



## Effect of different ratios of lecithin-cholesterol on the encapsulation stability of beta-carotene-loaded nanoliposomes

Sahar Namvar<sup>1</sup>, Bahram Fathi-Achachlouei<sup>2✉</sup> and Rezvan Shaddel<sup>2</sup>

<sup>1</sup>MSc of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

<sup>2</sup>Professor and Associate Professor respectively, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

✉ Corresponding author: b\_fathi@uma.ac.ir

### ARTICLE INFO

#### Article type:

Research Article

#### Article history:

Received: November 15, 2022

Accepted: September 23, 2023

Published: March 5, 2024

#### Keywords:

Beta-carotene, nanoliposome, thin film hydration, sonication, lecithin, cholesterol

### ABSTRACT

**Background:** The physical properties of liposome (especially in terms of size, size distribution, and layering) depend on different preparation methods, type of lipid (charged, uncharged and neutral), lipid composition, surfactant, organic solvent and ionic strength of the suspension medium used in the preparation techniques. The common method used to produce liposome is thin-layer hydration.

**Aims:** The purpose of this research was to investigate the effect of different ratios of lecithin-cholesterol on particle size, encapsulation efficiency, and stability of these two characteristics over time. Also, another goal of this research is to investigate the effectiveness of the combined method of thin layer hydration and sonication to solve the problems of large particle size and non-uniform distribution of particle size.

**Methods:** Experimental treatments in this research include lecithin-cholesterol ratios (30-30, 40-20, 50-10 and 60-0). Due to the incompatibility of beta-carotene with water, nanoliposome formulations were produced using the combined method of thin-layer hydration-sonication.

**Results:** The results showed that the effect of lecithin-cholesterol ratios on changes in particle size, particle size distribution (PDI), encapsulation efficiency and zeta potential was significant. By adding cholesterol at the ratio of 1:5 to lecithin, the particle size and particle size distribution decreased and the encapsulation efficiency increased; Also, the results of this research showed that the addition of cholesterol at a ratio of 1:5 to lecithin in the nanoliposome structure makes the particle size and encapsulation efficiency of beta-carotene more stable in 60 days compared to the nanoliposome structure without cholesterol. Also, the FTIR test determined that beta-carotene particles were well trapped in the structure of nanoliposomes.

**Conclusion:** According to the tests examined in this research, it can be concluded that the combined method of thin layer hydration-sonication along with the limited use of cholesterol is a suitable solution to obtain nano-scale particles with high stability over time.



## Extended Abstract

**Introduction:** Beta-carotene's significant antioxidant capabilities contribute to vital biological functions within the body, enhancing the immune system and lowering the risk of degenerative illnesses (Chen et al. 2021).  $\beta$ -Carotene, a key member of the carotenoid family, is recognized as one of the most potent antioxidants and the major provitamin A carotenoid available in the human diet. The health benefits of  $\beta$ -carotene are attributed to its given biological properties: (a) as antioxidants that scavenge and quench ROS of oxidative metabolism, (b) as provitamin A compounds that activate retinol-mediated pathways, (c) as electrophiles that boost endogenous antioxidant systems (Maurya et al., 2021). Its antioxidant properties are crucial in the prevention of a range of diseases, including heart disease, cancer, diabetes, and cataracts. Consequently, beta-carotene has gained widespread popularity as a dietary supplement in the food, cosmetic, and pharmaceutical sectors (Rocha et al. 2018). In recent years, the utilization of lipid structures for encapsulating beta-carotene has gained prominence due to the challenging free absorption of beta-carotene in the body and its high lipophilicity (Xu et al., 2022). Among the innovative strategies in drug and active ingredient delivery systems, liposomes have emerged as a significant approach (Liu et al., 2022). Liposomes are artificial membranous vesicles formed by phospholipids bilayers. Liposomes have long been receiving much consideration owing to their biocompatibility and interesting ability to carry hydrophobic and hydrophilic compounds. Due to their similarity with the bilayer structure of natural membranes, liposomes are used as a membrane model. The similarity between the liposomal and membrane bilayer core makes liposomes a very useful tool to inspect the consequence of carotenoids–membrane interactions (Elkholy et al., 2020). Cationic liposomes are magnificently used as drug delivery of therapeutic drugs and genes. Numerous studies have shown that these cationic nanocarriers are more effective vehicles for drug delivery to the brain than conventional, neutral, or anionic liposomes,

maybe due to the electrostatic interactions between the cationic liposomes and the negatively charged cell membranes, enhancing nanoparticle uptake by adsorptive-mediated endocytosis (Elkholy et al., 2020). Nanoliposomes have gained significant recognition as a successful approach for encapsulating sensitive bioactive compounds, safeguarding them against unfavorable processing or gastrointestinal conditions. The physical characteristics of liposomes, particularly their size, size distribution, and layering, are contingent upon various factors such as the chosen preparation methods, lipid type (charged, uncharged, or neutral), lipid composition, surfactant, organic solvent, and ionic strength of the suspension medium employed during the preparation techniques. Thin-layer hydration is a commonly employed method for liposome production; however, its application is limited due to the production of large particles and non-uniform particle size distribution. This study aimed to examine the impact of varying proportions of lecithin-cholesterol on the size of particles, the efficiency of encapsulation, and the stability of these attributes over some time. Additionally, another objective of this investigation was to assess the efficacy of employing a combined approach involving thin-layer hydration and sonication in addressing the issues related to large particle size and non-uniform distribution of particle size.

**Material and methods:** The experimental interventions in this study consist of different lecithin-cholesterol ratios, specifically 30-30, 40-20, 50-10, and 60-0. Because beta-carotene is not water-soluble, nanoliposome formulations were created through the combined technique of thin-layer hydration-sonication. Subsequently, to decrease the particle size, the liposomal blend was moved to an ice bath to prevent lipid hydrolysis and oxidation, and a probe sonicator was utilized along with 10 cycles of 1 minute each with a 1-minute break between cycles. The particle size was determined using the dynamic light scattering (DLS) test, which relies on the interaction between light and the particles. As time progresses, the light scattered by the

nanoparticles in the suspension changes, allowing for the estimation of the particle diameter. In this study, a 2 ml nanoliposome solution was diluted with double distilled water and then placed in a cuvette. The cuvette was inserted into the SZ-100 device, manufactured by HORIBA in Japan, and the desired characteristics were measured using visible light radiation with a wavelength of 633 nm (Damari et al., 2018; Tosi et al., 2020). To assess the zeta potential based on the techniques outlined by Chen et al. (2015), the SZ-100 instrument from HORIBA in Japan was employed. To examine the microstructure of nanoliposomes and verify their nanoscale size (less than 100 nm) in this study, the MIRA3 field emission scanning electron microscope made by TESCAN (Czech) was utilized. Statistical analysis was conducted using Duncan's multiple range test at a significance level of 5%.

**Results and discussion:** The findings indicated that the impact of lecithin-cholesterol ratios on alterations in particle size, particle size distribution (PDI), encapsulation efficiency, and zeta potential was statistically significant ( $P < 0.05$ ). When incorporating cholesterol in a 1:5 ratio with lecithin, there was a reduction in particle size and particle size distribution, accompanied by an increase in encapsulation efficiency. However, as the cholesterol-lecithin ratio increased further, there was an increase in particle size and particle size distribution, coupled with a decrease in encapsulation efficiency. According to Elkholy et al., (2020) findings, DLS results emphasize that the presence of charge may prevent aggregation of liposomes and consequently may decrease their size. The results of the particle size depicted by TEM are confirmed with results obtained by DLS measurements. As beta-carotene was observed at the boundary surface within liposomal assembly surface, the molecule of beta-carotene tends to be buried in lipid bilayer in random distribution without any preferred orientation which results in increased motional freedom of the alkyl hydrocarbon chains in liquid crystalline state and of the polar lipid head groups, thus fluidizing the entire lipid

bilayer which could explain why the size is increased. The particle size of liposome samples measured with DLS, was slightly larger when compared to TEM results and this could be explained by the basis beyond these two techniques in measuring particle size. DLS puts a higher emphasis on the larger particle sizes as an intensity-based technique. However, TEM as a number-based technique shows the strong emphasis of the smallest components in the size distribution. Moreover, DLS technique measures the size of liposomes while they are in solution, whereas the TEM measures the size of dried liposomes, which is naturally smaller than that of the hydrated ones (Elkholy et al., 2020). Furthermore, the zeta potential of each sample fell within the specified range, with a noticeable rise in zeta potential corresponding to higher levels of cholesterol. The magnitude of the zeta potential indicates the colloidal system's possible stability. As the zeta potential increases, there will be greater repulsion between particles resulting in a more stable dispersion of the colloids. If all suspended particles have high negative or positive zeta potential, then they will tend to repel each other and there will be no tendency for the particles to come together (Elkholy et al., 2020). Additionally, findings from this study indicated that incorporating cholesterol at a 1:5 ratio with lecithin in the nanoliposome composition resulted in enhanced stability of particle size and encapsulation efficiency of beta-carotene over 60 days when compared to nanoliposomes lacking cholesterol. The findings of this study indicated that utilizing the thin layer hydration-sonication technique proved to be an effective method for fabricating nanoliposomes incorporating beta-carotene, resulting in particle sizes ranging from 92.66 to 196.6 nm, falling within the desired range for nanoparticle localization. Throughout the conversion of layered structures into vesicles, cholesterol will likely reside within the molecular cavities formed. As a result, there is a notable enlargement in the size of the vesicles to a certain degree. The findings from previous studies indicate that there is no consistent pattern in terms of the

impact of cholesterol on the size of liposomal particles. In one study, the cholesterol-lecithin ratios were manipulated to create nanoliposomes with beta-carotene, revealing that an increase in the cholesterol-lecithin ratio did not result in a change in particle size (Pezeshky et al., 2016). Conversely, another study demonstrated that elevating the cholesterol-lecithin ratio during the production of nanoliposomes containing vitamin C led to an increase in particle size (Liu and Park, 2010). Furthermore, the FTIR analysis revealed that the nanoliposome structure effectively trapped the beta-carotene particles. Upon comparing beta-carotene and empty nanoliposomes with beta-carotene nanoliposomes, it is evident that the peaks at wavelengths of 3406, 2926, and 2857  $\text{cm}^{-1}$  exhibited an increased intensity. This can be attributed to the enhanced absorption intensity at these wavelengths due to the presence of beta-carotene in the liposome and the formation of new bonds. Additionally, within the wavelength range of 3750-3920  $\text{cm}^{-1}$ , two distinct peaks were observed solely in the beta-carotene nanoliposome, which were absent in both beta-carotene and empty nanoliposomes. The beta-carotene-loaded nanoliposomes were examined using a scanning electron microscope (FE-SEM) to analyze their morphology. The imaging revealed that the particles exhibited an approximately spherical shape and measured around 300 nm in diameter, consistent with the particle size determined through the DLS method. When aggregated, the mass size ranged from 1.5 to 6 micrometers, forming a network of nanoparticles with a porous, nearly spherical structure. Furthermore, the study demonstrated that the utilization of ultrasonic treatment resulted in the production of nanoscale particles.

