

UNIVERZITET U BEOGRADU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Ana S. Salević

**SINTEZA I KARAKTERIZACIJA  
AKTIVNIH VLAKANA I FILMOVA  
NA BAZI POLI( $\epsilon$ -KAPROLAKTONA) I ZEINA**

doktorska disertacija

Beograd, 2020.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF AGRICULTURE

Ana S. Salević

**SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF  
ACTIVE FIBERS AND FILMS BASED ON  
POLY( $\epsilon$ -CAPROLACTONE) AND ZEIN**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020.

## **Mentor**

**dr Viktor Nedović, redovni profesor**  
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

## **Članovi komisije**

**dr Petar Uskoković, redovni profesor**  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

**dr Steva Lević, docent**  
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

**dr Dušica Stojanović, viši naučni saradnik**  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

**dr Tanja Petrović, vanredni profesor**  
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

**dr Verica Đorđević, viši naučni saradnik**  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

**Datum odbrane doktorske disertacije: \_\_\_\_\_**

*Ova doktorska disertacija urađena je u okviru projekta integralnih i interdisciplinarnih istraživanja „Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenata hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti“ (evidencioni broj projekta III46010) finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.*

*Deo istraživanja urađen je u okviru COST akcije FP1405 „Active and intelligent fibre-based packaging - innovation and market introduction (ActInPak)“.*

*Eksperimentalni deo rada u okviru ove doktorske disertacije izveden je u laboratorijama Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Instituta za agrohemiju i prehrambenu tehnologiju Španskog nacionalnog saveta za istraživanja, Fakulteta za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu i Instituta tehničkih nauka Srpske akademije nauka i umetnosti.*

## **Zahvalnica**

*Neizmernu zahvalnost osećam prema svom mentoru, dr Viktoru Nedoviću, redovnom profesoru Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu, koji me je tokom izrade završnog i master rada uveo u svet istraživanja i kroz njega vodio tokom izrade ove doktorske disertacije. Veliko hvala na ukazanom poverenju, dragocenim savetima i velikoj pomoći, podršci i zalaganju, pruženim prilikama i ostvarenim kontaktima.*

*Zahvaljujem se dr Stevi Leviću, docentu Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na posvećenosti, prenetom znanju i savetima u svim fazama izrade ove doktorske disertacije. Hvala Vam na svim razgovorima, podršci i pomoći da prebrodim brojne prepreke.*

*Veliku zahvalnost na ukazanom poverenju, korisnim savetima i stečenom znanju dugujem dr Petru Uskokoviću, redovnom profesoru Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, koji mi je omogućio izradu dela disertacije u laboratorijama Tehnološko-metalurškog fakulteta. Hvala Vam što ste mi probudili nova interesovanja i pomogli pri izboru teme disertacije i njene izrade.*

*Zahvaljujem se dr Dušici Stojanović, višem naučnom saradniku Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na angažovanju, posvećenosti i strpljenju. Hvala Vam na bezrezervnoj pomoći i podršci tokom izrade ove disertacije.*

*dr Tanji Petrović, vanrednom profesoru Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu, hvala na kritičkoj oceni rada i korisnim sugestijama koje su doprinele poboljšanju disertacije.*

*Zahvaljujem se dr Verici Đorđević, višem naučnom saradniku Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na saradnji, podršci i savetima.*

*Posebnu zahvalnost želim da izrazim prof. dr Jose Maria Lagaron Cabello-u na mogućnosti da deo disertacije uradim na Institutu za agrohemiju i prehrambenu tehnologiju Španskog nacionalnog saveta za istraživanja. Hvala Vam na prilici da radim sa Vama i osećam se kao deo Vašeg tima, na velikoj pomoći, svakom savetu i motivaciji. Znanja i iskustva stečena tokom rada sa Vama za mene su neprocenljiva. Veliko hvala dr Cristini Prieto Lopez na uloženom trudu, nesebičnoj pomoći i savetima. Hvala što si bila uz mene, bodrila me i usmeravala. Beskrajno hvala što uz tebe period adaptacije nisam osetila, što si mi približila način života, duh i kulturu Španije. Hvala na svim nezaboravnim uspomenu. → I would like to express my deep gratitude to prof. dr. Jose Maria Lagaron Cabello for giving me the opportunity to perform a part of the research of this dissertation in his research group at the Institute of Agrochemistry and Food Technology of the Spanish National Research Council. Thank you for your hospitality, invaluable support, guidance, advice and motivation. Knowledge and experience gained during my STSM are of immense value for me. I am sincerely grateful to dr. Cristina Prieto Lopez for the great effort, unconditional support and guidance. Thank you for your enthusiasm and dedication, as well for all unforgettable moments. The time spent with you gave me wonderful impressions of the beautiful Spanish culture that will never fade.*

*Zahvaljujem se prof. dr Branku Bugarskom na pruženoj prilici da učestvujem u projektu kojim rukovodi.*

*Koleginicama sa Katedre za tehnološku mikrobiologiju Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu prof. dr Mileni Pantić, dr Dunji Miletić, dr Danki Matijašević i dr Aleksandri Sknepnek zahvaljujem se na velikoj pomoći u radu i savetima. Veliko hvala prof. dr Vladimiru Pavloviću sa Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu, doc. dr Ivani Sredović-Ignjatović sa Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu, dr Sanji Jeremić sa Instituta za*

*molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo i dr Smilji Marković sa Instituta tehničkih nauka SANU bez čijih stručnih saveta i velike pomoći u eksperimentalnom radu ova disertacija ne bi bila kompletna.*

*Zahvaljujem se kolegama iz laboratorije 117: doc. dr Saši Despotoviću, dr Ani Kalušević, dr Milu Veljoviću i prof. dr Dragani Paunović na saradnji, pomoći i savetima. Mileni Zdravković hvala na velikoj podršci. Veliko hvala dr Ivani Malagurski na ohrabriranju, motivaciji i korisnim savetima.*

*Najveću zahvalnost dugujem mojim najmilijima za безусловnu ljubav. Mami i tati za podršku i podstrek da ostvarim svoje snove i ciljeve. Seki za pozitivnu energiju i smeh kojima boji svaki moj dan. Bakama i deki što su uvek uz mene. Beskrajno hvala Urošu za strpljenje, podršku i razumevanje, za snagu i veru koje unosi u moj život.*

# SINTEZA I KARAKTERIZACIJA AKTIVNIH VLAKANA I FILMOVA NA BAZI POLI( $\epsilon$ -KAPROLAKTONA) I ZEINA

## SAŽETAK

Osnovni cilj doktorske disertacije bio je razvoj aktivnih, biorazgradivih materijala sa potencijalom primene kao ambalažnih materijala za pakovanje prehrambenih proizvoda. U ovom pogledu, istraživanja su obuhvatila formulisanje, sintezu i karakterizaciju različitih struktura na bazi biorazgradivih polimera različitog porekla, odnosno polimera dobijenih iz neobnovljivih (poli( $\epsilon$ -kaprolakton) i obnovljivih (zein) izvora. Ekstrakt žalfije inkorporiran je kao aktivni konstituent unutar polimernih matriksa u cilju postizanja funkcionalnosti materijala u prevenciji oksidacionih procesa i rasta bakterija. U ovom pogledu, poseban fokus bio je usmeren na analizu uticaja inkorporacije različitih sadržaja ekstrakta na fizička, hemijska i funkcionalna svojstva materijala, kao i na njihovu biorazgradivost.

U inicijalnoj fazi disertacije izvršena je priprema i karakterizacija ekstrakta žalfije (*Salvia officinalis* L.). Za ekstrakciju je primenjena tehnika maceracije, pri čemu su određeni optimalni uslovi ekstrakcije (ekstrakcioni medijum, dužina trajanja ekstrakcije i odnos biljnog materijala i rastvarača) za dobijanje ekstrakta sa što većim sadržajem ukupnih fenolnih jedinjenja. Analizom pripremljenog ekstrakta pokazano je da on predstavlja pogodan izvor fenolnih jedinjenja i fenolnih kiselina, od kojih je kvantitativno najdominantnija bila ruzmarinska kiselina. Pored toga, ekstrakt je ispoljio antioksidativnu i antibakterijsku aktivnost u pogledu sposobnosti inhibicije DPPH• slobodnog radikala, odnosno inhibitornog i baktericidnog delovanja na patogene bakterije *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*.

U drugom delu disertacije predmet istraživanja je bio usmeren na sintezu i karakterizaciju aktivnih, biorazgradivih materijala na bazi poli( $\epsilon$ -kaprolaktona) sa inkorporiranim ekstraktom žalfije. Sinteza materijala izvršena je u dve faze. Prvo su tehnikom elektropredenja dobijeni netransparentni uzorci bele boje, čije su strukture bile sačinjene od gusto raspoređenih, isprepletanih vlakana. U sledećoj fazi strukture elektropredenih vlakana su prevedene u strukture kontinualnih, kompaktnih filmova primenom kratkotrajnog termičkog tretmana na hidrauličnoj presi. Ovako dobijeni filmovi bili su tanki i transparentni, sa malim afinitetom prema vodi. Karakterizacija filmova ukazala je da je ekstrakt žalfije efikasno inkorporiran u matriksu polimera bez jakih hemijskih interakcija između konstituenata ekstrakta i matriksa. Tako usled odsustva jakih hemijskih interakcija inkorporacija nije uticala na termičku stabilnost niti na mehaničke karakteristike filmova. Sa druge strane, inkorporacija je olakšala difuziju vodene pare i arome kroz filmove. U pogledu funkcionalnih karakteristika, filmovi sa inkorporiranim ekstraktom su ispoljili sposobnost otpuštanja fenolnih jedinjenja pri direktnom kontaktu sa medijumima koji simuliraju prehrambene proizvode, naročito sa medijumom koji simulira proizvode lipofilnog karaktera. Pored toga, inkorporacijom ekstrakta u matriks polimera postignute su antioksidativna i antibakterijska funkcionalnost, određene kao sposobnost filmova da pri direktnom kontaktu neutrališu DPPH• slobodni radikal, odnosno da inhibiraju rast patogenih bakterija *S. aureus* i *E. coli*. Posmatrano sa ekološkog aspekta, važna karakteristika razvijenih filmova je podložnost potpunoj razgradnji u kompostu od strane prisutnih zemljišnih mikroorganizama, a koja može biti i ubrzana dodatkom bakterijske kulture *Pseudomonas aeruginosa* u kompost.

Treći deo istraživanja obuhvatio je sintezu i karakterizaciju aktivnih, potencijalno jestivih i biorazgradivih materijala na bazi zeina sa inkorporiranim ekstraktom žalfije. Nedostaci uočeni kod uzoraka na bazi zeina prevaziđeni su pripremom blendi zeina i želatina. Tako su predmet daljeg istraživanja ovog dela disertacije bili biopolimerni materijali na bazi blende proteina dobijeni tehnikama elektropredenja i izlivanja iz rastvora. Elektropredjenjem su dobijeni beli, netransparentni uzorci čije su strukture bile sačinjene od gusto raspoređenih, isprepletanih vlakana. Sa druge strane, izlivanjem iz rastvora dobijeni su transparentni uzorci sa strukturama kontinualnih i kompaktnih

filmova. Razlike u strukturi materijala na bazi blende proteina, koje potiču od primenjene tehnike za njihovo dobijanje, dovele su i do razlika u fizičko-hemijskim i funkcionalnim karakteristikama materijala. Generalno, karakterizacija elektropredenih vlakana i izlivenih filmova je ukazala na efikasnu inkorporaciju ekstrakta žalfije unutar matriksa proteina bez razdvajanja faza, a potencijalne interakcije između konstituenata ekstrakta i matriksa su bile slabog intenziteta. Ispitivanjem funkcionalnih karakteristika vlakana i filmova na bazi proteina sa inkorporiranim ekstraktom pokazano je da imaju sposobnost otpuštanja fenolnih jedinjenja i ruzmarinske kiseline pri direktnom kontaktu sa medijumima koji simuliraju prehrambene proizvode. Pored toga, inkorporacija ekstrakta je doprinela antioksidativnoj i antibakterijskoj funkcionalnosti vlakana i filmova u pogledu sposobnosti da pri direktnom kontaktu neutrališu DPPH• slobodni radikal, odnosno da inhibiraju rast patogenih bakterija *S. aureus* i *E. coli*. Posmatrano sa ekološkog aspekta, važna karakteristika razvijenih vlakana i filmova je podložnost potpunoj razgradnji u kompostu od strane prisutnih zemljišnih mikroorganizama tokom kratkog vremenskog perioda. U ovom pogledu, dodatak ukupnog proteinskog ekstrakta *Streptomyces* spp. sojeva u kompost nije imao značajan uticaj na razgradnju vlakana i filmova.

**Ključne reči:** inkorporacija, elektropredenje, izlivanje iz rastvora, vlakna, filmovi, poli( $\epsilon$ -kapolakton), zein, želatin, žalfija, aktivni ambalažni materijali za prehrambene proizvode

**Naučna oblast:** Tehnološko inženjerstvo

**Uža naučna oblast:** Nauka o konzervisanju i vrenju

**UDK:** 502.174.2:635.74(043.3)



# SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF ACTIVE FIBERS AND FILMS BASED ON POLY( $\epsilon$ -CAPROLACTONE) AND ZEIN

## ABSTRACT

The main aim of this doctoral dissertation was to develop active, biodegradable materials with a potential in food packaging applications. In this regard, the research comprised formulating, synthesis and characterization of various structures based on biodegradable polymers of different source of origin, i.e. synthetic (poly( $\epsilon$ -caprolactone)) and natural (zein) one. A sage extract was incorporated as an active constituent within the polymeric matrices in order to impart materials' functionality in preventing oxidation processes and bacterial growth. Therefore, a comprehensive investigation was carried out to evaluate the effect of the sage extract incorporation at different loading contents on physical, chemical and functional properties of the materials, as well as the materials' biodegradability.

Preparation and characterization of the sage extract (*Salvia officinalis* L.) were performed as the initial part of the research. The maceration technique was applied and the optimal extraction conditions (extraction medium, time of extraction and solid to solvent ratio) were determined with the aim to prepare the extract with a high content of total phenolic compounds. The analysis showed that the prepared extract is a good source of phenolic compounds and phenolic acids, with rosmarinic acid being quantitatively the most dominant one. In addition, the extract presented antioxidant and antibacterial activity in terms of DPPH<sup>•</sup> free radical scavenging ability, and inhibitory and bactericidal effects against the food-borne pathogens such as *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, respectively.

In the following part of the dissertation, the research was directed to synthesis and characterization of active, biodegradable poly( $\epsilon$ -caprolactone)-based materials loaded with the sage extract. The materials' synthesis was performed in two stages. Firstly, non-transparent, white-colored samples, structurally composed of densely and randomly oriented fibers, were produced employing the electrospinning technique. The obtained electrospun fibrous mats were packed into structures of continuous and compact films by means of the annealing treatment post-processing. The annealed films were thin and transparent with low water affinity. Characterization of the films indicated an efficient incorporation of the sage extract within the polymeric matrix with no chemical interactions between the extract compounds and the matrix. Due to the lack of the strong chemical interactions, the incorporation did not affect thermal stability neither mechanical properties of the films. On the other hand, water vapor and aroma diffusion through the films were facilitated by the extract incorporation. In terms of functional properties, the films loaded with the extract exhibited an ability to release phenolic compounds in direct contact with media simulating food products, primarily with the medium simulating lipophilic foods. In addition, the extract incorporation within the polymeric matrix contributed to the antioxidant and antibacterial functionality of the materials, determined as DPPH<sup>•</sup> free radicals scavenging and inhibition of the food-borne pathogens growth (*S. aureus* and *E. coli*) in direct contact with the films. In regard to an ecological aspect, a very important property of the developed films is their degradability in compost by soil microorganisms, which can be accelerated by addition of *Pseudomonas aeruginosa* bacterial culture to the compost.

The research within the third part of the dissertation was focused on synthesis and characterization of active, biodegradable, potentially edible, zein-based materials loaded with the sage extract. The properties of the zein-based samples were improved by blending zein with gelatine. In this way, biopolymer materials based on the proteins blend were developed employing the electrospinning and solvent casting techniques and further evaluated. The electrospun samples were white-colored and non-transparent, structurally composed of densely and randomly oriented fibers. On the other

hand, the samples obtained by the solvent casting technique were transparent, in structural forms of continuous and compact films. These structural differences between the proteins blend-based materials depending on the employed technique triggered differences in physico-chemical and functional properties of the materials. Generally, analysis of the electrospun fibers and casted films indicated an efficient incorporation of the sage extract within the proteinic matrix with no phase separations, while potential chemical interactions between the extract compounds and the matrix were weak. Evaluation of functional properties demonstrated an ability of the proteins-based fibers and films loaded with the extract to release phenolic compounds and rosmarinic acid in direct contact with media simulating food products. Furthermore, the extract incorporation within the proteinic matrix contributed to the antioxidant and antibacterial functionality of the materials, determined as DPPH• free radicals scavenging and inhibition of the food-borne pathogens growth (*S. aureus* and *E. coli*) in direct contact with the fibers and the films. In regard to an ecological aspect, a very important property of the developed fibers and films is their rapid degradability in compost by soil microorganisms. Addition of total proteinic extract of *Streptomyces* spp. strains to the compost did not have impact on the degradation process.

**Keywords:** incorporation, electrospinning, solvent casting, fibers, films, poly( $\epsilon$ -caprolactone), zein, gelatine, sage, active food packaging

**Scientific field:** Technological engineering

**Scientific subfield:** The science of food preservation and fermentation

**UDC:** 502.174.2:635.74(043.3)

## LISTA SKRAĆENICA

ABTS<sup>•+</sup> - 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)  
ATR - prigušena ukupna refleksija  
CFU - broj bakterija koje formiraju kolonije na podlozi  
DPPH<sup>•</sup> - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil  
DSC - diferencijalna skenirajuća kalorimetrija  
Fe(III)-TPTZ - kompleks feri-tripiridiltriazina  
FT-IR spektroskopija - infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom  
GAE - ekvivalenti galne kiseline  
HPLC - tečna hromatografija visokih performansi  
LDPE - polietilen niske gustine  
LP - propustljivost D-limonena  
LTR - stopa prolaska limonena kroz filmove  
MBK - minimalna baktericidna koncentracija  
MHA - Müeller Hinton agar  
MHB - Müeller Hinton bujon  
MIK - minimalna inhibitorna koncentracija  
n.d. - ispod limita detekcije  
OH<sup>•</sup> - hidroksil slobodni radikal  
PCL - poli( $\epsilon$ -kaprolakton); kontrolni uzorak filмова na bazi poli( $\epsilon$ -kaprolaktona)  
PCL-10E - film na bazi poli( $\epsilon$ -kaprolaktona) sa 10% inkorporiranog ekstrakta žalfije  
PCL-20E - film na bazi poli( $\epsilon$ -kaprolaktona) sa 20% inkorporiranog ekstrakta žalfije  
PCL-5E - film na bazi poli( $\epsilon$ -kaprolaktona) sa 5% inkorporiranog ekstrakta žalfije  
PE - polietilen  
PEO - poli(etilen-oksidi)  
PET - polietilen tereftalat  
PP - polipropilen  
PTFE - politetrafluoroetilen  
R - vrednost antibakterijske aktivnosti  
SEM - skenirajuća elektronska mikroskopija  
T - transparentnost  
TE - ekvivalenti Troloksa  
TGA - termogravimetrijska analiza  
T<sub>m</sub> - tačka topljenja  
TPC - sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja  
WVP - propustljivost vodene pare  
WVTR - stopa prolaska vodene pare kroz filmove  
X<sub>c</sub> - stepen kristaliničnosti  
ZG - formulacije na bazi zeina i želatina  
ZG-10Ef - film na bazi zeina i želatina sa 10% inkorporiranog ekstrakta žalfije  
ZG-10Ev - vlakna na bazi zeina i želatina sa 10% inkorporiranog ekstrakta žalfije  
ZG-5Ef - film na bazi zeina i želatina sa 5% inkorporiranog ekstrakta žalfije  
ZG-5Ev - vlakna na bazi zeina i želatina sa 5% inkorporiranog ekstrakta žalfije  
ZGf - kontrolni film na bazi zeina i želatina  
ZGv - kontrolna vlakna na bazi zeina i želatina  
 $\Delta H_m$  - entalpija topljenja  
 $\theta$  - kontaktni ugao između kapi vode i površine filмова

# SADRŽAJ

UVOD .....	- 1 -
1. TEORIJSKE OSNOVE.....	- 5 -
1.1. AMBALAŽA ZA PREHRAMBENE PROIZVODE.....	- 5 -
1.2. AKTIVNA PAKOVANJA .....	- 6 -
1.2.1. ANTIOKSIDATIVNA PAKOVANJA .....	- 8 -
1.2.2. ANTIMIKROBNA PAKOVANJA .....	- 11 -
1.3. TEHNIKE DOBIJANJA AKTIVNIH AMBALAŽNIH MATERIJALA .....	- 13 -
1.3.1. IZLIVANJE FILMOVA IZ RASTVORA .....	- 14 -
1.3.2. ELEKTROPREDENJE.....	- 16 -
1.4. POLIMERNI AMBALAŽNI MATERIJALI .....	- 19 -
1.4.1. POLI(E-KAPROLAKTON).....	- 22 -
1.4.2. PROTEINI.....	- 24 -
1.4.2.1. Zein .....	- 25 -
1.4.2.2. Želatin .....	- 26 -
1.5. AKTIVNE KOMPONENTE .....	- 27 -
1.5.1. BILJNI EKSTRAKTI.....	- 28 -
1.5.2. ŽALFIJA .....	- 29 -
1.5.3. PREGLED AKTIVNIH MATERIJALA NA BAZI BIORAZGRADIVIH POLIMERA I EKSTRAKATA BILJA.....	- 32 -
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	- 36 -
3. MATERIJAL I METODE.....	- 38 -
3.1. MATERIJAL .....	- 38 -
3.2. EKSTRAKT ŽALFIJE .....	- 40 -
3.2.1. PRIPREMA EKSTRAKTA ŽALFIJE .....	- 40 -
3.2.2. KARAKTERIZACIJA EKSTRAKTA.....	- 40 -
3.2.2.1. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja .....	- 40 -
3.2.2.2. Analiza fenolnih kiselina tečnom hromatografijom visokih performansi.....	- 41 -
3.2.2.3. Antioksidativna aktivnost.....	- 42 -
3.2.2.4. Antibakterijska aktivnost.....	- 43 -
3.3. FILMOVI NA BAZI POLI(ε-KAPROLAKTONA) I EKSTRAKTA ŽALFIJE .....	- 44 -
3.3.1. SINTEZA FILMOVA NA BAZI POLI(ε-KAPROLAKTONA) I EKSTRAKTA ŽALFIJE .....	- 44 -
3.3.2. KARAKTERIZACIJA FILMOVA NA BAZI POLI(ε-KAPROLAKTONA) I EKSTRAKTA ŽALFIJE .....	- 45 -
3.3.2.1. Morfološke karakteristike.....	- 45 -

3.3.2.2. Debljina filmova .....	- 46 -
3.3.2.3. Transparentnost.....	- 46 -
3.3.2.4. Kontaktni ugao sa vodom.....	- 46 -
3.3.2.5. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom.....	- 46 -
3.3.2.6. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija .....	- 46 -
3.3.2.7. Termogravimetrijska analiza .....	- 47 -
3.3.2.8. Mehaničke karakteristike .....	- 47 -
3.3.2.9. Barijerna svojstva .....	- 47 -
3.3.2.9.1. Propustljivost vodene pare.....	- 47 -
3.3.2.9.2. Propustljivost D-limonena.....	- 47 -
3.3.2.10. Otpuštanje aktivnih jedinjenja iz filmova u simulante hrane .....	- 48 -
3.3.2.11. Antioksidativna aktivnost.....	- 48 -
3.3.2.12. Antibakterijska aktivnost.....	- 48 -
3.3.2.13. Razgradnja u model sistemima komposta .....	- 49 -
3.4. VLAKNA I FILMOVI NA BAZI ZEINA I EKSTRAKTA ŽALFIJE.....	- 50 -
3.4.1. OPTIMIZACIJA SINTEZE VLAKANA I FILMOVA NA BAZI ZEINA I EKSTRAKTA ŽALFIJE .....	- 50 -
3.4.1.1. Sinteza vlakana i filmova na bazi zeina i ekstrakta žalfije.....	- 50 -
3.4.1.2. Sinteza vlakana i filmova na bazi zeina, poli(etilen-oksida) i ekstrakta žalfije ...	- 50 -
3.4.1.3. Sinteza vlakana i filmova na bazi zeina, želatina i ekstrakta žalfije.....	- 51 -
3.4.2. KARAKTERIZACIJA VLAKANA I FILMOVA NA BAZI ZEINA I EKSTRAKTA ŽALFIJE .....	- 52 -
3.4.2.1. Morfološke karakteristike.....	- 52 -
3.4.2.2. Debljina materijala.....	- 52 -
3.4.2.3. Transparentnost.....	- 52 -
3.4.2.4. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom.....	- 53 -
3.4.2.5. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija .....	- 53 -
3.4.2.6. Termogravimetrijska analiza .....	- 53 -
3.4.2.7. Otpuštanje aktivnih jedinjenja iz vlakana i filmova u simulante hrane .....	- 53 -
3.4.2.8. Antioksidativna aktivnost.....	- 53 -
3.4.2.9. Antibakterijska aktivnost.....	- 53 -
3.4.2.9.1. Antibakterijska svojstva vlakana i filmova .....	- 53 -
3.4.2.9.2. Sadržaj acetat-jona u suspenziji .....	- 54 -
3.4.2.10. Razgradnja u model sistemima komposta .....	- 54 -
3.5. STATISTIČKA ANALIZA .....	- 56 -
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	- 57 -
4.1. EKSTRAKT ŽALFIJE .....	- 57 -

4.1.1. OPTIMIZACIJA PROCESA EKSTRAKCIJE .....	- 57 -
4.1.2. KARAKTERIZACIJA EKSTRAKTA .....	- 59 -
4.1.2.1. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja .....	- 59 -
4.1.2.2. Analiza fenolnih kiselina tečnom hromatografijom visokih performansi.....	- 60 -
4.1.2.3. Antioksidativna aktivnost.....	- 61 -
4.1.2.4. Antibakterijska aktivnost.....	- 62 -
4.2. FILMOVI NA BAZI POLI( $\epsilon$ -KAPROLAKTONA) I EKSTRAKTA ŽALFIJE .....	- 64 -
4.2.1. KARAKTERIZACIJA FILMOVA NA BAZI POLI( $\epsilon$ -KAPROLAKTONA) I EKSTRAKTA ŽALFIJE .....	- 65 -
4.2.1.1. Morfološke karakteristike.....	- 65 -
4.2.1.2. Debljina filmova .....	- 69 -
4.2.1.3. Transparentnost.....	- 69 -
4.2.1.4. Kontaktni ugao sa vodom.....	- 70 -
4.2.1.5. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom .....	- 70 -
4.2.1.6. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija .....	- 72 -
4.2.1.7. Termogravimetrijska analiza .....	- 73 -
4.2.1.8. Mehaničke karakteristike .....	- 75 -
4.2.1.9. Barijerna svojstva .....	- 76 -
4.2.1.9.1. Propustljivost vodene pare.....	- 76 -
4.2.1.9.2. Propustljivost D-limonena.....	- 77 -
4.2.1.10. Otpuštanje aktivnih jedinjenja iz filmova u simulante hrane .....	- 78 -
4.2.1.11. Antioksidativna aktivnost.....	- 79 -
4.2.1.12. Antibakterijska aktivnost.....	- 79 -
4.2.1.13. Razgradnja u model sistemu komposta.....	- 80 -
4.3. VLAKNA I FILMOVI NA BAZI ZEINA I EKSTRAKTA ŽALFIJE .....	- 83 -
4.3.1. OPTIMIZACIJA SINTEZE VLAKANA I FILMOVA NA BAZI ZEINA I EKSTRAKTA ŽALFIJE .....	- 83 -
4.3.1.1. Sinteza vlakana i filmova na bazi zeina i ekstrakta žalfije.....	- 83 -
4.3.1.2. Sinteza vlakana i filmova na bazi zeina, poli(etilen-oksida) i ekstrakta žalfije ...	- 83 -
4.3.1.3. Sinteza vlakana i filmova na bazi zeina, želatina i ekstrakta žalfije.....	- 84 -
4.3.2. KARAKTERIZACIJA VLAKANA I FILMOVA NA BAZI PROTEINA I EKSTRAKTA ŽALFIJE .....	- 86 -
4.3.2.1. Morfološke karakteristike.....	- 86 -
4.3.2.2. Debljina materijala.....	- 87 -
4.3.2.3. Transparentnost.....	- 88 -
4.3.2.4. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom.....	- 88 -
4.3.2.5. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija .....	- 90 -

4.3.2.6. Termogravimetrijska analiza .....	- 91 -
4.3.2.7. Otpuštanje aktivnih jedinjenja iz vlakana i filmova u simulante hrane .....	- 94 -
4.3.2.8. Antioksidativna aktivnost.....	- 95 -
4.3.2.9. Antibakterijska aktivnost.....	- 96 -
4.3.2.10. Razgradnja u model sistemu komposta.....	- 98 -
5. ZAKLJUČAK .....	- 102 -
6. LITERATURA: .....	- 107 -
7. PRILOZI.....	- 128 -
PRILOG 1. Analiza fenolnih kiselina tečnom hromatografijom visokih performansi .....	- 128 -
PRILOG 2: Analiza acetat-jona u suspenziji nakon inkubacije sa vlaknima i filmovima na bazi zeina i želatina .....	- 130 -
PRILOG 3: Optimizacija procesa ekstrakcije.....	- 131 -
BIOGRAFIJA AUTORA .....	- 135 -
Izjava o autorstvu.....	- 136 -
Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada.....	- 137 -
Izjava o korišćenju .....	- 138 -





## UVOD

Ambalaža je veoma važan i neizostavan pratilac prehrambenih proizvoda čiji se značaj ogleda u njenoj višestrukoj funkciji. Primarno ambalaža ima ulogu u zaštiti i očuvanju proizvoda od dejstva raznih fizičkih, hemijskih i bioloških faktora. Pored toga, ambalaža ima i skladišno-transportnu, prodajnu, upotrebnu i ekološku funkciju. Ipak, ovakav koncept ambalaže se danas može smatrati tradicionalnim, a njena uloga pasivnom. Savremen način života, globalizacija tržišta, novi trendovi i razvoj prehrambene industrije pokrenuli su inovacije u sektoru ambalaže i razvoj novih koncepata i tehnologija u pogledu funkcija, dizajna i materijala. Jedan od inovativnih koncepata predstavlja aktivno pakovanje, razvijeno kao odgovor na trend usmeren ka proizvodnji visokokvalitetne, minimalno prerađene hrane bez dodatih konzervanasa, a istovremeno bezbedne i sa prihvatljivim rokom trajanja. Tako pored osnovnih funkcija koje ambalaža treba da ima koncept aktivnog pakovanja podrazumeva i inovativnu funkciju koja se ogleda u inkorporaciji aktivnih komponenti u ambalažni materijal i pozitivnim interakcijama sa proizvodom ili atmosferom iznad upakovanog proizvoda u cilju očuvanja kvaliteta i bezbednosti i produženja trajnosti proizvoda (Salmieri i Lacroix, 2006; Dainelli et al., 2008; Lazić i Novaković, 2010; Restuccia et al., 2010; Han, 2014; Petrović i Rajić, 2016; Yildirim et al., 2018; Kalpana et al., 2019).

Funkcija aktivne ambalaže i pakovanja prepoznata je Regulativom Evropske komisije o aktivnim materijalima i predmetima koji dolaze u dodir sa hranom prema kojoj se kao aktivni materijali definišu svi oni materijali namenjeni da produže rok trajanja proizvoda, očuvaju ili poboljšaju stanje upakovanog proizvoda. Njihov dizajn uključuje inkorporaciju komponenti koje će otpustiti ili apsorbovati supstance u ili iz upakovanog proizvoda ili atmosfere proizvoda (Regulativa Evropske komisije (EU) 450/2009). Istraživanja u ovoj oblasti su usmerena na razvoj inovativnih, ekološki prihvatljivih aktivnih ambalažnih materijala namenjenih za pakovanje prehrambenih proizvoda. Primena ovakvih materijala bi omogućila očuvanje, ili čak poboljšanje, bezbednosti i kvaliteta, i produženje trajnosti upakovanog proizvoda, rezultujući smanjenjem otpada nastalog od hrane, a time i ekoloških i ekonomskih problema. Pored toga, razvoj aktivnih materijala usmeren je na korišćenje aktivnih komponenti prirodnog porekla, kao i ekološki prihvatljivih, odnosno biorazgradivih polimera, sve sa ciljem smanjenja gubitaka hrane i deponovanja ambalažnog otpada u prirodi, odnosno smanjenja pritiska na životnu sredinu i pružanja doprinosa održivom razvoju (Vanderroost et al., 2014; Licciardello, 2017; Vilela et al., 2018).

Razni aktivni materijali sa širokim spektrom inkorporiranih aktivnih komponenti se razvijaju u zavisnosti od parametra kvaliteta proizvoda koji je potrebno očuvati (Vilela et al., 2018). Ovde treba imati u vidu da vodeće uzroke kvarenja prehrambenih proizvoda čine reakcije oksidacije i rast mikroorganizama što narušava ukus, aromu, boju i teksturu, smanjuje nutritivnu vrednost, kvalitet i trajnost proizvoda, a predstavlja i rizik po zdravlje potrošača (Tian et al., 2013; Gómez-Estaca et al., 2014; Realini i Marcos, 2014). Iz tog razloga aktivno pakovanje hrane koje sadrži komponente sa antioksidativnom i/ili antimikrobnom aktivnošću privlači pažnju kao inovativan pristup za prevenciju reakcija oksidacije, kontrolu i inhibiciju rasta mikroorganizama (Sung et al., 2013; Han et al., 2018; Vilela et al., 2018).

Razvoj aktivnih ambalažnih materijala predstavlja veoma dinamičnu oblast koja podrazumeva različite pristupe. Jedan od pristupa sinteze antioksidativnih i/ili antimikrobnih materijala zasniva se na direktnoj inkorporaciji isparljivih i neisparljivih aktivnih komponenti unutar matriksa polimera, dok se mehanizam njihovog delovanja zasniva na otpuštanju inkorporiranih komponenti (Dainelli et al., 2008; Tian et al., 2013; Gómez-Estaca et al., 2014;

Khaneghah et al., 2018). Na ovaj način formira se fizička barijera između aktivnih komponenti i okolne sredine što predstavlja efikasan pristup eliminacije faktora koji imaju negativan uticaj na efikasnost delovanja aktivnih komponenti. Naime, aktivne supstance, naročito one koje su ekstrahovane iz prirodnih izvora, su hemijski nestabilne, osetljive na svetlost, temperaturu, kiseonik, vodu i podložne su interakcijama sa konstituentima proizvoda, što može rezultovati njihovom degradacijom i inaktivacijom. Tako se inkorporacijom aktivnih komponenti u matriks polimera mogu postići brojne prednosti, kao što su stabilizacija i očuvanje funkcionalnosti tokom dužeg perioda, sprečavanje interakcija sa konstituentima proizvoda, produženo otpuštanje aktivnih komponenti iz matriksa ka površini proizvoda, povećanje efikasnosti delovanja i eliminisanje uticaja na teksturu i organoleptičke karakteristike proizvoda (Nedovic et al., 2011; Sung et al., 2013; Belščak-Cvitanović et al., 2015; Đorđević et al., 2015; Yildirim et al., 2018).

Izbor tehnike za dobijanje aktivnih ambalažnih materijala predstavlja jedan od ključnih faktora pri dizajnu i razvoju materijala zbog direktnog uticaja na njihova finalna svojstva. Jedna od najčešće primenjivanih tehnika na laboratorijskom nivou je izlivanje filmova iz rastvora (engl. *solvent casting*). Ovo je jednostavna tehnika koja se zasniva na sušenju filmogenog rastvora, a izvodi se na umerenim temperaturama bez primene pritiska što je veoma važno posmatrano sa aspekta očuvanja aktivnih komponenti. Pored laboratorijskog nivoa, nadogradnjom ove tehnike moguće je proizvesti filmove većih dimenzija tokom kraćeg vremena (de Moraes et al., 2013; Sung et al., 2013; Etxabide et al., 2018). Još jedna od tehnika koja privlači sve veću pažnju pri razvoju aktivnih ambalažnih materijala je elektropredenje (engl. *electrospinning*). U osnovi ove tehnike je elektro-hidrodinamički proces koji omogućava proizvodnju kontinualnih i uniformnih vlakana čiji prečnici mogu biti u nano, sub-mikro ili mikro opsegu. Princip tehnike se zasniva na ekstruziji rastvora polimera i njegovom izvlačenju u tanke niti pod dejstvom električnih sila. U ovom pogledu, elektropredeni aktivni materijali predstavljaju strukture sačinjene od mreže polimernih vlakana sa inkorporiranim aktivnim komponentama (Busolo et al., 2017; Echegoyen et al., 2017). Prednosti primene ove tehnike za razvoj aktivnih ambalažnih materijala za prehrambene proizvode su višestruke, a potiču od karakteristika procesa, kao i strukturnih i funkcionalnih karakteristika vlakana. Proces karakteriše jednostavnost, kontinualnost, ekonomičnost, kao i blagi procesni uslovi, odnosno to što ne zahteva primenu visokih temperatura zbog čega omogućava efikasnu inkorporaciju osetljivih aktivnih komponenti uz poboljšanje njihove stabilnosti. Strukture elektropredenih vlakana karakteriše veliki odnos površine prema zapremini, mogućnost modifikovanja dimenzija i oblika vlakana, kao i stepena poroznosti mreže vlakana. Pored navedenih karakteristika, važno je napomenuti da je tehnika elektropredenja fleksibilna, pa razvoj opreme i procesa omogućavaju masovnu proizvodnju vlakana (Bhardwaj i Kundu, 2010; Bhushani i Anandharamakrishnan, 2014; Echegoyen et al., 2017).

Pri formulisanju i razvoju aktivnih ambalažnih materijala posebnu pažnju potrebno je posvetiti izboru materijala. Polimerni materijali se zbog niza zadovoljavajućih karakteristika najčešće koriste u proizvodnji ambalaže za pakovanje prehrambenih proizvoda (Souza i Fernando, 2016). Rast proizvodnje polimernih ambalažnih materijala nadmašio je ostale materijale, ali i usmerio globalni trend ka proizvodnji plastičnih ambalažnih jedinica za jednokratnu ili kratkoročnu upotrebu. U ovom pogledu, masovno korišćenje ambalaže proizvedene od polimernih materijala dovelo je do ekoloških problema u pogledu njenog odlaganja. Naime, milioni tona odbačene plastične ambalaže završe na deponijama, rasuti u prirodi svake godine. Pri tom, ove ambalažne materijale karakteriše veoma spora razgradnja koja može zahtevati i više stotina godina, a zbog ostataka organske materije od hrane recikliranje plastične ambalaže nije uvek moguće što rezultuje kontaminacijom životne sredine. Tako je ovaj problem pokrenuo inovacije i trend ka korišćenju biorazgradivih ambalažnih materijala, naročito u slučaju ambalaže za jednokratnu i kratkoročnu upotrebu (Rhim et al., 2013; Souza i Fernando, 2016; Cherpinski et al., 2018a; UNEP 2018; Al-Tayyar et al., 2020). Jedan od biorazgradivih polimera sa potencijalom primene kao matriksa za inkorporaciju aktivnih komponenti i razvoj aktivnih ambalažnih materijala je poli( $\epsilon$ -kaprolakton)

(PCL). Ovaj polimer je alifatični poliestar koji se dobija hemijskom sintezom, semi-kristalan je i hidrofoban. Karakteristike kao što su komercijalna dostupnost, pristupačnost, laka obradivost, termoplastičnost, fleksibilnost, kontrola difuzije i biorazgradivost, čine ovaj polimer veoma interesantnim za razvoj novih ambalažnih materijala (Salmieri i Lacroix, 2006; Labet i Thielemans, 2009; Woodruff i Hutmacher, 2010; Dash i Konkimalla, 2012). Težnja ka održivosti i korišćenju ekološki prihvatljivih ambalažnih materijala usmerila je pažnju i ka biopolimerima, odnosno polimerima koji se dobijaju iz obnovljivih izvora i koji su biorazgradivi. S tim u vezi interesantan pristup pri razvoju aktivnih, biorazgradivih ambalažnih materijala predstavlja razvoj jestivih materijala dobijenih korišćenjem polimera ekstrahovanih iz biomase, pri čemu materijali na bazi proteina privlače veliku pažnju (Hanani et al., 2012; Lazić i Popović, 2015; Mellinas et al., 2016; Calva-Estrada et al., 2019). Zein, biljni protein iz grupe prolamina koji se dobija iz sporednih proizvoda prerade kukuruza, je jedan od biopolimera sa perspektivom primene kao matriksa za inkorporaciju aktivnih komponenti i razvoj aktivnih ambalažnih materijala. Važna karakteristika zeina je kompatibilnost sa širokim spektrom aktivnih komponenti, ali i drugim polimerima što omogućava dobijanje biorazgradivih višekomponentnih materijala. Tako se pripremom blendi proteina mogu kombinovati karakteristike više proteina i na taj način dobiti materijali sa boljim karakteristikama u odnosu na materijale na bazi samo jednog proteina (Lawton, 2002; Corradini et al., 2014; Yemenicioğlu, 2016; Calva-Estrada et al., 2019). Interesantna blenda na bazi proteina može se dobiti kombinovanjem zeina i želatina kao biopolimera hidrofobne i hidrofilne prirode. Želatin je protein koji se dobija iz pratećih proizvoda prerade mesa, a njegova svojstva pružaju mogućnosti za primenu u sintezi aktivnih ambalažnih materijala (Hanani et al., 2012; Liu et al., 2019; Xia et al., 2019). Značaj razvoja materijala na bazi ova dva proteina ogleda se i u iskorišćenju sporednih proizvoda prehrambene industrije.

Još jedan važan segment pri formulaciji i sintezi aktivnih ambalažnih materijala predstavlja izbor aktivne komponente koja će biti inkorporirana unutar matriksa polimera sa ciljem postizanja funkcionalnosti materijala u pogledu neutralizacije slobodnih radikala i/ili kontrole i inhibicije rasta mikroorganizama. Fokus je usmeren na korišćenje aktivnih komponenti prirodnog porekla, jer se smatraju bezbednijim i manje toksičnim u odnosu na sintetičke aditive koji se uobičajeno koriste za produženje trajnosti prehrambenih proizvoda. U ovom pogledu, ekstrakti lekovitih i začinskih biljaka prepoznati su kao prirodni izvori jedinjenja sa antioksidativnom i/ili antimikrobnom aktivnošću. Dodatne prednosti korišćenja prirodnih ekstrakata ogledaju se u sinergističkom dejstvu aktivnih komponenti, bioaktivnosti i nutraceutičkom potencijalu (Carocho et al., 2014; Carocho et al., 2015; Valdés et al., 2015; Yemenicioğlu, 2016; Majid et al., 2018). Jedan od prirodnih ekstrakata bogatih fenolnim jedinjenjima sa antioksidativnom, antibakterijskom i antifungalnom aktivnošću je ekstrakt žalfije (*Salvia officinalis* L.) (Veličković et al., 2003; Shan et al., 2007; Roby et al., 2013; Martins et al., 2015). Iz tog razloga, ekstrakt žalfije se može odabrati kao adekvatan model-funkcionalni konstituent za razvoj aktivnih ambalažnih materijala.

Tako je predmet istraživanja u okviru ove doktorske disertacije formulisanje aktivnih, biorazgradivih materijala polazeći od pripreme i karakterizacije ekstrakta žalfije, preko njegove inkorporacije u matriks polimera različitog porekla i strukture, do detaljne analize uticaja inkorporacije ekstrakta na svojstva sintetisanih materijala. U ovom pogledu, naučni doprinos disertacije ogleda se u:

- razumevanju fenomena ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz biljnog materijala kroz ispitivanje uticaja procesnih uslova na prinos fenolnih jedinjenja;
- karakterizaciji ekstrakta žalfije u pogledu sadržaja fenolnih jedinjenja, antioksidativne i antibakterijske aktivnosti i razumevanju mehanizma antioksidativnog i antibakterijskog delovanja ekstrakta;
- razumevanju fenomena elektropredenja vlakana kroz ispitivanje uticaja ekstrakta koji sadrži fenolna jedinjenja na struktuiranje polimernih vlakana na bazi poli( $\epsilon$ -kapolaktona), kao i u

razumevanju termičkog tretmana vlakana sa inkorporiranim ekstraktom i struktuiranja polimernih filmova;

- razumevanju fenomena elektropredenja vlakana i izlivanja filmova iz rastvora kroz ispitivanje uticaja ekstrakta koji sadrži fenolna jedinjenja na struktuiranje biopolimernih vlakana i filmova na bazi zeina, kao i kroz poboljšanje svojstava vlakana i filmova na bazi zeina kroz pripremu blende zeina sa drugim polimerima;
- ispitivanju složenih interakcija u višekomponentnim sistemima i to poli( $\epsilon$ -kaprolakton)-fenolna jedinjenja i zein-želatin-glicerol-fenolna jedinjenja, zatim razumevanju uticaja prirode i strukture polimernog matriksa, kao i inkorporacije ekstrakta koji sadrži fenolna jedinjenja u matriks na fizička, hemijska i funkcionalna svojstva sintetisanih vlakana i filmova, kao i na njihovu podložnost biorazgradnji.

Konačno, aplikativni značaj ove doktorske disertacije i razvijenih aktivnih, biorazgradivih materijala ogleda se u mogućnosti njihove primene kao ambalažnih materijala za prehrambene proizvode.

# 1. TEORIJSKE OSNOVE

## 1.1. AMBALAŽA ZA PREHRAMBENE PROIZVODE

Pakovanje prehrambenih proizvoda predstavlja fazu u procesu proizvodnje koja ima za cilj očuvanje proizvoda do upotrebe. U ovom pogledu ambalaža je važan i neizostavan pratilac prehrambenih proizvoda. Značaj ambalaže ogleda se kroz njenu višestruku funkciju:

- **Zaštitna.** Primarna funkcija ambalaže je u zaštiti upakovanog proizvoda tokom rukovanja, transporta, distribucije i skladištenja od dejstva raznih faktora, kao što su: fizički (mehanička oštećenja usled pritiska, vibracija, udara), hemijski (svetlost, vlaga, gasovi) i biološki (mikroorganizmi, glodari, insekti). U ovom pogledu, ambalaža predstavlja barijeru između proizvoda i njegovog okruženja sa ciljem očuvanja integriteta, kvaliteta i bezbednosti proizvoda.
- **Skladišno-transportna.** Ambalaža treba da omogući očuvanje oblika i količine proizvoda, bez gubitka sadržaja pri mehaničkom naprezanju, opterećenju i atmosferskim uticajima tokom transporta, skladištenja i manipulacije.
- **Prodajna.** Važna uloga ambalaže ogleda se i u promociji i marketingu upakovanog proizvoda. Tako su izgled i dizajn ambalaže veoma važni za plasman i prodaju proizvoda. Optimizacijom oblika i veličine ambalaža treba da omogući povećanje opsega prodaje, racionalizaciju i zadovoljenje različitih potreba potrošača, npr. u pogledu količine proizvoda, čime se indirektno doprinosi smanjenju otpada. Kroz deklarisanje upakovanog proizvoda ambalaža ostvaruje i informativnu funkciju pružajući informacije potrošaču o proizvođaču, sastavu i nutritivnoj vrednosti, uslovima skladištenja i pripreme, roku trajanja, kao i potencijalnim rizicima i zdravstvenim benefitima proizvoda.
- **Upotrebna.** Ambalaža treba da bude pogodna za upotrebu, kao i da omogući lagodnu upotrebu proizvoda. Ova funkcija podrazumeva obezbeđivanje hermetičnosti, jednostavnost otvaranja i zatvaranja, smanjenje rasipanja sadržaja i količine sadržaja koji zaostaje u ambalaži.
- **Ekološka.** Težnja ka zaštiti životne sredine i održivom razvoju ističu važnost ekološke funkcije ambalaže. S tim u vezi, važan je ekološki status celog životnog ciklusa ambalaže, od izvora i procesa dobijanja sirovina, preko proizvodnje, upotrebe i odbacivanja ambalaže, kao i pronalaženja rešenja za smanjenje količine ambalažnog otpada (npr. ponovna upotreba, reciklaža, kompostiranje, upotreba biorazgradivih materijala i jestive ambalaže).

Preduslov primene ambalaže za prehrambene proizvode predstavlja njena higijenska i zdravstvena ispravnost. Pored toga, u zavisnosti od namene, ambalaža treba da ima odgovarajuće dimenzione, strukturne, fizičke, mehaničke, hemijske i barijerne karakteristike. Posmatrano sa aspekta bezbednosti, glavni zahtev u pogledu ambalaže za pakovanje prehrambenih proizvoda predstavlja inertnost, koja podrazumeva minimum interakcija između ambalaže i proizvoda. Međutim, ovakav koncept danas se smatra tradicionalnim, a uloga ambalaže pasivnom. Razvoj prehrambene industrije i unapređenje tehnologija u cilju poboljšanja kvaliteta i produženja trajnosti proizvoda, a time i smanjenja otpada nastalog od hrane i povećanja profitabilnosti doveli su i do

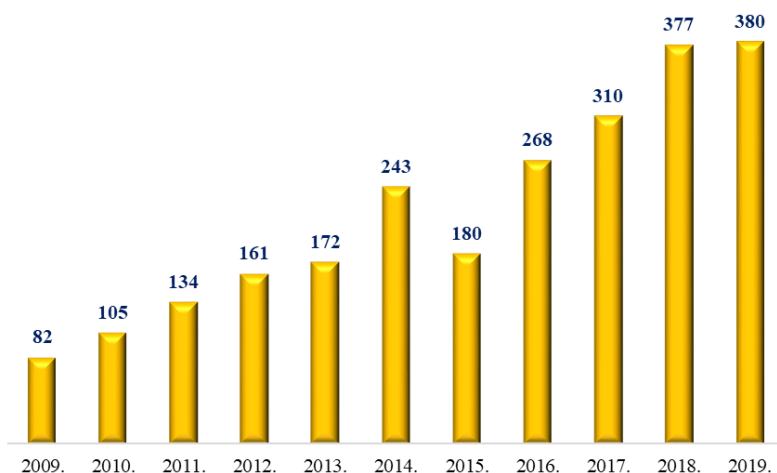
razvoja novih tehnologija i uslova pakovanja. Kroz ovaj razvoj funkcije ambalaže su se takođe razvijale i postajale sve složenije (Dainelli et al., 2008; Lazić i Novaković, 2010; Restuccia et al., 2010; Biji et al., 2015; Lazić i Popović, 2015; Petrović i Rajić, 2016; Kalpana et al., 2019; Al-Tayyar et al., 2020).

## 1.2. AKTIVNA PAKOVANJA

Savremen način života, novi trendovi u prehrambenoj industriji i globalizacija tržišta postavili su izazove pred sektor ambalaže i pakovanja hrane koji su pokrenuli inovacije i razvoj novih koncepata u pogledu ambalažnih materijala, dizajna i funkcija ambalaže. Jedan od inovativnih koncepata predstavlja aktivno pakovanje, razvijeno kao odgovor na trend usmeren ka proizvodnji visokokvalitetne, minimalno prerađene hrane bez dodatih konzervanasa, a istovremeno bezbedne i sa prihvatljivim rokom trajanja. Pored osnovnih, gore opisanih funkcija, koje ambalaža treba da ima koncept aktivnog pakovanja podrazumeva i inovativnu, aktivnu funkciju koja se zasniva na pozitivnim interakcijama ambalaže sa upakovanim proizvodom ili atmosferom oko proizvoda (Dainelli et al., 2008; Han, 2014; Vanderroost et al., 2014; Yildirim et al., 2018; Alehosseini et al., 2019). Ova funkcija definisana je Regulativom Evropske komisije o aktivnim materijalima i predmetima koji dolaze u dodir sa hranom prema kojoj se kao aktivni materijali definišu svi oni materijali namenjeni da produže rok trajanja proizvoda, očuvaju ili poboljšaju stanje upakovanog proizvoda. Njihov dizajn uključuje inkorporaciju komponenti koje će otpustiti ili apsorbirati supstance u ili iz upakovanog proizvoda ili atmosfere oko proizvoda (Regulativa Evropske komisije (EU) 450/2009).

Aktivna ambalaža i pakovanja su se prvi put pojavili u Japanu sredinom 1970-ih odakle su se sredinom 1990-ih godina proširili u Evropu i SAD. Uprkos velikoj popularnosti koju su dostigli na tržištu Japana, njihova zastupljenost na evropskom tržištu je znatno manja i još uvek je pod okriljem sektora za istraživanje i razvoj (Restuccia et al., 2010; Vilela et al., 2018). Vrednost globalnog tržišta aktivne ambalaže i pakovanja za 2019. godinu iznosila je 20,386 milijardi \$. Projekcije ukazuju da će vrednost tržišta rasti u narednim godinama i da će 2025. godine dostići vrednost od 30,145 milijardi \$ (Research and Markets, 2020).

Razvoj aktivnih ambalažnih materijala za pakovanje prehrambenih proizvoda predstavlja veoma aktuelnu i dinamičnu oblast istraživanja, što se može primetiti i na ilustrativnom prikazu broja publikovanih radova u ovoj oblasti za period 2009-2019 godine, prema podacima preuzetim iz *Scopus* baze (Slika 1.1.).



**Slika 1.1.** Broj publikacija u periodu 2009-2019 godine u oblasti aktivnih ambalažnih materijala namenjenih za prehrambene proizvode (izvor: *Scopus* baza podataka; ključni termin: *active food packaging*)

Ova istraživanja su usmerena ka razvoju inovativnih, ekoloških, ekonomičnih i komercijalno prihvatljivih ambalažnih materijala čijom primenom bi se omogućilo očuvanje, ili čak poboljšanje, bezbednosti i kvaliteta, i produženje trajnosti upakovanog proizvoda, rezultujući smanjenjem otpada od hrane, a time i ekoloških i ekonomskih problema. Dizajn aktivnih materijala podrazumeva inkorporaciju aktivnih komponenti u elemente koji čine deo ambalaže (npr. vrećice, nalepnice, poklopci); površinsku modifikaciju materijala ili pak direktnu inkorporaciju aktivnih komponenti unutar strukture materijala (Tian et al., 2013; Han et al., 2018; Vilela et al., 2018). Tako su različite vrste aktivnih materijala sa raznovrsnim inkorporiranim aktivnim komponentama razvijene u zavisnosti od parametra kvaliteta proizvoda koji je potrebno očuvati. Prema mehanizmu delovanja aktivni ambalažni materijali mogu se podeliti u dve kategorije i to:

- **apsorbere** - mehanizam delovanja se zasniva na apsorpciji nepoželjnih supstanci iz proizvoda ili njegove atmosfere (npr. kiseonik, vlaga, etilen, aroma);
- **emitere** - mehanizam delovanja se zasniva na otpuštanju aktivnih supstanci u proizvod ili njegovu atmosferu (npr. CO<sub>2</sub>, etanol, aroma, jedinjenja sa antioksidativnom i/ili antimikrobnom aktivnošću) (Yildirim et al., 2018).

Razvoj aktivne ambalaže usmeren je na korišćenje aktivnih komponenti prirodnog porekla, kao i ekološki prihvatljivih materijala uz efikasno korišćenje njihovih izvora, sve sa ciljem smanjenja gubitaka hrane i deponovanja ambalažnog otpada, odnosno smanjenja pritiska na životnu sredinu i pružanja doprinosa održivom razvoju (Vanderroost et al., 2014; Vilela et al., 2018).

Pregled aktivnih ambalažnih materijala razvijenih sa ciljem da produže trajnost prehrambenih proizvoda, mehanizam njihovog delovanja i primeri inkorporiranih aktivnih komponenti dati su u Tabeli 1.1. (Suppakul et al., 2003; Ozdemir i Floros, 2004; Vilela et al., 2018; Yildirim et al., 2018).

**Tabela 1.1.** Primeri aktivnih ambalažnih materijala

Vrsta aktivnog materijala	Mehanizam delovanja i svrha	Aktivne komponente
<b>Aktivni materijali čiji se mehanizam delovanja zasniva na apsorpciji nepoželjnih supstanci</b>		
apsorberi kiseonika	apsorpcija kiseonika u cilju prevencije reakcija oksidacije, degradacije nutrijenata, organoleptičkih promena, potamnivanja i rasta aerobnih mikroorganizama	gvožđe, paladijum, askorbinska kiselina, galna kiselina, nezasićene masne kiseline, enzimi
apsorberi vlage	apsorpcija vlage u cilju očuvanja teksture proizvoda, inhibicije rasta mikroorganizama i sprečavanja kondenzacije	silika gel, gline, kalcijum oksid
apsorberi arome	apsorpcija aromatičnih jedinjenja u cilju uklanjanja nepoželjnih mirisa	natrijum hidrogen karbonat, aktivni ugalj
apsorberi etilena	uklanjanje etilena iz atmosfere upakovanog proizvoda u cilju usporavanja procesa „starenja“, odnosno prevencije narušavanja teksture i degradacije	kalijum permanganat, minerali na bazi zeolita, nanočestice TiO <sub>2</sub>
<b>Aktivni materijali čiji se mehanizam delovanja zasniva na otpuštanju aktivnih supstanci</b>		
emiteri CO <sub>2</sub>	otpuštanje CO <sub>2</sub> u cilju smanjenja respiracije proizvoda i inhibicije rasta mikroorganizama	natrijum bikarbonat, askorbinska kiselina, limunska kiselina
emiteri etanola	otpuštanje etanola u atmosferu upakovanog proizvoda u cilju inhibicije rasta mikroorganizama	inkapsulisani etanol
emiteri arome	otpuštanje arome u cilju nadoknađivanja izgubljene ili pojačavanja postojeće arome	razne prehrambene arome
emiteri antimikrobnih komponenti	otpuštanje jedinjenja sa antimikrobnom aktivnošću u cilju kontrole ili inhibicije rasta mikroorganizama	organske kiseline i njihove soli, enzimi, bakteriocini, etarska ulja, ekstrakti, metali
emiteri antioksidativnih komponenti	otpuštanje jedinjenja sa antioksidativnom aktivnošću u cilju prevencije oksidacije	askorbinska kiselina, tokoferoli, fenolna jedinjenja, biljni ekstrakti, etarska ulja

U sledećim poglavljima dat je detaljniji uvid u aktivna pakovanja čija se funkcionalnost ogleda u sprečavanju oksidacije i inhibiciji rasta mikroorganizama sa ciljem očuvanja kvaliteta i bezbednosti, odnosno produženja trajnosti prehrambenih proizvoda.

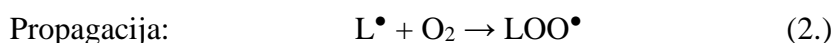
### 1.2.1. ANTIOKSIDATIVNA PAKOVANJA

Lipidi su veoma važni sastojci hrane koji utiču na njen kvalitet u pogledu nutritivnog (npr. esencijalne masne kiseline i liposolubilni vitamini), zdravstvenog (npr. omega-3 masne kiseline) i organoleptičkog (npr. punoća ukusa) aspekta. Međutim, lipidi su podložni reakcijama oksidacije



koje predstavljaju jedan od vodećih uzroka kvarenja prehrambenih proizvoda i koje imaju negativan uticaj na miris, ukus, boju i teksturu proizvoda, smanjuju nutritivnu vrednost i dovode do nastanka toksičnih jedinjenja (Tian et al., 2013; Gómez-Estaca et al., 2014).

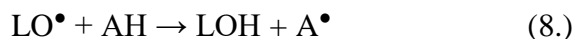
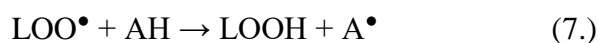
Oksidacija lipida se odvija kroz lančane reakcije prema slobodno-radikalском mehanizmu u tri faze. Sumarno se može predstaviti sledećom šemom:



U inicijalnoj fazi oksidacije iz molekula masne kiseline se u prisustvu inicijatora ( $\text{In}^\bullet$ ) oduzima atom vodonika, pri čemu nastaje alkil radikal ( $\text{L}^\bullet$ ) koji ima sposobnost delokalizacije duž dvostrukih veza (1.). Sledeću fazu (propagacija) čine lančane reakcije slobodnih radikala. U prvoj fazi propagacije alkil radikal u prisustvu kiseonika formira peroksil radikal ( $\text{LOO}^\bullet$ ) (2.) koji ima veću energiju usled čega može oduzeti atom vodonika iz drugog molekula masne kiseline pri čemu nastaju lipidni hidroperoksid (LOOH) i novi alkil radikal (3.). U fazi terminacije dolazi do interakcije između slobodnih radikala i nastanka neradikalских produkata (4.-6.) (Chaiyasit et al., 2007).

Različite strategije se primenjuju kako bi se poboljšala stabilnost proizvoda prema oksidaciji i na taj način produžila njihova trajnost. Jedna od strategija zasniva se na direktnom dodavanju antioksidanasa u proizvod (npr. dodatak antioksidanasa u formulaciju proizvoda, potapanje proizvoda u rastvor antioksidanasa ili raspršivanje antioksidanasa po površini proizvoda). Glavni nedostaci ovih postupaka su uticaj na organoleptičke karakteristike proizvoda i brza neutralizacija aktivnosti. U cilju zaštite prehrambenih proizvoda od oksidacije lipida primenjuje se i pakovanje pod vakuumom ili pakovanje u modifikovanoj atmosferi uz primenu ambalažnih materijala koje karakteriše mala propustljivost za kiseonik. Ovaj način pakovanja može efikasno ograničiti, ali ne i u potpunosti eliminisati prisustvo kiseonika. Deo kiseonika može zaostati ili proći kroz spojeve ambalaže, dok se njenim otvaranjem gubi vakuum ili modifikovana atmosfera. Inovativna alternativa navedenim strategijama za očuvanje kvaliteta i produženje trajnosti proizvoda predstavlja aktivno pakovanje koje sadrži komponente sa antioksidativnom aktivnošću (Han et al., 2018).

Pri razvoju antioksidativnog tipa aktivne ambalaže važan faktor je izbor aktivne komponente, pre svega njena funkcionalnost i stabilnost. Postoji širok spektar antioksidanasa prirodnog i veštačkog porekla koji se mogu koristiti u ovu svrhu. Ipak, pažnja je usmerena ka korišćenju prirodnih antioksidanasa koji se smatraju manje toksičnim i bezbednijim u odnosu na veštačke. Osim prema poreklu, antioksidansi se mogu klasifikovati i prema mehanizmu delovanja kao primarni i sekundarni, dok neki antioksidansi ispoljavaju aktivno delovanje kroz oba mehanizma. Primarni antioksidansi deluju kao „hvatači“ nastalih slobodnih radikala i na taj način sprečavaju lančane reakcije oksidacije, što podrazumeva prevođenje reaktivnih slobodnih radikala u stabilne oblike koji nemaju sposobnost učestvovanja u reakcijama inicijacije i propagacije. Reakcija antioksidanasa (AH) sa lipidnim radikalima (7.-9.), kao i učešće nastalih antioksidativnih radikala u reakcijama terminacije pri kojim nastaju neradikalски produkti (10.-13.) mogu se predstaviti na sledeći način:



Kao primarni antioksidansi prirodnog porekla mogu se koristiti tokoferoli, etarska ulja lekovitog bilja i začina, ekstrakti lekovitog bilja, začina, žitarica i voća. Sa druge strane, delovanje sekundarnih antioksidanasa zasniva se na eliminaciji faktora koji imaju katalitičko dejstvo na oksidaciju (npr. helacija metala, apsorpcija energije UV zračenja i uklanjanje reaktivnih kiseoničnih vrsta), pa se na ovaj način preventivno deluje na nastanak lipidnih hidroperoksida i slobodnih radikala, a time i na reakcije oksidacije. Kao sekundarni antioksidansi prirodnog porekla mogu se koristiti limunska kiselina, laktoferin, fenolna jedinjenja, karotenoidi (Chaiyasit et al., 2007; Tian et al., 2013; Vilela et al., 2018).

U skladu sa prethodno opisanim vrstama aktivnih ambalažnih materijala, kao i antioksidanasa, antioksidativni materijali mogu delovati na dva načina: kao apsorberi pri kontaktu sa supstancama koje učestvuju u procesima oksidacije (reaktivne kiseonične vrste, joni metala, slobodni radikali); i kao emiteri, odnosno izvori antioksidanasa koji otpuštaju ove komponente u proizvod ili u atmosferu proizvoda (Ganiari et al., 2017).

Neki od razvijenih sistema antioksidativnih ambalažnih materijala su patentirani što ukazuje na njihov industrijski potencijal. Tako je na primer kompanija Nurel (Španija) razvila antioksidativni film na bazi polietilena (PE) sa inkorporiranim inkapsulatima zelenog čaja. Sinteza materijala obuhvatila je dva procesa koja su zaštićena patentima. Prvi proces sinteze čini inkapsulacija ekstrakta zelenog čaja u cilju dobijanja stabilnijih oblika i zaštite aktivnih konstituenata tokom sledećeg procesa u kom su inkapsulati inkorporirani u rastop PE, a aktivni filmovi dobijeni ekstruzijom. Dobijeni filmovi su korišćeni kao ambalaža za pakovanje svežeg mlevenog mesa pri čemu su ispoljili aktivno delovanje u pogledu očuvanja kvaliteta i produženja trajnosti upakovanog proizvoda (Wrona et al., 2017a).

Ekstrakt zelenog čaja je korišćen kao aktivni konstituent pri razvoju još jednog tipa patentiranog antioksidativnog ambalažnog materijala. U pitanju su fleksibilne, višeslojne kesice i posudice izrađene od slojeva orijentisanog polipropilena sa ekstraktom zelenog čaja koji je inkorporiran u adheziv. Ovakva ambalaža je proizvedena u kompaniji Goglio (Italija). Kesice su korišćene za pakovanje pečenog kikirikija preliveog crnom čokoladom i žitarica preliveog mlečnom čokoladom čiji je proizvođač kompanija Lacasa S.A. (Španija). Analiza upakovanih proizvoda tokom dugoročnog skladištenja pod atmosferskim pritiskom u prisustvu kiseonika na 23 °C pokazala je efikasnost razvijene aktivne ambalaže u zaštiti proizvoda od oksidacije, sprečavanja užeglosti i produženja trajnosti (Carrizo et al., 2016).

Patentiran je i proces dobijanja antioksidativnog materijala u formi filma na bazi polipropilena (PP) sa imobilisanim ekstraktom ruzmarina koji je proizvela kompanija Artibal S.A. (Španija). Ispitivanjem antioksidativnih svojstava ovog materijala pokazana je njegova efikasnost u poboljšanju oksidativne stabilnosti i produženju trajnosti mioglobina i svežeg goveđeg bifteka (Nerín et al., 2006).

Još jedan primer patentirane antioksidativne ambalaže sa potvrđenim aktivnim delovanjem na sveže meso predstavljaju polietilen/poliamid laminatni filmovi sa ekstraktom origana, proizvedeni takođe u kompaniji Artibal S.A. (Španija). Testiranja su pokazala da se pakovanjem svežeg jagnječeg mesa u ove aktivne filmove može poboljšati oksidativna stabilnost mesa i očuvati njegova svežina i organoleptičke karakteristike (Camo et al., 2008).

Aktivni papiri se takođe mogu koristiti za produženje trajnosti proizvoda. Tako je aktivni papir sa etarskim uljem cimeta, koji ispoljava sposobnost sakupljanja slobodnih radikala i inhibicije enzima tirozinaze, proizvela i patentirala kompanija Repsol (Španija). Aktivno delovanje papira potvrđeno je na primeru očuvanja šampinjona od oksidacije. Tako je pakovanjem šampinjona u polietilen tereftalat (PET) posude obložene aktivnim papirima produžena njihova trajnost i sprečeni su gubitak mase i potamnjivanje tokom 9 dana skladištenja (Echegoyen i Nerín, 2015).

### 1.2.2. ANTIMIKROBNA PAKOVANJA

Rast mikroorganizama predstavlja vodeći uzrok kvarenja prehrambenih proizvoda, jer narušava aromu, boju i teksturu, odnosno dovodi do smanjenja trajnosti proizvoda, a predstavlja i rizik po zdravlje potrošača (Realini i Marcos, 2014). U ovom pogledu važna je prevencija i kontrola rasta bakterija izazivača kvarenja proizvoda, kao i patogenih bakterija (npr. *Lactobacillus* spp., *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*), plesni (*Rhizopus*, *Aspergillus*) i kvasaca (*Torulopsis*, *Candida*) (Vilela et al., 2018).

