

# Razvoj i karakterizacija jestivih filmova od kitozana, želatine i galne kiseline

---

**Poldan, Petra**

**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:159:888605>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

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



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2022.

Petra Poldan

**RAZVOJ I KARAKTERIZACIJA  
JESTIVIH FILMOVA OD KITOZANA,  
ŽELATINE I GALNE KISELINE**

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.

*Željela bih se zahvaliti mentorici doc. dr. sc. Mii Kurek na brojnim stručnim savjetima i prijedlozima, a posebno na izdvojenom vremenu, trudu i iznimnoj podršci koju mi je pružila tijekom pisanja diplomskog rada.*

*Hvala i mojoj dragoj obitelji koja me podržavala tijekom čitavog obrazovanja i uvijek bila uz mene.*

## 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

RAZVOJ I KARAKTERIZACIJA JESTIVIH FILMOVA OD KITOZANA, ŽELATINE I GALNE  
KISELINE

*Petra Poldan*, univ. bacc. ing. techn. aliment  
0058213207

**Sažetak:** Sukladno današnjim zahtjevima tržišta za smanjenom upotrebom plastičnih ambalažnih materijala, kao i visoko kvalitetnom hranom produženog roka trajanja, otvorili su prostor inovacijama u industriji pakiranja hrane. Cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj galne kiseline, kao bioaktivnog sastojka, na fizikalno kemijska svojstva (boja, transparentnost, debljina, udio vode, topljivost te kapacitet bubrenja), barijerna svojstva (kisik, ugljikov dioksid i vodena para), antioksidacijska svojstva (ukupni polifenoli) te biorazgradivost filmova. Pripremljeni su filmovi na bazi kitozana i želatine (CSGEL) bez ili s dodatkom galne kiseline u koncentracijama od 1 % (m/v) (CSGEL1) i 2 % (m/v) (CSGEL2). Dodatkom galne kiseline zabilježen je značajan porast ukupnih polifenola, smanjen je kapacitet bubrenja te propusnost na vodenu paru kao i propusnost na UV zračenje. No, dodatak galne kiseline značajno je oslabio barijerna svojstva filmova na plinove (O<sub>2</sub> i CO<sub>2</sub>) te je produžio vrijeme biorazgradnje u komercijalno dostupnoj zemlji.

**Ključne riječi:** kitozan, želatina, galna kiselina, aktivni filmovi, biorazgradivost, barijerna svojstva

**Rad sadrži:** 58 stranice, 13 slika, 7 tablica, 133 literaturna navoda, 1 prilog

**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. doc. dr. sc. Mia Kurek
3. doc. dr. sc. Marko Obranović
4. doc. dr. sc. Ivona Elez Garofulić (zamjenski član)

**Datum obrane:** 7. srpnja 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

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF EDIBLE FILMS BASED ON CHITOSAN,  
GELATINE AND GALLIC ACID

*Petra Poldan, univ. bacc. ing. techn. aliment.*

*0058213207*

**Abstract:** Due to the great commercial interest in reducing the use of single-use plastics, as well as needs for high-quality food with extended shelf-life, made great opening for innovations in food packaging industry. The aim of this work was to determine the influence of gallic acid, used as bioactive compound on physic-chemical (colour, transparency, thickness, water content and swelling), barrier (oxygen, carbon dioxide and water vapour), antioxidant (total phenolic content) properties together with biodegradability character. Chitosan and gelatin films were made without or with the addition of gallic acid in concentrations of 1 or 2 % (w/v) (CSGEL1 and CSGEL2, respectively). The addition of gallic acid resulted in the significant increase in total phenolic content, lower swelling, water vapour permeability and better UV blocking property. However, the addition of gallic acid significantly has impacted the gas barrier properties (O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>) and increased the degradation time in the commercial soil.

**Keywords:** chitosan, gelatine, gallic acid, active films, biodegradation, barrier properties

**Thesis contains:** 58 pages, 13 figures, 7 tables, 133 references, 1 supplement

**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:** Mia, Kurek, PhD, Assistant professor

**Reviewers:**

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

**Thesis defended:** July 7<sup>th</sup>, 2022

## Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. JESTIVI MATERIJALI ZA PAKIRANJE HRANE .....	4
2.1.1. Kitozan.....	4
2.1.2. Želatina.....	8
2.1.3. Višekomponentni filmovi.....	10
2.1.4. Plastifikatori .....	11
2.1.5. Izrada filmova.....	12
2.2. AKTIVNA AMBALAŽA NA BAZI BIOPOLIMERA .....	13
2.2.1. Galna kiselina .....	15
2.3. PRIMJENA JESTIVIH FILMOVA .....	15
2.4. ZAKONSKA REGULATIVA .....	17
3. EKSPERIMENTALI DIO .....	19
3.1. MATERIJALI .....	19
3.2. PRIPREMA FILMOVA .....	19
3.3. METODE KARAKTERIZACIJE FILMOVA .....	21
3.3.1. Određivanje debljine filmova.....	21
3.3.2. Određivanje boje filma .....	21
3.3.3. Mjerenje transparentnosti filma.....	22
3.3.4. Određivanje topljivosti filmova u vodi i udjela vode .....	23
3.3.5. Bubljenje filmova .....	23
3.3.6. Mjerenje propusnosti vodene pare kroz polimerni film.....	24
3.3.7. Mjerenje propusnosti plinova kroz polimerni film.....	25
3.3.8. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenola .....	26
3.3.9. Biorazgradivost filmova.....	27
3.3.10. Mjerenje pH otopina biopolimera.....	28
3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	28
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	29
4.1. PARAMETRI BOJE I TRANSPARENTNOST FILMOVA .....	29
4.2. UDIO VODE I SUHE TVARI, TOPLJIVOST I BUBRENJE FILMOVA .....	32
4.3. DEBLJINA, PROPUSNOST NA VODENU PARU (WVP) I BRZINA PRIJENOSA VODENE PARE (WVTR) FILMOVA.....	33
4.4. PROPUSNOST FILMOVA NA PLINOVE .....	35
4.5. UDIO UKUPNIH POLIFENOLA .....	37
4.6. BIORAZGRADIVOST FILMOVA.....	39
5. ZAKLJUČCI.....	41



6. LITERATURA .....	42
7. PRILOZI.....	58

# 1. UVOD

Suvremenim razvojem industrije i potrošačkog društva, proizvodnja i tržišna potražnja za plastičnom ambalažom se izrazito povećala, a s njezinim povećanjem došlo je do društvenog i znanstvenog osvještavanja o problematici primjene sintetičkih ambalažnih materijala kao i evidentnim posljedicama na ekološki sustav i ljudsko zdravlje (Prateepchanachai i sur., 2019). O relevantnosti problema prekomjerne upotrebe sintetičkih ambalažnih materijala, govori činjenica da plastika danas čini 80 % do 85 % morskog otpada na području Europske unije, gdje plastični predmeti za jednokratnu uporabu čine 50 %, a predmeti povezani s ribolovom 27 % ukupne količine otpada (Direktiva EU 2019/904). Osim problema gospodarenja otpadom i nerazmjernom upotrebom sintetičkih ambalažnih materijala, problem predstavlja i količina otpada od hrane. Prema statističkim podacima Organizacije za hranu i poljoprivredu (FAO), godišnje se gubi ili baci oko trećina proizvedene hrane radi isteka roka trajanja, promjena svojstava ili mikrobiološkog kvarenja (Motelica i sur., 2020). Problem upotrebe plastike i gomilanja otpada, te zahtjevi kupaca za kvalitetnijim proizvodima s dužim rokom trajanja, dovela je do interesa za istraživanje alternativnih materijala za pakiranje hrane, zbog čega razvoj jestivih filmova dobiva na sve većoj važnosti.

Filmovi na bazi biopolimera povezani su sa smanjenjem negativnog utjecaja na ekosustav i konceptom održivosti. Kao ambalažni materijal imaju funkciju mehaničke zaštite, barijere na vodenu paru, plinove i masti, očuvanja kvalitete, otpuštanja različitih komponenti i prevencije rasta mikroorganizama, a na njihova svojstva utječe formulacija, način proizvodnje i svojstva otapala i aditiva (Beikzadeh i sur., 2020). U svrhu produljenja roka trajanja, ali i poboljšanja proizvoda s nutritivnog aspekta, mogu se koristiti jestivi filmovi s dodatkom različitih aditiva, poput tvari aroma, antimikrobnih tvari ili antioksidansa. Također, određene bioaktivne komponente mogu se izolirati iz otpada hrane, što se uklapa u politiku održivog gospodarenja koja je posljednjih godina u trendu. Za izradu filmova koristit će se kitozan i želatina, a kao bioaktivni sastojak galna kiselina, budući da predstavljaju obećavajuće biomaterijale u razvoju jestive ambalaže, zahvaljujući svojstvu stvaranja filma, biorazgradivosti i jestivosti (Wang i sur., 2021).

U ovom diplomskom radu predloženi su sljedeći ciljevi:

- priprema jestivih, biorazgradivih filmova na bazi biopolimera (kitozan i želatina);
- utjecaj dodatka galne kiseline na svojstva pripremljenih filmova;

- karakterizacija i usporedba fizikalno-kemijskih i barijernih svojstava te biorazgradivosti pripremljenih filmova.

## 2. TEORIJSKI DIO

Plastika je zbog svojeg kratkog životnog vijeka, nemogućnosti ponovne upotrebe te neučinkovitih i neisplativih mogućnosti recikliranja, postala ekološki problem, posebice u onečišćenju vodenih površina. U cilju reguliranja ekološkog aspekta proizvodnje otpada iz plastike, stoga i ograničavanja upotrebe plastike kao ambalažnog materijala, bila je nužna uspostava pravnog okvira kojim bi se smanjili njezini štetni utjecaji na zdravlje i okoliš. Iz tog razloga Europska unija donijela je Direktivu (EU) 2019/904 Europskog parlamenta i Vijeća 5. lipnja 2019. godine o smanjenju utjecaja određenih plastičnih proizvoda na okoliš, kojoj je cilj smanjiti potrošnju plastike za jednokratnu upotrebu, proizvoda od oksorazgradive plastike i ribolovnog alata koji sadržava plastiku te zabranjuje njezino stavljanje na tržište. Uz to, Pravilnikom o ambalaži i otpadnoj ambalaži (NN br. 88/15, 78/16, 116/17, 14/20 i 144/20) propisuju se ciljevi u gospodarenju otpadnom ambalažom među kojima su recikliranje minimalno 55 % otpadne ambalaže te postizanje minimalne stope recikliranja ambalažnih materijala, što za plastiku iznosi 22,5 % računajući isključivo materijal koji je recikliran nazad u plastiku. Također, Međunarodna organizacija za standardizaciju (ISO) izdala je normu ISO 18604:2013 koja sadrži zahtjeve koje treba zadovoljiti određeni materijal za pakiranje hrane kako bi se mogao prikupiti, preraditi i reciklirati (Díaz-Montes i Castro-Muñoz, 2021).

Zbog velike količine otpada hrane i njegovog negativnog utjecaja na okoliš, u smislu potrošnje energenata, emisije ispušnih plinova, upotrebe resursa te onečišćenja vodenih površina i gubitka biološke raznolikosti, Europski parlament Rješenjem 2011/2175 (INI) predlaže politike smanjenja otpada. Jedna od predloženih strategija za reduciranje otpada hrane je naglašavanje važnosti ulaganja u učinkovitije načine pakiranja i metode skladištenja hrane. Osim toga, predlaže se razvoj različitih veličina pakiranja kako bi se smanjio udio otpada, ukazalo potrošačima na odgovarajuću količinu proizvoda, te dizajniranje pakiranja koje bi pomoglo u očuvanju kvalitete i produljenju roka trajanja (Europski parlament, 2011). Sve veći zahtjevi potrošača za minimalno procesiranim, prirodnijim, svježim i praktičnijim prehrambenim proizvodima predstavljaju izazov za industriju pakiranja hrane, uključujući i sve zahtjevniji regulatorni i zakonski okvir (Realini i Marco, 2014). Međutim, navedene okolnosti istovremeno stvaraju priliku industriji pakiranja za razvoj novih i inovativnih proizvoda koji bi udovoljili navedenim zahtjevima.

## 2.1. JESTIVI MATERIJALI ZA PAKIRANJE HRANE

Jestivi filmovi definiraju se kao tanki sloj materijala debljine do 0,3 mm, u/ili na površini namirnice koji potrošač može konzumirati te predstavljaju barijeru prema plinovima, vodenoj pari i otopljenim tvarima u samoj hrani ili između hrane i okoline (Bourlieu i sur., 2009; Galić, 2009; Díaz-Montes i Castro-Muñoz, 2021). Za razliku od jestivih premaza koji se nanose direktno na proizvod, filmovi se pripremaju i suše zasebno, te naknadno apliciraju na površinu proizvoda (Bourlieu i sur., 2009).

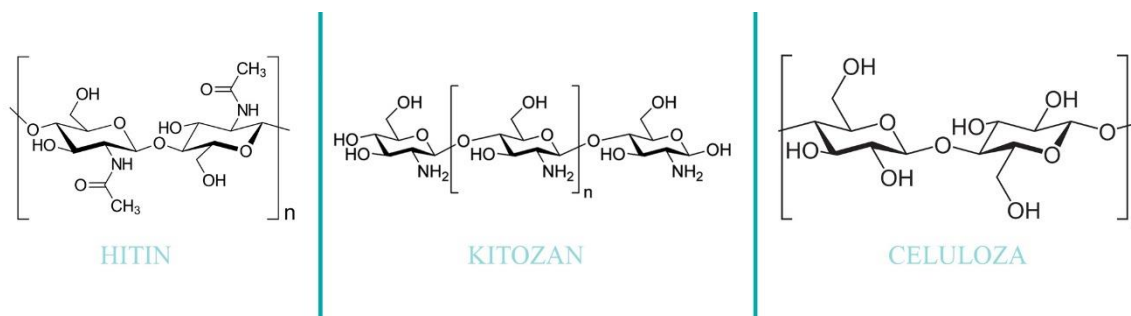
Kako bi bili prihvatljivi za upotrebu, jestivi filmovi trebaju biti netoksični, stabilni, dobro prijanjati na površinu, imati dobra mehanička i barijerna svojstva na vodenu paru, ali i plinove kao što su kisik, ugljikov dioksid, etilen te aromatske tvari. U suštini, svi dodani sastojci moraju biti jestivog kraktera te dodani u onoj količini koja je dozvoljena za ljudsku konzumaciju. Ovo posljednje se posebice odnosi na aktivne dodatke s posebnom funkcijom, kao što su primjerice eterična ulja i njihove komponente čija količina ne smije prelaziti one vrijednosti koje bi mogle imati negativnog utjecaja na ljudsko zdravlje, kao niti narušavati organoleptiku proizvoda (Motelica i sur., 2020).

Jestivi filmovi nisu namijenjeni, niti mogu zamijeniti tradicionalne nejestive sintetičke ambalažne materijale za dugotrajno skladištenje hrane, ali njihova primjenjivost leži u sinergističkom utjecaju da doprinose ukupnoj kvaliteti hrane, produljenju roka trajanja i poboljšanju ekonomske isplativosti materijala za pakiranje (u slučaju produženja trajnosti proizvoda) (Robertson, 2013). Prednosti takvih filmova nad sintetičkom ambalažom su: mogućnost konzumacije, relativno niski troškovi, doprinos zaštiti okoliša, poboljšanje organoleptičkih, mehaničkih i nutritivnih svojstava hrane, zaštita pojedinačnih porcija hrane, stvaranje barijere između komponenti heterogene hrane (Vujković i sur., 2007).

### 2.1.1. Kitozan

Kitozan je polisaharid dobiven alkalnom deacetilacijom iz hitina, koji je sastavni dio egzoskeleta rakova, škampa, jastoga, ali i staničnih stijenki kvasaca i gljiva (Darwesh i sur., 2018). Kopolimer je *N*-acetil-*D*-glukozamina i *D*-glukozamina, povezan  $\beta$ -1,4-glikozidnim vezama, a struktura mu je slična strukturi celuloze, koja umjesto acetilamino skupine ima hidroksilnu skupinu na drugom C atomu u molekuli (Benbettaïeb i sur., 2014). Slika 1. prikazuje kemijsku strukturu hitina, kitozana i celuloze. Zbog svoje biokompatibilnosti,

biorazgradivosti i netoksičnosti ima široku primjenu u područjima kao što su medicina, farmacija, prehrambena industrija, ali i u obradi vode i otapala, te agrikulturi. U prehrambenoj industriji koristi se kao: aditiv, sredstvo za vezanje masnoća, konzervans, dodatak za bistrenje voćnih sokova i pive, ambalažni materijal te u korigenciji mirisa i okusa (Martinac i Filipović-Grčić, 2002).



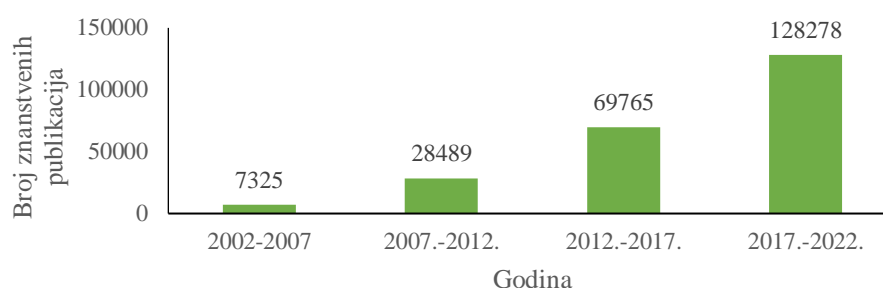
Slika 1. Kemijska struktura hitina, kitozana i celuloze (Anonymous 1, 2022)

S obzirom na široku primjenu kitozana, potrebna su njegova različita svojstva, koja ponajprije ovise o stupnju deacetilacije i molarnoj masi (Bajpai, 2019). Kitozan sa stupnjem deacetilacije od 75-80 % primjenjuje se u prehrambenoj industriji, a onaj sa stupnjem deacetilacije od 90-95 % u farmaceutskoj industriji (Martinac i Filipović-Grčić, 2002). Nadalje, što je veći stupanj deacetilacije to se više amino skupina može protonirati u kiselom mediju te se time poboljšava topljivost kitozana (Lavorgna i sur., 2010), koja još ovisi o pK<sub>a</sub> amino skupina, kemijskom sastavu, te duljini lanca (Nilsen-Nygaard i sur., 2015). Također, antioksidacijska aktivnost kitozana ovisi o stupnju deacetilacije, gdje se povećanjem stupnja deacetilacije, povećava njegova antioksidacijska aktivnost (Nair i sur., 2020).

