

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Jelena N. Jovanović

**Inkapsulacija aktivnih komponenti u pektin i
hitozan za primenu u aktivnom pakovanju i
biopesticidima**

doktorska disertacija

Beograd, 2022.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Jelena N. Jovanović

**Encapsulation of active components in pectin
and chitosan for application in active
packaging and biopesticides**

doctoral dissertation

Belgrade, 2022.

MENTORI:

dr Maja Vukašinović-Sekulić, vanredni profesor
Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Jovana Ćirković, viši naučni saradnik
Institut za multidisciplinarna istraživanja, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Zorica Knežević-Jugović, redovni profesor
Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Marica Rakin, redovni profesor
Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Aleksandar Radojković, viši naučni saradnik
Institut za multidisciplinarna istraživanja, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane doktorske disertacije: _____, Beograd

Zahvalnica

Doktorska disertacija „Inkapsulacija aktivnih komponenti u pektin i hitozan za primenu u aktivnom pakovanju i biopesticidima” je rezultat rada u Institutu za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu.

Zahvaljujem se svom mentoru dr Jovani Ćirković, višem naučnom saradniku Instituta za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu, za pomoć prilikom definisanja teme i izrade disertacije, kao i na nesebičnoj podršci, korisnim savetima i diskusijama tokom mog istraživačkog rada. Takođe, zahvalnost dugujem svom mentoru sa Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, dr Maji Vukašinović-Sekulić, vanrednom profesoru, na veoma korisnim savetima i sugestijama, nesebičnoj podršci i pomoći prilikom oblikovanja doktorske disertacije.

Zahvaljujem se dr Zorici Knežević-Jugović, redovnom profesoru Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na korisnim sugestijama, svesrdnoj podršci i pomoći prilikom oblikovanja doktorske disertacije. Takođe, želela bih da se zahvalim dr Marici Rakin, redovnom profesoru Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na korisnim sugestijama prilikom oblikovanja doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem kolegama sa Instituta za multidisciplinarna istraživanja, pre svega dr Aleksandru Radojkoviću, višem naučnom saradniku, na pomoći u pisanju naučnih radova, kao i oblikovanju i pisanju doktorske disertacije. Dr Nikoli Tasiću, naučnom saradniku, se zahvaljujem na strpljenju i uloženom vremenu prilikom mikroskopskih analiza, kao i na korisnim savetima i sugestijama. Zahvalnost dugujem dr Dragosavu Mutavdžiću, naučnom saradniku, na nesebičnoj pomoći i uloženom vremenu prilikom statističke analize rezultata. Dr Slobodanu Krnjajiću, višem naučnom saradniku, se zahvaljujem na urađenim analizama prilikom ispitivanja insekticidnih svojstava i korisnim stručnim savetima. Takođe, zahvaljujem se Gordani Stanojević na pomoći prilikom FTIR, TGA/DTG i DSC analiza.

Zahvaljujem se dr Gordani Bakić i dr Žarku Miškoviću sa Mašinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na pomoći pri određivanju mehaničkih karakteristika materijala.

Posebnu zahvalnost za smernice i dragocene stručne savete dugujem dr Goranu Brankoviću i dr Zorici Branković, naučnim savetnicima u Institutu za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu, čijom je pomoći i zalaganjima omogućena izrada ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se svojim kolegama i prijateljima na podršci i razumevanju.

Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj porodici na beskrajnoj podršci, ljubavi i razumevanju, kojoj posvećujem ovaj rad.

Beograd, 2022.

Jelena Jovanović

Inkapsulacija aktivnih komponenti u pektin i hitozan za primenu u aktivnom pakovanju i biopesticidima

Sažetak

Predmet istraživanja ove doktorske teze je priprema biopolimernih emulzija i disperzija, kao i dobijanje tankih filmova i prevlaka od njih, koje se mogu koristiti u aktivnom pakovanju za zaštitu namirnica i kao biopesticid. Glavni koncept naučno-istraživačkog rada zasniva se na ugradnji aktivnih komponenti (etarsko ulje limunove trave, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$, nanočestice ZnO) u polimernu matricu pektina i hitozana, sa ciljem da se postigne njihovo sporo otpuštanje i produžena antimikrobna/ insekticidna aktivnost. Emulzije i filmovi su ispitani različitim metodama u cilju strukturne (Particle Analyzer, ATR-FTIR, TGA/DTG i DSC) i morfološke (AFM, SEM) karakterizacije. Takođe, određena su mehanička svojstva i rastvorljivost filmova. Antibakterijsko dejstvo emulzija i disperzija testirano je u *in vitro* uslovima na vrstama bakterija koje su česti uzročnici kontaminacije i trovanja namirnicama (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus*). Filmovi na bazi hitozana pokazali su bolja mehanička svojstva i niži stepen rastvorljivosti u poređenju sa filmovima na bazi pektina. Emulzije i disperzije na bazi hitozana su pokazale jači antibakterijski efekat u *in vitro* uslovima, dok je kod emulzija na bazi pektina primećeno sinergističko dejstvo između aktivnih komponenti. Efikasnost prevlaka, koje bi se primenjivale u izradi aktivnog pakovanja, testirana je u *in vivo* uslovima na svežim malinama (*Rubus idaeus* L.), pri čemu je ostvaren produžetak svežine i roka trajanja maline sa četiri na osam dana. Dejstvo emulzije na bazi pektina kao biopesticida ispitano je na krompirovom moljcu (*Phthorimaea operculella* L.), kada je efekat sporog otpuštanja doveo do produženog dejstva bioaktivnih jedinjenja inkapsuliranog etarskog ulja u efikasnom suzbijanju krompirovog moljca.

Ključne reči: biopolimeri, pektin, hitozan, aktivne komponente, inkapsulacija, aktivno pakovanje, biopesticidi.

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Biohemijско inženjerstvo i biotehnologija

UDK broj:

Encapsulation of active components in pectin and chitosan for application in active packaging and biopesticides

Abstract

The research subject of this doctoral thesis is the preparation of biopolymer emulsions and dispersions, as well as obtaining thin films and coatings from them, which can be used in active packaging for food protection and as a biopesticide. The main concept of the scientific research is based on the incorporation of active components (lemongrass essential oil, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ZnO nanoparticles) into the polymer matrix of pectin and chitosan, to achieve their slow-release and prolonged antimicrobial/ insecticidal activity. The emulsions and films were investigated by various methods for structural (Particle Analyzer, ATR-FTIR, TGA/DTG, and DSC) and morphological (AFM, SEM) characterization. Also, the mechanical properties and solubility of the films were determined. The antibacterial effect of emulsions and dispersions was tested *in vitro* on the bacteria that are frequent causes of contamination and food poisoning (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Staphylococcus aureus*). The chitosan-based films showed better mechanical properties and a lower degree of solubility compared to the pectin-based films. The chitosan-based emulsions and dispersions showed a stronger antibacterial effect *in vitro*, while a synergistic effect between the active components was observed in the pectin-based emulsions. The effectiveness of the coatings, which would be applied in the production of active packaging, was tested *in vivo* on fresh raspberries (*Rubus idaeus* L.), whereby the freshness and shelf life of raspberries were extended from four to eight days. The effect of the pectin-based emulsion as a biopesticide was tested on the potato tuber moth (*Phthorimaea operculella* L.) when the slow release effect led to the prolonged activity of the bioactive compounds of the encapsulated essential oil in the effective control of the potato tuber moth.

Keywords: biopolymers, pectin, chitosan, active components, encapsulation, active packing, biopesticides.

Scientific field: Technological engineering

Scientific subfield: Biochemical engineering and biotechnology

UDC number:

SADRŽAJ

Uvod.....	1
1. Teorijski deo	4
1.1. Podela i vrste biopolimera	4
1.1.1. Polimeri ekstrahovani direktno iz biomase.....	6
1.2. Inkapsulacija aktivnih komponenti	7
1.2.1. Inkapsulacija ulja	8
1.2.2. Emulzioni sistemi za inkapsulaciju ulja	9
1.2.3. Stabilnost emulzija	11
1.2.4. Primena surfaktanata u procesu stabilizacije emulzije.....	13
1.3. Polimerna matrica na bazi polisaharid-protein za inkapsulaciju aktivnih komponenti	16
1.3.1. Interakcije između polisaharida i proteina	16
1.3.1.1. Kovalentne interakcije između polisaharida i proteina	16
1.3.1.2. Nekovalentne interakcije između polisaharida i proteina	16
1.3.1.3. Nekovalentne interakcije polisaharida i proteina u rastvorima.....	17
1.3.2. Hitozan-želatin kompleks kao polimerna matrica za inkapsulaciju.....	19
1.3.2.1. Hitozan.....	19
1.3.2.2. Želatin.....	22
1.3.2.3. Molekulske interakcije između hitozana i želatina.....	24
1.3.3. Pektin-želatin kompleks kao polimerna matrica za inkapsulaciju	26
1.3.3.1. Pektin.....	26
1.3.3.2. Molekulske interakcije između pektina i želatina	30
1.3.4. Primena plastifikatora u polimernim matricama.....	31
1.4. Aktivne komponente	33
1.4.1. Etarska ulja kao aktivne komponente	33
1.4.1.1. Etarsko ulje limunove trave (<i>Cymbopogon citratus</i> L.)	34
1.4.2. Nanočestice metala kao aktivne komponente.....	38
1.4.2.1. Mehanizam antimikrobnog delovanja nanočestica metal-oksida i jona metala	38
1.4.2.2. Antimikrobno dejstvo nanočestica metala ugrađenih u polimernu matricu	43
1.5. Metode za dobijanje filmova i prevlaka	46
1.6. Primena inkapsulacije u aktivnom pakovanju	48
1.6.1. Aktivno pakovanje.....	48
1.6.2. Antimikrobno aktivno pakovanje	48
1.7. Primena inkapsulacije u biopesticidima.....	50
2. Eksperimentalni deo.....	53
2.1. Priprema biopolimernih emulzija i disperzija.....	53

2.2. Karakterizacija emulzija i aktivnih komponenti.....	55
2.2.1. Određivanje hemijskog sastava etarskog ulja limunove trave.....	55
2.2.2. Određivanje veličine kapljica inkapsuliranog etarskog ulja i zeta potencijala	56
2.3. Dobijanje biopolimernih filmova	56
2.4. Karakterizacija biopolimernih filmova.....	56
2.4.1. Infracrvena spektroskopija sa Furijevom transformacijom (ATR–FTIR).....	56
2.4.2. Termijska analiza	56
2.4.3. Mikroskopija atomskih sila (AFM).....	57
2.4.4. Skanirajuća elektronska mikroskopija (SEM)	57
2.4.5. Određivanje sadržaja vlage i ukupne rastvorne materije filmova.....	57
2.4.6. Mehanička svojstva filmova	58
2.5. Ispitivanje antibakterijskih svojstava biopolimernih emulzija i disperzija u <i>in vitro</i> uslovima.....	58
2.6. Primena prevlaka na bazi hitozana i pektina u aktivnom pakovanju	59
2.6.1. Ispitivanje antimikrobnih svojstava prevlaka na bazi hitozana i pektina u <i>in vivo</i> uslovima	59
2.6.2. Ispitivanje zdravstvene bezbednosti ambalažnog materijala	59
2.7. Primena emulzije na bazi pektina kao biopesticida	59
2.7.1. Određivanje letalnih koncentracija (LC)	60
2.7.2. Određivanje smrtnosti insekata	60
2.7.3. Otpuštanje bioaktivnih jedinjenja	61
2.8. Statistička analiza	61
3. Rezultati i diskusija	62
3.1. Karakterizacija emulzija i aktivnih komponenti.....	62
3.1.1. Hemijski sastav etarskog ulja limunove trave	62
3.1.2. Veličina kapljica inkapsuliranog etarskog ulja i zeta potencijal.....	63
3.2. Karakterizacija filmova na bazi hitozana i pektina	67
3.2.1. Infracrvena spektroskopija sa Furijevom transformacijom (ATR–FTIR).....	69
3.2.2. Termijska analiza	72
3.2.3. Mikroskopija atomskih sila (AFM).....	75
3.2.4. Skanirajuća elektronska mikroskopija (SEM)	83
3.2.5. Sadržaj vlage i ukupne rastvorne materije filmova	85
3.2.6. Mehanička svojstva filmova	86
3.3. Antibakterijska svojstva biopolimernih emulzija i disperzija u <i>in vitro</i> uslovima	88
3.4. Primena prevlaka na bazi hitozana i pektina u aktivnom pakovanju	90
3.4.1. Antimikrobna svojstva prevlaka na bazi hitozana i pektina u <i>in vivo</i> uslovima.....	90
3.4.1.1. Senzorna svojstava malina tokom skladištenja u aktivnom pakovanju.....	93
3.4.2. Zdravstvena bezbednost ambalažnog materijala	94

3.5. Primena emulzije kao biopesticida	96
3.5.1. Primena emulzije na bazi pektina u suzbijanju krompirovog moljca	96
3.5.2. Letalne koncentracije (LC) i smrtnost insekata	97
3.5.3. Otpuštanje bioaktivnih jedinjenja	100
4. Zaključak	102
Literatura	104

Uvod

Poslednjih par decenija u prehrambenoj i poljoprivrednoj industriji došlo je do sve veće upotrebe veštačkih materijala i hemikalija, počevši od plastične ambalaže, preko štetnih aditiva i konzervanasa, do pesticida. Upotreba ovih materijala dovela je do ozbiljnih ekoloških problema, koji se odražavaju na životnu sredinu, zdravlje ljudi i životinja [1]. Plastična ambalaža, koja predstavlja monomere dobijene iz naftnih derivata, čini polovinu ukupnog svetskog plastičnog otpada. Samo 14% plastične ambalaže prikuplja se za reciklažu, dok se samo 5% uspešno reciklira i ponovo koristi za proizvodnju novog plastičnog materijala. Ovaj otpad koji se odlaze na deponijama uzrok je stvaranja metana, gasa staklene bašte, koji za više od 2000% prevazilazi ugljen-dioksid u izazivanju globalnog zagrevanja [2]. Zabrinutost zbog brzog trošenja fosilnih goriva, kao i akumulacija iskorišćenog plastičnog ambalažnog materijala dovela je do težnje za upotrebom prirodnih materijala, gde materijali poput biopolimera i prirodnih biljnih proizvoda dobijaju sve više na značaju [1,3]. S druge strane, nekontrolisana i učestala upotreba pesticida u velikoj meri dovodi do zagađenja zemljišta, vode i vazduha [4,5]. Sintetički pesticidi mogu izazvati ozbiljna zagađenja životne sredine, a mnogi visoko-toksični pesticidi mogu prouzrokovati ozbiljne bolesti kod ljudi i životinja [4,6]. Takođe, još jedan od značajnih problema sa kojim se susreće savremeno društvo jesu velike količine otpada od neiskorišćene hrane, koji takođe, utiče na globalnu emisiju gasova staklene bašte [7].

Aktivno pakovanje je jedan od inovativnih trendova u nauci o materijalima i tehnologiji pakovanja svežih namirnica kojima se mogu prevazići navedeni problemi. Aktivne komponente u ambalažnom materijalu reaguju sa uzročnicima kvarenja hrane, pružajući na taj način bolji kvalitet, zaštitu, kao i produženi rok trajanja namirnica, u poređenju sa tradicionalnim ambalažnim materijalima [8,9]. Upotreba aktivne ambalaže, takođe, može smanjiti količinu neiskorišćene hrane [7]. S druge strane, rastuća potražnja potrošača za hranom bez hemijskih konzervanasa usmerila je mnoga istraživanja u pravcu pronalaženja prirodnih materijala koji se mogu koristiti da bi se produžio rok trajanja prehrambenih proizvoda. Tako, ambalaža na bazi biopolimera dobija sve više na značaju, kao i prirodne supstance koje poseduju antimikrobna i antioksidativna svojstva, poput etarskih ulja i nekih prirodnih biopolimera [10,11]. Jedna od najpoželjnijih osobina koju treba da poseduje savremeni materijal za pakovanje jeste održivost. Održivi razvoj predstavlja sastavni deo multidisciplinarnog koncepta koji objedinjuje ekološke, socijalne i ekonomske karakteristike, kako bi se nastavio i stalno poboljšavao životni sistem ljudi. Biopolimeri dobijeni iz obnovljivih sirovina u potpunosti prate ideju održivosti, uglavnom zato što biopolimeri, kao funkcionalni materijali, nude jedinstvena karakteristična svojstva, uključujući rasprostranjenost u prirodi, biorazgradljivost, manju toksičnost i raznovrsnost u pogledu fizičkih i hemijskih svojstava. Prema tome, ambalaža za prehrambene proizvode izrađena na biološkoj osnovi može predstavljati sveukupni koncept održivog proizvoda [3]. Prirodni biopolimeri mogu biti nosioci različitih aktivnih komponenti (etarska ulja, biljni ekstrakti, nanočestice i mnogi drugi), obezbeđujući njihovo sporo otpuštanje i produženo dejstvo. Pored osnovne funkcije da produži rok trajanja hrani, ambalažni materijal proizveden na bazi prirodnih biopolimera ekološki je prihvatljiv. Posebno, biorazgradivi materijali u obliku tankih filmova ili prevlaka sa inkorporiranim aktivnim komponentama pokazali su se kao efikasno rešenje da bi se hrana zaštitila od kvarenja [10,12-14].

Etarska ulja su odavno prepoznata kao aktivne komponente u ambalažnim materijalima, zahvaljujući njihovoj antimikrobnoj aktivnosti [15]. Upotreba etarskih ulja ograničena je njihovom isparljivošću, niskom rastvorljivosti u vodi i osetljivosti na oksidaciju [16]. Ovaj problem se može prevazići inkapsulacijom etarskih ulja u polimernu matricu koja deluje kao proaktivni film, izolujući unutrašnje jezgro (aktivnu komponentu) [17]. Inkapsulacija etarskih ulja u polimerne disperzije izvodi se primenom tehnika emulgovanja i/ ili homogenizacije, tako da se dobijaju fine emulzije koje sadrže polimer u kontinualnoj vodenoj fazi. Iz ovakvih emulzija se dalje mogu formirati prevlake ili filmovi. U osušenim prevlakama/ filmovima ostaju kapljice etarskog ulja

ugrađene u polimernu matricu [18], što omogućava sporo oslobađanje aktivne komponente i njihovo produženo dejstvo [19]. Izbor polimernog materijala, takođe, ima važnu ulogu u inkapsulaciji, u zavisnosti od predviđene primene [20]. U tu svrhu, biopolimeri poput hitozana, pektina i želatina, našli su primenu zbog svojih hemijskih i fizičkih svojstava, kao i zbog netoksičnosti i bezbednosti za ljudsko zdravlje i životnu sredinu [21-23].

Metali u obliku soli, oksida, koloida, kompleksa ili elementarnih nanočestica, pronašli su primenu u aktivnom pakovanju za hranu, zbog njihovih adekvatnih svojstava (sposobnosti za oksidaciju etilena, uklanjanje kiseonika ili antimikrobnog dejstva) [24-26]. Nanočestice metala se sve češće koriste kao antimikrobna sredstva zbog njihove visoke termičke stabilnosti, dugotrajnosti i širokog spektra antifungalnih i antibakterijskih aktivnosti [27]. Neki nanostrukturni oksidi, poput cink-oksida (ZnO), sve više se koriste da bi se produžio rok trajanja hrane, zbog njihove antimikrobne aktivnosti. ZnO se koristi kao dodatak u prehrambenoj industriji i u stočnoj hrani [28]. Inkorporacija ZnO u razne biopolimerne materijale (hitozan [29], hitozan/ arabik guma [30] i pektin/ alginat [31]) dovela je do poboljšanja antimikrobnih svojstava. Takođe, najnovija istraživanja obuhvatala su kombinacije nekih etarskih ulja i nanočestica ZnO inkorporiranih u polimerne matrice, za potencijalnu primenu u antimikrobnom pakovanju: nanočestice ZnO i etarsko ulje karanfilića ugrađeni u želatin tipa B poboljšali su mehanička svojstva i doveli do dobre antibakterijske aktivnosti [32]; nanočestice ZnO u kombinaciji sa nekim etarskim uljima povećali su antibakterijska svojstva filmova na bazi polilaktida [33]; etarsko ulje ružmarina i nanočestice ZnO u polimernoj matrici natrijum-kazeinata uticali su na poboljšanje mehaničkih i barijernih svojstava filmova i smanjenje propusnosti vodene pare [34]; sinergistički efekat nanočestica ZnO/ Ag, etarskog ulja citronele i hitozana pružio je širok spektar antimikrobne aktivnosti [35]. Sva ova istraživanja svedoče o sve većoj ulozi nanočestica metala u zaštiti hrane.

U poslednje vreme postoji povećano interesovanje za prirodnim pesticidima zbog štetnosti po ljudsko zdravlje i povećanog zagađenja životne sredine izazvanog sintetičkim pesticidima [4-6]. Izraz „prirodni pesticidi” podrazumeva direktnu ili indirektnu upotrebu prirodnih biljnih proizvoda (uključujući etarska ulja) u kontroli različitih štetočina i bolesti [6]. Biopesticidi i „zeleni pesticidi” su izrazi koji se, takođe, koriste za prirodne pesticide i uključuju sve prirodne materijale koji mogu smanjiti populaciju štetočina [36,37]. Biološki efekti etarskog ulja limunove trave (*Cymbopogon citratus* L.) poslednjih godina su u fokusu istraživanja. Etarska ulja različitih vrsta roda *Cymbopogon* (*Poaceae*) sve češće se koriste zbog svojih antimikrobnih svojstava, kao i insekticidnog i repelentnog dejstva na insekte [38]. Ova etarska ulja takođe, pokazala su potencijalnu primenu u različitim metodama suzbijanja štetočina u nekim zemljama, što znači da se u budućnosti očekuje sve intenzivniji razvoj alternativnih prirodnih pesticida, koji bi zamenili one sintetičke, hemijske [39,40].

Cilj ove doktorske disertacije je da se primenom materijala koji su prirodni, biorazgradivi, netoksični, bezbedni po zdravlje ljudi i životinja, mogu prevazići i smanjiti problemi poput plastičnog otpada, otpada od hrane, zatim smanjenje upotrebe sintetičkih pesticida, štetnih aditiva i konzervanasa. Osnovni koncept predstavlja inkapsulaciju aktivnih komponenti u biopolimernu matricu i njihovo sporo otpuštanje sa produženom antimikrobnom i insekticidnom aktivnošću. Inkapsulacija je postignuta tehnikom visokoenergetske homogenizacije, kao i primenom emulgatora. Korišćeni su polimeri poput hitozana, pektina i želatina, koji se svrstavaju u grupu prirodnih polimera ekstrahovanih direktno iz biomase, zbog njihove dostupnosti, biorazgradljivosti, biokompatibilnosti i bezbednosti [14]. Etarsko ulje limunove trave i njegova kombinacija sa Zn(CH₃COO)₂·2H₂O (Zn-Ac) ili nanočesticama ZnO upotrebljeni su kao aktivne komponente ugrađene u matricu biopolimera, pretpostavljajući njihovo sinergističko dejstvo. Ideja upotrebe dve različite vrste aktivnih komponenti, etarsko ulje limunove trave kao isparljivo organsko jedinjenje sa fumigantnim i kontaktnim dejstvom i ZnO/ Zn-Ac kao neorganske čestice/ joni sa kontaktnim dejstvom, predstavlja pokušaj da se poboljša i proširi spektar zaštite od razvoja patogenih vrsta mikroorganizama, kako svežeg voća, tako i ambalaže u kontaktu sa njim. Pored toga, razmatrana je potencijalna primena nanočestica metal-oksida (ZnO) i jona metala (Zn-Ac) u zaštiti hrane. Sve

korišćene komponente nalaze se na spisku bezbednih supstanci (GRAS, eng. “*Generally Recognized As Safe*”) od strane američke Uprave za hranu i lekove (FDA, eng. “*U.S. Food and Drug Administration*”) [41]. Različite formulacije emulzija i disperzija, od kojih su dalje dobijani filmovi (metodom izlivanja) i prevlake (sprej metodom), korišćene su radi međusobnog upoređivanja i određivanja uticaja različitih aktivnih komponenti i biopolimera na fizičko-hemijska i antimikrobna (u *in vitro* i *in vivo* uslovima) svojstva materijala.

1. Teorijski deo

1.1. Podela i vrste biopolimera

Biopolimeri su polimeri izolovani iz živih organizama. To su veliki makromolekuli sastavljeni od velikog broja istih ili različitih monomernih jedinica koje se ponavljaju i kovalentno su povezane, stvarajući velike strukture [42,43]. Sintetički polimeri imaju slične i nasumične strukture, dok su biopolimeri raspoređeni u dobro definisanim strukturama [43].

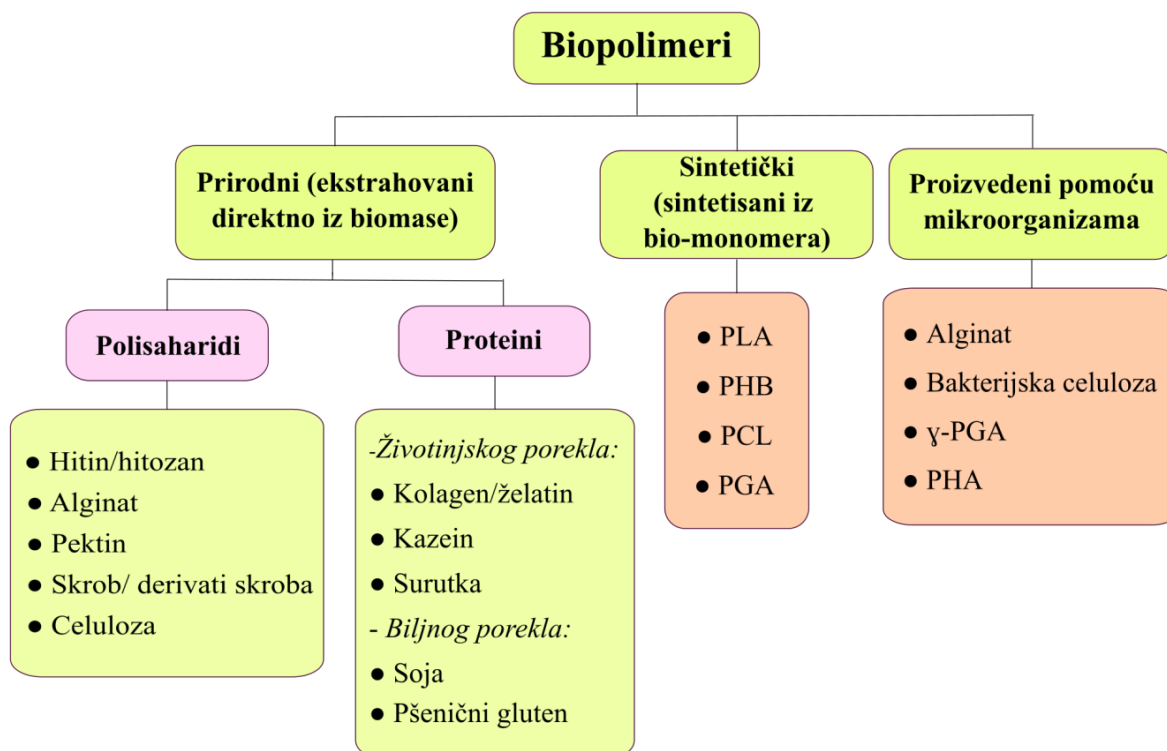
Na osnovu strukture i prema različitim monomernim jedinicama iz kojih su sastavljeni biopolimeri se klasifikuju na:

- (1) Polinukleotide (dugački polimeri sastavljeni od 50 ili više nukleotidnih monomera, na primer DNK i RNK);
- (2) Polipeptide (kratki polimeri aminokiselina);
- (3) Polisaharide (linearno vezani polimeri ugljenohidratne strukture) [3,42].

Zbog relativno slabih C–C veza, kao i prisustva hidroksilnih grupa, biopolimerni lanci se lako razgrađuju u kraće lance pod dejstvom enzima, vlage, toplote i drugih faktora. Mnogi biopolimeri su po svojoj prirodi hidrofilni i lako se razgrađuju nakon upijanja vode [43].

