

# تهیه نانو لیپوزوم های حاوی اسانس روغنی پرتقال با استفاده از روش حرارتی

محمدحسین نشاسته‌گیر<sup>1</sup>، محبت محبتی<sup>2\*</sup>، محمدحسین حدادخداپرست<sup>2</sup>، مهدی وریدی<sup>3</sup>

1- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

2- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

3- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ پذیرش: 1395/10/10

تاریخ دریافت: 1395/11/20

## چکیده

نانو لیپوزوم‌ها می‌توانند جهت به دام انداختن ترکیبات زیست فعال در غذاهای فراسودمند استفاده گردند. لیپوزوم‌های حاوی اسانس روغنی پرتقال با روش حرارتی و بدون استفاده از حلال‌های آلی تهیه شدند. ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی لیپوزوم‌ها از قبیل اندازه ذرات، پتانسیل زتا و راندمان ریزپوشانی اندازه‌گیری شد. قطر متوسط کلیه نانو حامل‌ها کمتر از 100 نانومتر و شاخص چندبسی پاشیدگی کمتر از 0/2 بود. پتانسیل زتا در لیپوزوم‌های بدون پوشش منفی گزارش شد. راندمان ریزپوشانی اسانس روغنی در نانو لیپوزوم‌های بدون پوشش 72-89 درصد بود. راندمان ریزپوشانی در نانو حامل‌های تولید شده با نسبت هسته به پوسته 1:3 بالاتر بود. تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی اتمی تشکیل نانو لیپوزوم‌ها را تأیید کرد.

**واژه های کلیدی:** نانو لیپوزوم، روش حرارتی، اسانس روغنی، حامل‌های لیپیدی

## 1- مقدمه

لستین و کلسترول تهیه کردند (21). پوشیدا و همکاران لیپوزوم‌های چندلایه حاوی اسانس روغنی برگ گیاه گیلاس برزیلی<sup>2</sup> را به روش هیدراسیون فیلم خشک<sup>3</sup> تهیه کرده، خصوصیات دیسپرسیون آبی و حالت منجمد خشک- شده آن را بررسی کردند (22). ارتان و همکاران در پژوهشی اثر نوع، ترکیب و غلظت لیپیدهای مورد استفاده در فرمولاسیون لیپوزوم‌های حاوی اسانس شوید را بر روی کارایی به دام انداختن و زمان پایداری آنها بررسی کردند (14). راستی و همکاران لیپوزوم‌ها و نانولیپوزوم‌های حاوی اسیدهای چرب چند غیراشباعی را با استفاده از روش‌های رایج و مظفیری تهیه کردند. سپس پایداری فیزیکی و اکسیداتیو آنها را با یکدیگر مقایسه شد (15). جهادی و همکاران اثر متغیرهای فرآیند بر تولید نانولیپوزوم‌های حاوی پروتئاز برای تسریع فرآیند رسانیدن پنیر را توسط طرح پلاکت- برمن<sup>4</sup> بررسی کردند (7). کولاس و همکاران ویژگی‌های میکروسکوپی و هدف گذاری باکتریایی نانولیپوزوم‌های حاوی نیسین تهیه شده به روش مظفیری را بررسی کردند (2). از آنجا که تاکنون پژوهشی جهت استفاده از روش فرایند حرارتی برای تولید نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس‌های روغنی صورت نگرفته است، لذا در این پژوهش نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس روغنی پرتقال به روش حرارتی تهیه و خصوصیات آن‌ها بررسی شد.

## 2- مواد و روش‌ها

فسفاتیدیل کولین سویا هیدروژنه شده با درصد خلوص بالا<sup>5</sup> از شرکت لیپوید (سوئیس)، اسانس روغنی پرتقال از شرکت داروسازی باریج اسانس کاشان، ویتامین E، توین 80 (پلی سوربات 80)<sup>6</sup> و گلیسرول از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده دارای درجه خلوص آزمایشگاهی بودند.