Kitozan je prikladan materijal za pakiranje hrane zbog izvrsne sposobnosti stvaranja filma, dobrih mehaničkih svojstava te niske propusnosti na plinove (Benbettaieb i sur., 2014). S obzirom da se kitozan s razvojem prehrambene tehnologije i pakiranja intezivno koristi posljednjih desetljeća u tom prehrambenom sektoru, u znanstvenoj literaturi postoje mnogi literaturni pregledi usredotočeni na cjelokupnu primjenu kitozana (Wang i sur., 2018; van den Broek i sur., 2015; Kerch i sur., 2015; Kumar i sur., 2000), antimikrobne filmove (Dutta i sur., 2009), aktivne i inteligentne filmove za pakiranje (Flórez i sur., 2022; Van Long i sur., 2016; Aider i sur., 2010) ili praktičnu primjenu u hrani (Romanazzi i sur., 2017). Kao što je prikazano na slici 2, može se primijetiti snažan porast broja znanstvenih publikacija povezanih s kitozansom i ambalažnom industrijom posljednjih 20 godina. Neka od svojstava filmova na bazi kitozana za pakiranje prikazani su u tablici 1.

**Tablica 1.** Primjeri nekih svojstava filma za pakiranje od kitozana

Konc. Kitozan	Kiselina za pripremu	Svojstva filma	Referenca
<b>Mehanička svojstva</b>			
1 %	octena	TS: 61,8 MPa, E: 4,59 %	Leceta i sur., 2013
2 %	octena	TS: 8,82 Mpa, E: 21,13 %	Luangapai i sur., 2022
2,5 %	octena	TS: 10 MPa, E: 58 %	Bof i sur., 2015
<b>Propusnost na vodenu paru (<math>\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}</math>)</b>			
2 %	octena	$(3,1-3,2) \times 10^{-10}$	Park i sur., 2002
	limunska	$(3,1-3,2) \times 10^{-10}$	
	mliječna	$(4,7-6,9) \times 10^{-10}$	
	jabučna	$(2,6-4,1) \times 10^{-10}$	
2 %	octena	$3,45 \times 10^{-10}$	Kurek i sur., 2012
2 %	octena	$3,61 \times 10^{-11}$	Lungapai i sur., 2022
<b>Propusnost na plinove</b>			
2 %	octena	$\text{PO}_2: 21,47 \times 10^{-17} \text{ g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$	Kurek i sur., 2012
1,3 %	octena	$\text{PO}_2: 4 \times 10^3 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2} \text{d}^{-1}$	Zhang i sur., 2019
<b>Termička stabilnost</b>			
2 %	octena	Termička degradacija u 2 stupnja: 30-105 °C isparavanje vode 106-250 °C degradacija glicerola >250 °C degradacija polimernog matriksa	Yong i sur., 2019
2 %	octena	Termička degradacija u 2 stupnja: 30-150 °C isparavanje vode 200-365 °C kemijska degradacija i deacetilacija kitozana	Kusmono i sur., 2019

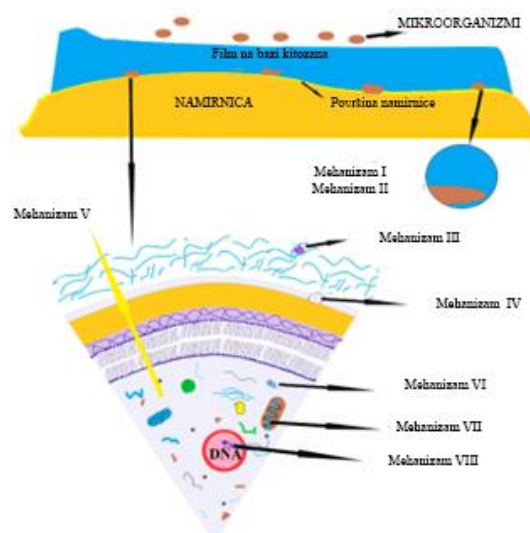


Slika 2. Broj znanstvenih publikacija u Scopusu vezanih za filmove od kitozana u periodu od 2002. do 2022. godine.

Antimikrobno djelovanje kitozana ovisi o njegovoj molarnoj masi, stupnju deacetilacije, koncentraciji u otopini, pH medija i vrsti mikroorganizama (Khwaldia i sur., 2010). Prema znanstvenim istraživanjima, na kitozan su osjetljive gram pozitivne i gram negativne bakterije te gljivice (Robertson, 2013). Postoji više objašnjenja o njegovom antimikrobnom djelovanju, a shematski prikaz predloženih mehanizama dan je na slici 3. Osim

što u nanosu tankog filma predstavlja fizičku barijeru, kitozan posjeduje i dobra barijerna svojstva prema kisiku, što nepovoljno utječe na rast i razvoj aerobnih mikroorganizama (mehanizam I i II). Zatim, oštećuje staničnu membranu bakterija, što rezultira istjecanjem staničnog sadržaja (mehanizam III i IV). Difuzijom kroz staničnu stijenku može djelovati kao kelatogena tvar, vezujući metale u tragovima i esencijalne hranjive tvari, što doprinosi inhibiciji rasta mikroorganizama i stvaranju toksina (mehanizam V i VI). Kitozan djeluje i na ekspresiju gena te se može vezati s DNA čime inhibira replikaciju (mehanizam VII i VIII) (Motelica i sur., 2020). Uz navedeno, mehanizam antimikrobnog učinka se objašnjava otpuštanjem i migracijom protoniranih jedinica glukozamina iz biopolimera u hranu (Robertson, 2013).

Kitozanu izoliranom iz škampa priznat je GRAS (eng. *Generally recognized as safe*) status 2002. (FDA, 2002), 2005. (FDA, 2005) i 2013. godine (FDA, 2013), dok je onom izoliranom iz *Aspergillus niger* GRAS status priznat 2011. godine (FDA, 2011).



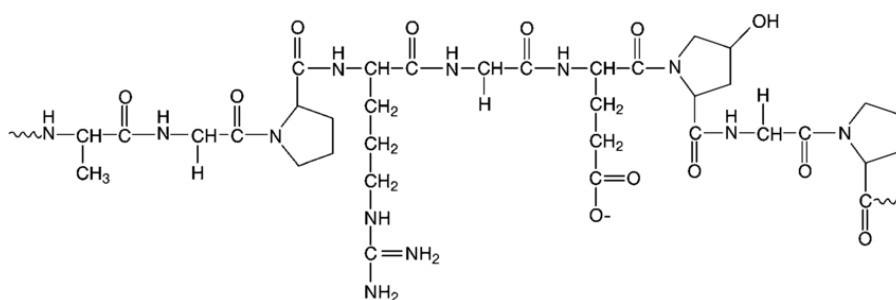
Slika 3. Mehanizmi antimikrobnog djelovanja kitozana (Motelica i sur., 2020)

Budući je prevalencija alergije na hranu u značajnom porastu u posljednjim desetljećima, važno je napomenuti i potencijalnu alergenost uporabe kitozana izoliranih iz morskih školjkaša kod onih ciljanih skupina potrošača s alergijama na riblje proizvode. Suprotno tome, u jednom istraživanju, Bae i sur. (2013) su prikazali potencijalnu primjenu kitozana i hitina u prevenciji alergijske reakcije na kikiriki. Mogućnost primjene kitozana u prehrambenoj industriji ovisi o njegovoj čistoći, budući da zaostali alergeni mogu imati potencijalno štetne posljedice na ljudsko zdravlje. Slijedom navedenoga, potrebna su daljnja istraživanja alergijskog potencijala kitozana izoliranih iz oklopa morskih školjkaša.



### 2.1.2. Želatina

Želatina je protein topljiv u vodi, a dobiven djelomičnom hidrolizom kolagena koji je sastavni dio kosti, kože, ligamenata i vezivnog tkiva sisavaca ili riba (Rawdkuen i sur., 2013). Struktura želatine određena je svojstvima kolagena iz kojeg se dobiva, a udio pretvorbe kolagena u želatinu ovisi o sljedećim čimbenicima: prethodnoj obradi kiselinom ili lužinom, pH, temperaturi i vremenu ekstrakcije (Bajpai, 2019). Ovisno o izvoru postoje želatine životinjskog i ribljeg podrijetla. Želatina ribljeg podrijetla je proteinski proizvod proizveden djelomičnom hidrolizom riblje kože (ili) ljuske bogate kolagenom. Kod životinjske želatine, ovisno o prethodnoj obradi razlikujemo dvije vrste: tip A dobiven iz svinjske kože, prethodnom kiselom obradom, i tip B dobiven iz goveđe kože i kostiju, prethodnom alkalnom obradom (Haug i Darget, 2009). Želatina sadrži visoki udio prolina, glicina i hidroksiprolina koji joj daju izvrsnu sposobnost stvaranja filmova (Wang i sur., 2021). Kemijska struktura želatine prikazana je na slici 4.



Slika 4. Kemijska struktura želatine (Kommareddy i sur., 2007)

Želatina vrhunske kvalitete ima visoku molekularnu masu i daje čvršće gelove (Haug i Darget, 2009). U kontekstu jestivih materijala za pakiranje hrane, želatina posjeduje poželjna svojstva, kao što su: topljivost u ustima uz brzo i intenzivno oslobađanje arome i okusa, jedinstvena tekstura, elastičnost i sjaj, visok udio proteina (s ciljem obogaćivanja proizvoda) te želiranje pri normalnom pH većine namirnica, kao i temperaturi hlađenja/obrade (Karim i Bhat, 2008). Zbog svojih funkcionalnih i tehnoloških svojstava želatina ima raznovrsnost upotrebe. Koristi se u konditorskoj, mliječnoj i farmaceutskoj industriji (Haug i Darget, 2009).

Poboljšanje konzistencije, stabilnosti i elastičnosti proizvoda može se postići upotrebom želatinskih filmova, gdje se smanjenjem gubitka vlage zadržava sočnost i okus te se poboljšava i njihova boja, tekstura, nutritivna vrijednosti i izgled (Arbolea i sur., 2008). Želatina pokazuje visoki potencijal kao materijal za izradu jestivih filmova zahvaljujući svojoj

zastupljenosti, biorazgradivosti i niskoj cijeni. Osim toga, želatina ima dobra svojstva prevlačenja, topiva je u toploj vodi, dok su njezini filmovi dobre čvrstoće i male poroznosti (Vujković i sur., 2007). No, filmovi napravljeni od želatine izolirane od goveđe ili svinjske kože posjeduju slaba barijerna svojstva na vodenu paru, koja se pak mogu poboljšati dodatkom lipida, na primjer maslinovog ulja (Ma i sur., 2012). Neki od literaturnih primjera filmova od želatine dani su u tablici 2.

Tablica 2. Primjeri nekih svojstava filma za pakiranje od želatine

Konc. želatine	Porijeklo želatine	Svojstva filma	Referenca
<b>Mehanička svojstva</b>			
4 %	pileća koža	TS: 2,11 MPa, E: 65,82 %	Alias i Sarbon, 2019
1 %	riba	TS: 1, 28 Mpa, E: 102,31 %	Al-Hassan i Norziah, 2012
3 %	kostorošci	TS: 2,34 MPa, E: 60 -70 %	Arpi i sur., 2018
	tilapija	TS: 1,72 MPa, E: 60 -70 %	
3,5 %	koža ribe talapije	TS: 42,86 MPa, E: 13.25 %	Tongnuanchan i sur., 2012
4 %	pileća koža	TS: 1,75MPa, E: 148,33 %	Nazmi i Sarbon, 2017
<b>Propusnost na vodenu paru</b>			
1 %	riba	$(1,5 - 2) \times 10^{-4} \text{ g mm m}^{-2} \text{ hPa}^{-1}$	Al-Hassan i Norziah, 2012
3,5 %	koža ribe talapije	$4.07 \times 10^{-11} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$	Tongnuanchan i sur., 2012
4 %	pileća koža	$2,10 \times 10^{-3} \text{ g mm m}^{-2} \text{ hPa}^{-1}$	Alias i Sarbon, 2019
3 %	kostorošci	$0,3 - 0,4 \times 10^{-2} \text{ g mm mm}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ mmHg}^{-1}$	Arpi i sur., 2018
	tilapija	$0,8 - 1,0 \times 10^{-2} \text{ g mm mm}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ mmHg}^{-1}$	
4 %	pileća koža	$0,024 \text{ g mm h}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ kPa}^{-1}$	Nazmi i Sarbon, 2017
<b>Termička stabilnost</b>			
4 %	pileća koža	$T_m = 45,46 \text{ }^\circ\text{C}$	Alias i Sarbon, 2019
1 %	riba	$T_m = 157,61 \text{ }^\circ\text{C}$	Al-Hassan i Norziah, 2012
3,5 %	koža ribe talapije	Termička degradacija u 3 stupnja: 67,50 - 87,50 °C isparavanje vode 200,75 - 239,92 °C degradacija glicerola > 305,48 °C degradacija polimernog matriksa	Tongnuanchan i sur., 2012
3 %	sipa	Termička degradacija u 3 stupnja: 50,03 - 70,00 °C isparavanje vode 196,30 - 216,71 °C degradacija glicerola > 271,40 °C degradacija polimernog matriksa	Hoque i sur., 2011

TS – vlačna čvrstoća (eng. *Tensile strength*), E – deformacija na granici elastičnosti (eng. *Elongation*),  $T_m$  – temperatura taljenja

Želatini je priznat GRAS status prema Agenciji za hranu i lijekove (FDA), Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO), Organizaciji za prehranu i poljoprivredu (FAO), Europskoj komisiji (EK) i kineskom nacionalnom standardu GB 6783-2013 (Wang i sur., 2021). Unatoč gore navedenim pogodnostima njezine konzumacije, postoje određene zabrinutosti u pogledu zdravstvene sigurnosti upotrebe želatine izolirane iz životinjskih izvora. Zbog pojave bolesti šaka, stopala, usta te goveđe spongiformne encefalopatije, javila se potreba tržišta za alternativnim izvorima želatine. Jedan takav izvor su riblja koža i kosti koje predstavljaju nusproizvod ribarstva. Tako proizvedena želatina prihvatljivija je s etičkog i vjerskog stajališta određene skupine potrošača (Rawdkuen i sur., 2013) te se na taj način promiče valorizacija otpada riblje industrije (Uranga i sur., 2018). Međutim, javljaju se drukčiji izazovi s obzirom na to da su alergije na ribu vrlo česte, zbog čega riblja želatina predstavlja potencijalni alergen. Glavni alergenom u goveđoj želatini, ali i u onoj ribljeg porijekla predstavlja kolagen tip I (Sakaguchi i sur., 2000). Dok je dokazano da goveđa želatina izaziva alergijske reakcije, André i sur. (2003) su pokazali je da želatina izolirana iz kože tune predstavlja minimalni rizik od alergijskih reakcija, zahvaljujući procesu proizvodnje kojim se eliminiraju alergeni.

### 2.1.3. Višekomponentni filmovi

Jestivi filmovi mogu biti pripremljeni od polisaharida, proteina, lipida ili njihovom kombinacijom. Upotrebom više biopolimera dobivaju se višekomponentni filmovi, promijenjenih mehaničkih i barijernih svojstava, koji pokazuju bolja fizikalna svojstva nego oni proizvedeni na bazi jednog biopolimera (Yousuf i sur., 2021). Primjerice, lipidi i voskovi često se kombiniraju s proteinima ili polisaharidima, gdje lipidi zahvaljujući svojoj hidrofobnosti osiguravaju bolju barijeru na vodenu paru, dok dodatak proteina ili polisaharida osigurava strukturni integritet kompozitnih filmova s boljim mehaničkim svojstvima (Khalil i sur., 2019; Debeaufor i sur., 1993).

U svrhu poboljšanja svojstava filmova na bazi kitozana dodaju se drugi prirodni biopolimeri, kao što su polisaharidi (celuloza, pektin, karagenan i alginati) ili proteini (kazeinat, želatina ili kolagen) (Nair i sur., 2020). Prema literaturnim istraživanjima čini se da su upravo kitozan i želatina najčešće primjenjivani biopolimeri za izradu jestive ambalaže (Beikzadeh i sur., 2020). Njihova kompatibilnost za izradu jestivih višekomponentnih filmova objašnjava se sljedećim mehanizmom: vrijednost  $pK_a$  kitozana iznosi 6,5 (Nilsen-Nygaard i sur., 2015), što ga čini pozitivno nabijenim u kiselom mediju, dok je želatina pri pH nižim od

izoelektrične točke negativno nabijena te iz tog razloga mogu međusobno reagirati kao polianion i polikation tvoreći polielektrični kompleks (Rezaee i sur., 2018). U kompleksu kitozan-želatina dolazi do nastajanja vodikovih veza i elektrostatskih interakcija između pozitivno nabijenih amino skupina ( $\text{NH}_3^+$ ) kitozana i negativno nabijenih karboksilnih skupina ( $\text{COO}^-$ ) želatine (Prateepchanachai i sur., 2019), čime se dobije film kompaktnije strukture s novim fizikalnim svojstvima (Benbettaieb i sur., 2014). Vodikove veze i elektrostatske interakcije ujedno su i najzastupljenije veze između kitozana i želatine te je njihov učinak dvostruk: a) s jedne strane omogućuju nastajanje više formi kompleksa, čime osiguravaju dobru miješanost kitozana i želatine; b) s druge pak strane, ometaju geliranje želatine čime utječu na formiranje nukleacijskih točaka te nastaje manje trostrukih zavojnica želatine, rezultirajući smanjenom čvrstoćom gela i promijenjenim svojstvima kompozitnog filma (Qiao i sur., 2017). Zaključno, kitozan i želatina zbog mogućnosti stvaranja trodimenzionalne mreže stabilizirane elektrostatskim interakcijama, predstavljaju obećavajuću kombinaciju biopolimera kao materijala za proizvodnju jestive ambalaže.

#### 2.1.4. Plastifikatori

U svrhu poboljšanja svojstava polimerne mreže u kompozitne filmove se dodaju razni aditivi kao što su plastifikatori, emulgatori, nanočestice, bojila, UV blokatori i sl. S obzirom na proizvodnju i primjenu, jedan od glavnih ciljeva je poboljšanje mehaničkih svojstava i to prvenstveno elastičnosti filмова, bez koje ne bi bila moguća ni proizvodnja ni aplikacija filмова ili premaza. Nadalje, plastificirani filmovi zbog svoje elastičnosti bolje prijanjaju uz proizvod, a s vremenom skladištenja potrebno je također osigurati njihovu postojanost odnosno da ne dolazi do pucanja polimerne mreže. Plastificiranje se može provesti na dva načina: modifikacijom kemijske strukture polimera (kopolimerizacijom, selektivnom hidrogenacijom ili transesterifikacijom), te dodavanjem plastifikatora (Guilbert i sur., 1995). Plastifikatori interferiraju s polimernim lancima, narušavajući intramolekulske sile što dovodi do povećanja, razrjeđenja i omekšavanja strukture polimera uz povećanje mobilnosti polimera, kao i koeficijenta difuzije plinova ili vode (Vujković i sur., 2007). Smanjuju krhkost i temperaturu staklastog prijelaza (Guilbert i sur., 1995). U prehrambenoj industriji uglavnom se koriste sljedeći plastifikatori: mono-, di-, oligo-saharidi (glukoza, fruktozno-glukozni sirupi), polioli (sorbitol, glicerol, derivati glicerila i polietilen glikoli), lipidi i derivati (masne kiseline, monogliceridi i derivati estera, fosfolipidi, surfaktanti) (Bourlieu i sur., 2009). Isti se također koriste za izradu jestivih prevlaka i filмова.