Prema načinu proizvodnje i izvoru iz koga su dobijeni (*Slika 1.1*), biopolimeri se najšire mogu klasifikovati na:

- (1) Prirodne polimere, koji su ekstrahovani/ izolovani direktno iz biomase. U ovu grupu spadaju polisaharidi (škrob/ derivati skroba, hitin/ hitozan, alginat, pektin), proteini životinjskog porekla (kolagen, želatin, kazein, proteini surutke) i biljnog porekla (soja, pšenični gluten) [44-46];
- (2) Polimere proizvedene „klasičnom“ hemijskom sintezom iz obnovljivih bio-monomera. U ovom postupku sami monomeri se dobijaju korišćenjem bioloških materijala poput šećera, aminokiselina, ulja ili prirodnih masti. Primer ovako dobijenog polimera je polilaktid (PLA), poliestar dobijen polimerizacijom monomera mlečne kiseline, koja se formira fermentacijom sirovine bogate ugljenim hidratima. U ovu grupu spadaju i drugi poliestri, kao što su: polihidroksibutirat (PHB), polikaprolakton (PCL), poliglikolna kiselina (PGA) i mnogi drugi [46,47];
- (3) Polimere proizvedene direktno upotrebom mikroorganizama ili genetički modifikovanih bakterija [44,48]. Bakterije mogu efikasno koristiti različite izvore ugljenika i azota i od njih sintetisati različite biopolimere, kao što su polisaharidi, poliamidi, poliesteri, polifosfati, DNK i proteinske komponente. Neki od primera bakterijskih polimera su: alginat (vrste roda *Pseudomonas*), bakterijska celuloza (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Sarcina* spp., *Agrobacterium* spp., *Rhizobium* spp.), poli-gama-glutaminska kiselina (γ -PGA) (*Staphylococcus epidermidis*, *E. coli*, različite vrste roda *Bacillus*), polihidroksialkanoati (PHA) (*Pseudomonas putida*, *Aeromonas hydrophila*) i mnogi drugi [49].



Slika 1.1. Podela biopolimera na osnovu načina proizvodnje i izvora iz koga su dobijeni [44]

Svi biopolimeri su dobijeni iz obnovljivih izvora i većina njih je biorazgradiva, dok se svi biorazgradivi materijali ne smatraju biopolimerima. Prema standardu D-5488-94d ASTM (eng. „*American Society for Testing and Materials*”) biorazgradivi materijal je definisan kao „materijal koji može da se razloži na ugljen-dioksid, metan, vodu, neorganska jedinjenja ili biomasu, gde do razgradnje dolazi delovanjem enzima mikroorganizama“. Kao primer sintetičkih polimera (dobijenih iz neobnovljivih izvora), a koji su biorazgradivi, mogu se navesti: polikaprolakton (PCL), poliglikolid (PGA) i polibutilen-sukcinat adipat (PBSA) [44].

Povećana potražnja za biopolimerima i razvoj alternativnih procesa biološke proizvodnje polimera u industriji materijala podstaknuta je zbog sve većeg nedostatka resursa (fosilnih goriva) iz kojih se dobijaju veštački polimeri, kao i akumulacije iskorišćenog plastičnog materijala. Takođe, poslednjih godina ekološka svest u svetu je porasla, pa su primenjeni novi propisi u zemljama Evropske unije, ograničavajući tako upotrebu tradicionalnih materijala [3,44].

Biopolimeri se smatraju održivim u pogledu snabdevanja materijalom, upotrebe vode i energije, i obrazovanja proizvodnog otpada. Održivost podrazumeva dobru ravnotežu između ekoloških, ekonomskih i socijalnih problema [44]. Zahvaljujući jedinstvenim svojstavima kao što su netoksičnost i biorazgradivost, u poređenju sa sintetičkim polimerima, biopolimeri se sve više primenjuju u elektronici, medicinskim uređajima, energetici, pakovanju hrane, i mnogim drugim oblastima. Biorazgradivi proizvodi su obično skuplji od polimera proizvedenih iz petrohemikalija, ali se ova okolnost postepeno menja, primenom novih tehnologija, kao i načinima prikupljanja i prerade sirovina [44]. Ugradnjom nanostrukturnih materijala u biopolimere ili proizvodnjom kompozita očekuje se da će se na tržištu obezbedi konkurentna prednost nad sintetičkim polimerima. Prema tome, poboljšanjem svojsatva biopolimera može se proširiti mogućnost njihove praktične primene [3,44].

1.1.1. Polimeri ekstrahovani direktno iz biomase

Polisaharidi su složeni molekuli ugljenih hidrata koji se sastoje od dugih lanaca monosaharida povezanih glikozidnim vezama [50]. Predstavljaju najzastupljenije makromolekule u biosferi i često su jedan od glavnih strukturnih komponenti biljaka (na primer celuloza), životinjskih egzoskeleta (na primer hitin) ili imaju važnu ulogu kao rezervne hranjive materije i izvor energije kod biljaka (na primer skrob) [44]. Monosaharidne jedinice od kojih su izgrađeni određuju njihova različita fizička i hemijska svojstva [50]. Polisaharidi sastavljeni od jednog tipa monomera poznati su kao „homopolisaharidi“, a kada su dve ili više vrsta monomera uključene u strukturu, onda se nazivaju „heteropolisaharidi“ [51]. Nakon njihove hidrolize, dugi lanci se razgrađuju na svoje sastavne monosaharide i oligosaharide [50]. Polisaharidi imaju veliki broj reaktivnih funkcionalnih grupa, promenljiv hemijski sastav i različit raspon molekulske mase, koji definišu njihovu raznolikost u svojstvima i strukturi. Različiti derivati polisaharida mogu se dobiti hemijskim modifikovanjem različitih reaktivnih grupa prisutnih na njihovim molekulskim lancima. Nerastvorljivi su u vodi i amorfne su prirode [50].

Zbog svoje velike raznolikosti polisaharidi i njihovi derivati se koriste u proizvodnji biorazgradivih filmova i tankih membrana, sa primenom u nekoliko industrijskih garana, kao što su farmaceutska, prehrambena, medicinska i u specifičnim industrijski procesima (na primer pervaporacija, gde se nepropusne ili propusne membrane koriste za razdvajanje smeša tečnosti). Membrane na bazi polisaharida sve više se koriste kao ambalažni materijal i jestive prevlake u prehrambenoj industriji. Polisaharidne membrane su obično atraktivne zbog svojih dobrih barijernih svojstava za kiseonik i ugljen-dioksid (pri niskoj ili umerenoj relativnoj vlažnosti), kao i dobrih mehaničkih svojstava. Njihov glavni nedostatak jeste hidrofилna priroda koja utiče na loša barijerna svojstva za vodenu paru. Pобољшanje funkcionalnih svojstava polisaharidnih filmova može se postići stvaranjem kompozita, dodatkom lipida ili plastifikatora [44].

Proteini su prirodni polimeri koji se sastoje od dugih lanaca aminokiselina. Nalaze se u živim organizmima kao enzimi ili sastavni deo tkiva, kostiju i mnogih drugih delova organizma [14]. Mogu biti biljnog (sojin protein, pšenični gluten, kukuruzni zein) ili životinskog porekla (kolagen, želatin, kazein, proteini surutke) [44,46].

Proteini imaju četiri nivoa strukture: primarnu, sekundarnu, tercijarnu i kvaternarnu. Primarne strukture proteina predstavljaju linearne oblike polimera sa nizom aminokiselina međusobno povezanih peptidnim vezama. Sekundarne strukture proteina imaju obično vrlo pravilne konformacije i predstavljaju prostorno organizovane primarne strukture.

U sekundarne strukture spadaju „ α -heliks“ i „ β -nabrana struktura“, koje su najčešće stabilizovane vodoničnim vezama. Tercijarna struktura proteina je trodimenzionalna, koju stabilizuje niz hidrofobnih aminokiselinskih ostataka, kao i disulfidne veze formirane između dve aminokiseline (cisteina). Kod tercijarne strukture peptida broj sulfidnih veza utiče na povećanje čvrstine i krutosti strukture proteina. Kvaternarna strukturu imaju proteini izgrađeni od više od dva peptidna lanca, koji čine jednu celu jedinicu. Kod ovih struktura interakcije između lanaca se ne dešavaju unutar samog niza (kao što je slučaj kod tercijarne strukture), već se interakcije dešavaju između dva lanca. Kvaternarna struktura objedinjuje grupisane pojedinačne peptidne lance u krajnji oblik (određenu geometrijsku strukturu), pomoću interaktivnih veza u molekulu (soni mostovi (podrazumevaju kombinaciju vodoničnih veza i elektrostatičkih interakcija kod proteina), vodonične veze, disulfidne veze). Dva najvažnija oblika proteina sa kvaternarnom strukturom su fibrilarni (končasti) i globularni (loptasti) [52].

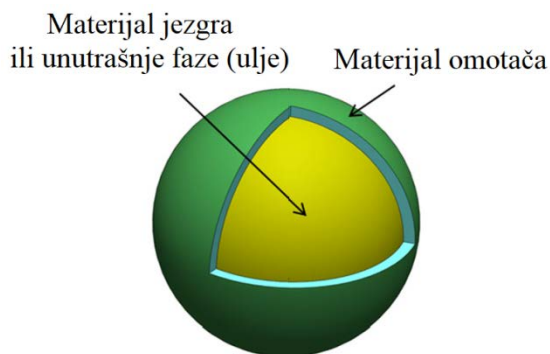
Proteini poseduju brojna funkcionalna svojstva. Imaju visok stepen međumolekulskog vezivanja zahvaljujući Van der Valsovим silama i značajan potencijal umrežavanja zbog stvaranja vodoničnih veza na različitim položajima. Poseduju mnogo bolja barijerna i mehanička svojstva od polisaharida. Njihove složene strukture sadrže brojna mesta za stvaranje veza, što omogućava modifikacije pomoću plastifikatora i drugih polimera, kao i stvaranje kompozita [14,52].

Ove osobine ih čine pogodnim materijalom za formiranje filмова, sa potencijalnom primenom u pakovanju hrane. Filmovi na bazi proteina dobro prijanjaju za hidrofilne površine, pružaju barijeru za kiseonik i ugljen-dioksid. Uprkos navedenim prednostima, problem kod upotrebe filmova na bazi proteina leži u činjenici da ih mogu razgraditi pojedini enzimi prisutni u hrani (na primer proteolitički enzimi iz mesnih proizvoda) [14]. Drugi nedostaci filmova na bazi proteina odnose se na njihova mehanička svojstva koja treba poboljšati (žilavost, zatezna čvrstoća, elastičnost, savijanje, napon smicanja i mnoge druge) [14,52].

Formiranje filmova na bazi proteina obično se zasniva na pripremi rastvora ili disperzija. Rastvarači koji se koriste su voda, etanol ili smeša etanola i vode. Protein treba da bude denaturisan tokom termičkog tretmana, kiselinama, bazama ili rastvaračima za stvaranje struktura pogodnih za formiranje filma. Lanci proteina mogu se povezati vodoničnim, jonskim, hidrofobnim i kovalentnim vezama. Step en izduženja lanaca, priroda i redosled aminokiselinskih ostataka su faktori koji utiču na kohezivnost filmova. Ravnomerna raspodela polarnih, hidrofobnih i/ ili tiol grupa duž polimernog lanca povećava verovatnoću njihovih međusobnih interakcija. Unapređenje polimerne interakcije između lanaca dovodi do stvaranja filmova koji su jači, ali manje fleksibilni i manje propusni za gasove, paru i tečnosti. Polimeri koji sadrže grupe koje se mogu povezati vodoničnim ili jonskim vezama grade filmove sa dobrim barijernim svojstvima za kiseonik, ali ne i za vlagu. Proteini koji se najčešće koriste za izradu filmova su sojini proteini, kazein, proteini surutke, kolagen/ želatin, pšenični gluten i kukuruzni zein [14,52].

1.2. Inkapsulacija aktivnih komponenti

Inkapsulacija se može definisati kao postupak zarobljavanja supstance unutar druge supstance, stvarajući na taj način čestice/ kapljice veličine od nekoliko nanometara do nekoliko milimetra [53]. Takođe, može se opisati kao proces stabilizacije aktivnih jedinjenja kroz strukturno ugrađivanje u sisteme sposobne za očuvanje njihovih hemijskih, fizičkih i bioloških svojstava, kao i njihovo oslobađanje pod utvrđenim ili željenim uslovima [54,55]. U procesu inkapsulacije se jedan ili smeša bioaktivnih materijala oblaže jednim ili kombinacijom materijala, gde se komponenta koja se inkapsulira naziva „jezgro” ili aktivna komponenta, a materijal kojim se oblaže naziva „omotač”, „zid” ili nosač (*Slika 1.2*) [54,56]. Materijal zida određuje stabilnost inkapsuliranog sistema, efikasnost procesa i step en zaštite jezgra [56]. Jezgro i omotač mogu biti različitih oblika, kao što su: sfere, mikrokapsule, mikro kuglice, jednojezgarni i višejezgarni sistemi i matrice. Materijal jezgra i omotača varira u zavisnosti od primene i željenih karakteristika inkapsulacionog sistema [54].



Slika 1.2. Šematski prikaz kapsule sa jezgrom i omotačem [56]

Inkapsulacija ima primenu u biologiji, medicini, farmaciji i prehrambenoj tehnologiji. U biologiji se vrši inkapsulacija živog tkiva, pojedinačnih ćelija, hormona, enzima ili antitela kao i drugih bioloških materijala. U prehrambenoj industriji inkapsulacija se vrši radi dodavanja arome

proizvodima u različitim fazama prerade hrane. U oblasti farmacije inkapsulacijom se omogućava ciljana isporuka prirodnih lekova i smanjuje neželjeni efekat dejstava sintetičkih lekova [54]. Tehnike inkapsulacije mogu se podeliti u dve glavne kategorije, na hemijske i fizičke. U hemijske metode inkapsulacije ubrajaju se koacervacija, molekularno uključivanje i kokristalizacija. Fizička inkapsulacija je poznata i kao mehanička inkapsulacija, i tu spadaju tehnike kao što su: sušenje raspršivanjem, ekstruzija, sušenje zamrzavanjem, sušenje u vakuumu, hlađenje ili hlađenje raspršivanjem i premazivanje u fluidizovanom sloju. Novije tehnike inkapsulacije obuhvataju tehnike emulgovanja [53,54].

1.2.1. Inkapsulacija ulja

Prirodna ulja (biljna, riblja i etarska), kao i njihove aktivne komponente, dobijaju sve značajniju primenu u prehrambenoj, poljoprivrednoj, pesticidnoj, tekstilnoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Ova ulja su široko prihvaćena od strane potrošača zato što su prirodna i bezbedna jedinjenja, kao i zbog brojnih funkcionalnih svojstava koja poseduju [56]. Iako je učinjeno nekoliko pokušaja da se iskoristi pun potencijal ovih ulja, ona su hemijski nestabilna i podložna oksidativnoj razgradnji i gubitku isparljivih jedinjenja, posebno kada su izložena kiseoniku, svetlosti, vlazi i toploti [56,57].

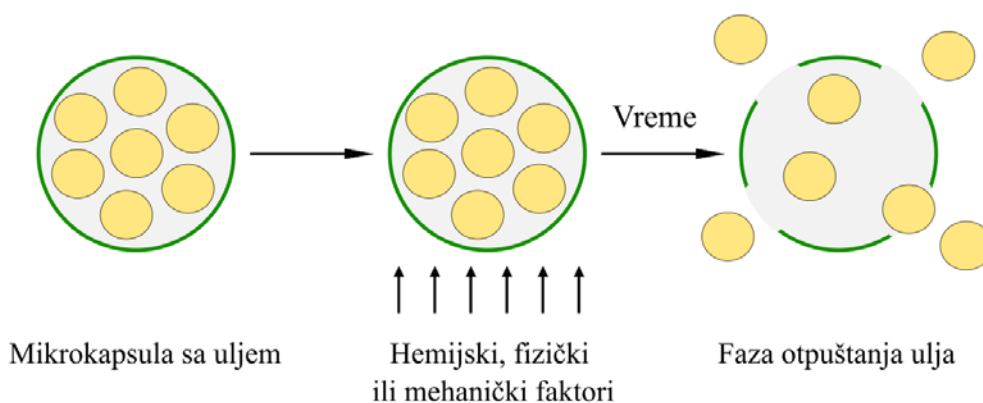
Tehnologija **mikro-inkapsulacije** predstavlja održivu opciju za očuvanje bioloških i funkcionalnih svojstava ulja. Na taj način omogućava se razvoj novih prirodnih proizvoda koji sadrže biljna, riblja ili etarska ulja. Inkapsulacija ulja komercijalno se sprovodi korišćenjem različitih metoda, uključujući emulgovanje, sušenje raspršivanjem, primenu koaksijalnog elektrosprej sistema, sušenje zamrzavanjem, koacervaciju, *in situ* polimerizaciju, tehnologiju superkritičnih fluida i premaza u fluidizovanom sloju. Izbor odgovarajuće tehnike inkapsulacije i materijala za omotač zavisi od krajnje namene proizvoda i uslova obrade [56,57]. Karakteristike koje treba da poseduje materijal omotača su: visok kvalitet za primenu u prehrambenim proizvodima, niska cena, mala viskoznost pri visokom sadržaju čvrste materije, dobra svojstva emulgovanja [57]. Sušenje raspršivanjem i koacervacija su najčešće korišćene tehnike mikro-inkapsulacije ulja. Mikro-inkapsulacija ima sposobnost da poboljša oksidativnu stabilnost, termostabilnost, rok trajanja i biološku aktivnost ulja. Pored toga, može imati veliki značaj u kontrolisanom i postepenom isparavanju i oslobađanju etarskih ulja. Materijali za omotač koji se uobičajeno koriste za mikro-inkapsulaciju ulja uključuju sintetičke polimere i prirodne biomaterijale (obično ugljene hidrate i proteine) [56].

Nano-inkapsulacija kao novija tehnologija se sve više koristi za ugradnju bioaktivnih jedinjenja sa antimikrobnim delovanjem. Primenom ovih metoda etarska ulja se mogu ugrađivati u različite polimerne matrice. Smanjenjem veličine kapljica u nanoopsegu dolazi do povećanja njihove bioraspoloživosti, zbog povećanja odnosa površine ulja prema ukupnoj zapremini. Tehnikama nano-inkapsulacije poboljšavaju se stabilnost i biološka svojstva ulja [58]. Važan korak u pripremi nano-inkapsuliranog proizvoda je izbor materijala za omotač, koji je obično polimer, odabran u zavisnosti od fizičko-hemijskih svojstava aktivne komponente i svrhe primene. Za nano-inkapsulaciju etarskih ulja do sada su korišćene mnoge prirodne i sintetičke polimerne matrice, kao što su: polietilen, ugljeni hidrati (skrob, celuloza i hitozan), proteini (kazein, albumin i želatin), lipidi (masne kiseline, vosak i parafin) i prirodne gume (alginat, karagenan i arapska guma) [56,58].

Pored svih navedenih tehnika inkapsulacije, tehnika emulgovanja je ključni korak u inkapsulaciji ulja. Obično se primenjuje za inkapsulaciju bioaktivne supstance u vodenim rastvorima. Rastvori se mogu koristiti direktno u tečnom stanju ili se mogu osušiti (sušenje raspršivanjem ili zamrzavanjem) da bi se nakon emulgovanja formirali praškovi. Kod inkapsulacije postupkom sušenja, jezgro i omotač materijala se pre konačnog sušenja, takođe, formiraju tehnikom emulgovanja [56]. Sušenje raspršivanjem je tehnika koja se najčešće koristi za postizanje nano-inkapsulacije. Ova tehnika uključuje pripremu emulzije koja sadrži etarsko ulje i materijal za

inkapsulaciju. Emulzija se zatim pretvara u veliki broj malih kapljica, koje padaju u komoru za prskanje istovremeno sa toplim vazduhom koji cirkuliše. Voda trenutno isparava u dodiru sa vrućim vazduhom, tako da kapljice postaju čvrste čestice [58].

Inkapsulacijom se omogućava efekat postepenog oslobađanja i samim tim produženo dejstvo različitih bioaktivnih jedinjenja ulja. Tehnologija kontrolisanog oslobađanja koristi se za prenošenje različitih jedinjenja, poput lekova, pesticida, mirisa ili aroma u preporučenim dozama, zajedno sa poboljšanom efikasnošću i bezbednošću [56]. Kontrolisano oslobađanje je definisano kao način kojim se jedno ili više aktivnih sredstava ili sastojaka prenosi do željenog mesta za određeni vremenski period. Na *Slici 1.3* je šematski prikaz mehanizma kontrolisanog otpuštanja ulja iz inkapsulacionog omotača [56].



Slika 1.3. Šematski prikaz mehanizma kontrolisanog otpuštanja ulja [56]

1.2.2. Emulzioni sistemi za inkapsulaciju ulja

Sistem od najmanje dve faze koje se ne mešaju naziva se disperzija. Disperzni sistem se sastoji od disperzne (dispergovane) faze u kontinualnoj fazi. Postoje tri glavne vrste disperzija zasnovane na fizici disperzne faze: gas u tečnoj smeši, suspenzija (čvrste supstance u tečnoj smeši) i emulzija (tečnost u tečnom sistemu) [59]. Emulzija predstavlja smešu dve ili više tečnih faza koje su po prirodi nemešljive, gde je jedna faza dispergovana u drugoj [59,60]. To je koloidni sistem u kome su fine kapljice jedne tečnosti raspršene u drugoj tečnosti [61] i stabilizovane upotrebom površinski aktivnih materija sa odgovarajućom ravnotežom hidrofili-lipofili koji karakteriše vrednost HLB (eng. "hydrophilic-lipophilic balance") [62]. U osnovi, emulzija se sastoji od kontinualne faze koja je poznata i kao spoljna faza, u kojoj su kapljice druge faze dispergovane, i dispergovane faze koja je definisana kao unutrašnja ili diskontinualna faza [59].

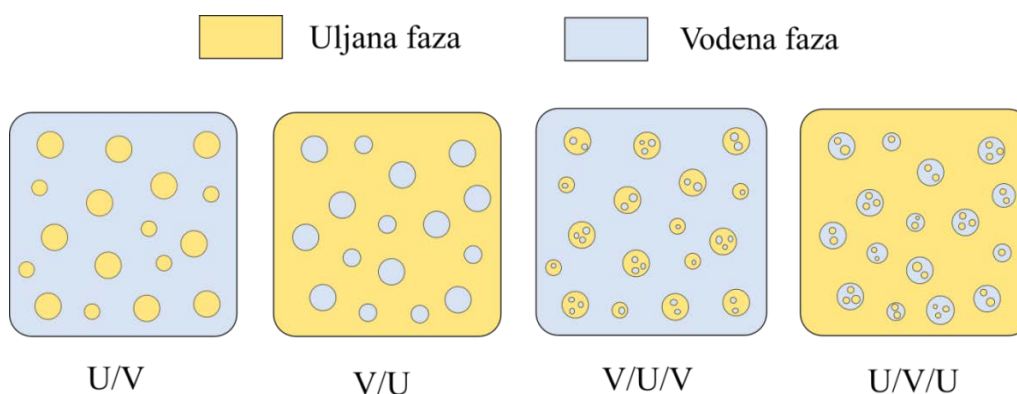
Emulzije se primenjuju u različitim industrijskim procesima u prehrambenoj, farmaceutskoj, poljoprivrednoj, kozmetičkoj i naftnoj industriji [59,62]. Takođe, emulzije su zastupljene u raznim prirodnim i prerađenim prehrambenim proizvodima. Koriste se kao koloidni sistemi za isporuku funkcionalnih sastojaka (vitamini, suplementi, antimikrobna sredstva, boje, arome i antioksidansi), formirani tako da inkapsuliraju, štite i kontrolišu njihovo oslobađanje [63].

Proces stvaranja emulzije je nespontan i dinamičan proces i naziva se emulgovanje ili emulzifikacija. To je proces koji zahteva značajnu količinu mehaničke energije za dispergovanje (rasprašivanje) jedne faze u drugu (u obliku malih kapljica u kontinualnoj fazi). Postoji nekoliko metoda emulgovanja uključujući jednostavno mešanje, mešanje pomoću rotor-stator sistema, ubrizgavanje tečnosti kroz porozne membrane, upotrebu homogenizatora sa visokim pritiskom ili ultrazvučnog generatora [59].

Emulzije su nestabilni sistemi zbog nepovoljnog kontakta uljane i vodene faze [59]. Kao posledica termodinamičke nestabilnosti emulzionog sistema javlja se pozitivna slobodna energija na

kontakta uljane i vodene faze, koja se manifestuje kao relativno visoka pozitivna međufazna napetost. Poreklo ove pozitivne slobodne energije je nepovoljna interakcija između molekula ulja i vode, što se uglavnom može pripisati činjenici da su molekuli vode sposobni da formiraju jake vodonične veze sa susednim molekulima vode, ali ne i sa molekulima ulja (hidrofobni efekat) [64]. Karakteristike emulzionih sistema se menjaju od početka njihovog formiranja do postizanja krajnjeg oblika i zavise od različitih faktora kao što su temperatura, brzina mešanja, vreme i pritisak. Dodatak površinski aktivnih materija (surfaktanata) je neophodan za dobijanje stabilnih emulzija tokom dužeg vremena, kako ne bi došlo do razdvajanja faza emulzije u različite slojeve, na osnovu razlika u njihovoj gustini [59]. Za stabilizaciju emulzija (smanjenjem međufazne napetosti između dve faze) obično se koriste emulgatori, koji uključuju prirodne polimere (polisaharidi, proteini i mnogi drugi) i hemijske surfaktante [62].

U zavisnosti od prirode disperzne faze, emulzije se mogu klasifikovati na emulzije ulje u vodi (U/V) i voda u ulju (V/U). Emulzija ulje u vodi (U/V) je emulzija u kojoj je ulje prisutno kao dispergovana faza i voda kao disperzioni medijum (kontinualna faza). Emulzija voda u ulju (V/U) je emulzija u kojoj je voda dispergovana fazu, a ulje deluje kao disperzioni medijum [55,61,62]. U novije vreme razvijeni su i složeniji tipovi emulzija, poznati kao višestruke emulzije: sistem voda u ulju u vodi (V/U/V) i ulje u vodi u ulju (U/V/U), (*Slika 1.4*) [59,61]. Višestruke emulzije mogu biti definisane kao emulzija u emulziji [59].



Slika 1.4. Klasifikacija emulzija u zavisnosti od prirode disperzne faze [59]

Emulzije se dalje mogu klasifikovati u tri grupe u zavisnosti od veličine kapljica: mikro (10 – 100 nm), nano (mini) (100 – 1000 nm) i makroemulzije (0,5 – 100 μm). Stabilnost emulzije raste kako se veličina kapljica smanjuje [65,55]. Takođe, neki autori navode da se veličina kapljica kod nanoemulzija kreće u opsegu 20 – 500 nm [66].