اخیراً استفاده از اسانس‌های روغنی و عصاره‌های به دست آمده از گیاهان مورد توجه فراوان تولیدکنندگان و مصرف کنندگان مواد غذایی قرار گرفته است. کاربرد مهمی که برای آن‌ها در مواد غذایی در نظر می‌گیرند، استفاده به عنوان طعم دهنده است، بنابراین اسانس‌ها نقش مهمی در رضایت مندی مصرف کننده ایفا می‌کنند و بر میزان مصرف مواد غذایی تأثیر می‌گذارند (1). یکی از مهمترین مسائل و چالش‌ها در زمینه استفاده از اسانس‌ها در مواد غذایی، بهبود و افزایش پایداری آن‌ها در مراحل فرآوری و همچنین کنترل آزاد شدن تا زمان مصرف می‌باشد. بنابراین بهتر است قبل از استفاده در مواد غذایی و نوشیدنی‌ها به منظور محدود کردن تجزیه یا افت آروما در طول فرآوری و نگهداری ریزپوشانی شوند. ریزپوشانی فرآیندی است که ذرات و قطرات مایع، جامد و گاز در غشایی از جنس مواد غذایی مجاز به دام می‌افتند و کپسول حاصل محتویات خود را تحت سرعت کنترل شده و با یک تحریک خاص و در یک زمان مشخص رها می‌کند. سیستم‌های حامل بر پایه لیپیدها شامل نانوامولسیون‌ها، نانولیپوزوم‌ها، نانوذرات لیپیدجامد و حامل‌های نانوساختار لیپیدی می‌باشند (10). نانولیپوزوم‌ها به علت امکان تولید در مقیاس صنعتی و قابلیت رهایش ترکیبات با خصوصیات آبدوستی متفاوت می‌توانند سیستم مناسبی برای ریزپوشانی ترکیبات محلول در چربی از قبیل اسانس‌های روغنی باشند (3). در سال‌های اخیر روش‌های بسیار متنوعی برای تهیه لیپوزوم‌ها تکامل پیدا کرده است. در سال 2005 مظفیری روش جدیدی برای تهیه سریع نانولیپوزوم‌ها بدون استفاده از مواد شیمیایی خطرناک، بر پایه تیمار حرارتی ارائه کرد (12). وارونا و همکاران لیپوزوم‌های حاوی اسانس روغنی لاواندولا را توسط روش‌های هیدراتاسیون لایه نازک و PGSS<sup>1</sup> با استفاده از

2- Brazilian cherry (Eugenia uniflora L.)

3-Dry film hydration

4-Placket-Burman

5-Phospholipon® P90H

6-Tween 80 (Polysorbate 80)

1-Particles from gas-saturated solutions (PGSS)

## 1-2- آماده سازی محلول ها

برای تهیه فاز آبی از محلول بافر استات در pH=3 استفاده شد. محلول بافر همچنین حاوی 0/02 درصد سدیم آزید به عنوان باکتریواستاتیک بود. فاز آبی حاوی فسفولیپید، امولسیفایر توین 80 (25 درصد فسفولیپید مصرفی) و ویتامین E (5 درصد فسفولیپید مصرفی) تهیه شد (12 و 13).

## 2-2- تولید نانو لیپوزوم

تولید نانو لیپوزوم ها بر اساس روش حرارتی در یک مرحله بدون استفاده از حلال های آلی یا دترژنت ها انجام شد. میزان فسفاتیدیل کولین در سه سطح 1، 3 و 5 درصد (W/V) و همچنین نسبت هسته به پوسته در سه سطح 1:5، 1:3 و 1:2 در نظر گرفته شد. برای تولید نانو لیپوزوم ها محلول لستین در حمام آبگرم با دمای 50 درجه سانتیگراد به مدت 5 دقیقه قرار گرفت. در مرحله بعد فاز روغنی شامل اسانس روغنی پرتقال، قطره قطره به فاز آبی اضافه شد و مخلوط در حمام آبگرم با دمای 50 درجه سانتیگراد برای مدت زمان 45-60 دقیقه تحت اتمسفر نیتروژن روی همزن مغناطیسی با دور 600 rpm همزده شد. سپس به منظور یکنواخت کردن اندازه حامل ها، به مدت 5 دقیقه با استفاده از التراتوراکس (25digitalULTRA-TURRAX®, IKA, Germany) در 10000 rpm هموزن گردید. در مرحله نهایی، دیسپرسیون نانو لیپوزوم ها در دمای بالاتر از دمای انتقال (50 درجه سانتیگراد) زیر اتمسفر نیتروژن به مدت یک ساعت به منظور پایدار شدن قرار گرفتند (2 و 11 و 12 و 13). لیپوزوم های شاهد نیز برای مقایسه با لیپوزوم های حاوی ترکیبات هیدروفوبیک تهیه شدند.