Jedan od najčešće korištenih plastifikatora je glicerol, koji se koristi za poboljšanje fleksibilnosti i rastezljivosti filmova. Topiv je u vodi, nehlapljiv te se nalazi na listi aditiva FDA (Thakhiew i sur., 2015). Dodatkom plastifikatora glicerola dolazi do narušavanja intra- i međumolekularnih interakcija između lanaca kitozana i sprječavanje nastajanja vodikovih veza susjednih lanaca kitozana, čime nastaje više vodikovih veza između molekula glicerola i glukoaminskih jedinica kitozana (Prateepchanachai i sur., 2019). Važno je istaknuti da se u uvjetima visoke relativne vlažnosti, molekule vode mogu apsorbirati na polimerne lance, uzrokujući plastifikacijski učinak što rezultira promjenama toplinskih, barijernih i mehaničkih svojstva filmova, a sam plastifikacijski učinak ovisi o stupnju interakcije između polimernih lanaca i adsorbiranih molekula vode (Aguirre-Loredo i sur., 2015).

#### 2.1.5. Izrada filmova

Za izradu jestivih filmova postoji više tehnika, pri čemu način i uvjeti izrade utječu na njihove karakteristike i svojstva. Općenito, filmovi trebaju biti proizvedeni tako da su dovoljno otporni na lomljenje i habanje te dovoljno fleksibilni da se odupru deformacijama (Guilbert i sur., 1995). Tehnike koje se učestalo koriste za izradu filmova su izlivanje filmogene otopine u laboratorijsko posuđe (npr. staklene, plastične ili teflonske Petrijeve zdjelice, ploče od pleksiglasa ili teflona), elektrospređanje te termoplastične metode.

Tehnika izlivanja filmogene otopine sastoji se od tri koraka, a to su: izlivanje, sušenje i skladištenje filmova kako bi se očuvala njihova svojstva. Ova tehnika je jeftina, jednostavna za izvođenje i ekološki prihvatljiva, no za prelazak u industrijske razmjere potrebna su daljnja istraživanja (Wang i sur., 2021). Kod ove tehnike, debljina filmova se kontrolira izlivanjem uvijek iste količine filmogene otopine po površini suporta, odnosno osiguravanjem iste količine suhe tvari po određenoj površini. Za pripremu filmogene otopine prvo se biopolimeri otapaju u odgovarajućem otapalu (najčešće je riječ o destiliranoj vodi ili vodeno-alkoholnom ili slabo kiselom mediju), dodaju se aditivi i/ili plastifikatori te se izliva u staklene ili plastične Petrijeve zdjelice. Sušenje se može provesti u ventiliranoj klima komori (Bandeira i sur., 2014) ali i pri sobnoj temperaturi (Jiang sur., 2019), dok se za skladištenje najčešće upotrebljava eksikator s odgovarajućom zasićenom otopinom određene soli ili drugog odgovarajućeg reagensa za osiguravanje predviđene relativne vlažnosti.

Elektrospređanje je metoda koja se u svojoj osnovi sastoji od prolaska polimerne otopine kroz špricu, pod djelovanjem električnog polja, gdje rezultirajuća nestabilnost u otopini uzrokuje nastanak tankog mlaza polimerne otopine koja se skrućuje u vlakna tvoreći vlaknastu

mrežu (Ghorani i sur., 2020). Ovaj proces je ekonomičan te primjenjiv za proizvodnju nanovlakna s velikom specifičnom površinom, visokom mehaničkom čvrstoćom i visokom učinkovitošću inkapsulacije lijekova (Lin i sur., 2019).

Termoplastične metode uključuju ekstruziju, tehniku puhanja, kompresijsko prešanje i njihove kombinacije (Wang i sur., 2021). Tehnika kompresijskog prešanja i ekstruzija su brže i učinkovitije, što ih čini prikladnijima za upotrebu u industrijskim razmjerima (Nilsuwan i sur., 2019). Također treba imati na umu da rijetko koji od jestivih polimera posjeduje termoplastična svojstva pa je njihova proizvodnja ekstruzijom itekako otežana.

## **2.2. AKTIVNA AMBALAŽA NA BAZI BIOPOLIMERA**

Jestivi filmovi s dodatkom funkcionalnih sastojaka klasificiraju se kao aktivni materijali čija se primjena na Europskom kontinentu odobrava tek 2009. godine, za razliku od primjerice Japana gdje njihova primjena datira 40-ak godina unazad. Uredbom (EZ) br. 450/2009 nastoje se 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. Detaljniji podaci o zakonskoj regulativi dani su u podpoglavlju 2.3. Zakonska regulativa.

Jedna od najvažnijih prednosti upotrebe jestivih filmova kao aktivnog pakiranja je mogućnost kontroliranog otpuštanja i zadržavanja aktivne komponenta na površini hrane u kritičnim koncentracijama kroz duži vremenski period, čime se rješava problem difuzije agensa u hranu i/ili njihove neutralizacije na površini prilikom tretiranja površine špricanjem ili potapanjem u otopine s antibakterijskim agensima. Ovakav pristup važan je kod namirnica gdje se porast mikroorganizama događa ponajprije na površini, kao što su meso i mesni proizvodi (Ouattara i sur., 2000). Budući da koncept postupnog otpuštanja aktivne komponente pomoću aktivnih filmova omogućuje smanjenje upotrebe kemijskih konzervansa u prehrambenim proizvodima, predmetno svojstvo može se koristiti u proizvodnji s ciljem stvaranja pozitivnije percepcije potrošača (Benbettaieb i sur., 2020). Primjerice, kitozan pokazuje obećavajuća svojstva kao medij za ugradnju i/ili postupno otpuštanje aktivnih komponenti zbog svojeg pozitivnog naboja pri određenom pH (Bajpai, 2019).

Proces otpuštanja aktivne komponente potaknut je kombinacijom procesa difuzije i bubrenjem filma, pri čemu važnu ulogu igra dostupnost vode. Sam mehanizam otpuštanja aktivne tvari opisuje se u dvije faze. Prva faza je naglo otpuštanje aktivne komponente koja je

rezultat brzog otapanja aktivnog spoja na površini kruto-tekuće, dok se druga faza oslobađanja aktivne komponente kontrolira mehanizmom razgradnje polimera (Rivero i sur., 2013). Općenito, na otpuštanje i bioaktivnost dodane komponente utječu različiti parametri kao što su: molekulska težina aktivnog spoja, interakcija s polimerom, struktura polimerne mreže, uvjeti obrade i svojstva hrane, temperatura, sadržaj soli, viskoznost i aktivitet vode.

Prema istraživanju Rezaee i sur. (2018) otpuštena koncentracija antioksidansa (galne kiseline) iz filmova na bazi kitozana i želatine nije dosegla ravnotežu ni nakon 25 dana, što pokazuje svojstvo produženog otpuštanja. To potvrđuje i istraživanje Benbettaieb i sur. (2020) koje pokazuje da vrijeme potrebno za postizanje maksimalne antioksidacijske aktivnosti u slučaju čistog praha galne kiseline iznosi 10 minuta, a za filmove na bazi kitozana i želatine s dodatkom galne kiseline iznosi nekoliko sati. Isto tako, antioksidacijska aktivnost galne kiseline u prahu i one inkorporirane u film na bazi kitozana i želatine ne mijenja se značajno, tj. način primjene galne kiselina nije utjecao na antioksidacijsku aktivnost nego na vrijeme njezinog oslobađanja. Međutim, Bertolo i sur. (2020) ističu razliku antioksidacijske aktivnosti samog ekstrakta kore nara (492 mg GAE g<sup>-1</sup> ekstrakta) i antioksidacijske aktivnosti ekstrakta kore nara inkomponiranog u filma na bazi kitozana i želatine (188 mg GAE g<sup>-1</sup> ekstrakta). Autori su ovu pojavu objasnili mogućim nastajanjem vodikovih veza između fenolnih spojeva prisutnih u ekstraktu (antocijanini, elaginske kiseline, tanini, itd.) s aaminskim, amidnim i hidroksilnim skupinama kitozana, kao i s karbonil, karboksil i amidnim skupinama želatine, pri čemu se smanjuje koncentracija fenola dostupnih za reakciju s Folin-Ciocalteu reagensom.

Benbettaieb i sur. (2020) navode da se koeficijent difuzije smanjuje povećanjem viskoznosti medija za oslobađanje. Također, na otpuštanje aktivnih komponenti u hidrofilnim filmovima, odnosno filmovima na bazi kitozana i želatine, može se utjecati i dodatkom hidrofobnih molekula. Na taj način se usporava hidratacija filma, čime se postiže kontrola otpuštanja aktivnih komponenti (Ouattara i sur., 2000).

Vrijeme otpuštanja bioaktivnih tvari utječe na trajnost prehrambenih proizvoda koji su zapakirani u aktivnu jestivu ambalažu, a samim produljenjem trajnosti hrane smanjuje se količina otpada od hrane. Za produljenje roka trajnosti i sprječavanje razvoja i širenja mikroorganizama primjenjivi su jestivi filmovi s dodatkom antimikrobnih agensa kao medija za postupno otpuštanje aktivne tvari. Kako bi se odabrala pogodna antimikrobna tvar potrebno je uzeti u obzir karakteristike prehrambenih proizvoda (npr. pH, udio vode, nutritivni sastav i uvjete skladištenja) kojima se može predvidjeti rast određenih mikroorganizama te željeni utjecaj na određeni mikroorganizam (Rivero i sur., 2013). Istraživanje Wang i sur. (2019) pokazuje da dodatak fenolnih kiselina, točnije galne i kafeinske kiseline, uvelike povećava

antimikrobno djelovanje kitozanskih filmova, što se može objasniti interakcijom pozitivno nabijene amino skupine fenolnih kiselina s negativno nabijenom staničnom stijenkam mikroorganizama rezultirajući istjecanjem unutarstaničnih komponenti. Nadalje, istraživanje Sun i sur. (2014) pokazuje antimikrobna svojstva kitozanskih filmova s dodatkom različitih koncentracija galne kiseline prema *E. coli*, *S. typhimurium*, *B. subtilis* i *L. innocua*, gdje su antimikrobna svojstva kitozanskih filmova značajno poboljšana dodatkom galne kiselina te se povećanjem njzine koncentracije smanjio porast navedenih bakterija. Također, koncentracija monoterepnoida direktno utječe na snagu inhibicije mikroorganizama te je antioksidativni potencijal izravno povezan s ukupnim sadržajem polifenola u filmovima (Baygar, 2019).

Osim antioksidacijskog i antimikrobnog utjecaja, dodani aditivi utječu i na mehanička i/ili barijerna svojstva filmova. Bonilla i Sobral (2016) su pokazali da dodatak ekstrakata ružmarina, cimeta, guarane i boldo biljke značajno povećava sjaj filma, dok se propusnost na vodenu paru ne mijenja značajno u odnosu na filmove bez ekstrakta. Nadalje, De Moraes Crizel i sur. (2018) su pokazali da se dodatkom brašna komine masline stvara heterogena i gruba struktura filma lošijih mehaničkih svojstava, dok je netopljivost brašna u otopini kitozana dovela do povećane poroznosti i topljivosti filmova u vodi. Međutim, dodatak mikročestica komine maslina doveo je do homogenije i kompaktnije strukture, boljih mehaničkih svojstava bez promjena u propusnosti filma na vodenu paru i topljivosti.

### 2.2.1. Galna kiselina

Galna kiselina ili 3,5,7-trihidroksibenzojeva kiselina i njezini derivati prirodni su produkti hidrolize tanina (Daneshfar i sur., 2008). Jedna je od najčešće korištenih fenolnih kiselina (Wang i sur., 2019). Može se naći u bobičastom voću, agrumima, žitaricama, čaju, vinu i začinskom bilju (Aytac i sur., 2016). Zahvaljujući svojoj biološkoj aktivnosti tj. antioksidativnim, antimikrobnim i antihiperглиkemijskim svojstvima koristi se u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Da Rosa i sur., 2013). Neki autori izdvajaju i izazove primjene galne kiseline zbog nestabilnosti pri ekstremnim temperaturama i u prisutnosti svjetla ili kisika, što su uobičajeni uvjeti prerade i skladištenja hrane (Rezaee i sur., 2018).

## 2.3. PRIMJENA JESTIVIH FILMOVA

Unatoč navedenim prednostima upotrebe jestive ambalaže, javlja se i niz izazova koje treba savladati prije njezine komercijalizacije. U usporedbi sa sintetičkim materijalima, jestiva



ambalaža predstavlja slabiju zaštitu proizvoda zbog lošijih mehaničkih i barijernih svojstava na plinove i tekućine. Zbog nepovoljnih svojstava javlja se i problematika ekonomske i tehnološke neisplativosti prilikom prelaska iz laboratorijske proizvodnje na proizvodnju u industrijskim razmjerima. Jedan od najvećih izazova plasiranja jestive ambalaže na tržište je manjak procjene njezine jestivosti i biorazgradivosti (Jeya i sur., 2020). U pogledu sigurnosti upotrebe javlja se i pitanje mikrobiološke ispravnosti ovakve ambalaže, na koje je moguće odgovoriti nužnom primjenom vanjskih omota kako bi se takva ambalaža zaštitila i time osigurala njezina mikrobiološka ispravnost.

Promatrajući plasiranje jestive ambalaže na tržište iz marketinškog aspekta, inovativnost, održivost i ekološki utjecaj jestive ambalaže čini je iznimno privlačnom potrošačima. Međutim, isto tako ova vrsta ambalaže može izazvati i averziju prilikom konzumacije zbog neizbježnog psihološkog utjecaja da se konzumira pakiranje tj. nešto nije konvencionalno jestivo. Slijedom navedenog, jestiva ambalaža, odnosno jestivi filmovi, trenutno ne mogu u potpunosti zamijeniti tradicionalne sintetičke ambalažne materijale. Unatoč tome, potrebno je uzeti u obzir sve prednosti i moguće primjene njihovih funkcionalnih karakteristika u prehrambenoj industriji, farmaciji ili medicini. Primjerice, biopolimeri se mogu koristiti kao dodatak drugim ambalažnim materijalima. U komercijalnoj papirnatost ambalaži dodaju se tanki filmovi od polietilena (PE) ili poli(etilen-tereftalata) (PET) kojima se postižu bolja mehanička svojstva, barijerna svojstva na kisik i masti te smanjenje propusnosti na vodenu paru (Motelica i sur., 2020). Takve sintetičke premaze potencijalno bi mogli zamijeniti premazi na bazi biopolimera, koji pružaju i mogućnost dodavanja aditiva kako bi se dobila aktivna ambalaža (Khwaldia i sur., 2010).

Pregled izdvojenih znanstvenih istraživanja u primjeni jestivih filmova prikazan u tablici 3. Nadovezujući se na pozitivne primjere primjene jestive ambalaže, ističe se projekt startupa *Notpla* koji je u praksi pokazao da jestiva ambalaža ima mjesto na tržištu i praktičnu primjenu, te ukazao na visoki potencijal u smanjenju plastičnog otpada. Primjerice, njihov poduhvat, u kojemu su natjecateljima pružene pojedinačna porcije sportskog napitka zapakiranog u jestivi film na bazi algi, uvelike je smanjio upotrebu plastičnih boca i čaša na maratonima (Patel, 2019). Nadalje, spomenuti startup razvio je i vrećice na bazi algi koje služe za pakiranje prehrambenih proizvoda poput umaka, preljeva za salate i začina.

Uz prehrambenu industriju, medicinu i farmaciju, jestivi filmovi su našli svoju primjenu i u gastronomiji. Tako je chef Ferran Adria kreirao transparentne raviole upotrebom filmova na bazi krumpirovog škroba i sojinog lecitina, čime je postigao gastronomsku inovaciju kojom se otapanjem filma u ustima oslobađa sadržaj raviola (Chloe, 2021). Nadalje,

Arboleya i sur. (2008) kreirali su jestive filmove na bazi želatine izolirane iz kože bakalara s ili bez dodatka komercijalne želatine, u svrhu kreiranja ukusnijih i inovativnih jela. Zanimljivi pristup upotrebi jestivih filmova demonstrirali su Wang i sur. (2017) u svojem istraživanju, kreirajući 2D jestive filmove koji tijekom kuhanja tj. procesom hidratacije prelaze u 3D oblike. Time su postigli stvaranje jedinstvenih tekstura i oblika u ustima obogaćujući doživljaj jela, te ujedno ostvarujući i uštedu prostora i resursa tijekom transporta i skladištenja.

Tablica 3. Pregled znanstvenih istraživanja u primjeni jestivih filmova

	<b>BIOPOLIMER</b>	<b>DODATAK</b>	<b>PRIMJENA</b>	<b>REFERENCA</b>
<b>POLISAHARIDI</b>	Kitozan i želatina	taninska kiselina	minimalno procesirane jabuke	Zhang i sur., 2021
	Kitozan	natamicin, nizin, ekstrakt nara i sjemenki grožđa	minimalno procesirane jagode	Duran i sur., 2016
	Kitozan	nanočestice Ag-kitozana	minimalno procesirana dinja	Ortiz-Duarte i sur., 2019
<b>PROTEINI</b>	Želatina	NaCl	smanjenje upotrebe soli u mesnim proizvodima	Xiong i sur., 2020
	Proteini sirutke	acai prah, matcha ekstrakt	pakiranje mesnih okruglica	Sen i Kılıç, 2021
	Natrijev alginat i proteini sirutke	Probiotici ( <i>Lactobacillus rhamnosus</i> )	pakiranje i dodatak probiotika kruhu	Soukoulis i sur., 2014
<b>LIPIDI I VOSKOVI</b>	Kandelila vosak	/	produljenje roka trajnosti jagode	Oregel-Zamudio i sur., 2017
	Suncokretovo ulje	/	smanjenje posmeđivanja narezane jabuke	Khan i sur., 2014

## 2.4. ZAKONSKA REGULATIVA

U današnje vrijeme, sigurnost upotrebe jestivih filmova i premaza, kao i aditiva, od presudne je važnosti s obzirom na njihov potencijalni utjecaj na zdravlje potrošača. Jestivi filmovi i prevlake mogu se klasificirati kao: prehrambeni proizvodi, dodatci hrani, sastojci hrane, tvari u dodiru s hranom ili materijali u dodiru s hranom, a s obzirom na to da su sastavni

dio proizvoda na njih se primjenjuju isti zakonski propisi kao i na prehrambene proizvode (Galić, 2009).

Prilikom formulacije jestivih filmova ili premaza važno je uzeti u obzir GRAS status materijala koji će se upotrebljavati. Onim materijalima kojima je priznat GRAS status mogu se koristiti, ali u granicama propisanim od strane FDA (Nair i sur., 2020). Ukoliko, proizvođač želi upotrijebiti sastojak za proizvodnju jestivog filma ili premaza, kojemu nije priznat GRAS status, ali se može potvrditi sigurnost upotrebe, treba se podnijeti zahtjev za odobrenje GRAS statusa FDA (Nor i Ding, 2020).

