Karakterizacija filmova od alginata i kitozana s prirodnim antioksidansima iz ekstrakta ružmarina za pakiranje hrane

Hasl, Karolina

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:068428

Rights / Prava: Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO - BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.

Karolina Hasl

KARAKTERIZACIJA FILMOVA OD ALGINATA I KITOZANA S PRIRODNIM ANTIOKSIDANSIMA IZ EKSTRAKTA RUŽMARINA ZA PAKIRANJE HRANE

Rad je izrađen u Laboratoriju za pakiranje hrane na Zavodu za prehrambeno - tehnološko inženjerstvo Prehrambeno - biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Mije Kurek, Prehrambeno - biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Najveću zahvalu dugujem svojoj divnoj mentorici, doc. dr. sc. Miji Kurek na prihvaćenom mentorstvu i svoj pomoći tijekom izrade ovog diplomskog rada. Hvala na izdvojenom vremenu, trudu, razumijevanju, svom podijeljenom znanju i savjetima.

Izuzetno sam zahvalna svojim kolegicama Andreji, Ivani i Ani koje su mi bile suputnice, podrška, rame za plakanje i ogromna motivacija te su mi uljepšale ove studentske dane.

Hvala mojim roditeljima, bratu i baki koji su mi dali vjetar u leđa, uskakali na sve načine i pružali neizmjernu podršku.

Posebno se želim zahvaliti svom Mateju koji me uvijek bodrio, bio moja mirna luka i oslonac.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno - tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za pakiranje hrane

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

KARAKTERIZACIJA FILMOVA OD ALGINATA I KITOZANA S PRIRODNIM ANTIOKSIDANSIMA IZ EKSTRAKTA RUŽMARINA ZA PAKIRANJE HRANE

Karolina Hasl, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058211788

Sažetak: Cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj dodatka vodenog ekstrakta ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) (30 % v/v) na fizikalno-kemijska svojstva (boja, debljina, udio vode, topljivost, kapacitet bubrenja), barijerna svojstva (kisik, ugljikov dioksid i vodena para), sadržaj ukupnih polifenola, te biorazgradivost pripremljenih filmova na bazi kitozana (2 % m/v) i alginata (1,5 % m/v). Nadalje, ispitan je i utjecaj dodatka kalcijevih iona (Ca^{2+}) s ciljem umrežavanja matriksa alginatnih filmova. Ekstrakt ružmarina korišten je kao prirodni antioksidans, izvor bioaktivnih sastojaka za pripremu jestive aktivne ambalaže za pakiranje hrane. Dodatak ekstrakta ružmarina utjecao je na smanjenje udjela vode i kapaciteta bubrenja te propusnosti na vodenu paru, a povećao se udio polifenola, topljivost filmova te propusnost na plinove (O_2 i CO_2). Umrežavanjem alginatnih filmova povećala im se propusnost na vodu, kapacitet bubrenja, topljivost, udio vode, sadržaj polifenola. Dodatak ekstrakta ružmarina i umrežavanje sa Ca^{2+} nisu imali značajan utjecaj na biorazgradnju filmova.

Ključne riječi: *vodeni ekstrakt ružmarina, kitozan, alginat, biorazgradnja, propusnost, umrežavanje*

Rad sadrži: 48 stranica, 11 slika, 5 tablica, 75 literaturnih navoda, 0 priloga
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Mia Kurek

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Mario Ščetar (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Mia Kurek (mentor)
3. prof. dr. sc. Marko Obranović (član)
4. prof. dr. sc. Ivona Elez Garofulić (zamjenski član)

Datum obrane: 22. rujna 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Food Packaging

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Engineering

CHARACTERISATION OF FILMS MADE FROM ALGINATE AND CHITOSAN WITH NATURAL ANTIOXIDANTS FROM ROSEMARY EXTRACT FOR FOOD PACKAGING

Karolina Hasl, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058211788

Abstract: The aim of this study was to determine the influence of rosemary water extract (*Rosmarinus officinalis* L.) (30% v/v) on physico-chemical properties (color, thickness, water content, solubility, swelling capacity), barrier properties (oxygen, carbon dioxide and water vapour), total polyphenols content and biodegradability of edible films made from chitosan (2 % w/v) and alginate (1.5 % w/v). Furthermore, the influence of cross-linking alginate matrix with calcium ions (Ca^{2+}) on film properties was examined. Rosemary extract was used as a natural antioxidant, a source of bioactive ingredients for the preparation of edible films as active food packaging. The addition of rosemary extract resulted in decreased water content, swelling capacity and water vapour permeability, while polyphenol content, film solubility and permeability to gases (O_2 and CO_2) was increased. Cross-linking of alginate films increased their water vapor permeability, swelling capacity, solubility, water content, and polyphenol content. The addition of rosemary extract and/or crosslinking with Ca^{2+} ions did not have any significant effect on the biodegradation of tested films.

Keywords: *rosemary water extract, chitosan, alginate, biodegradation, permeability, cross-linking*

Thesis contains: 48 pages, 11 figures, 5 tables, 75 references, 0 supplements
Original in: Croatian
Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology**,** Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD. Mia, Kurek, Assistant professor

Reviewers:

1. Mario Ščetar , PhD, Assistant professor (president)
2. Mia Kurek, PhD, Assistant professor (mentor)
3. Marko Obranović, PhD, Assistant professor (member)
4. Ivona, Elez Garofulić, PhD, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: September 22th, 2022

1.UVOD 1
2.TEORIJSKI DIO 3
2.1. JESTIVA AMBALAŽA 3
2.2. JESTIVI FILMOVI 4
2.3. MATERIJALI ZA IZRADU JESTIVE AMBALAŽE 5
2.3.1. Jestivi filmovi od polisaharida 6
2.3.1.1. *Alginat* 7
2.3.1.2. *Kitozan* 9
2.3.1.3. *Plastifikatori* 12
2.4. JESTIVI FILMOVI S BIOAKTIVNIM KOMPONENTAMA 13
2.4.1. Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) kao izvor bioaktivnih sastojaka 14
2.5. KARAKTERIZACIJA MATERIJALA ZA PAKIRANJE HRANE 15
2.5.1. Debljina filma 15
2.5.2. Barijerna svojstva 16
2.5.3. Mehanička svojstva 16
2.5.4. Topljivost i udio vode 17
2.6. ZAKONSKA REGULATIVA 17
3.EKSPERIMENTALNI DIO 19
3.1. MATERIJALI 19
3.2. PRIPREMA JESTIVIH FILMOVA 19
3.3.PRIPREMA VODENOG EKSTRAKTA RUŽMARINA EKSTRAKCIJOM POTPOMOGNUTOM EKSTRAKCIJOM MIKROVALOVIMA 20
3.4. METODE KARAKTERIZACIJE FILMOVA 20
3.4.1. Određivanje debljine filmova 20
3.4.2. Određivanje boje filmova 20
3.4.3. Određivanje topljivosti filmova u vodi 22
3.4.4. Bubrenje filmova 22
3.4.5. Mjerenje propusnosti vodene pare kroz polimerni film 23
3.4.6. Određivanje propusnosti plinova 24
3.4.7. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenola 24
3.4.8. Biorazgradivost filmova 25
3.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA 26
4. REZULTATI I RASPRAVA 27
4.1. BOJA FILMOVA 27

4.2. DEBLJINA FILMOVA 29
4.3. TOPLJIVOST I BUBRENJE FILMOVA U VODI 30
4.4. UDIO UKUPNIH POLIFENOLA U FILMOVIMA 33
4.5. PROPUSNOST FILMOVA NA VODENU PARU 34
4.6. PROPUSNOST FILMOVA NA PLINOVE (O_2 I CO_2) 36
4.7. BIORAZGRADIVOST FILMOVA 37
5.ZAKLJUČCI 40
6.LITERATURA 41

1. UVOD

Pakiranje hrane u odgovarajuću ambalažu je ključan element završnog procesa pripreme u prehrambenoj industriji. Ambalaža štiti prehrambene proizvode od fizičkih oštećenja, mikrobiološke i kemijske kontaminacije, nepovoljnih vanjskih utjecaja (npr. kisik, vlaga, svjetlost) te time produljuje rok trajanja namirnicama i smanjuje količinu otpadne hrane. Neki od najčešće korištenih materijala za pakiranje hrane su papir, plastika, staklo, čelik, aluminij i različite legure. Konvencionalna pakiranja su obično namijenjena za jednokratnu upotrebu te predstavljaju ogroman teret za okoliš unatoč relativno visokim stopama recikliranja za neke materijale (više od 20 % za određeni papir i karton), dok se drugi, npr. plastika, obično recikliraju pri niskim stopama recikliranja (manje od 20 %). Sekundarni negativni utjecaji su onečišćenje okoliša stvaranjem CO_2 i emisija otrovnih tvari tijekom spaljivanja materijala za izradu ambalaže, oslanjanje na neobnovljive rezerve nafte i potencijalno moguće štetne interakcije između reciklirane plastike i hrane (Petkoska i sur., 2021).

Povećavanjem ekološke svijesti o ograničenim prirodnim resursima i utjecaju konvencionalne ambalaže na okoliš dolazi do porasta istraživanja i fokusiranja i prehrambene industrije kao i industrije materijala na razvoj održivih, biorazgradivih i jestivih materijala te održivih procesa proizvodnje. Skupine znanstvenika te prehrambena i farmaceutska industrija prepoznaju jestivu ambalažu kao alternativu ili dodatak konvencionalnoj ambalaži u svrhu smanjenja otpada i stvaranja novih aplikacija koje bi poboljšale stabilnost, kvalitetu, sigurnost i povećale raznolikost prehrambenih proizvoda (Janjarasskul i Krochta, 2010). Jedinstvena svojstva biomaterijala za dobivanje jestive ambalaže uključuju sposobnost zaštite hrane svojim barijernim i mehaničkim svojstvima, poboljšanje senzornih karakteristika, kontrolirano otpuštanje bioaktivnih sastojaka i kontrola prijenosa mase između komponenti heterogene hrane. Jestivi filmovi i premazi nastaju od polimera i kompozita koji su sigurni za konzumaciju i sposobni formirati kontinuiranu kohezivnu strukturu (Jeevahan i Chandrasekaran, 2019). Škrob, derivati celuloze, kitozan/hitin, gume, životinjski ili biljni proteini i lipidi su neki od polimera koji se primjenjuju u proizvodnji jestivih filmova, a zadovoljavaju uvjete ne toksičnosti, dobrih barijernih svojstva za vlagu i/ili plin, biorazgradivosti i jestivosti.

Razvoj jestivih filmova je jedno od najperspektivnijih područja u znanosti o hrani, između ostalog, i zbog mogućnosti njihovog obogaćivanja s bioaktivnim tvarima kao što su antimikrobne tvari, vitamini, antioksidansi, nutriceutici, tvari boja i arome. Ugradnja bioaktivnih tvari u jestive filmove može izmijeniti strukturu filma i modificirati njihovu funkcionalnost i primjenu na hranu. Do sada je nekoliko vrsta aktivnih komponenta i vitamina

iz biljaka, začinima i bilja (organske kiseline, prirodni biljni ekstrakti i biljna eterična ulja) ugrađeno u jestive filmove (Silva-Weiss i sur., 2013).

Ciljevi ovog diplomskog rada su bili sljedeći:

- Priprema jestivih, biorazgradivih filmova na bazi kitozana i natrijeva alginata;
- Utjecaj dodatka ekstrakta ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) na svojstva filmova;
- Utjecaj umrežavanja alginatnih filmova sa Ca^{2+} na svojstva filmova;
- Detaljna karakterizacija i usporedba fizikalno–kemijskih (boja, debljina, udio vode, topljivost, kapacitet bubrenja), barijernih (kisik, ugljikov dioksid i vodena para) i antioksidacijskih (sadržaj ukupnih polifenola) svojstava, kao i biorazgradivost pripremljenih filmova na bazi kitozana i alginata bez ekstrakta i s ekstraktom ružmarina, te umreženog alginatnog filma.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. JESTIVA AMBALAŽA

Ambalaža je neophodna da bi se očuvala kvaliteta prehrambenih proizvoda tijekom skladištenja i transporta, ali predstavlja sve veći ekološki problem zbog njenog nagomilavanja i problema sa zbrinjavanjem. Povećana stopa ambalažnog otpada koji se teško ili uopće ne razgrađuje, uzrokuje fokusiranje industrije prema razvoju održivih, biorazgradivih i/ili jestivih ambalažnih materijala. Biorazgradiva ambalaža može biti jestiva, ukoliko su sve komponente od kojih se sastoji prepoznate kao sigurne za ljudsku konzumaciju, odnosno imaju GRAS (Generally Recognized As Safe) status (Ghosh i Katiyar, 2021). Prednost ovakvog pakiranja je da se može konzumirati zajedno s hranom/pićem s kojim dolazi i tako ne stvara otpad koji je potrebno zbrinuti (Jeya i sur., 2020). Međutim, ukoliko se takva ambalaža i ne jede zajedno sa proizvodnom, opet se brže razgrađuje u usporedbi sa sintetičkim i biorazgradivim materijalima (Jeevahan i Chandrasekaran, 2019). Nadalje, navedena jestiva pakiranja zamišljena su sa svrhom poboljšanja stabilnosti, kvalitete i sigurnosti prehrambenih proizvoda ali i doprinose njihovoj raznolikosti (Janjarasskul i Krochta, 2010). Jestiva ambalaža izrađuje se od jestivih sastojaka kao što su prirodni polimeri koji imaju sposobnost formiranja neprekidne i kohezivne polimerne mreže. Glavni biopolimeri koji se koriste su proteini, polisaharidi, lipidi i smole. Jestiva pakiranja općenito obuhvaćaju jestive filmove, listove, premaze i vrećice. Jestivi filmovi (debljine < 254 μm) ili listovi (debljine > 254 μm) su samostalne strukture koje se izrađuju odvojeno od hrane, a zatim se stavljaju na hranu ili između njenih sastojaka ili se zatvaraju (varenjem) u obliku jestivih vrećica. S druge strane, jestive prevlake su tanki slojevi jestivih materijala koji se formiraju izravno na površini prehrambenih proizvoda od koje su neodvojivi (Janjarasskul i Krochta, 2010).

.

Slika 1. Prednosti jestive ambalaže (*prema* Petkoska i sur., 2021).

Povijesno gledano, koncept jestivog premaza za zaštitu i produljenje roka trajanja namirnica pojavio se još u 12. stoljeću, kada su u Kini voskom premazivali citruse kako bi im spriječili gubitak vode. Jestiva prevlaka, odnosno premaz, može se dobiti različitim metodama od kojih su tri osnovne: premazivanje, raspršivanje i četkanje s podkategorijama: premazivanje umakanjem, raspršivanjem, pjenjenjem, četkanjem, omatanjem, kapanjem, te premazivanje u fluidiziranom sloju. Nasuprot jestivim premazima, preteča jestivih filmova smatra se Japanska "yuba" iz 15.stoljeća, odnosno kožica nastala na površini kipućeg sojinog mlijeka usred denaturacije proteina soje. Yuba je prvi samostojeći jestivi film, a koristila se za očuvanje kvalitete i izgleda mljevenog mesa i povrća te kao sastojak juha (Ghosh i Katiyar, 2021).

2.2. JESTIVI FILMOVI

Jestivi filmovi su neovisne, samostojeće, biorazgradive strukture, napravljene od prehrambenih materijala, kojima se namirnica oblaže i tako stvara barijeru između namirnice i njene okoline. Izraz "jestivi" označava da je izrađen od biomaterijala koji se inače koriste u ljudskoj prehrani te se smatraju sigurnima za konzumaciju, a "filmovi" se odnosi na sposobnost materijala da stvori kontinuiranu kohezivnu strukturu (Saklani i sur., 2019; Jeya i sur., 2020). Uloga jestivih filmova je produljiti kvalitetu i rok trajanja prehrambenih proizvoda tako što ih štite od fizičkog, kemijskog i biološkog propadanja. Fenomen prijenosa mase je uglavnom odgovoran za narušavanje kvalitete namirnica, a podrazumijeva apsorpciju vlage, ulja te nepoželjnih mirisa, prodiranje kisika, gubitak arome i migraciju komponenti pakiranja u hranu

i dr. Navedene pojave mogu se pojaviti između hrane i atmosfere, hrane i materijala za pakiranje ili među heterogenim sastojcima hrane (npr. prelazak vode iz umaka od rajčice u tijesto za pizzu). Funkcija navedene polupropusne barijere, odnosno filma, je zaštititi prirodne slojeve namirnice, poboljšati fizikalnu čvrstoću prehrambenih proizvoda te njihove vizualne i taktilne karakteristike, spriječiti gubitak vode (transpiracija), omogućiti selektivnu izmjenu plinova uključenih u respiraciju namirnice kao što su kisik, CO_2 i etilen (Han, 2014). Jestivi filmovi također mogu spriječiti mikrobni rast na površini namirnice, kemijske promjene izazvane svjetlom i oksidaciju hranjivih tvari. Također, mogu biti nosioci aktivnih tvari, poput antioksidansa, antimikrobnih sredstava, vitamina, boja i aroma i dr. i tako mu poboljšati kvalitetu i/ili nutritivnu vrijednost. Dobar jestivi film trebao bi ispunjavati zahtjeve: (i) izvrsna senzorska kakvoća, (ii) dobra barijerna svojstva, (iii) dobra mehanička čvrstoća, (iv) visoka mikrobna stabilnost, (v) netoksičan, (vi) siguran za zdravlje, (vii) jednostavan za proizvodnju, (viii) ekološki prihvatljiv i (ix) niska cijena proizvodnje (Jeya i sur., 2020).