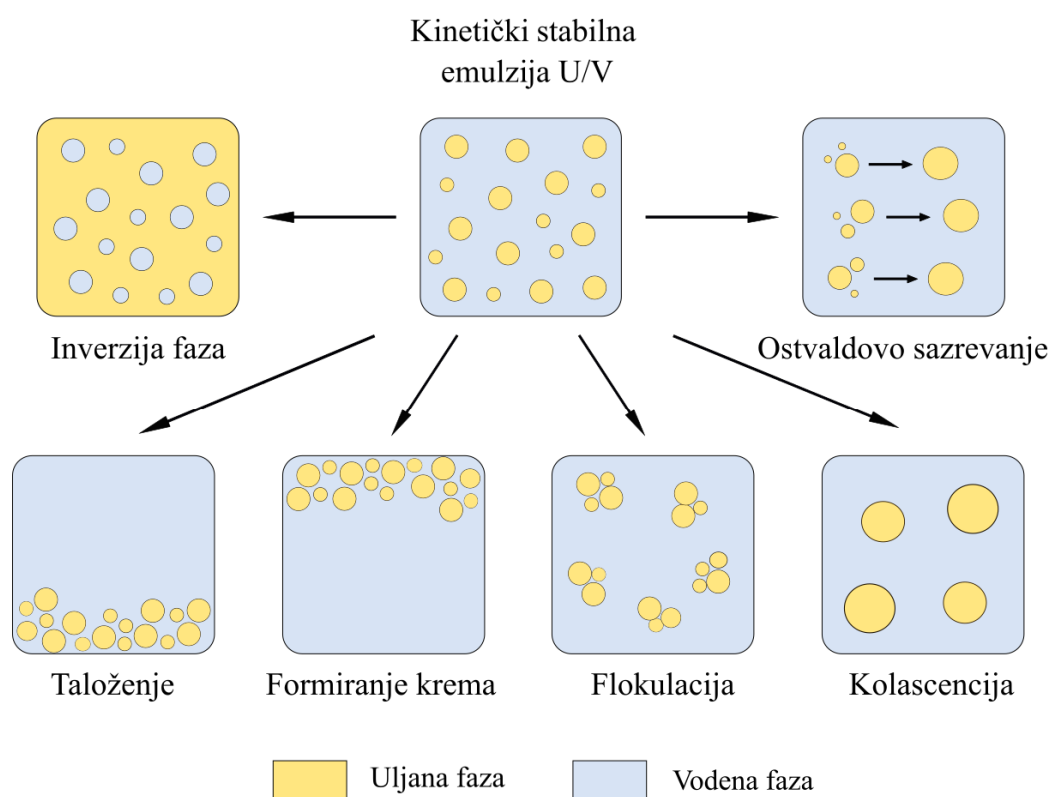
Energija potrebna za formiranje nanoemulzije može se dobiti iz mehaničkog uređaja (visokoenergetska emulzifikacija) ili iz hemijskog potencijala komponenti (niskoenergetska emulzifikacija). Visokoenergetske metode koriste intenzivne mehaničke sile da razbiju kapljice u manje kapljice i obično uključuju upotrebu mehaničkih uređaja. Visokoenergetska emulzifikacija obuhvata homogenizaciju pod visokim pritiskom, ultrazvučnu obradu i mikrofluidizaciju, a niskoenergetska emulzifikacija obuhvata temperaturnu inverziju faza, inverziju sastava faze i difuziju rastvarača [65].

Tehnologija nanoemulzije postaje atraktivna zbog svojih prednosti u odnosu na makroemulziju, kao što su veća efikasnost inkapsulacije i povećan prinos proizvoda [54,55,60,67]. Obično su emulzije sa mikronskim veličinama kapljica termodinamički nestabilni sistemi, dok se emulzije nanometarskih veličina kapljica smatraju termodinamički stabilnim emulzijama [60,67]. Prelaz iz nanoemulzija u makroemulzije javlja se usled značajne promene u veličini kapljica. Nanoemulzije se mogu pretvoriti u makroemulzije, i obrnuto, pod određenim termodinamičkim i procesnim uslovima. Dva pristupa se uglavnom primenjuju za određivanje stabilnosti emulzije: (a) merenje zeta potencijala površine inkapsuliranih kapljica ulja, radi utvrđivanja stabilnosti emulzije;

(b) testovi starenja, koji predstavljaju proučavanje promena svojstava emulzije tokom vremena. Dva zajednička procesa destabilizacije koja utiču na ujednačenost disperzija su migracija kapljica i varijacija veličine kapljica [60,67].

1.2.3. Stabilnost emulzija

Emulzije su termodinamički nestabilni sistemi, koji teže da se odvoje (to jeste da se vrate u odvojenu uljanu i vodenu fazu) pod dejstvom spoljnih sila. Do takvog odvajanja dolazi u vremenskim periodima koji se mogu razlikovati za nekoliko reda veličine [64,68,69]. Vremenski period u kojem emulzija mora da ostane stabilna zavisi od primene konačnog proizvoda [64]. Glavni mehanizmi koji utiču na starenje emulzija su: formiranje kreme i taloženje, flokulacija, koalescencija, inverzija faza i Ostvaldovo sazrevanje (*Slika 1.5*). Ovi procesi destabilizacije su međusobno povezani i mogu uticati jedni na druge tokom starenja emulzije [68-70]. Dominantni mehanizam u određenoj emulziji zavisi od njenog sastava, strukture i okruženja [64].



Slika 1.5. Šematski prikaz mehanizama koji izazivaju nestabilnost emulzija [64]

Procesi **formiranje krema** i **taloženje** su rezultat spoljnih sila kao što su gravitaciona ili centrifugalna. Ovim procesima u suštini upravlja razlika u gustini dve tečne faze, pošto kapljice u emulziji obično imaju drugačiju gustinu od tečnosti koja ih okružuje [64,68,69]. Kada takve spoljne sile premašuju toplotno kretanje kapljica (Braunovo kretanje), u sistemu se stvara gradijent koncentracije usled kretanju većih kapljica brže ka vrhu (ako je njihova gustina manja od gustine medija) ili ka dnu (ako je njihova gustina veća od gustine medija) posude [64,69]. Kapljice mogu formirati nasumično ili uređeno zbijeno polje na vrhu ili dnu sistema u odnosu na kontinualnu tečnu fazu [68]. Uglavnom kapljice u U/V emulziji imaju tendenciju stvaranja krema, dok one u V/U emulzijama imaju tendenciju da se talože. Međutim, mogu postojati situacije gde se dešava suprotno ako je gustina uljane faze povećana usled dodavanja sredstava za uravnoteženje

(ponderisanje) ili usled kristalizacije ulja [64]. Za razliku od stvaranja krema i taloženja, ostali navedeni fenomeni su manje ili više direktno povezani sa svojstvima međufazne oblasti tečnost-tečnost [69].

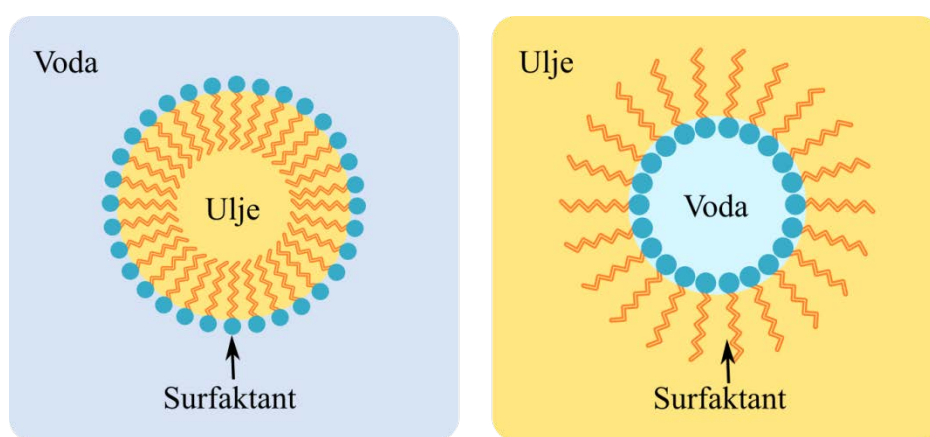
Kapljice u emulzijama su u neprekidnom kretanju zbog svoje toplotne energije, gravitacionih sila ili primenjenih mehaničkih sila, i dok se kreću međusobno se sudaraju. Nakon sudara, kapljice emulzije se mogu ili razdvojiti ili ostati sjedinjene, u zavisnosti od relativne veličine privlačnih i odbojnih sila između njih. Kapljice teže ka sjedinjavanju (agregaciji) kada je dejstvo neto sila na njih jako privlačno ili ostaju kao zasebne jedinice kada je dejstvo neto sila snažno odbojno. Na brzinu agregacije kapljica unutar određene emulzije utiču učestalost i efikasnost sudara. U emulzijama se obično javljaju dve vrste agregacije kapljica: **flokulacija** i **koalescencija**. Kod flokulacije dve ili više kapljica se spajaju formirajući agregat u kome kapljice emulzije zadržavaju svoj individualni integritet. U slučaju koalescencije, dve ili više kapljica se spajaju i formiraju jednu veću kapljicu [64]. **Flokulacija** podrazumeva spajanje kapljica u veće jedinice usled interakcija slojeva adsorbovanih na površini kapljica [68,69]. Nastaje kao rezultat Van der Valsove privlačne sile i javlja se kada nema dovoljno odbijanja da se kapljice razdvoje na udaljenosti na kojima je slaba Van der Valsova sila privlačenja. Flokulacija može biti „jaka“ ili „slaba“ u zavisnosti od veličine energije privlačenja [68]. **Koalescencija** je fuzija dve ili više kapljica u veće. Povezana je sa stanjivanjem i pucanjem tečnog filma između kapljica [68,69]. Koalescencija u emulzijama može nastati kada pokretne kapljice međusobno dolaze u kontakt ili kao posledica njihove flokulacije [69]. Krajnji slučaj spajanja je potpuno odvajanje emulzije na dve različite tečne faze [68].

Inverzija faza se odnosi na proces u kome dolazi do razmene između disperzne faze i medijuma [68]. Podrazumeva prelazak emulzije U/V u emulziju V/U ili obrnuto i obično se javlja kao rezultat promena u sastavu sistema ili uslova okoline [64,68]. Dešava se kroz niz složenih fizičko-hemijskih mehanizama koji uključuju fragmentaciju kapljica i proces agregacije. Tokom ovih promena sistem može nakratko da sadrži regione poput emulzije U/V, emulzije V/U i višestuke emulzije pre prelaska u svoje konačno stanje. Do inverzije faza mogu dovesti promene zapreminskog udela dispergovane faze, tip emulgatora, koncentracija emulgatora, temperatura, jonska jačina, pH vrednost ili primena mehaničkih sila [64].

Ostvaldovo sazrevanje se manifestuje kao rast krupnih kapljica na račun manjih usled difuzije molekula disperzne faze kroz kontinuiranu fazu [64]. Nastaje usled konačne rastvorljivosti tečnih faza i indukovano je kapilarnim pritiskom. Tečnosti koje se smatraju nemešljivim često imaju međusobnu rastvorljivost koja nije zanemarljiva. Kod polidisperznih emulzija manje kapljice imaju veću rastvorljivost u poređenju sa većim, tako da vremenom dolazi do prenosa mase od manjih ka većim kapljicama. U emulziji manje kapljice nestaju, njihovi molekuli se raspršuju i talože se na većim kapljicama [68-70].

1.2.4. Primena surfaktanata u procesu stabilizacije emulzije

U cilju kontrole procesa emulgovanja i postizanja stabilnosti emulzije, koriste se odgovarajuće komponente kao što su surfaktanti male molekulske mase, biomolekuli, polimeri, proteini, čvrste nanočestice ili složenije kombinacije surfaktanata i nanočestica [68,69]. Efikasni emulgatori imaju snažnu sposobnost da smanje napetost u međufaznim oblastima, karakteriše ih kratko vreme adsorpcije i visok stepen pokrivenosti međufazne oblasti voda-ulje nakon adsorbovanja [69]. Budući da su površinski aktivne materije (opšte poznate kao surfaktanti) amfifilna jedinjenja zbog prisustva i hidrofilnih i hidrofobnih grupa u svojoj hemijskoj strukturi [71,72], ona se adsorbuju na međufaznim oblastima voda-ulje i na taj način formiraju „film” oko dispergovane faze [68,69]. Napolarni (hidrofobni deo), obično ravni ili razgranati ugljovodonični ili fluorougljenični lanac, koji sadrži 8 – 18 atoma ugljenika, vezan je na polarni (hidrofilni) ili jonski deo [71,73]. U međufaznoj oblasti hidrofilni deo surfaktanta je okrenut ka vodi, a hidrofobni prema uljanoj fazi. (Slika 1.6).



Slika 1.6. Šematski prikaz emulzije ulje u vodi i voda u ulju stabilizovane surfaktantom

U zavisnosti od karakteristika hidrofilne grupe, surfaktanti se mogu klasifikovati u četiri tipa: katjonski surfaktanti (pozitivno naelektrisane hidrofilne grupe), anjonski surfaktanti (negativno naelektrisane hidrofilne grupe), cviterjonski surfaktanti (koji imaju i pozitivno i negativno naelektrisane hidrofilne grupe) i nejonski surfaktanti (hidrofilna grupa nema naelektrisanje) (Slika 1.7) [71,72,74].

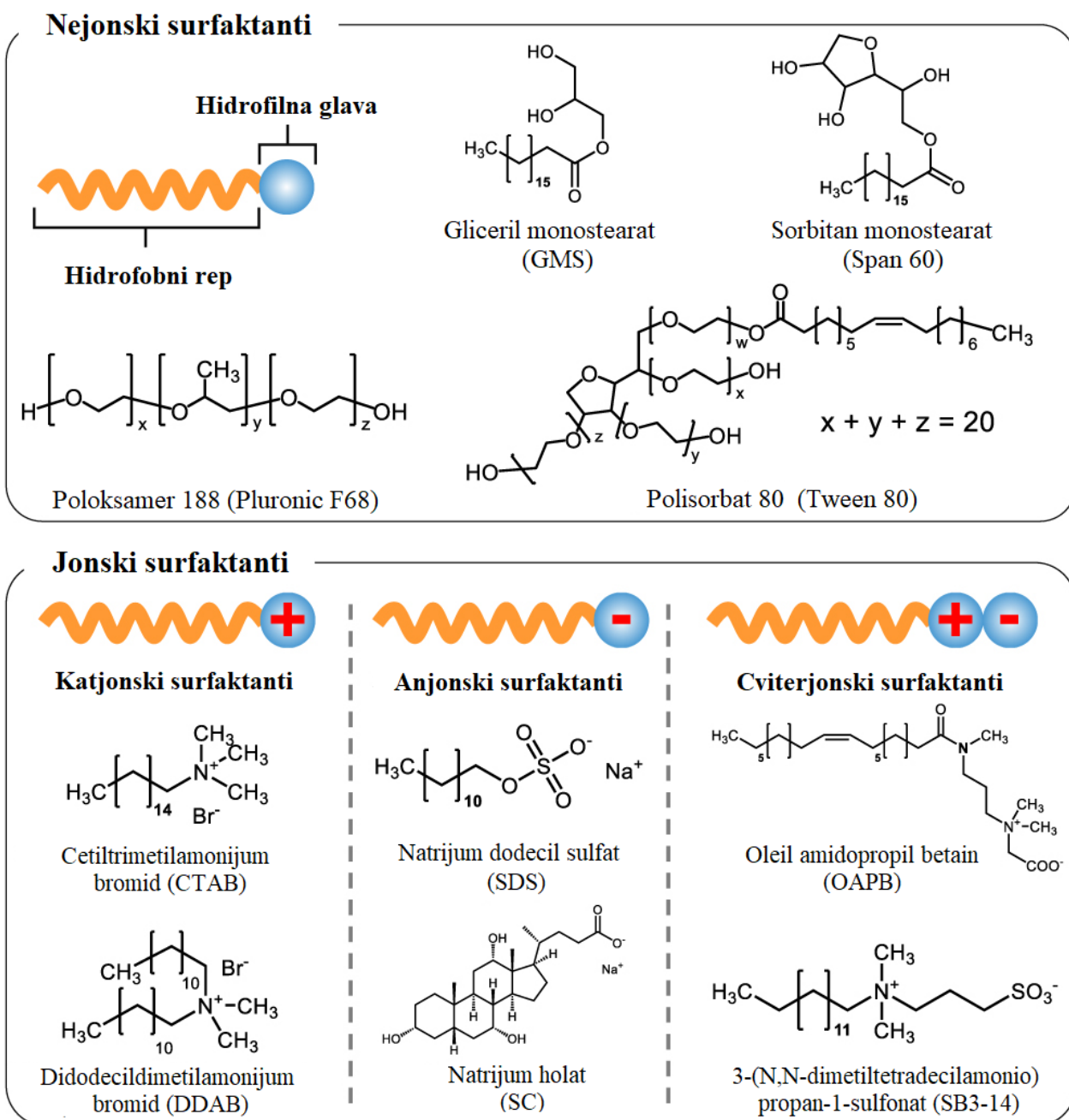
Kod **anjonskih surfaktanata** najčešće hidrofilne grupe su: karboksilati ($C_nH_{(2n+1)}COO^-X$), sulfati ($C_nH_{(2n+1)}OSO_3^-X$), sulfonati ($C_nH_{(2n+1)}SO_3^-X$), fosfati ($C_nH_{(2n+1)}OPO(OH)O^-X$); Gde je $n = 8 - 16$ atoma, a jon suprotnog naelektrisanja X je obično Na^+ . Ovo je najčešće korišćena klasa surfaktanata u industriji zbog relativno niskih troškova proizvodnje [71,73].

Katjonski surfaktanti koji su najčešće u upotrebi su kvaternarna amonijumova jedinjenja sa opštom formulom $R'R''R'''R''''N^+X^-$, gde je X obično hloridni jon, a R predstavlja alkilne grupe. Katjonski surfaktanti su obično rastvorljivi u vodi kada postoji samo jedna dugačka alkil grupa. Oni su uglavnom kompatibilni sa većinom neorganskih jona i „tvrdom” vodom, ali su nekompatibilni sa metasilikatima i visokokondenzovanim fosfatima, a takođe, nekompatibilni su sa materijalima sličnim proteinima. Obično su stabilni pri promenama pH vrednosti (u kiselioj i alkalnoj sredini). Nekompatibilni su sa većinom anjonskih površinski aktivnih materija, ali su kompatibilni sa nejonskim [71,73].

Amfoterni ili cviterjonski surfaktanti sadrže i katjonske i anjonske grupe. Glavna karakteristika ove grupe surfaktanata je zavisnost od pH vrednosti rastvora u kome se nalaze. U kiselim vodenim rastvorima molekul postaje pozitivno naelektrisan i ponaša se kao katjonski surfaktant, dok je u alkalnim rastvorima negativno naelektrisan i ponaša se kao anjonski.

Može se definisati specifična pH vrednost pri kojoj obe jonske grupe pokazuju jednaku jonizaciju (izoelektrična tačka molekula). Amfoterni surfaktanti pokazuju odličnu kompatibilnost sa drugim surfaktantima, formirajući mešovite micelle. Hemijski su stabilni i u kiselinama i u bazama [71,73].

Od **nejonskih surfaktanta** u upotrebi su dve veće grupe: etoksilovani surfaktanti i polihidroksilni surfaktanti. Etoksilovani surfaktanti su na bazi etilen-oksida i razlikuju se nekoliko klasa: etoksilovani alkoholi, etoksilovani alkil-fenoli, etoksilati masnih kiselina, etoksilovani monoalkaloamidi, etoksilovani sorbitanski estri, etoksilovani amini masnih kiselina i etilenoksid-propilenoksid kopolimeri (poznati kao polimerni surfaktanti). U polihidroksilne surfaktante spadaju: glikolni estri, glukozidi (i poliglukozidi), glicerol (i poliglicerolski) estri i šećerni estri [71,73].

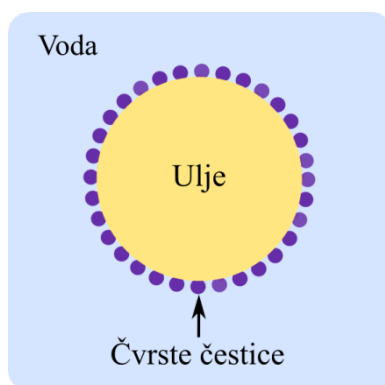


Slika 1.7. Hemijske formule karakterističnih surfaktanata [72,74]

Nejonski surfaktanti su najviše u upotrebi kod U/V i V/U emulzija, a najčešće korišćena grupa ovih surfaktanata su sorbitanski estri masnih kiselina (Spans[®]) i njihovi etoksilovani derivati (Tweens[®]) [71]. Sorbitan estri se proizvode reakcijom sorbitola sa masnom kiselinom na visokoj

temperaturi ($> 200\text{ }^{\circ}\text{C}$). Sorbitol se dehidrira u 1,4-sorbitan, a zatim dolazi do esterifikacije. Ako jedan mol masne kiseline reaguje sa jednim molom sorbitola, dobija se mono-estar (neki di-estri, takođe, proizvode se kao sporedni proizvodi). Slobodne $-\text{OH}$ grupe u molekulu se mogu esterifikovati, proizvodeći di- i tri-estre. Dostupno je nekoliko proizvoda u zavisnosti od prirode alkilne grupe kiseline i da li je proizvod mono-, di- ili tri-estar. Estri sorbitola su nerastvorni u vodi, ali su rastvorni u većini organskih rastvarača i imaju nizak HLB broj. Primeri ovih surfaktanata su: sorbitan monolaurat (Span 20), sorbitan monopalmitat (Span 40), sorbitan monostearat (Span 60), sorbitan monooleat (Span 80), sorbitan tristearat (Span 65) i sorbitan trioleat (Span 85). Etoksilisani derivati Spans-a (Tweens) nastaju reakcijom etilen oksida sa bilo kojom hidroksilnom grupom koja ostaje na grupi estara sorbitana. Alternativno, sorbitol se prvo etoksiluje, a zatim esterifikuje. Primeri Tween-a su: polioksietilen (20) sorbitan monolaurat (Tween 20), polioksietilen (20) sorbitan monopalmitat (Tween 40), polioksietilen (20) sorbitan monostearat (Tween 60), polioksietilen (20) sorbitan monooleat (Tween 80), polioksietilen (20) sorbitan tristearat (Tween 65), polioksietilen (20) sorbitan trioleat (Tween 85). Tween-ovi su najčešće rastvorljivi u vodi i imaju relativno visok HLB broj. Jedna od glavnih prednosti estera sorbitana i njihovih etoksiliranih derivata je što su odobreni kao aditivi u hrani, a takođe, u upotrebi su u kozmetici i nekim farmaceutskim preparatima [71,73].

Pored primene najčešće korišćenih surfaktanata, za stabilizaciju emulzija mogu se koristiti i površinski aktivne materija u vidu čestica. Ovakav oblik emulzije naziva se „**pickering**” emulzija (*Slika 1.8*). Kao i u slučaju gore spomenutih surfaktanata, stabilizacija kapljica emulzija odvija se adsorpcijom **malih čvrstih čestica** na površini dispergovanih kapljica, a sam mehanizam adsorpcije veoma se razlikuje od mehanizma surfaktanata. Ovakav način stabilizacije emulzije može naći primenu u antimikrobnom aktivnom pakovanju zbog veće stabilnosti i odsustva surfaktanata. S druge strane, nedostaci ovakvog sistema su neprozirnost i ograničen broj čestica za stabilizaciju koje se mogu koristiti u prehrambenoj industriji [55].



Slika 1.8. Šematski prikaz „pickering” emulzije stabilizovane čvrstim česticama [55]

1.3. Polimerna matrica na bazi polisaharid-protein za inkapsulaciju aktivnih komponenti

Mešanjem polimera može doći do poboljšanja fizičkih svojstava čistih komponenti, stvaranjem novih međumolekulskih veza [75]. U cilju sto efikasnije inkapsulacije aktivnih komponenti u stabilne polimerne matrice koriste se različite kombinacije polisaharida i proteina. Emulzije i koloidi na bazi polisaharida i proteina uveliko se koriste kao prehrambeni sastojci, usled njihove visoke biokompatibilnosti, dobre biorazgradivosti i mogućnosti primene u različitim oblastima tehnologije. Ovi biopolimeri se u mnogim namirnicama (koje su u obliku emulzija) koriste kao emulgatori, modifikatori teksture i stabilizatori. Formiranjem kompleksa polisaharid-protein može se proširiti funkcionalnost ovih biopolimera, tako da ovakav kompleks ima primenu u regulisanju karakteristika međufazne oblasti ulje-voda, menjajući time stabilnost i osobine emulzija. Na ovaj način, dobijaju se emulzije sa svojstvima namenjenim za određenu primenu, kao što su sistemi za dostavu bioaktivnih komponenti [63,76]. Prema tome, kompleks polisaharid-protein se sa jedne strane primenjuje kao matrica za inkapsulaciju aktivnih komponenti, a s druge strane, može biti stabilizator emulzije ulje-voda [76]. Ovi površinski aktivni kompleksi nastaju usled kovalentnih ili nekovalentnih interakcija između proteina i polisaharida [63].

1.3.1. Interakcije između polisaharida i proteina

1.3.1.1. Kovalentne interakcije između polisaharida i proteina

Polisaharid-protein konjugati nastali kovalentnim umrežavanjem su obično stabilniji od kompleksa polisaharid-protein koji su povezani fizičkim interakcijama. Kovalentni kompleksi mogu se dobiti *Maillard*-ovom reakcijom i enzimskom konjugacijom [63].

Maillard-ova reakcija podrazumeva stvaranje kovalentne veze između amino grupe na proteinu i karbonilne grupe na polisaharidu (posebno ϵ -amino grupa lizinskih ostataka i terminalna redukciona karbonilna grupa polisaharida) [63,77]. Ove reakcije ne zahtevaju upotrebu dodatnih hemikalija i odvijaju se prirodno u uslovima kontrolisanog vremena, temperature, pH vrednosti i vlage. *Maillard*-ove reakcije se odnose na složenu grupu reakcija i mogu se podeliti u tri faze: ranu, naprednu i završnu. Sve ove faze su međusobno povezane i mogu se pojaviti istovremeno, a na njih utiču uslovi reakcije [77]. Pokazalo se da ovakvi polisaharid-protein kompleksi imaju niz korisnih funkcionalnih svojstava kao što su: antioksidativna i antimikrobna aktivnost, termička stabilnost, rastvorljivost i sposobnost emulgovanja [63,77].

Enzimski katalizovanim reakcijama mogu se, takođe, dobiti kompleksi polisaharid-protein. Tako na primer, aromatične aminokiseline i neki fenoli mogu formirati kovalentne veze u prisustvu oksidaza kao što su: tirozinaza, lakaza i peroksidaza [63].

1.3.1.2. Nekovalentne interakcije između polisaharida i proteina

Nekovalentne interakcije između polisaharida i proteina uključuju elektrostatičke i hidrofobne interakcije, vodonične veze i sterno odbijanje [63,76,78]. Ove interakcije su obično reverzibilne i mogu biti u različitim oblicima, kao što su elektrostatičko kompleksiranje ili termodinamička nekompatibilnost [63].

Elektrostatičke interakcije su važne za biopolimere koji imaju naelektrisanje u uslovima u kojima se koriste (pH vrednost i jonska jačina sredine). Ove interakcije mogu biti privlačne ili odbojne u zavisnosti od naelektrisanja biopolimera [78]. Električni naboj na kičmi proteinskog ili polisaharidnog lanca je odgovoran za njihovo međusobno elektrostatičko privlačenje ili odbijanje

[63,76]. Proteini imaju pozitivan ili negativan zeta potencijal, u zavisnosti od pH vrednosti sredine. Zeta potencijal je pozitivan kada je pH vrednost sredine niža od izoelektrične tačke (pI) proteina, a negativan kada je pH vrednost sredine viša od pI proteina. Ovo naelektrisanje na lancu proteina ukazuje na prisustvo različitih aminokiselina u molekulima proteina i njihov način jonizacije u različitim opsezima pH vrednosti. Polisaharidi se deprotonuju (postaju anjonski) u opsegu pH vrednosti većem od njegovog pKa [76]. Snaga i opseg ovih elektrostatičkih interakcija opada sa povećanjem jonske jačine sredine [78]. Iako je elektrostatičko privlačenje glavna pokretačka snaga za stvaranje kompleksa između polisaharida i proteina, takođe, utvrđeno je da vodonično vezivanje i hidrofobne interakcije igraju sekundarnu ulogu za stabilnost ovih kompleksa [76].

Hidrofobne interakcije su karakteristične za biopolimere u vodenim rastvorima koji imaju nepolarne grupe, a manifestuju se kao tendencija da se ove grupe međusobno povežu [78]. Prisustvo –COOH grupe na polisaharidu, a –NH₃ i –COOH grupa na lancu proteina, izvori su vodonične veze između ova dva biopolimera [76].

Vodonične veze se javljaju kod biopolimera koji imaju segmente duž svog lanca koji mogu formirati relativno jake vodonične veze sa segmentima na drugim molekulima, na primer, kroz spiralnu ili strukturu „lista” [78].

Sterno odbijanje nastaje zbog smanjenja zapremine koja je dostupna molekulima biopolimera. S obzirom da mnogi biopolimeri u rastvoru zauzimaju relativno velike zapremine, dolazi do smanjenja entropije mešanja sistema i efekta sternog odbijanja [78].