U cilju zaštite prehrambenih proizvoda od mikrobiološke kontaminacije primenjuju se razni postupci, kao što su direktno dodavanje antimikrobnih agenasa (npr. dodatak antimikrobnih agenasa u formulaciju proizvoda, potapanje proizvoda u antimikrobni rastvor ili raspršivanje antimikrobnog rastvora po površini proizvoda), konzervisanje primenom raznih metoda, pakovanje u modifikovanoj atmosferi ili pod vakuumom. Direktno dodavanje antimikrobnih agenasa nije u potpunosti efikasno, jer brzo dolazi do gubitka njihove aktivnosti. Sa druge strane, konzervisanjem se menjaju svojstva proizvoda. Pakovanje pod vakuumom ili u modifikovanoj atmosferi je selektivno efikasno, pa u određenim slučajevima može omogućiti rast anaerobnih mikroorganizama, dok se pri otvaranju ambalaže efikasnost stvorene atmosfere gubi. Inovativna alternativa ovim postupcima za kontrolu i inhibiciju rasta mikroorganizama je aktivno pakovanje hrane koje sadrži komponente sa antimikrobnom aktivnošću (Suppakul et al., 2003; Gutiérrez et al., 2011; Sung et al., 2013).

Postoji širok spektar aktivnih komponenti koje se mogu koristiti pri formulisanju i razvoju antimikrobnih ambalažnih materijala. Kao i kod formulisanja antioksidativnih materijala, fokus je usmeren ka korišćenju aktivnih komponenti prirodnog porekla. Tako se mogu koristiti razna etarska ulja (npr. cimeta, origana, timijana, bosiljka), izolovani aktivni konstituenti etarskih ulja (npr. timol, karvakrol, linalol, cinamaldehyd), biljni ekstrakti (npr. semenki grožđa), enzimi (npr. lizozim), bakteriocini (npr. nizin, enterocin, pediocin), organske kiseline i njihove soli (npr. limunska kiselina). Nanočestice metala i oksida metala (npr. srebro, titanijum dioksid, cink oksid) takođe privlače pažnju kao potencijalne aktivne komponente pri formulisanju antimikrobnih materijala zbog velike reaktivne površine i efikasnosti. Pored ovih aktivnih komponenti, neki od polimera ispoljavaju antimikrobno delovanje (npr.  $\epsilon$ -polilizin, hitozan) (Sung et al., 2013; Yildirim et al., 2018).

Aktivno delovanje ambalažnih materijala sa antimikrobnim komponentama postiže se pri direktnom ili indirektnom kontaktu sa površinom proizvoda. Direktni kontakt podrazumeva migraciju neisparljivih aktivnih supstanci ka površini proizvoda, dok indirektni kontakt podrazumeva delovanje isparljivih aktivnih supstanci u atmosferi oko proizvoda i njihovu apsorpciju od strane proizvoda. Antimikrobne komponente ispoljavaju razne mehanizme aktivnog

delovanja, pri čemu se efekti razlikuju u zavisnosti od aktivne komponente i vrste mikroorganizma. Mehanizmi delovanja uključuju izazivanje promena na ćelijskim membranama, narušavanje ćelijskog metabolizma i aktivnog transporta, onemogućavanje sinteze konstituenata ćelijskog zida, narušavanje strukture i denaturaciju proteina, sprečavanje replikacije, transkripcije i translacije nukleinskih kiselina. Ovo delovanje rezultuje produženjem lag faze i inhibicije faze rasta mikroorganizama, što može doprineti očuvanju kvaliteta, bezbednosti i zdravstvene ispravnosti, odnosno produženju trajnosti proizvoda (Sung et al., 2013; Realini i Marcos, 2014; Khaneghah et al., 2018).

Neki od razvijenih antimikrobnih ambalažnih materijala su patentirani što ukazuje na njihovu industrijsku relevantnost. Tako je aktivni PET film sa etil lauril arginatom proizvela i patentirala kompanija Artibal S.A. (Španija). Antibakterijsko delovanje ovog filma pokazano je na primeru sira. Naime, pakovanjem sira, čija je površina bila inokulisana bakterijom *Escherichia coli* O157:H7, u dati aktivni film postignuto je smanjenje broja bakterija tokom 7 dana skladištenja na temperaturi hlađenja (Otero et al., 2014).

Osim patentiranih filmova sa potvrđenim antibakterijskim delovanjem, kompanija Artibal S.A. proizvela je i patentirala samolepljive, transparentne aktivne nalepnice od polipropilena sa etarskim uljem cimeta. Pri testiranju aktivnog delovanja nalepnice su zalepljene na poklopce PET posuda u koje su potom upakovane breskve. Aktivne nalepnice ispoljile su antifungalno delovanje i omogućile produženje trajnosti plodova u pogledu očuvanja fizičko-hemijskih, pre svega mase i čvrstoće, ali i senzornih karakteristika plodova tokom 12 dana skladištenja na sobnoj temperaturi (Montero-Prado et al., 2011). Aktivno delovanje ove nalepnice testirano je i na bezglutenskom hlebu. Nalepnica je zalepljena na PE ambalažu u koju je potom upakovan hleb i skladišten 90 dana na sobnoj temperaturi. Pakovanje hleba u ambalažu sa aktivnom nalepnicom omogućilo je njegovu zaštitu od plesni, a efikasnost zaštite je bila veća pri većem sadržaju etarskog ulja u nalepnici. Pored toga, senzorni kvalitet hleba u pogledu ukusa, arome i teksture bio je bolje očuvan pakovanjem u aktivnu ambalažu u odnosu na pakovanje u modifikovanoj atmosferi pod istim uslovima (Gutiérrez et al., 2011).

Aktivni papiri se takođe mogu koristiti za kontrolu i prevenciju rasta plesni. Tako je kompanija Rylesa-Repsol YPF (Španija) proizvela i patentirala aktivnu formulaciju parafina sa etarskim uljem cimeta. Ovakav parafin nanet je, kao aktivni premaz, na papir. Antifungalno delovanje papira ispitano je na sečenom hlebu. Po 3 parčeta hleba, od kojih je parče u sredini bilo inokulisano sporama *Rhizopus stolonifer*, upakovana su u aktivnu papirnu ambalažu i skladištena na sobnoj temperaturi 3 dana (Rodriguez et al., 2008). Aktivni papir je ispoljio sposobnost potpune inhibicije rasta plesni. Slično ovome, aktivni papir dobijen je i nanošenjem parafinskog premaza čija je formulacija kao aktivnu komponentu sadržala etarsko ulje kore cimeta, a koji je takođe proizveden i patentiran od strane Rylesa-Repsol kompanije. Od aktivnih papira napravljene su kutije u koje je upakovan čeri paradajz, inokulisan sporama *Alternaria alternata*, i skladišten na sobnoj temperaturi. Rezultati ove studije su potvrdili aktivno delovanje papira u pogledu inhibicije rasta plesni i produženja trajnosti plodova (Rodriguez-Lafuente et al., 2010).

Aktivna ambalaža sa antimikrobnom aktivnošću može se naći na tržištu. Tako je kompanija LINPAC Packaging (Ujedinjeno Kraljevstvo) u saradnji sa kompanijom Addmaster (Ujedinjeno Kraljevstvo) razvila antimikrobne posude i filmove izrađene od recikliranog PET-a. Posude su namenjene za pakovanje prehrambenih proizvoda, na primer svežeg mesa, u cilju inhibicije rasta bakterija. Aktivna komponenta je na bazi srebra, a na tržištu je dostupna pod nazivom Biomaster (<https://www.bpf.co.uk/Packaging/Case Studies/Antimicrobial solutions for trays and films>; <https://www.addmaster.co.uk/biomaster/what-is-an-antimicrobial>). Na tržištu se mogu naći i aktivne papirne vrećice koje proizvodi kompanija Freund Corporation (Japan) pod nazivom Antimold® (<http://www.freund.co.jp/english/chemical/preservation/>). Vrećice su namenjene za očuvanje

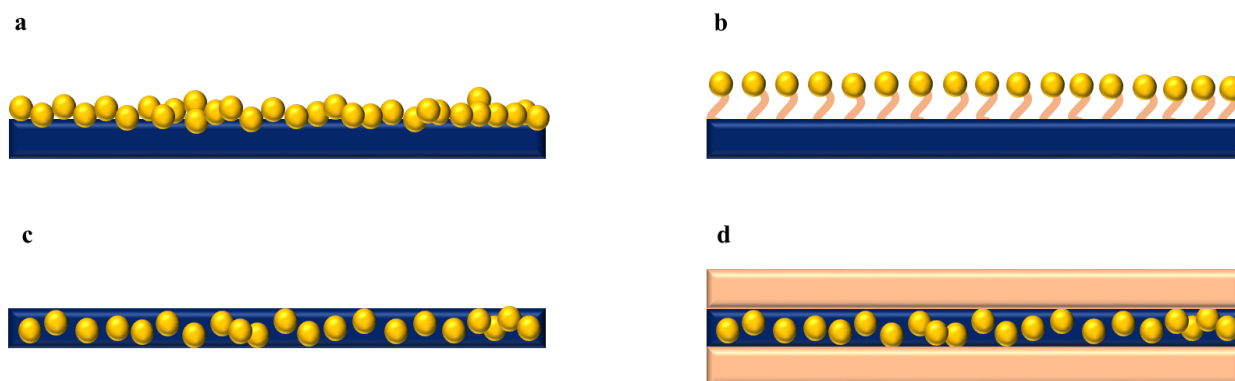
kvaliteta prehrambenih proizvoda inhibicijom rasta plesni. Aktivna komponenta ovih vrećica je etanol adsorbovan na silika gelu. Komercijalni antimikrobni ambalažni materijal sa aktivnom komponentom biljnog porekla proizvodi kompanija Mitsubishi-Chemical Foods Corporation (Japan), a na tržištu je dostupan pod nazivom Wasaouro™. Ovaj materijal ima sposobnost sprečavanja rasta bakterija, plesni i kvasaca, a namenjen je za očuvanje kvaliteta i produženje svežine i trajnosti prehrambenih proizvoda. Dostupan je u različitim oblicima (listovi, nalepnice, filmovi). Aktivna komponenta ovog materijala je wasabi (začin koji se koristi u Japanu, npr. uz suši), a čija se aktivnost pripisuje alil izotiocijanatu (<https://www.mfc.co.jp/wasaouro/eng/index.html>).

### 1.3. TEHNIKE DOBIJANJA AKTIVNIH AMBALAŽNIH MATERIJALA

Kao što je pomenuto u prethodnim sekcijama, razvoj ambalažnih materijala koji ispoljavaju antioksidativnu i/ili antimikrobnu aktivnost podrazumeva različite dizajne i pristupe:

- **Primena polimera koji ispoljavaju aktivno delovanje.** U ovom pogledu se posebno ističe hitozan kao antimikrobni polisaharid čije se antimikrobno delovanje pripisuje pozitivno naelektrisanim amino grupama. Tako hitozan zbog antimikrobne aktivnosti i sposobnosti da formira filmove predstavlja predmet brojnih studija u oblasti aktivnih ambalažnih materijala.
- **Inkorporacija aktivnih komponenti, naročito isparljivih supstanci, u kesice ili nalepnice i njihova inkluzija u konvencionalnu ambalažu.** Princip delovanja aktivnih kesica zasniva se na apsorpciji ili otpuštanju isparljivih komponenti čije odsustvo, odnosno prisustvo pozitivno utiče na kvalitet i bezbednost proizvoda. Ovakav tip aktivnog pakovanja nije pogodan za tečne proizvode niti za proizvode koji imaju visok sadržaj vode.
- **Nanošenje premaza aktivnih komponenti, odnosno njihova fizička adsorpcija na površinama materijala koji dolaze u dodir sa proizvodom.** Postupak dobijanja ovog tipa aktivnog materijala podrazumeva nanošenje rastvora ili disperzije aktivnih komponenti na površinu ambalažnog materijala, pri čemu se zahteva potpuna adhezija između aktivnog sloja i supstrata. Mehanizam delovanja ovakvih materijala se zasniva na otpuštanju aktivnih komponenti, pri čemu efikasnost delovanja zavisi od otpuštene količine aktivnih komponenti.
- **Imobilizacija aktivnih komponenti na površinama materijala koji dolaze u dodir sa proizvodom.** Postupak dobijanja ovog tipa aktivnog materijala obuhvata površinsku modifikaciju matriksa na koju se potom jonskim ili kovalentnim vezama imobilizuju aktivne komponente. Aktivno delovanje ovakvih materijala se zasniva na direktnom kontaktu sa proizvodom zbog čega je ovaj koncept posebno efikasan za pakovanje tečnih proizvoda.
- **Direktna inkorporacija isparljivih i neisparljivih aktivnih komponenti u matriks polimera.** Kod ovog tipa aktivnog materijala postupak dobijanja podrazumeva dispergovanje aktivnih komponenti u matriksu polimera. Kao i u prethodnom slučaju, mehanizam delovanja zasniva se na otpuštanju aktivnih komponenti. Dizajn ovog tipa materijala obuhvata različite strukture, npr. filmove i vlakna, u zavisnosti od svojstava aktivne komponente i polimernog matriksa, kao i namene materijala. Ovaj koncept obuhvata i višeslojne materijale kod kojih je sloj sa inkorporiranom aktivnom komponentom smešten, „u sendviču“, između dva inertna sloja kako bi se poboljšala određena svojstva, npr. mehanička, barijerna i/ili omogućilo produženo otpuštanje aktivne komponente (Tian et al., 2013; Gómez-Estaca et al., 2014; Khaneghah et al., 2018).

Neki od navedenih tipova aktivnih materijala ilustrativno su prikazani na Slici 1.2.



**Slika 1.2.** Ilustrativni prikaz različitih tipova aktivnih materijala: materijal sa fizički adsorbovanim aktivnim komponentama (a); materijal sa imobilisanim aktivnim komponentama (b); materijal sa aktivnim komponentama inkorporiranim u matriksu polimera (c); višeslojni materijal kod kog je sloj sa inkorporiranim aktivnim komponentama smešten između dva inertna sloja (d)

U nastavku će fokus biti usmeren na aktivne ambalažne materijale sa aktivnim komponentama inkorporiranim unutar matriksa polimera. Cilj ovog pristupa je da se eliminiše uticaj faktora koji dovode do degradacije i inaktivacije aktivnih komponenti. Naime, aktivne komponente, naročito one koje su ekstrahovane iz prirodnih izvora, karakterišu hemijska nestabilnost, osetljivost na svetlost, temperaturu, kiseonik, vodu, kao i podložnost interakcijama sa konstituentima proizvoda, što negativno utiče na efikasnost njihovog delovanja (Belščak-Cvitanović et al., 2015; Đorđević et al., 2015). U ovom pogledu, inkorporacijom aktivnih komponenti u matriks polimera formira se fizička barijera između aktivnih komponenti i okolne sredine što predstavlja efikasan pristup za prevazilaženje navedenih problema. U odnosu na direktno dodavanje aktivnih komponenti proizvodu, inkorporacijom u matriks polimera mogu se postići brojne prednosti:

- stabilizacija i očuvanje funkcionalnosti aktivnih komponenti tokom dužeg perioda;
- sprečavanje brze difuzije u proizvod i interakcija sa konstituentima proizvoda, odnosno smanjenje stope inaktivacije aktivnih komponenti;
- produženo otpuštanje aktivnih komponenti iz matriksa ka površini proizvoda, postizanje adekvatne koncentracije i povećanje efikasnosti delovanja;
- eliminisanje uticaja na teksturu i organoleptičke karakteristike proizvoda (Nedovic et al., 2011; Sung et al., 2013; Yildirim et al., 2018).

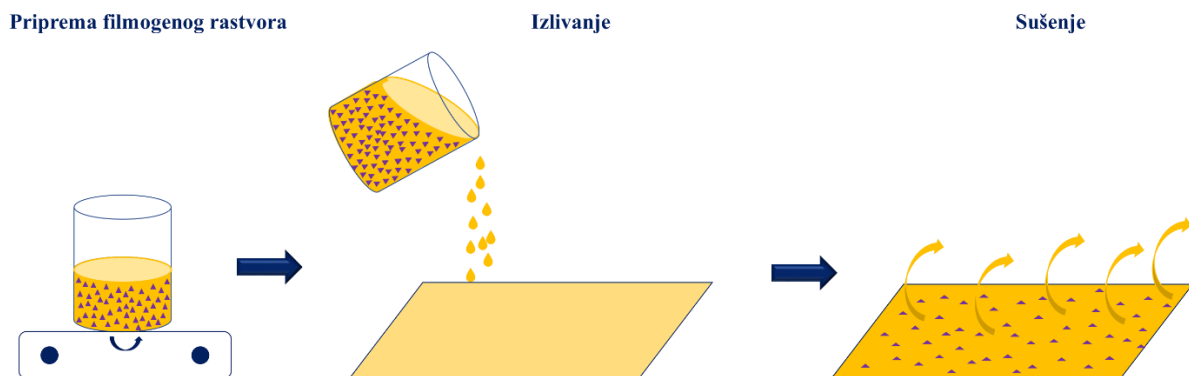
Razne tehnike se mogu primeniti pri dizajnu i razvoju aktivnih ambalažnih materijala, pri čemu izbor tehnike predstavlja jedan od ključnih faktora zbog direktnog uticaja na finalna svojstva materijala. Aktivni materijali se veoma često sintetišu u formi filmova. Tehnike koje se primenjuju za dobijanje filmova se u zavisnosti od procesa dele u dve grupe: suve (ekstruzija, injektovanje, termičko oblikovanje, presovanje) i vlažne (izlivanje filmova iz rastvora). Pored filmova, aktivni materijali sačinjeni od vlakana dobijeni tehnikom elektropredenja privlače sve veću pažnju (Mellinas et al., 2016; Etxabide et al., 2018). Tehnike koje se zasnivaju na suvim procesima se konvencionalno koriste za dobijanje filmova. Međutim, ovi procesi podrazumevaju primenu visokih temperatura i pritisaka što može dovesti do degradacije ili inaktivacije aktivnih komponenti tokom sinteze materijala (Sung et al., 2013). Iz tog razloga, u nastavku će pažnja biti posvećena sintezi aktivnih materijala tehnikama izlivanja filmova iz rastvora i elektropredenja.

### **1.3.1. IZLIVANJE FILMOVA IZ RASTVORA**

Jedna od najčešće primenjivanih tehnika pri razvoju aktivnih ambalažnih materijala na laboratorijskom nivou je izlivanje filmova iz rastvora (engl. *solvent casting*). Ovo je jednostavna

tehnika koja se zasniva na sušenju filmogenog rastvora, a obuhvata tri koraka ilustrativno prikazana na Slici 1.3.:

- **Priprema filmogenog rastvora.** Ovaj korak obuhvata rastvaranje polimera, aktivnih komponenti i aditiva, npr. plastifikatora, u odgovarajućem rastvaraču. Aktivne komponente se mogu direktno dodavati u rastvor ili prethodno inkapsulisati. U nekim slučajevima ovaj korak sinteze uključuje zagrevanje i/ili podešavanje pH vrednosti rastvora u cilju poboljšanja svojstava finalnih filmova.
- **Izlivanje.** Rastvori u vidu homogenih disperzija pripremljeni u prethodnom koraku se izlivaju na ravne površine. U zavisnosti od polimera, mogu se koristiti površine za izlivanje napravljene od različitih materijala, pri čemu se često koriste površine od polistirena, stakla i politetrafluoroetilena (Teflon).
- **Sušenje.** Ovaj korak obuhvata uklanjanje rastvarača sušenjem pod kontrolisanim uslovima pri čemu nastaje film koji se uklanja sa površine. Prema literaturnim podacima, opseg primenjene temperature sušenja je 20-45 °C, dok samo trajanje sušenja varira između 5 i 72 h, u zavisnosti od sastava i karakteristika rastvora (Rhim i Ng, 2007; Mellinas et al., 2016; Etxabide et al., 2018).



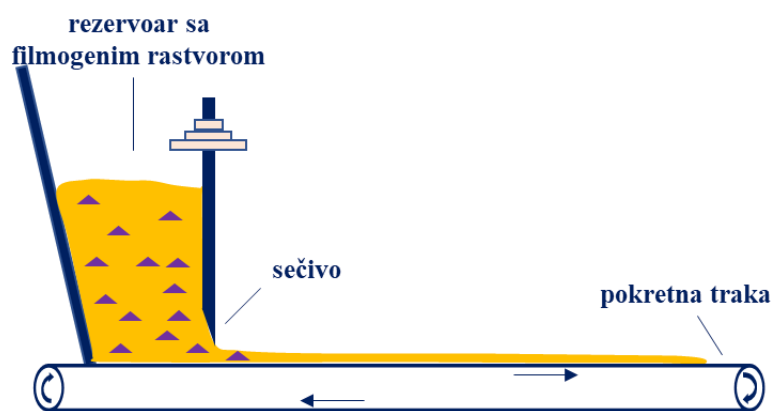
**Slika 1.3.** Šematski prikaz izlivanja filmova iz rastvora

Kao što je već pomenuto, plastifikatori se mogu koristiti pri formulisanju i razvoju filmova. Cilj njihovog korišćenja je modifikovanje fizičkih svojstava filmova. Naime, plastifikatori su niskomolekulska, polarna jedinjenja čije se delovanje zasniva na povećanju slobodnog prostora i mobilnosti lanaca polimera, smanjenju stepena kristaliničnosti i temperature prelaska u staklasto stanje. Kao rezultat ovog delovanja dolazi do smanjenja krutosti i povećanja fleksibilnosti i obradivosti filmova. Jedinjenja koja sadrže nekoliko hidroksilnih grupa, poput glicerola, sorbitola i poli(etilen glikola), se najčešće koriste kao plastifikatori (Rhim i Ng, 2007; Guerrero et al., 2010; Mellinas et al., 2016).

Izlivanje filmova iz rastvora izvodi se na umerenim temperaturama bez primene pritiska što je veoma važno posmatrano sa aspekta očuvanja aktivnih komponenti (Sung et al., 2013). Temperatura i vreme sušenja utiču na karakteristike filmova. Generalno, izliveni filmovi su tanki, transparentni i zadovoljavajućih karakteristika (Anbukarasu et al., 2015). Antioksidativne i/ili antimikrobne karakteristike filmova izlivenih iz rastvora mogu se postići inkorporacijom raznih aktivnih komponenti, poput minerala (Malagurski et al., 2017a), vitamina (Martins et al., 2012), bakteriocina (Meira et al., 2017), fenolnih jedinjenja (Luzi et al., 2018), etarskih ulja (Kashiri et al., 2017), biljnih ekstrakata (Talón et al., 2017a), izolovanih aktivnih konstituenata (Du et al., 2008), u matriks polimera. Tako su na primer, Malagurski et al. (2017a) primenom tehnike izlivanja iz rastvora razvili mineralizovane nanokompozitne filmove na bazi agra sa potencijalom otpuštanja cinka i antimikrobnim delovanjem na *Staphylococcus aureus*.

Izlivanjem iz rastvora se mogu sintetisati i aktivni filmovi na bazi blendi različitih polimera kako bi se dobili filmovi sa što boljim svojstvima (Mellinas et al., 2016). Tako su na primer Hu et al. (2020) razvili multifunkcionalne filmove izlivenne iz rastvora na bazi derivata hitozana (kvaternerni amonijum hitozan) i želatina sa inkorporiranim ekstraktom *Amaranthus tricolor* L. Naime, analizom filmova pokazana je njihova antioksidativna aktivnost prema 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil slobodnom radikalu (DPPH<sup>•</sup>), kao i antimikrobna aktivnost prema *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium* i *L. monocytogenes*. Pored toga, filmovi su usled prisustva pigmenta betalaina u inkorporiranom ekstraktu ispoljili osetljivost na promene pH vrednosti i sposobnost da menjaju boju u alkalnoj sredini. Ovakav rezultat je ukazao na potencijal filmova da budu korišćeni i kao inteligentni materijali za praćenje kvaliteta proizvoda, npr. svežine ribljih proizvoda.

Uprkos navedenim pozitivnim karakteristikama, male dimenzije filmova izlivenih iz rastvora na laboratorijskom nivou i dugo vreme potrebno za uklanjanje rastvarača, odnosno za dobijanje filmova, predstavljaju ograničavajuće faktore za primenu ove tehnike na komercijalnom nivou. Izlivanje filmova u trake (engl. *tape casting*) predstavlja nadogradnju ove tehnike i omogućava dobijanje filmova većih dimenzija tokom kraćeg vremena. U ovom slučaju filmogeni rastvor se iz rezervoara sečivom podesive visine nanosi na pokretnu traku (Slika 1.4.). Prema tome, debljina filma zavisi od visine sečiva, dok kod laboratorijskog postupka debljina filma zavisi od izlivenne mase rastvora. Rastvarač se uklanja provođenjem toplote, cirkulacijom zagrejanog vazduha, infracrvenim zračenjem ili njihovom kombinacijom pri čemu nastaju filmovi (de Moraes et al., 2013; Etxabide et al., 2018). Du et al. (2008) su izlivanjem u trake dobili film na bazi pirea jabuke kom su kao aditivi dodati glicerol, askorbinska kiselina, limunska kiselina i nisko metoksilirani pektin u cilju poboljšanja karakteristika rezultujućeg filma. Karvakrol je inkorporiran u filmove kao aktivna komponenta čime je postignuta sposobnost filmova da inhibiraju rast bakterije *E. coli* O157:H7.



Slika 1.4. Šematski prikaz izlivanja filmova u trake

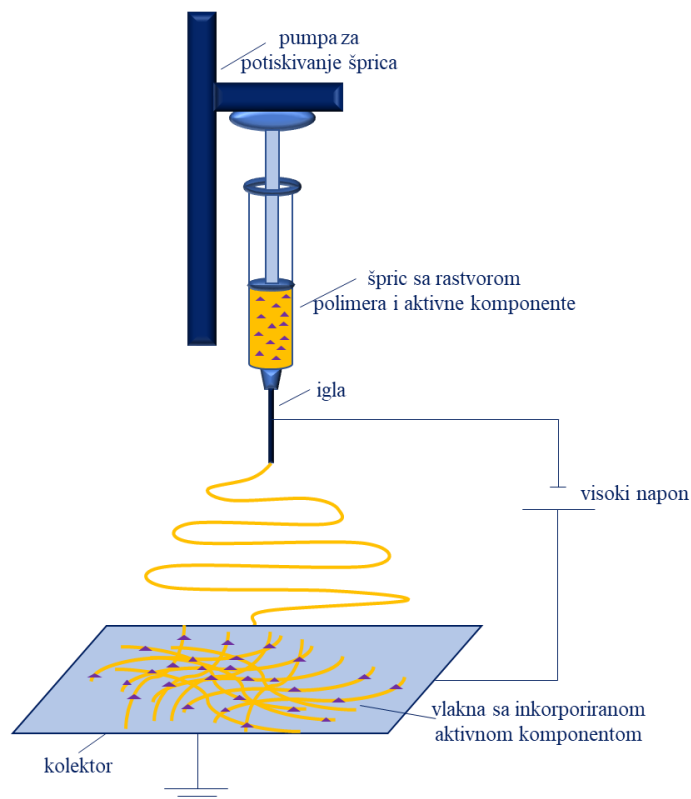
### 1.3.2. ELEKTROPREDENJE

Jedna od tehnika koja privlači sve više pažnje pri razvoju aktivnih ambalažnih materijala je elektropredenje (engl. *electrospinning*). U osnovi ove tehnike je elektro-hidrodinamički proces koji omogućava proizvodnju kontinualnih i uniformnih vlakana čiji prečnici mogu biti u nano, sub-mikro ili mikro opsegu. U ovom pogledu, elektropredeni aktivni materijali predstavljaju strukture sačinjene od mreže polimernih vlakana sa inkorporiranim aktivnim komponentama (Busolo et al., 2017; Echegoyen et al., 2017).

Kod tehnike elektropredenja aktivne komponente se rastvaraju ili disperguju u rastvoru polimera i potom inkorporiraju u strukture polimernih vlakana. Tipičan sistem elektropredenja čine: pumpa, špric sa kapilarnom ili iglom od nerđajućeg čelika, izvor visokog napona i uzemljeni metalni kolektor (Slika 1.5.). Princip tehnike se zasniva na ekstruziji rastvora polimera i njegovom



izvlačenju u tanke niti pod dejstvom električnih sila. Naime, rastvor polimera se pumpom potiskuje iz šprica kroz iglu konstantnom brzinom pri čemu na vrhu igle nastaje kap rastvora. Razlika električnog potencijala se uspostavlja između igle i kolektora. Tako pod dejstvom električnog polja formirana kap na vrhu igle postaje naelektrisana, izdužuje se i dobija konusni oblik, koji se naziva Taylor-ov konus. U trenutku kada električno polje dostigne kritičnu vrednost, odnosno kada električne sile savladaju površinski napon rastvora sa vrha Taylor-ovog konusa se ka kolektoru izbacuje naelektrisani mlaz rastvora na koga deluju električne, viskoelastične i sile odbijanja, kao i gravitacione sile. Pod dejstvom ovih sila polimerni mlaz se izdužuje i tanji, a rastvarač isparava i na taj način nastaju kontinualna vlakna koja se deponuju na uzemljenom kolektoru. Osim iz rastvora, elektropredena vlakna se mogu dobiti i iz emulzija i rastopa polimera (Ghorani i Tucker, 2015; Busolo et al., 2017; Zhang et al., 2017).



Slika 1.5. Šematski prikaz sistema za elektropredenje

Razni polimeri, kako sintetskog, tako i prirodnog porekla, kao i kombinacije polimera se mogu koristiti za dobijanje elektropredenih aktivnih materijala. Prečnik i morfologija vlakana zavise od sledećih parametara:

- **Karakteristike rastvora:**

- **Koncentracija polimera, molekulska masa polimera i viskoznost rastvora.** Koncentracija i molekulska masa polimera utiču na viskoznost rastvora, a time i na uvrtnje lanaca polimera i uspešnost nastajanja vlakana. Pri suviše niskim koncentracijama polimera dolazi do elektroraspršivanja rastvora (engl. *electrospraying*) i nastanka čestica. Sa blagim povećanjem koncentracije polimera u rastvoru dolazi do nastanka i čestica i vlakana, dok dalje povećanje koncentracije polimera, a time i viskoziteta rastvora, omogućava kontinualno nastajanje vlakana. Sa druge strane, pri suviše visokim koncentracijama polimera dolazi do sušenja rastvora na vrhu igle i narušavanja kontinualnosti procesa. Prema tome, potrebno je optimizovati koncentraciju polimera u rastvoru tako da bude što je moguće veća, ali da viskoznost rastvora bude dovoljno niska da omogući nastajanje mlaza. Slično, molekulska masa polimera takođe utiče na karakteristike rastvora, a time i na stepen uvrtnja lanaca polimera i morfologiju

vlakana. Generalno, rastvori polimera velikih molekulskih masa se koriste kako bi se postigla potrebna viskoznost za kontinualno dobijanje vlakana. Viskoznost utiče i na prečnik vlakana, pa se elektropredenjem viskoznijih rastvora dobijaju vlakna većeg prečnika.

- **Površinski napon rastvora.** Sastav rastvarača utiče na površinski napon rastvora, a time i na proces elektropredenja. Generalno, kada je površinski napon rastvora manji proces elektropredenja je stabilniji, a dobijena vlakna su pravilnija.
- **Provodljivost rastvora.** Na provodljivost rastvora utiču priroda polimera i rastvarača. Ukoliko je provodljivost rastvora mala, izduženje mlaza u električnom polju je nedovoljno za nastajanje uniformnih vlakana i dolazi do nastajanja čestica. Sa povećanjem provodljivosti rastvora povećava se i izduženje mlaza u električnom polju zbog čega nastaju tanja vlakna. Ipak, provodljivost rastvora ne sme biti ni suviše velika, jer je u tom slučaju nestabilnost mlaza u električnom polju velika što dovodi do široke distribucije prečnika dobijenih vlakana.
- **Procesni parametri:**
  - **Napon.** Primena visokog napona dovodi do naelektrisanja rastvora i inicira proces elektropredenja i nastajanje vlakana zbog čega se smatra ključnim parametrom. Vrednosti napona određuju snagu električnog polja. Prema tome, u većini slučajeva primena jačeg napona dovodi do većeg istežanja mlaza i nastajanja tanjih vlakana. Međutim, pri jačem naponu Taylor-ov konus je nestabilniji, a time je verovatnoća nastajanja čestica veća.
  - **Protok rastvora.** Ovaj procesni parametar utiče na brzinu mlaza i isparavanje rastvarača. Generalno, pri nižim protocima rastvora isparavanje rastvarača je efikasnije, dobijena vlakna su tanja i uniformnija, a poroznost između vlakana je manja. Ipak, protoci ne smeju biti suviše niski kako bi se sprečilo isparavanje rastvarača na vrhu igle.
  - **Tip kolektora.** Različiti tipovi kolektora se mogu koristiti kao provodni supstrati za deponovanje elektropredenih vlakana, pri čemu orijentacija vlakana zavisi od geometrije kolektora. Tako se na kolektorima u vidu ravne ploče deponuju međusobno isprepletana vlakna, dok se na kolektorima u vidu rotirajućeg bubnja deponuju međusobno paralelna vlakna.
  - **Rastojanje između vrha igle i kolektora.** Optimizacija rastojanja između vrha igle i kolektora je važna kako bi se omogućilo efikasno uklanjanje rastvarača na putu mlaza od Taylor-ovog konusa do kolektora i dobijanje suvih, uniformnih vlakana bez nastajanja čestica. Pored toga, veće rastojanje između vrha igle i kolektora rezultuje nastajanjem tanjih vlakana.
- **Ambijentalni uslovi:**
  - **Temperatura.** Temperatura utiče na viskoznost rastvora i stopu isparavanja rastvarača, a time i na prečnik elektropredenih vlakana. Naime, na višim temperaturama viskoznost rastvora je manja, a stopa isparavanja rastvarača veća što rezultuje nastajanjem tanjih vlakana.
  - **Relativna vlažnost.** Vlažnost utiče na očvršćavanje naelektrisanog mlaza. Tako pri većoj vlažnosti nastaju deblja vlakna sa poroznim površinama (Bhardwaj i Kundu, 2010; Ghorani i Tucker, 2015; Busolo et al., 2017).

Prednosti primene tehnike elektropredenja za razvoj aktivnih materijala su višestruke, a potiču od karakteristika procesa, kao i strukturnih i funkcionalnih karakteristika vlakana. Proces karakterišu jednostavnost, kontinualnost i ekonomičnost. Pored toga, proces ne zahteva primenu visokih temperatura i omogućava efikasnu inkorporaciju osetljivih aktivnih komponenti u matriks polimera uz poboljšanje njihove stabilnosti. Strukture elektropredenih vlakana karakteriše pre svega veliki odnos površine prema zapremini, kao i mogućnost modifikovanja prečnika i oblika vlakana, kao i stepena poroznosti mreže vlakana. Važno je napomenuti da tehniku elektropredenja karakteriše i fleksibilnost, pa novi dizajni i razvoj opreme i procesa omogućavaju masovnu

proizvodnju vlakana (Bhardwaj i Kundu, 2010; Bhushani i Anandharamkrishnan, 2014; Echevoyen et al., 2017).

Antioksidativne i/ili antimikrobne karakteristike elektropredenih vlakana mogu se postići inkorporacijom raznih aktivnih komponenti, poput vitamina (Aytac et al., 2017), peptida (Wang et al., 2015), fenolnih jedinjenja (Neo et al., 2013), etarskih ulja (Yao et al., 2017), biljnih ekstrakata (Solaberrieta et al., 2020), izolovanih aktivnih konstituenata (Tatlisu et al., 2019) u matriks polimera. Tako su na primer Solaberrieta et al. (2020) razvili materijale na bazi elektropredenih poli(etilen oksid) vlakana sa inkorporiranim ekstraktom *Aloe vera*. Inkorporacijom ekstrakta postignuta je antioksidativna aktivnost vlakana određena kao sposobnost inhibicije DPPH• i 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS•+) slobodnih radikala i sposobnost redukcije kompleksa feri-tripiridiltriazina (Fe(III)-TPTZ). Elektropredena vlakna se mogu podvrgnuti i kratkotrajnom termičkom tretmanu u cilju njihovog prevođenja u strukture filmova. Tako su Figueroa-Lopez et al. (2019) primenom termičkog tretmana preveli poli(3-hidroksibutirat-co-3-hidroksivalerat) elektropredena vlakna sa inkorporiranim etarskim uljem origana i ekstraktima ruzmarina i zelenog čaja u kontinualne, transparentne filmove. Dobijeni filmovi ispoljili su sposobnost inhibicije DPPH• slobodnog radikala, kao i antibakterijsku aktivnost prema *S. aureus* i *E. coli*, pri čemu je najsnažnije aktivno delovanje postignuto inkorporacijom etarskog ulja origana.

Razni polimeri se mogu kombinovati u cilju poboljšanja procesa i dobijanja vlakana sa što boljim karakteristikama. U ovom pogledu, jedan od koncepata podrazumeva direktno mešanje polimera tokom pripreme rastvora. Tatlisu et al. (2019) su inkorporacijom timola u vlakna na bazi polivinil alkohola i proteina surutke razvili materijale koji sprečavaju rast plesni *Aspergillus parasiticus*. Mešanje polivinil alkohola i proteina surutke omogućilo je dobijanje pravilnijih i uniformnijih vlakana u odnosu na vlakna na bazi samo jednog od ova dva polimera. Pored toga, inkorporacija timola u polimerni matriks tehnikom elektropredenja rezultovala je poboljšanjem antifungalne efikasnosti u odnosu na efikasnost timola u slobodnom obliku što potvrđuje značaj koncepta aktivne ambalaže za očuvanje kvaliteta i bezbednosti proizvoda.

Aktivni materijali na bazi vlakana mogu se dobiti i postupkom koaksijalnog elektropredenja koji je naročito pogodan kada se koriste veoma osetljive aktivne komponente. Kod ovog postupka primenjuju se dve koncentrične nozle i dve pumpe pri čemu se dva različita rastvora simultano elektropredu. Na ovaj način dobijaju se strukture jezgro-omotač (engl. *core-shell*). Spoljašnji rastvor od kog nastaje omotač čini rastvor polimera, dok unutrašnji rastvor od kog nastaje jezgro može biti rastvor polimera ili samo rastvarač koji će dovesti do nastanka šupljine (Busolo et al., 2017). Tako su na primer Yao et al. (2017) koaksijalnim elektropredenjem inkapsulisali etarsko ulje pomorandže u matriks na bazi zeina i na taj način razvili aktivni materijal koji ispoljava antimikrobno delovanje prema *E. coli*.

## 1.4. POLIMERNI AMBALAŽNI MATERIJALI

Izbor materijala je jedan od ključnih segmenata pri formulisanju i razvoju aktivne ambalaže. Tradicionalno korišćeni materijali u proizvodnji ambalaže za pakovanje prehrambenih proizvoda su papir i karton, staklo, metal, razni polimeri, kao i višeslojni polimerni i kombinovani materijali. Među njima, najčešće su korišćeni polimerni ambalažni materijali, jer imaju relativno nisku cenu, malu gustinu, hemijski su postojani, lako se prerađuju pri čemu se mogu dobiti razni oblici i veličine, a imaju i dobra fizičko-hemijska i funkcionalna svojstva (npr. transparentnost, mehaničke i barijerne performanse). Najčešće korišćeni polimerni ambalažni materijali su polietilen niske gustine (LDPE), polietilen visoke gustine (HDPE), polipropilen (PP), polietilen tereftalat (PET), polivinil hlorid (PVC), poliamid (PA) i polistiren (PS). Razne vrste krute (npr. boce, šolje, posude) i fleksibilne (npr. kese, filmovi, folije) plastične ambalaže, odnosno ambalaže formirane od

polimernih materijala široko su u upotrebi (Lalpuria et al., 2012; Rhim et al., 2013; Lazić i Popović, 2015; Souza i Fernando, 2016; Licciardello, 2017).

Sektor plastike koji obuhvata proizvođače sirovina, prerađivače i proizvođače opreme je jedan od najinovativnijih sektora u Evropskoj Uniji što pokazuje i podatak da je u periodu od 2002. do 2013. godine barem 1 na svakih 25 patenata poticao iz ovog sektora (Souza i Fernando, 2016). Kontinuirane inovacije su rezultovale rastom potražnje za plastikom što jasno pokazuju podaci Udruženja proizvođača plastike (PlasticsEurope) o globalnoj proizvodnji plastike. Od oko 1,5 miliona tona plastike proizvedene 1950. godine globalni rast proizvodnje plastike dostigao je 245 miliona tona proizvedenih 2008. godine, odnosno 348 i 359 miliona tona proizvedenih 2017. i 2018. godine, respektivno. Na tržištu Evropske Unije proizvedeno je 61,8 miliona tona plastike 2018. godine, od čega je najveći deo (39,9%) korišćen za proizvodnju ambalaže (PlasticsEurope et al., 2008; PlasticsEurope et al., 2009; PlasticsEurope i EPRO, 2019).

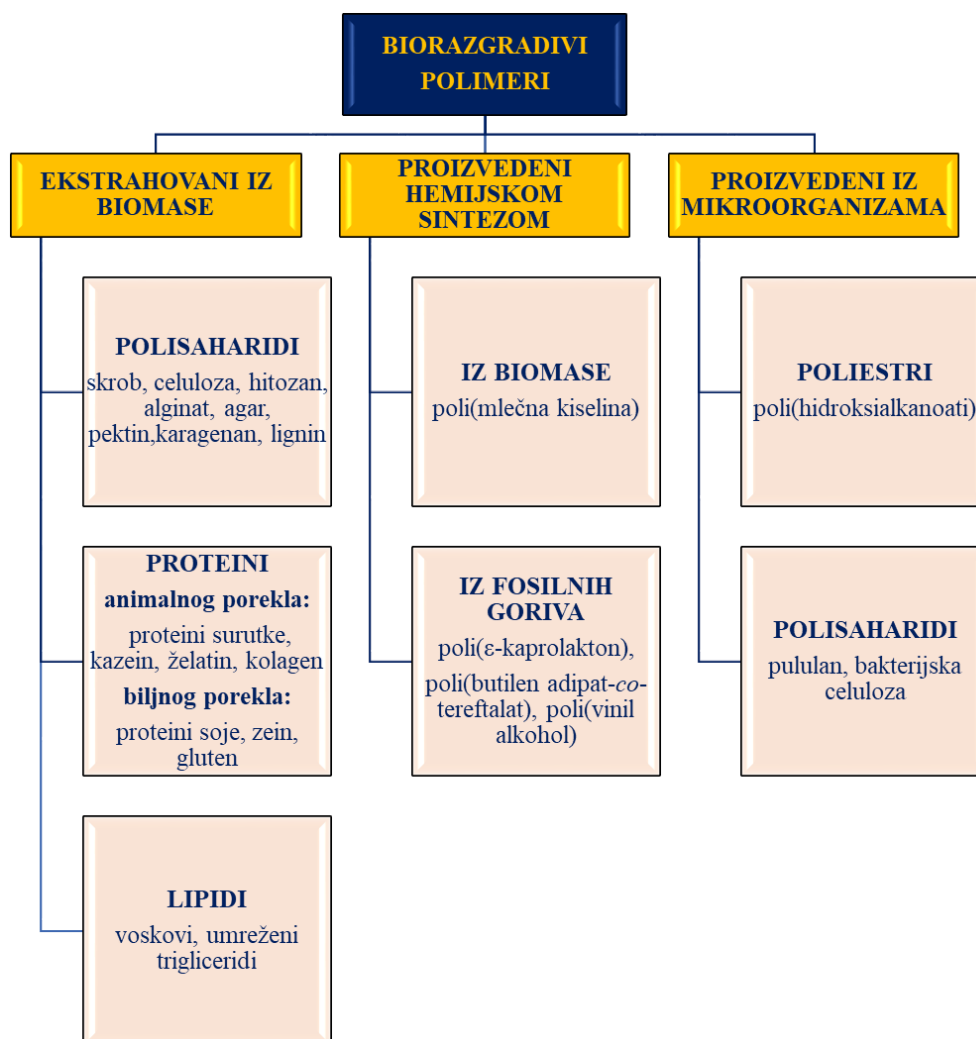
Rast proizvodnje polimernih ambalažnih materijala nadmašio je ostale materijale, ali i usmerio globalni trend ka proizvodnji plastične ambalaže za jednokratnu upotrebu. U ovom pogledu, masovno korišćenje plastične ambalaže dovelo je do ekoloških problema u pogledu njenog odlaganja. U Evropskoj Uniji je odlaganje plastičnog otpada na deponije i dalje prva opcija, pri čemu je skoro 8 miliona tona plastičnog otpada deponovano samo tokom 2014. godine. Pri tom, procenjuje se da oko 47% od globalnog plastičnog otpada generisanog tokom 2015. godine čini otpad od plastične ambalaže (PlasticsEurope i EPRO, 2015; UNEP 2018). Naime, mnoge plastične ambalažne jedinice za pakovanje prehrambenih proizvoda se jednokratno ili kratkoročno koriste, a zbog ostataka organske materije njihovo recikliranje nije uvek moguće, održivo ili ekonomski opravdano. Tako milioni tona plastične ambalaže završe na deponijama, rasuti u prirodi svake godine što zbog veoma spore razgradnje, koja može zahtevati i više stotina godina, rezultuje kontaminacijom životne sredine. Problem stvara i prisustvo mikro- (prečnik <1 mm) i nano-plastike (prečnik <100 nm) u prirodi. Naime, prisustvo mikroplastike utvrđeno je u vazduhu, zemljištu, padavinama, pijaćoj vodi, hrani i piću. Pri tom, procenjuje se da prosečna osoba godišnje unese 121.000 mikročestica plastike. Ukoliko se za preporučeni unos vode upotrebljava samo flaširana voda, godišnji unos mikročestica plastike se uvećava za 90.000. Razne studije su pokazale da unos mikroplastike ima višestruke negativne uticaje na zdravlje ljudi. Tako je ovaj problem pokrenuo inovacije i trend ka korišćenju biorazgradivih ambalažnih materijala, naročito u slučaju ambalaže namenjene za jednokratnu ili kratkoročnu upotrebu. Biorazgradivi materijali podležu razgradnji pod dejstvom faktora spoljašnje sredine i aktivnosti mikroorganizama prisutnih u prirodi kroz fragmentaciju i dezintegraciju, rezultujući mineralizacijom materijala i nastankom biomase, bez nastajanja toksičnih i ekološki štetnih produkata. Proces biorazgradnje započinje adhezijom mikroorganizama na površini materijala što dovodi do erozije površine i cepanja lanaca polimera, nakon čega mikroorganizmi luče enzime koji dovode do depolimerizacije i daljeg narušavanja materijala rezultujući njegovom biorazgradnjom. Na ovaj način se biorazgradivi materijali aktivnošću mikroorganizama prevode u ugljen-dioksid i vodu pod aerobnim uslovima, odnosno u ugljen-dioksid i metan pod anaerobnim uslovima, kao i u biomasu. Potpuna biorazgradnja je dostignuta kada nema zaostalog polimernog materijala (Rhim et al., 2013; Lazić i Popović, 2015; Genovese et al., 2016; Souza i Fernando, 2016; Cox et al., 2019; Al-Tayyar et al., 2020; Bojic et al., 2020).

Ubrzana razgradnja materijala pod dejstvom mešanih populacija mikroba u vlažnim, toplim i kontrolisanim uslovima definiše se kao kompostiranje (Lazić i Novaković, 2010). Da bi se materijal kategorisao kao industrijski kompostabilan potrebno je da ispoljava sledeće karakteristike:

- **Hemijske karakteristike.** Sadržaj organske materije mora iznositi najmanje 50%, a sadržaj teških metala u kompostu ne sme preći propisane limite.

- **Dezintegracija.** Do narušavanja integriteta materijala praćenog fragmentacijom sitnih, vizuelno neuočljivih komadića (<2 mm) mora doći tokom 12 nedelja kompostiranja pod kontrolisanim uslovima.
- **Biorazgradnja.** Step en biorazgradnje mora biti barem 90% nakon 6 meseci kompostiranja pod kontrolisanim uslovima.
- **Ekotoksičnost.** Rezultujući kompost, koji eventualno sadrži nerazgrađene ostatke materijala, ne sme imati negativan uticaj na klijanje i rast biljaka (Rujnić-Sokele i Pilipović, 2017).

Biorazgradivi polimeri mogu biti različitog porekla, pri čemu biorazgradivost zavisi od njihove molekulske mase i hemijske strukture materijala (Siracusa et al., 2008; Lazić i Novaković, 2010; Reddy et al., 2013). Tradicionalno korišćeni polimerni ambalažni materijali se dobijaju iz neobnovljivih izvora sirovina, odnosno fosilnih goriva (naftni derivati), što pored dugog životnog veka takođe predstavlja ekološki problem. Pored toga, cena ovih sirovina je podložna čestim fluktuacijama. Iz tog razloga inovacije su usmerene ka ekološki i ekonomski održivom razvoju kroz korišćenje ne samo biorazgradivih polimera dobijenih iz fosilnih goriva, već i biorazgradivih polimera dobijenih iz obnovljivih izvora sirovina, tkzv. biopolimera. Za dobijanje biopolimera često se koriste sporedni proizvodi prehrambene industrije što predstavlja dodatnu prednost posmatrano sa aspekta ekološki i ekonomski održivog razvoja (Tang et al., 2012; Lazić i Popović, 2015; Genovese et al., 2016; Souza i Fernando, 2016; Elsayy et al., 2017). Primeri biorazgradivih polimera u zavisnosti od porekla i načina dobijanja prikazani su na Slici 1.6. (Lazić i Novaković, 2010; Reddy et al., 2013; Rhim et al., 2013; Sharma et al., 2020).



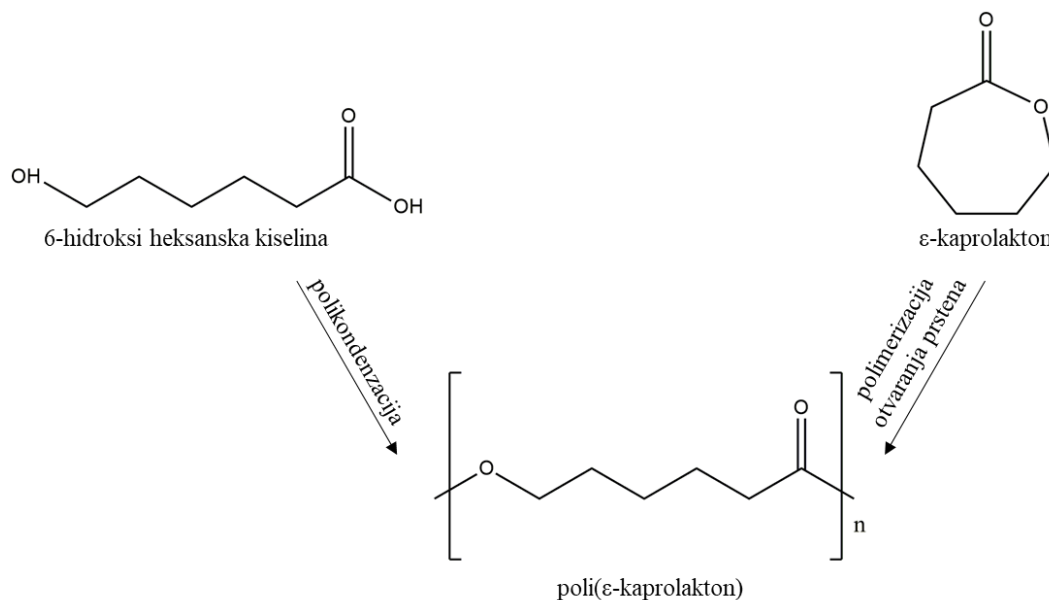
Slika 1.6. Podela biorazgradivih polimera

Posmatrajući sistem ambalaža-proizvod koncept aktivnih materijala na bazi biorazgradivih polimera ima za cilj da se produži trajnost proizvoda, a time i smanji nastanak otpada od hrane, uz istovremeno efikasno korišćenje izvora i smanjenje negativnog uticaja na životnu sredinu. U ovom pogledu se može zaključiti da koncept aktivnih materijala višestruko doprinosi održivom razvoju (Licciardello, 2017). U nastavku je dat detaljniji uvid u karakteristike nekih od biorazgradivih polimera sa potencijalom primene za razvoj aktivnih ambalažnih materijala, i to poli( $\epsilon$ -kaprolaktona), dobijenog hemijskom sintezom iz neobnovljivih izvora, i zeina i želatina, dobijenih ekstrakcijom iz obnovljivih izvora sirovina.

#### 1.4.1. POLI( $\epsilon$ -KAPROLAKTON)

Poli( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL) je alifatični poliestar koga čine heksanoatne ponavljajuće jedinice (Slika 1.7.) (Labet i Thielemans, 2009). Prvi put je sintetisan od strane grupe V. Karotersa (*W. Carothers*) početkom 30-ih godina 20. veka, dok je biorazgradivost ovog sintetskog polimera utvrđena 1973. godine (Sinha et al., 2004).

PCL se dobija iz neobnovljivih izvora, odnosno hemijskom konverzijom sirove nafte (Gross i Kalra, 2002). Za sintezu PCL-a mogu se primeniti dve metode: polikondenzacija 6-hidroksi heksanske kiseline i polimerizacija otvaranja prstena  $\epsilon$ -kaprolaktona (Slika 1.7.). Polimerizacija otvaranja prstena cikličnog monomera  $\epsilon$ -kaprolaktona se češće primenjuje, jer se na ovaj način dobija polimer veće molekulske mase uz manju polidisperznost. Postoje 4 mehanizma polimerizacije otvaranja prstena  $\epsilon$ -kaprolaktona u zavisnosti od katalizatora koji se koristi i to: anjonski, katjonski, monomer-aktivacioni i koordinaciono-insercioni mehanizam. Katalizatori mogu biti na bazi alkalnih (litijum diizopropilamid), zemnoalkalnih (magnezijum, kalcijum, stroncijum), prelaznih (cink, titanijum) i ostalih (aluminijum, kalaj) metala. Polimerizacija otvaranja prstena  $\epsilon$ -kaprolaktona može biti katalizovana i enzimima, najčešće lipazama, kao i raznim organskim jedinjenjima i neorganskim kiselinama (Labet i Thielemans, 2009).



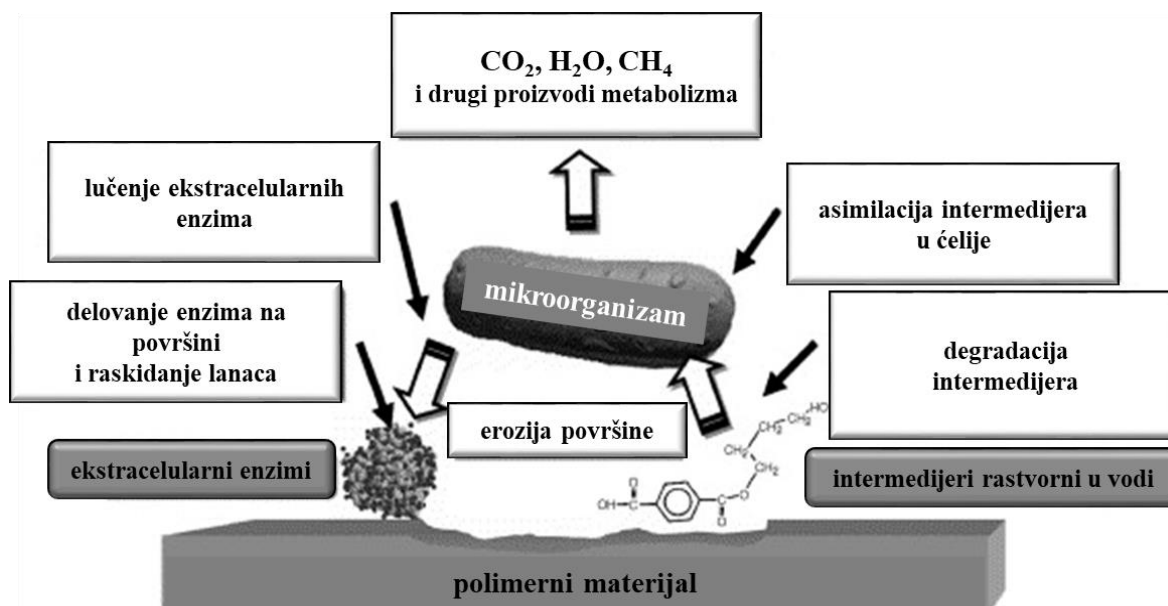
**Slika 1.7.** Sinteza poli( $\epsilon$ -kaprolaktona)

Fizička, termička i mehanička svojstva PCL-a zavise od njegove molekulske mase i stepena kristaliničnosti. Vrednosti srednje molekulske mase su u opsegu od 560-630.000 g/mol. PCL je semi-kristalan polimer čiji stepen kristaliničnosti može dostići 69%. Kao hidrofoban polimer PCL se na sobnoj temperaturi dobro rastvara u hloroformu, dihlormetanu, ugljen-tetrahloridu, benzenu, toluenu, cikloheksanonu i 2-nitropropanu. Slabije se rastvara u acetonu, 2-butanonu, etil-acetatu,

dimetilformamidu i acetonitrilu, dok je nerastvorljiv u alkoholima, petroletru, dietil-etri i vodi. PCL je termoplastični polimer koga kao takvog karakterišu temperatura prelaska u staklasto stanje na  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  i temperatura topljenja u opsegu od  $56\text{-}65\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Temperatura dekompozicije PCL-a iznosi  $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Hemijski je rezistentan prema vodi, ulju, rastvaračima i hloru (Siracusa et al., 2008; Labet i Thielemans, 2009; Woodruff i Hutmacher, 2010). Na osnovu mehaničkih karakteristika (Jungov modul elastičnosti, zatezna čvrstina, izduženje pri kidanju) ovaj polimer se definiše kao fleksibilan što omogućava dizajn i razvoj različitih sistema u formi mikrosfera, nanočestica, vlakana, hidrogelova i filmova na bazi PCL-a (Dash i Konkimalla, 2012).

Prethodno navedene karakteristike PCL-a, kao i komercijalna dostupnost, pristupačnost, laka obradivost, dobra kompatibilnost sa drugim polimerima, kontrola difuzije, biokompatibilnost i biorazgradivost čine ovaj polimer veoma interesantnim za različite primene. Intenzivna istraživanja su istakla veliki potencijal korišćenja PCL-a kao polimernog matriksa pri razvoju sistema za kontrolisanu dostavu lekova. Pored toga, PCL privlači veliki interes u inženjerstvu tkiva i regenerativnoj medicini kao biomaterijal za razvoj *in vivo* mehaničkih potpora za regeneraciju oštećenog tkiva (engl. *scaffold*), kao i za razvoj implantata i obloga za rane (Woodruff i Hutmacher, 2010; Dash i Konkimalla, 2012). U prehrambenoj industriji PCL privlači pažnju kao polimerni matriks za inkapsulaciju ili inkorporaciju aktivnih komponenti, odnosno za razvoj novih sistema dostave aktivnih komponenti i dijetetskih suplemenata, kao i za razvoj aktivnih ambalažnih materijala (Salmieri i Lacroix, 2006; Aytac i Uyar, 2016).

Biorazgradivost je veoma važna karakteristika PCL-a, posmatrano sa aspekta njegove primene kao polimernog matriksa za razvoj aktivnih ambalažnih materijala. Različiti procesi se mogu primeniti za biorazgradnju PCL-a i to: mezofilna digestija ( $\leq 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) u prisustvu anaerobnih bakterija, kao i kompostiranje u domaćinstvima ( $\leq 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ili na industrijskom nivou ( $50\text{-}60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) u prisustvu aerobnih bakterija i gljiva (Rujnić-Sokele i Pilipović, 2017). Biorazgradivost zavisi od molekulske mase, stepena kristaliničnosti polimera i uslova razgradnje, pa može trajati od nekoliko meseci do nekoliko godina (Labet i Thielemans, 2009). Strukturno, PCL je linearni poliestar kod kog su ponavljajuće jedinice vezane estarskim vezama koje su podložne enzimskoj razgradnji u prisustvu esteraza i lipaza iz prirode. Tako mnogi mikroorganizmi u prirodi, pre svega bakterije i gljive, luče enzime koji mogu raskidati estarske veze i u potpunosti razgraditi PCL (Slika 1.8.). Zbog nerastvorljivosti u vodi i veličine molekula polimera, bakterije ne mogu direktno razgrađivati polimer kroz biohemijske procese u svojim ćelijama. Iz tog razloga, mehanizam biorazgradnje se zasniva na nehomogenoj eroziji površine koja je praćena difuzijom enzima u polimerni matriks, raskidanjem estarskih veza, depolimerizacijom, fragmentacijom i brzim smanjenjem mase materijala. Biorazgradnji prvo podležu krajevi polimernih lanaca i amorfni segmenti materijala, a potom kristalni segmenti. Kada se molarna masa polimera dovoljno smanji nastali intermedijeri ulaze u metaboličke procese mikroorganizama pri čemu kao krajnji proizvodi biorazgradnje nastaju ugljen-dioksid, voda, odnosno metan u slučaju anaerobne razgradnje, i biomasa (Tsuji et al., 1998; Eldsäter et al., 2000; Gross i Kalra, 2002; Mueller, 2006; Fukushima et al., 2010a; Fukushima et al., 2010b). Glavna komercijalna primena PCL-a je u proizvodnji biorazgradivih boca i kompostabilnih kesa (Khan et al., 2013).



Slika 1.8. Mehanizam biorazgradnje polimernih materijala (Mueller, 2006; slika uz dozvolu i modifikaciju preuzeta od izdavača Elsevier)

Potencijal primene PCL-a kao polimernog matriksa za razvoj ekološki prihvatljivih aktivnih materijala predstavlja predmet raznih studija. Tako su na primer Martínez-Abad et al. (2013) izlivanjem iz rastvora razvili film na bazi PCL-a sa inkorporiranim cinamaldehydom koji je ispoljio antibakterijsko delovanje prema *S. enterica* i *L. monocytogenes*. Aktivni ambalažni materijal na bazi PCL-a sa potencijalom primene za pakovanje prehrambenih proizvoda razvili su i Valdés García et al. (2020). U ovom slučaju tehnikom presovanja u kalupu dobijen je PCL film sa inkorporiranim ekstraktom ljuske badema. Rezultujući film ispoljio je antioksidativnu aktivnost, određenu kao sposobnost sakupljanja DPPH<sup>•</sup> slobodnih radikala, ali i efikasnost u očuvanju prženih badema od oksidacije lipida. PCL se može koristiti i u kombinaciji sa biopolimerima pri formulaciji i sintezi višeslojnih aktivnih materijala u cilju poboljšanja performansi i funkcionalnosti biopolimera. Tako je npr. tehnikom elektrospredanja nanet po sloj PCL vlakana sa inkorporiranim  $\beta$ -karotenom sa obe strane termoplastičnog filma na bazi skroba dobijenog presovanjem u kalupu. U odnosu na film na bazi skroba rezultujuća višeslojna struktura ispoljila je znatno bolja barijerna svojstva prema prolasku vodene pare i kiseonika zbog hidrofobne prirode PCL-a, kao i antioksidativnu aktivnost prema ABTS<sup>•+</sup> slobodnom radikalu zbog inkorporirane aktivne komponente (Fabra et al., 2016).

#### 1.4.2. PROTEINI

Težnja ka unapređenju čuvanja hrane, održivosti i korišćenju ekološki i ekonomski prihvatljivijih ambalažnih materijala usmerila je pažnju ka biopolimerima, odnosno polimerima koji se dobijaju iz obnovljivih izvora sirovina i koji su biorazgradivi. U poređenju sa sintetskim filmovima, biopolimerni filmovi su podložniji razgradnji, a često se mogu i konzimirati zajedno sa upakovanim proizvodom sprečavajući pojavu otpada što može doprineti smanjenju zagađenja životne sredine. Tako je jedan od pristupa pri razvoju aktivnih biorazgradivih materijala usmeren na razvoj jestivih materijala korišćenjem polimera dobijenih iz raznih prirodnih izvora. U ovu svrhu najčešće korišćeni biopolimeri su hidrokoloidi: proteini i polisaharidi. Pri tom, sve komponente koje se koriste za sintezu aktivnih jestivih filmova (biopolimeri, plastifikatori, aktivne komponente i rastvarači) moraju biti netoksične i bezbedne za primenu u kontaktu sa hranom (engl. *food grade*). Kao jestivi materijali najčešće se sintetišu filmovi u formi tankog sloja materijala tehnikama koje primenjuju vlažne i suve procese, pri čemu polimerni matriks omogućava kohezivnost i strukturni integritet. Tako dobijeni filmovi se mogu primenjivati kao samostalni ambalažni materijali za



pakovanje, prekrivanje ili umotavanje proizvoda, zatim za razdvajanje slojeva ili komponenti proizvoda (npr. konditorski proizvodi) kako bi se sprečila migracija sastojaka, ali i kao sloj višeslojnih ambalažnih materijala najbliži proizvodu. U ovom pogledu, važno ih je razlikovati od jestivih omotača (engl. *coatings*) koji se ne mogu koristiti samostalno, već se direktno nanose na površinu proizvoda, bilo prskanjem rastvora biopolimera po površini ili uranjanjem proizvoda u rastvor (Rhim i Ng, 2007; Lazić i Novaković, 2010; Hanani et al., 2012; Hanani et al., 2014; Lazić i Popović, 2015; Mellinas et al., 2016; Calva-Estrada et al., 2019).

Proteini se intenzivno ispituju kao biopolimeri sa potencijalom primene u inženjerstvu tkiva, sistemima kontrolisanog otpuštanja lekova i bioaktivnih komponenti, kao i za obloge za rane. Zbog zastupljenosti, sposobnosti stvaranja filmova, biorazgradivosti i nutritivne vrednosti proteini predstavljaju predmet brojnih istraživanja i u oblasti prehrambene tehnologije kao polimerni matriksi za razvoj biorazgradivih, aktivnih i potencijalno jestivih materijala. Proteini su biopolimeri, kompleksnog sastava i strukture čiju osnovnu gradivnu jedinicu čine aminokiseline. Amfifilne su prirode i imaju više funkcionalnih grupa, pa kao takvi mogu vezati i inkorporirati raznovrsne aktivne komponente, hidrofилne i hidrofobne prirode, kroz elektrostatička privlačenja, hidrofobne interakcije, vodonične i kovalentne veze. Filmovi na bazi proteina dobijaju se delimičnom denaturacijom polipeptidnih lanaca u prisustvu rastvarača i/ili elektrolita, promenom pH vrednosti i/ili zagrevanjem. Proteinski matriksi i filmovi nastaju kao rezultat uspostavljanja hidrofилnih i hidrofobnih veza između denaturisanih lanaca, pa se tako biomaterijali na bazi proteina mogu definisati kao stabilne 3D strukture. Filmove na bazi proteina karakteriše efikasna barijera prema prolasku O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> i aromatičnih jedinjenja. Mala propustljivost O<sub>2</sub> kroz filmove omogućava produženje trajnosti proizvoda bez stvaranja anaerobnih uslova. Mehaničke karakteristike filmova na bazi proteina zavise od molekulske mase, konformacije i distribucije aminokiselina, kao i interakcija između lanaca proteina. Interakcije između lanaca proteina mogu dovesti do nastanka krutih i krtih struktura filmova. U ovom slučaju, pri sintezi filmova zahteva se dodatak plastifikatora, malih molekula niske isparljivosti, koji smanjuju interakcije između lanaca proteina i povećavaju mobilnost lanaca što rezultuje smanjenjem zatezne jačine i povećanjem stepena izduženja pri kidanju, odnosno dobijanjem fleksibilnijih filmova. U ovom pogledu, glicerol ispoljava veliku efikasnost. Pored filmova, primenom tehnike elektropredenja se mogu dobiti aktivne strukture na bazi proteina čiji integritet čini niz vlakana sa dobrim funkcionalnim svojstvima. Ipak, kompleksna sekundarna i tercijarna struktura proteina otežava nastajanje vlakana. Iz tog razloga, proteini se za proces elektropredenja u vlakna moraju dobro rastvoriti do konformacije slučajne zavojnice. Za sintezu aktivnih materijala mogu se koristiti proteini biljnog i animalnog porekla (Slika 1.6.), a neki od njih se mogu dobiti iz sporednih proizvoda nastalih u prehrambenoj industriji. U nastavku je dat detaljniji uvid u karakteristike proteina koji se dobijaju iz sporednih proizvoda prehrambene industrije, a koji imaju potencijal primene za razvoj aktivnih, biorazgradivih ambalažnih materijala, što je veoma značajno sa aspekta održivosti, ekologije i ekonomije (Rhim i Ng, 2007; Reddy et al., 2013; Etxabide et al., 2018; Calva-Estrada et al., 2019; Kumar et al., 2019; Zhang et al., 2020).