**Conclusion:** The study demonstrated that incorporating a small amount of cholesterol into lecithin-based nanoliposomes enhances particle size, particle size distribution, and encapsulation efficiency. Conversely, an increased cholesterol content relative to lecithin led to unfavorable outcomes in these properties, suggesting minimal alteration to the

primary structure of nanoliposomes is preferred. Overall, the findings of this investigation indicate that employing a combination of thin layer hydration-sonication technique with restricted cholesterol utilization is an effective approach for producing nano-sized particles with prolonged stability.

## اثر غلظت‌های مختلف لستین - کلسترول بر پایداری درونپوشانی نانولیپوزوم‌های حامل بتاکاروتن

سحر نامور<sup>۱</sup>، بهرام فتحی آچاجلویی<sup>۲</sup> ✉ و رضوان شاددل<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> دانش آموخته مقطع کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

<sup>۲</sup> به ترتیب استاد و دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

✉ مسئول مکاتبه: b\_fathi@uma.ac.ir

### چکیده

### مشخصات مقاله

**زمینه مطالعاتی:** خواص فیزیکی لیپوزوم (به ویژه از نظر اندازه، توزیع اندازه و لایه‌بندی) به روش‌های مختلف آماده‌سازی، نوع لیپید (باردار، بدون بار و خنثی)، ترکیب لیپیدی، سورفاکتانت، حلال آلی و قدرت یونی محیط سوسپانسیون مورد استفاده در تکنیک‌های آماده‌سازی بستگی دارد. روش رایج مورد استفاده برای تولید لیپوزوم هیدراسیون لایه نازک می‌باشد.

**هدف:** هدف از این تحقیق بررسی تاثیر نسبت‌های متفاوت لستین-کلسترول بر اندازه ذرات، درون-پوشانی و پایداری این دو ویژگی در طول زمان است. همچنین بررسی کارایی روش ترکیبی هیدراسیون لایه نازک-سونیکاسیون برای رفع مشکلات بزرگی اندازه ذرات و توزیع غیریکنواخت اندازه ذرات است.

**روش کار:** تیمارهایی آزمایشی در این پژوهش شامل نسبت‌های ترکیبی لستین-کلسترول (۳۰-۳۰، ۲۰-۴۰، ۱۰-۵۰ و ۶۰-۰) می‌باشد. با توجه به عدم امتزاج‌پذیری بتاکاروتن با آب، فرمولاسیون‌های نانولیپوزوم‌ها با استفاده از روش ترکیبی هیدراسیون لایه نازک-سونیکاسیون تولید گردید.

**نتایج:** نتایج نشان داد که اثر غلظت‌های ترکیبی لستین-کلسترول بر تغییرات اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات (PDI)، بازده درون‌پوشانی و پتانسیل زتا معنی‌دار است. با افزودن کلسترول به نسبت ۵:۱ به لستین اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات کاهش و بازده درون‌پوشانی افزایش یافت، اما با افزایش بیشتر نسبت کلسترول به لستین اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات افزایش و بازده درون‌پوشانی کاهش یافت. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که افزودن کلسترول به نسبت ۵:۱ به لستین در ساختار نانولیپوزوم باعث می‌شود که در بازه زمانی ۶۰ روز اندازه ذرات و کارایی درون‌پوشانی بتاکاروتن نسبت به ساختار نانولیپوزوم فاقد کلسترول پایداری بیشتری داشته باشد. همچنین آزمون FTIR مشخص کرد که ذرات بتاکاروتن به خوبی درون ساختار نانولیپوزوم‌ها به دام افتاده است.

**نتیجه گیری:** با توجه به آزمون‌های مورد بررسی در این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که روش ترکیبی هیدراسیون لایه نازک-سونیکاسیون به همراه استفاده محدود از کلسترول راه‌حل مناسبی برای دستیابی به ذراتی در مقیاس نانو با پایداری بالا در طول زمان است.

### نوع مقاله:

علمی پژوهشی

### تاریخچه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۱/۸/۲۴

پذیرش: ۱۴۰۲/۷/۱

انتشار: ۱۴۰۲/۱۲/۱۵

### کلید واژه:

بتاکاروتن، نانولیپوزوم، هیدراسیون لایه نازک، سونیکاسیون، لستین، کلسترول

## مقدمه

هویج یکی از مهمترین منابع حاوی بتاکاروتن می‌باشد. بتاکاروتن به عنوان پیش‌ساز ویتامین A در بدن شناخته شده است و از سوی دیگر دارای خواص ضداکسایشی بالایی می‌باشد که تأثیرات سلامتی‌بخش آن در جلوگیری از ابتلا به انواع سرطان‌ها و بیماری‌های قلبی- عروقی به اثبات رسیده است (دای و رو ۲۰۱۹). همچنین هویج حاوی مقادیر زیادی فیبر، پروتئین و کربوهیدرات بوده و منبع خوبی از عناصر معدنی و ویتامین‌های B1, B2, B6, B12 می‌باشد (اسدی و احمدی ۱۴۰۰). سالانه بیش از ۱۵ درصد از هویج تولیدی در مراحل حمل و نقل، بسته‌بندی و صنایع تبدیلی دچار صدمات فیزیکی شده و بصورت پسماند دور ریخته می‌شود (دآندرلیما و همکاران ۲۰۱۸). از جمله کاربردهایی که برای این ضایعات می‌توان متصور شد استخراج بتاکاروتن به منظور استفاده برای فرمولاسیون و غنی‌سازی محصولات غذایی و تولید فرآورده‌های غذایی- دارویی جدید است (جلالی جیوان و همکاران ۲۰۱۹).

بتاکاروتن مورد مطالعه‌ترین عضو خانواده کاروتنوئیدها است که عمدتاً در میوه‌ها و سبزیجات یافت می‌شود (جیا و همکاران ۲۰۱۵). این رنگدانه طبیعی دارای بیشترین فعالیت پروویتامین A در میان کاروتنوئیدها است (ماوریا و همکاران ۲۰۲۱). با توجه به خاصیت ضداکسایشی بالای بتاکاروتن، حضور میزان مناسبی از بتاکاروتن در رژیم غذایی عملکردهای بیولوژیکی مهمی را در بدن ایجاد می‌کند که باعث تقویت سیستم ایمنی بدن می‌گردد و احتمال ابتلا به بیماری‌های دژنراتیو<sup>۱</sup> را کاهش می‌دهد (چن و همکاران ۲۰۲۱). خواص آنتی‌اکسیدانی بتاکاروتن نقش مهمی در پیشگیری از بیماری‌های مختلف مانند بیماری‌های قلبی، سرطان، دیابت و آب مروارید دارد. از این رو، بتاکاروتن به یک مکمل غذایی محبوب در صنایع غذایی، آرایشی و بهداشتی و دارویی تبدیل شده است (روچا و همکاران ۲۰۱۸). با اینحال استفاده از بتاکاروتن به عنوان یک ماده مغذی یا رنگ طبیعی در غذاها در حال حاضر توسط

تعدادی از عوامل مانند حلالیت ضعیف در آب، نقطه ذوب بالا، ناپایداری شیمیایی، ویژگی چربی دوست و فراهمی‌زیستی کم محدود شده است (ماوریا و همکاران ۲۰۲۰). بتاکاروتن همچنین به دلیل تأثیرات تنش‌های شیمیایی، مکانیکی و حرارتی بسیار ناپایدار و مستعد تخریب فیزیکی و فتوشیمیایی در طول فرآوری و ذخیره‌سازی مواد غذایی است (رحمان و همکاران ۲۰۲۰). با توجه به اینکه جذب بتاکاروتن بصورت آزاد در بدن به سختی صورت می‌گیرد و از آنجا که خاصیت چربی‌دوستی بتاکاروتن بالا می‌باشد در سال‌های اخیر از درون‌پوشانی بتاکاروتن در ساختارهای لیپیدی برای جذب بهتر آن در بدن استفاده شده است (ژو و همکاران ۲۰۲۲).

لیپوزوم‌ها یکی از اصلی‌ترین رویکردهای نوین و پیشرفته در سیستم‌های تحویل دارو و مواد فعال هستند (لیو و همکاران ۲۰۲۲). تحقیقات مربوط به لیپوزوم‌ها در زمینه‌های دارویی، بیولوژیکی و پزشکی اهمیت جذابی پیدا کرده‌است، زیرا لیپوزوم‌ها مناسب‌ترین حامل‌ها برای ارائه موثر انواع مواد مانند داروهای ضد سرطان (ایتو و همکاران ۲۰۱۶؛ پترسون و همکاران ۲۰۱۶)، آنتی‌بیوتیک‌ها (جانگ و همکاران ۲۰۱۵)، ضد التهابی (قنبرزاده و آرامی ۲۰۱۳)، ژن‌ها (زیلبربرگ و همکاران ۲۰۱۷) و ضد قارچی (پرز و همکاران ۲۰۱۶) هستند. لیپوزوم‌ها که به عنوان وزیکول‌های لیپیدی نیز شناخته می‌شوند یا گاهی اوقات به آن‌ها وزیکول نیز می‌گویند، ساختارهای کروی میکروسکوپی هستند که از یک یا چند لایه لیپیدی (معمولاً فسفولیپیدهای طبیعی و مصنوعی) دولایه تشکیل شده‌اند که حجم کمی از فاز آبی را به دام می‌اندازند (دی لئو و همکاران ۲۰۲۱؛ هاس و سونتار ۲۰۲۰). آن‌ها تمایل دارند که عوامل آبدوست را در هسته آبی داخلی و عوامل چربی دوست در نواحی غشایی محصور کنند (علوی و همکاران ۲۰۲۲). به طور کلی، راندمان درون‌پوشانی (EE) عوامل چربی دوست در مقایسه با عوامل آبدوست در لیپوزوم‌ها همیشه بالاتر است زیرا آن‌ها می‌توانند در غشاها قرار بگیرند. مزایای اصلی لیپوزوم‌های سیستمیک به عنوان فرمولاسیون دارویی ناشی از تجزیه زیستی

<sup>1</sup> Degenerative

و سیالیت داخلی وزیکول می‌تواند تا حدی پایداری لیپوزوم در طول زمان را افزایش دهد؛ همچنین کلسترول از جمله موادی است که می‌تواند دافعه الکتروستاتیک ایجاد کرده و از توده‌ای شدن مواد در طول زمان جلوگیری کند (هودیانتی و همکاران ۲۰۱۹).