Za postizanje željenih mehaničkih, barijernih i/ili organoleptičkih svojstava filmova upotrebljavaju se različite bioaktivne komponente koje imaju sposobnost migriranja u prehrambeni proizvod. Migracija ili otpuštanje aktivnih komponenti mora udovoljavati specifikacijama i ograničenjima propisanim zakonodavnim okvirom Europske unije i/ili nacionalnim propisima primjenjivim na hranu, kako bi se zaštitila sigurnost potrošača. Uredbom Komisije (EU) br. 450/2009 od 29. svibnja 2009. godine o aktivnim i inteligentnim materijalima i predmetima koji dolaze u dodir s hranom propisano je da se količina otpuštene aktivne tvari ne uključuje u vrijednost izmjerene globalne migracije u slučajevima kada je granica globalne migracije utvrđena u posebnoj mjeri Europske unije za materijale koji dolaze u dodir s hranom u koje je sastojak ugrađen. Količina otpuštene aktivne tvari može premašiti posebno ograničenje utvrđeno za tu tvar, pod uvjetom da je ona u skladu s odredbama Europske unije i/ili u skladu s nacionalnim propisima primjenjivim na hranu. U Republici Hrvatskoj u skladu s Pravilnikom o zdravstvenoj ispravnosti materijala i predmeta koji dolaze u neposredan dodir s hranom (NN br. 125/09, 31/11 i 39/13), aktivna tvar koja migrira u hranu mora odgovarati zahtjevima Zakona o hrani, Pravilnika o prehrambenim aditivima, kao i drugim propisima navedenog pravilnika. Unutar europskog zakonodavnog okvira aditivi koji se dodaju u aktivno pakiranje podliježu Uredbi (EU) br. 1331/2008 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2008. godina o prehrambenim aditivima, kojom je propisano da prehrambeni aditivi moraju biti sigurni za upotrebu, njihova upotreba mora biti tehnološki opravdana te ne smije dovesti potrošača u zabludu. Također, moraju se označavati na način da je oznaka dobro vidljiva, jasno čitljiva i neizbrisiva, te da je na jeziku koji potrošači lako razumiju. Slijedom navedenog, takav proizvod treba biti adekvatno označen na način da sadrži informaciju o upotrebljenim aditivima, nutritivnoj vrijednosti, ali i eventualnoj alergnosti proizvoda (Nor i Ding, 2020; Galić, 2009).

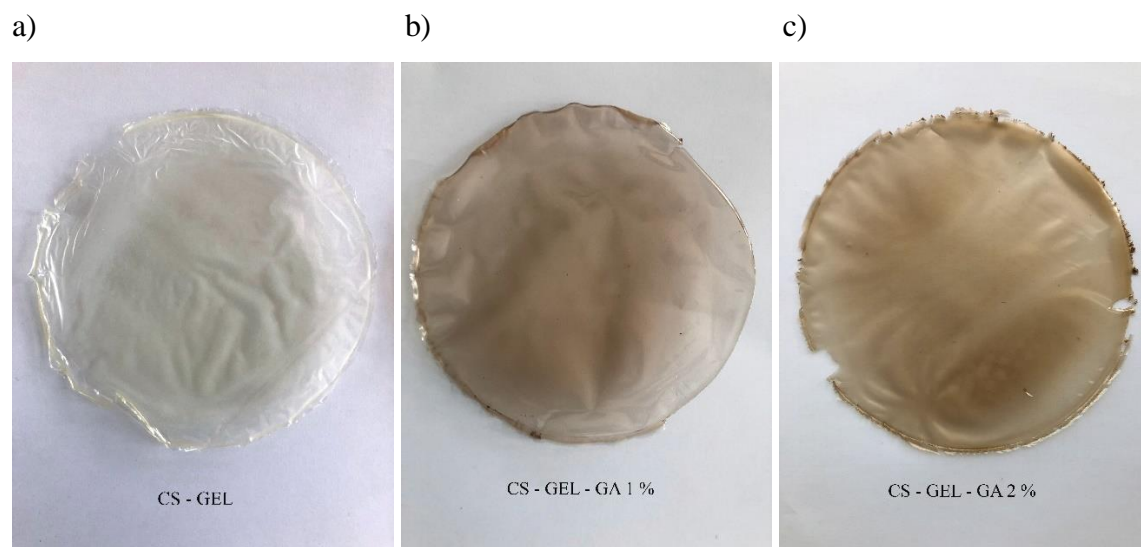
## **3. EKSPERIMENTALI DIO**

### **3.1. MATERIJALI**

U ovom radu za proizvodnju filmova korišteni su prirodni biopolimeri kitozan (kitozan tip 652, molekulske mase 165 kDa, stupanj deacetiliranja iznad 85 %, France Chitin, Marseille, Francuska) i želatina (ribljeg podrijetla, Louis Francois, Croissy Beaubourg, Francuska). Kao bioaktivni sastojak koristila se galna kiselina (CAS 149-91-7, Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka), a kao plastifikator biljni glicerol (minimalne čistoće 99,5 %, E422, Dekorativna točka d.o.o, Poznanovec, Hrvatska). Vodena otopina octene kiseline (ledena octena kiselina, J.T. Baker, Schwerte, Njemačka) i destilirana voda koristile su se kao otapala. Prilikom pripreme zasićene otopine za održavanje relativne vlažnosti (53 % RH) korišten je magnezijev nitrat ( $Mg(NO_3)_2$ , Sigma - Aldrich, St. Louis, SAD). Za test biorazgradivosti korištena je zemlja Florafi (Eko-Terra d.o.o, Nedelišće, Hrvatska).

### **3.2. PRIPREMA FILMOVA**

Otopina mješavine kitozana i želatine (CSGEL) dobivena je mješanjem zasebno pripremljene 1,5 % (m/v) otopine kitozana i 1 % (m/v) otopine želatine. Filmogena otopina kitozana (CS) dobivena je otapanjem 1,5 g kitozana u 1 % (v/v) vodenoj otopini octene kiseline te se otopina miješala na magnetskoj mješalici 4 h do potpunog dispergiranja polimera. Filmogena otopina želatine (GEL) dobivena otapanjem 1 g želatine u destiliranoj vodi te je zatim zagrijavana na 70 °C u trajanju od 30 minuta. Potom su otopine izmiješane i ostavljene na magnetskoj mješalici (1200 rpm) tijekom 1 h. U otopinu je dodano 30 % glicerola, računajući na suhu tvar polimera. Za pripremu filmova s aktivnom komponentom, u filmogenu otopinu dodana je određena količina galne kiseline kako bi se postigla 1 % i 2 % koncentracija (m/v). Određeni volumen tako pripremljene otopine za formiranje filmova izliven je u Petrijeve zdjelice, točno poznatih dimenzija. Sušenje se provodilo u ventiliranoj klima komori (HPP110, Memmert, Schwabach, Njemačka) tijekom 24 h, pri kontroliranim uvjetima temperature od 30 °C i relativne vlažnosti 40 %. Osušeni filmovi odlijepljeni su s površine Petrijevih zdjelica te su čuvani u eksikatoru s zasićenom vodenom otopinom  $Mg(NO_3)_2$ , kako bi se postigli kontrolirani uvjeti relativne vlažnosti od RH 53 % pri  $23 \pm 2$  °C. Pripremljeni filmovi prikazani su na slici 5.



Slika 5. Pripremljeni filmovi na bazi a) kitozana i želatine (CS – GEL), b) kitozana i želatine s 1 % (m/v) galne kiseline (CS – GEL – GA 1 %) i c) kitozana i želatine s 2 % (m/v) galne kiseline (CS – GEL – GA 2 %)

### 3.3. METODE KARAKTERIZACIJE FILMOVA

#### 3.3.1. Određivanje debljine filmova

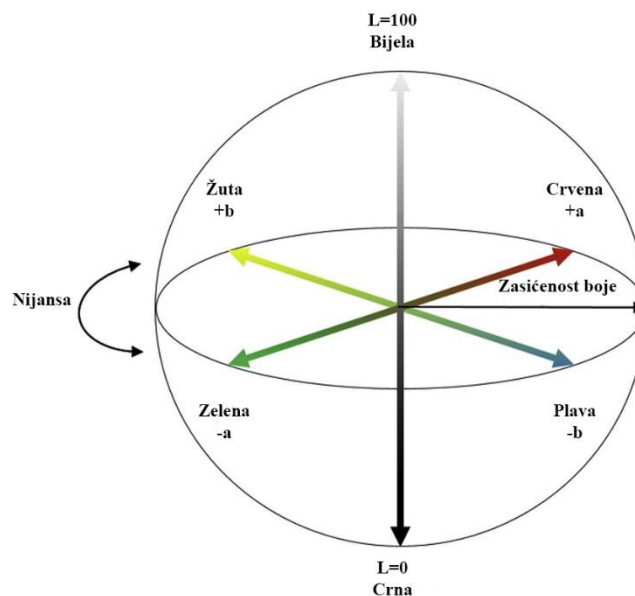
Debljina filmova mjerena je digitalnim mikrometrom (Digimet, HP, Helios Preisser, Gammertingen, Njemačka), koji je prikazan na slici 6. Mjerenja su provedena na 10 različitih mjesta u svakom uzorku filma, a za rezultat je uzeta srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom.



Slika 6. Digitalni mikrometar (Anonymous 3, 2022)

#### 3.3.2. Određivanje boje filma

Boja filma određena je pomoću kolorimetra (Konica Minolta Spectrophotometer CM3500d, Langenhagen, Njemačka), koji radi na principu CIE  $L^*a^*b^*$  prostornog modela (slika 7). CIE  $L^*a^*b^*$  je trodimenzionalni prostor boja temeljen na objektivnom vrjednovanju boja i najbliži je vizualnoj percepciji. Boje su definirane pomoću tri parametra:  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ .  $L^*$  predstavlja svjetlinu boje, u rasponu od 0 (apsolutno crna) do 100 (bijela). Vrijednost  $a^*$  predstavlja raspon crveno do zeleno, dok se  $b^*$  odnosi na raspon žuto do plavo. Uređaj se prvo kalibrira, a potom se uzorak stavlja ispod otvora. Mjerenje je provedeno na 10 različitih mjesta u svakom uzorku, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom.



Slika 7. Prikaz CIELAB dijagrama (Ly i sur., 2020)

Kolorimetrijska razlika ( $\Delta E$ ) pokazuje odstupanje reprodukcije od originala, a računa se kao srednja vrijednost razlika između  $L$ ,  $a$  i  $b$  vrijednosti standarda (referentna vrijednost) i vrijednosti izmjerene na uzorku, prema sljedećoj 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 (Ly i sur., 2020).

### 3.3.3. Mjerenje transparentnosti filma

Transparentnost filmova mjerena je pomoću UV-VIS spektrofotometra (Lambda 25, PerkinElmer, Waltham, SAD). Komadi filmova stave se na predviđeno mjesto (za kivetu) u uređaju te se mjeri apsorbanacija pri 600 nm. Transparentnost filmova ( $T$ ) izračunata je prema sljedećoj jednadžbi [2]:

$$T_{600} = \frac{A_{600}}{x} \quad [2]$$

gdje je:

$A_{600}$ - apsorbanacija pri 600 nm,

$x$ - debljina filma (mm).

#### 3.3.4. Određivanje topljivosti filmova u vodi i udjela vode

Topljiost filmova u vodi određena je metodom Gontard i sur. (1996), a definira se sadržajem suhe tvari otopljene u destiliranoj vodi, nakon uranjanja tijekom 24 h. Svi su se uzorci, prije mjerenja, čuvali u eksikatoru pri kontroliranim uvjetima relativne vlažnosti od 53 %. Filmovi istih dimenzija (2 x 2 cm) osušili su se na 105 °C te se odvažuju na analitičkoj vagi kako bi im se odredio početni udio suhe tvari ( $W_i$ ). Zatim su izvagani filmovi suspendirani u 30 mL destilirane vode pri  $23 \pm 1$  °C. Nakon 24 h, filmovi se uklanjaju iz otopine te se ponovno suše u sušioniku (Memmert, Schwabach, Njemačka) na 105 °C do konstantne mase. Potom se hlade i važu kako bi se odredila masa suhe tvari neotopljene u vodi ( $W_f$ ).

Topljiost filma ( $FS$ , %) izračunata je prema sljedećoj jednadžbi [3]:

$$FS (\%) = \frac{W_i - W_f}{W_i} * 100 \quad [3]$$

gdje je:

$FS$  – topljiost filma (%),

$W_i$  – početni sadržaj suhe tvari (g),

$W_f$  – masa suhe tvari neotopljene u vodi (g).

Udio vode u filmu određen je razlikom mase nakon sušenja ( $W_f$ ) i početnog sadržaja suhe tvari ( $W_i$ ). Za svaki uzorak provedena su tri mjerenja.

#### 3.3.5 Bubrenje filmova

Bubrenje filmova opisano je kapacitetom bubrenja (swelling ratio,  $SW$ ), koji je određen standardnom metodom ASTM D2765-95C. Kapacitet bubrenja izračunat je pomoću sljedeće jednadžbe [4]:

$$SW (\%) = \frac{W_s - W_d}{W_d} * 100 \quad [4]$$



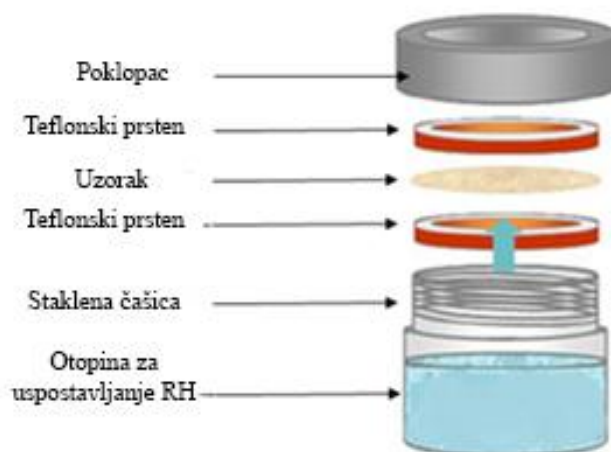
gdje je:

$W_s$  – masa uzoraka nakon bubrenja;

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

### 3.3.6. Mjerenje propusnosti vodene pare kroz polimerni film

Propusnost filmova na vodenu paru određena je gravimetrijski pomoću modificirane ASTM E96 - 80 (1980) standardne metode, koja je prilagođena za jestive materijale (Debeaufort i sur., 1993). Posuda korištena za određivanje propusnosti materijala na vodenu paru prikazana je na slici 8.



Slika 8. Posuda za određivanje propusnosti materijala na vodenu paru (Kurek, 2012)

Prije mjerenja, uzorci se čuvaju u eksikatoru pri kontroliranim uvjetima vlage (53 % RH). Mjerenja su provedena kako bi se izračunala propusnost kod dva gradijenta RH, 70 % za one proizvode sa većim udjelom vode i 35 % za one proizvode s manjim udjelom vode. U mjernu čašicu se ulije 20 ml destilirane vode (100 % RH) ili zasićena otopina  $\text{NaNO}_3$  (65 % RH). Zatim se između dva teflonska prstena stavi uzorak filma te se posude pohranjuju u ventiliranu klima komoru (Mettler HPP110, Mettler, Schwabach, Njemačka) pri uvjetima relativne vlažnosti od 30 % i temperaturi od  $25 \pm 1$  °C. Uzorci se važu svaka 24 h na analitičkoj vagi (KERN ABS320-4N, KERN&SOHN GmbH, Balingen, Njemačka), sve do ustaljenja gubitka mase. Za svaki film mjerenja su provedena u 9 paralela.

Propusnost na vodenu paru ( $WVP$ ,  $\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$ ) izračunata je iz promjene mase posude u odnosu na vrijeme u stacionarnom stanju, koristeći sljedeću jednadžbu [5]:

$$WVP = \frac{\Delta m}{\Delta t \cdot A \cdot \Delta p} \cdot x \quad [5]$$

gdje je:

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

$A$  – površina filma izložena prijenosu vlage ( $9,08 \times 10^{-4} \text{ m}^2$ );

$x$  – debljina filma (m);

$\Delta p$  – razlika tlaka vodene pare između dvije strana filma (Pa).

Također, određena je i brzina prijenosa pare kroz uzorak ( $WVTR$ ,  $\text{g m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), a izračunata je prema sljedećem izrazu [6] :

$$WVTR = \frac{\Delta m}{A \cdot \Delta t} \quad (\text{g m}^{-2} \text{ s}^{-1}) \quad [6]$$

### 3.3.7. Mjerenje propusnosti plinova kroz polimerni film

Propusnost filmova na  $\text{O}_2$  i  $\text{CO}_2$  provedeno je na uređaju za mjerenje propusnosti Brugger, GDP-C (Brugger Feinmechanik GmbH, Munich, Njemačka) (slika 9), manometarskom metodom. Uzorak se postavlja između gornjeg i donjeg dijela permeacijske ćelije, točno poznatog volumena. Prije svakog mjerenja evakuira se zrak iz gornjeg i donjeg dijela ćelije, a zatim se kroz jednu stranu uzorka (gornja ćelija) propušta mjerni plin pod tlakom od 5 bara i protoka  $80 \text{ mL min}^{-1}$ . Zbog razlike u tlaku dolazi do difuzije plina kroz ispitivani materijal što uzrokuje postupan porast tlaka u donjem dijelu ćelije. Uređaj automatski očitava porast tlaka, registrira i zabilježi na računalu pomoću računalnog programa. Rezultati se očitaju kao vrijednost permeacije ( $\text{cm}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1} \text{ bar}^{-1}$ ), a izraženi kao koeficijent propusnosti  $\text{O}_2$  ( $PO_2$ ) i koeficijent propusnosti  $\text{CO}_2$  ( $PCO_2$ ) izražen u  $\text{cm}^3 \text{ m}^{-1} \text{ dan}^{-1} \text{ bar}^{-1}$ , izračunat je kao aritmetički produkt permeacije i debljine filma, prema sljedećim jednadžbama [7] i [8]:

$$PO_2 = q \cdot x \cdot d \quad [7]$$

$$PCO_2 = q \cdot x \cdot d \quad [8]$$

gdje je:

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

$d$  - debljina filma ( $\mu\text{m}$ ).



Slika 9. Uređaj za određivanje propusnosti plinova (Anonymous 4, 2022)

### 3.3.8. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenola

Udio ukupnih polifenola u filmovima određen je metodom koja se temelji na kolorimetrijskoj reakciji s Folin-Ciocalteu reagensom.

#### *Kemikalije i standardi za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola*

- Folin-Ciocalteu reagens (FC reagens)
- Zasićena otopina natrijeva karbonata  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (20 %-tna otopina)

Priprema: u 800 mL vruće deionizirane vode otopi se 200 g anhidrida  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , a zatim se ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , nadopuni u odmjerneju tikvici od 1000 mL te se nakon 24 h filtrira.

#### *Princip metode*

Princip metode temelji se na kolorimetrijskoj reakciji reducirajućeg reagensa tj. fenola s Folin-Ciocalteu reagensom, koji je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline. Prilikom reakcije nastaju volframov oksid i molibdenov oksid koji daju plavo obojeni kompleks čiji je intenzitet obojenja proporcionalan koncentraciji fenola (Singleton i sur., 1999a; Singleton i sur., 1999b). Određivanje se provodi u etanolnom/metanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode a nastali intenzitet obojenja mjeri se pri valnoj duljini od 765 nm (Shortle i sur., 2014).

