



## Investigating the effect of glycerol and polyvinyl alcohol in the production of antibacterial films from nanocrystals cellulose

Ali Rahgozar<sup>1</sup>, Elyas Afra<sup>2\*</sup>, Mohammadreza Dehghani-Firouzabadi<sup>3</sup>

1- Ph.D candidate of pulp and paper industries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

2- Corresponding author, Associate Professor of pulp and paper industries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. Email: [elyasafra@yahoo.com](mailto:elyasafra@yahoo.com)

3- Associate Professor of pulp and paper industries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Received: January 2025

Accepted: January 2024

### Abstract

**Problem definition and objectives:** Today, a significant share of food packaging is related to petroleum-based plastics, but are non-biodegradable materials. Biodegradable polymers, although they are biocompatible, but they cannot be widely used in the packaging industry due to their high production cost and poor resistance and barrier properties. Among the biodegradable polysaccharides, cellulose is the most abundant biopolymer on earth, which can be easily changed and modified. Nanocrystalline cellulose (CNC) has been more limited in the development of food packaging due to the formation of brittle films compared to other nanocellulosic materials. The use of some materials such as plasticizers, crosslinking agents, and antimicrobial agents in the structure of these films can enable their wide applicability. Therefore, in this study, with the aim of achieving CNC-based films with optimal barrier and resistance properties that can be used in the packaging industry, the effects of two plasticizers, polyvinyl alcohol (PVA) and glycerol (Gly), the crosslinking agent citric acid and pomegranate peel extract (PPE) as antimicrobial agents were investigated in two combined and layer-by-layer methods.

**Methodology:** For this purpose, CNC-based films were prepared in combination with 20% by weight of polyvinyl alcohol (PVA) or glycerol (Gly), a 1:1 ratio of citric acid: CNC, and 3 levels of 1, 2, and 4% PPE relative to the base composition, by two combined and layer-by-layer (LBL) methods. The structural properties of the films were investigated using FTIR analysis and FESEM images. The barrier, physical, and mechanical properties of the prepared films were also investigated.

**Results:** FTIR results showed that significant chemical bonds were formed between the components of the films. In the antimicrobial results, it was found that the films had significant antimicrobial activity, in the combined method this effect was stronger on both gram-negative *Escherichia coli* and gram-positive *Staphylococcus aureus* bacteria, but in the LBL method this antimicrobial effect was longer. The results showed that CNC composite films with citric acid crosslinking agent, PVA plasticizer and 2% and 4% PPE showed better water vapor transmission rate, water absorption, moisture content, elastic modulus and antibacterial effect than other films, and Gly presented poorer performance in CNC films. Except for the elastic modulus and longer

antimicrobial performance, other properties were weaker in the LBL method than in the combined method.

**Conclusion:** Based on the results obtained, taking into account the physical and mechanical properties of the films as well as the production cost of these materials, and considering that most of the differences between the CNC/PVA/2%PPE and CNC/PVA/4%PPE films were in the same statistical group, films made from the CNC/PVA/2%PPE combination, which has a lower cost due to the lower content of pomegranate peel extract, are introduced as a suitable option for replacing plastic in food packaging requiring antimicrobial properties.

**Keywords:** Nanocrystalline cellulose, biodegradable film, glycerol, polyvinyl alcohol, pomegranate peel extract, antibacterial film.

## بررسی اثر گلیسرول و پلی ونیل الکل در تولید فیلم‌های ضدباکتری از نانوکریستال سلولز

علی رهگذر<sup>۱</sup>، الیاس افرا<sup>۲\*</sup>، محمدرضا دهقانی فیروزآبادی<sup>۳</sup>

- ۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم و مهندسی کاغذ، دانشکده مهندسی چوب و کاغذ، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.  
 ۲- نویسنده مسئول، دانشیار گروه علوم و مهندسی کاغذ، دانشکده مهندسی چوب و کاغذ، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. پست الکترونیک: [elyasafr@yaho.com](mailto:elyasafr@yaho.com)  
 ۳- دانشیار گروه علوم و مهندسی کاغذ، دانشکده مهندسی چوب و کاغذ، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

تاریخ دریافت: دی ۱۴۰۳

تاریخ پذیرش: بهمن ۱۴۰۳

### چکیده

**بیان مساله و اهداف:** امروزه سهم قابل توجهی از بسته‌بندی مواد غذایی مربوط به پلاستیک‌های مبتنی بر نفت می‌باشد که با هزینه کم در دسترس هستند اما موادی غیرقابل تجزیه زیستی هستند. پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر اگرچه زیست‌سازگار هستند اما به دلیل هزینه بالای تولید و ویژگی‌های مقاومتی و ممانعتی ضعیف قابلیت استفاده گسترده در صنعت بسته‌بندی را ندارند. در میان پلی‌ساکاریدهای زیست‌تخریب‌پذیر، سلولز فراوان‌ترین زیست‌پلیمر روی زمین می‌باشد که به‌راحتی قابل تغییر و اصلاح است. نانوکریستال سلولز (CNC) به دلیل تشکیل فیلم‌های شکننده در مقایسه با سایر مواد نانوسلولزی محدودیت بیشتری در توسعه بسته‌بندی غذایی داشته است. استفاده از برخی مواد نظیر نرم‌کننده‌ها، عوامل اتصال عرضی و همچنین عوامل دارای ویژگی‌های ضد میکروب در ساختار این فیلم‌ها می‌تواند قابلیت کاربرد وسیع آن‌ها را میسر کند. از این رو در این پژوهش با هدف دستیابی به فیلم‌های برپای CNC با ویژگی‌های ممانعتی و مقاومتی بهینه و قابل کاربرد در صنعت بسته‌بندی تأثیر دو نرم‌کننده پلی ونیل الکل (PVA) و گلیسرول (Gly)، عامل اتصال عرضی اسیدسیتریک و عصاره پوست انار (PPE) به‌عنوان عامل ایجادکننده اثر ضد میکروبی در دو روش ترکیبی و لایه به لایه مورد بررسی قرار گرفتند.

**مواد و روشها:** برای این منظور فیلم‌های برپای CNC در ترکیب با ۲۰٪ وزنی پلی‌ونیل‌الکل (PVA) و یا گلیسرول (Gly)، نسبت ۱:۱ اسیدسیتریک: CNC و ۳ سطح مصرف ۱، ۲ و ۴٪ PPE نسبت به ترکیب پایه، با دو روش ترکیبی و لایه‌به‌لایه (LBL) تهیه شدند. ویژگی ساختاری فیلم‌ها با استفاده از آنالیز FTIR و تصاویر FESEM مورد بررسی قرار گرفتند. ویژگی‌های ممانعتی، فیزیکی و مکانیکی فیلم‌های تهیه شده نیز مورد بررسی قرار گرفتند.

**نتایج:** نتایج FTIR نشان دادند که پیوندهای شیمیایی قابل توجهی بین اجزای فیلم‌ها صورت گرفته بود. در بررسی نتایج ضد میکروب مشخص شد که فیلم‌ها فعالیت ضد میکروب قابل توجهی داشتند، در روش ترکیبی این اثر بر روی هردو باکتری گرم منفی اشیشیاکلی و گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس قوی‌تر اما در روش LBL این اثر ضد میکروب طولانی‌تر بود. نتایج نشان دادند که فیلم‌های ترکیبی CNC با عامل اتصال عرضی اسیدسیتریک، نرم‌کننده PVA و ۲٪ و ۴٪ PPE میزان عبور بخار آب، جذب آب، رطوبت، مدول الاستیسیته و اثر ضدباکتری بهتری را نسبت به سایر فیلم‌ها نشان داد و Gly عملکرد ضعیف‌تری را در ترکیب با فیلم‌ها ارائه کرد. به‌استثنای مدول الاستیسیته و عملکرد ضد میکروب طولانی‌تر در زمان سایر ویژگی‌ها در روش LBL ضعیف‌تر از روش ترکیبی بود.

**نتیجه‌گیری:** بر اساس نتایج به‌دست‌آمده با در نظر گرفتن ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی فیلم‌ها و همچنین هزینه تولید این مواد و با توجه به اینکه در اکثر ویژگی‌های اختلاف ایجادشده بین فیلم‌های ترکیب CNC/PVA/4%PPE و CNC/PVA/2%PPE در یک گروه آماری قرار داشتند، فیلم‌های ساخته شده از ترکیب CNC/PVA/2%PPE که به دلیل داشتن عصاره پوست انار کمتر هزینه تمام‌شده کمتری را نیز در

پی دارد به عنوان گزینه‌ای مناسب برای جایگزینی پلاستیک در بسته‌بندی مواد غذایی نیازمند به ویژگی‌های ضد میکروب معرفی می‌گردد.

**واژه های کلیدی:** نانوکریستال سلولز، فیلم زیست‌تخریب‌پذیر، گلیسرول، پلی ونیل الکل، عصاره پوست انار، فیلم ضدباکتری.

## مقدمه

متداول کرده است [۲]. با این حال به دلیل مسائلی همچون هزینه بالای تولید و ویژگی‌های ممانعتی و مقاومتی ضعیف، فیلم‌ها و پوشش‌های برپای مواد زیست‌تخریب‌پذیر تنها بین ۵ تا ۱۰ درصد بازار پلاستیک کنونی را تشکیل می‌دهند [۳]. از سوی دیگر، اکثر بسته‌های غذایی قادر به حفظ طراوت غذا بدون استفاده از مواد ضد عفونی کننده که برای سلامتی مضر هستند نمی‌باشند. از این رو، توسعه فیلم‌های پلیمری تجزیه‌پذیر، ضد میکروب و ارزان برای بسته‌بندی مواد غذایی بسیار مهم هستند. در میان مواد خام مورد استفاده برای تولید فیلم‌های پلیمری زیستی پلی‌ساکاریدهایی نظیر سلولز که فراوان‌ترین زیست پلیمر روی زمین می‌باشد بسیار مورد توجه بوده است. این ماده به عنوان ماده خام برای ساخت فیلم‌ها، به آسانی در دسترس می‌باشد و به راحتی قابل تغییر و اصلاح است. فیبریل‌های سلولزی می‌توانند زمانی که در یک محیط اسیدی هیدرولیز می‌شوند به صورت عرضی از قسمت‌های بی‌شکل آمورف شکافته شوند و کریستال‌های کوچکی را ایجاد کنند. این ذرات به شدت کریستالی زمانی که نسبت L/D آن‌ها کمتر از ۲۰۰ نانومتر باشد نانوسلولز (NFC)، نانوکریستال سلولز (CNC)، ویسکرها و نانویسکرهای سلولزی را ایجاد می‌کنند [۴].

در سال‌های اخیر، گروه‌های تحقیقاتی مختلفی فناوری‌های جدیدی را برای تشکیل نانو مواد سلولزی از مواد مختلف و ترکیب آن‌ها در مواد پلیمری را گزارش کرده‌اند. CNCها مزایای بی‌شماری در مقایسه با سایر مواد نانو ساختار دارند که از آن جمله می‌توان به سهولت تشکیل، هزینه کم ماده اولیه و ویژگی‌های مکانیکی بهتر آن‌ها در مقایسه با نانولوله‌های کربنی و نانوالیاف معدنی

افزایش جمعیت، گرم شدن زمین و افزایش آلودگی- های زیست‌محیطی منجر به افزایش توجه جامعه انسانی به محیط زیست شده است. امروزه سهم قابل توجهی از بسته‌بندی مواد غذایی مربوط به پلاستیک‌های مبتنی بر نفت می‌باشد که موادی غیر قابل تجزیه زیستی بوده و بر محیط زیست و امنیت فیزیکی تأثیر منفی می‌گذارند. این مواد در مقادیر زیاد و با هزینه کم در دسترس هستند و ویژگی‌های خوبی از جمله مقاومت کششی، مقاومت در برابر پارگی و ممانعت در برابر گاز و ترکیبات معطر را دارند. با این حال، این پلاستیک‌های مصنوعی تجزیه‌پذیر نیستند و با انباشتگی منجر به ایجاد مشکلات زیست‌محیطی جدی شده‌اند. علاوه بر این ذخایر سوخت‌های فسیلی نیز در حال کاهش می‌باشند. این مسائل منجر شده است تا در سال‌های اخیر تلاش‌های تحقیقاتی زیادی بر روی توسعه فیلم‌ها و پوشش‌های زیست‌تخریب‌پذیر به عنوان یک راه حل بالقوه برای کاهش مشکلات زیست‌محیطی و یافتن جایگزین برای مواد پلاستیکی برپای نفت متمرکز شود [۱].