#### 1.4.2.1. Zein

Zein je biljni protein iz grupe prolamina koji se nalazi u kukuruzu. Dobija se ekstrakcijom iz sporednih proizvoda prerade kukuruza, pri čemu se kao ekstrakcioni medijum najčešće koristi vodeni rastvor etanola ili izopropanola. Bistrenje ekstrakta vrši se centrifugiranjem, a precipitacija zeina hlađenjem, nakon čega se sušenjem dobija amorfan prah zeina žute boje. Čini ga nekoliko proteinskih frakcija različite rastvorljivosti:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ . Kvantitativno najzastupljenija frakcija je  $\alpha$ -zein koji ima strukturu uređenog  $\alpha$ -heliksa. Najzastupljenije aminokiseline u zeinu su glutaminska kiselina (21-26%) koja pripada klasi kiselih aminokiselina i leucin (20%), prolin (10%) i alanin (10%) koje pripadaju klasi nepolarnih aminokiselina. Zastupljenost nepolarnih aminokiselina doprinosi hidrofobnom karakteru zeina. Tako aminokiselinski sastav utiče na rastvorljivost zeina,

pa je zein rastvorljiv u binarnim rastvaračima vode i nižih alifatičnih alkohola, poput etanola i izopropanola, kao i u drugim organskim rastvaračima koji sadrže hidroksilne, karbonilne i amino grupe, dok je nerastvorljiv u vodi. Izoelektrična tačka zeina je na pH 6,2. Temperatura prelaska u staklasto stanje iznosi 165 °C i značajno se smanjuje pri povećanju plastičnosti. Zein je termički stabilan do temperature od 280 do 320 °C (Shukla i Cheryan, 2001; Lawton, 2002; Corradini et al., 2014).

U prehrambenoj industriji zein se može koristiti kao polimerni matriks za inkapsulaciju raznih aktivnih komponenti čime se omogućava njihovo kontrolisano otpuštanje. Pored toga, zein ima sposobnost stvaranja zaštitnih, termički rezistentnih premaza visokog sjaja, otpornih na prolazak masti, kiseonika i aromatičnih jedinjenja. Ovi zaštitni premazi mogu se nanositi na kartonsku ambalažu za pakovanje soli, kao i raznih konditorskih i pekarskih proizvoda čineći je otpornijom. Takođe, zein se može koristiti za dobijanje baza i premaza za gume za žvakanje, ali i za glazure za konditorske proizvode. Pokazano je da zaštitni premazi na bazi zeina mogu doprineti i produženju trajnosti prehrambenih proizvoda (npr. orašastih plodova, paradajza i jaja). Premazi na bazi zeina mogu se koristiti i za zaštitu etiketa na bocama i limenkama. Pored stvaranja zaštitnih premaza, zein ima perspektivu primene i kao polimer dobijen iz obnovljivih izvora za razvoj samostalnih, aktivnih, biorazgradivih ambalažnih materijala (Shukla i Cheryan, 2001; Lawton, 2002; Meng i Cloutier, 2014).

Zbog svoje molekulske mase, stepena polimerizacije, hemijske strukture i termoplastičnosti zein ima veoma dobru sposobnost stvaranja filmova kroz nastajanje 3D struktura stabilizovanih vodoničnim i disulfidnim vezama, kao i hidrofobnim interakcijama između lanaca proteina. Za dobijanje filmova na bazi zeina primenjuju se tehnike presovanja i izlivanja iz rastvora. Filmove karakteriše čvrstina, sjaj, termička rezistentnost, barijerno delovanje prema prolasku O<sub>2</sub> i CO<sub>2</sub>, biokompatibilnost i biorazgradivost. Tehnikom elektropredenja mogu se dobiti i materijali na bazi zeina strukturno sačinjeni od vlakana. Glavni nedostatak tankih filmova na bazi zeina predstavlja njihova krtost. U ovom pogledu, jedan od veoma efikasnih pristupa za poboljšanje karakteristika filmova na bazi proteina predstavlja priprema polimernih blendi. Tako se na primer mešanjem proteina sa drugim polimerima mogu dobiti materijali sa boljim fizičkim, mehaničkim i/ili funkcionalnim karakteristikama u odnosu na individualne filmove. Tako se biorazgradivi materijali mogu dobiti mešanjem proteina sa raznovrsnim polimerima, npr. sa poli(mlečnom kiselinom) (PLA), PCL-om, raznim polisaharidima, ali i drugim proteinima (Lawton, 2002; Torres-Giner et al., 2008; Corradini et al., 2014; Calva-Estrada et al., 2019; Zhang et al., 2020).

Važna karakteristika zeina za razvoj aktivnih ambalažnih materijala je kompatibilnost sa raznovrsnim aktivnim komponentama. Tako se zein može koristiti kao matriks za inkorporaciju aktivnih komponenti raznih struktura, npr. proteinskih (enzimi), polipeptidnih (bakteriocini), fenolnih (fenolne kiseline, flavonoidi, razni ekstrakti i etarska ulja bogati fenolnim jedinjenjima) (Arcan i Yemenicioğlu, 2011; Yemenicioğlu, 2016).

#### **1.4.2.2. Želatin**

Želatin je protein koji se dobija hidrolizom kolagena iz pratećih proizvoda prerade mesa. U zavisnosti od primenjenog predtretmana sirovina razlikuju se dva tipa želatina: A (predtretman kiselinom) i B (predtretman bazom). Nakon ekstrakcije vrelom vodom dobijeni rastvor želatina se filtrira, dejonizuje, koncentriše uparavanjem, sterilise i potom hladi do nastanka gela. Rezultujući gel se ekstrudira, suši i usitnjava čime se dobija želatin u formi praha ili granula, providan ili blago žute boje, bez ukusa i mirisa. Najzastupljenije aminokiseline u želatinu su glicin, koji čini oko 33%, prolin i hidrokisprolin, koji zajedno čine oko 22% ukupnih aminokiselina želatina. U hladnoj vodi želatin je nerastvorljiv, bubri i hidratiše, dok se u vodi zagrejanom na iznad 40 °C rastvara, pri čemu

nastaje koloidni rastvor u kom molekuli želatina imaju strukturu slučajne zavojnice (Hanani et al., 2014; Meng i Cloutier, 2014).

U prehrambenoj industriji želatin se koristi kao sredstvo za geliranje, stabilizaciju, emulgovanje i modifikovanje teksture raznih prehrambenih proizvoda. Karakteriše ga dobra sposobnost formiranja filmova, pa se može koristiti za sintezu aktivnih materijala. Pored uobičajeno korišćenog želatina svinjskog i goveđeg porekla, socijalni, kulturološki, religiozni i zdravstveno-bezbednosni razlozi su doveli i do upotrebe želatina koji se dobija iz riba. Rezultujući filmovi su transparentni, mogu se zaptivati toplotom, imaju zadovoljavajuće mehaničke karakteristike u pogledu čvrstine i elastičnosti, ispoljavaju efikasno barijerno delovanje prema prolasku UV zraka, O<sub>2</sub> i aromatičnih jedinjenja u uslovima niske do umerene relativne vlažnosti i biorazgradivi su. Filmovi na bazi želatina mogu se dobiti presovanjem u kalupima, ekstruzijom i izlivanjem iz rastvora. Pored toga, strukture na bazi želatina sačinjene od vlakana mogu se dobiti tehnikom elektropredenja pod uslovima pri kojim protein ima konformaciju slučajne zavojnice. Glavni problem koji ograničava širu primenu filmova na bazi želatina predstavlja hidrofилnost, odnosno osetljivost na visoku vlažnost i velika permeabilnost vodene pare (Hanani et al., 2012; Hanani et al., 2014; Hosseini et al., 2015; Hosseini i Gómez-Guillén, 2018; Calva-Estrada et al., 2019; Liu et al., 2019; Zhang et al., 2020).

Među prirodnim polimerima, želatin je najsličniji sintetičkim polimerima zbog svoje linearne strukture, prilično ograničenog monomernog sastava i polidisperznosti. Istraživanja su pokazala da se mehaničke karakteristike filmova na bazi proteina mogu poboljšati inkluzijom želatina pri čemu nastaju čvršći i fleksibilniji filmovi u odnosu na kontrolne filmove bez želatina. Ovaj efekat se pripisuje vlaknastoj tercijarnoj strukturi želatina, kao i međumolekulskim interakcijama između proteina što omogućava dobijanje strukturno uređenijih filmova (Cao et al., 2007; Song et al., 2014). U ovom pogledu, priprema blende na bazi zeina i želatina omogućila bi kombinovanje karakteristika ova dva proteina i dobijanje materijala sa boljim karakteristikama u odnosu na materijale na bazi samo jednog proteina. Preciznije, uloga zeina je da smanji osetljivost želatina prema vodi, dok je uloga želatina da smanji krtost zeina.

Višeslojni aktivni film na bazi zeina i želatina kao aktivni ambalažni materijal razvili su Xia et al. (2019). Ovaj jestivi višeslojni film dobijen je laminacijom tri filma izlivena iz rastvora i to: spoljašnjeg hidrofobnog sloja od zeina, središnjeg hibridnog sloja kog čine zein i želatin i unutrašnjeg hidrofilnog sloja želatina. Komercijalni polifenol dobijen iz čaja inkorporiran je u različitim koncentracijama u središnji i unutrašnji sloj filma, tako da se gradijent koncentracije kretao od središnjeg ka unutrašnjem sloju. Na ovaj način postignuto je produženo otpuštanje aktivne komponente iz višeslojnog filma. Pored toga, višeslojni film sa inkorporiranim polifenolom čaja ispoljio je sposobnost očuvanja trajnosti plodova svežeg i sečenog voća kroz kontrolu gubitka vode, potamnjenja i rasta mikroorganizama.

## 1.5. AKTIVNE KOMPONENTE

Pri dizajnu i razvoju aktivnih ambalažnih materijala za pakovanje hrane izbor aktivne komponente koja će doprineti funkcionalnosti materijala u pogledu neutralizacije slobodnih radikala i/ili kontrole i inhibicije rasta bakterija predstavlja još jedan važan korak. U ovom pogledu, fokus je usmeren ka ispitivanju potencijala korišćenja aktivnih konstituenata izolovanih iz prirodnih izvora zbog manje toksičnosti i veće bezbednosti u odnosu na sintetičke aditive koji se uobičajeno koriste za produženje trajnosti prehrambenih proizvoda. Dodatne prednosti korišćenja prirodnih aktivnih konstituenata ogledaju se u njihovoj bioaktivnosti i nutraceutičkom potencijalu (Carocho et al., 2014; Majid et al., 2018).

Izbor aktivne komponente zavisi od specifične aktivnosti koju je potrebno postići. Važno je da aktivna komponenta i polimer budu kompatibilni i da se inkorporacijom postigne homogena distribucija aktivne komponente unutar matriksa polimera, kao i da se omogući njeno otpuštanje iz matriksa u proizvod ili njegovu atmosferu kako bi se ispoljilo određeno aktivno delovanje. Pored postizanja funkcionalnih karakteristika u pogledu antioksidativnog i antimikrobnog delovanja, inkorporacija aktivnih komponenti može dovesti i do promena raznih karakteristika materijala, npr. morfoloških, mehaničkih, barijernih, toplotnih. Iz ovog razloga je veoma važno ispitati karakteristike materijala pre i posle inkorporacije aktivnih komponenti kako bi se što bolje razumele interakcije između inkorporirane komponente i polimernog matriksa (Valdés et al., 2015; Majid et al., 2018).

### **1.5.1. BILJNI EKSTRAKTI**

Začinske i lekovite biljke se tradicionalno koriste širom sveta kao sredstva za aromatizovanje, začinjavanje i bojenje prehrambenih proizvoda, ali i za konzervisanje. Zbog pozitivnih efekata koje ispoljavaju na zdravlje ljudi koriste se i u medicini. U ovom pogledu, biološka aktivnost začinskih i lekovitih biljaka koja obuhvata brojne pozitivne fiziološke efekte, kao i antioksidativnu i antimikrobnost, pripisuje se sintezi sekundarnih biljnih metabolita (Rubió et al., 2013; Valdés et al., 2015).

Najbogatiji izvor antioksidanasa u ljudskoj ishrani predstavljaju upravo začinske i lekovite biljke pri čemu se naročito ističu vrste iz familija Apiaceae i Lamiaceae. Među bioaktivnim konstituentima sa antioksidativnom aktivnošću posebna pažnja pridaje se fenolnim jedinjenjima čije antioksidativno delovanje potiče od prisustva  $-OH$  grupa i konjugovanih dvostrukih veza aromatičnog prstena. Mehanizam antioksidativnog delovanja fenolnih jedinjenja zasniva se na redoks potencijalu, sposobnosti sakupljanja slobodnih radikala i prekidanja lančanih reakcija, helaciji prelaznih metala, gašenju aktivnosti reaktivnih kiseoničnih vrsta i/ili uklanjanju kiseonika. Fenolna jedinjenja kao antioksidanse karakteriše jaka sposobnost da doniraju vodonik iz  $-OH$  grupa pri čemu sama fenolna jedinjenja postaju radikali koje stabilizuje rezonantna delokalizacija elektrona unutar aromatičnog prstena i nastanak strukture hinona. Glavni antioksidativni konstituenti biljaka su fenolne kiseline (npr. galna, protokatehinska, kafeinska, ruzmarinska kiselina), diterpeni (npr. karnozol i karnozinska kiselina), flavonoidi (npr. kvercetin i katehin), konstituenti etarskih ulja (npr. eugenol, karvakrol, timol). Antioksidativno delovanje ovih biljnih konstituenata predstavlja predmet brojnih studija koje su ukazale na zavisnost antioksidativne aktivnosti od hemijske strukture (Brewer, 2011; Rubió et al., 2013; Valdés et al., 2015).

Raznovrsnost aktivnih fitohemikalija začinskih i lekovitih biljaka omogućava njihovo korišćenje i sa ciljem kontrole i inhibicije rasta mikroorganizama. Tako fenolna jedinjenja privlače veliku pažnju kao biljni konstituenti koji pored antioksidativne, ispoljavaju i antimikrobnost. Njihovo antibakterijsko delovanje prema bakterijama izazivačima kvarenja hrane, ali i patogenim bakterijama predstavlja predmet brojnih studija. Mehanizam antibakterijskog delovanja ovih aktivnih jedinjenja nije u potpunosti razjašnjen, jer ga čini niz interakcija i aktivnosti koje se simultano odvijaju. Generalno, mehanizam antibakterijskog delovanja aktivnih komponenti prirodnog porekla zasniva se na degradaciji ćelijskog zida, oštećenju citoplazmatične membrane i proteina membrane što dovodi do izlivanja sadržaja iz ćelija i koagulacije citoplazme. Pored toga, ova jedinjenja menjaju odnos proteina i lipida u membrani, dovode do izlivanja jona kalijuma, ometaju funkcionalnost membrane i dovode do lize ćelijskog zida. U literaturi je prijavljeno i da ometaju rad metaboličkih enzima i aktivni transport, kao i da dovode do rasipanja energije ćelija. Slično kao kod antioksidativne aktivnosti, struktura fenolnih jedinjenja utiče i na antimikrobnost. Tako npr. kod fenolnih kiselina vrsta, pozicija i broj supstituenata na benzenovom prstenu i dužina zasićenog lanca određuju antioksidativni i antimikrobni potencijal. Osim sposobnosti kontrole i inhibicije rasta bakterija, ekstrakti začinskih i lekovitih biljaka ispoljavaju i

antimikrobnu aktivnost prema širokom spektru plesni i kvasaca (Shan et al., 2007; Negi, 2012; Cetin-Karaca i Newman, 2015).

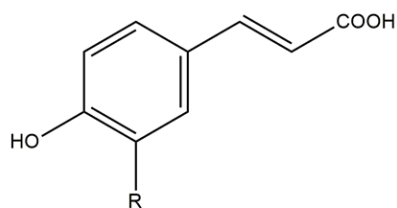
Ekstrakcija predstavlja jedan od efikasnih načina izolovanja i koncentrisanja aktivnih jedinjenja iz biljnog materijala. Tako ekstrakte čine rastvorljive frakcije izolovane iz biljnog materijala rastvaranjem jedinjenja od interesa u rastvaračima odgovarajuće polarnosti (Brewer, 2011). Korišćenje biljnih ekstrakata omogućava sinergističko delovanje raznih fenolnih jedinjenja, što je prednost u odnosu na korišćenje izolovanih i prečišćenih individualnih molekula (Carocho et al., 2015). Iz tog razloga se intenzivno ispituje potencijal korišćenja ekstrakata lekovitih i začinskih biljaka pri razvoju aktivnih ambalažnih materijala. Ideja je da se korišćenjem prirodnih izvora aktivnih jedinjenja postignu antioksidativna i/ili antimikrobna funkcionalnost materijala (Valdés et al., 2015; Yemenicioğlu, 2016). Kako je prethodno pomenuto, pH vrednost, konstituenti i matriks prehrambenih proizvoda, kao i uslovi pripreme i skladištenja mogu ograničiti efikasnost delovanja aktivnih konstituenata izolovanih iz prirodnih izvora. U ovom pogledu, inkorporacija ekstrakata u matriks polimera predstavlja efikasan pristup za postizanje stabilnosti aktivnih konstituenata i očuvanje njihove aktivnosti (Brewer, 2011; Nedovic et al., 2011).

### 1.5.2. ŽALFIJA

Žalfija (*Salvia officinalis* L.) je višegodišnja razgranata biljka iz familije Lamiacea. Potiče sa područja Bliskog istoka i Mediterana, ali se danas gaji širom sveta. Tradicionalno se koristi u pripremi hrane kao začinska i aromatična biljka. Koristi se i u preparatima insekticida, kao i u kozmetičkim formulacijama i aromaterapiji. Pored toga, pozitivni efekti žalfije na zdravlje cenjeni su još od vremena starih Rimljana preko srednjeg veka, o čemu svedoči i sačuvana izreka: „*Cur moriatur homo cui Salvia crescit in horto?*“ - „Zašto bi umro čovek kome u vrtu raste žalfija?“. Tako se žalfija koristi i u medicinske svrhe za lečenje raznih poremećaja, kao što su čir, reumatizam, vrtoglavica, paraliza, hiperglikemija, hiperlipidemija, dispepsija, prekomerno znojenje, kognitivni poremećaji povezani sa starenjem, razne upale, poput grla, bronhija i kože. Takođe, žalfija ispoljava i antioksidativnu i antimikrobnu aktivnost, kao i antikancerogene efekte (Kamatou et al., 2008; Ghorbani i Esmailizadeh, 2017).

Širok spektar fitohemikalija je identifikovan u cvetovima, listovima i stabljikama *S. officinalis* uključujući alkaloidne, ugljene hidrate, masne kiseline, glikozidne derivate, fenolna jedinjenja, terpenoide i voskove (Ghorbani i Esmailizadeh, 2017). Ekstrakti žalfije su bogat izvor fenolnih jedinjenja. Identifikovana fenolna jedinjenja pretežno pripadaju klasama fenolnih kiselina i flavonoida. Među identifikovanim terpenoidima naročito se ističu diterpeni. Njihove hemijske strukture su prikazane na Slici 1.9. Tako je identifikovano prisustvo kafeinske, ruzmarinske, ferulične, *p*-kumarne, *p*-hidroksibenzoeve i galne kiseline, kao i derivata ruzmarinske kiseline. Većina identifikovanih flavonoida pripada grupi flavona i to su uglavnom luteolin i njegovi derivati, pre svega luteolin-7-*O*-glukozid, kao i apigenin i njegovi derivati, pre svega apigenin-7-*O*-glukozid. Među identifikovanim diterpenima su karnozinska kiselina, karnozol, metil karnozat, rozmanol i njegovi izomeri. Od identifikovanih fenolnih jedinjenja ruzmarinska kiselina je kvantitativno najdominantnija fenolna kiselina, luteolin-7-*O*-glukozid je najdominantniji flavonoid, dok su rozmanol i karnozinska kiselina najdominantniji diterpeni. U ekstraktima žalfije identifikovano je i prisustvo triterpenskih kiselina, od kojih je najdominantnija ursolna kiselina, praćena oleanolnom kiselinom (Farhat et al., 2013; Kontogianni et al., 2013; Martins et al. 2015).

### FENOLNE KISELINE

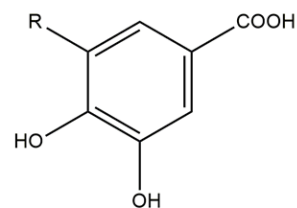


derivati cinamične kiseline

R = H: *p*-kumarna kiselina

R = OH: kafeinska kiselina

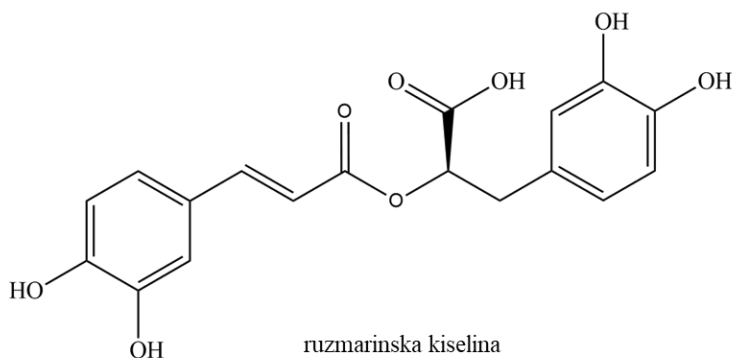
R = OCH<sub>3</sub>: ferulična kiselina



derivati benzojeve kiseline

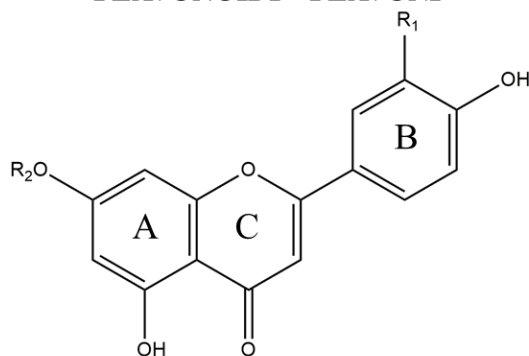
R = H: protokatehinska kiselina

R = OH: galna kiselina



ruzmarinska kiselina

### FLAVONOIDI - FLAVONI



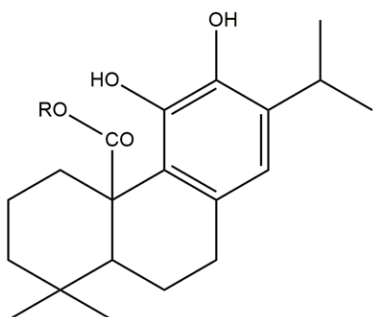
R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = H: luteolin

R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = glu: luteolin-7-*O*-glukozid

R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = H: apigenin

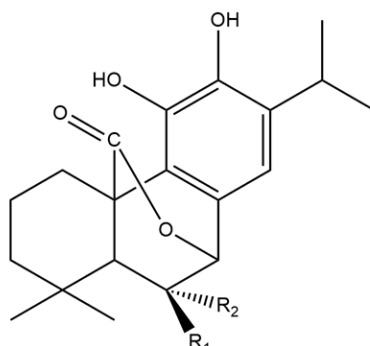
R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = glu: apigenin-7-*O*-glukozid

### DITERPENI



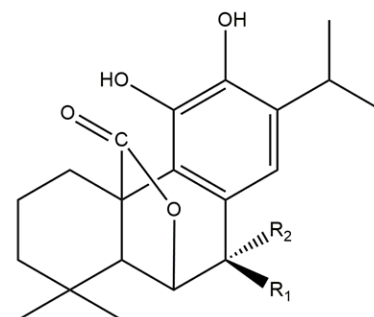
R = H: karnozinska kiselina

R = CH<sub>3</sub>: metil-karnozat



R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = H: karnozol

R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = H: epirozozmanol



R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = OH: rozmanol

R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = H: epirozozmanol

**Slika 1.9.** Strukture glavnih aktivnih fitohemikalija identifikovanih u žalfiji

Antioksidativno delovanje ekstrakata žalfije predmet je brojnih studija. Lu i Foo (2001) su u svojoj studiji pokazali da fenolna jedinjenja žalfije ispoljavaju antioksidativnu aktivnost određenu kao sposobnost sakupljanja DPPH• i superoksid anjonskih radikala, kao i sposobnost redukcije Mo(VI) u Mo(V). U navedenoj studiji, ruzmarinska kiselina i njeni oligomerni derivati ispoljili su efikasno antioksidativno delovanje, koje je jače u odnosu na delovanje troloksa, hidrosolubilnog analoga vitamina E. Antioksidativna aktivnost ruzmarinske kiseline pripisana je *orto*-dihidroksibenzenovoj (katehol) strukturi koja omogućava sakupljanje slobodnih radikala, kao i ostacima kafeinske kiseline koji inhibiraju ksantin oksidazu. Generalno, antioksidativna aktivnost žalfije u velikoj meri potiče od fenolnih kiselina, pre svega derivata cinamičnih kiselina, zbog njihove katehol strukture. Sa druge strane, flavonoidi žalfije, luteolin i apigenin glukozidi, pokazuju slabo do umereno antioksidativno delovanje. Naime, u strukturi flavonoida B prsten doprinosi njihovom antioksidativnom delovanju zbog katehol strukture, dok A prsten ima znatno slabiju aktivnost, koju dodatno slabi inkluzija antioksidativno neaktivnih glikozidnih jedinica. Takođe, istraživanja su pokazala da *S. officinalis* ekstrakt ispoljava sposobnost sakupljanja ABTS•+ slobodnog radikala, što je pripisano katehol strukturi sadržanoj u fenolnim kiselinama i diterpenima (Shan et al., 2005). Pored toga, antioksidativno delovanje ekstrakata *S. officinalis* potvrđeno je i u pogledu sposobnosti redukovanja Fe(III) u Fe(II), inhibicije dekolorizacije β-karotena, inhibicije peroksidacije lipida (Martins et al. 2015), kao i sposobnosti sakupljanja hidroksil (OH•) (Dorman et al., 2003) i peroksil (ROO•) slobodnih radikala (Stagos et al., 2012).

Antimikrobno delovanje ekstrakata *S. officinalis* prema širokom spektru mikroorganizama je takođe potvrđeno. U zavisnosti od vrste, građe i strukture mikroorganizmi ispoljavaju različitu osetljivost prema delovanju ekstrakta što određuje efikasnost ekstrakta u pogledu kontrole ili inhibicije rasta mikroorganizama. Inhibitorno delovanje ekstrakata žalfije potvrđeno je prema rastu raznih sojeva patogenih bakterija, poput *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Salmonella anatum*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*. Osim antibakterijskog, pokazano je i antifungalno delovanje ekstrakata žalfije prema *Candida albicans* i *Aspergillus niger* (Veličković et al., 2003; Shan et al., 2007; Mosafa et al., 2014). Inhibitorno delovanje konstituenata žalfije na rast bakterija pokazano je za triterpenske kiseline (ursolna i oleanolna kiselina) i diterpene (karnozol i karnozinska kiselina) (Ghorbani i Esmaeilzadeh, 2017).

Potencijal korišćenja žalfije kao aktivnog konstituenta pri razvoju aktivnih ambalažnih materijala za pakovanje prehrambenih proizvoda ispitivan je u nekoliko studija. Tako su Oudjedi et al. (2019) razvili antioksidativni materijal u formi višeslojnog filma dobijenog laminacijom PET-a i LDPE-a pri čemu je korišćena adhezivna formula sa inkorporiranim ekstraktom žalfije. Inkorporacija ekstrakta žalfije u adhezivnu formulu nije uticala na boju filma. Aktivno delovanje ovog ambalažnog materijala pokazano je na primeru čipsa kao sposobnost inhibicije oksidacije lipida čipsa tokom 20 dana skladištenja na 40 °C. Pakovanje čipsa u ambalažu sa inkorporiranim ekstraktom žalfije rezultovalo je smanjenjem oksidacije lipida za 40% u odnosu na pakovanje u kontrolnu ambalažu, bez ekstrakta. Gavril et al. (2019) su takođe razvili antioksidativni materijal sa žalfijom kao aktivnim konstituentom, ali koristeći biorazgradivi polimer. Naime, presovanjem rastopa u kalupu dobijeni su filmovi na bazi poli(mlečne kiseline) sa inkorporiranim prahom lišća žalfije. Njihova antioksidativna aktivnost potvrđena je kao redukciona moć i sposobnost sakupljanja OH• slobodnih radikala. Inkorporacija lista žalfije rezultovala je smanjenjem termičke stabilnosti i zatezne jačine filmova. Pored toga, inkorporacija je doprinela značajnom smanjenju migracije linearnih i cikličnih oligomera iz polimera u medijume koji simuliraju prehrambene proizvode. Sa druge strane Akcan et al. (2017) su primenom tehnike izlivanja iz rastvora razvili jestiv film na bazi izolata proteina surutke sa inkorporiranim ekstraktom žalfije. Karakteristike filmova nisu ispitivane u okviru navedene studije, ali je ispitana potencijalna primena. Tako je kuvano mleveno meso u potpunosti obloženo filmogenim rastvorima što je omogućilo kontrolu hidrolize i oksidacije lipida tokom skladištenja na -18 °C u trajanju od 60 dana.

### **1.5.3. PREGLED AKTIVNIH MATERIJALA NA BAZI BIORAZGRADIVIH POLIMERA I EKSTRAKATA BILJA**

Pregled primera aktivnih materijala za pakovanje na bazi biorazgradivih polimera različitog porekla dat je u Tabeli 1.2. Aktivnost navedenih materijala postignuta je inkorporacijom ekstrakata lekovitog, začinskog i aromatičnog bilja za šta su primenjene razne tehnike. Takođe, efekti inkorporacije ekstrakata na karakteristike materijala su navedeni u Tabeli 1.2.



Tabela 1.2. Pregled aktivnih materijala za pakovanje na bazi biorazgradivih polimera i biljnih ekstrakata

Polimer	Aktivna komponenta	Tehnika	Efekat inkorporacije aktivne komponente na svojstva materijala	Referenca
hidroksipropil-metilceluloza	ekstrakt zelenog čaja inkapsulisan u nanočestice poli(mlečne kiseline)	izlivanje filmova iz rastvora	<ul style="list-style-type: none"> <li>- neznatne promene boje filma</li> <li>- postojanje molekulskih interakcija između konstituenata filmova</li> <li>- sposobnost otpuštanja ekstrakta iz filmova u medijum koji simulira prehrambene proizvode sa visokim sadržajem lipida</li> <li>- antioksidativno delovanje otpuštenog ekstrakta prema DPPH• slobodnom radikalu</li> </ul>	Wrona et al., 2017b
hitozan	ekstrakt lišća manga	izlivanje filmova iz rastvora	<ul style="list-style-type: none"> <li>- povećanje sadržaja inkorporiranog ekstrakta rezultovalo je povećanjem debljine i neprozirnosti</li> <li>- smanjenje sadržaja vode, stepena hidrofилности, rastvorljivosti u vodi i propustljivosti vodene pare</li> <li>- povećanje zatezne jačine i modula elastičnosti, smanjenje izduženja pri kidanju</li> <li>- povećanje sadržaja inkorporiranog ekstrakta rezultovalo je jačom sposobnošću sakupljanja DPPH• i ABTS<sup>•+</sup> slobodnih radikala, kao i redukcije Fe(III)-TPTZ</li> <li>- sposobnost očuvanja indijskog oraha od oksidacije</li> </ul>	Rambabu et al., 2019
skrob	ekstrakt ruzmarina	izlivanje filmova iz rastvora	<ul style="list-style-type: none"> <li>- neznatan uticaj na debljinu i sadržaj vode</li> <li>- neznatan uticaj na zateznu jačinu</li> <li>- smanjenje hidrofилности filmova</li> <li>- povećanje propustljivosti vodene pare kroz filmove</li> <li>- povećanje modula elastičnosti, smanjenje izduženja pri kidanju</li> <li>- povećanje sadržaja inkorporiranog ekstrakta rezultovalo je većim sadržajem ukupnih fenolnih jedinjenja, efikasnijim barijernim delovanjem prema prolasku UV svetla, jačom antioksidativnom aktivnošću i većim očuvanjem integriteta tokom kompostiranja</li> </ul>	Piñeros-Hernandez et al., 2017

*Sinteza i karakterizacija aktivnih vlakana i filmova na bazi poli( $\epsilon$ -kaprolaktona) i zeina*

			<ul style="list-style-type: none"> <li>- sposobnost otpuštanja ukupnih fenolnih jedinjenja u medijum koji simulira hidrofilne prehrambene proizvode</li> </ul>	
biokompozit skroba i poli(vinil alkohola)	ekstrakt mate	kombinovanje tehnika izlivanja iz rastvora i elektropredenja	<ul style="list-style-type: none"> <li>- povećanje modula elastičnosti, neznatan uticaj na zateznu jačinu i izduženje pri kidanju</li> <li>- smanjenje propustljivosti UV svetla</li> <li>- sposobnost sakupljanja DPPH<sup>•</sup> slobodnih radikala</li> </ul>	López-Córdoba et al., 2019
poli(3-hidroksibutirat-co-3-hidroksivalerat)	ekstrakt ruzmarina; ekstrakt zelenog čaja	elektropredenje praćeno termičkim tretmanom	<ul style="list-style-type: none"> <li>- pojava žute boje i smanjenje transparentnosti</li> <li>- smanjenje stepena hidrofobnosti</li> <li>- neznatan uticaj na termičku stabilnost</li> <li>- sposobnost sakupljanja DPPH<sup>•</sup> slobodnih radikala</li> <li>- inhibicija rasta <i>S. aureus</i> i <i>E. coli</i></li> </ul>	Figuroa-Lopez et al., 2019
poli(mlečna) kiselina	ekstrakt zelenog čaja	ekstruzija	<ul style="list-style-type: none"> <li>- smanjenje prolaska vodene pare kroz filmove</li> <li>- smanjenje zatezne jačine i povećanje izduženja pri kidanju</li> <li>- zaštita dimljenog lososa od oksidacije lipida</li> </ul>	Martins et al., 2018
zein	ekstrakt mate	elektropredenje	<ul style="list-style-type: none"> <li>- inkorporacijom ekstrakta postignuta je termička stabilnost u odnosu na ekstrakt u slobodnom obliku</li> <li>- sposobnost otpuštanja ekstrakta iz vlakana u medijum koji simulira prehrambene proizvode hidrofilnog karaktera</li> <li>- formulacija sa najvišim sadržajem inkorporiranog ekstrakta ispoljila je najjače antioksidativno delovanje prema DPPH<sup>•</sup> slobodnom radikalu</li> </ul>	Pinheiro Bruni et al., 2020
blenda hitozana i poli(vinil alkohola)	ekstrakt nane	izlivanje filmova iz rastvora	<ul style="list-style-type: none"> <li>- bez uticaja na propustljivost vodene pare</li> <li>- postizanje antioksidativnog delovanja prema DPPH<sup>•</sup> slobodnom radikalu</li> <li>- sposobnost otpuštanja ukupnih fenolnih jedinjenja u zavisnosti od temperature medijuma</li> </ul>	Kanatt et al., 2012
želatin	ekstrakt kurkume	izlivanje filmova iz rastvora	<ul style="list-style-type: none"> <li>- interakcije između konstituenata filmova rezultovale su poboljšanjem mehaničkih svojstava i smanjenjem permeabilnosti vodene pare</li> </ul>	Bitencourt et al., 2014

			<ul style="list-style-type: none"> <li>- jače barijerno delovanje prema prolasku UV i vidljive svetlosti</li> <li>- povećanje sadržaja inkorporiranog ekstrakta rezultovalo je jačom antioksidativnom aktivnošću prema DPPH• i ABTS•+ slobodnim radikalima</li> </ul>	
alginat	ekstrakt ženšena	umrežavanje jonima kalcijuma i izlivanje filmova iz rastvora	<ul style="list-style-type: none"> <li>- smanjenje zatezne jačine i modula elastičnosti</li> <li>- bez uticaja na propustljivost vodene pare</li> <li>- postizanje antioksidativnog delovanja prema DPPH• slobodnom radikalumu</li> </ul>	Norajit et al., 2010
etilen vinil alkohol kopolimer	ekstrakt zelenog čaja	ekstruzija	<ul style="list-style-type: none"> <li>- pojava braon boje</li> <li>- poboljšanje barijernog delovanja prema prolasku vodene pare i kiseonika u uslovima niske do umerene relativne vlažnosti, osetljivost na uslove visoke relativne vlažnosti</li> <li>- poboljšanje termičke rezistentnosti i povećanje stepena kristaliničnosti</li> <li>- delimična degradacija aktivnih komponenti tokom ekstruzije</li> <li>- antioksidativno delovanje prema DPPH• i ABTS•+ slobodnim radikalima</li> <li>- sposobnost otpuštanja aktivnih komponenti u medijume koji simuliraju hidrofилne i lipofilne proizvode</li> </ul>	López de Dicastillo et al., 2011
dvokomponentni sistem furcellarana i izolata proteina surutke	ekstrakt mate; ekstrakt belog čaja	izlivanje filmova iz rastvora	<ul style="list-style-type: none"> <li>- efekat na sadržaj vode, rastvorljivost, bubrenje i propustljivost vodene pare je u zavisnosti od vrste inkorporiranog ekstrakta</li> <li>- povećanje modula elastičnosti i smanjenje izduženja pri kidanju nakon inkorporacije ekstrakta mate; neznatan uticaj ekstrakta belog čaja</li> <li>- produženje trajnosti sira i eliminacija koliformnih bakterija</li> </ul>	Pluta-Kubica et al., 2020

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Osnovni cilj doktorske disertacije bio je sinteza aktivnih, biorazgradivih materijala sa potencijalom primene kao ambalažnih materijala za pakovanje prehrambenih proizvoda. U okviru ovog cilja postavljeno je nekoliko specifičnih ciljeva, a to su:

- ispitivanje potencijala korišćenja prirodnog ekstrakta kao aktivnog konstituenta materijala sa ciljem postizanja antioksidativne i antimikrobne funkcionalnosti materijala;
- ispitivanje potencijala primene biorazgradivih polimera različitog porekla kao matriksa za inkorporaciju prirodnog ekstrakta i dobijanje aktivnih materijala;
- sinteza aktivnih materijala različitih struktura;
- analiza uticaja inkorporacije prirodnog ekstrakta na karakteristike materijala.

U ovom pogledu, doktorska disertacija sačinjena je iz tri eksperimentalne sekcije.

**1. Priprema i karakterizacija ekstrakta žalfije kao model aktivnog konstituenta za sintezu aktivnih ambalažnih materijala.** Cilj inicijalnog dela disertacije bio je usmeren na određivanje optimalnih uslova ekstrakcije za dobijanje ekstrakta žalfije sa što većim sadržajem fenolnih jedinjenja, kao nosioca antioksidativne i antimikrobne aktivnosti. Nakon pripreme ekstrakta pod uslovima koji su prethodno definisani kao optimalni, cilj je usmeren na karakterizaciju ekstrakta kao potencijalnog aktivnog konstituenta za sintezu aktivnih ambalažnih materijala u pogledu sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, individualnih fenolnih kiselina, antioksidativne i antimikrobne aktivnosti.

**2. Sinteza i karakterizacija aktivnih, biorazgradivih ambalažnih materijala na bazi poli( $\epsilon$ -kaprolaktona).** U ovom delu disertacije cilj je bio usmeren na dobijanje aktivnih, biorazgradivih materijala sa potencijalom korišćenja za pakovanje hrane. Poli( $\epsilon$ -kaprolakton) je odabran za sintezu matriksa i inkorporaciju ekstrakta žalfije kao biorazgradiv polimer dobijen iz neobnovljivih izvora. Za sintezu materijala primenjena je tehnika elektropredenja praćena kratkotrajnim termičkim tretmanom kako bi se dobili materijali u formi kontinualnih, transparentnih, tankih filmova. U ovom pogledu, pažnja je usmerena na uslove i parametre procesa elektropredenja za kontinualnu proizvodnju vlakana ujednačenog oblika i veličine, kao i na ispitivanje uticaja različitih temperatura termičkog tretmana na efikasnost spajanja vlakana. Kako bi se što bolje razumeo efekat inkorporacije ekstrakta u polimerni matriks izvršena je opsežna karakterizacija i poređenje kontrolne formulacije filma, bez inkorporiranog ekstrakta, i formulacija sa različitim sadržajima inkorporiranog ekstrakta. U ovu svrhu, analiza je usmerena na sledeće karakteristike: morfologiju, debljinu, transparentnost, hidrofobnost površine, interakcije između aktivne komponente i polimernog matriksa, toplotna svojstva, termičku stabilnost, mehaničke karakteristike, permeabilnost vodene pare i arome, sposobnost otpuštanja aktivnih konstituenata u medijume koji simuliraju prehrambene proizvode, antioksidativnu aktivnost, antibakterijsku aktivnost i podložnost razgradnji u kompostu.

**3. Sinteza i karakterizacija aktivnih, biorazgradivih ambalažnih materijala na bazi zeina.** U ovom delu disertacije cilj je bio usmeren na dobijanje aktivnih, biorazgradivih i potencijalno jestivih materijala sa mogućnošću njihovog korišćenja kao kontaktnog sloja sa prehrambenim

proizvodom. Proteini su odabrani za sintezu matriksa i inkorporaciju ekstrakta žalfije u ovom segmentu disertacije. Cilj je bio da osnovu matriksa čini zein kao biopolimer dobijen iz obnovljivih izvora. Pored toga, razlog primene zeina bio je iskorišćenje sporednih proizvoda prerade kukuruza. Kako bi se dobili materijali na bazi zeina sa što boljim karakteristikama, jedan od fokusa ovog dela disertacije bio je usmeren na pripremu blendi zeina i želatina, čime se doprinosi i iskorišćenju pratećih proizvoda prerade mesa. Cilj sinteze u ovom segmentu disertacije bio je dobijanje različitih struktura materijala na bazi proteina, i to struktura sačinjenih od vlakana primenom tehnike elektropredenja i struktura kontinualnih filmova primenom tehnike izlivanja iz rastvora. Kako bi se što bolje razumeo efekat inkorporacije ekstrakta u polimerni matriks izvršena je opsežna karakterizacija i poređenje kontrolnih formulacija vlakana i filmova, bez inkorporiranog ekstrakta, i formulacija sa različitim sadržajima inkorporiranog ekstrakta. U ovu svrhu, analiza je usmerena na sledeće karakteristike: morfologiju, debljinu, transparentnost, interakcije između aktivne komponente i polimernog matriksa, toplotna svojstva, termičku stabilnost, sposobnost otpuštanja aktivnih konstituenata u medijume koji simuliraju prehrambene proizvode, antioksidativnu aktivnost, antibakterijsku aktivnost i podložnost razgradnji u kompostu.

## 3. MATERIJAL I METODE

### 3.1. MATERIJAL

#### Biljni materijal:

- list žalfije (*Salviae folium*; *Salvia officinalis* L.): Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, Srbija.

#### Polimeri:

- poli(etilen-oksidi) ( $M_n = 600.000$  g/mol): Acros Organics, Belgija;
- poli( $\epsilon$ -kaprolakton) ( $M_n = 80.000$  g/mol): Sigma Aldrich, SAD;
- zein: Acros Organics, Belgija;
- želatin: HiMedia Laboratories, Indija.

#### Plastifikator:

- glicerol: NRK inženjering, Srbija.

#### Rastvarači:

- acetonitril (HPLC čistoće): J.T. Baker, Fisher Scientific, Ujedinjeno Kraljevstvo;
- butanol (99,5%): Panreac Quimica SLU, Španija;
- dimetil sulfoksid (99,9%): VWR Chemicals, SAD;
- etanol (apsolutni): Panreac Quimica SLU, Španija;
- etanol (96%): Reahem, Srbija;
- hloroform (99,5%): Panreac Quimica SLU, Španija;
- metanol (HPLC čistoće): J.T. Baker, Fisher Scientific, Ujedinjeno Kraljevstvo;
- metanol (99,9%): Panreac Quimica SLU, Španija;
- mravlja kiselina (89-91%): Merck KGaA, Nemačka;
- sirćetna kiselina (glacijalna): Zorka Pharma - Hemija, Srbija.

#### Reagensi:

- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil: Sigma Aldrich, SAD;
- D-limonen: Sigma Aldrich, SAD;
- Folin-Ciocalteu: Merck KGaA, Nemačka;
- rezaurin: MP Biomedicals LLC, SAD.

#### Standardi:

- ( $\pm$ )-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina: Sigma Aldrich, SAD;
- ferulična kiselina: Sigma Aldrich, SAD;
- galna kiselina: Merck Schuchardt OHG, Nemačka;
- kafeinska kiselina: Sigma Aldrich, SAD;

- *p*-kumarna kiselina: Sigma Aldrich, SAD;
- protokatehinska kiselina: Sigma Aldrich, SAD;
- ruzmarinska kiselina: EDQM, Francuska.

**Mikrobiološke podloge:**

- hranljivi agar: HiMedia Laboratories, Indija;
- hranljivi bujon: HiMedia Laboratories, Indija;
- komponente fermentacionog medijuma: Becton-Dickinson, SAD; Oxoid, Ujedinjeno Kraljevstvo; Sigma Aldrich, SAD;
- komponente medijuma mineralnih soli: Acros Organics, Belgija; AppliChem, Nemačka; Merck KGaA, Nemačka; Sigma Aldrich, SAD;
- Müeller Hinton agar: Merck KGaA, Nemačka;
- Müeller Hinton bujon: Merck KGaA, Nemačka.

**Soli:**

- natrijum hidrogen karbonat: Merck KGaA, Nemačka;
- natrijum karbonat: Fisher Scientific, Ujedinjeno Kraljevstvo; Merck KGaA, Nemačka.

## **3.2. EKSTRAKT ŽALFIJE**

### **3.2.1. PRIPREMA EKSTRAKTA ŽALFIJE**

Ekstrakt žalfije pripremljen je tehnikom maceracije. Uslovi ekstrakcije su najpre optimizovani u cilju dobijanja ekstrakta sa što većim sadržajem fenolnih jedinjenja, kao nosioca aktivnosti ekstrakta. U tu svrhu ispitana je efikasnost različitih rastvarača kao ekstrakcionih medijuma: destilovane vode, 30, 50, 70 i 96% (v/v) rastvora etanola u vodi. Za svaki ekstrakcioni medijum ispitani su različiti odnosi biljnog materijala i rastvarača: 1:10, 1:20, 1:30 i 1:40 (w/v). Ekstrakcija je vršena mešanjem na orbitalnom šejkeru (model 3005, GFL, Nemačka) pri konstantnoj rotaciji od 200 obr/min na sobnoj temperaturi u trajanju od 5, 15, 30, 60, 90, 120, 150 i 180 minuta.

Ekstrakt žalfije pripremljen pod uslovima pri kojima je dobijen najveći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja proceđen je kroz cediljku za čaj i medicinsku gazu, a rastvarač je iz filtrata uklonjen u univerzalnoj sušnici na 35 °C (model UF 55, Memmert GmbH + Co.KG, Nemačka). Prinos ekstrakcije izračunat je prema sledećoj jednačini:

$$\text{Prinos (\%)} = \frac{m_2}{m_1} \times 100 \quad (3.1.)$$

gde je:  $m_1$  masa suvog biljnog materijala korišćenog za pripremu ekstrakta (g), a  $m_2$  masa pripremljenog suvog ekstrakta (g).

Ovako pripremljen ekstrakt u suvom obliku analiziran je u pogledu sadržaja fenolnih jedinjenja i aktivnosti nakon čega je korišćen kao aktivni konstituent pri sintezi vlakana i filmova. Svi testovi karakterizacije ekstrakta urađeni su u tri ponavljanja.

### **3.2.2. KARAKTERIZACIJA EKSTRAKTA**

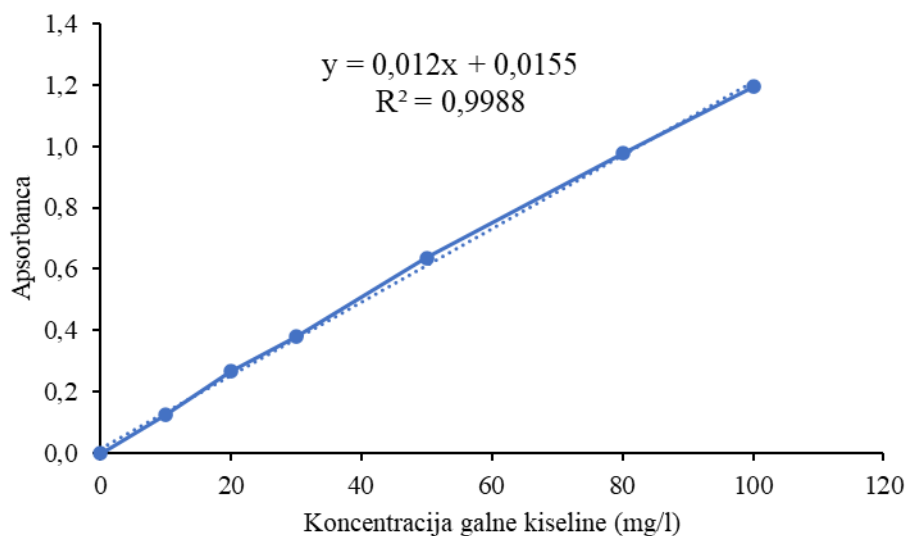
#### **3.2.2.1. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja**

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja ekstrakta žalfije određen je spektrofotometrijski prema metodi koja se zasniva na kolorimetrijskoj reakciji između fenolnih jedinjenja i Folin-Ciocalteu reagensa (Singleton i Rossi, 1965; Singleton et al., 1999). Tokom optimizacije uslova ekstrakcije, alikvoti ekstrakta su u navedenim vremenskim tačkama direktno uzimani za analizu, dok je ekstrakt žalfije u suvom obliku prethodno rekonstituisan u 50% (v/v) rastvoru etanola u vodi. U test epruvetu otpipetirano je 0,5 ml uzorka i 2,5 ml 10% (v/v) Folin-Ciocalteu reagensa u vodi. Reakciona smeša je snažno promešana i ostavljena na tamnom mestu na sobnoj temperaturi. Nakon 5 minuta, 2 ml rastvora natrijum karbonata (75 g/l) dodato je u reakcionu smešu koja je potom snažno promešana i ostavljena na tamnom mestu na sobnoj temperaturi 2 h. Slepa proba je pripremljena tako što je umesto 0,5 ml uzorka otpipetirano 0,5 ml odgovarajućeg rastvarača, zavisno od uzorka. Apsorbanca nastalog plavog obojenja očitana je na talasnoj dužini od 760 nm na UV/Vis spektrofotometru HALO DB-20S (Dynamica Scientific Ltd., Velika Britanija).

Galna kiselina je korišćena kao standard za konstruisanje kalibracione krive. Napravljen je osnovni rastvor galne kiseline u vodi koncentracije 100 mg/l, a zatim je od njega napravljena serija rastvora koncentracija od 10-80 mg/l. Vrednosti apsorbanci pripremljenih rastvora galne kiseline određene su prema prethodno opisanom postupku za određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja. U epruvetu koja predstavlja slepu probu umesto rastvora galne kiseline dodata je



destilovana voda. Na osnovu dobijenih rezultata napravljena je kalibraciona kriva  $A = f(c)$  (Slika 3.1.).



**Slika 3.1.** Kalibraciona kriva rastvora galne kiseline

Na osnovu jednačine kalibracione krive izračunata je koncentracija ukupnih fenolnih jedinjenja u ekstraktu. Rezultati su izraženi u mg ekvivalenata galne kiseline (GAE) po g biljnog materijala tokom optimizacije ekstrakcije, odnosno u mg ekvivalenata galne kiseline (GAE) po mg suvog ekstrakta korišćenog za sintezu aktivnih materijala.

### 3.2.2.2. Analiza fenolnih kiselina tečnom hromatografijom visokih performansi

Nakon određivanja optimalnih uslova ekstrakcije, identifikacija i kvantifikacija fenolnih kiselina u ekstraktu žalfije izvršena je tečnom hromatografijom visokih performansi (engl. *High Performance Liquid Chromatography* - HPLC). U tu svrhu upotrebljen je Bischoff tečni hromatografski sistem (Bischoff Chromatography, Nemačka) opremljen degazatorom, pumpom za mobilnu fazu i injektorom zapremine 20  $\mu$ l pod gradijentnim uslovima. Reverzno-fazna C18 kolona (dimenzije: 150  $\times$  4,6 mm; veličina čestica: 5  $\mu$ m; ProntoSIL 120-5-C18 AQ PLUS) korišćena je za razdvajanje fenolnih kiselina sa detekcijom na UV-Vis detektoru. U ovu svrhu korišćeni su standardi protokatehinske, ferulične, kafeinske, *p*-kumarne i ruzmarinske kiseline.

Pre analize, ekstrakt žalfije u suvom obliku (60 mg) rekonstituisan je u 50% (v/v) rastvoru etanola u vodi (20 ml), dok su neposredno pre injektiranja, uzorci i standardni rastvori filtrirani kroz špric filtere sa membranom od najlona i veličinom pora 0,45  $\mu$ m. Mobilnu fazu činio je sistem rastvarača: 0,2% (v/v) rastvor mravlje kiseline u vodi (rastvarač A) i acetonitril (rastvarač B). Razdvajanje fenolnih kiselina izvršeno je prema gradijentnom eluiranju primenjenom od strane Trifković (2016) uz blagu modifikaciju: 0-2 min 5-20% B, 2-20 min 20-55% B, 20-25 min 80% B, 25-30 min 80-100% B, pri konstantnom protoku od 0,8 ml/min. Talasna dužina detekcije ispitivanih kiselina iznosila je 290 nm, a određena je na osnovu UV-Vis spektara pojedinačnih rastvora standarda u metanolu koncentracije 100 mg/l (Prilog 1., Slika P1.1.). Naime, analizom UV-Vis spektara utvrđeno je da ispitivane kiseline pokazuju maksimum apsorpcije na različitim talasnim dužinama, ali istovremeno imaju plato u oblasti od 290-305 nm.

Kalibracioni rastvori koncentracija 1, 5, 10, 15 i 20 mg/l napravljeni su mešanjem pojedinačnih standardnih rastvora ispitivanih kiselina pripremljenih u metanolu. Za svaku od ispitivanih kiselina napravljene su kalibracione krive koje pokazuju zavisnost koncentracije (c)

(mg/l) od površine pika (A) i predstavljene su linearnim jednačinama  $c = kA$ . Parametri kalibracionih kriva dati su u Prilogu 1. (Tabela P1.1.). Hromatogram kalibracionog rastvora ispitivanih kiselina pokazuje razlike u retencionim vremenima, simetričnost i dobru razdvojenost pikova što ukazuje da se mogu koristiti u analitičke svrhe (Prilog 1., Slika P1.2.). Identifikacija fenolnih kiselina u ekstraktu izvršena je poređenjem retencionih vremena i spektara sa retencionim vremenima i spektrima standardnih rastvora i standardnim dodatkom, dok je kvantifikacija izvršena na osnovu površine pikova i jednačina kalibracionih kriva. Sadržaj fenolnih kiselina izražen je u mg/g suvog ekstrakta.

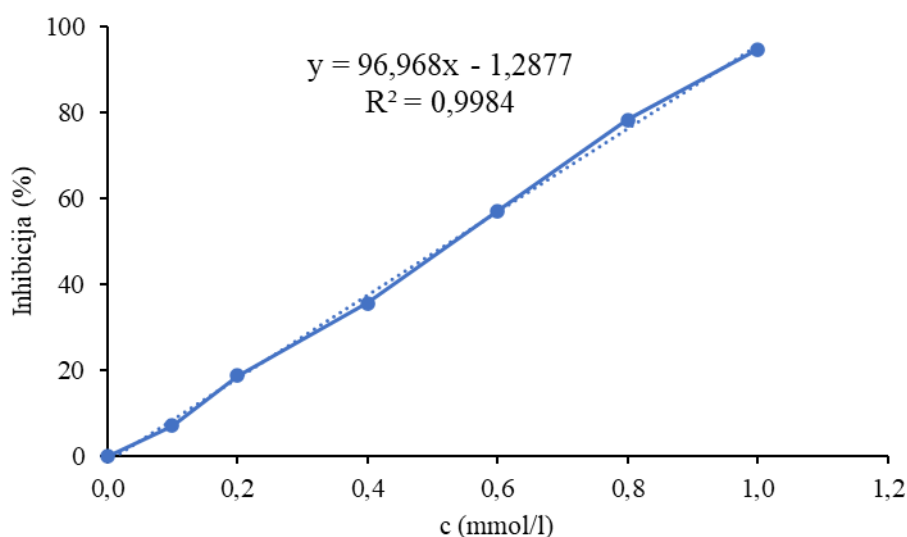
### 3.2.2.3. Antioksidativna aktivnost

Antioksidativni potencijal ekstrakta žalfije ocenjen je kao sposobnost redukovanja DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) stabilnog slobodnog radikala (Brand-Williams et al., 1995). Princip ove metode zasniva se na praćenju obezbojavanja, odnosno merenju smanjenja apsorbanca DPPH<sup>•</sup> rastvora, pri čemu tamno ljubičasta boja rastvora koji sadrži DPPH<sup>•</sup> slobodni radikal prelazi u žutu boju, kao rezultat redukcije DPPH<sup>•</sup> radikala od strane antioksidanasa. Rastvor DPPH<sup>•</sup> u metanolu, koncentracije 0,094 mmol/l, pripremljen je neposredno pred eksperiment. Ekstrakt žalfije u suvom obliku rekonstituisan je u metanolu nakon čega je 0,1 ml odgovarajućeg razblaženja otpipetirano u test epruvetu u koju je dodato i 1,9 ml rastvora DPPH<sup>•</sup>. Reakciona smeša je snažno promešana i ostavljena na tamnom mestu na sobnoj temperaturi. Ravnoteža reakcije postignuta je nakon 30 minuta inkubacije i tada je izmerena apsorbanca nastalog obojenja na talasnoj dužini od 517 nm korišćenjem UV/Vis spektrofotometra (model 4000, Dinko instruments, Španija). U epruvetu koja predstavlja slepu probu umesto 0,1 ml uzorka otpipetirano je 0,1 ml rastvarača. Procenat inhibicije DPPH<sup>•</sup> radikala (I) izračunat je prema sledećoj jednačini:

$$I(\%) = \frac{A_{sp} - A_{uz}}{A_{sp}} \times 100 \quad (3.2.)$$

gde je:  $A_{sp}$  apsorbanca slepe probe, a  $A_{uz}$  apsorbanca uzorka.

Troloks, hidrosolubilni analog vitamina E, korišćen je kao standard za konstruisanje kalibracione krive (Gorjanović et al., 2012). Napravljen je osnovni rastvor Troloksa u metanolu, koncentracije 1 mmol/l, a zatim je od njega napravljena serija rastvora koncentracija od 0,1-0,8 mmol/l. Procenat inhibicije DPPH<sup>•</sup> radikala u prisustvu rastvora Troloksa određen je prema prethodno opisanom postupku za ekstrakt i na osnovu dobijenih rezultata napravljena je kalibraciona kriva:  $I(\%) = f(c \text{ Troloksa})$  (Slika 3.2.) Antioksidativna aktivnost ekstrakta žalfije izračunata je na osnovu jednačine kalibracione krive i izražena u mmol Troloks ekvivalenta po g suvog ekstrakta (mmol TE/g).



Slika 3.2. Kalibraciona kriva Trolaksa

### 3.2.2.4. Antibakterijska aktivnost

Antibakterijska svojstva ekstrakta žalfije prema jednom Gram-pozitivnom soju, *Staphylococcus aureus* (CECT240) i jednom Gram-negativnom soju, *Escherichia coli* (CECT434) ispitana su primenom mikrodilucione metode (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015; Figueroa-Lopez et al., 2019). Odabrani sojevi bakterija bili su poreklom iz španske tipske kolekcije kultura (engl. *Spanish Type Culture Collection* - CECT, Španija). Antibakterijska aktivnost ekstrakta prema test bakterijama ocenjena je određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) i minimalne baktericidne koncentracije (MBK) korišćenjem mikrotitar ploča sa 96 bunarića (Thermo Fischer Scientific, Danska).

Kulture bakterija gajene su u Müller Hinton bujonu (MHB) u vodenom kupatilu pri konstantnom mešanju od 100 obr/min na 37 °C tokom 24 h. Tako pripremljene suspenzije bakterija su razblažene do koncentracije  $10^5$ - $10^6$  CFU/ml i korišćene za testiranje antibakterijske aktivnosti (Klančnik et al., 2010). Pre analize, ekstrakt žalfije u suvom obliku rekonstituisan je u 10% (v/v) rastvoru dimetil sulfoksida u vodi i sterilisan pod UV lampama u trajanju od 30 minuta u Biostar laminarnoj komori (Telstar S.A., Španija). U sterilne bunariće mikrotitar ploče dodato je 90  $\mu$ l suspenzije bakterija i 10  $\mu$ l ekstrakta. Testirane koncentracije ekstrakta bile su u opsegu od 0,31 do 160,00 mg/ml. Paralelno su pripremljeni i kontrolni bunarići koji su sadržali samo MHB, samo uzorke ekstrakta, odnosno samo suspenziju bakterija u MHB. Mikrotitar ploče su inkubirane na 37 °C tokom 24 h, nakon čega je u svaki bunarić dodato po 10  $\mu$ l resazurina, indikatora metaboličke aktivnosti, i ploče su ponovo inkubirane na 37 °C. Nakon 3 h inkubacije, sadržaj svakog bunarića je analiziran u pogledu boje resazurina. Naime, resazurin je netoksična plava boja koja u prisustvu oksidoreduktaza živih ćelija podleže redukciji i prelazi u pink obojeni resofurin i dalje u bezbojni hidrosesofurin (Sarker et al., 2007). MIK je određena kao najniža koncentracija ekstrakta pri kojoj nije došlo do promene boje resazurina, odnosno pri kojoj nema vidljivog rasta bakterija. Sadržaji bunarića u kojima su koncentracije ekstrakta označene kao MIK zasejani su na Müller Hinton agar i inkubirani na 37 °C 24 h. Nakon inkubacije, MBK je određena kao najniža koncentracija ekstrakta pri kojoj nije došlo do rasta bakterija na površini agara (Duvnjak et al., 2016).

### **3.3. FILMOVI NA BAZI POLI( $\epsilon$ -KAPROLAKTONA) I EKSTRAKTA ŽALFIJE**

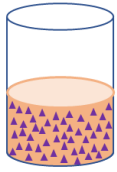
#### **3.3.1. SINTEZA FILMOVA NA BAZI POLI( $\epsilon$ -KAPROLAKTONA) I EKSTRAKTA ŽALFIJE**

**Priprema rastvora.** Za sintezu filmova na bazi PCL-a pripremljene su 4 formulacije rastvora: rastvor PCL-a (10%, w/w) bez ekstrakta žalfije (kontrola) i PCL rastvori (koncentracija polimera 10%, w/w) sa različitim sadržajem ekstrakta žalfije (5, 10 i 20%, w/w u odnosu na masu polimera). Kontrolni rastvor PCL-a pripremljen je rastvaranjem PCL granula u binarnom rastvaraču (hloroform:butanol = 3:1, v/v) mešanjem na magnetnoj mešalici na sobnoj temperaturi tokom 1 h. Za pripremu aktivnih filmova, ekstrakt žalfije rastvaran je u binarnom rastvaraču hloroform/butanol mešanjem na magnetnoj mešalici tokom 24 h. Pripremljeni rastvori centrifugirani su pri 10000 obr/min tokom 10 minuta, nakon čega su supernatanti profiltrirani kroz filtere sa membranom od politetrafluoroetilena (PTFE) i veličinom pora 0,22  $\mu$ m. PCL granule rastvorene su u dobijenim filtratima mešanjem na magnetnoj mešalici tokom 1 h. Faze sinteze PCL filmova ilustrativno su prikazane na Slici 3.3.

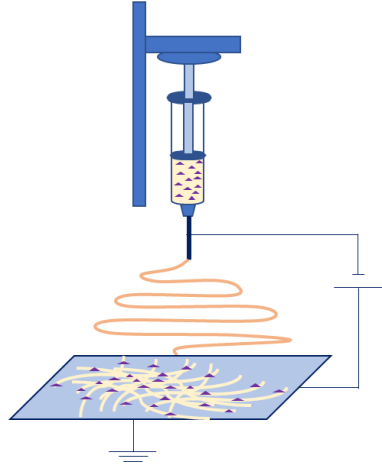
**Elektropredenje.** PCL vlakna, bez i sa inkorporiranim ekstraktom žalfije, dobijena su korišćenjem uređaja Fluidnatek LE-500 (Bioinicia S.L., Španija) (Slika 3.4. a). Rastvori, pripremljeni po prethodno opisanoj proceduri, prebačeni su u plastične špriceve od po 20 mL, koji su potom postavljeni na pumpu i preko PTFE creva povezani sa metalnom iglom unutrašnjeg prečnika 0,6 mm. Pozitivna elektroda izvora visokog napona prikačena je na iglu. Rastvori su kroz iglu potiskivani pumpom pri konstantnom protoku od 3 ml/h i naponu od 19 kV tokom 2 h. Vlakna su pomoću automatizovanog pokretnog injektora homogeno deponovana na aluminijumskoj foliji postavljenoj na uzemljeni metalni kolektor. Rastojanje između vrha igle i kolektora podešeno je na 15 cm. Temperatura i relativna vlažnost tokom procesa elektropredenja bili su 25 °C i 30%, respektivno.

**Termički tretman.** Elektropredena vlakna su podvrgnuta termičkom tretmanu u cilju njihovog prevođenja u tanke, kontinualne i transparentne filmove. U tu svrhu korišćena je hidraulična presa, model 4122 (Carver Inc., SAD) (Slika 3.4. b). Uzorci su obloženi PTFE listovima i postavljeni između zagrejanih ploča prese tokom 25 s bez primene pritiska. Ispitan je uticaj različitih temperatura tretmana (45, 50, 55 i 60 °C), nižih od tačke topljenja polimera, na efikasnost spajanja vlakana.

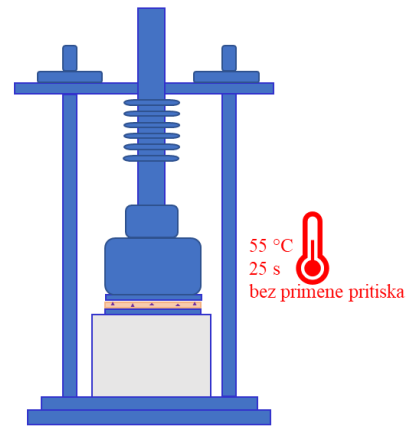
## 1. Priprema rastvora



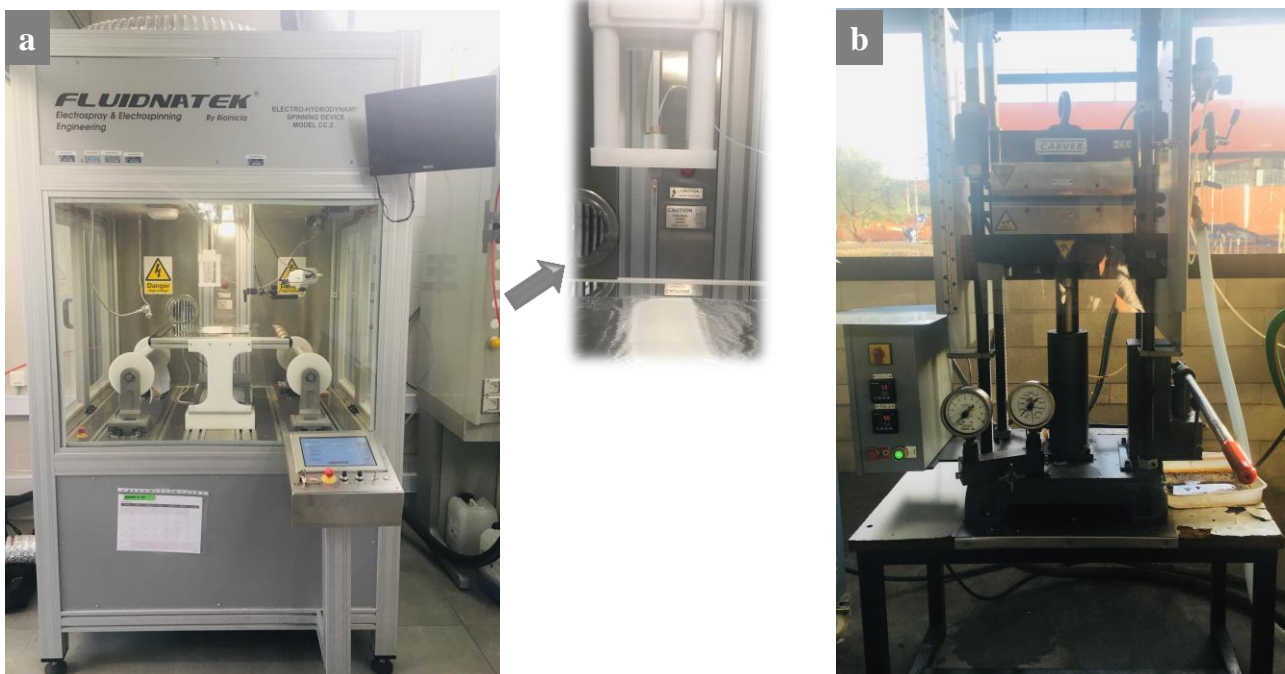
## 2. Elektropredenje



## 3. Termički tretman



Slika 3.3. Šematski prikaz sinteze PCL filmova



Slika 3.4. Uređaj za elektropredenje Fluidnatek LE-500 (a) i hidraulična presa model 4122 (b)

### 3.3.2. KARAKTERIZACIJA FILMOVA NA BAZI POLI( $\epsilon$ -KAPROLAKTONA) I EKSTRAKTA ŽALFIJE

#### 3.3.2.1. Morfološke karakteristike

Morfologija površine elektropredenih vlakana i poprečnih preseka filmova dobijenih termičkim tretmanom vlakana ispitana je skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) na Hitachi S-4800 mikroskopu (Hitachi Ltd., Japan) pri naponu od 5 kV. Poprečni preseki filmova pripremljeni su prelamanjem uzoraka u tečnom azotu. Pre SEM analize uzorci su napareni leguom zlato/paladijum u vakuumu korišćenjem uređaja Polaron SC7640 (Quorum Technologies, Velika Britanija). Merenje prečnika elektropredenih vlakana izvršeno je u ImageJ programu (National Institutes of Health, Bethesda, SAD) korišćenjem slika dobijenih SEM analizom. Raspodela veličine i srednja vrednost prečnika određeni su merenjem prečnika 100 pojedinačnih vlakana sa pet SEM slika svake formulacije.