## 3-2- سنجش اندازه ذرات و شاخص چندبس پاشیدگی

متوسط اندازه ذرات و شاخص چندبس پاشیدگی (PDI) نانو ذرات با استفاده اسپکتروسکوپی همبستگی فوتونی<sup>1</sup> بر مبنای تفرق نور پویا توسط دستگاه آنالیز اندازه ی ذرات<sup>2</sup>

در (Cordouan, VASCOTechnologies, France)

دمای محیط، طول موج 657 نانومتر و زاویه 90 درجه تعیین شد. برای انجام این آزمون نانو لیپوزوم ها به نسبت 1 به 10 با آب دیونیزه رقیق سازی شدند. Z-average به عنوان متوسط اندازه ی ذرات گزارش شد (19).

## 4-2- پتانسیل زتا

پتانسیل زتا به وسیله زتا متر (Zeta Compact, CAD instrumentation, France) اندازه گیری شد.

## 5-2- تعیین راندمان ریزپوشانی

راندمان ریزپوشانی (EE) از طریق اندازه گیری میزان اسانس روغنی آزاد در دیسپرسیون نانو لیپوزوم ها با استفاده از روش سانتیفریوژاسیون تعیین گردید. بدین منظور 0/3 میلی لیتر از دیسپرسیون به دقت وزن شد و با 10 میلی لیتر استون به عنوان حلال اسانس روغنی مخلوط گردید. پس از آن، مخلوط حاصل به مدت 3 دقیقه با سرعت 2000 دور بر دقیقه سانتیفریوژ گردید. مقدار لیمون موجود در نمونه به عنوان ترکیب شاخص و اصلی روغن پرتقال با استفاده از اسپکتروفوتومتر در 252 نانومتر اندازه گیری شد (12). این ناحیه بیشینه طول موج جذبی لیمون در دامنه 200-600 نانومتر است. منحنی استاندارد با استفاده از محلول های با غلظت های مختلف لیمون در استون رسم گردید. از نمونه استون نیز به عنوان شاهد برای جلوگیری از خطای جذب در دستگاه استفاده شد. راندمان ریزپوشانی با استفاده از رابطه 1-2 محاسبه گردید (3):

$$EE = \frac{(W_T - W_F)}{W_T} \cdot 100$$

که در این رابطه  $W_t$  وزن کل اسانس روغنی مورد استفاده در ساختار نانو لیپوزوم و  $W_f$  میزان اسانس روغنی آزاد موجود در سوپرناتانت می باشد.

## 2-6- بررسی مورفولوژیکی

مورفولوژی لیپوزوم ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی اتمی<sup>1</sup> (Full plus، آرا پژوهش، ایران) بررسی شد (2).

## 2-7- طرح آماری

آزمایش ها در قالب طرح کاملاً تصادفی در 3 سطح غلظت فسفولیپید و 3 سطح نسبت هسته به پوسته و در 3 تکرار انجام شد. برای مقایسه میانگین ها از آزمون دانکن استفاده شد. سطح معنی داری در مورد تمامی فاکتورها 5 درصد بوده، برای این منظور از نرم افزار SPSS.16 استفاده شد. رسم نمودارها توسط نرم افزار Microsoft Excel2013 انجام شد.