Značaj ovih interakcija i stepen stvaranja kompleksa polisaharid-protein u određenom sistemu zavisi od vrste molekula biopolimera koji su uključeni (njihove molekulske konformacije, molekulske mase, gustine naelektrisanje u odnosu na pH vrednost, fleksibilnosti, hidrofobnosti), osobina rastvora (pH vrednost i jonska jačina) i uslova u okolnoj sredini (temperatura, smicanje). Modifikacijom ovih parametara moguće je kontrolisati interakcije između biopolimera [63,76,78].

Koncentracija polisaharida i pH vrednost imaju važnu ulogu u rastvorljivosti agregata polisaharid-protein. Vezivanjem anjonskih polisaharida (pH ~ pKa) za katjonske proteine (pH < pI) nastaju i rastvorljivi i nerastvorni kompleksi. Početno vezivanje anjonskih polisaharida za katjonske proteine izaziva neutralizaciju naelektrisanja, što dovodi do stvaranja nerastvornih agregata protein-polisaharid. Dalje vezivanje polisaharida za te neutralne agregate čini ga efikasno anjonskim (rastvorni kompleksi). Takođe, poznato je da vezivanju anjonskih polisaharida sa anjonskim proteinima (pH > pI) upravljaju interakcije između anjonskih reaktivnih mesta polisaharida i malih katjonskih reaktivnih mesta proteina. Vezivanje anjonskih polisaharida za katjonsku stranu proteina (pri pH > pI) dovodi do stvaranja anjonskih agregata polisaharid-protein, koji su uglavnom rastvorni kompleksi [76].

Parametari rastvora od kojih zavisi obim navedenih nekovalentnih interakcije su pH vrednost, jonska jačina, temperatura i mnogi drugi. [63,76]. Temperatura je jedan od faktora koji može značajno uticati na zastupljenost vodonične veze i hidrofobne interakcije. Od temperature zavisi da li će protein biti u savijenoj ili rasklopljenoj konformaciji. Rasklopljene konformacije proteina omogućavaju više reaktivnih mesta (aminokiselina) i veće šanse za interakciju ili vezivanje sa polisaharidom [76].

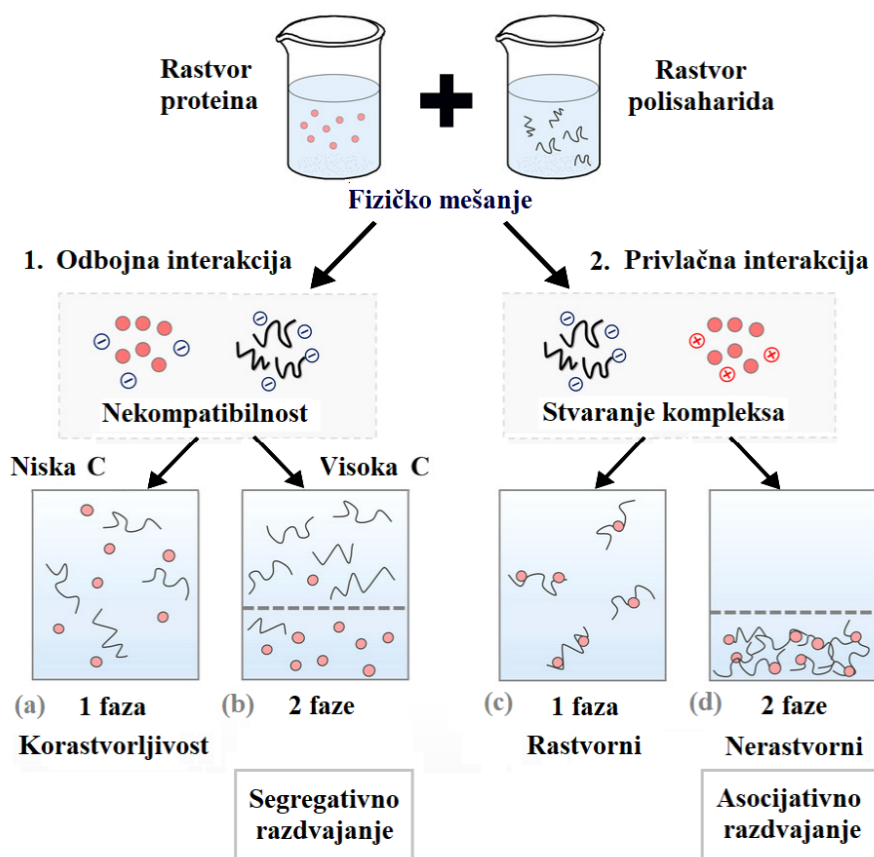
1.3.1.3. Nekovalentne interakcije polisaharida i proteina u rastvorima

Proteini i polisaharidi mogu postojati nezavisno jedan od drugog u rastvoru ili mogu formirati **rastvorljive ili nerastvorljive komplekse** u zavisnosti od prirode molekula koji su uključeni, kao i fizičko-hemijskih svojstava rastvora [63]. Takođe, dva biopolimera mogu postojati ili u **jednofaznim sistemima** ili u **fazno odvojenim sistemima** u zavisnosti od prirode biopolimera, njihove koncentracije i osobina rastvora [63,76,78].

1. Kada se dva biopolimera koji imaju isto naelektrisanje mešaju zajedno, oni mogu da postoje u jednofaznom sistemu (gde se dva odvojena biopolimera ravnomerno raspoređuju po medijumu)

(Slika 1.9 - (a)) ili postoje kao dve različite faze (svaka faza sadrži različite biopolimere) (Slika 1.9 - (b)) [76]. U uslovima razblaženog rastvora i u odsustvu dovoljno jakih privlačnih sila između proteina i polisaharida, mešoviti sistem teži da formira jednofazni rastvor. Povećanjem koncentracije proteina i polisaharida, dva biopolimera postaju termodinamički nekompatibilna jedan sa drugim zbog efekata sternog odbijanja. Kao rezultat toga, rastvor se razdvaja u dve faze, jednu koja je bogata proteinima i osiromašena polisaharidom, a drugu bogatu polisaharidom i osiromašenu proteinima [63].

2. Kada dva biopolimera imaju suprotno naelektrisanje, onda se oni aglomerišu da bi formirali rastvorljive komplekse (jednofazni sistem) (Slika 1.9 - (c)) ili nerastvorne taloge (dvofazni sistem) (Slika 1.9 - (d)) [76]. U uslovima u kojima postoji dovoljno jaka privlačna sila između proteina i polisaharida, oni mogu formirati fizičke komplekse, koji mogu biti rastvorljivi ili nerastvorljivi. Obično je elektrostatičko privlačenje između suprotno naelektrisanih biopolimera najčešći način formiranja ovih vrsta fizičkih kompleksa. Zbijeni rastvorljivi kompleksi imaju tendenciju da formiraju jednofazni rastvor, dok se nerastvorni kompleksi (poput koacervata i taloga) mogu razdvojiti u dve faze kada stoje dovoljan dug vremenski period. U ovom slučaju, jedna od faza je obogaćena sa oba biopolimera, dok je druga osiromašena (Slika 1.9 - (d)) [63].



Slika 1.9. Šematski prikaz četiri različita fazna ponašanja nastala u smeši polisaharida i proteina [63]

U sistemu polisaharid-protein može doći do razdvajanja faza putem dva različita mehanizma: **asocijativno razdvajanje faza** i **segregativno razdvajanje faza**. Ova razdvajanja izazivaju velike promene u funkcionalnim svojstvima biopolimera [76,78].

Asocijativno razdvajanje faza je agregacija između dva suprotno naelektrisana biopolimera pokrenuta elektrostatičkim privlačenjem. Nastaje usled relativno snažne privlačnosti između dve različite vrste biopolimera i dovodi do razdvajanja faza. Nastali dvofazni sistem sastoji se od faze

koja je bogata sa oba biopolimera i faze koja je osiromašena sa oba biopolimera (*Slika 1.9 - (d)*). Faza bogata biopolimerima može biti ili koacervat ili talog, u zavisnosti od intenziteta privlačenja i prirode uključenih biopolimera [76,78].

Do **segregativnog razdvajanja faza** dolazi ili zbog jakog elektrostatičkog odbijanja (između dva slično naelektrisana biopolimera) ili zbog veoma visoke sterne isključenosti (između dva neutralna biopolimera). U ovom slučaju, pri niskoj koncentraciji, dva biopolimera mogu postojati u jednoj fazi, dok pri većoj koncentraciji započinje odvajanje faza (*Slika 1.9 - (c)*) [76,78].

Vrsta, broj, redosled i tip vezivanja monomera u biopolimerima određuju njegove molekulske karakteristike u rastvoru, kao što su dužina lanca, grananje, naelektrisanje, fleksibilnost i hidrofobnost. Pored toga, molekulske karakteristike biopolimera u velikoj meri određuju njihova funkcionalna svojstva (stvaranje gelova, zadržavanje vode, stvaranje i stabilizuju emulzije) [78].

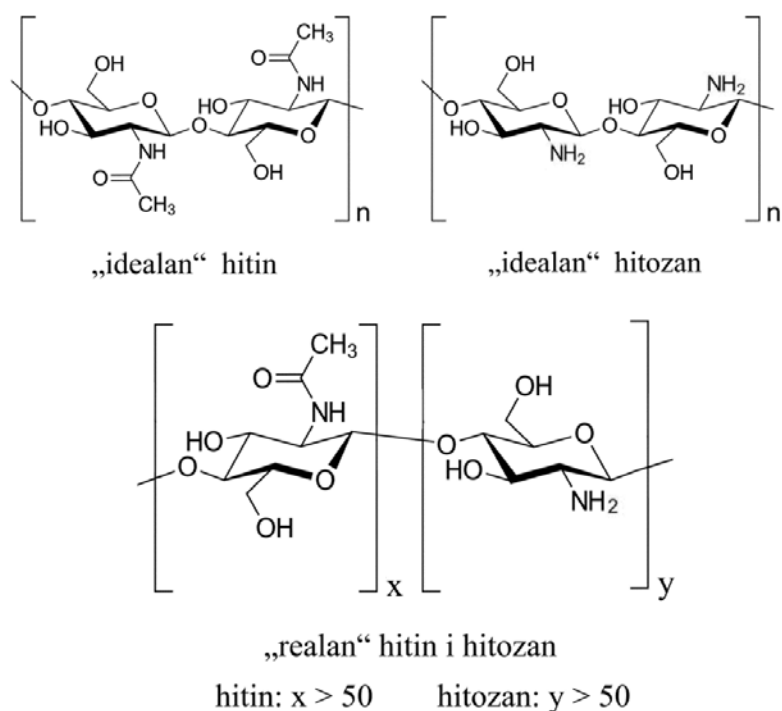
1.3.2. Hitozan-želatin kompleks kao polimerna matrica za inkapsulaciju

1.3.2.1. Hitozan

Hitozan je linearni katjonski polisaharid, dobijen deacetilacijom hitina [79,80]. Deacetilacija hitina uglavnom se vrši upotrebom tri različite metode: hemijske (alkalne), enzimske i primenom mikroorganizama. U enzimskim i mikrobiološkim metodama, enzimi i mikroorganizmi deacetiliraju hitin [81]. Hemijske metode za dobijanje hitozana najčešće se koriste u komercijalne svrhe zbog njihove niske cene [80].

Hitin je linearni homopolimer izgrađen od monomernih jedinica N-acetilglukozamina (2-acetamido-2-deoksi- β -D-glukopiranoze) međusobno povezanih $\beta(1-4)$ glikozidnim vezama [79]. To je prirodni polisaharid koji sintetišu različita živa bića i ubraja se u najbrojnije prirodne polimere, posle celuloze [80]. U prirodnom obliku javlja se u vidu uređenih kristalnih mikrofibrila koji formiraju strukturne komponente u egzoskeletu beskičmenjaka, kutikulama insekata ili ćelijskom zidu pečuraka, plesni i kvasaca. Do sada je glavni komercijalni izvor hitina bio otpad prehrambene industrije (školjke, rakovi, jastozi, škampi) [80,82]. U svetu se godišnje sakupi nekoliko miliona tona hitina, pa se stoga ovaj biopolimer smatra jeftinim i lako dostupnim [80]. U industrijskoj preradi, hitin se ekstrahuje kiselim tretmanom radi rastvaranja kalcijum-karbonata, a zatim sa alkalnim rastvorom radi rastvaranja proteina. Pored toga, često se dodaje još jedan korak tokom koga se uklanjanja boja, kako bi se uklonili pigmenti i dobio bezbojan, čist hitin. Svi ti tretmani se moraju prilagoditi izvoru hitina, zbog razlika u ultrastrukturi polaznog materijala, da bi se prvo stvorio visokokvalitetni hitin, a zatim hitozan (posle delimične deacetilacije) [82]. Hitin je nerastvoran u vodi i najčešće korišćenim organskim rastvaračima, a rastvoran je u rastvaračima kao što su: N,N-dimetilacetamid, heksafluoroaceton ili heksafluoro-2-propanol [83]. Zbog slabe rastvorljivosti ne nalazi praktičnu primenu, za razliku od svog deacetilovanog oblika, hitozana, koji ima široku primenu u proizvodnji biomaterijala [82].

Molekul hitozana se sastoji od jedinica glukozamina (2-amino-2-deoksi- β -D-glukopiranoze) i N-acetilglukozamina (2-acetamido-2-deoksi- β -D-glukopiranoze) povezanih $\beta(1-4)$ glikozidnim vezama [79,82]. Hitozan sadrži tri vrste reaktivnih funkcionalnih grupa, amino grupu na položaju C-6, kao i primarnu i sekundarnu hidroksilnu grupu na pozicijama C-6 i C-3 [81]. Hitin se razlikuje od hitozana prema stepenu acetilacije (DA, eng. "degree of N-acetylation") [80], koji se definiše kao prosečan broj N-acetil-D-glukozaminskih jedinica na 100 monomernih jedinica, i izražava se u procentima [84]. Kada je DA manji od 50%, hitin postaje rastvorljiv u kiselim vodenim rastvorima (pH < 6,0) i naziva se hitozan [84]. Prema nomenklaturi koju je predložilo „Evropsko društvo za hitozan“ (EUCHIS, eng. "European Chitin Society"), hitin i hitozan treba da budu klasifikovani na osnovu njihove nerastvorljivosti i rastvorljivosti u 0,1 M rastvoru sirćetne kiseline; pri čemu se nerastvorljivi materijal naziva hitin, a rastvorljivi hitozan [83]. Strukture „idealnog“ i „realnog“ hitina i hitozana predstavljene su na *Slici 1.10*.



Slika 1.10. Hemijska struktura hitina i hitozana [80,83]

Za vreme deacetilacije uklanjaju se acetilne grupe, ali se dešava i reakcija depolimerizacije, što se može uočiti na osnovu promene molekulske mase hitozana (M) [80]. Hitozan može postojati u više različitih oblika na osnovu stepena njegove deacetilacije (DD) i molekulske mase [80,82,83]. S druge strane, stepen deacetilacije i molekulska masa određuju osobine hitozana [80,83], direktno utičući na niz hemijskih i bioloških svojstava (**Tabela 1.1**) [82].

Tabela 1.1. Odnos između strukturnih parametara i osobina hitozana [82]

Osobina	Strukturalne karakteristike
Rastvorljivost	↑ DD
Stepen kristalnosti	↓ DD
Biorazgradivost	↓ DD, ↓ M
Viskoznost	↑ DD
Biokompatibilnost	↑ DD
Antimikrobna svojstva	↑ DD
Antioksidativna svojstva	↑ DD, ↓ M
↑ Direktno proporcionalno osobini; ↓ Obrnuto proporcionalno osobini; DD – stepen deacetilacije; M – molekulska masa.	

Hitozan predstavlja slabu bazu, nerastvornu u vodi i organskim rastvaračima. Rastvara se u razblaženim vodenim rastvorima kiselina ($\text{pH} < 6,5$), koji mogu pretvoriti jedinice glukozamina u rastvorljivi oblik R-NH^{3+} [81]. Takođe, pokazano je da hitozan ispoljava jači antimikrobni efekat prema mikroorganizmima pri nižim pH vrednostima i da antimikrobna aktivnost slabi sa povećanjem pH vrednosti [85].

Hitozan i njegovi derivati zbog svojih karakteristika kao što su biokompatibilnost, biorazgradivost, bezbednost, netoksičnost i biološka aktivnost (antimikrobno, antioksidativno, antitumorno dejstvo), našli su široku primenu u medicini, biotehnologiji, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji [80]. Ova svojstva su posebno prepoznata u oblasti čuvanja i pakovanja

hrane kako bi se izbegla upotreba hemijskih konzervansa. Predstavlja najistraživaniji polisaharid kada je reč o razvoju antimikrobnih jestivih filmova i prevlaka zbog antimikrobnih i antifungalnih svojstava i sposobnosti formiranja filma [81]. Hitozan, takođe, ne migrira lako iz formiranog filma i ima dobra barijerna svojstva [13,86].

Hitozanski filmovi su selektivno propustljivi za gasove (SO_2 i O_2) i poseduju dobra mehanička svojstva. Međutim, njihova visoka propustljivost vodene pare, ograničava njihovu upotrebu, što predstavlja značajan nedostatak za efikasnu kontrolu prenosa vlage, koja je poželjna za većinu namirnica, naročito onih koji se čuvaju u sredinama u kojima je relativna vlažnost vazduha velika. U upotrebi je nekoliko strategija koje se koriste za poboljšanje fizičkih svojstava biopolimernih filmova. Obećavajući rezultati u pogledu povećanja hidrofobnosti dobijeni su dodavanjem neutralnih lipida, voskova, masnih kiselina i glina, iako se time često narušava njihova mehanička i hemijska stabilnost i/ ili organoleptička svojstva [21]. Razna hemijska sredstva (sredstava za umrežavanje) [87,88] i fizički postupci (zračenje i ultrazvučni tretmani) pokazali su se kao dobre strategije za poboljšanje mehaničkih osobina hitozanskih filmova [89]. Takođe, mešanje polimera, upotreba kompozita i višeslojnih sistema su moguća rešenja za prevazilaženje hidrofobnog karaktera hitozana [80].

Dokazano je da hitozan poseduje antimikrobno dejstvo prema mnogim grupama mikroorganizama, Gram-pozitivnim i Gram-negativnim vrstama bakterija, plesnima i kvascima [89]. Tačni mehanizmi antimikrobnog delovanja hitozana i njegovih derivata još uvek nisu poznati. Poznato je da na antimikrobnu aktivnost hitozana utiče veliki broj faktora koji deluju nezavisno jedni od drugih [85]. Postoji nekoliko hipoteza koje se odnose na mehanizam delovanja hitozana na ćelije mikroorganizama [21,81]:

(1) Najrasprostranjenija hipoteza podrazumeva da pozitivno naelektrisani molekul hitozana reaguje sa negativno naelektrisanim grupama prisutnim na površini ćelija mikroorganizama [81]. Veruje se da antimikrobna aktivnost potiče od polikatjonske prirode hitozana, odnosno od elektrostatičkih sila između protonovane amino grupe (NH_3^+) hitozana i negativnih grupa prisutnih na površini citoplazmatične membrane [21];

(2) Hitozan hidrolizovan do manje molekulske mase difunduje kroz citoplazmatičnu membranu i reaguje sa molekulima DNK, što dovodi do inhibicije sinteze iRNK i sinteze proteina u ćeliji [81,85,90];

(3) Hitozan inhibira rast i razmnožavanje ćelija mikroorganizama helacijom hranljivih materija i bitnih metala [81];

(4) Na površini ćelije mikroorganizama hitozan može formirati polimernu membranu koja sprečava ulazak hranljivih materija u ćeliju, ili kod ćelija aerobnih mikroorganizama deluje kao prepreka za kiseonik inhibirajući tako njihov rast i razmnožavanje [81,85].

Različita fizička stanja i molekulske mase hitozana i njegovih derivata pokazuju specifične načine antibakterijskog delovanja. Ultrafine nanočestice hitozana male molekulske mase, zbog svoje rastvorljivosti u vodi, mogu da prodru kroz ćelijski zid bakterija i reaguju sa DNK i inhibiraju transkripciju DNK i sintezu iRNK u unutrašnjosti ćelije. Umesto toga, hitozan velike molekulske mase (koji može biti u čvrstom obliku ili rastvoren u vodi) uključujući nanočestice većih dimenzija, deluje na površinu citoplazmatične membrane tako što menja njenu propustljivost (ili obrazuje nepropusni sloj oko ćelije) i sprečava transport esencijalnih rastvornih materija u ćeliju [85].

Ustanovljeno je da različiti faktori imaju uticaja na antimikrobnu aktivnost hitozana kao što su: osobine mikroorganizama (vrsta i starost ćelija mikroorganizama), osobine hitozana (pozitivna gustina naelektrisanja, molekulska masa, koncentracija, hidrofilna/ hidrofobna svojstva i helatni kapacitet), fizičkog stanja hitozana (rastvorljivost u vodi i čvrsto stanje) i spoljnih faktora (jonska jačina sredine, pH vrednost, temperatura i dužina delovanja) [81,85].

Mehanizam i jačina antimikrobnog delovanja hitozana na ćelije mikroorganizama može u velikoj meri zavisiti od vrste i starosti samih ćelija mikroorganizama. Iako hitozan poseduje širok spektar antimikrobne aktivnosti, hitozan pokazuje različitu antimikrobnu efikasnost prema različitim vrstama plesni, Gram-pozitivnim i Gram-negativnim vrstama bakterija. Antifungalno dejstvo

hitozana sprečava sporulaciju i klijanje spora kod plesni [91]. Suprotno tome, antibakterijsko delovanje je složen proces, koji se razlikuje kod Gram-pozitivnih i Gram-negativnih vrsta bakterija, zbog njihove različite strukture ćelijskog zida [92]. Razlike u antimikrobnom dejstvu hitozana mogu se pripisati različitim osobinama mikroorganizama, budući da površinsko naelektrisanje ćelija mikroorganizama može da se menja u zavisnosti od vrste mikroorganizma [94]. Takođe, elektronegativnost površine ćelije menja se u zavisnosti od faze rasta mikroorganizama, što može dovesti do različite osetljivosti ćelija na hitozan [93].

1.3.2.2. Želatin

Želatin je prirodan, biokompatibilan, biorazgradiv i višefunkcionalan biopolimer [95]. Predstavlja polipeptid velike molekulske mase poreklom iz kolagena [96]. Sadrži oko 20 vrsta esencijalnih aminokiselina, koje su zastupljene u ljudskoj ishrani [43,97]. Proizvodi se hidrolizom sirovog kolagena [43], kada se visoko organizovana vlakna kolagena, koja su nerastvorna u vodi, prevode do depolimerizovanog sistema (želatina), koji je rastvorljiv u vodi. Velika raznolikost vrsta želatina povezana je sa složenom strukturom kolagena i raznovrsnošću hemijskih (kiselinski ili alkalni) i enzimskih tretmana koji se mogu primeniti u proizvodnji želatina [95,96,97].

Kolagen je najzastupljeniji biopolimer u živim organizmima. To je nerastvoran, vlaknasti protein koji se sastoji od tri polipeptidna lanca namotana jedan oko drugog. Nalazi se u ekstracelularnom matriksu i dominantan je protein u vezivnom tkivu [98]. Važna funkcija kolagena je održavanje celovitosti vezivnog tkiva, poput kostiju, hrskavice, rožnjače, tetiva, ligamenata, krvnih sudova i dentina [97]. Aminokiselinski sastav kolagena kod sisara je stalan, gde je 18 – 20 aminokiselina (koje se inače nalaze u proteinima) uvek prisutno. Kolagen se odlikuje visokim sadržajem glicina, prolina i hidroksiprolina [96]. Izolovani molekuli kolagena su dugi oko 280 nm, molekulske mase od $360 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$, a molekuli su stabilizovani vodoničnim i međumolekulskim vezama. Hemijska i enzimska hidroliza su uobičajene metode za pripremu kolagena [98]. Osnovni element u konfiguraciji kolagena je tropokolagen, koji se sastoji od tri lanca, od kojih je svaki levoruk. Lanci su isprepletani poput pramenova i međusobno povezani vodoničnim vezama čineći blagi, desnoruki superheliks. Različite kombinacije ova tri polipeptidna lanca dovode do formiranja različitih vrsta molekula tropokolagena (tip I, II, III, IV) (*Slika 1.11*) [96].

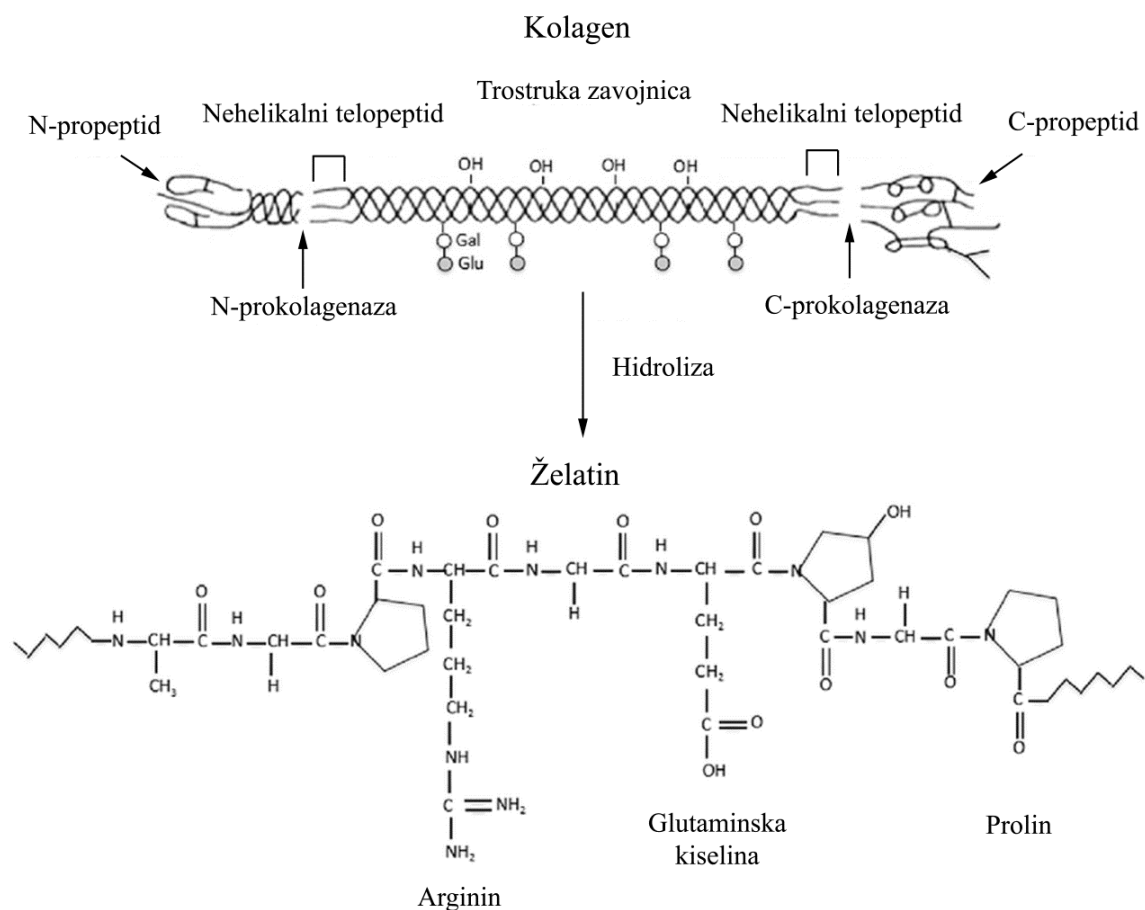
Želatini dobijeni od sisara (svinjski i goveđi) koriste se u regenerativnoj medicini poslednjih nekoliko decenija. Ovi želatini imaju slične polipeptidne strukture kao onaj humanog porekla. Želatini dobijeni iz ribe imaju znatno nižu tačku topljenja, nižu temperaturu geliranja, slabiju termičku stabilnost i veću viskoznost. Takođe, ovi želatini u svojim polipeptidnim lancima imaju relativno niži sadržaj peptida koji se ponavljaju (ili aminokiselinskih ostataka), kao što su prolinamid i hidroksiprolinamid [95,97].