### *Postupak rada*

U staklene epruvete se otpipetira 20  $\mu\text{L}$  ekstrakta, 200  $\mu\text{L}$  FC reagensa i 2 mL deionizirane vode, a nakon 3 minute doda se 1 mL zasićene otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  te se s uzorcima vorteksiraju. Uzorci se termostatiraju 25 minuta pri 50 °C u vodenoj kupelji, nakon čega se mjeri apsorbancija plavog obojenja pri 765 nm. Od apsorbancije uzoraka oduzima se apsorbancija slijepe probe, koja se priprema na isti način kao i uzorci, ali sadrži otapalo za ekstrakciju umjesto ekstrakta.

### *Izračun*

Pomoću jednadžbe baždarne krivulje izračunava se udio ukupnih polifenola u ekstraktima filmova. Jednadžba baždarne krivulje glasi [9]:

$$Y = 0,0030 \times X \text{ [9]}$$

gdje je:

Y- apsorbancija pri 765 nm;

X- koncentracija galne kiseline ( $\text{mg L}^{-1}$ );

R<sup>2</sup>- koeficijent determinacije.

### 3.3.9. Biorazgradivost filmova

Filmovi dimenzija 2 x 2 cm, točno određene mase ( $m_1$ ) stavljaju se na aluminijsku mrežicu i zakopavaju na 6 cm dubine u plastične čaše koje sadrže zemlju (univerzalni prirodni supstrat, Florafin, Eko-Terra d.o.o, Hrvatska), na sobnoj temperaturi ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Filmovi se otkopavaju 6 puta, nakon 7, 54, 92, 103 i 120 dana. Po potrebi, sakupljeni filmovi ispiru se u destiliranoj vodi kako bi se uklonio višak zemlje te se suše na 105 °C tijekom 24 h (Luís i sur., 2019). Nakon toga im se određuje masa ( $m_2$ ) i fotografira ih se. Udio razgradnje (%) izračunava se prema slijedećem izrazu [10]:

$$\% \text{ biorazgradnje} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \text{ [10]}$$

### 3.3.10. Mjerenje pH otopina biopolimera

pH otopina biopolimera odredilo se pomoću uređaja pH metra FiveGO (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska). Za mjerenje pH korištene su svježe pripremljene otopine biopolimera, a za svaki uzorak mjerenja su provedena 3 puta te je uzeta njihova srednja vrijednost.

## 3.4. 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

### 4.1. PARAMETRI BOJE I TRANSPARENTNOST FILMOVA

Boja filma određena je na principu CIE  $L^*a^*b^*$  prostornog modela, a u tablici 4 prikazani su parametri boje ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ), ukupna razlika u obojenosti ( $\Delta E$ ) i transparentnost ( $T$ ) u svježe pripremljenim filmovima od kitozana (CS) i želatine (GEL), s ili bez dodatka galne kiseline. Porijeklo i vrsta sirovine korištena prilikom formulacije filmova utjecat će na vizualni izgled filma pa tako boja želatine ovisi o vrsti sirovine iz koje se dobiva (Bajpai, 2019). Primjerice, ukoliko zaostanu tragovi ugljikohidrata u sirovini, mogu nastupiti reakcije s amino skupinama aminokiselina tj. Maillardove reakcije pri čemu dolazi do razvitka boje (Haug i Darget, 2009). Uz to, veći udio CS u filmovima na bazi CS i GEL (CSGEL) rezultirat će više žutim i zelenijim tonovima filma (tablica 4.) (Mohammed Manshor i sur., 2018). Općenito, dodatak plastifikatora, odnosno glicerola u ovom istraživanju, dobiju su bistri i bezbojni filmovi. Konkretno, primjenom glicerola dobije se glatka, bistra i homogena površina filma s dobrom mehaničkom čvrstoćom (Jeya i sur., 2020). Na boju filma također utječe temperatura sušenja i skladištenja, što je u ovom istraživanju bila ambijentalna ( $23 \pm 2$  °C), odnosno dosta niska s neznačajnim utjecajem na pojavu značajnog žutila u filmovima. Ovu pojavu evidentirali su Prateepchanachai i sur. (2019), u čijem je istraživanju došlo do smanjenja svjetline filma kao posljedica interakcije glicerola s kitozonom i utjecajem povišene temperature. Povišena temperature može uzrokovati lakše nastajanje vodikovih veza smanjujući mobilnost polimernih lanaca, i odvajanja faza, pri čemu glicerol migrira na površinu i uzrokuje smanjenje svjetline filma. Budući da dolazi do isprepletanja makromolekula, posljedično svjetlost teže prolazi kroz takvu mrežu biopolimera. Također, poželjno je da filmovi imaju što neutralnija organoleptička svojstva tj. da su transparentni, bistri, bez okusa i mirisa (Guilbert i sur., 1995). Samim time dodani aditivi ne bi smjeli negativno utjecati na organoleptička svojstva filmova, kako bi bili prihvaćeni od strane potrošača.

Tablica 4. Parametri boje ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ), ukupna razlika obojenosti ( $\Delta E$ ) i transparentnost ( $T$ ) pripremljenih filmova

Uzorak	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E$	$T_{600}$
CSGEL	$88,48 \pm 3,89^a$	$0,98 \pm 0,58^b$	$-1,71 \pm 2,28^b$	$0,00 \pm 0,00^b$	$4,62 \pm 0,46^a$
CSGELGA1	$76,43 \pm 4,19^b$	$5,09 \pm 0,80^a$	$8,87 \pm 2,99^a$	$16,56 \pm 5,02^a$	$1,66 \pm 0,17^b$
CSGELGA2	$77,57 \pm 3,13^b$	$4,85 \pm 0,58^a$	$5,91 \pm 3,09^a$	$13,86 \pm 4,05^a$	$5,55 \pm 0,56^a$

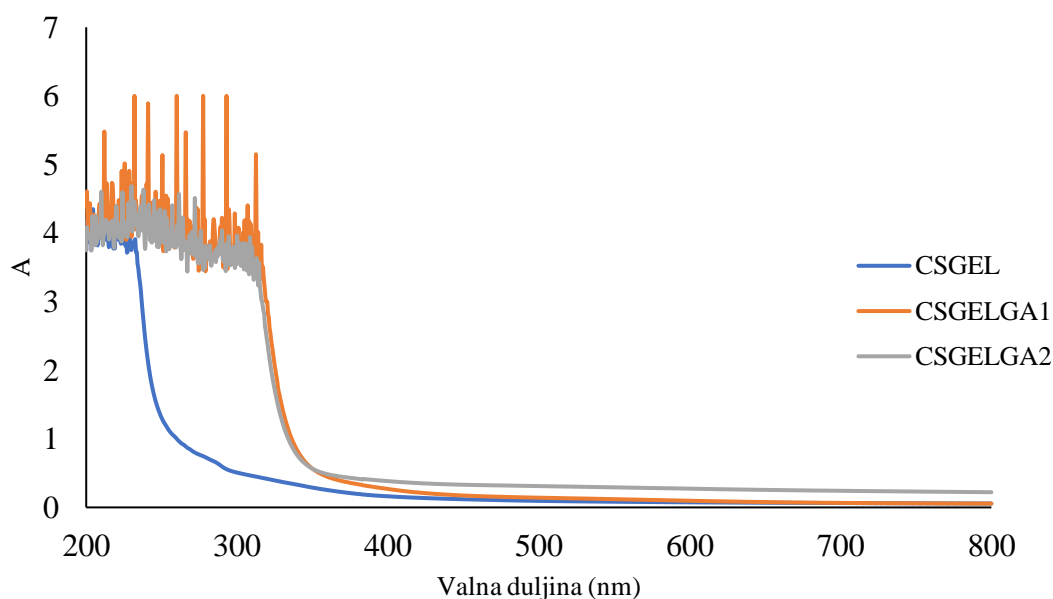
CSGEL - filmovi od kitozana i želatine, CSGELGA1 - filmovi od kitozana i želatine s 1 % (m/v) galne kiseline, CSGELGA2 - filmovi od kitozana i želatine s 2 % (m/v) galne kiseline  
Različiti eksponenti (<sup>a-b</sup>) unutar stupca ukazuju na statistički značajne razlike među uzorcima ( $p < 0,05$ )

Vizualno, CSGEL filmovi bili su najsvjetliji i ljudskom oku bezbojni, dok je dodatak GA kiseline uzrokovao crvenkasto-žute filmove, što je prikazano slikom 5. Nešto niže vrijednosti parametra  $L^*$  mogu se objasniti prisutnošću kitozana koji uzrokuje smanjenje  $L^*$  vrijednost CSGEL filmova u usporedbi s čistim GEL filmovima (Bonilla i Sobrala, 2016; Jridi i sur, 2014). Uz to, dodatak GA kiseline značajno je smanjio  $L^*$  vrijednost filmova, što ukazuje na to da GA kiselina ima negativan učinak na svjetlinu filmova. Nadalje, dodatkom GA kiseline u filmove vrijednosti parametra  $b^*$  značajno su promijenjene. Vrijednost parametra  $b^*$  za CSGEL uzorak bila više negativna ( $-1,71 \pm 2,28$ ) u odnosu na pozitivne vrijednosti kod CSGELGA1 ( $8,87 \pm 2,99$ ) i CSGELGA2 ( $5,91 \pm 3,09$ ). To ukazuje da se obojenje filmova dodatkom GA kiseline promijenilo iz plavkasto-zelene u žutu. Za sve filmove vrijednost parametra  $a^*$  je pozitivna, što ukazuje na crveno obojenje, sa značajno višim vrijednostima parametra  $a^*$  kod filmova obogaćenih s GA kiselinom. CSGELGA1 i CSGELGA2 pokazuju slične vrijednosti parametra  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  bez statistički značajne razlike među njima. Rezultati se slažu s istraživanjem Rezaee i sur. (2018) gdje se vrijednosti  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  za CSGEL filmove s dodatkom 1 % GA iznosili  $80,44 \pm 3,81$ ,  $2,76 \pm 0,76$ ,  $8,55 \pm 1,01$ .

S obzirom na to da je transparentnost jedna važnijih svojstava filma te je od ključne važnosti za prihvaćanje filma od strane potrošača, pogotovo ukoliko se koristi za oblaganje namirnice ili poboljšanje izgleda proizvoda (Benbettaieb i sur., 2014), poželjne su što niže vrijednosti parametra  $T$ . Također, visoka transparentnost pokazuje homogenost filmova tj. da nije došlo do odvajanja faza (Ahmed i Ikram, 2016). Budući da se vrijednosti  $T$  filmova dobivenih u ovom istraživanju razlikuju i ne može se pretpostaviti njihovo ponašanje u ovisnosti dodatka GA kiseline, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdio uzrok

ovakvog ponašanja (Tablica 4).

Parametar  $\Delta E$  predstavlja ukupnu razliku u boji te pokazuje odstupanje reprodukcije od originala. Ako je njegova vrijednost veća od tri, razlika u boji vidljiva je ljudskom oku (Ly i sur., 2020). Za uzorke CSGELGA1 i CSGELGA2 parametar  $\Delta E$  računat je u odnosu na CSGEL film. Uzorci obogaćeni s 1 % i 2 % GA imaju  $\Delta E$  vrijednost veću od tri, što ukazuje na postojanje vidljive razlike u boji u odnosu na kontrolu (tablica 4).



Slika 10. ApSORBANCA različitih filmova na bazi kitozana i želatine pri valnim duljinama od 200 do 800 nm

CSGEL - filmovi od kitozana i želatine, CSGELGA1 - filmovi od kitozana i želatine s 1 % (m/v) galne kiseline, CSGELGA2 - filmovi od kitozana i želatine s 2 % (m/v) galne kiseline

ApSORBANCija UV svjetla i vidljivog dijela spektra, u rasponu valnih duljina 200-800 nm, pripremljenih filmova prikazana je na slici 10. CSGEL filmovi pokazuju dobra barijerna svojstva prema UV zračenju u dijelu spektra od 200 do 280 nm, što je u skladu s rezultatima Ahmed i Ikram (2016) te Hosseini i sur. (2013). Filmovi na bazi proteina, pa tako i želatine, imaju dobra barijerna svojstva na UV zahvaljujući visokom sadržaju aminokiselina s aromatskim prstenom koje mogu apsorbirati UV zračenje (Jridi i sur., 2014). Dodatak GA smanjio je propusnost UV zračenja tj. ovako pripremljeni filmovi pokazuju dobra barijerna svojstva pri valnim duljinama od 200 do 350 nm. Rezultati se slažu s onima Limpisophon i Schleining (2016), gdje se dodatkom GA u GEL filmove s uvelike smanjila propusnost na UV



zračenje. Slijedom navedenog, ovako pripremljeni filmovi pokazuju obećavajuća zaštitna svojstva od UV svjetla, čime bi se smanjile oksidacijske reakcije koje uzorkuju kvarenje proizvoda, gubitak nutritivnih tvari, promjene boje i nastanak neugodnog mirisa.

#### 4.2. UDIO VODE I SUHE TVARI, TOPLJIVOST I BUBRENJE FILMOVA

Udio vode, suhe tvari, kapacitet bubrenja i topljivost pripremljenih filmova prikazani su u tablici 5. Topljivost je važna karakteristika ambalažnih materijala. Generalno, netopljivost filma poželjna je karakteristika, kako bi poboljšali integritet proizvoda i otpornost na vodu. Također, hidrofilni materijali imaju sposobnost navlačenja vode u uvjetima povišene relativne vlažnosti. Filmovi na bazi kitozana mogu apsorbirati do 40 % vlage pri uvjetima relativne vlažnosti od 90,3 %, pri čemu vlaga odnosno voda djeluju kao plastifikatori. Do učinka plastificiranja može doći pri sadržaju vlage većem od 20 % (Aguirre-Loredo i sur., 2015).

Tablica 5. Udio vode, udio suhe tvari, postotak bubrenja (SW) i topljivost pripremljenih filmova od kitozana i želatine

Uzorak	Udio vode (%)	Udio suhe tvari (%)	SW (%)	Topljivost (%)
CSGEL	12,54 ± 0.55 <sup>a</sup>	87,46 ± 0.55 <sup>c</sup>	12,22 ± 4.52 <sup>c</sup>	37,29 ± 3.39 <sup>ab</sup>
CSGELGA1	8,86 ± 0.27 <sup>b</sup>	91,14 ± 0.27 <sup>b</sup>	2,37 ± 1.43 <sup>b</sup>	29,11 ± 2.1 <sup>b</sup>
CSGELGA2	7,33 ± 0.26 <sup>c</sup>	92,67 ± 0.26 <sup>a</sup>	2,32 ± 1.62 <sup>a</sup>	45,49 ± 4.36 <sup>a</sup>

CSGEL - filmovi od kitozana i želatine, CSGELGA1 - filmovi od kitozana i želatine s 1 % (m/v) galne kiseline, CSGELGA2 - filmovi od kitozana i želatine s 2 % (m/v) galne kiseline  
Različiti eksponenti (<sup>a-c</sup>) unutar stupca ukazuju na statistički značajne razlike među uzorcima (p < 0,05)

Na topljivost kompozitnog filma utjecat će udio i topljivost njegovih komponenti. S obzirom na to da je želatina topiva u vodi za očekivati je da će filmovi na bazi želatine biti topivi u vodi, dok su oni na bazi kitozana manje topivi, zahvaljujući hidrofobnim svojstvima kitozana (Ahemed i Ikram, 2016). To potvrđuje i istraživanje Hosseini i suradnika (2013) gdje su GEL filmovi imali veću topljivost (63,81 %) u usporedbi CS filmovima i CSGEL kompozitnim filmovima. Na slične rezultate naišli su i Jridi i sur. (2014). Autori manju topljivost CSGEL kompozitnih filmova od GEL filmova objašnjavaju nastankom kompleksa između kitozana i želatine tj. filmovi na bazi kitozana imaju -OH i -NH<sub>2</sub> skupine koje s molekulama vode mogu tvoriti vodikove veze i na taj način navlačiti vodu te samim time imaju

veći udio vode. Dodatkom želatine u kitozanske filmove smanjuje se udio vode, zahvaljujući vezama nastalima između kitozana i želatine te se samim time smanjuje i broj slobodnih grupa za vezivanje s molekulama vode, čime se smanjuje mogućnost bubrenja filma. Također, na topivost i bubrenje utječe i dodatak plastifikatora. Njegovim dodatkom smanjuje se broj interakcija između polimera, što je opisano poglavljem 2.1.4. Plastifikatori pa takav film posjeduju više slobodnih hidroksilnih skupina za interakciju s molekulama vode te se stvara više slobodnog prostora za absorpciju vode čime se povećava topljivost filmova (Ahemed i Ikram, 2016).

Dodatkom GA kiseline udio vode kao i kapacitet bubrenja filma značajno su se smanjili te su se povećanjem koncentracije GA kiseline s 1 % na 2 % navedena svojstva filmova dodatno smanjila. Ovi rezultati u skladu su s onim Pacheco i sur. (2018) gdje se kapacitet bubrenja filmovi na bazi kitozana i škroba s dodatkom GA (2,5 i 5,0 %) smanjio te je opadao s povišenjem njezine koncentracije. Topljivost filmova prvo se smanjila dodatkom GA kiseline, ali povećanjem njezine koncentracije povećala se i topljivost filma (45,49 %) i to u većoj mjeri nego bez dodatka GA (37,27 %) (tablica 5). No, začuđuje to što CSGELGA2 film pokazuje visoku topljivost s obzirom da sadrži najmanji udio vode. Kako bi se utvrdio uzrok ovakvog ponašanja potrebna su daljnja istraživanja. Yadav i sur. (2020) smanjili su topljivost CSGEL filmova s 58,13 % na 41,23 % dodatkom kompleksa sastava kvercetin-škrob. Također, došlo je do smanjenja kapaciteta bubrenja spomenutih filmova. Autori ovu pojavu objašnjavaju interakcijama amino skupina želatine i kitozana s fenolnom komponentom kvercetina. Riaz i sur. (2019) dodatkom nanočestica kore jabuka smanjili su topljivost CSGEL filmova kao i vrijednosti kapaciteta bubrenja. No, povećanjem udjela nanočestica topljivost navedenih filmova se smanjivala, što nije u skladu s rezultatima ovog rada. Autori kao objašnjenje, uz već navedeno gore, navode i hidrofobnu prirodu inkorporiranih nanočestica. Na slične rezultate naišli su i Xu i sur. (2021), gdje su istraživali svojstva CSGEL filmova s ekstraktom biljke hmelja. Kapacitet bubrenja se smanjio dodatkom bioaktivnih agenasa, dok nije došlo do velike promjene u udjelu vode dodatkom bioaktivnih agenasa u filmove, što se objašnjava upotrebom male koncentracije ekstrakata.

