



## توسعه و بررسی عملکرد فیلم کیتوزان/آلیزارین به عنوان بسته بندی هوشمند با خواص ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی و حساس به pH

میثم سلیمانی نجف آبادی<sup>۱</sup>، امیر شاکریان<sup>۲</sup>، زهره مشاک<sup>۳\*</sup>، ابراهیم رحیمی<sup>۲</sup>

۱- گروه بهداشت مواد غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲- مرکز تحقیقات تغذیه و محصولات ارگانیک، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۳- گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: [mashak@kiauo.ac.ir](mailto:mashak@kiauo.ac.ir)

دریافت مقاله: ۵ مرداد ۱۴۰۴، بازنگری: ۲۳ مرداد ۱۴۰۴، پذیرش نهایی: ۰۲ آذر ۱۴۰۴

 10.22034/nfvm.2025.538094.1296

### چکیده

فیلم‌های نشانگر تغییر رنگ دهنده حساس به pH برای سیستم‌های بسته بندی هوشمند ضروری هستند. آلیزارین، یک رنگدانه آلی با خواص حساس به تغییرات pH، به عنوان نشانگر بصری در بسته بندی‌های هوشمند مورد توجه محققان قرار گرفته است. بنابراین، این مطالعه با هدف توسعه و بررسی عملکرد فیلم هوشمند کیتوزان/آلیزارین به عنوان یک سامانه بسته بندی فعال با قابلیت حساسیت به تغییرات pH، و ارزیابی فعالیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی آن انجام شد. آلیزارین استخراج شده از ریشه‌ی روناس با ضریب جذب مولی  $\epsilon=5.5$  و مقدار  $3/43$  میلی گرم بر گرم وزن خشک، در ساخت فیلم هوشمند کیتوزان حاوی ۳ درصد آلیزارین به کار گرفته شد. برهمکنش گروه های عاملی (FTIR)، مورفولوژی سطح فیلم (SEM) فعالیت ضد میکروبی (MIC، MBC و قطر هاله عدم رشد) بر پاتوژن‌های غذازاد شامل *S. aureus*، *E. coli*، *S. typhimurium* و *L. monocytogenes*، فعالیت آنتی اکسیدانی (DPPH و ABTS) و تغییرات رنگ فیلم هوشمند در pH 1 تا 14 بررسی شد. تحلیل های FTIR و SEM نشان دادند که برهم کنش میان گروه‌های آمینی کیتوزان و ساختار آروماتیک آلیزارین منجر به تغییرات ساختاری و افزایش ناهموازی سطحی فیلم شد. این فیلم فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی (MIC، MBC و قطر هاله عدم رشد)، در برابر پاتوژن‌های غذازاد نشان داد، به ویژه علیه باکتری‌های گرم مثبت نشان داد ( $p < 0.05$ ). همچنین، آزمون‌های DPPH و ABTS افزایش معنی دار فعالیت آنتی اکسیدانی فیلم را تأیید کردند ( $p < 0.05$ ). پاسخ رنگی فیلم در محدوده‌ی pH 1 تا 14 از زرد به بنفش تغییر کرد که نشان دهنده‌ی حساسیت بالا به تغییرات محیطی است. در مجموع می‌توان گفت فیلم کیتوزان/آلیزارین با عملکرد چندگانه‌ی ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی و حساس به pH، یک گزینه‌ی مؤثر و کاربردی برای توسعه‌ی بسته بندی‌های هوشمند و ایمن سازی مواد غذایی محسوب می‌شود.

**واژگان کلیدی:** آلیزارین، کیتوزان، ضد باکتری، آنتی اکسیدان، حساس به تغییرات pH و بسته بندی هوشمند

## مقدمه

بیماری‌های ناشی از غذا که معمولاً ماهیت عفونی یا سمی دارند و توسط باکتری‌ها (۳۹ درصد)، ویروس‌ها (۵۹ درصد)، انگل‌ها (۲ درصد) یا از طریق غذای آلوده به مواد شیمیایی وارد بدن می‌گردند، ایجاد می‌شوند. این بیماری‌ها معمولاً عفونت‌های ناشی از غذا و یا مسمومیت غذایی نامیده می‌شوند (۱). بیماری‌های باکتریایی منتقله از غذا به دلیل ماهیت متنوع، مقاومت ضد میکروبی در حال تکامل و مسیرهای انتقال پیچیده، چالش‌های قابل توجهی را ایجاد می‌کنند. مقاومت ضد میکروبی یک تهدید حیاتی برای سلامت جهانی است (۲). با وجود پیشرفت در ایمنی مواد غذایی، بیماری‌های ناشی از غذا در حال افزایش هستند. مراکز کنترل و پیشگیری از بیماری‌ها (CDC)<sup>۱</sup> گزارش می‌دهد که چهار مرحله ساده، یعنی تمیز کردن، جدا کردن، پختن و خنک کردن، می‌توانند بیماری‌های ناشی از غذا را به طور قابل توجهی کنترل کنند و به پیشگیری از بیماری‌های مرتبط با غذا در سطح خانوار کمک کنند (۳). اما با تکامل نسل‌های جدید چالش‌های مقاومت ضد میکروبی، تقاضای مصرف‌کنندگان، دانشمندان و صنعت غذا را به سمت استراتژی‌هایی سوق می‌دهد که ماندگاری، نظارت در زمان واقعی، ویژگی‌های حسی، بسته‌بندی و کیفیت کلی غذا را بهبود می‌بخشند. این استراتژی‌ها به منظور جلوگیری از آلودگی میکروبی در سراسر زنجیره تأمین مواد غذایی به ارمغان آورده است (۴-۵).

بسته‌بندی هوشمند رویکردی است که اخیراً در صنعت بسته‌بندی مواد غذایی معرفی شده است و به ادغام حسگرها، شاخص‌ها یا کدهای QR<sup>۲</sup> در سیستم بسته‌بندی برای نظارت و انتقال اطلاعات مربوط به وضعیت محصولات، مانند تازگی، کیفیت و قابلیت ردیابی، اشاره دارد. در واقع،

## توسعه و بررسی عملکرد فیلم کیتوزان/آلیزارین به عنوان بسته‌بندی هوشمند ...

بسته‌بندی هوشمند بر قابلیت تشخیص یا نظارت بر ویژگی‌های خاص محصول غذایی، محیط داخلی بسته‌بندی یا شرایط حمل و نقل تمرکز دارد (۶). بسته‌بندی هوشمند امکان ردیابی سریع وضعیت محصول را فراهم می‌کند و داده‌های ارزشمندی در مورد عواملی مانند دما، رطوبت و وجود آلاینده‌ها ارائه می‌دهند و در نتیجه توانایی ارزیابی و اطمینان از یکپارچگی محصول در سراسر زنجیره تأمین مواد غذایی را افزایش می‌دهند (۷). در میان شاخص‌های گزارش شده، شاخص تازگی به دلیل سادگی فرآیند و سهولت ارتباط با مصرف‌کننده برجسته شده‌اند. در واقع شاخص تازگی، برای نظارت و اطلاع‌رسانی کیفیت محصولات غذایی در طول ذخیره‌سازی و حمل و نقل با تشخیص رشد میکروبی و تغییرات شیمیایی طراحی شده است (۸). این شاخص‌ها با محصولات جانبی حاصل از فعالیت میکروبی تعامل دارند و نشانه‌های بصری در مورد کیفیت میکروبی محصول ارائه می‌دهند. در بیشتر موارد، شاخص‌های تازگی به استفاده از ترکیباتی مانند آنتوسیانین‌ها، رنگ‌های مصنوعی و طبیعی متکی هستند که به تغییرات pH ناشی از تخریب محصول حساس هستند و منجر به تغییر قابل مشاهده در رنگ شاخص می‌شوند (۶). با این حال، رنگ‌های مصنوعی (مانند بروموکرزول بنفش، بروموتیمول آبی، بروموکرزول سبز، متیل قرمز، کرزول قرمز، زایلنول و کلروفنول) به دلیل اثرات سمی و سرطان‌زای آنها بر سلامت انسان برای استفاده در مواد غذایی مناسب نیستند (۹). از این رو، محققان به دنبال جایگزینی رنگ‌های مصنوعی با جایگزین‌های طبیعی مناسب هستند. انواع رنگدانه‌های طبیعی مانند شیکونین<sup>۳</sup> (۱۰)، آلیزارین، (۱۱) بتالائین (۱۲)، کورکومین (۱۳)، آنتوسیانین‌ها (۸) و بسیاری دیگر می‌توانند تحت تاثیر تغییرات pH تغییر رنگ دهند. در میان آنها، آلیزارین (C<sub>14</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>) یک رنگدانه قرمز است که از ریشه گیاهان

<sup>1</sup> Centers for Disease Control and Prevention

<sup>2</sup> Quick Response

<sup>3</sup> Shikonin

منابع زیستی و ژنتیکی واقع در تهران، ایران تهیه شدند. همچنین تمام ترکیبات شیمیایی مورد نیاز از شرکت Merck (آلمان) و محیط‌های کشت مورد نیاز از شرکت Q-Lab (کانادا) خریداری شدند.

### استخراج رنگدانه آلیزارین از ریشه گیاه روناس:

پس از تمیزکردن ریشه گیاه و حذف ریشه‌های جانبی اضافی، به صورت جداگانه به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۵۰ درجه سلسیوس درون آون (Memmert, Germany) خشک شدند. سپس این ریشه‌های خشک‌شده با استفاده از هاون پودر شدند. مقدار ۰/۱ میلی‌گرم از ریشه‌های پودر شده از فلاسک برداشته و به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد جوشانده شد. پس از خنک شدن تا رسیدن به دمای اتاق، محلول از طریق فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر (MilliporeSigma, USA) فیلتر شد و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد (۱۳).

**تهیه فیلم‌های نشانگر:** فیلم‌های هوشمند با استفاده از روش ریخته‌گری محلول تهیه شدند. کیتوزان با اضافه کردن حجم از پیش تعیین‌شده‌ای از پودر کیتوزان (۲ گرم) به حجم مشخصی از محلول اسید استیک ۱ درصد (۱۰۰ میلی‌لیتر) تحت هم زدن مداوم (IKA, Germany) در دمای اتاق (۲۵ درجه سلسیوس) در اسید استیک حل شد. سپس، گلیسرول به‌عنوان عامل نرم‌کننده (پلاستی‌سایزر) به میزان ۰/۷۵ درصد وزن کیتوزان به محلول اضافه گردید (۱۴). همچنین، محلول آلیزارین با غلظت ۳/۰ درصد (وزنی/حجمی) به‌صورت جداگانه در اتانول حل شد و پس از هم‌زدن کامل، به محلول پایه (کیتوزان و گلیسرول) اضافه گردید (۱۵).

تعیین غلظت آنتراکینون‌ها (آلیزارین) استخراج شده از ریشه گیاه روناس: غلظت آنتراکینون‌ها در ریشه‌ها از طریق آنالیز اسپکتروفتومتری با استفاده از اسپکتروفتومتر (Hitachi, Japan) تعیین شد. جذب عصاره‌های ریشه مستقیماً در طول موج ۴۳۴ نانومتر اندازه‌گیری شد. سطح کل آنتراکینون‌ها با استفاده از ضریب جذب مولی آلیزارین (ε434 = 5.5) تعیین و به صورت میلی‌گرم در هر گرم وزن

روناس (*Rubia tinctorum*) استخراج می‌شود یک ترکیب آنتراکینون با جایگزینی گروه -OH در موقعیت‌های ۱ و ۲، به عنوان یک شاخص رنگ‌سنجی یا pH در نظر گرفته شد که حساسیت بالایی به pH تغییرات و گاز NH<sub>3</sub> نشان می‌دهد و در شرایط اسیدی از زرد به قرمز و بالعکس در شرایط بازی تغییر رنگ می‌دهد. این طیف تغییرات رنگی، آلیزارین را به عنوان یک رنگ طبیعی برای ساخت نشانگر پیشنهاد می‌کند. همچنین آلیزارین خواص عملکردی مختلفی مانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی و خواص مسدودکننده اشعه ماوراء بنفش، همراه با افزایش آبگریزی و پایداری حرارتی هنگام افزودن به پلیمر کیتوزان از خود نشان می‌دهد (۹). ترکیب کیتوزان با آلیزارین، ضمن ارتقای خواص مکانیکی و زیست‌سازگاری فیلم‌های بسته‌بندی، امکان طراحی سامانه‌های حساس به تغییرات pH را فراهم می‌سازد. این ویژگی، قابلیت تشخیص بصری فساد مواد غذایی را بدون نیاز به باز کردن بسته‌بندی فراهم کرده و گامی مؤثر در افزایش ایمنی مصرف‌کننده و کاهش ضایعات غذایی به‌شمار می‌رود. بنابراین این مطالعه ابتدا با هدف استخراج آلیزارین از ریشه گیاه روناس و تعیین غلظت آلیزارین استخراج شده انجام شد. در ادامه برهم-کنش آلیزارین با کیتوزان، فعالیت ضد میکروبی، فعالیت آنتی-اکسیدانی، مورفولوژی سطحی فیلم و تغییرات رنگ در pH محدوده ۱ تا ۱۴ بررسی شد. از این رو، امید است این مطالعه بتواند رویکردی جدید در پیشرفت‌های بالقوه در بسته‌بندی هوشمند خوراکی مواد غذایی مبتنی بر کیتوزان را ارائه کند.

