تاثیر پوشش‌های نانوکامپوزیتی حاوی ذرات مس بر مشخصه‌های میکروبی و فیزیکی شیر در مقایسه با بسته‌های پلی اتیلن معمولی

سعیده ابراهیمی اصل [a*]، علی سلطانی چپه‌زاد [b]، افشین جوادی [c]

[a] استادیار گروه نانو تکنولوژی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران
[b] دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه مهندسی پلیمر، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران
[c] دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

تاریخ دریافت مقاله : ۱۳۹۵/۹/۱۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۱۲/۲۲

چکیده

مقدمه: استفاده از تکنولوژی نانو در بسته‌بندی مواد غذایی، به منظور ترکیب ماده نانو با مواد بسته‌بندی جهت جلوگیری از فساد باکتریایی و از دست رفتن مواد مغذی و افزایش مدت زمان ماندگاری است. هدف ازاین تحقیق افزایش ماندگاری شیر با ترکیب نانوذرات مس در بسته‌بندی‌های پلی اتیلن ضد میکروبی بود.

مواد و روش‌ها: فیلم‌های نانوکامپوزیت به روش اختلاط اکستروژنی هیدروفوبیک با استفاده از پلیمر LLDPE و نانوذرات مس تهیه و برای بسته‌بندی و نگهداری شیر در دمای $4\ ^{\circ}C$ بکار برده شد. پایداری میکروبی، میزان تغییرات pH ، آزمون پایداری حرارتی، میزان مهاجرت نانو ذرات در لحظه صفر و پس از ۷ تا ۴۵ روز انبارداری، آزمون مقاومت در برابر عبور رطوبت در سه تکرار ارزیابی شد.

یافته‌ها: تعداد کپک‌ها، مخمرها و باکتری‌های موجود در شیر بسته‌بندی شده در پوشش‌های نانوکامپوزیت پس از ۴۱ روز انبارداری، به ۶/۲ logcfu/ml رسید. میزان تولید اسید ناشی از فساد شیر و تغییرات pH در نمونه‌های نانو کامپوزیت در زمان انبار مانی ناچیز بود. آنالیز حرارتی شیر پس از ۳۸ روز نشاندهنده عدم فساد شیر بود. میزان مهاجرت نانوذرات مس پس از ۴۵ روز بسته‌بندی در محدوده مجاز ppb ۲,۱ بود. تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری و روبشی، پراکندگی یکنواخت نانو ذرات مس را در بستر پلیمری تایید نمود. همچنین با افزایش غلظت نانو ذرات مس، میزان جذب رطوبت فیلم‌ها کاهش یافت (t-test= ۲/۷۹۸).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که نانوکامپوزیت مس پلی اتیلن تهیه شده به شیوه صنعتی به میزان چشمگیری موجب افزایش ماندگاری شیر در طول دوره انبارمانی گردید.

واژه‌های کلیدی: *بسته‌بندی، زمان ماندگاری، شیر، نانو ذرات مس، نانوکامپوزیت*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: Ebrahimi.asl@iau-ahar.ac.ir

مقدمه

بسته‌بندی عبارت است از ساخت محفظه‌ای که سلامت کالای محتوای خود را از مرحله بعد از تولید تا مرحله مصرف حفظ می‌نماید و به عبارتی دیگر بسته‌بندی، یک مفهوم تضمین کننده برای تحویل مطمئن کالا به آخرین مصرف کننده در شرایط مطلوب با حداقل هزینه است. ضمن اینکه اهداف اولیه بسته‌بندی یعنی خاصیت حفاظتی و جذابیت را نیز دارا باشد. نسل جدید بسته‌بندی‌های فعال که به وسیله اضافه کردن نانو ذرات فلزی به فیلم‌های پلیمری ایجاد می‌شوند یک راه کار جدید برای حفظ ماندگاری مواد می‌باشند. فناوری نانو، امیدهای بسیاری برای دستیابی به بسته‌بندی مواد غذایی با قابلیت‌های ایمنی و نگهداری بیشتر و مهار اکسیژن، تولید دی اکسیدکربن، حذف بخارآب، حذف اتیلن و انتشار اتانول ایجاد می‌کند. این عوامل فساد مواد غذایی را در بسته‌بندی کنترل می‌کنند (Lagaron *et al*., 2005; Azizi Samir *et al*., 2005; Brody, 2007; Chaudhry *et al*., 2008).

در نانو کامپوزیت‌ها، با افزودن ذرات کوچک نانو مقیاس به پلاستیک‌ها می‌توان نفوذپذیری آن‌ها را نسبت به آب و گاز کنترل کرد. استفاده از این پلاستیک‌ها در بسته‌بندی مواد غذایی از فساد میوه‌ها، سبزیجات و دیگر کالاهای فاسد شدنی جلوگیری و زمان ماندگاری آنها را بیشتر می‌کند (مرتضوی، ۱۳۸۵). استفاده از نانو ذرات نقره، اکسید روی و اکسید مس اثرات ضد میکروبی فیلم‌های پلیمری را افزایش داده و به طور معنی‌داری مانع رشد باکتری‌ها در نانو کامپوزیت سنتز شده می‌گردد (محمدی، ۱۳۹۱؛ حسینی، ۱۳۸۸).

در میان پلی‌مرها، فیلم‌های پلیمری نفتی به دلیل قابلیت شکل‌پذیری آسان، قیمت ارزان، سبکی، مقاومت شیمیایی بالا، تنوع خواص فیزیکی، قابلیت درز بندی به وسیله حرارت، چاپ پذیری خوب و فرآیند تولید آسان به طور گسترده‌ای در صنایع بسته بندی مورد استفاده قرار می‌گیرند. پلی اتیلن (PE)، نوعی پلیمر است که پایین ترین نقطه ذوب، برابر با ۸۰ درجه سانتی‌گراد دارد. سطح PE با آب خیس نمی‌شود. پلی اتیلن در برابر نفوذ بخار آب، مقاومت عالی دارد اما در برابر اکسیژن مقاوم نمی‌باشد. این پلیمر به راحتی پاره می‌شود و نفوذپذیری‌اش در برابر حلال‌ها زیاد است. لذا در بسته‌بندی‌هایی که باید در دماهای پایین نگهداری شوند معمولا از پلی اتیلن استفاده می‌شود (Koutny *et al*., 2006). برای بسته‌بندی شیر، بیشتر LDPE (پلی اتیلن با دانسیته پایین) مورد استفاده قرار می‌گیرد که معمولا به صورت فیلم‌های نازک انعطاف پذیر می‌باشد. دو ویژگی مهم که کاربرد آن را در صنعت بسته‌بندی محصول غذایی وسیع‌تر می‌کند عبارت از، خنثی بودن آن یعنی عدم واکنش با محصول و قابلیت دوخت حرارتی آن می‌باشد. برای این منظور در بسته‌بندی‌های چند لایه، باید از فیلم نازک LDPE به عنوان لایه درونی و در تماس مستقیم با محصول استفاده شود.