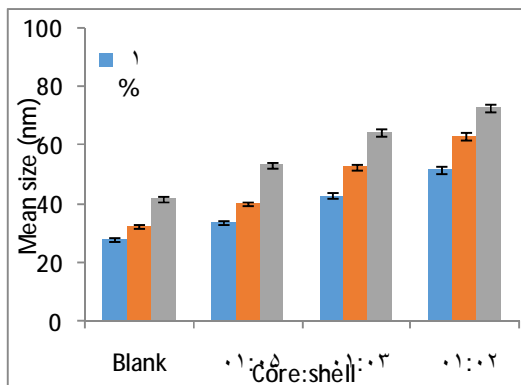
## 3- نتایج و بحث

### 3-1- شاخص چند بس پاشیدگی و میانگین اندازه نانو

#### لیپوزومها

شاخص چند بس پاشیدگی نانو ذرات به صورت تئوری در محدود صفر تا یک قرار دارد و مقادیر بزرگتر از 0/5 نشان-دهنده پراکندگی وسیع اندازه ذرات می باشد (18). شاخص چند بس پاشیدگی کلیه نانو لیپوزومها کمتر از 0/2 بود که مبین توزیع اندازه یکنواخت و در نتیجه موفقیت فرآیند تولید نانو لیپوزومها در غلظت های مختلف فسفولیپید می باشد. اما با افزایش غلظت لیپید، تغییرات در اندازه ذرات هم افزایش یافت. قطر متوسط کلیه نمونه ها در زمان تولید کمتر از 100 نانومتر بود. نتایج به دست آمده نشان می دهد با افزایش غلظت لستین و نسبت هسته به دیواره اندازه لیپوزومها از 27/87 تا 72/75 نانومتر افزایش می یابد (شکل 1). نانو لیپوزومها با اندازه کوچکتر دارای پایداری بیشتری می باشند که به دلیل مقاومت بالاتر نسبت به نیروی ثقل به واسطه حرکت برآونی است (3). نتایج تجزیه واریانس میانگین اندازه لیپوزومها در پاسخ به فاکتورهای مورد بررسی نشان داد، تأثیر غلظت لستین بر قطر متوسط ذرات معنی دار بود ( $P < 0/05$ ). به طوری که با افزایش غلظت لستین و نسبت هسته به پوسته اندازه ذرات لیپوزوم بزرگتر

شد. افزایش اندازه لیپوزومها با افزایش غلظت فسفولیپید را می توان با مکانیسم تشکیل لیپوزوم توضیح داد؛ با افزایش غلظت فسفولیپید ممکن است یک تکه دولایه ای دیگر ساخته شده و با بسته شدن خود به خودی این تکه های دولایه ای می تواند یک لیپوزوم بزرگتر حاصل شود. نانو لیپوزومهایی که در فرمولاسیون آنها مقدار بیشتری اسانس روغنی استفاده شد (نسبت هسته به پوسته 2:1) به طور معنی داری ( $P < 0/05$ ) بزرگتر از نانو لیپوزومهای دارای مقدار کمتر اسانس روغنی (نسبت هسته به پوسته 5:1) بودند. این پدیده به دلیل ساختار حجمی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس روغنی و در نتیجه اشغال کردن فضای زیادی از نانو لیپوزومها می باشد (16 و 17).



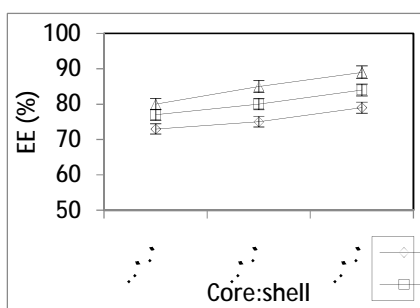
شکل 1- اندازه ذرات نانو لیپوزومهای بدون پوشش

اندازه نانو لیپوزومهای تولیدشده در این پژوهش، نسبت به پژوهش های قبلی (2 و 15) به مراتب کوچکتر بود؛ لذا دارای خواص عملکردی مناسب تری می باشند. لیو و پارک در بررسی اثر شرایط مختلف فرآیند از نظر نسبت فسفولیپید به کلسترول و زمان فراصوت، فرآیند تولید لیپوزومهای حاوی ویتامین E را بهینه سازی کردند. شرایط بهینه برای تولید کوچکترین لیپوزومها با قطر میانگین 87/5 نانومتر نسبت فسفولیپید به کلسترول 60:40 و 12 دقیقه زمان اعمال فراصوت بود (9).

زتای نانو لیپوزوم های تولید شده نسبت به برخی پژوهش های گزارش شده بیشتر (17) و نسبت به برخی دیگر کمتر (2) بود.