### مواد و روش‌ها

**تهیه مواد اولیه:** ریشه گیاه روناس در اواخر پاییز سال ۱۴۰۲ از شهرستان اراک (استان مرکزی، ایران)، کیتوزان از شرکت Sigma-Aldrich (آلمان)، تمام گونه‌ها باکتریایی (*Escherichia coli* O157:H7 (IBRC-M 10698)، *Listeria monocytogenes* (IBRC-M 10671)، *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) و *Staphylococcus aureus* (IBRC-M 10690) توسط مرکز

خشک اندازه‌گیری شد (۱۳).

#### طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR):

طیف‌های نمونه کامپوزیتی آسیاب شده FTIR با استفاده از یک طیف‌سنج (Shimadzu, Japan) FTIR برای مدت ۲۰ ساعت در محدوده طول موج  $4000-400 \text{ cm}^{-1}$  با وضوح  $4 \text{ cm}^{-1}$  تعیین شد (۱۶).

#### فعالیت ضد میکروبی فیلم هوشمند:

جهت فعالیت ضد میکروبی فیلم‌های هوشمند از مهمترین پاتوژن‌های غذا زاد نظیر *Escherichia coli* O157:H7 و *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* و *Listeria monocytogenes* برای آزمایش استفاده شد. پاتوژن‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر دو بار در محیط کشت Brain Heart Infusion فعال شدند که به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. پس از آن، کلنی‌های رشد یافته بر روی آگارهای انتخابی مختلف (شامل EMB aga برای *E.Coli*، XLD برای *S. typhimurium*، *Listeria Oxford Agar*، *S. typhimurium* برای *L. monocytogenes* و Baird Parker Agar همراه با تلوریت زرده تخم مرغ برای *S. aureus*) جدا شدند و به لوله‌های آزمایش حاوی ۵/۰ میلی لیتر محلول نمک استریل در ۰/۸۵ درصد (مول/حجم) منتقل شدند. کدورت با محلول سولفات باریم استاندارد (استاندارد نیم مک فارلند برابر با غلظت  $8 \log \text{CFU/mL}$ ) مقایسه شد (۱۷).