به طور کلی، پلیمرهای زیستی پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیری هستند که از واحدهای مونومری تشکیل شده‌اند که با پیوند کووالانسی به هم متصل شده‌اند و زنجیره شبیه ماکرومولکول‌ها را تشکیل می‌دهند. آن‌ها دارای مزایای مختلفی فرای سایر پلیمرهای سنتزی نظیر زیست‌تخریب‌پذیری، زیست‌فعالی و دسترس‌پذیری زیاد می‌باشند و از این رو ثابت می‌کنند که یکی از مواد امیدوارکننده برای استفاده به عنوان یک بسته‌بندی غذایی دوست‌دار محیط زیست می‌باشند. دو ویژگی زیست‌سازی و قابلیت تجزیه‌پذیری این پلیمرها آن‌ها را جایگزین مناسبی برای مواد برپای نفت که موادی زیست‌تخریب ناپذیر هستند، در ساخت پلاستیک‌های

<sup>1</sup> Nano Fibrillated Cellulose

<sup>2</sup> Cellulose Nano-Crystal

مونوگلیسریدها و مشتقات استری، فوسفولیپیدها و سورفاکتانتها) اشاره نمود. در میان پلاستیک‌های مورد استفاده در تولید فیلم‌های زیستی گلیسرول (Gly<sup>۳</sup>) و پلی ونیل الکل (PVA<sup>۴</sup>) به‌عنوان مواد در دسترس با ویژگی‌های عملکرد مناسب بیش از سایر مواد شیمیایی مورد توجه قرار گرفته‌اند.

Gly یک پلی الکل می‌باشد که محصول جانبی تولید شده از زنجیره بایودیزل است و از این رو یک ماده کم هزینه با دسترس‌پذیری زیاد می‌باشد. عملکرد مؤثر این نرم‌کننده به دلیل اتصالات هیدروژنی بین زنجیره‌های پلیمری است که فضاهای بین مولکولی را گسترش می‌دهند و منجر به افزایش نفوذپذیری و انعطاف‌پذیری فیلم‌ها و کاهش نیروهای درون مولکولی در طول زنجیره‌های پلیمری می‌شوند [۹]. PVA یک پلیمر محلول در آب است که برخی از ویژگی‌های آن نظیر قابلیت تشکیل فیلم عالی، کریستالیت بالا، غیرسمی بودن، زیست‌تخریب‌پذیری، زیست‌سازگاری، مقاومت شیمیایی عالی، مقاومت مکانیکی زیاد، پایداری نوری، ویژگی‌ممانعت‌گازی زیاد (خصوصاً در برابر اکسیژن) و ویژگی‌های فیزیکی مناسب نشان دهنده پتانسیل تکنولوژیکی بالای آن می‌باشد [۱۰]. به خاطر ویژگی تشکیل فیلم عالی در حلال آب، فیلم‌های مبتنی بر PVA می‌توانند به‌آسانی تحت شرایط ملایم ساخته شوند. این پلیمر توانایی بالقوه‌ای برای تشکیل پیوند هیدروژنی با سطوح آب‌دوست مواد زیستی برای تولید کامپوزیت‌های سبز را دارد [۱۱]. تحقیقات نشان می‌دهند که Gly و PVA هر دو جاذب آب می‌باشند و حضور آن‌ها در ساختار فیلم‌های CNC اگرچه می‌تواند منجر به افزایش انعطاف‌پذیری فیلم‌های حاصل گردد فیلم‌های حاصل مقاومت‌تر ضعیفی خواهند داشت که مصرف آن‌ها در صنعت بسته‌بندی مواد غذایی را محدود می‌کند [۱۲]. از این رو استفاده از این ترکیبات در ساختار فیلم نیازمند حضور یک عامل اتصال عرضی می‌باشد. با توجه به اینکه اسیدسیتریک یک ماده زیست‌سازگار، محلول در آب و یک اسید آلی ملایم است و نتایج خوبی را در ترکیب با پلیمرهای زیستی در تولید فیلم‌ها به روش ریخته‌گری نشان داده است. اسیدسیتریک از طریق

اشاره نمود. در میان نانو مواد سلولزی، CNC به دلیل ویژگی‌های مکانیکی عالی، تجدیدپذیری و هزینه اقتصادی خود معمولاً به‌عنوان مناسب‌ترین و کارآمدترین افزودنی تقویت‌کننده شناخته شده است [۵]. با این حال در تحقیقات متعددی، تولید و توصیف فیلم‌های شفاف تهیه شده از طریق قالب‌گیری و تبخیر از سوسپانسیون آبی CNC مورد بحث قرار گرفته است [۶]. فیلم‌های تولید شده از CNC ها سفتی و شکنندگی زیادی را نشان دادند که مانع از حرکت آن‌ها می‌شود. به‌منظور غلبه بر این ویژگی‌های نامطلوب و ساخت فیلم‌های CNC با قابلیت استفاده آسان‌تر، ترکیبات پلی‌هیدروکسی معمولاً به‌عنوان نرم‌کننده برای اختلاط با CNC ها قبل از تهیه فیلم‌ها استفاده می‌شوند. Klemm و همکاران (۲۰۱۱) اثر ناشسته و گلیسرول را برای تغییر ویژگی‌های شبکه هیدروژل نانوکامپوزیت CNC برای تولید فیلم‌های زیستی مورد بررسی قرار دادند [۷]. این گزارش‌ها می‌دهند که به دلایل متنوع نظیر ویژگی‌های مقاومتی و ممانعتی ضعیف، استفاده از مواد زیست‌تخریب‌پذیر نظیر نانوسلولزها به‌صورت خالص برای تولید فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر مشکلات قابل‌توجهی را دارد و فیلم‌های تولید شده از این مواد نمی‌توانند جایگزین‌های مطلوبی برای بسته‌بندی‌های پلاستیکی در زمینه تأمین ویژگی‌های مقاومتی و ممانعتی و همچنین انعطاف‌پذیری مورد نیاز باشند. از آنجایی که کاربرد نانوکریستال‌های سلولزی نیز در تولید مواد بسته‌بندی غذایی به دلیل شکننده بودن فیلم‌های حاصل و انعطاف‌پذیری بسیار ضعیف آن‌ها ممکن نمی‌باشد ترکیب CNC با پلیمرهای زیستی دیگر می‌تواند یکی از استراتژی‌های عملی برای بهبود ویژگی‌های فیلم‌سازی آن‌ها باشد. از جمله ترکیبات مورد استفاده برای افزایش انعطاف‌پذیری فیلم‌های CNC، نرم‌کننده‌ها هستند. ترکیب نرم‌کننده‌ها در مواد نانوسلولزی منجر به کاهش شمار اتصالات هیدروژنی بین نانوالیاف می‌شوند و از این طریق انعطاف‌پذیری فیلم‌های تشکیل شده را افزایش می‌دهد و در نتیجه، فیلم نانوسلولز حاصل انعطاف‌پذیرتر می‌شود [۸]. پلاستیک‌کننده‌های متعددی در تولید فیلم‌ها و پوشش‌های زیست‌تخریب‌پذیر مورد استفاده قرار گرفته‌اند که از آن جمله می‌توان به مونو-دی- و اولیگوساکارایدها (گلوکز، ساکاروز)؛ پلی‌اول‌ها (گلیسرول، سوربیتول، مشتقات گلیسرول) و لیپیدها (اسیدهای چرب اشباع،

<sup>3</sup> Glycerol

<sup>4</sup> Polyvinyl alcohol

انار به عنوان عامل ایجاد کننده اثر ضدباکتری مورد بررسی قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

#### مواد

برای تهیه PPE، پوست انار از شهرستان ساری تهیه گردید. پوست انار سایه خشک شده با استفاده از دستگاه آسیاب برقی خرد و برای عصاره‌گیری آماده شد. CNC های مورد استفاده با درجه پلیمریزاسیون ۲۰۰-۶۰۰، درصد کریستالیت ۸۰-۹۰ درصد، پایداری حرارتی °C ۲۴۰ و ابعاد ۱۰-۵۰ نانومتر از شرکت نانو نوین پلیمر (ایران) خریداری شدند. نرم کننده مورد استفاده اول PVA با فرمول شیمیایی  $(-C_2H_4O)_n$  از شرکت مرک آلمان به شماره 8.21038.0100 بود. دومین نرم کننده Gly با فرمول شیمیایی  $(C_3H_8O_3)$  به صورت مایع ویسکوز شفاف بی‌رنگ با جرم مولی حدود  $92,10 \text{ g/mol}$  و درصد خلوص حدود ۹۸/۵ درصد بود که از شرکت مجتمع صنایع شیمیایی و دارویی کیان کاوه آزما تهیه گردید. عامل اتصال عرضی مورد استفاده اسیدسیتریک تک آب با فرمول شیمیایی  $(C_6H_8O_7 \cdot H_2O)$  و جرم مولی  $g/mol$  1.00244.0100 از شرکت مرک آلمان به شماره ۲۱۰/۱۴ بود.

#### عصاره‌گیری

PPE با استفاده از روش آغشته سازی از ترکیب ۱۰ گرم پودر پوست انار با ۱۰۰ cc اتانول ۸۰٪ تهیه گردید. برای این منظور ترکیب مذکور برای مدت ۷۲ ساعت روی یک شیکر دورانی ساخت شرکت پوزان پژوه (ایران)، تحت شرایط همزنی پیوسته با سرعت ۱۲۰ rpm قرار گرفت. سپس عصاره استخراج شده با استفاده از کاغذ صافی واتمن از پودرهای باقی مانده جداسازی شدند. به منظور جداسازی اتانول از ترکیب عصاره، عصاره حاصل برای مدت زمان ۲۴ ساعت در یک محیط تاریک تحت شرایط محیطی قرار گرفت.

#### بررسی ویژگی‌های ساختاری عصاره پوست انار

به منظور سنجش ترکیبات فعال موجود در عصاره پوست انار استخراج شده میزان فنول کل بر اساس روش

ایجاد پیوند با گروه‌های هیدروکسیل موجود در ساختار CNC و نرم کننده‌ها، علاوه بر افزایش مقاومت نهایی فیلم‌ها، قابلیت تشکیل پیوند آن‌ها با گروه‌های OH آب را کاهش می‌دهد. از این رو در این تحقیق اثر Gly و PVA به عنوان نرم کننده همراه با اسیدسیتریک به عنوان عامل اتصال عرضی در تولید فیلم‌های برپای CNC به منظور دستیابی به فیلم‌هایی با قابلیت کاربرد در صنعت بسته‌بندی مورد بررسی قرار گرفتند. از آنجا که در صنایع بسته‌بندی غذایی این لایه‌های پوششی در تماس مستقیم با مواد غذایی قرار دارند وجود ویژگی ضد میکروبی در این پوشش‌ها می‌تواند منجر به افزایش طول عمر مواد غذایی شود. استفاده از مواد ضد میکروب در فرمولاسیون فیلم‌های پوششی می‌تواند اثر مثبتی در توسعه استفاده از این فیلم‌ها در صنعت بسته‌بندی و افزایش ماندگاری مواد غذایی داشته باشد. مواد ضدباکتری طبیعی با توجه به اینکه غیرسمی هستند و زیست سازگاری خوبی دارند، انتخاب ارجح‌تری برای بسته‌بندی غذایی هستند. عصاره‌های گیاهی و ترکیبات فنولی به عنوان ترکیبات دوست‌دار محیط زیست منابع خوبی از ترکیبات زیست فعال می‌باشند که امروزه توجه‌های بسیاری را به خود جلب کرده‌اند [۱۳].