نانوذرات مس جزو نانو ذرات فلزی بوده و مانند نانو ذرات طلا و نقره دارای خواص مختلفی از جمله خاصیت ضد میکروبی و ضد باکتریایی می‌باشد. خود فلز مس نیز به مانند فلز نقره اما با درجه کمتر، دارای خواص ضد میکروبی است. ولی نکته مهم این است که میزان سمیت نانو ذرات مس از نانو ذرات نقره کمتر می‌باشد و مضرات این نانو ذرات برای انسان بسیار ناچیز است که این مهم یکی از نقاط قوت نانو ذرات مس می‌باشد. این خاصیت موجب گردیده تا از نانو ذرات مس در صنایع مختلف از جمله صنایع بسته‌بندی غذایی استفاده شود. برخی از خواص ویژه این ذرات عبارتند از سمی نبودن، سازگاری با محیط زیست، بی‌ضرر بودن برای انسان و همچنین خاصیت ضد میکروبی مناسب. نانو ذرات مس مانند نانو ذرات نقره توانایی اضافه شدن به برخی مواد مانند پلیمرها، رنگ‌ها و مواد دارویی را بدون تغییر دادن خواص آن‌ها دارد (Ruparelia *et al*., 2008; Yoon *et al*., 2007). فعالیت ضد میکروبی این نانوذرات از طریق مکانیسم‌های تخریب ساختار غشاء سلول (Sawai, 2003)، انتشار یون از سطح نانوذرات و مرگ باکتری به علت اتصال به غشای سلول گزارش شده است (Sondi *et al*., 2004). استفاده از این نانوذرات در بسته بندی مواد غذایی می‌تواند به دلیل ممانعت از رشد میکروبی، باعث افزایش ماندگاری مواد غذایی گردد. برخی محققین در بررسی خواص ضد میکروبی فیلم‌های کامپوزیت کیتوسان و پلی پایرول، حضور نانو مس را باعث افزایش خصلت ضد میکروبی فیلم سنتز شده گزارش کردند (Ebrahimiasl *et al*., 2015). در تحقیقی مشابه خواص ضدمیکروبی فیلم نانو کامپوزیت مس برای بسته‌بندی مواد

غذایی مورد بررسی قرار گرفتت. در این روش نانو ذرات مس تولید شده با استفاده از اشعه لیزر در درون ماتریس پلی لاکتیک اسید به‌عنوان یک پلی‌مر زیست تخریب پذیر به کار برده شد. نتایج به‌دست آمده توسط آنان نشان‌دهنده فعالیت ضد میکروبی این کامپوزیت درمقابل باکتری‌های گرم منفی می‌باشد (Longano *et al*., 2012). همچنین از نانوذرات نقره در بسته بندی خرما استفاده شده است. بدین منظور یک لایه از نانوذرات نقره بر روی پلاستیکی که در بسته‌بندی خرما استفاده می‌شود (پلی اتیلن ترفتالات) ایجاد شده و از نظر میکروبی مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. نتایج نشان می‌دهد که خرما می‌تواند در این بسته‌بندی طی ۴ ماه نگه داری هم در دمای ۴ درجه و هم در دمای محیط نگهداری شود (بینش، ۱۳۸۸).

فیلم پلی پروپیلن ضدباکتری با استفاده از نانوپوشش حاوی نانوذرات تیتانیم دی اکسید و روی اکسید تهیه و خاصیت ضد باکتریایی آن مورد بررسی قرار گرفت. برای ایجاد خاصیت ضدباکتری در پلی پروپیلن، پوشش دهی با استفاده از رزین پلی آمید و مخلوط دو نانو پودر روی اکسید و تیتانیم دی اکسید انجام شد. خاصیت ضدباکتری پوشش در برابر باکتری اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس بررسی شد. نتایج آزمون‌های کیفی نشان داد که پوشش ایجاد شده مانع رشد کلونی‌های باکتری شده است و بهترین نتیجه مربوط به فیلم پلی پروپیلن با پوشش حاوی ۵/۵ درصد وزنی از مخلوط دو نانو پودر بود (ولی‌پوز، ۱۳۹۱)

با توجه به تحقیقات اخیر نسبت به خواص ضد میکروبی نانو ذرات به ویژه مس، لزوم استفاده از روشی ساده برای ورود این ماده در فرایند تولید صنعتی کامپوزیت‌های بسته بندی، بسیار ضروری می‌باشد و تا کنون روش‌های صنعتی تولید و بسته بندی مواد غذایی با این ماده مورد بررسی قرار نگرفته است. در این پژوهش، نانو ذرات مس با ساختار کروی در بستر پلی اتیلن سبک، به روش صنعتی ساده و ارزان قیمت سنتز شد. سپس توانایی نانوکامپوزیت سنتز شده در مقابل عوامل میکروبی به منظور استفاده در بسته‌بندی شیر تعیین گردید.

مواد و روش‌ها

نانو ذرات مس (Cu) با قطر متوسط۴۰ نانومتر (Nano Amour USA) از شرکت پیشگامان نانو مواد خریداری و بدون تغییر مورد استفاده قرار گرفت. از پلی اتیلن با مشخصات، دانه رزین LDPE با گرید خاص (MFI=2 gr/ml)، دانسیته ۹۲ gr/ml و نقطه ذوب ۹۴ $^{\circ}C$ جهت تهیه فیلم پلیمری استفاده شد. شیر محلی و تازه از دامداری‌های شهرستان اهر تهیه گردید.

تهیه فیلم پلیمری در دستگاه اکسترودر دو مارپیچ تهیه و تولید گردید و خواص ضد باکتریایی آن ارزیابی شد. تهیه گرانول‌های نمونه مادر از جنس پلی اتیلن سبک به روش اختلاط مستقیم و با استفاده از اکسترودر دو مارپیچه (Cincinnati Milacron, Batavia, OH) با قطر اکسترودر ۵۵ میلی‌متر و نسبت طول پیچ به قطر ۳۰ و با برنامه حرارتی در ۶ منطقه دمایی، ۱۵۰، ۱۵۰، ۱۷۵، ۱۶۰، ۱۶۰ و ۱۴۰ درجه سانتی‌گراد اجرا شد. فیلم‌های نانو کامپوزیتی با درصدهای متفاوتی از نانو ذرات مس (۲/۵ و ۵ و ۱۰ ٪) و ضخامت ۵۰ میکرومتر به صورت جداگانه از اختلاط مستقیم نمونه‌های مادر حاوی نانوکامپوزیت مس باگرانول‌های پلی اتیلن سبک با استفاده از دستگاه اکستروژن بادی با قطر اکسترودر ۴۵ میلیمتر و نسبت طول پیچ به قطر ۲۸ با برنامه حرارتی در۲ منطقه دمایی ۱۹۰ درجه سانتی‌گراد تولید شدند.