#### تعیین قطر هاله عدم رشد: برای تعیین فعالیت ضد

میکروبی فیلم کیتوزان و فیلم هوشمند کیتوزان/آلیزارین در برابر باکتری‌های مورد بررسی، از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد. دیسک‌ها به قطعات ۱۰/۰ میلی‌متری بریده شدند و پس از آغشته شدن به نانوامولسیون‌ها (۰/۸، ۰/۴، ۰/۱۶، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴، ۰/۵، ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸، ۰/۹، ۱/۰، ۱/۱، ۱/۲، ۱/۳، ۱/۴، ۱/۵، ۱/۶، ۱/۷، ۱/۸، ۱/۹، ۲/۰، ۲/۱، ۲/۲، ۲/۳، ۲/۴، ۲/۵، ۲/۶، ۲/۷، ۲/۸، ۲/۹، ۳/۰، ۳/۱، ۳/۲، ۳/۳، ۳/۴، ۳/۵، ۳/۶، ۳/۷، ۳/۸، ۳/۹، ۴/۰، ۴/۱، ۴/۲، ۴/۳، ۴/۴، ۴/۵، ۴/۶، ۴/۷، ۴/۸، ۴/۹، ۵/۰، ۵/۱، ۵/۲، ۵/۳، ۵/۴، ۵/۵، ۵/۶، ۵/۷، ۵/۸، ۵/۹، ۶/۰، ۶/۱، ۶/۲، ۶/۳، ۶/۴، ۶/۵، ۶/۶، ۶/۷، ۶/۸، ۶/۹، ۷/۰، ۷/۱، ۷/۲، ۷/۳، ۷/۴، ۷/۵، ۷/۶، ۷/۷، ۷/۸، ۷/۹، ۸/۰، ۸/۱، ۸/۲، ۸/۳، ۸/۴، ۸/۵، ۸/۶، ۸/۷، ۸/۸، ۸/۹، ۹/۰، ۹/۱، ۹/۲، ۹/۳، ۹/۴، ۹/۵، ۹/۶، ۹/۷، ۹/۸، ۹/۹، ۱۰/۰، ۱۰/۱، ۱۰/۲، ۱۰/۳، ۱۰/۴، ۱۰/۵، ۱۰/۶، ۱۰/۷، ۱۰/۸، ۱۰/۹، ۱۱/۰، ۱۱/۱، ۱۱/۲، ۱۱/۳، ۱۱/۴، ۱۱/۵، ۱۱/۶، ۱۱/۷، ۱۱/۸، ۱۱/۹، ۱۲/۰، ۱۲/۱، ۱۲/۲، ۱۲/۳، ۱۲/۴، ۱۲/۵، ۱۲/۶، ۱۲/۷، ۱۲/۸، ۱۲/۹، ۱۳/۰، ۱۳/۱، ۱۳/۲، ۱۳/۳، ۱۳/۴، ۱۳/۵، ۱۳/۶، ۱۳/۷، ۱۳/۸، ۱۳/۹، ۱۴/۰، ۱۴/۱، ۱۴/۲، ۱۴/۳، ۱۴/۴، ۱۴/۵، ۱۴/۶، ۱۴/۷، ۱۴/۸، ۱۴/۹، ۱۵/۰، ۱۵/۱، ۱۵/۲، ۱۵/۳، ۱۵/۴، ۱۵/۵، ۱۵/۶، ۱۵/۷، ۱۵/۸، ۱۵/۹، ۱۶/۰، ۱۶/۱، ۱۶/۲، ۱۶/۳، ۱۶/۴، ۱۶/۵، ۱۶/۶، ۱۶/۷، ۱۶/۸، ۱۶/۹، ۱۷/۰، ۱۷/۱، ۱۷/۲، ۱۷/۳، ۱۷/۴، ۱۷/۵، ۱۷/۶، ۱۷/۷، ۱۷/۸، ۱۷/۹، ۱۸/۰، ۱۸/۱، ۱۸/۲، ۱۸/۳، ۱۸/۴، ۱۸/۵، ۱۸/۶، ۱۸/۷، ۱۸/۸، ۱۸/۹، ۱۹/۰، ۱۹/۱، ۱۹/۲، ۱۹/۳، ۱۹/۴، ۱۹/۵، ۱۹/۶، ۱۹/۷، ۱۹/۸، ۱۹/۹، ۲۰/۰، ۲۰/۱، ۲۰/۲، ۲۰/۳، ۲۰/۴، ۲۰/۵، ۲۰/۶، ۲۰/۷، ۲۰/۸، ۲۰/۹، ۲۱/۰، ۲۱/۱، ۲۱/۲، ۲۱/۳، ۲۱/۴، ۲۱/۵، ۲۱/۶، ۲۱/۷، ۲۱/۸، ۲۱/۹، ۲۲/۰، ۲۲/۱، ۲۲/۲، ۲۲/۳، ۲۲/۴، ۲۲/۵، ۲۲/۶، ۲۲/۷، ۲۲/۸، ۲۲/۹، ۲۳/۰، ۲۳/۱، ۲۳/۲، ۲۳/۳، ۲۳/۴، ۲۳/۵، ۲۳/۶، ۲۳/۷، ۲۳/۸، ۲۳/۹، ۲۴/۰، ۲۴/۱، ۲۴/۲، ۲۴/۳، ۲۴/۴، ۲۴/۵، ۲۴/۶، ۲۴/۷، ۲۴/۸، ۲۴/۹، ۲۵/۰، ۲۵/۱، ۲۵/۲، ۲۵/۳، ۲۵/۴، ۲۵/۵، ۲۵/۶، ۲۵/۷، ۲۵/۸، ۲۵/۹، ۲۶/۰، ۲۶/۱، ۲۶/۲، ۲۶/۳، ۲۶/۴، ۲۶/۵، ۲۶/۶، ۲۶/۷، ۲۶/۸، ۲۶/۹، ۲۷/۰، ۲۷/۱، ۲۷/۲، ۲۷/۳، ۲۷/۴، ۲۷/۵، ۲۷/۶، ۲۷/۷، ۲۷/۸، ۲۷/۹، ۲۸/۰، ۲۸/۱، ۲۸/۲، ۲۸/۳، ۲۸/۴، ۲۸/۵، ۲۸/۶، ۲۸/۷، ۲۸/۸، ۲۸/۹، ۲۹/۰، ۲۹/۱، ۲۹/۲، ۲۹/۳، ۲۹/۴، ۲۹/۵، ۲۹/۶، ۲۹/۷، ۲۹/۸، ۲۹/۹، ۳۰/۰، ۳۰/۱، ۳۰/۲، ۳۰/۳، ۳۰/۴، ۳۰/۵، ۳۰/۶، ۳۰/۷، ۳۰/۸، ۳۰/۹، ۳۱/۰، ۳۱/۱، ۳۱/۲، ۳۱/۳، ۳۱/۴، ۳۱/۵، ۳۱/۶، ۳۱/۷، ۳۱/۸، ۳۱/۹، ۳۲/۰، ۳۲/۱، ۳۲/۲، ۳۲/۳، ۳۲/۴، ۳۲/۵، ۳۲/۶، ۳۲/۷، ۳۲/۸، ۳۲/۹، ۳۳/۰، ۳۳/۱، ۳۳/۲، ۳۳/۳، ۳۳/۴، ۳۳/۵، ۳۳/۶، ۳۳/۷، ۳۳/۸، ۳۳/۹، ۳۴/۰، ۳۴/۱، ۳۴/۲، ۳۴/۳، ۳۴/۴، ۳۴/۵، ۳۴/۶، ۳۴/۷، ۳۴/۸، ۳۴/۹، ۳۵/۰، ۳۵/۱، ۳۵/۲، ۳۵/۳، ۳۵/۴، ۳۵/۵، ۳۵/۶، ۳۵/۷، ۳۵/۸، ۳۵/۹، ۳۶/۰، ۳۶/۱، ۳۶/۲، ۳۶/۳، ۳۶/۴، ۳۶/۵، ۳۶/۶، ۳۶/۷، ۳۶/۸، ۳۶/۹، ۳۷/۰، ۳۷/۱، ۳۷/۲، ۳۷/۳، ۳۷/۴، ۳۷/۵، ۳۷/۶، ۳۷/۷، ۳۷/۸، ۳۷/۹، ۳۸/۰، ۳۸/۱، ۳۸/۲، ۳۸/۳، ۳۸/۴، ۳۸/۵، ۳۸/۶، ۳۸/۷، ۳۸/۸، ۳۸/۹، ۳۹/۰، ۳۹/۱، ۳۹/۲، ۳۹/۳، ۳۹/۴، ۳۹/۵، ۳۹/۶، ۳۹/۷، ۳۹/۸، ۳۹/۹، ۴۰/۰، ۴۰/۱، ۴۰/۲، ۴۰/۳، ۴۰/۴، ۴۰/۵، ۴۰/۶، ۴۰/۷، ۴۰/۸، ۴۰/۹، ۴۱/۰، ۴۱/۱، ۴۱/۲، ۴۱/۳، ۴۱/۴، ۴۱/۵، ۴۱/۶، ۴۱/۷، ۴۱/۸، ۴۱/۹، ۴۲/۰، ۴۲/۱، ۴۲/۲، ۴۲/۳، ۴۲/۴، ۴۲/۵، ۴۲/۶، ۴۲/۷، ۴۲/۸، ۴۲/۹، ۴۳/۰، ۴۳/۱، ۴۳/۲، ۴۳/۳، ۴۳/۴، ۴۳/۵، ۴۳/۶، ۴۳/۷، ۴۳/۸، ۴۳/۹، ۴۴/۰، ۴۴/۱، ۴۴/۲، ۴۴/۳، ۴۴/۴، ۴۴/۵، ۴۴/۶، ۴۴/۷، ۴۴/۸، ۴۴/۹، ۴۵/۰، ۴۵/۱، ۴۵/۲، ۴۵/۳، ۴۵/۴، ۴۵/۵، ۴۵/۶، ۴۵/۷، ۴۵/۸، ۴۵/۹، ۴۶/۰، ۴۶/۱، ۴۶/۲، ۴۶/۳، ۴۶/۴، ۴۶/۵، ۴۶/۶، ۴۶/۷، ۴۶/۸، ۴۶/۹، ۴۷/۰، ۴۷/۱، ۴۷/۲، ۴۷/۳، ۴۷/۴، ۴۷/۵، ۴۷/۶، ۴۷/۷، ۴۷/۸، ۴۷/۹، ۴۸/۰، ۴۸/۱، ۴۸/۲، ۴۸/۳، ۴۸/۴، ۴۸/۵، ۴۸/۶، ۴۸/۷، ۴۸/۸، ۴۸/۹، ۴۹/۰، ۴۹/۱، ۴۹/۲، ۴۹/۳، ۴۹/۴، ۴۹/۵، ۴۹/۶، ۴۹/۷، ۴۹/۸، ۴۹/۹، ۵۰/۰، ۵۰/۱، ۵۰/۲، ۵۰/۳، ۵۰/۴، ۵۰/۵، ۵۰/۶، ۵۰/۷، ۵۰/۸، ۵۰/۹، ۵۱/۰، ۵۱/۱، ۵۱/۲، ۵۱/۳، ۵۱/۴، ۵۱/۵، ۵۱/۶، ۵۱/۷، ۵۱/۸، ۵۱/۹، ۵۲/۰، ۵۲/۱، ۵۲/۲، ۵۲/۳، ۵۲/۴، ۵۲/۵، ۵۲/۶، ۵۲/۷، ۵۲/۸، ۵۲/۹، ۵۳/۰، ۵۳/۱، ۵۳/۲، ۵۳/۳، ۵۳/۴، ۵۳/۵، ۵۳/۶، ۵۳/۷، ۵۳/۸، ۵۳/۹، ۵۴/۰، ۵۴/۱، ۵۴/۲، ۵۴/۳، ۵۴/۴، ۵۴/۵، ۵۴/۶، ۵۴/۷، ۵۴/۸، ۵۴/۹، ۵۵/۰، ۵۵/۱، ۵۵/۲، ۵۵/۳، ۵۵/۴، ۵۵/۵، ۵۵/۶، ۵۵/۷، ۵۵/۸، ۵۵/۹، ۵۶/۰، ۵۶/۱، ۵۶/۲، ۵۶/۳، ۵۶/۴، ۵۶/۵، ۵۶/۶، ۵۶/۷، ۵۶/۸، ۵۶/۹، ۵۷/۰، ۵۷/۱، ۵۷/۲، ۵۷/۳، ۵۷/۴، ۵۷/۵، ۵۷/۶، ۵۷/۷، ۵۷/۸، ۵۷/۹، ۵۸/۰، ۵۸/۱، ۵۸/۲، ۵۸/۳، ۵۸/۴، ۵۸/۵، ۵۸/۶، ۵۸/۷، ۵۸/۸، ۵۸/۹، ۵۹/۰، ۵۹/۱، ۵۹/۲، ۵۹/۳، ۵۹/۴، ۵۹/۵، ۵۹/۶، ۵۹/۷، ۵۹/۸، ۵۹/۹، ۶۰/۰، ۶۰/۱، ۶۰/۲، ۶۰/۳، ۶۰/۴، ۶۰/۵، ۶۰/۶، ۶۰/۷، ۶۰/۸، ۶۰/۹، ۶۱/۰، ۶۱/۱، ۶۱/۲، ۶۱/۳، ۶۱/۴، ۶۱/۵، ۶۱/۶، ۶۱/۷، ۶۱/۸، ۶۱/۹، ۶۲/۰، ۶۲/۱، ۶۲/۲، ۶۲/۳، ۶۲/۴، ۶۲/۵، ۶۲/۶، ۶۲/۷، ۶۲/۸، ۶۲/۹، ۶۳/۰، ۶۳/۱، ۶۳/۲، ۶۳/۳، ۶۳/۴، ۶۳/۵، ۶۳/۶، ۶۳/۷، ۶۳/۸، ۶۳/۹، ۶۴/۰، ۶۴/۱، ۶۴/۲، ۶۴/۳، ۶۴/۴، ۶۴/۵، ۶۴/۶، ۶۴/۷، ۶۴/۸، ۶۴/۹، ۶۵/۰، ۶۵/۱، ۶۵/۲، ۶۵/۳، ۶۵/۴، ۶۵/۵، ۶۵/۶، ۶۵/۷، ۶۵/۸، ۶۵/۹، ۶۶/۰، ۶۶/۱، ۶۶/۲، ۶۶/۳، ۶۶/۴، ۶۶/۵، ۶۶/۶، ۶۶/۷، ۶۶/۸، ۶۶/۹، ۶۷/۰، ۶۷/۱، ۶۷/۲، ۶۷/۳، ۶۷/۴، ۶۷/۵، ۶۷/۶، ۶۷/۷، ۶۷/۸، ۶۷/۹، ۶۸/۰، ۶۸/۱، ۶۸/۲، ۶۸/۳، ۶۸/۴، ۶۸/۵، ۶۸/۶، ۶۸/۷، ۶۸/۸، ۶۸/۹، ۶۹/۰، ۶۹/۱، ۶۹/۲، ۶۹/۳، ۶۹/۴، ۶۹/۵، ۶۹/۶، ۶۹/۷، ۶۹/۸، ۶۹/۹، ۷۰/۰، ۷۰/۱، ۷۰/۲، ۷۰/۳، ۷۰/۴، ۷۰/۵، ۷۰/۶، ۷۰/۷، ۷۰/۸، ۷۰/۹، ۷۱/۰، ۷۱/۱، ۷۱/۲، ۷۱/۳، ۷۱/۴، ۷۱/۵، ۷۱/۶، ۷۱/۷، ۷۱/۸، ۷۱/۹، ۷۲/۰، ۷۲/۱، ۷۲/۲، ۷۲/۳، ۷۲/۴، ۷۲/۵، ۷۲/۶، ۷۲/۷، ۷۲/۸، ۷۲/۹، ۷۳/۰، ۷۳/۱، ۷۳/۲، ۷۳/۳، ۷۳/۴، ۷۳/۵، ۷۳/۶، ۷۳/۷، ۷۳/۸، ۷۳/۹، ۷۴/۰، ۷۴/۱، ۷۴/۲، ۷۴/۳، ۷۴/۴، ۷۴/۵، ۷۴/۶، ۷۴/۷، ۷۴/۸، ۷۴/۹، ۷۵/۰، ۷۵/۱، ۷۵/۲، ۷۵/۳، ۷۵/۴، ۷۵/۵، ۷۵/۶، ۷۵/۷، ۷۵/۸، ۷۵/۹، ۷۶/۰، ۷۶/۱، ۷۶/۲، ۷۶/۳، ۷۶/۴، ۷۶/۵، ۷۶/۶، ۷۶/۷، ۷۶/۸، ۷۶/۹، ۷۷/۰، ۷۷/۱، ۷۷/۲، ۷۷/۳، ۷۷/۴، ۷۷/۵، ۷۷/۶، ۷۷/۷، ۷۷/۸، ۷۷/۹، ۷۸/۰، ۷۸/۱، ۷۸/۲، ۷۸/۳، ۷۸/۴، ۷۸/۵، ۷۸/۶، ۷۸/۷، ۷۸/۸، ۷۸/۹، ۷۹/۰، ۷۹/۱، ۷۹/۲، ۷۹/۳، ۷۹/۴، ۷۹/۵، ۷۹/۶، ۷۹/۷، ۷۹/۸، ۷۹/۹، ۸۰/۰، ۸۰/۱، ۸۰/۲، ۸۰/۳، ۸۰/۴، ۸۰/۵، ۸۰/۶، ۸۰/۷، ۸۰/۸، ۸۰/۹، ۸۱/۰، ۸۱/۱، ۸۱/۲، ۸۱/۳، ۸۱/۴، ۸۱/۵، ۸۱/۶، ۸۱/۷، ۸۱/۸، ۸۱/۹، ۸۲/۰، ۸۲/۱، ۸۲/۲، ۸۲/۳، ۸۲/۴، ۸۲/۵، ۸۲/۶، ۸۲/۷، ۸۲/۸، ۸۲/۹، ۸۳/۰، ۸۳/۱، ۸۳/۲، ۸۳/۳، ۸۳/۴، ۸۳/۵، ۸۳/۶، ۸۳/۷، ۸۳/۸، ۸۳/۹، ۸۴/۰، ۸۴/۱، ۸۴/۲، ۸۴/۳، ۸۴/۴، ۸۴/۵، ۸۴/۶، ۸۴/۷، ۸۴/۸، ۸۴/۹، ۸۵/۰، ۸۵/۱، ۸۵/۲، ۸۵/۳، ۸۵/۴، ۸۵/۵، ۸۵/۶، ۸۵/۷، ۸۵/۸، ۸۵/۹، ۸۶/۰، ۸۶/۱، ۸۶/۲، ۸۶/۳، ۸۶/۴، ۸۶/۵، ۸۶/۶، ۸۶/۷، ۸۶/۸، ۸۶/۹، ۸۷/۰، ۸۷/۱، ۸۷/۲، ۸۷/۳، ۸۷/۴، ۸۷/۵، ۸۷/۶، ۸۷/۷، ۸۷/۸، ۸۷/۹، ۸۸/۰، ۸۸/۱، ۸۸/۲، ۸۸/۳، ۸۸/۴، ۸۸/۵، ۸۸/۶، ۸۸/۷، ۸۸/۸، ۸۸/۹، ۸۹/۰، ۸۹/۱، ۸۹/۲، ۸۹/۳، ۸۹/۴، ۸۹/۵، ۸۹/۶، ۸۹/۷، ۸۹/۸، ۸۹/۹، ۹۰/۰، ۹۰/۱، ۹۰/۲، ۹۰/۳، ۹۰/۴، ۹۰/۵، ۹۰/۶، ۹۰/۷، ۹۰/۸، ۹۰/۹، ۹۱/۰، ۹۱/۱، ۹۱/۲، ۹۱/۳، ۹۱/۴، ۹۱/۵، ۹۱/۶، ۹۱/۷، ۹۱/۸، ۹۱/۹، ۹۲/۰، ۹۲/۱، ۹۲/۲، ۹۲/۳، ۹۲/۴، ۹۲/۵، ۹۲/۶، ۹۲/۷، ۹۲/۸، ۹۲/۹، ۹۳/۰، ۹۳/۱، ۹۳/۲، ۹۳/۳، ۹۳/۴، ۹۳/۵، ۹۳/۶، ۹۳/۷، ۹۳/۸، ۹۳/۹، ۹۴/۰، ۹۴/۱، ۹۴/۲، ۹۴/۳، ۹۴/۴، ۹۴/۵، ۹۴/۶، ۹۴/۷، ۹۴/۸، ۹۴/۹، ۹۵/۰، ۹۵/۱، ۹۵/۲، ۹۵/۳، ۹۵/۴، ۹۵/۵، ۹۵/۶، ۹۵/۷، ۹۵/۸، ۹۵/۹، ۹۶/۰، ۹۶/۱، ۹۶/۲، ۹۶/۳، ۹۶/۴، ۹۶/۵، ۹۶/۶، ۹۶/۷، ۹۶/۸، ۹۶/۹، ۹۷/۰، ۹۷/۱، ۹۷/۲، ۹۷/۳، ۹۷/۴، ۹۷/۵، ۹۷/۶، ۹۷/۷، ۹۷/۸، ۹۷/۹، ۹۸/۰، ۹۸/۱، ۹۸/۲، ۹۸/۳، ۹۸/۴، ۹۸/۵، ۹۸/۶، ۹۸/۷، ۹۸/۸، ۹۸/۹، ۹۹/۰، ۹۹/۱، ۹۹/۲، ۹۹/۳، ۹۹/۴، ۹۹/۵، ۹۹/۶، ۹۹/۷، ۹۹/۸، ۹۹/۹، ۱۰۰/۰، ۱۰۰/۱، ۱۰۰/۲، ۱۰۰/۳، ۱۰۰/۴، ۱۰۰/۵، ۱۰۰/۶، ۱۰۰/۷، ۱۰۰/۸، ۱۰۰/۹، ۱۰۱/۰، ۱۰۱/۱، ۱۰۱/۲، ۱۰۱/۳، ۱۰۱/۴، ۱۰۱/۵، ۱۰۱/۶، ۱۰۱/۷، ۱۰۱/۸، ۱۰۱/۹، ۱۰۲/۰، ۱۰۲/۱، ۱۰۲/۲، ۱۰۲/۳، ۱۰۲/۴، ۱۰۲/۵، ۱۰۲/۶، ۱۰۲/۷، ۱۰۲/۸، ۱۰۲/۹، ۱۰۳/۰، ۱۰۳/۱، ۱۰۳/۲، ۱۰۳/۳، ۱۰۳/۴، ۱۰۳/۵، ۱۰۳/۶، ۱۰۳/۷، ۱۰۳/۸، ۱۰۳/۹، ۱۰۴/۰، ۱۰۴/۱، ۱۰۴/۲، ۱۰۴/۳، ۱۰۴/۴، ۱۰۴/۵، ۱۰۴/۶، ۱۰۴/۷، ۱۰۴/۸، ۱۰۴/۹، ۱۰۵/۰، ۱۰۵/۱، ۱۰۵/۲، ۱۰۵/۳، ۱۰۵/۴، ۱۰۵/۵، ۱۰۵/۶، ۱۰۵/۷، ۱۰۵/۸، ۱۰۵/۹، ۱۰۶/۰، ۱۰۶/۱، ۱۰۶/۲، ۱۰۶/۳، ۱۰۶/۴، ۱۰۶/۵، ۱۰۶/۶، ۱۰۶/۷، ۱۰۶/۸، ۱۰۶/۹، ۱۰۷/۰، ۱۰۷/۱، ۱۰۷/۲، ۱۰۷/۳، ۱۰۷/۴، ۱۰۷/۵، ۱۰۷/۶، ۱۰۷/۷، ۱۰۷/۸، ۱۰۷/۹، ۱۰۸/۰، ۱۰۸/۱، ۱۰۸/۲، ۱۰۸/۳، ۱۰۸/۴، ۱۰۸/۵، ۱۰۸/۶، ۱۰۸/۷، ۱۰۸/۸، ۱۰۸/۹، ۱۰۹/۰، ۱۰۹/۱، ۱۰۹/۲، ۱۰۹/۳، ۱۰۹/۴، ۱۰۹/۵، ۱۰۹/۶، ۱۰۹/۷، ۱۰۹/۸، ۱۰۹/۹، ۱۱۰/۰، ۱۱۰/۱، ۱۱۰/۲، ۱۱۰/۳، ۱۱۰/۴، ۱۱۰/۵، ۱۱۰/۶، ۱۱۰/۷، ۱۱۰/۸، ۱۱۰/۹، ۱۱۱/۰، ۱۱۱/۱، ۱۱۱/۲، ۱۱۱/۳، ۱۱۱/۴، ۱۱۱/۵، ۱۱۱/۶، ۱۱۱/۷، ۱۱۱/۸، ۱۱۱/۹، ۱۱۲/۰، ۱۱۲/۱، ۱۱۲/۲، ۱۱۲/۳، ۱۱۲/۴، ۱۱۲/۵، ۱۱۲/۶، ۱۱۲/۷، ۱۱۲/۸، ۱۱۲/۹، ۱۱۳/۰، ۱۱۳/۱، ۱۱۳/۲، ۱۱۳/۳، ۱۱۳/۴، ۱۱۳/۵، ۱۱۳/۶، ۱۱۳/۷، ۱۱۳/۸، ۱۱۳/۹، ۱۱۴/۰، ۱۱۴/۱، ۱۱۴/۲، ۱۱۴/۳، ۱۱۴/۴، ۱۱۴/۵، ۱۱۴/۶، ۱۱۴/۷، ۱۱۴/۸، ۱۱۴/۹، ۱۱۵/۰، ۱۱۵/۱، ۱۱۵/۲، ۱۱۵/۳، ۱۱۵/۴، ۱۱۵/۵، ۱۱۵/۶، ۱۱۵/۷، ۱۱۵/۸، ۱۱۵/۹، ۱۱۶/۰، ۱۱۶/۱، ۱۱۶/۲، ۱۱۶/۳، ۱۱۶/۴، ۱۱۶/۵، ۱۱۶/۶، ۱۱۶/۷، ۱۱۶/۸، ۱۱۶/۹، ۱۱۷/۰، ۱۱۷/۱، ۱۱۷/۲، ۱۱۷/۳، ۱۱۷/۴، ۱۱۷/۵، ۱۱۷/۶، ۱۱۷/۷، ۱۱۷/۸، ۱۱۷/۹، ۱۱۸/۰، ۱۱۸/۱، ۱۱۸/۲، ۱۱۸/۳، ۱۱۸/۴، ۱۱۸/۵، ۱۱۸/۶، ۱۱۸/۷، ۱۱۸/۸، ۱۱۸/۹، ۱۱۹/۰، ۱۱۹/۱، ۱۱۹/۲، ۱۱۹/۳، ۱۱۹/۴، ۱۱۹/۵، ۱۱۹/۶، ۱۱۹/۷، ۱۱۹/۸، ۱۱۹/۹، ۱۲۰/۰، ۱۲۰/۱، ۱۲۰/۲، ۱۲۰/۳، ۱۲۰/۴، ۱۲۰/۵، ۱۲۰/۶، ۱۲۰/۷، ۱۲۰/۸، ۱۲۰/۹، ۱۲۱/۰، ۱۲۱/۱، ۱۲۱/۲، ۱۲۱/۳، ۱۲۱/۴، ۱۲۱/۵، ۱۲۱/۶، ۱۲۱/۷، ۱۲۱/۸، ۱۲۱/۹، ۱۲۲/۰، ۱۲۲/۱، ۱۲۲/۲، ۱۲۲/۳، ۱۲۲/۴، ۱۲۲/۵، ۱۲۲/۶، ۱۲۲/۷، ۱۲۲/۸، ۱۲۲/۹، ۱۲۳/۰،