با توجه به تحقیقات انجام شده، نانولیپوزوم‌ها حامل مناسبی برای غنی‌سازی مواد غذایی با ترکیبات زیست فعال آبرگیز گزارش شده‌اند. اما به علت پایداری پایین در طول زمان کاربرد تجاری آن‌ها محدود شده است. بنابراین هدف از این تحقیق تولید نانولیپوزوم‌های حاوی بتاکاروتن بر اساس روش ترکیبی هیدراسیون لایه نازک-سونیکاسیون با استفاده از ابزارهای پیشرفته است، بطوریکه معایب ذاتی این روش که ناشی از ابزارهای نامناسب بود برطرف گشته و اندازه و توزیع اندازه ذرات کاهش و بازده درون‌پوشانی افزایش یابد. همچنین تاثیر نسبت‌های متفاوت لسیتین-کلسترول بر اندازه ذرات، درون-پوشانی و پایداری این دو ویژگی در طول زمان بررسی می‌شود.

### مواد و روش‌ها

#### مواد مصرفی

تمام مواد شیمیایی و حلال‌های مورد استفاده در این پژوهش از نمایندگی شرکت مرک آلمان خریداری شدند و بدون انجام خالص‌سازی بیشتر مورد استفاده قرار گرفتند.

#### ریزپوشانی بتاکاروتن

تیمارهای آزمایشی در این پژوهش شامل نسبت‌های ترکیبی لسیتین-کلسترول (۳۰-۳۰، ۴۰-۲۰، ۵۰-۱۰ و ۶۰-۰) می‌باشد که تاثیر آن‌ها بر اندازه ذرات و کارایی درون‌پوشانی بتاکاروتن در طول زمان بررسی شد. با توجه به عدم امتزاج‌پذیری بتاکاروتن با آب، فرمولاسیون‌های نانولیپوزوم‌ها با استفاده از روش ترکیبی هیدراسیون لایه نازک-سونیکاسیون تولید گردید، که بر اساس مواد استفاده شده و شرایط انجام آزمایش تغییراتی در آن اعمال گردیده است (کو و لی ۲۰۱۰). در گام اول لسیتین با نسبت‌های مختلف (۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ میلی‌گرم)

آن‌ها، کاهش سمیت سیستمیک، تحویل هدفمند، محافظت از مولکول‌های حساس و بهبود اثرات فارماکوکیتیک<sup>۲</sup> است (فخرآور و همکاران ۲۰۱۶؛ خان و همکاران ۲۰۲۰؛ ماجا و همکاران ۲۰۲۰). فسفاتیدیل اتانول آمین و فسفاتیدیل لینوزیتول از مهم‌ترین فسفولیپیدهای لسیتین ساز هستند. لسیتین‌های طبیعی اساساً مولکول‌های آبرگیز با HLB تقریبی ۸ هستند، بنابراین آن‌ها به تنهایی برای تثبیت حامل‌های لیپیدی مناسب نیستند، اما به دلیل خواص ساختاری آن‌ها در ترکیب سورفکتانت‌های دیگر می‌توانند برای این اهداف استفاده شوند (شاه و همکاران ۲۰۲۰). لسیتین‌ها سورفکتانت‌های زویتریونی هستند؛ از این رو، ممکن است بر اساس محتوای الکترولیت یا مقدار pH دارای بارهای مثبت، منفی یا خنثی باشند. از سوی دیگر، لسیتین‌ها احتمالاً حاوی مقادیر زیادی اسیدهای چرب غیراشباع هستند و بنابراین در برابر اکسیداسیون ناپایدار هستند. این ترکیبات برای استفاده تجاری گسترده در صنایع غذایی و دارویی بی‌خطر هستند (سراندی و همکاران ۲۰۱۹؛ سنگپتا و همکاران ۲۰۲۱). خواص فیزیکی لیپوزوم (به ویژه از نظر اندازه، توزیع اندازه و لایه‌بندی) به روش‌های مختلف آماده-سازی، نوع لیپید (باردار، بدون‌بار و خنثی)، ترکیب لیپیدی، سورفکتانت، حلال آلی و قدرت یونی محیط سوسپانسیون مورد استفاده در تکنیک‌های آماده‌سازی بستگی دارد (هاس و سونتار ۲۰۲۰). استفاده از مولکول‌های آمفی‌فیل با بار منفی یا مولکول‌های آمفی‌فیل با بار مثبت (کلسترول) می‌تواند لیپوزوم‌های باردار تولید کند که به نوبه خود باعث جلوگیری از پدیده توده‌ای شدن لیپوزوم‌ها می‌گردد و پایداری آن‌ها را افزایش می‌دهد (رحمان و همکاران ۲۰۱۸؛ فرزانه و همکاران ۲۰۱۸). با وجود مزایای ذکر شده در مورد لیپوزوم به دلیل قیمت نسبتاً بالای لسیتین خالص، بازده درون‌پوشانی نسبتاً پایین، پایداری پایین در طول زمان و ناپداری و یکنواخت نبودن اندازه وزیکول در طول زمان استفاده از آن‌ها محدود شده است (حمادلو و همکاران ۲۰۲۰). افزودن موادی مانند کلسترول به دلیل کاهش نفوذپذیری غشا، سفت‌تر شدن دیواره وزیکول

<sup>2</sup> Pharmacokinetics

در این روش، از روی حرکت براونی ذرات در فاز سیال می‌توان توزیع ابعاد ذرات در یک محلول را مشخص کرد. برای انجام این آزمون مقدار ۲ میلی‌لیتر از محلول نانولیپوزوم ابتدا با آب مقطر دوبار تقطیر رقیق شد و سپس در کووت جایگذاری شد. کووت در دستگاه SZ-100 ساخت شرکت HORIBA ژاپن، استقرار یافت و ویژگی‌های مورد نظر توسط تایش نورمرئی در طول موج ۶۳۳ نانومتر و در دمای ۲۵ درجه سانتی-گراد اندازه‌گیری شدند (داماری و همکاران ۲۰۱۸؛ توسی و همکاران ۲۰۲۰).

#### پتانسیل زتا

دستگاه زتا پتانسیل، توانایی اندازه‌گیری فاصله هیدرودینامیکی و پتانسیل زتا (پتانسیلی که در این فاصله وجود دارد) را داراست. پتانسیل زتا در اغلب موارد به عنوان شاخصی برای بررسی پایداری پراکندگی نمونه به کار می‌رود. پتانسیل زتای بالا از نظر اندازه به این معناست که سوسپانسیون از نظر پایداری الکتروستاتیکی در وضعیت مطلوبی است. بالا بودن پتانسیل زتای ذرات کلوئیدی موجب بالا رفتن نیروی دافعه الکترواستاتیک و در نتیجه افزایش پایداری فیزیکی سیستم می‌شود؛ برای اندازه‌گیری پتانسیل زتا لیپوزوم‌های حاوی بتاکاروتن از دستگاه SZ-100 ساخت شرکت HORIBA ژاپن استفاده شد. در ابتدا هر یک از نمونه توسط آب مقطر ۵۰ برابر رقیق‌تر شد. سپس نمونه داخل کووت مخصوص ریخته شد و در محل مشخص در دستگاه قرار داده شدند. پتانسیل زتا در pH برابر با ۷/۴، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و توان ۱۴۹ وات اندازه‌گیری شد (چن و همکاران ۲۰۱۵؛ امیری و همکاران ۲۰۱۸).

#### کارایی درون پوشانی

به منظور اندازه‌گیری بتاکاروتن آزاد شده باید اول منحنی جذب آن رسم شود. بدین منظور ۱۰ میلی‌گرم بتاکاروتن در در ۱ سی‌سی کلروفرم حل شد و سپس غلظت‌های مختلفی از آن (۰/۵، ۱، ۲/۵، ۵ و ۷/۵ ماکروگرم بر میلی‌لیتر) تهیه شد. سپس شدت جذب هر کدام از غلظت‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر ماورای بنفش- مرئی در طول موج ۴۵۰ نانومتر

را در ۲ سی‌سی آب مقطر روی گرم‌کن دارای همزن مغناطیسی حل شد و سپس ۱۵ سی‌سی اتانول به آن اضافه شد تا به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۵۰ دور بر دقیقه هم‌زده شود تا بصورت هیدارته درآید. در این مدت با فویل آلومینیومی درپوش بشر پوشاند شد تا اتانول تبخیر نشود. در گام دوم غلظت‌های مختلف کلاسترول (۳۰، ۲۰، ۱۰ و ۰ میلی‌گرم) به ترکیب قبلی اضافه شد و دوباره درپوش بشر را بسته و همزدن به مدت یک ساعت دیگر ادامه یافت. در گام سوم بتاکاروتن و هگزان (۰/۱ گرم در ۱ میلی‌لیتر هگزان) را در لوله آزمایش ریخته و توسط شیکر حل شد تا محلول یکدست و پرننگ و غلیظ بدست آید. سپس به میزان ۲۴۰ میکرولیتر (معادل ۲۴۰۰ میکروگرم بتاکاروتن) از محلول بدست آمده به مخلوط لستین-کلاسترول در فلاسک ته گرد ۵۰ ml اضافه شد. در گام چهارم حلال (الکل مطلق) در یک تبخیر کننده چرخشی در ۳۵°C تبخیر شد و یک لایه نازک تشکیل شد. در گام پنجم ۱۲ میلی‌لیتر آب مقطر استریل و دانک‌های شیشه‌ای برای کمک به هیدراته شدن لیپیدها در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به تبخیر کننده چرخشی اضافه شد. در انتهای گام پنجم لیپوزوم‌های مولتی لاملار میکرومتری تولید شدند.