2.3. MATERIJALI ZA IZRADU JESTIVE AMBALAŽE

Glavne komponente naše svakodnevne hrane kao što su proteini, ugljikohidrati i lipidi mogu ispunjavati zahtjeve za formiranje jestivih filmova. Kao opće pravilo, masti se koriste za smanjenje izmjene vode, polisaharidi se koriste za kontrolu prijenosa kisika i drugih plinova, dok proteinski filmovi osiguravaju mehaničku stabilnost (Pavlath i Orts, 2009). Ovi se materijali mogu koristiti pojedinačno ili kao kompozitne mješavine za stvaranje filmova pod uvjetom da ne mijenjaju okus hrane na nepoželjno.

Pravilan odabir jestivih komponenti za izradu jestive ambalaže uglavnom ovisi o prehrambenom proizvodu za koji će se koristiti, te o sastavu materijala od kojeg je jestiva ambalaža izrađena, uključujući i način obrade. Jestiva ambalaža bi trebala biti senzorski kompatibilna s hranom koja se u nju pakira (Restrepo i sur., 2018). Većina jestivih filmova se brzo otapa u vodi i ustima, dok filmovi od nekih biopolimera kao što su šelak i protein soje mogu biti netopivi u vodi, ali su probavljivi nakon konzumacije (Rossman, 2009).

Slika 2. Biomaterijali sa ciljanom primjenom za jestiva pakiranja (*prema* Katiyar i Ghosh, 2021).

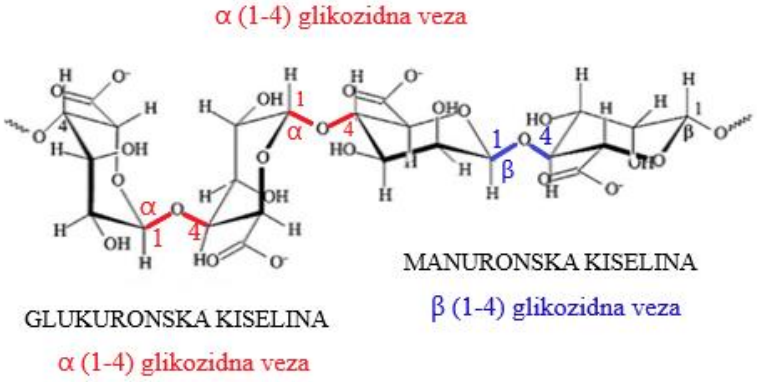
2.3.1. Jestivi filmovi od polisaharida

Polisaharidi su dugolančani polimeri formirani od mono- ili disaharidnih ponavljajućih jedinica međusobno povezanih glikozidnim vezama. Zbog velikog broja hidroksilnih skupina (-OH) ili drugih hidrofilnih ostataka u neutralnoj strukturi ugljikohidrata, vodikove veze imaju najznačajniju ulogu u stvaranju i karakteristikama filma. Općenito, matriks polisaharidnih filmova nastaje prekidanjem postojećih interakcija između dugolančanih polimernih segmenata, tijekom procesa koacervacije, i stvaranjem novih međumolekularnih interakcija, hidrofilnih i vodikovih veza, nakon isparavanja otapala. Polisaharidi su jeftini, jednostavni za rukovanje i imaju dobra svojstva stvaranja filma. Odlikuje ih dobra svojstva mehaničke i plinske barijere te su učinkovita barijera za ulja i lipida. Međutim, zbog svoje hidrofilne prirode pružaju nisku otpornost na prodiranje vode. Vlaga utječe na njihova funkcionalna svojstva. Polisaharidi se mogu modificirati dodavanjem soli, promjenom otapala, toplinskom želatinizacijom, promjenama pH, kemijskom modifikacijom hidroksilnih skupina, umrežavanjem polisaharida, hidroliza polisaharida i korištenje nanotehnologije u svrhu poboljšavanja fizikalno-kemijskih svojstava filma (Janjarasskul i Krochta, 2010). Polisaharidni materijali koji stvaraju filmove uključuju škrob, neškrobne polisaharide, gume i vlakna. Većina ugljikohidrata je neutralna, dok su neke gume negativno nabijene s vrlo iznimnim slučajevima pozitivnog naboja, kao što je guma arabika (Han, 2014).

2.3.1.1. Alginat

Alginati su neprobavljivi, prirodno ionski, hidrokoloidni polisaharidi koji se obično ekstrahiraju vrućom alkalnom ekstrakcijom (Khalil i sur., 2018) iz vanjskog sloja stanične stjenke različitih rodova smeđih algi (uglavnom *Laminaria hyperborean, Macrocystis pyrifera, Ascophyllum nodosum*). Alginat je naziv koji se obično koristi za jednovalentne soli alginske kiseline, a unutar staničnih stjenki smeđih algi nalazi se u obliku magnezijeve, kalcijeve i natrijeve soli alginske kiseline. Za alkalnu ekstrakciju alginata najčešće korišteno otapalo je natrijev karbonat (Tavassoli-Kafrani i sur., 2016). Osim dobivanja iz smeđih morskih algi, alginat mogu sintetizirati i neki sojevi bakterija *Azotobacter* i *Pseudomonas*, međutim, takva proizvodnja se još uvijek ne primjenjuje u komercijalne svrhe (Parreidt i sur., 2018).

S gledišta molekularne strukture, alginat je nerazgranati linearni kopolimer sastavljen od monomernih ostataka β-D-manuronske kiseline (M) i α-L-guluronske kiseline (G) koji su međusobno povezane 1- 4 glikozidnim vezama u različitim sekvencama ili blokovima (Slika 3). Guluronska kiselina je C5 epimer manuronske kiseline. Ove dvije poliuronske kiseline su asimetrično raspoređene unutar molekule, stoga se struktura alginata može podijeliti na tri regije (bloka), a to su homopolimerni M- i G- blok te heteropolimerni MG- blok. M blok, odnosno G blok, su regije unutar polimernog lanca koje su sastavljene od međusobno povezanih D- manuronskih (MMMM), odnosno L- guluronskih (GGGG) monomera. Nasuprot tome, MG blok čine naizmjence povezan ostatci obje poliuronske kiseline (MGMGMG).



Slika 3. Struktura alginata, glukuronska i manuronska jedinica povezane 1- 4 glikozidnom vezom. (b) Umrežavanje alginatnih polimernih lanaca sa kalcijevim ionom (*prema* Davis i sur., 2003).

Monomeri u polimernom lancu zauzimaju svoju energetski najpovoljniju strukturu. M-M jedinice su međusobno povezane ekvator - ekvator, G - G jedinice aksijalno - aksijalno, a M

- G sa ekvatorijalno - aksijalno orijentiranom (1 - 4) glikozidnom vezom. Zbog takvog povezivanja G regije (blokovi) u polimernom lancu su krute i savijene, a M regije su fleksibilne i nalik vrpci (Onsøyen, 1997) što se može vidjeti na slici 3. Omjer M/G i struktura blokova od velikog je značaja za fizikalno-kemijska svojstva alginatnih gelova, pa tako s porastom udjela M jedinica dobivaju se fleksibilniji gelovi, dok veći udio G jedinica daje čvršće i lomljivije gelove (Khalil i sur, 2018). Udio pojedinih regija ovisi o vrsti, starosti i dijelu alge iz koje je alginat izoliran te o okolišnim čimbenicima u kojima je alga rasla.

Alginat je proziran biopolimer, a između ostalog karakterizira ga i niska toksičnost, dobra biokompatibilnost, biorazgradivost, relativno niska cijena, izvrsna svojstva formiranja filma (Abdullah i sur., 2021). U odnosu na ostale alginate, natrijev alginat ima mogućnost formiranja filmova koji su slabo propusni na kisik i ulja, topljivi u vodi, čvrsti, sjajni, bez okusa i mirisa (Tavassoli-Kafrani i sur., 2016). Natrijev alginat ima puno hidroksilnih skupina, a manje skupina karboksilnih kiselina što omogućava stvaranje međumolekularnih vodikovih veza.

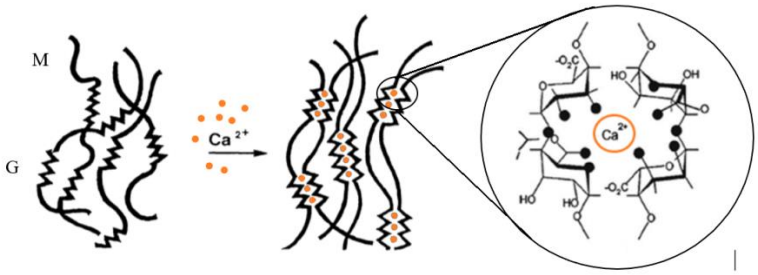
Hidrokoloidi se definiraju kao dugolančani hidrofilni polimeri koji zbog velikog broja hidroksilnih skupina u strukturi imaju povećanu sposobnost vezanja vode i zato dispergirani u vodi formiraju viskozne otopine i/ili gelove (Khalil i sur., 2018). Od većine korištenih hidrokoloida posebno mjesto zauzimaju alginati koji su jedni od najpopularnijih i najproučavanijih polisaharida. Hidrofilni karakter alginatu omogućava apsorpciju molekula vode 200-300 puta veću od svoje težine. Zbog svoje strukture, alginat može formirati čvrste filmove vlaknaste strukture u krutom stanju, stoga se smatraju dobrim filmogenim materijalom (Gheorghita, 2021).

Cijena alginata je relativno niska jer se izoliraju iz smeđih morskih algi koje su dostupne u izobilju, mogu rasti na raznim staništima te se lako uzgajaju u prirodnom okruženju. Također, ostale karakteristike morskih algi, kao što su biorazgradivost, hipoalergena priroda, biokompatibilnost te održivost čini ih pogodnim biopolimerom za proizvodnju jeftinog i biorazgradivog ambalažnog materijala.

Filmovi od alginata mogu se formirati (1) isparavanjem otapala iz alginatnog gela ili (2) postupkom koji uključuje sušenje otopine alginata nakon čega slijedi obrada otopinom kalcijeve soli kako bi se induciralo trenutačno umrežavanje (Janjarasskul i Krochta, 2010).

Geliranje alginata temelji se na afinitetu alginata prema određenim ionima i sposobnosti da te ione selektivno i kooperativno vežu (Draget i sur., 1997). Uvođenje dvovalentnog kationa u otopinu alginata može dovesti do procesa ionske izmjene u kojem alginat topljiv u vodi (npr.

u obliku Na ili K soli) izmjenjuje svoje protone s dodanim dvovalentnim kationom za koji ima veći afinitet vezanja. Posljedično dolazi do prijelaza iz soli u gel. Najčešće korišten dvovalentni kation je Ca^{2+}, a uklapa se u strukture guluronske kiseline poput jajeta u kutiji za jaja (engl. „*egg-box model*“) te se tako povezuju susjedne G regije alginatnih polimernih lanaca (slika 4). Sposobnost umrežavanja alginata uvelike ovisi o duljini i udjelu G blokova u polimeru. Što su G blokovi u alginatu dulji i njihov udio je veći, to se stvara više zona spajanja te je dobiveni gel čvršći. Alginatni gel se smatra djelomično otopinom, a djelomično krutinom. Zone spajanja predstavljaju kruti dio, dok su molekule vode fizički zarobljene u matriksu alginata ali još uvijek mogu slobodno migrirati. Afinitet alginata prema zemnoalkalijskim metalima, raste redoslijedom $Ca^{2+} < Sr^{2+} < Ba^{2+}$, a jednovalentni kationi i ioni Mg^{2+} ne mogu formirati gel. U nedostatku dvovalentnih iona, alginat se može koristiti samo za povećanje viskoznosti (Parreidt i sur., 2018). Glavna prednost alginata kao sredstva za stvaranje gela je njegova sposobnost formiranja toplinski stabilnih gelova koji se mogu stvrdnuti na sobnoj temperaturi.



Slika 4. Umrežavanje (engl. *crosslinking*) alginata i dvovalentnog kalcijevog kationa (*prema* Onsøyen, 1997).

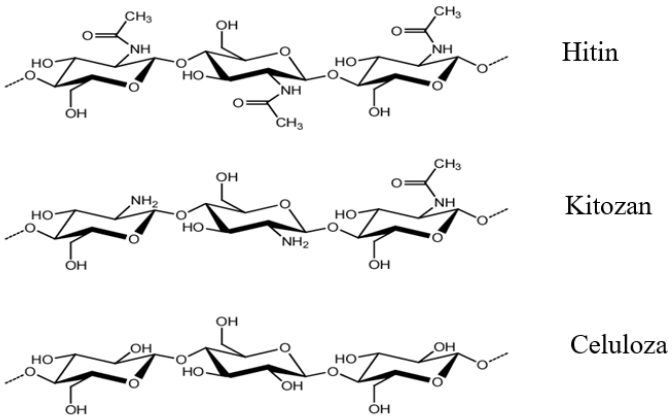
2.3.1.2. Kitozan

Kitozan je jedan od najbolje istraženih polisaharida i nakon celuloze, drugi najzastupljeniji polisaharid na svijetu. Komercijalnu primjenu do sada pronalazi u kemijskoj, biomedicinskoj i prehrambenoj industriji. Velik interes znanstvenika za kitozan proizlazi, primarno iz njegove sposobnosti stvaranja polimernih vlakana i prirodnog antimikrobnog učinka, te iz svojstava poput netoksičnosti, biorazgradivosti, biokompatibilnosti, biofunkcionalnosti te ne-antigenosti. Sve navedeno i činjenica da je kitozan jeftin i komercijalno dostupan biopolimer čine ga među najperspektivnijim materijalima za zamjenu sintetičkih, a posebice za primjenu u prehrambenoj industriji.

Može se dobiti iz brojnih obnovljivih izvora, a prvenstveno se dobiva iz hitina. Hitin se uglavnom izolira iz otpada industrije školjkaša (npr. škampi i rakovi). Prevođenje hitina u kitozan i njegove derivate predstavlja rješenje za zbrinjavanje otpadnih ljuski postrojenja za

preradu morskih plodova. Naime, stopa biorazgradnje hitina u takvom obliku je izrazito spora, iako je hitin prirodni organski polimer. Stoga, u ovom aspektu, proizvodnja kitozana je ekonomski održiva i rješava problem zbrinjavanja otpada od školjkaša. Alternativni izvori hitina, a time i kitozana, su gljive, kvasac, protozoe, zelene mikroalge i kukci, iako je njihova industrijska primjena ograničena.

Kitozan je kationski aminopolisaharid, velike mlekulske mase i polukristalne strukture, sastavljen od ponavljajućih monomera N- acetil – D- glukozamina i D- glukozamina linearno povezanih β - (1,4) glikozidnom vezom. Dobiva se alkalnom kemijskom deacetilacijom hitina. Deacetilacija hitina nije potpuna, stoga se kitozan sastoji od različitog udjela acetiliranih (N-acetil-2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoza) i deacetiliranih podjedinica (2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoza) što je prikazano na slici 5. Udio deacetiliranih podjedinica, odnosno D-glukozamina je uglavnom veći od 80 % (Azeredo i sur, 2010). Strukturni je analog celuloze od koje se razlikuje po acetamido ili amino skupinama na ugljiku 2 (C2) umjesto hidroksilnih skupina.



Slika 5. Razlika u strukturi polisaharidnog lanca hitina, kitozana i celuloze (*prema* De Alvarenga i sur., 2011).

Kemijska i fizikalna svojstva kitozana ovise o molekulskoj masi, stupnju deacetilacije, stupnju ionizacije/broju slobodne amino skupine. Kitozan je polikation čija gustoća naboja ovisi o stupnju deacetilacije i pH, te je jedini alkalni polisaharid u prirodi. Topiv je u razrijeđenim kiselim otopinama zbog protonacije $–NH_2$ skupina na položaju C2, a netopiv je iznad pH 7. Topivost ovisi o pK_a i jačini kiselog otapala. S povećanjem stupnja deacetilacije, lanac kitozana postaje fleksibilniji zbog formiranja nasumičnih zavojnica s više intramolekularnih vodikovih veza unutar lanca. Takvi lanci su manje isprepleteni, a mehanička

svojstva su lošija. Nasuprot tome, manje deacetilirani lanac je produženiji s jačim međumolekularnim interakcijama i zato su lanci međusobno isprepletenih s boljim mehaničkim svojstvima. Netoksičan je, bez mirisa, biokompatibilan i biorazgradiv. U ljudskom organizmu polako se razgrađuje na bezopasne proizvode (aminošećere) koji se u potpunosti apsorbiraju u tijelu.

Formiranje filma nastaje zbog očuvanja isprepletenosti lanaca i međumolekularnih interakcija, kao što su elektrostatička i vodikova veza, koje nastaju tijekom procesa sušenja (Cazón i Vázquez, 2019). Sposobnost kitozana da formira film omogućuje proizvodnju vlakana i materijala za oblaganje hrane, koji bi pridonijeli njenoj sigurnosti i produžili joj rok trajanja, a karakteriziraju ih dobra mehanička i antimikrobna svojstva te selektivna propusnost za CO_2 i O_2. Razlikujemo dvije vrste hidrogelova, ovisno o načinu pripreme. ,,Fizikalni'' hidrogelovi se formiraju na način da se polimerni lanci međusobno umrežavaju sekundarnim interakcijama kao što su ionske poprečne veze, vodikove veze i hidrofobne interakcije, za razliku od ,,kemijskih'' gelova u kojima polimerne lance drže zajedno ireverzibile kovalentne veze (Pellá i sur., 2018). S jedne strane, polimerni filmovi dobiveni fizikalnim metodama često u usporedbi s onima dobivenim kemijskim reakcijama rezultiraju lošijim mehaničkim i svojstvima propusnosti. S druge strane, kemijska sredstva za umrežavanje često izazivaju toksičnost ili daju druge neželjene učinke tim filmovima.