### 3-3- راندمان ریزپوشانی نانو لیپوزوم ها

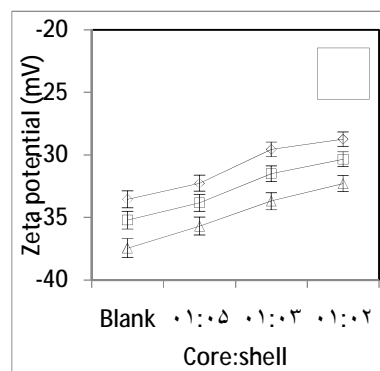
نمودار راندمان ریزپوشانی بر حسب ماده دی لیمونن از اسانس روغنی پرتقال نشان می دهد در غلظت های مختلف فسفاتیدیل کولین، با افزایش نسبت هسته به دیواره، راندمان ریزپوشانی افزایش می یابد (شکل 3). نانو لیپوزوم ها دارای راندمان ریزپوشانی بین 72 تا 89% بودند. در ساختار لیپوزوم دو بخش آبدوست و آبگریز وجود دارد، ترکیبات آبدوست در محیط آبی درون لیپوزوم و ترکیبات آبگریز در بین دو لایه فسفولیپیدی محصور می گردند؛ بنابراین دولایه ی فسفولیپیدی به عنوان مخزنی برای اسانس روغنی عمل می کند. نتایج راندمان ریزپوشانی گزارش شده در این پژوهش مشابه نتایج در پژوهش های قبلی (15 و 17 و 20) در مورد نانو لیپوزوم ها می باشد. اما در مقایسه با پژوهش های انجام شده در مورد لیپوزوم ها تفاوت معنی داری وجود دارد (8 و 21). یک توضیح احتمالی برای این تفاوت این است که فرآیند کاهش اندازه لیپوزوم ها پیوند بین ترکیبات آبگریز و فسفاتیدیل کولین و محصور شدن آنها در لایه ی فسفولیپیدی را تحت تأثیر قرار نداده، اما هسته آب دوست لیپوزوم ها را کوچکتر کرده است. همچنین ممکن است این امر به دلیل این باشد که فرآیند کاهش اندازه، منجر به افزایش مساحت سطح ذرات و امکان تماس و پیوند بین ترکیبات آبگریز و فسفولیپیدهای غشای لیپوزوم می شود (6).



شکل 3. میزان راندمان ریزپوشانی (%) نانو لیپوزوم های بدون پوشش

### 2-3- پتانسیل زتای نانو لیپوزوم ها

پتانسیل زتا یکی از فاکتورهای مهم در پایداری نانو ذرات است. هرچه اندازه پتانسیل زتا بیشتر باشد، بار سطحی نانو ذرات بیشتر و در نتیجه دافعه الکترواستاتیک بالاتر و میزان به هم چسبیدگی ذرات کمتر خواهد بود. پتانسیل زتای پایین نانو ذرات سبب کاهش پایداری آنها و به هم چسبیدگی ذرات طی نگهداری به حالت محلول می شود. پتانسیل زتا در تمامی نمونه ها، منفی و از 28/55 میلی ولت تا 35/69 میلی-ولت متغیر بود (شکل 2). دلیل اصلی منفی بودن بار سطحی در نانو لیپوزوم ها، وجود لستین به عنوان یک امولسیفایر آنیونی می باشد. اما گروه هیدروکسیل در توئین 80 (امولسیفایر غیر یونی) نیز می تواند تا حدودی باعث ایجاد بار منفی در آنها شود. در مورد امولسیفایرهای غیر یونی، بازدارندگی استری یکی از عواملی است که باعث پایداری نانوذرات در طی نگهداری می شود. برای نانو سوسپانسیون های پایدار شده به صورت الکتروستاتیکی، به حداقل پتانسیل زتای 30 میلی ولت نیاز می باشد (5)، در حالی که در سوسپانسیون های پایدار شده به صورت الکتروستاتیکی و نیروی استری حداقل پتانسیل زتای 20 میلی ولت نیز کافی است (18). همانطور که در شکل 2 مشاهده می شود در غلظت های مختلف لیپید، اختلاف پتانسیل زتا در نسبت های 5:1 و 3:1 هسته به دیواره معنی دار و در نسبت های 3:1 و 2:1 معنی دار نیست.