- اندازه‌گیری مقدار جذب رطوبت

برای اندازه‌گیری آهنگ انتقال بخار آب، از روش اندازه‌گیری استاندارد E96 (ASTM Standards, 1995) استفاده شد. برای این کار ویال‌های مخصوصی با قطر cm ۲ و ارتفاع cm ۴/۵ به کار برده شدند. در درپوش این ویال‌ها منفذی به قطر mm ۸ قرار دارد که قطعه‌ای از فیلم مورد آزمون در این قسمت قرار می‌گیرد. ۳ گرم سولفات کلسیم که رطوبت نسبی آن صفر است، در داخل ویال‌ها قرار داده شد. ابتدا فیلم‌ها در رطوبت نسبی ۵۵٪ که توسط نیتریت کلسیم ایجاد شده بود به مدت ۲۴ ساعت واجد شرایط شدند و سپس قطعه‌ای از فیلم بریده و در درپوش ویال قرار گرفته و بر روی ویال بسته شد. ویال‌ها همراه با محتویاتشان توزین شده و درون دسیکاتوری حاوی محلول اشباع سولفات پتاسیم قرار گرفتند. دسیکاتور در درون انکوباتور قرار گرفت و پس از گذشت ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰ و ۱۴۰ ساعت وزن ویال‌ها اندازه‌گیری شد.

مقدار بخار آب انتقال یافته از فیلم‌ها، از روی افزایش

وزن ویال‌ها تعیین شد. منحنی افزایش وزن ویال‌ها با گذشت زمان رسم و پس از محاسبه رگرسیون خطی، شیب خط حاصل محاسبه گردید. از تقسیم کردن شیب خط مربوط به هر ویال، به سطح کل فیلم که در معرض انتقال بخار آب قرار داشت، آهنگ انتقال بخار آب به دست می‌آید (WVTR) سپس با استفاده از رابطه زیر، نفوذپذیری نسبت به بخار آب (WVP) محاسبه شد:

$$WVP = \frac{WVTR}{P(R_1 - R_2)} X$$ معادله ۱

که در آن X ضخامت فیلم، P فشار بخار آب خالص، R_1 رطوبت نسبی در دسیکاتور، R_2 رطوبت نسبی در داخل ویال می‌باشد (بر اسا س استاندارد ملی ایران به شماره ۹۵۴۳).

- آزمون میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و عبوری (TEM)

برای انجام آزمون میکروسکوپ الکترونی روبشی و بررسی ریز ساختار و مورفولوژی فیلم تهیه شده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (Hitachi S3000N) در ولتاژ ۱۵ کیلوولت استفاده شد. برای روکش‌دهی فیلم جهت انجام میکروسکوپی روبشی از روش لایه نشانی کندوپاش (Sputter coating) که پوشش‌دهی در خلاء است استفاده شد. در این روش ماده مورد نظر جهت لایه نشانی، در مقابل زیر لایه و در فشار اولیه ۱۰-۶ Torr قرار گرفت. از عبور گاز آرگون که در پلاسما ایجاد شده و درمیدان ایجاد کننده پلاسما شتاب می‌گیرد (و فشار را به ۱ تا ۱۰۰ Torr افزایش می‌دهد) برای تامین یون‌های طلا استفاده شد. مقایسه مورفولوژی ساختار فیلم تهیه شده و نیز چگونگی توزیع نانو ذرات نقره در بستر پلی‌مر با میکروسکوپی الکترونی روبشی انجام شد.

تصاویر مربوط به ساختار پودر نانو ذرات، نمونه‌ها و مورفولوژی پوشش‌های مورد استفاده در بسته‌بندی با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) مدل EM10C-100 KV، ساخت شرکت Zeiss آلمان و توسط شرکت (Daypetronik) تهیه گردید. برای آماده سازی فیلم، برش‌گیری از نمونه فیلم با دستگاه الترامیکروتومی مدل (OmU3 - Reichert) ساخت کشور اتریش صورت گرفت. سپس با استفاده چاقوی الماس برش‌گیری انجام و جهت مطالعه با TEM، برش‌ها روی گرید مسی قرار داده شد.

- بسته بندی شیر

ابتدا مقدار زیادی شیر محلی و تازه از یکی از دامداری‌های اهر (به روش تصادفی) تهیه شد. سپس در آزمایشگاه مقداری از شیر تازه داخل بشر ۱۰۰۰ میلی لیتری ریخته و بوسیله بن ماری در دمای ۶۵-۶۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه پاستوریزه گردید. شیر پاستوریزه شده به مدت ۳ ساعت تا دمای $20^{\circ}C$ خنک شد و داخل فیلم‌های پلیمری (LDPE) از جنس پلی اتیلن تهیه شده حاوی نانو ذرات مس با مقادیر ۲/۵ ، ۵ و۱۰ درصد ریخته و با استفاده از دستگاه پرس حرارتی لبه پلاستیک‌ها دوخت داده شد. نمونه‌های بسته‌بندی شده در یخچال نگهداری شدند. این نمونه‌ها طی روزهای ۳، ۵، ۷، ۹، ۱۲، ۱۷، ۲۲، ۲۵ و ۲۹، پس از ذخیره سازی یکی از بسته‌ها به همراه نمونه شاهد از یخچال خارج کرده و مورد بررسی آزمایشات تعیین کیفیت و ارگانولپتیک و ظاهری قرار گرفتند. این آزمایشات طبق موسسه تحقیقات استاندارد صنعتی ایران ارایه شده و شامل آزمایشات تعیین pH و میزان رشد باکتری‌ها و توتال کانت می باشد.

- کشت و شمارش کلی میکروبی

مقدار ۱۰ گرم/میلی لیتر از نمونه شیر خام و فرآورده‌های آن با ۹۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیکی استریل مخلوط و کاملا همگن شد و سپس لوله های رقت ۰/۱ و ۰/۰۱ با سرم فیزیولوژیکی استریل تهیه گردیدند. از هر رقت به صورت سطحی در محیط نوترینت آگار (pH= ۳/۵) کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای $37^{\circ}C$ روز گرمخانه‌گذاری و پس از رشد کلونی‌ها مورد شمارش قرار گرفتند (استاندارد شماره ۲۴۰۶ سازمان ملی استاندارد ایران).