### **4.3. DEBLJINA, PROPUSNOST NA VODENU PARU (WVP) I BRZINA PRIJENOSA VODENE PARE (WVTR) FILMOVA**

Rezultati mjerenja debljine, WVP i WVTR dani su u tablici 6. Prema dobivenim rezultatima, nema statistički značajne razlike u debljini uzoraka neovisno o sastavu polimernog

matriksa. Ovaj rezultat je u skladu s rezultatima dobivenim u radu Pacheco i sur. (2018), gdje dodatak polifenola nije utjecao na debljinu filmova.

Propusnost na vodenu paru svih uzoraka bila je reda veličine  $10^{-10} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ , dok su se vrijednosti brzine prijenosa vodene pare kretale u redu  $10^{-3} \text{ g m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Vrijednosti mjerene pri većem RH gradijentu (70 %) su više u odnosu na one dobivene kod manjeg gradijenta (35 %). Isti trend uočen je i za WVTR. Navedeno ponašanje ukazuje da pri višoj razlici parcijalnog tlaka vode s obje strane filma molekule vodene pare lakše i brže prolaze kroz barijeru (film) dajući više vrijednosti WVP i WVTR. S obzirom na to da je gradijent tlaka vodene pare uzet u obzir u izračunu, u teoriji propusnost vodene pare trebala bi biti neovisna o tom parametru (Aguirre-Loredo i sur., 2015). Međutim, hidrofilni materijali, kao što su kitozan i želatina, imaju sposobnost apsorpcije molekula voda čime im se mijena WVP te je posljedično transport otpiljenih tvari olakšan. Primjerice, kitozan koji nije topljiv u vodi, zbog svojih funkcionalnih skupina (amino i hidroksilne skupine) može vezati na sebe molekule vode vodikovim vezama, a da time ne uzorkuje modifikacije u kemijskoj strukturi. Samim time, povećanjem RH okoline film će adsorbirati molekule vode i bubriti, gdje će voda djelovati kao plastifikator. Rezultati ovog rada slažu se s istraživanjem Rezaee i sur. (2018) gdje je vrijednost WVP za CSGEL film iznosila  $2,40 \times 10^{-10} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$  a za CSGELGA1 film  $2,02 \times 10^{-10} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$  pri RH od 75 %. Također, Wang i sur. (2019) istraživali su utjecaj dodatka GA kiseline na kitozanske filmove. Dodatak GA kiseline u kitozanske filmove značajno je smanjio propusnost na vodenu paru u usporedbi s čistim kitozanskim filmovima, vrlo vjerojatno uzrokovano promjenom u strukturi polimernog matriksa ometajući difuziju molekula vode kroz polimernu rešetku. Uz to, polifenoli mogu tvoriti vodikove veze i hidrofobne interakcije s polarnim grupama biopolimera čime se ograničava broj OH skupina koje mogu reagirati s vodom (Pacheco i sur., 2018). Međutim, Sun i sur. (2014) ispitivali su filmove na bazi kitozana s 0,5 %, 1 % i 1,5 % GA kiseline. Kada je koncentracija GA kiseline bila 1 % došlo je do smanjenja vrijednost WVP filmova, dok je dodatak GA kiseline u postotku većem od 1 % rezultiralo daljnjim povećanjem WVP. To može biti povezano s koncentracijom galne kiseline, koja ukoliko je u većem udjelu prisutna u filmu, tada dolazi do smanjenja međumolekulskih sila između polimernih lanaca i povećanja slobodnog volumena.

Barijerna svojstva filmova na vodenu paru ovise o različitim čimbenicima, uključujući: kontakt filma s proizvodom, sastav filma, debljinu, površinu, uniformnost, gradijent koncentracije ali i vanjske čimbenike kao što su temperatura i relativna vlažnost (Khalil i sur., 2019). Uz to, ovisit će o vrsti i količini upotrebljenog plastifikatora, gdje je povećanje udjela plastifikatora direktno proporcionalno povećanju WVP (Arvanitoyannis i sur., 1998). Budući

da su ovom istraživanju korištene iste koncentracije glicerola u svim formulacijama, ovaj fenomen se može zanemariti.

Gledajući s aspekta zaštite proizvoda, općenito bi WVP vrijednost filmova trebala biti što niža kako bi se spriječio ili barem smanjio gubitak vlage u okolinu. S jedne strane visoka propusnost na vodenu paru može dovesti do sušenja proizvoda, što utječe na teksuru i kvalitetu proizvoda. No, s druge strane niska propusnost dovodi do kondenzacije vlage na unutrašnjoj strani filma, što uzrokuje mikrobiološku kontaminaciju (Khalil i sur., 2019). Slijedom navedenog, različiti proizvodi zahtijevaju različita svojstva filmova kako bi se uspješno očuvala svježina, a samim time i kvaliteta proizvoda.

Tablica 6. Debljina filma, propusnost na vodenu paru (WVP) i brzina prijenosa vodene pare (WVTR) pri dva gradijenta relativne vlažnosti (70 % i 35 % RH)

Uzorak	Debljina filma ( $\mu\text{m}$ )	$\Delta\text{RH } 70 \%$		$\Delta\text{RH } 35 \%$	
		WVP ( $\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$ ) $\times 10^{-10}$	WVTR ( $\text{g m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) $\times 10^{-3}$	WVP ( $\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$ ) $\times 10^{-10}$	WVTR ( $\text{g m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) $\times 10^{-3}$
<b>CSGEL</b>	$58,27 \pm 16,30^a$	$2,42 \pm 0,06^a$	$9,16 \pm 0,24^a$	$1,3 \pm 0,04^a$	$2,46 \pm 0,08^{cd}$
<b>CSGELGA1</b>	$62,8 \pm 19,19^a$	$1,49 \pm 0,09^b$	$5,62 \pm 0,33^b$	$0,32 \pm 0,05^b$	$0,61 \pm 0,1^e$
<b>CSGELGA2</b>	$75,27 \pm 20,72^a$	$1,09 \pm 0,36^b$	$4,12 \pm 1,37^{bc}$	$0,53 \pm 0,31^b$	$1,01 \pm 0,64^{de}$

CSGEL - filmovi od kitozana i želatine, CSGELGA1 - filmovi od kitozana i želatine s 1 % (m/v) galne kiseline, CSGELGA2 - filmovi od kitozana i želatine s 2 % (m/v) galne kiseline  
Različiti eksponenti (<sup>a-e</sup>) unutar stupca ukazuju na statistički značajne razlike među uzorcima ( $p < 0,05$ )

#### 4.4. PROPUSNOST FILMOVA NA PLINOVE

Rezultati mjerenja propusnosti filmova na  $\text{O}_2$  i  $\text{CO}_2$  dani su u tablici 7. Vrijednosti propusnosti na  $\text{CO}_2$  značajno su veće u odnosu na propusnost na  $\text{O}_2$ . Općenito, filmovi na bazi kitozana pokazuju niske vrijednosti propusnosti na kisik koje se mogu usporediti etilenvinil alkoholom ili poli(viniliden-kloridom) (PVDC) (Wang i sur., 2021). Kroz hidrofilne polimere  $\text{CO}_2$  prolazi puno brže u odnosu na  $\text{O}_2$ , što se objašnjava većom topivosti  $\text{CO}_2$  u vodenom mediju ( $34,5 \text{ mmol L}^{-1}$  pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  i 1 atm) u odnosu na  $\text{O}_2$  (Gontard i sur., 1996). Kada u polimernom matriksu nema mikropora, oštećenja i pukotina, tada je propusnost jednaka umnošku koeficijenta difuzije, koji predstavlja mobilnost permeanta kroz polimer, i

koeficijenta topljivosti, koji predstavlja koncentraciju plina u polimeru ovisno o parcijalnom tlaku plina. Stoga je povećanje propusnosti povezana s povećanjem koeficijenta difuzije u polimeru, zbog modifikacija u strukturi i povećanja topljivosti (Gontard i sur., 1996). Budući se filmovi na bazi kitozana pripremaju u kiselom mediju, tada je za očekivati da će topljivost CO<sub>2</sub> biti viša u odnosu na O<sub>2</sub> (Kurek i sur., 2014). Općenito, filmovi na bazi želatine pokazuju loša, a filmovi na bazi kitozana dobra barijerna svojstva na kisik, te se smatra da je u kompozitnim filmovima kitozan odgovoran za dobra barijerna svojstva. U znanstvenoj literaturi zabilježeno je da ovisno o formulaciji, filmovi na bazi kitozana i želatine pokazuju dobra barijerna svojstva na plinove i arome (Benbettaieb i sur., 2019). Benbettaieb i sur. (2014) istraživali su utjecaj dodatak želatine u filmove na bazi kitozana, pri čemu je propusnost na kisik u filmu s 50 % želatine iznosila  $943,21 \times 10^{-12} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ , a u filmu sa 100 % želatine je iznosila  $296,67 \times 10^{-12} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ . Poboljšana barijerna svojstva filmova s dodatkom želatine autori su objasnili povećanjem gustoće polimerne mreže i promjene topljivosti kisika u istoj.

Tablica 7. Propusnost filmova od kitozana i želatine na O<sub>2</sub> i CO<sub>2</sub>

<b>Uzorak</b>	<b>PO<sub>2</sub></b> (cm <sup>3</sup> m <sup>-1</sup> dan <sup>-1</sup> bar <sup>-1</sup> ) x 10 <sup>-5</sup>	<b>PCO<sub>2</sub></b> (cm <sup>3</sup> m <sup>-1</sup> dan <sup>-1</sup> bar <sup>-1</sup> ) x 10 <sup>-5</sup>
<b>CSGEL</b>	4,62 ± 1,03 <sup>c</sup>	15,46 ± 20,75 <sup>b</sup>
<b>CSGELGA1</b>	1218,31 ± 17,76 <sup>b</sup>	602,35 ± 63,06 <sup>b</sup>
<b>CSGELGA2</b>	6811,94 ± 734,49 <sup>a</sup>	11478,68 ± 798,36 <sup>a</sup>

CSGEL - filmovi od kitozana i želatine, CSGELGA1 - filmovi od kitozana i želatine s 1 % (m/v) galne kiseline, CSGELGA2 - filmovi od kitozana i želatine s 2 % (m/v) galne kiseline  
Različiti eksponenti (<sup>a-c</sup>) unutar stupca ukazuju na statistički značajne razlike među uzorcima (p < 0,05)

Propusnost pripremljenih filmova na O<sub>2</sub> i CO<sub>2</sub> povećava se dodatkom GA kiseline, pri čemu se povećanjem koncentracije povećava i propusnost navedenih filmova. Suprotno ovom istraživanju, Zhang i sur. (2021) i Wang i sur. (2019) su dodatkom taninske, odnosno galne kiseline postigli bolja barijerna svojstva filma na kisik. Iako bi se moglo pretpostaviti da se dodatkom galne kiseline povećava kristaliničnost matriksa, odnosno dobiva kompleksnija i nepropusnija struktura, suprotnosti u ponašanju u ovom istraživanju mogu se objasniti strukturalnim promjenama koje nastaju uslijed dodatka GA kiseline. Moguće je da zbog narušenih mehaničkih svojstava, dodatkom GA dolazi do stvaranja mikropukotina prilikom

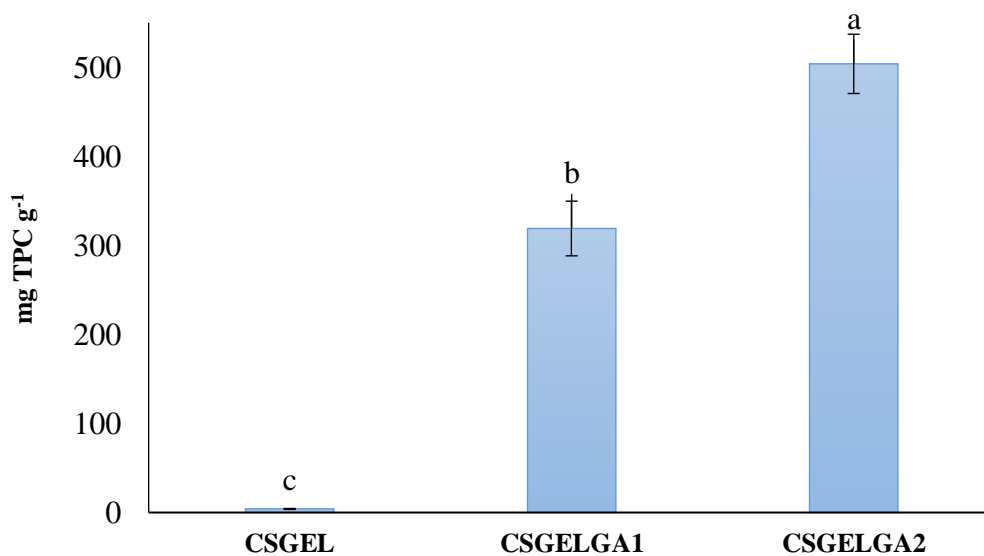
odljepljivanja filma s površine koje su ljudskom oku nevidljive no ipak prisutne i utječu na propusnost molekula male molekulske mase. Yadav i sur. (2020) su dodatkom kompleksa kvercetin-škrob u film na bazi želatine i kitozana smanjili vrijednost propusnosti na kisik za 50 %, a dobivene vrijednosti su slične onima u ovom istraživanju. Propusnost kitozanskog filma autori su objasnili interakcijom O<sub>2</sub> i NH<sub>3</sub><sup>+</sup> skupina u molekulama kitozana, a značajno smanjenje propusnosti na kisik mogućom modifikacijom strukture kitozanskog filma pomoću kvercetina.

S obzirom na to da relativna vlažnost uvelike utječe na mehanička i barijerna svojstva filmova te je funkcija temperature, jasno je da kontrola vanjskih uvjeta predstavlja imperativ kod očuvanja svojstava jestivih filmova (Arboleya i sur., 2008). Nadalje, prisutnost kisika može se manifestirati oksidacijskim promjenama, promjenama sastava plinskog prostora i pogoršanjem organoleptičkih svojstava hrane (npr. gubitak aromatičnih tvari) (Vujković i sur., 2007), ali i porastom aerobnih mikroorganizama (Wang i sur., 2021). Iako je jedna od glavnih funkcija ambalaže zaštita od djelovanja kisika, njegovo prisustvo u proizvodu može izazvati poželjne, nepoželjne ili pak nikakve posljedice. Primjerice, kvaliteta i rok trajanja upakiranog ekstra djevičanskog maslinovog ulja ograničena je prisutnošću kisika, koji djeluje na nezasićene veze masnih kiselina što posljedično uzrokuje užeglost ulja i neprikladnost za ljudsku upotrebu (Iqdiam i sur., 2020). Dok je u slučaju pakiranja svježeg voća i povrća prisutnost kisika neophodna za uspostavu optimalne brzine respiracije i time očuvanje kvalitete i produženje roka trajnosti namirnice.

#### **4.5. UDIO UKUPNIH POLIFENOLA**

Antioksidacijska aktivnost važan je parametar u karakterizaciji aktivnih filmova, s obzirom na to da može produžiti rok trajanja hrane sprječavajući oksidaciju lipida i drugih sastojaka hrane (Wang i sur., 2019). Osim što dodatak antioksidansa povećava antioksidacijsku aktivnost, treba imati na umu da njegova prisutnost u ambalažnom materijalu može smanjiti udio kisika u pakovini, zahvaljujući većem afinitetu antioksidansa prema kisiku nego komponentama namirnice (Vujković i sur., 2007).

Udio ukupnih polifenola u pripremljenih filmovima dane su na slici 11.



Slika 11. Ukupni udio polifenola u uzorcima filmova na bazi kitozana i želatine (CSGEL) i onih s 1 % (m/v) (CSGELGA1) i 2 % (m/v) dodatka galne kiseline (CSGELGA2)

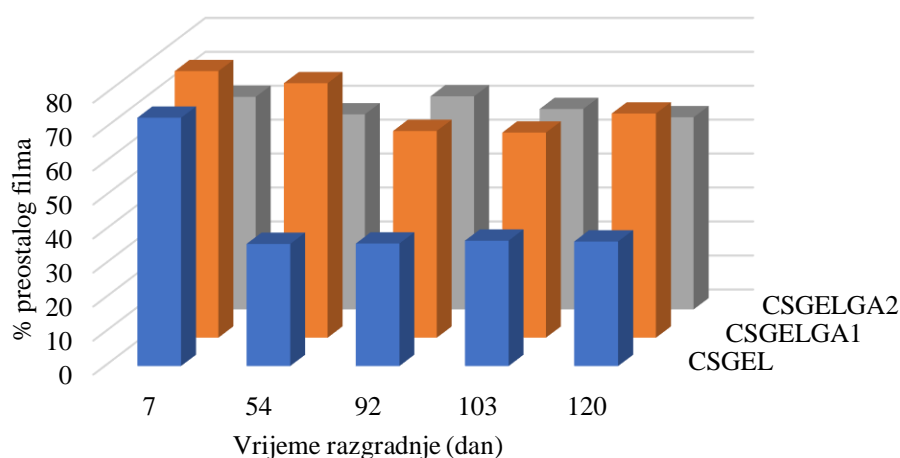
Različiti eksponenti (<sup>a-c</sup>) ukazuju na statistički značajne razlike među uzorcima ( $p < 0,05$ )

CSGEL filmovi pokazuju znatno nižu vrijednost udjela ukupnih polifenola u usporedbi s filmovima obogaćenim GA, što je i očekivano. Ukupna količina fenola u kontrolnim uzorcima (CSGEL) iznosi  $4,01 \pm 0,55$  mg TPC g<sup>-1</sup>. Prisutnost fenola često je odgovorna za antioksidacijsku aktivnost materijala, pa se često udio ukupnih fenola korelira i s povezuje s antioksidacijskim kapacitetom. Mjerljive vrijednosti ukupnih fenola u CSGEL filmovima bez dodatka GA, objašnjavaju se reakcijom FC reagensa s NH<sub>2</sub> skupinom kitozana (Bajić i sur., 2019). Slobodne amino skupine u kitozanu mogu reagirati sa slobodnim radikalima tvoreći stabilne amonijeve skupine i makromolekularne radikale (Pacheco i sur., 2018) koje također rezultiraju antioksidacijskim odgovorom. Uz navedeno, sposobnost hvatanja slobodnih radikala pokazuje i riblja želatina, zahvaljujući svojim peptidnim frakcijama (Benbettaïeb i sur., 2020). Iako kitozan pokazuje bolja antioksidacijska svojstva od želatine, prema istraživanja Jridi i sur. (2014) dodatkom kitozana u želatinske filmove smanjila se antioksidacijska aktivnost filmova, što se može objasniti manjom topljivosti višekomponentnog filma o samog filma na bazi želatine. Nadalje, antioksidacijsku aktivnost pokazuju i fenolni spojevi, među kojima je i galna kiselina. Antioksidacijski učinak prirodnih fenolnih kiselina temelji se na mogućnosti da reagiraju sa slobodnim radikalima, apsorbiraju svjetlo u UV području (100 do 400 nm) te da keliraju prijelazne metale (Benbettaïeb i sur.,

2020). U CSGELGA2 uzorku određen je najveći udio ukupnih polifenola ( $503,79 \pm 33,27$  mg TPC  $g^{-1}$ ), dok je statistički značajan manji udio polifenola ( $318,94 \pm 30,73$  mg TPC  $g^{-1}$ ) određen u CSGELGA1 uzorku ( $p < 0,05$ ). Slično je opisano i u radu Pacheco i sur. (2018), gdje je antioksidacijska aktivnost CSGA filma bila proporcionalna udjelu dodane GA kiseline. Također, u istraživanju Limpisophon i Schleining (2016) dodatkom GA kiseline u GEL film značajno se povećala antioksidacijski aktivnost kao i udio ukupnih polifenola, pri čemu glicerol nije imao utjecaj na antioksidacijsku aktivnost niti na otpuštanje GA kiseline. Da GA kiselina značajno poboljšava antioksidacijskog potencijala CS filmova pokazali su i Wang i sur. (2019).