Fizikalni hidrogelovi na bazi kitozana mogu se pripremiti izravno iz nativnog kitozan (kombiniran sam ili s anionskim malim molekulama) ili u kombinaciji s drugim polimerom. Kitozan se samostalno umrežava (eng. *self-crosslinking*) onda kada je početna koncentracija polimera iznad kritične koncentracije lančanog isprepletanja te kada je postignuta ravnoteža između hidrofilnih i hidrofobnih interakcija (Pellá i sur., 2018). Takav gel je stabiliziran vodikovim vezama između lanaca kitozana. Postiže se nakon smanjenja prividne gustoće naboja, isparavanjem otapala ili promjenom dielektrične konstante medija. U kiselim uvjetima, amino skupine kitozana se protoniraju te nastaje polikation. Za razliku od neutralnog polimera, nastali polikationi se elektrostatski odbijaju i omogućuju otapanje polimera. U prisutnosti odgovarajućih suprotno nabijenih molekula, ovi polikationi podliježu elektrostatskom umrežavanju i tvore hidrogelove. Filmovi kitozana su krti, što se pripisuje visokoj temperaturi staklastog prijelaza polimera. Dodatkom plastifikatora, kao što su glicerol, sorbitol i polietilen glikol, poboljšava se fleksibilnost, elongacija i žilavost filma. Plastifikatori smanjuju međumolekulske sile i tako povećavaju pokretljivost polimernih lanaca i posljedično se temperatura staklastog prijelaza (T_g) snižava (Azeredo i sur, 2010).

Prednost kitozana u odnosu na druge biomaterijale je njegovo antimikrobno djelovanje na široki spektra mikroorganizama, uključujući gljive, alge i neke bakterije. Iako mehanizam djelovanja nije u potpunosti razjašnjen, od predloženih nekoliko modela antimikrobnog djelovanja najprihvatljiviji je model elektrostatskih interakcija između pozitivno nabijenih amino skupina (NH^{3+}) kitozana, protoniranih pri pH nižem od 6,3 i negativno nabijene površine bakterija. Rezultira dvojakim učinkom: (1) povećana propusnost stjenke mikroorganizma, što izaziva unutrašnju osmotsku neravnotežu i tako inhibira rast mikroorganizma; (2) hidroliza peptidoglikana u stijenci mikroorganizama uzrokuje istjecanja unutarstaničnih elektrolita i proteinskih komponenti niske molekulske mase (npr. proteini, nukleinske kiseline, glukoza i laktat dehidrogenaza). Veća učinkovitost antimikrobnog djelovanja je pri nižem pH jer je tada veća protonizacija kitozana. Također, povećanjem stupnja deacetilacije povećava se broj protoniranih amino skupina (NH_2) prisutnih u kitozanu što utječe na antimikrobno djelovanje (Elsabee i Abdou, 2013). Gustoća naboja na površini stanice mikroorganizma utječe na udio adsorbiranog kitozana, što je više adsorbiran veće su i promjene u strukturi i propusnosti stanične membrane. Najosjetljiviji su kvasci i pjesni, a zatim slijede Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije.

Amino skupine kitozana ostavljaju mogućnost za kemijsku modifikaciju s obzirom da kationske skupine mogu reagirati s bilo kojim negativno nabijenim tvarima, npr. mastima, kolesterolom, bazičnim ionima i proteinima. Kationsko svojstvo kitozana uz antimikrobno nudi i antioksidativno djelovanje, kao i sposobnost prijenosa i sporog otpuštanja funkcionalnih sastojaka (Janjarasskul i Krochta, 2010).

2.3.1.3. Plastifikatori

Plastifikatori su najčešće hidrofilni nehlapivi agensi male molekulske mase koji se dodaju u otopinu za stvaranje filmova kako bi im se poboljšala fleksibilnost i mehanička svojstva. Molekule plastifikatora smjeste se u polimernu mrežu i natječu za vodikove veze lanac- lanac dužinom cijele polimerne površine (Janjarasskul i Krochta, 2010), odnosno prekidaju interakcije polimer- polimer i stvaraju interakcije polimer- plastifikator. Najučinkovitiji plastifikator je onaj koji ima sličnu strukturu polimernoj, zato su hidrofilni plastifikatori poput poliola najprikladniji za polisaharidne filmove (Sothornvit i Krochta, 2005). Različite vrste prehrambenih poliola, glikola, šećera i lipida koriste se kao plastifikatori za izradu jestivih filmova. Plastifikatori koji se obično koriste u filmskim sustavima su monosaharidi, disaharidi ili oligosaharidi (npr. glukoza, fruktozno-glukozni sirupi, saharoza i med), polioli (npr. glicerol, sorbitol, derivati glicerila i polietilen glikoli), te lipidi i derivati

(npr. fosfolipidi, masne kiseline i surfaktanti). Općenito, plastikatori su bistri i bez mirisa, te stoga ne mijenjaju značajno izgled i boju filma. U literaturi su zabilježeni različiti utjecaji plastifikatora na svojstva filma. Dok polioli (kao što su glicerol i sorbitol) daju meku, glatku, čistu i homogenu površinu filma s dobrom mehaničkom čvrstoćom, glikolni plastificirani filmovi daju tvrdu, neprozirnu i hrapavu površinu s relativno slabom mehaničkom čvrstoćom (Jeya i sur., 2020).

Postoje dvije glavne vrste plastifikatora (Sothornvit i Krochta, 2005):

1. Sredstva koja mogu stvoriti velik broj vodikovih veza i tako mogu prekinuti polimer- polimer veze i održati veće udaljenosti između polimernih lanaca.
2. Sredstva koja su vrlo hidrofilna i higroskopna pa mogu privući velike količine molekula vode i formirati veliki hidrodinamički kompleks voda- plastifikatora

Za proteinske i polisaharidne jestive filmove, plastifikatori prekidaju inter- i intramolekularne vodikove veze, povećavaju udaljenost između polimernih molekula i smanjuju udio kristalne regiju u odnosnu na amorfnu. Molekule vode u filmovima djeluju kao plastifikatori. Voda je zapravo vrlo dobar plastifikator, ali se lako može izgubiti dehidracijom pri niskoj relativnoj vlažnosti (Han, 2014).

2.4. JESTIVI FILMOVI S BIOAKTIVNIM KOMPONENTAMA

Jestivi filmovi, osim što služe kao barijera koja izolira prehrambene proizvode od štetnog utjecaja okoline, mogu biti i nosioci bioaktivnih spojeva, najčešće antioksidansa. Cilj ugradnje bioaktivnih komponenti u jestive filmove je ostvariti njihovu interakciju sa upakiranim proizvodom kako bi osigurali sigurnost i kvalitetu proizvoda tijekom skladištenja te produljili rok trajanja proizvoda. Ambalaža koja ulazi u aktivnu interakciju sa upakiranim proizvodom spada u aktivnu, a naziva se još i interaktivnom ambalažom. Definirani su Uredbom (EZ) br. 450/2009, kojom se nastoje utvrditi posebna pravila za aktivne i inteligentne materijale i predmete koji nadopunjuju ona utvrđena Uredbom (EZ) br. 1935/2004, općom uredbom o materijalima i predmetima koji dolaze u dodir s hranom. Njome se utvrđuju posebni zahtjevi za stavljanje u promet tih materijala i predmeta te određuje postupak njihova odobrenja na razini EU-a aktivni i inteligentni materijali i predmeti koji dolaze u dodir s hranom. Aktivni jestivi filmovi i premazi mogu predstavljaju dva različita načina djelovanja, jedan od njih uključuje otpuštanje sastojaka na prehrambeni proizvod, poput antioksidansa i antimikrobnih sredstava, a drugi se temelji na uklanjanju nepoželjnih spojeva, poput kisika i ugljičnog dioksida iz pakiranja (Ribeiro i sur., 2020). Nehlapljive tvari, odnosno bioaktivne komponente

iz jestivih filmova kontrolirano se otpuštaju difuzijom iz matriksa filma na površinu hrane, a hlapljivi spojevi emisijom prelaze u atmosferu koja okružuje hranu i tako ostvaruju pozitivan učinak na zapakirani proizvod. Aktivni spojevi mogu biti agensi protiv posmeđivanja, bojila, arome, hranjive tvari, začini, antimikrobni ili antioksidativni spojevi te mogu biti prirodnog ili sintetičkog podrijetla (Barbosa i sur., 2021). Danas je sve jači zahtjev potrošača da se umjetni aditivi mijenjaju prirodnima zbog učinka na zdravlje. Agroindustrijski otpad ili nusproizvodi, npr. dobivenih preradom voća i povrća, ili industrije vina, piva, mliječnih proizvoda i mesa, pružaju praktične i ekonomične izvore aktivnih spojeva, kao što su eterična ulja, ekstrakti, polifenoli, antocijanini, pigmenti, peptidi i dr. (Salgado i sur., 2015). Prednosti inkorporacije aktivnih sastojaka u film u odnosu na izravno dodavanje u namirnicu su: potrebna manja količina aktivnih spojeva, aktivnost usmjerenu na površinu hrane, produljeni učinak antioksidansa zbog kontrolirane migracije od filma do matriksa hrane, smanjena potreba za dodatnim koracima obrade hrane (Sanches-Silva i sur., 2014). Kada se u jestivi film inkorporiraju bioaktivni spojevi takve filmove nazivamo funkcionalnima ukoliko jedne ili više bioaktivnih komponenti jestivih filmova djeluju pozitivno na ljudsko zdravlje.

2.4.1. Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) kao izvor bioaktivnih sastojaka

Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) je grmolika biljka iz porodice *Lamiaceae* koja samoniklo raste u Sredozemlju. Danas se ova biljka uzgaja diljem svijeta, a koristi se u kulinarstvu kao začin te u ljekovite svrhe. Ekstrakti ružmarina naširoko se koriste kao konzervansi u prehrambenoj industriji zbog svoje visoke inherentne antioksidativne aktivnosti. Ružmarin je stoljećima poznat kao ljekovita biljka, a pripisuju mu se mnoga potencijalna biološka svojstva: hepatoprotektivan, antimikroban, antitrombotik, diuretik, antidijabetik, protuupalan, antioksidans i antikancerogen. Nadalje, postoje studije u kojima ekstrakt ružmarina i njegove izolirane komponente djeluju inhibitorno na rast stanica raka dojke, jetre, prostate, pluća i leukemije (Borrás-Linares i sur., 2014).

Glavne skupine spojeva koje se nalaze u ružmarinu su fenolni diterpeni koji uključuju: karnoznu kiselinu, karnozol ili rozmanol; flavonoide kao što je genkvanin, cirsimaritin ili homoplantaginin; i triterpeni kao što je ursolna kiselina koji imaju snažno antioksidansko djelovanje (Moreno i sur., 2006). Koristi se za liječenje bolesti i za konzerviranje hrane (Nieto i sur., 2018). Najvažniji primjeri primjene ružmarina za obradu hrane i pakiranje dani su u Tablici 1.

Tablica 1. Primjeri primjene ružmarina za obradu hrane i pakiranje.

Tip primjene	Hrana	Osnovne karakteristike / postignuti efekt	Referenca
Jestivi film od želatine sa EO ružmarina	/	Antimikrobno djelovanje protiv *E.coli* i *P. Aeruginosa*	Yeddes i sur., 2019
Premaz od hidroksipropilmetilceluloze s dodatkom ružmarina	/	Inhibitorno djelovanje na bakteriju *Bacillus subtilis*i *Pseudomonas fluorescens*	Ulbin-Figlewicz i sur., 2013
Premaz - karboksimetil celuloza s dodatkom ekstrakta ružmarina	Govedina	Produljenje roka trajanja, usporena oksidacija, smanjen stupanj kvarenja	Liu i sur., 2012
Premaz od želatine s vodenim ekstraktom ružmarina	Sardina (*Sardina pilchardus*)	Usporava oksidaciju lipida, ali rast mikroorganizama nije inhibiran	Gomezestaca i sur., 2007
Prženje krumpirića u sojinom ulju s dodatkom EO ružmarina	Krumpir	Veća antioksidacijska aktivnost, smanjeno tamnjenje i užeglost ulja	Lalas i Dourtoglou, 2003
Aktivno pakiranje-polietilenski sloj sa EO ružmarina	Govedina	Reduciran broj psihrotrofnih, *Brochothrix*, *Pseudomonas* spp. i *Enterobacteriaceae*	Sirocchi i sur., 2017
Ružmarin u prahu	Ulje repice	Povećana oksidacijska stabilnost i sigurnost, bolja nutritivna vrijednosti ulja	Redondo-Cuevas i sur., 2018

EO – eterično ulje

2.5. KARAKTERIZACIJA MATERIJALA ZA PAKIRANJE HRANE

2.5.1. Debljina filma

Jestivi filmovi i premazi su tanki slojevi, uglavnom debljine manje od 0,3 mm. Debljina filmova ovisi o viskoznosti filmogene otopine, tako se otopine veće viskoznosti teže razlijevaju i posljedično se dobivaju deblji filmovi. Debljina filma je važan faktor za prijenos vode i plina između upakirane namirnice i vanjskog okoliša što uvelike utječe na rok trajanja upakirane namjernice. Što je debljina filma veća to je brzina difuzije manja. Također, debljina filma može

imati utjecaj na izgled i okus proizvoda. Ukoliko je zaštitni premaz jestiv i konzumira se zajedno s proizvodom, mora se minimalno nanijeti kako ne bi negativno promijenio izvorni okus proizvoda (Pavlath i Orts, 2009).

2.5.2. Barijerna svojstva

Barijerna svojstva jestivih filmova i premaza presudna su u predviđanju roka trajanja proizvoda s obzirom da je fizikalna i kemijska razgradnja hrane usko povezana s prijenosom plinova između proizvoda i okoline. S aspekta pakiranja i očuvanja hrane, najvažnije je poznavati prijenos (propusnost) na vodenu paru, O_2 i CO_2. Vodena para je povezana s količinom vlage u proizvodu, a O_2 i CO_2 s disanjem proizvoda. Propusnost na vlagu je kritičan parametar za formiranje filmova i premaza, a ovisi o debljini filma, temperaturi i relativnoj vlažnosti okolnog medija. Vlažnost proizvoda povezana je s difuzijom vodene pare koja je potaknuta razlikom tlaka para između hrane i okolnog zraka. Nadalje, filmovi i premazi također mogu djelovati kao barijera na plinove, posebice bitno kod pakiranja u modificiranoj atmosferi gdje smanjujući dostupnost kisika unutar pakovine što posljedično rezultira smanjenom proizvodnjom CO_2. Međutim, ovakva modificirana atmosfera trebala bi izbjegavati stvaranje anaerobnih uvjeta kako bi se izbjegao anaerobni rast unutar proizvoda (Parreidt i sur., 2018). Barijerna svojstva za hlapljive organske spojeve su važna kako bi se spriječio gubitak karakteristične arome i onemogućio prijelaz neugodnih mirisa iz okoline u zapakiranu hranu tijekom skladištenja i distribucije.

2.5.3. Mehanička svojstva

Jestivi filmovi/premazi štite upakirane/obložene prehrambene proizvode od fizičkih oštećenja izazvanih mehaničkim udarcima, pritiskom, vibracijama i drugim mehaničkim čimbenicima. Ispitivanja mehaničkih svojstava uključuju najčešće vlačnu čvrstoću, elongaciju pri pucanju, modul elastičnosti, silu prianjanja, otpornost na savijanje i drugo. Sastav polimera ima važan utjecaj na njegova mehanička svojstva. Vlačna čvrstoća i Youngov modul većine jestivih filmova su usporedivi, dok je elongacija pri pucanju vrlo niska te su filmovi vrlo lomljivi (Jeevahan i Chandrasekaran, 2019). Jestivi filmovi imaju lošija mehanička svojstva u odnosu na sintetičke materijale, a dodatkom stabilizatora, aditiva, plastifikatora i/ili emulgatora se može utjecati na njihovo poboljšanje.

2.5.4. Topljivost i udio vode

Topljivost filmova važno je svojstvo iz dva razloga: 1) zbog lakše probavljivosti i apsorpcije aktivnih sastojaka u organizmu nakon konzumacije i probave koja počinje u ustima sa žvakanjem i miješanjem sa slinom. 2) kako ne bi došlo do prijevremenog otapanja filma na površini namirnice. Udio vode u filmu određuje hidrofobnost odnosno hidrofilnost. Hidrofilni/hidrofobni karakter uvelike utječe na sva ostala svojstva filmova kao što su osjetljivost na vodenu paru; kontrolirano otpuštanje aktivne komponente; mehanička svojstva i propusnost na plinove i vodenu paru. Ovo svojstvo je također bitno poznavati prilikom dizajniranja formulacije, odnosno proizvodnje filma, a posebice s dodatkom aktivne komponente koja isto može biti hidrofilna ili hidrofobna. Ukoliko su i film i aktivna komponenta istog karaktera (npr. hidrofobni) tada se smatraju kompatibilnima.