### 3.3.2.2. Debljina filmova

Debljina filmova dobijenih termičkim tretmanom vlakana određena je korišćenjem digitalnog mikrometra (model S00014, Mitutoyo, Japan). Za određivanje prosečne debljine filmova, uzeta su po tri uzorka svake formulacije i debljina svakog uzorka izmerena je na pet različitih pozicija.

### 3.3.2.3. Transparentnost

Kontaktna transparentnost uzoraka ispitana je postavljanjem uzoraka na listove sa oznakama. Transparentnost filmova dobijenih termičkim tretmanom vlakana određena je i kvantitativno, merenjem apsorpcije svetlosti pomoću UV/Vis spektrofotometra (model UV/Vis4000, Denco Instruments, Španija) u zavisnosti od debljine. U tu svrhu, uzorci filmova dimenzija 2 x 5 cm fiksirani su u test ćeliju spektrofotometra normalno na optički put svetlosnog zraka. Merenje je izvršeno u tri ponavljanja. Transparentnost filmova (T) izračunata je prema sledećoj jednačini (Han i Floros, 1997):

$$T(\text{mm}^{-1}) = \frac{A_{600}}{L} \quad (3.3.)$$

gde je:  $A_{600}$  apsorbanca filma izmerena na talasnoj dužini od 600 nm, a L debljina filma (mm).

### 3.3.2.4. Kontaktni ugao sa vodom

Hidrofobnost površine sintetisanih filmova određena je merenjem kontaktnog ugla između kapi vode i površine filma pomoću Theta Lite optičkog tenziometra (Biolin Scientific, Švedska). Od svake formulacije filmova testirana su po 3 uzorka dimenzija 2 x 5 cm, tako što je po 5 pojedinačnih kapi ultra čiste vode, zapremine od po 5  $\mu\text{l}$ , naneto na različite pozicije površine svakog uzorka. Merenja kontaktnog ugla izvršena su na sobnoj temperaturi.

### 3.3.2.5. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom

Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR spektroskopija) komponenti korišćenih za dobijanje filmova (PCL granule i ekstrakt žalfije) i samih filmova izvršena je korišćenjem IR-Affinity-1 spektrofotometra (Shimadzu, Japan) tehnikom prigušene ukupne refleksije (engl. *Attenuated Total Reflection* - ATR). Uzorci su u svojim originalnim oblicima, bez prethodne pripreme, direktno postavljeni na ATR kristal. Snimanje FT-IR spektara izvršeno je u opsegu talasnih brojeva od 4000-600  $\text{cm}^{-1}$  pri rezoluciji od 4  $\text{cm}^{-1}$ . Broj akumulacija po skenu bio je 100. Za obradu spektara korišćeni su programi IR solution (Shimadzu, Japan) i Spectragryph (Menges, 2018).

### 3.3.2.6. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija

Toplotna svojstva ekstrakta žalfije u slobodnom obliku i filmova na bazi PCL-a, kontrolnog i sa različitim sadržajem inkorporiranog ekstrakta, ispitana su metodom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC). Uzorci su hermetički zatvoreni u aluminijumske posude i potom analizirani korišćenjem uređaja DSC131 EVO (Setaram Instrumentation, Francuska). Analiza je izvedena u temperaturnom opsegu od -40 do 250  $^{\circ}\text{C}$ , pri brzini zagrevanja od 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , u atmosferi azota.

Stepen kristaliničnosti uzoraka ( $X_c$ ) izračunat je prema sledećoj jednačini:

$$X_c(\%) = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0} \times 100 \quad (3.4.)$$

gde je:  $\Delta H_m$  promena entalpije topljenja ispitivanih PCL filmova, a  $\Delta H_m^0$  teorijska vrednost promene entalpije potpuno kristalnog PCL-a molekulske mase 80.000 g/mol (139,5 J/g) (Radisavljevic et al., 2018; Filipović et al., 2019).

### 3.3.2.7. Termogravimetrijska analiza

Termička stabilnost ekstrakta žalfije u slobodnom obliku i filmova na bazi PCL-a, kontrolnog i sa različitim sadržajem inkorporiranog ekstrakta žalfije, ispitana je termogravimetrijskom analizom (TGA) pomoću uređaja TG-STD A thermobalance (model TGA/STD A851e/LF/1600, Mettler-Toledo, LLC, SAD). Analiza je izvršena u temperaturnom opsegu od 25 do 700 °C, pri brzini zagrevanja od 5 °C/min, u atmosferi azota, pri protoku gasa od 50 ml/min.

### 3.3.2.8. Mehaničke karakteristike

Mehaničke karakteristike filmova ispitane su pomoću uređaja Universal Testing Maschine (model AGS-X 500 N, Shimadzu, Japan) prema ASTM D638 standardu (ASTM, 2010). Pre testiranja, uzorci dimenzija 5 × 25 mm kondicionirani su na 25 °C i relativnoj vlažnosti vazduha od 50% tokom 24 h. Testiranje je izvedeno na sobnoj temperaturi pri brzini istezanja od 10 mm/min u pet ponavljanja za svaku formulaciju. Na osnovu merenja sile i pomeraja dobijene su krive napon-deformacija i određene su sledeće karakteristike filmova: zatezna jačina, modul elastičnosti, izduženje pri kidanju i žilavost.

### 3.3.2.9. Barijerna svojstva

#### 3.3.2.9.1. Propustljivost vodene pare

Propustljivost vodene pare (engl. *Water Vapour Permeability* – WVP) kroz PCL filmove merena je gravimetrijski prema ASTM E96-95 standardu (ASTM, 1995) u triplikatu. U tu svrhu korišćene su Payne posude prečnika 3,5 cm (Elcometer SPRL, Belgija) napunjene sa po 5 ml destilovane vode. Uzorci filmova su postavljeni na posude i zaptiveni tako da je jedna strana filma bila izložena relativnoj vlažnosti od 100%, bez direktnog kontakta sa vodom. Tako pripremljene posude sa uzorcima su stavljene u eksikator pod kontrolisanim uslovima relativne vlažnosti od 0% i temperature od 25 °C. Payne posuda napunjena sa 5 ml vode i postavljenim aluminijumskim filmom i Payne posude bez vode sa postavljenim uzorcima ispitivanih filmova pripremljene su kao kontrolni uzorci kako bi se odredili gubitak vode kroz zaptivku i gubitak isparljivih jedinjenja iz uzoraka, respektivno. Masa posuda merena je periodično do uspostavljanja ravnoteže. Na osnovu ravnotežnih kriva dobijenih regresionom analizom izmerenih gubitaka mase po jedinici površine filma tokom vremena određena je stopa prolaska vodene pare kroz filmove (engl. *Water Vapor Transmission Rate* – WVTR). Gubitak mase kroz filmove dobijen je tako što su od ukupnog gubitka mase oduzeti neznatni gubici koji nastaju kroz zaptivku ili isparavanje jedinjenja iz uzoraka. Konačno, WVP je određena korigovanjem WVTR vrednosti razlikom parcijalnih pritisaka vodene pare sa obe strane filma i prosečnom debljinom uzoraka.

#### 3.3.2.9.2. Propustljivost D-limonena

Propustljivost D- limonena (engl. *Limonene Permeability* – LP) kroz PCL filmove merena je gravimetrijski u triplikatu, prema postupku koji je veoma sličan prethodno opisanom za određivanje WVP. U ovu svrhu, Payne posude su napunjene sa po 5 ml D-limonena, nakon čega su na posude postavljeni i zaptiveni uzorci filmova. Tako pripremljene posude sa uzorcima su stavljene u eksikator pod kontrolisanim uslovima relativne vlažnosti od 40% i temperature od 25 °C. Payne posuda napunjena sa 5 ml limonena i postavljenim aluminijumskim filmom i Payne posude bez limonena sa postavljenim uzorcima ispitivanih filmova pripremljene su kao kontrolni uzorci kako bi

se odredili gubitak limonena kroz zaptivku i gubitak isparljivih jedinjenja iz uzoraka, respektivno. Stopa prolaska limonena kroz filmove (engl. *Limonene Transmission Rate* - LTR) određena je iz ravnotežnih kriva dobijenih na isti način kao i kod određivanja WVTR. Konačno, LP je određena korigovanjem LTR vrednosti razlikom parcijalnih pritisaka limonena sa obe strane filma i prosečnom debljinom uzoraka.

### 3.3.2.10. Otpuštanje aktivnih jedinjenja iz filmova u simulante hrane

Potencijal otpuštanja aktivnih jedinjenja iz filmova ispitan je korišćenjem dva medijuma koji simuliraju prehrambene proizvode: 10% (v/v) rastvor etanola u vodi (proizvodi hidrofilnog karaktera) i 95% (v/v) rastvor etanola u vodi (proizvodi lipofilnog karaktera) (Regulativa Evropske komisije (EU) 2017/752). Filmovi su sa obe strane direktno izloženi medijumima za otpuštanje pri odnosu kontaktne površine i medijuma od 6 dm<sup>2</sup>/kg i u triplikatima inkubirani pod statičkim uslovima u mraku na 20 °C tokom 10 dana. Medijumi za otpuštanje bez filmova pripremljeni su kao slepa proba i inkubirani pod istim uslovima kao i medijumi u kontaktu sa filmovima. Nakon inkubacije filmovi su uklonjeni, dok su medijumi filtrirani kroz filtere sa membranom od najlona i prečnikom pora od 0,45  $\mu$ m i potom analizirani u pogledu sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i fenolnih kiselina prema procedurama opisanim u Sekcijama 3.2.2.1. i 3.2.2.2., respektivno. Dobijeni rezultati izraženi su u mg otpuštenih jedinjenja po kg medijuma.

### 3.3.2.11. Antioksidativna aktivnost

Antioksidativni potencijal filmova na bazi PCL-a ocenjen je kao sposobnost redukcije DPPH<sup>•</sup> stabilnog slobodnog radikala. Princip ove metode opisan je u Sekciji 3.2.2.3. U test epruvetu dodati su uzorak filma i metanolni rastvor DPPH<sup>•</sup> radikala, koncentracije 0,094 mmol/l, pri ekvivalentu od 1 mg/ml. Reakciona smeša je snažno promešana i ostavljena na tamnom mestu na sobnoj temperaturi pod statičkim uslovima 1 h, nakon čega je apsorbancija nastalog obojenja izmerena na talasnoj dužini od 517 nm korišćenjem UV/Vis spektrofotometra (model HALO DB-20S, Dynamica Scientific Ltd., Velika Britanija). U epruvetu koja je predstavljala slepu probu dodat je rastvor DPPH<sup>•</sup> radikala bez filma. Test je izveden u tri ponavljanja. Antioksidativna aktivnost filmova određena je kao procenat inhibicije DPPH<sup>•</sup> slobodnog radikala (I) u direktnom kontaktu sa filmovima prema sledećoj jednačini:

$$I(\%) = \frac{A_{sp} - A_{uz}}{A_{sp}} \times 100 \quad (3.5.)$$

gde je:  $A_{sp}$  apsorbancija slepe probe, a  $A_{uz}$  apsorbancija uzorka.

### 3.3.2.12. Antibakterijska aktivnost

Antibakterijska svojstva PCL filmova ocenjena su primenom modifikovanog Japanskog industrijskog standarda (JIS Z 2801, 2000). U tu svrhu, korišćeni su jedan Gram-pozitivan soj - *Staphylococcus aureus* (CECT240) i jedan Gram-negativan soj - *Escherichia coli* (CECT434), poreklom iz španske tipske kolekcije kultura (engl. *Spanish Type Culture Collection* - CECT, Španija).

Kulture bakterija pripremljene su prema postupku opisanom u Sekciji 3.2.2.4. Neposredno pred analizu, uzorci filmova kvadratnog oblika, dimenzija 2  $\times$  2 cm, sterilisani su sa obe strane pod UV lampama u trajanju od po 15 minuta u Biostar laminarnoj komori (Telstar S.A., Španija) i postavljeni u sterilne Petri šolje. Suspenzija bakterija u MHB-u, koncentracije 5 $\times$ 10<sup>5</sup> CFU/ml, naneta je na površinu jednog uzorka filma i potom prekrivena drugim uzorkom filma iste formulacije. Tako inokulisani uzorci su inkubirani pri relativnoj vlažnosti od 95% na 25 °C tokom



24 h. Nakon inkubacije, od tretiranih suspenzija bakterija pripremljene su serije razređenja koje su potom zasejane na MHA i inkubirane na 37 °C tokom 24 h, nakon čega je izvršeno brojanje kolonija. Komercijalni filmovi od polistirena su testirani kao kontrolni uzorci prema istom postupku kao i ispitivani PCL filmovi. Test je izveden u tri ponavljanja.

Antibakterijska aktivnost filmova određena je kao sposobnost da pri direktnom, površinskom kontaktu sa patogenim bakterijama dovedu do redukcije njihovog broja. Površinska redukcija broja bakterija (R) izračunata je prema sledećoj jednačini:

$$R = \left[ \log \left( \frac{B}{A} \right) - \log \left( \frac{C}{A} \right) \right] = \log \left( \frac{B}{C} \right) \quad (3.6.)$$

gde je: A prosečan broj bakterija na kontrolnom uzorku odmah nakon inokulacije; B prosečan broj bakterija na kontrolnom uzorku nakon 24 h inkubacije i C prosečan broj bakterija na ispitivanom uzorku filma nakon 24 h inkubacije. Antibakterijska aktivnost filmova ocenjena je na osnovu R vrednosti kao: beznačajna ( $R < 0,5$ ); blaga ( $0,5 \leq R < 1$ ), značajna ( $1 \leq R < 3$ ) i jaka ( $R \geq 3$ ).

### 3.3.2.13. Razgradnja u model sistemima komposta

Ispitivanje razgradnje PCL filmova u model sistemu komposta sprovedeno je kroz dva testa. U prvom testu korišćen je samo model sistem komposta. U drugom testu je ispitana razgradnja filmova u model sistemu komposta, istom kao i u slučaju prvog testa, uz dodatak bakterijske kulture *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692), poreklom iz američke tipske kolekcije kultura (engl. *American Type Culture Collection* - ATCC, SAD). U ovu svrhu, soj *P. aeruginosa* PAO1 je submerzno gajen u medijumu mineralnih soli koji je sadržao:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$  (9,0 g/l),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,5 g/l),  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (0,2 g/l),  $\text{CaCl}_2$  (0,002 g/l) i  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1,0 g/l) uz dodatak kazamino kiselina (0,7%, w/v) i maslinovog ulja (1%, v/v) kao izvora ugljenika (Schlegel et al., 1961). Bakterijska kultura inkubirana je na 30 °C pri konstantnom mešanju od 180 obr/min tokom 48 h. Pripremljena tečna kultura *P. aeruginosa* dodata je u kompost ( $\log 10^4$  ćelija/g komposta), nakon čega je kompost dobro homogenizovan sterilnom špatulom.

Testovi su izvedeni u duplikatima, u staklenim Petri šoljama prečnika 14 cm i visine 2 cm. 100 g neinokulisanog komposta, odnosno 100 g komposta inokulisanog bakterijskom kulturom postavljeno je u Petri šolje za izvođenje prvog i drugog testa, respektivno, nakon čega su u kompost na dubini od 1 cm postavljeni uzorci filmova, dimenzija  $2 \times 1,5$  cm. Tako pripremljene Petri šolje inkubirane su na 37 °C tokom 4 meseca u slučaju prvog testa, odnosno tokom 4 nedelje u slučaju drugog testa. Na početku svake sedmice u kompost je dodavan svež alikvot kulture (8 ml) kako bi se održavali konstantan nivo bakterijske aktivnosti i vlažnost komposta. U određenim vremenskim periodima uzorci su vađeni iz komposta, pažljivo očišćeni etanolom i osušeni. Razgradnja filmova analizirana je vizuelno, poređenjem izgleda uzoraka pre postavljanja u kompost i nakon vađenja iz komposta, kao i određivanjem gubitka mase uzoraka tokom eksperimenta prema sledećoj jednačini:

$$\text{gubitak mase (\%)} = \frac{m_0 - m_i}{m_0} \times 100 \quad (3.7.)$$

gde je:  $m_0$  početna masa uzorka, neposredno pre stavljanja u kompost (g), a  $m_i$  masa uzorka nakon vađenja iz komposta, čišćenja i sušenja (g).

### **3.4. VLAKNA I FILMOVI NA BAZI ZEINA I EKSTRAKTA ŽALFIJE**

#### **3.4.1. OPTIMIZACIJA SINTEZE VLAKANA I FILMOVA NA BAZI ZEINA I EKSTRAKTA ŽALFIJE**

##### **3.4.1.1. Sinteza vlakana i filmova na bazi zeina i ekstrakta žalfije**

**Priprema rastvora.** Za sintezu materijala na bazi zeina pripremljene su dve formulacije rastvora: rastvor zeina (25%, w/w) bez ekstrakta žalfije (kontrola) i rastvor zeina (koncentracija zeina 25%, w/w) sa dodatkom ekstrakta žalfije (10%, w/w, u odnosu na masu zeina). Kontrolni rastvor zeina pripremljen je rastvaranjem zeina u 80% (v/v) rastvoru etanola u vodi mešanjem na magnetnoj mešalici na sobnoj temperaturi tokom 2 h. Za pripremu aktivnog rastvora, ekstrakt je rastvaran u 80% (v/v) rastvoru etanola primenom ultrazvučnih talasa frekvencije 40 kHz tokom 15 minuta, a potom mešanjem na magnetnoj mešalici tokom 24 h, nakon čega je u rastvor dodat zein i mešanje je nastavljeno još 2 h. Sinteza vlakana i filmova ilustrativno je prikazana na Slici 3.5.

**Elektropredenje.** Vlakna zeina, kontrolna i sa inkorporiranim ekstraktom žalfije, dobijena su korišćenjem uređaja za elektropredenje CH-01 (Linari Engineering, Italija) (Slika 3.6.). Rastvori, pripremljeni po prethodno opisanoj proceduri, prebačeni su u plastične špriceve od po 20 ml, postavljeni na pumpu i preko PTFE creva povezani sa metalnom iglom unutrašnjeg prečnika 0,8 mm. Pozitivna elektroda izvora visokog napona prikačena je na iglu. Rastvori su kroz iglu potiskivani pumpom pri konstantnom protoku od 2 ml/h i naponu od 22 kV tokom 1 h. Vlakna su deponovana na aluminijumskoj foliji postavljenoj na uzemljeni metalni kolektor. Rastojanje između vrha igle i kolektora podešeno je na 13 cm.

**Izlivanje filmova iz rastvora.** Filmovi na bazi zeina, kontrolni i sa inkorporiranim ekstraktom žalfije, su takođe pripremljeni. Po 10 g gore opisanih rastvora izliveno je u Petri šolje od polistirena, prečnika 9 cm. Filmovi su dobijeni nakon 48 h sušenja rastvora na 35 °C u univerzalnoj sušnici (model UF 55, Memmert GmbH + Co.KG, Nemačka).

##### **3.4.1.2. Sinteza vlakana i filmova na bazi zeina, poli(etilen-oksida) i ekstrakta žalfije**

**Priprema rastvora.** Za sintezu materijala na bazi zeina i poli(etilen-oksida) pripremljene su dve formulacije rastvora. Prva formulacija rastvora sadržala je zein i poli(etilen-oksid) (PEO) (ukupna koncentracija polimera: 25%, w/w, odnos zein:poli(etilen-oksid) = 19:1, w/w) bez ekstrakta žalfije (kontrola). Druga formulacija rastvora sadržala je zein i poli(etilen-oksid) (ukupna koncentracija polimera: 25%, w/w, odnos zein:poli(etilen-oksid) = 19:1, w/w) sa dodatkom ekstrakta žalfije (10%, w/w u odnosu na ukupnu masu polimera). Kontrolni rastvor je pripremljen rastvaranjem PEO u 80% (v/v) rastvoru etanola u vodi mešanjem na magnetnoj mešalici na sobnoj temperaturi tokom 24 h, nakon čega je dodat zein i mešanje je nastavljeno još 2 h. Za pripremu aktivnog rastvora, ekstrakt je rastvaran u 80% (v/v) etanolu primenom ultrazvučnih talasa frekvencije 40 kHz tokom 15 minuta, a potom mešanjem na magnetnoj mešalici. Nakon 24 h u rastvor je dodat PEO i mešanje je nastavljeno 24 h, a potom je dodat i zein i rastvor je mešan još 2 h.

**Elektropredenje.** Vlakna na bazi zeina i PEO, bez i sa inkorporiranim ekstraktom žalfije, dobijena su korišćenjem uređaja CH-01 (Linari Engineering, Italija). Konfiguracija i postavka uređaja za rad opisani su u Sekciji 3.4.1.1. U ovom slučaju, korišćena je igla unutrašnjeg prečnika

0,8 mm, a rastojanje između vrha igle i kolektora podešeno je na 13 cm. Primenjeni procesni parametri su bili protok od 0,8 ml/h i napon od 26 kV.

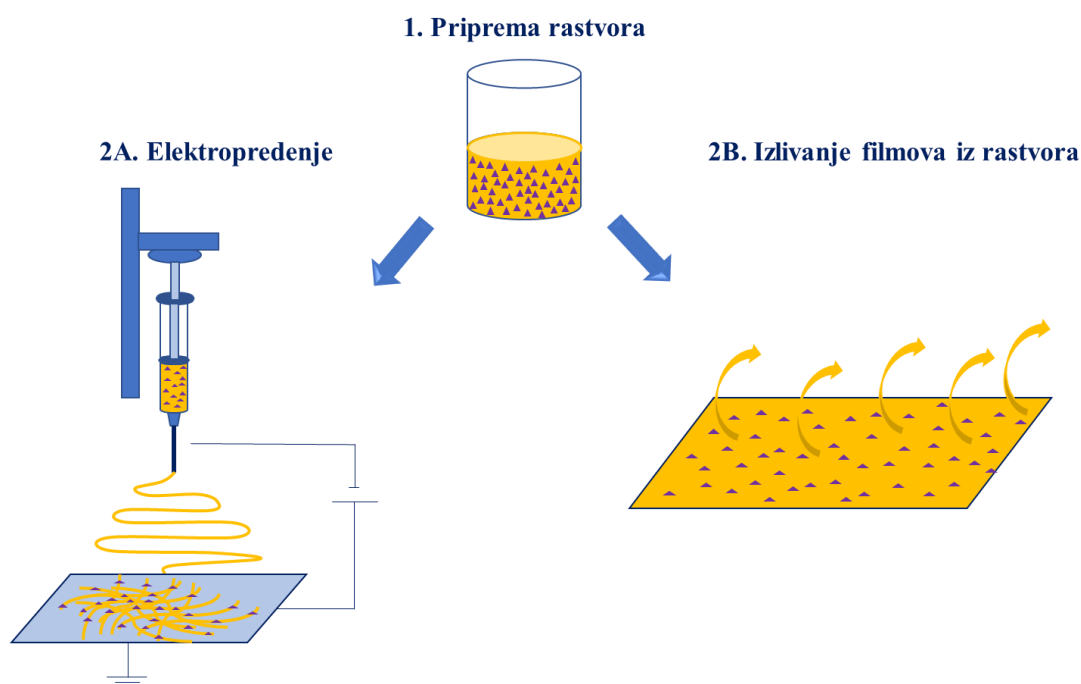
**Izliivanje filmova iz rastvora.** Filmovi na bazi zeina i PEO, kontrolni i sa inkorporiranim ekstraktom žalfije, su takođe pripremljeni prema proceduri opisanoj u Sekciji 3.4.1.1.

### 3.4.1.3. Sinteza vlakana i filmova na bazi zeina, želatina i ekstrakta žalfije

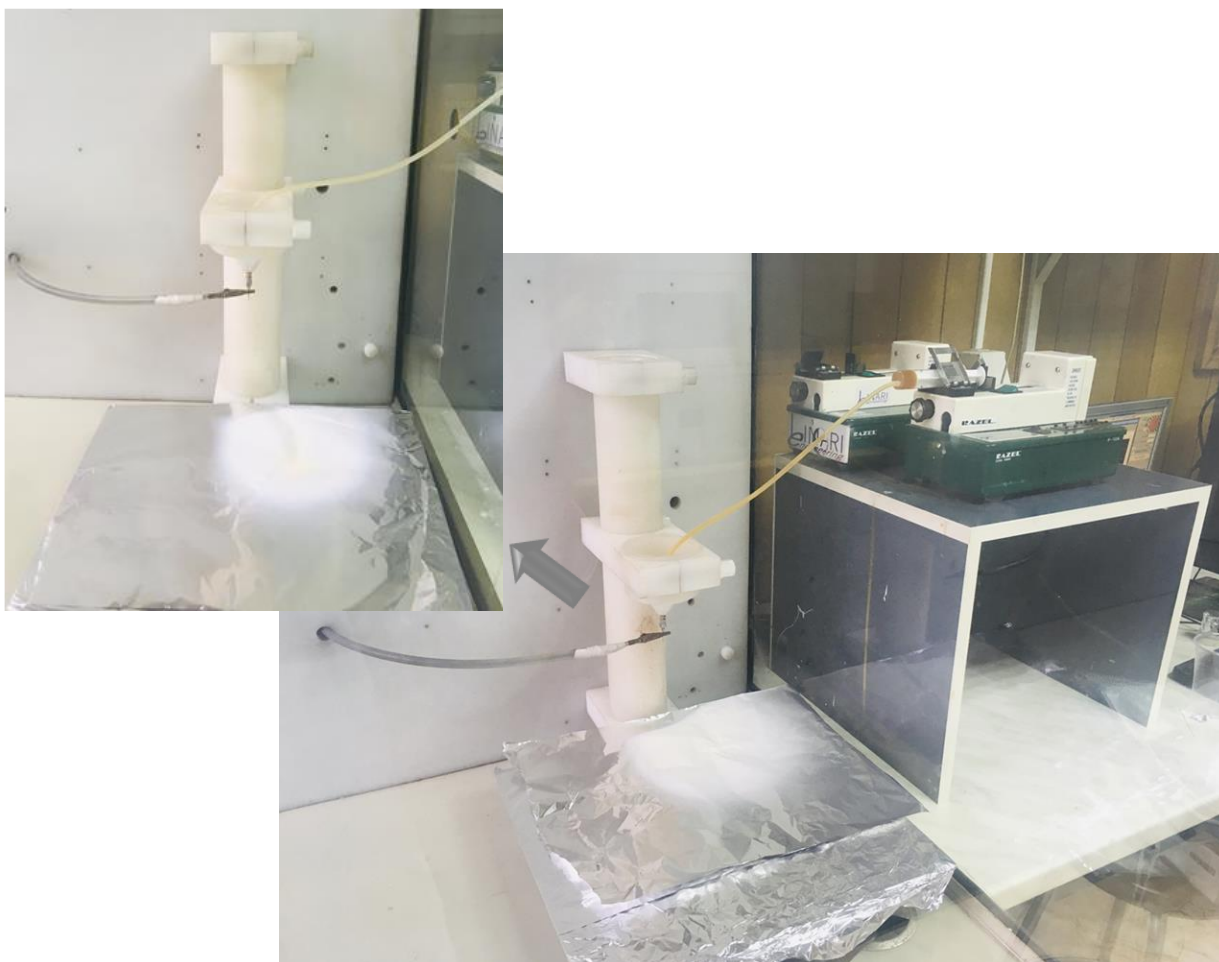
**Priprema rastvora.** Za sintezu materijala na bazi zeina i želatina pripremljene su 4 formulacije rastvora. Kontrolni rastvor je sadržao zein i želatin (ukupna koncentracija biopolimera: 30%, w/w, odnos zein:želatin = 3:1, w/w) bez ekstrakta žalfije. Ostala tri rastvora su sadržala zein i želatin (ukupna koncentracija biopolimera: 30%, w/w, odnos zein:želatin = 3:1, w/w) uz dodatak ekstrakta žalfije (5, 10 i 20%, w/w, u odnosu na ukupnu masu biopolimera). Sve 4 formulacije rastvora sadržale su glicerol kao plastifikator (30%, w/w, u odnosu na ukupnu masu biopolimera). Za pripremu kontrolnog rastvora zein je rastvaran u 80% (v/v) rastvoru sirćetne kiseline u vodi mešanjem na magnetnoj mešalici na sobnoj temperaturi tokom 2 h, nakon čega je rastvoru dodat želatin i mešanje je nastavljeno još 24 h. Potom je u rastvor biopolimera dodat glicerol, i takav finalni rastvor mešan je 1 h. Za pripremu aktivnih rastvora, ekstrakt žalfije u suvom obliku je rastvaran u 80% (v/v) rastvoru sirćetne kiseline mešanjem na magnetnoj mešalici tokom 24 h, nakon čega je rastvor centrifugiran, a supernatant filtriran prema proceduri opisanoj u Sekciji 3.3.1. U filtrat je dodat prvo zein, a nakon 2 h mešanja i želatin, uz nastavak mešanja. Nakon 24 h u rastvor biopolimera sa aktivnim konstituentom dodat je glicerol i takav finalni rastvor mešan je 1 h.

**Elektropredenje.** Vlakna na bazi zeina i želatina, bez i sa inkorporiranim ekstraktom žalfije, dobijena su korišćenjem uređaja za elektropredenje CH-01 (Linari Engineering, Italija). Konfiguracija i postavka uređaja opisani su u Sekciji 3.4.1.1. Korišćena je igla unutrašnjeg prečnika 0,8 mm, a rastojanje između vrha igle i kolektora podešeno je na 15 cm. Primenjeni procesni parametri su bili protok od 1,5 ml/h i napon od 23 kV, a dužina trajanja procesa 1 h.

**Izliivanje filmova iz rastvora.** Filmovi na bazi zeina i želatina, kontrolni i sa inkorporiranim ekstraktom žalfije, su takođe pripremljeni. Po 7 g gore opisanih rastvora izliveno je u Petri šolje, a filmovi su dobijeni prema proceduri opisanoj u Sekciji 3.4.1.1.



Slika 3.5. Šematski prikaz sinteze vlakana (2A) i filmova (2B)



**Slika 3.6.** Uređaj za elektropredenje CH-01

### **3.4.2. KARAKTERIZACIJA VLAKANA I FILMOVA NA BAZI ZEINA I EKSTRAKTA ŽALFIJE**

#### **3.4.2.1. Morfološke karakteristike**

Morfologija površine elektropredenih vlakana i izlivenih filmova ispitana je skenirajućom elektronskom mikroskopijom na JEOL JSM-6390LV mikroskopu (JEOL Ltd., Japan), pri naponu od 15 kV. Neposredno pred SEM analizu uzorci su napareni zlatom u vakuumu korišćenjem uređaja BAL-TEC SCD 005 (BAL-TEC AG, Lihtenštajn). Merenje prečnika elektropredenih vlakana i određivanje raspodele njihove veličine i srednje vrednosti izvršeno je prema postupku opisanom u Sekciji 3.3.2.1.

#### **3.4.2.2. Debljina materijala**

Debljina materijala dobijenih tehnikama elektropredenja i izlivanja iz rastvora određena je korišćenjem digitalnog mikrometra (pro-max Fowler, Fowler High Precision, SAD) prema postupku opisanom u Sekciji 3.3.2.2.

#### **3.4.2.3. Transparentnost**

Kontaktna transparentnost vlakana i filmova ispitana je posmatranjem uzoraka postavljenih na listove sa oznakama. Transparentnost izlivenih filmova određena je i kvantitativno merenjem apsorpcije svetlosti pomoću UV/Vis spektrofotometra (HALO DB-20S, Dynamica Scientific Ltd., Velika Britanija) u zavisnosti od debljine prema proceduri opisanom u Sekciji 3.3.2.3.

#### 3.4.2.4. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom

Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FT-IR spektroskopija) komponenti korišćenih za dobijanje vlakana i filmova (zein, želatin, glicerol i ekstrakt žalfije), kao i samih vlakana i filmova, izvršena je prema proceduri opisanoj u Sekciji 3.3.2.5.

#### 3.4.2.5. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija

Toplotna svojstva ekstrakta žalfije u slobodnom obliku, kao i elektropredenih vlakana i filmova izlivenih iz rastvora, kontrolnih i sa različitim sadržajem inkorporiranog ekstrakta, ispitivana su metodom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC), prema proceduri opisanoj u Sekciji 3.3.2.6.

#### 3.4.2.6. Termogravimetrijska analiza

Termička stabilnost ekstrakta žalfije u slobodnom obliku, kao i elektropredenih vlakana i filmova izlivenih iz rastvora, kontrolnih i sa različitim sadržajem inkorporiranog ekstrakta, ispitana je termogravimetrijskom analizom (TGA). U tu svrhu korišćen je TGA/DTA uređaj SETSYS 2400 CS Evolution (Setaram Instrumentation, Francuska). Analiza je izvršena u temperaturnom opsegu od 25 do 700 °C, pri brzini zagrevanja od 5 °C/min, u atmosferi argona, pri protoku gasa od 20 ml/min.

#### 3.4.2.7. Otpuštanje aktivnih jedinjenja iz vlakana i filmova u simulante hrane

Potencijal otpuštanja aktivnih jedinjenja iz vlakana i filmova u medijume koji simuliraju prehrambene proizvode ispitan je prema proceduri opisanoj u Sekciji 3.3.2.10. Potencijalne interakcije između Folin-Ciocalteu reagensa i proteina i posledično njihov uticaj na vrednost sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja eliminisani su istovremenom analizom proteinskih vlakana i filmova, bez i sa inkorporiranim ekstraktom žalfije. Vrednosti apsorbance medijuma koji su bili u kontaktu sa kontrolnim uzorcima, odnosno sa uzorcima bez inkorporiranog ekstrakta, oduzete su od vrednosti apsorbanci medijuma koji su bili u kontaktu sa uzorcima sa inkorporiranim ekstraktom žalfije.

#### 3.4.2.8. Antioksidativna aktivnost

Antioksidativni potencijal vlakana i filmova na bazi zeina i želatina ocenjen je kao sposobnost redukcije DPPH• stabilnog slobodnog radikala prema proceduri opisanoj u Sekciji 3.3.2.11.

#### 3.4.2.9. Antibakterijska aktivnost

##### 3.4.2.9.1. Antibakterijska svojstva vlakana i filmova

Antibakterijska efikasnost vlakana i filmova na bazi zeina i želatina ocenjena je primenom modifikovane makrodilucione metode (Klančnik et al., 2010; Malagurski et al., 2017b). U tu svrhu, korišćeni su jedan Gram-pozitivan soj - *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) i jedan Gram-negativan soj - *Escherichia coli* (ATCC 25922), poreklom iz američke tipske kolekcije kultura (engl. *American Type Culture Collection* - ATCC, SAD).

Od kultura gajenih u hranljivom bujonu na 37 °C tokom 24 h pripremljene su suspenzije bakterija koncentracije oko 10<sup>6</sup> CFU/ml. Neposredno pred analizu uzorci vlakana i filmova sterilisani su sa obe strane pod UV lampama u trajanju od po 15 minuta u laminarnoj komori (model: BSC-1800IIA2-X, BIOBASE, Kina). Tako pripremljeni uzorci su dodati u suspenzije

bakterija pri koncentraciji od 320 mg/ml, koje su potom inkubirane na 37 °C pod statičkim uslovima tokom 24 h. Po završetku inkubacije od tretiranih suspenzija bakterija pripremljene su serije razređenja koja su zasejana na hranljivi agar i inkubirana na 37 °C tokom 24 h, nakon čega je izvršeno brojanje kolonija. Suspenzije bakterija bez prisustva vlakana i filmova testirane su kao kontrolni uzorci. Antibakterijska aktivnost vlakana i filmova određena je kao sposobnost da pri direktnom kontaktu sa patogenim bakterijama dovedu do redukcije broja bakterija, izraženog kao log<sub>10</sub> CFU/ml.

#### **3.4.2.9.2. Sadržaj acetat-jona u suspenziji**

Sadržaj acetat-jona otpuštenih iz vlakana i filmova u suspenzije tokom inkubacije određen je jonskom hromatografijom korišćenjem Metrohm 761 Compact IC modela (Methrom Ion Analysis, Švajcarska). Za razdvajanje jona primenjene su zaštitna (Metrosep A Supp 1) i separaciona (Phenomenex Star-Ion, dimenzije: 100 × 4,6 mm) kolona. Primenjene kolone su bile sačinjene od iste polimerne smole za anjonsku izmenu i opremljene anjonskim samoregenerišućim supresorom (Metrohm Suppressor Module) sa očekivanom provodljivošću šuma od 5-15  $\mu$ S. Za detekciju je primenjen konduktometrijski detektor (Metrohm conductivity detector) koji je bio termostatiran. Kontrola rada instrumenta, snimanje i evaluacija hromatograma izvršeni su pomoću programskog paketa (The Metrodata IC Net 2.3. software, Metrohm, Švajcarska).

Vlakna i filmovi su uklonjeni iz suspenzija po završetku inkubacije, nakon čega su suspenzije razblažene, a potom su i suspenzije i standardni rastvori filtrirani kroz špic filtere sa membranom od najlona i veličinom pora 0,45  $\mu$ m. Petljom su injektovane zapremine od 20  $\mu$ l. Smeša natrijum hidrogenkarbonata koncentracije 1,7 mmol/l i natrijum karbonata koncentracije 1,8 mmol/l korišćena je kao eluent za razdvajanje anjona. Dužina trajanja analize iznosila je 10 minuta, pri protoku mobilne faze od 1 ml/min.

Za određivanje koncentracije acetat-jona u suspenzijama konstruisana je kalibraciona kriva koja pokazuje zavisnost koncentracije acetat-jona (c) (mg/l) od površine pika (A). Površine pikova su izračunate prema njihovim specifičnim provodljivostima ( $\mu$ S/cm). U tu svrhu, pripremljeni su kalibracioni rastvori acetat-jona u vodi, opsega koncentracija od 1-100 mg/l. Jonski hromatogram kalibracionog rastvora acetat-jona dat je u Prilogu 2. (Slika P2.1.). Dobijena kalibraciona kriva predstavljena je sledećom kvadratnom jednačinom:

$$c = 2,838 A - 0,0189A^2 \quad (3.8.)$$

Na osnovu relativne standardne devijacije od 9,52% i koeficijenta korelacije od 0,9985 utvrđeno je da se acetat-jon u suspenzijama može odrediti sa dovoljnom tačnošću i ponovljivošću. Identifikacija acetat-jona u suspenzijama izvršena je poređenjem retencionih vremena i spektara sa retencionim vremenima i spektrima standardnih rastvora i standardnim dodatkom, dok je kvantifikacija izvršena na osnovu površine pikova i jednačine kalibracione krive. Sadržaj acetat-jona u suspenzijama izražen je u mg/ml.

#### **3.4.2.10. Razgradnja u model sistemima komposta**

Ispitivanje razgradnje elektropredenih vlakana i filmova izlivenih iz rastvora u model sistemu komposta sprovedeno je kroz dva testa. U prvom testu korišćen je samo model sistem komposta. U drugom testu je ispitana razgradnja vlakana i filmova u model sistemu komposta, istom kao i u slučaju prvog testa, ali u prisustvu ukupnog proteinskog ekstrakta tri soja *Streptomyces* spp. koji pokazuju proteaznu aktivnost. Korišćeni su *Streptomyces* spp. sojevi poreklom iz kolekcije mikroorganizama Laboratorije za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama (Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Srbija), izolovani iz različitih prirodnih staništa, prvenstveno zemljišta. U ovu svrhu, *Streptomyces* spp. sojevi su

kultivisani u fermentacionom medijumu Ferm II (pH 7,00) koji je sadržao: dekstrin (20 g/l), tripton (10 g/l),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,0 g/l),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (3,4 g/l),  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (0,3 g/l),  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (0,01 g/l),  $\text{ZnCl}_2$  (0,1 g/l),  $\text{CuSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (0,01 g/l),  $\text{MgCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  (0,003 g/l),  $\text{CaCl}_2$  (0,01 g/l),  $\text{NaCl}$  (0,03 g/l) (Chi et al., 2009). Bakterijske kulture su inkubirane na 30 °C pri konstantnom mešanju od 180 obr/min tokom 48 h, a potom centrifugirane na 4 °C pri 5000 obr/min tokom 10 minuta (GS-3 rotor, Sorvall Centrifuge, DuPont Instruments, SAD). Nakon centrifugiranja odvojeni su supernatant i ćelijski pelet. Supernatant je čuvan na ledu, dok je ćelijski pelet resuspendovan u 20 mM natrijum-fosfatnom puferu (pH 7,40) pri koncentraciji od 1%, w/v. Ćelije su potom podvrgnute sonifikaciji korišćenjem Soniprep 150 sonifikatora (MSE, Ujedinjeno Kraljevstvo) u 5 ciklusa od po 20 s, praćenih intervalima hlađenja u trajanju od po 20 s, dok je pelet uklonjen centrifugiranjem na 4 °C pri 14000 obr/min tokom 40 minuta. Ovako pripremljen ćelijski ekstrakt (engl. *cell free extract*) spojen je sa prethodno dobijenim supernatantom čime je dobijen ukupni proteinski ekstrakt koji je dodat u kompost.

Testovi razgradnje su izvedeni u trajanju od po 25 dana prema proceduri opisanoj u Sekciji 3.3.2.13. U određenim vremenskim intervalima uzorci su vađeni iz komposta, pažljivo očišćeni heksanom i osušeni, a analiza razgradnje vlakana i filmova izvršena je takođe na način opisan u Sekciji 3.3.2.13.

### 3.5. STATISTIČKA ANALIZA

Statistička analiza rezultata prikazanih kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija izvršena je korišćenjem softverskog paketa SPSS Statistics 26 (IBM, SAD). U ovu svrhu, primenjena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) uz *post hoc* poređenje Tukey's HSD testom. Normalnost podataka ispitana je primenom Shapiro-Wilk testa, a homogenost varijansi primenom Levene's testa. U slučaju kada preduslovi za primenu ANOVA testa nisu bili ispunjeni, odnosno kada podaci nisu sledili normalnu raspodelu i varijanse nisu bile homogene, statistička analiza rezultata izvršena je primenom Kruskal-Wallis testa uz *post hoc* poređenje Mann-Whitney U testom. Nivo statističke značajnosti postavljen je na  $p < 0,05$ .



## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

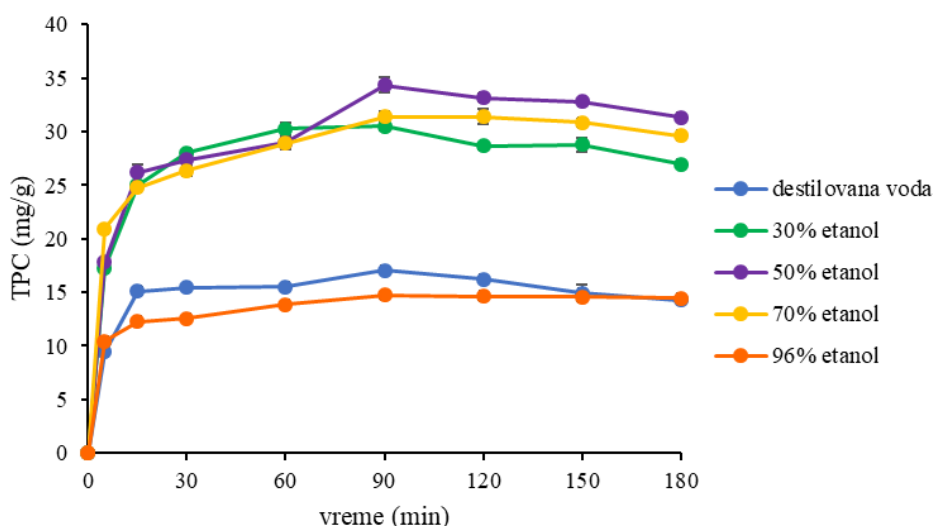
### 4.1. EKSTRAKT ŽALFIJE

Inicijalna faza istraživanja u okviru doktorske disertacije bila je usmerena na pripremu i karakterizaciju ekstrakta žalfije kao izvora jedinjenja sa antioksidativnim i antibakterijskim svojstvima koji bi kao takav bio korišćen kao aktivni konstituent vlakana i filmova.

#### 4.1.1. OPTIMIZACIJA PROCESA EKSTRAKCIJE

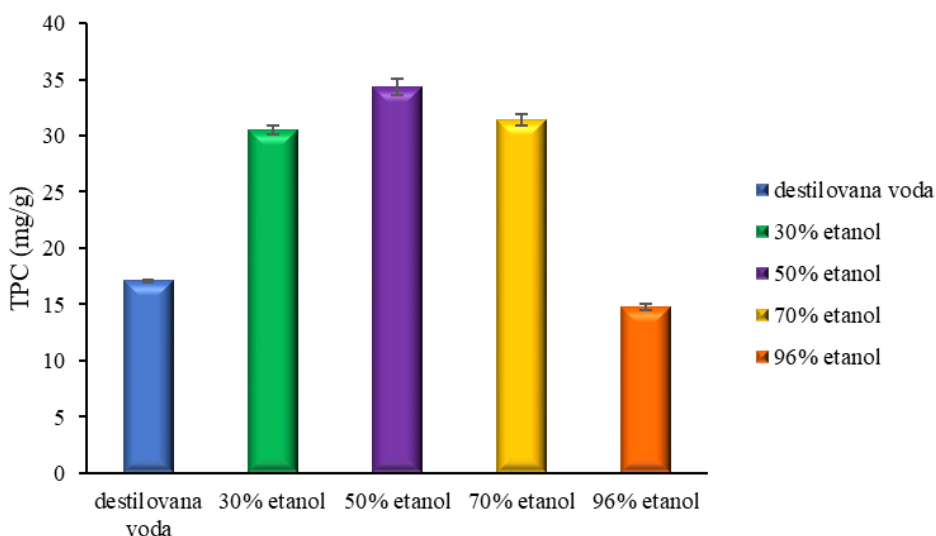
Ekstrakt žalfije pripremljen je tehnikom maceracije. Parametri ekstrakcije optimizovani su sa ciljem dobijanja ekstrakta sa što većim sadržajem ukupnih fenolnih jedinjenja (engl. *Total Phenolic Content* - TPC). U tom pogledu, ispitan je uticaj različitih uslova ekstrakcije: dužina trajanja ekstrakcije, sastav rastvarača i odnos biljni materijal-rastvarač na prinos fenolnih jedinjenja metodom sa Folin-Ciocalteu reagensom. Fenolna jedinjenja su odabrana kao relevantan i reprezentativan kriterijum ekstrakcije, jer su upravo ovi biljni konstituenti usko vezani sa antioksidativnom i antimikrobnom aktivnošću ekstrakata začinskog i lekovitog bilja (Shan et al., 2005; Shan et al., 2007). Rezultati su sumarno prikazani u Prilogu 3, Tabela P3.1.

**Trajanje ekstrakcije.** Optimizacija trajanja ekstrakcije važna je sa aspekta smanjenja energetske troškova. Na Slici 4.1. prikazan je prinos ukupnih fenolnih jedinjenja (mg TPC/g biljke) određen u vremenskim tačkama: 5, 15, 30, 60, 90, 120, 150 i 180 minuta ekstrakcije. Dobijeni rezultati prikazani su za ekstrakciju izvršenu pri odnosu biljni materijal:rastvarač = 1:20, w/v, koji je određen kao optimalni odnos, što će u nastavku biti objašnjeno. Posmatrajući kinetiku ekstrakcije ukupnih fenolnih jedinjenja, uočavaju se tri faze nezavisno od primenjenog rastvarača. U prvoj fazi ekstrakcije, do 15. minuta, dolazi do brzog, inicijalnog porasta TPC, dok se u drugoj fazi, do 90. minuta, ekstrakcija odvija sporije. Početna, brza faza rezultat je ekstrakcije fenolnih jedinjenja sa ili u blizini površine biljnog materijala, dok se u sledećoj fazi sa produženjem trajanja ekstrakcije povećava rastvorljivost i oslobađanje fenolnih jedinjenja iz unutrašnjosti materijala (Herodež et al., 2003; Jovanović et al., 2019). Plato ekstrakcije i najveći prinos fenolnih jedinjenja ( $p < 0,05$ ) dostignuti su u 90. minutu. Treću fazu, odnosno dalje produženje procesa, karakteriše ravnoteža u kojoj dolazi do blagih varijacija TPC.



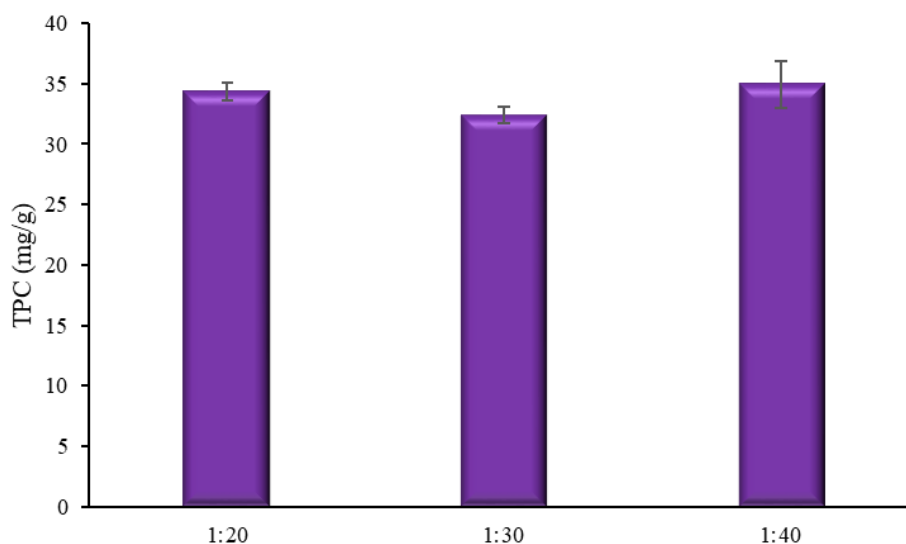
Slika 4.1. Uticaj trajanja ekstrakcije na prinos ukupnih fenolnih jedinjenja

**Rastvarač.** Efikasnost ekstrakcije ukupnih fenolnih jedinjenja zavisila je i od sastava i polarnosti ekstrakcionog medijuma. Na Slici 4.2. prikazan je prinos ukupnih fenolnih jedinjenja (mg TPC/g biljke) u zavisnosti od primenjenog ekstrakcionog medijuma, pri trajanju ekstrakcije od 90 minuta i odnosu biljni materijal:rastvarač 1:20, w/v. Najmanju efikasnost ekstrakcije ispoljio je 96% (v/v) etanol, a zatim destilovana voda. Hidroalkoholni rastvarači (30 i 70%, v/v, rastvori etanola u vodi) ispoljili su veću efikasnost ekstrakcije, dok je najveći TPC ( $p < 0,05$ ) postignut korišćenjem 50% (v/v) rastvora etanola u vodi. Dobijeni rezultat može se objasniti sinergističkim delovanjem vode i etanola. U tom pogledu, voda dovodi do efektivnog bubrenja biljnog materijala, čime se povećava njegova dodirna površina sa rastvaračem, dok etanol razara veze u biljnom materijalu i tako olakšava difuziju jedinjenja koja se ekstrahuju (Čujić et al., 2016; Jovanović et al., 2017). Pored toga, uzimajući u obzir da žalfija sadrži fenolna jedinjenja različite polarnosti, upotrebom kombinacije vode i etanola kao ekstrakcionog medijuma povećava se efektivnost ekstrakcije (Durling et al., 2007). Slično tome, Jovanović et al. (2017) su upotrebom 50% (v/v) rastvora etanola u vodi u poređenju sa destilovanom vodom i etanolno-vodenim rastvorima sa različitim udelima etanola postigli najveći prinos ukupnih fenolnih jedinjenja iz majčine dušice, koja kao i žalfija pripada familiji Lamiaceae.



Slika 4.2. Uticaj rastvarača na prinos ukupnih fenolnih jedinjenja

**Odnos čvrste i tečne faze.** Različiti odnosi biljni materijal:rastvarač: 1:10, 1:20, 1:30 i 1:40 (w/v) su takođe upoređeni u pogledu efikasnosti ekstrakcije fenolnih jedinjenja. Odnos biljni materijal:rastvarač 1:10 (w/v) pokazao se nepraktičnim za pripremu ekstrakta, jer je najveći deo rastvarača bio vezan od strane biljnog materijala. Iz tog razloga, ovaj odnos je izuzet iz dalje analize. Na Slici 4.3. prikazan je prinos ukupnih fenolnih jedinjenja (mg TPC/g biljke) postignut ekstrakcijom pri odnosima biljni materijal:rastvarač 1:20, 1:30 i 1:40 (w/v) sa 50% (v/v) rastvorom etanola u trajanju od 90 minuta. Osnovna pretpostavka je bila da će usled povećanja zapremine rastvarača u odnosu na masu biljnog materijala i povećanja gradijenta koncentracije doći i do povećanja difuzije fenolnih jedinjenja iz biljke i prinosa ekstrakcije. Međutim, dobijeni rezultati su pokazali da između ispitivanih odnosa nije bilo statistički značajne razlike ( $p > 0,05$ ). Izostanak značajnih razlika u prinosu fenolnih jedinjenja u zavisnosti od odnosa biljni materijal:rastvarač pokazuje da je već pri odnosu 1:20 (w/v) postignuta ravnoteža i maksimalni kapacitet ekstrakcije od strane primenjenog rastvarača. Ovakav rezultat posmatrano sa ekološkog i ekonomskog aspekta ukazuje da je optimalni odnos biljni materijal:rastvarač za pripremu ekstrakta 1:20 (w/v). Dobijeni rezultat je u saglasnosti sa studijom Silva et al. (2007) u kojoj povećanje odnosa biljni materijal:rastvarač iznad 1:20 (w/v) nije imalo uticaja na prinos ukupnih fenolnih jedinjenja ekstrahovanih iz lišća *Inga edulis*.



**Slika 4.3.** Uticaj odnosa biljni materijal:rastvarač na prinos ukupnih fenolnih jedinjenja

Na osnovu dobijenih rezultata 50% (v/v) rastvor etanola u vodi kao ekstrakcioni medijum, dužina trajanja ekstrakcije od 90 minuta i odnos biljnog materijala i rastvarača 1:20 (w/v) odabrani su kao optimalni uslovi za pripremu ekstrakta žalfije. Ekstrakcija je praćena uklanjanjem rastvarača, a dobijeni suvi ekstrakt je dalje analiziran i korišćen za sintezu aktivnih vlakana i filmova.

#### 4.1.2. KARAKTERIZACIJA EKSTRAKTA

Prinos suvog ekstrakta žalfije bio je 15,66% (w/w). Za ekstrakt u suvom obliku dalje su određeni sadržaji ukupnih fenolnih jedinjenja i fenolnih kiselina, kao i sposobnost da neutrališe slobodne radikale i inhibira rast patogenih bakterija.

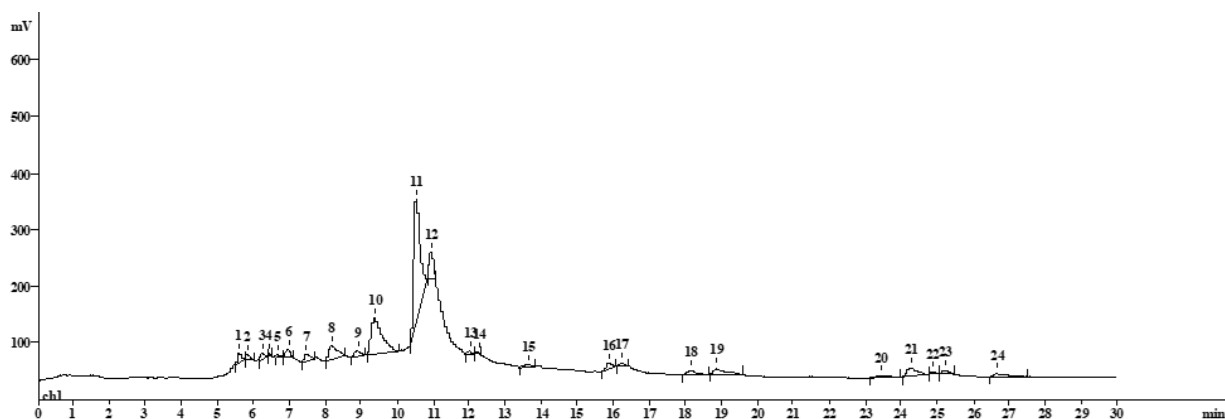
##### 4.1.2.1. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u suvom ekstraktu žalfije, određen metodom sa Folin-Ciocalteu reagensom, iznosi  $157,73 \pm 2,89$  mg GAE/g. U poređenju sa literaturnim podacima za *S. officinalis* ekstrakte, TPC u ekstraktu pripremljenom u okviru ove doktorske disertacije nalazi se u opsegu prijavljenom za metanolne ekstrakte tuniskog porekla (112,93-161,37 mg GAE/g) (Farhat et

al., 2013), dok je znatno viši u odnosu na vodeni ekstrakt grčkog porekla (91 mg GAE/g) (Stagos et al., 2012) i etanolni ekstrakt egipatskog porekla (5,80 mg GAE/g) (Roby et al., 2013). Ove razlike mogu poticati od različitog porekla, uslova gajenja biljke (npr. klima, zemljište) i načina obrade biljke i/ili primenjenog postupka ekstrakcije.

#### 4.1.2.2. Analiza fenolnih kiselina tečnom hromatografijom visokih performansi

Pet fenolnih kiselina, i to jedan derivat benzoeve kiseline: protokatehinska i četiri derivata cinamične kiseline: ferulična, kafeinska, *p*-kumarna i ruzmarinska kiselina, identifikovano je u ekstraktu žalfije poređenjem retencionih vremena i spektara sa odgovarajućim standardima (Slika 4.4.). Metoda standardnog dodatka je takođe primenjena pri identifikaciji pikova. Sadržaj identifikovanih fenolnih kiselina određen je na osnovu kalibracionih kriva standarda (Tabela 4.1.).



**Slika 4.4.** Hromatogram ekstrakta žalfije. Identifikacija pikova: (1) - protokatehinska, (6) - kafeinska, (8) - *p*-kumarna, (9) - ferulična, (11) - ruzmarinska kiselina (ostali pikovi su neidentifikovani)

Kvantitativno najdominantnija fenolna kiselina u pripremljenom ekstraktu je ruzmarinska kiselina (15,49 mg/g). Strukturno, ruzmarinska kiselina je estar kafeinske kiseline i 3,4-dihidroksifenil-mlečne kiseline (Petersen i Simmonds, 2003). Dobijeni rezultat je u saglasnosti sa prethodnim studijama u kojima je na osnovu analize ekstrakata žalfije ruzmarinska kiselina označena kao glavni fenolni konstituent žalfije (Zheng i Wang, 2001; Shan et al., 2005; Farhat et al., 2013). S tim u vezi, sadržaj ruzmarinske kiseline, zbog njenih pozitivnih bioloških efekata, predstavlja jedan od glavnih parametara kvaliteta ekstrakata žalfije (Farhat et al., 2013). Sadržaj ruzmarinske kiseline u ekstraktu pripremljenom u okviru ove doktorske disertacije nalazi se u opsegu saopštenom za metanolne ekstrakte žalfije (13,680-18,378 mg/g) (Farhat et al., 2013), dok je znatno viši u poređenju sa ekstraktom žalfije koji je dobijen korišćenjem dva rastvarača: heksana i etil acetata (10,00 mg/g) (Kontogianni et al., 2013). Slično kao kod ukupnih fenolnih jedinjenja, ove razlike mogu biti posledica različitih uslova gajenja biljke i/ili primenjenog postupka ekstrakcije.

**Tabela 4.1.** Sadržaj fenolnih kiselina u ekstraktu žalfije

Fenolne kiseline	Koncentracija (mg/g)
protokatehinska	$0,87 \pm 0,25$
ferulična	$1,18 \pm 0,12$
kafeinska	$0,31 \pm 0,03$
<i>p</i> -kumarna	$2,33 \pm 0,32$
ruzmarinska	$15,49 \pm 0,50$

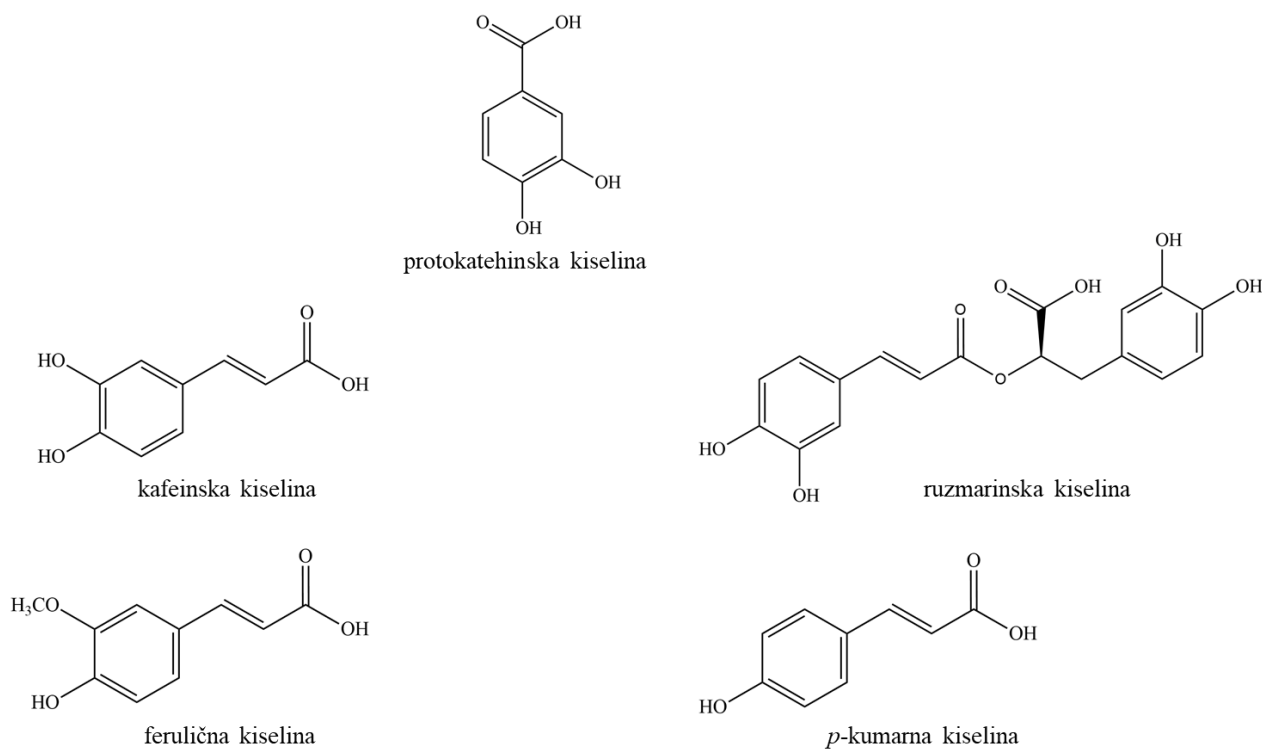
### 4.1.2.3. Antioksidativna aktivnost

Antioksidativni potencijal ekstrakta žalfije ocenjen je DPPH• metodom. DPPH• je stabilan slobodni radikal sa delokalizovanim nesparenim elektronom. Široko je korišćen kao indikator za testiranje efikasnosti potencijalnih antioksidanasa, odnosno njihovog kapaciteta da doniraju atom vodonika i da na taj način neutrališu ovaj slobodni radikal. Supresija DPPH• radikala od strane antioksidanasa, odnosno njegova redukcija, vizuelno je praćena promenom boje od tamnoljubičaste do žute (Dorman et al., 2003; Molyneux, 2004).

Ekstrakt žalfije nakon rekonstituisanja u rastvaraču, pri koncentraciji od 0,5 mg/ml, pokazuje sposobnost inhibicije DPPH• slobodnog radikala od 50,56%, što odgovara antioksidativnoj aktivnosti od  $1,07 \pm 0,06$  mmol TE/g suvog ekstrakta. Poređenja radi, vodeni ekstrakti zelenog čaja, ruzmarina, ulong čaja i crnog čaja, poznati kao moćni biljni antioksidansi, imaju sposobnost inhibicije DPPH• slobodnog radikala od 59,40, 55,32, 54,60 i 49,00%, respektivno, takođe pri koncentraciji od 0,5 mg/ml (Yen i Chen, 1995; Chen et al., 2007). Prethodne studije su takođe pokazale da ekstrakti žalfije vrste *S. officinalis*, različitog porekla i uslova ekstrakcije, imaju visok DPPH• antioksidativni kapacitet koji je u značajnoj korelaciji sa fenolnim jedinjenjima (Lamien-Meda et al., 2010; Farhat et al., 2013; Martins et al., 2015).

Mehanizam antioksidativne aktivnosti fenolnih fitohemikalija zasniva se na njihovom redukcionom kapacitetu, odnosno sposobnosti da slobodnim radikalima doniraju vodonik iz hidroksilnih grupa vezanih za aromatični prsten, koji takođe može da stabilizuje nesparene elektrone slobodnih radikala. Na ovaj način fenolna jedinjenja „gase“ aktivnost reaktivnih slobodnih radikala i tako sprečavaju njihove reakcije sa biomolekulima prisutnim u hrani (Dorman et al., 2003; Dey et al., 2016).

Antioksidativnost ekstrakta žalfije velikim delom potiče od prisutnih fenolnih kiselina, pri čemu hemijska struktura utiče na snagu njihovog antioksidativnog delovanja. Hemijske strukture fenolnih kiselina identifikovanih i kvantifikovanih u pripremljenom ekstraktu žalfije prikazane su na Slici 4.5.



**Slika 4.5.** Hemijske strukture fenolnih kiselina određenih u ekstraktu žalfije

Istraživanja pokazuju da je *o*-dihidroksibenzenova (katehol) struktura ključna za sposobnost fenolnih kiselina da „gase“ aktivnost slobodnih radikala (Lu i Foo, 2001). U tom pogledu, može se pretpostaviti da *p*-kumarna kiselina najmanje doprinosi antioksidativnoj aktivnosti ekstrakta, jer kao supstituent sadrži samo jednu –OH grupu, dok ferulična kiselina doprinosi više zbog prisustva dva supstituenta: jedne –OH i jedne –OCH<sub>3</sub> grupe. Očekivano je da znatno viša antioksidativna aktivnost potiče od kafeinske i protokatehinske kiseline, jer one kao supstituente sadrže po dve hidroksilne grupe. Ipak, kafeinska kiselina se smatra jačim antioksidansom, jer kao derivat cinamične kiseline sadrži –CH=CH–COOH grupu koja dvostrukom vezom doprinosi stabilizaciji slobodnog radikala, dok protokatehinska kiselina, kao derivat benzojeve kiseline, sadrži samo –COOH grupu (Cuvelier et al., 1992; Benbettaieb et al., 2018). Najveći doprinos antioksidativnoj aktivnosti ekstrakata žalfije pruža ruzmarinska kiselina (Lu i Foo, 2001; Dorman et al., 2003), čiji doprinos u pogledu sposobnosti inhibicije DPPH• slobodnih radikala može dostići čak i do 55% (Lamien-Meda et al., 2010).

Pored fenolnih kiselina, sa posebnim akcentom na ruzmarinskoj kiselini, istraživanja pokazuju da doprinos antioksidativnoj aktivnosti ekstrakta žalfije pružaju i jedinjenja iz grupe diterpena, pre svega karnozolna kiselina i karnozol (Cuvelier et al., 1996), čija se aktivnost takođe povezuje sa *o*-dihidroksilnim grupama (Farhat et al., 2013). Na osnovu analiziranih rezultata, antioksidativna aktivnost ekstrakta pripremljenog u okviru ove doktorske disertacije generalno se može pripisati sinergističkom delovanju fenolnih jedinjenja.

Analiza antioksidativne aktivnosti pripremljenog ekstrakta žalfije istakla je njegov potencijal da bude korišćen kao funkcionalni konstituent aktivnih ambalažnih materijala posmatrano sa aspekta sposobnosti „gašenja“ aktivnosti slobodnih radikala.