مطالعات زیادی نشان داده‌اند که پوست انار منبع مهمی از ترکیبات زیست فعال نظیر ترکیبات فنولیک می‌باشد که دارای فعالیت‌های ضدالتهابی، ضدسرطان‌زایی و ضدباکتریایی هستند، اما در حال حاضر استفاده از آن به صورت صنعتی صورت نگرفته است و به میزان محدود و سنتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. با توجه به اینکه پوست انار مصرف خوراکی ندارد، مقدار زیاد ترکیبات زیست فعال حاضر در این بخش‌های غیرقابل خوردنی می‌تواند برای اهداف مختلفی در توسعه محصولات ضدباکتری جدید استفاده شود [۱۴]. این امر امکان استفاده از عصاره پوست انار (PPE) به عنوان یک ماده در دسترس و ارزان را برای تولید فیلم‌های ضدباکتری ممکن می‌سازد. در این تحقیق با هدف تولید یک فیلم زیست فعال ضدباکتری با حداکثر ویژگی‌های بهبود یافته و دارای قابلیت کاربرد در مقیاس صنعتی اثر گلیسرول و پلی ونیل الکل به عنوان نرم کننده، اسیدسیتریک به عنوان عامل اتصال عرضی و عصاره پوست

### تهیه فیلم‌های لایه به لایه (LBL)

برای تولید فیلم‌های LBL نیز از روش قالب‌گیری استفاده شد. برای این منظور در ابتدا برای تشکیل لایه اول میزان ۵۰ و ۷۰ درصد از محلول مورد استفاده برای تشکیل کل فیلم از CNC/PVA و CNC/Gly به صورت مجزا در پتری دیش‌ها ریخته شدند. برای تشکیل لایه اول نمونه‌ها برای ۵ ساعت در آن  $30^{\circ}\text{C}$  قرار داده شدند. در مرحله دوم میزان ۲٪ PPE نسبت به وزن کل CNC مصرفی روی لایه اول اسپری شد، پس از ۶ ساعت نهفتگی در دمای محیط و در شرایط تاریک، برای تشکیل لایه دوم میزان محلول‌های مشابه لایه اول تشکیل شده، با نسبت ۵۰ و ۳۰ درصد نسبت به وزن کلی فیلم‌ها روی لایه اول ریخته شدند، نمونه‌ها برای ۱۲ ساعت در آن تحت شرایط دمایی  $30^{\circ}\text{C}$  قرار داده شدند.

### آزمون ضدباکتری فیلم‌های نانوکریستال سلولز

#### اصلاح شده

برای انجام آزمون ضدباکتری از محیط کشت مایع BHIB<sup>۹</sup> (برند ایبرسکو) و محیط کشت جامد مولر هینتون آگار<sup>۱۱</sup> (برند مرک) استفاده شد. سنجش میزان فعالیت ضدباکتری فیلم‌ها با استفاده از روش هاله و در برابر دو باکتری گرم منفی اشریشیاکالی (E.coli No. PPCC 1399) و گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس (S.aureus No. ATCC 25923) انجام شد. برای انجام آزمون نمونه‌هایی با قطر ۵ mm از فیلم‌ها جدا شدند. جهت استریل کردن فیلم‌ها از اشعه UV استفاده شد.

انجام آزمون ضدباکتری مطابق با استانداردهای مربوط بر اساس روش مورد استفاده Goncalves و همکاران (۲۰۰۸) انجام شد. برای این منظور نمونه‌ها برای ۲۴ ساعت در انکوباتور در محیط کشت جامد آغشته به سوسپانسیون باکتری با غلظت نیم مک‌فارلند قرار گرفتند و پس از گذشت دور نهفتگی هاله‌های ایجاد شده در اطراف هر یک از نمونه‌ها برحسب mm اندازه‌گیری شد. در این آزمون هر تیمار در سه تکرار برای هر یک از باکتری‌ها

معرف فنول فولین- سیوکالتیوز<sup>۶</sup> با استفاده از منحنی کالیبراسیون گالیک اسید ( $R2 = 0.9975$ ) و مقدار فلاونوئید کل (TFCY) عصاره پوست انار با استفاده از روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم ( $\text{AlCl}_3$ ) و با استفاده از منحنی کالیبراسیون کوئرستین ( $R2 = 0.9989$ ) اندازه‌گیری شدند [۱۵].

### تهیه محلول مورد استفاده برای ساخت فیلم از

#### نانوکریستال سلولز

برای ساخت فیلم‌های برپای CNC، میزان ۲ گرم از ژل CNC بر مبنای وزن خشک با ۹۸cc آب دیونیزه ترکیب شد. برای دستیابی به یک محلول یکنواخت ترکیب مذکور برای زمان ۱۰ دقیقه تحت شرایط اولتراسونیک با قدرت ۶۰ وات قرار داده شد. سپس ترکیب حاصل برای مدت زمان ۲ ساعت تحت شرایط دمایی  $30^{\circ}\text{C}$  با استفاده از یک همزن حرارتی با دور ۱۰۰۰ rpm همزده شد. در این مرحله میزان ۲۰٪ بر مبنای وزن CNC از PVA و یا Gly به محلول آب و CNC افزوده شد. محلول برای ۲۰ دقیقه تحت شرایط همزنی با دور ۱۰۰۰ rpm قرار گرفت و سپس میزان مشخصی از محلول اسیدسیتریک به ترکیب CNC/PVA و همچنین CNC/Gly در حال هم خوردن افزوده شد. برای تکمیل واکنش‌های اتصال عرضی محلول‌ها برای ۳ ساعت تحت شرایط هم خوردن با دور ۱۰۰۰ rpm قرار گرفتند.

### تهیه فیلم‌های ترکیبی

برای تهیه فیلم‌ها از روش قالب‌گیری استفاده شد. در فیلم‌های ترکیبی میزان ۱، ۲ و ۴ درصد از PPE نسبت به وزن خشک CNC به محلول‌های CNC/PVA و CNC/Gly اضافه شدند و ترکیب برای ۱۰ دقیقه در دمای محیط همزده شد. برای ساخت فیلم‌ها میزان ۲۰۰ میلی‌گرم از محلول فیلم‌سازی، درون پلیت‌های شیشه‌ای مسطح به قطر ۱۰ سانتی‌متر ریخته شدند. برای حذف حلال و تشکیل فیلم‌ها، پتری‌دیش‌های حاوی محلول برای مدت ۱۲ ساعت درون آن با دمای  $30^{\circ}\text{C}$  قرار گرفتند [۱۶].

<sup>8</sup> Layer by Layer

<sup>9</sup> Brain Heart Infusion Broth

<sup>1</sup> Ibresco 0

<sup>1</sup> Mueller-Hinton agar 1

<sup>1</sup> Merck 2

<sup>6</sup> Folin-Ciocalteu's phenol reagent

<sup>7</sup> Total Flavonoid Content

وزن به عنوان وزن خشک فیلمها در نظر گرفته شد که با Wd در فرمول زیر نشان داده شد. رطوبت با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد [۱۸]:

$$\% \text{ مقدار رطوبت} = \frac{W_m - d}{W_m} \times 100 \quad (2)$$

میزان نفوذ بخار آب: میزان نفوذ بخار آب فیلمها با استفاده از روش وزن سنجی بر اساس استاندارد ASTM E96-80 با اندکی تغییرات انجام شد. به طور خلاصه، یک ظرف شیشه‌ای با حجم ۲۵ mm با قطر داخلی ۳۳ mm و سطح منظر ۸۳۹/۳۲ mm<sup>2</sup> برای مطالعه استفاده شد. با ۱ گرم کلرید کلسیم بی‌آب کاملاً خشک شده پر شد و دهانه با فیلمهای نمونه با پلاستیک پارافینی به گونه‌ای مهروموم شد که رطوبت فقط از طریق فیلم بتواند وارد شیشه شود. وزن شیشه مهروموم شده با فیلم ثبت شد و در یک دسیکاتور با دمای ۲۵ °C، حاوی محلول آبی NaCl اشباع شده قرار داده شد. تغییرات وزن شیشه به طور منظم در فاصله ۱۲ ساعت برای ۷ روز اندازه‌گیری و ثبت شد. مقادیر نرخ انتقال بخار آب (WVTR) و نفوذپذیری بخار آب (WVP) برای هر فیلم با توجه به معادلات زیر محاسبه شد [۱۹]:

$$\text{نرخ انتقال بخار آب} = \frac{W}{A \times t} \quad (3)$$

$$\text{نفوذپذیری بخار آب} = \frac{W \times d}{p \times (R_2 - R_1)} \quad (4)$$

در فرمول‌های فوق W وزن به دست آمده، t زمان سپری شده، A سطح در معرض فیلم برای انتقال بخار آب، d ضخامت فیلم‌های مورد بررسی، p فشار بخار اشباع آب (۳۱/۷ mbar در ۲۵ °C)، R1 رطوبت نسبی در دسیکاتور بیرون ظرف و R2 رطوبت نسبی درون ظرف می‌باشد. جذب آب: برای تعیین جذب آب، فیلم‌های کاملاً خشک شده با وزن Wd، در ۳۰ mm آب مقطر غوطه‌ور شدند و افزایش وزن تا رسیدن به تعادل کنترل شد. وزن نهایی فیلم اشباع شده با آب در معادله با Ww نشان داده شده است. جذب آب با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد [۲۰]:

$$\% \text{ جذب آب} = \frac{W_w - d}{W_d} \times 100 \quad (5)$$

انجام شد. سنجش عملکرد ضدباکتری فیلمها نسبت به دو نمونه کنترل مثبت پنسیلین (Penicillin) و جنتامیسین (Gentamicin) انجام شد.

### آنالیز ویژگی‌های نانوساختاری فیلم‌های نانوکریستال سلولز اصلاح شده

به منظور بررسی تشکیل پیوندهای شیمیایی جدید بین ترکیبات مختلف در ساختار فیلم‌های تشکیل شده آزمون طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه<sup>۳</sup> (FTIR) استفاده شد. طیف‌های مربوطه توسط دستگاه Bruker ساخت آلمان مدل Tensor II دانشگاه گلستان تهیه شدند. بررسی نحوه پراکنش و مرفولوژی فیلمها با استفاده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی<sup>۴</sup> (FESEM) انجام شد. این تصاویر توسط دستگاه FESEM شرکت Zeiss کشور آلمان مدل Sigma 300-HV دانشگاه صنعتی شاهرود تهیه شدند.