Hidrolitički procesi prevođenja kolagena tipa I u želatin mogu se klasifikovati u tri grupe: fizičke, hemijske i enzimske. Čitav postupak od kolagena tipa I do želatina može se podeliti u tri faze: predobrada sirovine, ekstrakcija želatina i prečišćavanje i/ ili sušenje proizvoda. U zavisnosti od protokola koji se koriste za prethodnu obradu kolagena tipa I, pre postupka ekstrakcije, mogu se proizvesti dve glavne vrste želatina [95,97]:

- Želatin tipa A (sa izoelektričnom tačkom 9,0), koji se proizvodi kiselom hidrolizom sirovog kolagena u prisustvu neorganske kiseline (sumporne ili hlorovodonične). Sastoji se od 18,5% azota [43,97];
- Želatin tipa B (sa izoelektričnom tačkom 5,0), koji se dobija alkalnom hidrolizom kolagena tipa I, koristeći alkalni rastvor (NaOH). Sadrži 18% atoma azota bez amidne grupe (–CONH–). U ovom slučaju, amidne grupe asparagina i glutamina u molekulima kolagena tipa I hidrolizom se prevode u karboksilne grupe i dolazi do formiranja ostataka aspartata i glutamata u molekulima želatina [97].

Želatin tipa B je termolabilan pri niskim i povišenim temperaturama. Na povišenim temperaturama se topi i prelazi u savijenu namotanu formaciju, a na nižim temperaturama prelazi od namotane do helikoidne (spiralne) formacije. Može se modifikovati kompozitima i nanokompozitima zbog prisustva reaktivnih grupa kao što su $-\text{CONH}-$, $-\text{SH}-$ i $-\text{COOH}-$. Ima jedinstveno svojstvo umrežavanja i sposobnost stvaranja hidrogelova koji se koriste u biomedicinske svrhe (inženjerstvu tkiva, previjanju rana, genetičkom inženjerstvu i kontrolisanom otpuštanju lekova) [43].

Tokom hidrolitičkih procesa, tipična struktura trostruke zavojnice kolagena tipa I delimično se razbija na jednolančane molekule polimera (pojedinačni lanci) (*Slika 1.11*).



Slika 1.11. Struktura trostruke zavojnice kolagena tipa I i želatina [97]

Prosečna molekulska masa želatina je između 15 i 400 $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$. Teorijski gledano, svi želatini, bez obzira na poreklo, sastoje se od peptidnih jedinica koje se ponavljaju „glicin–X–Y“; pri čemu X i Y mogu biti bilo koje aminokiseline, a najčešće je u X–položaju prolin, a u Y–položaju hidroksiprolin. Sastav i sekvence aminokiselina u pojedinačnim lancima mogu se razlikovati u velikoj meri u zavisnosti od porekla želatina, što utiče na njegova konačna svojstva [96,97]. Prosečne dužine i molekulske mase polipeptidnih lanaca želatina zavise od nekoliko faktora, kao što su: poreklo sirovine, metode prethodne obrade i parametri hidrolitičke obrade (na primer pH vrednost, temperatura i vreme). Između pojedinačnih lanaca želatina postoje jake nekovalentne interakcije, poput Van der Valsovih sila, vodoničnih veza, elektrostatičkih i hidrofobnih interakcija [97].

Želatin se koristi u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji i medicini zbog njegovih jedinstvenih mehaničkih osobina. U medicini i farmaciji želatini se koristi kao matrice za implantate i kao stabilizatori u različitim vakcinama. Takođe, koriste se u intravenskim infuzijama,

tvrdim i mekim kapsulama, plazma ekspanderima, oblogama za rane, kao bioadhezivi u tkivima i hemostatima [95].

Kada se želatin stavi u hladnu vodu on nabubri, upijajući 5 do 10 puta više vode od sopstvene zapremine. Kada se zagreje do temperature iznad tačke topljenja, nabubrela želatina se rastvara i hlađenjem stvara gel. Ova sol-gel konverzija je reverzibilna i može se ponavljati, što omogućava njegovu primenu u nosačima lekova u farmaceutskoj industriji, a takođe, upotrebljava se u prehrambenoj industriji [95,96]. Želatinski gelovi počinju da se tope na temperaturama između 27 i 34 °C. Geliranje želatina nastaje mehanizmom nasumičnog obrtanja spiralne zavojnice. Regioni različitih polipeptidnih lanaca bogati aminokiselinama dobijaju spiralnu konformaciju hlađenjem. Ove zavojnice se stabilizuju vodoničnim vezama stvarajući trodimenzionalni gel [96].

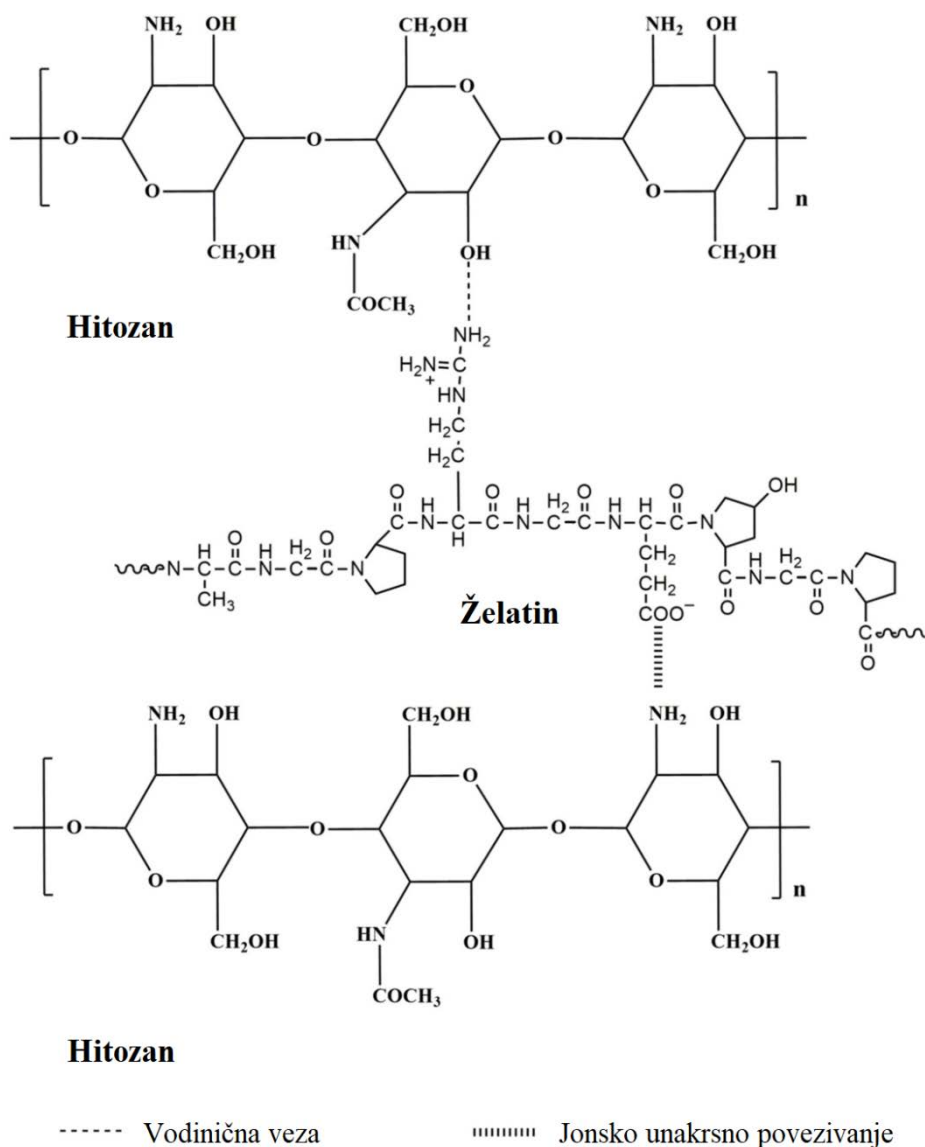
Želatinu se pripisuje dobra sposobnost stvaranja filma, ali njihova primena može biti otežana zbog visoke higroskopsnosti i relativno loših mehaničkih svojstava. Prema tome, filmovi na bazi želatina zahtevaju određene modifikacije. Hemijska modifikacija i enzimski tretmani do sada su najčešće primenjivani za poboljšanje fizičkih svojstava ovih filmova. Međutim, toksičnost i visoka cena nekih hemikalija i enzimskih preparata mogu ograničiti njihovu primenu. Mešanje želatina sa drugim biopolimerima predstavlja jedan od efikasnijih načina za poboljšanje fizičkih svojstava želatinskih filmova [75].

Filmovi i prevlake na bazi hitozana i želatina su značajni zbog svojih mehaničkih i dobrih barijernih svojstva za gasove (kiseonik), pri srednjem i niskom procentu relativne vlažnosti, pa se stoga mogu primeniti za poboljšanje kvaliteta i roka trajanja hrane [81,99]. Uprkos dobrim svojstvima jednodimenzionalnih hitozanskih i želatinskih filmova, oni imaju svoje nedostatke koji ograničavaju njihovu krajnju upotrebu. Obećavajuća strategija za prevazilaženje takvih ograničenja je stvaranje kompozita ili dvoslojnih filmova [99]. Mešanje želatina sa hitozanom je opcija koja obećava dobijanje biokompozita sa novim svojstvima. Zabeleženo je da su kompozitni filmovi na bazi hitozana i želatina (ili kolagena) poboljšali mehanička i fizička svojstva u poređenju sa svojstvima jednodimenzionalnih filmova [75]. Takođe, potvrđena su antioksidativna i antimikrobna svojstva ovakvih kompozita [100]. Sa aspekta propustljivosti vodene pare i mehaničkih osobina, dvoslojni filmovi na bazi hitozana/želatina pokazali su bolja svojstva nego kompozitni filmovi, dok su kompozitni filmovi pokazali znatno bolja antimikrobna svojstva [99].

1.3.2.3. Molekulske interakcije između hitozana i želatina

Hitozan ispoljava biokompatibilnost, biorazgradljivost, antioksidativno i antimikrobno dejstvo [101]. Kombinacijom hitozana sa želatinskom mogu se prevazići njegovi morfološki nedostaci, kao što je krutost. Želatin ispoljava dobra svojstva geliranja, tako da se stvaranjem kompozita postiže bolja elastičnost i fleksibilnost materijala. Želatin u svojoj strukturi sadrži slobodne amino i karboksilne grupe, koje utiču na smanjenje njegovog afiniteta prema vodi, dok prisustvo hidrofilnih funkcionalnih grupa na polimernom lancu povećava njegov afinitet prema vodi. Prilagodljiva lančana struktura želatina omogućava formiranje kompaktno umrežene polimerne matrice [102].

Kulkarni (*Kulkarni*) i saradnici [102] ispitivali su efekat različitih koncentracija želatina na fizička, hemijska i morfološka svojstva kompozitnih membrana hitozan-želatin. Hitozan je korišćen kao osnovni polimer, a membrane su dobijene metodom izlivanja. Na osnovu analiza infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom (FTIR) pokazano je da u ovim kompozitima dolazi do jonskog unakrsnog povezivanja između -COO^- grupa želatina i -NH^{3+} grupa hitozana. Takođe, dobijeni spektri ukazali su na pojačane među- i unutar-molekulske vodonične veze između ova dva biopolimera. Analizama skanirajuće elektronske mikroskopije (SEM) potvrđena je ugradnja želatina u hitozansku matricu i kompatibilnost između dva biopolimera, pri svim variranim koncentracijama. Interakcije između hitozana i želatina prikazane su na *Slici 1.12* [102].



Slika 1.12. Interakcije između hitozana i želatina [102]

Takođe, Čiao (*Qiao*) i saradnici su na osnovu reoloških, spektroskopskih, difraktometrijskih i kalorimetrijskih analiza ispitali opšte karakteristike molekularnih interakcija između hitozana i želatina u kompozitnim filmovima [75]. Tom prilikom došli su do zaključka da su želatin i hitozan potpuno kompatibilni, što omogućava formiranje kompozitnih filmova. Interakcije između želatina i hitozana bile su uslovljene elektrostatičkim interakcijama (uglavnom se javljaju između $-\text{COO}^-$ grupa želatina i $-\text{NH}^{3+}$ grupa hitozana) i vodoničnim vezama (formiraju se unutar i između polimernih lanaca, koji uključuju njihove karbonilne, hidroksilne i amino grupe). Uticaj ovih snažnih interakcija je dvojak, tako što sa jedne strane mogu olakšati stvaranje raznih kompleksa, što dovodi do dobrog mešanja želatina i hitozana. S druge strane, interakcije ometaju fizičko geliranje želatina, što dovodi do smanjenja sadržaja trostrukih spirala unutar filma [75].

Iako je pokazano da je ovakav kompleks biopolimera potpuno kompatibilan i da postoje jake molekulske veze, njegova praktična primena je ograničena prirodom samih biopolimera, koji ispoljavaju loša mehanička svojstva u vodenoj sredini [101].

Hitozan-želatin kompoziti pokazali su se kao dobre matrice za inkapsulaciju različitih aktivnih komponenti. Etarska ulja cimeta [100], karanfilica, komorača, čempresa, lavande, majčine dušice, bora i ruzmarina [103], origana [23], estragona [104] uspešno su inkapsulirana u ovakav polimerni

kompleks. Inkapsulirana etarska ulja pokazala su antioksidativno i antimikrobno dejstvo prema različitim vrstama mikroorganizama. Pokazalo se da ovakav sistem obezbeđuje stabilnost aktivnih komponenti i omogućava njihovo ciljano dejstvo. Takođe, u biopolimerni kompleks hitozan-želatin uspešno su ugrađene čestice metala kao što su: nanočestice cink-oksida [105,106], nanočestice srebra [107,108,109], bifazni kalcijum-fosfat [110], čije krajnje primene mogu biti raznovrsne.

1.3.3. Pektin-želatin kompleks kao polimerna matrica za inkapsulaciju

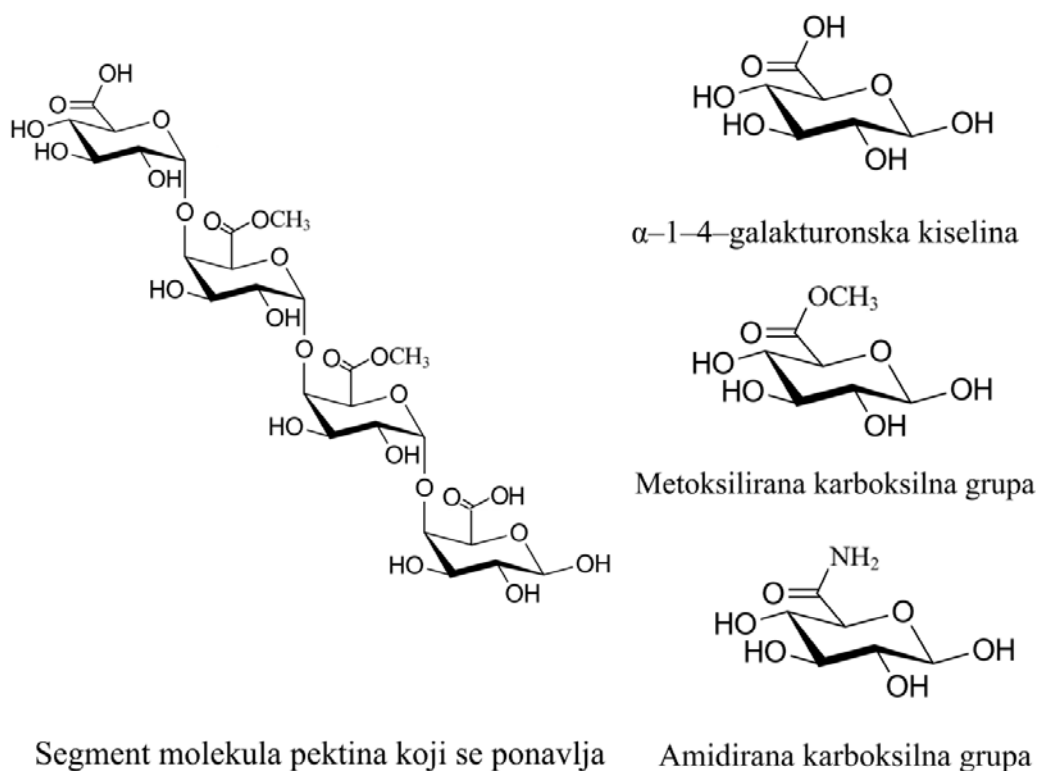
1.3.3.1. Pektin

Pektin je biljni biopolimer koji predstavlja jednu od glavnih komponenti ćelijskog zida viših biljaka. Čini oko jedne trećine suve materije ćelijskog zida i doprinosi strukturi biljne ćelije. Predstavlja složenu mešavinu polisaharida velike molekulske mase i smatra se jednim od najsloženijih makromolekula u prirodi [22,111,112]. Termin pektin obuhvata brojne polimere koji se razlikuju prema njihovoj molekulskoj masi, hemijskoj konfiguraciji, sadržaju neutralnih šećera, izvoru dobijanja i uslovima primenjenim tokom njihove izolacije [111,112]. Iako se pektin često javlja kod većine biljnih tkiva, broj sirovina koje se mogu koristiti za komercijalnu proizvodnju pektina je veoma ograničen [112].

Sposobnost pektina da formira gel zavisi od veličine molekula i stepena esterifikacije (DE, eng. „*degree of esterification*”), tako da pektin iz različitih izvora nema istu sposobnost geliranja zbog promenljivosti ovih parametara. Trenutno se komercijalni pektini skoro isključivo dobijaju iz kore citrusa ili komine jabuka, kao sporednih proizvoda u proizvodnji sokova (ili cidera). Citrusni pektini su svetlokrem ili svetlo žuto-smeđe boje, dok su jabučni pektini često tamniji. Alternativni izvori za dobijanje pektina su otpad šećerne repe (iz proizvodnje šećera), suncokreta (seme koje se koristi za proizvodnju jestivog ulja) i manga. Komercijalno, pektin se ekstrahuje tretiranjem sirovine sa vrućom razblaženom mineralnom kiselinom pri pH ~ 2 [112]. Pektin je rastvorljiv u vodi, ali je nerastvoran u većini organskih rastvarača. Stopa rastvorljivosti u vodi je povezana sa stepenom polimerizacije, brojem i distribucijom metil-estarskih grupa [111].

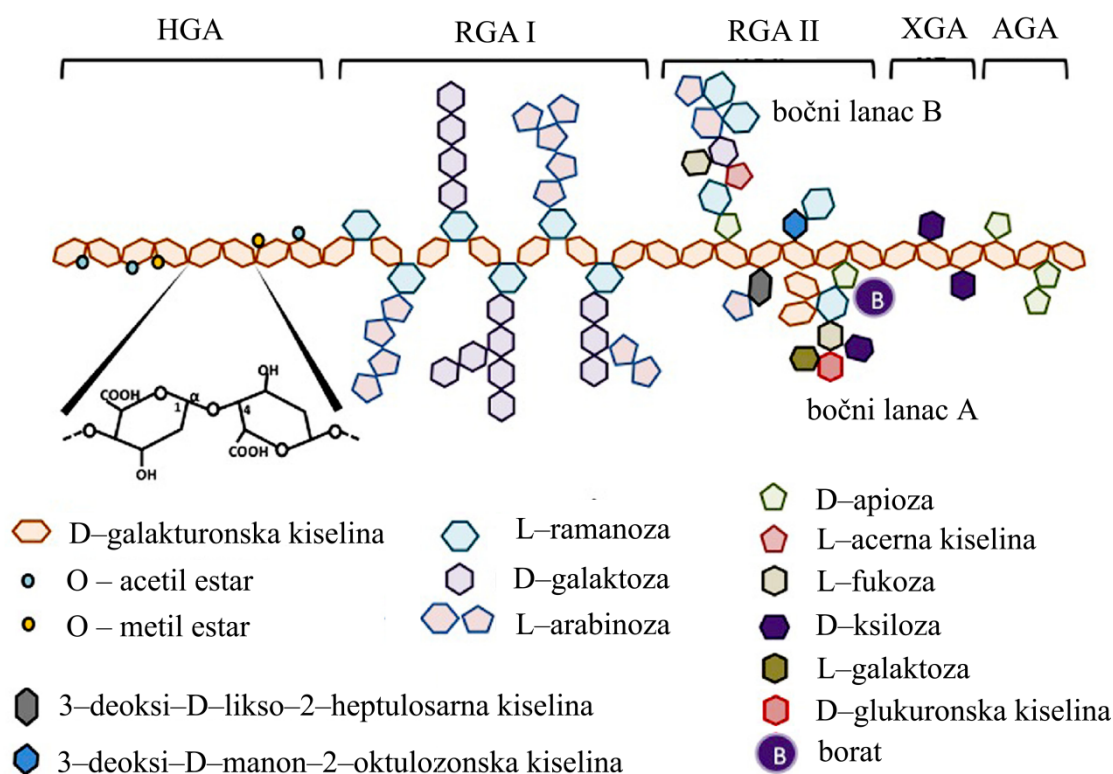
Pektin je u osnovi linearni polisaharid, koji se uglavnom sastoji od jedinica D-galakturonske kiseline (GalA) međusobno povezanih u lance α -(1-4)glikozidnim vezama preko atoma kiseonika. Sadrži od nekoliko stotina do oko 1000 saharidnih jedinica u lančanoj konfiguraciji, što odgovara u proseku molekulskoj masi od oko 50 do 150 kg·mol⁻¹ [111,112].

Hemijski gledano, pektin je poli α -1-4-galakturonska kiselina, sa različitim stepenom metilovanih ostataka karboksilne kiseline i/ ili amidiranih ostataka poligalakturonske kiseline (*Slika 1.13*). Metoksilirane karboksilne grupe se dobijaju esterifikacijom karboksilnih grupa galakturonske kiseline metanolom. Amidirane karboksilne grupe se dobiju kada se deo galakturonske kiseline pomoću amonijaka prevede u amid karboksilne kiseline [22,112].



Slika 1.13. Hemijska struktura α -1-4-galakturonske kiseline, α -1-4-galakturonske kiseline sa metoksiliranom karboksilnom grupom i α -1-4-galakturonske kiseline sa amidiranom karboksilnom grupom, koje učestvuju u izgradnji molekula pektina [22,112]

Pektin uvek sadrži i različite količine neutralnih šećera kao što su D-galaktoza, L-ramnoza, L-arabinoza i D-ksiloza. Neki od ovih neutralnih šećera su sastavni deo bočnih lanaca povezanih sa kosturom galakturonana. Međutim, 1,2-vezana L-ramnoza je prisutna u glavnom poligalakturonskom lancu, zbog čega dolazi do formiranja uvijene strukture molekulskog lanca. Takođe, ksiloza je veoma važan neutralni šećer u jabučnom pektinu, koji je vezan u samom homogalakturonskom lancu. Deo molekula bez bočnih lanaca je opisan kao „glatka regija“. Kada su u strukturu uključeni bočni lanci neutralnih šećera (koji su uglavnom koncentrisani u relativno kratkim segmentima) onada se taj deo galakturonskog lanca naziva „razgranata regija“ [111]. Tačna struktura pektina još uvek nije u potpunosti definisana. Do sada su tri glavna pektinska polisaharida izolovana iz biljaka i njihova struktura je identifikovana: homogalakturonan (HGA), ramnogalakturonan-I (RGA-I) i supstituisani galakturonani (GSA) [22,113] (**Slika 1.14**).



Slika 1.14. Šematski prikaz strukture pektina [113]

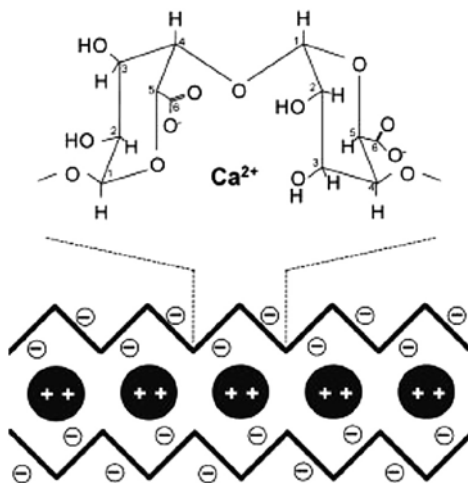
Homogalakturonan čini glavni deo molekula pektina (oko 65%) i formira „glatku regiju“. Predstavlja linearni lanac D-galaktopiranosiluronske kiseline (GalpA) vezane α -1-4 vezom, dok karboksilna grupa nekih ostataka može biti metil-esterifikovana [22,113]. Takođe, HGA mogu delimično biti O-acetilirani na C-3 ili C-2 (**Slika 1.14**) [113]. Ramnogalakturonan-I čini oko 20–35% molekula pektina i nalazi se u „visokorazgranatoj regiji“. Glavni lanac RGA-I je sastavljen od ponovljenih jedinica D-galaktopiranosiluronske kiseline (GalpA) i L-ramnopiranoze (Rhap) vezane $[\rightarrow 4) - \alpha -D-GalpA- (1 \rightarrow 2) - \alpha -L-Rhap- (1 \rightarrow]$. Ostaci D-galaktopiranosiluronske kiseline koji čine glavni lanac mogu biti O-acetilirani u C-3 ili C-2, ali obično nisu povezani sa monomerima ili bočnim lancima. Bočni lanci najčešće sadrže α -L-arabinofuranozil (Araf) i/ili galaktopiranozil (Galp). Ovi bočni lanci (arabini, galaktani ili arabinogalaktani) mogu biti linearni ili razgranati (**Slika 1.14**) [22,113].

Supstituisani galakturonani čine grupu različitih polisaharida čiji se linearni lanac sastoji od ostataka D-GalpA povezanih α -1,4 vezom (kao kod HGA) i na koje se vezuju drugi ostaci. Ovde spada ramnogalakturonan-II (RGA-II), čiji glavni lanac nije sastavljen od GalA-Rhap disaharida (kao kod RGA-I), već od HGA lanca. Četiri vrste lanaca sa strukturno različitim oligosaharidima povezane su sa glavnim lancem RGA-II. Ovi lanci se sastoje od 12 vrsta glikozidnih ostataka povezanih pomoću najmanje 22 vrste glikozidnih veza. Jedan monosaharid (bočni lanac B) i jedan oktasaharid (bočni lanac A) su vezani za C-2 nekih GalA ostataka iz glavnog lanca, a dva različita disaharida povezana su za C-3 glavnog lanca. Lokalizacija ovih bočnih lanaca, jedan u odnosu na drugi, još nije utvrđena. Ostali supstituisani galakturonani su opisani kod malog broja biljaka i tu spadaju: ksilogalakturonan (XGA) i apiogalakturonan (AGA). Ksilogalakturonan sadrži β -D-ksilozil (Ksilp) povezan za C-3 glavnog lanca. Apiogalakturonan sadrži monomere ili dimere β -D-apioduranozila (Apif) koji su vezani za C-2 i C-3 glavnog lanca [113].

Prema stepenu esterifikacije metanolom (DE) pektin može biti klasifikovan kao visoko metoksil pektin (HMP, eng. “*high methoxyl pectin*”) ili nisko metoksil pektin (LMP, eng. “*low methoxyl pectin*”), gde DE predstavlja odnos između esterifikovanih grupa galakturonske kiseline i ukupnih grupa galakturonske kiseline. HMP imaju preko 50% svojih esterifikovanih karboksilnih grupa (DE > 50), dok LMP imaju manje od 50% (DE < 50) [22,112]. DE vrednosti za komercijalne HMP obično se kreću od 60 do 75%, a za LMP od 20 do 40% [112].

Upotreba pektina zasniva se na njegovoj sposobnost geliranja. Step en esterifikacije utiče na svojstvo geliranja pektina, tako da HMP i LMP stvaraju gelove različitim mehanizmima [22,111,112]. U geliranju pektina uključene su različite intermolekulske interakcije. LMP formira gel u prisustvu multivalentnih jona, koji deluju kao most između parova karboksilnih grupa različitih pektinskih lanaca [22]. LMP nisu osetljivi na promene pH vrednosti, proizvode gelove nezavisno od sadržaja šećera i zahtevaju kontrolisane količine kalcijuma ili drugih dvovalentnih katjona za geliranje [112].

Kod geliranja LMP javlja se model koji je poznat kao „kutije za jaja” (eng. “*egg box*”) (Slika 1.15). Ovaj oblik nastaje između dva susedna polimerna lanca i stabilizovan je Van der Valsovima interakcijama i vodoničnim vezama uz elektrostatičke interakcije. Geliranje LMP uključuje elektrostatičke interakcije između katjona i negativno naelektrisanih šupljina formiranih od polimernih lanca, u kojima su umetnuti katjoni [22].