2.6. ZAKONSKA REGULATIVA

Svi prehrambeni proizvodi koji se nalaze na tržištu Europske unije, pa samim time i Republike Hrvatske kao ravnopravne članice, moraju biti u skladu s Uredbom (EZ) br. 178/2002 Europskog parlamenta i Vijeća kojom su definirana opća načela i uvjeti zakona o hrani. Sigurnost materijala i predmeta koji dolaze u dodir s hranom je od iznimne važnosti zbog mogućnosti da stupe u interakciju s hranom tijekom njene obrade, skladištenja i prijevoza. Različite zemlje slijede različite propise o materijalu za pakiranje hrane, a takve varijacije mogu značajno utjecati na količinu podataka potrebnih da se odobri uporaba određenog materijala za pakiranje (Jeya i sur., 2020). Prema Uredbi (EZ) br. 1935/2004, svi materijali i predmeti koji dolaze u dodir s hranom trebaju ispunjavati četiri osnovna zahtjeva: (a) ne smiju ugrožavati zdravlje ljudi, (b) ne smiju mijenjati sastav hrane na neprihvatljiv način, (c) ne smiju mijenjati okus, miris ili teksturu hrane, (d) moraju biti proizvedene u skladu sa dobrom proizvođačkom praksom (DPP). U Republici Hrvatskoj prema Pravilniku o zdravstvenoj ispravnosti materijala i predmeta koji dolaze u neposredan dodir s hranom (NN 125/2009), materijalima se smatraju: metali i njihove slitine, emajl, cement, keramika i porculan, staklo, polimerni materijali (plastika uključujući lakove, premaze i prevlake, celuloza i elastomeri), drvo uključujući i pluto te tekstil.

Svjetska regulatorna tijela klasificiraju jestive filmove i premaze kao prehrambene proizvode, prehrambene sastojke, prehrambene aditive, tvari koje dolaze u dodir s hranom ili materijale za pakiranje hrane. S obzirom da se jestivi filmovi smatraju sastavnim dijelom hrane s kojom dolaze, moraju se pridržavati propisa koji se odnose na prehrambene proizvode. Iz toga

slijedi da svi sastojci koji se koriste za izradu jestivih filmova i/ili premaza moraju imati GRAS status (Jeya i sur., 2020).

Uredbom (EZ) br. 450/2009 opisani su aktivni i inteligentni materijali i predmeti koji dolaze u dodir s hranom. Aktivni materijali i predmeti u dodiru s hranom osmišljeni su da namjerno sadrže „aktivne" sastojke namijenjene otpuštanju u hranu ili apsorbiranju tvari iz hrane. Namijenjeni su produljenju trajnosti upakiranog proizvoda. S druge strane, inteligentni materijali registriraju uvijete u pakiranju, odnosno okolini koja ga okružuje i tako pružaju informacije o stanju hrane. Aktivni materijali i predmeti koji su u dodiru s hranom smiju mijenjati sastav ili organoleptička svojstva hrane samo ako su promjene sukladne odredbama EU koje se primjenjuju na hranu, kao što je Pravilnik o prehrambenim aditivima (NN 62/2010). Unutar europskog zakonodavnog okvira aditivi koji se dodaju u aktivno pakiranje podliježu Uredbi (EU) br. 1331/2008 o prehrambenim aditivima. Sastojci koji se koriste za jestive filmove i premaze moraju se nalaziti na listi dozvoljenih aditiva u hrani. Uporaba aditiva mora biti tehnološki opravdana i sigurna za zdravlje potrošača, a važno je navesti da je određeni aditiv korišten te koja su njegova korisna djelovanja i prednosti upotrebe.

Europski odbor za standardizaciju je donio normu ISO 13432:2002 koja se odnosi na "Zahtjeve za ambalažu koja se može obnoviti kompostiranjem i biorazgradnjom – Shema ispitivanja i kriteriji ocjenjivanja za konačno prihvaćanje ambalaže". Ova norma definira karakteristike koje ambalaža mora imati da bi se mogla nazvati kompostabilnom ili biorazgradivom. Prema ovom standardu, pakiranje se može nazvati kompostabilnim ako je:

- Biorazgradivo što podrazumjeva metaboličku pretvorbu materijala do CO_2 s razinom prihvatljivosti od 90 % (u usporedbi s celulozom) koja se postiže za manje od 6 mjeseci;
- ima sposobnost raspadanja, što se odnosi na vizualno odsustvo komadića ili fragmenata materijala u konačnom kompostu;
- nema negativnog utjecaja na proces kompostiranja i kvalitetu dobivenog komposta;
- sadrži nisu razinu teških metala.

Također, zahtijeva se da nema promjene u fizikalno - kemijskim svojstvima (pH, sadržaj soli, topljive čestice, koncentracija dušika, fosfora, magnezija i kalija) nakon razgradnje.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

U ovom radu kao osnovni materijali za izradu jestivih filmova, korišteni su prirodni biopolimeri kitozan (kitozan tip 652, molekulske mase 165 kDa, stupanj deacetiliranja iznad 85 %, France Chitin, Marseille, Francuska) i alginat (Sigma-Aldrich, SAD), a kao dodatci korišteni su biljni glicerin u ulozi plastifikatora (minimalne čistoće 99,5 %, E422, Dekorativna točka d.o.o, Hrvatska) te ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) koji služi kao izvor bioaktivnih sastojaka. Ružmarin je ubran na obali Sjevernog Jadrana, u okolici Rijeke, u proljeće 2021. godine, sušen i čuvan na zraku. Također, za filmove od alginata korištena je otopina kalcijevog klorida ($CaCl_2$) koja služi za umrežavanje matriksa filma. Korištena otapala su: destilirana voda za alginat i octena kiselina (ledena octena kiselina, J.T. Baker, Schwerte, Njemačka) za kitozan. Magnezijev nitrat ($Mg(NO_3)_2$, Sigma - Aldrich, St. Louis, SAD) se koristio za pripravu zasićene otopine za održavanje relativne vlažnosti (53 % RH) za čuvanje filmova i ispitivanje propusnosti na vodenu paru. Za test biorazgradivosti korištena je zemlja Florafi (Eko-Terra d.o.o, Nedelišće, Hrvatska).

3.2. PRIPREMA JESTIVIH FILMOVA

Filmogena otopina kitozana pripremljen je otapanjem 2 g praha kitozana u 100 ml 1 % (m/v) vodene otopine octene kiseline pomoću magnetne miješalice. Otopina je miješana 2 h (600 rpm), odnosno do potpunog otapanja (dispergiranja) polimera. Filmogena otopina alginata pripremljena je otapanjem 1,5 g praha alginata u 100 ml destilirane vode na magnetnoj miješalici uz zagrijavanje do 65 °C u trajanju od 15 min, kako bi se poboljšala topljivost alginata. Tako su dobivene 2 % (m/v) otopina kitozana i 1,5 % (m/v) otopina alginata u koje je potom dodan glicerol (30 % (m/m) u odnosu na suhu tvar polimera), a koji služi kao plastifikator i filmovima daje elastičnost. Nakon dodatka glicerola otopine su ponovno promiješane na magnetnoj miješalici na sobnoj temperaturi (23 ± 2 °C) tijekom 20 minuta.

Aktivni filmovi od kitozana i alginata pripremljeni su dodatkom vodenog ekstrakta ružmarina kao aktivne tvari. Za izradu takvih filmova koristilo se 90 ml određenog otapala (vodena otopina octene kiseline/destilirana voda) te se dodalo 10 ml vodenog ekstrakta ružmarina. Ostatak postupka je isti kao i kod samostalnih filmova od kitozana i alginata.

Točno određeni volumen tako pripremljenih filmogenih otopina izliven je u Petrijeve zdjelice, poznatih dimenzija. Pripremljene otopine od kitozana izlivene su u staklene, a otopine

od alginata u plastične Petrijeve zdjelice kako bi se mogli odvojiti nakon sušenja. Na jedan dio filmova od alginata i alginata s dodatkom aktivne tvari raspršena je 4 % otopina $CaCl_2$ (m/v) koja služi za umrežavanje matriksa i tako nastaje čvršći film.

Sušenje je provedeno u ventiliranoj klima komori (HPP110, Memmert, Schwabach, Njemačka) pri kontroliranim uvjetima temperature od 30 °C i relativne vlažnosti 40 % u trajanju od 24 h. Osušeni filmovi su odlijepljeni s površine Petrijevih zdjelica te su čuvani u eksikatoru s zasićenom otopinom $Mg(NO_3)_2$, kako bi se postigli kontrolirani uvjeti relativne vlažnosti od RH 53 % pri 23 ± 2 °C.

3.3. PRIPREMA VODENOG EKSTRAKTA RUŽMARINA EKSTRAKCIJOM POTPOMOGNUTOM EKSTRAKCIJOM MIKROVALOVIMA

Osušeni listovi ružmarina su samljeveni u mlincu za domaćinstvo do praškastog stanja. Ekstrakcija se provela na uređaju za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima (MILESTONE, START S Microwave Labstation for Synthesis). U svaku od 7 ćelija dodano je 100 ml vode, 5 g mljevenog ružmarina i magnet za miješanje. Ekstrakcija ružmarina je provedena na 80 °C u trajanju od 10 min, a snaga uređaja bila je podešena na 400 W. Dobiveni vodeni ekstrakt ružmarina je profiltriran pod vakuumom, a dobiveni supernatant se koristi kao dodatak za formiranje aktivnih filmova. Do korištenja čuvan je u plastičnim posudicama na 4 °C.

3.4. METODE KARAKTERIZACIJE FILMOVA

3.4.1. Određivanje debljine filmova

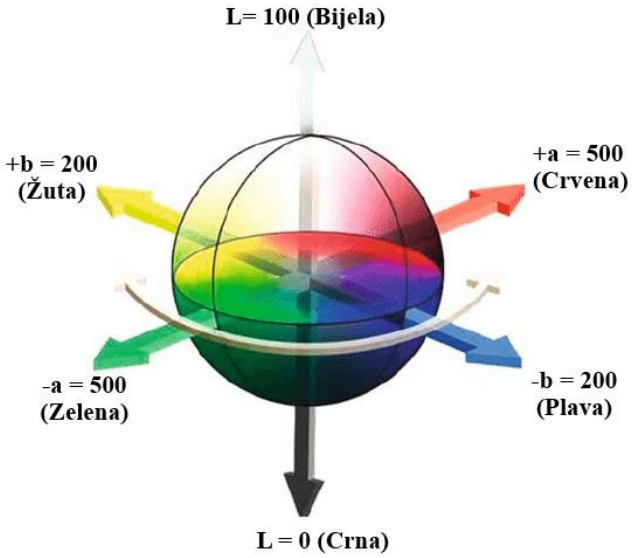
Za mjerenje debljine filmova korišten je digitalni mikrometar preciznosti do 0,001 mm (Digimet, HP, Helios Preisser, Njemačka). Od svakog tipa pripremljenih filmova uzeta su tri uzorka kojima je izmjerena debljina na tri različita mjesta. Rezultat je prikazan kao srednja vrijednost s standardnom devijacijom (μm).

3.4.2. Određivanje boje filmova

Instrumentalne metode za određivanje boje daju objektivne podatke, a ne subjektivni doživljaj. Svakom instrumentalnom određivanju temelj je princip funkcioniranja ljudskog oka koje boju detektira putem "receptora" (Mihoci, 2015). Boja pripremljenih filmova je određena

kolorimetrom (Konica Minolta Spectrophotometer CM3500d, Langenhagen, Njemačka) koji radi na principu u CIE L*a*b prostornog modela.

CIE L*a*b prostorni model je trodimenzionalni sustav boja koji se sastoji od primarnih boja koje predstavljaju osi trodimenzionalnog kordinatnog sustava (slika 6.). Temelji se na Heringtovoj teoriji suprotnih parova boja. Funkcija svjetline, odnosno akromatska os *L**, daje skalu neutralne boje od crne do bijele (od 0 do 100 jedinica svjetline), os *a** sadrži raspon boja od crvene (+) do zelene (-), a os *b** od žute (-) do plave (+).



Slika 6. CIE L*a*b* sustav boja (*prema* Singh i sur., 2009)

Mjerenje se provedi tako da se uređaj prvo kalibrira, a potom se ispod otvora stavi uzorak filma. Svakim mjerenjem dobivaju se *L**, *a** i *b** vrijednosti, a postupak mjerenja se ponavljao na 8 mjesta po uzorku. Dobiveni rezultati su izraženi kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom. Rezultati se izražavaju kao vrijednost kolorimetrijske razlike (*ΔE*) koja pokazuje odstupanje reprodukcije od originala.

Kolorimetrijska razlika (*ΔE*) se računa prema jednadžbi [1]:

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2} \quad [1]$$

sa:

$\Delta L = L_0 - L_1$
$\Delta a = a_0 - a_1$
$\Delta b = b_0 - b_1$

i gdje su:

L_0, a_0, b_0- vrijednosti referentne boje prema kojoj se mjeri odstupanje;

L_1, a_1, b_1- vrijednosti ispitivanoga uzorka boje (Petrović i sur., 2013).

3.4.3. Određivanje topljivosti filmova u vodi

Za određivanje topljivosti filmova korištena je metoda Gontard i sur. (1996), prema kojoj se topljivost filmova u vodi definira kao količina otopljene suhe tvari u destiliranoj vodi nakon 24 h od uranjanja filma. Filmovi izrezane na kvadrate dimenzija 2 x 2 cm sušeni su u sušioniku (Memmert, Schwabach, Njemačka) na 105 °C do konstantne mase, zatim su izvagani na analitičkoj vagi kako bi im se odredio početni udio suhe tvari (W_i). Tako osušeni i izvagani filmovi uronjeni su u 30 mL destilirane vode i ostavljeni na magnetnoj miješalici tijekom 24 h na sobnoj temperaturi (23 ± 2 °C). Nakon proteka zadanog vremena, filmovi su izvađeni iz otopine te ponovno sušeni u sušioniku na 105 °C do konstantne mase. Suhi filmovi su zatim izvagani kako bi se odredila masa suhe tvari neotopljene u vodi (W_f). Za svaki film mjerenje je provedeno u paraleli.

Za izračun topljivosti filma (FS, %) korištena je sljedeća jednadžba [2]:

$$FS(\%) = \frac{Wi - Wf}{Wi} * 100 \quad [2]$$

gdje su:

FS – topljivost filma (%);

W_i – početni sadržaj suhe tvari (g);

W_f – masa suhe tvari neotopljene u vodi (g)

3.4.4. Bubrenje filmova

Za određivanje kapaciteta bubrenja (engl. *swelling ratio*, SW) filmova korištena je standardna metoda ASTM D2765-95C. Bubrenje filmova određeno je paralelno sa određivanjem topljivosti filma u vodi, na način da se film nakon 24 h namočenih u vodi izvadi i važe prije njegova sušenja. Tako se dobiva masa uzorka nakon bubrenja (W_d). Kapacitet bubrenja određen je samo za filmove koji se nisu otopili nakon 24 h u vodi.

Kapacitet bubrenja izračunat je pomoću sljedećeg izraza [3]:

$$SW(\%) = \frac{Ws - Wd}{Wd} * 100 \quad [3]$$

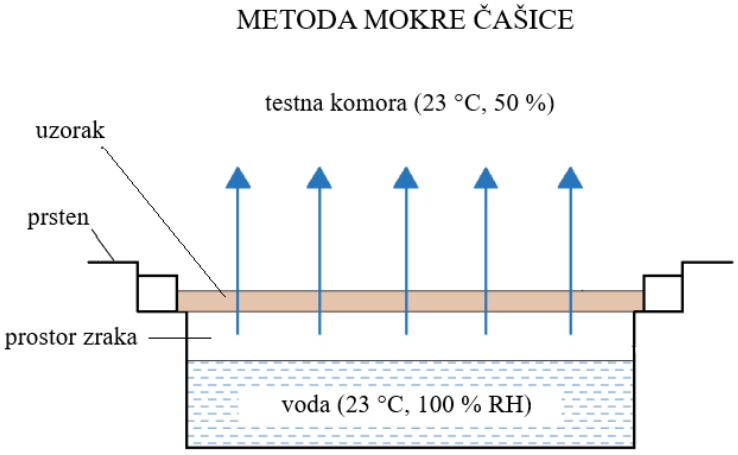
gdje su:

W_s – masa uzoraka nakon bubrenja;

W_d – masa suhog uzorka (Deepa i sur., 2016).

3.4.5. Mjerenje propusnosti vodene pare kroz polimerni film

Za mjerenje propusnost filmova na vodenu paru korištena je gravimetrijska modificirana ASTM E96-80 (1980) standardna metoda, koja je prilagođena za jestive materijale (Debeaufort i sur., 1993). Metoda se temelji se na postavljanju uzorka filma između dvije okoline s različitom relativnom vlažnošću (slika 7). Mjerenje se provodi vaganjem uzorka filma sa čašicom sve dok se ne postigne ravnoteža. Kada je ravnoteža postignuta masa se više ne mijenja. Vodena para kroz film prolazi s mjesta veće koncentracije/relativne vlažnosti (unutar čašice) na mjesto manje koncentracije/relativne vlažnosti (okolina van čašice). U ovom radu korištena je metoda mokre čašice sa unutrašnjom relativnom vlažnošću od 100 % i od 65 % RH, odnosno kako bi se postigao gradijent RH od 70 i 35 % čime se simuliraju različiti uvjeti skladištenja i karakteristika prehrambenog proizvoda.



Slika 7. Princip mjerenja propusnosti filma na vodenu paru metodom „mokre čašice" (*prema* Narloch i sur., 2021).

U posebno dizajnirane čašice za mjerenje propusnosti (po principu prema slici 7.) ulije se 20 ml destilirane vode (100 % RH) ili zasićena otopina $NaNO_3$ (65 % RH). Filmovi se izrežu u dimenzijama grla čašica. Rub grla mjerne čašice se namaže vakuum kremom, na njega se postavi film, učvrsti se teflonskim prstenom te zatvori odgovarajućim nastavkom. Tako pripremljene čašice važu se na analitičkoj vagi (KERN ABS320-4N, KERN&SOHN GmbH, Balingen, Njemačka), i zabilježi se početna masa. Zatim se uzorci stavljaju u ventiliranu klima komoru (Memmert HPP110, Memmert, Njemačka) pri točno definiranim uvjetima: temperatura 23 °C i relativna vlažnost 30 % RH. Uzorci se važu svaka 24 h na analitičkoj vagi sve do ustaljenja gubitka mase.