#### کاهش سایز لیپوزوم

در ادامه فرایندهای انجام گرفته جهت کاهش سایز لیپوزوم‌ها تشریح می‌گردد. در گام اول نمونه‌ها در هموژنایزر با سرعت ۲۰۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای بالای انتقال فاز لیپوزوم‌ها همگن‌سازی شدند. در ادامه مخلوط لیپوزومی به داخل حمام یخ (به منظور اجتناب از اعمال انرژی مازاد به داخل محلول و پیش‌گیری از هیدرولیز و اکسیداسیون لیپید) و سونیکاتور پروب منتقل شد و ۱۰ سیکل ۱ دقیقه‌ای با ۱ دقیقه استراحت ما بین سیکل‌ها به مخلوط اعمال شد؛ در این مرحله نانو لیپوزوم‌های یونی لاملار تولید شد.

#### تعیین اندازه و توزیع اندازه ذرات

برای اندازه‌گیری اندازه ذرات از آزمون پراکندگی نور دینامیکی (DLS) استفاده شد. این روش به برهمکنش نور با ذره بستگی دارد. نور پراکنده شده بوسیله نانوذرات موجود در سوسپانسیون با زمان تغییر می‌کند که می‌تواند به قطر ذره ارتباط داده شود.



1) غلظت بتاکاروتن در مایع‌رویی و  $V$  (mL) حجم کل امولسیون است.

#### آنالیز طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه

با استفاده از آزمون FTIR می‌توان وجود یا عدم وجود و یا تغییر میزان یک پیوند را در ماده مورد بررسی مشخص کرد (سرابندی و همکاران ۲۰۱۹). برای ارزیابی نمونه‌های نانولیپوزوم حاوی بتاکاروتن ابتدا نمونه‌ها رو بصورت پودر درآورده و سپس مقدار کمی از پودر مورد نظر را با نسبت ۱ به ۱۰۰ با پودر نمک پتاسیم برمید (KBr) در هاون مخصوص مخلوط کردیم. سپس مخلوط حاصله را درون قالبی مخصوص ریخته و آن را تحت خلا نسبی (برای خارج کردن هوا) قرار داده شد و با استفاده از یک پرس با فشار ۶۰ کیلوپاسکال و به مدت ۱۰ دقیقه، پودرها به شکل قرصی با ابعاد مشخص تبدیل گردید. به دلیل عدم جذب نور مادون قرمز وسط پودر KBr، از این ماده برای آماده سازی نمونه پودری استفاده شد. طیف-سنجی توسط دستگاه (Spectrum Two, Perkin Elm) در محدوده طول‌موج  $4000-400 \text{ cm}^{-1}$  و با قدرت تفکیک ۰/۵  $\text{cm}^{-1}$  مورد آنالیز قرار گرفت.

**میکروسکوپ الکترونیکی روبشی انتشار میدانی (FE-SEM)** بمنظور بررسی ریزساختار نانولیپوزوم و تایید اندازه در مقیاس نانو (کوچکتر از ۱۰۰ نانومتر) در این تحقیق از میکروسکوپ الکترونیکی روبشی انتشار میدانی MIRA3 ساخت شرکت TESCAN کشور چک استفاده شد. برای آماده سازی یک قطره از نمونه لیپوزوم حاوی بتاکاروتن روی لام آزمایشگاهی ریخته می‌شود و در دمای محیط، تحت فشار خلا به مدت یکساعت خشک می‌شود. در نهایت نمونه با لایه‌ای از طلا توسط دستگاه اسپاترینگ پوشانده شد و با بزرگنمایی در محدوده ۵۰-۳۰ هزار برابر تصویربرداری انجام گرفت (سوری و همکاران ۲۰۲۱).

#### تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌های مستخرج از آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام پذیرفت و تفاوت میان تیمارها با یکدیگر، توسط آزمون آماری دانکن در سطح احتمال ۵ درصد، آنالیز واریانس

قرائت شد و منحنی استاندارد ترسیم شد (مینهاوردت-ولوبر و همکاران ۲۰۱۸). که در نهایت پس از رسم نمودار مورد نظر فرمول (۱) از آن استخراج گردید.

$$y = 0.0183 \times X \quad (1)$$

که در این رابطه:  $X$ : غلظت بتاکاروتن؛  $y$ : شدت جذب نور می‌باشند.

برای تعیین غلظت بتاکاروتن در ترکیبات مختلف لسیتین-کلسترول (۳۰-۳۰، ۴۰-۲۰، ۵۰-۱۰ و ۶۰-۰) ابتدا باید بتاکاروتن موجود در محلول را با استفاده از هگزان شستشو دهیم تا از کل محلول جدا شده و در قسمت بالایی جمع‌آوری گردد. بدین منظور ۱ میلی‌لیتر از محلول نانولیپوزوم حاوی بتاکاروتن را با ۱۰ میلی‌لیتر هگزان در سه مرحله شستشو دادیم. در ابتدا یکی میلی‌لیتر از محلول نانولیپوزوم رو در فالكون درب دار ریخته و سپس ۳ میلی‌لیتر هگزان به آن اضافه گردید. درب فالكون بسته شد، سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور قرار گرفت تا همزده شود. سپس برای جداسازی فاز آلی قسمت بالایی محلول که شفاف و نارنجی رنگ است در ظرفی درب دار ریخته و اطراف ظرف با فویل پوشانده شد؛ این عمل به علت حساسیت بتاکاروتن به نور و جلوگیری از تخریب آن انجام شد. سپس محلول هگزان باقیمانده در دو گام داخل فالكون ریخته شد و اعمال مرحله قبل تکرار گردید و در هر گام قسمت نارنجی از سایر محلول جدا شد و به مواد داخل ظرف فویل پیچ شده اضافه گردید. در انتها محصول جدا شده در دستگاه طیف‌سنج تحت طول موج ۴۵۰ نانومتر (طول موج جذب بتاکاروتن) قرار گرفت تا شدت جذب آن مشخص شده و با استفاده از رابطه (۱) غلظت بتاکاروتن محاسبه گردد. در نهایت کارایی درون‌پوشانی (EE) بتاکاروتن با استفاده از رابطه (۲) محاسبه گردید (لینو و همکاران ۲۰۲۰).

$$EE = \frac{W - C \times V}{W} \times 100 \quad (2)$$

که در این رابطه EE (درصد) کارایی درون‌پوشانی بتاکاروتن،  $W$  (mg) مقدار کل بتاکاروتن کپسوله شده و  $C$  (mg.mL<sup>-1</sup>)

یک‌طرفه (One-way ANOVA) ارزیابی شد. همچنین، تمامی آزمون‌ها در ۳ تکرار انجام گردید.

## نتایج و بحث

### تعیین اندازه، توزیع اندازه ذرات، پتانسیل زتا و بازده درون‌پوشانی

در شکل (۱) اثر تغییرات نسبت کسترول-لستین بر اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات، پتانسیل زتا نانولیپوزوم و بازده درون‌پوشانی بتاکاروتن نشان داده شده است. همانطور که در شکل (۱) مشخص است اضافه کردن نسبت پایین کسترول باعث کاهش اندازه و توزیع اندازه ذرات شده است؛ اما هرچه نسبت کسترول به لستین افزایش می‌یابد اندازه و توزیع اندازه ذرات افزایش یافته که نشان از کارایی پایین کسترول در تشکیل ذرات نانولیپوزومی است. پتانسیل زتا با افزایش نسبت کسترول به لستین افزایش یافته است. با اینحال پتانسیل زتای تمامی تیمارها بسیار بالاتر از محدوده مطلوب (محدوده مطلوب <math>30</math>) می‌باشد. همچنین اضافه کردن نسبت پایین کسترول باعث بهبود کارایی انکپسوله کردن بتاکاروتن شده است اما هرچه نسبت کسترول به لستین افزایش می‌یابد. کارایی انکپسوله کردن بتاکاروتن کاهش یافته که نشان از کارایی پایین کسترول در به دام انداختن بتاکاروتن است. نتایج این تحقیق نشان داد که روش هیدراسیون لایه نازک- سونیکاسیون، رویکرد مناسبی برای تولید نانولیپوزوم‌های حاوی بتاکاروتن است، بطوریکه کوچکترین و بزرگترین اندازه ذرات تولید شده در این تحقیق به ترتیب ۹۲/۶۶ و ۱۹۶/۶ نانومتر است که در محدوده مناسب ذرات نانو قرار دارند. احتمالاً طی فرایند تبدیل ساختارهای لایه‌ای به وزیکول‌ها، کسترول در میان حفره‌های مولکولی ایجاد شده، ساکن می‌شود. بنابراین تا حدی باعث افزایش معنی‌دار در اندازه‌ی وزیکول‌ها می‌گردد. با اینحال تأثیر کسترول بر اندازه ذرات تا حد زیادی به فرایند تولید و گونه فسفولیپید استفاده شده، وابسته است. با توجه به این واقعیت افزایش سایز نانولیپوزوم‌ها رو نمی‌توان بطور قطع به افزایش نسبت کسترول به لستین نسبت داد (موتالیک و همکاران ۲۰۱۴؛ پزشکی و همکاران ۲۰۱۶). نتایج تحقیقات

گذشته نشان می‌دهد که روند یکسانی در مورد اثر کسترول بر اندازه ذرات لیپوزومی وجود ندارد. در تحقیقی از نسبت‌های ترکیبی کسترول-لستین برای ساخت نانولیپوزوم‌های حاوی بتاکاروتن استفاده شد که نتایج نشان داد افزایش نسبت کسترول به لستین تأثیری در اندازه ذرات ندارد (پزشکی و همکاران ۲۰۱۶). از سوی دیگر در تحقیقی افزایش نسبت کسترول به لستین در ساخت نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین C باعث شد که اندازه ذرات افزایش یابد (لیو و پارک ۲۰۱۰). همچنین در تحقیقی از نسبت‌های ترکیبی کسترول-لستین برای میکرودرنپوشانی گاما-اوریزانول استفاده شد، نتایج این تحقیق نشان داد که افزایش کسترول نسبت به لستین باعث کاهش اندازه ذرات می‌شود (ویریاروجی ۲۰۰۹). بنابراین بنظر می‌رسد که افزودن کسترول به ترکیبات لیپوزومی تأثیر چندانی بر اندازه ذرات ندارد و بیشتر روش تولید لیپوزوم بر اندازه ذرات تشکیل شده تأثیر گذار است. همچنین، احتمالاً افزودن کسترول بیشتر بر پایداری فیزیکی (پایداری اندازه ذرات در طول زمان) تأثیر گذار است که در ادامه به بررسی آن پرداخته می‌شود.