پوشش داده شدند، نهایتاً نمونه‌ها به محفظه میکروسکوپ الکترونی جهت بمباران الکترونی انتقال یافت و مورفولوژی ذرات کامپوزیت با ولتاژ ۵/۰ کیلوولت بررسی شد (۲۲).

**تجزیه و تحلیل آماری:** نتایج به دست آمده در آزمایشات، برای داده‌های تجربی (آزمایشی) به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار در سه بار تکرار بیان شدند. داده‌های آزمایشات با تجزیه و تحلیل واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) مقایسه و تفاوت‌های معنی‌دار آماری بین مقادیر میانگین‌ها (در مواردی که اثر کلی تیمارها معنی‌دار باشد) با استفاده از آزمون تعقیبی چند دامنه‌ای دانکن تعیین شد. نتایج آزمون‌های آماری به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۶ انجام شد. سطح معنی‌داری  $p \leq 0.05$  برای مقایسه داده‌ها در نظر گرفته شد.

### نتایج

بر اساس قانون Beer-Lambert، جذب نوری در طول موج ۴۳۴ نانومتر مستقیماً با غلظت آلیزارین آزاد در نمونه مرتبط است. در این مطالعه، با استفاده از ضریب جذب مولی  $\epsilon = 5/5$  و طول مسیر نور ۱/۰ سانتی‌متر، غلظت آلیزارین از طریق اندازه‌گیری جذب در این طول موج محاسبه شد (شکل ۱). بر این اساس غلظت آلیزارین استخراج شده برابر با ۳/۴۳ میلی‌گرم/گرم وزن خشک بود.

برهمکنش بین مولکولی کیتوزان و آلیزارین در ماتریس فیلم با استفاده از FTIR بررسی شد و نتایج در شکل ۲ نشان داده شده است.

برای دستیابی به غلظت نهایی ۲/۵۴ میلی‌مولار مخلوط شدند، به مدت ۱۶ ساعت در مکانی تاریک انکوبه شدند و سپس با آب مقطر رقیق شدند تا جذب نوری ۱ در طول موج ۷۳۴ نانومتر برای تهیه محلول ABTS به دست آید. محلول DPPH (۰/۰۰۴ درصد وزنی/حجمی متانول) نیز با حل کردن DPPH در متانول تهیه شد. نمونه‌های آزمایشی (آلیزارین و اسید آسکوربیک در غلظت‌های مختلف و ۵۰ میلی‌گرم از هر نمونه فیلم) با ۱۰ میلی‌لیتر محلول‌های ABTS یا DPPH مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در مکان تاریک انکوبه شدند. به عنوان شاهد، از محلول‌های ABTS و DPPH بدون نمونه‌های آزمایشی با همان روش استفاده شد. سپس جذب با استفاده از اسپکتروفتومتر UV-visible در طول موج‌های ۷۳۴ و ۵۱۷ نانومتر به ترتیب برای آنالیز ABTS و DPPH اندازه‌گیری شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌ها از رابطه (۱) محاسبه شد:

رابطه (۱)

$$I\% = (A \text{ control} - A \text{ sample}) / A \text{ control} \times 100$$

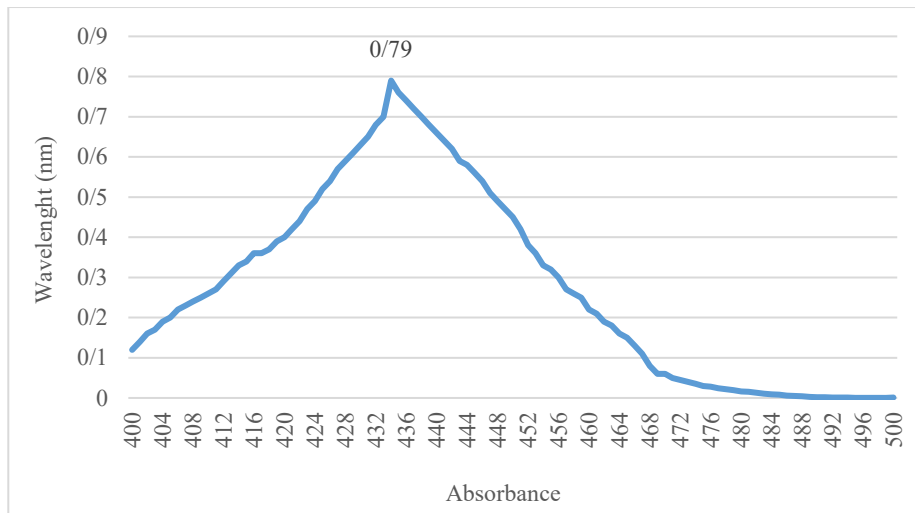
**تعیین پاسخ تغییرات رنگ فیلم‌ها:** توسط محلول‌های بافری در pH های ۱ تا ۱۴ انجام شد. بدین ترتیب که فیلم‌ها در ابعاد ۲ × ۲ سانتی‌متر تهیه و در محلول‌های بافر غوطه‌ور شد و تغییر رنگ ملاحظه شده و گزارش گردید (۲۱).