- بررسی میزان رهایش نانو ذرات در زمان انبارداری

برای اندازه‌گیری میزان نانو ذرات مس وارد شده به داخل نمونه‌های شیر از بسته‌های پلیمری حاوی نانو ذرات از دستگاه جذب اتمی shimadzu مدل AA – 670 استفاده شد. برای اسیدی کردن نمونه ها، ابتدا در یک بالن حجمی ۱۰۰ میلی لیتر، ۵۰ میلی لیتر از تری کلرو استیک

اسید با ۵ میلی لیتر از نمونه شیر مخلوط و با آب مقطر به حجم رسانده شد. بعد اینکه نمونه‌ها اسیدی شد جهت جدا شدن فاز جامد شیر از سرم آن به مدت ۴۸ ساعت در دمای آزمایشگاه (۲۰ درجه سلسیوس) نگهداری شدند. بعد از اسیدی شدن شیر و جدا شدن سرم از فاز جامد، جهت حذف و از بین بردن پروتیین‌های و هیدروکربن‌ها (درشت مولکول‌ها) موجود در شیر، نمونه‌ها با ۵ میلی‌لیتر اسیدنیتریک ۶۵٪ مخلوط و در دمای ۹۰ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه حرارت داده شد. تا کاتیون مس بصورت خالص باقی بماند وجذب آن به راحتی خوانده شود. سپس به هر نمونه ۲۰ سانتی متر مکعب آب دیونیزه اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه جداسازی مجدد با سانتریفوژ (سرعت ۱۰۰۰ دور بر دقیقه) انجام شد. سرم بدست آمده از فاز آبی جهت تزریق به دستگاه جذب اتمی الکتروترمال استفاده شد و جذب بدست آمده قرائت شد. الکترون‌های اتم ها با جذب طول موج مشخصی از انرژی می‌توانند به سطوح بالاتر انرژی بروند و برای مدت کوتاهی به حالت برانگیخته در بیایند. هنگامی که اتم برانگیخته به حالت پایه برمی‌گردد طول موج مشخصی از خود ساطع می‌کند با اندازه‌گیری میزان جذب نمونه و رسم منحنی کالیبراسیون و قانون بیر لامبرت می توان به میزان نمونه مجهول پی برد. در این تحقیق با استفاده از قانون بیرلامبرت مقدار غلظت کاتیون مس موجود در شیر مورد بررسی قرار گرفت (Hankinson, *et al*. 1975).

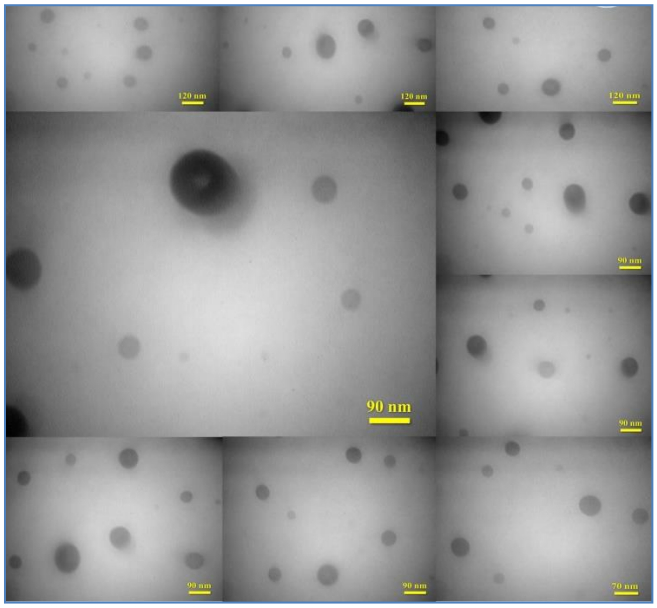
- تجزیه و تحلیل آماری

یافته‌های مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۱۷) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. پس از انجام آمار توصیفی بر روی داده‌های مطالعه، بصورت میانگین و انحراف معیار ارائه گردید. آزمون مقایسه میانگین گروههای شاهد با نانوکامپوزیت (۵٪ و ۱۰٪) بصورت دو به دو توسط آزمون تی (Two sample assuming unequal variances) به تفکیک متغیرهای مورد بررسی (pH و میزان رهایش و درصد جذب رطوبت) انجام گردید.

یافته‌ها

- میکروسکوپی الکترونی عبوری

شکل ۱ تصاویر میکروسکپ الکترونی عبوری فیلم‌های پلی‌اتیلنی حاوی نانو ذرات مس را نشان می‌دهد. این تصاویر، توزیع نسبتاً یکنواخت نانو ذرات در فیلم‌های نانوکامپوزیتی را نشان می‌دهند. توزیع یکنواخت نانو ذرات در بستر پلیمر با افزایش قدرت ضد میکروبی پلیمر حاصل به‌دلیل افزایش سطح تماس با میکروارگانیسم‌ها رابطه مستقیمی دارد. همچنین توزیع یکنواخت نانو ذرات بر میزان مقاومت فیلم کامپوزیتی در مقابل عبور رطوبت و گازها و نیز مقاومت در برابر نورUV رابطه مستقیمی دارد. با توجه به شکل ۱ نانو ذرات مس (با قطر تقریباً ۵۰ نانومتر) به خوبی در بستر پلیمر توزیع شده‌اند.



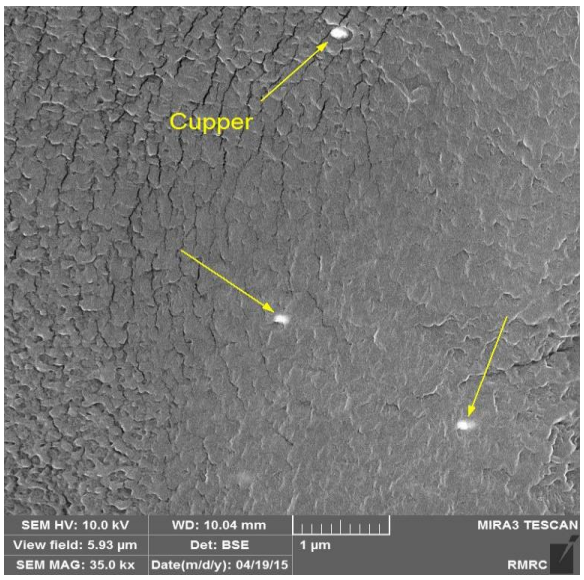
شکل ۱- مجموع تصاویر TEM از فیلم پلی اتیلن/ مس با ۱۰٪ وزنی از نانو ذرات با مقیاس های مختلف از نواحی مختلف فیلم سنتز شده