#### **4.1.2.4. Antibakterijska aktivnost**

Pripremljeni ekstrakt žalfije ispoljio je antibakterijsku aktivnost prema dve testirane patogene bakterije: *Staphylococcus aureus* (Gram-pozitivan soj) i *Escherichia coli* (Gram-negativan soj). Jače antibakterijsko dejstvo ekstrakta ispoljeno je prema *S. aureus* sa vrednostima minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije od 0,31 i 20,00 mg/ml, respektivno. Efikasnost antibakterijskog dejstva ekstrakta prema *E. coli* postignuta je pri višim vrednostima minimalne inhibitorne (2,50 mg/ml) i minimalne baktericidne (40,00 mg/ml) koncentracije. U poređenju sa literaturnim podacima za antibakterijsku aktivnost ekstrakata žalfije u zavisnosti od ekstragensa (Witkowska et al., 2013), ekstrakt pripremljen u okviru ove disertacije inhibira rast bakterija pri znatno nižim koncentracijama (prijavljene MIK vrednosti su od 5 do 20 mg/ml prema *S. aureus*, odnosno od 10 do 40 mg/ml prema *E. coli*). Sa druge strane, minimalne koncentracije potrebne za bicidni efekat su u opsegu prijavljenom od strane Witkowska et al. (2013) (MBK vrednosti od 10 do >40 mg/ml prema *S. aureus*, odnosno od 20 do >40 mg/ml prema *E. coli*).

Istraživanja ukazuju da fenolna jedinjenja pružaju veliki doprinos efektivnoj antibakterijskoj aktivnosti ekstrakata žalfije (Shan et al., 2007). Kao antibakterijski aktivni konstituenti ekstrakata žalfije posebno se ističu ruzmarinska, salvianolinska i karnozolna kiselina, karnozol i rozmanol (Klančnik et al., 2010). Antibakterijsko delovanje aktivnih jedinjenja iz prirodnih izvora zasniva se na ometanju oksidativne fosforilacije, aktivnog transporta, metaboličkih enzima i/ili sinteze DNK, RNK, proteina, lipida i polisaharida. Pored toga, izazivaju oštećenja ćelijskog zida i citoplazmatične membrane usled čega može doći do povećanja fluidnosti i permeabilnosti membrane, izlivanja ćelijskog sadržaja i koagulacije citoplazme (Shan et al., 2007; Negi, 2012; Cetin-Karaca i Newman, 2015). U tom pogledu, Witkowska et al. (2013) su pokazali da ekstrakt žalfije pri MIK i MBK dovodi do ireverzibilnog oštećenja ćelijske membrane bakterija, pri čemu je zapaženo smanjenje koncentracije unutarćelijskog ATP već pri MIK ekstrakta. Što se tiče antibakterijskog delovanja fenolnih kiselina, čije je prisustvo određeno u ekstraktu pripremljenom u okviru ove disertacije,

smatra se da one zbog svog delimičnog lipofilnog karaktera lako prolaze kroz ćelijsku membranu bakterija, pri čemu narušavaju strukturu i povećavaju permeabilnost membrane. Slično kao kod antioksidativne aktivnosti, struktura fenolnih kiselina utiče na njihov antibakterijski potencijal, pa tako derivati cinamične kiseline dovode do većeg izlivanja jona kalijuma i fosfora u odnosu na derivate benzoeve kiseline. Pored toga, fenolne kiseline kao slabe organske kiseline mogu dovesti do acidifikacije citoplazme, odnosno smanjenja unutarćelijske pH vrednosti i denaturacije proteina (Campos et al., 2009).

Mehanizam antibakterijskog delovanja zavisi i od testiranog soja bakterije. Dobijeni rezultati su pokazali da pripremljeni ekstrakt žalfije deluje na *S. aureus* inhibitorno pri osmostruko manjim i baktericidno pri dvostruko manjim minimalnim koncentracijama u poređenju sa delovanjem na *E. coli*. Veća osetljivost *S. aureus* prema ekstraktu u saglasnosti je sa literaturom i rezultat je razlika u građi Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (Shan et al., 2007). Naime, Gram-negativne bakterije imaju spoljašnju membranu oko peptidoglukana koja je bogata lipopolisaharidima i deluje kao barijera za prolazak antibakterijskih jedinjenja. Pored toga, u periplazmatskom prostoru Gram-negativnih bakterija nalaze se enzimi koji imaju sposobnost inaktivacije molekula unetih iz spoljašnje sredine. Sa druge strane, Gram-pozitivne bakterije imaju tanku, poroznu strukturu bez spoljašnje membrane zbog čega su permeabilnije i podložnije delovanju aktivnih jedinjenja (Shan et al., 2007; Matijašević et al., 2016).

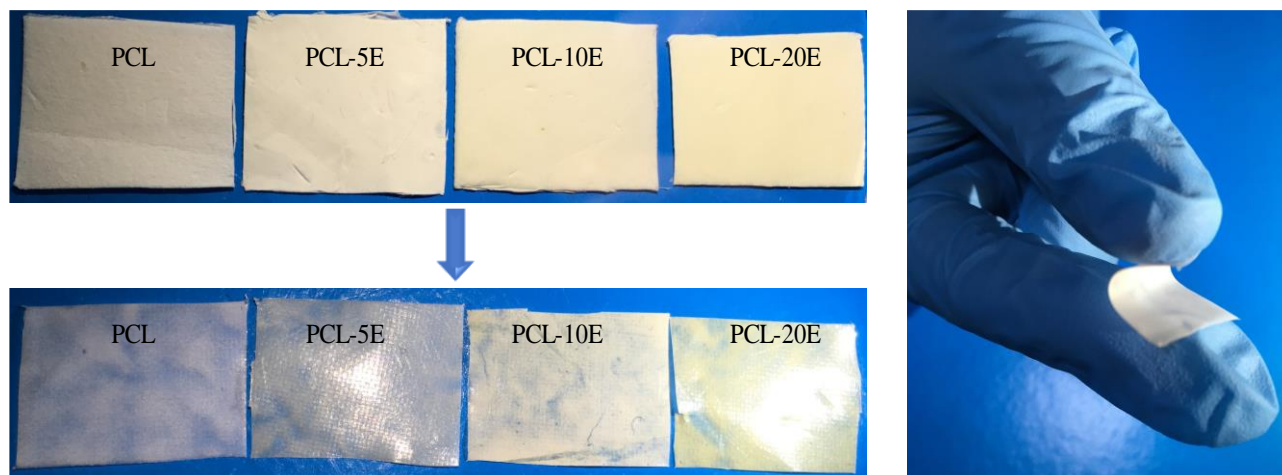
Dobijeni rezultati su pokazali da pripremljeni ekstrakt žalfije zbog sposobnosti inhibitornog i baktericidnog delovanja na patogene bakterije ima potencijal da bude korišćen kao funkcionalni konstituent, ne samo sa aspekta antioksidativnosti, već i antimikrobnosti, pri formulisanju i sintezi aktivnih ambalažnih materijala.

## 4.2. FILMOVI NA BAZI POLI( $\epsilon$ -KAPROLAKTONA) I EKSTRAKTA ŽALFIJE

PCL filmovi bez inkorporiranog ekstrakta žalfije (kontrola) i PCL filmovi sa različitim sadržajem inkorporiranog ekstrakta žalfije (5, 10 i 20%) sintetisani su u dve faze. Najpre su tehnikom elektropredenja dobijene bele, netransparentne forme sačinjene od vlakana. Proces elektropredenja bio je stabilan i kontinualan, bez kapanja rastvora i nastajanja vlakana makroskopske veličine. Dodatak ekstrakta nije uticao na proces elektropredenja. Ovako dobijeni uzorci podvrgnuti su kratkotrajnom termičkom tretmanu na hidrauličnoj presi. Cilj primenjenog tretmana bio je prevođenje struktura vlakana u strukture filmova kako bi se postigla poželjnija svojstva posmatrano sa aspekta potencijalne primene kao ambalažnih materijala. Osnovni princip termičkog tretmana zasniva se na spajanju vlakana i njihovom prevođenju u kontinualne, kompaktne, tanke i transparentne filmove kao rezultat dejstva temperature bez primene pritiska (Cherpinski et al., 2017, Alp-Erbay et al., 2019). Makroskopski izgled uzoraka pre i posle termičkog tretmana prikazan je na Slici 4.6. Dalje je analiziran uticaj inkorporacije ekstrakta žalfije na fizička, hemijska i funkcionalna svojstva filmova, kao i na njihovu biorazgradivost. Oznake sintetisanih PCL filmova koje će biti korišćene u nastavku teksta date su u Tabeli 4.2.

**Tabela 4.2.** Oznake i sastav filmova na bazi PCL-a

Oznaka	Sastav
PCL	nosač: PCL kontrola
PCL-5E	nosač: PCL aktivna komponenta: ekstrakt žalfije 5% (w/w)
PCL-10E	nosač: PCL aktivna komponenta: ekstrakt žalfije 10% (w/w)
PCL-20E	nosač: PCL aktivna komponenta: ekstrakt žalfije 20% (w/w)



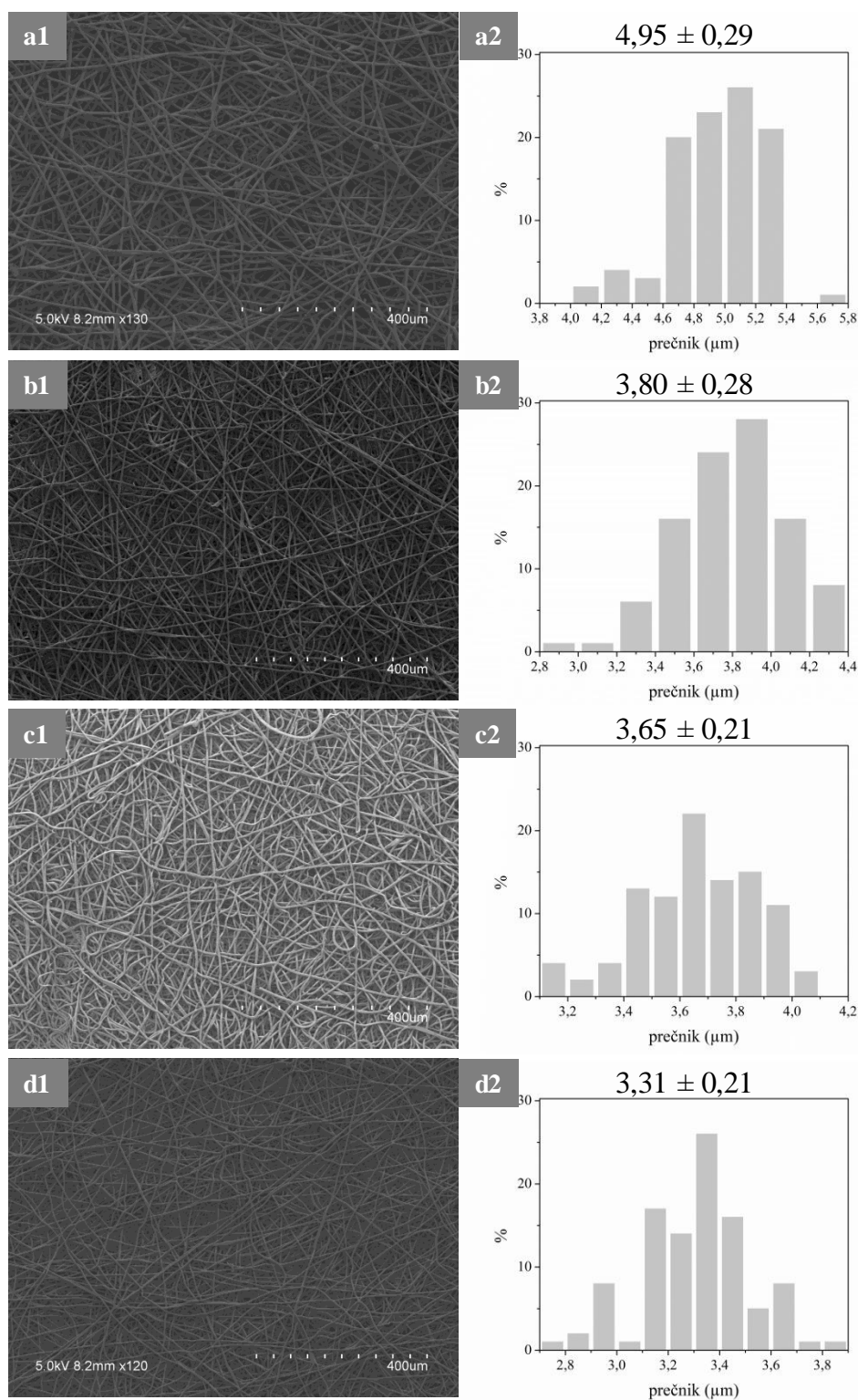
**Slika 4.6.** Makroskopski izgled PCL uzoraka pre (gore) i posle (dole) termičkog tretmana. Fleksibilnost filma dobijenog termičkim tretmanom elektropredenih vlakana (desno)



## 4.2.1. KARAKTERIZACIJA FILMOVA NA BAZI POLI( $\epsilon$ -KAPROLAKTONA) I EKSTRAKTA ŽALFIJE

### 4.2.1.1. Morfološke karakteristike

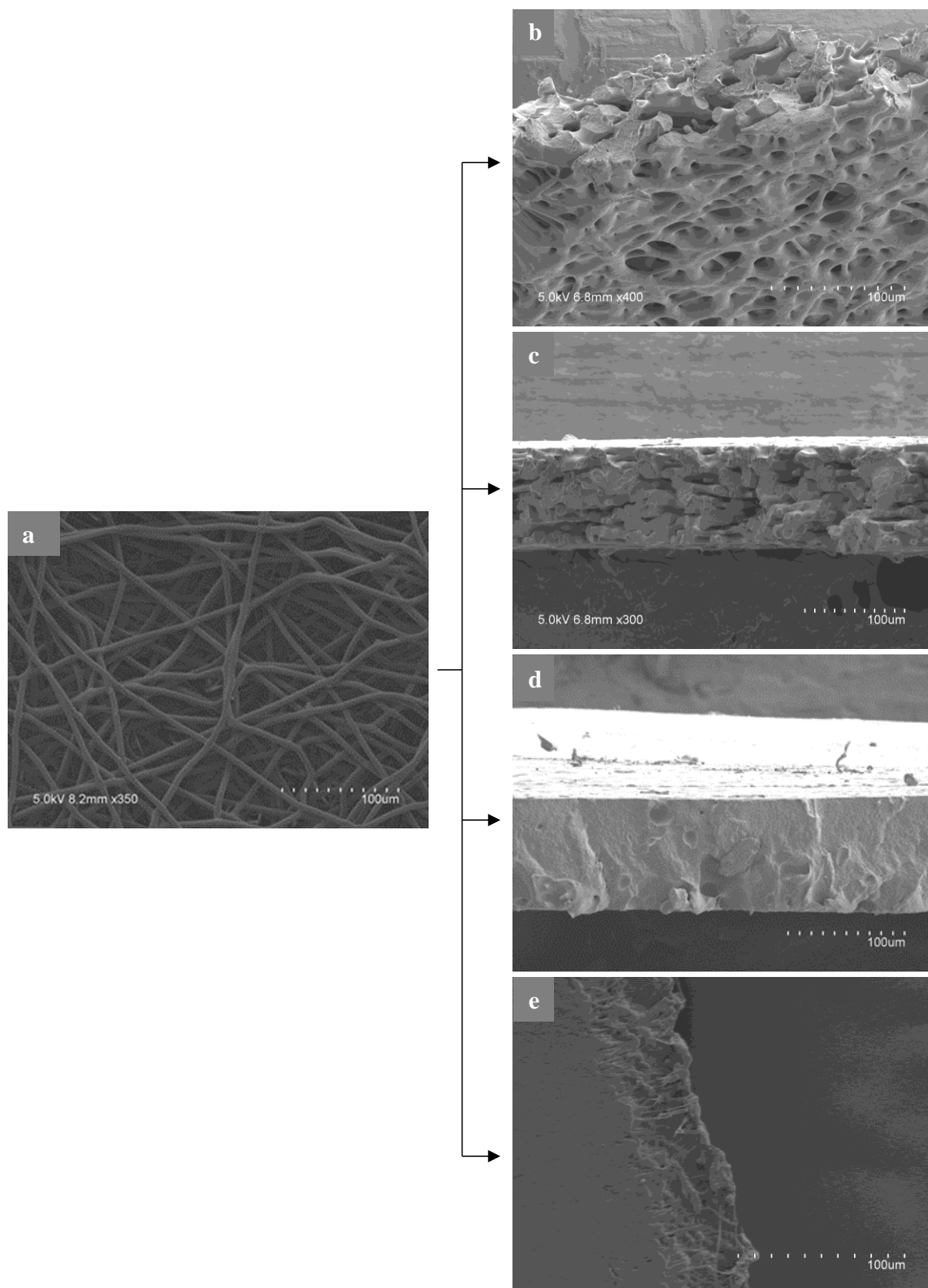
Strukture elektropredenih uzoraka na bazi poli( $\epsilon$ -kaprolaktona) pre termičkog tretmana analizirane su skenirajućom elektronskom mikroskopijom (Slika 4.7.).



**Slika 4.7.** SEM slike PCL vlakana (levo) i distribucija njihovih prečnika (desno): a1-a2: PCL; b1-b2: PCL-5E; c1-c2: PCL-10E; d1-d2: PCL-20E

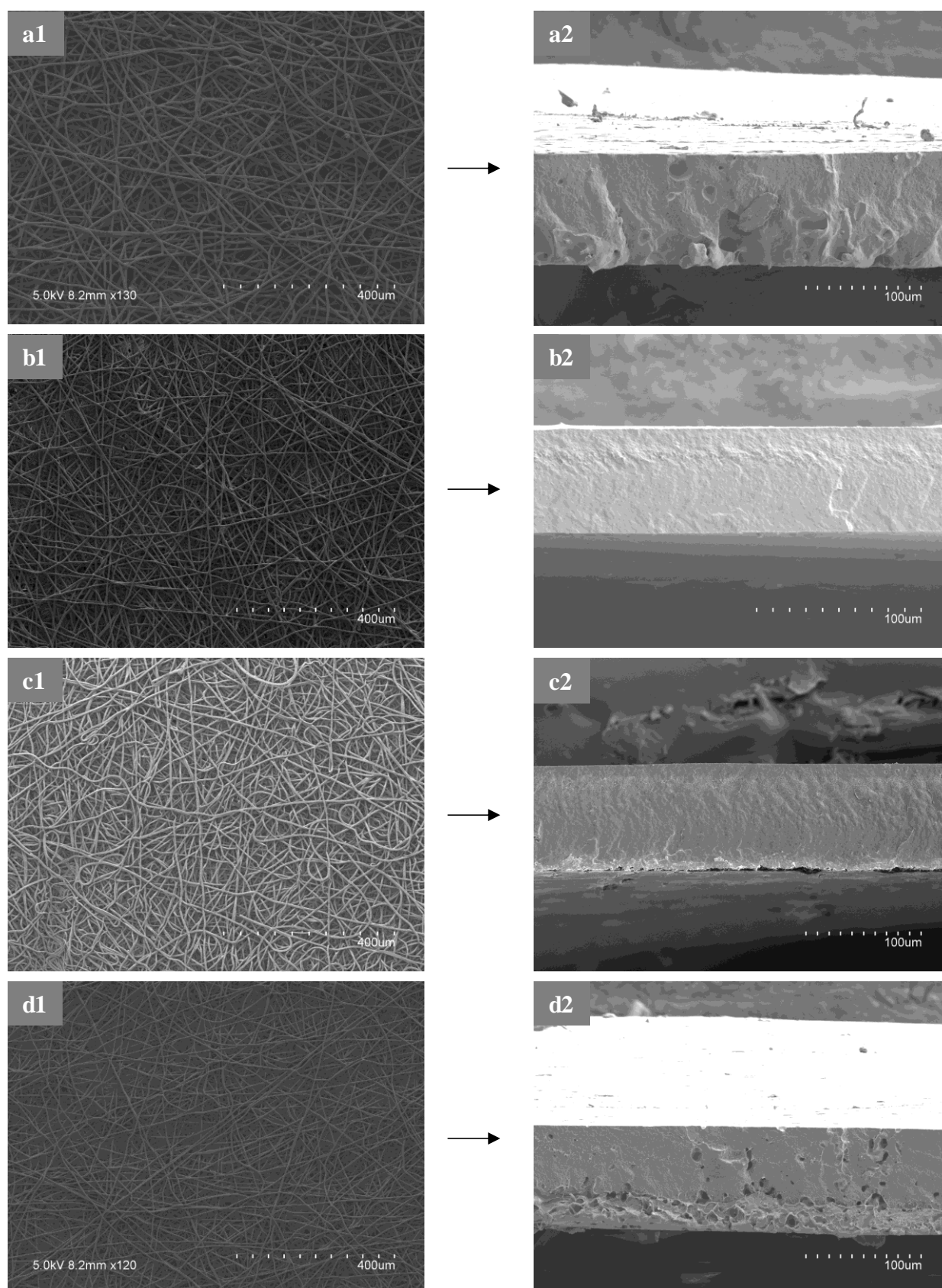
SEM slike pokazuju da su primenom tehnike elektropredenja dobijene strukture sačinjene od isprepletanih, gusto raspoređenih vlakana slične morfologije. Generalno, vlakna svih pripremljenih formulacija pokazuju pravilan, uniforman oblik i glatku površinu bez vidljivih čestica ili aglomerata. Dodatak ekstrakta žalfije nije uticao na strukturne i površinske karakteristike PCL vlakana što ukazuje na homogenu disperziju ekstrakta unutar vlakana. Inkorporacija ekstrakta žalfije imala je statistički značajan efekat ( $p < 0,05$ ) na prečnik vlakana. Distribucija prečnika vlakana u zavisnosti od sadržaja ekstrakta žalfije u njima prikazana je na Slici 4.7., a2-d2. Naime, sa povećanjem sadržaja inkorporiranog ekstrakta dobijena su vlakna manjeg prečnika. Uzimajući u obzir da su sve formulacije pripremljene pod identičnim procesnim parametrima elektropredenja, očekivano je da je smanjenje prečnika vlakana posledica promena karakteristika rastvora izazvanih dodatkom ekstrakta. Tako na primer, smanjenje viskoznosti polimernog rastvora uzrokuje intenzivnije istežanje mlaza rastvora tokom procesa elektropredenja što dovodi do nastajanja tanjih vlakana (Altan et al., 2018). Takođe, povećanje provodljivosti polimernog rastvora može biti uzrok smanjenja prečnika vlakana usled jačeg intenziteta sila odbijanja i istežanja mlaza izazvanih većom gustinom naelektrisanja rastvora (El-Naggar et al., 2016). U literaturi je takođe zapažen efekat smanjenja prečnika PCL vlakana usled inkorporacije prirodnih ekstrakata, kao što su oleorezini crnog bibera (Figuroa-Lopez et al., 2018), ekstrakt lišća *Clerodendrum phlomidis* (Ravichandran et al., 2019) i ekstrakt lišća *Gymnema sylvestre* (Ramalingam et al., 2019).

Termički tretman vlakana na bazi poli( $\epsilon$ -kaprolaktona) optimizovan je sa aspekta primenjene temperature u cilju postizanja što kompaktnijeg sjedinjavanja vlakana i dobijanja filmova sa što manjim stepenom poroznosti. U tom pogledu primenjeni su tretmani na 45, 50, 55 i 60 °C u trajanju od po 25 s, a dobijene strukture prikazane su na Slici 4.8. Termički tretmani na 45 i 50 °C rezultovali su samo delimičnim spajanjem vlakana, dok je primenom tretmana na 55 °C postignuto potpuno spajanje vlakana i dobijanje kompaktne strukture filma (Slika 4.8., b, c, d). Sa druge strane, na poprečnom preseku filma dobijenog na 60 °C primećeno je da je došlo do topljenja strukture (Slika 4.8., e), jer je ova vrednost temperature veoma bliska tački topljenja poli( $\epsilon$ -kaprolaktona). Na osnovu analize morfoloških karakteristika, termički tretman na 55 °C odabran je kao optimalan. Ovaj zaključak je u skladu sa literaturnim podacima koji ukazuju da je ova temperatura pogodna za termički tretman vlakana na bazi poli( $\epsilon$ -kaprolaktona) ne samo sa aspekta dobijanja kontinualnih filmova sa smanjenom poroznošću (Alp-Erbay et al., 2019), već i sa visokom hidrofobnošću (Lasprilla-Botero et al., 2018).



**Slika 4.8.** SEM slike elektropredenih PCL uzoraka: (a) pre termičkog tretmana i nakon termičkog tretmana na: (b) 45; (c) 50; (d) 55; (e) 60 °C

Na osnovu prethodno diskutovanih rezultata, termički tretman elektropredenih vlakana na 55 °C primenjen je za dobijanje kontrolnog PCL filma i PCL filmova sa inkorporiranim ekstraktom žalfije.



**Slika 4.9.** SEM slike PCL struktura pre (levo) i posle (desno) termičkog tretmana: a1-a2: PCL; b1-b2: PCL-5E; c1-c2: PCL-10E; d1-d2: PCL-20E

Kao što se može videti na Slici 4.9., primenom termičkog tretmana strukture vlakana su u potpunosti prevedene u strukture kontinualnih filmova. Uprkos generalno sličnoj morfologiji, primećene su određene strukturne razlike između filmova u zavisnosti od sadržaja ekstrakta. Naime,

hrapava struktura sa vidljivim brazdama i udubljenjima uočena za kontrolni film prelazi u potpuno kompaktnu i glatku strukturu filmova sa 5 i 10% inkorporiranog ekstrakta (Slika 4.9., a2, b2, c2). Navedena razlika u homogenosti struktura može se povezati sa većim prečnikom kontrolnih vlakana u odnosu na vlakna sa inkorporiranim ekstraktom što može imati uticaja na proces spajanja vlakana. Sa druge strane, dalje povećanje sadržaja inkorporiranog ekstrakta (20%) dovelo je do formiranja pora (Slika 4.9., d2). U literaturi je takođe prijavljena pojava pora pri termičkom tretmanu vlakana sa inkorporiranim prirodnim ekstraktima, što je pripisano migraciji lako isparljivih jedinjenja ekstrakata usled dejstva temperature (Figuroa-Lopez et al., 2019). Bez obzira na primećeno prisustvo pora, struktura filma sa 20% inkorporiranog ekstrakta može se smatrati generalno kompaktnom i iz tog razloga uključena je u dalju karakterizaciju.

#### 4.2.1.2. Debljina filmova

Dobijene vrednosti debljine kontrolnih filmova i filmova sa inkorporiranim ekstraktom žalfije prikazane su u Tabeli 4.3. Uočava se da je sadržaj inkorporiranog ekstrakta imao uticaj na debljinu filmova, pri čemu su sa povećanjem sadržaja inkorporiranog ekstrakta (10 i 20%) dobijeni tanji filmovi. Ovaj efekat se može pripisati manjem prečniku elektropredenih vlakana sa većim sadržajem inkorporiranog ekstrakta žalfije i njihovom efikasnijem prevođenju u strukturu filma tokom termičkog tretmana.

**Tabela 4.3.** Debljina i transparentnost PCL filmova

Uzorak	Debljina ( $\mu\text{m}$ )	Transparentnost ( $\text{mm}^{-1}$ )
PCL	$90,49 \pm 13,10^*$	$12,96 \pm 1,24^a$
PCL-5E	$97,06 \pm 14,71^a$	$13,31 \pm 1,41^a$
PCL-10E	$81,53 \pm 12,64^b$	$14,24 \pm 0,65^a$
PCL-20E	$81,41 \pm 12,90^b$	$16,16 \pm 1,91^a$

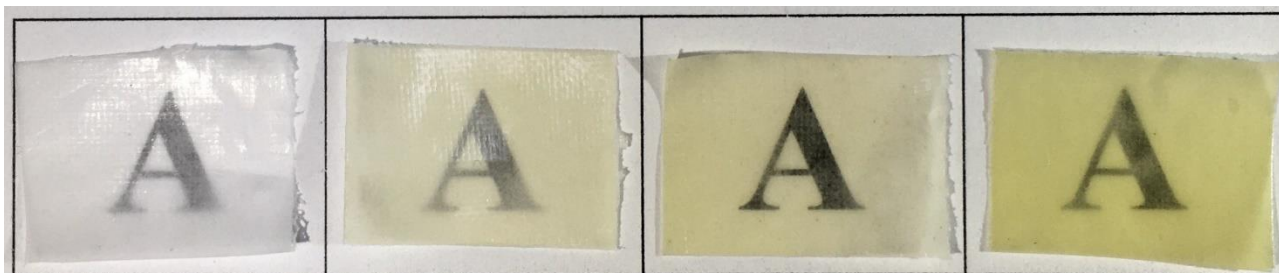
\* vrednosti unutar iste kolone obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju ( $p < 0,05$ )

#### 4.2.1.3. Transparentnost

Makroskopski izgled elektropredenih vlakana na bazi poli( $\epsilon$ -kaprolaktona) posle termičkog tretmana prikazan je na Slici 4.10. Primenom termičkog tretmana postignuta je transparentnost uzoraka što može biti rezultat prethodno diskutovanih strukturnih promena. Naime, u literaturi se navodi da termički tretman dovodi do povećanja transparentnosti uzoraka zbog prevođenja struktura vlakana u strukture kontinualnih filmova, odnosno zbog smanjenja poroznosti i prelamanja svetlosti (Cherpinski et al., 2018a). Vizuelno, snimljene fotografije ukazuju na visoku kontaktnu transparentnost filmova. U poređenju sa kontrolnim PCL filmom, aktivni filmovi su žute boje, pri čemu se intenzitet boje povećava sa povećanjem sadržaja inkorporiranog ekstrakta. Nastala boja potiče od boje ekstrakta žalfije. Slično tome, Figuroa-Lopez et al. (2019) su primetili da inkorporacija ekstrakata ruzmarina i zelenog čaja dovodi do nastanka žute boje poli(3-hidroksibutirat-co-3-hidroksivalerat) filmova dobijenih termičkim tretmanom elektropredenih vlakana.

Transparentnost filmova na bazi poli( $\epsilon$ -kaprolaktona) određena je i kvantitativno. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 4.3. Veće T vrednosti predstavljaju manju transparentnost. Inkorporacija ekstrakta žalfije dovela je do neznatnog smanjenja ( $p > 0,05$ ) transparentnosti filmova. Generalno, kvalitativna i kvantitativna analiza transparentnosti ukazuje da termički tretman vlakana nije doveo do degradacije polimera niti agregacije ekstrakta i da bi dobijeni filmovi kao

potencijalni ambalažni materijali za prehrambene proizvode omogućili vizuelnu ocenu upakovanog proizvoda.



**Slika 4.10.** Kontaktna transparentnost filmova: PCL, PCL-5E, PCL-10E, PCL-20E (sa leva na desno)

#### **4.2.1.4. Kontaktni ugao sa vodom**

Kontaktni ugao između kapi vode i površine sintetisanih filmova ( $\theta$ ) izmeren je kako bi se ocenila kvašljivost površine filmova, odnosno njihov afinitet prema vodi. U ovom pogledu, vrednost kontaktnog ugla sa vodom predstavlja indikator hidrofilnosti ( $\theta < 65^\circ$ ) i hidrofobnosti ( $\theta > 65^\circ$ ) površine (Vogler, 1998).

Površine sintetisanih filmova na bazi PCL-a mogu se okarakterisati kao hidrofobne, sa malim afinitetom prema vodi ( $\theta > 65^\circ$ ), što prvenstveno potiče od hidrofobne prirode polimera. Konkretno, kontaktni ugao između kapi vode i površine kontrolnog PCL filma, odnosno filma bez inkorporiranog ekstrakta žalfije, iznosi  $76,6^\circ$  što je u skladu sa literaturnim podacima ( $\sim 74^\circ$ ) (Figueroa-Lopez et al., 2018). U slučaju PCL filmova sa inkorporiranim ekstraktom žalfije, uočava se trend povećanja stepena hidrofobnosti površina sa povećanjem sadržaja inkorporiranog ekstrakta, odnosno sa smanjenjem debljine i povećanjem heterogenosti struktura. Tako su vrednosti kontaktnog ugla od  $73,6$ ,  $92,3$  i  $100,8^\circ$  izmerene za formulacije PCL-5E, PCL-10E i PCL-20E, respektivno. Ovakav rezultat može se pripisati promenama u površinskoj topologiji, pri čemu heterogene, hrapave i neravne površine pokazuju veći kontaktni ugao sa vodom (Han i Krochta, 1999; Erbil et al., 2003). Kako je prethodno diskutovano, SEM slike PCL filma sa 20% inkorporiranog ekstrakta ukazale su na prisustvo pora koje nisu primećene golim okom (Seksija 4.2.1.1., Slika 4.9., d2). Ove mikroskopske pore mogu zarobiti vazduh što rezultuje povećanjem kontaktnog ugla sa vodom, odnosno povećanjem hidrofobnosti površine (Lasprilla-Botero et al., 2018; Pardo-Figuerez et al., 2018). Slično, Medina Jaramillo et al. (2015) su u svojoj studiji pokazali da se hidrofobnost površine izlivenog filma na bazi skroba može postići inkorporacijom prirodnog ekstrakta (*Ilex paraguariensis*). Poređenja radi, filmovi polietilena niske gustine (LDPE, debljine  $25 \mu\text{m}$ ) i polietilen tereftalata (PET, debljine  $77 \mu\text{m}$ ) pokazuju vrednosti kontaktnog ugla sa vodom od  $100,7^\circ$  (Péroval et al., 2002) i  $82,3^\circ$  (Pardo-Figuerez et al., 2018), respektivno.

Generalno, analizirani rezultati kontaktnog ugla sa vodom ukazuju na otpornost površine sintetisanih PCL filmova na kvašljivost, odnosno na širenje kapi vode po njihovoj površini, koja se poboljšava sa porastom sadržaja inkorporiranog ekstrakta žalfije.

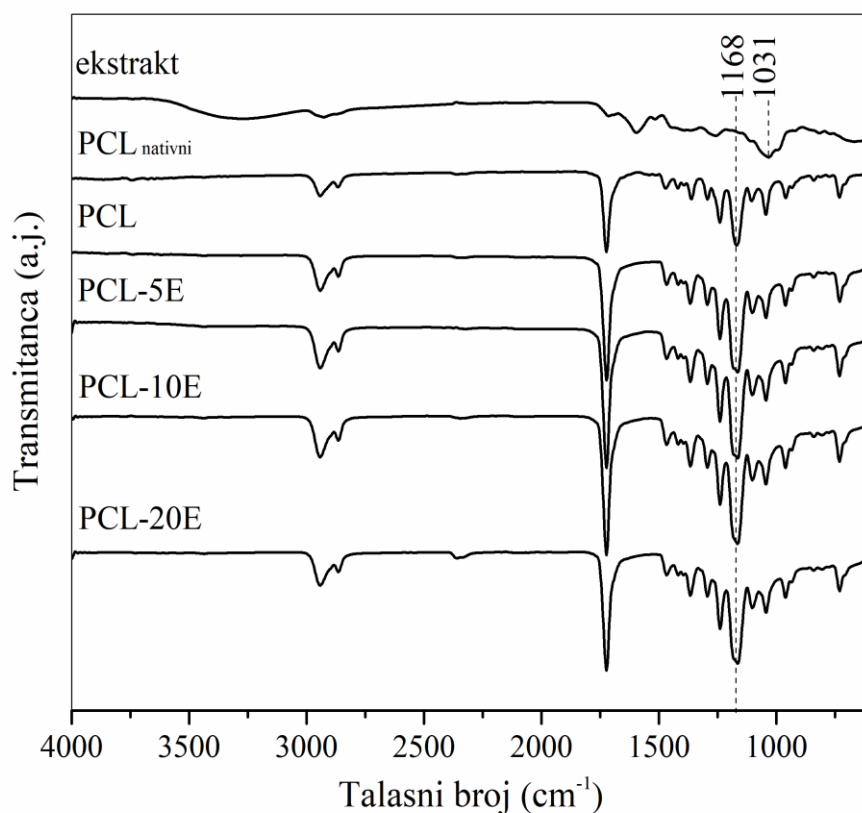
#### **4.2.1.5. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom**

Hemijski sastav, efekat inkorporacije ekstrakta žalfije na strukturalna svojstva PCL filmova, kao i potencijalne hemijske interakcije između inkorporiranog ekstrakta i PCL matriksa ispitani su FT-IR spektroskopijom. FT-IR spektri ekstrakta žalfije u slobodnom obliku, PCL granula i razvijenih PCL filmova, bez i sa inkorporiranim ekstraktom, prikazani su na Slici 4.11. FT-IR spektar slobodnog ekstrakta u suvoj formi pokazuje nekoliko karakterističnih traka. Široka traka u opsegu talasnih brojeva između  $3600$  i  $3000 \text{ cm}^{-1}$  pripisuje se vibracionim istezanjima hidroksilnih

grupa, a traka na oko  $2925\text{ cm}^{-1}$  vibracionim istežanjima alifatičnih grupa (Torkamani et al., 2018). Traka na oko  $1715\text{ cm}^{-1}$  javlja se usled  $\text{C}=\text{O}$  vibracionih istežanja, a traka na oko  $1031\text{ cm}^{-1}$  usled  $\text{C}-\text{O}$  vibracija. Ove dve trake najverovatnije potiču od ekstrahovanih primarnih biljnih metabolita (Schulz i Baranska, 2007). Dalje, trake uočene na oko  $1596$  i  $1517\text{ cm}^{-1}$  potiču od vibracija istežanja benzenovog prstena što ukazuje na prisustvo sekundarnih biljnih metabolita u ekstraktu, pre svega fenolnih jedinjenja (Heneczowski et al., 2001; Moreno et al., 2019).

Na FT-IR spektru PCL-a u formi granule uočava se intenzivna traka na oko  $1722\text{ cm}^{-1}$  koja potiče od  $\text{C}=\text{O}$  vibracija. Pored ove trake, uočavaju se i trake na oko  $2941$  i  $2862\text{ cm}^{-1}$  koje se pripisuju asimetričnim i simetričnim vibracijama  $-\text{CH}_2$  grupa. Trake u oblasti talasnih brojeva između  $1490$  i  $1350\text{ cm}^{-1}$  javljaju se usled  $\text{C}-\text{H}$  vibracija, a trake na oko  $1240$ ,  $1103$  i  $1044\text{ cm}^{-1}$  usled  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  vibracija u molekulu polimera. Dalje, traka na oko  $1294\text{ cm}^{-1}$  potiče od  $\text{C}-\text{C}$  i  $\text{C}-\text{O}$  valencionih vibracija u kristalnoj fazi, dok traka na oko  $1168\text{ cm}^{-1}$  potiče od  $\text{C}-\text{C}$  i  $\text{C}-\text{O}$  vibracija u amorfnoj fazi polimera (Lepry et al., 2016; Ponjavic et al., 2017; Cherpinski et al., 2019).

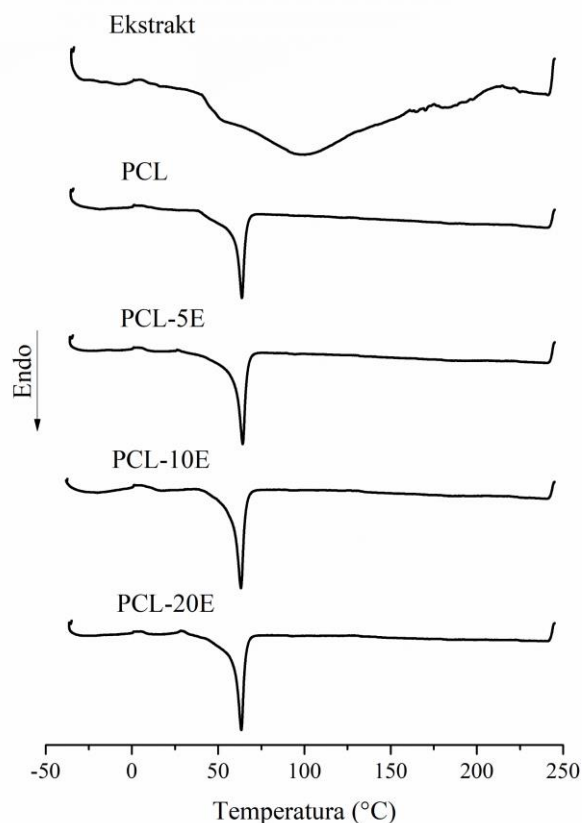
Poređenjem spektara PCL granule i PCL filmova mogu se uočiti promene u poziciji trake koja potiče od  $\text{C}-\text{O}$  vibracija u amorfnoj fazi polimera. Maksimum ove trake u spektrima PCL filmova je pomeren na oko  $1163\text{ cm}^{-1}$  što ukazuje na moguće promene u kristaliničnosti polimera do kojih najverovatnije dolazi tokom procesa elektropredenja. Na FT-IR spektrima aktivnih filmova uočavaju se samo trake koje potiču od PCL matriksa i koje u potpunosti prekrivaju sve trake koje potiču od ekstrakta, što ukazuje na efikasnu inkorporaciju ekstrakta žalfije unutar polimernog matriksa. U poređenju sa kontrolnim PCL filmom, inkorporacija ekstrakta nije dovela do nastajanja novih niti promena u poziciji ili obliku postojećih traka, što ukazuje da između polimernog matriksa i inkorporirane aktivne komponente nije bilo jakih hemijskih interakcija.



**Slika 4.11.** FT-IR spektri ekstrakta žalfije u slobodnom obliku, PCL granula i PCL filmova, bez i sa inkorporiranim ekstraktom žalfije

#### 4.2.1.6. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija

Uticaj inkorporacije ekstrakta žalfije na toplotna svojstva PCL filmova, u pogledu temperature topljenja ( $T_m$ ) i entalpije topljenja ( $\Delta H_m$ ), kao i na stepen kristaliničnosti ( $X_c$ ), ispitan je primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC). DSC termogrami ekstrakta žalfije u slobodnom obliku i filmova, kontrolnog i sa različitim sadržajem inkorporiranog ekstrakta žalfije, prikazani su na Slici 4.12., a vrednosti analiziranih parametara prikazane su u Tabeli 4.4.



**Slika 4.12.** DSC termogrami ekstrakta žalfije u slobodnom obliku i PCL filmova, kontrolnog i sa različitim sadržajem inkorporiranog ekstrakta žalfije

**Tabela 4.4.** Rezultati DSC analize PCL filmova

Uzorak	Temperatura topljenja (°C)	Entalpija topljenja (J/g)	Stepen kristaliničnosti (%)
PCL	63,78	91,32	65,46
PCL-5E	64,23	93,35	66,92
PCL-10E	63,23	89,14	63,90
PCL-20E	63,45	95,25	68,28

Na DSC termogramu ekstrakta žalfije u slobodnom obliku prisutan je širok endotermni pik sa maksimumom na 100,13 °C i entalpijom od 368,99 J/g, što se može pripisati gubitku rezidua rastvarača i lako isparljivih konstituenata ekstrakta. DSC termogram PCL filma bez inkorporiranog ekstrakta pokazuje oštar i intenzivan endotermni pik na 63,78 °C, što predstavlja tačku topljenja kristalne faze PCL-a. Ova vrednost je bliska vrednostima prijavljenim u literaturi (~ 60-65 °C) za različite strukture na bazi PCL-a (Basar et al., 2017; Filipović et al., 2019). Inkorporacija ekstrakta



nije uticala na  $T_m$  filmova, tako da sve ispitivane formulacije, nezavisno od prisustva i sadržaja inkorporiranog ekstrakta, pokazuju veoma slične  $T_m$  vrednosti, u opsegu od 63,23-64,23 °C. U pogledu entalpije topljenja i stepena kristaliničnosti, blage varijacije se uočavaju kod filmova sa 5 i 10% inkorporiranog ekstrakta u odnosu na kontrolni film. Nešto veći uticaj primetan je kod filma sa 20% inkorporiranog ekstrakta, pri čemu je došlo do povećanja  $\Delta H_m$  za ~3 J/g i  $X_c$  za ~4% u odnosu na kontrolni film. Ovakav rezultat sugerise da se pri inkorporaciji većeg sadržaja ekstrakta žalfije najverovatnije postiže blag efekat nukleacije (Castro-Mayorga et al., 2017a). Literaturni podaci takođe ukazuju da inkorporacija aktivnih komponenti u PCL matriks može rezultovati blagim porastom stepena kristaliničnosti (Basar et al., 2017).

DSC termogrami PCL filmova, nezavisno od prisustva i sadržaja ekstrakta, su veoma slični i ne uočavaju se razlike. Na svim termogramima filmova prisutan je samo endotermni pik sa maksimumom na oko 63-64 °C, prethodno pripisan tački topljenja PCL-a, dok se prisustvo pika koji potiče od ekstrakta žalfije ne uočava. Ovakav izgled termograma ukazuje da je ekstrakt žalfije efikasno inkorporiran u polimernom matriksu u vidu čvrste disperzije (Potrč et al., 2015).

Generalno, rezultati DSC analize su u saglasnosti sa FT-IR analizom i potvrđuju da između polimernog matriksa i komponenti ekstrakta nije bilo jakih hemijskih interakcija.

#### 4.2.1.7. Termogravimetrijska analiza

Termička stabilnost ekstrakta žalfije u slobodnom obliku, kao i uticaj inkorporacije ekstrakta žalfije na termičku stabilnost PCL filmova ispitani su termogravimetrijskom analizom (TGA). U ovom pogledu, određeni su sledeći parametri: temperatura na kojoj počinje degradacija uzoraka, definisana kao temperatura na kojoj dolazi do gubitka mase od 5% ( $T_{d5\%}$ ), temperatura degradacije ( $T_d$ ), gubitak mase uzoraka na temperaturi degradacije ( $m_{T_d}$ ) i rezidualna masa na 700 °C ( $m_{r700^\circ C}$ ) (Tabela 4.5.). TGA krive gubitka mase u funkciji od temperature (plava boja) i analiza prvog izvoda (narandžasta boja) prikazane su na Slici 4.13.

**Tabela 4.5.** TGA rezultati ekstrakta žalfije u slobodnom obliku i PCL filmova, kontrolnog i sa različitim sadržajem inkorporiranog ekstrakta žalfije

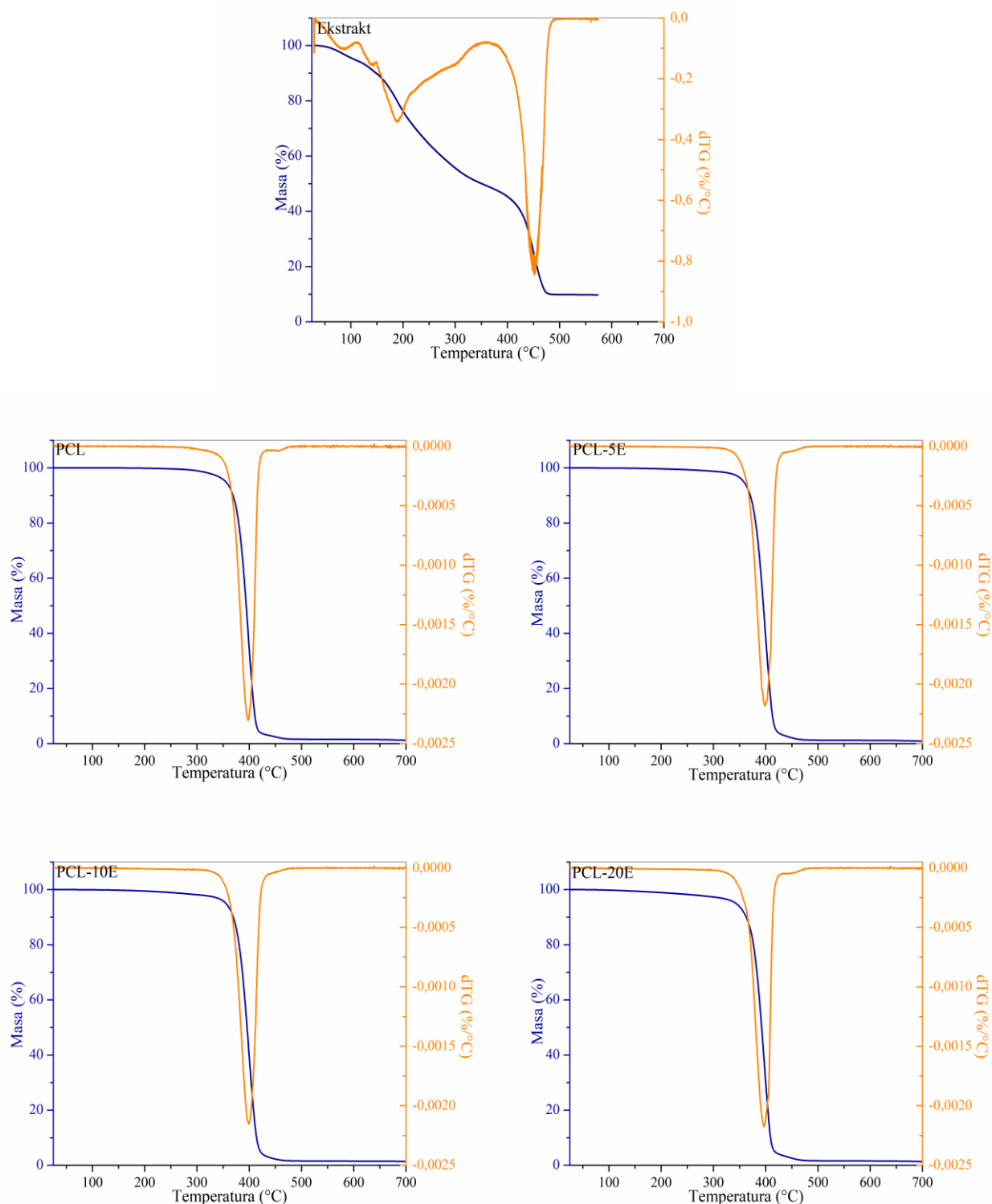
Uzorak	$T_{d5\%}$ (°C)	$T_d$ (°C)	$m_{T_d}$ (%)	$m_{r700^\circ C}$ (%)
Ekstrakt	106,26	452,14	76,48	8,09
PCL	354,79	397,75	59,64	1,23
PCL-5E	357,81	398,50	57,66	0,87
PCL-10E	355,27	399,25	58,73	1,38
PCL-20E	343,01	396,25	60,32	1,34

Termička degradacija ekstrakta žalfije u slobodnom obliku odvija se kroz nekoliko koraka. Početak degradacije, definisan kao temperatura na kojoj dolazi do gubitka mase od 5%, zabeležen je na oko 106 °C i može se pripisati gubitku apsorbovane vode i lako isparljivih jedinjenja ekstrakta. Sa daljim povećanjem temperature degradacija ekstrakta je nastavljena, pri čemu je maksimalna stopa degradacije, odnosno gubitak mase od 76,48%, dostignut na 452,14 °C. Rezidualna masa ekstrakta određena na 700 °C iznosi oko 8%.

Svi PCL filmovi, nezavisno od prisustva i sadržaja inkorporiranog ekstrakta žalfije, pokazuju veoma slične krive termičke degradacije (Slika 4.13.). Inkorporacija ekstrakta u PCL matriks rezultovala je neznatnim varijacijama parametara termičke stabilnosti (Tabela 4.5.). Proces termičke dekompozicije ispitivanih formulacija filmova počinje na oko 350 °C. Nešto niža

temperatura početka degradacije u odnosu na kontrolni film primećena je za formulaciju sa najvećim sadržajem inkorporiranog ekstrakta (PCL-20E) što najverovatnije potiče od prisustva veće količine lako isparljivih jedinjenja. Početno smanjenje mase pripisano gubitku lako isparljivih jedinjenja kod ekstrakta žalfije u slobodnom obliku nije uočeno kod filmova sa inkorporiranim ekstraktom, dok se temperaturni opseg glavne termičke dekompozicije ekstrakta u velikoj meri poklapa sa opsegom dekompozicije filmova. Maksimalna stopa degradacije PCL filmova, odnosno gubitak mase od oko 60%, dostignut je na skoro 400 °C. Rezidualna masa filmova na 700 °C je u opsegu od 0,87-1,38%, pri čemu su nešto veće vrednosti primećene za formulacije sa većim sadržajem inkorporiranog ekstrakta (PCL-10E i PCL-20E). Temperatura na kojoj dolazi do maksimalne stope degradacije ispitivanih filmova slična je vrednosti prijavljenoj za elektropredena PCL vlakna, kontrolna i sa inkorporiranim karvakrolom (~393 °C, Tampau et al., 2018), kao i za kontrolni PCL film dobijen ekstruzijom iz rastopa polimera (~404 °C, Hadj-Hamou et al., 2017).

Generalno, TGA rezultati su pokazali da inkorporacija ekstrakta žalfije u PCL matriks nije uticala na termičku stabilnost filmova u poređenju sa kontrolnom formulacijom, bez inkorporiranog ekstrakta. Takođe, ispitivane formulacije PCL filmova pokazale su termičku stabilnost do ~350 °C, što ukazuje na njihovu pogodnost za zaštitu lako isparljivih aktivnih konstituenata ekstrakta.



**Slika 4.13.** TGA/dTG krive ekstrakta žalfije u slobodnom obliku i PCL filмова, kontrolnog i sa različitim sadržajem inkorporiranog ekstrakta žalfije

#### 4.2.1.8. Mehaničke karakteristike

U okviru mehaničke karakterizacije PCL filмова, kontrolnog i sa različitim sadržajem inkorporiranog ekstrakta žalfije, određeni su zatezna jačina, modul elastičnosti, izduženje pri kidanju i žilavost. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 4.6.

**Tabela 4.6.** Mehaničke karakteristike PCL filmova

Uzorak	Modul elastičnosti (MPa)	Zatezna jačina (MPa)	Izduženje pri kidanju (%)	Žilavost (mJ/m <sup>3</sup> )
PCL	420,77 ± 61,45 <sup>a*</sup>	24,32 ± 3,79 <sup>a</sup>	4,60 ± 0,34 <sup>a</sup>	1,41 ± 0,19 <sup>a</sup>
PCL-5E	425,40 ± 40,85 <sup>a</sup>	26,11 ± 2,76 <sup>a</sup>	4,90 ± 0,48 <sup>a</sup>	1,51 ± 0,09 <sup>a</sup>
PCL-10E	410,78 ± 24,70 <sup>a</sup>	31,98 ± 4,42 <sup>a</sup>	5,44 ± 0,78 <sup>a</sup>	1,62 ± 0,02 <sup>a</sup>
PCL-20E	359,25 ± 63,43 <sup>a</sup>	26,43 ± 5,19 <sup>a</sup>	5,28 ± 0,57 <sup>a</sup>	1,52 ± 0,15 <sup>a</sup>

\*različita slova u okviru iste kolone ukazuju na statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ )

Inkorporacija ekstrakta žalfije u matriks PCL-a dovela je do neznatnog smanjenja modula elastičnosti i povećanja zatezne jačine, izduženja pri kidanju i žilavosti u odnosu na kontrolni PCL film, bez inkorporiranog ekstrakta žalfije. Ovakav rezultat ukazuje na veoma blag plastificirajući efekat ekstrakta na matriks polimera. Nezavisno od sadržaja inkorporiranog ekstrakta promene mehaničkih karakteristika nisu statistički značajne ( $p > 0,05$ ). Kako je prethodno diskutovano, između polimernog matriksa i konstituenta inkorporiranog ekstrakta nije bilo jakih hemijskih interakcija (Sekcija 4.2.1.5.), što može biti razlog neznatnog uticaja inkorporacije ekstrakta u matriks PCL-a na mehaničke karakteristike filmova. Takođe, mehaničke karakteristike ispitivanih filmova su u saglasnosti sa prethodno diskutovanim termičkim karakteristikama (Sekcije 4.2.1.6. i 4.2.1.7.). Slično dobijenim rezultatima, inkorporacija oleorezina crnog bibera u PCL slojeve višeslojnog PCL-želatin-PCL filma nije rezultovala značajnim promenama mehaničkih karakteristika (Figueroa-Lopez et al., 2018).

U poređenju sa nekim od široko korišćenih ambalažnih materijala, kao što je LDPE, pripremljeni filmovi na bazi PCL-a su čvršći, ali i manje podložni deformacijama. Tako na primer LDPE film dobijen ekstruzijom, debljine 44  $\mu\text{m}$ , pokazuje zateznu jačinu i izduženje pri kidanju od 5,88 MPa i 112,39%, respektivno (Gaikwad et al., 2017). Posmatrano sa aspekta potencijalne primene kao ambalažnih materijala za pakovanje prehrambenih proizvoda, razvijeni PCL filmovi su naročito pogodni u slučajevima kada se pri manipulaciji zahtevaju mehanička čvrstina i otpornost materijala na kidanje.

#### 4.2.1.9. Barijerna svojstva

Analiza barijernih svojstava materijala važna je kako bi se bolje razumela veza između njihovog sastava, strukture i svojstava, ali i da bi se stekao bliži uvid o njihovom potencijalu primene kao ambalažnih materijala za pakovanje prehrambenih proizvoda. U okviru barijernih svojstava PCL filmova, kontrolnog i sa različitim sadržajem inkorporiranog ekstrakta žalfije, ispitana je njihova sposobnost sprečavanja prolaska vodene pare i D-limonena. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 4.7.

##### 4.2.1.9.1. Propustljivost vodene pare

Analiza propustljivosti vodene pare kroz PCL filmove ukazala je na razlike između ispitivanih formulacija (Tabela 4.7.). Tako je kontrolni film, bez inkorporiranog ekstrakta, ispoljio značajno jaču ( $p < 0,05$ ) barijeru prema prolasku vodene pare u poređenju sa filmovima u kojima je inkorporiran veći sadržaj ekstrakta (10 i 20%). Sa druge strane, barijera prolaska vodene pare kroz kontrolni film bila je nešto manja u poređenju sa filmom sa 5% inkorporiranog ekstrakta. Na osnovu dobijenih rezultata može se uočiti zavisnost između debljine filmova (Tabela 4.3.) i propustljivosti vodene pare, pri čemu deblji filmovi pružaju jaču barijeru za prolazak vodene pare što je u skladu sa literaturom (Péroval et al., 2002; Cherpinski e al., 2018b). Pored toga, rezultati ukazuju da sadržaj inkorporiranog ekstrakta i morfologija filmova takođe doprinose razlikama u

propustljivosti vodene pare. Posmatrajući konstituente filmova, ekstrakt žalfije ima veći afinitet prema vodi u poređenju sa PCL matriksom koji je hidrofobne prirode. Međutim, inkorporacija niskog sadržaja ekstrakta (5%) rezultovala je efikasnijim spajanjem elektropredenih vlakana i dobijanjem glatke, kompaktne strukture, bez vidljivih nepravilnosti u odnosu na strukturu kontrolnog PCL filma (Slika 4.9., a2, b2), što je najverovatnije uzrok boljih barijernih performansi formulacije PCL-5E. U slučaju inkorporacije većih sadržaja ekstrakta (10 i 20%), manja barijerna efikasnost filmova može se pripisati većem afinitetu ekstrakta prema vodi. Takođe, migracija lako isparljivih jedinjenja ekstrakta tokom termičkog tretmana vlakana može dovesti do stvaranja pora, što je prethodno uočeno za formulaciju PCL-20E (Slika 4.9., d2), i na taj način stvoriti put za difuziju vodene pare.

Propustljivost vodene pare kroz kontrolni PCL film veoma je slična literaturnoj vrednosti prijavljenoj za kontrolni PCL film izliven iz rastvora ( $3,39 \times 10^{-14}$  kg·m/Pa·s·m<sup>2</sup>), pri čemu je dodatak funkcionalnog konstituenta (celulozna vlakna) takođe imao pozitivan uticaj na barijernu performansu pri sadržaju od 5%, odnosno negativan pri sadržaju od 10% (Sanchez-Garcia et al., 2008). U poređenju sa komercijalnim ambalažnim materijalima, propustljivost vodene pare kroz celofan ( $6,90 \times 10^{-14}$  kg·m/Pa·s·m<sup>2</sup>), poliamid 6 ( $2,06 \times 10^{-14}$  kg·m/Pa·s·m<sup>2</sup>) i etilen-vinil alkohol ( $1,70 \times 10^{-14}$  kg·m/Pa·s·m<sup>2</sup>) nalazi se u rangu vrednosti određenih za ispitivane PCL filmove, dok polietilen tereftalat ( $0,23 \times 10^{-14}$  kg·m/Pa·s·m<sup>2</sup>) i polietilen niske gustine ( $0,12-0,19 \times 10^{-14}$  kg·m/Pa·s·m<sup>2</sup>) pokazuju bolje barijerne performanse (Péroval et al., 2002; Lagarón, 2011).

**Tabela 4.7.** Propustljivost vodene pare (WVP) i D-limonena (LP) kroz PCL filmove

Uzorak	WVP (kg·m/Pa·s·m <sup>2</sup> )	LP (kg·m/Pa·s·m <sup>2</sup> )
PCL	$(3,78 \pm 0,97) \times 10^{-14a*}$	$(1,01 \pm 0,05) \times 10^{-13a}$
PCL-5E	$(1,60 \pm 0,28) \times 10^{-14a}$	$(1,84 \pm 0,21) \times 10^{-13b}$
PCL-10E	$(8,63 \pm 1,35) \times 10^{-14b}$	$(1,22 \pm 0,02) \times 10^{-13ac}$
PCL-20E	$(8,07 \pm 0,18) \times 10^{-14b}$	$(1,40 \pm 0,09) \times 10^{-13c}$

\*različita slova u okviru iste kolone označavaju statistički značajne razlike između uzoraka (p < 0,05)

#### 4.2.1.9.2. Propustljivost D-limonena

Barijerna performansa PCL filmova prema aromatičnim jedinjenjima ispitana je koristeći D-limonen kao uobičajeno primenjivani standard za ovu svrhu (Cherpinski et al., 2018a). Dobijeni rezultati su pokazali da je propustljivost D-limonena veća kroz filmove sa inkorporiranim ekstraktom žalfije u odnosu na kontrolni film, pri čemu trend povećanja propustljivosti ne sledi povećanje sadržaja inkorporiranog ekstrakta (Tabela 4.7.). Generalno, uočeno je da na propustljivost D-limonena i vodene pare kroz PCL filmove ne utiču isti faktori. D-limonen, kao nepolarno organsko jedinjenje, ima jak plastificirajući efekat na PCL, pri čemu je sorpcija ove arome od strane PCL-a velika (Cava et al., 2006; Lasprilla-Botero et al., 2018). Tako su Sanchez-Garcia et al. (2008) pokazali da sorpcija D-limonena od strane kontrolnog PCL filma izlivenog iz rastvora iznosi 9,80%, a propustljivost  $5,51 \times 10^{-13}$  kg·m/Pa·s·m<sup>2</sup>, što je više u poređenju sa PCL filmovima razvijenim u okviru ove disertacije. Pored toga, u navedenoj studiji je pokazano da dodatak funkcionalnog konstituenta (celulozna vlakna) i povećanje njegovog sadržaja rezultuju većim stepenom sorpcije D-limonena od strane PCL filmova. U ovom pogledu, veća permeabilnost D-limonena kroz uzorke sa inkorporiranim ekstraktom ukazuje da konstituenti ekstrakta dodatno olakšavaju sorpciju i difuziju ove arome kroz filmove.

U poređenju sa komercijalnim ambalažnim materijalima, propustljivost D-limonena kroz PET film dobijen presovanjem ( $1,17 \times 10^{-13}$  kg·m/Pa·s·m<sup>2</sup>) nalazi se u opsegu vrednosti određenih za ispitivane PCL filmove (Sanchez-Garcia et al., 2007). U poređenju sa korona tretiranim LDPE komercijalnim filmom ( $2,16 \times 10^{-13}$  kg·m/Pa·s·m<sup>2</sup>; Lasprilla-Botero et al., 2018), ispitivani PCL filmovi predstavljaju efikasniju barijeru za prolazak arome.

#### 4.2.1.10. Otpuštanje aktivnih jedinjenja iz filmova u simulante hrane

Posmatrano sa aspekta potencijalne primene sintetisanih filmova kao aktivnih ambalažnih materijala za pakovanje prehrambenih proizvoda, glavni mehanizam delovanja zasnovao bi se na otpuštanju aktivnih jedinjenja iz filmova u proizvod pri njihovom direktnom kontaktu. Otpuštanje aktivnih jedinjenja iz polimernog matriksa odvija se kroz tri sukcesivna koraka: bubrenje polimernog matriksa i difuzija rastvarača kroz matriks; relaksacija matriksa; i difuzija aktivnih jedinjenja kroz matriks u okolni medijum (Talón et al., 2017b; Tampau et al. 2018).

U ovoj sekciji disertacije ispitivan je potencijal otpuštanja ukupnih fenolnih jedinjenja i fenolnih kiselina iz filmova u medijume koji simuliraju hranu, i to 10% i 95% (v/v) rastvora etanola u destilovanoj vodi koji simuliraju proizvode hidrofilnog i lipofilnog karaktera, respektivno. Filmovi su u direktnom kontaktu sa medijumima inkubirani na 20 °C u trajanju od 10 dana što simulira stvarni kontakt materijala i proizvoda u temperaturnom opsegu od rashlađivanja (5°C) do ambijentalne temperature (do 20°C) tokom 3-30 dana (Regulativa Evropske komisije (EU) br. 10/2011). Integritet filmova bio je u potpunosti očuvan nakon njihove inkubacije u kontaktu sa medijumima za otpuštanje. Dobijeni rezultati su pokazali da je veća količina ukupnih fenolnih jedinjenja otpuštena u 95% rastvor u odnosu na 10% rastvor etanola (Tabela 4.8.), dok je količina otpuštenih fenolnih kiselina bila ispod limita detekcije nezavisno od korišćenog medijuma. Pored toga, veća količina ukupnih fenolnih jedinjenja kvantifikovana je u medijumima koji su bili u kontaktu sa filmovima u kojima je sadržaj inkorporiranog ekstrakta veći, što je statistički bilo značajno kada je 95% rastvor etanola ispitivan kao medijum ( $p < 0,05$ ). Migracioni limit i ograničenja u pogledu količine otpuštenih fenolnih jedinjenja iz materijala predviđenih da budu u kontaktu sa hranom nisu propisani regulativom, zbog čega se u tom slučaju primenjuje generalni limit migracije od 60 mg/kg simulanta (Regulativa Evropske komisije (EU) br. 10/2011). Vrednosti kvantifikovane za ispitivane formulacije u oba medijuma bile su ispod navedenog limita.

**Tabela 4.8.** Koncentracija ukupnih fenolnih jedinjenja otpuštenih iz filmova u simulante hrane

Uzorak	Ukupna fenolna jedinjenja (mg GAE /kg medijuma)	
	10% rastvor etanola	95% rastvor etanola
PCL-5E	$1,34 \pm 0,10^{a1*}$	$4,72 \pm 0,11^{a1}$
PCL-10E	$1,63 \pm 0,13^{a1}$	$7,71 \pm 0,14^{a2}$
PCL-20E	$2,38 \pm 0,11^{a1}$	$12,04 \pm 0,04^{b2}$

\* vrednosti u istoj koloni obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ); vrednosti iste formulacije obeležene različitim brojevima se statistički značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ) u zavisnosti od medijuma

Na otpuštanje aktivnih jedinjenja iz polimernog matriksa utiču polarnost medijuma i hemijski afinitet između medijuma i polimera, pa je stopa otpuštanja aktivnih jedinjenja iz PCL matriksa veća što je polarnost medijuma manja (Tampau et al., 2018). S tim u vezi, uzimajući u obzir da je PCL nepolaran polimer i da su površine ispitivanih formulacija hidrofobne (Sekcija 4.2.1.4.), pretpostavka je da je otpuštanje veće količine ukupnih fenolnih jedinjenja u 95% rastvor

etanola rezultat manje polarnosti ovog medijuma zbog manjeg sadržaja vode i prema tome većeg kapaciteta da dovede do relaksacije PCL matriksa i oslobađanja inkorporiranih aktivnih jedinjenja. Generalno, dobijeni rezultati ukazuju da razvijeni filmovi na bazi PCL-a sa inkorporiranim ekstraktom žalfije imaju potencijal da budu korišćeni kao materijali koji će oslobađati aktivne konstituente u prehrambene proizvode, naročito one sa lipofilnim karakterom.

#### 4.2.1.11. Antioksidativna aktivnost

Antioksidativni potencijal filmova na bazi PCL-a ocenjen je kao sposobnost filmova da u direktnom kontaktu sa rastvorom DPPH• neutrališu ovaj slobodni radikal. Uzimajući u obzir prethodno diskutovane rezultate u pogledu otpuštanja aktivnih jedinjenja u simulante hrane, DPPH• je odabran kao model koji predstavlja lipofilne slobodne radikale koji se javljaju u sistemima podložnim oksidaciji gde učestvuju u lančanim reakcijama iniciranim autooksidacijom lipida ili drugih nezasićenih jedinjenja (Molyneux, 2004; Roby et al., 2013).