Slika 1.15. Šematski prikaz modela „kutija za jaja” na primeru pektin-kalcijum gela. Lanci poligalakturonske kiseline su predstavljeni crnim linijama, joni kalcijuma (Ca^{2+}) crnim krugovima, a karboksilne grupe u polimernom lancu belim krugovima [114]

Formiranje gelova kog HMP dešava se u kiseloj sredini (pH vrednost oko 3,0) uz dodatak različitih šećera, poput saharoze ili glukoze, u uslovima gde su smanjene elektrostatičke odbojne sile i aktivnost vode [22,111,112]. HMP zahteva minimalne količine rastvorljivih čvrstih supstanci kako bi se formirali gelovi [112], a umrežavanje nastaje stvaranjem polimernih lančanih agregata različitih veličina [22]. HMP gelovi su termički reverzibilni, rastvorljivi su u toploj vodi i često sadrže sredstvo za disperziju (za sprečavanje stvaranja aglomerata), kao što je dekstroza [112].

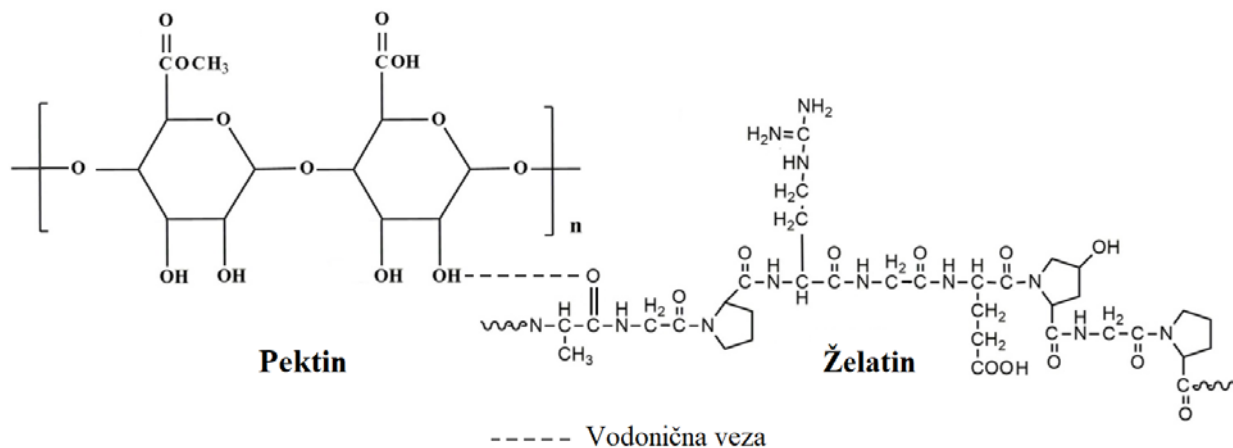
Pektin je odobren od strane FDA kao bezbedan i uspešno se koristi duži niz godina u prehrambenoj industriji i industriji pića, kao sredstvo za zgušnjavanje, geliranje, stabilizaciju (u proizvodima poput džemova, napitaka od jogurta, voćnih mlečnih napitaka i sladoleda). Takođe, pektin ima nekoliko jedinstvenih svojstava zbog kojih može da se koristi kao matrica za inkapsulaciju i/ ili dostavu različitih lekova, proteina i ćelija, pa stoga pronalazi sve veću primenu u biotehnologiji i farmaceutskoj industriji [22,112].

Pored navedenih dobrih osobina pektina, kao materijala za inkapsulaciju, pektinski filmovi su pokazali nisku termijsku stabilnost i loša mehanička svojstva. Pektin se zbog toga primenjuje pomešan sa različitim polimerima radi poboljšanja toplotne i mehaničke stabilnosti [115]. Postoji više metoda kojima se može postići proizvodnja pektinskih filmova, kao što su izlivanje, ekstruzija, prskanje i oblaganje nožem [22].

1.3.3.2. Molekulske interakcije između pektina i želatina

Kompleks pektin-želatin do sada je najčešće korišćen za inkapsulaciju lekova u cilju njihovog kontrolisanog otpuštanja, primenom metode kompleksne koacervacije [116,117,118].

Jedno od istraživanja tokom koga je ispitano umrežavanje pektina i želatina odnosi se na formiranje hidrogelne membrane za potencijalnu primenu u previjanju rana [115]. Mišra (*Mishra*) i saradnici [115] su varirali različite odnose pektina i želatina, a glutaraldehid je korišćen kao sredstvo za umrežavanje. Na osnovu FTIR analize ovih hidrogelova pokazano je da dolazi do jakih međumolekulskih interakcija između pektina i želatina. Na osnovu spektara utvrđeno je da je došlo do smanjenja intenziteta pikova koji potiču od –OH vibracionih istezanja, u poređenju sa uobičajenim –OH istezanjem čistog pektina i želatina. Ovo se pripisuje povećanju broja vodoničnih veza ili snažnim međumolekulskim interakcijama između pektina i želatina (*Slika 1.16*). Termijska analiza filmova je pokazala da uključivanje želatina u hidrogelnu mrežu poboljšava termijsku stabilnost kompleksa. Analiza brzine prenosa vodene pare ukazala je da membrane zadržavaju vlagu [115].



Slika 1.16. Mehanizam vezivanja i umrežavanja pektina i želatina vodoničnim vezama [115]

Liu (*Liu*) i saradnici su u svojim preliminarnim istraživanjima pokazali da kompozitni filmovi na bazi pektin-protein pokazuju bolju otpornost na vlagu u poređenje sa pektinskim filmovima ili pektin-skrobnim filmovima [119]. U drugom istraživanju, gde su ispitivali kompozitne filmove na bazi pektina i želatina iz riblje kože ili proteina iz sojinog brašna, rezultati su ukazali da je uključivanje proteina u pektinske filmove poboljšalo i mehaničku čvrstoću i fleksibilnost filmova. Takođe, pokazano je da dodatak sredstva za umrežavanje (glutaraldehid/ metanol) dodatno povećava čvrstoću i smanjuje propustljivost vodene pare, uz zadržavanje fleksibilnosti. Na osnovu SEM analize je potvrđeno da filmovi sa glutaraldehidom pokazuju dobru strukturnu heterogenost, uz uklanjanje pukotina i praznina nastalih tokom umrežavanja polimera [120].

Primer upotrebe polimernog kompleksa pektin-želatin, kao sistema za inkapsulaciju etarskih ulja, objavljen je u literaturi [121], kada su etarska ulja pitome nane (*Mentha pulegium* L.) i lavande (*Lavandula angustifolia* L.) inkapsulirana u kompozitne filmove pektin-želatin i primenjena da bi se produžio rok trajanja ribljih fileta. Ovaj sistem se pokazao kao efikasno aktivno pakovanje [121].

1.3.4. Primena plastifikatora u polimernim matricama

Plastifikatori su klasa neisparljivih jedinjenja, male molekulske mase, koja se koriste kao dodaci polimernim materijalima (plastika, filmovi na bazi biopolimera, boje i lepkovi) [122,123]. To su linearni ili ciklični lanci ugljenika (14 – 40 atoma ugljenika), uglavnom tečnosti sa visokom tačkom ključanja [122]. Njihova primarna uloga je da poboljšaju fleksibilnost, plastičnost i obradivost polimera, snižavanjem temperature staklastog prelaza [122-124]. Plastifikator je definisan od strane IUPAC-a („Međunarodna unija čistih i primenjenih hemija”) kao „supstanca ili sastojak ugrađen u materijal kako bi se povećala njegova fleksibilnost, obradivost ili rastegljivost“ [122-124]. Male veličine molekula im omogućavaju da zauzmu međumolekularni prostor između polimernih lanaca, smanjujući tako sekundarne sile između njih. Ovi molekuli tako menjaju trodimenzionalnu molekularnu organizaciju polimera, smanjujući energiju potrebnu za kretanje molekula i formiranje vodoničnih veza između lanaca. Kao posledica toga, dolazi do povećanja slobodne zapremine, a time i molekulske pokretljivosti. Stepenn plastičnosti materijala na bazi polimera u velikoj meri zavisi od hemijske strukture korišćenog plastifikatora, njegove molekulske mase i prisutnih funkcionalnih grupa [122,124].

Faktori koji određuju izbor plastifikatora za određeni sistem su: kompatibilnost između komponenti; količina potrebna za plastifikaciju; način obrade; željena termijska, električna i mehanička svojstva krajnjeg proizvoda; postojanost; otpornost na vodu, hemikalije i sunčevo zračenje; toksičnost i cena. Kompatibilnost između plastifikatora i polimera je od velikog značaja za efikasnu plastifikaciju i različiti parametri mogu uticati na ovu osobinu, uključujući polaritet, stvaranje vodoničnih veza, dielektričnu konstantu i parametar rastvorljivosti. Rastvorljivost predstavlja važan faktor, jer plastifikatorima sa parametrima rastvorljivosti bliskim parametrima polimera potrebno je manje energije za povezivanje sa polimerom [122].

Mehanizmi plastifikacije se mogu odvijati po jednom od sledećih pravila:

- (1) Teorija maziva: plastifikator deluje kao mazivo, koje ne ispoljava sile vezivanja sa polimernim lancima;
- (2) Teorija gela: plastifikator narušava interakcije polimer-polimer uključujući vodonične veze, Van der Valsove i jonske sile;
- (3) Teorija slobodne zapremine: plastifikator smanjuje temperaturu staklastog prelaza povećanjem pokretljivosti polimernih lanaca [123,125];
- (4) Teorija namotane opruge: efekat plastifikacije usled zamršenih makromolekula [123].

Osnovni koncept prve tri navedene teorije je da se plastifikator umetne između polimernih lanaca, menjajući tako sile i raskidajući veze koje drže lance zajedno [123,125].

U tehnologiji izlivanja filmova/ prevlaka primena plastifikatora je potrebna, posebno kada je reč o biopolimernim materijalima. Biopolimerni filmovi su često kruti i kruti zbog brojnih interakcija između polimernih lanaca [101,115,123]. Dodatkom plastifikatora u biopolimerne filmove utiče se na održavanje celovitosti, tako da se mogu izbeći pore i pukotine u polimernoj matrici [120,122]. Nekompatibilnost između biopolimera i plastifikatora obično se prepoznaje razdvajanjem faza između biopolimera i plastifikatora, u vidu izdvojenih kapljica na površini proizvoda neposredno nakon mešanja ili tokom nanošenja finalnog proizvoda [122].

Plastifikatori koji se primenjuju u biopolimernim filmovima mogu se podeliti na rastvorljive i nerastvorljive u vodi. Vrsta i količina plastifikatora snažno utiču na proces stvaranja filmova iz vodenih polimernih disperzija. Kada se hidrofilni plastifikatori dodaju polimernim disperzijama, oni se rastvaraju u vodenom rastvoru, i ako se dodaju u velikoj koncentraciji, mogu dovesti do povećanja difuzije vode u polimer. Nasuprot tome, hidrofobni plastifikatori mogu zatvoriti mikro šupljine u filmu, što dovodi do smanjenja unosa vode. Međutim, plastifikatori nerastvorni u vodi mogu uzrokovati odvajanje faza, što dovodi do gubitaka fleksibilnosti ili do stvaranja zona

diskontinuiteta tokom sušenja filma, a kao posledica toga, povećava se propusnost vodene pare. Potpuno preuzimanje nerastvorljivog plastifikatora od strane polimera može se postići optimalnom brzinom mešanja polimerne disperzije sa plastifikatorom [122-124].

Prema sirovinama iz kojih se dobijaju, plastifikatori se mogu podeliti na one na bio-bazi i na bazi nafte. Upotreba plastifikatora na bazi nafte dovedena je u pitanje zbog njihove toksičnosti i visokog stepena migracije, usled čega je došlo do potražnje za novim nisko-toksičnim plastifikatorima na prirodnoj bazi sa niskom stopom migracije. Idealan "zeleni" plastifikator treba da bude: (1) netoksičan, (2) dobro mešljiv sa polimerom, (3) efikasan kao konvencionalni plastifikatori, (4) visoko otporan na ispiranje iz polimera, (5) relativno jeftin [124].

Plastifikatori na prirodnoj bazi mogu se dobiti iz nusproizvoda i otpada poljoprivredne industrije, tako da su održivi, jeftini i uglavnom iz dostupnih resursa. Skrob i celuloza dobijeni iz pšenice, kukuruza, slame ili krompira, prevode se u nekoliko šećera i saharidnih derivata koji se mogu koristiti kao plastifikatori (manoz, glukoza, fruktoza, sorbitol, ksilitol, manitol). Biljna ulja (trigliceridi) koja potiču od soje, lanenog semena, palme, ricinusa, koriste se za dobijanje nekih plastifikatora (glicerol, kardanol, izosorbid estar) posle hemijskih modifikacija. Zatim, limunska kiselina (dobijena iz šećerne trske, cvekle ili citrusnog voća) hemijskim reakcijama može se prevesti u različite citrate i itakonate koji se koriste kao plastifikatori. Takođe, drugi molekuli kao što su aminokiseline, voskovi ili lecitin proučavani su kao plastifikatori za jestive ili biorazgradive filmove [124].

Plastifikatori koji su najčešće u upotrebi u biopolimernim filmovima su polioli, mono-, di- i oligosaharidi. Utvrđeno je da su polioli posebno efikasni u plastifikaciji hidrofилnih polimera [122,126], zbog svoje sposobnosti da smanje broj unutrašnjih vodoničnih veza, uz povećanje međumolekulskog razmaka [124]. U poslednje vreme, predmet mnogih istraživanja bio je upotreba prirodnih plastifikatora u jestivim i/ ili biorazgradivim filmovima, gde su najčešće bili korišćeni: polioli (glicerol, etilen glikol, dietilen glikol, trietilen glikol, tetraetilen glikol i polietilen glikol, propilen glikol, sorbitol, manitol i ksilitol), masne kiseline, monosaharidi (glukoza, manoz, fruktoza, saharoz), etanolamin, urea, trietanolamin, biljna ulja, lecitin, voskovi, aminokiseline, surfaktanti i voda. Takođe, voda, koja je glavni rastvarač biopolimera smatra se plastifikatorom, jer njeni molekuli smanjuju temperature staklenog prelaza i povećavaju slobodnu zapreminu biopolimera [122].

Glicerol (GLI) je jednostavan polioli koji sadrži tri hidroksilne grupe, odgovorne za njegovu rastvorljivost u vodi. To je jedan od najčešće korišćenih poliola za plastifikaciju jestivih i biorazgradivih filmova, jer je kao aditiv odobren za hranu od strane FDA i ima visoku termičku stabilnost, polaran je i neisparljiv [124]. Predstavlja visoko higroskopni molekul i dodaje se rastvorima za formiranje filma kako bi se sprečila njihova krtost [122,126].

1.4. Aktivne komponente

1.4.1. Etarska ulja kao aktivne komponente

Etarska ulja su prirodne aromatične supstance sa određenim biološkim svojstvima (antioksidativno, antimikrobno, antitumorno, analgetsko, insekticidno i antidijabetsko) [9,16,127]. Dobijaju se postupcima ekstrakcije iz različitih delova biljaka [128-130] i fizički se mogu odvojiti od drugih biljnih sastojaka i membranskog tkiva. Sastoje se od lipofilnih i visoko isparljivih sekundarnih biljnih metabolita [131]. Prema „Međunarodnoj organizaciji za standardizaciju” (ISO, eng. *“International Organization for Standardization”*), izraz „etarsko ulje“ rezervisan je za „proizvod dobijen iz biljnih sirovina, parnom ili vodenom destilacijom, ili mehaničkim postupkom iz epikarpa citrusnog voća, ili suvom destilacijom“ (ISO 9235, 1997), odnosno samo fizičkim putem. Većina etarskih ulja dostupnih na tržištu dobija se destilacijom vodenom parom [131]. Etarska ulja namenjena za primenu u medicini moraju biti u skladu sa nacionalnom ili međunarodnom farmakopejom. Što se tiče unosa hranom, FDA je uvrstila većinu etarskih ulja u bezbedne aditive za hranu [41,131].

Po hemijskom sastavu, etarska ulja su veoma složene prirodne smeše [130]. Identifikovano je više različitih, ali često strukturno bliskih bioaktivnih jedinjenja u njihovom sastavu [131]. Mogu sadržati oko 20 – 60 bioaktivnih jedinjenja zastupljenih u prilično različitim koncentracijama, pri čemu su dva ili tri glavna bioaktivna jedinjenja prisutna u visokim koncentracijama (20 – 70%), u poređenju sa ostalim sastojcima (prisutnim u tragovima), koja određuju njihova biološka svojstva [130]. Uglavnom se bioaktivna jedinjenja etarskog ulja mogu svrstati u lipofilne terpenoide, fenilpropanoide ili kratkolančane derivate alifatičnih ugljovodonika male molekulske mase. Terpenoidi različitih hemijskih klasa kao što su: ugljovodonici, ketoni, alkoholi, oksidi, aldehidi, fenoli ili estri, imaju glavnu ulogu u etarskim uljima [131]. Sastav etarskih ulja određuje njihove fizičke, hemijske i biološke karakteristike [132]. Postoji više faktora koji utiču na njihov sastav i zastupljenost glavnih bioaktivnih jedinjenja, kao što su: stanište, klimatske karakteristike, deo biljke koji se koristi za ekstrakciju i metoda ekstrakcije [16,103].

Bioaktivna jedinjenja etarskog ulja lako prelaze jedna u druge oksidacijom, izomerizacijom, ciklizacijom ili reakcijama dehidrogenacije, pokrenutih enzimskim ili hemijskim dejstvom. Ovo se dešava budući da su terpenoidi isparljivi, termolabilni i mogu se lako oksidovati ili hidrolizovati u zavisnosti od njihove strukture. Takođe, hemijski sastav etarskih ulja zavisi i od uslova tokom prerade i skladištenja biljnog materijala, destilacije, kao i od primenjenih postupaka tokom rukovanja samim uljem [131].

Na stabilnost etarskih ulja u velikoj meri mogu uticati spoljni faktori poput temperature, svetlosti, dostupnosti atmosferskog kiseonika, kao i prisustva nečistoća (joni teških metala). Smatra se da ultraljubičasta (UV) i vidljiva (Vis) svetlost ubrzavaju procese autoksidacije, podstičući uklanjanje vodonika što dovodi do stvaranja alkil radikala. Sa povećanjem temperature dolazi do ubrzanja hemijskih reakcija. Suprotno tome, niže temperature omogućavaju bolje rastvaranje kiseonika u tečnostima, što zauzvrat može negativno uticati na stabilnost etarskog ulja. Reakcije oksidacije smatraju se glavnim uzročnicima kvarenja etarskih ulja. Oksidacija etarskih ulja može se ubrzati sa povećanjem koncentracije rastvorenog kiseonika, što opet u velikoj meri zavisi od parcijalnog pritiska kiseonika u spoljnoj sredini, kao i od temperature okoline. Kada nema mešanja, difuzija kiseonika u etarsko ulje odvija se postepeno tokom vremena. Smatra se da teški metali, posebno joni bakra i gvožđa, podstiču autoksidaciju, naročito ako su u etarskom ulju već prisutni hidroperoksidi [131].

Osim što se koriste kao aromatične supstance, etarska ulja predstavljaju „zelenu“ alternativu u poljoprivredi, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji, zbog utvrđenih antimikrobnih, nematocidnih, insekticidnih i antioksidativnih svojstava, pa čak i aktivnosti koje stimulišu nervni sistem. Etarska ulja mogu posedovati više različitih i kombinovanih karakteristika, pa prema tome

imaju i brojne primene. Mogu se koristiti kao antioksidansi i konzervansi u hrani ili se mogu ugraditi u materijale za pakovanje hrane. Takođe, sve više se razmatra njihova primena kao sredstva za zaštitu bilja i useva [131,133].

1.4.1.1. Etarsko ulje limunove trave (*Cymbopogon citratus* L.)

Rod *Cymbopogon* obuhvata oko 180 vrsta i podvrsta, a najvažnije vrste ovog roda su: *Cymbopogon flexuosus* Stapf. (istočnoindijska limunova trava), *Cymbopogon citratus* DC Stapf. (zapadnoindijska limunova trava), *Cymbopogon nardus* L., *Cymbopogon winterianus* Jowitt (citronela), *Cymbopogon martinii* Roxb. (palmarosa), *C. nardus* i *C. jwarancusa* (Jones) Schult [134,135]. Glavna bioaktivna jedinjenja u ovim etarskim uljima su monoterpeni, kao što su: citral (izomerna smeša geraniala (α -citral) i nerala (β -citral)), geraniol, citronelol, citronelal, linalool, elemol, 1,8-cineol, limonen, β -kariofilen, metil heptenon, geranil acetat i geranil format [135].

Etarska ulja iz različitih vrsta roda *Cymbopogon* (*Poaceae*) imaju značajnu primenu zbog svojih antimikrobnih i insekticidnih aktivnosti [38,135]. Takođe, ova etarska ulja pokazala su potencijalnu primenu u različitim metodama kontrole štetočina, što predstavlja alternativu sintetičkim hemijskim pesticidima. Lako su dostupna, imaju prijatnu aromu, netoksična su i bezbedna po ljudsko zdravlje [39].

Cymbopogon citratus L., poznata još i kao limunova trava (**Slika 1.17**), jedna je od najpoznatijih vrsta roda *Cymbopogon*. Poreklom je iz Azije (Indokina, Indonezija i Malezija), Afrike i Amerike, ali se gaji i u umerenim i tropskim predelima sveta [134]. *C. citratus* je višegodišnja, tropska trava sa tankim i dugim listovima [38]. Etarsko ulje limunove trave ekstrahuje se destilacijom vodenom parom iz suvog ili svežeg lišća biljke. Predstavlja jednu od najčešće korišćenih biljaka u zapadnoj Africi, sa najraznovrsnijom primenom u narodnoj medicini kao lek protiv kašlja, gripa, glavobolje, artritisa, gube, malarije i kod zapaljenskih procesa. Objavljeno je više istraživanja u kojima je pokazano potencijalno antiupalno, antitumorno, antikancerogeno, antidijabetsko, antioksidativno, antihipertenzivno, kao i antimikrobno i insekticidno dejstvo ove biljke [134]. *C. citratus* je snažan antimikrobni i antioksidativni bioproizvod, koji se koristi u konzerviranju hrane kao alternativa sintetičkim jedinjenjima [136].



Slika 1.17. *Cymbopogon citratus* L. (limunova trava)
(izvor: <https://stock.adobe.com/>)

Hemijski sastav etarskog ulja *C. citratus* može se menjati u zavisnosti od geografskog porekla biljke. Supstance izolovane iz biljke sadrže jedinjenja kao što su: terpenoidi, tanini, steroli, fenoli, ketoni, flavonoidi i šećeri. [134], gde su glavna bioaktivna jedinjenja oksogenisani monoterpenoidi [136]. Glavna bioaktivna jedinjenja koja ulaze u sastav ovog etarskog ulja su neral (α -citral) i geranial (β -citral), a u manjim količinama zastupljeni su nerol, geraniol, citronelol, terpinolen, geranil acetat, mircen, α -terpineol i druga jedinjenja [137].

Pokazalo se da glavna bioaktivna jedinjenja etarskog ulja limunove trave u *in vitro* uslovima sprečavaju rast i razmnožavanje različitih patogenih vrsta bakterija koje dovode do kvarenja hrane: *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus aureus* i mnoge druge. [136,138]. U prehrambenoj industriji etarsko ulje limunove trave do sada je primenjivano kao prirodni biokonzervans za sprečavanje kvarenja hrane i rasta i razmnožavanja vrsta plesni koje proizvode mikotoksine, kao što je to vrsta *Aspergillus flavus* izolovana iz pirinča čuvanog u skladištima, kao i vrste roda *Phytophthora* odgovornih za ozbiljna oštećenja kod useva pre i posle žetve [136].

Kao što je već spomenuto u **Odeljku 1.2.1.**, etarska ulja se mogu inkapsulirati različitim metodama. Jedna od tehnika koja se najčešće primenjuje za zaštitu i stabilizaciju etarskih ulja u aktivnom pakovanju hrane je metoda emulzifikacije [133]. U **Tabeli 1.2** navedeni su primeri etarskih ulja koja su inkapsulirana u biopolimere određenom metodom, za primenu u aktivnoj ambalaži, kao i njihova antimikrobna aktivnost.

Tablela 1.2. Primeri antimikrobne aktivnosti različnih etarskih ulja inkapsuliranih u biopolimerne materijale za primenu u aktivnom pakvanju

Etarsko ulje	Polimerni sistem/ matrica	Postupak formiranja materijala	Antimikrobna aktivnost	Testiranje na hrani	Referenca
Lavanda	Želatin	Emulzifikacija, formiranje filmova metodom izlivanja	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> i <i>L. monocytogenes</i>	Čeri paradajz	[139]
Limunova trava	Hitozan-želatin i pektin- želatin	Emulzifikacija, filmovi dobijeni metodom izlivanja, prevlake dobijene sprej metodom	<i>In vitro</i> uslovi: <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> i <i>S. aureus</i> . <i>In vivo</i> uslovi: <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> spp., plesni i kvasci.	Sveže maline (<i>Rubus idaeus</i> L.)	[140]
Origano	Skrob od slatkog krompira	Filmovi dobijeni izlivanjem rastvora	Antibakterijska aktivnost prema <i>S. aureus</i> i <i>E. coli</i>	–	[141]
Cimet	Hitozan	Jestivi polielektrolitni filmovi dobijeni izlivanjem rastvora	Antibakterijska aktivnost prema <i>S. aureus</i> i <i>E. coli</i>	–	[142]
<i>Rosmarinus officinalis</i> L., <i>Artemisia herba alba</i> Asso, <i>Ocimum basilicum</i> L. i <i>Mentha pulegium</i> L.	Natrijum alginat	Jestivi filmovi dobijeni izlivanjem rastvora	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterococcus faecium</i> <i>Salmonella enterica</i> , , <i>Enterococcus faecalis</i> <i>K. pneumoniae</i> i.	–	[143]
Bergamot	Sojin protein/ nanoceluloza	Emulzifikacija, filmovi dobijeni metodom izlivanja	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> <i>L. monocytogenes</i> i <i>S.aureus</i>	–	[144]

Karanfilić	Hitozan	Jestivi filmovi na bazi hitozana dobijeni iz “pickering” emulzije stabilizovane zeinom	<i>E. coli</i> i <i>S. aureus</i>	–	[145]
Majoran	Pektin	Filmovi dobijeni izlivanjem rastvora nano-emulzije i “pickering” emulzije	<i>E. coli</i> i <i>S. aureus</i>	–	[146]
Cimet	Izolat proteina surutke ugrađen u nanovlakna hitozana	Etarsko ulje ugrađeno u nano-strukturirani lipidni nosač ultrazvukom; Nanokompozitni fimovi metodom izlivanja	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> i <i>P. aeruginosa</i>	–	[147]

1.4.2. Nanočestice metala kao aktivne komponente

Jedno od efikasnih i inovativnih rešenja za sprečavanje rasta i razmnožavanja patogenih vrsta mikroorganizama koje se prenose hranom, zajedno sa očuvanjem njenog kvaliteta, svežine i bezbednosti, jeste upotreba nanočestica. Pored uobičajenih antimikrobnih agenasa, biocidni agensi u nanorazmeri su od velikog interesa zbog svoje visoke reaktivnosti i efikasnosti [26].

Do danas su uvedene mnoge neorganske i metalne nanočestice u materijale za aktivno pakovanje i duži roka trajanja hrane [26]. Upotreba nanočestica omogućila je razvoj materijala sa novim svojstvima, kao što su sposobnost oksidacije etilena ili vezivanje kiseonika. Fotoaktivni titan-dioksid može oksidovati etilen u vodu i ugljen-dioksid, kontrolisati razvoj mikroorganizama i delovati kao „hvatač“ kiseonika. Takođe, u nekim istraživanjima nanočestice srebra pokazale su se kao blokatori etilena i dobar antimikrobni agens za postizanje dužeg roka trajanja namirnica [148].