- بررسی ساختار فیلم کامپوزیت با میکروسکوپی الکترونی روبشی

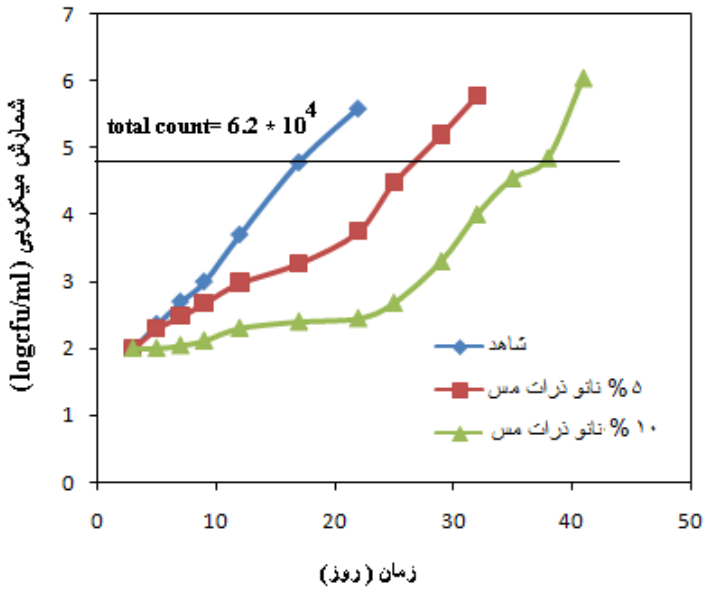
تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از فیلم تهیه شده در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج بررسی مورفولوژی سطح نانو کامپوزیت نشان می‌دهد که نانوکامپوزیت تهیه شده دارای ساختار همگن بوده و قطر متوسط ذرات مس در فیلم کامپوزیت حدود ۹۰ نانومتر می‌باشد. البته در برخی مکانها تجمع ذرات و توده‌ای شدن مشاهده می‌شود که به دلیل ابعاد بسیار کوچک و انرژی سطحی بالای نانو ذرات است، که موجب چسبیدن ذرات به هم می‌شود. ساختار یکنواخت سطح نشانگر توزیع مناسب نانو ذرات در ماتریس پلی‌اتیلن می‌باشد که تصاویر بدست آمده از میکروسکوپ الکترونی عبوری را تایید می‌کند.

- آزمون‌های میکروبی، pH و آزمون پایداری حرارتی شیر

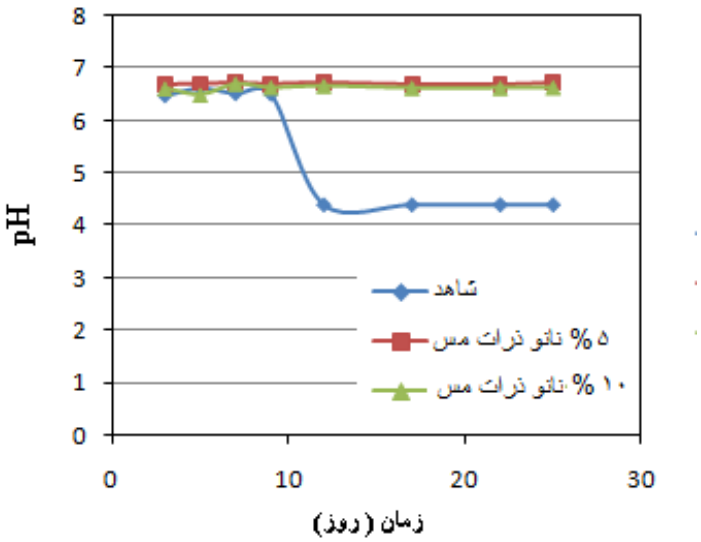
نتایج آزمون‌های میکروبی شیر در شکل ۳ به ترتیب برای نمونه شاهد و نمونه فیلم کامپوزیت دارای نانو ذرات مس ۵٪ و ۱۰٪ نشان داده شده است.



شکل ۲- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (FESEM) حاصل از نانومس/ پلی‌اتیلن درمقیاس یک میکرومتر



شکل ۳- نتایج شمارش باکتری شیر بسته بندی شده در پلاستیک‌های نوع معمولی و حاوی نانو ذرات مس (۵ و ۱۰٪ وزنی)



شکل ٤- نتایج pH شیر بسته بندی شده در پلاستیک‌های نوع معمولی و حاوی نانو ذرات مس (۵ و ۱۰٪ وزنی)

مجموع باکتری‌های شمارش شده در شکل ۴ نشان داده شده و برای شیر خام $۱/۴\times۱۰^{۹}$ cfu/ml می‌باشد. ولی در شیر پاستوریزه شده این میزان به ۱×۱۰^{۲} cfu/ml کاهش می‌یابد که به دلیل انجام عمل پاستوریزاسیون می‌باشد. در نمونه‌های شیر نگهداری شده در فیلم شاهد، از روز دوازدهم pH نمونه شیر به شدت کاهش پیدا کرده و به ۴/۳۹ می‌رسد که در محدوده اسیدی است. این عامل نشانگر فساد نمونه‌ها در این محدوده pH می‌باشد. تعداد باکتری‌های شمارش شده نیز از روز ۱۷ به میزان ماکزیمم خود $۶/۲\times۱۰^{۴}$ cfu/ml افزایش می‌یابد. بر اساس استانداردهای ملی و بین‌المللی (ISIRI 2406, 1381) تعداد باکتری‌ها در نمونه‌های شیر بسته‌بندی شده در فیلم شاهد نشاندهنده فساد در این نمونه‌ها در روز ۱۷ می‌باشد.

نتایج بررسی‌های انجام شده برای نمونه‌های بسته‌بندی شده در فیلم با ۵٪ نانو ذرات مس نشان می دهد که تغییرات ناگهانی در تعداد باکتری‌های شمارش شده از روز ۳۸ قابل مشاهده است. نتایج نشان می‌دهد که میزان باکتری‌های شمارش شده تا قبل از این روز تغییر چشمگیری را نشان نمی‌دهد. مقایسه pH نمونه‌های بسته‌بندی شده شیر در داخل نمونه‌های نانوکامپوزیت ۵٪ مس/ پلی‌اتیلن نشان می‌دهد که با وجود گذشت ۳۵ روز تغییری در pH نمونه‌های شیر ایجاد نشده است. با توجه به اینکه تغییرات pH یکی از مهمترین علائم شروع فعالیت باکتری‌های مولد فساد شیر است. عدم تغییر pH بعد از این مدت نشان دهنده تاثیر ضدمیکروبی نانو ذرات مس در نمونه‌های شیر بسته‌بندی شده در بسته‌های حاوی ۵٪ نانوکامپوزیت مس/ پلی‌اتیلن می‌باشد.

نتایج بررسی‌های انجام شده برای نمونه‌های بسته‌بندی شده در فیلم با ۱۰٪ نانو ذرات مس نشاندهنده تغییرات ناگهانی در تعداد باکتری‌های شمارش شده ازروز ۴۱ است. نتایج نشان می‌دهد که میزان باکتری‌های شمارش شده تا قبل از ۴۱ روز تغییر چشمگیری را نشان نمی‌دهد.

آزمون پایداری در مقابل حرارت به روش جوشاندن برای نمونه‌های شیر در فیلم نانو کامپوزیت و فیلم پلی‌اتیلن معمولی در روزهای ۱۲، ۱۷، ۲۲، ۲۵، ۲۹، ۳۲، ، ۳۵، ۳۸ و ۴۱ صورت گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که در نمونه‌های شیر بسته‌بندی شده در پلی‌اتیلن معمولی از روز ۱۲ ام پایداری در مقابل حرارت کاهش یافته و لخته شدن شیر صورت گرفت. در نمونه‌های شیر بسته‌بندی شده در نانوکامپوزیت مس ۵٪ این زمان به ۳۸ روز افزایش یافت. با افزایش ترکیب درصد نانو ذرات مس در نمونه‌های ۱۰٪ وزنی این زمان ۴۱ روز افزایش یافت.