### بررسی ویژگی‌های فیزیکی و مقاومتی فیلم‌های نانوکریستال سلولز اصلاح شده

برخی از ویژگی‌های فیزیکی فیلمها مطابق با روش‌های زیر اندازه‌گیری شدند:

ضخامت: با استفاده از میکرومتر دیجیتالی (PN-PT6) ساخت شرکت PNSHAR کشور چین با وضوح mm ۰,۰۰۱ در پنج نقطه تصادفی در هر فیلم اندازه‌گیری شد. شفافیت: ضریب گسیل انرژی نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ nm با استفاده از یک اسپکتوفوتومتر UV-vis/NIR اندازه‌گیری شد. شفافیت با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید. در این فرمول T600 انتقال در ۶۰۰ nm و t ضخامت فیلم بر حسب mm می‌باشد [۱۷].

$$\text{شفافیت} = \log\left(\frac{T_{600}}{t}\right) \quad (1)$$

درصد رطوبت: برای اندازه‌گیری درصد رطوبت، فیلمها به قطعات مربعی به ابعاد ۲ × ۲ cm بریده و توزین شدند. این وزن اولیه فیلمها به عنوان Wm در نظر گرفته شد. سپس فیلمها در آون خلاء با دمای ۱۰۵ °C تا زمانی که به وزن ثابت برسند قرار داده شدند. نمونه‌ها توزین و این

<sup>3</sup> Fourier Transform Infrared Spectroscopy

<sup>4</sup> Field Emission Scanning Electron Microscopy

مقاومت کششی فیلم‌ها با استفاده از دستگاه BONGSHIN مدل (DBBP-100) ساخت کشور کره اندازه‌گیری شد. فیلم‌ها در نوارهایی با عرض ۱۵ mm و طول گیج هر کدام ۱۰۰ mm برش داده شدند. سرعت کراس هد روی ۱۰ mm/min تنظیم شد.

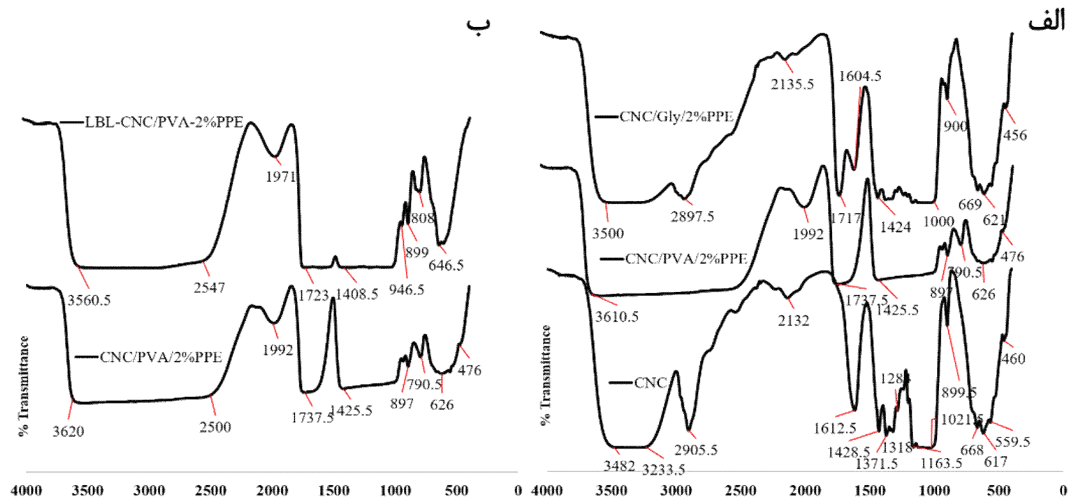
ارزیابی معنی‌داری بین میانگین‌ها در این تحقیق با آزمون دانکن در سطح اعتماد ۰/۹۵ انجام شد که برای این منظور از نرم‌افزار SPSS 26 استفاده گشت. برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار EXCEL 2019 استفاده شد.

### نتایج و بحث

در شکل (۱- الف) باند  $cm^{-1}$  ۳۴۸۲ در طیف فیلم CNC خالص مربوط به پیوندهای O-H گروه هیدروکسیل موجود در ساختار سلولز می‌باشد که در واقع معرف حضور ارتعاشات اتصال هیدروژنی درون مولکولی و بین مولکولی در سلولز است [۱۹]. جذب در محدوده  $cm^{-1}$  ۲۹۰۵/۵ مربوط به ارتعاش کششی C-H می‌باشد [۸]. باندهای ایجادشده در  $cm^{-1}$  ۱۶۱۲/۵ مربوط به ارتعاش کشش کربونیل C=O است [۸]. جذب در محدوده  $cm^{-1}$  ۱۴۲۸/۵ مربوط به اتصالات C-OH در طیف نانوسلولز می‌باشد و در واقع معرف حضور سلولز در ترکیب است [۲۰]. باند مشاهده شده در طول موج  $cm^{-1}$  ۱۳۷۱/۵ و ۱۳۱۸ مربوطه به تغییر شکل گروه‌های C-O است. حلقه پیرانوزی C-O-C که به سلولز نسبت داده می‌شود دارای باندهای در محدوده  $cm^{-1}$  ۱۰۵۰ می‌باشد که در طیف CNC با طیف‌های موجود در محدوده  $cm^{-1}$  ۱۰۲۰ تا  $cm^{-1}$  ۱۱۶۰ که مربوط به کشش C-O می‌باشد یکی شده است [۲۱]. در طیف به‌دست‌آمده از فیلم‌های ترکیبی CNC/PVA/2%PPE باند پدیدار شده در محدوده  $cm^{-1}$  ۳۴۸۲ تا  $cm^{-1}$  ۳۲۳۳/۵ مربوط به گروه‌های هیدروکسیل موجود در ساختار CNC می‌باشد که با پیک  $cm^{-1}$

۲۹۰۵/۵ که مربوط به C-H کششی است یکی شده و از هر دو سمت توسعه یافته است و با باند در محدوده  $cm^{-1}$  ۳۶۵۰-۳۶۰۰ که مربوط به باند هیدروکسیل قوی الکل آزاد (باند کششی OH- غیرپیوندی) در PVA می‌باشد یکی شده است. این در حالی است که این باند در فیلم‌های حاوی Gly تنها در بخش گروه هیدروکسیل توسعه داشته است این پدیده نشان‌دهنده رفتار آب‌دوست Gly است و به پیوندهای هیدروژنی تشکیل‌شده بین CNC و Gly مرتبط است [۲۲]. وجود Gly همچنین منجر به تغییراتی در ناحیه نواری بین  $cm^{-1}$  ۸۰۰ تا  $cm^{-1}$  ۱۲۰۰ شده است که اطلاعاتی در مورد باندهای کششی الکی C-O و نوارهای ارتعاشات کششی نامتقارن و متقارن (C-O-C) می‌دهد. باندها در این ناحیه با باندهای مربوط به CNC یکی شده‌اند که این شدن می‌تواند ناشی از ارتعاش کششی C-O در پیوندهای C-O-H گلیسرول باشد [۲۳]. باند تیز شدید در  $cm^{-1}$  ۱۶۰۴/۵ مربوط به جذب C=C یک ترکیب آروماتیک است [۲۴] که مربوط به پیوندهای ایجادشده با PPE است. به‌طورکلی تغییرات ایجادشده در طیف CNC بعد از افزودن ترکیبات شیمیایی مختلف نشان می‌دهد که واکنش‌های شیمیایی قابل‌توجهی در ساختار این فیلم‌ها ایجادشده است. در شکل (۱- ب) طیف‌های به‌دست‌آمده بسیار مشابه هم می‌باشند و تنها تفاوت مشاهده‌شده در این طیف‌ها مربوط به محدود طول باند  $cm^{-1}$  ۱۷۴۰ تا  $cm^{-1}$  ۱۰۰۰ است که در طیف فیلم تهیه شده به روش لایه به لایه به دو باند تقریباً چسبیده کوتاه تبدیل‌شده‌اند اما در فیلم‌های تهیه شده به روش ترکیبی این باندها بسیار مجزا و با شدت بیشتری می‌باشند که نشان دهنده قوی‌تر بودن پیوندهای C=O کششی در باند  $cm^{-1}$  ۱۷۳۷/۵ و پیوند نامتقارن CH<sub>2</sub> در باند  $cm^{-1}$  ۱۴۲۵ می‌باشد که می‌تواند نشان دهنده تفاوت ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی این فیلم‌ها باشد.

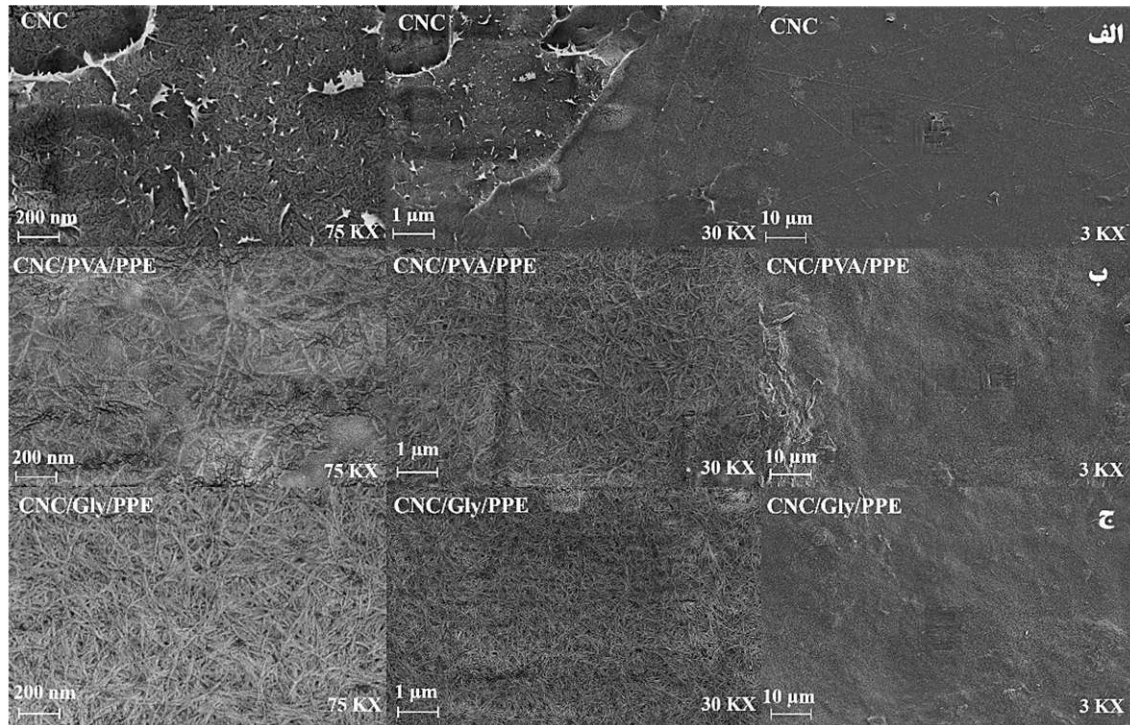
در شکل (۱- الف) باند  $cm^{-1}$  ۳۴۸۲ در طیف فیلم CNC خالص مربوط به پیوندهای O-H گروه هیدروکسیل موجود در ساختار سلولز می‌باشد که در واقع معرف حضور ارتعاشات اتصال هیدروژنی درون مولکولی و بین مولکولی در سلولز است [۱۹]. جذب در محدوده  $cm^{-1}$  ۲۹۰۵/۵ مربوط به ارتعاش کششی C-H می‌باشد [۸]. باندهای ایجادشده در  $cm^{-1}$  ۱۶۱۲/۵ مربوط به ارتعاش کشش کربونیل C=O است [۸]. جذب در محدوده  $cm^{-1}$  ۱۴۲۸/۵ مربوط به اتصالات C-OH در طیف نانوسلولز می‌باشد و در واقع معرف حضور سلولز در ترکیب است [۲۰]. باند مشاهده شده در طول موج  $cm^{-1}$  ۱۳۷۱/۵ و ۱۳۱۸ مربوطه به تغییر شکل گروه‌های C-O است. حلقه پیرانوزی C-O-C که به سلولز نسبت داده می‌شود دارای باندهای در محدوده  $cm^{-1}$  ۱۰۵۰ می‌باشد که در طیف CNC با طیف‌های موجود در محدوده  $cm^{-1}$  ۱۰۲۰ تا  $cm^{-1}$  ۱۱۶۰ که مربوط به کشش C-O می‌باشد یکی شده است [۲۱]. در طیف به‌دست‌آمده از فیلم‌های ترکیبی CNC/PVA/2%PPE باند پدیدار شده در محدوده  $cm^{-1}$  ۳۴۸۲ تا  $cm^{-1}$  ۳۲۳۳/۵ مربوط به گروه‌های هیدروکسیل موجود در ساختار CNC می‌باشد که با پیک  $cm^{-1}$



