bioactive material extracted from cheap agricultural wastes has been considered by many researchers for environmental, economic and health considerations. In this research, active biodegradable film based on chitosan and carboxymethyl cellulose were developed and the effects of two different ways of incorporating pistachio green hall extract (PGHE)-loaded nanoliposomes into the film were investigated based on its physico-mechanical, chemical, antioxidant capacity and release properties.

Materials and methods: Phenolic component of pistachio green hall were extracted, purified, and encapsulated into nanoliposomes. 10 film samples incorporated with 0, 1, 1.5, and 2% (w/w) layered and dispersed 1000 ppm PGHE-loaded nanoliposome were developed based on chitosan, carboxymethyl cellulose, and glycerol as plasticizer. Total phenolic content of PGHE, liposome dimension, loading efficiency, mechanical resistance, optical properties, antioxidant capacity and release profile of film samples were studied. In addition, FTIR analysis of the film samples was studied to evaluate possible interactions among film ingredients and liposomes.

Results: All film samples showed desirable mechanical properties. However, film samples with 1.5 to 2% (w/w) liposome especially the sample containing dispersed liposomes presented significantly higher mechanical strength and the percentage of elongation. Also, the film samples with 1.5 to 2% (w/w) liposome demonstrated a high antioxidant potential with concentration dependency. According to the FTIR studies, the spectra of both film containing liposome were similar to blank sample, indicating no probable interactions between the film ingredients and liposomes. In addition, electrostatic interaction of chitosan and carboxymethyl cellulose was detectable. There was no significant difference among optical data showing that incorporating liposomes had no effect on the clarity of film samples. The similar release kinetic were observed regarding films with layered and those incorporated with free extract. These findings revealed that antioxidant components could release without any delay and entanglement with film matrix.

Conclusion: Generally, it can be concluded that although all prepared film samples had notable optical, tensile strength, and antioxidant features, those with 2% layered liposome showed more efficient release kinetic of antioxidants besides exhibiting desired physico-mechanical, optical and antioxidant properties. Therefore, the proposed method in this research could be a promising way for developing active biodegradable films.

Keywords: Pistachio green hall, Active film, Antioxidant, Mechanical properties, Nanoliposome

* Corresponding author: tivkafil@ut.ac.ir