#### 4.6. BIORAZGRADIVOST FILMOVA

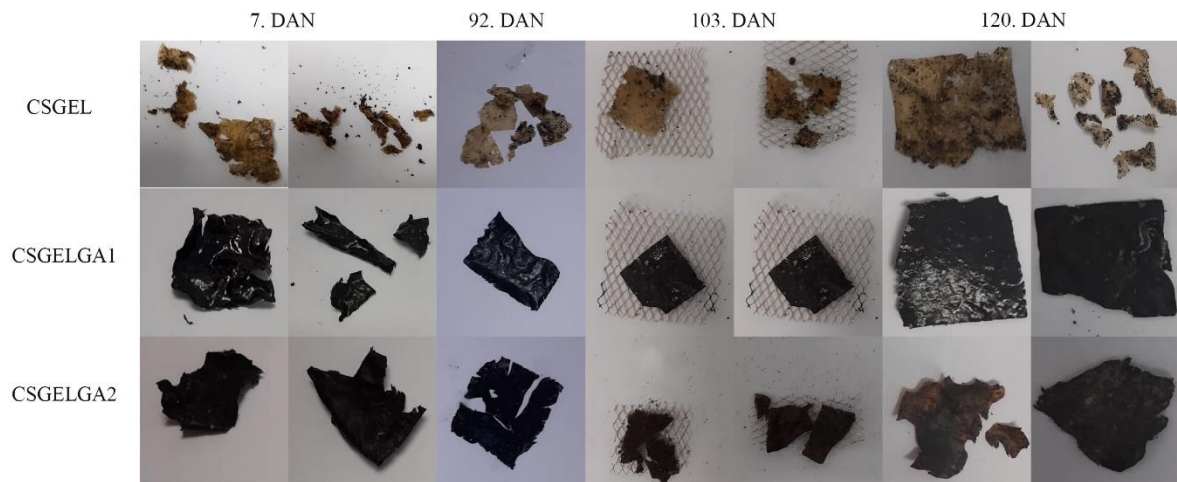
Ovisnosti vremena razgradnje o postotku preostalog filma prikazan je na slici 12. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da CSGEL filmovi pokazuju veći stupanj biorazgradnje od onih obogaćenih GA kiselinom. Ovi rezultati slažu se s istraživanjem Ediyilyam i sur. (2021) koji su istraživali biorazgradivost filmova na bazi kitozana i želatine s dodatkom nanočestica srebra. Nakon 14 dana CSGEL filmovi pokazali su najveći stupanj degradacije tj. filmovi su postali krhki i počeli su se skupljati, dok je dodatak nanočestica srebra smanjio biorazgradivost filmova. Ovakvo ponašanje može se pripisati antimikrobnom djelovanju nanočestica srebra. Nadalje, Yaradoddi i sur. (2020) pokazali su da su filmovi na bazi karboksimetilceluloze, želatine i agra biorazgradivi u roku od 7 – 10 dana. Kod uzoraka obogaćenih GA kiselinom postoji nekonzistentnost rezultata. Postotak preostalog filma prvo smanjuje pa povećava, što se može objasniti nedovoljnim ispiranjem i zaostalom zemljom na uzorcima filma.



Slika 12. Ovisnost vremena razgradnje i postotka preostalog filma



Jedan od važnih čimbenika biorazgradivih filmova je da se moraju raspasti i razgraditi nakon upotrebe, a da pri tome ne uzrokuju kontaminaciju ili onečišćenja tla, vode i zraka (Yaradoddi i sur., 2020). Biorazgradivost pripisuje utjecaju vlage na filmove, koja prodire u filmove rezultirajući narušavanju svojstava i strukture filmova. Takvi filmovi postaju izloženi napadu mikroorganizama pri čemu se razgrađuju (Luís i sur., 2019). Na slici 13 prikazana je biorazgradnja filmova kroz period od 120 dana.



Slika 13. Slike CSGEL, CSGELGA1 i CSGELGA2 filmova iskopanih iz zemlje kroz period od 7, 92, 103 i 120 dana

## 5. ZAKLJUČCI

U ovom radu uspješno su pripremljeni aktivni biorazgradivi filmovi na bazi kitozana i želatine uz dodatak galne kiseline u koncentraciji od 1 % i 2 % (m/v).

1. Filmovi bez GA kiseline bili su prozirni, dok njezinim dodatkom dolazi do crveno-žutog obojenja filma. Svi filmovi su bili bez vidljivih nepravilnosti na površini.
2. Propusnost UV zračenja smanjila se dodatkom GA kiseline, čime ovakvi filmovi pokazuju obećavajuća zaštitna svojstva od UV svjetla.
3. Kapacitet bubrenja i udio vode smanjio se dodatkom GA te ova svojstva opadaju povećanjem njene koncentracije.
4. Najbolju barijeru na vodenu paru pokazao je CSGEL2 film, a najlošiju CSGEL film.
5. Dodatkom GA kiseline barijera na O<sub>2</sub> i CO<sub>2</sub> je slabila. Najmanju propusnost na plinove pokazao je CSGEL film, dok je najvišu pokazao CSGELGA2.
6. Udio ukupnih fenola povećavao se s udjelom dodane GA kiseline.
7. Najbolju biorazgradivost pokazali su CSGEL filmovi, dok su oni obogaćeni GA kiselinom pokazali nešto lošiju biorazgradivost.

## 6. LITERATURA

Abdul Khalil HPS, Saurabh CK, Syakir MI, Fazita MRN, Bhat A, Banerjee A, Fizree HM, Rizal S, Tahir PM (2019) Barrier properties of biocomposites/hybrid films. Mechanical and Physical Testing of Biocomposites, Fibre-Reinforced Composites and Hybrid Composites, Woodhead Publishing Series in Composites Science and Engineering 241–258. doi:10.1016/b978-0-08-102292-4.00013-8

Aguirre-Loredo RY, Rodríguez-Hernández AI, Morales-Sánchez E, Gómez-Aldapa CA, Velazquez G (2016) Effect of equilibrium moisture content on barrier, mechanical and thermal properties of chitosan films. *Food Chem* **196**, 560–566. doi:10.1016/j.foodchem.2015.09.06

Ahmed S, Ikram S (2016) Chitosan and gelatin based biodegradable packaging films with UV-light protection. *J Photochem Photobiol B: Biology* **163**, 115–124. doi:10.1016/j.jphotobiol.2016.08.023

Aider M (2010) Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT - Food Sci Technol* **43**(6), 837–842. doi:10.1016/j.lwt.2010.01.021

Al-Hassan AA, Norziah MH (2012) Starch–gelatin edible films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. *Food Hydrocol* **26**(1), 108–117. doi:10.1016/j.foodhyd.2011.04.015

Alias SA, Mhd Sarbon N (2019) Rheological, physical, and mechanical properties of chicken skin gelatin films incorporated with potato starch. *Npj Science of Food* **3**(1). doi:10.1038/s41538-019-0059-3

Alvarado S, Sandoval G, Palos I, Tellez S, Aguirre-Loredo Y, Velazquez G (2015) The effect of relative humidity on tensile strength and water vapor permeability in chitosan, fish gelatin and transglutaminase edible films. *Food Sci Technol* **35**(4), 690–695. doi:10.1590/1678-457x.6797

André F, Cavagna S, André C (2003) Gelatin Prepared from Tuna Skin: A Risk Factor for Fish Allergy or Sensitization? *Int Arch Allergy Immunol*, **130**(1), 17–24. doi:10.1159/000068370

Anonymous 1 (2022) [Chitosan - Introduction \(swicofil.com\)](https://www.swicofil.com). Pristupljeno 26. Veljače 2022.

Anonymous 2 (2022) Tricol Biomedical inc. <https://tricolbiomedical.com/product/onestop-bandage-rx/>. Pristupljeno 25. Veljače 2022.

Anonymous 3 (2022) <https://www.conrad.cz/p/helios-preisser-digi-met-1865-513-trmenovy-mikrometr-s-digitalnim-displejem-25-50-mm-odecet-0001-mm-din-863-1-821503>. Pristupljeno 14. Travnja 2022.

Anonymous 4 (2022) [https://www.brugger-feinmechanik.com/fileadmin/user\\_upload/Datenblaetter/P\\_GDP-C\\_gb.pdf](https://www.brugger-feinmechanik.com/fileadmin/user_upload/Datenblaetter/P_GDP-C_gb.pdf). Pristupljeno 14. Travnja 2022.

Arboleya JC, Olabarrieta I, Luis-Aduriz A, Lasa D, Vergara J, Sanmartín E, i sur.... (2008) From the chef's mind to the dish: how scientific approaches facilitate the creative process. *Food Biophys* **3**(2), 261–268. doi:10.1007/s11483-008-9078-3

Arpi N, Fahrizal, Martunis, Hardianti E (2018) Preparation and characterization of biodegradable film based on skin and bone fish gelatin. *IOP Conf Ser: Earth Environ Sci* **207**, 012050

Arvanitoyannis IS, Nakayama A, Aiba S (1998) Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties. *Carb Polym* **37**(4), 371–382. doi:10.1016/s0144-8617(98)00083-6

Aytac Z, Kusku SI, Durgun E, Uyar T (2016) Encapsulation of gallic acid/cyclodextrin inclusion complex in electrospun polylactic acid nanofibers: Release behavior and antioxidant activity of gallic acid. *Mater Sci Eng C* **63**, 231–239. doi:10.1016/j.msec.2016.02.063

Bae MJ, Shin HS, Kim EK, Kim J, Shon DH (2013) Oral administration of chitin and chitosan prevents peanut-induced anaphylaxis in a murine food allergy model. *Int Jof Biol Macromol* **61**, 164–168. doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.06.01

Bajić M, Jalšovec H, Travan A, Novak U, Likozar B (2019) Chitosan-based films with incorporated supercritical CO<sub>2</sub> hop extract: Structural, physicochemical, and antibacterial properties. *Carbohydr Polym.* **219**, 261–268

Bajpai P (2019) Properties of biobased packaging material. *Biobased Polym*, 25–111. doi:10.1016/b978-0-12-818404-2.00003-5

Bandeira SF, da Silva RSG, de Moura JM, de Almeida Pinto LA (2015) Modified gelatin films from croaker skins: effects of pH, and addition of glycerol and chitosan. *J Food Process Eng.***38**(6), 613-620. doi:10.1111/jfpe.12191

Baygar T (2019) Bioactivity potentials of biodegradable chitosan/gelatin film forming solutions combined with monoterpenoid compounds. *J Polym Env* **27**, 1686–1692. doi:10.1007/s10924-019-01465-4

Beikzadeh S, Ghorbani M, Shahbazi N, Izadi F, Pilevar Z, Mortazavian AM (2020) The effects of novel thermal and nonthermal technologies on the properties of edible food packaging. *Food Eng Rev.* **12**, 333–345. doi:10.1007/s12393-020-09227-y

Benbettaïeb N, Kurek M, Bornaz S, Debeaufort F (2014) Barrier, structural and mechanical properties of bovine gelatin-chitosan blend films related to biopolymer interactions. *J Sci Food Agric* **94**(12), 2409–2419. doi:10.1002/jsfa.6570

Benbettaïeb N, Mahfoudh R, Moundanga S, Brachais CH, Chambin O, Debeaufort F (2020) Modeling of the release kinetics of phenolic acids embedded in gelatin/chitosan bioactive-packaging films: Influence of both water activity and viscosity of the food simulant on the film structure and antioxidant activity. *Int J Biol Macromol* **160**, 780-794. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.05.199

Benbettaïeb N, O'Connell C, Viaux A, Bou-Maroun E, Seuvre AM, Brachais CH, Debeaufort F (2019) Sorption kinetic of aroma compounds by edible bio-based films from marine-by product macromolecules: Effect of relative humidity conditions. *Food Chem* **298**, 125064. doi:10.1016/j.foodchem.2019.125064

Bertolo MRV, Martins VCA, Horn MM, Brenelli LB, Plepis AMG (2019) Rheological and antioxidant properties of chitosan/gelatin-based materials functionalized by pomegranate peel extract. *Carb Polym* 115386. doi:10.1016/j.carbpol.2019.11538

Bof MJ, Bordagaray VC, Locaso DE, García MA (2015) Chitosan molecular weight effect on starch-composite film properties. *Food Hydrocol* **51**, 281–294. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2015.05.018>

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. doi:10.1016/j.fbio.2016.07.003

Bourlieu C, Guillard V, Vallès-Pamiès B, Guilbert S, Gontard N (2009) Edible moisture barriers: how to assess of their potential and limits in food products shelf-life extension? *Crit Rev Food Sci Nutr* **49**(5), 474–499. doi:10.1080/10408390802145724

Chloe (2021) Contemporary Issues in Food Science :Molecular Gastronomy and the Disappearing Ravioli. <https://www.food280.com/molecular-gastronomy-and-the-disappearing-ravioli/>. Pristupljeno 09. Travnja 2022.

Da Rosa CG, Borges CD, Zambiasi RC, Nunes MR, Benvenuti EV, Luz SR da, i sur (2013) Microencapsulation of gallic acid in chitosan,  $\beta$ -cyclodextrin and xanthan. *Ind Crops Prod* **46**, 138–146. doi:10.1016/j.indcrop.2012.12.053

Daneshfar A, Ghaziaskar, HS, Homayoun N (2008) Solubility of gallic acid in methanol, ethanol, water, and ethyl acetate. *J Chem Eng Data* **53**(3), 776–778. doi:10.1021/je700633w

Darwesh OM, Sultan YY, Seif MM, Marrez DA (2018) Bio-evaluation of crustacean and

fungal nano-chitosan for applying as food ingredient. *Toxicology Reports*, **5**, 348–356. doi:10.1016/j.toxrep.2018.03.002

De Moraes Crizel T, de Oliveira Rios A, D. Alves V, Bandarra N, Moldão-Martins M, Hickmann Flôres S (2018) Active food packaging prepared with chitosan and olive pomace. *Food Hydrocol* **74**, 139–150. doi:10.1016/j.foodhyd.2017.08.007

Debeaufort F, Martin-Polo M, Voilley A (1993) Polarity and structure affect water vapor permeability of model edible films. *J Food Sci* **58**, 428 – 434.

Debeaufort F, Martin-Polo M, Voilley A (1993) Polarity homogeneity and structure affect water vapor permeability of model edible films. *J Food Sci* **58**(2), 426–429. doi:10.1111/j.1365-2621.1993.tb04290.x

Deepa B, Abraham E, Pothan L, Cordeiro N, Faria M, Thomas S (2016) Biodegradable nanocomposite films based on sodium alginate and cellulose nanofibrils. *Materials* **9**(1), 50. doi:10.3390/ma9010050

Díaz-Montes E, Castro-Muñoz R (2021) Edible films and coatings as food-quality preservers: An overview. *Foods*, **10**(2), 249. doi:10.3390/foods10020249

Direktiva (EU) 2019/904 Europskog parlamenta i Vijeća od 5. lipnja 2019. o smanjenju utjecaja određenih plastičnih proizvoda na okoliš.

Duran M, Aday MS, Zorba NND, Temizkan R, Büyükcan MB, Caner C (2016) Potential of antimicrobial active packaging “containing natamycin, nisin, pomegranate and grape seed extract in chitosan coating” to extend shelf life of fresh strawberry. *Food Bioprod Proces* **98**, 354–363. doi:10.1016/j.fbp.2016.01.007

Dutta PK; Tripathi S; Mehrotra GK; Dutta J (2009) Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chem* **114**, 1173–1182. doi:10.1016/j.foodchem.2008.11.047

Ediyilyam S, George B, Shankar SS, Dennis TT, Waclawek S, Černík M, Padil VVT (2021)

Chitosan/gelatin/silver nanoparticles composites films for biodegradable food packaging applications. *Polym* **13**(11), 1680. doi:10.3390/polym13111680

European Parliament (2011) On how to avoid food wastage: strategies for a more efficient food chain in the EU. [https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/A-7-2011-0430\\_EN.html](https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/A-7-2011-0430_EN.html) Pristupljeno 17. Ožujka 2022. Pristupljeno 14. Travnja 2022.

FDA (2002) US Food and Drugs Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. U.S. agency response letter GRAS notice no. GRN 73 [https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=73&sort=GRN\\_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=chitosan](https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=73&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=chitosan). Pristupljeno 25. Ožujka 2022.

FDA (2005) US Food and Drugs Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. U.S. agency response letter GRAS notice no. GRN 170 [https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=170&sort=GRN\\_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=chitosan](https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=170&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=chitosan). Pristupljeno 25. Ožujka 2022.

FDA (2011) US Food and Drugs Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. U.S. agency response letter GRAS notice no. GRN 397 [https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=397&sort=GRN\\_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=chitosan](https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=397&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=chitosan). Pristupljeno 25. Ožujka 2022.

FDA (2013) US Food and Drugs Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. U.S. agency response letter GRAS notice no. GRN 443 [https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=443&sort=GRN\\_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=chitosan](https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=443&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=chitosan). Pristupljeno 25. Ožujka 2022.

Flórez M, Guerra-Rodríguez E, Cazón P, Vázquez M (2022) Chitosan for food packaging: Recent advances in active and intelligent films. *Food Hydrocol*, **124**(Part B), 107328. doi:10.1016/j.foodhyd.2021.107328



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>

Ghorani B, Emadzadeh B, Rezaeinia H, Russell SJ (2020) Improvements in gelatin cold water solubility after electrospinning and associated physicochemical, functional and rheological properties. *Food Hydrocol*, 105740. doi:10.1016/j.foodhyd.2020.105740

Gontard N, Thibault R, Cuq B, Guilbert S (1996) Influence of relative humidity and film composition on oxygen and carbon dioxide permeabilities of edible films. *J Agric Food Chem* **44**(4), 1064–1069. doi:10.1021/jf9504327

Gontard N, Thibault R, Cuq B, Guilbert S (1996) Influence of relative humidity and film composition on oxygen and carbon dioxide permeabilities of edible films. *J Agr Food Chem* **44**, 1064–1069.