شکل ۱- نمودار FTIR مربوط به الف) فیلم‌های نانوکریستال سلولز (CNC)، نانوکریستال سلولز / پلی وینیل الکل / عصاره پوست انار (CNC/Gly/2%PPE)، ب) فیلم‌های CNC/PVA/2%PPE و LBL-CNC/PVA-2%PPE

حاوی Gly بوده است که نتایج FTIR نیز این افزایش پیوند را در فیلم‌های حاوی PVA نسبت به فیلم‌های Gly نشان می‌دهد، همچنین یکنواختی سطحی بیشتری در فیلم‌های CNC حاوی PVA دیده شد. میزان فنول کل موجود در هر گرم پوست انار با استفاده از منحنی کالیبراسیون گالیک اسید تعیین شد. بر اساس معادله حاصل از منحنی رگرسیون گالیک اسید، میزان فنول کل موجود در عصاره پوست انار به‌عنوان هم ارزش گالیک اسید بر گرم وزن خشک گیاه (mg of GAE/g of dry weight (DW) برابر با  $5/8 \cdot 3$  mg در هر گرم پوست انار خشک بود (جدول ۱). میزان فلاونوئید کل در هر گرم پوست انار بر اساس منحنی کالیبراسیون کوئرستین محاسبه گردید که بر اساس معادله به‌دست‌آمده از منحنی رگرسیون کوئرستین مقدار فلاونوئید کل موجود در یک گرم پوست انار  $1/5 \cdot 2$  mg بود. این نتایج نشان می‌دهند که ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی سهم قابل‌توجهی را در هر گرم پوست انار به خود اختصاص داده‌اند که می‌تواند در عملکرد ضد میکروب این عصاره‌های گیاهی اثر قابل‌توجهی داشته باشد.

در شکل (۲) تصاویر FESEM نشان دادند که ذرات CNC عرضی کمتر از ۲۰ نانومتر داشتند و طول الیاف CNC بسیار کم و در محدوده ۲۰۰ نانومتر بود که این به دلیل جدا شدن نواحی آمورف از ساختار CNC است. از طرف دیگر تصاویر نشان دادند که در فیلم‌های CNC نحوه پراکنش ذرات بسیار یکنواخت بود و میزان تخلخل مشاهده شده بسیار ناچیز بوده است. در تصویر (ب) و (ج) که به ترتیب مربوط به فیلم‌های CNC در ترکیب با PVA و Gly به‌عنوان نرم‌کننده، اسیدسیتریک به‌عنوان عامل اتصال عرضی و PPE به‌عنوان عامل ضد میکروب است نشان داده شد که افزودن ترکیبات مختلف به ساختار لیفی CNC باعث شد که فیلم حاصل در مقایسه با فیلم CNC خالص تغییرات مرفولوژی قابل‌توجهی را نشان دهد. حضور افزودنی‌ها باعث کاهش قابل‌توجه در تخلخل بین الیاف CNC و افزایش در اتصال بین الیاف شده است. تصاویر FESEM نشان دادند که فیلم‌های حاوی PVA و Gly بسیار مشابه هم می‌باشند اما در بزرگنمایی ۷۵ هزار برابر مشاهده می‌شود که افزایش اتصال و کاهش تخلخل در فیلم‌های تهیه شده از PVA کمی بیشتر از فیلم‌های



شکل ۲- تصاویر FESEM از فیلم‌های (الف) CNC خالص، (ب) CNC/PVA/2%PPE و (ج) CNC/Gly/2%PPE در سه بزرگنمایی ۳ و ۲۰ و ۷۵ هزار برابر

جدول ۱- ترکیبات مؤثر موجود در عصاره پوست انار

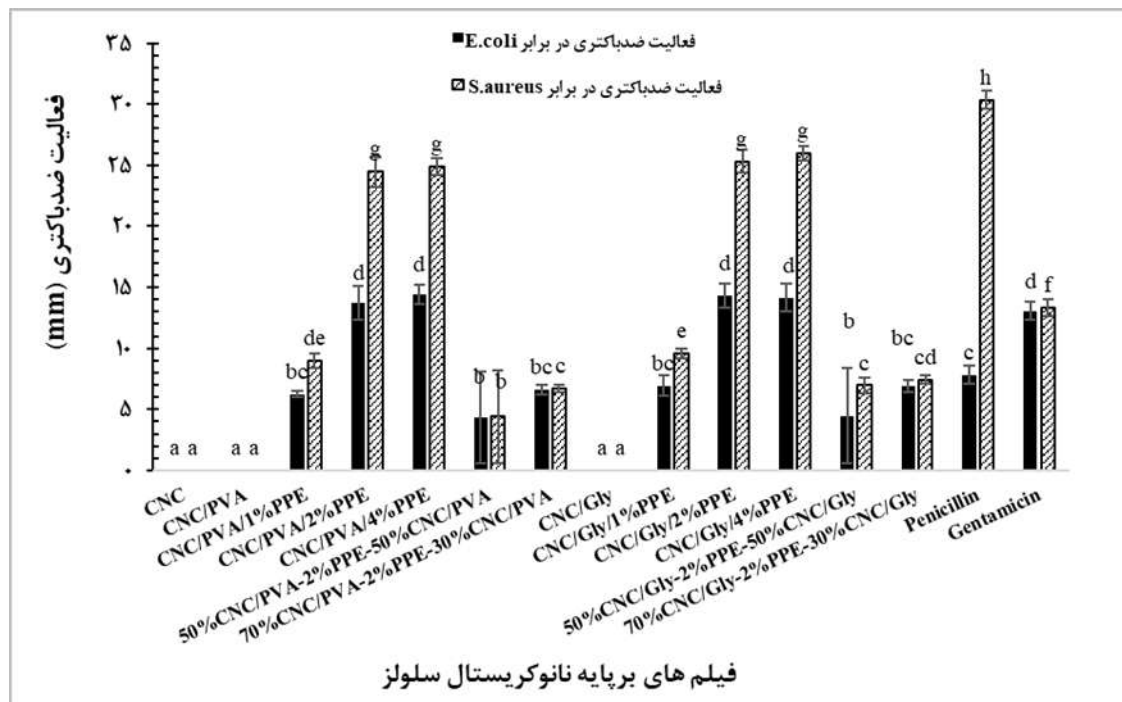
نوع ماده	میزان	فرمول محاسبه گالیک اسید	فرمول محاسبه کوئرستین
فنول کل	mg ۵/۸۰۳	$y = 72/151 x + 0/0033$	-
فلاونوئید کل	mg ۱/۵۰۲	-	$y = 19/644 x + 0/0486$

گذاری در دو غلظت ۲ و ۴ درصد قابل توجه نبود. از طرف دیگر مشاهده شد که در فیلم‌های لایه به لایه (LBL) با غلظت برابر PPE میزان عملکرد ضد میکروب به‌طور قابل توجهی کمتر بود که به دلیل کاهش دسترس‌پذیری ترکیبات فعال PPE در فیلم‌های LBL بود. در غلظت‌های کمتر، ترکیبات فعال موجود در PPE فعالیت آنزیم‌ها را مهار می‌کنند، درحالی‌که در غلظت‌های بالاتر باعث تقلیب پروتئین می‌شوند. آن‌ها با گروه‌های سولفیدریل پروتئین‌های میکروبی محلول و خارج سلولی واکنش می‌دهند و فعالیت‌های آن‌ها را مهار می‌کنند. Vaquero و همکاران گزارش کردند که برخی از فلاونول‌ها (دسته‌ای از فلاونوئیدها) مانند کوئرستین موجود در PPE نفوذپذیری غشای سلولی E.coli را افزایش داده و به نوبه خود توان آن را کاهش می‌دهد. نتایج نشان دادند که روند اثر ضدباکتری فیلم‌ها در برابر باکتری گرم مثبت S.aureus

نتایج آزمون ضدباکتری (شکل ۳) نشان دادند که فیلم‌های CNC خالص و همچنین فیلم‌های حاصل از ترکیب CNC با PVA و یا Gly (CNC/PVA، CNC/Gly) فاقد هرگونه اثر ضدباکتریایی بودند، اما با افزودن ۱٪ PPE فیلم‌ها توانستند رشد باکتری‌ها را به میزان حدود ۶mm در برابر باکتری E.coli کاهش دهند. PPE منبعی غنی از ترکیبات ضدباکتریایی نظیر ترکیبات پلی‌فنولیک، به‌ویژه فلاونوئیدها می‌باشد که می‌توانند ظهور باکتری‌ها را کاهش دهد. پلی‌فنول‌ها از طریق تشکیل کمپلکس‌هایی با پروتئین‌های موجود در دیواره‌های سلولی باکتری به‌عنوان عامل ضد عفونت عمل می‌کنند و در نتیجه باعث تحلیل بیماری می‌شوند. علاوه بر این، فعالیت ضد میکروبی پلی‌فنل‌ها به غلظت آن‌ها بستگی دارد [۲۴]. نتایج نشان دادند با افزایش درصد PPE میزان رشد باکتری‌ها کاهش یافت اما اختلاف اثر

مربوط می‌شود [۲۵] و به‌طور کلی تحقیقات نشان داده‌اند که عصاره‌های گیاهی عملکرد ضد میکروب بیشتری روی باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی دارند.