استفاده از کسترول در ساختار نانولیپوزوم دارای تأثیراتی می‌باشد که از آن جمله می‌توان به ارتقا پایداری، تقلیل نفوذپذیری و کاستن میزان درونپوشانی به علت فشرده‌ترسازی ساختار لیپوزوم اشاره کرد. ضخیم و محکم شدن غشا توسط کسترول تا حد زیادی می‌تواند موجب ممانعت از باز شدن غشای لیپوزومی و متعاقباً استقرار کمتر مواد فعال آگریز در آن شود (وینکیلسون و کیسلوالی ۲۰۰۵). همچنین، ممکن است وجود کسترول در غشای لیپوزومی، از نزدیکی و مجاورت ویتامین A پالمیتات (بتاکاروتن) با غشای لیپوزومی بکاهد، که در نتیجه این عوامل باعث می‌شوند افزایش بیش از حد نسبت کسترول به لستین تأثیر منفی بر کارایی درون‌پوشانی بتاکاروتن با استفاده از نانولیپوزوم داشته باشد (راملی و همکاران ۲۰۲۱). کارایی بالای درونپوشانی در مقادیر کم کسترول را می‌توان به بهبود پایداری غشای لیپوزومی به دلیل تأثیر کسترول بر تقلیل سیالیت غشا نسبت داد و کارایی پایین در نسبت‌های بیشتر کسترول به لستین را به گسیختگی غشای لیپوزومی

بزرگتر شده است بطوریکه در روز ۶۰ اندازه ذرات چهار برابر روز اول است. در حالیکه برای غلظت ۱۰-۵۰ لستین - کلسترول تغییر معنی‌داری در اندازه ذرات در بازه زمانی ۶۰ روز دیده نشد که نشان دهنده تاثیر کلسترول بر پایداری اندازه ذرات نانولیپوزوم در گذر زمان است.

در مقادیر زیاد کلسترول نسبت داد (فان و همکاران ۲۰۰۸). با توجه به این که پتانسیل زتای تمام تیمارها در محدوده مطلوب قرار دارد بر اساس اندازه ذرات و بازه درون‌پوشانی دو تیمار با نسبت لستین-کلسترول ۱۰-۵۰ و ۶۰-۰ به‌عنوان تیمارهای بهینه انتخاب شدند و پایداری آن در ۶۰ روز بررسی شد.

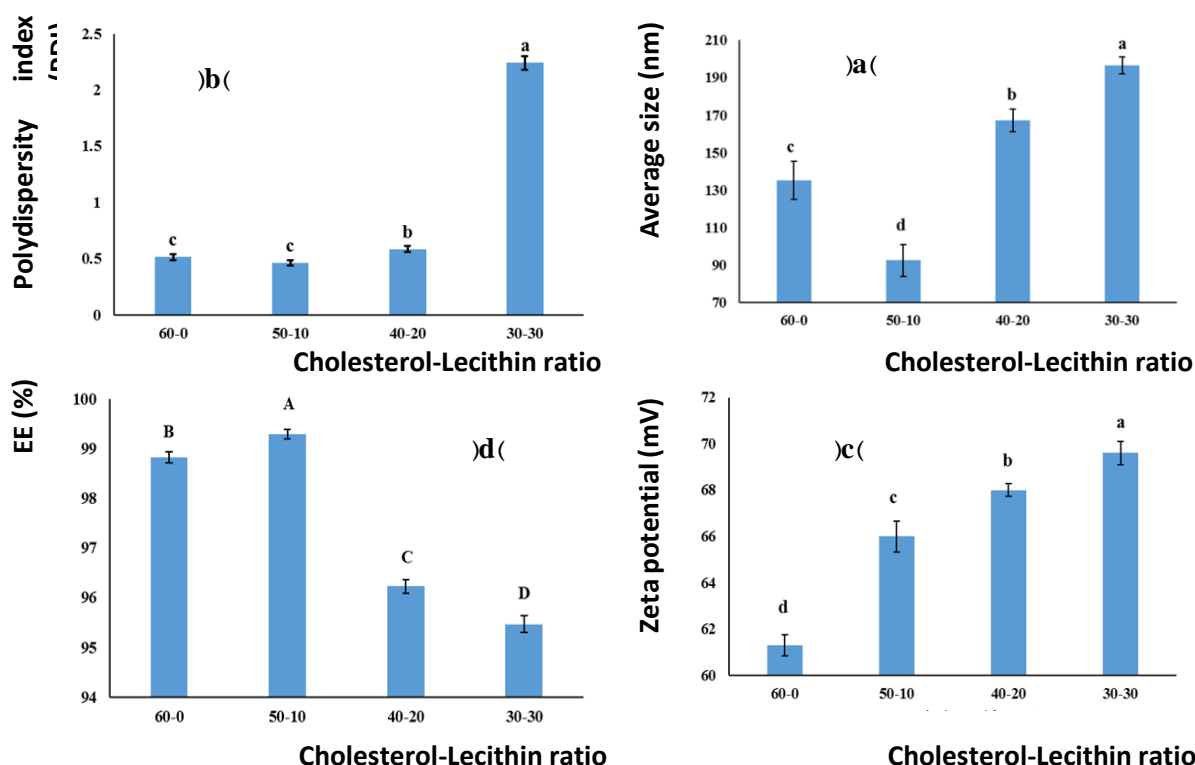


Figure 1- Changes: a) particle size, b) particle size distribution, c) zeta potential and d) beta-carotene encapsulation efficiency based on changes in cholesterol-lecithin ratio

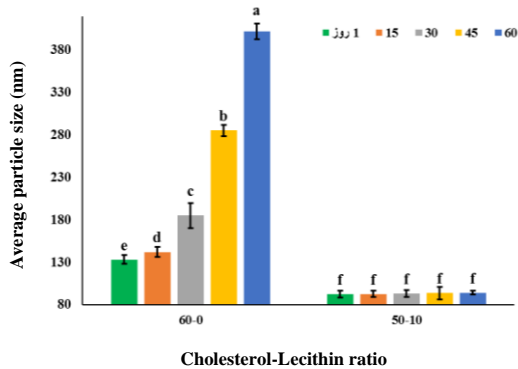
نانولیپوزوم‌ها به علت اختلاف ناچیز دانسیته آن‌ها با فاز پیوسته، درگیر پدیده ته‌نشینی و شناوری نمی‌گردند (تفکیک گرانشی در آن‌ها رخ نمی‌دهد) و حرکات براونی، باعث معلق ماندن لیپوزوم‌ها می‌گردد. در مقابل، انبوهش (فلوکولاسیون<sup>۳</sup>) و سپس درهم‌آمیختگی علت‌های اصلی ناپایداری و افزایش اندازه ذرات

پایداری اندازه ذرات در گذر زمان

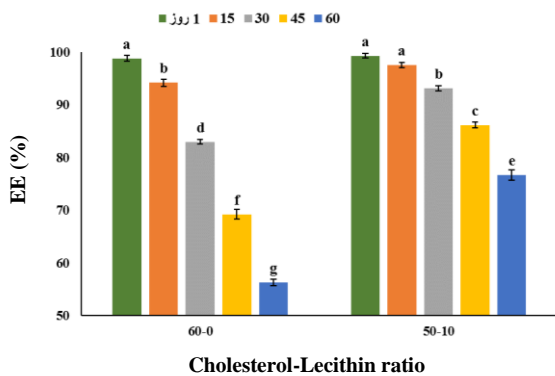
شکل (۲) اندازه ذرات نانولیپوزوم‌های حاوی بتاکاروتن برای غلظت‌های ۱۰-۵۰ و ۶۰-۰ لستین-کلسترول را در بازه زمانی دو ماهه نشان می‌دهد. همانطور که از شکل (۲) مشخص است برای غلظت ۶۰-۰ لستین-کلسترول بین روزهای مختلف تفاوت معنی‌داری وجود دارد و با گذشت زمان اندازه ذرات

<sup>3</sup> Flocculation

کلسترول سیالیت و تحرک زنجیره‌های آسیل را محدود می‌سازد (لیانگ و همکاران ۲۰۰۴). در تحقیقات زیادی ذکر شده است که افزودن کلسترول در ترکیب مواد سازنده لیپوزوم برای درونپوشانی مواد آنگیریز در نسبت‌های پایین باعث پایداری فیزیکی ذرات نانولیپوزوم‌ها شده اما با افزایش نسبت کلسترول به لستین روند متضادی ایجاد شده است (پزشکی و همکاران ۲۰۱۶؛ بشیری و همکاران ۲۰۱۶؛ هودیانتی و همکاران ۲۰۱۸).



**Figure 2- Effect of storage time on encapsulation efficiency in ratios of 50-10 and 60-0 lecithin to cholesterol of nanoliposomes containing beta-carotene**



**Figure 3- Effect of storage time on encapsulation efficiency in concentrations of 10-50 and 0-60 lecithin to cholesterol of nanoliposomes containing beta-carotene.**

پایداری بازده درون‌پوشانی در گذر زمان

شکل ۳ بازده درون‌پوشانی نانولیپوزوم‌های حاوی بتاکاروتن برای غلظت‌های ۵۰-۱۰ و ۶۰-۰ لستین-کلسترول را در بازه

هستند. بنابراین مهمترین فرایندی که موجب ناپایداری سیستم- های کلوییدی می‌گردد، انبوهش ذرات در طول دوره ننگه داری است (پزشکی و همکاران ۲۰۱۶). نیروهای جذبی بین ذرات موجب چسبیدگی ذرات به یکدیگر شده و در نهایت ساختارهای بزرگتری تشکیل می‌شود و اگر فرایندهای تهنشینی و شناور شدن ذرات نانولیپوزومی در زمان نگهداری سیستم لیپوزومی اتفاق بیفتد، نشانگر توده‌ای شدن ذرات است. در دمای محیط، لیپوزوم‌ها به علت سیالیت بالای غشا دچار تغییر شکل شده و لخته تشکیل می‌دهند که منجر به افزایش اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات گسترده و ناهمگون می‌شوند (امیری و همکاران ۲۰۱۸). در رابطه با اثر کلسترول بر پایداری ذرات می‌توان چنین گفت که کلسترول در مقادیر بهینه با افزایش سفتی غشا و ارتقا پتانسیل زتا، باعث افزایش دفعه الکترواستاتیک بین ذرات می‌شود و از فرایند به هم‌آمیختگی ذرات ممانعت می‌کند و باعث بهبود پایداری انداز ذرات می- گردد و در مقادیر بالاتر احتمالاً موجب گسیختگی غشا می‌شود (بنگ و همکاران ۲۰۱۱). گروه هیدروکسیل مستقر در سر کلسترول در هم‌نشینی گروه‌های کربونیل استرلییدی واقع شده و حلقه آنگریز کلسترول، موازی با زنجیره‌های آسیل لستین جهت‌گیری می‌کند. افزایش کلسترول منجر به سفت‌تر شدن ساختار و کم‌شدن سیالیت غشا و کاهش توده‌ای شدن وزیکول‌ها می‌گردد (تسنگ و همکاران ۲۰۰۷). هرچه پیوندهای هیدروژنی مابین گروه هیدروکسیل کلسترول و گروه کربونیل فسفولیپید بیشتر شود، پایداری دو لایه‌ای لیپیدی بهبود خواهد یافت. در فاز ژلی، اضافه کردن کلسترول موجب تحرک بیشتر زنجیره‌های آسیل شده و منجر به سیالیت راحت‌تر غشای لیپوزومی می‌گردد و با تضعیف پیوندهای واندروالس بین زنجیره‌های هیدروکربنی اسیده‌های چرب از کریستالیزاسیون لیپوزوم جلوگیری می‌کند. درحالی‌که در فاز مایع افزودن