Guilbert S, Gontard N, Cuq B (1995) Technology and applications of edible protective films. *Pack Technol Sci* **8**(6), 339–346. doi:10.1002/pts.2770080607

Haug IJ, Draget KI (2009) Gelatin. *Handbook of Hydrocolloids*, str. 142–163. doi:10.1533/9781845695873.142

Hoque MS, Benjakul S, Prodpran T (2011) Effects of partial hydrolysis and plasticizer content on the properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin. *Food Hydrocol* **25**(1), 82–90. doi:10.1016/j.foodhyd.2010.05.008

Hosseini SF, Rezaei M, Zandi M, Ghavi FF (2013) Preparation and functional properties of fish gelatin–chitosan blend edible films. *Food Chem* **136**(3-4), 1490–1495. doi:10.1016/j.foodchem.2012.09.081

Iqdiam BM, Welt BA, Goodrich-Schneider R, Sims CA, Baker GL, Marshall M R (2020) Influence of headspace oxygen on quality and shelf life of extra virgin olive oil during storage. *Food Pack Shelf Life* **23**, 100433. doi:10.1016/j.fpsl.2019.100433

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

Jiang W, Hu S, Li S, Liu Y (2019) Evaluation of the preservation effect of gelatin-water soluble chitosan film incorporated with maillard peptides on bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) slices packaging. *LWT* **113**, 108294. doi:10.1016/j.lwt.2019.108294

Jridi M, Hajji S, Ayed HB, Lassoued I, Mbarek A, Kammoun M, i sur.(2014) Physical, structural, antioxidant and antimicrobial properties of gelatin–chitosan composite edible films. *Int J Biol Macromol* **67**, 373–379. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.03.05

Karim AA, Bhat R (2008) Gelatin alternatives for the food industry: recent developments, challenges and prospects. *Trends Food Sci Technol* **19**(12), 644–656. doi:10.1016/j.tifs.2008.08.001

Kerch G (2015) Chitosan films and coatings prevent losses of fresh fruit nutritional quality: A review. *Trends Food Sci Technol* **46**, 159–166. doi: 10.1016/j.tifs.2015.10.010

Khan MKI, Cakmak H, Tavman Ş, Schutyser M, Schroën, K (2014) Anti-browning and barrier properties of edible coatings prepared with electrospraying. *Innov Food Sci Emerg Technol* **25**, 9–13. doi:10.1016/j.ifset.2013.10.006

Khwaldia K, Arab-Tehrany E, Desobry S (2010) Biopolymer coatings on paper packaging materials. *Compr Rev Food Sci* **9**(1), 82–91. doi:10.1111/j.1541-4337.2009.00095.x

Kommareddy S, Shenoy DB, Amiji MM (2007) Gelatin Nanoparticles and Their Biofunctionalization. *Nanotechnologies for the Life Sciences*. C.S.S.R. Kumar (Ed.). doi:10.1002/9783527610419.ntls00

Kumar MNVRA (2000) review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym* **46**, 1–27

Kurek M (2012) Comprehensive study of the effects of formulation and processing parameters on structural and functional properties of active bio-based packaging films. Doktorska disertacija.

Kurek M, Galus S, Debeaufort F (2014) Surface, mechanical and barrier properties of bio-based composite films based on chitosan and whey protein. *Food Pack Shelf Life* **1**(1), 56–67. doi:10.1016/j.fpsl.2014.01.00

Kurek M, Guinault A, Voilley A, Galic K, Debeaufort F (2014). Effect of relative humidity on carvacrol release and permeation properties of chitosan based films and coating. *Food Chem* **144**, 9-17. doi:10.1016/j.foodchem.2012.11.132ff.

Kusmono, Abdurrahim I (2019) Water sorption, antimicrobial activity, and thermal and mechanical properties of chitosan/clay/glycerol nanocomposite films. *Heliyon* **5**(8), e02342. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e0234

Lavorgna M, Piscitelli F, Mangiacapra P, Buonocore GG (2010) Study of the combined effect of both clay and glycerol plasticizer on the properties of chitosan films. *Carbohydr Polym* **82**(2), 291–298. doi:10.1016/j.carbpol.2010.04.054

Leceta I, Guerrero P, De La Caba K (2013) Functional properties of chitosan-based films. *Carbohydr Polym* **93**(1):339–346. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.04.031>

Limpisophon K, Schleining G (2016) Use of gallic acid to enhance the antioxidant and mechanical properties of active fish gelatin film. *J Food Sci* **82**(1), 80–89. doi:10.1111/1750-3841.13578

Lin L, Gu Y, Cui H (2019) Moringa oil/chitosan nanoparticles embedded gelatin nanofibers for food packaging against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* on cheese. *Food Pack Shelf Life* **19**, 86–93. doi:10.1016/j.fpsl.2018.12.005

Luangapai F, Peanparkdee M, Iwamoto S (2022) Effects of a curcumin nanoemulsion on the physico-chemical properties of chitosan-based films. *Int J Food Sci Technol* **57**, 101-109. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15337>

Luís A, Domingues F, Ramos A (2019) Production of Hydrophobic Zein-Based Films Bioinspired by The Lotus Leaf Surface: Characterization and Bioactive Properties. *Microorganisms*, **7**(8), 267. doi:10.3390/microorganisms7080267

Ly BCK, Dyer EB, Feig JL, Chien AL, Del Bino S (2020) Research techniques made simple: cutaneous colorimetry: A reliable technique for objective skin color measurement. *J Invest Dermatol* **140**(1), 3–12.e1. doi:10.1016/j.jid.2019.11.003

Ma W, Tang CH, Yin SW, Yang XQ, Wang Q, Liu F, Wei ZH (2012) Characterization of gelatin-based edible films incorporated with olive oil. *Food Res Int* **49**(1), 572–579. doi:10.1016/j.foodres.2012.07.037

Martinac A, Filipović-Grčić J (2002) Kitozan – biopolimer 21.stoljeća. *Farmaceutski glasnik*, **58** (1), 1-10. Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:632991>.

Md Nor S, Ding P (2020). Trends and advances in edible biopolymer coating for tropical fruit: A review. *Food Res Int* 109208. doi:10.1016/j.foodres.2020.109208

Mohammed Manshor N, Rezali MI, Jai J, Yahya A (2018). Effect of plasticizers on physicochemical and mechanical properties of chitosan-gelatin films. *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng. (discontin.)* **358**, 012040. doi:10.1088/1757-899x/358/1/012040

Motelica L, Fikai D, Fikai A, Oprea OC, Kaya DA, Andronescu E (2020) Biodegradable antimicrobial food packaging: Trends and perspectives. *Foods* **9**(10), 1438. doi:10.3390/foods9101438

Nair MS, Tomar M, Punia S, Kukula-Koch W, Kumar M (2020). Enhancing the functionality of chitosan- and alginate-based active edible coatings/films for the preservation of fruits and vegetables: A review. *Int J Biol Macromol* **164**, 304-320. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.07.083

Nguyen Van Long N, Joly C, Dantigny P (2016) Active packaging with antifungal activities. *Int J Food Microbiol* **220**, 73–90. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.001

Nilsen-Nygaard J, Strand S, Vårum K, Draget K, Nordgård C (2015) Chitosan: gels and interfacial properties. *Polymers* **7**(3), 552–579. doi:10.3390/polym7030552

Nilsuwan K, Guerrero P, Caba K, Benjaku S, Prodpran T (2019) Properties of fish gelatin films containing epigallocatechin gallate fabricated by thermo-compression molding. *Food Hydrocol* **97**, 105236. doi:10.1016/j.foodhyd.2019.105236

Nor MHM, Nazmi NNM, Sarbon NM (2017) Effects of plasticizer concentrations on functional properties of chicken skin gelatin films. *Int Food Res* **24**(5), 1910-1918.

Notpla (2022) NOTPLA X Heinz Tomato Ketchup Sachet <https://notpla.shop/products/ketchup-sachets?variant=36825391431845>. Pristupljeno 09. Travnja 2022.

Oregel-Zamudio E, Angoa-Pérez MV, Oyoque-Salcedo G, Aguilar-González CN, Mena-Violante HG (2017) Effect of candelilla wax edible coatings combined with biocontrol bacteria on strawberry quality during the shelf-life. *Sci Hortic* **214**, 273–279. doi:10.1016/j.scienta.2016.11.038

Ortiz-Duarte G, Pérez-Cabrera LE, Artés-Hernández F, Martínez-Hernández GB (2019) Ag-chitosan nanocomposites in edible coatings affect the quality of fresh-cut melon. *Postharvest Biol Technol*, **147**, 174–184. doi:10.1016/j.postharvbio.2018.09

Ouattara B, Simard RE, Piette G, Begin A, Holley RA (2000) Diffusion of acetic and propionic acids from chitosan-based antimicrobial packaging films. *J Food Sci* **65**(5), 768–773. doi:10.1111/j.1365-2621.2000.tb13584.x

Pacheco N, Naal-Ek MG, Ayora-Talavera T, Shirai K, Román-Guerrero A, Fabela-Morón MF, Cuevas-Bernardino, JC (2018) Effect of bio-chemical chitosan and gallic acid into rheology and physicochemical properties of ternary edible films. *Int J Biol Macromol* **125**, 149-158. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.12.060

Park SY, Marsh KS, Rhim JW (2002) Characteristics of different molecular weight

chitosan films affected by the type of organic solvents. *J Food Sci* **67**(1), 194–197. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb11382.x>

Patel P (2019) Edible Packaging. *ACS Cent Sci* **5**(12), 1907-1910. doi:10.1021/acscentsci.9b01251

Prateepchanachai S, Thakhiew W, Devahastin S, Soponronnarit S (2019) Improvement of heat-sealing and mechanical properties of edible chitosan films via addition of gelatin and CO<sub>2</sub> treatment of film-forming solutions. *Int J Biol Macromol* **131**, 589-600. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.03.06

Pravilnik (2009) Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti materijala i predmeta koji dolaze u neposredan dodir s hranom. Narodne novine 125, Zagreb. [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2009\\_10\\_125\\_3092.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2009_10_125_3092.html). Pristupljeno 14. Travnja 2022.

Pravilnik (2015) Pravilnik o ambalaži i otpadnoj ambalaži. Narodne novine 88, Zagreb. [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2015\\_08\\_88\\_1735.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2015_08_88_1735.html). Pristupljeno 27. Veljače 2022.

Qiao C, Ma X, Zhang J, Yao J (2017) Molecular interactions in gelatin/chitosan composite films. *Food Chem* **235**, 45–50. doi:10.1016/j.foodchem.2017.05.04

Rawdkuen S, Thitipramote N, Benjakul S (2013) Preparation and functional characterisation of fish skin gelatin and comparison with commercial gelatin. *Int J Food Sci Technol* **48**(5), 1093–1102. doi:10.1111/ijfs.12067

Realini CE, Marcos B (2014) Active and intelligent packaging systems for a modern society. *Meat Sci* **98**(3), 404–419. doi:10.1016/j.meatsci.2014.06.031

Rezaee M, Askari G, EmamDjomeh Z, Salami M (2018) Effect of organic additives on physiochemical properties and anti-oxidant release from chitosan-gelatin composite films to fatty food simulant. *Int J Biol Macromol* **114**, 844–850. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.03.12

Riaz A, Lagnika C, Abdin M, Hashim MM, Ahmed W (2019) preparation and characterization of chitosan/gelatin-based active food packaging films containing apple peel nanoparticles. *J Polym Env* **28**,411–420. doi:10.1007/s10924-019-01619-4

Rivero S, Giannuzzi L, García MA, Pinotti A (2013) Controlled delivery of propionic acid from chitosan films for pastry dough conservation. *J Food Eng* **116**(2), 524–531. doi:10.1016/j.jfoodeng.2012.12.02

Robertson GL (2013) Food Packaging, Principles and Practice, Marcel Dekker, Inc., New York. str. 23

Romanazzi G; Feliziani E.; Baños SB; Sivakumar D (2017) Shelf life extension of fresh fruit and vegetables by chitosan treatment. *Crit Rev Food Sci Nutr* **57** 579–601. doi: 10.1080/10408398.2014.900474

Sakaguchi M, Toda M, Ebihara T, Irie S, Hori H, Imai A, Yanagida M, Miyazawa H, Ohsuna H, Ikezawa Z, Inouye S (2000) IgE antibody to fish gelatin (type I collagen) in patients with fish allergy. *J Allergy Clin Immunol*, **106**(3), 579–584. doi:10.1067/mai.2000.108499

Şen DB, Kılıç B (2021) Effects of edible coatings containing acai powder and matcha extracts on shelf life and quality parameters of cooked meatballs. *Meat Sci* **179**, 108547. doi:10.1016/j.meatsci.2021.108547

Shortle E, O’Grady MN, Gilroy D, Furey A, Quinn N, Kerry JP (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci* **98**(4), 828–834. doi:10.1016/j.meatsci.2014.07.001

Singleton VL, Orthofer R, Lamela-Raventós RM (1999a) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants means od Folin-Ciocalteu reagent. *Meth Enzymol* **299**, 1179.

Singleton VL, Orthofer R, Lamela-Raventós RM (1999b) Flavanoids and other

polyphenols. *Meth Enzymol* **299**: 152.

Soukoulis C, Yonekura L, Gan HH, Behboudi-Jobbehdar S, Parmenter C, Fisk I (2014) Probiotic edible films as a new strategy for developing functional bakery products: The case of pan bread. *Food Hydrocol* **39**, 231–242. doi:10.1016/j.foodhyd.2014.01.023

Sun X, Wang Z, Kadouh H, Zhou K (2014) The antimicrobial, mechanical, physical and structural properties of chitosan–gallic acid films. *LWT - Food Sci Technol*, **57**(1), 83–89. doi:10.1016/j.lwt.2013.11.037

Thakhiew W, Champahom M, Devahastin S, Soponronnarit S (2015) Improvement of mechanical properties of chitosan-based films via physical treatment of film-forming solution. *J Food Eng* **158**, 66–72. doi:10.1016/j.jfoodeng.2015.02.02

Tongnuanchan P, Benjakul S, Prodpran T (2012) Properties and antioxidant activity of fish skin gelatin film incorporated with citrus essential oils. *Food Chem* **134**(3), 1571–1579. doi:10.1016/j.foodchem.2012.03.09

Uranga J, Puertas AI, Etxabide A, Dueñas MT, Guerrero P, de la Caba K (2018) Citric acid-incorporated fish gelatin/chitosan composite films. *Food Hydrocol*. doi:10.1016/j.foodhyd.2018.02.018

Uredba komisije (EZ) br. 1331/2008 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2008. o uspostavi zajedničkog postupka odobravanja prehrambenih aditiva, prehrambenih enzima i prehrambenih aroma.

Uredba komisije (EZ) br. 1935/2004 Europskog parlamenta i Vijeća od 27. listopada 2004. o materijalima i predmetima koji dolaze u dodir s hranom i stavljanju izvan snage direktiva 80/590/EEZ i 89/109/EEZ.

Uredba komisije (EZ) br. 450/2009 od 29. svibnja 2009. o aktivnim i inteligentnim materijalima i predmetima koji dolaze u dodir s hranom.

Van den Broek LA; Knoop RJ; Kappen FH; Boeriu CG (2015) Chitosan films and blends



for packaging material. *Carbohydr Polym* **116**, 237–242. doi:10.1016/j.carbpol.2014.07.039

Vujković I, Galić K, Vereš M, Ambalaža za pakiranje namirnica, Sveučilišni udžbenik, TECTUS, Zagreb 2007. Str. 293-304.

Waibel KH, Haney B, Moore M, Whisman B, Gomez R (2011) safety of chitosan bandages in shellfish allergic patients. *Mil Med* **176**(10), 1153–1156. doi:10.7205/milmed-d-11-00150

Wang H, Ding F, Ma L, Zhang Y (2021) Edible films from chitosan-gelatin: Physical properties and food packaging application. *Food Biosci* **40**, 100871. doi:10.1016/j.fbio.2020.100871

Wang H, Qian J, Ding F (2018) emerging chitosan-based films for food packaging applications. *J Agri Food Chem* **66**(2), 395–413. doi:10.1021/acs.jafc.7b04528

Wang W, Yao L, Zhang T, Cheng CY, Levine D, Ishii H (2017) Transformative appetite. U: Proceedings of the 2017 CHI Conference on Human Factors in Computing Systems - CHI '17 Denver Colorado doi:10.1145/3025453.3026019

Wang Y, Du H, Xie M, Ma G, Yang W, Hu Q, Pei F (2019) Characterization of the physical properties and biological activity of chitosan films grafted with gallic acid and caffeic acid: A comparison study. *Food Pack Shelf Life* **22**, 100401. doi:10.1016/j.fpsl.2019.100401

Xiong Y, Deng B, Warner RD, Fang Z (2020) Reducing salt content in beef frankfurter by edible coating to achieve inhomogeneous salt distribution. *Int J Food Sci Technol* **55**(8), 2911-2919. doi:10.1111/ijfs.14552

Xu D, Chen T, Liu Y (2021) The physical properties, antioxidant and antimicrobial activity of chitosan–gelatin edible films incorporated with the extract from hop plant. *Polym Bull.* **78**, 3607–3624. doi:10.1007/s00289-020-03294-1

Yadav S, Mehrotra GK, Bhartiya P, Singh A, Dutta PK (2019) Preparation,

Physicochemical and biological evaluation of quercetin based chitosan-gelatin film for food packaging. *Carbohydr Polym* 115348. doi:10.1016/j.carbpol.2019.115348

Yaradoddi JS, Banapurmath NR, Ganachari SV, Soudagar MEM, Mubarak NM, Hallad S, i sur. (2020) Biodegradable carboxymethyl cellulose based material for sustainable packaging application. *Sci Report* **10**(1). doi:10.1038/s41598-020-78912-z

Yong H, Wang X, Bai R, Miao Z, Zhang X, Liu J (2019) Development of antioxidant and intelligent pH-sensing packaging films by incorporating purple-fleshed sweet potato extract into chitosan matrix. *Food Hydrocol* **90**, 216–224. doi:10.1016/j.foodhyd.2018.12.01

Yousuf B, Sun Y, Wu S (2021) Lipid and lipid-containing composite edible coatings and films. *Food Rev Int* 1–24. doi:10.1080/87559129.2021.1876084

Zhang C, Yang Z, Shi J, Zou X, Zhai X, Huang X, Xiao J, i sur. (2021) Physical properties and bioactivities of chitosan/gelatin-based films loaded with tannic acid and its application on the preservation of fresh-cut apples. *LWT* **144**, 111223. doi:10.1016/j.lwt.2021.111223

Zhang X, Lian H, Shi J, Meng W, Peng Y (2019) Plant extracts such as pine nut shell, peanut shell and jujube leaf improved the antioxidant ability and gas permeability of chitosan films. *Int J Biol Macromol* **148**, 1242-1250. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.11.108


## 7. PRILOZI

Prilog 1. Kazalo kratica

<b>KRATICA</b>	<b>KAZALO</b>
CS	kitozan
GEL	želatina
CSGEL	film na bazi kitozana i želatine
CSGELGA1	film na bazi kitozana i želatine s 1 % (m/v) galne kiseline
CSGELGA2	film na bazi kitozana i želatine s 2 % (m/v) galne kiseline
SW	<i>eng. swelling ratio</i> , kapacitet bubrenja
GA	galna
WVP	<i>eng. water vapor permeability</i> , propusnost na vodenu paru
WVTR	<i>eng. water vapor transmission rate</i> , brzina prijenosa vodene pare

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Petra Poldan, izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Handwritten signature of Petra Poldan in blue ink, written over a horizontal line.

Vlastoručni potpis