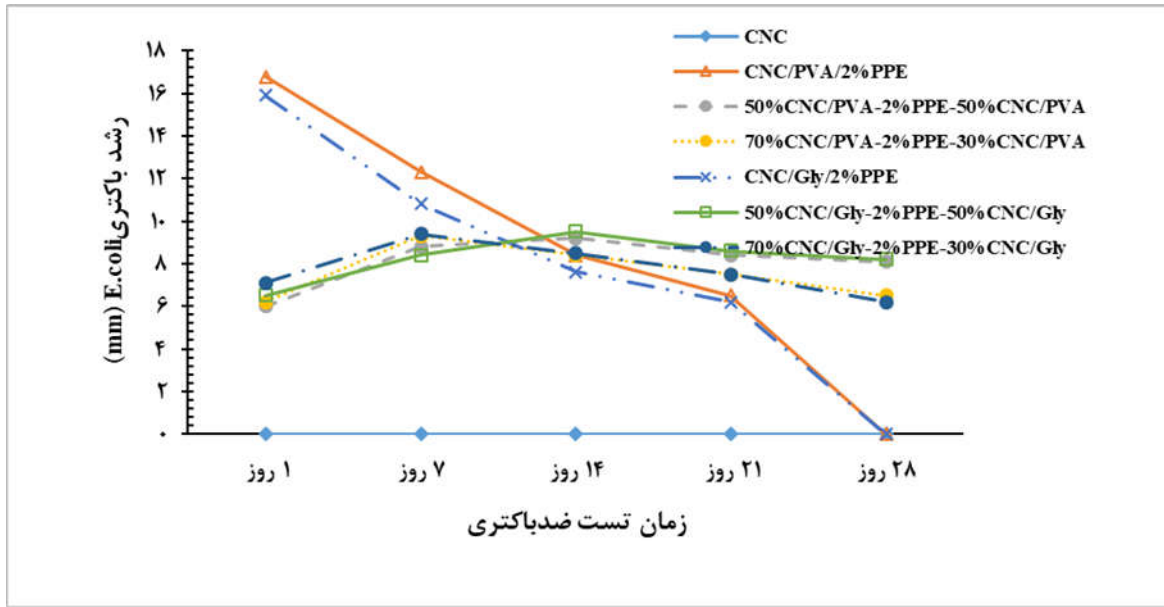
مشابه با E.coli بوده است با این تفاوت که اثر ضد میکروبی فیلم‌ها در برابر S.aureus به‌طور قابل توجه‌ای بیشتر از E.coli بود. Al-Zoreky گزارش کرد که این فعالیت به سطوح زیاد ترکیبات فنلی موجود در PPE



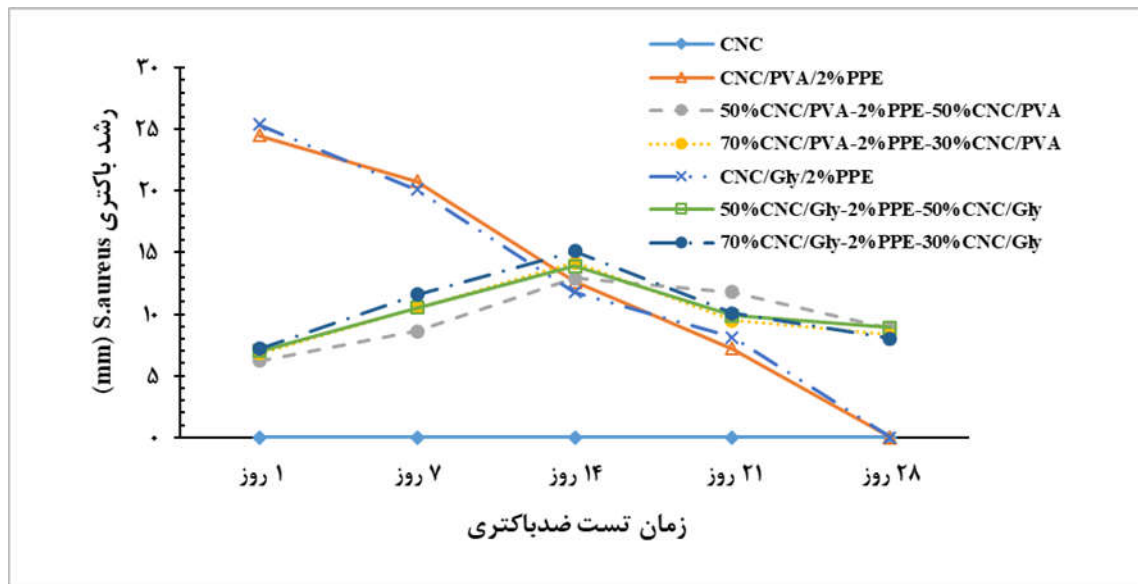
شکل ۳. تغییرات میزان رشد باکتری اشریشیاکلی (E.coli) در برابر عملکرد ضدباکتری فیلم‌های نانوکریستال خالص (CNC)، ترکیب نانوکریستال / پلی ونیل الکل / اسیدسیتریک (CNC/PVA)، ترکیب نانوکریستال / پلی ونیل الکل / اسیدسیتریک / ۱ درصد عصاره پوست انار (CNC/PVA/1%PPE)، ترکیب نانوکریستال / پلی ونیل الکل / اسیدسیتریک / ۲ درصد عصاره پوست انار (CNC/PVA/2%PPE)، ترکیب نانوکریستال / پلی ونیل الکل / اسیدسیتریک / ۱ درصد عصاره پوست انار (CNC/PVA/4%PPE)، ترکیب نانوکریستال / پلی ونیل الکل / اسیدسیتریک / ۴ درصد عصاره پوست انار (CNC/PVA/4%PPE)، فیلم‌های لایه به لایه با ضخامت برابر ۵۰:۵۰ نانوکریستال سلولز / پلی ونیل الکل / اسیدسیتریک و یک لایه عصاره پوست انار در وسط (50%CNC/PVA-2%PPE-50%CNC/PVA) و فیلم‌های لایه به لایه با ضخامت برابر ۷۰:۳۰ نانوکریستال سلولز / پلی ونیل الکل / اسیدسیتریک و یک لایه عصاره پوست انار در وسط (70%CNC/PVA-2%PPE-30%CNC/PVA)

است، به‌مرور زمان پس از گذشت ۱ هفته اثر ضدباکتری آن‌ها در برابر باکتری‌ها افزایش یافت و سپس به‌مرور زمان این اثر روند کاهشی یافت. فیلم‌های LBL توانستند اثر ضدباکتری خود را پس از ۱ ماه به‌خوبی حفظ کنند. در فیلم‌های LBL، در فیلم‌های دارای لایه‌های ۵۰ به ۵۰ مقایسه با ۳۰ به ۷۰ اثر ضدباکتری در مرور زمان پایدارتر بود. این عملکرد در برابر هر دو باکتری روند مشابهی را داشت با این تفاوت که اثر مانع‌تی فیلم‌های اصلاح شده در برابر باکتری گرم مثبت S.aureus به‌مراتب بیشتر از E.coli بود.

شکل (۴ و ۵) عملکرد ضدباکتری فیلم‌های حاوی ۲/PPE به دو روش ترکیبی و LBL در برابر باکتری E.coli و S.aureus در طول زمان را نشان می‌دهند. در فیلم‌های تهیه شده به روش ترکیبی در ابتدا اثر ضدباکتری قابل توجه‌ای مشاهده شد که به‌مرور زمان اثر ضدباکتری در برابر باکتری‌ها کاهش یافت و تنها تا ۳ هفته این فیلم‌ها توانستند اثر ضد میکروب خود را حفظ کنند. در ارتباط با فیلم‌های تهیه شده به روش LBL نتایج نشان دادند که در ابتدا این فیلم‌ها فعالیت ضدباکتری ضعیفی را نشان دادند که به دلیل عدم در دسترس بودن ترکیبات فعال PPE در سطح فیلم‌ها بوده



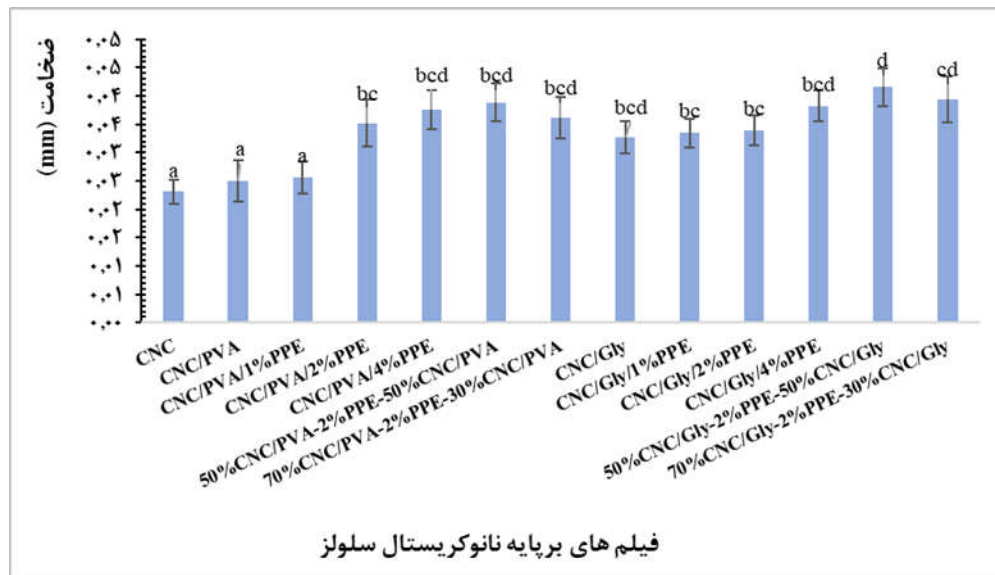
شکل ۴- تغییرات میزان رشد باکتری E.coli در نتیجه فعالیت ضدباکتری فیلم‌های اصلاح شده در طول یک ماه



شکل ۵- تغییرات میزان رشد باکتری S.aureus در نتیجه فعالیت ضدباکتری فیلم‌های اصلاح شده در طول یک ماه

۶). این روند افزایشی در تمام فیلم‌ها مشاهده شد که می‌تواند تأثیر قابل‌توجهی بر ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی فیلم‌های نهایی داشته باشد. نتایج نشان دادند که روند تغییر ضخامت در فیلم‌های حاوی PVA تقریباً مشابه با فیلم‌های حاوی Gly بود.

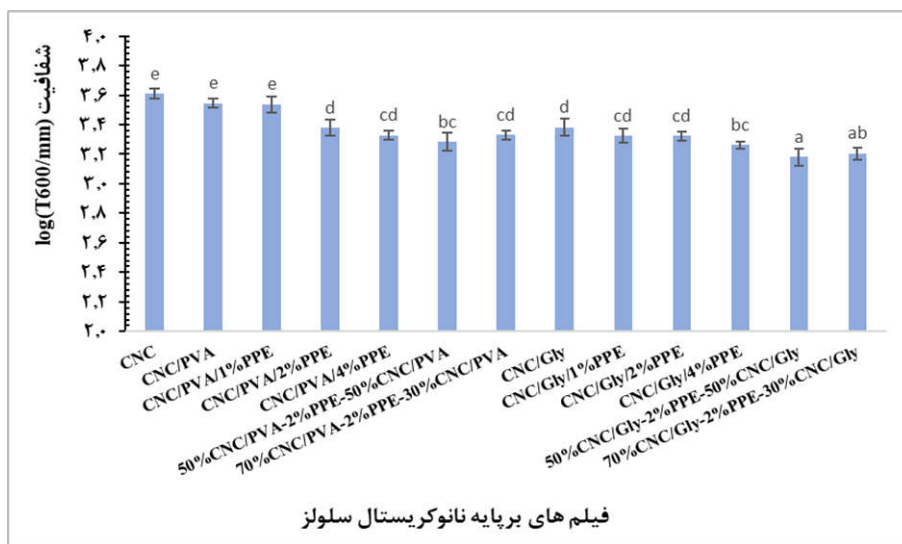
نتایج نشان دادند که با افزایش ترکیبات در فیلم‌های برپای CNC نظیر اضافه شدن PVA و یا Gly و اسیدسیتریک و PPE ضخامت فیلم‌های نهایی افزایش یافت و از ۰/۰۲۳ mm در فیلم CNC خالص به حدود ۰/۰۳۷ mm در فیلم CNC/PVA/4%PPE رسید (شکل



شکل ۶- تغییرات ضخامت فیلم‌های نانوکریستال سلولز اصلاح شده

اثر Gly در کاهش شفافیت فیلم‌های اصلاح شده در مقایسه با PVA کمی بیشتر بود و فیلم‌های حاصل از ترکیب Gly ( $\log(T600/\text{mm})$  ۳/۳۸) شفافیت کمتری را در مقایسه با فیلم‌های ترکیبی با PVA ( $\log(T600/\text{mm})$  ۳/۵۵) نشان دادند. این کاهش شفافیت با افزایش PPE و افزایش درصد آن به فرمول فیلم‌ها بیشتر شد به نحوی که در فیلم‌های CNC/PVA/4%PPE و CNC/Gly/4%PPE شفافیت فیلم‌ها به ترتیب معادل  $\log(T600/\text{mm})$  ۳/۳۳ و  $\log(T600/\text{mm})$  ۳/۲۶ شد. در این فیلم‌ها کمترین میزان شفافیت مربوط به فیلم‌های LBL می‌باشد که بیشترین ضخامت را داشتند.