بررسی بارگذاری بتاکاروتن در نانولیپوزوم با استفاده از

#### FTIR

آزمون FTIR روش مطلوبی جهت تعیین و تفکیک ترکیبات آلی و گروه‌های عاملی موجود در مواد می‌باشد. اصول شناسایی گروه‌های عاملی در این آزمون به صورت کیفی است، بطوریکه با اندازه‌گیری و ثبت شدت جذب در پیک‌های منحنی (طول موج-شدت جذب) امکان شناسایی ترکیبات و بر همکنشهای آنها وجود دارد. بر اساس این اصل که گروه‌های عاملی شدت جذب مشخصی در فرکانس‌های مشخص دارند، چنانچه در ساختار ترکیبات تغییراتی رخ دهد طول‌موج‌های دارای پیک و شدت جذب در آنها تغییر خواهد کرد. در شکل ۴ طیف جذب مادون قرمز ترکیبات تشکیل دهنده نانولیپوزوم بتا کاروتن رسم شده است. در ساختار لسیتین، گروه‌های عاملی آلکان‌ها و متیل به صورت کششی وجود دارند که در محدوده طول موج  $3000-2800\text{ cm}^{-1}$  قابل مشاهده هستند. همچنین گروه عاملی آمین در محدوده  $3500-3300\text{ cm}^{-1}$  قابل مشاهده است. همچنین طول موج  $1459\text{ cm}^{-1}$  مربوط به  $\text{CH}_2$  می‌باشد و محدوده طول موج  $1300-1100\text{ cm}^{-1}$  مربوط به گروه فسفات ( $\text{PO}_2$ ) است. در نهایت طول موج  $1735\text{ cm}^{-1}$  مربوط به گروه استری می‌باشد (کولیگوسکی و همکاران ۲۰۰۸؛ پزشکی و همکاران ۲۰۱۶). در ساختار کلسترول، گروه‌های عاملی هیدروکسیل به صورت کششی وجود دارند که در طول موج  $3403\text{ cm}^{-1}$  قابل مشاهده هستند. همچنین گروه عاملی متیلی آزاد در محدوده  $3100-2700\text{ cm}^{-1}$  قابل مشاهده است. همچنین طول موج  $1462\text{ cm}^{-1}$  مربوط به گروه آلکنی می‌باشد و محدود طول موج  $1100-940\text{ cm}^{-1}$  مربوط به گروه آلکیل (حلقه مرکزی کلسترول) می‌باشد (گوپتا و همکاران ۲۰۱۴؛ پزشکی و همکاران ۲۰۱۶). در ساختار بتاکاروتن، گروه‌های عاملی آلکان به صورت کششی وجود دارند که در طول موج-های  $966$  و  $2855\text{ cm}^{-1}$  قابل مشاهده هستند. همچنین گروه-های آروماتیک در طول موج‌های  $1562$  و  $1764\text{ cm}^{-1}$  قابل مشاهده است. همچنین، طول موج  $1366\text{ cm}^{-1}$  مربوط به گروه  $\text{CH}_2$  می‌باشد و طول موج  $1462\text{ cm}^{-1}$  مربوط به گروه  $\text{CH}_3$  می‌باشد (نوگاچی و همکاران ۱۹۹۴؛ موه و همکاران ۱۹۹۹؛

زمانی دو ماهه نشان می‌دهد. همانطور که از شکل ۳ مشخص است شیب تغییرات بازده درون‌پوشانی نسبت به زمان، برای غلظت ۶۰-۰ لسیتین-کلسترول شدیدتر از غلظت ۵۰-۱۰ لسیتین-کلسترول است؛ بطوریکه بازده درون‌پوشانی غلظت ۶۰-۰ در روز ۴۵ (۶۹/۲) کمتر از بازده درون‌پوشانی غلظت ۵۰-۱۰ در روز ۴۵ (۸۶/۱۶) و ۶۰ (۷۶/۷) است. نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از کلسترول در ساختار نانولیپوزوم باعث پایداری بهتر نانولیپوزوم در گذر زمان خواهد شد. مقدار و نرخ خروج ماده فعال هسته‌ای به فرمولاسیون لیپید و ترکیب فعال وابسته است. در صورتی که ماده فعال تمایل شدیدی به فرار از ساختار غشای لیپوزومی داشته باشد بهبود ساختار غشا دولایه‌ای و افزایش استحکام آن منجر به حفظ مواد فعال در لیپوزوم‌ها می‌گردد (مظفری ۲۰۰۴). در تحقیق حاضر به منظور کاهش سیالیت غشای لیپوزومی از کلسترول استفاده گردید. وزیکول‌های فسفاتیدیل کولین با اضافه شدن کلسترول به دلیل ایجاد پیوند با گروه کولین فسفولیپید و پرکردن فضاهای شکل گرفته توسط زنجیره‌های آسیل فسفاتیدیل کولین ساختار سفت‌تری بدست خواهند آورد و پایداری آنها در مقابل تنش‌های برشی افزایش خواهد یافت. از سوی دیگر اضافه شدن کلسترول به فرمولاسیون لیپوزوم‌ها باعث تقویت ماندگاری ماده کپسوله‌شده می‌شود و به عبارت دیگر اضافه شدن کلسترول به ساختار لیپوزوم منجر به کاهش نفوذپذیری غشای لیپوزومی می‌گردد (هولشه و همکاران ۲۰۱۸؛ وو و همکاران ۲۰۲۲). دلیل دیگری که باعث افزایش پایداری ماده فعال طی مدت نگهداری می‌شود، ماهیت لیپوفیلی ماده فعال (بتاکاروتن) و استقرار آن در دولایه فسفولیپیدی می‌باشد. بنابراین، زنجیره‌های آسیل فسفولیپید محیط مطلوبی برای بتاکاروتن تامین می‌کنند، بطوریکه از اکسیداسیون و تجزیه هیدرولیکی آن جلوگیری خواهد شد. همچنین همان‌طور که در منابع مختلف ذکر شده است زمانی که ماده آبریز در دولایه فسفولیپیدی مستقر می‌شود، تعدادی از ویژگی‌های لیپوزوم مانند پایداری تحت تاثیر مثبت قرار می‌گیرند؛ بنابراین تا حد زیادی می‌توان پایداری ساختار لیپوزوم حاوی بتاکاروتن در طی دوره نگهداری را به عوامل ذکر شده نسبت داد (لیو و همکاران ۲۰۲۰).

داده شود و تایید کننده بارگذاری موفقیت‌آمیز بتاکاروتن در نانولیپوزوم باشد (شکل ۴).

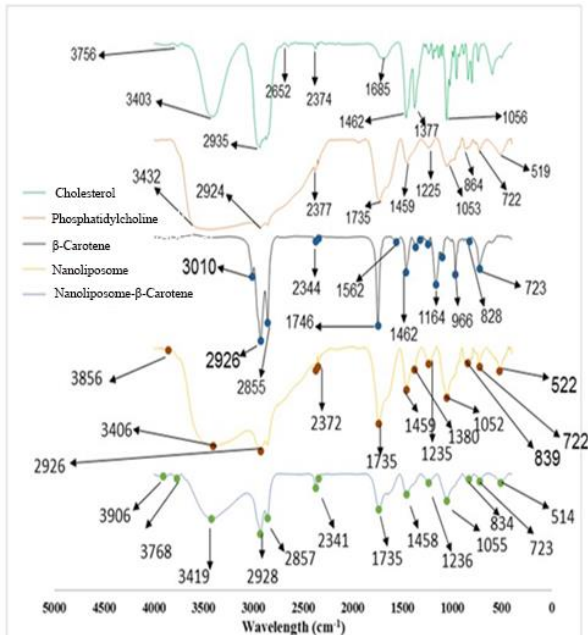
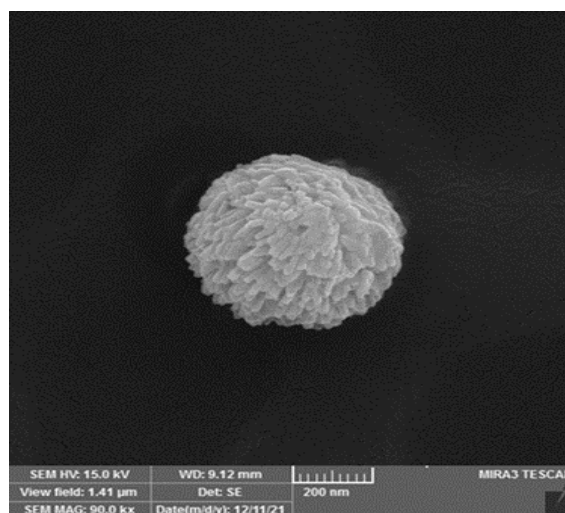