**بررسی مورفولوژی فیلم‌ها با میکروسکوپ الکترونی:** فیلم‌های بسته‌بندی تولید شده در ابعاد ۲×۲ سانتی‌متر درون حلال گلوتر آلدئید<sup>۱</sup> و استونیتریل<sup>۲</sup> به خوبی حل شدند، بعد از تبخیر حلال با لایه نازکی از طلا

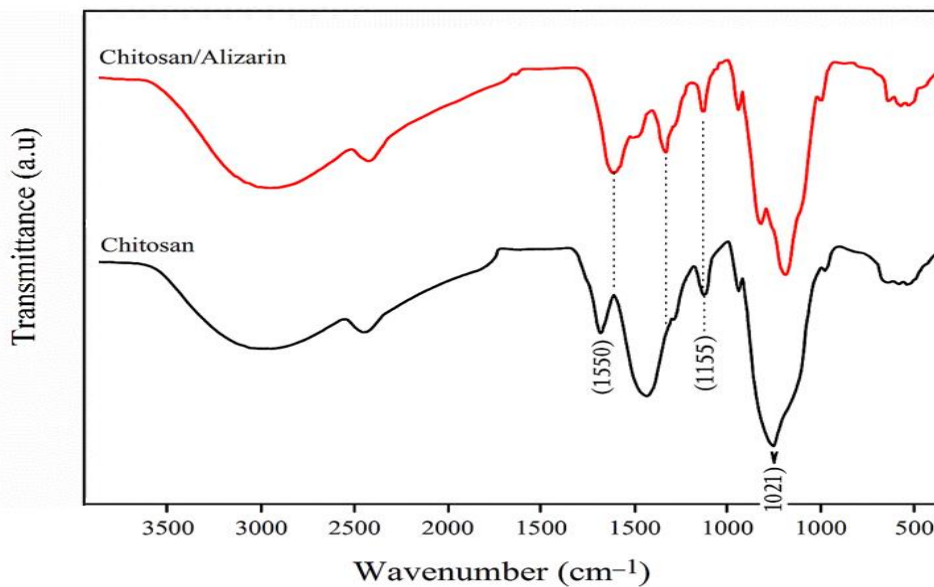
<sup>1</sup> Glutaraldehyde

<sup>2</sup> Acetonitrile

توسعه و بررسی عملکرد فیلم کیتوزان/آلیزارین به عنوان بسته‌بندی هوشمند ...



شکل ۱- طیف جذب آلیزارین استخراج‌شده از عصاره ریشه‌ی روناس



شکل ۲- طیف‌های FTIR کیتوزان و فیلم‌های کامپوزیت کیتوزان/آلیزارین

سبب افزایش فعالیت باکتریواستاتیک و باکتریسیدال فیلم‌های هوشمند شد ( $p < 0.05$ ). همچنین بررسی نتایج قطر هاله عدم رشد نمونه های فیلم نیز نشان دهنده فعالیت ضد میکروبی فیلم هوشمند کیتوزان/آلیزارین بود ( $p < 0.05$ ). در مقایسه بین پاتوژن ها، باکتری های گرم مثبت حساسیت بیشتری به فیلم هوشمند کیتوزان/آلیزارین نشان دادند ( $p < 0.05$ ).

نتایج فعالیت ضد میکروبی فیلم های بسته بندی فعال بر باکتری های گرم مثبت (*Staphylococcus aureus*) و *Escherichia coli* و گرم منفی (*Listeria monocytogenes*) و *Salmonella typhimurium* در جدول ۱ نشان داده شده است. مطابق نتایج فیلم کیتوزان خالص اثر باکتریواستاتیک (MIC) و باکتریسیدال (MBC) از خود نشان نداد ( $p > 0.05$ ). درحالیکه افزودن آلیزارین به فیلم های فعال

جدول ۱- میانگین نتایج ضد میکروبی (log CFU/mL) نمونه‌های فیلم

تیما	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>L. monocytogenes</i>
کیتوزان	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ <sup>b</sup>	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ <sup>b</sup>	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ <sup>b</sup>	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ <sup>b</sup>
کیتوزان/آلیزارین	۵۰/۰۰ ± ۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱۶/۶۶ ± ۵/۸۹ <sup>a</sup>	۴۱/۶۶ ± ۱۱/۷۸ <sup>a</sup>	۳۳/۳۳ ± ۱۱/۷۸ <sup>a</sup>
کیتوزان	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ <sup>b</sup>	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ <sup>b</sup>	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ <sup>b</sup>	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ <sup>b</sup>
کیتوزان/آلیزارین	۶۶/۶۶ ± ۲۳/۵۷ <sup>a</sup>	۲۵/۰۰ ± ۲۳/۵۷ <sup>a</sup>	۵۰/۰۰ ± ۰/۰۰ <sup>a</sup>	۴۱/۶۶ ± ۱۱/۷۸ <sup>a</sup>
کیتوزان	۰/۵۰ ± ۰/۴۷ <sup>b</sup>	۱/۰۰ ± ۰/۰۰ <sup>b</sup>	۰/۵۰ ± ۰/۴۷ <sup>b</sup>	۱/۰۰ ± ۰/۰۰ <sup>b</sup>
کیتوزان/آلیزارین	۸/۳۳ ± ۰/۴۷ <sup>a</sup>	۹/۶۶ ± ۵/۸۹۲ <sup>a</sup>	۸/۶۶ ± ۰/۴۷ <sup>a</sup>	۹/۳۳ ± ۰/۴۷ <sup>a</sup>

\*حروف کوچک متفاوت نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ستون می‌باشد (p<0.05).

مطابق نتایج ادغام آلیزارین در ماتریس فیلم کیتوزان بطورمعناداری فعالیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش داد (p<0.05).

نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی به دو روش DPPH و ABTS نمونه‌های فیلم کیتوزان و فیلم هوشمند کیتوزان/آلیزارین در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲- میانگین نتایج آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های فیلم

تیما	DPPH (mg/ml)	ABTS (mg/ml)
کیتوزان	۱۳/۱۵ ± ۰/۱۰ <sup>a</sup>	۹/۷۹ ± ۰/۲۴ <sup>a</sup>
کیتوزان/آلیزارین	۲/۴۳ ± ۰/۰۲ <sup>a</sup>	۱/۸۸ ± ۰/۰۲ <sup>b</sup>

\*حروف کوچک متفاوت نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ستون می‌باشد (p<0.05).

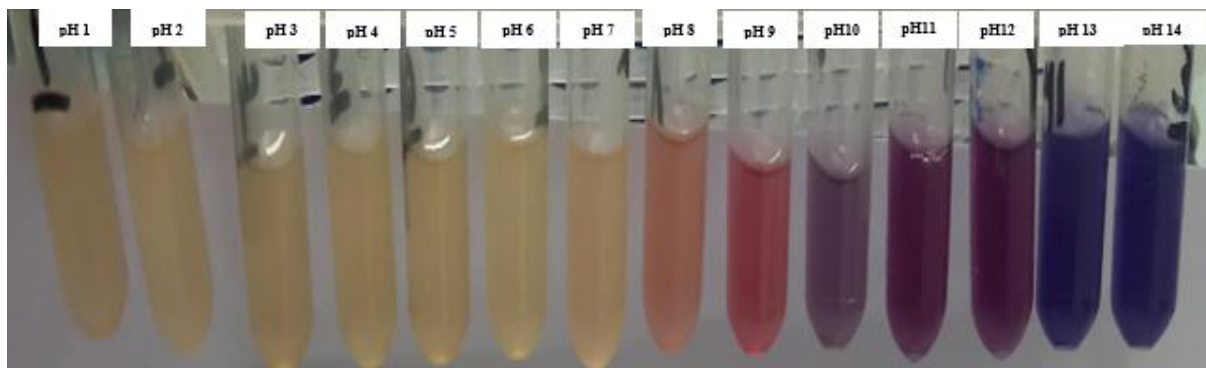
طور معنی‌داری افزایش و سپس با افزایش pH تا ۱۴ به طور معنی‌داری کاهش یافت (p<0.05). همچنین نشان داده شد با افزایش pH تا ۴، b\* (شاخص زردی-سبزی) فیلم هوشمند به طور معنی‌داری افزایش یافت و با افزایش pH تا ۱۴ شاخص b\* فیلم هوشمند به طور معنی‌داری کاهش یافت (p<0.05). نتایج \*a\* (شاخص قرمزی-آبی) نیز روند مشابهی با روند b\* داشت.

نتایج تغییر رنگ فیلم‌های هوشمند کیتوزان/آلیزارین در pH های مختلف در جدول ۳ و مشاهده بصری تغییرات رنگ در تصویر نشان داد که با تغییرات pH از ۱ تا ۱۴ رنگ آن‌ها از کمی زرد به بنفش تغییر کرد بطوریکه در pH های اسیدی تا خنثی (۶)، به رنگ کرم تا زرد، در pH های قلیایی (۷-۱۴)، از گلبهی تا رنگ بنفش تغییر کرد. مطابق نتایج، L\* (روشنایی) فیلم، با افزایش pH تا ۶، به

جدول ۳- میانگین نتایج تغییرات شاخص رنگی فیلم در pH های مختلف

RGB Code	HEX Code	رنگ مشاهده شده	$\Delta E$	$b^*$	$a^*$	$L^*$	
255, 215, 0	#FFD700	زرد	$41/29 \pm 0/79^e$	$26/01 \pm 1/03^b$	$6/01 \pm 0/43^e$	$46/55 \pm 0/57^b$	pH 2
255, 140, 0	#FF8C00	نارنجی	$39/71 \pm 0/26^d$	$30/39 \pm 0/36^a$	$7/39 \pm 0/26^d$	$51/58 \pm 0/62^a$	pH 4
255, 99, 71	#FF6347	قرمز روشن	$34/18 \pm 0/62^d$	$25/90 \pm 0/21^c$	$3/90 \pm 0/31^f$	$53/21 \pm 0/55^a$	pH 6
255, 105, 180	#FF69B4	صورتی مایل به قرمز	$45/45 \pm 0/69^c$	$20/90 \pm 0/49^d$	$21/56 \pm 0/61^a$	$41/8 \pm 0/59^c$	pH 8
218, 112, 214	#DA70D6	صورتی مایل به بنفش	$59/54 \pm 0/50^b$	$-13/01 \pm 0/38^e$	$17/26 \pm 0/82^b$	$22/75 \pm 1/01^d$	pH 10
128, 0, 128	#800080	بنفش مایل به آبی	$72/80 \pm 0/75^a$	$-16/83 \pm 0/38^f$	$21/19 \pm 0/53^a$	$10/26 \pm 0/22^e$	pH 12

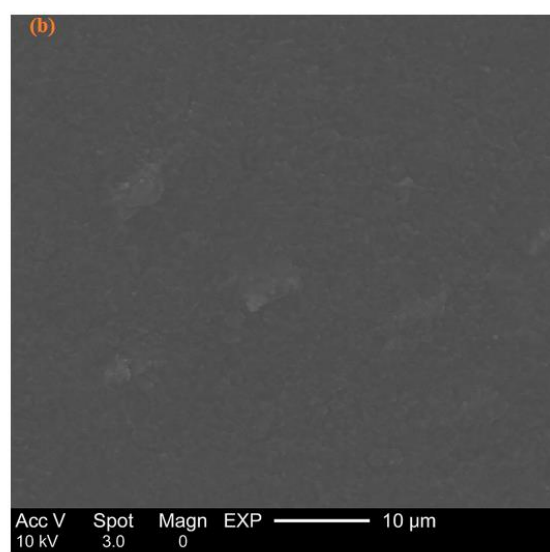
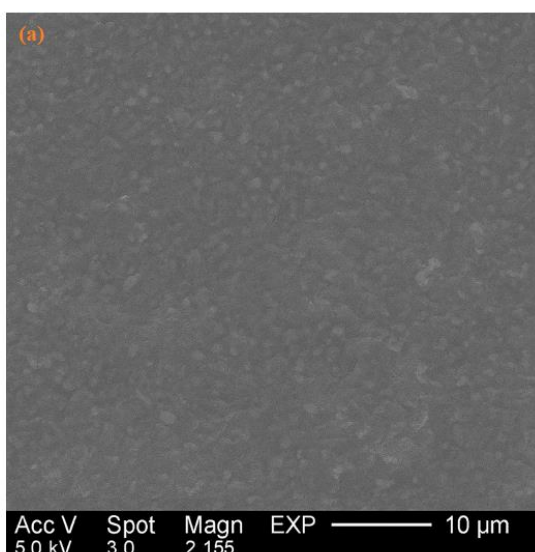
\*حروف کوچک متفاوت نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ستون می‌باشد ( $P < 0.05$ ).