Propusnost na vodenu paru (WVP) izračuna se pomoću izraza [4]:

$$WVP = \frac{\Delta m}{\Delta t \cdot A \cdot \Delta p} \cdot x \quad [4]$$

gdje su:

WVP – propusnost na vodenu paru (g $^{-1}$ m^{-1} s $^{-1}$),

$\frac{\Delta m}{\Delta t}$ – maseni gubitak vlage po jedinici vremena (g s^{-1}),

A – površina filma izložena prijenosu vlage (9,08 × 10^{-4} m^2),

x – debljina filma (m),

Δp – razlika tlaka vodene pare između dvije strana filma (Pa).

3.4.6. Određivanje propusnosti plinova

Mjerenje propusnosti filmova provedeno je manometrijskom metodoma na uređaju Brugger, GDP - C (Brugger Feinmechanik GmbH, Njemačka). Filmovi se postavljaju na za to predviđeno mjesto u uređaju, između gornjeg i donjeg djela permeacijske ćelije. Vakuum pumpom se evakuira zrak iz volumena permeacijske ćelije, a potom se mjerni plin pod tlakom od 5 bara i protokom od 80 mL/min propušta s jedne strane ispitivanog uzorka filma. Razlika tlakova uzrokuje difundaciju mjernog plina kroz uzorak filma. Računalo automatski bilježi postepeni porast tlaka u djelu ćelije, suprotnom od izvora mjernog plina. Dobivena vrijednost se naziva permeanca (cm^3 m^{-2} d $^{-1}$ bar^{-1}).

Propusnost na kisik (PO_2) i ugljikov dioksid (PCO_2) dobiveni su kao aritmetički produkt debljine filma i permeance izraženo kao cm^3 m^{-1} dan^{-1} Pa^{-1}, prema sljedećem izrazu [5]:

$$PO_2 \, ili \, PCO_2 = q * \mathrm{d} \quad [5]$$

gdje je:

q - permeanca (cm^3 m^{-2} d^{-1} bar^{-1});

d- debljina filma (μm).

3.4.7. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenola

Određivanje udjela ukupnih polifenola provedeno je kolorimetrijskom metodom temeljenom na reakciji fenolnih spojeva s reducirajućim Folin-Ciocalteu reagensom što

uzrokuje nastanak plavo obojenje čiji je intenzitet proporcionalan koncentraciji polifenola. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline. Intenzitet nastalog plavog obojenja mjeri se spektrofotometrom pri valnoj duljini 765 nm. Plavo obojenje nastaje kada se, prilikom oksidacije polifenola, kiseline reduciraju u wolframov oksid i molidbenov oksid.

Za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola korišteni su Folin-Ciocalteu reagens (FC reagens) i zasićena otopina natrijeva karbonata Na_2CO_3 (20 %-tna otopina).

U staklenu epruvetu se otpipetira redom 100 µL uzorka tj. ekstrakta ružmarina (ili otopine filma), 200 µL Folin-Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode te se nakon 3 minute doda 1 mL 20 % zasićene otopine natrijeva karbonata (Na_2CO_3). Dodatkom 20 %-tne otopine Na_2CO_3 pokreće se reakcija. Zatim, sadržaj epruveta se izmiješa na vortexu i stave se u kupelj na 50 °C tijekom 25 min kako bi se termostatirale. Odmah nakon, uzorci se preliju u kivete i mjeri se apsorbancija na sprektrofotometru pri valnoj duljini 765 nm. Također, potrebno je napraviti i slijepu probu koja se priprema na isti način, ali se koristi 100 µL otapala za ekstrakciju umjesto 100 µL ekstrakta ružmarina. Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralele, a kao rezultat uzima se srednja vrijednost i standardna devijacija.

Udio ukupnih polifenola u ekstraktima filmova izračunava se iz jednadžbe baždarne krivulje koja glasi [6]:

$$y = 0{,}0035^{x}\ x \quad [6]$$

gdje je:

y- apsorbancija pri 765 nm;

x- koncentracija polifenola ružmarina (mg L^{-1}).

3.4.8. Biorazgradivost filmova

Svaki od pripremljenih filmova izrezan je na kvadrate dimenzija 2 x 2 cm te mu je odvagnuta masa (m_1). Filmovi se zakopavaju se u zemlju (Florafin, Eko-Terra d.o.o, Hrvatska) u plastične čaše na 6 cm dubine. Filmovi su zakopani na aluminijskoj mrežici kako bi se lakše pronašli prilikom otkopavanja. Čaše sa zemljom i filmovima stajale su na svjetlu na sobnoj temperaturi (23 ± 2°C). Nakon 6, 12, 25, 90 dana filmovi se otkopavaju, peru destiliranom vodom od eventualno zaostale zemlje, suše na 105 °C/ 24 h. Tako osušeni filmovi se važu te se dobiva masa (m_2) filma nakon eventualne biorazgradnje u zemlji. Sa nekih filmova nije bilo moguće skinuti sve zaostatke zemlje, a to su uglavnom bili filmovi topivi u vodi. Kako bi se uklonili ostatci zemlje takvi filmovi su otopljeni u poznatoj količini destilirane vode i

profiltrirani. Dobiveni filtrat je stavljen na sušenje na 105 °C do konstante mase. Svaki film je fotografiran prije zakopavanja i nakon njegovog otkopavanja.

Udio razgradnje (%) izračunava se prema slijedećem izrazu [7]:

$$\%\, razgradnje = \frac{m1-m2}{m1} \qquad [7]$$

Gdje su:

m_1- masa prije zakopavanja;

m_2 - masa nakon otkopavanja i sušenja.

3.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statistička analiza podataka provedena je analizom varijance (ANOVA) pomoću Xlstat 2022 24.2.1311 (Addinsoft, SAD). Podaci su rangirani i statističke razlike su ocijenjene u redovima s jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) i Tukey-ovim višestrukim usporednim testovima. U svim slučajevima vrijednost $p < 0,05$ se smatra statistički značajnom.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U sklopu ovog rada pripremljeni su filmovi od kitozana i od alginata, bez dodatka i s dodatkom ekstrakta ružmarina koji služi ako izvor bioaktivnih sastojaka. Filmovi od alginata bez dodatka i s dodatkom ekstrakta ružmarina su umreženi, odnosno „*crosslinkani*", sa kalcijem iz otopine kalcijeva klorida ($CaCl_2$). Cilj ovog rada je ispitati osnovna fizikalno-kemijska svojstva pripremljenih filmova (boja filma, debljina filma, barijerna svojstva, udio ukupnih fenola, biorazgradivost) te usporediti utjecaj dodatka ekstrakta ružmarina i umrežavanja s Ca^{2+} na navedena svojstva filmova. Dobiveni rezultati su prikazani grafički i tablično.

4.1. BOJA FILMOVA

Boja jestivih filmova u koje se hrana pakira je od izuzetne važnosti kako bi potrošači prihvatili sam proizvod. Ispitivanje boje svih pripravljenih filmova provedeno je na principu CIE L*a*b* prostornog modela. U tablici 2. su prikazani dobiveni parametri boje (L^*, a^*, b^*) i ukupna razlika u obojenosti (ΔE).

Parametar L^* predstavlja svjetlinu boje i kreće se u rasponu od 0 (tama tj. crna) do 100 (svjetlina tj. bijela). Iz tablice 2. je vidljivo da od pripravljanih filmova najvišu L^* vrijednost ima film od alginata (ALG) što znači da je on najsvjetliji. Svi filmovi imaju L^* vrijednost veću od 70, a najnižu vrijednost ima CS-a (72,80). Vizualno, filmovi od alginata (ALG) i kitozana (CS) su prozirni, bez pora i vrlo slična izgleda, a iz dobivenih rezultata mjerenja (tablica 2.) vidljivo je da je ipak alginat nešto svjetliji. Filmovi od kitozana i alginata oboje pokazuju pozitivne a^* vrijednosti i negativne b^* vrijednosti (tablica 2-) što ukazuje da imaju crveno – plave tonove. Alginatni filmovi u istraživanju Mahcene i sur. (2020) imaju izmjerenu negativnu a^* i pozitivnu b^* vrijednost. Negativna b^* vrijednost filma od natrijevog alginata (1 % NaAlg, 0,5 % glicerol) dobili su Lou i sur. (2019). Kurek i sur. (2018) i Homez-Jara i sur. (2018) bilježe negativne a^* i pozitivne b^* vrijednosti za kontrolne filmove od kitozana. Povećavanjem (% m/v) udjela kitozana povećavaju se vrijednosti parametara a^* i b^* (Homez-Jara i sur., 2018)

Dodatkom ekstrakta ružmarina svjetlina filma, odnosno vrijednost L^*, se smanjila što je očekivano jer je otopina ekstrakta ružmarina vidno tamnije boje. Svi pripravljeni filmovi s ekstraktom ružmarina (CS-a, ALG-a, ALG-a-cross) imaju pozitivne vrijednosti a^* i b^* parametara što ukazuje na žuto – crvene tonove što je u skladu s rezultatima Yan i sur. (2013) za filmove sa škrobom i alginatom.

Jancikova i sur. (2019) u svom istraživanju opisuju da su filmovi od furcelarana i želatine nakon dodatka ekstrakta ružmarina postali vizualno zeleniji, a izmjerene vrijendosti *a** i *b** ukazuju na zelene i žute tonove što se veže uz prisutnost pigmenata iz lista ružmarina. Yan i sur. (2013) u svojem istraživanju aktivnih škrob/alginat filmova bilježe porast *a** i *b** vrijednosti nakon dodatka ekstrakta ružmarina, a vrijednosti se povećavaju s koncentracijom ekstrakta. Zanimljivo je primijetiti da *a** vrijednosti pripremljenih filmova u ovom radu su niže kod aktivnih filmova.

Iz rezultata je vidljivo da nema velike razlike između dobivenih vrijednost parametara *L**, *a** i *b** za ALG i ALG-cross umrežen sa $CaCl_2$. Međutim, nešto veće razlike u rezultatima mjerenja primijećene su kod ALG-a i ALG-a-cross, gdje je parametar svjetline ALG-a-cross manja. Negativne *b** vrijendosti ALG-cross nisu u skladu s rezultatima filmova od natrijeva alginata (1,25 %), $CaCl_2$ (81 %) i glicerola (50 %) koje su pripremili Galus i Lenart (2013). Biao i sur. (2019) pripremili su film od natrijeva alginata (1,5 %) s dodatkom $CaCl_2$ i izmjerili pozitivnu *a** (0,0 ± 0,1) te negativnu *b** vrijednost (-0,4 ± 0,1) što je u skladu s rezultatima ALG-cross iz tablice 2.

Tablica 2. Parametri boje (*L**, *a**, *b**) filmova na bazi kitozana i alginata i ukupna razlika obojenosti (*ΔE*).

Uzorak	*L**	*a**	*b**	*ΔE*
CS	$90,74 \pm 0,24^{a}$	$0,67 \pm 0,80^{c}$	$-1,55 \pm 0,67^{d}$	$0,00 \pm 0,00^{b}$
CS-a	$72,80 \pm 2,03^{d}$	$0,51 \pm 1,00^{c}$	$21,38 \pm 2,21^{a}$	$29,15 \pm 2,86^{a}$
ALG	$92,09 \pm 0,14^{a}$	$2,58 \pm 0,05^{a}$	$-7,76 \pm 0,13^{e}$	$0,00 \pm 0,00^{c}$
ALG-a	$85,51 \pm 1,98^{b}$	$1,06 \pm 0,16^{c}$	$6,09 \pm 3,31^{c}$	$15,41 \pm 3,81^{b}$
ALG-cross	$91,10 \pm 0,90^{a}$	$2,64 \pm 0,29^{a}$	$-6,89 \pm 1,08^{e}$	$1,63 \pm 1,07^{c}$
ALG-cross-a	$80,35 \pm 3,00^{c}$	$1,77 \pm 0,40^{b}$	$12,93 \pm 2,26^{b}$	$23,88 \pm 3,22^{a}$

CS – filmovi od kitozana, CS-a – aktivni filmovi od kitozana s ekstraktom ružmarina, ALG- filmovi od alginata, ALG-a, aktivni filmovi od alginata s ekstraktom ružmarina, ALG-cross –filmovi od alginata umreženi sa $CaCl_2$, ALG-a-cross – aktivni filmovi od alginata s ekstraktom ružmarina umreženi sa $CaCl_2$.
Različiti eksponenti ($^{a-e}$) unutar stupca ukazuju na statistički značajne razlike među uzorcima ($p < 0,05$).

Izračunata vrijednost *ΔE* iz tablice 2. predstavlja ukupno razliku, odnosno odstupanje u boji reprodukcije od originala. Kao referentni uzorak za filmove s kitozanom korišten je monopolimerni film CS, dok je za sve filmove na bazi alginata korišten film ALG. Ljudsko oko će vidjeti razliku u boji ukoliko je vrijednost *ΔE* veća od 3 (Luo i sur., 2019), što je slučaj kod svih pripremljenih filmova osim kod ALG-cross. Najveću *ΔE* vrijednost ima CS-a, a najmanju ALG-cross (tablica 2.).

4.2. DEBLJINA FILMOVA

Izmjerena debljina pripremljenih filmova nalazi se u tablici 3. Debljina filma je važna karakteristika koja utječe na mehanička i barijerna svojstva. Iz dobivenih rezultata (tablica 3.) vidljivo je da se dodatkom ekstrakta ružmarina debljina filma smanjila. Ovakav rezultat je suprotan rezultatima istraživanja Jancikova i sur. (2019) koji bilježe povećanje debljine filma od furcelarana i želatine nakon dodatka ekstrakta ružmarina. Također, isti autori su primijetili povećanje debljine filmova s povećanjem koncentracije dodanog ekstrakta. U literaturi se bilježi povećanje debljine filmova kitozana (2 % kitozan, 30 % glicerol) obogaćenih polifenolima iz ekstrakta zelenog i crnog čaja (Peng, 2013). Debljina filma od kitozana u istraživanju Kurek i sur. (2018) iznosi 53,1 ± 10,24 μm, a dodatkom nižih koncentracija ekstrakta komine borovnice i kupine debljina filmova se smanjuje. Dodatkom vodenog ekstrakta lista guave u alginatne filmove Lou i sur. (2019) zamjećuju smanjenje debljine filmova. Moguće je da dodani ekstrakti, s visokim sadržajem polifenola stupaju u interakciju s polisaharidima ili plastifikatorima i zato mijenjaju debljinu filma (Zhu, 2012).

Iz tablice 3. može se uočiti da je debljina alginatnih filmova porasla nakon umrežavanja sa Ca^{2+}, a veće vrijednosti pokazuje ALG-cross-a u odnosu na ALG-cross. Ovakav rezultat je različit u odnosu na ostale pripremljene filmove sa aktivnom komponentom koji su pokazivali niže vrijednosti debljine od njihovih kontrolnih parova. Russo i sur. (2007) pripremili su kontrolne alginatne filmove (1 % m/v) te su dio umrežili potapanjem 30 minuta u vodenu otopinu $CaCl_2$. Mjerenjem debljine filmova prije i nakon umrežavanja sa Ca^{2+} izvještavaju o povećanju debljine filmova nakon umrežavanja za 37 - 56 %. Međutim, ovako velike razlike u debljini filmova mogu biti posljedica umrežavanja matriksa filma u nabubrenom stanju.

Velika standardna devijacija koja se može primijetiti kod umreženih alginatnih filmova može biti posljedica pojave kristalnih struktura $CaCl_2$ koje se izdvajaju na nekim mjestima. U budućem radu potrebno je poboljšati dispergiranje Ca^{2+} u polimernom matriksu. Navedena pojava vidljiva je ljudskim okom. Naime, vizualno filmovi su imali bijela obojenja na određenim mjestima na površini. Također, bijela obojenja se mogu povezati sa svjetlinom filmova gdje su kod ALG-corss više vrijednosti parametra L^*.

Tablica 3. Debljina filmova.

Uzorak filma	Debljina filma (μm)
CS	$55,25 \pm 12,63^{a}$
CS-a	$47,67 \pm 10,26^{a,b}$
ALG	$23,89 \pm 7,00^{c}$
ALG-a	$22,78 \pm 4,44^{c}$
ALG-cross	$36,75 \pm 14,77^{b,c}$
ALG-cross-a	$39,38 \pm 7,43^{a,b}$

CS- kitozan , ALG- alginat , a – aktivna komponenta (ekstrakt ružmarina), cross – umreženi s $CaCl_2$
Različiti eksponenti ($^{a-c}$) unutar stupca ukazuju na statistički značajne razlike među uzorcima ($p < 0,05$).

4.3. TOPLJIVOST I BUBRENJE FILMOVA U VODI

Otpornost jestivih filmova na vlagu jedno je od najvažnijih svojstava za njihovu potencijalnu komercijalnu upotrebu. Natrijev alginat stvara čvrste filmove, no unatoč tome zbog hidrofilne prirode polimera pokazuju slabu otpornost na vodu te se zato smatra vrstom alginata koja je topljiva u vodi. Sredstvo za umrežavanje kao što su ioni kalcija (Ca^{2+}) omogućuju prevladavanje ove prepreke (Roger i sur., 2006) U tablici 4. nalaze se dobiveni rezultati mjerenja udjela vode, topljivosti i bubrenja filmova (SW).