Figure 4- FTIR spectrum of beta-carotene nanoliposome components

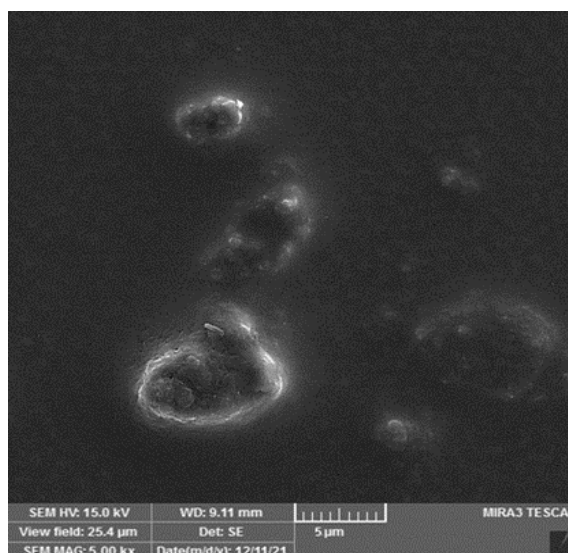
#### بررسی مورفولوژی نانولیپوزوم با میکروسکوپ الکترونیکی روبشی انتشار میدانی (FE-SEM)

مورفولوژی نانولیپوزوم‌های بارگیری شده با بتاکاروتن با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (FE-SEM) در شکل ۵ نشان داده شده است. همانگونه که در تصویر مشخص است ذرات دارای ساختاری تقریباً کروی و از نظر اندازه حدوداً ۳۰۰ نانومتر بودند که نتایج مربوط به اندازه‌گیری ذرات با روش پراکندگی نورپویا (DLS) را تایید نمود. در حالت تجمعی (شکل ۶)، اندازه توده‌های تشکیل یافته بین ۱/۵ تا ۶ میکرومتر متغیر بود و آرایش نانوذرات یک شبکه با ظاهری متخلخل و تقریباً کروی را تشکیل داده‌اند. نتایج این تحقیق نشان داد که اعمال فرایند فراصوت باعث تولید ذراتی در مقیاس نانو شد. در سایر تحقیقات نیز ذکر شده است که می‌توان با اعمال فرایند فراصوت ذراتی در محدوده نانو تولید کرد (کولاس و همکاران ۲۰۰۸؛ پزشکی و همکاران ۲۰۱۶).

دندادو و همکاران ۲۰۰۹؛ کائور و همکاران ۲۰۱۶). با مقایسه نمودارهای مربوط به نانولیپوزوم خالی و نانولیپوزوم بتاکاروتن به بررسی تغییرات در پیک‌های جذبی و احتمال تشکیل پیوندهای جدید می‌پردازیم. با بررسی نمودار نانولیپوزوم خالی مشخص است که در این منحنی نشانی از پیک‌های مربوط به بتاکاروتن وجود ندارد و روند پیک‌های موجود در آن تا حد زیادی مشابه پیک‌های منحنی‌های لستین و کسترویل می‌باشد. با بررسی دقیق منحنی نانولیپوزوم بتاکاروتن می‌توان پیک‌های مشخصی را شناسایی کرد که مشخصه وجود بتاکاروتن در ساختار نانولیپوزوم هست. پیک‌های موجود در محدوده ۳۰۰۰-۲۸۰۰  $\text{cm}^{-1}$  بیانگر وجود گروه آلکان در ساختار نانولیپوزوم می‌باشد؛ همچنین پیک موجود در طول موج ۱۷۳۵  $\text{cm}^{-1}$  بیانگر وجود گروه‌های آروماتیک می‌باشد؛ همچنین، می‌توان به پیک موجود در طول موج ۱۴۵۸  $\text{cm}^{-1}$  اشاره کرد که بیانگر وجود گروه  $\text{CH}_3$  در ساختار نانولیپوزوم می‌باشد که هر سه این گروه‌ها از مشخصه‌های ساختاری بتاکاروتن هستند. در مقایسه بتاکاروتن و نانولیپوزوم خالی با نانولیپوزوم بتاکاروتن می‌توان به افزایش شدت پیک‌های موجود در طول موج‌های ۳۴۰۶، ۲۹۲۶ و ۲۸۵۷  $\text{cm}^{-1}$  اشاره کرد که می‌توان افزایش شدت جذب در این طول موج‌ها را ناشی از حضور بتاکاروتن در لیپوزوم و ایجاد پیوندهای جدید نسبت داد. همچنین در محدوده طول موج ۳۷۵۰-۳۹۲۰  $\text{cm}^{-1}$  شاهد ایجاد دو پیک عمیق در نانولیپوزوم بتاکاروتن هستیم که چنین پیک‌هایی در بتاکاروتن و نانولیپوزوم خالی وجود نداشت. در مقایسه نانولیپوزوم بتاکاروتن با بتاکاروتن و نانولیپوزوم خالی می‌توان به حذف پیک در طول موج ۱۳۵۰  $\text{cm}^{-1}$  اشاره کرد. تغییرات ایجاد شده در ظهور، حذف، جابجایی و شدت پیک‌های جذبی در نمودار شدت جذب نانولیپوزوم بتاکاروتن در مقایسه با نمودار بتاکاروتن و نانولیپوزوم خالی می‌تواند به برهمکنش‌های بین مواد دیواره‌ای نانولیپوزوم و ماده هسته (بتاکاروتن) نسبت



**Figure 5-** Electron microscope image of nanoliposome containing beta-carotene for ratio of cholesterol to lecithin of 10-50



**Figure 6-** Electron microscope image of nanoliposome particles in an aggregated state

### نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که کارایی کلوسترول در ساختار نانولیپوزوم در گذر زمان مشخص می‌شود، زیرا نانولیپوزوم‌های حاوی کلوسترول نسبت به نانولیپوزوم لسیتین خالی بعد از گذشت ۶۰ روز اندازه ذراتشان تغییر نکرده و نیز بازده درون-پوشانی بالاتری داشتند. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که ترکیب روش‌های هیدراسیون لایه نازک و سونیکاسیون، رویکرد مناسبی برای تولید لیپوزوم حاوی بتاکاروتن در مقیاس نانو با توزیع اندازه ذرات یکنواخت می‌باشد.

نتایج این تحقیق نشان داد که اضافه کردن درصد پایینی از کلوسترول به نانولیپوزوم‌های مبتنی بر لسیتین باعث بهبود اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات و کارایی درون‌پوشانی می‌شود. با افزایش بیشتر غلظت کلوسترول نسبت به لسیتین خواص مذکور از حالت مطلوب خارج می‌شوند که بیانگر این نکته هست که ساختار اصلی نانولیپوزوم نباید زیاد دچار تغییر شود. همچنین

## References

- Alavi M, Rai M, Varma RS, Hamidi M and Mozafari MR, 2022. Conventional and novel methods for the preparation of micro and nanoliposomes. *Micro Nano Bio Aspects* 1(1): 18-29.
- Amiri S, Ghanbarzadeh B, Hamishehkar H, Hosein M, Babazadeh A and Adun P, 2018. Vitamin E loaded nanoliposomes: effects of gammaoryzanol, polyethylene glycol and lauric acid on physicochemical properties. *Colloid and Interface Science Communications* 26: 1-6.
- Asadi M, and Ahmadi E, 2021. Investigation of the Influence of Packaging Film Type and Indoor Atmosphere on the Characteristics of Sangak Bread Enriched with Carrot Powder. *Journal of Food Research*, 31(3), pp.23-37.
- Bang SH, Hwang IC, Yu YM, Kwon HR, Kim DH and Park HJ, 2011. Influence of chitosan coating on the liposomal surface on physicochemical properties and the release profile of nanocarrier systems. *Journal of Microencapsulation* 28(7): 595-604.
- Bashiri S, Ghanbarzadeh B, Hamishekar H and Dehghannya J, 2016. BetaCarotene loaded nanoliposome: effects of gama-oryzanol on particle size stability and encapsulation. *Research and Innovation in Food Science and Technology* 4(4): 365-382.
- Chen QH, Wu BK, Pan D, Sang LX and Chang B, 2021. Beta-carotene and its protective effect on gastric cancer. *World Journal of Clinical Cases* 9(23): 6591-6607.
- Chen X, Zou LQ, Niu J, Liu W, Peng SF and Liu CM, 2015. The stability, sustained release and cellular antioxidant activity of curcumin nanoliposomes. *Molecules* 20(8): 14293-14311.
- Colas JC, Shi W, Rao VM, Omri A, Mozafari MR and Singh H, 2007. Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by Mozafari method and their bacterial targeting. *Micron* 38(8): 841-847.
- Dai Y, and Row KH, 2019. Isolation and determination of beta-carotene in carrots by magnetic chitosan beta-cyclodextrin extraction and high-performance liquid chromatography (HPLC). *Analytical Letters* 52(11): 1828-1843.
- Damari SP, Shamrakov D, Varenik M, Koren E, Nativ-Roth E, Barenholz Y and Regev O, 2018. Practical aspects in size and morphology characterization of drug-loaded nano-liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 547(1-2): 648-655.
- de Andrade Lima M, Charalampopoulos D and Chatzifragkou A, 2018. Optimisation and modelling of supercritical CO<sub>2</sub> extraction process of carotenoids from carrot peels. *The Journal of supercritical fluids* 133: 94-102.
- De Leo V, Milano F, Agostiano A and Catucci L, 2021. Recent advancements in polymer/liposome assembly for drug delivery: From surface modifications to hybrid vesicles. *Polymers* 13(7): 10-27.
- De Nardo T, Shiroma-Kian C, Halim Y, Francis D and Rodriguez-Saona LE, 2009. Rapid and simultaneous determination of lycopene and  $\beta$ -carotene contents in tomato juice by infrared spectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry* 57(4): 1105-1112.
- Elkholy NS, Shafaa MW, Mohammed HS. 2020. Biophysical characterization of lutein or beta carotene-loaded cationic liposomes. *RSC advances* 10(54):32409-22.
- Fakhravar Z, Ebrahimnejad P, Daraee H and Akbarzadeh A, 2016. Nanoliposomes: Synthesis methods and applications in cosmetics. *Journal of cosmetic and laser therapy* 18(3): 174-181.
- Fan M, Xu S, Xia S and Zhang X, 2008. Preparation of salidroside nano-liposomes by ethanol injection method and in vitro release study. *European food research and technology* 227(1): 167-174.
- Farzaneh H, Nik ME, Mashreghi M, Saberi Z, Jaafari MR and Teymouri M, 2018. A study on the role of cholesterol and phosphatidylcholine in various features of liposomal doxorubicin: From liposomal preparation to therapy. *International journal of pharmaceutics* 551(1-2): 300-308.
- Ghanbarzadeh, S., & Arami, S. (2013). Enhanced transdermal delivery of diclofenac sodium via conventional liposomes, ethosomes, and transfersomes. *BioMed research international* 2013:1-7.
- Gupta U, Singh VK, Kumar V and Khajuria Y, 2014. Spectroscopic studies of cholesterol: fourier transform infra-red and vibrational frequency analysis. *Materials Focus* 3(3): 211-217.