Integritet filmova bio je u potpunosti očuvan nakon njihove inkubacije u direktnom kontaktu sa rastvorom DPPH•. Kontrolni uzorak, bez inkorporiranog ekstrakta žalfije, pokazao je sposobnost inhibicije DPPH• radikala od 3,64%. Ova antioksidativna aktivnost je veoma slaba i pre se može pripisati apsorpciji DPPH• od strane filma tokom njihovog kontakta (Aytac i Uyar, 2016). Značajno jača ( $p < 0,05$ ) sposobnost filmova da „gase“ aktivnost slobodnih radikala postignuta je inkorporacijom ekstrakta žalfije i povećanjem količine inkorporiranog ekstrakta. Tako je procenat inhibicije DPPH• slobodnog radikala pri kontaktu sa formulacijama sa 5, 10 i 20% inkorporiranog ekstrakta iznosio 30,64, 53,84 i 86,46%, respektivno. Ovakav rezultat jasno pokazuje da antioksidativna aktivnost pripremljenih formulacija potiče isključivo od inkorporiranog ekstrakta žalfije. Kako je u Sekciji 4.1.2.3. objašnjeno, ekstrakt žalfije ima sposobnost inhibicije DPPH• slobodnog radikala koja se u velikoj meri pripisuje prisutnim fenolnim jedinjenjima i njihovom kapacitetu da doniraju atom vodonika slobodnom radikalima i na taj način dovedu do njegove redukcije. Prema tome, dobijeni rezultat sugerise da je sposobnost ekstrakta da neutralise reaktivne slobodne radikale zadržana pri njegovoj inkorporaciji u PCL matriks, odnosno tokom procesa elektropredenja i termičkog tretmana. Na ovaj način razvijeni su antioksidativni materijali kao potencijalni aktivni ambalažni materijali za pakovanje prehrambenih proizvoda sa inovativnom funkcijom u prevenciji oksidacionih procesa i kvarenja upakovanih proizvoda.

#### 4.2.1.12. Antibakterijska aktivnost

Antibakterijska efikasnost filmova na bazi PCL-a prema patogenim bakterijama: *S. aureus* (Gram-pozitivan soj) i *E. coli* (Gram-negativan soj) ocenjena je kao sposobnost filmova da pri direktnom, površinskom kontaktu sa bakterijama dovedu do redukcije njihovog broja. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 4.9.

PCL film bez inkorporiranog ekstrakta žalfije nije ispoljio antibakterijsku aktivnost ( $R < 0,5$ ) prema testiranim sojevima bakterija, što je u skladu sa literaturom (Radisavljevic et al., 2018). Efekat inhibicije rasta bakterija postignut je inkorporacijom ekstrakta žalfije u PCL matriks. Sve formulacije filmova sa inkorporiranim ekstraktom, nezavisno od sadržaja ekstrakta, ispoljile su potpun baktericidni efekat na *S. aureus*. Naime, na MHA nije došlo do porasta kolonija *S. aureus* nakon 24 h kontakta ovog bakterijskog soja sa filmovima koji su sadržali ekstrakt (PCL-5E, PCL-10E, PCL-20E). Sa druge strane, dobijeni rezultati su ukazali na veću rezistentnost *E. coli* prema dejstvu filmova. Tako je inhibitorni efekat filmova na *E. coli* zavisio od sadržaja inkorporiranog ekstrakta, pri čemu je površinska redukcija broja bakterija pri kontaktu sa filmovima neznatno porasla pri povećanju sadržaja inkorporiranog ekstrakta sa 5 na 10%, i značajno pri povećanju sadržaja ekstrakta na 20%. U tom pogledu, antibakterijska aktivnost filmova prema *E. coli* može se definisati kao blaga ( $0,5 \leq R < 1$ ) za formulacije PCL-5E i PCL-10E, odnosno jaka ( $R > 3$ ) za formulaciju PCL-20E (Tabela 4.9.). Razlika u osetljivosti *S. aureus* i *E. coli* pri kontaktu sa PCL

### *Sinteza i karakterizacija aktivnih vlakana i filmova na bazi poli( $\epsilon$ -kaprolaktona) i zeina*

filmovima sa inkorporiranim ekstraktom žalfije može se pripisati prethodno diskutovanim antibakterijskim svojstvima ekstrakta (Sekcija 4.1.2.4.). Podsećanja radi, veće koncentracije ekstrakta u slobodnom obliku potrebne su za postizanje inhibitornih i baktericidnih efekata na *E. coli* u odnosu na *S. aureus*, što je pripisano kompleksnijoj građi *E. coli*, kao Gram-negativne bakterije, i prisustvu spoljašnje membrane koja deluje kao barijera za prolazak aktivnih jedinjenja. Tako kompleksnija građa *E. coli* može biti uzrok veće rezistentnosti ovog soja bakterije ne samo prema delovanju slobodnog ekstrakta, već i filmova sa inkorporiranim ekstraktom.

**Tabela 4.9.** Antibakterijska aktivnost PCL filmova

Uzorak	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	Broj bakterija (log CFU/ml)	Površinska redukcija R	Broj bakterija (log CFU/ml)	Površinska redukcija R
Kontrola	6,10 ± 0,09	-	7,09 ± 0,12	-
PCL	5,77 ± 0,15	0,33	6,89 ± 0,09	0,20
PCL-5E	< 1	baktericidni efekat	6,36 ± 0,13	0,73
PCL-10E	< 1	baktericidni efekat	6,18 ± 0,16	0,91
PCL-20E	< 1	baktericidni efekat	2,40 ± 0,52	4,69

CFU – broj bakterija koje formiraju kolonije na podlozi (engl. *Colony Forming Units*); R – vrednost antibakterijske aktivnosti

Generalno, dobijeni rezultati sugerišu da je sposobnost inhibitornog i baktericidnog delovanja ekstrakta na patogene bakterije održana tokom procesa elektropredenja i termičkog tretmana. Time su inkorporacijom ekstrakta žalfije u matriks PCL-a razvijeni ne samo antioksidativni, već i antibakterijski materijali koji kao potencijalni aktivni ambalažni materijali za pakovanje prehrambenih proizvoda mogu imati važan doprinos u očuvanju kvaliteta i bezbednosti upakovanog proizvoda.

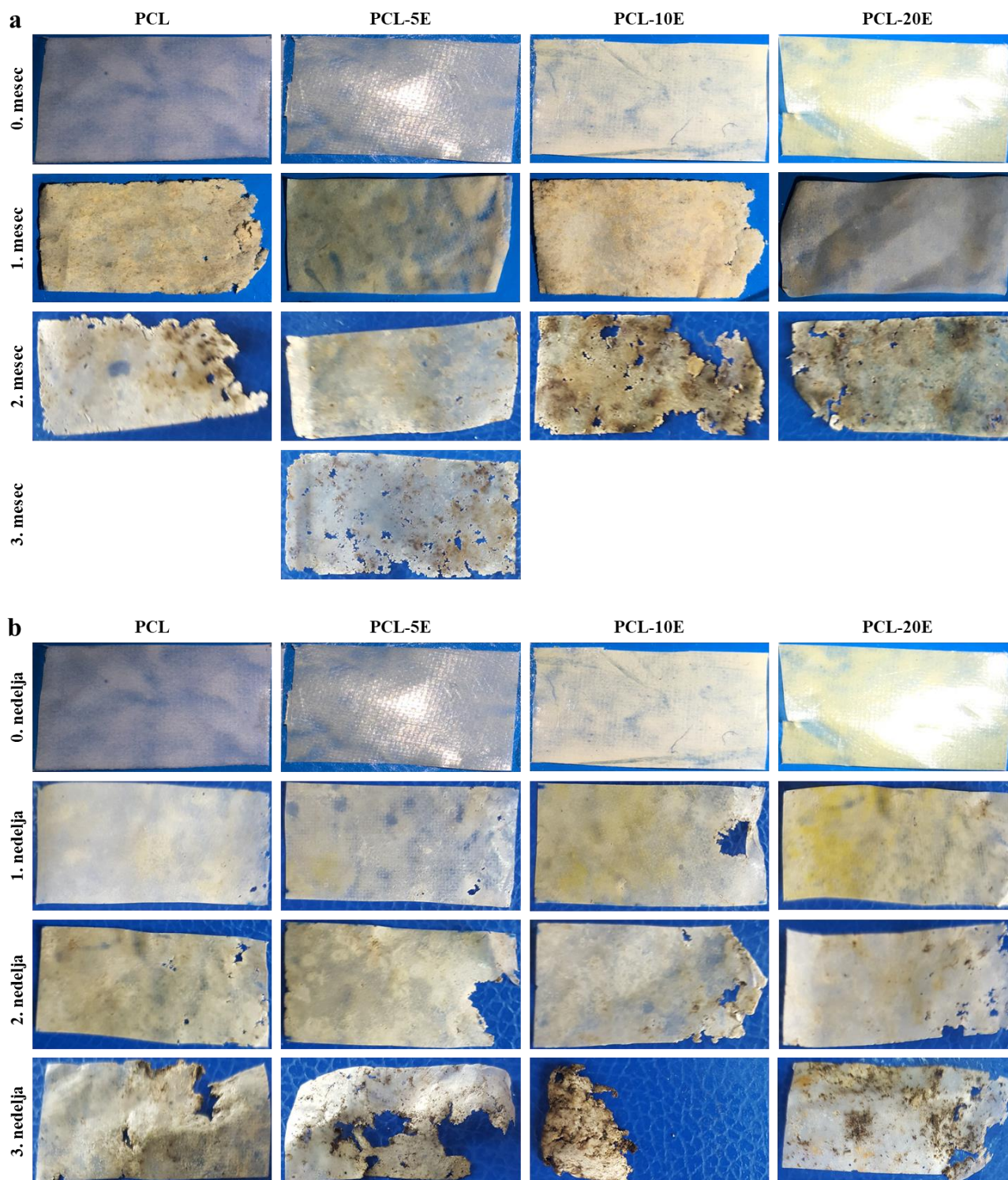
#### **4.2.1.13. Razgradnja u model sistemu komposta**

Razgradnja PCL filmova ispitana je u model sistemu komposta, bez i sa dodatkom bakterijske kulture *P. aeruginosa*. Ovaj bakterijski soj odabran je zbog sposobnosti da luči enzime lipaze koje mogu raskidati estarske veze PCL lanaca (Valdés et al., 2016; Filipović et al., 2019). Prema tome, cilj ove eksperimentalne sekcije bio je da se ispita potencijal razgradnje PCL filmova u uslovima prirodnog okruženja, ali i u uslovima koji mogu ubrzati stopu razgradnje filmova. Razgradnja filmova analizirana je vizuelno, poređenjem izgleda filmova pre stavljanja u kompost i nakon određenog vremena kompostiranja (Slika 4.14.). Pored toga, stepen razgradnje filmova određen je gravimetrijski, kao gubitak mase u funkciji od vremena (Slika 4.15.). Potpuna razgradnja uzoraka definisana je kao dezintegracija uzoraka do neočljivih i/ili sitnih nemerljivih komada rasutih u kompostu.

Sve formulacije filmova, nezavisno od prisustva i sadržaja ekstrakta žalfije, podlegli su razgradnji u model sistemima komposta, pri čemu je različita stopa razgradnje uočena u kompostu bez i sa dodatkom bakterijske kulture *P. aeruginosa*. U slučaju komposta bez dodatka bakterijske kulture eksperiment je trajao 4 meseca. Na kraju svakog meseca uzorci su vađeni iz komposta i analizirani. Nakon 1. meseca inkubacije u kompostu uočena je promena boje, gubitak transparentnosti i početak dezintegracije svih ispitivanih formulacija filmova. Promena boje i gubitak transparentnosti nastaju usled promena indeksa prelamanja svetlosti tokom razgradnje u kompostu (Martínez-Abad et al., 2016), dok do dezintegracije dolazi usled dejstva zemljišnih mikroorganizama (Ponjavic et al., 2017). Dezintegracija je nastavljena tokom vremena, pri čemu su



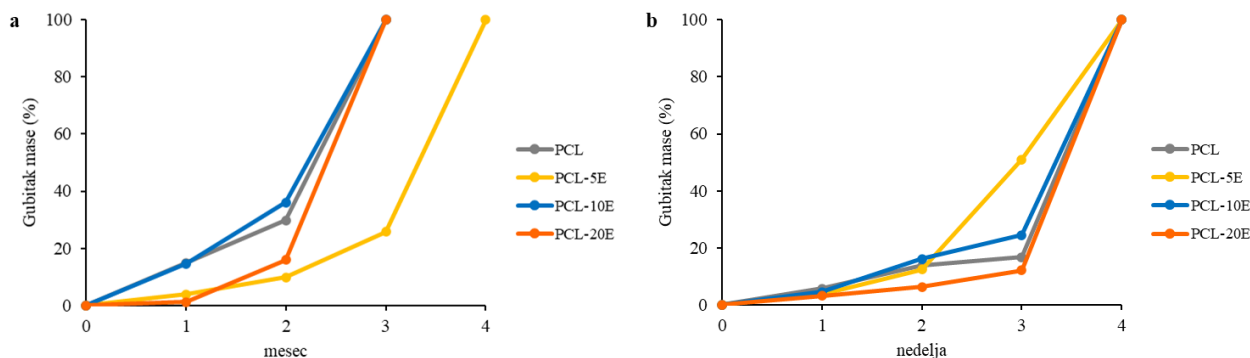
još veći gubici mase filmova izmereni nakon 2. meseca inkubacije. Formulacije PCL, PCL-10E i PCL-20E bile su u potpunosti dezintegrisane bez vidljivih delova u kompostu nakon 3. meseca inkubacije. Sa druge strane, formulacija PCL-5E ispoljila je sporiju stopu razgradnje dostižući potpunu dezintegraciju nakon 4. meseca inkubacije. Sporija stopa razgradnje PCL-5E filma može se pripisati većoj debljini ovog filma u poređenju sa ostalim formulacijama filmova (Sekcija 4.2.1.2.).



**Slika 4.14.** Dezintegracija PCL filmova u model sistemu komposta bez (a) i sa dodatkom bakterijske kulture *P. aeruginosa* (b)

Dodatak bakterijske kulture *P. aeruginosa* u kompost znatno je ubrzao stepen razgradnje PCL filmova, pa je u ovom slučaju eksperiment trajao 4 nedelje. Na kraju svake nedelje uzorci su

vađeni iz komposta i analizirani. Već nakon 1. nedelje uočene su promene koje potiču od razgradnje filmova, a stopa razgradnje se povećavala tokom vremena. Na kraju 4. nedelje svi uzorci su bili u potpunosti dezintegrirani i u veoma sitnim komadima rasuti po kompostu. Ovakav rezultat ukazuje da je nakon dodatka kulture *P. aeruginosa* u kompost došlo do lučenja enzima koji su katalizovali razgradnju filmova. Katalitička aktivnost se pripisuje pre svega *Pseudomonas* lipazi koja pokazuje sposobnost razgradnje i amorfni i kristalnih regija PCL filmova (Liu et al., 2000).



**Slika 4.15.** Gubitak mase PCL filmova tokom inkubacije u model sistemu komposta bez (a) i sa dodatkom bakterijske kulture *P. aeruginosa* (b)

Generalno, dobijeni rezultati su pokazali da inkorporacijom ekstrakta žalfije koji pokazuje antimikrobnu aktivnost nije narušena razgradivost PCL filmova u kompostu od strane prirodno prisutnih mikroorganizama, niti dodate bakterijske kulture. Međutim, uočeno je da se razgradnja ispitivanih formulacija filmova tokom inkubacije u kompostu, pre dostizanja potpune dezintegracije, ne odvija istim intenzitetom. Prema Ponjavic et al. (2017, 2018) razgradnja filmova na bazi PCL-a u kompostu odvija se od površine ka unutrašnjosti kroz mehanizam nehomogene površinske erozije. Nehomogenost ovog mehanizma ukazuje da stepen kontakta sa kompostom i/ili rast zemljišnih mikroorganizama nisu bili homogeni po celoj površini filmova što dovodi do fragmentacije pojedinih delova filmova pre potpune dezintegracije (Fukushima et al., 2010b; Ponjavic et al., 2017). Ipak, svi filmovi su ispoljili podložnost potpunoj razgradnji u kompostu od strane prisutnih mikroorganizama, a koja može biti i ubrzana dodatkom bakterijske kulture *P. aeruginosa*, što je veoma važno posmatrano sa aspekta potencijalne primene filmova kao ambalažnih materijala.

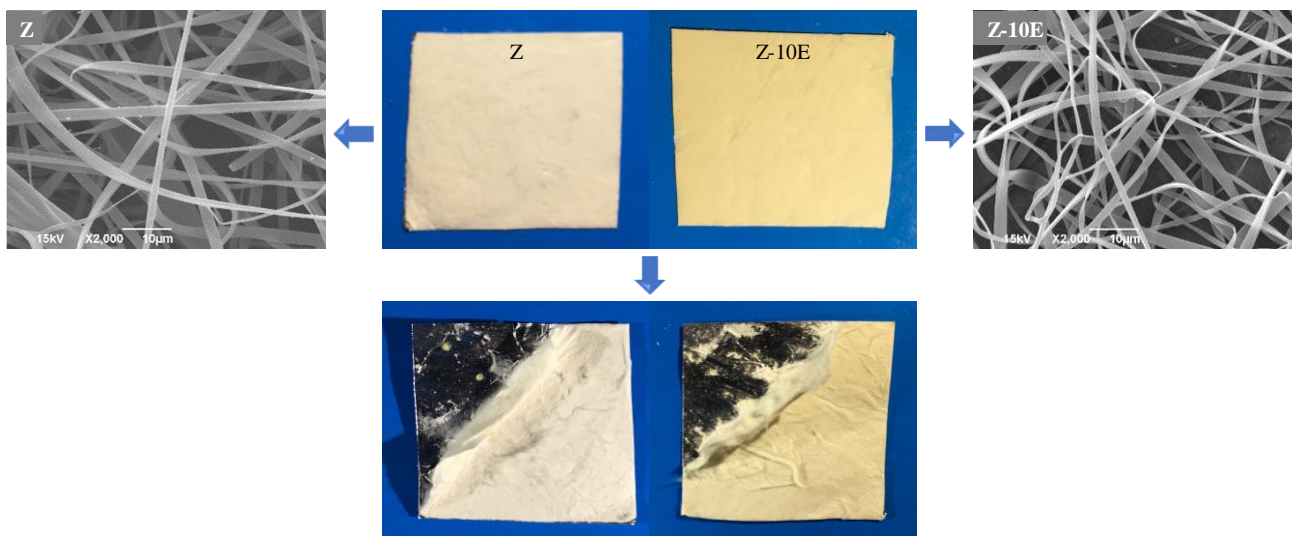
### 4.3. VLAKNA I FILMOVI NA BAZI ZEINA I EKSTRAKTA ŽALFIJE

#### 4.3.1. OPTIMIZACIJA SINTEZE VLAKANA I FILMOVA NA BAZI ZEINA I EKSTRAKTA ŽALFIJE

Kontrolne i aktivne strukture materijala na bazi zeina, odnosno strukture na bazi zeina bez inkorporiranog ekstrakta i sa različitim sadržajem inkorporiranog ekstrakta žalfije, razvijene su primenom tehnika elektropredenja i izlivanja iz rastvora.

##### 4.3.1.1. Sinteza vlakana i filmova na bazi zeina i ekstrakta žalfije

Vlakna zeina, kontrolna i sa 10% (w/w) inkorporiranog ekstrakta žalfije, dobijena su tehnikom elektropredenja. Proces elektropredenja bio je kontinualan i stabilan pri čemu nije uočeno formiranje vlakana makroskopskih dimenzija niti kapanje rastvora. SEM analiza je pokazala da su vlakna zeina glatka i pravilnog oblika (Slika 4.16.). Međutim, uzorke dobijene elektropredenjem nije bilo moguće odvojiti sa folija bez narušavanja njihovog integriteta usled loših mehaničkih karakteristika što je neprihvatljivo sa aspekta potencijalne primene kao ambalažnih materijala. Mehaničke karakteristike filmova dobijenih izlivanjem iz rastvora takođe nisu bile zadovoljavajuće zbog izražene krtosti. Iz tog razloga, dalji fokus je bio usmeren na pripremu blendi zeina sa drugim polimerima u cilju prevazilaženja navedenih problema.

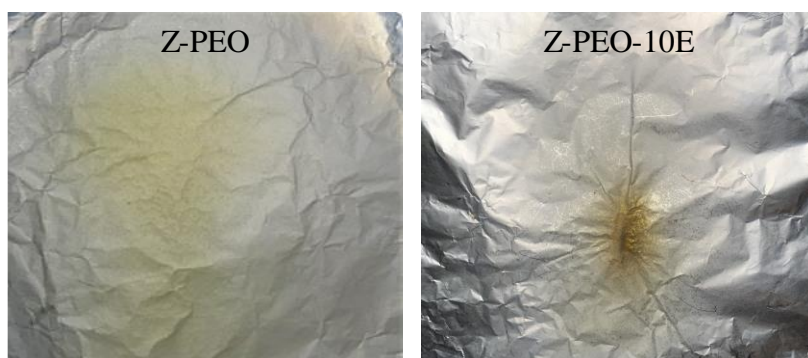


**Slika 4.16.** Makroskopski i mikroskopski izgled i strukture vlakana zeina bez (Z) i sa 10% inkorporiranog ekstrakta žalfije (Z-10E)

##### 4.3.1.2. Sinteza vlakana i filmova na bazi zeina, poli(etilen-oksida) i ekstrakta žalfije

PEO, sintetički polimer, korišćen je za pripremu blende sa zeinom, pre svega zbog dobrih mehaničkih karakteristika, kao što je veliko izduženje pri kidanju (Grkovic et al., 2017), ali i zbog drugih karakteristika, kao što su niska cena, procesibilnost i biorazgradivost (Grkovic et al., 2015). Iako su zein i PEO u potpunosti rastvoreni u istom rastvoru bez razdvajanja faza, tokom sinteze je došlo do razdvajanja faza, najverovatnije usled neadekvatnih koncentracija i odnosa polimera za dobijanje uniformnih vlakana, odnosno filmova. Kod uzoraka dobijenih elektropredenjem uočavaju se različito obojeni delovi usled razdvajanja faza polimera (Slika 4.17.). Ovo razdvajanje faza je još očiglednije kod izlivenih uzoraka nakon isparavanja rastvarača pri čemu je uočena aglomeracija

zeina na površini. Zbog navedenih zapažanja, vlakna i filmovi na bazi zeina i PEO su smatrani neprihvatljivim i nisu bili dalji predmet ispitivanja.



**Slika 4.17.** Makroskopski izgled vlakana na bazi zeina i poli(etilen oksida) bez (Z-PEO) i sa 10% inkorporiranog ekstrakta žalfije (Z-PEO-10E)

#### **4.3.1.3. Sinteza vlakana i filmova na bazi zeina, želatina i ekstrakta žalfije**

Sledeći pristup bio je usmeren na sintezu potencijalno jestivih blendi biopolimera, zeina i želatina (ZG), kako bi se kroz njihovu sinergiju iskoristile prednosti oba proteina, a smanjili individualni nedostaci (Ganiari et al., 2017; Fan et al., 2018).

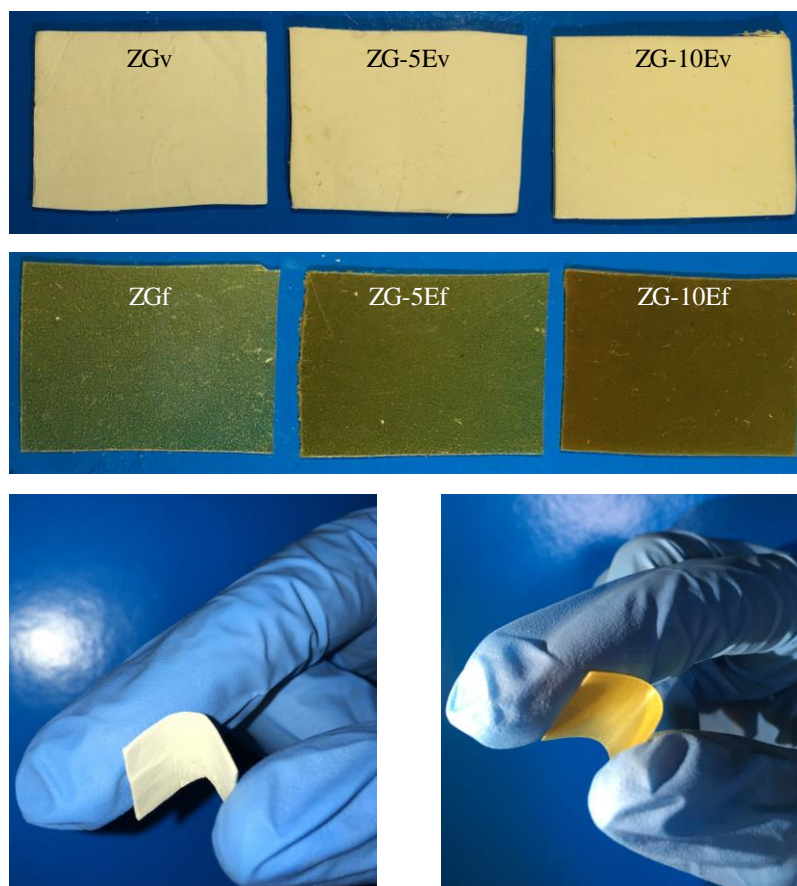
Biopolimerna vlakna na bazi zeina i želatina, kontrolna i sa 5 i 10% (w/w) inkorporiranog ekstrakta žalfije, dobijena su tehnikom elektropredenja. Proces elektropredenja bio je kontinualan i stabilan bez nastajanja vlakana makroskopskih dimenzija ili kapanja rastvora. U slučaju rastvora sa 20% (w/w) ekstrakta kontinualnost procesa bila je narušena uz periodičnu pojavu spajanja vlakana i nastajanja vlakana makroskopskih dimenzija zbog čega ova formulacija nije obuhvaćena daljom analizom.

Filmovi izliveni iz rastvora bili su fleksibilni, vizuelno homogeni i kompaktni bez vidljivih defekata nezavisno od prisustva i sadržaja ekstrakta žalfije u njima. Za razliku od uzoraka dobijenih elektropredenjem, filmovi izliveni iz rastvora bili su transparentni. Primećeno je da su filmovi sa inkorporiranim ekstraktom (5 i 10%, w/w) bili tamnije boje u poređenju sa kontrolnim proteinskim filmom.

Na osnovu ovih zapažanja, odlučeno je da vlakna i filmovi na bazi zeina i želatina budu predmet dalje karakterizacije. Oznake uzoraka korišćene u daljem tekstu date su u Tabeli 4.10., a vizuelni izgled uzoraka prikazan je na Slici 4.18.

Tabela 4.10. Oznake i sastav uzoraka na bazi zeina i želatina

Tehnika dobijanja	Oznaka	Sastav
Elektropredenje	ZGv	nosač: zein:želatin (3:1; 30%, w/w) plastifikator: glicerol (30%, w/w) kontrola
	ZG-5Ev	nosač: zein:želatin (3:1; 30%, w/w) plastifikator: glicerol (30%, w/w) aktivna komponenta: ekstrakt žalfije (5%, w/w)
	ZG-10Ev	nosač: zein:želatin (3:1; 30%, w/w) plastifikator: glicerol (30%, w/w) aktivna komponenta: ekstrakt žalfije (10%, w/w)
Izlivanje filmova iz rastvora	ZGf	nosač: zein:želatin (3:1; 30%, w/w) plastifikator: glicerol (30%, w/w) kontrola
	ZG-5Ef	nosač: zein:želatin (3:1; 30%, w/w) plastifikator: glicerol (30%, w/w) aktivna komponenta: ekstrakt žalfije (5%, w/w)
	ZG-10Ef	nosač: zein:želatin (3:1; 30%, w/w) plastifikator: glicerol (30%, w/w) aktivna komponenta: ekstrakt žalfije (10%, w/w)



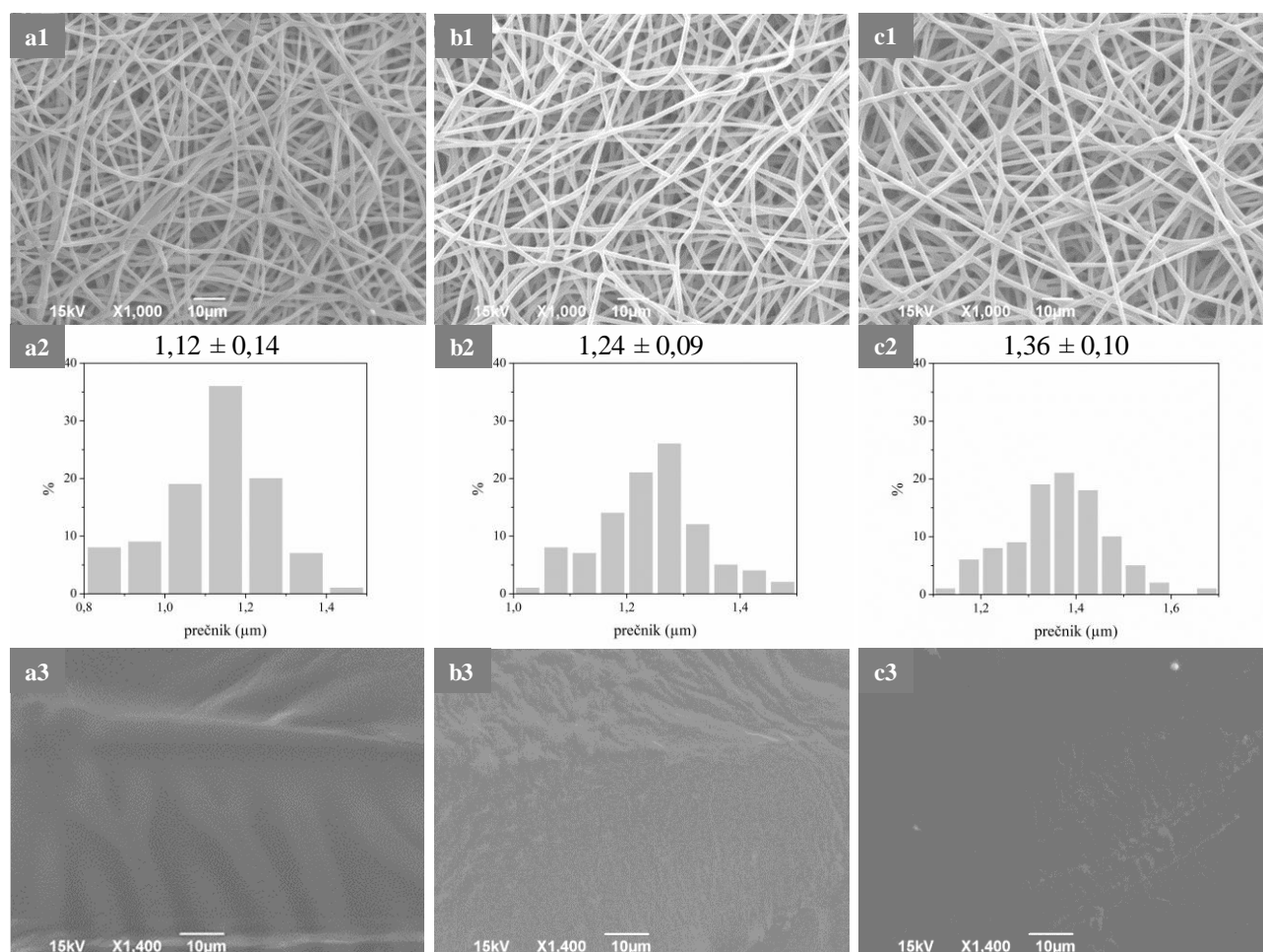
**Slika 4.18.** Makroskopski izgled vlakana (I red) i filmova (II red) na bazi zeina i želatina, kontrolnih i sa različitim sadržajem inkorporiranog ekstrakta žalfije. Fleksibilnost vlakana (III red, levo) i filmova (III red, desno)

### 4.3.2. KARAKTERIZACIJA VLAKANA I FILMOVA NA BAZI PROTEINA I EKSTRAKTA ŽALFIJE

#### 4.3.2.1. Morfološke karakteristike

SEM analiza uzoraka na bazi proteina ukazuje na jasne strukturne razlike u zavisnosti od primenjene tehnike dobijanja (Slika 4.19.). Primenom tehnike elektrospredanja dobijene su strukture sačinjene od isprepletanih, gusto raspoređenih vlakana (Slika 4.19., a1-b1-c1). Nezavisno od prisustva i sadržaja ekstrakta žalfije, dobijena su homogena vlakna, pravilnog i uniformnog oblika, glatke površine, bez vidljivih strukturnih i površinskih defekata. Analizirane morfološke karakteristike ukazuju na homogenu disperziju ekstrakta unutar vlakana.

Distribucija prečnika vlakana na bazi zeina i želatina u zavisnosti od sadržaja inkorporiranog ekstrakta žalfije prikazana je na Slici 4.19., a2-b2-c2. Inkorporacija ekstrakta uticala je na prečnik vlakana ( $p < 0,05$ ), pri čemu su sa povećanjem sadržaja inkorporiranog ekstrakta dobijena vlakna većeg prečnika. Kada se uzme u obzir da su procesni parametri elektrospredanja bili identični za dobijanje svih formulacija, pretpostavka je da je dodatak ekstrakta doveo do promena karakteristika rastvora što može biti uzrok zapaženog povećanja prečnika vlakana. Tako se na primer, pri povećanju viskoznosti polimernog rastvora povećava stepen uvrtnja lanaca polimera i smanjuje intenzitet istezanja mlaza rastvora tokom procesa elektrospredanja što dovodi do nastanka debljih vlakana (Altan et al., 2018). Sličan trend povećanja prečnika elektrospredanih vlakana na bazi zeina i želatina primetili su Li et al. (2020) nakon inkorporacije resveratrola.



**Slika 4.19.** SEM slike zein-želatin vlakana (gore), distribucija prečnika vlakana (sredina) i SEM slike zein-želatin filmova (dole): a1-a2-a3: ZG; b1-b2-b3: ZG-5E; c1-c2-c3: ZG-10E

Strukture proteinskih blendi dobijenih tehnikom izlivanja filmova iz rastvora prikazane su na Slici 4.19., a3-b3-c3. Površine svih filmova nezavisno od prisustva i sadržaja ekstrakta žalfije u njima su kontinualne i kompaktne, bez vidljivih pora, pukotina ili razdvajanja faza. Ovakva morfologija ukazuje na kompatibilnost zeina, želatina i inkorporiranog ekstrakta žalfije (Bonilla i Sobral, 2016). Međutim, primetno je prisustvo talasastih zona na površinama filmova što se može pripisati procesu sušenja. Naime, kod tehnike izlivanja filmova iz rastvora isparavanje rastvarača odvija se sporo na površini rastvora što može uticati na agregaciju i orijentaciju proteinskih lanaca i ostaviti trag na površini formiranog filma (Deng et al., 2018a). Poboljšanje morfologije u vidu smanjenja talasastih zona površine filmova na bazi proteina postignuto je inkorporacijom ekstrakta žalfije. Homogenije površine filmova sa inkorporiranim ekstraktom u odnosu na površinu kontrolnog filma mogu biti rezultat potencijalnih interakcija između konstituenata ekstrakta i proteina što utiče na orijentaciju lanaca proteina i njihovo homogenije deponovanje tokom sušenja. Sličan efekat postizanja homogenijih površina zapažen je za izlivenne filmove na bazi želatina nakon inkorporacije ekstrakta zelenog čaja što je pripisano interakcijama proteina sa fenolnim jedinjenjima ekstrakta (Wu et al., 2013).

#### 4.3.2.2. Debljina materijala

U tabeli 4.11. prikazane su vrednosti debljine uzoraka na bazi proteina dobijenih tehnikama elektropredenja i izlivanja iz rastvora. U slučaju tehnike elektropredenja, inkorporacija ekstrakta žalfije dovela je do povećanja debljine dobijenih uzoraka ( $p < 0,05$ ) u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Analizom vrednosti debljine elektropredanih uzoraka i prečnika vlakana koja ih sačinjavaju (Slika 4.19.) uočava se trend povećanja debljine uzoraka usled povećanja prečnika vlakana sa inkorporiranim ekstraktom. Ipak, razlika u debljini uzoraka sa inkorporiranim ekstraktom u zavisnosti od sadržaja ekstrakta nije bila statistički značajna ( $p > 0,05$ ). U slučaju tehnike izlivanja iz rastvora, inkorporacija ekstrakta dovela je do neznatnog porasta debljine dobijenih uzoraka ( $p > 0,05$ ) što ukazuje da je ekstrakt homogeno distribuiran unutar proteinskog matriksa. Poređenjem formulacija sa inkorporiranim ekstraktom istog sastava u zavisnosti od tehnike primenjene za njihovo dobijanje uočavaju se razlike u debljini. Uzorci filmova izlivenih iz rastvora su tanji u odnosu na elektropredene uzorke istog sastava što je rezultat prethodno diskutovanih strukturnih razlika. Naime, filmovi izliveni iz rastvora imaju veću gustinu i kompaktniju strukturu, pa je stoga njihova debljina manja. Slično tome, Del Gaudio et al. (2011) su pokazali da se tanji uzorci na bazi poliestara dobijaju tehnikom izlivanja iz rastvora u poređenju sa tehnikom elektropredenja.

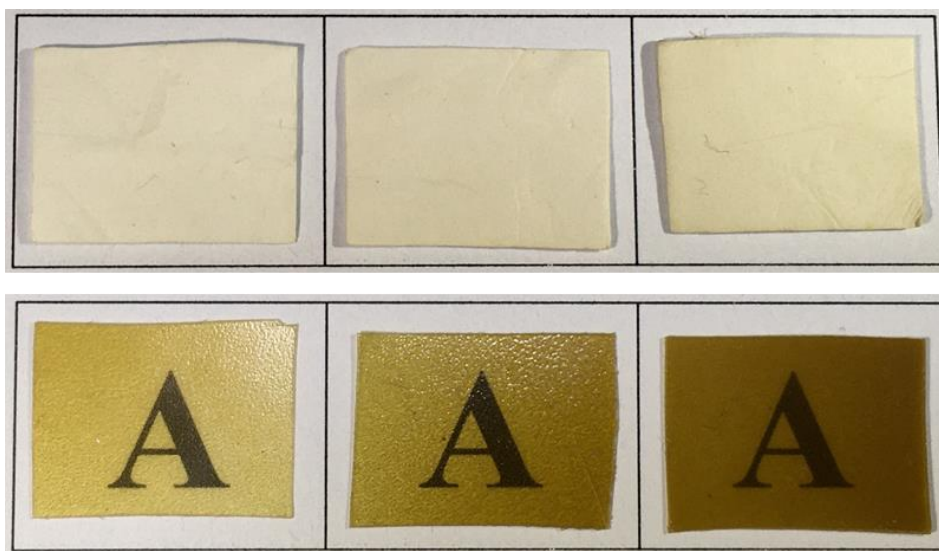
**Tabela 4.11.** Debljina i transparentnost uzoraka na bazi proteina

Uzorak	Debljina ( $\mu\text{m}$ )	Transparentnost ( $\text{mm}^{-1}$ )
ZGv	$364,67 \pm 123,71^{\text{a1}*}$	-
ZG-5Ev	$488,67 \pm 98,51^{\text{b1}}$	-
ZG-10Ev	$534,67 \pm 123,55^{\text{b1}}$	-
ZGf	$341,33 \pm 86,71^{\text{a1}}$	$3,49 \pm 0,29^{\text{a}}$
ZG-5Ef	$397,33 \pm 34,15^{\text{a2}}$	$3,37 \pm 0,11^{\text{a}}$
ZG-10Ef	$414,67 \pm 89,80^{\text{a2}}$	$3,28 \pm 0,27^{\text{a}}$

\* vrednosti u istoj koloni obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ); vrednosti formulacija istog sastava obeležene različitim brojevima se statistički značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ) u zavisnosti od tehnike dobijanja

#### 4.3.2.3. Transparentnost

Makroskopski izgled i kontaktna transparentnost uzoraka na bazi proteina prikazani su na Slici 4.20. Vizuelno, razlike između elektropredenih struktura i filmova izlivenih iz rastvora su očigledne i rezultat su prethodno opisanih strukturnih razlika (Sekcija 4.3.2.1.). Elektropredene strukture, nezavisno od inkorporiranog ekstrakta žalfije, su bele boje i u potpunosti netransparentne, jer struktura sačinjena od isprepletanih, tankih vlakana dovodi do prelamanja i rasejanja svetlosti (Tijing et al., 2013; Cherpinski et al., 2018a). Sa druge strane, usled kompaktne i kontinualne strukture filmovi izliveni iz rastvora pokazuju dobru kontaktnu transparentnost. Film bez inkorporiranog ekstrakta je žute boje. U ovom pogledu, pokazano je da blende zeina i želatina kombinuju efikasnost zeina da blokira prolazak svetlosti i transparentnost želatina (Xia et al., 2019). Inkorporacija ekstrakta i povećanje njegovog sadržaja dovode do tamnije boje koja potiče upravo od boje ekstrakta. Ovaj efekat je u skladu sa literaturnim podacima. Tako tamnija boja proteinskih filmova sa inkorporiranim prirodnim ekstraktima može doprineti efikasnijem blokiranju svetlosti i zaštiti od oksidacije (Gómez-Estaca et al., 2009). Transparentnost filmova izlivenih iz rastvora određena je i kvantitativno, a dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 4.11. Generalno, transparentnost filmova je veoma slična ( $p > 0,05$ ) bez obzira na prisustvo i sadržaj ekstrakta što ukazuje na kompatibilnost komponenti i uređenost matriksa. Posmatrano sa aspekta potencijalne primene sintetisanih elektropredenih vlakana i filmova izlivenih iz rastvora kao ambalažnih materijala za pakovanje prehrambenih proizvoda izbor bi zavisio od specifične uloge u zavisnosti od toga da li treba da se omogući vizuelno ispitivanje upakovanog proizvoda.



**Slika 4.20.** Kontaktna transparentnost uzoraka dobijenih elektropredjenjem (gore) i izlivanjem iz rastvora (dole): ZG, ZG-5E i ZG-10E (sa leva na desno)

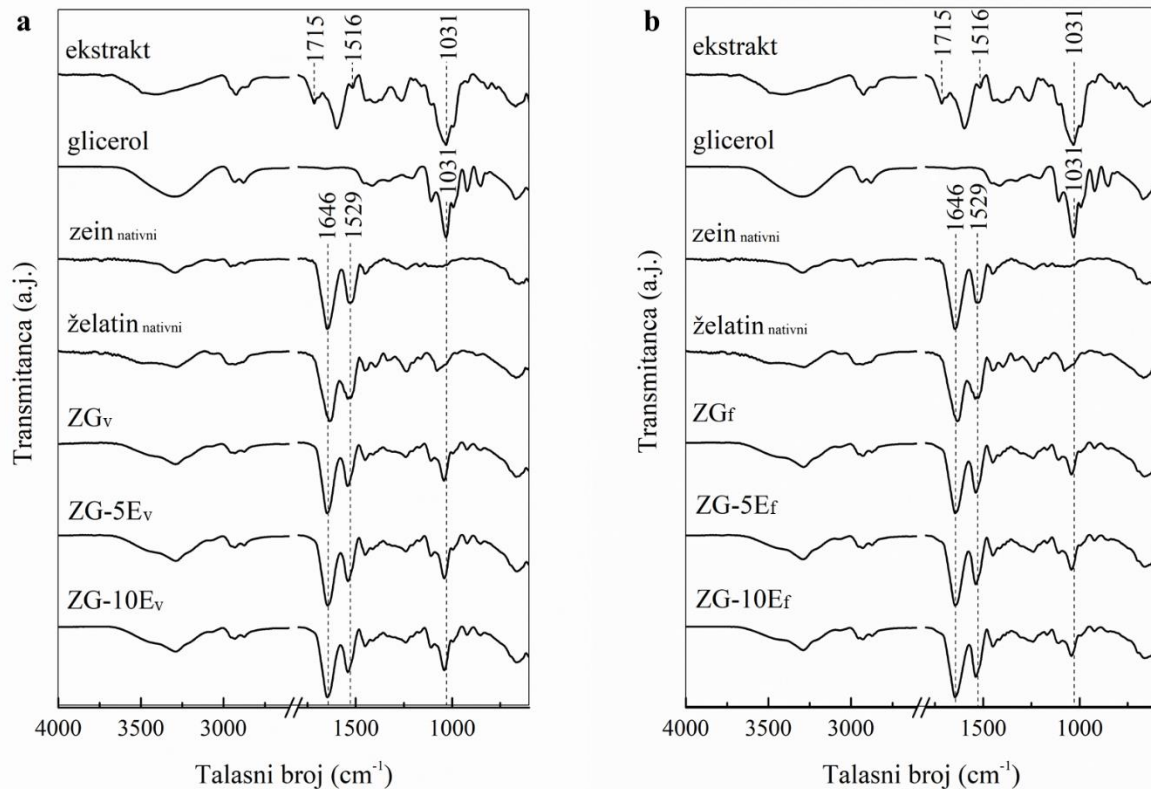
#### 4.3.2.4. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom

Efekat inkorporacije ekstrakta žalfije na strukturalna svojstva proteinskog matriksa, kao i potencijalne hemijske interakcije između konstituenata sintetisanih vlakana i filmova ispitani su FT-IR spektroskopijom. FT-IR spektri nativnih konstituenata (ekstrakt žalfije, zein, želatin, glicerol), kao i spektri sintetisanih elektropredenih vlakana i izlivenih filmova, kontrolnih i sa različitim sadržajem inkorporiranog ekstrakta žalfije, prikazani su na Slici 4.21.

Na FT-IR spektru suvog ekstrakta u slobodnom obliku uočavaju se trake koje su prethodno opisane u Sekciji 4.2.1.5. FT-IR spektri matriksa pokazuju tipične trake identifikovane za materijale na bazi proteina. Karakteristične trake zeina javljaju se na oko  $1646\text{ cm}^{-1}$  usled  $\text{C}=\text{O}$  vibracionih istezanja (amidna traka I) i na oko  $1529\text{ cm}^{-1}$  usled  $\text{N}-\text{H}$  vibracionih savijanja i  $\text{C}-\text{N}$  istezanja



(amidna traka II) (Brahatheeswaran et al., 2012; Neo et al., 2013). Slične trake prisutne su i na spektru želatina, ali na različitim pozicijama u poređenju sa spektrom zeina (amidna traka I na oko  $1634\text{ cm}^{-1}$  i amidna traka II na oko  $1539\text{ cm}^{-1}$ ) što ukazuje na strukturne razlike između ova dva proteina. Spektri oba proteina pokazuju trake na oko  $3290$ ,  $2960$  i  $1230\text{ cm}^{-1}$  koje potiču od N–H vibracionih istezanja (amid A), C–H vibracionih istezanja alifatičnih grupa, i kombinacije vibracija C–N istezanja i N–H savijanja (amid III), redom (Deng et al., 2018a). Dalje, na spektru glicerola uočava se intenzivna traka na oko  $1030\text{ cm}^{-1}$  usled C–O vibracionih istezanja (de Barros et al., 2019).



**Slika 4.21.** FT-IR spektri nativnih konstituenata i sintetisanih elektropredanih vlakana (a) i izlivenih filmova (b), kontrolnih i sa različitim sadržajem inkorporiranog ekstrakta žalfije

FT-IR spektri sintetisanih biopolimernih materijala su veoma slični spektrima čistih proteina, ali i međusobno, nezavisno od primenjene tehnike za njihovo dobijanje. Potencijalne interakcije koje se ogledaju u preklapanju traka zeina i želatina su slabe i do njih dolazi tokom formiranja vlakana, odnosno filmova. Pri tom, nije uočeno razdvajanje traka što ukazuje na homogenu distribuciju konstituenata vlakana i filmova. Dalje, važno je napomenuti da pozicija amidne trake I daje informacije o sekundarnoj strukturi proteina. Elektropredena vlakna i izliveni filmovi, kontrolni i sa različitim sadržajem inkorporiranog ekstrakta, pokazuju amidnu traku I na oko  $1647\text{--}1643\text{ cm}^{-1}$  što odgovara slučajnoj konfiguraciji proteina (Bourassa et al., 2010).

Intenzivna traka koja potiče od glicerola ( $1030\text{ cm}^{-1}$ ) vidljiva je na spektrima vlakana i filmova, pri čemu je uočeno njeno pomeranje ka višim talasnim brojevima (nova pozicija na oko  $1041\text{ cm}^{-1}$ ) najverovatnije usled interakcija glicerola sa proteinima kroz nastajanje vodoničnih veza i promene molekulske veze između proteina (Yan et al., 2017).

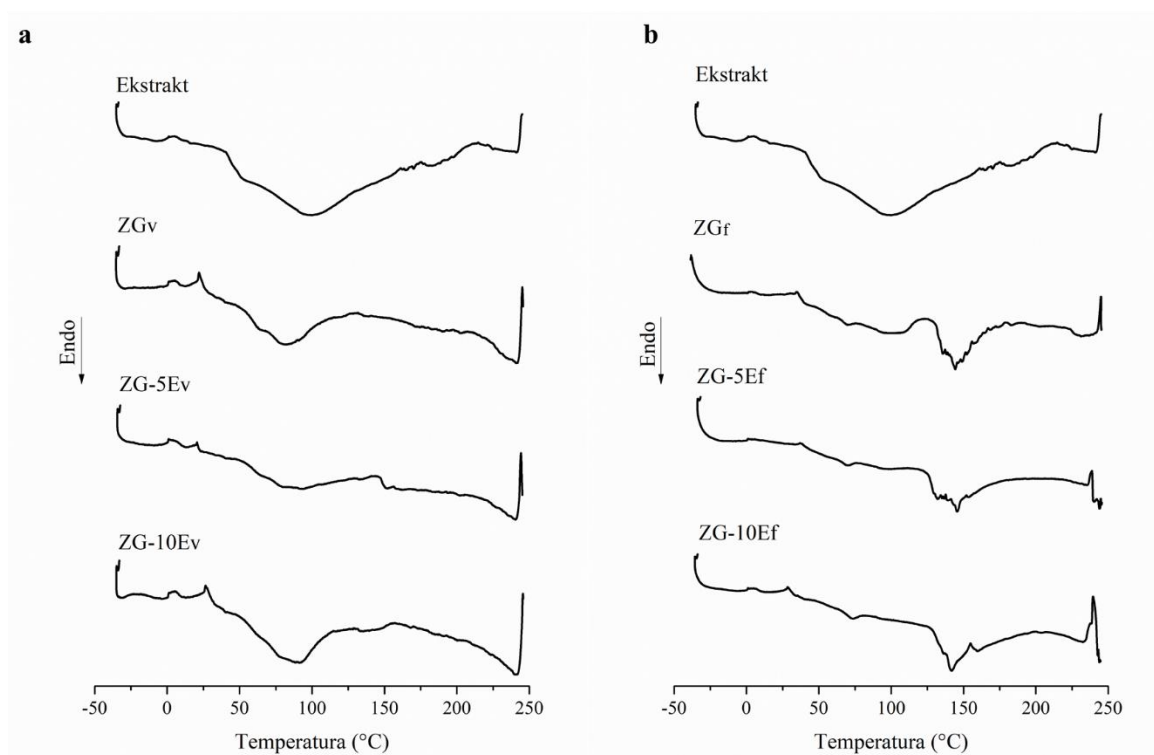
Na FT-IR spektrima vlakana i filmova sa inkorporiranim ekstraktom žalfije nisu vidljive trake koje potiču od ekstrakta što potencijalno ukazuje na efikasnu inkorporaciju ekstrakta unutar matriksa proteina. Pored toga, inkorporacija ekstrakta nije dovela do promena u poziciji ili obliku

traka koje potiču od matriksa, niti do pojave novih traka, na osnovu čega se može pretpostaviti da je ekstrakt fizički inkorporiran u proteinskom matriksu bez značajnih hemijskih interakcija.

#### 4.3.2.5. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija

Uticaj inkorporacije ekstrakta žalfije na toplotna svojstva, i to na temperaturu denaturacije ( $T_d$ ) i entalpiju denaturacije ( $\Delta H_d$ ), elektropredenih vlakana i filmova izlivenih iz rastvora na bazi zeina i želatina, ispitan je primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC). DSC termogrami ekstrakta žalfije u slobodnom obliku, kao i vlakana i filmova, kontrolnih i sa različitim sadržajem inkorporiranog ekstrakta, prikazani su na Slici 4.22., a dobijeni rezultati u Tabeli 4.12.

Na DSC termogramu ekstrakta žalfije u slobodnom obliku uočava se širok endotermni pik sa maksimumom na 100,13 °C i entalpijom od 368,99 J/g, prethodno pripisan gubitku rezidua rastvarača i lako isparljivih konstituenata (Sekcija 4.2.1.6.). Posmatrajući DSC termograme vlakana i filmova na bazi zeina i želatina, nezavisno od prisustva i sadržaja ekstrakta, uočavaju se jasne razlike u toplotnim svojstvima koje potiču od tehnika primenjenih za njihovo dobijanje.



**Slika 4.22.** DSC termogrami ekstrakta žalfije u slobodnom obliku i ZG elektropredenih vlakana (a) i izlivenih filmova (b), kontrolnih i sa različitim sadržajem inkorporiranog ekstrakta

**Tabela 4.12.** Rezultati DSC analize ZG elektropredenih vlakana i izlivenih filmova

Uzorak	Temperatura denaturacije (°C)	Entalpija denaturacije (J/g)
ZGv	81,17	62,83
ZG-5Ev	79,92	60,56
ZG-10Ev	88,37	101,66
ZGf	144,29	61,48
ZG-5Ef	145,54	64,45
ZG-10Ef	141,76	60,78

DSC termogram ZG elektropredenih vlakana bez inkorporiranog ekstrakta žalfije pokazuje endotermni pik sa maksimumom na 81,17 °C što predstavlja temperaturu denaturacije. Određena vrednost je veoma bliska vrednosti prijavljenoj u literaturi (83,77 °C) za elektropredena vlakna na bazi zeina i želatina, takođe pri odnosu 3:1 (w/w) u korist zeina (Deng et al., 2018b). Generalno, temperatura denaturacije proteinskih matriksa zavisi od uređenosti strukture (Li et al., 2020). Inkorporacija 5% ekstrakta u elektropredena vlakna rezultovala je neznatnim varijacijama toplotnih svojstava, dok je inkorporacija 10% ekstrakta dovela do povećanja vrednosti  $T_d$  i  $\Delta H_d$  u odnosu na kontrolna ZG vlakna. Povećanje temperature denaturacije usled inkorporacije veće količine ekstrakta ukazuje na potencijalne interakcije između biopolimera i aktivnih konstituenata. Na ovaj način nastaju kompaktnije i uređenije strukture koje zahtevaju veću količinu toplotne energije za denaturaciju (Deng et al., 2019; Zhang et al., 2019). Prema tome, dobijeni rezultati ukazuju da pri inkorporaciji većeg sadržaja ekstrakta žalfije u ZG vlakna dolazi do mogućih interakcija između konstituenata ekstrakta i proteina koje prethodno nisu detektovane FT-IR analizom.

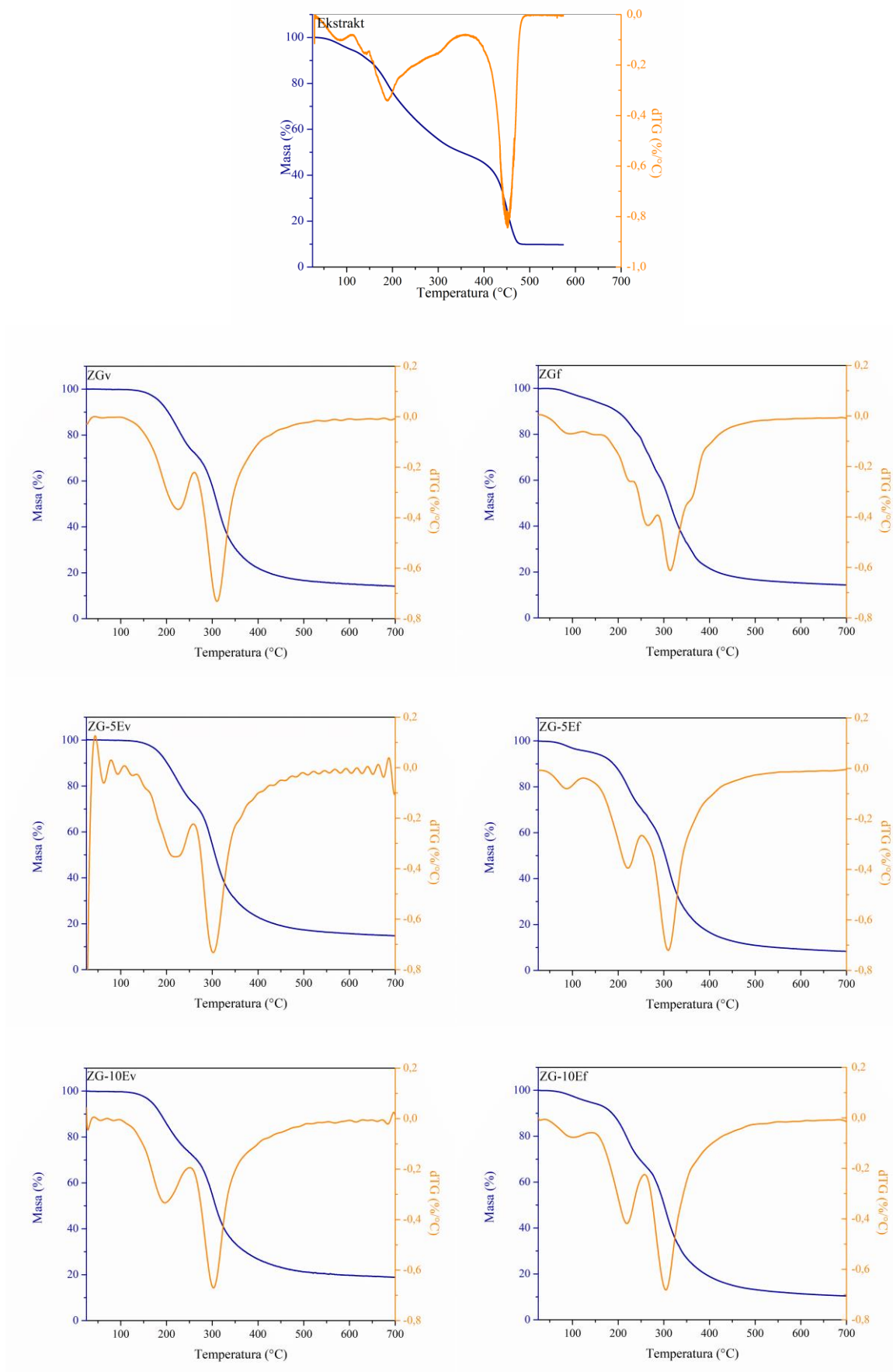
U slučaju ZG filma izlivenog iz rastvora, bez inkorporiranog ekstrakta žalfije, na DSC termogramu uočava se endotermni pik sa maksimumom na 144,29 °C što odgovara njegovoj temperaturi denaturacije. Inkorporacija ekstrakta u izliveno filmove dovela je do blagih varijacija toplotnih svojstava, tako da sve ispitivane formulacije filmova, nezavisno od prisustva i sadržaja ekstrakta, pokazuju veoma slične vrednosti  $T_d$  i  $\Delta H_d$ , u opsegu od 141,76-145,54 °C i 60,78-64,45 J/g, respektivno. Takođe, endotermni pikovi manjeg intenziteta sa maksimumima na 69,56, 69,67 i 73,50 °C se uočavaju za formulacije ZGf, ZG-5Ef i ZG-10Ef. Ovi pikovi se mogu pripisati prelasku u staklasto stanje, a blag porast temperature prelaska u staklasto stanje usled povećanja sadržaja inkorporiranog ekstrakta ukazuje na potencijalne interakcije slabog intenziteta između konstituenata ekstrakta i biopolimera (Deng et al., 2019).

Poređenjem toplotnih svojstava vlakana i filmova uočava se uticaj tehnike primenjene za njihovo dobijanje, pa su tako  $T_d$  vrednosti elektropredenih vlakana znatno niže u poređenju sa  $T_d$  vrednostima ZG filmova istog sastava dobijenih izlivanjem iz rastvora. Ove razlike mogu poticati od razlika u brzini isparavanja rastvarača tokom sinteze, kao i od morfoloških razlika između vlakana i filmova. U ovom pogledu, brzina isparavanja rastvarača utiče na uređenost strukture, pa se usled znatno bržeg isparavanja rastvarača tokom procesa elektropredenja dobijaju manje uređene strukture u odnosu na strukture dobijene izlivanjem filmova iz rastvora (Krstić et al., 2017).

Na termogramima ZG vlakana i filmova sa inkorporiranim ekstraktom žalfije, nezavisno od primenjene tehnike sinteze i sadržaja inkorporiranog ekstrakta, ne uočava se prisustvo pika koji potiče od ekstrakta što sugeriše da je ekstrakt efikasno inkorporiran u matriksu proteina.

#### 4.3.2.6. Termogravimetrijska analiza

Uticaj inkorporacije ekstrakta žalfije na termičku stabilnost elektropredenih vlakana i filmova izlivenih iz rastvora na bazi zeina i želatina ispitan je termogravimetrijskom analizom (TGA). TGA krive gubitka mase u funkciji od temperature (plava boja) i analiza prvog izvoda (narandžasta boja) prikazane su na Slici 4.23. U ovom pogledu, određeni su sledeći parametri: temperatura na kojoj počinje degradacija uzorka, definisana kao temperatura na kojoj dolazi do gubitka 5% mase ( $T_{d5\%}$ ), temperatura degradacije ( $T_d$ ), gubitak mase uzorka na temperaturi degradacije ( $m_{T_d}$ ) i rezidualna masa na 700 °C ( $m_{r700^\circ C}$ ) (Tabela 4.13.).



**Slika 4.23.** TGA/dTG krive ekstrakta žalfije u slobodnom obliku i ZG elektropredjenih vlakana (levo) i izlivenih filmova (desno), kontrolnih i sa inkorporiranim ekstraktom

**Tabela 4.13.** Rezultati TGA ekstrakta žalfije u slobodnom obliku i ZG elektropredanih vlakana i izlivenih filmova, kontrolnih i sa različitim sadržajem inkorporiranog ekstrakta

Uzorak	Td5% (°C)	Td1 (°C)	m <sub>Td1</sub> (%)	Td2 (°C)	m <sub>Td2</sub> (%)	m <sub>r700°C</sub> (%)
ZGv	183,41	225,38	17,44	310,29	49,53	14,13
ZG-5Ev	181,84	220,03	16,23	302,06	46,96	14,77
ZG-10Ev	168,12	196,51	13,02	302,64	46,94	18,86
ZGf	140,23	265,29	28,37	313,88	50,22	14,38
ZG-5Ef	142,51	221,39	20,07	309,59	54,67	8,31
ZG-10Ef	136,19	219,07	20,59	304,43	52,55	10,43

Termička degradacija ekstrakta žalfije u slobodnom obliku odvija se kroz nekoliko koraka prethodno objašnjenih u Sekciji 4.2.1.7. Početak degradacije, odnosno temperatura na kojoj dolazi do gubitka mase ekstrakta od 5%, usled gubitka apsorbovane vode i lako isparljivih konstituenata dešava se na 106 °C, dok se maksimalna stopa degradacije, odnosno gubitak mase od 76,48%, dostiže na 452,14 °C.

Termička degradacija elektropredanih vlakana i filmova izlivenih iz rastvora na bazi zeina i želatina odvija se kroz tri koraka (Slika 4.23.). Početak degradacije ispitivanih formulacija vlakana, odnosno gubitak mase od 5%, uočen je u temperaturnom opsegu od 168-183 °C i viši je u odnosu na temperaturni opseg u kom ispitivane formulacije filmova istog sastava gube 5% mase (136-142 °C). Ovaj gubitak mase uzoraka može se pripisati gubitku vode i lako isparljivih jedinjenja (Neo et al., 2013). Sa daljim povećanjem temperature gubitak mase uzoraka se nastavlja, pri čemu dolazi do pojave dva karakteristična pika. Ovi pikovi su na dTG krivama vlakana prisutni u temperaturnim opsezima od 196-225 °C i 302-310 °C, a odgovaraju gubicima mase od 13-17% i 46-50%, respektivno. Posmatrajući dTG krive filmova, pikovi se nalaze u opsegu od 219-265 °C i 304-314 °C, a odgovaraju gubicima mase od 20-28% i 50-55%, respektivno. Prvi pik najverovatnije potiče od gubitka glicerola i vezane sirćetne kiseline, odnosno od dekompozicije proteinskog matriksa, dok drugi pik potiče od degradacije proteina (Wu et al., 2013; Contardi et al., 2017; Deng et al., 2018b). Dobijeni rezultati (Tabela 4.13.) pokazuju da su vrednosti temperature na kojoj dolazi do maksimalne stope degradacije (Td2) formulacija istog sastava veoma slične, nezavisno od tehnike primenjene za njihovo dobijanje. Takođe, ove vrednosti su bliske Td2 vrednosti prijavljenoj u literaturi za elektropredena vlakna na bazi zeina i želatina bez inkorporiranih aktivnih komponenti, a kod kojih je odnos proteina 3:1 (w/w) u korist zeina (311,83 °C) (Deng et al., 2018b). Pored toga, dobijeni rezultati su u saglasnosti sa studijom Liu et al. (2018) koji su pokazali da kompoziti na bazi etil celuloze i želatina ne pokazuju razlike u Td vrednostima u zavisnosti od toga da li su dobijeni elektropredanjem ili izlivanjem iz rastvora. Dalje povećanje temperature rezultovalo je pirolizom uzoraka, pri čemu su na kraju termičkog tretmana (700 °C) rezidualne mase bile u opsezima od 14-19% za uzorke vlakana, odnosno 8-14% za uzorke filmova.

Inkorporacija ekstrakta žalfije u proteinske matrikse dovela je do smanjenja temperature početka degradacije i dekompozicije u odnosu na kontrolna vlakna i filmove, što je verovatno rezultat prisustva lako isparljivih, niskomolekulskih konstituenata ekstrakta. Tako se termička stabilnost kontrolnog ZG matriksa smanjuje od ~225 °C do ~197 °C pri inkorporaciji većeg sadržaja ekstrakta u slučaju vlakana, odnosno od ~265 °C do ~219 °C u slučaju filmova. U pogledu temperature na kojoj dolazi do maksimalne stope degradacije vlakana i filmova inkorporacija ekstrakta dovela je do neznatnih razlika. Pored toga, pik prethodno identifikovan na termogramu ekstrakta žalfije u slobodnom obliku i pripisan termičkoj degradaciji ekstrakta ne uočava se na termogramima vlakana i filmova, već je preklapljen pikom koji potiče od termičke degradacije

proteina. Ovakav rezultat ukazuje da je inkorporirani ekstrakt efikasno dispergovan u strukturama vlakana i filmova bez razdvajanja faza (Contardi et al., 2017), što je u saglasnosti sa prethodno diskutovanim morfološkim karakteristikama (Sekcija 4.3.2.1.). Na ovaj način može se postići zaštita aktivnih komponenti osetljivih na dejstvo visoke temperature.

#### 4.3.2.7. Otpuštanje aktivnih jedinjenja iz vlakana i filmova u simulante hrane

Sposobnost otpuštanja inkorporiranih aktivnih jedinjenja iz vlakana i filmova u medijume koji simuliraju prehrambene proizvode ispitana je kao važan pokazatelj njihovog potencijala da budu korišćeni kao aktivni ambalažni materijali. Test je izveden inkubacijom uzoraka u direktnom kontaktu sa dva medijuma (10% i 95% rastvori etanola) na 20 °C u trajanju od 10 dana. Uslovi izvođenja testa i mehanizam otpuštanja aktivnih jedinjenja iz polimernih matriksa objašnjeni su u Sekciji 4.2.1.10.

Nakon inkubacije u direktnom kontaktu sa medijumima i otpuštanja aktivnih jedinjenja i vlakna i filmovi su zadržali svoj prvobitni integritet. Količine ukupnih fenolnih jedinjenja i ruzmarinske kiseline otpuštene iz formulacija na bazi zeina i želatina u korišćene medijume prikazane su u Tabeli 4.14. Sve kvantifikovane vrednosti bile su niže od propisanog opšteg limita migracije (60 mg/kg medijuma; Regulativa Evropske komisije (EU) br. 10/2011).