- آزمون میزان نفوذ پذیری نسبت به رطوبت

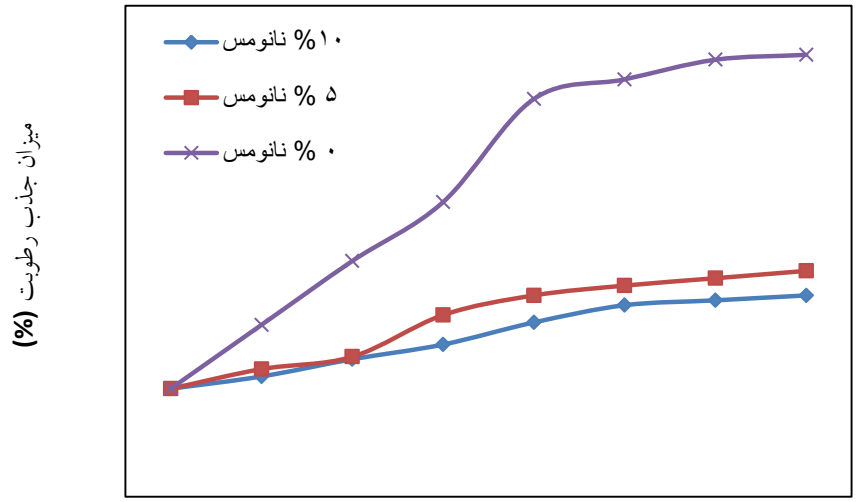
نتایج اندازه‌گیری میزان رطوبت جذب شده در فیلم نانوکامپوزیت LLDPE/Cu در شکل ۵ نشان داده شده است. همانطور که نتایج نشان می‌دهد، میزان جذب رطوبت در نمونه‌های شاهد و ۵٪ و ۱۰٪ نانو ذرات مس به ترتیب

۱۲/۷۵±۵/۲۹، ۷/۲±۱/۸۵۱ و ۶/۵۷±۱/۴۱۲ می‌باشد. تحلیل آماری نتایج جذب رطوبت نمونه فاقد نانو ذرات و ۵٪ نانو ذرات مس بیانگر وجود ارتباط معنی‌دار (t-test= ۲/۷۹۸) میان آنهاست. این ارتباط بین نمونه شاهد و ۱۰٪ نانو ذرات مس نیز کاملا معنی‌دار (t-test= ۳/۱۸۷) برآورد گردید. اما میان نمونه ۵٪ و ۱۰٪ نانو ذرات ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد.

- **آزمون میزان رهایش نانو ذرات در زمان انبارمانی**

نمونه‌های شیر بسته‌بندی شده در نانو کامپوزیت LLDPE/Cu به منظور بررسی میزان رهایش نانو ذرات درون ماده غذایی بسته‌بندی شده، براساس استاندارد شماره ۹۲۶۶ مورد بررسی قرار گرفت. این بررسی بر روی نمونه‌های شیر بسته بندی شده در فیلم پس از ۴۵ روز انجام گردید. نتایج بدست آمده از آنالیز نمونه‌های شیر بسته‌بندی شده در فیلم شاهد و LLDPE/Cu با ترکیب ۵ و ۱۰٪ از نانو ذرات مس در جدول ۱ ارائه شده است.

نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که بعد از ۴۵ روز بسته بندی شیر در فیلم نانو کامپوزیت LLDPE/Cu حاوی ۵٪ و ۱۰٪ نانو ذرات مس، به ترتیب به مقدار ۱/۰۴ ±۰/۰۲ ppb و ۲/۱±۰/۲ ppb از ذرات مس در نمونه‌های شیر نفوذ نموده است. تحلیل آماری نتایج میزان رهایش نانو ذرات میان نمونه شاهد و ۵٪ نانو ذرات مس بیانگر وجود ارتباط معنی‌دار (t-test= ۱۱۶/۵۹) میان آنهاست. این ارتباط بین نمونه شاهد و ۱۰٪ نانو ذرات مس نیز کاملا معنی‌دار (t-test= ۱۸/۱۴) برآورد گردید. این ارتباط میان نمونه ۵٪ و ۱۰٪ نانو ذرات نیز ارتباط معنی‌داری (t-test= ۶/۰۳) مشاهده شد.



شکل ۵- میزان جذب رطوبت (نفوذ پذیری) بخار آب در نمونه های کامپوزیت LDPE بدون نانو ذرات و حاوی ۵٪ و ۱۰٪ نانو ذرات مس

جدول ۱- نتایج آنالیز نمونه‌های شیر هضم شده از نظر میزان رهایش نانو ذرات در محلول شیر بسته بندی شده در فیلم کامپوزیت LLDPE/Cu

میزان رهایش مس در شیر (ppb)	نوع بسته بندی
۲/۱±۰/۲	حاوی ۱۰٪ نانو ذرات مسLLDPE/Cu
۱/۴±۰/۰۲	حاوی ۵٪ نانو ذرات مسLLDPE/Cu
۰/۰۰۴±۰/۰۰۵	بسته بندی معمولی

بحث

نتایج حاصل از شمارش میکروارگانیسم‌ها درشیر موجود در بسته‌های پلی‌اتیلن خالص پس از ۱۷ روز بیانگر افزایش تعداد میکروب‌ها (کپک‌ها و مخمرها و باکتری‌ها) است. درشیر موجود در بسته‌های نانوکامپوزیتی این رشد میکروبی به طور چشمگیری کاهش یافته است. طبق شکل ۳ افزایش جمعیت میکروبی با افزایش غلظت نانو ذرات مس در نمونه های شیر رابطه معکوس دارد به طوری که با افزایش غلظت نانو ذرات مس تا ۱۰ ٪قدرت ضدمیکروبی فیلم حاصل نسبت به بسته‌های حاوی ۵ /۰ ٪ نانو مس، افزایش می‌یابد. این موضوع را می‌توان به افزایش تعداد نانو ذرات و افزایش مقدار پراکسید هیدروژن تولید شده از سطح ذرات نسبت داد. تولید گونه‌های حاوی اکسیژن فعال یکی از مهمترین دلایل فعالیت ضدمیکروبی نانو ذرات ذکر شده است (Adams *et al*., 2006). در شیر موجود در بسته‌های پلی‌اتیلنی خالص، پس از ۱۷ روز انبارداری، تعداد کپک‌ها، مخمرها و باکتری‌ها به ۶/۲ logcfu/ml می‌رسد. در شیر بسته‌بندی شده در بسته‌های ضد میکروبی متوسط تعداد کپک‌ها، مخمرها و باکتری‌ها پس از ۳۸ روز به کمتر از متوسط لگاریتم تعداد کلنی در میلی‌لیتر (۶ logcfu/ml) حد مجاز جمعیت میکروبی شیر تازه در شرایط یخچال رسیده است (Raccach *et al*., 2007). اما پس از ۴۱ روز انبارمانی در کلیه بسته‌ها تعداد کلیه میکروارگانیسم‌ها از حد مجاز اشاره شده بالاتر رفته است. به طور کلی، شیر موجود در بسته‌های پلی‌اتیلن سبک با ۱۰ ٪ نانوکامپوزیت نقره کمترین رشد میکروبی را پس از ۴۱ روز انبارداری نسبت به سایر بسته‌ها به خود اختصاص داده‌اند. تحقیقات مشابه نشان می‌دهد که فیلم حاوی نانو ذرات نقره در بسته‌های گوشت مرغ می‌تواند رشد میکروب‌ها را تا۴۰ ٪ کاهش دهد (Fernández *et al*., 2009). برخی محققان دلیل اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره را تولید رادیکال آزاد در محیط میکروب‌ها و سبب صدمه به غشاء و انهدام آنها بیان کردند (Kim *et al*., 2007).