- Hamadou AH, Huang WC, Xue C and Mao X, 2020. Comparison of  $\beta$ -carotene loaded marine and egg phospholipids nanoliposomes. *Journal of Food Engineering* 283: 1-9.
- Has C and Sunthar P, 2020. A comprehensive review on recent preparation techniques of liposomes. *Journal of liposome research*, 30(4): 336-365.
- Holzschuh S, Kaeß K, Bossa GV, Decker C, Fahr A and May S, 2018. Investigations of the influence of liposome composition on vesicle stability and drug transfer in human plasma: a transfer study. *Journal of Liposome Research* 28(1): 22-34.
- Hudiyanti D, Aminah S, Hikmahwati Y and Siahaan P, 2019, April. Cholesterol implications on coconut liposomes encapsulation of beta-carotene and vitamin C. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 509, No. 1, p. 012037). IOP Publishing.
- Hudiyanti D, Fawrin H and Siahaan P, 2018, April. Simultant encapsulation of vitamin C and beta-carotene in sesame (*Sesamum indicum* L.) liposomes. In *IOP conference series: materials science and engineering* (Vol. 349, No. 1, p. 012014). IOP Publishing.
- Ito K, Hamamichi S, Asano M, Hori Y, Matsui J, Iwata M and Fujii H, 2016. Radiolabeled liposome imaging determines an indication for liposomal anticancer agent in ovarian cancer mouse xenograft models. *Cancer science* 107(1): 60-67.
- Jalali-Jivan M, Abbasi S and Scanlon MG, 2019. Microemulsion as nanoreactor for lutein extraction: Optimization for ultrasound pretreatment. *Journal of food biochemistry* 43(8): e12929.
- Jung SW, Thamphiwatana S, Zhang L and Obonyo M, 2015. Mechanism of antibacterial activity of liposomal linolenic acid against *Helicobacter pylori*. *PloS one* 10(3): 1-13.
- Kaur M, Bawa M and Singh M, 2016.  $\beta$ -Carotene- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex: Towards enhanced aqueous solubility. *Journal of Global Biosciences* 5(2): 3665-3675.
- Khan AA, Allemailem KS, Almatroodi SA, Almatroudi A and Rahmani AH, 2020. Recent strategies towards the surface modification of liposomes: an innovative approach for different clinical applications. *3 Biotech*, 10(4): 1-15.
- Ko S and Lee SC, 2010. Effect of nanoliposomes on the stabilization of incorporated retinol. *African Journal of Biotechnology* 9(37): 6158-6161.
- Kuligowski J, Quintás G, Garrigues S and De la Guardia M, 2008. Determination of lecithin and soybean oil in dietary supplements using partial least squares–Fourier transform infrared spectroscopy. *Talanta* 77(1): 229-234.
- Liang X, Mao G and Ng KS, 2004. Mechanical properties and stability measurement of cholesterol-containing liposome on mica by atomic force microscopy. *Journal of colloid and interface science* 278(1): 53-62.
- Lino RC, Carvalho SMD, Noronha CM, Sganzerla WG, Rosa CGD, Nunes MR and Barreto PLM, 2020. Development and characterization of poly- $\epsilon$ -caprolactone nanocapsules containing  $\beta$ -carotene using the nanoprecipitation method and optimized by response surface methodology. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 63:1-15.
- Liu G, Hou S, Tong P and Li J, 2022. Liposomes: preparation, characteristics, and application strategies in analytical chemistry. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 52(2): 392-412.
- Liu N and Park, HJ, 2010. Factors effect on the loading efficiency of Vitamin C loaded chitosan-coated nanoliposomes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 76(1): 16-19.
- Liu X, Wang P, Zou YX, Luo ZG and Tamer TM, 2020. Co-encapsulation of Vitamin C and  $\beta$ -Carotene in liposomes: Storage stability, antioxidant activity, and in vitro gastrointestinal digestion. *Food Research International* 136: 1-8.
- Maja L, Željko K and Mateja P, 2020. Sustainable technologies for liposome preparation. *The Journal of Supercritical Fluids* 165: 1-17.
- Maurya VK, Shakya A, Aggarwal M, Gothandam KM, Bohn T and Pareek S, 2021. Fate of  $\beta$ -carotene within loaded delivery systems in food: state of knowledge. *Antioxidants* 10(3): 1-52.
- Maurya VK, Singh J, Ranjan, V, Gothandam KM, Bohn T and Pareek S, 2020. Factors affecting the fate of  $\beta$ -carotene in the human gastrointestinal tract: A narrative. *Int J Vitam Nutr Res* 1:1-21.

- Meinhardt-Wollweber M, Suhr C, Kniggendorf AK and Roth B, 2018. Absorption and resonance Raman characteristics of  $\beta$ -carotene in water-ethanol mixtures, emulsion and hydrogel. *AIP Advances* 8(5): 1-15.
- Moh MH, Man YB, Badlishah BS, Jinap S, Saad MS and Abdullah WJW, 1999. Quantitative analysis of palm carotene using Fourier transform infrared and near infrared spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 76(2): 249-254.
- Mozafari MR, 2004. Micro and nano carrier technologies: high quality production within pharmaceutical standards. *Cell. Mol. Biol. Lett* 9: 44-45.
- Mutalik S, Salian SR, Avadhani K, Menon J, Joshi H, Hegde AR, ... and Adiga SK, 2014. Liposome encapsulated soy lecithin and cholesterol can efficiently replace chicken egg yolk in human semen cryopreservation medium. *Systems biology in reproductive medicine* 60(3): 183-188.
- Noguchi T, Mitsuka T and Inoue Y, 1994. Fourier transform infrared spectrum of the radical cation of  $\beta$ -carotene photoinduced in photosystem II. *FEBS letters* 356(2-3): 179-182.
- Perez AP, Altube MJ, Schilrreff P, Apezteguia G, Celes FS, Zacchino S, ... and Morilla MJ, 2016. Topical amphotericin B in ultradeformable liposomes: Formulation, skin penetration study, antifungal and antileishmanial activity in vitro. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 139: 190-198.
- Petersen GH, Alzghari SK, Chee W, Sankari SS and La-Beck NM, 2016. Meta-analysis of clinical and preclinical studies comparing the anticancer efficacy of liposomal versus conventional non-liposomal doxorubicin. *Journal of controlled release* 232: 255-264.
- Pezeshky A, Ghanbarzadeh B, Hamishehkar H, Moghadam M and Babazadeh A, 2016. Vitamin A palmitate-bearing nanoliposomes: Preparation and characterization. *Food Bioscience* 13: 49-55.
- Ramli NA, Ali N, Hamzah S and Yatim NI, 2021. Physicochemical characteristics of liposome encapsulation of stingless bees' propolis. *Heliyon* 7(4): 1-7.
- Rehman A, Tong Q., Jafari SM, Assadpour E, Shehzad Q, Aadil RM, ... and Ashraf W, 2020. Carotenoid-loaded nanocarriers: A comprehensive review. *Advances in colloid and interface science*, 275: 1-70.
- Rehman AU, Omran Z, Anton H, Mély Y, Akram S, Vandamme TF and Anton N, 2018. Development of doxorubicin hydrochloride loaded pH-sensitive liposomes: Investigation on the impact of chemical nature of lipids and liposome composition on pH-sensitivity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 133: 331-338.
- Rocha F, Sugahara LY, Leimann FV, de Oliveira SM, da Silva Brum E, Calhelha RC, ... and Gonçalves OH, 2018. Nanodispersions of beta-carotene: effects on antioxidant enzymes and cytotoxic properties. *Food & function* 9(7): 3698-3706.
- Sarabandi K, Mahoonak AS, Hamishehkar H, Ghorbani M and Jafari SM, 2019. Protection of casein hydrolysates within nanoliposomes: Antioxidant and stability characterization. *Journal of Food Engineering* 251: 19-28.
- Sengupta P, Bose A and Sen K, 2021. Liposomal Encapsulation of Phenolic Compounds for Augmentation of Bio-Efficacy: A Review. *ChemistrySelect* 6(38): 10447-10463.
- Shah S, Dhawan V, Holm R, Nagarsenker MS and Perrie Y, 2020. Liposomes: Advancements and innovation in the manufacturing process. *Advanced Drug Delivery Reviews* 154: 102-122.
- Souri J, Almasi H, Hamishehkar H and Amjadi S, 2021. Sodium caseinate-coated and  $\beta$ -cyclodextrin/vitamin E inclusion complex-loaded nanoliposomes: A novel stabilized nanocarrier. *Lwt* 151: 112-124.
- Tosi MM, Ramos AP, Esposto BS and Jafari SM, 2020. Dynamic light scattering (DLS) of nanoencapsulated food ingredients. In *Characterization of nanoencapsulated food ingredients* (pp. 191-211). Academic Press.
- Tseng LP, Liang HJ, Chung TW, Huang YY and Liu DZ, 2007. Liposomes incorporated with cholesterol for drug release triggered by magnetic field. *Journal of medical and biological Engineering* 27(1): 29-34.
- Viriyaroj A, Ngawhirunpat T, Sukma M, Akkaramongkolporn P, Ruktanonchai U and Opanasopit P, 2009. Physicochemical properties and antioxidant activity of gamma-oryzanol-loaded liposome formulations for topical use. *Pharmaceutical development and technology* 14(6): 665-671.
- Wilkinson MG and Kilcawley KN, 2005. Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. *International Dairy Journal* 15(6-9): 817-830.

- Wu Y, Wang K, Liu Q, Liu X, Mou B, Lai OM, ... and Cheong LZ, 2022. Selective antibacterial activities and storage stability of curcumin-loaded nanoliposomes prepared from bovine milk phospholipid and cholesterol. *Food chemistry* 367: 1-10.
- Xia S, Tan C, Zhang Y, Abbas S, Feng B, Zhang X and Qin F, 2015. Modulating effect of lipid bilayer-carotenoid interactions on the property of liposome encapsulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 128: 172-180.
- Xu T, Zhang J, Jin R, Cheng R, Wang X, Yuan C and Gan C, 2022. Physicochemical properties, antioxidant activities and in vitro sustained release behaviour of co-encapsulated liposomes as vehicle for vitamin E and  $\beta$ -carotene. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 102(13): 5759-5767.
- Zylberberg C, Gaskill K, Pasley S and Matosevic, S, 2017. Engineering liposomal nanoparticles for targeted gene therapy. *Gene therapy* 24(8): 441-452.