تصویر ۱- تغییر رنگ فیلم هوشمند کیتوزان/آلیزارین با تغییرات pH=1-14

۲-ا مشاهده می‌شود، سطح صافی در فیلم بدون آلیزارین مشاهده شد، در حالی-که فیلم هوشمند کیتوزان/آلیزارین ساختار ناهمگنی داشت (تصویر ۲-ب).

تصاویر SEM از فیلم کیتوزان قبل و بعد از افزودن آلیزارین به فیلم در تصویر ۲ (a-b) با بزرگنمایی ۱۰ میکرومتر نشان داده شده است. همانطور که در تصویر



تصویر ۲- تصاویر SEM فیلم (a) کیتوزان، (b) کیتوزان/آلیزارین

## بحث و نتیجه گیری

آلیزارین (C<sub>14</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>) یا ۱،۲-دی هیدروکسی آنتراکینون) یک رنگدانه آلی متعلق به خانواده آنتراکینون‌ها با ساختار والدی ۹،۱۰-آنتراسن‌دیون و دو گروه هیدروکسیل (OH<sup>-</sup>) مجاور در موقعیت‌های C-1 و C-2 است. آلیزارین به عنوان یک جزء فراوان از رنگ‌های قرمز استخراج شده از گیاهان خانواده Rubiaceae شناخته شده است (۲۳). روش اسپکتروفتومتری به عنوان یک روش سریع، دقیق و قابل تکرار برای تعیین کمی آنتراکینون‌ها معرفی شده است. بنابراین در این مطالعه، غلظت کل آنتراکینون‌ها در عصاره‌ی ریشه‌ی گیاه روناس با استفاده از اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر و ضریب جذب مولی آلیزارین ( $\epsilon = 5.5 \text{ L}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) به صورت دقیق تعیین شد. نتایج نشان دادند که پیک جذب در این طول موج به طور اختصاصی مربوط به آلیزارین آزاد بوده و سایر ترکیبات مانند پورپورین و روبیادین تأثیر ناچیزی در این ناحیه دارند، که این موضوع دقت روش را افزایش می‌دهد (۲۳). در این مطالعه از حلال اتانول جهت استخراج آلیزارین استفاده شد. طبق مطالعات، حلال بیشترین اهمیت در استخراج آلیزارین را داد. حلال‌های اتانول و متانول، حلالی‌های انتخابی جهت استخراج آلیزارین از گیاه هستند. آلیزارین حاوی گروه‌های هیدروکسیل است که با سایر گروه‌های هیدروکسیل اتانول و متانول پیوندهای هیدروژنی تشکیل می‌دهند و در نتیجه افزایش بازیابی آلیزارین را سبب می‌شوند (۲۴). همچنین تأثیر دما بر بازیابی آلیزارین نیز گزارش شده است. در این مطالعه دمای استخراج ۸۰ درجه سلسیوس بود. بطور کلی دما از دو طریق بر استخراج تأثیر می‌گذارد: ویسکوزیته حلال را کاهش داده و نفوذپذیری ترکیب را افزایش می‌دهد و در نتیجه راندمان استخراج را بهبود می‌بخشد (۲۴).

Derksen و همکاران (۲۰۰۴)، طی بررسی غلظت آنتراکینون‌های استخراجی از ریشه گونه‌های مختلف گیاه روناس به دو روش رفلکس گرم (با حلال اتانول و آب به نسبت ۱:۱) و روش غیر مستقیم با حلال

تتراهیدروفوران-آب نشان دادند غلظت آنتراکینون‌ها بین ۳/۲ تا ۵/۸ میلی گرم/وزن خشک ریشه گیاه بود (۲۶).  
Abou Elmaaty و همکاران (۲۰۲۳)، طی بازیابی آلیزارین از ریشه گیاه روناس گزارش کردند دمای ۶۵ درجه سلسیوس، ۴۵ دقیقه و ۹ میلی‌لیتر در دقیقه جریان حلال بهینه شرایط بود و بازیابی آلیزارین در شرایط بهینه ۱/۳۴ گرم بر کیلوگرم بود (۲۵). باید توجه داشت که غلظت آنتراکینون‌ها تحت تأثیر عوامل محیطی مانند نوع خاک، زمان برداشت، و شرایط رشد گیاه قرار دارد (۲۴).

طی بررسی گروه‌های عاملی موجود در نمونه فیلم‌ها مشاهده شد، در طیف FTIR مربوط به فیلم کیتوزان خالص، باند کششی وسیع در ناحیه  $3400 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاشات گروه‌های OH- و NH<sub>2</sub>- است که نشان‌دهنده‌ی پیوندهای هیدروژنی قوی درون زنجیره‌ای و بین‌زنجیره‌ای بوده و نقش مؤثری در ساختار سه‌بعدی فیلم دارد (۲۶). حضور باند در ناحیه  $1650 \text{ cm}^{-1}$  به ارتعاشات C=O در گروه‌های آمیدی نسبت داده شده که احتمالاً ناشی از باقی‌مانده‌های N-acetyl پس از داستیل‌اسیون ناقص کیتوزان است (۲۷). پیک قابل مشاهده در حدود  $1590-1550 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاشات خمشی گروه‌های آمینی اولیه می‌باشد که نشان‌دهنده‌ی ماهیت پلی‌ساکاریدی کیتوزان و وجود گروه‌های فعال آمینی است (۲۸). همچنین، باندهای واقع در ناحیه  $1150 \text{ cm}^{-1}$  تا  $1020 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاشات پیوندهای C-O-C و C-O در ساختار گلیکوزیدی کیتوزان می‌باشد که تأثیر قابل توجهی در رفتار جذب رطوبت و ساختار مولکولی فیلم دارند (۲۹).

در فیلم کیتوزان/آلیزارین، تغییرات قابل توجهی نسبت به کیتوزان خالص مشاهده شد که بیانگر تعامل بین اجزاء است. تشدید پیک در ناحیه  $1580-1550 \text{ cm}^{-1}$  که به گروه‌های آمینی اولیه مربوط است، احتمالاً ناشی از تشکیل پیوندهای هیدروژنی یا الکترواستاتیک بین گروه‌های آمین کیتوزان و گروه‌های فنولی آلیزارین می‌باشد (۲۹). افزایش شدت پیک در ناحیه  $1170-1150 \text{ cm}^{-1}$  نیز می‌تواند ناشی از حضور گروه‌های هیدروکسیل آلیزارین باشد که با ماتریس

## توسعه و بررسی عملکرد فیلم کیتوزان/آلیزارین به عنوان بسته‌بندی هوشمند ...

هنگامی که آلیزارین در پلیمرهایی مانند کیتوزان یا سلولز ادغام می‌شود، می‌تواند خواص رهایش کنترل شده‌ای را ارائه دهد و عملکرد ضد میکروبی پایدار را در طول زمان تضمین کند. نشان داده شده است آلیزارین با کلاته کردن یون‌های کلسیم و اختلال در بیان ژن‌های بیماری‌زا، تشکیل بیوفیلم و تولید سموم را در باکتری‌های گرم‌مثبت مهار می‌کند. در باکتری‌های گرم‌منفی، به دلیل وجود غشای خارجی، اثر آن ضعیف‌تر است اما می‌تواند با تولید گونه‌های فعال اکسیژن و تغییر نفوذپذیری غشا، باعث آسیب سلولی شود (۳۴). همچنین فعالیت ضد میکروبی ذاتی کیتوزان ناشی از بار مثبت گروه‌های آمینی موجود در آن است که این گروه‌ها با غشاء میکروارگانیزم‌ها که دارای بار منفی هستند واکنش داده و منجر به نشت پروتئین و اجزاء درون سلولی میکروارگانیزم‌ها می‌گردد (۳۵). همراه با نتایج این مطالعه، Ezati و همکاران (۲۰۲۰)، نشان دادند هنگامی که آلیزارین در فیلم کیتوزان گنجانده شد، نتایج ضد باکتریایی بسته به نوع باکتری متفاوت بود. فیلم کیتوزان/آلیزارین در مقایسه با فیلم کیتوزان خالص، اثربخشی ضد باکتریایی علیه *E. coli* را افزایش نداد، اما فعالیت بهبود یافته‌ای را علیه *L. monocytogenes* نشان داد. این محققان اثر ضدباکتریایی محدود مشاهده شده با آلیزارین را احتمالاً به دلیل غلظت کم آلیزارین (۱ درصد وزنی) اضافه شده به فیلم کیتوزان گزارش کردند (۱۵). El Tanahy (۲۰۲۲)، طی بررسی فعالیت ضد میکروبی آلیزارین بدست آمده از ریشه روناس در برابر *Staphylococcus aureus*، *Klebsiella pneumoniae*، *Pseudomonas aeruginosa* و *E. coli* را نشان دادند. علاوه بر این، حداقل غلظت مهارکنندگی تعیین و نشان داده شد که حساس‌ترین ارگانیزم‌ها به عصاره آلیزارین، *Klebsiella pneumoniae* بود (۳۶). تفاوت عملکرد ضد میکروبی فیلم‌ها در مورد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی به ساختار و شکل ظاهری این دو گروه باکتری مرتبط است. باکتری‌های گرم منفی یک غشای بیرونی پیچیده غنی از لیپوپلی ساکارید دارند که انتشار ترکیبات آبرگیر را

کیتوزان تعامل داشته و پیوندهای جدیدی ایجاد کرده‌اند (۳۰). تغییرات در ناحیه  $1030-1020\text{ cm}^{-1}$  که به پیوندهای گلیکوزیدی مربوط است، حاکی از اثر ساختاری آلیزارین بر چیدمان زنجیره‌های گلوکز در کیتوزان بوده و ممکن است نشان‌دهنده تغییر در نظم فضایی پلیمر باشد (۲۶). همچنین، تغییرات در شدت باند وسیع  $3400\text{ cm}^{-1}$  نشان‌دهنده برهم‌کنش‌های جدید بین گروه‌های OH- و NH<sub>2</sub>- کیتوزان با گروه‌های هیدروکسیل آلیزارین باشد، که می‌تواند ساختار شبکه‌ی هیدروژنی فیلم را تحت تأثیر قرار دهد (۳۱).

بسته‌بندی هوشمند مبتنی بر آلیزارین با ترکیب رنگ در یک ماتریس پلیمری مناسب برای تولید فیلم‌هایی که قادر به نشان دادن تازگی محصولات فساد پذیر مثل گوشت و محصولات دریایی هستند، توسعه یافته است. رنگ آلیزارین را می‌توان در یک ماتریس پلیمری یا یک فیلم بیوپلیمری (مانند ژلاتین، کیتوزان، سلولز و غیره) ادغام نمود تا یک حسگر رنگ‌سنجی به عنوان بخشی از بسته‌بندی فراهم نماید (۳۲). فعالیت ضد میکروبی فیلم‌های هوشمند و فیلم کیتوزان در برابر باکتری‌های گرم مثبت (*Staphylococcus aureus* و *Listeria monocytogenes*) و گرم‌منفی (*Escherichia coli* و *Salmonella typhimurium*) در جدول ۱ نشان دهنده عدم فعالیت باکترئواستاتیک و باکتریوسیدال فیلم کیتوزان بر پاتوژن‌های مورد بررسی بود. همچنین کمترین قطر هاله عدم رشد پاتوژن‌ها در مواجهه با فیلم کیتوزان مشاهده شد. درحالی‌که نتایج نشان داد ادغام آلیزارین در فیلم کیتوزان بطور معنادار فعالیت ضد میکروبی فیلم هوشمند در برابر پاتوژن‌های مورد بررسی را افزایش داد. به ترتیب پاتوژن‌های *Staphylococcus aureus* > *Listeria monocytogenes* > *Escherichia coli* > *Salmonella typhimurium* بیشترین حساسیت را به فیلم هوشمند داشتند. آلیزارین حاوی گروه‌های هیدروکسیل و کینون است که می‌تواند با دیواره‌های سلولی باکتری‌ها، پروتئین‌ها و DNA تعامل داشته باشند و رشد باکتری‌ها را مهار کنند (۳۳).