شیر پاستوریزه دارای ظاهری روشن، بوی طبیعی و مطبوع، فاقد طعم ترشیدگی یا هر گونه طعم غیرطبیعی است، چنانکه کمی از آن به طور آزمایشی جوشانده شود در مقابل حرارت پایدار بوده و اصطلاحاً لخته نخواهد شد. آزمون حرارتی برای نمونه‌های شیر در فیلم نانو کامپوزیت و فیلم پلی‌اتیلن معمولی نشان داد که در نمونه‌های معمولی از روز ۱۷ ام و همزمان با افت pH و افزایش رشد میکروارگانیسم‌ها، پایداری در مقابل حرارت کاهش یافته و لخته شدن شیر صورت گرفت. این زمان در نمونه‌های شیر بسته‌بندی شده در نانو کامپوزیت مس، با ترکیب درصد ۵ و ۱۰٪ به ترتیب به ۳۸ و ۴۱ روز افزایش یافت که با نتایج آزمون‌های میکروبی و pH مطابقت خوبی نشان می‌دهد. آزمون پایداری حرارتی شیر به تنهایی نمی‌تواند تایید کننده سلامت فراورده باشد ولیکن در راستای آزمون‌های میکروبی و فیزیکی تایید کننده نتایج بدست آمده از این آزمون‌ها خواهد بود.

رطوبت به عنوان یکی از فاکتورهای مهم در افزایش رشد میکروارگانیسم‌هاست و بنابراین موجب فساد مواد غذایی در مدت زمان کوتاه‌تر می‌گردد. جذب رطوبت یک فیلم، در درجهٔ اول به ویژگی آبدوستی آن پلیمر یا بیوپلیمر و سپس به وجود حفرات و فضاهای خالی در بین زنجیرها بستگی دارد. نتایج بررسی میزان رطوبت فیلم نانو کامپوزیت نشان داد که افزودن نانو مس، مقاومت فیلم پلیمری را در برابر رطوبت افزایش می‌دهد. اثر نانوذرات مس در کاهش جذب رطوبت فیلم پلیمری را به صورت‌های مختلفی می‌توان توجیه نمود. مهمترین مکانیسم پیشنهاد شده، این است که حضور ذرات نانومس در ماتریکس بیوپلیمری، باعث ایجاد مسیرهای زیگزاگ و پرپیچ و خمی برای نفوذ مولکول‌های بخار آب می‌شود. در واقع در حضور نانو مس، مولکول‌های بخار آب برای عبور از فیلم، بایستی مسیر طولانی‌تر و پیچیده تری را طی کنند و همین مسئله باعث کاهش میزان نفوذ مولکول‌های بخار آب می‌شود. بنابراین تأثیر نانوذرات مس در کاهش جذب رطوبت فیلم‌های نانوکامپوزیت، به شکل ساختمانی و نحوهٔ قرارگیری آن در بین زنجیرهای بیوپلیمر مربوط می‌شود نه ترکیب شیمیایی و ساختار مولکولی آن (Carvalho *et al*., 2001; Huang *et al*., 2005). در تحقیقات اخیر مشخص شد که این ویژگی بازدارندگی فیلم‌های پلی‌مری، با افزودن نانو ذرات بهبود می‌یابد (Paralikar *et al*., 2008; Svagan *et al*., 2009).

نانو کامپوزیت‌های پلیمری در بردارنده نانوذرات فلزی و اکسید فلزی، به دلیل خواص بهینه آنها (مقاومت در برابر عبورگاز، انعطاف‌پذیری، خواص آنتی باکتریال و خواص ضد میکروبی) به صورت گسترده ای رشد یافته‌اند. کاربرد برخی از این نانو ذرات ازجمله نقره به دلیل خاصیت ضد میکروبی آن، در بسته‌بندی مواد غذایی بیشتر مورد استفاده قرار گرفته است (Walczak *et al*., 2013). بنابراین ارزیابی میزان مهاجرت نانو ذرات از ظرف غذا به ماده غذایی، و خطر مصرف مواد نانو برای مصرف کننده‌ها بسیار با اهمیت است. بررسی‌ها نشان می‌دهد که نانوذرات آزاد مهندسی شده می‌توانند از موانع سلولی عبور کرده و منجر به تولید اکسی رادیکال‌ها و متعاقبا تخریب اکسیداتیو سلول شوند (Donaldson *et al*., 2004; Li *et al*., 2003). مطالعات نظری پیرامون مهاجرت نانو ذرات از بسته‌بندی به ماده غذایی، نشان می‌دهد که مهاجرت نانو ذرات از ماتریس پلیمری با دانسیته پایین مانند پلی الفین، پلی اتیلن سبک و پلی پروپیلن زمانی رخ می‌دهد که اندازه نانو ذرات بسیار کوچک در محدوده یک نانو متر باشد (Simon *et al*., 2008). نتایج حاصل از این تحقیق در بررسی میزان مهاجرت نانو ذرات مس از فیلم نانوکامپوزیت به شیر نشان می‌دهد که پس از گذشت بیش از ۴۵ روز، میزان نانو ذرات موجود در شیر بسیار محدود می‌باشد. نتایج همچنین نشان می‌دهد که میزان نفوذ این ذرات با افزایش ترکیب درصد نانو ذرات مس در ماتریس پلیمر از ۵ به ۱۰٪ افزایش می‌یابد و لی همچنان کمتر از حد مجاز ارائه شده در قوانین اروپایی می‌باشد. این نتایج با یافته‌های اچیگون و همکارانش در بررسی میزان مهاجرت نانو ذرات نقره نیز مطابقت دارد (Echegoyen *et al*., 2013).

نتیجه‌گیری

نتایج کلی نشان می‌دهد که استفاده از نانو ذرات مس ۵٪ وزنی به طور چشمگیری ماندگاری شیر را افزایش می‌دهد ولیکن با افزایش مس تا ۱۰٪ تفاوت معنی‌داری در نتایج بررسی‌ها نشان نمی‌دهد. لذا نانو ذرات مس با ۵٪ وزنی به عنوان محدوده بهینه انتخاب می‌شود.

منابع

بی‌نام. (۱۳۸۶). بسته‌بندی - مقررات کلی فیلم‌های پلاستیکی مورد استفاده در بسته‌بندی مواد غذایی - ویژگی‌ها و روش‌های آزمون. استاندارد شماره ۹۵۴۳.