شکل 2- پتانسیل زتا (mV) نانو لیپوزوم های بدون پوشش

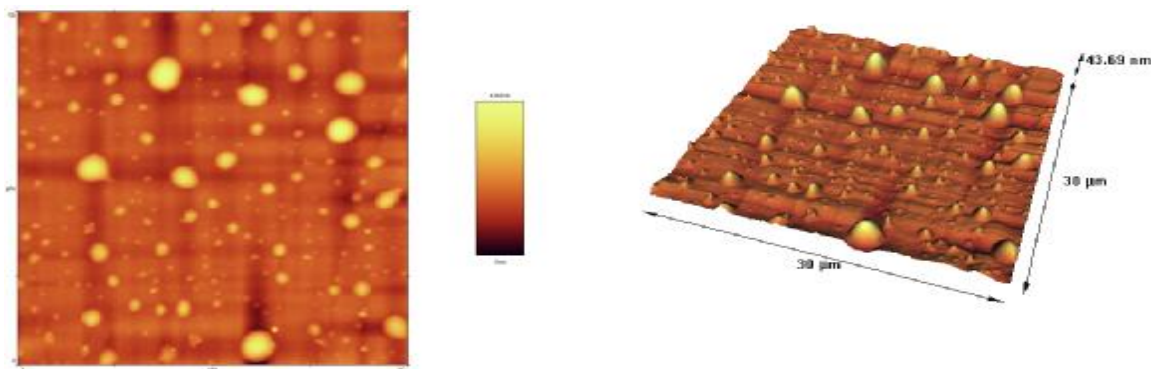
طبق پژوهش های قبلی (2 و 15 و 17)، با کاهش اندازه لیپوزوم ها، پتانسیل زتا افزایش می یابد. با این وجود پتانسیل

### 3-4- بررسی مورفولوژی نانو لیپوزوم ها

مورفولوژی نانو لیپوزوم ها قبل از مرحله پوشش دهی بوسیله میکروسکوپ الکترونی اتمی مورد بررسی قرار گرفت و حضور لیپوزوم ها در تمام نمونه ها قابل مشاهده بود و تشکیل لیپوزوم ها به تایید رسید. نظر به اینکه کلیه نمونه ها دارای شکل یکسانی بودند، یکی از تصاویر به عنوان نمونه نمایش داده شده است (شکل 4). اندازه نانو لیپوزوم های به دست آمده به وسیله میکروسکوپ الکترونی اتمی با اندازه های به دست آمده از طریق تفرق نور پویا تطابق داشت.

به طور کلی ثابت شده است که راندمان ریزپوشانی مواد در ساختار لیپوزوم می تواند تحت تأثیر اندازه و مساحت سطح خاص<sup>1</sup> قرار بگیرد (4). با این وجود، روش های کاهش اندازه به طور بالقوه می توانند به عملکرد و یا ساختار مواد محصور شده آسیب برسانند. از معایب دیگر این روش ها، تخریب لیپوزوم ها می باشد که منجر به کاهش راندمان ریزپوشانی مواد آب دوست محصور در هسته می شود. با این حال، یافته های مطالعه حاضر رابطه معکوس کاهش اندازه و راندمان ریزپوشانی را برای اسانس روغنی به عنوان ترکیبی آبگریز نشان داد. همچنین مطالعه راستی و همکاران بر روی اسیدهای چرب غیراشباع به عنوان ترکیبی آبگریز این موضوع را تصدیق می کند (15).

شکل 4- مورفولوژی نانو لیپوزوم بدون پوشش



effects of process variables on protease-loaded nano-liposome production by plackett-burman design for utilizing in cheese ripening acceleration. *Asian Journal of Chemistry*, 24(9): 3891-3894.

8. Laridi, R., Kheadr, E. E., Benech, R. O., Vuillemand, J. C., Lacroix, C., Fliss, I. 2003. Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and release during milk fermentation. *International Dairy Journal*, 13(4): 325-336.
9. Liu, N., Park, H.-J. 2009. Chitosan-coated nanoliposome as vitamin E carrier. *Journal of Microencapsulation*, 26(3): 235-242.
10. McClements, D. J. 2005. Food emulsions. principles, practices and techniques. CRC Press, Boca Raton.
11. Mortazavi, S. M., Mohammadabadi, M. R., Khosravi-Darani, K., Mozafari, M. R. 2007. Preparation of liposomal gene therapy vectors by a scalable method without using volatile solvents or detergents. *Journal of Biotechnology*, 129(4): 604-613.
12. Mozafari, R. M., Mortazavi, S. M. 2005. Nanoliposomes: From Fundamentals to Recent Developments, Trafford Publishing, Ltd, Oxford, UK. ISBN 1-4120-5545-8.
13. Mozafari, M. R., and Khosravi-Darani, K. 2007. An Overview Of Liposome-Derived Nanocarrier Technologies. *Nanomaterials And Nanosystems For Biomedical Applications*. Dordrecht, Springer: 113-123.
14. Ortan, A., CÂmpeanu, Gh., Dinu – PÎrvu, C., Popescu, L. 2009. Studies concerning the entrapment of anethum graveolens essential oil in liposomes. *Roumanian Biotechnological Letters*, 14(3): 4411-4417.
15. Rasti, B., Jinap, S., Mozafari, M. R., and Yazid, A. M. 2012. Comparative study of the oxidative and physical stability of liposomal and nanoliposomal polyunsaturated fatty acids prepared with conventional and Mozafari methods. *Food Chemistry*, 135(4): 2761-2770.