محدود می‌کند. با این حال، باکتریهای گرم مثبت دیواره پپتیدوگلیکان ضخیمی دارند که به اندازه کافی مترام نیست تا در برابر مولکول‌های ضد میکروبی کوچک مقاومت کند و امکان دسترسی به غشای سلولی را فراهم می‌کند (۳۷).

آنتی‌اکسیدان مولکولی است که اکسیداسیون را مهار می‌کند و در طی یک واکنش شیمیایی می‌تواند رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن<sup>۱</sup> (ROS) تولید کند (۳۳). نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌ها در جدول ۲ نشان داد فیلم کیتوزان دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی به هر دو روش DPPH و ABTS بود و فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد فیلم کیتوزان در روش ABTS بیشتر از روش DPPH بود. مطالعات نشان داده کیتوزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ذاتی از خود نشان می‌دهد و می‌تواند به عنوان جایگزینی برای آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی استفاده شود. در واقع اثر آنتی‌اکسیدانی کیتوزان با وزن مولکولی، غلظت و ویسکوزیته آن نسبت مستقیم دارد (۳۸). فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم کیتوزان به دلیل وجود یک گروه آمینو در موقعیت C-2 زنجیره‌های کیتوزان بود. گروه آمینو از شروع پراکسیداسیون لیپید از طریق کارایی کلات یون فلزی جلوگیری می‌کند (۳۹). فعالیت آنتی‌اکسیدانی کمتر فیلم کیتوزان در روش DPPH عمدتاً به دلیل کاهش مواجهه با گروه‌های آمینو بود که به دلیل نرخ تورم پایین بیوپلیمر در حلال متانول مورد استفاده برای تجزیه و تحلیل، می‌باشد (۱۵). علاوه بر این نتایج نشان داد افزودن آلزارین در ماتریس فیلم کیتوزان بطورمعناداری سبب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه فیلم‌ها شد (جدول ۲). آلزارین، یک ترکیب آنتراکینون طبیعی، مانند سایر ترکیبات فنلی خواص آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی از خود نشان می‌دهد. آلزارین ممکن است الکترون‌ها یا اتم‌های هیدروژن را به رادیکال‌های آزاد مانند رادیکال‌های هیدروکسیل، پراکسیل و سوپراکسید منتقل کند، بنابراین

آنها را به مولکول‌های پایدار و غیر واکنشی تبدیل می‌کند. این امر آن را قادر می‌سازد تا رادیکال‌های آزاد را از بین ببرد (۴۰). همچنین مطالعات نشان داده ستون اصلی آنتراکینون آلزارین، همراه با گروه‌های فنلی -OH، به مولکول اجازه می‌دهد تا الکترون‌ها یا اتم‌های هیدروژن را به رادیکال‌های آزاد مانند هیدروکسیل، پراکسیل و سوپراکسید اهدا کند، عوامل فعال را از بین ببرد و استرس اکسیداتیو را کاهش دهد (۴۱). فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم هوشمند حاوی آلزارین توسط مطالعات مختلف گزارش شده است. Ezati و همکاران (۲۰۲۰)، نشان دادند فعالیت آنتی‌اکسیدانی به دو روش مهارکنندگی رادیکال DPPH و ABTS فیلم کربوکسی متیل سلولز/آلزارین نسبت به نمونه سلولز خالص، به ترتیب از ۲۴/۱ به ۳۲/۵ درصد و از ۹/۳ به ۸۶/۷ درصد افزایش یافت (۴۲). همچنین Wu و همکاران (۲۰۲۲) نشان دادند فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌های پلی لاکتیک اسید حاوی کیتوزان و آلزارین به روش DPPH به ترتیب ۴۳/۳ و ۷۲/۸ درصد بود (۴۳).

حساسیت فیلم به pH و تغییر رنگ فیلم هوشمند کیتوزان/آلزارین در pH های مختلف ارزیابی شد (جدول ۳ و تصویر ۳). با افزایش pH، رنگ فیلم به طور قابل توجهی از زرد ملایم به بنفش تغییر کرد. فیلم در pH 4 کمی زرد، در pH 5 خاکی و با افزایش pH به 7 روشن تر شد. متعاقباً، تغییرات قرمزی قابل توجهی با افزایش pH از 7 به 9 مشاهده شد و سپس با افزایش قلیاییت، رنگ بنفش بسیار قابل توجهی ظاهر شد. تغییرات رنگ مشابه وابسته به pH در شاخص‌های کاغذ نشاسته حاوی آلزارین نیز مشاهده شده است (۳۲). مقدار روشنایی فیلم کیتوزان/آلزارین در pH 6 بیشترین مقدار را داشت و با افزایش pH کاهش یافت و کمترین مقدار در pH 12 بود. مقادیر مثبت b\* تا pH 8 به دلیل افزایش رنگ زرد بود، در حالی که مقدار مثبت a\* و مقدار منفی بالای b\* در pH 10 به دلیل تغییر رنگ آلزارین به بنفش تیره در pH های بالا بود. به طور کلی، اگر

<sup>1</sup> Reactive oxygen species

## توسعه و بررسی عملکرد فیلم کیتوزان/آلیزارین به عنوان بسته‌بندی هوشمند ...

بگذارد، به طوری که ولتاژ بالاتر (تصویر ۲-b) ممکن است جزئیات بیشتری از سطح را آشکار کرده باشد، هر چند ساختار کلی همچنان مترکم و یکنواخت باقی مانده است. در این مطالعه یک فیلم تغییر رنگ دهنده مبتنی بر کیتوزان و واکنش‌پذیر به pH که با آلیزارین ترکیب شده بود، برای کاربردهای بسته‌بندی فعال و هوشمند تهیه شد. غلظت آلیزارین آزاد استخراج‌شده از ریشه‌ی روناس برابر با ۳/۴۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک محاسبه شد. نتایج SEM و FTIR نشان داد که آلیزارین به طور یکنواخت در ماتریس کیتوزان پراکنده شده و یک فیلم کامپوزیتی سازگار تشکیل داده است. فیلم هوشمند کیتوزان/آلیزارین فعالیت ضدباکتریایی در برابر هر دو گروه باکتری گرم مثبت و گرم منفی و همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی نشان داد. فیلم هوشمند در پاسخ به تغییر pH در محدوده ۴ تا ۱۰، تغییر رنگ واضحی از زرد ملایم به بنفش نشان داد. علاوه بر این، فیلم تغییر رنگ متمایزی از خاکی به قهوه‌ای روشن نشان داد. در مجموع می‌توان گفت فیلم هوشمند کیتوزان/آلیزارین با خواص ضدباکتریایی، آنتی‌اکسیدانی و تغییر رنگ واکنش‌پذیر به pH می‌تواند به عنوان یک سامانه بسته‌بندی فعال با قابلیت مهار رشد پاتوژن‌های غذازاد استفاده شوند. این عملکرد، به‌ویژه در صنایع بسته‌بندی مواد غذایی، می‌تواند نقش مهمی در افزایش ایمنی، کاهش فساد و ارتقاء کیفیت نگهداری داشته باشد. این عملکرد می‌تواند به‌ویژه در بسته‌بندی محصولات حساس مانند گوشت تازه یا ماهی، نقش مؤثری در افزایش ایمنی، کاهش فساد و ارتقاء کیفیت نگهداری ایفا کند. با این حال، برای تأیید اثربخشی آن در شرایط واقعی، انجام تحقیقات بیشتر در محیط‌های غذایی طبیعی پیشنهاد می‌شود.

### تعارض منافع

این مطالعه هیچ‌گونه تعارض منافی برای نویسندگان ندارد.

اختلاف رنگ کل ( $\Delta E$ ) بیشتر از ۵ باشد، فرد می‌تواند تغییر رنگ را به صورت بصری درک کند (۴۴). تفاوت  $\Delta E$  بین pH ۱۲ تا ۱۴ بیشترین مقدار است که نشان دهنده تفاوت قابل توجه در رنگ با چشم غیر مسلح است.  $\Delta E$  می‌تواند به عنوان شاخصی از رنگ قابل تشخیص بصری با تغییر pH داخل محیط بسته‌بندی استفاده شود (۴۴). Ezati و همکاران (۲۰۱۹) تغییر رنگ آلیزارین را به دلیل تشکیل پیوندهای هیدروژنی درون مولکولی بین دو گروه هیدروکسیل و اتم‌های اکسیژن کربونیل، نسبت دادند (۴۵).

ریزساختار لایه‌های کیتوزان قبل و بعد از افزودن آلیزارین توسط SEM مشاهده شده است، همانطور که در تصویر ۲ نشان داده شده است. سطح لایه کیتوزان (تصویر ۲-a) فشرده و صاف و بدون ترک است که نشان دهنده شکل‌پذیری عالی لایه کیتوزان است. این ویژگی‌ها نشان می‌دهند که زنجیره‌های کیتوزان به‌خوبی در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند و ساختاری مترکم و بدون تخلخل قابل مشاهده ایجاد کرده‌اند که برای کاربردهای زیست‌پزشکی و بسته‌بندی بسیار مطلوب است (۴۶).

مورفولوژی مشابهی از لایه کیتوزان هنگام افزودن آلیزارین به لایه کیتوزان مشاهده شد که نشان دهنده سازگاری خوب بین کیتوزان و آلیزارین است. این به دلیل ساختار شیمیایی آلیزارین حاوی گروه‌های هیدروکسیل فنلی است که می‌توانند با گروه‌های هیدروکسیل کیتوزان تعامل داشته باشند و پیوندهای هیدروژنی تشکیل دهند. در نتیجه، همانطور که در نتایج SEM مشاهده شد، آلیزارین به طور یکنواخت در ماتریس کیتوزان، بدون ایجاد تخلخل یا ناهمگنی سطحی، توزیع و پراکنده شد که این موضوع نقش مهمی در حفظ خواص مکانیکی و زیست‌سازگاری فیلم دارد. تفاوت در ولتاژ شتاب‌دهنده بین دو تصویر نیز می‌تواند بر وضوح و جزئیات سطحی تأثیر