**Tabela 4.14.** Količina ukupnih fenolnih jedinjenja i ruzmarinske kiseline otpuštenih iz ZG elektropredenih vlakana i izlivenih filmova u simulante hrane

Uzorak	Ukupna fenolna jedinjenja (mg GAE/kg medijuma)		Ruzmarinska kiselina (mg/kg medijuma)	
	10% rastvor etanola	95% rastvor etanola	10% rastvor etanola	95% rastvor etanola
ZG-5Ev	15,42 ± 0,70 <sup>a1*</sup>	22,18 ± 0,56 <sup>a2</sup>	n.d.	2,12 ± 0,55 <sup>a</sup>
ZG-10Ev	27,46 ± 0,59 <sup>b1</sup>	32,13 ± 2,31 <sup>b1</sup>	1,78 ± 0,48 <sup>a1</sup>	9,22 ± 2,43 <sup>b2</sup>
ZG-5Ef	12,02 ± 0,50 <sup>ac1</sup>	11,93 ± 0,52 <sup>c1</sup>	n.d.	n.d.
ZG-10Ef	20,33 ± 0,72 <sup>ad1</sup>	20,94 ± 0,76 <sup>a1</sup>	1,08 ± 0,18 <sup>b1</sup>	6,43 ± 0,00 <sup>c2</sup>

\* vrednosti u istoj koloni obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ); vrednosti iste formulacije obeležene različitim brojevima se statistički značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ) u zavisnosti od medijuma  
n.d. ispod limita detekcije

Dobijeni rezultati su pokazali da na otpuštanje aktivnih jedinjenja iz vlakana i filmova na bazi zeina i želatina utiču sastav formulacije, tehnika primenjena za njihovo dobijanje i kontakti medijum. Očekivano, formulacije sa većom količinom inkorporiranog ekstrakta žalfije otpustile su veću količinu ukupnih fenolnih jedinjenja i ruzmarinske kiseline, nezavisno od tehnike primenjene za njihovo dobijanje i posmatranog medijuma.

Poređenjem formulacija istog sastava u zavisnosti od tehnike primenjene za njihovo dobijanje, veće količine ukupnih fenolnih jedinjenja i ruzmarinske kiseline otpuštene su iz elektropredenih vlakana u poređenju sa filmovima izlivenim iz rastvora, nezavisno od posmatranog medijuma. Ova razlika se može pripisati prethodno opisanim razlikama u morfologiji uzoraka u zavisnosti od tehnike primenjene za njihovo dobijanje (Sekcija 4.3.2.1.). Strukture elektropredenih vlakana su porozne i imaju veliki odnos površine prema zapremini (Aytac et al., 2017) što se može smatrati ključnim faktorom koji olakšava difuziju rastvarača kroz matriks, što dalje dovodi do relaksacije matriksa i otpuštanja inkorporiranih aktivnih jedinjenja.

Na otpuštanje ukupnih fenolnih jedinjenja iz elektropredenih vlakana uticala je i polarnost medijuma, pa je veća količina otpuštena u 95% rastvor etanola. Ovakav rezultat može biti posledica sastava i rastvorljivosti proteinskog matriksa. S obzirom da matriks čine zein koji je zbog visokog sadržaja nepolarnih amino kiselina nerastvoran u vodi i želatina koji se rastvara u zagrejanjoj vodi (Meng i Cloutier, 2014), kao i da je odnos zeina i želatina 3:1 (w/w), osetljivost matriksa veća je prema rastvaračima manje polarnosti, što je u ovom slučaju 95% rastvor etanola. Sa druge strane, 95% rastvor etanola nije ispoljio veću efikasnost u pogledu otpuštanja ukupnih fenolnih jedinjenja iz filmova izlivenih iz rastvora ukazujući na složeniji proces otpuštanja na koji osim sastava matriksa utiču i drugi faktori. Različita orijentacija hidrofilnih i hidrofobnih grupa proteina prema površini u zavisnosti od primenjene tehnike za dobijanje uzoraka bi mogla biti jedan od potencijalnih faktora. Kako je u literaturi pokazano, površine filmova izlivenih iz rastvora imaju veći afinitet prema vodi, odnosno manje su hidrofobne, u poređenju sa površinama elektropredenih vlakana istog sastava (Tijing et al., 2013; Liu et al., 2018), što može biti uzrok veće rezistentnosti filmova prema 95% rastvoru etanola. U slučaju ruzmarinske kiseline, iz svih formulacija su otpuštene veće količine u 95% rastvor u odnosu na 10% rastvor etanola. Pored prethodno opisane veće osetljivosti matriksa, ovaj rezultat se može pripisati i većem hemijskom afinitetu ruzmarinske kiseline prema etanolu i većoj rastvorljivosti u medijumu koji sadrži 95% etanola (Talón et al., 2017b).

Dobijeni rezultati ukazuju da vlakna i filmovi na bazi zeina i želatina sa inkorporiranim ekstraktom žalfije imaju potencijal da budu korišćeni kao aktivni ambalažni materijali za pakovanje prehrambenih proizvoda. Prednost vlakana u odnosu na filmove ogleda se u oslobađanju veće količine aktivnih jedinjenja, naročito u medijum koji simulira proizvode lipofilnog karaktera.

#### 4.3.2.8. Antioksidativna aktivnost

Antioksidativni potencijal vlakana i filmova na bazi zeina i želatina ocenjen je kao sposobnost da u direktnom kontaktu sa rastvorom DPPH<sup>•</sup> neutrališu ovaj slobodni radikal. Kao i u slučaju PCL filmova, DPPH<sup>•</sup> je na osnovu rezultata otpuštanja aktivnih jedinjenja iz proteinskih matriksa u simulante hrane odabran kao model lipofilni slobodni radikal za ispitivanje antioksidativnog potencijala vlakana i filmova.

Nakon inkubacije u direktnom kontaktu sa rastvorom DPPH<sup>•</sup> i vlakna i filmovi su zadržali svoj prvobitni integritet. Kontrolni uzorci, bez inkorporiranog ekstrakta žalfije, pokazali su određeni stepen inhibicije DPPH<sup>•</sup> slobodnog radikala i to 17,98% u slučaju vlakana, odnosno 10,46% u slučaju filmova. Inhibicija DPPH<sup>•</sup> radikala od strane kontrolnih proteinskih uzoraka može biti rezultat apsorpcije DPPH<sup>•</sup> tokom kontakta sa vlaknima, odnosno filmovima, kao i antioksidativne aktivnosti  $\alpha$  frakcije zeina (Altan et al., 2018) i pojedinih peptidnih frakcija želatina (Mendis et al., 2005; Jridi et al., 2017). Značajno jača ( $p < 0,05$ ) antioksidativna aktivnost proteinskih vlakana i filmova postignuta je inkorporacijom ekstrakta žalfije i povećanjem sadržaja inkorporiranog ekstrakta. Tako je procenat inhibicije DPPH<sup>•</sup> slobodnog radikala pri kontaktu sa vlaknima sa 5 i 10% inkorporiranog ekstrakta iznosio 65,62 i 89,38%, respektivno, dok je pri kontaktu sa filmovima sa 5 i 10% inkorporiranog ekstrakta iznosio 43,83 i 73,10%, respektivno. Pozitivan doprinos inkorporacije ekstrakta žalfije u proteinske matrikse na njihovu sposobnost da „gase“ aktivnost DPPH<sup>•</sup> slobodnog radikala potiče od prethodno diskutovane antioksidativne aktivnosti ekstrakta usled prisustva jedinjenja sa potencijalom da doniraju atom vodonika i tako redukuju slobodni radikal (Sekcija 4.1.2.3.). Ovakav rezultat ukazuje da je antioksidativna aktivnost ekstrakta očuvana kako tokom elektropredenja vlakana, tako i tokom izlivanja filmova iz rastvora. Ipak, poređenjem formulacija istog sastava u zavisnosti od tehnike primenjene za njihovo dobijanje veća efikasnost inhibicije DPPH<sup>•</sup> slobodnog radikala ( $p < 0,05$ ) postignuta je pri kontaktu sa elektroprednim vlaknima u poređenju sa filmovima izlivenim iz rastvora. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa rezultatima otpuštanja aktivnih jedinjenja iz vlakana i filmova u simulante hrane i

takođe se može pripisati prethodno diskutovanim strukturnim razlikama formulacija u zavisnosti od tehnike primenjene za njihovo dobijanje (Sekcija 4.3.2.1.). Velika dodirna površina elektropredenih vlakana omogućava veći kontakt sa rastvorom slobodnih radikala (Aytac et al., 2017) i na taj način povećava stepen neutralizacije reaktivnih slobodnih radikala od strane aktivnih konstituenata inkorporiranog ekstrakta.

Generalno, dobijeni rezultati su pokazali da vlakna i filmovi na bazi zeina i želatina sa inkorporiranim ekstraktom žalfije ispoljavaju antioksidativnu aktivnost što ističe njihov potencijal da budu korišćeni kao aktivni ambalažni materijali za pakovanje prehrambenih proizvoda sa ciljem očuvanja kvaliteta i produženja roka trajanja upakovanog proizvoda.

#### 4.3.2.9. Antibakterijska aktivnost

Antibakterijska efikasnost vlakana i filmova na bazi zeina i želatina ocenjena je primenom makrodilucionog testa kao sposobnost da pri direktnom kontaktu sa patogenim bakterijama dovedu do redukcije broja bakterija. Kao test sojevi bakterija korišćeni su *S. aureus* (Gram-pozitivan soj) i *E. coli* (Gram-negativan soj). Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 4.15.

Svi uzorci su pokazali određeni stepen antibakterijske aktivnosti, nezavisno od prisustva i sadržaja ekstrakta, kao ni tehnike primenjene za njihovo dobijanje. Tako su i elektropredena vlakna i filmovi izliveni iz rastvora na bazi zeina i želatina bez inkorporiranog ekstrakta pokazali sposobnost inhibicije rasta testiranih bakterija. Inkorporacijom ekstrakta žalfije u matriks proteina i povećanjem sadržaja inkorporiranog ekstrakta postignuta je veća efikasnost antibakterijskog delovanja vlakana i filmova. Na osnovu smanjenja broja bakterija nakon 24 h inkubacije u kontaktu sa aktivnim materijalima (Tabela 4.15.), efekat delovanja materijala definiše se kao bakteriostatički ukoliko je postignuto sprečavanje rasta bakterija ili redukcija njihovog broja do 3 log CFU/ml, dok se dalja redukcija broja bakterija ( $\geq 3$  log CFU/ml) definiše baktericidnim efektom (Castro-Mayorga et al., 2017b). Prema tome, svi uzorci su ispoljili bakteriostatički efekat prema rastu testiranih bakterija, koji je prešao u baktericidni efekat u slučaju formulacija ZG-10Ev, ZG-5Ef i ZG-10Ef prema *S. aureus*, kao i u slučaju formulacije ZG-10Ef prema *E. coli*.

**Tabela 4.15.** Antibakterijska aktivnost ZG elektropredenih vlakana i izlivenih filmova

Uzorak	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	Broj bakterija (log CFU/ml)	Redukcija broja bakterija	Broj bakterija (log CFU/ml)	Redukcija broja bakterija
Kontrola	8,39	-	9,48	-
ZGv	6,03 $\pm$ 0,11	2,36	9,00 $\pm$ 0,00	0,48
ZG-5Ev	5,48 $\pm$ 0,12	2,91	7,79 $\pm$ 0,36	1,69
ZG-10Ev	5,39 $\pm$ 0,13	3,00	6,98 $\pm$ 0,02	2,50
Kontrola	8,39	-	9,11	-
ZGf	6,08 $\pm$ 0,50	2,31	6,63 $\pm$ 0,67	2,48
ZG-5Ef	4,75 $\pm$ 0,38	3,64	6,34 $\pm$ 0,34	2,77
ZG-10Ef	3,88 $\pm$ 0,25	4,51	5,19 $\pm$ 0,71	3,92

CFU - broj bakterija koje formiraju kolonije na podlozi (engl. *Colony Forming Units*)

Prema literaturnim podacima, filmovi i vlakna na bazi zeina (Vahedikia et al., 2019; Wang et al., 2019), odnosno želatina (Bonilla i Sobral, 2016; Tang et al., 2019) bez inkorporiranih aktivnih agenasa ne ispoljavaju antibakterijsku aktivnost. Međutim, kontrolni uzorci, odnosno



uzorci bez inkorporiranog ekstrakta žalfije, razvijeni u okviru ove disertacije pokazali su sposobnost inhibitornog delovanja na rast bakterija. Ovakav rezultat inicirao je određivanje acetat-jona u suspenzijama nakon inkubacije sa vlaknima i filmovima tehnikom jonske hromatografije kako bi se utvrdilo eventualno prisustvo rezidua sirćetne kiseline korišćene kao rastvarača pri sintezi vlakana i filmova i na taj način što bolje razumela njihova antibakterijska aktivnost. Analizom je pokazano da vlakna i filmovi na bazi zeina i želatina imaju sposobnost da zadrže sirćetnu kiselinu tokom sinteze i da je potom otpuste pri kontaktu sa suspenzijama. Naime, koncentracije acetat-jona od 2,24, 1,78 i 2,02 mg/ml suspenzije određene su nakon inkubacije sa uzorcima ZGv, ZG-5Ev i ZG-10Ev, respektivno, odnosno 1,94, 1,89 i 1,64 mg/ml nakon inkubacije sa uzorcima ZGf, ZG-5Ef i ZG-10Ef, respektivno. Jonski hromatogrami suspenzija nakon inkubacije sa vlaknima i filmovima dati su u Prilogu 2 (Slike P2.2., P2.3.). Prema izveštajima Zajedničkog stručnog odbora Organizacije za hranu i poljoprivredu i Svetske zdravstvene organizacije o aditivima za hranu (engl. *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives - JECFA*) rezidue sirćetne kiseline u hrani poreklom iz antimikrobnih rastvora ne predstavljaju rizik za bezbednost (JECFA, 2005). U ovom pogledu, istraživanja su pokazala da pri kontaktu suspenzije bakterija sa materijalima na bazi zeina u čijim strukturama su zarobljene rezidue kiseline korišćene za rastvaranje zeina može doći do oslobađanja kiseline što dovodi do sprečavanja rasta bakterija (Torres-Giner et al., 2009). Tako je pokazano da se rastvaranjem biopolimera u sirćetnoj kiselini može povećati efikasnost antimikrobnog delovanja, jer prisustvo sirćetne kiseline dovodi do smanjenja pH vrednosti i time do stresa ćelija (Cruz-Romero et al., 2013). Prema tome, na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da antibakterijska aktivnost vlakana i filmova bez inkorporiranog ekstrakta potiče od oslobađanja rezidua sirćetne kiseline iz njihovih struktura. U slučaju uzoraka sa inkorporiranim ekstraktom antibakterijska aktivnost se može pripisati sinergističkom delovanju inkorporiranog ekstrakta i rezidua sirćetne kiseline. Slično ovome, Contardi et al. (2017) su pokazali da elektropredena vlakna i filmovi izliveni iz rastvora na bazi polivinilpirolidona inhibiraju rast *E. coli* zbog rezidua sirćetne kiseline korišćene za rastvaranje polimera, pri čemu je antibakterijska efikasnost ispitivanih struktura poboljšana inkorporacijom ciprofloksacin antibiotika.

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 4.15. uočava se da je *S. aureus* osetljiviji soj u odnosu na *E. coli* prema dejstvu vlakana i filmova, što je u saglasnosti sa prethodno diskutovanim antibakterijskim svojstvima ekstrakta žalfije u slobodnom obliku. Kako je u Sekciji 4.1.2.4. objašnjeno, razlika u osetljivosti *S. aureus* i *E. coli* može se pripisati razlikama u strukturi ćelijskog zida G-pozitivnih i G-negativnih bakterija. Tako su veće koncentracije ekstrakta potrebne za postizanje baktericidnog efekta na *E. coli* u odnosu na *S. aureus* usled prisustva spoljašnje membrane kod G-negativnih bakterija koja deluje kao barijera za prolazak aktivnih agenasa.

Osim u pogledu sadržaja inkorporiranog ekstrakta i soja testiranih bakterija, razlika u antibakterijskom delovanju ispitivanih uzoraka uočava se i poređenjem formulacija istog sastava u zavisnosti od tehnike primenjene za njihovo dobijanje. Konkretno, filmovi izliveni iz rastvora ispoljili su jaču sposobnost inhibicije rasta bakterija u odnosu na elektropredena vlakna. Ovakav rezultat je pokazao da ispitivane formulacije istog sastava, ali različite strukture nemaju istu antibakterijsku efikasnost površine. U ovom pogledu, važan faktor koji utiče na efikasnost antibakterijske aktivnosti je površinska gustina aktivnih agenasa (Hardiansyah et al., 2015). Kako kompaktni filmovi izliveni iz rastvora imaju znatno veću gustinu u poređenju sa poroznim elektropredenim strukturama sačinjenim od vlakana (Tijing et al., 2013), pretpostavka je da je i gustina aktivnih agenasa na površini filmova veća što rezultuje antibakterijski efikasnijom površinom.

Analizirani rezultati su pokazali da je sposobnost inhibitornog i baktericidnog delovanja ekstrakta žalfije na patogene bakterije očuvana tokom elektropredenja vlakana, odnosno izlivanja filmova iz rastvora. Pored toga, inkorporirani ekstrakt je u sinergističkom dejstvu sa sirćetnom kiselinom doprineo funkcionalnosti vlakana i filmova na bazi zeina i želatina kao antibakterijskih

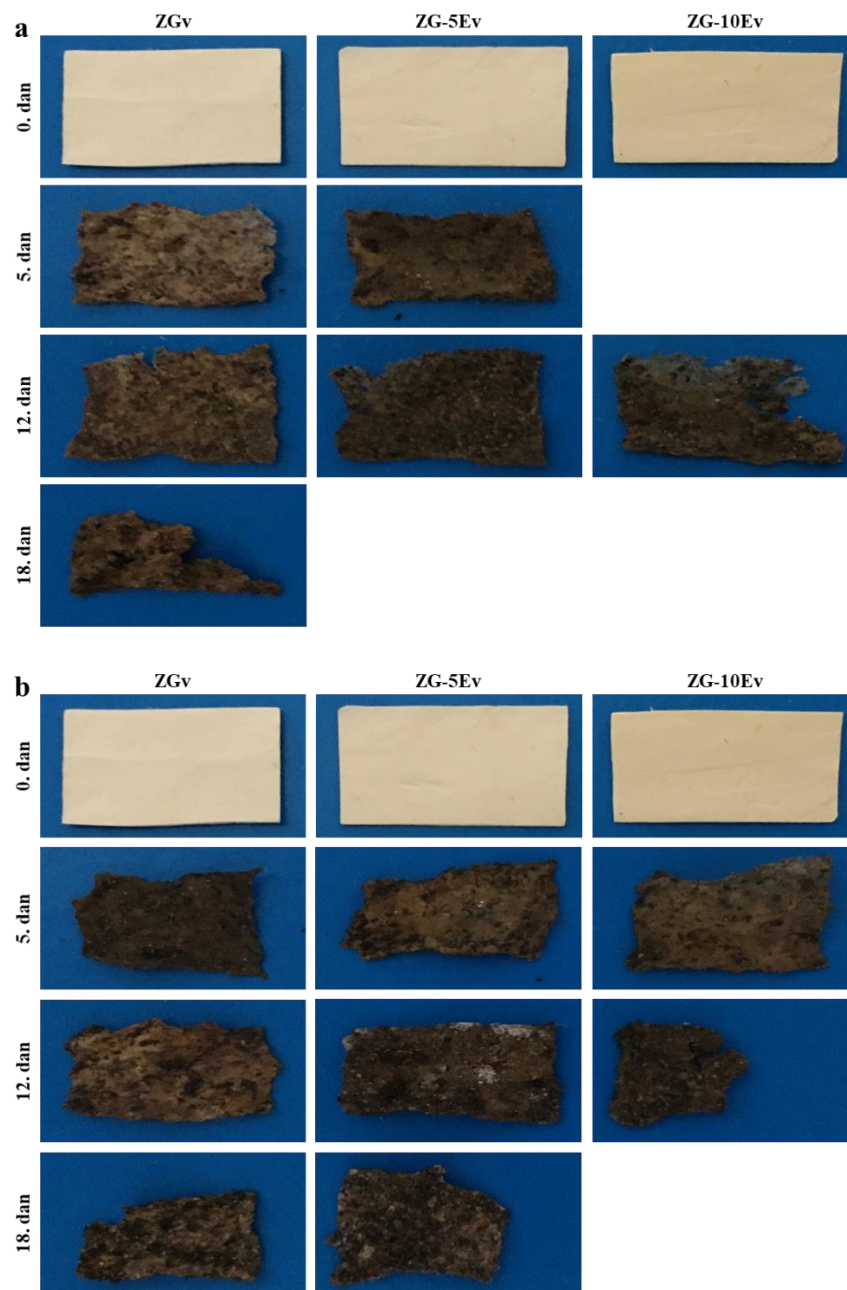
materijala. Prema tome, ovakav rezultat je dodatno istakao potencijal primene razvijenih vlakana i filmova kao aktivnih ambalažnih materijala za pakovanje prehrambenih proizvoda sa ciljem očuvanja kvaliteta i bezbednosti upakovanog proizvoda.

#### **4.3.2.10. Razgradnja u model sistemu komposta**

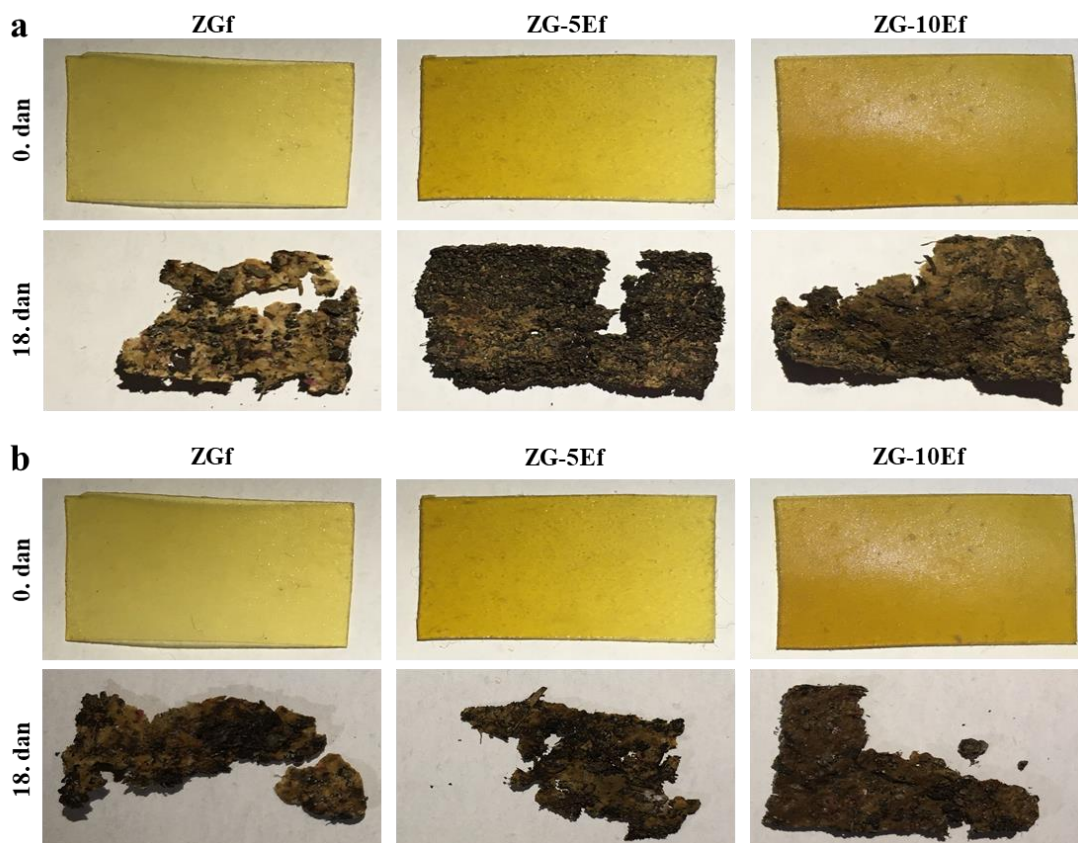
Razgradnja vlakana i filmova na bazi zeina i želatina ispitana je u model sistemu komposta, bez i sa dodatkom ukupnog proteinskog ekstrakta tri soja *Streptomyces* spp. Bakterije iz roda *Streptomyces* imaju potencijal da učestvuju u procesima biorazgradnje zbog sposobnosti da luče veliki broj biokatalizatora, uključujući proteaze (Chater et al., 2010; Spasic et al., 2018). Prema tome, cilj ove eksperimentalne sekcije bio je da se ispita potencijal razgradnje vlakana i filmova na bazi proteina u uslovima prirodnog okruženja, ali i u uslovima koji mogu ubrzati stopu njihove razgradnje. Razgradnja vlakana (Slika 4.24.) i filmova (Slika 4.25.) analizirana je vizuelno, poređenjem izgleda uzoraka pre stavljanja u kompost i nakon određenog vremena kompostiranja. Pored toga, stepen razgradnje vlakana i filmova određen je gravimetrijski, kao gubitak mase uzoraka u funkciji od vremena (Slika 4.26.). Gubitak mase uzoraka bilo je teško odrediti sa potpunom sigurnošću, pri čemu su uočene varijacije vrednosti tokom vremena usled nemogućnosti da se sa uzoraka nakon inkubacije u potpunosti uklone sve zalepljene čestice komposta. U određenim vremenskim periodima uzorci su vađeni iz komposta i analizirani. Potpuna razgradnja uzoraka definisana je kao dezintegracija uzoraka do sitnih nemerljivih i/ili neuočljivih komada rasutih u kompostu.

Sve formulacije elektropredenih vlakana i filmova izlivenih iz rastvora, nezavisno od prisustva i sadržaja ekstrakta žalfije, podlegle su razgradnji u model sistemima komposta, kako sa, tako i bez dodatka ukupnog proteinskog ekstrakta sojeva *Streptomyces* spp. Test razgradnje vlakana i filmova u model sistemima komposta izveden je u trajanju od 25 dana.

Podložnost elektropredenih vlakana razgradnji u model sistemima komposta bila je slična, nezavisno od prisustva ukupnog proteinskog ekstrakta. Promene u izgledu uzoraka uočene su već nakon 5. dana inkubacije u kompostu jasno ukazujući na početak razgradnje. Naime, kod svih ispitivanih formulacija vlakana došlo je do bubrenja, promene boje i oblika, kao i početne dezintegracije. Razgradnja vlakana nastavljena je tokom vremena, pri čemu je do potpune razgradnje došlo nakon 18 do 25 dana inkubacije u model sistemima komposta zavisno od formulacije. Inkorporacija ekstrakta žalfije u strukture vlakana ispoljila je pozitivan efekat u pogledu njihove razgradnje u kompostu bez ukupnog proteinskog ekstrakta. Ovaj efekat se ogleda u kraćem vremenskom periodu potrebnom za potpunu razgradnju formulacija vlakana sa inkorporiranim ekstraktom (ZG-5Ev i ZG-10Ev) u odnosu na kontrolna vlakna (ZGv). Slično ovome, Jaramillo et al. (2016) su pokazali da inkorporacija prirodnog ekstrakta mate skraćuje vreme razgradnje biopolimernih filmova na bazi skroba pripisavši ovaj efekat brzom razgradnji niskomolekulskih jedinjenja ekstrakta. Dodatak ukupnog proteinskog ekstrakta u kompost produžio je vreme potrebno za potpunu razgradnju formulacije ZG-5Ev, dok u pogledu razgradnje formulacija ZGv i ZG-10Ev nisu uočene promene.



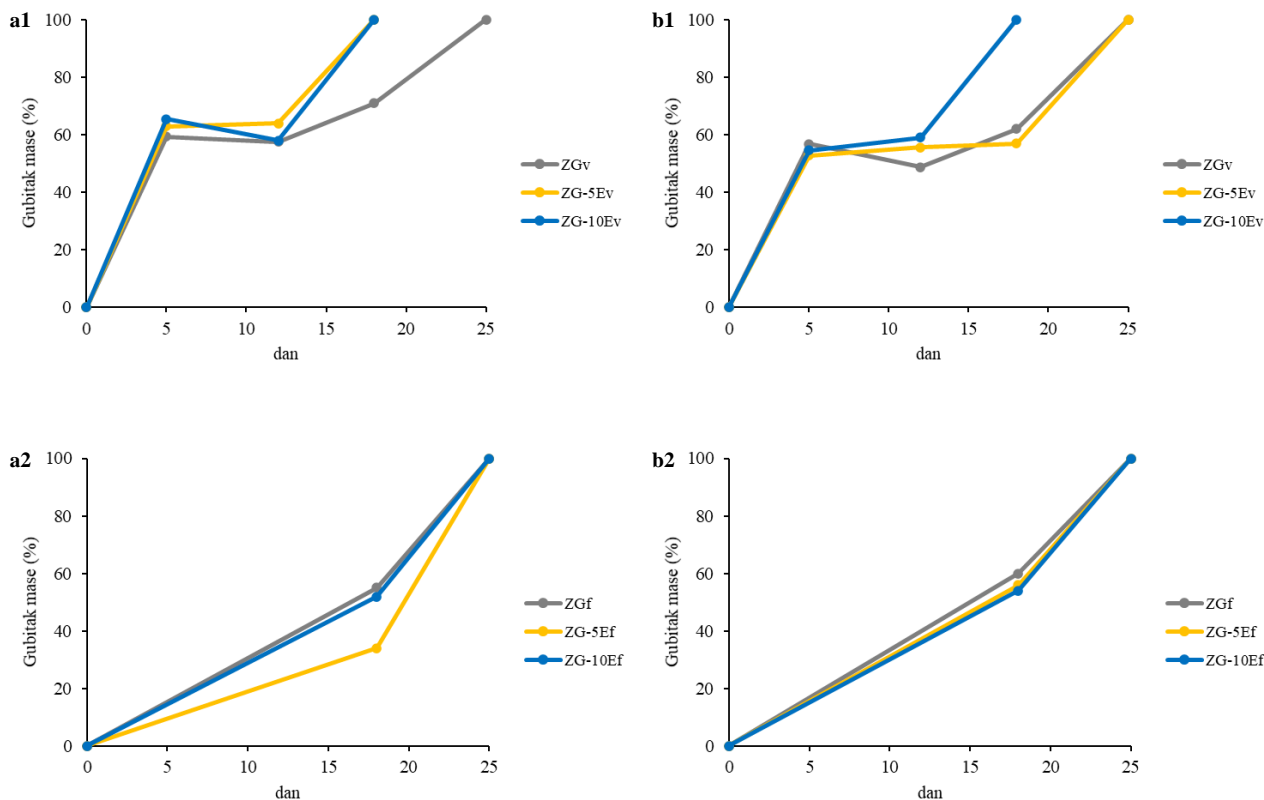
**Slika 4.24.** Dezintegracija ZG vlakana u model sistemu komposta bez (a) i sa dodatkom ukupnog proteinskog ekstrakta *Streptomyces* spp. sojeva (b)



**Slika 4.25.** Dezintegracija ZG filmova u model sistemu komposta bez (a) i sa dodatkom ukupnog proteinskog ekstrakta *Streptomyces* spp. sojeva (b)

U slučaju filmova izlivenih iz rastvora razgradivost u model sistemima komposta bila je veoma slična za sve formulacije, nezavisno od prisustva i sadržaja ekstrakta žalfije, niti od dodatka ukupnog proteinskog ekstrakta. Početni period inkubacije izlivenih filmova u kompostu bio je praćen bubrenjem uzoraka, dok je dezintegracija uzoraka započeta nešto kasnije u odnosu na elektropredena vlakna istog sastava. Ovakav rezultat se može pripisati prethodno diskutovanim strukturnim razlikama uzoraka u zavisnosti od tehnike primenjene za njihovo dobijanje (Sekcija 4.3.2.1.). Pretpostavka je da porozne strukture vlakana sa velikim odnosom površine prema zapremini omogućavaju veću dodirnu površinu uzoraka sa zemljišnim mikroorganizmima i tako ubrzavaju inicijalnu razgradnju u odnosu na kompaktne strukture filmova. Tako su u slučaju filmova znaci koji ukazuju na razgradnju, odnosno gubitak transparentnosti, promene boje i oblika, kao i dezintegracija, uočeni nakon 18. dana inkubacije u kompostu. Uprkos razlikama u vremenskom periodu potrebnom za inicijalnu razgradnju uzoraka, potpuna razgradnja ispitivanih formulacija filmova, baš kao i vlakana, ne zahteva više od 25 dana inkubacije u kompostu. U ovom pogledu, istraživanja su pokazala da kod polimera podložnih biorazgradnji u kompostu veća dodirna površina uzoraka ima uticaja samo na inicijalnu fazu biorazgradnje čineći je bržom, dok se u kasnijim fazama njen uticaj gubi usled fragmentacije koja dovodi do slične veličine površina svih uzoraka (Yang et al., 2005). Tako na početku testa razgradivosti kompaktne strukture pružaju veći otpor infiltraciji mikroorganizama čineći inicijalnu fazu razgradnje sporijom, dok se u kasnijoj fazi testa kompaktnost struktura narušava čime se gubi njen uticaj na stopu razgradnje (Xiong et al., 2008). U ovom pogledu, Castro Mayorga et al. (2018) su pokazali da se u zavisnosti od primenjene tehnike mogu dobiti različite površine u pogledu njihove dostupnosti mikroorganizmima, što dovodi do razlika u vremenu potrebnom za početak biorazgradnje uzoraka bez uticaja na period potreban za potpunu biorazgradnju.

Mehanizam razgradnje biopolimernih materijala u kompostu odvija se kroz nekoliko faza. Na početku dolazi do erozije površine koja na taj način postaje dostupnija zemljišnim mikroorganizmima. Nakon kolonizacije po površini mikroorganizmi luče enzime koji u sinergističkom dejstvu sa vlagom i temperaturom dovode do slabljenja i skraćivanja polimernih lanaca, rezultujući fragmentacijom i na kraju mineralizacijom uzoraka (Cerruti et al., 2011; Balaguer et al., 2015). Kratko vreme potrebno za potpunu razgradnju proteinskih struktura u kompostu u saglasnosti je sa literaturom i ukazuje da mehanizam razgradnje uključuje i eroziju unutrašnjosti matriksa usled raskidanja hidrolizabilnih veza (Balaguer et al., 2015).



**Slika 4.26.** Gubitak mase ZG vlakana (gore) i filmova (dole) tokom inkubacije u model sistemu komposta bez (a1-a2) i sa dodatkom ukupnog proteinskog ekstrakta *Streptomyces* spp. sojeva (b1-b2)

Generalno, dobijeni rezultati su pokazali da inkorporacija ekstrakta žalfije koji pokazuje antibakterijsku aktivnost nije narušila razgradivost vlakana i filmova na bazi zeina i želatina u model sistemima komposta, već je u slučaju vlakana sa većim sadržajem inkorporiranog ekstrakta imala pozitivan efekat. Dodatak ukupnog proteinskog ekstrakta *Streptomyces* spp. sojeva u kompost nije imao katalitičko dejstvo u pogledu razgradnje proteinskih vlakana i filmova, nezavisno od prisustva i sadržaja ekstrakta žalfije. Tako su bez obzira na prisustvo ukupnog proteinskog ekstrakta sve formulacije vlakana i filmova ispoljile podložnost potpunoj razgradnji u kompostu od strane prirodno prisutnih mikroorganizama tokom kratkog vremenskog perioda. Ovakav rezultat je od velike važnosti posmatrano sa ekološkog aspekta i potencijalne primene vlakana i filmova kao ambalažnih materijala.

## 5. ZAKLJUČAK

Prvi deo doktorske disertacije bio je usmeren na pripremu i karakterizaciju ekstrakta žalfije kao aktivnog konstituenta pri sintezi aktivnih materijala.

- 50% (v/v) rastvor etanola u vodi kao ekstrakcioni medijum, dužina trajanja ekstrakcije od 90 minuta i odnos biljnog materijala i rastvarača 1:20 (w/v) su na osnovu sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja određeni kao optimalni uslovi za pripremu ekstrakta tehnikom maceracije.
- Prinos suvog ekstrakta bio je 15,66% (w/w).
- Određen je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja od  $157,73 \pm 2,89$  mg GAE/g suvog ekstrakta.
- Pet fenolnih kiselina (protokatehinska, ferulična, kafeinska, *p*-kumarna i ruzmarinska kiselina) je identifikovano i kvantifikovano u pripremljenom ekstraktu. Kvantitativno najdominantnija je bila ruzmarinska kiselina sa sadržajem od 15,49 mg/g suvog ekstrakta.
- Antioksidativna aktivnost ekstrakta određena je kao sposobnost inhibicije DPPH• slobodnog radikala i iznosila je  $1,07 \pm 0,06$  mmol TE/g suvog ekstrakta. Ovaj rezultat je istakao potencijal pripremljenog ekstrakta da bude korišćen kao funkcionalni konstituent pri formulisanju i sintezi aktivnih ambalažnih materijala posmatrano sa aspekta sposobnosti „gašenja“ aktivnosti slobodnih radikala.
- Pripremljeni ekstrakt je ispoljio i antibakterijsku aktivnost, pri čemu su manje koncentracije bile potrebne za postizanje inhibitornog (MIK 0,31 mg/ml) i baktericidnog (MBK 20,00 mg/ml) efekta na *S. aureus* u odnosu na *E. coli* (MIK i MBK: 2,50 i 40,00 mg/ml, respektivno). Tako je pokazano da se funkcionalnost ekstrakta pri formulisanju i sintezi aktivnih ambalažnih materijala ogleda i u sposobnosti inhibitornog i baktericidnog delovanja na patogene bakterije.

Drugi deo disertacije bio je usmeren na pripremu i karakterizaciju aktivnih, biorazgradivih materijala na bazi PCL-a sa inkorporiranim ekstraktom žalfije. Sintetisane su četiri formulacije: kontrolni PCL film (bez inkorporiranog ekstrakta žalfije) i PCL filmovi sa različitim sadržajem inkorporiranog ekstrakta žalfije (5, 10 i 20%). Sinteza filmova je sprovedena u dve faze. Najpre su tehnikom elektropredenja dobijene forme koje su potom podvrgnute kratkotrajnom termičkom tretmanu sa ciljem postizanja poželjnijih svojstava posmatrano sa aspekta potencijalne primene kao ambalažnih materijala. Poseban fokus bio je usmeren na analizu uticaja inkorporacije ekstrakta na fizička, hemijska i funkcionalna svojstva filmova, kao i na njihovu biorazgradivost.

- SEM analiza je pokazala da su elektropredene strukture sačinjene od isprepletanih, gusto raspoređenih, pravilnih vlakana. Inkorporacija ekstrakta nije uticala na strukturne i površinske karakteristike vlakana, ukazujući na homogenu disperziju ekstrakta unutar vlakana.
- Sa druge strane, inkorporacija ekstrakta uticala je na prečnik vlakana, pa su sa povećanjem sadržaja inkorporiranog ekstrakta dobijena vlakna manjeg prečnika.
- Na osnovu analize morfoloških karakteristika filmova, termički tretman elektropredenih vlakana na 55 °C određen je kao optimalan za dobijanje filmova.

- Primenom termičkog tretmana strukture vlakana su u potpunosti prevedene u strukture kontinualnih filmova. Proces spajanja vlakana zavisio je od njihovog prečnika, pa su tretmanom vlakana manjeg prečnika dobijene kompaktne i glatke strukture filmova.
- 20% je najveći prihvatljiv sadržaj inkorporiranog ekstrakta, jer pri termičkom tretmanu dolazi do migracije lakoisparljivih konstituenata što narušava strukturu filmova.
- Prečnik vlakana i sadržaj inkorporiranog ekstrakta uticali su i na debljinu filmova, pa su tako vlakna manjeg prečnika sa većim sadržajem ekstrakta prevedena u tanje filmove.
- Prevođenjem struktura vlakana u strukture filmova postignuta je transparentnost uzoraka. Inkorporacija ekstrakta žalfije nije narušila transparentnost filmova, ali je svojom bojom ekstrakt doprineo nastanku žute boje filmova. Ovako dobijeni filmovi bi kao potencijalni ambalažni materijali omogućavali vizuelnu ocenu upakovanog proizvoda.
- Na osnovu vrednosti kontaktnog ugla sa vodom, površine sintetisanih PCL filmova okarakterisane su kao hidrofobne, sa malim afinitetom prema vodi. Inkorporacija ekstrakta doprinela je otpornosti na kvašljivost, odnosno na širenje kapi vode po površini filmova.
- Na FT-IR spektrima nakon inkorporacije ekstrakta nisu uočene nove trake, niti promene u poziciji ili obliku traka koje potiču od matriksa, dok su trake koje potiču od ekstrakta u potpunosti prekrivene trakama matriksa. Tako je analizom spektara zaključeno da je ekstrakt žalfije efikasno inkorporiran unutar PCL matriksa bez jakih hemijskih interakcija između konstituenata ekstrakta i polimernog matriksa.
- DSC termogrami svih formulacija PCL filmova bili su veoma slični, pri čemu je uočeno prisustvo samo pika koji potiče od matriksa, bez pika koji potiče od ekstrakta žalfije. Inkorporacija ekstrakta nije uticala na temperaturu topljenja, dok je nešto veći uticaj na entalpiju topljenja i stepen kristaliničnosti u odnosu na kontrolni film uočen tek pri inkorporaciji najvećeg sadržaja ekstrakta, ukazujući na potencijalni blag efekat nukleacije. Analizom DSC rezultata je takođe zaključeno da je ekstrakt efikasno inkorporiran u matriksu polimera bez jakih hemijskih interakcija između konstituenata ekstrakta i matriksa.
- TGA krive svih formulacija PCL filmova bile su takođe veoma slične. Inkorporacija ekstrakta žalfije nije uticala na termičku stabilnost filmova, pri čemu su filmovi ispoljili stabilnost do ~350 °C. Pored toga, TGA krive ekstrakta u slobodnom obliku i filmova sa inkorporiranim ekstraktom ukazale su na pogodnost struktura PCL filmova za zaštitu termički osetljivih konstituenata ekstrakta.
- Usled odsustva hemijskih interakcija između konstituenata ekstrakta žalfije i PCL matriksa, uticaj inkorporacije ekstrakta na mehaničke karakteristike filmova bio je neznan. Analiza mehaničkih karakteristika ukazala je na pogodnost primene PCL filmova u slučajevima kada se pri manipulaciji zahtevaju mehanička čvrstina i otpornost materijala na kidanje.
- Analizom propustljivosti vodene pare kroz PCL filmove uočena je njena zavisnost od sadržaja inkorporiranog ekstrakta, odnosno od morfologije i debljine filmova. Tako su deblji filmovi ispoljili bolje barijerno delovanje prema prolasku vodene pare u odnosu na tanje filmove. Slabijoj barijernoj performansi tanjih filmova doprinosi i veći sadržaj inkorporiranog ekstrakta koji ispoljava afinitet prema vodi, ali i koji sadrži lakoisparljiva jedinjenja podložna migraciji tokom termičkog tretmana vlakana što stvara put za difuziju vodene pare.
- Na propustljivost D-limonena utiču drugi faktori u poređenju sa propustljivošću vodene pare. Generalno, inkorporacija ekstrakta je olakšala difuziju D-limonena kroz filmove.
- Filmovi sa inkorporiranim ekstraktom ispoljili su sposobnost otpuštanja ukupnih fenolnih jedinjenja pri direktnom kontaktu sa medijumima koji simuliraju prehrambene proizvode. Veća količina ovih aktivnih konstituenata otpuštena je iz formulacija sa većim sadržajem ekstrakta i to u medijum koji simulira proizvode lipofilnog karaktera usled hidrofobnosti površina filmova.
- Antioksidativna aktivnost ekstrakta žalfije očuvana je tokom procesa elektropredenja i termičkog tretmana. Tako je inkorporacijom ekstrakta u PCL matriks i povećanjem

njegovog sadržaja postignuta sposobnost filmova da u direktnom kontaktu sa rastvorom DPPH• neutrališu ovaj slobodni radikal. Na ovaj način su razvijeni antioksidativni materijali kao potencijalni aktivni ambalažni materijali za pakovanje prehrambenih proizvoda i inovativnom funkcijom u prevenciji oksidacionih procesa i kvarenja upakovanih proizvoda.

- Antibakterijska aktivnost ekstrakta prema patogenim bakterijama je takođe očuvana tokom procesa elektropredenja i termičkog tretmana. Inkorporacijom ekstrakta u PCL matriks postignuta je sposobnost filmova da pri direktnom kontaktu sa patogenim bakterijama dovedu do redukcije njihovog broja. Sve formulacije filmova sa inkorporiranim ekstraktom ispoljile su potpun baktericidni efekat prema *S. aureus*, dok se efekat delovanja na *E. coli* pojačavao sa povećanjem sadržaja ekstrakta u filmu. Tako je inkorporacijom ekstrakta žalfije u matriks PCL-a postignuta ne samo antioksidativna, već i antibakterijska funkcionalnost, što sa stanovišta potencijalne primene filmova kao ambalažnih materijala može imati važan doprinos u očuvanju kvaliteta i bezbednosti upakovanog proizvoda.
- Sve formulacije filmova podlegle su potpunoj razgradnji od strane prisutnih zemljišnih mikroorganizama nakon 3 do 4 meseca inkubacije u model sistemu komposta. Dodatak bakterijske kulture *P. aeruginosa* u kompost ispoljio je katalitički efekat na razgradnju filmova. Tako je period inkubacije potreban za potpunu razgradnju filmova skraćen na 4 nedelje dodatkom kulture *P. aeruginosa* u kompost. Pri tom, inkorporacija antibakterijski aktivnog ekstrakta nije narušila razgradivost filmova niti od strane prirodno prisutnih mikroorganizama, niti dodate bakterijske kulture. Ova karakteristika sintetisanih PCL filmova je veoma važna posmatrano sa ekološkog aspekta.

Treći deo doktorske disertacije bio je usmeren na pripremu i karakterizaciju aktivnih materijala na bazi zeina sa inkorporiranim ekstraktom žalfije. Mehaničke karakteristike elektropredenih vlakana i izlivenih filmova na bazi zeina, nezavisno od prisustva ekstrakta, nisu omogućavale manipulaciju uzorcima bez narušavanja njihovog integriteta što je neprihvatljivo posmatrano sa aspekta potencijalne primene kao ambalažnih materijala. U cilju prevazilaženja ovog problema dalji fokus bio je usmeren na pripremu blende zeina sa drugim polimerima. Pri sintezi vlakana i filmova na bazi zeina i PEO uočeno je razdvajanje faza ukazujući na neadekvatne koncentracije i odnos ova dva polimera za dobijanje uniformnih vlakana i filmova. Sledeći pristup bio je usmeren na sintezu potencijalno jestivih vlakana i filmova na bazi biopolimera, zeina i želatina. Ovaj pristup rezultovao je zadovoljavajućim karakteristikama uzoraka zbog čega su bili dalji predmet istraživanja. Tehnikom elektropredenja sintetisane su 3 formulacije na bazi proteina: bez inkorporiranog ekstrakta žalfije (kontrola) i sa 5 i 10% inkorporiranog ekstrakta žalfije. 10% je najveći sadržaj ekstrakta u rastvoru koji ne narušava stabilnost procesa elektropredenja. Tehnikom izlivanja iz rastvora sintetisane su još 3 formulacije na bazi proteina: bez inkorporiranog ekstrakta žalfije (kontrola) i sa 5 i 10% inkorporiranog ekstrakta žalfije. Poseban fokus bio je usmeren na analizu uticaja inkorporacije ekstrakta na fizička, hemijska i funkcionalna svojstva ZG vlakana i filmova, kao i na njihovu biorazgradivost.

- SEM analiza je istakla strukturne razlike između uzoraka u zavisnosti od tehnike dobijanja. Elektropredene strukture su bile sačinjene od isprepletanih, gusto raspoređenih, pravilnih vlakana. Inkorporacija ekstrakta i povećanje njegovog sadržaja rezultovali su nastajanjem vlakana većeg prečnika. Izlivanjem iz rastvora dobijene su strukture kontinualnih i kompaktnih filmova, bez vidljivih defekata. Inkorporacijom ekstrakta dobijene su homogenije površine filmova. Generalno, analiza morfoloških karakteristika vlakana i filmova ukazala je na kompatibilnost zeina i želatina, kao i na homogenu disperziju ekstrakta unutar matriksa.
- Elektropredeni uzorci sa inkorporiranim ekstraktom su zbog većeg prečnika vlakana deblji u odnosu na kontrolne elektropredene uzorke, dok je u slučaju izlivenih filmova inkorporacija dovela do neznatnog porasta debljine. Pored toga, uzorci izliveni iz rastvora su zbog veće gustine i kompaktnije strukture tanji u odnosu na elektropredene uzorke istog sastava.



- Strukturne razlike elektropredenih vlakana i izlivenih filmova doprinele su i očiglednim vizuelnim razlikama. Tako su porozni elektropredeni uzorci bili bele boje i potpuno netransparentni, dok su kompaktni i kontinualni filmovi bili transparentni. Inkorporacija ekstrakta nije uticala na transparentnost uzoraka, ali je svojom bojom ekstrakt doprineo nastanku žute boje. Posmatrano sa aspekta potencijalne primene elektropredenih i izlivenih blendi proteina kao ambalažnih materijala izbor bi zavisio od toga da li treba da se omogući vizuelno ispitivanje upakovanog proizvoda.
- FT-IR spektri elektropredenih vlakana i izlivenih filmova su veoma slični, bez razdvajanja i preklapanja traka zeina i želatina ukazujući da su konstituenti matriksa homogeno distribuirani, a potencijalne interakcije su slabog intenziteta. Na spektrima vlakana i filmova sa inkorporiranim ekstraktom nisu uočene nove trake, promene u poziciji ili obliku traka koje potiču od proteina, kao ni trake koje potiču od ekstrakta, na osnovu čega je zaključeno da je ekstrakt fizički inkorporiran unutar proteinskog matriksa bez značajnih hemijskih interakcija između konstituenata ekstrakta i matriksa.
- Usled razlika u uređenosti struktura temperatura denaturacije elektropredenih vlakana je niža u odnosu na izlivenih filmova. DSC analiza je pokazala i da inkorporacija većeg sadržaja ekstrakta dovodi do blagih varijacija toplotnih svojstava vlakana i filmova, ukazujući na potencijalne interakcije slabog intenziteta između konstituenata ekstrakta i matriksa koje nisu detektovane FT-IR analizom. Na DSC termogramima nisu uočeni pikovi koji potiču od ekstrakta što potvrđuje zaključak FT-IR analize da je ekstrakt efikasno inkorporiran unutar matriksa.
- Termička degradacija ZG vlakana i filmova se odvija kroz tri faze: gubitak lako isparljivih jedinjenja, zatim gubitak glicerola i vezane sirćetne kiseline, odnosno dekompozicija matriksa, i na kraju degradacija proteina. Inkorporacija ekstrakta je usled prisustva lako isparljivih konstituenata rezultovala smanjenjem temperature početka degradacije i dekompozicije u odnosu na kontrolna vlakna i filmove. Sa druge strane, inkorporacija je dovela do neznatnih promena u pogledu temperature na kojoj dolazi do maksimalne stope degradacije vlakana i filmova, pri čemu nije uočeno prisustvo pika koji potiče od ekstrakta što još jednom potvrđuje da je ekstrakt efikasno dispergovan unutar proteinskih matriksa bez razdvajanja faza.
- Otpuštanje aktivnih jedinjenja iz ZG elektropredenih vlakana i izlivenih filmova pri direktnom kontaktu sa medijumima koji simuliraju prehrambene proizvode se razlikovalo u zavisnosti od sastava formulacija, tehnike primenjene za dobijanje uzoraka i medijuma. Tako su formulacije sa većim sadržajem ekstrakta otpustile veće količine ukupnih fenolnih jedinjenja i ruzmarinske kiseline. Strukturne karakteristike elektropredenih vlakana su omogućile otpuštanje veće količine ukupnih fenolnih jedinjenja i ruzmarinske kiseline u odnosu na izlivenih filmova. U slučaju elektropredenih vlakana veće količine ukupnih fenolnih jedinjenja otpuštene su u 95% rastvor etanola u poređenju sa 10% rastvorom etanola, dok su iz izlivenih filmova slične količine ukupnih fenolnih jedinjenja otpuštene u 10% i 95% rastvor etanola. Nezavisno od strukture uzoraka, veće količine ruzmarinske kiseline otpuštene su u 95% rastvor etanola.
- Antioksidativna aktivnost ekstrakta očuvana je kako tokom elektropredenja vlakana, tako i tokom izlivanja filmova. ZG vlakna i filmovi bez inkorporiranog ekstrakta žalfije (kontrolne) ispoljili su određeni stepen antioksidativne aktivnosti u pogledu inhibicije DPPH• slobodnog radikala. Inkorporacijom ekstrakta i povećanjem njegovog sadržaja postignuta je značajno jača sposobnost vlakana i filmova da pri direktnom kontaktu neutrališu DPPH• slobodni radikal. Pri tom, strukturne karakteristike elektropredenih vlakana omogućile su veću efikasnost inhibicije DPPH• radikala u odnosu na izlivenih filmova. Tako je analiza antioksidativne aktivnosti vlakana i filmova na bazi zeina i želatina sa inkorporiranim ekstraktom žalfije istakla njihov potencijal da budu korišćeni kao aktivni ambalažni materijali sa ciljem očuvanja kvaliteta i produženja roka trajanja upakovanog proizvoda.

- Antibakterijska aktivnost ekstrakta prema patogenim bakterijama (*S. aureus* i *E. coli*) takođe je očuvana tokom elektropredenja vlakana, odnosno izlivanja filmova. Sve formulacije vlakana i filmova ispoljile su određeni stepen antibakterijske aktivnosti pri direktnom kontaktu sa bakterijama. U slučaju kontrolnih uzoraka, bez inkorporiranog ekstrakta, sposobnost inhibitornog delovanja na rast bakterija potiče od rezidua sirćetne kiseline. Inkorporacijom ekstrakta i povećanjem njegovog sadržaja poboljšana je antibakterijska efikasnost vlakana i filmova usled sinergističkog delovanja konstituenata ekstrakta i rezidua sirćetne kiseline. Veća osetljivost *S. aureus* prema ekstraktu u slobodnom obliku doprinela je većoj osetljivosti prema vlaknima i filmovima. Strukturne razlike između elektropredenih vlakana i izlivenih filmova dovele su do razlika u antibakterijskoj efikasnosti površina, pri čemu su zbog veće površinske gustine filmovi ispoljili jače antibakterijsko delovanje u odnosu na vlakna istog sastava. Generalno, inkorporacija ekstrakta žalfije doprinela je ne samo antioksidativnoj, već i antibakterijskoj funkcionalnosti vlakana i filmova na bazi zeina i želatina, što je dodatno istaklo potencijal njihove primene kao aktivnih ambalažnih materijala sa ciljem očuvanja kvaliteta i bezbednosti upakovanog proizvoda.
- Sve formulacije ZG vlakana i filmova podlegle su potpunoj razgradnji od strane prisutnih zemljišnih mikroorganizama nakon 18 do 25 dana inkubacije u model sistemu komposta. Strukturne razlike između vlakana i filmova su uticale na inicijalnu fazu razgradnje, koja je bila brža u slučaju vlakana u odnosu na filmove istog sastava, dok nije bilo razlika u pogledu perioda inkubacije potrebnog za potpunu razgradnju ispitivanih uzoraka. Dodatak ukupnog proteinskog ekstrakta *Streptomyces* spp. sojeva u kompost nije imao katalitičko dejstvo na razgradnju uzoraka. Pored toga, inkorporacija antibakterijski aktivnog ekstrakta žalfije nije narušila razgradivost ZG vlakana i filmova u model sistemima komposta, već je u slučaju vlakana sa većim sadržajem ekstrakta imala pozitivan efekat. Ova karakteristika sintetisanih materijala na bazi proteina je od velike važnosti posmatrano sa ekološkog aspekta.

Generalno, analizirane karakteristike sintetisanih materijala ukazale su da ispunjavaju kriterijume da budu korišćeni kao aktivni materijali za pakovanje prehrambenih proizvoda. Pored sposobnosti neutralisanja reaktivnih slobodnih radikala i inhibicije rasta patogenih bakterija, sintetisane materijale karakteriše i biorazgradivost što ih čini ekološki prihvatljivim.

## 6. LITERATURA:

Akcan, T., Estévez, M., Serdaroğlu, M. (2017): Antioxidant protection of cooked meatballs during frozen storage by whey protein edible films with phytochemicals from *Laurus nobilis* L. and *Salvia officinalis*. *LWT - Food Science and Technology* 77: 323-331.

Alehosseini, A., Gómez-Mascaraque, L.G., Martínez-Sanz, M., López-Rubio, A. (2019): Electrospun curcumin-loaded protein nanofiber mats as active/bioactive coatings for food packaging applications. *Food Hydrocolloids* 87: 758-771.

Alp-Erbay, E., Figueroa-Lopez, K.J., Lagaron, J.M., Çağlak, E., Torres-Giner, S. (2019): The impact of electrospun films of poly ( $\epsilon$ -caprolactone) filled with nanostructured zeolite and silica microparticles on in vitro histamine formation by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella Paratyphi* A. *Food Packaging and Shelf Life* 22: 100414.

Altan, A., Aytac, Z., Uyar, T. (2018): Carvacrol loaded electrospun fibrous films from zein and poly (lactic acid) for active food packaging. *Food Hydrocolloids* 81: 48-59.

Al-Tayyar, N.A., Youssef, A.M., Al-Hindi, R. (2020): Antimicrobial food packaging based on sustainable Bio-based materials for reducing foodborne Pathogens: A review. *Food Chemistry* 310: 125915.

Anbukarasu, P., Sauvageau, D., Elias, A. (2015): Tuning the properties of polyhydroxybutyrate films using acetic acid via solvent casting. *Scientific Reports* 5: 17884.

Arcan, I., Yemenicioğlu, A. (2011): Incorporating phenolic compounds opens a new perspective to use zein films as flexible bioactive packaging materials. *Food Research International* 44: 550-556.

ASTM standard D638-10 (2010): Standard test methods for tensile properties of plastics. American Society for Testing and Materials International, West Conshohocken, Pennsylvania, USA.

ASTM standard E96-95 (1995): Standard test methods for water vapour transmission of materials. American Society for Testing and Materials International, West Conshohocken, Pennsylvania, USA.

Aytac, Z., Keskin, N.O.S., Tekinay, T., Uyar, T. (2017): Antioxidant  $\alpha$ -tocopherol/ $\gamma$ -cyclodextrin-inclusion complex encapsulated poly (lactic acid) electrospun nanofibrous web for food packaging. *Journal of Applied Polymer Science* 134(21): 44858.

Aytac, Z., Uyar, T. (2016): Antioxidant activity and photostability of  $\alpha$ -tocopherol/ $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex encapsulated electrospun polycaprolactone nanofibers. *European Polymer Journal* 79: 140-149.

Balaguer, M.P., Villanova, J., Cesar, G., Gavara, R., Hernandez-Munoz, P. (2015): Compostable properties of antimicrobial bioplastics based on cinnamaldehyde cross-linked gliadins. *Chemical Engineering Journal* 262: 447-455.

Basar, A.O., Castro, S., Torres-Giner, S., Lagaron, J.M., Sasmazel, H.T. (2017): Novel poly ( $\epsilon$ -caprolactone)/gelatin wound dressings prepared by emulsion electrospinning with controlled

- release capacity of Ketoprofen anti-inflammatory drug. *Materials Science and Engineering: C* 81: 459-468.
- Belščak-Cvitanović, A., Đorđević, V., Karlović, S., Pavlović, V., Komes, D., Ježek, D., Bugarski, B., Nedović, V. (2015): Protein-reinforced and chitosan-pectin coated alginate microparticles for delivery of flavan-3-ol antioxidants and caffeine from green tea extract. *Food Hydrocolloids* 51: 361-374.
- Benbettaieb, N., Tanner, C., Cayot, P., Karbowski, T., Debeaufort, F. (2018): Impact of functional properties and release kinetics on antioxidant activity of biopolymer active films and coatings. *Food Chemistry* 242: 369-377.
- Bhardwaj, N., Kundu, S.C. (2010): Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances* 28(3): 325-347.
- Bhushani, J.A., Anandharamakrishnan, C. (2014): Electrospinning and electrospraying techniques: Potential food based applications. *Trends in Food Science & Technology* 38(1): 21-33.
- Biji, K.B., Ravishankar, C.N., Mohan, C.O., Gopal, T.S. (2015): Smart packaging systems for food applications: a review. *Journal of Food Science and Technology* 52(10): 6125-6135.
- Bitencourt, C.M., Fávoro-Trindade, C.S., Sobral, P.J.A., Carvalho, R.A. (2014): Gelatin-based films additivated with curcuma ethanol extract: Antioxidant activity and physical properties of films. *Food Hydrocolloids* 40: 145-152.
- Bojic, S., Falco, M.M., Stojkovic, P., Ljubic, B., Gazdic Jankovic, M., Armstrong, L., Marković, N., Dopazo, J., Lako, M., Bauer, R., Stojkovic, M. (2020): Platform to study intracellular polystyrene nanoplastic pollution and clinical outcomes. *Stem Cells* 1-5.
- Bonilla, J., Sobral, P.J. (2016): Investigation of the physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of gelatin-chitosan edible film mixed with plant ethanolic extracts. *Food Bioscience* 16: 17-25.
- Bourassa, P., Kanakis, C.D., Tarantilis, P., Pollissiou, M.G., Tajmir-Riahi, H.A. (2010): Resveratrol, genistein, and curcumin bind bovine serum albumin. *The Journal of Physical Chemistry B* 114(9): 3348-3354.
- Brahatheeswaran, D., Mathew, A., Aswathy, R.G., Nagaoka, Y., Venugopal, K., Yoshida, Y., Maekawa, T., Sakthikumar, D. (2012): Hybrid fluorescent curcumin loaded zein electrospun nanofibrous scaffold for biomedical applications. *Biomedical Materials* 7(4): 045001.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995): Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology* 28(1): 25-30.
- Brewer, M.S. (2011): Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 10(4): 221-247.
- Busolo, M.A., Castro, S., Lagaron, J.M. (2017): Electro-hydrodynamic processes (electrospinning and electrospraying): nonthermal processes for micro- and nanoencapsulation. In: Krokida, M. (Ed.), *Thermal and nonthermal encapsulation methods*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA, pp. 115-136.

- Calva-Estrada, S.J., Jiménez-Fernández, M., Lugo-Cervantes, E. (2019): Protein-based films: Advances in the development of biomaterials applicable to food packaging. *Food Engineering Reviews* 11(2): 78-92.
- Camo, J., Beltrán, J.A., Roncalés, P. (2008): Extension of the display life of lamb with an antioxidant active packaging. *Meat Science* 80(4): 1086-1091.
- Campos, F.M., Couto, J.A., Figueiredo, A.R., Tóth, I.V., Rangel, A.O.S.S., Hogg, T.A. (2009): Cell membrane damage induced by phenolic acids on wine lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 135(2): 144-151.
- Cao, N., Fu, Y., He, J. (2007): Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatin composite films. *Food Hydrocolloids* 21(7): 1153-1162.
- Carocho, M., Barreiro, M.F., Morales, P., Ferreira, I.C. (2014): Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13(4): 377-399.
- Carocho, M., Morales, P., Ferreira, I.C. (2015): Natural food additives: *Quo vadis?*. *Trends in Food Science & Technology* 45(2): 284-295.
- Carrizo, D., Taborda, G., Nerín, C., Bosetti, O. (2016): Extension of shelf life of two fatty foods using a new antioxidant multilayer packaging containing green tea extract. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 33: 534-541.
- Castro Mayorga, J.L., Fabra Rovira, M.J., Cabedo Mas, L., Sánchez Moragas, G., Lagaron Cabello, J.M. (2018): Antimicrobial nanocomposites and electrospun coatings based on poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and copper oxide nanoparticles for active packaging and coating applications. *Journal of Applied Polymer Science* 135(2): 45673.
- Castro-Mayorga, J.L., Fabra, M.J., Cabedo, L., Lagaron, J.M. (2017a): On the use of the electrospinning coating technique to produce antimicrobial polyhydroxyalkanoate materials containing in situ-stabilized silver nanoparticles. *Nanomaterials* 7(1): 4.
- Castro-Mayorga, J.L., Fabra, M.J., Pourrahimi, A.M., Olsson, R.T., Lagaron, J.M. (2017b): The impact of zinc oxide particle morphology as an antimicrobial and when incorporated in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) films for food packaging and food contact surfaces applications. *Food and Bioproducts Processing* 101: 32-44.
- Cava, D., Gimenez, E., Gavara, R., Lagaron, J.M. (2006): Comparative performance and barrier properties of biodegradable thermoplastics and nanobiocomposites versus PET for food packaging applications. *Journal of Plastic Film & Sheeting* 22(4): 265-274.
- Cerruti, P., Santagata, G., d'Ayala, G.G., Ambrogi, V., Carfagna, C., Malinconico, M., Persico, P. (2011): Effect of a natural polyphenolic extract on the properties of a biodegradable starch-based polymer. *Polymer Degradation and Stability* 96(5): 839-846.
- Cetin-Karaca, H., Newman, M.C. (2015): Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against *Salmonella* and *Escherichia Coli*. *Food Bioscience* 11: 8-16.
- Chaiyasit, W., Elias, R.J., McClements, D.J., Decker, E.A. (2007): Role of physical structures in bulk oils on lipid oxidation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47(3): 299-317.

- Chater, K.F., Biro, S., Lee, K.J., Palmer, T., Schrempf, H. (2010): The complex extracellular biology of *Streptomyces*. FEMS Microbiology Reviews 34(2): 171-198.
- Chen, H.Y., Lin, Y.C., Hsieh, C.L. (2007): Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. Food Chemistry 104(4): 1418-1424.
- Cherpinski, A., Gozutok, M., Sasmazel, H.T., Torres-Giner, S., Lagaron, J.M. (2018a): Electrospun oxygen scavenging films of poly(3-hydroxybutyrate) containing palladium nanoparticles for active packaging applications. Nanomaterials 8(7): 469.
- Cherpinski, A., Szewczyk, P.K., Gruszczyński, A., Stachewicz, U., Lagaron, J.M. (2019): Oxygen-scavenging multilayered biopapers containing palladium nanoparticles obtained by the electrospinning coating technique. Nanomaterials 9(2): 262.
- Cherpinski, A., Torres-Giner, S., Cabedo, L., Lagaron, J.M. (2017): Post-processing optimization of electrospun submicron poly (3-hydroxybutyrate) fibers to obtain continuous films of interest in food packaging applications. Food Additives & Contaminants: Part A 34(10): 1817-1830.
- Cherpinski, A., Torres-Giner, S., Cabedo, L., Méndez, J.A., Lagaron, J.M. (2018b): Multilayer structures based on annealed electrospun biopolymer coatings of interest in water and aroma barrier fiber-based food packaging applications. Journal of Applied Polymer Science 135(24): 45501.
- Chi, W.-J., Song, J.-H., Oh, E.A., Park, S.-W., Chang, Y.K., Kim, E.-S., Hong, S.-K. (2009): Medium optimization and application of affinity column chromatography for trypsin production from recombinant *Streptomyces griseus*. Journal of Microbiology and Biotechnology 19(10): 1191-1196.
- Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI document M07-A10 (2015): Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, Approved standard - tenth edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA.
- Contardi, M., Heredia-Guerrero, J.A., Perotto, G., Valentini, P., Pompa, P.P., Spanò, R., Goldoni, L., Bertorelli, R., Athanassiou, A., Bayer, I.S. (2017): Transparent ciprofloxacin-povidone antibiotic films and nanofiber mats as potential skin and wound care dressings. European Journal of Pharmaceutical Sciences 104: 133-144.
- Corradini, E., Curti, P.S., Meniqueti, A.B., Martins, A.F., Rubira, A.F., Muniz, E.C. (2014): Recent advances in food-packing, pharmaceutical and biomedical applications of zein and zein-based materials. International Journal of Molecular Sciences 15(12): 22438-22470.
- Cox, K.D., Covernton, G.A., Davies, H.L., Dower, J.F., Juanes, F., Dudas, S.E. (2019): Human consumption of microplastics. Environmental Science & Technology 53(12): 7068-7074.
- Cruz-Romero, M.C., Murphy, T., Morris, M., Cummins, E., Kerry, J.P. (2013): Antimicrobial activity of chitosan, organic acids and nano-sized solubilisates for potential use in smart antimicrobially-active packaging for potential food applications. Food Control 34(2): 393-397.
- Cuvelier, M.E., Richard, H., Berset, C. (1992): Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: structure-activity relationship. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 56(2): 324-325.