Tablica 4. Udio vode i suhe tvari te topljivost filmova i bubrenje (SW).

Uzorak	Udio vode (%)	Udio suhe tvari (%)	Topljivost (%)	SW (%)
CS	$26,65 \pm 0,47^{a}$	$73,35 \pm 0,47^{a}$	$29,86 \pm 0,17^{c}$	$140,53 \pm 35,50^{b,c}$
CS-a	$23,10 \pm 1,06^{a}$	$76,90 \pm 1,06^{a}$	$30,01 \pm 0,88^{c}$	$59,54 \pm 15,35^{c}$
ALG	$25,64 \pm 0,17^{a}$	$74,36 \pm 0,17^{a}$	$28,09 \pm 0,88^{c}$	$267,57 \pm 65,49^{b}$
ALG-a	$11,06 \pm 2,72^{a}$	$88,94 \pm 2,72^{a}$	$100,00 \pm 0,00^{a}$	Nm
ALG-cross	$31,39 \pm 22,63^{a}$	$68,61 \pm 22,63^{a}$	$35,16 \pm 1,09^{c}$	$282,20 \pm 42,00^{b}$
ALG-a-cross	$16,39 \pm 1,45^{a}$	$83,61 \pm 1,47^{a}$	$56,77 \pm 9,78^{b}$	$602,78 \pm 29,58^{c}$

CS- kitozan , a – aktivna komponenta (ekstrakt ružmarina), ALG- alginat, cross – umreženi (*crosslinkani*) sa $CaCl_2$, nm – nemjerljivo
Različiti eksponenti ($^{a-c}$) unutar stupca ukazuju na statistički značajne razlike među uzorcima ($p < 0,05$).

4.3.1. Udio vode

Udio vode pripremljenih filmovima u ovom radu kreće se između 11 i 32 %, a niže vrijednosti zabilježene su kod filmova sa aktivnom komponentom ružmarina (CS-a, ALG-a, ALG-a-cross). Takvi rezultati su u skladu sa rezultatima istraživanja Lou i sur. (2019) gdje se udio vode u alginatnim filmovima smanjio dodatkom vodenog ekstrakta lista guave, a povećanjem udjela ekstrakta u filmu povećava se i udio vode. Autor objašnjava da je moguće

da natrijev alginat zbog velikobrojnih hidrofilnih skupina (–OH i –COOH) u molekuli ima veći sadržaj vode. Naime, hidroksilne skupine u ekstraktima mogu formirati međumolekularne vodikove veze s hidrofilnim skupinama natrijeva alginata što smanjuje interakciju između vode i matriksa filma. U literaturi se navodi da dodatak ekstrakta ružmarina neznatno povećava sadržaj vode u filmovima od kasave/škroba (Piñeros-Hernandez i sur., 2016) i filmovima od furcelarana/želatine (Jancikova i sur., 2019). Janickova i sur. (2019) navode da je mogući razlog tome interakcije između ružmarinske kiseline prisutne u ekstraktu ružmarina sa NH_2 grupama pri čemu se formiraju molekule H_2O. Iz dobivenih rezultata (tablica 4.) možemo zaključiti da alginatni umreženi filmovi (ALG-cross i ALG-a-cross) imaju veći udio vode od njihovih neumreženih parova (ALG i ALG-a).

4.3.2. Topljivost

Iz tablice 4. je vidljivo da najveću topljivost nakon 24 h u vodi pokazuju umreženi aktivni alginatni filmovi (56,77 ± 9,78 %), a najmanje vrijednosti imaju kontrolni alginatni filmovi (28,09 ± 0,88 %), dok je aktivni film od alginata (ALG-a) potpuno otopljen u vodi. Giz i sur. (2020) u svojem istraživanju navode da su se svi neumreženi alginatni filmovi sa dodatkom 10, 20 i 30 % glicerola otopili u vodi, a njihovi parovi umreženi sa Ca^{2+} su samo nabubrili ali se nisu otopili. U usporedbi sa radom Giz i sur. (2020), razlog zašto se kontrolni alginatni filmovi (ALG) u ovom radu nisu otopili može biti zbog nižih udjela plastifikatora glicerola koji je hidrofilne prirode. U istraživanju Homez-Jara i sur. (2018), filmovi od (1,5 % m/v) kitozana s 0,3 % glicerola i sušeni pri temperaturama od 2 °C, 25 °C i 40 °C, pokazuju vrijednost topljivosti od 25,1 %, 19,3 % i 24,4 %. U ovom radu vrijednosti topljivosti monopolimernih filmova od kitozana (CS) iznose 29,86 ± 0,17 %.

Filmovi s dodatkom aktivne komponente pokazuju veću topljivost (tablica 4.) u odnosnu na one bez, iako je ta razlika kod kitozana izrazito mala (29,86 % i 30,01 %). Dobiveni rezultati su u skladu sa istraživanjem Luo i sur. (2019) u kojem topljivost alginatnih filmova u vodi se povećala s povećanjem sadržaja vodenog ekstrakta lista guave. Ovakvo povećanje topljivosti u vodi pripisuje se hidrofilnim skupinama polifenola u hidrofilnom (vodenom) ekstraktu ružmarina koje se lako mogu vezati s vodom. Nadalje, Peng i sur. (2013) su dobili povećanu topljivost aktivnih kitozanskih filmova s ekstraktom zelenog čaja u čijem su sastavu 99,9 % polifenoli čaja. Dodatak istih koncentracije crnog čaja u kitozanske filmove imao je neznatan učinak na povećanje topljivosti, što se pripisuje drugačijem udjelu aktivnih komponenti u crnom čaju (20 % polifenoli čaja i 60 % teaflavini). Može se zaključiti da je priroda i udio

polifenola s vezujućim slobodnim –OH skupinama ključan faktor za promjene u topljivosti jestivih filmova.

Umreženi alginatni filmovi (ALG-cross i ALG-a-cross) pokazuju više vrijednosti topljivosti (35,16 % i 56,77 %) u odnosu na kontrolne alginatne filmove (28,09 %). Da su filmovi s dodanom aktivnom komponentom bolje topljivi u vodi možemo primijetiti iz rezultata (tablica 4.) dobivenih za umrežene alginatne filmove gdje je topljivost ALG-a-cross veća. Biao i sur. (2019) u svom istraživačkom radu opažaju da su umreženi, aktivni alginatni filmovi sa više od 3 % polifenola čaja u svom sastavu, značajno topljiviji od kontrolnih filmova alginata.

4.3.3. Bubrenje

Bubrenje se odnosi na sposobnost filma da zadrži vodu u svom matriksu što je povezano s prisutnošću hidrofilnih skupina, kao što su karboksilne i hidroksilne skupine, u strukturi polimera koje mogu lako stupiti u interakciju s vodom. Također, na bubrenje uzorka može utjecati pristunost glicerola koji je također hidrofilne prirode. Svi filmovi su pokazali visok kapacitet bubrenja (tablica 4.).

Uspoređujući kontrolne filmove od alginata (267,57 ± 65,49 %) i kitozana (140,53 ± 35,50 %), veći kapacitet bubrenja uočen je kod alginata. Peng i suradnici (2013) prijavljuju nizak stupanj bubrenja (110 %) za kitozanske filmove (2 %, m/v) sa 30 % glicerola. U ovom radu uočene su nešto više vrijednosti bubrenja CS filmova (140,53 %), a još više vrijednosti za filmove od 1,5 % kitozana bilježe Homez Jara i suradnici (2018)(184 – 236 %).

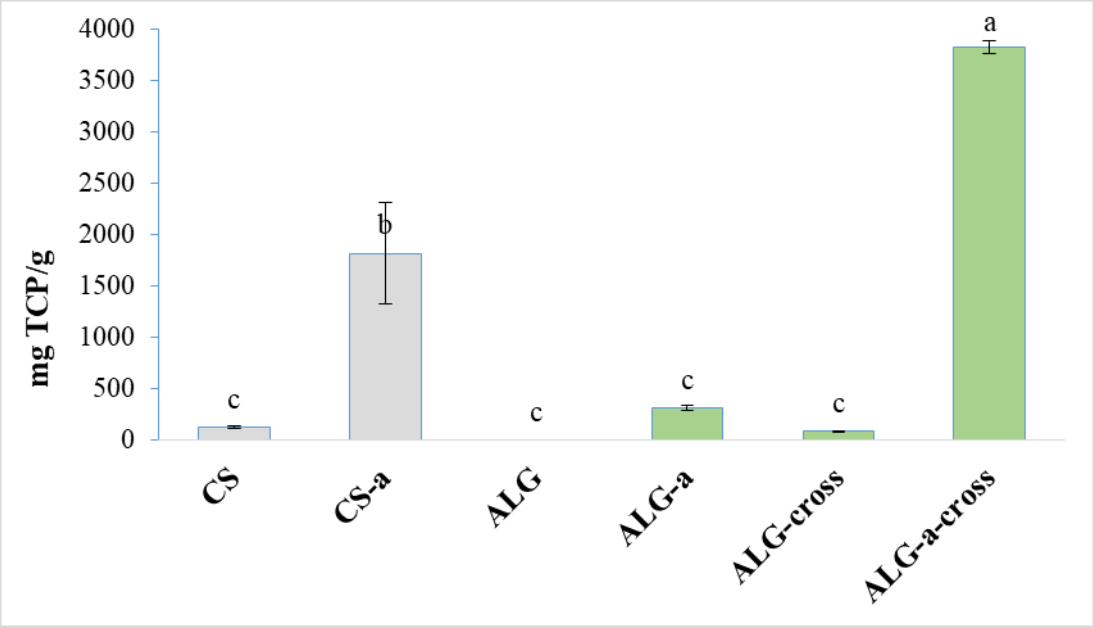
U ovom radu primijećen je značajno manji kapacitet bubrenja kod aktivnih filmova od kitozana, CS-a (59,54 %), u odnosu na njihovu kontrolu, CS (140,53 %). Suprotno ponašanje je uočeno u istraživanju Peng i sur. (2018) u kojem filmovi kitozana dodatkom polifenola crnog i zelenog čaja imaju veći stupanj bubrenja u odnosu na kontrolni uzorak.

Iz dobivenih vrijednosti vidljivo je da umrežavanje filmova povećava kapacitet bubrenja, a ALG-a-cross se nije otopio te ima najveći kapacitet bubrenja (602,78 %). Giz i sur. (2020) na temelju provedenog istraživanja zaključuju da se bubrenje filmova smanjilo povećanjem udjela Ca^{2+}, a povećanje udjela glicerola povećava kapacitet bubrenja. Kapacitet bubrenja pripremljenih umreženih alginatnh filmova sa Ca^{2+} iz tablice 4. pokazuju slične vrijendosti od 267 i 282,20 %, ali su ipak nešto više za ALG-cross. Bubrenje umreženih aktivnih filmova od alginata sa polifenolima čaja bilo je znatno niže od onog u kontrolnim uzorcima u istraživanju Biao i sur. (2019).

4.4. UDIO UKUPNIH POLIFENOLA U FILMOVIMA

Dobiveni rezultati mjerenja ukupnih fenola pripremljenih filmova prikazani su na slici 8. Film od alginata (ALG) ima najnižu vrijednost, odnosno vrijednost nula jer ne sadrži fenole. Udio fenola ovisi o materijalu od kojeg je film izrađen te o dodatku ekstrakta ružmarina. Očekivano je da aktivni filmovi (CS-a, ALG-a i ALG-a-cross) imaju znatan udio polifenola jer se upravo iz tog razloga dodaje aktivna komponenta - ekstrakt ružmarina.

Najveću vrijednost polifenola ima ALG-a-cross koja iznosi 3828,93 ± 63,09 mg g^{-1}, a nakon njega slijedi CS-a sa udjelom polifenola od 1822,63 mg g^{-1}. Ove povišene vrijednosti ukazuju na mogućnost umrežavanja veće količine polifenola u polimernu mrežu i manje gubitke tijekom sušenja filmova s dodatkom agenasa za umrežavanje. Također je moguće da su vrijednosti kod ovih uzoraka još više zbog prisutnih Ca^{2+} iona u otopini čije prisustvo može utjecati na mjerljive vrijednosti spektrofotometrijskom metodom. Stoga bi bilo interesantno u budućim istraživanjima potvrditi ove vrijednosti još dodatnim metodama za određivanje ukupnih fenola.



Slika 8. Ukupni udio polifenola u uzorcima filmova na bazi kitozana (CS) i alginata(ALG), njihovim aktivnim filmovima (CS-a i ALG-a) i umreženim filmovima alginata (ALG-cross i ALG-a-cross).

CS- kitozan , a – aktivna komponenta (ekstrakt ružmarina), ALG- alginat, cross – umreženi (*crosslinkani*) sa $CaCl_2$.
Različiti eksponenti ($^{a-c}$) unutar stupca ukazuju na statistički značajne razlike među uzorcima ($p < 0,05$).

4.5. PROPUSNOST FILMOVA NA VODENU PARU

Prijenos vodene pare kroz materijal bitno je svojstvo filmova za pakiranje hrane. Na ovaj parametar utječu ravnoteža između: omjera hidrofilnih/hidrofobnih komponenti filma, kristaličnosti filma, vijugavosti puta i prisutnosti površinskih ili strukturnih defekata (Ludueña i sur., 2012.).

Iz rezultata dobivenih u tablici 5. vidljivo je da kitozanski i alginatni filmovi sa dodanim ekstraktom ružmarina imaju niže vrijednosti propusnosti na vodenu paru (WVP) od kontrolnih filmova kod oba RH gradijenta. Veće promjene i veće vrijednosti mjerenja WVP primijećene su kod nižeg RH gradijenta (35 %) u odnosu na viši gradijent (70 %). Kod RH gradijenta 70 % nema značajne razlike u izmjerenim vrijednostima WVP za ALG i ALG-a.

U istraživanju koje su proveli Piñeros-Hernandez i suradnici (2016) propusnost na vodenu paru pripremljenih filmova od škroba i kasave, značajno je porasla dodatkom 10 i 20 % vodenog ekstrakta ružmarina, dok je nešto manji porast zabilježen dodatkom 5% ekstrakta u odnosu na WVP kontrolnog filma. Iz toga se može zaključiti da se povećanjem hidrofilnog sadržaja povećava i osjetljivost filmova na vodenu paru. Da se WVP povećava dodatkom ekstrakta ružmarina u filmu od škroba i alginata, izvještavaju i Yan i suradnici (2012) u čijem istraživanju se WVP povećala od 2.31 x 10^{-12} do 2.68 10^{-12} g cm cm^{-2} s^{-1} Pa^{-1} kada se udio ekstrakta ružmarina u povećao s 0,3 na 1,2 %. Autori navode da se porast WVP vrijednosti može pripisati uvođenju hidrofilnih skupina, iz ekstrakta ružmarina u matriks filma, koje su sklone adsorpciji i desorpciji molekula vode.

Smanjenje WVP alginatnih filmova nakon dodatka vodenog ekstrakta lista guave (10-20 %) zabilježili su Luo i sur. (2019), a pretpostavlja se da je razlog tome nastanak guste mreže između polifenola i biopolimera povezanih intermolekularnim interakcijama. Također, smanjenje WVP kitozanskih filmova nakon dodatka ekstrakta čaja prijavljuju Peng i sur. (2013) te takvu pojavu pripisuju stvaranju interakcija između kitozana i ekstrakta čaja što uzrokuje kidanje vodikovih veza između kitozana i vode u matriksu filma.

Generalno umrežavanjem filmogenog matriksa sa ionima, propusnost se općenito smanjuje. U ovom radu propusnost filma na vodenu paru se nakon umrežavanja povećala. Ovakve rezultate također su dobili i Russo i sur. (2007) umrežavanjem alginatnih filmova uranjanjem u otopinu $CaCl_2$. Takvo neobično ponašanje pripisuju umrežavanju lanaca alginata u stanju povećanog slobodnog volumena zbog bubrenja filma te nakon sušenja lanci ne mogu zauzeti konformaciju koju su imali prije umrežavanja. Povećanjem slobodnog volumena olakšava se put molekulama koje difundriraju te se posljedično povećaju transportni parametri.

U istraživanju Biao i sur. (2019) propusnost vodene pare kroz aktivne alginatne filmove umrežene sa 3 %-tnom otopinom kalcijevog laktata, značajno se povećala s povećanjem udjela polifenola čaja i to gotovo 4 puta veća za uzorak s 5 % polifenola nego za kontrolu. Ovaj rezultat sugerira da je prisutnost polifenola čaja povećala hidrofilnost i/ili poroznost filmova, čime je omogućila molekulama vode da brže difundiraju kroz njih. U ovom radu rezultati propusnosti na vodenu paru i brzine prijenosa vodene pare između ALG-cross i ALG-cross-a se ne razlikuju značajno.