## References

- 1- Wagh RV, Priyadarshi R, Khan A, Riahi Z, Packialakshmi JS, Kumar P, Rindhe SN, Rhim JW. The Role of Active Packaging in the Defense Against Foodborne Pathogens with Particular Attention to Bacteriophages. *Microorganisms*. 2025 Feb 12;13(2):401.
- 2- Walsh TR, Gales AC, Laxminarayan R, Dodd PC. Antimicrobial resistance: addressing a global threat to humanity. *PLoS medicine*. 2023 Jul 3;20(7):e1004264.
- 3- CDC Four Steps to Food Safety-CDC. 2024. Available online: <https://www.cdc.gov/food-safety/prevention/index.html> (accessed on 1 December 2024).
- 4- Wagh RV, Ezati P, Khan A, Priyadarshi R, Rhim JW. Vaccinium corymbosum-Derived Carbon Dots and Anthocyanin-Infused Gelatin Multifunctional Films for Smart Packaging Applications. *Packaging Technology and Science*. 2024 Nov;37(11):1049-64.
- 5- Rindhe S, Khan A, Priyadarshi R, Chatli M, Wagh R, Kumbhar V, Wankar A, Rhim JW. Application of bacteriophages in biopolymer-based functional food packaging films. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2024 May;23(3):e13333.
- 6- Mkhari T, Adeyemi JO, Fawole OA. Recent Advances in the Fabrication of Intelligent Packaging for Food Preservation: A Review. *Processes*. 2025 Feb 14;13(2):539.
- 7- Ashiagbor K, Jayan H, Yosri N, Amaglo NK, Zou X, Guo Z. Advancements in SERS based systematic evolution of ligands by exponential enrichment for detection of pesticide residues in fruits and vegetables. *Food Chemistry*. 2024 Sep 23;141394.
- 8- Klaric SV, Galvão Maciel A, Arend GD, Tres MV, de Lima M, Soares LS. Application of Plant Extracts Rich in Anthocyanins in the Development of Intelligent Biodegradable Packaging: An Overview. *Processes*. 2025 Jan 11;13(1):191.
- 9- Khan A, Ezati P, Rhim JW. Alizarin: Prospects and sustainability for food safety and quality monitoring applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2023 Mar 1;223:113169.
- 10- Madaan N, Oommen IE, Roy S. Development of Shikonin-Incorporated Biobased Intelligent Packaging Sensors for Enhanced Fresh Produce Quality Monitoring and Preservation. *ACS Food Science & Technology*. 2025 May 20;5(6):2021-35.
- 11- He J, Peng Q, Wang J, Deng J, Li W, Lin Q, Zhong F, Xia X. An intelligent thymol/alizarin-loaded polycaprolactone/gelatin/zein nanofibrous film with pH-responsive and antibacterial properties for shrimp freshness monitoring and preservation. *Food Chemistry*. 2025 Apr 15;471:142812.
- 12- Sathianathan RV, Joseph J, Raveena R, Ilanthendral K. Intelligent packaging film fortified with betacyanin for prolonging rice cake freshness. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2025 Feb 7:1-7.
- 13- Gnanaraj M, Sivamaruthi BS, Mohamed SS, Sisubalan N, Basha MH, Chaiyasut C. Optimization of conditions to achieve a high content of alizarin and purpurin in the adventitious roots of *Rubia cordifolia* L. 2024 Mar. 2024:1-9.
- 14- Soleymani Najafabadi M, Shakerian A, Mashak Z, Rahimi E. Production of Smart Packaging Chitosan Films Utilizing *Malva sylvestris* Mucilage and *Rubia tinctorum* Extract for Enhancing Fish Freshness and Prolonging Shelf Life. *Journal of Food Biochemistry*. 2024;2024(1):7275427.
- 15- Ezati P, Rhim JW. pH-responsive chitosan-based film incorporated with alizarin for intelligent packaging applications. *Food Hydrocolloids*. 2020 May 1;102:105629.
- 16- Lee MH, Kim SY, Park HJ. Effect of halloysite nanoclay on the physical, mechanical, and antioxidant properties of chitosan films incorporated with clove essential oil. *Food Hydrocolloids*. 2018 Nov 1;84:58-67.
- 17- da Silva BD, do Rosário DK, Neto LT, Lelis CA, Conte-Junior CA. Antioxidant, antibacterial and antibiofilm activity of nanoemulsion-based natural compound delivery systems compared with non-nanoemulsified versions. *Foods*. 2023 May 6;12(9):1901.
- 18- Ansarifard E, Moradinezhad F. Encapsulation of thyme essential oil using electrospun zein fiber for strawberry preservation. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 2022 Jan 13;9(1):2.
- 19- El Hamdaoui A, Msanda F, Boubaker H, Leach D, Bombarda I, Vanlout P, El Aouad N, Abbad A, Boudyach EH, Achemchem F, Elmoslih A. Essential oil composition, antioxidant and antibacterial activities of wild and cultivated *Lavandula mairei* Humbert. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2018 Feb 1;76:1-7.

- 20- Roy S, Rhim JW.** Agar-based antioxidant composite films incorporated with melanin nanoparticles. *Food Hydrocolloids*. 2019 Sep 1;94:391-8.
- 21- Vo TV, Dang TH, Chen BH.** Synthesis of intelligent pH indicative films from chitosan/poly (vinyl alcohol)/anthocyanin extracted from red cabbage. *Polymers*. 2019 Jun 26;11(7):1088.
- 22- Liang T, Wang H, Shu Y, Khan S, Li C, Zhang Z.** An intelligent film based on self-assembly of funoran and *Ophiopogon japonicus* seed anthocyanins and its application in monitoring protein rich food freshness. *Food Control*. 2024 May 1;159:110300.
- 23- Do KL, Mushtaq A, Zhao F, Su M.** Alizarin old and new: Extraction techniques for coloration, advances in detection methods for historical textiles and novel applications as a functional dye. *Coloration Technology*. 2024 Feb;140(1):5-29.
- 24- Anouar EH, Osman CP, Weber JF, Ismail NH.** UV/Visible spectra of a series of natural and synthesised anthraquinones: experimental and quantum chemical approaches. SpringerPlus. 2014 May 8;3(1):233.
- 25- Abou Elmaaty T, Sayed-Ahmed K, Magdi M, Elsisy H.** An eco-friendly method of extracting alizarin from *Rubia tinctorum* roots under supercritical carbon dioxide and its application to wool dyeing. *Scientific Reports*. 2023 Jan 2;13(1):30.
- 26- Derksen GC, Lelyveld GP, van Beek TA, Capelle A, de Groot AE.** Two validated HPLC methods for the quantification of alizarin and other anthraquinones in *Rubia tinctorum* cultivars. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*. 2004 Nov;15(6):397-406.
- 27- Machatová Z, Barbieriková Z, Poliak P, Jančovičová V, Lukeš V, Brezová V.** Study of natural anthraquinone colorants by EPR and UV/vis spectroscopy. *Dyes and Pigments*. 2016 Sep 1;132:79-93.
- 28- Rhim JW, Hong SI, Park HM, Ng PK.** Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2006 Aug 9;54(16):5814-22.
- 29- Ghanem SN, Marzouk MI, Tawfik ME, Eskander SB.** Spectroscopic approaches for structural analysis of extracted chitosan generated from chitin deacetylated for escalated periods. *BMC chemistry*. 2025 Jul 16;19(1):214.
- 30- Duraisamy P, Vinod AR.** Extraction, characterization, antimicrobial activity of chitosan extracted from crab shell and preparation of chitosan-based bioplastic film for food packaging. *Journal of Advanced Scientific Research*. 2022 Feb 28;13(01):263-8.
- 31- Rinaudo M.** Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in polymer science*. 2006 Jul 1;31(7):603-32.
- 32- Ezati P, Tajik H, Moradi M, Molaei R.** Intelligent pH-sensitive indicator based on starch-cellulose and alizarin dye to track freshness of rainbow trout fillet. *International journal of biological macromolecules*. 2019 Jul 1;132:157-65.
- 33- Gam S, Kalita P, Gogoi B, Bora NS, Roy S.** A review on alizarin-added bio-based smart meat packaging sensors. *Materials Research Express*. 2025 Jun 1.
- 34- Li R, Zhuang D, Feng H, Wang S, Zhu J.** Novel “all-in-one” multifunctional gelatin-based film for beef freshness maintaining and monitoring. *Food Chemistry*. 2023 Aug 30;418:136003.
- 35- Chang SY, Lai HM.** Effect of trisodium citrate on swelling property and structure of cationic starch thin film. *Food Hydrocolloids*. 2016 May 1;56:254-65.
- 36- El Tanahy AH.** Antibacterial activity of *Rubia tinctorum* extracts. *Records of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. 2022 Apr 1;6(2):23-8.
- 37- Azhdarzadeh F, Hojjati M.** Chemical composition and antimicrobial activity of leaf, ripe and unripe peel of bitter orange (*Citrus aurantium*) essential oils. *Nutrition and food in health and disease*. 2016 Feb 10;3(1):43-50.
- 38- Muthu M, Gopal J, Chun S, Devadoss AJ, Hasan N, Sivanesan I.** Crustacean waste-derived chitosan: Antioxidant properties and future perspective. *Antioxidants*. 2021 Feb 3;10(2):228.
- 39- Muñoz-Tebar N, Pérez-Álvarez JA, Fernández-López J, Viuda-Martos M.** Chitosan edible films and coatings with added bioactive compounds: Antibacterial and antioxidant properties and their application to food products: A review. *Polymers*. 2023 Jan 12;15(2):396.
- 40- Sani MA, Zhang W, Abedini A, Khezerlou A, Shariatifar N, Assadpour E, Zhang F, Jafari SM.** Intelligent packaging systems for the quality and safety monitoring of meat products: From lab scale to industrialization. *Food Control*. 2024 Jun 1;160:110359.
- 41- Zhao L, Zheng L.** A Review on Bioactive Anthraquinone and Derivatives as the Regulators for

ROS. *Molecules*. 2023 Dec 17;28(24):8139.

**42- Ezati P, Rhim JW, Moradi M, Tajik H, Molaie R.** CMC and CNF-based alizarin incorporated reversible pH-responsive color indicator films. *Carbohydrate polymers*. 2020 Oct 15;246:116614.

**43- Wu Y, Ma Y, Gao Y, Liu Y, Gao C.** Poly (lactic acid)-based pH responsive membrane combined with chitosan and alizarin for food packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022 Aug 1;214:348-59.

**44- Ma Q, Liang T, Cao L, Wang L.** Intelligent poly (vinyl alcohol)-chitosan nanoparticles-

mulberry extracts films capable of monitoring pH variations. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018 Mar 1;108:576-84.

**45- Ezati P, Tajik H, Moradi M.** Fabrication and characterization of alizarin colorimetric indicator based on cellulose-chitosan to monitor the freshness of minced beef. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2019 Apr 15;285:519-28.

**46- Shankar S, Rhim JW.** Preparation of sulfur nanoparticle-incorporated antimicrobial chitosan films. *Food Hydrocolloids*. 2018 Sep 1;82:116-23.



Volume 8, Issue 4, Winter 2026, pages: 11-26

۲۶

## Development and Performance Evaluation of Chitosan/Alizarin Film as a Smart Packaging with Antimicrobial, Antioxidant, and pH-Sensitive Properties

Meysam Soleymani Najafabadi<sup>1</sup>, Amir Shakerian<sup>2</sup>, Zohreh Mashak<sup>3\*</sup>  
and Ebrahim Rahimi<sup>2</sup>

1- Department of Food Hygiene, Sha.C, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2- Research Center of Nutrition and Organic Products, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

3- Department of Food Hygiene and Quality Control, Ka.C., Islamic Azad University, Karaj, Iran.

Correspondence author: email: [mashak@kia.u.ac.ir](mailto:mashak@kia.u.ac.ir)

Receive: July 30, 2025; Revise: August 14, 2025; Accept: November 23, 2025

 [10.22034/nfv.m.2025.538094.1296](https://doi.org/10.22034/nfv.m.2025.538094.1296)

### Abstract

pH-sensitive colorimetric indicator films are essential components of intelligent packaging systems. Alizarin, an organic dye with pH-responsive properties, has attracted attention as a visual indicator in intelligent packaging applications. Therefore, this study aimed to develop and evaluate the performance of an intelligent chitosan/alizarin film as an active packaging system with pH sensitivity, and to assess its antimicrobial and antioxidant activities. Alizarin was extracted from madder root with a molar absorptivity coefficient of  $\epsilon = 5.5$  and a yield of 3.43 mg/g dry weight, and incorporated into chitosan films at a concentration of 3%. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), surface morphology (SEM), antimicrobial activity (MIC, MBC, and IZ) against foodborne pathogens including *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, and *L. monocytogenes*, antioxidant activity (DPPH and ABTS), and color changes of the intelligent film were measured at pH 1 to 14 were investigated. FTIR and SEM analyses revealed that interactions between the amino groups of chitosan and the aromatic structure of alizarin led to structural modifications and increased surface roughness of the film. The film exhibited significant antimicrobial activity in MIC, MBC, and inhibition zone tests, particularly against Gram-positive bacteria ( $p < 0.05$ ). Additionally, DPPH and ABTS assays confirmed a significant enhancement in antioxidant activity ( $p < 0.05$ ). The film's color response varied from yellow to purple across the pH range of 1 to 14, indicating high sensitivity to environmental changes. Overall, the chitosan/alizarin film, with its multifunctional properties—antimicrobial, antioxidant, and pH-responsive—represents a promising and practical candidate for the development of intelligent packaging systems to promote food safety.

**Keywords:** Alizarin, Chitosan, Antibacterial, Antioxidant, pH-sensitive, Smart Packaging