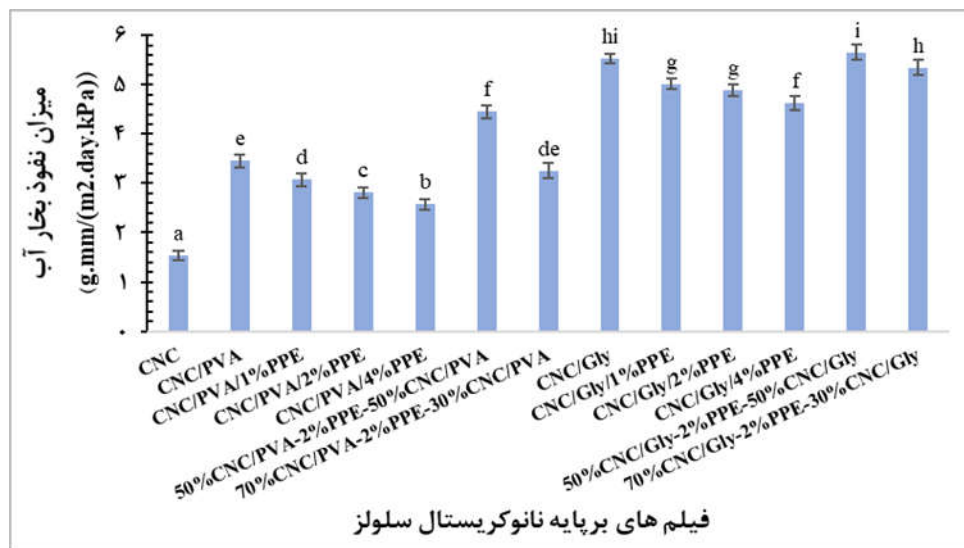
یکی از ویژگی‌های بسیار مهم در صنعت بسته‌بندی این است که این مواد باید از مواد غذایی در برابر اثرات نور به‌ویژه اشعه ماوراءبنفش محافظت کنند. شفافیت فیلم‌های CNC خالص به‌طور قابل‌توجهی زیاد و برابر با  $\log(T600/\text{mm})$  ۳/۶۱ اندازه‌گیری شد. طبق گزارشات سایر محققین شفافیت فیلم‌های حاصل از CNC در مقایسه با PVA و گلیسرول کمی بیشتر است که به دلیل شفافیت ذاتی بیشتر CNC در مقایسه با PVA و Gly می‌باشد [۲۶]. از این رو همان‌طور که در شکل ۷ مشاهده می‌شود استفاده از مواد نرم‌کننده PVA و Gly منجر به کاهش شفافیت فیلم‌های نهایی شد. نتایج نشان دادند که



شکل ۷- تغییرات درصد شفافیت فیلم‌های نانوکریستال سلولز اصلاح شده

تلقی می‌گردد [۱]. با توجه به اینکه نفوذ بخار آب فیلم‌های CNC خالص بسیار کم می‌باشد نتایج نشان دادند که افزودن نرم‌کننده‌های PVA و Gly که ترکیبات آب‌دوستی می‌باشند منجر به افزایش نفوذ بخار آب فیلم‌های نهایی شد. این افزایش در فیلم‌های حاوی Gly به مراتب بیشتر از فیلم‌های حاوی PVA بوده است که به دلیل ویژگی آب‌دوستی بسیار زیاد Gly می‌باشد. این افزایش نفوذ بخار آب با افزودن PPE که دارای ترکیبات آب‌گریز می‌باشد و احتمالاً در ترکیب با برخی گروه‌های آب‌دوست نرم‌کننده‌ها قرار گرفته است کاهش یافت.

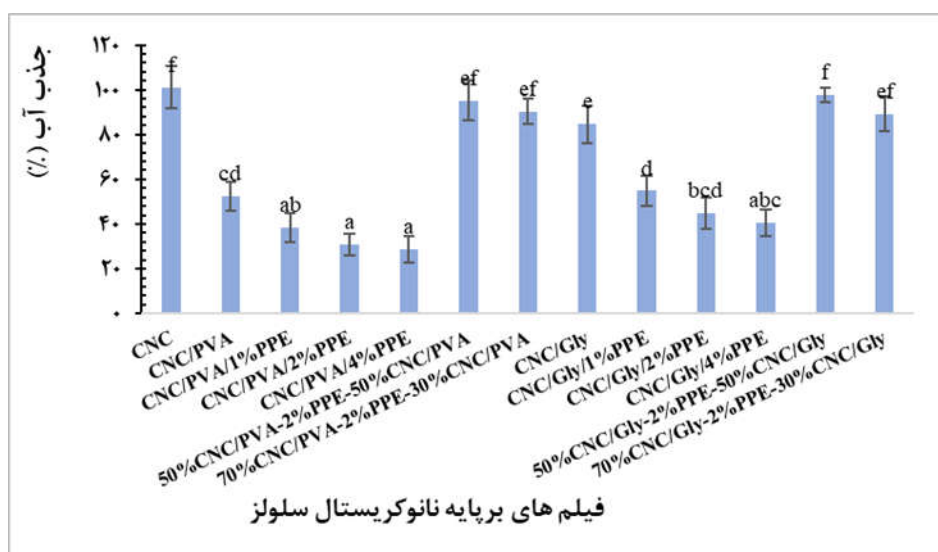
از آنجایی که فیلم‌های برپایه نانو مواد سلولزی حساس به جذب رطوبت می‌باشند در تولید فیلم از CNC ویژگی ممانعت به نفوذ بخار آب فاکتور مهمی است [۲۷]. نتایج نشان دادند که در فیلم‌های CNC خالص میزان نفوذ بخار آب معادل  $1/54$  (g.mm/(m<sup>2</sup>.day.kPa)) بود. نفوذپذیری سلولز به کریستالی بودن آن بستگی دارد چراکه مناطق با کریستالیت بالا برای مولکول‌های آب غیرقابل دسترس هستند. سلولز حاوی یک جزء پاراکریستالی (منطقه آمورف) است که برای مولکول‌های آب قابل دسترس است و به واسطه این بخش است که سلولز ماده آب‌دوستی



شکل ۸. تغییرات میزان نفوذ بخار آب فیلم‌های نانوکریستال سلولز اصلاح شده

اما مهم‌ترین فاکتور در کاهش میزان جذب آب پیوندهای کووالانسی ایجادشده توسط عامل اتصال عرضی اسیدسیتریک می‌تواند باشد که دسترس‌پذیری گروه‌های هیدروکسیل PVA و CNC را برای شرکت در واکنش با گروه‌های هیدروکسیل آب کاهش داده است. اثر Gly در فیلم‌های CNC بر جذب آب کمی کمتر از فیلم‌های حاوی PVA بوده است که با توجه به آنالیز FTIR نیز می‌توان به درصد بیشتر گروه‌های OH در ساختار Gly نسبت داد. نتایج نشان دادند که در فیلم‌های LBL میزان جذب آب کمی بیشتر بود که می‌تواند به دلیل تداخل بیشتر این فیلم‌ها در مقایسه با فیلم‌ها ترکیبی باشد [۲۸].

در شکل ۹ میزان جذب آب فیلم‌های برپایه CNC نشان داده شده است. مولکول‌های آب ترجیحاً از طریق نواحی آمورف ماتریس پلیمری پخش می‌شوند. از آنجا که CNC فاقد بخش آمورف است در نتیجه جذب آب کمی را نشان داد. PVA یک ماده آب‌دوست می‌باشد اما حضور آن در فیلم‌های CNC منجر به کاهش جذب آب فیلم‌های شده است. PVA احتمالاً از طریق کاهش تداخل و ایجاد پیوند (نتایج FTIR ایجاد پیوند بین گروه‌های واکنشگر CNC و PVA را اثبات کردند) با گروه‌های واکنشگر CNC که دسترس‌پذیری آب به گروه‌های هیدروکسیل CNC را کاهش می‌دهد منجر به کاهش جذب آب در فیلم‌ها شد؛



شکل ۹- تغییرات میزان جذب آب فیلیم های نانوکریستال سلولز اصلاح شده

می تواند منجر به افزایش استحکام کششی آن ها شود و علت آن را به شکسته شدن دسته های فیبریل سلولز نسبت دادند [۲۹]. افزودن PVA همراه با اسیدسیتریک استحکام کششی فیلیم های حاصل را به میزان ۳۴۶٪ افزایش داد در حالی که اثر Gly در مقایسه با PVA کمتر بود و استحکام کششی فیلیم های حاصل به میزان ۲۳۴٪ افزایش یافت. به طور کلی افزایش استحکام کششی در مقایسه با فیلیم های خالص را می توان به تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین دو پلیمر نسبت داد. در این فیلیم ها ترکیب PPE در فیلیم ها منجر به کاهش استحکام کششی فیلیم ها شد. کمترین میزان استحکام کششی در فیلیم های تهیه شده به روش LBL به دست آمد که بیشترین درصد رطوبت را داشتند. مدول الاستیسیته در فیلیم های برپای CNC خالص معادل ۰/۶۴٪ بود که در ترکیب با PVA و اسیدسیتریک و Gly و اسیدسیتریک به ترتیب افزایش ۶۹٪ و ۱۲۸٪ ای را نشان داد. تغییرات ایجاد شده در این فیلیم ها با افزایش درصد PPE بیشتر بوده است که می تواند به دلیل حضور ترکیبات فنولیک در ساختار فیلیم ها و کاهش پیوندهای بین مولکولی در ساختار فیلیم باشد. بیشترین درصد مدول الاستیسیته مربوط به فیلیم های 50%CNC/Gly-2%PPE-50%CNC/Gly بود ۱۲/۶۲٪ بود که بیشترین رطوبت و ضعیف ترین ساختار پیوندی را نشان داده بود.