Pokazano je da nanočestice u malim dozama obezbeđuju snažnu, ciljanu i produženu antimikrobnu aktivnost. Antimikrobna efikasnost nanomaterijala povezana je sa strukturnim i fizičkim svojstvima, kao što su veličina, oblik i/ ili zeta potencijal [149]. Zbog dimenzija manjih od ćelija bakterija i velikog odnosa površine i zapremine, metalni nanomaterijali postižu snažnu antibakterijsku interakciju sa ćelijama bakterija i biofilmovima (brže reakcije i veće brzine prodiranja) [26,149].

Nanočestice metala koje su obično antimikrobni agensi uključuju titan, srebro, cink, selen, bakar, magnezijum i zlato. Takođe, značajno interesovanje privukle su neke od nanočestica na bazi oksida metala, uključujući TiO_2 , ZnO , MgO i CaO [26,148]. Ovi oksidi su otporni na ekstremne uslove obrade i ispoljavaju snažne mikrobiocidne efekte prema patogenim vrstama mikroorganizama koje se prenose hranom. Veličine nanočestica se kreću u opsegu od 1 do 100 nm, a nanočestice koje se primenjuju u određenom materijalu ispoljavaju potpuno različite fizičke i hemijske karakteristike u poređenju sa onim u makro-razmeri [26].

Nanočestice različitih metala su ugrađivane u filmove za pakovanje i pokazana je njihova antimikrobna aktivnost prema vrstama mikroorganizama koji su uzročnici kvarenja ili trovanja hranom. Srebro, cink-oksidi, titan-dioksid i bakar su ugrađeni u filmove, a zatim primenjeni na hrani kako bi se poboljšao njen kvalitet tokom skladištenja [148]. Pakovanje koje sadrži nanočestice ima prednosti, kao što je smanjenje upotrebe konzervansa i veći procenat inhibicije rasta i razmnožavanja mikroorganizama. Bez obzira na to, bezbednost upotrebe metalnih i neorganskih nanočestica u ambalaži za hranu su i dalje glavno ograničenje i potrebno je sprovesti više istraživanja zajedno sa kliničkim ispitivanjima pre njihove masovne proizvodnje [26].

1.4.2.1. Mehanizam antimikrobnog delovanja nanočestica metal-oksida i jona metala

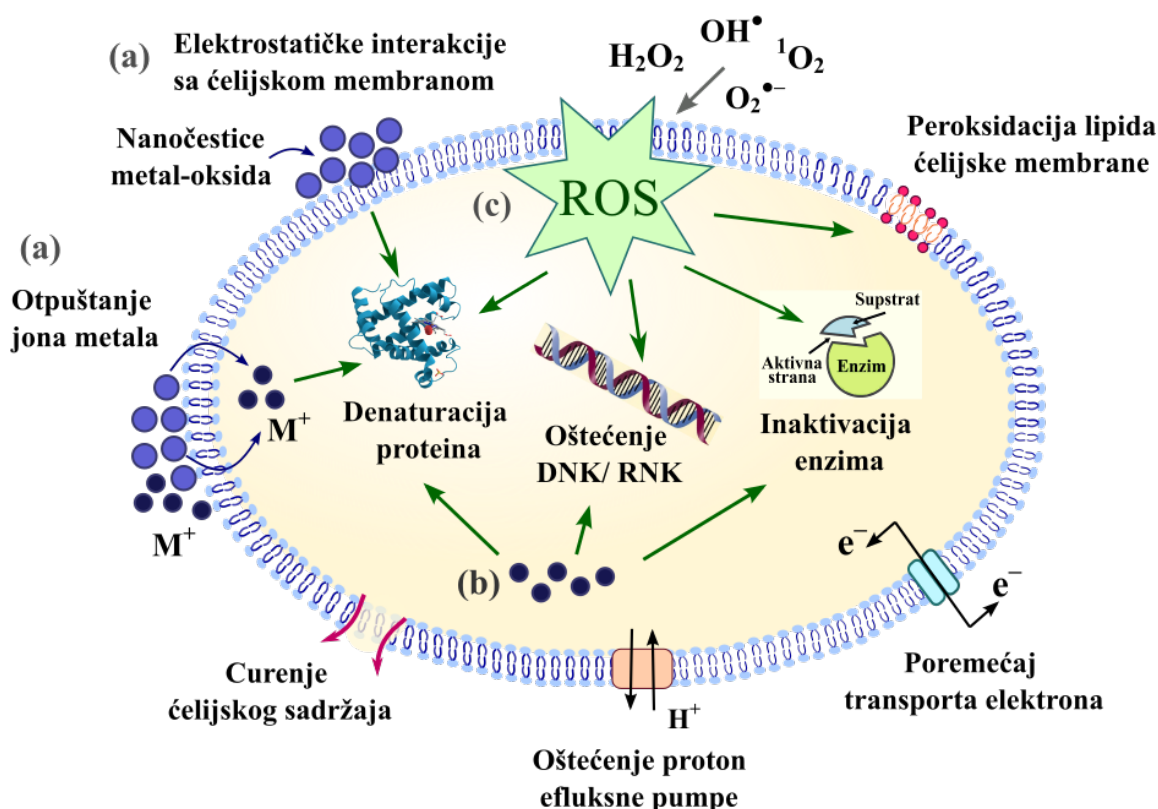
Nanočestice na bazi metala su u stanju da razlikuju prokariotske (bakterijske) ćelije od eukariotskih (ćelija sisara) na osnovu različitog sistema za transport metala i metaloproteina. Metalne nanočestice ispoljavaju svoju baktericidnu efikasnost posredstvom više mehanizama [149]. Tri glavna puta preko kojih nanočestice metala fizički vrše interakciju sa bakterijskim ćelijama su (*Slika 1.18*):

(a) **Interakcije sa fosfolipidnim dvoslojem** odvijaju se tako što se nanočestice metala elektrostatički vezuju za ćelijski zid bakterije i/ ili oslobađaju metalne jone, utičući tako na elektrohemijski potencijal i celovitost citoplazmatične membrane [149]. Do elektrostatičke interakcije dolazi usled vezivanja pozitivno naelektrisanih nanočestica metala za negativno naelektrisane grupe prisutne u ćelijskom zidu. Ove interakcije remete funkciju citoplazmatične membrane i dovode do povećanog oksidativnog stresa koji oštećuje proteine prisutne u ćelijama

bakterija. Usled narušavanja funkcije citoplazmatične membrane oslobađa se velika količina vode iz citosola što ćelije pokušavaju da nadoknade preko protonske pumpe i transporta elektrona, što dalje izaziva ozbiljna oštećenja i otežava funkciju citoplazmatične membrane [150]. Neravnoteža jona i narušavanje stabilnosti citoplazmatične membrane dovodi do otežanog odvijanja procesa disanja, prenosa energije i konačno smrti ćelije. Ovaj mehanizam je karakterističan za nanočestice srebra, zlata, cink-oksida i titan-dioksida [149];

(b) Vezivanje nanočestica za citosolne sastojke (kao što su enzimi i DNK) dovodi do usporene funkcije ćelije, inhibicije procesa disanja, metaboličkih puteva i sinteze ATP-a. Dolazi do otežane funkcije citoplazmatične membrane i nagomilavanja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS, eng “*reactive oxygen species*”) unutar citosola ćelije [149];

(c) Formiranje reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) je indirektno indukovano samim nanočesticama i predstavlja alternativni mehanizam kojim nanočestice dovode do smrti ćelija bakterije. Uglavnom se proizvode četiri tipa ROS: superoksidni radikal ($O_2^{\bullet-}$), hidroksilni radikal (OH^{\bullet}), vodonik-peroksid (H_2O_2) i singletni kiseonik (1O_2). ROS dovode do ozbiljnog oksidativnog stresa i oštećenja ćelijskih makromolekula izazivajući peroksidaciju lipida, denaturaciju proteina, inhibiciju aktivnosti enzima i oštećenje RNK/ DNK [149,150]. Takođe, jak oksidativni stres može da formira pukotine ili jame unutar citoplazmatične membrane ćelije bakterije, izazivajući tako lizu ćelije [149].



Slika 1.18. Šematski prikaz antibakterijske aktivnosti nanočestica metala

Nanočestice zlata pokazuju antimikrobnu aktivnost prema patogenim vrstama mikroorganizama koji se prenose hranom. Mehanizam njihovog delovanja povezan je sa strukturnim promenama koje utiču na aktivnost enzima uključenih u lanac disanja i zbog kojih na kraju dolazi do smrti ćelije. Takođe, pokazano je da se nanočestice zlata vezuju za DNK molekul ćelije bakterije čime se sprečava razdvajanje polinukleotidnih lanaca i početak transkripcije [148]. Postoje dva mehanizma

kojima nanočestice zlata ispoljavaju antibakterijsku aktivnost. Prvi mehanizam utiče na promenu naelektrisanja citoplazmatske membrane ćelije i potiskuje aktivnost ATP sintetaze, čime se smanjuje koncentracija ATP-a i usporavaju metabolički procesi u ćeliji. Drugi mehanizam sprečava da se ribozomalne subjedinice vežu za tRNK, čime se sprečava odvijanje procesa transkripcije [26].

U radovima objavljenim do sada nisu navedeni primeri aktivne ambalaže sa nanočesticama zlata koja bi se dovodila direktno u kontakt sa hranom. Međutim, sprovedena su brojna istraživanja u *in vitro* uslovima, u kojima je ovakav oblik ambalaže pokazao značajnu antibakterijsku aktivnost [26,148]. Jedan od takvih primera su aktivni filmovi na bazi škroba dobijenog iz kine sa ugrađenim nanočesticama zlata koji su pokazali jaku antibakterijsku aktivnost prema patogenim vrstama bakterija koje se prenose hranom sa značajnim stepenom inhibicije prema vrstama *E. coli* i *S. aureus* [151].

Nanočestice srebra su dobro poznate po svojoj visokoj stabilnosti i jakoj antimikrobnoj aktivnosti prema različitim vrstama mikroorganizama, tako da najčešće korišćeni nanokompoziti za pakovanje hrane sadrže srebro [148]. Antimikrobni efekat nanočestica srebra zavisi od sastava i oblika nanočestica, kao i od veličine, koncentracije i vrste ispitivanog mikroorganizma. Prema najnovijim istraživanjima, joni i nanočestice srebra mogu izazvati citotoksičnost i genotoksičnost u ćelijama mikroorganizama. Utvrđeno je da su nanočestice srebra trouglastog i zarubljenog oblika veoma reaktivne, jer su njihove veličine manje od 10 nm. Takođe, pokazano je da nanočestice srebra lakše ulaze u ćeliju mikroorganizama u poređenju sa jonima srebra. Antimikrobna aktivnost nanočestica srebra veličine manje od 10 nm potiče pre svega od samih nanočestica, međutim, kako se njihova veličina povećava, joni srebra postaju glavni antimikrobni agensi [26].

Antimikrobna aktivnost nanočestica srebra može se povezati sa nekoliko mehanizama, uključujući izazivanje oksidativnog stresa usled formiranja reaktivnih kiseoničnih vrsta, koje mogu uticati na strukturu citoplazmatske membrane i oslobađanje jona sa površine nanočestica što izaziva smrt ćelija mikroorganizama. Nanočestice srebra mogu ulaziti u ćelije mikroorganizama i tom prilikom oštetiti DNK [148]. Ipak, krajnji mehanizam antimikrobnog dejstva nanočestica i jona srebra još uvek nije poznat do kraja [26].

Najjači antimikrobni efekat srebra je pokazalo prema različitim vrstama bakterija. Baktericidna aktivnost nanočestica srebra može se ukratko opisati pomoću nekoliko mehanizama: (1) apsorpcija nanočestica/ jona srebra koja je praćena njihovom akumulacijom u ćelijama bakterija, što dovodi do odvajanja citoplazmatske membrane od ćelijskog zida kao posledica njenog skupljanja; (2) razmnožavanje ćelija bakterija je sprečeno usled reakcije između Ag^+ i DNK molekula; (3) ometanje ćelijskog disanja mikromolarnim koncentracijama Ag^+ jona; (4) joni srebra oštećuju citoplazmatsku membranu formirajući „pukotine“ unutar njenog sloja [26].

Različiti biopolimerni filmovi na bazi škroba, hitozana i agara sa ugrađenim nanočesticama srebra su pokazali dobru antimikrobnu aktivnost [26,148]. Na antimikrobnu efikasnost polimernog filma sa nanočesticama srebra utiču različiti faktori kao što su veličina čestica, distribucija veličine, stepen aglomeracije čestica, sadržaj srebra i interakcija površine srebra sa polimerom [148]. Usled visoke termičke otpornosti, bezbedne upotrebe i širokog spektra antimikrobnog dejstva, nanočestice srebra su upotrebljene i u nekim komercijalnim proizvodima. Do danas, neke kompanije, kao što su Duretham[®] i Kodak[®], koriste nanočestice srebra u polimeru za pakovanje kako bi se produžio rok trajanja i zaustavio rast i razmnožavanje mikroorganizama u lako kvarljivim prehrambenim proizvodima [26].

Zbog svoje antimikrobne aktivnosti **nanočestice bakra i bakar-oksida** su našle primenu u medicini i prehrambenoj industriji [148]. Bakar ima brojne prednosti kao biocidni agens, jer je isplativ i poseduje ista svojstva kao plemeniti metali, poput srebra i zlata [26]. Bakar ima jaka antimikrobna svojstva, ali u poređenju sa srebrom, biocidna aktivnost bakra je slabija. Međutim, nanočestice bakra imaju prednost u odnosu na nanočestice srebra zbog niže cene, lakšeg

mešanja sa polimerima i relativno boljih fizičko-hemijskih svojstava. Takođe, sa razvojem nanotehnologije, nanočestice bakar-oksida su privukle veliku pažnju zbog njihovog uticaja na brojne vrste mikroorganizama [26].

Za većinu aerobnih mikroorganizama bakar je neophodan za normalan metabolizam i transport elektrona, međutim, kada njegova koncentracija postane prevelika postaje toksičan i inhibira rast i razmnožavanje bakterijskih ćelija [26]. Mehanizam antimikrobnog delovanja bakra proučavan je u novije vreme i smatra se da on svoj efekat ostvaruje tokom složenih oksido-redukcionih reakcija koje se dešavaju u ćelijama, nanoseći tom prilikom nepoporavljiva oštećenja, poput oksidacije proteina, inaktivacije enzima, razgradnje molekula DNK i RNK, efekta na razmenu esencijalnih jona i narušavanje celovitosti citoplazmatične membrane usled peroksidacije lipida (formiranje slobodnih peroksidnih radikala) [26,148].

Koloidne nanočestice bakra ugrađene u filmove hitozana su ispitane za primenu u aktivnom pakovanju, pri čemu je pokazana antibakterijska aktivnost filmova prema vrstama *S. aureus* i *S. typhimurium*. Takođe, ugradnja nanočestica bakra u matricu hitozana poboljšala je barijerna svojstva filmova, smanjujući propustljivost kiseonika i vodene pare, a povećavajući zaštitu od UV zraka [152].

Primenu nanočestica bakra ograničava upotreba toksičnih hemikalija i štetni nusproizvodi koji nastaju tokom njegove proizvodnje [148].

Titan-dioksid ili titan(IV)-oksid je prirodni oblik oksidovanog titana. Nanočestice TiO_2 postale su popularne u nauci i industrijskoj primeni zbog svojih jedinstvenih karakteristika, kao što su visoka stabilnost, ekonomičnost i mikrobicidno dejstvo [26]. Američka agencija za hranu i lekove odobrila je upotrebu ovih nanočestica kao aditiva za hranu i u materijalima koji su u kontaktu sa hranom [26,153]. TiO_2 je u upotrebi kao foto-katalizator za prečišćavanje vode i vazduha, ili kao antimikrobno sredstvo u sistemima za prečišćavanje i filtriranje vode [26]. Obično se primenjuje u ambalažnom materijalu namenjenom za hranu, i to kao pigment i aditiv za premazivanje [26,153]. Bele TiO_2 čestice efikasno rasipaju vidljivu svetlost, dajući tako obloženom predmetu belinu i sjaj. Za pakovanja pasterizovanog mleka, PET (eng. “*polyethylene terephthalate*”, odnosno polietilen tereftalat) i koekstrudirane HDPE (eng. “*high density polyethylene*”, odnosno polietilen velike gustine) boce se obično kombinuju sa nanočesticama TiO_2 , kako bi se smanjio štetni uticaj svetlosti na kvalitet mleka. Kao tanak omotač u čvrstom obliku, TiO_2 je neisparljiv, nezapaljiv, potpuno inertan i nerastvoran u svim prehrambenim proizvodima [153].

TiO_2 ispoljava mikrobicidni efekat, jer može oksidovati nezasićeni deo fosfolipida citoplazmatične membrane ćelije mikroorganizama. Nekoliko istraživanja sprovedenih o antimikrobnim efektima TiO_2 ukazalo je da pod svetlošću ili ultraljubičastim zracima TiO_2 , takođe, formira reaktivne vrste kiseonika kao što su: superoksidni anjoni, vodonik-peroksid i hidroksilni radikali, koji direktno oštećuju ćelijski zid mikroorganizama [153]. Zbog svojih fotokatalitičkih svojstava, nanočestice TiO_2 su korisne kao antibakterijski agensi i agensi za prečišćavanje u prehrambenoj industriji. Utvrđeno je da je fotokatalitička aktivnost TiO_2 posebno korisna za dekontaminaciju vode [148]. Primećena su dva oblika fotohemijskih reakcija na površini TiO_2 prilikom izlaganja UV zracima: (1) redoks reakcija, izazvana pojavom fotona u adsorbovanim supstancama, i (2) hidrofilna modifikacija samog TiO_2 nastala fotonima. Hidroksilni radikali, superoksidni anjoni i vodonik-peroksid su tipični ROS agensi koji se obrazuju na površini ozračenog TiO_2 i koji pokreću peroksidaciju polinezasićenih delova fosfolipida prisutnih u citoplazmatičnoj membrani mikroorganizama. Hidroksilni radikali su oko hiljadu ili možda deset hiljada puta efikasniji pri inaktivaciji vrste *E. coli* u poređenju sa dezinfekcionim sredstvima koji se najčešće koriste, kao što su hlor, hlor-dioksid i ozon, dok superoksidni joni ili radikali kiseonika pokazuju slab uticaj na ćelije bakterija, što je povezano sa njihovim negativnim naelektrisanjem koje ih sprečava da prođu kroz citoplazmatičnu membranu ćelije bakterije [26]. Aktivacija jedinjenja titana UV zracima ima ograničenu praktičnu primenu, bez obzira što su se poslednjih

godina fotokatalizatori sa srebrom i TiO₂ koji apsorbuju vidljivu svetlost pokazali uspešnim u inhibiciji rasta i razmnožavanja vrsta *S. aureus* i *E. coli* [148].

Takođe, nanočestice TiO₂ poseduju sposobnost da modifikuju svojstva biorazgradivih filmova. Primena nanočestica TiO₂ u ambalaži (naneta na površini ili ugrađena u materijal) namenjenoj da bi se poboljšao kvalitet hrane, poslednjih godina je privukao značajnu pažnju [148]. Antimikrobni efekat folije za pakovanje napravljene od orijentisanog polipropilena presvučenog TiO₂ ispitan je u *in vitro* i *in vivo* uslovima prema vrsti *E. coli*, u prisustvu dva veštačka svetla različitog intenziteta [154]. Rezultati su pokazali da je opadanje broja ćelija *E. coli* veće pri primeni filma obloženog TiO₂ u kombinaciji sa UVA zracima. Takođe, analize sprovedene na sveže rezanoj salati pokazale su da film obložen TiO₂ smanjuje kontaminaciju mikroorganizmima, a samim tim i rizik od rasta i razmnožavanja mikroorganizama na površini sveže rezanih prehrambenih proizvoda [154].

Takođe, nanočestice TiO₂ mogu da kontrolišu sadržaj organskih jedinjenja kao što je etilen ili se mogu koristiti kao „hvatači” kiseonika. Ugradnja „hvatača“ O₂ u sisteme za pakovanje hrane može usporiti procese kvarenja [148].

Bez obzira na navedene prednosti, TiO₂ nije ocenjen kao GRAS komponenta od strane FDA i drugih organizacija, jer njegove štetne efekte na zdravlje treba precizno ispitati sprovođenjem studije slučaja [26].

Istraživanja su pokazala da **nanočestice cink-oksida** imaju selektivnu toksičnost prema različitim vrstama bakterija i da pokazuju samo minimalne efekte na humane ćelije, što omogućava njihovu primenu u poljoprivredi i prehrambenoj industriji. Cink je mikroelement prisutan u ljudskom organizmu i neophodan je za pravilno funkcionisanje imunog sistema. ZnO se koristi kao aditiv u hrani i ocenjen je kao bezbedan (GRAS) od strane FDA. Antimikrobno dejstvo nanočestica ZnO prema različitim vrstama mikroorganizama odgovornih za kvarenje hrane ukazuje da se one mogu koristiti u sprečavanju rasta i razmnožavanja mikroorganizama i primeniti u prehrambenim proizvodima [148]. Neke Gram-pozitivne (*Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus*) i Gram-negativne vrste bakterija (*Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter jejuni* i *Escherichia coli*) pokazale su osetljivost u prisustvu nanočestica ZnO [28].

Tačan mehanizam delovanja nanočestica ZnO još uvek nije poznat. Međutim, antimikrobna aktivnost ovih nanočestica pripisuje se dejstvu nekoliko mehanizama: (1) oslobađanje antimikrobnih jona (Zn²⁺ jon koji se oslobađa produžuje lag fazu rasta mikroorganizama kada se nađe vezan za njihovu citoplazmatičnu membranu) [26,28]; (2) elektrostatičke interakcije pozitivno naelektrisanih nanočestica sa negativno naelektrisanom citoplazmatičnom membranom ćelija mikroorganizama, usled čega dolazi do oštećenja bakterijskih ćelija [28]; (3) formiranje reaktivnih kiseoničnih vrsta koje utiču na stabilnost ćelije (uključujući vodonik-peroksid (H₂O₂), koji deluje kao jako oksidaciono sredstvo na bakterijske ćelije) [26,28]. Stvaranje parova elektron-šupljina dolazi kada su nanočestice ZnO izložene izvoru UV zračenja. Usled reakcije između šupljina (h⁺) i OH⁻, na površini nanočestica ZnO dolazi do stvaranja hidroksilnih radikala, superoksidnog anjona i perhidroksidnog radikala (RO₂[•]). Ovi aktivni nanaelektrisani molekuli oštećuju ćeliju mikroorganizma i konačno dolazi do njene smrti. Superoksidi i hidroksilni radikali sa negativnim naelektrisanjem ne mogu da prođu kroz citoplazmatičnu membranu i imaju tendenciju da se zadržavaju na površini ćelije, dok H₂O₂ lako prolazi u unutrašnjost bakterijske ćelije [28].

Na antimikrobnu aktivnost nanočestica ZnO može uticati više faktora, kao što su veličina nanočestica (samim tim i aktivna površina) i njegova sinergistička aktivnost sa drugim antimikrobnim agensima. Istraživanja su pokazala da se sa smanjenjem veličine čestica ZnO poboljšava antibakterijski efekat prema *E. coli* i *S. aureus*. Do ovoga dolazi zbog povećanja odnosa površina/ zapremina, tako što smanjenje veličine nanočestica dovodi do povećanja reaktivne površine ZnO. Dakle, veća površina dovodi do stvaranja više ROS na površini ZnO, a samim tim i do ispoljavanja jače antibakterijske aktivnosti manjih nanočestica. Takođe, neki podaci iz literature ukazuju na to da manje čestice, odnosno one sa većom specifičnom površinom, pokazuju toksičniji efekat prema bakterijama, kvascima i plesnima. Međutim, prema tvrdnjama drugih naučnika razlog

za ovu toksičnost može biti povezan sa uticajem drugih faktora, kao što su intenzitet svetlosti, hemijski sastav površine, morfologija čestica i ukupan broj ćelija mikroorganizma. Stoga bi trebalo sprovesti veći broj istraživanja tokom kojih bi se precizno kontrolisale promenljive i spoljni faktori da bi se razjasnio efekat veličine čestica na aktivnost ZnO [28].

Postoji veći broj istraživanja u kojima su nanočestice ZnO ugrađivane u različite polimerne matrice da bi se obezbedila antimikrobna aktivnost materijala za pakovanje i poboljšala svojstva pakovanja [28]. Filmovi na bazi hitozana sa ugrađenim nanočesticama ZnO su pokazali antibakterijsku aktivnost prema vrstama *E.coli* i *S.aureus* [29]. Antimikrobna aktivnost filmova na bazi pektin/ alginat koji su sadržali nanočestice ZnO ispitana je prema vrstama *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Colletotrichum gloeosporioides* i *Aspergillus niger*, gde je uočeno da se širina zone inhibicije povećava sa povećanjem koncentracija nanočestica ZnO. Takođe, pokazano je da je inhibitorni efekat nanočestica ZnO prema vrstama *A. niger* i *C. gloeosporioides* veći nego prema vrstama *E. coli* i *Saccharomyces cerevisiae*, pa se na osnovu toga došlo do zaključka da antimikrobna aktivnost nanočestica ZnO uglavnom zavisi od strukture ćelijskog zida mikroorganizama [31].

1.4.2.2. Antimikrobno dejstvo nanočestica metala ugrađenih u polimernu matricu

Pokazano je da antimikrobna aktivnost nanokompozita polimer/ metal uglavnom potiče od samih nanočestica metala, tako da su mehanizmi antimikrobnog dejstva ovakvih kompozita slični efektu samog aktivnog agensa (nanočestice metala i metal-oksida). U zavisnosti od vrste aktivnog agensa, moguće je dejstvo metalnih nanočestica ili jona metala oslobođenih iz nanočestica [155].

U gustim, termoplastičnim polimerima sa ugrađenim nanočesticama metala, oslobađanje jona je glavni mehanizam koji stoji iza njihove antimikrobne aktivnosti. Do oslobađanja jona metala iz polimerne mase dolazi prilikom adsorpcije ćelija bakterija na površinu polimera i difuzije molekula vode iz medijuma koji okružuje ćelije bakterija kroz polimernu matricu. Kada voda sa rastvorenim kiseonikom dođe do površine ugrađenih nanočestica metala nastaje proces rastvaranja ili korozije. Nakon toga, joni koji nastaju tokom korozije ili rastvaranja mogu difundovati kroz polimernu matricu i konačno se osloboditi na površinu kompozita, gde deluju na bakterijsku ćeliju. Ovako oslobođeni joni oštećuju citoplazmatsku membranu i mogu da difunduju dalje u bakterijsku ćeliju.

Polimerne matrice na bazi hidrogelova imaju mnogo veću slobodnu zapreminu u svojoj strukturi u poređenju sa gustim termoplastičnim matricama. Zbog prirode hidrogelova do difuzije vode u/ iz matrice ne mora doći. Nanočestice i joni metala iz ovakve polimerne matrice mnogo lakše se oslobađaju, pa je mehanizam njihovog dejstva mnogo sličniji dejstvu nanočestica čistih metala [155].

Dodavanje nanočestica metala u polimerne matrice predstavlja uspešan način da se iskoristi njihova jaka antimikrobna aktivnost pri primeni u aktivnom pakovanju. U **Tabeli 1.3** su predstavljeni neki primeri sistema aktivnog pakovanja baziranih na biopolimerima sa ugrađenim nanočesticama metala.