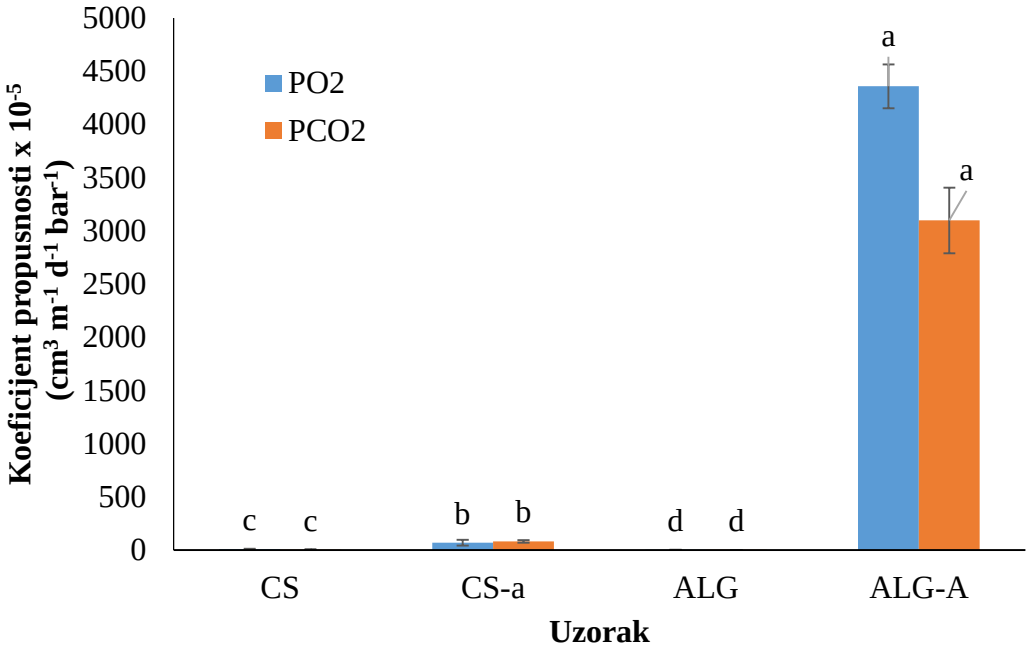
Tablica 5. Propusnost na vodenu paru (WVP) i brzina prijenosa vodene pare (WVTR) pri dva gradijenta relativne vlažnosti (70 % i 35 % RH)

Uzorak	ΔRH 70 %		ΔRH 35%	
	WVP (g m^{-1} s^{-1} Pa^{-1}) x10^{-10}	**WVTR (g m^{-1} s^{-1}) x10^{-3}**	**WVP (g m^{-1} s^{-1} Pa^{-1}) x10^{-11}**	**WVTR (g m^{-1} s^{-1}) x10^{-3}**
CS	$3,05 \pm 0,11^{a}$	$11,83 \pm 0,44^{a}$	$8,46 \pm 0,32^{a}$	$3,28 \pm 0,12^{a}$
CS-a	$2,44 \pm 0,16^{b}$	$11,26 \pm 0,76^{a}$	$6,40 \pm 0,17^{a,b}$	$2,96 \pm 0,08^{a}$
ALG	$1,27 \pm 0,02^{c}$	$11,69 \pm 0,22^{a}$	$5,29 \pm 0,36^{a,b}$	$4,87 \pm 0,34^{a}$
ALG-a	$1,26 \pm 0,08^{c}$	$12,17 \pm 0,74^{a}$	$3,66 \pm 0,34^{b}$	$3,54 \pm 0,33^{a}$
ALG-cross	$2,22 \pm 0,05^{b}$	$12,96 \pm 0,29^{a}$	$6,48 \pm 0,71^{a,b}$	$3,77 \pm 0,41^{a}$
ALG-cross-a	$2,19 \pm 0,07^{b}$	$12,24 \pm 0,38^{a}$	$5,41 \pm 1,76^{a,b}$	$3,03 \pm 0,98^{a}$

CS- kitozan , a – aktivna komponenta (ekstrakt ružmarina), ALG- alginat, cross – croslinkani (umreženi) sa $CaCl_2$.
Različiti eksponenti ($^{a-c}$) unutar stupca ukazuju na statistički značajne razlike među uzorcima ($p < 0,05$).

4.6. PROPUSNOST FILMOVA NA PLINOVE (O_2 I CO_2)

Rezultati mjerenja propusnosti na plinove dani su na slici 9.



Slika 9. Koeficijent propusnosti materijala na kisik (PO_2) i ugljikov dioksid (PCO_2)

CS- kitozan , a – aktivna komponenta (ekstrakt ružmarina), ALG- alginat, cross – croslinkani (umreženi) sa $CaCl_2$. Različiti eksponenti ($^{a-c}$) unutar stupca ukazuju na statistički značajne razlike među uzorcima ($p < 0,05$).

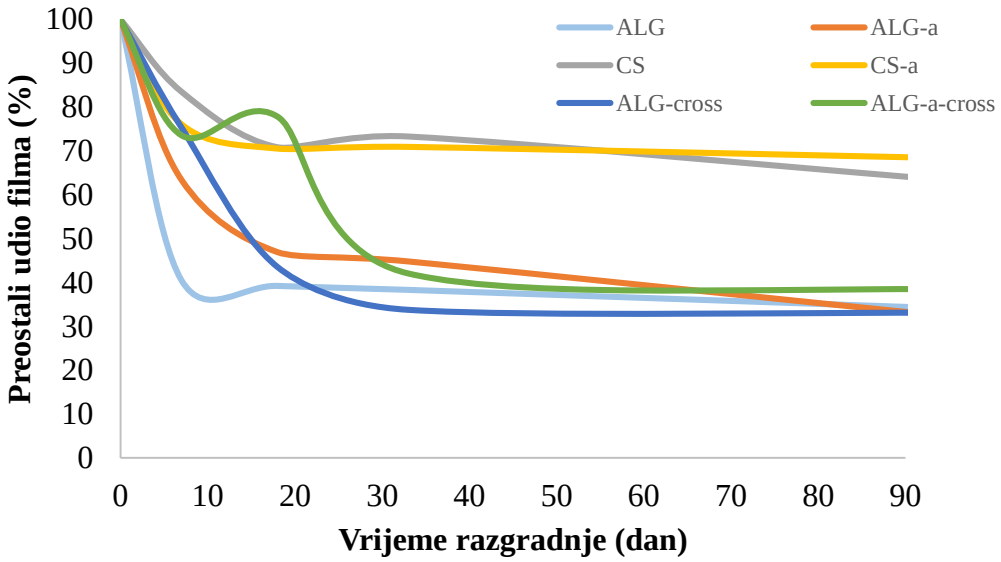
Najmanju propusnost imali su uzorci od alginata (PO_2 = 1,29 x 10^{-5} cm^3 m^{-1} d^{-1} bar^{-1} i PCO_2 = 0,63 x 10^{-5} cm^3 m^{-1} d^{-1} bar^{-1}), a slijedi ih CS i CS-a. S dodatkom aktivne komponente dolazi do statistički značajnog porasta u vrijednostima koeficijenta propusnosti na kisik i ugljikov dioksid, kod oba tipa materijala. Najvišu propusnost na oba ispitivana plina imao je uzorak od alginata s dodatkom ekstrakta ružmarina. Do povišenja propusnosti uzoraka s dodatkom aktivne komponente vrlo vjerojatno dolazi zbog narušene kompaktnosti i strukturnih promjena u materijalu. Ove hipoteze bi trebalo dodatno ispitati u daljnjim istraživanjima preciznijim i detaljnijim metodama za ispitivanje strukture biopolimera kao što su termalne analize, elektronska pretražna mikroskopija (SEM) ili infracrvena spektroskopija s Furierovom transformacijom (FTIR). Gomaa i sur. (2018) ispitali su propusnost kompozitnih filmova od kitozana i alginata na kisik. Pripremili su umrežene i neumrežene alginat/kitozan filmove sa i bez dodatka aktivne komponente fukoidana koji je izvor polifenola. Najniža propusnost na kisik (PO_2) zabilježena je kod kontrolnih neumreženih film bez fukoidana (5,53 ± 0,14×10^{-3} g 100 μm^{-1} m^{-2} s^{-1}). PO_2 se povećala dodatkom aktivne komponente (8,56 ± 0,44 ×10^{-3} g 100 μm^{-1} m^{-2} s^{-1}) i umrežavanjem filmova sa Ca^{2+} (8,09 ± 0,09 ×10^{-3} g 100 μm^{-1} m^{-2} s^{-1}). Vrijednost PO_2 dobivene za umrežene aktivne filmove iznosila je 8.18 ± 0.51×10^{-3} g 100 μm^{-1} m^{-2} s^{-1} što je

neznatno veća vrijednost od umreženih filmova bez fukoidana. U ovom radu nije bilo moguće ispitati uzorke s dodatkom $CaCl_2$, odnosno filmove od alginata umrežene s Ca^{2+} zbog loših mehaničkih svojstava i nemogućnosti pripreme filma dimenzija potrebnih za provedbu analize ispitivanja propusnosti na plinove.

Uspoređujući propusnost na kisik i ugljikov dioksid kod iste vrste filma, kod svih uzoraka vrijednosti propusnosti na CO_2 niže su od propusnosti na O_2. Suprotno tome, u istraživanju Chakravartula i sur. (2019), propusnost alginatnih filmova (3 % m/m) bila je 2,4 puta veća na CO_2 u odnosu na O_2. Razlike su moguće zbog razlika u strukturi dobivenog materijala.

4.7. BIORAZGRADIVOST FILMOVA

Vrijednosti mjerenja razgradnje filmova dane su na slici 10. Do najniže razgradnje dolazi kod filmova od kitozana. Nakon 90 dana, preostali udio iznosi 61 %. Dodatak ekstrakta ružmarina ne utječe značajno na stupanj biorazgradnje kitozana, te nakon 90 dana preostaje 68 % uzoraka CS-a. Za razliku od kitozana, filmovi od alginata imaju veći stupanj biorazgradnje dosežući vrijednosti od 70 % nakon 90 dana razgradnje. Uspoređujući uzorke od alginata, slično kao i kod kitozana dodatak ekstrakta ružmarina ne utječe statistički značajno na stupanj razgradnje. Nadalje, nema statistički značajne razlike niti u odnosu na uzorke umrežene Ca^{2+}. Slike filmova nakon iskapanja tijekom 90 dana dane su na slici 11.

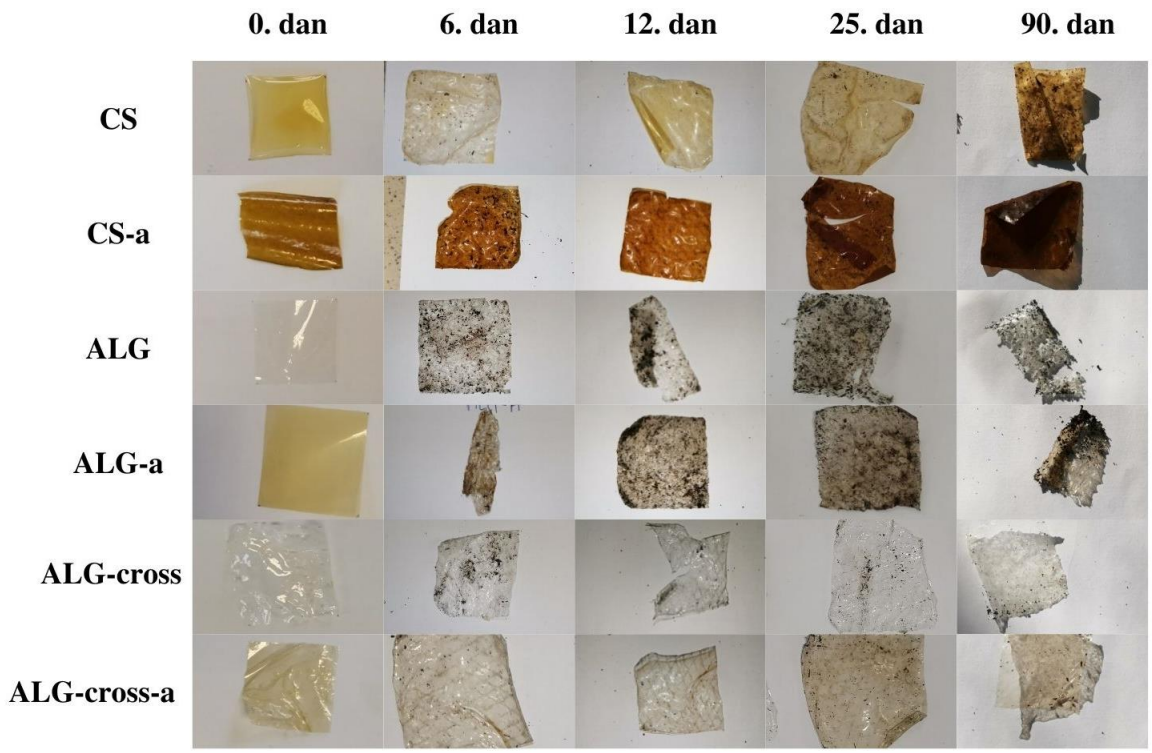


Slika 10. Biorazgradnja filmova tijekom perioda od 90 dana.

CS- kitozan , a – aktivna komponenta (ekstrakt ružmarina), ALG- alginat, cross – umreženi (*crosslinkani*) sa $CaCl_2$.

Riaz i sur. (2020) su u znanstvenom radu objavili da nakon provedenog testa zakopavanja kitozanskih filmova (2 % m/v) u tlu, razgrađeno je 47 % filma obogaćenog ekstraktom korijena Kineskog vlasca (*Allium tuberosum*) unutar 3 tjedna. Nasuprot tome, kontrolni film od kitozana razgradio se samo 26,98 % što je slično rezultatima dobivenim u ovom radu. Nadalje, Riaz i sur. (2020) bilježe povećanje biorazgradivosti filma s povećanim udjelom polifenola. Piñeros-Hernandez i sur. (2016) uočavaju da se razgradnja filmova na bazi kasave i škroba dogodila gotovo u potpunosti nakon 14 dana ispitivanja. Međutim, jednako pripremljeni aktivni filmovi sa dodatkom 5, 10 i 15 % ekstrakta ružmarina pokazuju bolju očuvanost, što ukazuje da se biorazgradnja usporava prisutnošću ekstrakta ružmarina. U istraživanju Filho i sur. (2019) kontrolni filmovi od alginata (1,5 m/v) razgradili su se 98,01 % nakon 10 dana. Testa biorazgradnje proveden je uz konstantno zalijevanje zemlje kako bi se vlažnost zemlje održala od prilike na 40 %. U ovom radu kontrolni alginatni film se nakon 6 i 12 dana razgradio oko 60 %, a mogući razlog tome je ne zalijevanje zemlje, odnosno niski udio vlage. Mikroorganizmi i vlaga u tlu od velike su važnosti za biorazgradnju filmova.

Razlike u rezultatima navedenih studija mogle bi se pripisati različitim formulacijama filmova. Dodavanje ekstrakta sa polifenolima u sastav filma mogu dovesti do nastajanja pukotina koje olakšavaju interakciju bakterija u tlu s filmovima, a time i njihovu razgradnju. Također, polifenolni ekstrakt u matriksu filma može izazvati stvaranje zbijene mikrostrukture filma što rezultira usporenim interakcijama i razgradnjom. U konačnici takve razlike mogu dovesti do različitih stopa razgradnje u tlu, ali unatoč tome svi filmovi na bazi polisaharida s ekstraktima polifenola su biorazgradivi (Zhu, 2021).



Slika 11. Fotografije filmova prije ukopavanja (0 dan) i iskopanih filmova iz zemlje kroz 90 dana.

CS - kitozan , a – aktivna komponenta (ekstrakt ružmarina), ALG- alginat, cross – umreženi (*crosslinkani*) sa $CaCl_2$.

5. ZAKLJUČCI

1. Aktivni filmovi na bazi kitozana i alginata s vodenim ekstraktom ružmarina imaju niže *L** vrijednosti te su tamniji u odnosu na kontrolne filmove bez ekstrakta. Također, dodatkom ekstrakta ružmarina izmjerene su pozitivne *b** vrijednosti (crvena nijansa) za razliku od kontrolnih filmova koji imaju negativne *b** (plava nijansa).
2. Polimerni filmovi s dodanim ekstraktom ružmarina su manje debljine u odnosu na filmove bez ekstrakta, a alginatni filmovi umreženi sa Ca^{2+} imaju veću debljinu od ne umreženih.
3. Dodatak ekstrakta ružmarina smanjio je udio vode i kapacitet bubrenja u kontrolnim alginatnim i kitozanskim filmovima. Umrežavanjem alginatnih filmova sa Ca^{2+} kapacitet bubrenja i udio vode filmova se povećao u odnosu na neumrežene kontrolne filmove.
4. Topljivost filmova se povećala dodatkom ekstrakta ružmarina i umrežavanjem alginatnih filmova, a alginatni film sa aktivnom komponentom se potpuno otopio. Također, umreženi alginatni filmovi sa ekstraktom ružmarina su bolje topljivi (56,77 ± 9,78 %) od onih bez (35,16 ± 1,09 %).
5. Aktivni filmovi od kitozana imaju niže vrijendosti polifenolnih spojeva od alginatnih, a umrežavanjem alginatnih filmova udio polifenola se povećao.
6. Propusnost filma na vodenu paru smanjila se dodatkom ekstrakta ružmarina u kitozanske filmove, dok na alginatne filmove nije imala značajan utjecaj. Umrežavanjem alginatnim filmovima propusnost na vodenu paru se povećava.
7. Propusnost na plinove (kisik i ugljikov dioksid) rasla je slijedećim redoslijedom: ALG < CS < CS-a < ALG-a. Dodatkom aktivne komponente došlo je do statistički značajnog porasta propusnosti na plinove što se pripisuje promjenama u strukturi materijala dodatkom hidrofilnog ekstrakta ružmarina.
8. Alginatni filmovi su bolje biorazgradivi od kitozanskih, a dodatak ekstrakta ružmarina i umrežavanje sa Ca^{2+} nije značajno utjecao na biorazgradivost.

6. LITERATURA

Abdullah NAS, Mohamad Z, Khan ZI, Jusoh M, Zakaria ZY, Ngadi N (2021) alginate based sustainable films and composites for packaging: a review. *Chem Engineer Trans* **83**, 271-276. https://doi.org/10.3303/CET2183046

ASTM Standard Test Method E96 – 80, Water Vapor Transmission of Materials (1980).