- Cuvelier, M.E., Richard, H., Berset, C. (1996): Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 73(5): 645-652.
- Ćujić, N., Šavikin, K., Janković, T., Pljevljakušić, D., Zdunić, G., Ibrić, S. (2016): Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chemistry* 194: 135-142.
- Dainelli, D., Gontard, N., Spyropoulos, D., Zondervan-van den Beuken, E., Tobback, P. (2008): Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. *Trends in Food Science & Technology* 19: S103-S112.
- Dash, T.K., Konkimalla, V.B. (2012): Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. *Journal of Controlled Release* 158(1): 15-33.
- de Barros, N.R., dos Santos, R.S., Miranda, M.C.R., Bolognesi, L.F.C., Borges, F.A., Schiavon, J.V., Marques, R.F.C., Herculano, R.D., Norberto, A.M.Q. (2019): Natural latex-glycerol dressing to reduce nipple pain and healing the skin in breastfeeding women. *Skin Research & Technology* 25(4): 461-468.
- de Moraes, J.O., Scheibe, A.S., Sereno, A., Laurindo, J.B. (2013): Scale-up of the production of cassava starch based films using tape-casting. *Journal of Food Engineering* 119(4): 800-808.
- Del Gaudio, C., Ercolani, E., Nanni, F., Bianco, A. (2011): Assessment of poly (ε-caprolactone)/poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) blends processed by solvent casting and electrospinning. *Materials Science and Engineering: A* 528(3): 1764-1772.
- Deng, L., Kang, X., Liu, Y., Feng, F., Zhang, H. (2018a): Characterization of gelatin/zein films fabricated by electrospinning vs solvent casting. *Food Hydrocolloids* 74: 324-332.
- Deng, L., Li, Y., Feng, F., Wu, D., Zhang, H. (2019): Encapsulation of allopurinol by glucose cross-linked gelatin/zein nanofibers: Characterization and release behavior. *Food Hydrocolloids* 94: 574-584.
- Deng, L., Zhang, X., Li, Y., Que, F., Kang, X., Liu, Y., Feng, F., Zhang, H. (2018b): Characterization of gelatin/zein nanofibers by hybrid electrospinning. *Food Hydrocolloids* 75: 72-80.
- Dey, T.B., Chakraborty, S., Jain, K.K., Sharma, A., Kuhad, R.C. (2016): Antioxidant phenolics and their microbial production by submerged and solid state fermentation process: A review. *Trends in Food Science & Technology* 53: 60-74.
- Dorman, H.J.D., Peltoketo, A., Hiltunen, R., Tikkanen, M.J. (2003): Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chemistry* 83(2): 255-262.
- Du, W.X., Olsen, C.W., Avena-Bustillos, R.J., Mchugh, T.H., Levin, C.E., Friedman, M. (2008): Storage stability and antibacterial activity against *Escherichia coli* O157:H7 of carvacrol in edible apple films made by two different casting methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(9): 3082-3088.

- Durling, N.E., Catchpole, O.J., Grey, J.B., Webby, R.F., Mitchell, K.A., Foo, L.Y., Perry, N.B. (2007): Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol–water mixtures. *Food Chemistry* 101(4): 1417-1424.
- Duvnjak, D., Pantić, M., Pavlović, V., Nedović, V., Lević, S., Matijašević, D., Sknepnek, A., Nikšić, M. (2016): Advances in batch culture fermented *Coriolus versicolor* medicinal mushroom for the production of antibacterial compounds. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 34: 1-8.
- Đorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., Kostić, I., Komes, D., Bugarski, B., Nedović, V. (2015): Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. *Food Engineering Reviews* 7(4): 452-490.
- Echegoyen, Y., Fabra, M.J., Castro-Mayorga, J.L., Cherpinski, A., Lagaron, J.M. (2017): High throughput electro-hydrodynamic processing in food encapsulation and food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology* 60: 71-79.
- Echegoyen, Y., Nerín, C. (2015): Performance of an active paper based on cinnamon essential oil in mushrooms quality. *Food Chemistry* 170: 30-36.
- Eldsäter, C., Erlandsson, B., Renstad, R., Albertsson, A.C., Karlsson, S. (2000): The biodegradation of amorphous and crystalline regions in film-blown poly(ε-caprolactone). *Polymer* 41(4): 1297-1304.
- El-Naggar, M.E., Abdelgawad, A.M., Salas, C., Rojas, O.J. (2016): Curdlan in fibers as carriers of tetracycline hydrochloride: Controlled release and antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers* 154: 194-203.
- Elsawy, M.A., Kim, K.H., Park, J.W., Deep, A. (2017): Hydrolytic degradation of polylactic acid (PLA) and its composites. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 79: 1346-1352.
- Erbil, H.Y., Demirel, A.L., Avcı, Y., Mert, O. (2003): Transformation of a simple plastic into a superhydrophobic surface. *Science* 299(5611): 1377-1380.
- Etxabide, A., Garrido, T., Uranga, J., Guerrero, P., de la Caba, K. (2018): Extraction and incorporation of bioactives into protein formulations for food and biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules* 120: 2094-2105.
- Fabra, M.J., López-Rubio, A., Sentandreu, E., Lagaron, J.M. (2016): Development of multilayer corn starch-based food packaging structures containing β-carotene by means of the electro-hydrodynamic processing. *Starch-Stärke* 68(7-8): 603-610.
- Fan, H.Y., Duquette, D., Dumont, M.J., Simpson, B.K. (2018): Salmon skin gelatin-corn zein composite films produced via crosslinking with glutaraldehyde: Optimization using response surface methodology and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules* 120: 263-273.
- Farhat, M.B., Landoulsi, A., Chaouch-Hamada, R., Sotomayor, J.A., Jordán, M.J. (2013): Characterization and quantification of phenolic compounds and antioxidant properties of *Salvia* species growing in different habitats. *Industrial Crops and Products* 49: 904-914.
- Figuerola-Lopez, K.J., Castro-Mayorga, J.L., Andrade-Mahecha, M.M., Cabedo, L., Lagaron, J.M. (2018): Antibacterial and barrier properties of gelatin coated by electrospon



polycaprolactone ultrathin fibers containing black pepper oleoresin of interest in active food biopackaging applications. *Nanomaterials* 8(4): 199.

Figuroa-Lopez, K.J., Vicente, A.A., Reis, M.A., Torres-Giner, S., Lagaron, J.M. (2019): Antimicrobial and antioxidant performance of various essential oils and natural extracts and their incorporation into biowaste derived poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) layers made from electrospun ultrathin fibers. *Nanomaterials* 9(2): 144.

Filipović, N., Veselinović, Lj., Ražić, S., Jeremić, S., Filipič, M., Žegura, B., Tomić, S., Čolić, M., Stevanović, M. (2019): Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) microspheres for prolonged release of selenium nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C* 96: 776-789.

Fukushima, K., Abbate, C., Tabuani, D., Gennari, M., Rizzarelli, P., Camino, G. (2010a): Biodegradation trend of poly( $\epsilon$ -caprolactone) and nanocomposites. *Materials Science and Engineering: C* 30(4): 566-574.

Fukushima, K., Tabuani, D., Abbate, C., Arena, M., Ferreri, L. (2010b): Effect of sepiolite on the biodegradation of poly(lactic acid) and polycaprolactone. *Polymer Degradation and Stability* 95(10): 2049-2056.

Gaikwad, K.K., Lee, S.M., Lee, J.S., Lee, Y.S. (2017): Development of antimicrobial polyolefin films containing lauroyl arginate and their use in the packaging of strawberries. *Journal of Food Measurement and Characterization* 11(4): 1706-1716.

Ganiari, S., Choulitoudi, E., Oreopoulou, V. (2017): Edible and active films and coatings as carriers of natural antioxidants for lipid food. *Trends in Food Science & Technology* 68: 70-82.

Gavril, G.L., Wrona, M., Bertella, A., Świeca, M., Râpă, M., Salafranca, J., Nerín, C. (2019): Influence of medicinal and aromatic plants into risk assessment of a new bioactive packaging based on polylactic acid (PLA). *Food and Chemical Toxicology* 132: 110662.

Genovese, L., Lotti, N., Gazzano, M., Siracusa, V., Dalla Rosa, M., Munari, A. (2016): Novel biodegradable aliphatic copolyesters based on poly(butylene succinate) containing thioether-linkages for sustainable food packaging applications. *Polymer Degradation and Stability* 132: 191-201.

Ghorani, B., Tucker, N. (2015): Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. *Food Hydrocolloids* 51: 227-240.

Ghorbani, A., Esmailizadeh, M. (2017): Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 7(4): 433-440.

Gómez-Estaca, J., Bravo, L., Gómez-Guillén, M.C., Alemán, A., Montero, P. (2009): Antioxidant properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films induced by the addition of oregano and rosemary extracts. *Food Chemistry* 112(1): 18-25.

Gómez-Estaca, J., López-de-Dicastillo, C., Hernández-Muñoz, P., Catalá, R., Gavara, R. (2014): Advances in antioxidant active food packaging. *Trends in Food Science & Technology* 35(1): 42-51.

Gorjanović, S., Komes, D., Pastor, F.T., Belščak-Cvitanović, A., Pezo, L., Hečimović, I., Sužnjević, D. (2012): Antioxidant capacity of teas and herbal infusions: polarographic assessment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(38): 9573-9580.

Grkovic, M., Stojanovic, D.B., Kojovic, A., Strnad, S., Kreze, T., Aleksic, R., Uskokovic, P.S. (2015): Keratin–polyethylene oxide bio-nanocomposites reinforced with ultrasonically functionalized graphene. *RSC Advances* 5(111): 91280-91287.

Grkovic, M., Stojanovic, D.B., Pavlovic, V.B., Rajilic-Stojanovic, M., Bjelovic, M., Uskokovic, P.S. (2017): Improvement of mechanical properties and antibacterial activity of crosslinked electrospun chitosan/poly (ethylene oxide) nanofibers. *Composites Part B: Engineering* 121: 58-67.

Gross, R.A., Kalra, B. (2002): Biodegradable polymers for the environment. *Science* 297(5582): 803-807.

Guerrero, P., Retegi, A., Gabilondo, N., De la Caba, K. (2010): Mechanical and thermal properties of soy protein films processed by casting and compression. *Journal of Food Engineering* 100(1): 145-151.

Gutiérrez, L., Batlle, R., Andújar, S., Sánchez, C., Nerín, C. (2011): Evaluation of antimicrobial active packaging to increase shelf life of gluten-free sliced bread. *Packaging Technology and Science* 24(8): 485-494.

Hadj-Hamou, A.S., Metref, F., Yahiaoui, F. (2017): Thermal stability and decomposition kinetic studies of antimicrobial PCL/nanoclay packaging films. *Polymer Bulletin* 74(9): 3833-3853.

Han, J.H. (2014): A review of food packaging technologies and innovations. In: Han, J.H. (Ed.), *Innovations in food packaging*, 2<sup>nd</sup> edition. Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA, pp. 3-12.

Han, J.H., Floros, J.D. (1997): Casting antimicrobial packaging films and measuring their physical properties and antimicrobial activity. *Journal of Plastic Film & Sheeting* 13(4): 287-298.

Han, J.H., Krochta, J.M. (1999): Wetting properties and water vapor permeability of whey-protein-coated paper. *Transactions of the ASAE* 42(5): 1375-1382.

Han, J.W., Ruiz-Garcia, L., Qian, J.P., Yang, X.T. (2018): Food packaging: A comprehensive review and future trends. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 17(4): 860-877.

Hanani, Z.N., Beatty, E., Roos, Y.H., Morris, M.A., Kerry, J.P. (2012): Manufacture and characterization of gelatin films derived from beef, pork and fish sources using twin screw extrusion. *Journal of Food Engineering* 113(4): 606-614.

Hanani, Z.N., Roos, Y.H., Kerry, J.P. (2014): Use and application of gelatin as potential biodegradable packaging materials for food products. *International Journal of Biological Macromolecules* 71: 94-102.

Hardiansyah, A., Tanadi, H., Yang, M.C., Liu, T.Y. (2015): Electrospinning and antibacterial activity of chitosan-blended poly (lactic acid) nanofibers. *Journal of Polymer Research* 22(4): 59.

Heneczkowski, M., Kopacz, M., Nowak, D., Kuźniar, A. (2001): Infrared spectrum analysis of some flavonoids. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research* 58: 415-420.

- Herodež, Š.S., Hadolin, M., Škerget, M., Knez, Ž. (2003): Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *Food Chemistry* 80(2): 275-282.
- Hosseini, S.F., Gómez-Guillén, M.C. (2018): A state-of-the-art review on the elaboration of fish gelatin as bioactive packaging: Special emphasis on nanotechnology-based approaches. *Trends in Food Science & Technology* 79: 125-135.
- Hosseini, S.F., Rezaei, M., Zandi, M., Farahmandghavi, F. (2015): Bio-based composite edible films containing *Origanum vulgare* L. essential oil. *Industrial Crops and Products* 67: 403-413.
- <http://www.freund.co.jp/english/chemical/preservation/> (poslednji pristup: 02.08.2020.).
- <https://www.addmaster.co.uk/biomaster/what-is-an-antimicrobial> (poslednji pristup: 22.09.2020.).
- [https://www.bpf.co.uk/Packaging/Case Studies/Antimicrobial solutions for trays and films](https://www.bpf.co.uk/Packaging/Case%20Studies/Antimicrobial%20solutions%20for%20trays%20and%20films) (poslednji pristup: 02.08.2020.).
- <https://www.mfc.co.jp/wasaouro/eng/index.html> (poslednji pristup: 01.08.2020.).
- Hu, H., Yao, X., Qin, Y., Yong, H., Liu, J. (2020): Development of multifunctional food packaging by incorporating betalains from vegetable amaranth (*Amaranthus tricolor* L.) into quaternary ammonium chitosan/fish gelatin blend films. *International Journal of Biological Macromolecules* 159: 675-684.
- Japanese Industrial Standard Committee - JIS Z 2801:2000 (2000): Antimicrobial products - Test for antimicrobial activity and efficacy. Japanese Standards Association, Tokyo, Japan.
- Jaramillo, C.M., Gutiérrez, T.J., Goyanes, S., Bernal, C., Famá, L. (2016): Biodegradability and plasticizing effect of *yerba mate* extract on cassava starch edible films. *Carbohydrate Polymers* 151: 150-159.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives – JECFA (2005): Evaluation of certain food additives: sixty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO technical report series 928, Geneva, Switzerland.
- Jovanović, A., Skrt, M., Petrović, P., Častvan, I., Zdunić, G., Šavikin, K., Bugarski, B. (2019): Ethanol *Thymus serpyllum* extracts: evaluation of extraction conditions via total polyphenol content and radical scavenging activity. *Lekovite Sirovine* 39: 23-30.
- Jovanović, A.A., Đorđević, V.B., Zdunić, G.M., Pljevljakušić, D.S., Šavikin, K.P., Gođevac, D.M., Bugarski, B.M. (2017): Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques. *Separation and Purification Technology* 179: 369-380.
- Jridi, M., Sellimi, S., Lassoued, K.B., Beltaief, S., Souissi, N., Mora, L., Toldra, F., Elfeki, A., Nasri, M., Nasri, R. (2017): Wound healing activity of cuttlefish gelatin gels and films enriched by henna (*Lawsonia inermis*) extract. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 512: 71-79.
- Kalpana, S., Priyadarshini, S.R., Leena, M.M., Moses, J.A., Anandharamakrishnan, C. (2019): Intelligent packaging: Trends and applications in food systems. *Trends in Food Science & Technology* 93: 145-157.

- Kamatou, G.P., Makunga, N.P., Ramogola, W.P.N., Viljoen, A.M. (2008): South African *Salvia* species: a review of biological activities and phytochemistry. *Journal of Ethnopharmacology* 119(3): 664-672.
- Kanatt, S.R., Rao, M.S., Chawla, S.P., Sharma, A. (2012): Active chitosan–polyvinyl alcohol films with natural extracts. *Food Hydrocolloids* 29(2): 290-297.
- Kashiri, M., Cerisuelo, J.P., Domínguez, I., López-Carballo, G., Muriel-Gallet, V., Gavara, R., Hernández-Muñoz, P. (2017): Zein films and coatings as carriers and release systems of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil for antimicrobial food packaging. *Food Hydrocolloids* 70: 260-268.
- Khan, R.A., Beck, S., Dussault, D., Salmieri, S., Bouchard, J., Lacroix, M. (2013): Mechanical and barrier properties of nanocrystalline cellulose reinforced poly(caprolactone) composites: Effect of gamma radiation. *Journal of Applied Polymer Science* 129(5): 3038-3046.
- Khaneghah, A.M., Hashemi, S.M.B., Limbo, S. (2018): Antimicrobial agents and packaging systems in antimicrobial active food packaging: An overview of approaches and interactions. *Food and Bioproducts Processing* 111: 1-19.
- Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., Smole Možina, S. (2010): Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods* 81(2): 121-126.
- Kontogianni, V.G., Tomic, G., Nikolic, I., Nerantzaki, A.A., Sayyad, N., Stosic-Grujicic, S., Stojanovic, I., Gerothanassis, I.P., Tzakos, A.G. (2013): Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. *Food Chemistry* 136(1): 120-129.
- Krstić, M., Radojević, M., Stojanović, D., Radojević, V., Uskoković, P., Ibrić, S. (2017): Formulation and characterization of nanofibers and films with carvedilol prepared by electrospinning and solution casting method. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 101: 160-166.
- Kumar, T.S.M., Kumar, K.S., Rajini, N., Siengchin, S., Ayrilmis, N., Rajulu, A.V. (2019): A comprehensive review of electrospun nanofibers: Food and packaging perspective. *Composites Part B: Engineering* 175: 107074.
- Labet, M., Thielemans, W. (2009): Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chemical Society Reviews* 38(12): 3484-3504.
- Lagarón, J.M. (2011): Multifunctional and nanoreinforced polymers for food packaging. In: Lagarón, J.M. (Ed.), *Multifunctional and nanoreinforced polymers for food packaging*. Woodhead Publishing, Sawston, UK, pp. 1-28.
- Lalpuria, M., Anantheswaran, R., Floros, J. (2012): Packaging technologies and their role in food safety. In: Demirci, A., Ngadi, M. (Eds.), *Microbial decontamination in the food industry*. Woodhead Publishing, Sawston, UK, pp. 701-745.
- Lamien-Meda, A., Nell, M., Lohwasser, U., Börner, A., Franz, C., Novak, J. (2010): Investigation of antioxidant and rosmarinic acid variation in the sage collection of the genebank in Gatersleben. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(6): 3813-3819.

- Lasprilla-Botero, J., Torres-Giner, S., Pardo-Figueroa, M., Álvarez-Láinez, M., Lagaron, J.M. (2018): Superhydrophobic bilayer coating based on annealed electrospun ultrathin poly( $\epsilon$ -caprolactone) fibers and electrospayed nanostructured silica microparticles for easy emptying packaging applications. *Coatings* 8(5): 173.
- Lawton, J.W. (2002): Zein: A history of processing and use. *Cereal Chemistry* 79(1): 1-18.
- Lazić, V., Novaković, D. (2010): *Ambalaža i životna sredina*. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Lazić, V., Popović, S. (2015): *Biorazgradivi ambalažni materijali*. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Lepry, W.C., Smith, S., Liverani, L., Boccaccini, A.R., Nazhat, S.N. (2016): Acellular bioactivity of sol-gel derived borate glass-polycaprolactone electrospun scaffolds. *Biomedical Glasses* 2(1): 88-98.
- Li, L., Wang, H., Chen, M., Jiang, S., Cheng, J., Li, X., Zhang, M., Jiang, S. (2020): Gelatin/zein fiber mats encapsulated with resveratrol: Kinetics, antibacterial activity and application for pork preservation. *Food Hydrocolloids* 101: 105577.
- Licciardello, F. (2017): Packaging, blessing in disguise. Review on its diverse contribution to food sustainability. *Trends in Food Science & Technology* 65: 32-39.
- Liu, J., Yong, H., Liu, Y., Qin, Y., Kan, J., Liu, J. (2019): Preparation and characterization of active and intelligent films based on fish gelatin and haskap berries (*Lonicera caerulea* L.) extract. *Food Packaging and Shelf Life* 22: 100417.
- Liu, L., Li, S., Garreau, H., Vert, M. (2000): Selective enzymatic degradations of poly(L-lactide) and poly( $\epsilon$ -caprolactone) blend films. *Biomacromolecules* 1(3): 350-359.
- Liu, Y., Deng, L., Zhang, C., Chen, K., Feng, F., Zhang, H. (2018): Comparison of ethyl cellulose-gelatin composite films fabricated by electrospinning versus solvent casting. *Journal of Applied Polymer Science* 135(46): 46824.
- López de Dicastillo, C., Nerín, C., Alfaro, P., Catalá, R., Gavara, R., Hernández-Muñoz, P. (2011): Development of new antioxidant active packaging films based on ethylene vinyl alcohol copolymer (EVOH) and green tea extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(14): 7832-7840.
- López-Córdoba, A., Estevez-Areco, S., Goyanes, S. (2019): Potato starch-based biocomposites with enhanced thermal, mechanical and barrier properties comprising water-resistant electrospun poly (vinyl alcohol) fibers and yerba mate extract. *Carbohydrate Polymers* 215: 377-387.
- Lu, Y., Foo, L.Y. (2001): Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry* 75(2): 197-202.
- Luzi, F., Puglia, D., Dominici, F., Fortunati, E., Giovanale, G., Balestra, G.M., Torre, L. (2018): Effect of gallic acid and umbelliferone on thermal, mechanical, antioxidant and antimicrobial properties of poly (vinyl alcohol-co-ethylene) films. *Polymer Degradation and Stability* 152: 162-176.

Majid, I., Nayik, G.A., Dar, S.M., Nanda, V. (2018): Novel food packaging technologies: Innovations and future prospective. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 17(4): 454-462.

Malagurski, I., Levic, S., Nestic, A., Mitric, M., Pavlovic, V., Dimitrijevic-Brankovic, S. (2017a): Mineralized agar-based nanocomposite films: Potential food packaging materials with antimicrobial properties. *Carbohydrate Polymers* 175: 55-62.

Malagurski, I., Levic, S., Pantic, M., Matijasevic, D., Mitric, M., Pavlovic, V., Dimitrijevic-Brankovic, S. (2017b): Synthesis and antimicrobial properties of Zn-mineralized alginate nanocomposites. *Carbohydrate Polymers* 165: 313-321.

Martínez-Abad, A., González-Ausejo, J., Lagarón, J.M., Cabedo, L. (2016): Biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/thermoplastic polyurethane blends with improved mechanical and barrier performance. *Polymer Degradation and Stability* 132: 52-61.

Martínez-Abad, A., Sánchez, G., Fuster, V., Lagaron, J.M., Ocio, M.J. (2013): Antibacterial performance of solvent cast polycaprolactone (PCL) films containing essential oils. *Food Control* 34(1): 214-220.

Martins, C., Vilarinho, F., Silva, A.S., Andrade, M., Machado, A.V., Castilho, M.C., Sá, A., Cunha, A., Vaz, M.F., Ramos, F. (2018): Active polylactic acid film incorporated with green tea extract: Development, characterization and effectiveness. *Industrial Crops and Products* 123: 100-110.

Martins, J.T., Cerqueira, M.A., Vicente, A.A. (2012): Influence of  $\alpha$ -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. *Food Hydrocolloids* 27(1): 220-227.

Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Henriques, M., Silva, S., Ferreira, I.C. (2015): Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from *Salvia officinalis* L. *Food Chemistry* 170: 378-385.

Matijašević, D., Pantić, M., Rašković, B., Pavlović, V., Duvnjak, D., Sknepnek, A., Nikšić, M. (2016): The antibacterial activity of *Coriolus versicolor* methanol extract and its effect on ultrastructural changes of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis. *Frontiers in Microbiology* 7: 1226.

Medina Jaramillo, C., Gonzalez Seligra, P., Goyanes, S., Bernal, C., Famá, L. (2015): Biofilms based on cassava starch containing extract of *yerba mate* as antioxidant and plasticizer. *Starch-Stärke* 67(9-10): 780-789.

Meira, S.M.M., Zehetmeyer, G., Werner, J.O., Brandelli, A. (2017): A novel active packaging material based on starch-halloysite nanocomposites incorporating antimicrobial peptides. *Food Hydrocolloids* 63: 561-570.

Mellinas, C., Valdés, A., Ramos, M., Burgos, N., Garrigos, M.D.C., Jiménez, A. (2016): Active edible films: Current state and future trends. *Journal of Applied Polymer Science* 133(2): 42631.

Mendis, E., Rajapakse, N., Kim, S.K. (2005): Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(3): 581-587.

- Meng, Y., Cloutier, S. (2014): Gelatin and other proteins for microencapsulation. In: Gaonkar, A.G., Vasisht, N., Khare, A.R., Sobel, R. (Eds.), *Microencapsulation in the food industry: A practical implementation guide*. Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA, pp. 227-239.
- Menges, F. (2018): Spectragryph - optical spectroscopy software, version 1.2.8. <http://www.ffmpeg2.de/spectragryph/>.
- Molyneux, P. (2004): The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar Journal of Science and Technology* 26(2): 211-219.
- Montero-Prado, P., Rodriguez-Lafuente, A., Nerin, C. (2011): Active label-based packaging to extend the shelf-life of “Calanda” peach fruit: Changes in fruit quality and enzymatic activity. *Postharvest Biology and Technology* 60(3): 211-219.
- Moreno, M.A., Orqueda, M.E., Gómez-Mascaraque, L.G., Isla, M.I., López-Rubio, A. (2019): Crosslinked electrospun zein-based food packaging coatings containing bioactive chilito fruit extracts. *Food Hydrocolloids* 95: 496-505.
- Mosafa, E., Yahyaabadi, S., Doudi, M. (2014): In-vitro antibacterial properties of sage (*Salvia officinalis*) ethanol extract against multidrug resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences* 16(10): 42-46.
- Mueller, R.J. (2006): Biological degradation of synthetic polyesters - Enzymes as potential catalysts for polyester recycling. *Process Biochemistry* 41(10): 2124-2128.
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., Bugarski, B. (2011): An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science* 1: 1806-1815.
- Negi, P.S. (2012): Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology* 156(1): 7-17.
- Neo, Y.P., Ray, S., Jin, J., Gizdavic-Nikolaidis, M., Nieuwoudt, M.K., Liu, D., Quek, S.Y. (2013): Encapsulation of food grade antioxidant in natural biopolymer by electrospinning technique: A physicochemical study based on zein-gallic acid system. *Food Chemistry* 136(2): 1013-1021.
- Nerín, C., Tovar, L., Djenane, D., Camo, J., Salafranca, J., Beltrán, J.A., Roncalés, P. (2006): Stabilization of beef meat by a new active packaging containing natural antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(20): 7840-7846.
- Norajit, K., Kim, K.M., Ryu, G.H. (2010): Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. *Journal of Food Engineering* 98(3): 377-384.
- Otero, V., Becerril, R., Santos, J.A., Rodríguez-Calleja, J.M., Nerín, C., García-López, M.L. (2014): Evaluation of two antimicrobial packaging films against *Escherichia coli* O157: H7 strains *in vitro* and during storage of a Spanish ripened sheep cheese (Zamorano). *Food Control* 42: 296-302.

Oudjedi, K., Manso, S., Nerin, C., Hassissen, N., Zaidi, F. (2019): New active antioxidant multilayer food packaging films containing Algerian Sage and Bay leaves extracts and their application for oxidative stability of fried potatoes. *Food Control* 98: 216-226.

Ozdemir, M., Floros, J.D. (2004): Active food packaging technologies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 44(3): 185-193.

Pardo-Figuerez, M., López-Córdoba, A., Torres-Giner, S., Lagaron, J.M. (2018): Superhydrophobic bio-coating made by co-continuous electrospinning and electrospraying on polyethylene terephthalate films proposed as easy emptying transparent food packaging. *Coatings* 8(10): 364.

Péroval, C., Debeaufort, F., Despré, D., Voilley, A. (2002): Edible arabinoxylan-based films. 1. Effects of lipid type on water vapor permeability, film structure, and other physical characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(14): 3977-3983.

Petersen, M., Simmonds, M.S. (2003): Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 62(2): 121-125.

Petrović, T., Rajić, J. (2016): *Ambalaža i pakovanje hrane*. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd.

Piñeros-Hernandez, D., Medina-Jaramillo, C., López-Córdoba, A., Goyanes, S. (2017): Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. *Food Hydrocolloids* 63: 488-495.

Pinheiro Bruni, G., dos Santos Acunha, T., de Oliveira, J.P., Martins Fonseca, L., Tavares da Silva, F., Martins Guimarães, V., da Rosa Zavareze, E. (2020): Electrospun protein fibers loaded with yerba mate extract for bioactive release in food packaging. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 100(8): 3341-3350.

PlasticsEurope, EPRO (2015): *Plastics - the facts 2015: An analysis of European plastics production, demand and waste data*. PlasticsEurope - Association of Plastics Manufactures, European Association of Plastics Recycling and Recovery Organisations. <https://www.plasticseurope.org/en/resources/publications/93-plastics-facts-2015> (poslednji pristup: 05.10.2020.).

PlasticsEurope, EPRO (2019): *Plastics - the facts 2019: An analysis of European plastics production, demand and waste data*. PlasticsEurope - Association of Plastics Manufactures, European Association of Plastics Recycling and Recovery Organisations. <https://www.plasticseurope.org/en/resources/publications/1804-plastics-facts-2019> (poslednji pristup: 05.10.2020.).

PlasticsEurope, EuPC, EuPR, EPRO (2008): *The compelling facts about plastics: An analysis of plastics production, demand and recovery for 2006 in Europe*. PlasticsEurope - Association of Plastics Manufactures, European Plastics Converters, European Plastics Recyclers, European Association of Plastics Recycling and Recovery Organisations. <https://www.plasticseurope.org/en/resources/publications/185-compelling-facts-about-plastics-2006> (poslednji pristup: 05.10.2020.).

PlasticsEurope, EuPC, EuPR, EPRO (2009): *The compelling facts about plastics: An analysis of European plastics production, demand and recovery for 2008*. PlasticsEurope - Association of Plastics Manufactures, European Plastics Converters, European Plastics Recyclers, European Association of Plastics Recycling and Recovery Organisations.



<https://www.plasticseurope.org/en/resources/publications/180-compelling-facts-about-plastics-2009> (poslednji pristup: 05.10.2020.).

Pluta-Kubica, A., Jamróz, E., Kawecka, A., Juszczak, L., Krzyściak, P. (2020): Active edible furcellaran/whey protein films with yerba mate and white tea extracts: Preparation, characterization and its application to fresh soft rennet-curd cheese. *International Journal of Biological Macromolecules* 155: 1307-1316.

Ponjavic, M., Nikolic, M.S., Jeremic, S., Djokic, L., Nikodinovic-Runic, J., Cosovic, V.R., Djonlagic, J. (2018): Influence of short central PEO segment on hydrolytic and enzymatic degradation of triblock PCL copolymers. *Journal of Polymers and the Environment* 26(6): 2346-2359.

Ponjavic, M., Nikolic, M.S., Nikodinovic-Runic, J., Jeremic, S., Stevanovic, S., Djonlagic, J. (2017): Degradation behaviour of PCL/PEO/PCL and PCL/PEO block copolymers under controlled hydrolytic, enzymatic and composting conditions. *Polymer Testing* 57: 67-77.

Potrč, T., Baumgartner, S., Roškar, R., Planinšek, O., Lavrič, Z., Kristl, J., Kocbek, P. (2015): Electrospun polycaprolactone nanofibers as a potential oromucosal delivery system for poorly water-soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 75: 101-113.

Radisavljevic, A., Stojanovic, D.B., Perisic, S., Djokic, V., Radojevic, V., Rajilic-Stojanovic, M., Uskokovic, P.S. (2018): Cefazolin-loaded polycaprolactone fibers produced *via* different electrospinning methods: Characterization, drug release and antibacterial effect. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 124: 26-36.

Ramalingam, R., Dhand, C., Leung, C.M., Ong, S.T., Annamalai, S.K., Kamruddin, M., Verma, N.K., Ramakrishna, S., Lakshminarayanan, R., Arunachalam, K.D. (2019): Antimicrobial properties and biocompatibility of electrospun poly-ε-caprolactone fibrous mats containing *Gymnema sylvestri* leaf extract. *Materials Science and Engineering: C* 98: 503-514.

Rambabu, K., Bharath, G., Banat, F., Show, P.L., Cocolletzi, H.H. (2019): Mango leaf extract incorporated chitosan antioxidant film for active food packaging. *International Journal of Biological Macromolecules* 126: 1234-1243.

Ravichandran, S., Radhakrishnan, J., Jayabal, P., Venkatasubbu, G.D. (2019): Antibacterial screening studies of electrospun Polycaprolactone nano fibrous mat containing *Clerodendrum phlomidis* leaves extract. *Applied Surface Science* 484: 676-687.

Realini, C.E., Marcos, B. (2014): Active and intelligent packaging systems for a modern society. *Meat Science* 98(3): 404-419.

Reddy, M.M., Vivekanandhan, S., Misra, M., Bhatia, S.K., Mohanty, A.K. (2013): Biobased plastics and bionanocomposites: Current status and future opportunities. *Progress in Polymer Science* 38(10-11): 1653-1689.

Regulativa Evropske komisije (EU) 2017/752: Commission Regulation (EC) 2017/752 of 28 April 2017 amending and correcting Regulation (EU) No 10/2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. *Official Journal of the European Union* L 113/18.

Regulativa Evropske komisije (EU) 450/2009: Commission Regulation (EC) No 450/2009 of 29 May 2009 on active and intelligent materials and articles intended to come into contact with food. Official Journal of the European Union L 135/3.

Regulativa Evropske komisije (EU) br. 10/2011: Commission Regulation (EC) No 10/2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. Official Journal of the European Union L 12/1.

Research and Markets (2020): Active packaging market - Forecasts from 2020 to 2025. [https://www.researchandmarkets.com/reports/4986709/active-packaging-market-forecasts-from-2020-to?utm\\_source=dynamic&utm\\_medium=GNOM&utm\\_code=6w5jwl&utm\\_campaign=1393271+-+Insights+into+the+Worldwide+Active+Packaging+Industry+to+2025+-+Key+Drivers+and+Restraints+&utm\\_exec=jamu273gnomd](https://www.researchandmarkets.com/reports/4986709/active-packaging-market-forecasts-from-2020-to?utm_source=dynamic&utm_medium=GNOM&utm_code=6w5jwl&utm_campaign=1393271+-+Insights+into+the+Worldwide+Active+Packaging+Industry+to+2025+-+Key+Drivers+and+Restraints+&utm_exec=jamu273gnomd) (poslednji pristup: 02.08.2020.).

Restuccia, D., Spizzirri, U.G., Parisi, O.I., Cirillo, G., Curcio, M., Iemma, F., Puoci, F., Vinci, G., Picci, N. (2010): New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food industry applications. *Food Control* 21(11): 1425-1435.

Rhim, J.W., Ng, P.K. (2007): Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47(4): 411-433.

Rhim, J.W., Park, H.M., Ha, C.S. (2013): Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Progress in Polymer Science* 38(10-11): 1629-1652.

Roby, M.H.H., Sarhan, M.A., Selim, K.A.H., Khalel, K.I. (2013): Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products* 43: 827-831.

Rodriguez, A., Nerin, C., Batlle, R. (2008): New cinnamon-based active paper packaging against *Rhizopus stolonifer* food spoilage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(15): 6364-6369.

Rodriguez-Lafuente, A., Nerin, C., Batlle, R. (2010): Active paraffin-based paper packaging for extending the shelf life of cherry tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(11): 6780-6786.

Rubió, L., Motilva, M.J., Romero, M.P. (2013): Recent advances in biologically active compounds in herbs and spices: a review of the most effective antioxidant and anti-inflammatory active principles. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 53(9): 943-953.

Rujnić-Sokele, M., Pilipović, A. (2017): Challenges and opportunities of biodegradable plastics: A mini review. *Waste Management & Research* 35(2): 132-140.

Salmieri, S., Lacroix, M. (2006): Physicochemical properties of alginate/polycaprolactone-based films containing essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(26): 10205-10214.

Sanchez-Garcia, M.D., Gimenez, E., Lagaron, J.M. (2007): Novel PET nanocomposites of interest in food packaging applications and comparative barrier performance with biopolyester nanocomposites. *Journal of Plastic Film & Sheeting* 23(2): 133-148.

- Sanchez-Garcia, M.D., Gimenez, E., Lagaron, J.M. (2008): Morphology and barrier properties of solvent cast composites of thermoplastic biopolymers and purified cellulose fibers. *Carbohydrate Polymers* 71(2): 235-244.
- Sarker, S.D., Nahar, L., Kumarasamy, Y. (2007): Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* 42(4): 321-324.
- Schlegel, H.G., Kaltwasser, H., Gottschalk, G. (1961): Ein submersverfahren zur kultur wasserstoffoxydierender bakterien: wachstumsphysiologische untersuchungen. *Archiv für Mikrobiologie* 38(3): 209-222.
- Schulz, H., Baranska, M. (2007): Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* 43(1): 13-25.
- Scopus. [www.scopus.com](http://www.scopus.com) (poslednji pristup: 28.07.2020.).
- Shan, B., Cai, Y.Z., Brooks, J.D., Corke, H. (2007): The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology* 117(1): 112-119.
- Shan, B., Cai, Y.Z., Sun, M., Corke, H. (2005): Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(20): 7749-7759.
- Sharma, R., Jafari, S.M., Sharma, S. (2020): Antimicrobial bio-nanocomposites and their potential applications in food packaging. *Food Control* 112: 107086.
- Shukla, R., Cheryan, M. (2001): Zein: the industrial protein from corn. *Industrial Crops and Products* 13(3): 171-192.
- Silva, E.M., Rogez, H., Larondelle, Y. (2007): Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology* 55(3): 381-387.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M. (1999): Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299: 152-178.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965): Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158.
- Sinha, V.R., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R., Trehan, A. (2004): Poly- $\epsilon$ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *International Journal of Pharmaceutics* 278(1): 1-23.
- Siracusa, V., Rocculi, P., Romani, S., Dalla Rosa, M. (2008): Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Science & Technology* 19(12): 634-643.
- Solaberrieta, I., Jiménez, A., Cacciotti, I., Garrigós, M.C. (2020): Encapsulation of bioactive compounds from *Aloe Vera* agrowastes in electrospun poly (ethylene oxide) nanofibers. *Polymers* 12(6): 1323.

- Song, N.B., Lee, J.H., Al Mijan, M., Song, K.B. (2014): Development of a chicken feather protein film containing clove oil and its application in smoked salmon packaging. *LWT - Food Science and Technology* 57(2): 453-460.
- Souza, V.G.L., Fernando, A.L. (2016): Nanoparticles in food packaging: Biodegradability and potential migration to food - A review. *Food Packaging and Shelf Life* 8: 63-70.
- Spasic, J., Mandic, M., Djokic, L., Nikodinovic-Runic, J. (2018): *Streptomyces* spp. in the biocatalysis toolbox. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102(8): 3513-3536.
- Stagos, D., Portesis, N., Spanou, C., Mossialos, D., Aligiannis, N., Chaita, E., Panagoulis, C., Reri, E., Skaltsounis, L., Tsatsakis, A.M., Kouretas, D. (2012): Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic *Lamiaceae* species. *Food and Chemical Toxicology* 50(11): 4115-4124.
- Sung, S.Y., Sin, L.T., Tee, T.T., Bee, S.T., Rahmat, A.R., Rahman, W.A.W.A., Tan, A.C., Vikhraman, M. (2013): Antimicrobial agents for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology* 33(2): 110-123.
- Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K., Bigger, S.W. (2003): Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *Journal of Food Science* 68(2): 408-420.
- Talón, E., Trifkovic, K.T., Nedovic, V.A., Bugarski, B.M., Vargas, M., Chiralt, A., González-Martínez, C. (2017a): Antioxidant edible films based on chitosan and starch containing polyphenols from thyme extracts. *Carbohydrate Polymers* 157: 1153-1161.
- Talón, E., Trifkovic, K.T., Vargas, M., Chiralt, A., González-Martínez, C. (2017b): Release of polyphenols from starch-chitosan based films containing thyme extract. *Carbohydrate Polymers* 175: 122-130.
- Tampau, A., González-Martínez, C., Chiralt, A. (2018): Release kinetics and antimicrobial properties of carvacrol encapsulated in electrospun poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanofibres. Application in starch multilayer films. *Food Hydrocolloids* 79: 158-169.
- Tang, X.Z., Kumar, P., Alavi, S., Sandeep, K.P. (2012): Recent advances in biopolymers and biopolymer-based nanocomposites for food packaging materials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 52: 426-442.
- Tang, Y., Zhou, Y., Lan, X., Huang, D., Luo, T., Ji, J., Mafang, Z., Miao, X., Wang, H., Wang, W. (2019): Electrospun gelatin nanofibers encapsulated with peppermint and chamomile essential oils as potential edible packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67(8): 2227-2234.
- Tatlisu, N.B., Yilmaz, M.T., Arici, M. (2019): Fabrication and characterization of thymol-loaded nanofiber mats as a novel antimould surface material for coating cheese surface. *Food Packaging and Shelf Life* 21: 100347.
- Tian, F., Decker, E.A., Goddard, J.M. (2013): Controlling lipid oxidation of food by active packaging technologies. *Food & Function* 4(5): 669-680.
- Tijing, L.D., Park, C.H., Choi, W.L., Ruelo, M.T.G., Amarjargal, A., Pant, H.R., Im, I.T., Kim, C.S. (2013): Characterization and mechanical performance comparison of multiwalled carbon

nanotube/polyurethane composites fabricated by electrospinning and solution casting. *Composites Part B: Engineering* 44(1): 613-619.

Torkamani, A.E., Syahariza, Z.A., Norziah, M.H., Wan, A.K.M., Juliano, P. (2018): Encapsulation of polyphenolic antioxidants obtained from *Momordica charantia* fruit within zein/gelatin shell core fibers *via* coaxial electrospinning. *Food Bioscience* 21: 60-71.

Torres-Giner, S., Gimenez, E., Lagarón, J.M. (2008): Characterization of the morphology and thermal properties of zein prolamine nanostructures obtained by electrospinning. *Food Hydrocolloids* 22: 601-614.

Torres-Giner, S., Ocio, M.J., Lagaron, J.M. (2009): Novel antimicrobial ultrathin structures of zein/chitosan blends obtained by electrospinning. *Carbohydrate Polymers* 77(2): 261-266.

Trifković, K. (2016): Hidrogelovi na bazi hitozana za kontrolisano otpuštanje polifenola. Doktorska disertacija. Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Republika Srbija.

Tsuji, H., Mizuno, A., Ikada, Y. (1998): Blends of aliphatic polyesters. III. Biodegradation of solution-cast blends from poly(L-lactide) and poly( $\epsilon$ -caprolactone). *Journal of Applied Polymer Science* 70(11): 2259-2268.

UNEP (2018): Single-use plastics: A roadmap for sustainability. United Nations Environment Programme, Kenya.

Vahedikia, N., Garavand, F., Tajeddin, B., Cacciotti, I., Jafari, S.M., Omid, T., Zahedi, Z. (2019): Biodegradable zein film composites reinforced with chitosan nanoparticles and cinnamon essential oil: Physical, mechanical, structural and antimicrobial attributes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 177: 25-32.

Valdés García, A., Juárez Serrano, N., Beltrán Sanahuja, A., Garrigós, M.C. (2020): Novel antioxidant packaging films based on poly( $\epsilon$ -Caprolactone) and almond skin extract: Development and effect on the oxidative stability of fried almonds. *Antioxidants* 9(7): 629.

Valdés, A., Fenollar, O., Beltrán, A., Balart, R., Fortunati, E., Kenny, J.M., Garrigós, M.C. (2016): Characterization and enzymatic degradation study of poly ( $\epsilon$ -caprolactone)-based biocomposites from almond agricultural by-products. *Polymer Degradation and Stability* 132: 181-190.

Valdés, A., Mellinas, A.C., Ramos, M., Burgos, N., Jiménez, A., Garrigós, M.D.C. (2015): Use of herbs, spices and their bioactive compounds in active food packaging. *RSC Advances* 5(50): 40324-40335.

Vanderroost, M., Ragaert, P., Devlieghere, F., De Meulenaer, B. (2014): Intelligent food packaging: The next generation. *Trends in Food Science & Technology* 39(1): 47-62.

Veličković, D.T., Ranđelović, N.V., Ristić, M.S., Veličković, A.S., Šmelcerović, A.A. (2003): Chemical constituents and antimicrobial activity of the ethanol extracts obtained from the flower, leaf and stem of *Salvia officinalis* L. *Journal of the Serbian Chemical Society* 68(1): 17-24.

Vilela, C., Kurek, M., Hayouka, Z., Röcker, B., Yildirim, S., Antunes, M.D.C., Nilsen-Nygaard, J., Pettersen, M.K., Freire, C.S. (2018): A concise guide to active agents for active food packaging. *Trends in Food Science & Technology* 80: 212-222.

Vogler, E.A. (1998): Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science* 74(1-3): 69-117.

Wang, L., Mu, R.J., Li, Y., Lin, L., Lin, Z., Pang, J. (2019): Characterization and antibacterial activity evaluation of curcumin loaded konjac glucomannan and zein nanofibril films. *LWT* 113: 108293.

Wang, X., Yue, T., Lee, T.C. (2015): Development of Pleurocidin-poly(vinyl alcohol) electrospun antimicrobial nanofibers to retain antimicrobial activity in food system application. *Food Control* 54: 150-157.

Witkowska, A.M., Hickey, D.K., Alonso-Gomez, M., Wilkinson, M. (2013): Evaluation of antimicrobial activities of commercial herb and spice extracts against selected food-borne bacteria. *Journal of Food Research* 2(4): 37-54.

Woodruff, M.A., Hutmacher, D.W. (2010): The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21<sup>st</sup> century. *Progress in Polymer Science* 35(10): 1217-1256.

Wrona, M., Cran, M.J., Nerín, C., Bigger, S.W. (2017b): Development and characterisation of HPMC films containing PLA nanoparticles loaded with green tea extract for food packaging applications. *Carbohydrate Polymers* 156: 108-117.

Wrona, M., Nerín, C., Alfonso, M.J., Caballero, M.Á. (2017a): Antioxidant packaging with encapsulated green tea for fresh minced meat. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 41: 307-313.

Wu, J., Chen, S., Ge, S., Miao, J., Li, J., Zhang, Q. (2013): Preparation, properties and antioxidant activity of an active film from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids* 32(1): 42-51.

Xia, C., Wang, W., Wang, L., Liu, H., Xiao, J. (2019): Multilayer zein/gelatin films with tunable water barrier property and prolonged antioxidant activity. *Food Packaging and Shelf Life* 19: 76-85.

Xiong, H., Tang, S., Tang, H., Zou, P. (2008): The structure and properties of a starch-based biodegradable film. *Carbohydrate Polymers* 71(2): 263-268.

Yan, Z., Li, Q., Zhang, P. (2017): Soy protein isolate and glycerol hydrogen bonding using two-dimensional correlation (2D-COS) attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR FT-IR) spectroscopy. *Applied Spectroscopy* 71(11): 2437-2445.

Yang, H.S., Yoon, J.S., Kim, M.N. (2005): Dependence of biodegradability of plastics in compost on the shape of specimens. *Polymer Degradation and Stability* 87(1): 131-135.

Yao, Z.C., Chen, S.C., Ahmad, Z., Huang, J., Chang, M.W., Li, J.S. (2017): Essential oil bioactive fibrous membranes prepared via coaxial electrospinning. *Journal of Food Science* 82(6): 1412-1422.

Yemenicioğlu, A. (2016): Zein and its composites and blends with natural active compounds: Development of antimicrobial films for food packaging. In: Barros-Velázquez, J. (Ed.), Antimicrobial food packaging. Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA, pp. 503-513.

Yen, G.C., Chen, H.Y. (1995): Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43(1): 27-32.

Yildirim, S., Röcker, B., Pettersen, M.K., Nilsen-Nygaard, J., Ayhan, Z., Rutkaite, R., Radusin, T., Suminska, P., Marcos, B., Coma, V. (2018): Active packaging applications for food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 17(1): 165-199.

Zhang, C., Li, Y., Wang, P., Zhang, H. (2020): Electrospinning of nanofibers: Potentials and perspectives for active food packaging. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 19(2): 479-502.

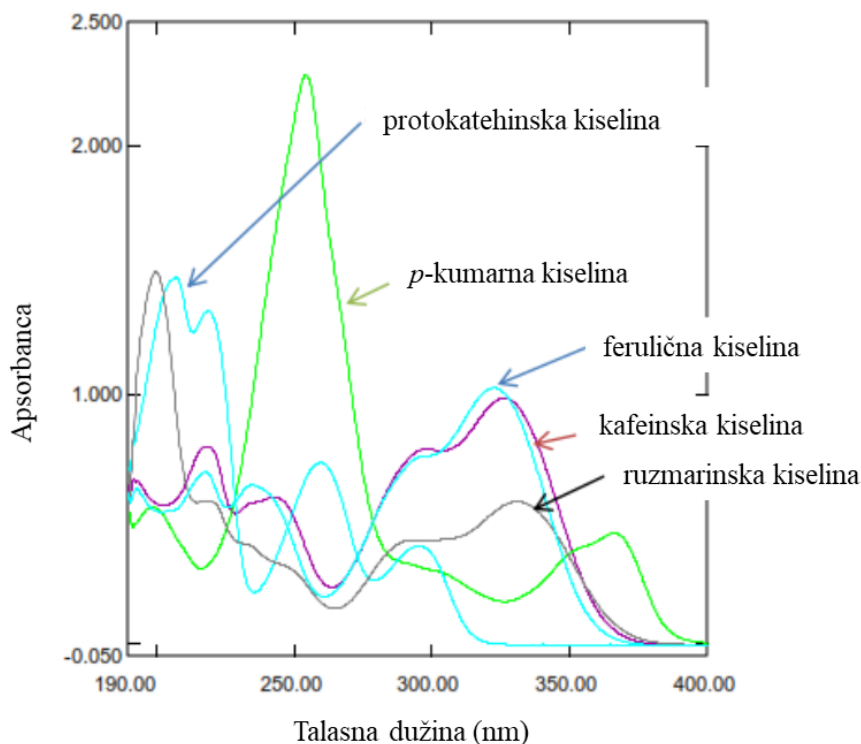
Zhang, W., Ronca, S., Mele, E. (2017): Electrospun nanofibres containing antimicrobial plant extracts. *Nanomaterials* 7(2): 42.

Zhang, X., Ma, L., Yu, Y., Zhou, H., Guo, T., Dai, H., Zhang, Y. (2019): Physico-mechanical and antioxidant properties of gelatin film from rabbit skin incorporated with rosemary acid. *Food Packaging and Shelf Life* 19: 121-130.

Zheng, W., Wang, S.Y. (2001): Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(11): 5165-5170.

## 7. PRILOZI

### PRILOG 1. Analiza fenolnih kiselina tečnom hromatografijom visokih performansi

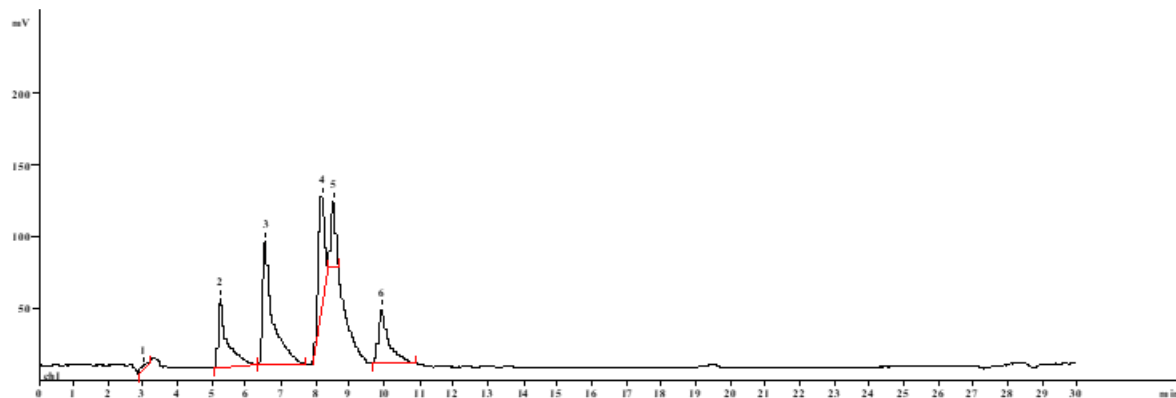


Slika P1.1. UV-Vis spektri ispitivanih fenolnih kiselina

Tabela P1.1. Parametri kalibracionih kriva za ispitivane fenolne kiseline

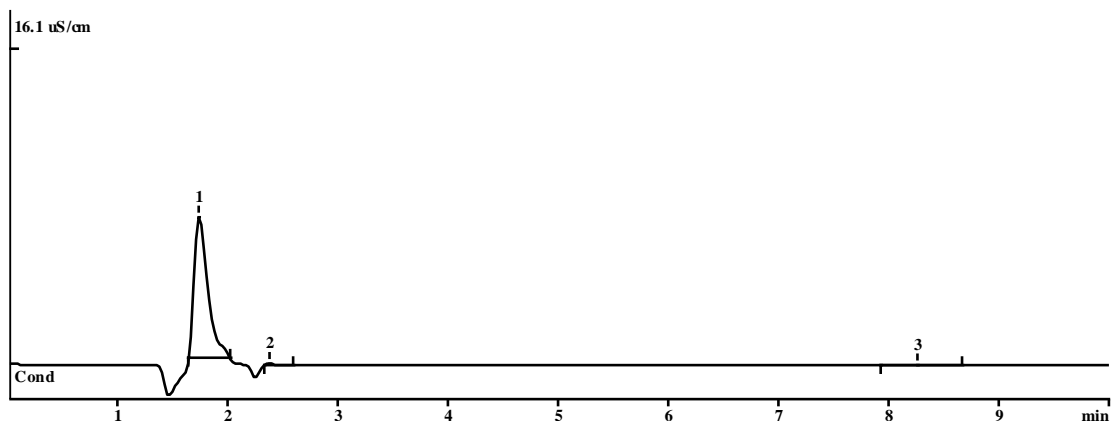
Kiselina	Retenciono vreme (min)	Kalibracioni koeficijent k	Relativna standardna devijacija	R <sup>2</sup>
protokatehinska	5,24	0,370252	7,94	0,9682
kafeinska	6,52	0,178692	5,48	0,9950
p-kumarna	8,15	0,349791	5,43	0,9950
ferulična	8,51	0,730161	0,86	0,9999
ruzmarinska	9,94	0,37477	10,10	0,9682



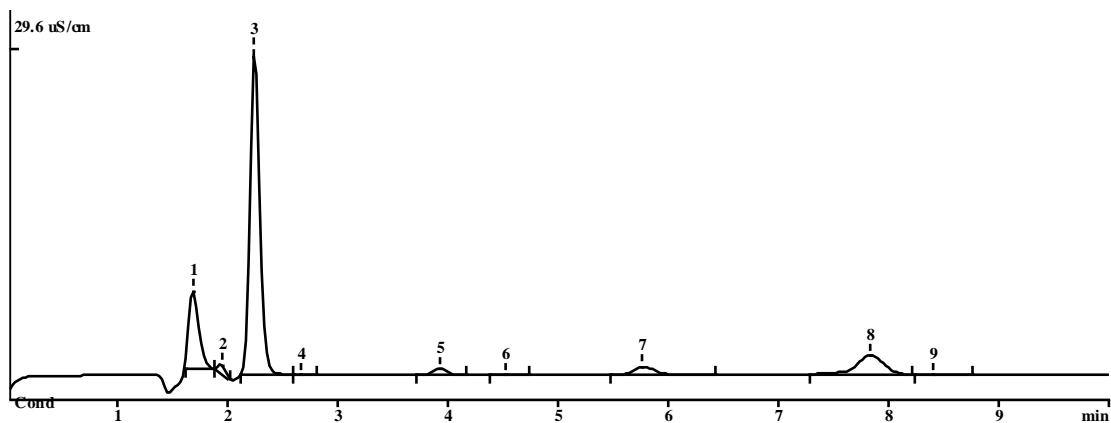


**Slika P1.2.** Hromatogram standardnog rastvora fenolnih kiselina koncentracije 15 mg/l. Identifikacija pikova: (1) - neidentifikovan pik, (2) - protokatehinska, (3) - kafeinska, (4) - *p*-kumarna, (5) - ferulična, (6) - ruzmarinska kiselina

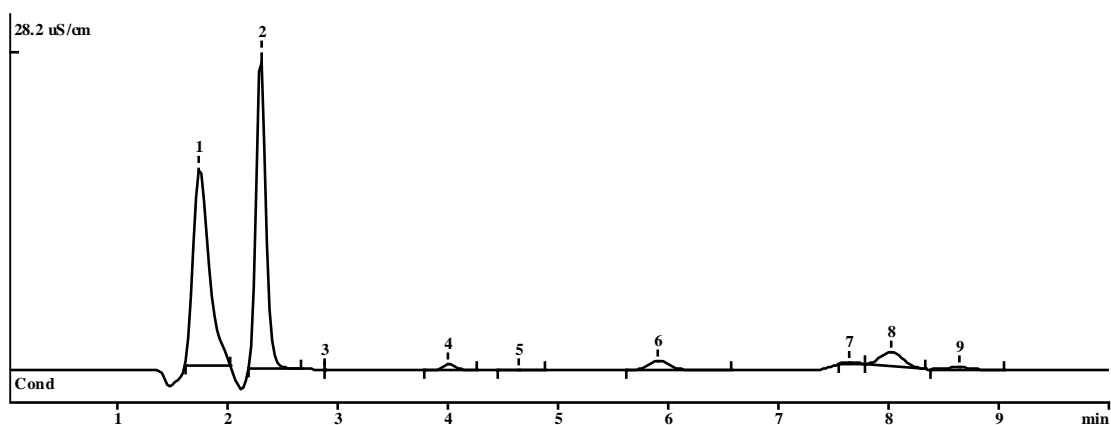
**PRILOG 2: Analiza acetat-jona u suspenziji nakon inkubacije sa vlaknima i filmovima na bazi zeina i želatina**



**Slika P2.1.** Hromatogram kalibracionog rastvora acetat-jona koncentracije 50 mg/l



**Slika P2.2.** Hromatogram suspenzije nakon inkubacije sa uzorkom vlakana (formulacija: ZG-5Ev, 40x razblaženje). Oznake pikova: (1) - acetat-jon, (2-9) - neidentifikovani pikovi



**Slika P2.3.** Hromatogram suspenzije nakon inkubacije sa uzorkom filma (formulacija: ZG-10Ef, 100x razblaženje). Oznake pikova: (1) - acetat-jon, (2-9) - neidentifikovani pikovi

## PRILOG 3: Optimizacija procesa ekstrakcije

Tabela P3.1. Uticaj uslova ekstrakcije na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja

Odnos biljni materijal:rastvarač (w/v)	Rastvarač	Vreme (min)	Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (mg/g)
1:20	destilovana voda	5	9,41 ± 0,00
1:20	destilovana voda	15	15,12 ± 0,34
1:20	destilovana voda	30	15,44 ± 0,14
1:20	destilovana voda	60	15,54 ± 0,03
1:20	destilovana voda	90	17,08 ± 0,06
1:20	destilovana voda	120	16,23 ± 0,14
1:20	destilovana voda	150	14,95 ± 0,72
1:20	destilovana voda	180	14,30 ± 0,21
1:20	30% etanol	5	17,28 ± 0,09
1:20	30% etanol	15	25,02 ± 0,03
1:20	30% etanol	30	28,03 ± 0,34
1:20	30% etanol	60	30,29 ± 0,58
1:20	30% etanol	90	30,51 ± 0,40
1:20	30% etanol	120	28,67 ± 0,31
1:20	30% etanol	150	28,78 ± 0,64
1:20	30% etanol	180	26,98 ± 0,15
1:20	50% etanol	5	17,80 ± 0,15
1:20	50% etanol	15	26,19 ± 0,74
1:20	50% etanol	30	27,39 ± 0,92
1:20	50% etanol	60	28,97 ± 0,68
1:20	50% etanol	90	34,35 ± 0,71
1:20	50% etanol	120	33,18 ± 0,37
1:20	50% etanol	150	32,80 ± 0,06
1:20	50% etanol	180	31,34 ± 0,09
1:20	70% etanol	5	20,92 ± 0,06
1:20	70% etanol	15	24,80 ± 0,15
1:20	70% etanol	30	26,38 ± 0,46
1:20	70% etanol	60	28,89 ± 0,49
1:20	70% etanol	90	31,41 ± 0,46
1:20	70% etanol	120	31,41 ± 0,71
1:20	70% etanol	150	30,85 ± 0,37
1:20	70% etanol	180	29,65 ± 0,25
1:20	96% etanol	5	10,42 ± 0,18
1:20	96% etanol	15	12,29 ± 0,05
1:20	96% etanol	30	12,59 ± 0,23

*Sinteza i karakterizacija aktivnih vlakana i filmova na bazi poli( $\epsilon$ -kaprolaktona) i zeina*

Odnos biljni materijal:rastvarač (w/v)	Rastvarač	Vreme (min)	Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (mg/g)
1:20	96% etanol	60	13,88 ± 0,15
1:20	96% etanol	90	14,75 ± 0,28
1:20	96% etanol	120	14,65 ± 0,29
1:20	96% etanol	150	14,56 ± 0,15
1:20	96% etanol	180	14,47 ± 0,05
1:30	destilovana voda	5	8,99 ± 0,02
1:30	destilovana voda	15	13,61 ± 0,21
1:30	destilovana voda	30	16,03 ± 0,30
1:30	destilovana voda	60	17,29 ± 0,09
1:30	destilovana voda	90	18,14 ± 0,28
1:30	destilovana voda	120	16,62 ± 0,37
1:30	destilovana voda	150	15,61 ± 0,46
1:30	destilovana voda	180	14,23 ± 0,11
1:30	30% etanol	5	16,75 ± 0,41
1:30	30% etanol	15	27,27 ± 1,29
1:30	30% etanol	30	30,37 ± 0,60
1:30	30% etanol	60	31,27 ± 0,14
1:30	30% etanol	90	34,81 ± 0,18
1:30	30% etanol	120	28,96 ± 0,09
1:30	30% etanol	150	28,68 ± 1,24
1:30	30% etanol	180	28,96 ± 0,28
1:30	50% etanol	5	19,17 ± 0,18
1:30	50% etanol	15	27,10 ± 0,69
1:30	50% etanol	30	29,64 ± 0,92
1:30	50% etanol	60	29,13 ± 1,52
1:30	50% etanol	90	32,39 ± 0,69
1:30	50% etanol	120	31,89 ± 0,00
1:30	50% etanol	150	30,59 ± 0,51
1:30	50% etanol	180	29,92 ± 0,78
1:30	70% etanol	5	19,22 ± 0,78
1:30	70% etanol	15	24,01 ± 0,09
1:30	70% etanol	30	29,35 ± 0,14
1:30	70% etanol	60	30,82 ± 0,23
1:30	70% etanol	90	33,41 ± 0,87
1:30	70% etanol	120	31,94 ± 0,23
1:30	70% etanol	150	31,55 ± 0,74
1:30	70% etanol	180	28,29 ± 0,74
1:30	96% etanol	5	8,09 ± 0,21
1:30	96% etanol	15	11,13 ± 0,30

Odnos biljni materijal:rastvarač (w/v)	Rastvarač	Vreme (min)	Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (mg/g)
1:30	96% etanol	30	13,10 ± 0,25
1:30	96% etanol	60	11,84 ± 0,05
1:30	96% etanol	90	15,58 ± 0,11
1:30	96% etanol	120	14,59 ± 0,05
1:30	96% etanol	150	13,92 ± 0,46
1:30	96% etanol	180	13,78 ± 0,34
1:40	destilovana voda	5	9,50 ± 0,55
1:40	destilovana voda	15	12,39 ± 0,09
1:40	destilovana voda	30	15,70 ± 0,28
1:40	destilovana voda	60	19,23 ± 0,03
1:40	destilovana voda	90	19,98 ± 0,52
1:40	destilovana voda	120	16,64 ± 0,06
1:40	destilovana voda	150	15,66 ± 0,25
1:40	destilovana voda	180	12,54 ± 0,03
1:40	30% etanol	5	18,17 ± 0,18
1:40	30% etanol	15	19,14 ± 0,49
1:40	30% etanol	30	33,05 ± 0,55
1:40	30% etanol	60	33,73 ± 1,11
1:40	30% etanol	90	35,16 ± 0,06
1:40	30% etanol	120	30,65 ± 0,06
1:40	30% etanol	150	31,47 ± 0,86
1:40	30% etanol	180	30,57 ± 1,35
1:40	50% etanol	5	21,17 ± 1,29
1:40	50% etanol	15	27,56 ± 0,61
1:40	50% etanol	30	31,85 ± 1,29
1:40	50% etanol	60	31,62 ± 1,47
1:40	50% etanol	90	34,93 ± 1,96
1:40	50% etanol	120	32,60 ± 0,06
1:40	50% etanol	150	32,15 ± 0,06
1:40	50% etanol	180	31,47 ± 0,49
1:40	70% etanol	5	21,17 ± 0,31
1:40	70% etanol	15	26,81 ± 0,37
1:40	70% etanol	30	27,86 ± 0,49
1:40	70% etanol	60	29,52 ± 0,12
1:40	70% etanol	90	34,78 ± 0,12
1:40	70% etanol	120	32,53 ± 0,12
1:40	70% etanol	150	30,87 ± 0,49
1:40	70% etanol	180	31,25 ± 1,66
1:40	96% etanol	5	10,14 ± 0,21

*Sinteza i karakterizacija aktivnih vlakana i filmova na bazi poli( $\epsilon$ -kaprolaktona) i zeina*

<b>Odnos biljni materijal:rastvarač (w/v)</b>	<b>Rastvarač</b>	<b>Vreme (min)</b>	<b>Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (mg/g)</b>
1:40	96% etanol	15	11,45 ± 0,43
1:40	96% etanol	30	13,56 ± 0,31
1:40	96% etanol	60	14,08 ± 0,37
1:40	96% etanol	90	15,62 ± 0,34
1:40	96% etanol	120	15,51 ± 0,55
1:40	96% etanol	150	15,29 ± 0,06
1:40	96% etanol	180	14,76 ± 0,80

## BIOGRAFIJA AUTORA

Ana S. Salević rođena je 24.07.1990. godine u Čačku, Republika Srbija. Osnovno i srednje obrazovanje (Gimnazija, opšti smer) stekla je u Arilju. Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu, studijski program Prehrambena tehnologija, modul Tehnologija konzervisanja i vrenja, upisala je 2009. godine. Osnovne akademske studije završila je 2013. godine sa prosečnom ocenom 9,73 odbranivši završni rad pod nazivom „Očuvanje bioaktivnih komponenti iz semenjače crne soje primenom inkapsulacije“ sa ocenom 10. Master akademske studije na istom fakultetu, studijski program Prehrambena tehnologija, upisala je 2013., a završila 2014. godine sa prosečnom ocenom 10,00 odbranivši master rad pod nazivom „Potencijal primene mikroinkapsuliranih bioaktivnih komponenti ekstrakata *Reishi* gljiva (*Ganoderma lucidum*) i zelenog čaja (*Camellia sinensis* L.) za poboljšanje funkcionalnih svojstava piva“ sa ocenom 10.

Bila je stipendista Ministarstva prosvete i Fonda za mlade talente (Dositeja) Ministarstva omladine i sporta Republike Srbije. Za postignute rezultate tokom osnovnih akademskih studija nagrađena je od strane opštine Arilje, Privredne komore Užica i matičnog fakulteta.

Doktorske akademske studije na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Prehrambena tehnologija, upisala je 2014. godine. Položila je sve ispite predviđene planom i programom studija sa prosečnom ocenom 10,00.

Od 2015. godine bila je angažovana kao stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije na projektu „Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenata hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti“ (evidencioni broj projekta III46010) na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Na istom fakultetu bila je angažovana u zvanju istraživač-pripravnik od 2018. godine, a od 2019. angažovana je kao istraživač-saradnik. Učesnik je Eureka projekta PROBIBARS. Bila je učesnik inovacionog projekta „Kapsule zdravlja u ledenom čaju“.

Bila je član tima koji je predstavljao Srbiju na evropskom takmičenju studentskih timova u kreiranju ekoinovativnih prehrambenih proizvoda (2015. godina). Obavila je dva studijska boravka u evropskim istraživačkim institucijama: *Agricultural University of Athens* (u okviru Erasmus+ projekta *Higher Education – KA107 International Mobility*) i *Institute of Agrochemistry and Food Technology (IATA) – Spanish National Research Council (CSIC)* (u okviru COST akcije FP1405). Dobitnica je granta zajedničkog istraživačkog centra Evropske komisije (*Joint Research Centre EC – JRC*) za trening program u oblasti Nanobiotehnologije.

U saradnji sa drugim autorima publikovala je 3 rada u međunarodnim časopisima (kategorije M21, M22 i M23), 1 u nacionalnom časopisu međunarodnog značaja (kategorija M24), 1 u nacionalnom časopisu (kategorija M51), 15 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima (kategorije M33 i M34) i 3 saopštenja na nacionalnim naučnim skupovima (kategorija M63).

## **Izjava o autorstvu**

Ime i prezime autora: Ana Salević

Broj indeksa: TH 14/36

### **Izjavljujem**

da je doktorska disertacija pod naslovom:

Sinteza i karakterizacija aktivnih vlakana i filmova na bazi poli( $\epsilon$ -kaprolaktona) i zeina

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis autora**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Ana Salević

Broj indeksa: TH 14/36

Studijski program: Prehrambena tehnologija

Naslov rada: Sinteza i karakterizacija aktivnih vlakana i filmova na bazi poli( $\epsilon$ -kapolaktona) i zeina

Mentor: Prof. dr Viktor Nedović

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala radi pohranjenja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis autora**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Sinteza i karakterizacija aktivnih vlakana i filmova na bazi poli(ε-kaprolaktona) i zeina

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.  
Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave.)

**Potpis autora**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. **Autorstvo – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. **Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.