نتایج مربوط به مقاومت کششی، مدول الاستیسیته و درصد رطوبت که مهم ترین فاکتور تأثیرگذار بر ویژگی های مقاومتی فیلیم ها می باشد در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان دادند که با افزودن PVA و Gly به دلیل ویژگی جذب آب بیشتر آن ها نسبت به CNC درصد رطوبت فیلیم ها افزایش یافت و رطوبت از ۱۵/۳۹٪ به ترتیب به ۱۷/۶۱ و ۲۳/۴۴٪ رسید همان طور که مشاهده می شود اثر Gly در افزایش رطوبت فیلیم ها بسیار بیشتر از فیلیم های حاوی PVA بود. PVA و Gly هر دو دارای گروه های آب دوست زیادی هستند که اکثر این گروه ها به دلیل شرکت در پیوند کووالانسی با اسیدسیتریک متقابل مصرف می شوند و از این رو پس از آن برای تعامل با مولکول های آب در دسترس نیستند؛ اما افزودن PPE به دلیل ماهیت آب گریزی مواد فنلی موجود در PPE منجر به کاهش جذب آب فیلیم ها شد. بیشترین درصد رطوبت مربوط به فیلیم های تهیه شده به روش LBL بود که با توجه به تصاویر FESEM می تواند به دلیل ساختار نامتقارن سطحی فیلیم های LBL و عدم اتصال یا اتصال ضعیف ترکیبات عصاره پوست انار با سایر اجزای فیلیم باشد. در جدول ۲ مشاهده می شود که افزودن نرم کننده ها همراه با عامل اتصال عرضی به ترکیب فیلیم های CNC منجر به افزایش استحکام کششی فیلیم ها شد. Csiz'ar و Nagy (۲۰۱۷) گزارش کردند که فیلیم های CNC شفاف، قوی و سفت اما شکننده هستند و افزودن نرم کننده ها

جدول ۲- نتایج مربوط به تغییرات میزان رطوبت، مقاومت به کشش و مدول الاستیسیته در فیلم‌های اصلاح شده برپای CNC

نوع فیلم	رطوبت (%)	مقاومت به کشش (MPa)	مدول الاستیسیته (%)
CNC	۱۵/۳۹	۲۵/۲۵	۰/۶۵
CNC/PVA	۱۷/۶۱	۱۱۲/۸۱	۱/۰۸
CNC/PVA/1%PPE	۱۶/۰۱	۱۰۰/۸۵	۱/۳۶
CNC/PVA/2%PPE	۱۴/۸۱	۱۰۲/۵۹	۱/۶۶
CNC/PVA/4%PPE	۱۴/۵۲	۸۸/۹۳	۲/۰۰
50%CNC/PVA-2%PPE-50%CNC/PVA	۱۹/۳۵	۱۸/۶۰	۷/۸۲
70%CNC/PVA-2%PPE-30%CNC/PVA	۲۰/۱۲	۱۸/۳۰	۷/۸۳
CNC/Gly	۲۳/۴۴	۸۵/۰۴	۱/۴۶
CNC/ Gly /1%PPE	۲۱/۴۴	۷۸/۱۴	۱/۶۴
CNC/ Gly /2%PPE	۱۸/۴۲	۷۶/۵۱	۱/۸۵
CNC/ Gly /4%PPE	۱۶/۶۱	۶۵/۰۳	۲/۲۶
50%CNC/ Gly -2%PPE-50%CNC/ Gly	۲۱/۴۴	۱۵/۷۷	۷/۸۴
70%CNC/ Gly -2%PPE-30%CNC/ Gly	۲۰/۶۳	۱۶/۹۹	۷/۹۵

### نتیجه‌گیری

این پژوهش با هدف یافتن یک جایگزین زیست تخریب‌پذیر ضد میکروب به جای مواد بسته‌بندی پرپایه مواد نفتی به انجام رسید. با توجه به این نکته که در سال‌های اخیر تمام توجه‌ها به حفظ محیط زیست و استفاده از مواد زیست تخریب‌پذیر می‌باشند در این پژوهش به منظور بهبود ویژگی‌های ممانعتی و مقاومتی در فیلم‌های برپای نانوکریستال سلولوز اثر پلی و نیل الکل و گلیسرول به عنوان نرم‌کننده و اثر عصاره پوست انار به عنوان عامل ضد میکروب در دو روش ترکیبی و لایه به لایه با محلول پایه مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس نتایج به دست آمده فیلم‌های متشکل از ترکیب نانوکریستال سلولوز، پلی و نیل الکل و ۲ درصد عصاره با بهترین شفافیت، ممانعت از نفوذ بخار آب، درصد رطوبت و جذب آب کمتر، استحکام کششی مناسب و عملکرد ضدباکتری مطلوب و کم‌ترین هزینه تولید، بهترین گزینه برای بسته‌بندی مواد غذایی می‌باشد. اگر چه فیلم‌های تهیه شده به روش لایه به لایه نیز در محیط‌هایی که نیاز به ویژگی‌های ممانعتی به جذب آب ندارند اما

عملکرد ضد میکروب در طول زمان مهم می‌باشد گزینه مناسبی خواهند بود.

### منابع

- [1] Cazón, P., Vázquez, M., and Velazquez, G., 2018. Composite films of regenerate cellulose with chitosan and polyvinyl alcohol: Evaluation of water adsorption, mechanical and optical properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 117, pp.235-246.
- [2] Nguyen, A. T., Parker, L., Brennan, L., and Lockrey, S., 2020. A consumer definition of eco-friendly packaging. *Journal of Cleaner Production*, 252, pp.119792.
- [3] de Lima Barizão, C., Crepaldi, M. I., Oscar de Oliveira, S., de Oliveira, A. C., Martins, A. F., Garcia, P. S., and Bonafé, E. G., 2020., Biodegradable films based on commercial κ-carrageenan and cassava starch to achieve low production costs. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, pp.582-590.
- [4] Sun, J., Zhang, C., Yuan, Z., Ji, X., Fu, Y., Li, H., and Qin, M., 2017. Composite films with ordered carbon nanotubes and cellulose nanocrystals. *The Journal of Physical Chemistry C*, 121(16), pp.8976-8981.
- [5] Mujtaba, M., Salaberria, A. M., Andres, M. A., Kaya, M., Gunyakti, A., and Labidi, J., 2017. Utilization of flax (*Linum usitatissimum*) cellulose nanocrystals as reinforcing material for chitosan films. *International journal of biological macromolecules*, 104, pp.944-952.

- Bernal-Chávez, S.A., Magaña, J.J. and Leyva-Gómez, G., 2023. Films for wound healing fabricated using a solvent casting technique. *Pharmaceutics*, 15 (7), p.1914.
- [18] Nwabor, O.F., Singh, S., Paosen, S., Vongkamjan, K. and Voravuthikunchai, S.P., 2020. Enhancement of food shelf life with polyvinyl alcohol-chitosan nanocomposite films from bioactive Eucalyptus leaf extracts. *Food Bioscience*, 36, p.100609.
- [19] Priyadarshi, R., Kumar, B. and Negi, Y.S., 2018. Chitosan film incorporated with citric acid and glycerol as an active packaging material for extension of green chilli shelf life. *Carbohydrate polymers*, 195, pp.329-338.
- [20] Foster, E.J., Moon, R.J., Agarwal, U.P., Bortner, M.J., Bras, J., Camarero-Espinosa, S., Chan, K.J., Clift, M.J., Cranston, E.D., Eichhorn, S.J. and Fox, D.M., 2018. Current characterization methods for cellulose nanomaterials. *Chemical Society Reviews*, 47(8), pp.2609-2679.
- [21] Van Nguyen, S. and Lee, B.K., 2021. Microfibrillated cellulose film with enhanced mechanical and water-resistant properties by glycerol and hot-pressing treatment. *Cellulose*, 28(9), pp.5693-5705.
- [22] Theivasanthi, T., Christma, F.A., Toyin, A.J., Gopinath, S.C. and Ravichandran, R., 2018. Synthesis and characterization of cotton fiber-based nanocellulose. *International journal of biological macromolecules*, 109, pp.832-836.
- [23] Cerqueira, M.A., Souza, B.W., Teixeira, J.A. and Vicente, A.A., 2012. Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films—A comparative study. *Food hydrocolloids*, 27(1), pp.175-184.
- [24] Amaefule, O. C., Ugariogu, N. S., Ojediran, G. O., and Akalazi, C. O., 2024. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of quaternary ammonium compounds from natural oils. *Journal of Science and Technology*, 2024, 11(01), pp.071–085
- [25] Diganta, D., Sukalyani, D., Sudipta, H., Subhalakshmi, G., Ratnamala, R. and Banasri, H., 2012. Pomegranate pericarp extract enhances the antibacterial activity of ciprofloxacin against extended-spectrum b-lactamase (ESBL) and metallo-b-lactamase (MBL) producing Gram-negative bacilli. *Food Chemistry and Toxicology*, 50, pp.4302-4309.
- [26] Al-Zoreky, N.S., 2009. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *International journal of food microbiology*, 134(3), pp.244-248.
- [27] Ben Shalom, T., Nevo, Y., Leibler, D., Shtein, Z., Azerraf, C., Lapidot, S. and Shoseyov, O., 2019. Cellulose nanocrystals (CNCs) induced crystallization of polyvinyl alcohol (PVA) super
- [6] Beck, S., Bouchard, J., and Berry, R., 2011. Controlling the reflection wavelength of iridescent solid films of nanocrystalline cellulose. *Biomacromolecules*, 12, pp.167–172.
- [7] Klemm, D., Kramer, F., Moritz, S., Lindström, T., Ankerfors, M., Gray, D., and Dorris, A., 2011. Nanocelluloses: a new family of nature-based materials. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(24), pp.5438-5466.
- [8] Sun, Y., Meng, C., Zheng, Y., Xie, Y., He, W., Wang, Y., Qiao, K. and Yue, L., 2018. The effects of two biocompatible plasticizers on the performance of dry bacterial cellulose membrane: a comparative study. *Cellulose*, 25, pp.5893-5908.
- [9] Ma, Y., Xin, L., Tan, H., Fan, M., Li, J., Jia, Y., Ling, Z., Chen, Y. and Hu, X., 2017. Chitosan membrane dressings toughened by glycerol to load antibacterial drugs for wound healing. *Materials Science and Engineering: C*, 81, pp.522-531.
- [11] Dai, H., Huang, Y., and Huang, H., 2018. Eco-friendly polyvinyl alcohol/carboxymethyl cellulose hydrogels reinforced with graphene oxide and bentonite for enhanced adsorption of methylene blue. *Carbohydrate Polymers*, 185, pp.1–11.
- [12] Chen, J., Wei, D., Gong, W., Zheng, A. and Guan, Y., 2018. Hydrogen-bond assembly of poly (vinyl alcohol) and polyhexamethylene guanidine for nonleaching and transparent antimicrobial films. *ACS applied materials & interfaces*, 10(43), pp.37535-37543.
- [13] Nguyen, A.T., Parker, L., Brennan, L. and Lockrey, S., 2020. A consumer definition of eco-friendly packaging. *Journal of Cleaner Production*, 252, p.119792.
- [14] Kaya, M., Khadem, S., Cakmak, Y.S., Mujtaba, M., Ilk, S., Akyuz, L., Salaberria, A.M., Labidi, J., Abdulqadir, A.H. and Deligöz, E., 2018. Antioxidative and antimicrobial edible chitosan films blended with stem, leaf and seed extracts of *Pistacia terebinthus* for active food packaging. *RSC advances*, 8(8), pp.3941-3950.
- [15] Mansour, E., Ben Khaled, A., Lachiheb, B., Abid, M., Bachar, K. and Ferchichi, A., 2013. Phenolic compounds, antioxidant, and antibacterial activities of peel extract from Tunisian pomegranate. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15(7), pp.1393-1403.
- [16] Bag, G.C., Devi, P.G. and Bhaigyabati, T.H., 2015. Assessment of total flavonoid content and antioxidant activity of methanolic rhizome extract of three *Hedychium* species of Manipur valley. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 30(1), pp.154-159.
- [17] Borbolla-Jiménez, F.V., Peña-Corona, S.I., Farah, S.J., Jiménez-Valdés, M.T., Pineda-Pérez, E., Romero-Montero, A., Del Prado-Audelo, M.L.,

- films by using nanocellulose as an additive. *International Journal of Biological Macromolecules*, 166, pp.288-296.
- [30] Csiszár, E. and Nagy, S., 2017. A comparative study on cellulose nanocrystals extracted from bleached cotton and flax and used for casting films with glycerol and sorbitol plasticisers. *Carbohydrate polymers*, 174, pp.740-749.
- performing nanocomposite films. *Macromolecular bioscience*, 19(3), p.1800347.
- [28] Vähä-Nissi, M., Koivula, H.M., Räisänen, H.M., Vartiainen, J., Ragni, P., Kenttä, E., Kaljunen, T., Malm, T., Minkkinen, H. and Harlin, A., 2017. Cellulose nanofibrils in biobased multilayer films for food packaging. *Journal of Applied Polymer Science*, 134(19).
- [29] Zhang, W., Zhang, Y., Cao, J. and Jiang, W., 2021. Improving the performance of edible food packaging