#### 4- نتیجه گیری

با توجه به بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی لیپوزوم های تهیه شده، از نظر اندازه، پتانسیل زتا و راندمان ریزپوشانی، نانو لیپوزوم های تهیه شده با نسبت هسته به پوسته 1 : 3 در غلظت های مختلف فسفولیپید با اندازه ذرات 42-64 نانومتر، پتانسیل زتا 29-33 میلی ولت و راندمان ریزپوشانی 80-89 درصد مورد پذیرش قرار گرفتند.

#### 5- منابع

1. جایمند، ک. و رضایی، م. ب. 1385. اسانس، دستگاه های تقطیر، روش های آزمون و شاخص- های بازداری در تجزیه اسانس. انجمن گیاهان دارویی، چاپ اول.
2. Colas, J.-C., Shi, W., Rao, V. S. N. M., Omri, A., Mozafari, M. R., Singh, H. 2007. Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by Mozafari method and their bacterial targeting. *Micron*, 38(8): 841-847.
3. Fathi, M., Mozafari, M. R., Mohebbi, M. 2012. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in food science & technology*, 23(8): 13-27.
4. Feller, S. E., Garwrisch, K., MacKerell, Jr. 2002. Polyunsaturated fatty acids in lipid bilayers intrinsic and environmental contributions to their unique physical properties. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 124(2), 318-326.
5. Freitas, C., Müller, R. H. 1998. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN™) dispersions. *International Journal of Pharmaceutics*, 168(2): 221-221.
6. Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J. E., Benoit, J. P. 2003. Physicochemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*, 24(23), 4283-4300.
7. Jahadi, M., Khosravi-Darani, K., Saboury, A.A., Ehsani, M.R., Seydahmadian, F., Mozafari, M.R., Vafabakhsh, Z. 2012. Evaluating the

20. Valenti, D., De Logu, A., Loy, G., Sinico, C., Bonsignore, L., Cottiglia, F., Garau, D. and Fadda, A. M. 2001. Liposome-incorporated santolina insularis essential oil: preparation, characterization and in vitro antiviral activity. *Journal of Liposome Research*, 11(1): 73-90.
21. Varona, S., Martín, A. n., and Cocero, M. a. J. 2011. Liposomal incorporation of lavandin essential oil by a thin-film hydration method and by particles from gas-saturated solutions. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 50(4): 2088-2097.
22. Yoshida, P. A., Yokota, D., Foglio, M. A., Rodrigues, R. A. F., Pinho, S. C. 2010. Liposomes incorporating essential oil of brazilian cherry (*eugenia uniflora* l.): characterization of aqueous dispersions and lyophilized formulations. *Journal of Microencapsulation*, 27(5): 416-425.
16. Sebaaly, C., Jraij, A., Fessi, H., Charcosset, C., Greige-Gerges, H. 2015. Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. *Food Chemistry*, 178: 52-62.
17. Sebaaly, C., Greige-Gerges, H., Agusti, G., Fessi, H., Charcosset, C. 2016. Large-scale preparation of clove essential oil and eugenol-loaded liposomes using a membrane contactor and a pilot plant. *Journal of Liposome Research*, 26(2):126-38.
18. Tamjidi, F., Shahedi, M., Varshosaz, J., and Nasirpour, A. 2013. Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 87: 21-43.
19. Tamjidi, F., Shahedi, M., Varshosaz, J., and Nasirpour, A. 2014. Design and characterization of astaxanthin-loaded nanostructured lipid carriers. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 21: 366-374.