ASTM-D2765 Standard Test Methods. Determination of Gel Content and Swell Ratio of Crosslinked Ethylene Plastics (2016).

Azeredo HMC, Mattoso LHC, Avena-Bustillos RJ, Filho GC, Munford ML, Wood D, McHugh TH (2010) Nanocellulose reinforced chitosan composite films as affected by nanofiller loading and plasticizer content. *J Food Sci* **75**(1), 1–7. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01386.x

Barbosa CH, Andrade MA, Vilarinho F, Fernando AL, Silva AS (2021) Active edible packaging. *Encyclopedia* **1**(2), 360–370. https://doi.org/10.3390/ encyclopedia1020030

Biao Y, Yuxuan C, Qi T, Ziqi Y, Zhou Y, McClements DJ, Chongjiang C (2019) Enhanced performance and functionality of active edible films by incorporating tea polyphenols into thin calcium alginate hydrogels. *Food Hydrocol* **97**, 1-8. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105197

Bonilla J, Sobral PJA (2016) Investigation of the physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of gelatin-chitosan edible film mixed with plant ethanolic extracts. *Food Biosci* **16**, 17–25. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2016.07.003

Borrás-Linares I, Stojanović Z, Quirantes-Piné R, Arráez-Román D, Švarc-Gajić J, Fernández-Gutiérrez A, Segura-Carretero A (2014) Rosmarinus Officinalis Leaves as a Natural Source of Bioactive Compounds. *Int J Mol Sci* **15**(11), 20585–20606. .https://doi.org/10.3390/ijms151120585

Cazón P, Vázquez M (2020) Mechanical and barrier properties of chitosan combined with other components as food packaging film. *Environ Chem Lett* **18,** 257–267. https://doi.org/10.1007/s10311-019-00936-3

Chakravartula SSN, Soccio M, Lotti N, Balestra F, Dalla Rosa M, Siracusa V (2019) Characterization of composite edible films based on pectin/alginate/whey protein concentrate. *Materials* **12**(15), 2454. https://doi.org/10.3390/ma12152454

Davis TA, Llanes F, Volesky B, Diaz-Pulido G, Mccook L, Mucci A (2003)^{1}H-NMR study of Na alginates extracted from *Sargassum spp*. in relation to metal biosorption. *Appl biochem biotech* **110**(2), 75–90. https://doi.org/10.1385/ABAB:110:2:75

De Alvarenga ES (2011) Characterization and properties of chitosan. U: Elnashar M (ured.) Biotechnology of biopolymers, InTech., Rijeka, str. 91–108.https://doi.org/10.5772/17020

De Oliveira Filhoa JG, Rodriguesa JM, Fernandes Valadaresa AC, De Almeidaa AB, de Limaa TM, Takeuchib KP, Fernandes Alvesa CC, De Figueiredo Sousac HA, Da Silvac ER, Dyszya FH, Egea MB (2019) Active food packaging: Alginate films with cottonseed protein hydrolysates. *Food Hydrocoll* **92**, 267-275. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.052

Debeaufort F, Martin-Polo M, Voilley A (1993) Polarity and structure affect water vapor permeability of model edible films. *J Food Sci* **58**(2), 428–434. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb04290.x

Dou L, Li B, Zhang K, Chu X, Hou Hu (2018) Physical properties and antioxidant activity of gelatin/sodium alginate edible films with tea polyphenol. *Int J Biol Macromol* **118**, 1377-1383. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.121

Draget KI, Skjåk-Bræk G, Smidsrød O (1997) Alginate based new materials. *Int J Biol Macromol* **21**(1-2), 47–55. https://doi.org/10.1016/s0141-8130(97)00040-8

Elsabee MZ, Abdou ES (2013) Chitosan based edible films and coatings: A review. *Mater Sci Eng* **33**(4), 1819–1841. https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.010

Galić K (2009) Jestiva ambalaža u prehrambenoj industriji. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **4**(1-2), 23-31. Preuzeto s https://hrcak.srce.hr/49941

Gheorghita R, Gutt G, Amariei S (2020) The use of edible films based on sodium alginate in meat product packaging: An eco-friendly alternative to conventional plastic materials. *Coatings* **10**(2), 166. https://doi.org/10.3390/coatings10020166

Ghosh T, Katiyar V (2021) Edible Food Packaging: An Introduction. U: Ghosh T, Katiyar V (ured.), Nanotechnology in Edible Food Packaging, Springer, Singapore, str. 1-19. https://doi.org/10.1007/978-981-33-6169-0_1

Giz AS, Berberoglu M, Bener S, Aydelik-Ayazoglu S, Bayraktar H, Alaca BE, Catalgil-Giz H (2020) A detailed investigation of the effect of calcium crosslinking and glycerol plasticizing on the physical properties of alginate films. *Int J Biol Macromol* **148**, 49-55. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.10

Gomaa M, Hifney AF, Fawzy MA, Abdel-Gawad KM (2018) Use of seaweed and filamentous fungus derived polysaccharides in the development of alginate-chitosan edible films containing fucoidan: Study of moisture sorption, polyphenol release and antioxidant properties. *Food Hydrocol* **82**, 239–247. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.03.056

Gomezestaca J, Montero P, Gimenez B, Gomezguillen M (2007) Effect of functional edible films and high pressure processing on microbial and oxidative spoilage in cold-smoked sardine (*Sardina pilchardus*). *Food Chem* **105**(2), 511–520. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.00

Gontard N, Thibault R, Cuq B, Guilbert S (1996) Influence of relative humidity an filcomposition on oxygen and carbon dioxide permeabilities of edible films. *J Agr Food Chem* **44**, 1064–1069. https://doi.org/10.1021/jf9504327

Han J (2014) Edible Films and Coatings: A Review. U: Han JH (ured.) Innovations in Food Packaging, 2. izd., Elsevier Ltd., Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, str. 214-241.

Han JH, Gennadios A (2005) Edible films and coatings: a review. U: Han JH (ured.) Innovations in Food Packaging, Elsevier Ltd., str. 239–262. https://doi.org/10.1016/b978-012311632-1/50047-4

Homez-Jara A, Daza LD, Aguirre DM, Muñoz JA, Solanilla JF, Váquiro HA (2018) Characterization of chitosan edible films obtained with various polymer concentrations and drying temperatures. *Int J Biol Macromol* **113**, 1233–1240. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.05

ISO 13432:2002 Packaging Recoverable Through Composting and Biodegradation

Jancikova S, Jamróz E, Kulawik P, Tkaczewska J, Dordevic D (2019) Furcellaran/gelatin hydrolysate/rosemary extract composite films as active and intelligent packaging materials. *Int J Biol Macromol* **131**, 19–28. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.05

Janjarasskul T, Krochta M (2010) Edible packaging materials. *Annu Rev Food Sci Technol* **1**, 415-448. https://doi.org/10.1146/annurev.food.080708.100836

Jeevahan J, Chandrasekaran M (2019) Nanoedible films for food packaging: a review. *Mater Sci* **54**, 12290– 12318. https://doi.org/10.1007/s10853-019-03742-y.

Jeya JJ, Chandrasekaran M, Venkatesan SP, Sriram V, Britto JG, Mageshwaran G, Durairaj RB (2020) Scaling up difficulties and commercial aspects of edible films for food packaging: A review. *Trends Food Sci Tech* **100**, 210–222.https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.014

Katiyar V, Ghosh T (2021) Edible Food Packaging: An Introduction U: Vijay Kumar Thakur (ured.), Nanotechnology in Edible Food Packaging, Springer Nature Singapore Pte Ltd, Singapore str.1-19. https://doi.org/10.1007/978-981-33-6169-0

Khalil HPS, Lai TK, Tye YY, Rizal S, Chong EWN, Yap SW, Hamzah AA, Nurul Fazita MR, Paridah MT (2018) A review of extractions of seaweed hydrocolloids: Properties and applications. *Express Polym Lett* **12**(4) 296–317. https://doi.org/10.3144/EXPRESSPOLYMLETT.2018.27

Lalas S, Dourtoglou V (2003) Use of rosemary extract in preventing oxidation during deep-fat frying of potato chips. *J Am Oil Chem Soc* **80**(6), 579–583. https://doi.org/10.1007/s11746-003-0741-x

Liu Q, Han JC, Zhang YG, Li SM, Li J (2012) Antimicrobial and antioxidant activities of carboxymethyl cellulose edible films incorporated with rosemary extracts on fresh beef during refrigerated storage. *Adv Mat Res* **554-556**, 1187–1194. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/amr.554-556.1187

Luduena L, Vázquez A, Alvarez V (2012) Effect oflignocellulosic filler type and content on the behavior of polycaprolactone based eco-composites for packaging applications. *Carbohydr Polym* **87**, 411– 421. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.064

Luo Y, Liu H, Yang S, Zeng J, Wu Z (2019) Sodium alginate-based green packaging films functionalized by guava leaf extracts and their bioactivities. *Materials* **12**(18), 2923. https://doi.org/10.3390/ma12182923

Mahcene Z, Khelil A, Hasni S, Akman PK, Bozkurt F, Birech K, Goudjil MB, Tornuk F (2020) Development and characterization of sodium alginate based active edible films incorporated with essential oils of some medicinal plants. *Int J Biol Macromol* **145**, 124–132. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.093

Mihoci M (2015) Spektrofotometrijsko određivanje boje. *Kem Ind* **64**(11-12), 681–694. Preuzeto sa https://hrcak.srce.hr/file/218636

Moore J, Yousef M, Tsiani E (2016) Anticancer effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract and rosemary extract polyphenols. *Nutrients* **8**(11), 731. https://doi.org/10.3390/nu8110731

Moreno S, Scheyer T, Romano CS, Vojnov AA (2006) Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Res* **40**(2), 223–231. https://doi.org/10.1080/10715760500473834

Narloch P, Piatkiewicz W, Pietruszka B (2021) The effect of cement addition on water vapour resistance factor of rammed earth. *Materials* **14**(9), 2249. https://doi.org/10.3390/ma14092249

Nieto G, Ros G, Castillo J (2018) Antioxidant and antimicrobial properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A review. *Medicines* **5**(3), 98. https://doi.org/10.3390/medicines5030098

Onsøyen, E. (1997) Alginates. U: Imeson AP (ured.) Thickening and Gelling Agents for Food. Springer, Boston, MA, str. 22-44. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2197-6_2

Parreidt T, Müller K, Schmid M (2018) Alginate-based edible films and coatings for food packaging applications. *Foods* **7(10)**, 170. https://doi.org/10.3390/foods7100170

Pavlath AE, Orts W (2009) Edible Films and Coatings: Why, What, and How? U: Huber K, Embuscado M (Ured.) Edible Films and Coatings for Food Applications, Springer, New York, NY, str. 1–23 https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1_1

Pellá MCG, Lima-Tenório MK, Tenório-Neto ET, Guilherme MR, Muniz EC, Rubira AF (2018) Chitosan-based hydrogels: From preparation to biomedical applications. *Carbohyd Polym* **196**, 233–245.https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.033

Peng Y, Wu Y, Li Y (2013) Development of tea extracts and chitosan composite films for active packaging materials. *Int J Biol Macromol* **59**, 282–289. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.01

Petkoska T, Daniloski A, D'Cunha D, Naumovski NM, Broach AT (2021). Edible packaging: Sustainable solutions and novel trends in food packaging. *Food Res Int* **140**, 109981. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109981

Petrović V, Milković M, Valdec D (2013) Komparacija karakteristika ink-jet otisaka dobivenih vodenim, solventnim i UV bojilima. *Tehnički glasnik* **7**(2), 191 – 197. https://hrcak.srce.hr/105606

Piñeros-Hernandez D, Medina-Jaramillo C, López-Córdoba A, Goyanes S (2017) Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. *Food Hydrocoll* **63**, 488–495. https://doi.org/10.1016/j. foodhyd.2016.09.034

Pravilnik (2009) Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti materijala i predmeta koji dolaze u neposredan dodir s hranom. NN125/2009. Narodne novine 125, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2009_10_125_3092.html Pristupljeno 31. kolovoz 2022.

Pravilnik (2010) Pravilnik o prehrambenim aditivima. NN62/2010. Narodne novine 62, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2010_05_62_1981.html Pristupljeno 31. kolovoz 2022.

Redondo-Cuevas L, Hayes H, Nicol F, Raikos V (2018) Rosemary powder filtrate improves the oxidative stability and antioxidant properties of rapeseed oil: potential applications for domestic cooking. *Int J Food Sci Tech* **54**, 432-439.https://doi.org/10.1111/ijfs.13955

Restrepo AE, Rojas JD, Garcia OR, Sanchez L T, Pinzon M I, Villa CC (2018) Mechanical, barrier, and color properties of banana starch edible films incorporated with nanoemulsions of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and rosemary *(Rosmarinus officinalis*) essential oils. *Food Sci Technol Int* **24**(8), 705-712. https://doi.org/10.1177/1082013218792133

Ribeiro AM, Estevinho BN, Rocha F (2020) Preparation and incorporation of functional ingredients in edible films and coatings. *Food Bioprocess Tech* **14**, 209–231. https://doi.org/10.1007/s11947-020-02528-4

Roger S, Talbot D, Bee A (2006) Preparation and effect of Ca^{2+} on water solubility, particle release and swelling properties of magnetic alginate films. *J Magn Mater* **305**(1), 221–227. https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2006.01.005

Rossman JM (2009) Commercial Manufacture of Edible Films. U: Huber K, Embuscado M (ured) Edible Films and Coatings for Food Applications, Springer, New York, NY, str. 367–390 https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1_14

Russo R, Malinconico M, Santagata G (2007) Effect of cross-linking with calcium ions on the physical properties of alginate films. *Biomacromols* **8**(10), 3193–3197. https://doi.org/10.1021/bm700565h

Saklani P, Siddhnath, Das SK, Singh SH (2019) A review of edible packaging for foods. *Int J Curr Microbiol App Sci* **8**(7), 2885-2895. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.807.359

Salgado PR, Ortiz CM, Musso YS, Di Giorgio L, Mauri AN (2015) Edible films and coatings containing bioactives. *Curr Opin Food Sci* **5**, *86–92*.https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.09.004

Sanches-Silva A, Costa D, Albuquerque TG, Buonocore GG, Ramos F, Castilho MC, Machado AM, Costa HS (2014) Trends in the use of natural antioxidants in active food packaging: a review. *Food Addit Contam A* **31**(3), 374–395. https://doi.org/10.1080/19440049.2013.879215

Sasikumar B (2012) Rosemary. U: Peter K V (Ured.), Handbook of Herbs and Spices, 2. izd., Woodhead Publishing Limited, str. 452–468. https://doi.org/10.1533/9780857095671.452

Silva-Weiss A, Ihl M, Sobral PJA, Gómez-Guillén MC, Bifani V (2013) Natural additives in bioactive edible films and coatings: functionality and applications in foods. *Food Eng Rev* **5**(4), 200–216. https://doi.org/10.1007/s12393-013-9072-5

Singh B, Parwate DV, Shukla SK (2009) radiosterilization of fluoroquinolones and cephalosporins: assessment of radiation damage on antibiotics by changes in optical property and colorimetric parameters. *AAPS Pharm Sci Tech* **10**(1), 34–43.https://doi.org/10.1208/s12249-008-9177-y

Sirocchi V, Devlieghere F, Peelman N, Sagratini G, Maggi F, Vittori S, Ragaert P(2017) Effect of *Rosmarinus Officinalis* L. essential oil combined with different packaging conditions to extend the shelf life of refrigerated beef meat. *Food Chem* **221**, 1069–1076. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.054

Sothornvit R, Krochta JM (2005) Plasticizers in edible films and coatings. U: Han JH (ured.)Innovations in Food Packaging, Elsevier Acad., New York, str. 403-433 https://doi.org/10.1016/B978-012311632-1/50055-3

Tavassoli-Kafrani E, Shekarchizadeh H, Masoudpour-Behabadi M (2016) Development of edible films and coatings from alginates and carrageenans. *Carbohyd Polym* **137,** 360–374. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.074

Ulbin-Figlewicz N, Zimoch A, Jarmoluk A (2013) Plant extracts as components of edible antimicrobial protective coatings. *Czech J Food Sci* **31**(6), 596–600. https://doi.org/10.17221/68/2013-cjfs

UREDBA (EZ) br. 178/2002 EUROPSKOG PARLAMENTA I VIJEĆA o utvrđivanju općih načela i uvjeta zakona o hrani, osnivanju Europske agencije za sigurnost hrane te utvrđivanju postupaka u područjima sigurnosti hrane

UREDBA (EZ) br. 1935/2004 EUROPSKOG PARLAMENTA I VIJEĆA o materijalima i predmetima koji dolaze u dodir s hranom i stavljanju izvan snage direktiva 80/590/EEZ i 89/109/EEZ, Pristupljeno 27.6.2021.

UREDBA (EZ) br. 450/2009 EUROPSKOG PARLAMENTA I VIJEĆA o aktivnim i inteligentnim materijalima i predmetima koji dolaze u dodir s hranom

Yeddes W, Nowacka M, Rybak K, Younes I, Hammami M, Saidani-Tounsi M, Witrowa-Rajchert D (2019) Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activity of rosemary essential oils as gelatin edible film component. *Food Sci Technol Res* **25**(2), 321–329. https://doi.org/10.3136/fstr.25.321

Zhu F (2021) Polysaccharide based films and coatings for food packaging: Effect of added polyphenols. *Food Chem* **359**, 129871.https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.12987

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja KAROLINA HASL izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

_____

Vlastoručni potpis