بی‌نام. (۱۳۸۰). شیر و فرآورده‌های آن- شیرخام- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون-ویژگی‌ها و روش‌های آزمون. استاندارد شماره ۲۴۰۶.

بینش، م.، مرتضوی، ع.، آرمین، م. و مرادی، م. (۱۳۸۸). بررسی تاثیر استفاده از نانو کامپوزیت نقره و دی اکسید تیتانیوم در بسته‌بندی مورد استفاده در نگهداری خرمای مضافتی بر تغییرات میکروبی آن طی دوره‌ی انبارداری. مجله علوم و صنایع غذایی. سال۲، شماره ۱، صفحات ۸-۱.

حسینی، م. (۱۳۹۰). تولید بسته‌بندی آنتی باکتریال مواد غذایی با استفاده از ترکیب نانوذرات نقره و اکسید روی. پایان نامه کارشناسی ارشد صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قوچان.

محمدی، آ. (۱۳۹۱). اثرات بسته‌بندی فعال حاوی نانوذرات ZnO و CuO بر برخی میکروارگانیسم‌های عامل فساد و پاتوژن مواد غذایی. پایان نامه کارشناسی ارشد صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی.

مرتضوی، ع. (۱۳۸۸). بررسی تاثیر بسته‌بندی‌های نانوکامپوزیت بر کیفیت و ماندگاری زرشک در مقایسه با بسته‌های معمولی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد.

ولی پور، پ.، سیدی، ل. و حامد، م. (۱۳۹۱) . تهیه و بررسی خواص فیلم پلی پروپیلن ضدباکتری با استفاده از نانوپوشش حاوی نانوذرات تیتانیم دی اکسید و روی اکسید. مجله علمی - ترویجی علوم و فناوری نساجی، سال دوم، شماره ۲، صفحه ۵۹-۶۳.

Adams, L. K., Lyon, D. Y. & Alvarez, P. J. (2006). Comparative ecotoxicity of nanoscale TiO_2, SiO_2, and ZnO water suspensions. Water Research, 40, 3527-3532.

Azizi Samir, M. A. S., Alloin, F. & Dufresne, A. (2005). Review of recent research into Cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite Field. Biomacromolecules, 6, 612–626.

Brody, A. L. (2007). Nanocomposite technology in food packaging. Food Technology, 61(10), 80–83

Carvalho, A. J. F., de Curvelo, A. A. S. & Agnelli, J. A. M. (2001). A first insight on composite of thermoplastic starch and kaolin. Carbohydrate Polymers, 45, 189–194.

Chaudhry, Q., Scotte, M., Blackburn, J., Ross, B., Boxall, A. & Castle, L. (2008). Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. Food Additives and Contaminants, 25(3), 241–258.

Donaldson, K., Stone, V., Tran, C. L., Kreyling, W. & Borm, P. (2004). Deposition and effects of fine and ultrafine particles in the respiratory tract. Journal of Occupational and Environmental Medicine, 61, 727–728.

Ebrahimiasl, S., Zakaria, A., Kassim, A. & Basri, S. N. (2015). Novel conductive polypyrrole/zinc oxide/chitosan bionanocomposite: synthesis, characterization, antioxidant, and antibacterial activities. International Journal of Nanomedicine, 10, 217—227.

Echegoyen, Y. & Nerín, C. (2013). Nanoparticle release from nano-silver antimicrobial food containers. Food and Chemical Toxicology, 62, 16–22.

Fernández, A., Soriano, E., López-Carballo, G., Picouet, P., Lloret, E. & Gavara, R. (2009). Preservation of aseptic conditions in absorbent pads by using silver nanotechnology. Food Research International, 42, 1105-1112.

Huang, M., Yu, J., Ma, X. & Peng, J. (2005). High performance biodegradable thermoplastic starch- EMMT nanoplastics. Polymer. 46, 3157-3164.

Hankinson, D. & Dairy, J. J. (1975). Potential sources of copper contamination of farm milk supplies measured by atomic absorption spectrophotometry. Jounal of Dairy Science, 58, 326.

Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K., Kim, J. H., Park, S. J. & Lee, S. J. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 3, 95–101.

Koutny, M., Lemaire, J. & Delort A. M. (2006). Biodegradation of polyethylene ilms with prooxidant additives. Chemosphere, 64, 1243–1252.

Lagaron, J. M., Cabedo, L., Cava, D., Feijoo, J. L., Gavara, R. & Gimenez, E. (2005). Improving packaged food quality and safety part 2: nanocomposites. Food Additives and Contaminants, 22(100), 994–998.

Li, N., Sioutas, C., Cho, A., Schmitz, D., Misra, C., Sempf, J., Wang, M., Oberley, T., Froines, J. & Nel, A. (2003). Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. Environmental Health Perspective, 111, 455–460.

Longano, D., Ditaranto N., Cioffi, N., Niso, F., Sibillano, T., Ancona, A., Conte, A., Nobile, M., Sabbatini, L. & Torsi, L. (2012). Analytical characterization of laser-generated copper nanoparticles for antibacterial composite food packaging. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 403, 1179-1186.

Mohanty, A. K., Misra, M. & Hinrichsen, G. (2000). Biofibres, biodegradable polymer and composites: an overview. Macromolecular Materials and Engineering, 276, 277- 124.

Paralikar, S. A., Simonsen, J. & Lombardi, J. (2008). Polyvinyl alcohol / cellulose nanocrystal barrier membranes. Journal of Membrane Science, 320, 248-258.

Raccach M. M. & Mellatdoust, M. (2007). The effect of temprature on microbial growth in orange juice. Journal of Food Processing and Preservation, 31,129-142.

Sawai, J. (2003). Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay. Journal of Microbiological Methods, 54, 177-182

Sawai, J. & Yoshikawa, T. (2004). Quantitative evaluation of antifungal activity of metallic oxide powders (MgO, CaO and ZnO) by an indirect conductimetric assay. Journal of Applied Microbiology, 96, 803–9.

Simon, P., Chaudhry, Q. & Bakos, D. J. (2008). Migration of nanosized layered double hydroxide platelets from polylactide nanocomposite films. Food Nutrition Research, 47, 105–113.

Sondi, I. & Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. Journal of Colloid Interface Science, 275, 177-182

Walczak, A. P., Fokkink, R., Peters, R., Tromp, P., Herrera Rivera, Z. E., Rietjens, I. M. C. M., Hendriksen, P. J. M. & Bouwmeester, H. (2013). Behaviour of silver nanoparticles and silver ions in an in vitro human gastrointestinal digestion model. Nanotoxicology.

http://dx.doi.org/10.3109/17435390.2012.726382.

Yoon, K., Hoon, B. & Park, J. (2007). Susceptibility constrants of e.coli and bacillus subtillis to silver and coper nanoparticles. Science of the Total Environment, 327(2-3), 572-575.