Tablela 1.3. Primeri nanočestica metala i metal-oksida ugrađenih u biopolimerne materijale za primenu u antimikrobnom aktivnom pakvanju

Nanočestice	Polimerni sistem/ matrica	Antimikrobna aktivnost	Testiranje na hrani	Referenca
Au	Film na bazi skroba iz kinoe	<i>E. coli</i> i <i>S. aureus</i>	–	[151]
Ag	Hitozanski filmovi	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>S. aureus</i> i <i>L. monocytogenes</i>	–	[156]
Ag	Celulozna nanovlakna	<i>E. coli</i> i <i>L. monocytogenes</i>	–	[157]
Ag-Cu	Agar	<i>L. monocytogenes</i> i <i>S. thyphimurium</i>	–	[158]
Ag-Cu	Film na bazi ribljeg želatina	<i>L. monocytogenes</i> i <i>S. thyphimurium</i>	–	[159]
Cu	Filmovi na bazi hitozana	<i>S. aureus</i> i <i>S. thyphimurium</i>	–	[152]
CuO	Agar, alginat, karagenan, hitozan i karboksimetil celuloza	<i>L. monocytogenes</i> i <i>E. coli</i>	–	[160]
TiO ₂	Zein/ natrijum alginat nanovlakna	<i>E. coli</i> i <i>S. aureus</i>	–	[161]
TiO ₂	Nanokompozitni filmovi na bazi sojinih proteina/ celuloznih nanovlakana/ etarskog ulja ruzmarina	<i>In vitro</i> uslovi: <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>S. aureus</i> i <i>P. fluorescens</i> ; <i>In vivo</i> uslovi: <i>Pseudomonas</i> spp.i <i>Enterobacteriaceae</i>	Sirovo jagnjeće meso	[162]
Se-Ag	Želatin/ furcelaran filmovi	<i>E. coli</i> i <i>S. aureus</i>	Mini kivi	[163]

SiO ₂	Filmovi na bazi hitozana	<i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> i <i>S. typhimurium</i>	–	[164]
ZnO	Pektin/ alginat filmovi	<i>E. coli</i> , <i>A. niger</i> , <i>S. cerevisiae</i> i <i>C. gloeosporioides</i>	–	[31]
ZnO	Nanovlakna etilceluloza/ želatin	<i>E. coli</i> i <i>S. aureus</i>	–	[165]
ZnO	Filmovi na bazi polilaktida sa etarskim uljem <i>Zataria multiflora Boiss</i> i <i>Menthe piperita L.</i>	<i>E. coli</i> , <i>S. enterica</i> , <i>B. cereus</i> , <i>P. aeruginosa</i> i <i>S. aureus</i>	Zamrznuti fileti <i>Otolithes ruber</i>	[33]
Zn-MgO	Filmovi na bazi alginata	<i>L. monocytogenes</i>	Meso dimljenog lososa	[166]
ZnO/Ag	Filmovi na bazi hitozana sa etarskim uljem citronele	<i>E. coli</i> , <i>C. albicans</i> i <i>S. aureus</i>	Belo grožđe	[35]

1.5. Metode za dobijanje filmova i prevlaka

Kao matrice za ugradnju antimikrobnih komponenti sve više se koriste biopolimeri u formi filmova i prevlaka. Oni se dalje mogu primeniti kao aktivno pakovanje za kontakt sa voćem ili povrćem, kako bi se produžio rok trajanja i sačuvao njihov kvalitet tokom skladištenja [167]. Materijal može biti u obliku zasebnih filmova ili u vidu prevlaka koje se formiraju na površini namirnica ili na površini materijala za njihovo pakovanje [168].

Da bi se formirali filmovi i prevlake koji se koriste kao ambalažni materijal potrebne su najmanje dve komponente: polimerna matrica (sastoji se od makromolekula koji mogu da formiraju kohezivnu strukturu) i plastifikator (potreban za smanjenje krutosti i krtost, karakterističnih za većinu polimernih matrica) [169]. Tokom proizvodnje komponente moraju biti dispergovane i rastvorene u rastvaračima kao što su voda, alkohol ili mešavina vode i alkohola ili mešavina drugih rastvarača [168]. Da bi se poboljšala fizička (barijerna, mehanička, otpornost na vlagu) svojstva filmova i prevlaka, mogu se ugraditi i neke druge komponente (lipidi, nanočestice) [169].

Za proizvodnju biomaterijala za potrebe pakovanja koriste se uglavnom dva osnovna tehnološka pristupa koja obuhvataju **vlažne i suve procese** [169].

Vlažni procesi se zasnivaju na razdvajanju makromolekula od faze rastvarača, obično isparavanjem rastvarača. Tu spadaju: metoda izlivanja, sprej metoda i metoda premazivanja nožem [22,169].

Metoda izlivanja se sastoji od izlivanja prethodno homogenizovane i vakuumom degazirane disperzije, iz koje se formira film (sadrži najmanje biopolimernu matricu, rastvarač i najčešće plastifikator), na odgovarajući materijal (od koga se film može lako odvojiti). Nakon toga, sledi sušenje do određenog optimalnog sadržaja vlage i uklanjanje formiranog filma [22,169]. Formiranje filma uključuje inter- i intra-molekulske reakcije ili umrežavanje polimernih lanaca, koji stvaraju mrežu u kojoj rastvarač ostaje zarobljen i imobilisan. Stepem kohezije zavisi od strukture polimera, korišćenog rastvarača, temperature i prisustva drugih molekula [169]. Rastvarači koji se koriste za proizvodnju jestivih biopolimernih filmova uključuju vodu, etanol ili njihovu kombinaciju [22].

Sprej metoda ili metoda prskanja podrazumeva, takođe, mokru obradu, gde se polimeri prethodno dispergovani ili rastvoreni u tečnoj fazi prskaju i suše. U procesu prskanja, rastvor za formiranje prevlaka se raspršuje na površinu proizvoda ili na pomoćni materijal, kao što je nelepljiva površina. Na odabranoj površini kapljice nastale raspršivačem formiraju ujednačene prevlake. Ova metoda omogućava kraće vreme sušenja, jer prilikom prskanja rastvarač u određenoj meri isparava po izlasku iz mlaznice raspršivača [22].

Ograničenje procesa za proizvodnju i nanošenje jestivih prevlaka, opisanih u literaturi, je primena laboratorijskih diskontinualnih tehnika i tehnika malih razmera. Disperzija se obično nanosi direktno na površinu hrane (ili između delova hrane) potapanjem ili prskanjem. Potapanje je adekvatnije kada se mora prekriti nepravilna površina. Nakon potapanja, ostavlja se da sa proizvoda iscure višak materijala za oblaganje. Prskanje je adekvatnije za formiranje tanjih prevlaka i/ ili kada samo jedna strana proizvoda treba da bude obložena. Metode prskanja i potapanja su praćene sušenjem u slučaju prevlaka na bazi polisaharida ili proteina, ili hlađenjem kod prevlaka na bazi lipida [169].

Metoda premazivanja (prevlačenja) nožem predstavlja kontinuirani postupak namenjen za industrijsku proizvodnju filmova, za razliku od metode izlivanja koji se koristi samo za proizvodnju filmova u pogonima sa malim kapacitetom. Određeni sloj rastvora se nanosi noževima na površinu koja se kreće ispod noževa. Moguća su mikrometarska podešavanja visine noža iznad površine, čime se povećava ili smanjuje debljina filma. Ova metoda omogućava efikasnu kontrolu debljine i brzine nanošenja rastvora biopolimera preko odgovarajućih nosača. Važna prednost ovako nastalih filmova je uniformnosti, što dovodi do manjih grešaka prilikom određivanja njihovih svojstva (uglavnom mehaničkih). Uređaj koji se koristi u ovom postupku je jednostavan za rukovanje, a vreme sušenja je značajno kraće u odnosu na metodu izlivanja. Zbog svega navedenog, ovaj

postupak predstavlja dobru metodu za proizvodnju filmova u pogonima sa velikim kapacitetom [22].

Nasuprot vlažnim procesima, suvi procesi koriste termoplastične osobine makromolekula u uslovima niske vlažnosti. Biomaterijali se mogu oblikovati postojećim tehnikama za preradu plastike (takozvane termoplastične tehnologije obrade), uključujući termoformiranje, kompresijsko oblikovanje, ekstruziju, mlevenje na valjcima ili ekstruziono premazivanje i laminaciju. Zagrevanjem amorfni polimera iznad njihove temperature staklastog prelaza (T_g) polimeri dobijaju strukturu sličnu gumi, što omogućava formiranje filmova nakon hlađenja. Iako suvi procesi zahtevaju obimniju i napredniju opremu, oni su efikasni u pogonima sa velikim kapacitetom zbog niskog sadržaja vlage, visokih temperatura, visokih pritisaka i kratkog vremena trajanja procesa [169].

Ekstruzija se najčešće koristi za proizvodnju komercijalne plastične ambalaže, kao što su polietilenski filmovi male gustine [22,169]. Ekstruder se sastoji od zagrejanog, fiksiranog metalnog bureta koje sadrži jedan ili dva zavrtnja koji rotiranjem prenose sirovinu kroz bure [169]. Rotiranjem šrafova povećava se pritisak koji gura sastojke potrebne za proizvodnju polimera napred i meša ih kroz kalup gde se dešava ekspanzija [22]. Proces ekstruzije je brz i potrebno je manje energije za uklanjanje vode. Uspešnost ovog postupka zavisi od više faktora kao što su: izbor polimera, brzina dovoda tečnosti, konfiguracija zavrtnja, brzina zavrtnja, temperatura, ulazni/izlazni pritisci proizvoda (i njihove razlike), kao i konfiguracija kalupa. Iako je ekstruzija obećavajući pristup za izradu filmova, ograničavajući faktori su veći broj parametara koji treba kontrolisati tokom njene primene [22,169].

Mnoge biopolimerne filmove je teže proizvesti suvim procesima u poređenju sa veštačkim polimerima, zato što oni obično nemaju definisane tačke topljenja (zbog njihove heterogene prirode) i lako se raspadaju pri zagrevanju [169].

1.6. Primena inkapsulacije u aktivnom pakovanju

1.6.1. Aktivno pakovanje

Materijal za pakovanje hrane treba da bude bezbedan po ljudsko zdravlje, da očuva kvalitet hrane tokom čuvanja i da kasnije može lako da se reciklira [133]. Pakovanje ima za cilj da očuva kvalitet i bezbednost hrane od trenutka njene proizvodnje do upotrebe od strane potrošača. Materijali za pakovanje hrane obezbeđuju fizičku, hemijsku i biološku barijeru od uticaja faktora spoljašnje sredine, kao što su vazduh, vlaga, mikroorganizmi, insekti i mehanička oštećenja [170,171]. Namena materijala za pakovanje hrane je da uspori ili odloži kvarenje hrane u određenom vremenskom periodu. Cilj istraživanja i razvoja ovakvih materijala je prvenstveno zaštita hrane tokom čuvanja, ali takođe, može biti i produžetak njenog roka trajanja sprečavanjem razvoja patogenih vrsta mikroorganizama. Materijali koji se danas uglavnom koriste za proizvodnju ambalaže za pakovanje hrane su papir, plastika, staklo i metal. Konvencionalna plastika koja se najčešće koristi za pakovanje hrane, poput polietilen tereftalata (PET), poli (vinil hlorida) (PVC), polietilena (PE), polipropilena (PP), polistirena (PS) i poliamida (PA) dobija se iz nafte. Svi ovi materijali, iako imaju dobre mehaničke i fizičke karakteristike, nerazgradivi su i stvaraju velike probleme prilikom upravljanja otpadom [172].

Poslednjih godina, aktivno pakovanje zauzima veoma značajno mesto u prehrambenoj industriji i nauci o materijalima. Aktivne komponente u ambalažnom materijalu reaguju sa uzročnicima koji dovode do kvarenja hrane, pružajući bolji kvalitet, sigurnost i duži rok trajanja prehrambenim proizvodima u poređenju sa tradicionalnim ambalažnim materijalima [8,9]. Aktivno pakovanje u skladu sa propisima Evropske unije (1935/2004/EC i 450/2009/EC) dizajnirano je da sadrži komponente koje bi oslobađale ili apsorbivale supstance u/ iz upakovane hrane ili okoline koja je okružuje. Tehnologije aktivnog pakovanja uključuju neku fizičku, hemijsku ili biološku aktivnost koja menja interakcije između pakovanja, proizvoda i/ ili glavnog prostora unutar pakovanja, kako bi se dobili željeni rezultati [148,173]. Aktivno pakovanje obično podrazumeva kesice i jastučice koji se smeštaju unutar pakovanja, ili su aktivni sastojci direktno ugrađeni u materijal za pakovanje. Ovakva ambalaža može biti u obliku antimikrobnog filma, „hvatača” kiseonika, sredstva za uklanjanje etilena i apsorbira/ emitira ugljen-dioksida. Apsorberi kiseonika u kesicama se obično nalaze u mesu i proizvodima od živine, kafi, picama, pečenim proizvodima i sušenoj hrani. Neke kesice mogu emitovati etanol kao antimikrobno sredstvo kako bi se produžio rok trajanja pekarskih proizvoda sa visokim sadržajem vlage. Jastučići sprečavaju rast i razmnožavanje plesni ili bakterija tako što upijaju vodu pomoću superupijajućih polimernih granula. Antimikrobna ambalaža je u stanju da kontroliše populaciju mikroorganizama ili atmosferu oko hrane i tako smanji, inhibira ili uspori rast i razmnožavanje mikroorganizama koji dovode do kvarenja. Aktivni filmovi mogu sadržati različite antimikrobne agense kao što su organska/ neorganska jedinjenja, etarska ulja, enzimi i ekstrakti povrća [148,173].

1.6.2. Antimikrobno aktivno pakovanje

Antimikrobno aktivno pakovanje ima za cilj da uspori i spreči rast i razmnožavanje mikroorganizama u prehrambenim proizvodima, produžavajući tako rok trajanja namirnica, uz zadržavanje kvaliteta i senzorskih svojstava, čineći proizvod bezbednim po zdravlje potrošača [27].

Kontaminacija hrane mikroorganizmima, koja dovodi do kvarenja i propadanja namirnica, uzrokuje značajne gubitke u prehrambenoj industriji. Takođe, konzumiranje hrane kontaminirane mikroorganizmima može dovesti do ozbiljnih zdravstvenih problema, kao što su trovanja, bolesti i epidemije koje se prenose hranom. Mikrobiološko kvarenje hrane uglavnom uzrokuju nepatogene vrste mikroorganizama, koje su odgovorne za promene u nutritivnim i senzornim karakteristikama

prehrambenih proizvoda, kao što su oksidacija, formiranje lošeg ukusa i neprijatnih mirisa, kao i neodgovarajuće promene u teksturi i boji [174]. S druge strane, prema izveštaju Svetske zdravstvene organizacije (SZO) iz 2010. godine, patogene vrste mikroorganizama koje izazivaju trovanja, bolesti i epidemije koje se prenose hranom svake godine prouzrokuju 600 000 000 slučajeva bolesti, sa skoro 420 000 smrtnih ishoda [175].

Sprečavanje rasta mikroorganizama u prehrambenoj industriji je prvobitno vršeno dodavanjem antimikrobnih sredstava i konzervansa direktno u prehrambene proizvode, što se pokazalo kao nedovoljno efikasan način. Razvoj tehnologije za proizvodnju antimikrobne ambalaže za pakovanje hrane dovelo je do uključivanja antimikrobnih supstanci u materijal za pakovanje, čime se upakovana hrana štiti od kvarenja bez dodavanja jestivih konzervansa direktno u prehrambeni proizvod. S obzirom da antimikrobna sredstva moraju doći u kontakt sa ćelijama mikroorganizama da bi zaustavili njihov rast i razmnožavanje ili prouzrokovali njihovu smrt, antimikrobni agensi moraju biti u kontaktu sa hranom, bilo u gasovitoj fazi, bilo u direktnom kontaktu između aktivne ambalaže i hrane [27]. Primenom antimikrobnog pakovanja rast i razmnožavanje mikroorganizma može se usporiti ili čak inhibirati tokom kontakta sa zapakovanom hranom (direktan kontakt) ili prostorom unutar pakovanja (indirektni kontakt) [174]. Do sada je razvijeno nekoliko efikasnih oblika antimikrobne ambalaže, kao što su: polimerni filmovi sa ugrađenim antimikrobnim supstancama (metoda ekstruzije, izlivanja) i prevlake (oblaganje), adsorbovana ili ugrađena antimikrobna sredstva na površini polimera, vrećice ili jastučići koji sadrže isparljive antimikrobne komponente [27].

Sa čestim promenama potrošačkih trendova i zakonodavstva, broj antimikrobnih supstanci koje se mogu primenjivati u antimikrobnom pakovanju za hranu je prilično velik i stalno se razvija i menja. Od sintetičkih antimikrobnih sredstava tu se ubrajaju hemijska jedinjenja kao što su organske kiseline (propionska, sorbinska, benzoeva, mlečna, sirćetna) i njihove soli, triklosan, antibiotici, hlor-dioksid, nitriti i amonijumove soli [27]. Sve više je prisutan trend da se u proizvodnji hrane sintetički konzervansi zamene prirodnim, i da se pređe na biorazgradivu ambalažu upotrebom polimernih materijala [133]. Supstance prirodnog porekla koje su u upotrebi su razni biopolimeri, etarska ulja i njihova bioaktivna jedinjenja, prirodni ekstrakti i njihova bioaktivna jedinjenja, nanočestice metala, enzimi, bakteriocini, bakteriofage i mnoge druge [27].

Inkapsulacija antimikrobnih jedinjenja u ambalažni materijal namenjen pakovanju hrane obezbeđuje efikasnost materijalu tako što: (1) štiti antimikrobna jedinjenja od razgradnje, isparavanja ili neželjenih interakcija sa materijalima za pakovanje, (2) poboljšava kompatibilnost između polimera za pakovanje i antimikrobne supstance, (3) povećava dostupnost antimikrobnog sredstva i (4) obezbeđuje kontrolisano oslobađanje ili/ i oslobađanje inicirano dodatnim spoljašnjim stimulansima, da bi se produžilo dejstvo aktivnog materijala [55].

Inkapsulacija nekih vrsta antimikrobnih supstanci postala je neophodna da bi se rešili problemi koji ograničavaju njihovu upotrebu u ambalažnim pakovanjima. Razvijeni su brojni sistemi za dostavu i nosači za inkapsulaciju bioaktivnih jedinjenja u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, kao što su ciklodekstrini, lipozomi, emulzije, nanočestice ili mikrokapsule. Međutim, svi ovi dostupni nosači ne mogu se primeniti u antimikrobnom aktivnom pakovanju, jer je neophodno da budu kompatibilni sa materijalom za pakovanje, bez negativnih uticaja na njihova mehanička i fizička svojstva, kako bi očuvali svoju primarnu funkciju da zaštite hranu od kvarenja [55]. U slučaju etarskih ulja, inkapsulacija je od suštinskog značaja da bi se smanjili gubici nastali isparavanjem ili razgradnjom. Takođe, njihovom inkapsulacijom se smanjuje njihov uticaj na organoleptičke karakteristike prehrambenih proizvoda uzrokovane njihovim jakim mirisom [55,133].

1.7. Primena inkapsulacije u biopesticidima

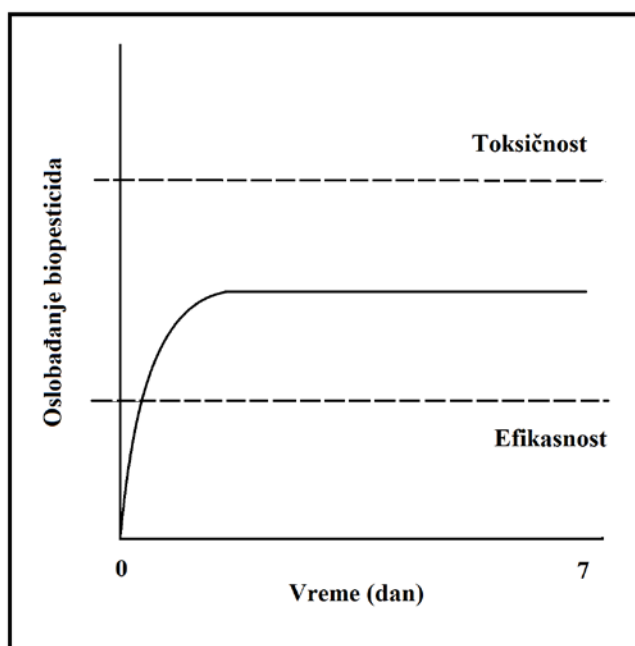
Truljenje je bitan faktor koji nakon berbe ograničava dužinu skladištenja plodova voća i povrća i odgovorno je za znatne ekonomske gubitke. Fungicidi i pesticidi se obično koriste da bi se sprečilo pogoršanje kvaliteta i propadanje poljoprivrednih proizvoda nakon žetve [56]. Termin pesticid odnosi se na svaku supstancu ili smešu supstanci namenjenu za sprečavanje, uništavanje ili kontrolisanje štetočina (neželjenih vrsta biljaka i životinja), koje nanose štetu tokom proizvodnje, obrade, skladištenja, transporta ili stavljanja u promet hrane, poljoprivrednih proizvoda, stočne hrane, drveta i proizvoda od drveta. Takođe, pesticidi se mogu primeniti na usevima pre ili posle žetve kako bi se roba zaštitila od propadanja tokom skladištenja i transporta („Međunarodni kodeks ponašanja u vezi sa distribucijom i upotrebom pesticida“, Organizacija Ujedinjenih nacija za hranu i poljoprivredu, 2002). Nakon primene, najveći deo pesticida ostaje neiskorišćen, tako da dolazi do njihovog mešanja sa vazduhom, zemljom i vodom, što štetno utiče na ljude, kućne ljubimce i životnu sredinu [4]. Neke od najčešće korišćenih agrohemijskih sredstava koje se primenjuju u koncentrovanom obliku mogu godinama da se ugrađuju u tlo ili podzemne vode. Dug period razgradnje ima za posledicu njihovo uključivanje u lanac ishrane [66]. Većina pesticida koja se primenjuje u poljoprivredi nije namenjena samo za određenu grupu organizama, pa tako mogu uticati na zdravlje osetljivih organizama, kao što su to populacije ljudi i divljih životinja [4,5]. Oni mogu izazvati ozbiljna zagađenja životne sredine, ekološke i zdravstvene probleme, posebno ako se koriste stalno i nekontrolisano. Mnogi visoko-toksični pesticidi mogu izazvati ozbiljne bolesti [4]. Česta upotreba sintetičkih pesticida dovela je do razvoja otpornosti štetočina na pesticide i do njihovog ponovnog pojavljivanja [6]. Novija istraživanja pokazala su da više od 70% tradicionalnih pesticida nije tako efikasno u poljoprivredi zbog česte upotrebe sve većih doza za postizanje optimalne bioefikasnosti. Mnogi pesticidi su u razvijenim zemljama zabranjeni strogim propisima o pesticidima, ali se nažalost, još uvek primenjuju u mnogim zemljama u razvoju [66].

U poslednje vreme postoji povećano interesovanje za pesticidima prirodnog porekla, zbog toksičnog efekta na zdravlje ljudi i sve većeg zagađenja životne sredine, uzrokovane primenom sintetičkih pesticida. Prirodni pesticidi podrazumevaju direktno ili indirektno korišćenje prirodnih biljnih proizvoda/ botaničkih sredstava, uključujući etarska ulja, u kontroli štetočina i bolesti [6]. Biopesticidi i „zeleni pesticidi“ su izrazi koji se, takođe, koriste za prirodne pesticide i obuhvataju sve prirodne materijale koji mogu smanjiti populaciju štetočina i povećati proizvodnju hrane [36,37]. Većina etarskih ulja se smatra ekološki prihvatljivim, bezbednim za ljudsku upotrebu i životnu sredinu, sa niskom toksičnošću po sisare i nalaze se na GRAS listi [176]. Mnoga etarska ulja u prirodi imaju važnu ulogu u zaštiti biljaka, jer poseduju antibakterijska, antivirusna, antifungicidna, insekticidna, privlačna ili odbojna svojstva prema brojnim vrstama insekata uz određenu selektivnost [130].

Tehnike inkapsulacije sve više nalaze primenu u oblasti poljoprivrede za inkapsulaciju pesticida, đubriva i drugih agrohemijskih sredstava, omogućavajući uzgajivačima da precizno kontrolišu uslove pod kojima se aktivni sastojak oslobađa. Inkapsulacija može pomoći da se upotreba pesticida svede na najmanju moguću meru i tako smanji njihov uticaj na životnu sredinu [54]. U slučaju pesticida, inkapsulacija treba da omogući sporo i kontinuirano oslobađanje aktivnog agensa u životnu sredinu do postizanja optimalnih koncentracija. Minimalna brzina oslobađanja je određena efikasnošću inkapsuliranog aktivnog sredstva, a maksimalna brzina zavisi od njihove fitotoksičnosti. Na *Slici 1.19* dat je prikaz idealanog kontrolisanog oslobađanja biopesticida tokom sedam dana, koji se sastoji od brzog početnog oslobađanja uz postizanje koncentracije koja se nalazi između maksimalne koncentracije sa kojom se postiže efikasnost i minimalne koncentracije koja prouzrokuje toksičnost, nakon čega sledi dugo i konstantno oslobađanje. U procesu kontrolisanog otpuštanja je uključeno više parametara, kao što su stepen apsorpcije od strane biljke, isparavanje, ispiranje i razgradnja [177].

Za primenu ovakvog sistema potrebno je zadovoljiti još jedan važan uslov, da primenjeni pesticidi budu dostupni u optimalnoj koncentraciji najmanje nedelju dana kako bi se izbegla njihova

ponovna primena. Oslobođanje aktivnog agensa nakon inkapsulacije je moguće jednostavnom difuzijom, pod dejstvom spoljašnjeg faktora ili erozijom matriksa. U svim slučajevima, važno je da ni matrica, ni njeni proizvodi razgradnje nisu toksični po životnu sredinu, pa se zbog toga mnogi prirodni polimeri koriste za inkapsulaciju pesticida [177].



Slika 1.19. Kontrolisano oslobađanje biopesticida koje pokazuje brzo početno oslobađanje uz postizanje koncentracije koja se nalazi između maksimalne koncentracije kojom se postiže efikasnost i minimalne koncentracije koja prouzrokuje toksičnost, nakon čega sledi dugo i konstantno oslobađanje [177]

Sve prethodno pomenute tehnike inkapsulacije etarskih ulja se mogu primeniti i kod biopesticida (**Odeljak 1.2.1.**) [56,57]. Formulacije pesticida na bazi vode, koje koriste koloidne sisteme, mogu predstavljati dobru alternative za postojeće formulacije [66]. Emulzija ulje u vodi je formulacija koja omogućava da se tečni pesticidi koji su nerastvorni u vodi ili organski rastvarači koji sadrže rastvorene čvrste pesticide raspršuju kao male kapljice u vodi, uz primenu određene energije ili dodatak surfaktanata. Ova formulacija pesticida na bazi vode uglavnom se smatra bezbednom i ekološki prihvatljivom [178].

U novije vreme javlja se veći broj istraživanja gde se makroemulzije i nanoemulzije sa inkapsuliranim etarskim uljima primenjuju kao biopesticidi [66]. Akutna toksičnost i repelentna aktivnost različitih etarskih ulja u obliku nano-formulacija (hladni aerosol) i gelova ispitana je na *Tribolium confusum* L., insektu koji je najčešća štetočina za brašno. Nano-formulacije su dobijene mešanjem destilovane vode, surfaktanta (Tween 80) i osam različitih etarskih ulja (anisa, pelina, komorača, belog luka, lavande, mente i ruzmarina). Gelovi na bazi etarskih ulja dobijeni su pomoću hidrofилnog gel supstrata; korišćenjem agaroze za postizanje jače teksture i natrijum-poliakrilata za održavanje hidratacije gela. Najbolje repelentno dejstvo pokazala je gel-formulacija na bazi etarskog ulja anisa, a nano-formulacija sa uljem belog luka izazvala je najveću smrtnost odraslih *T. confusum*. [179]. Nanoemulzije na bazi etarskog ulja eukaliptusa, surfaktanta i vode pokazale su se kao uspešne protiv dva glavna insekta (*Sitophilus orizae* L. i *Tribolium castaneum* (Herbst)) koji napadaju pirinač tokom skladištenja [180]. Nanoemulzije sa etarskim uljem *Lippia multiflora* ispitane su kod suzbijanja štetočina karakterističnih za kupus (kuposov moljac (*Plutella kilostella* L.), lisne vaši (*Brevicoryne brassicae* L.), mrena (*Hellula undalis* L.), lišćara (*Spodoptera ekigua* L.) i bele mušice (*Bemisia tabaci* L.)) na poljoprivrednim parcelama. Takođe, nanoemulzija

dobijena niskoenergetskom metodom korišćenjem etarskog ulja, 89,75% hidrolata i 0,25% hitozana, pokazala se veoma efikasnom prema vrstama *B. brassicae* i *P. kilostella* [181].

2. Eksperimentalni deo

2.1. Priprema biopolimernih emulzija i disperzija

Hemikalije i reagensi koji su korišćeni u pripremi emulzija i disperzija predstavljeni su u *Tabeli 2.1.*

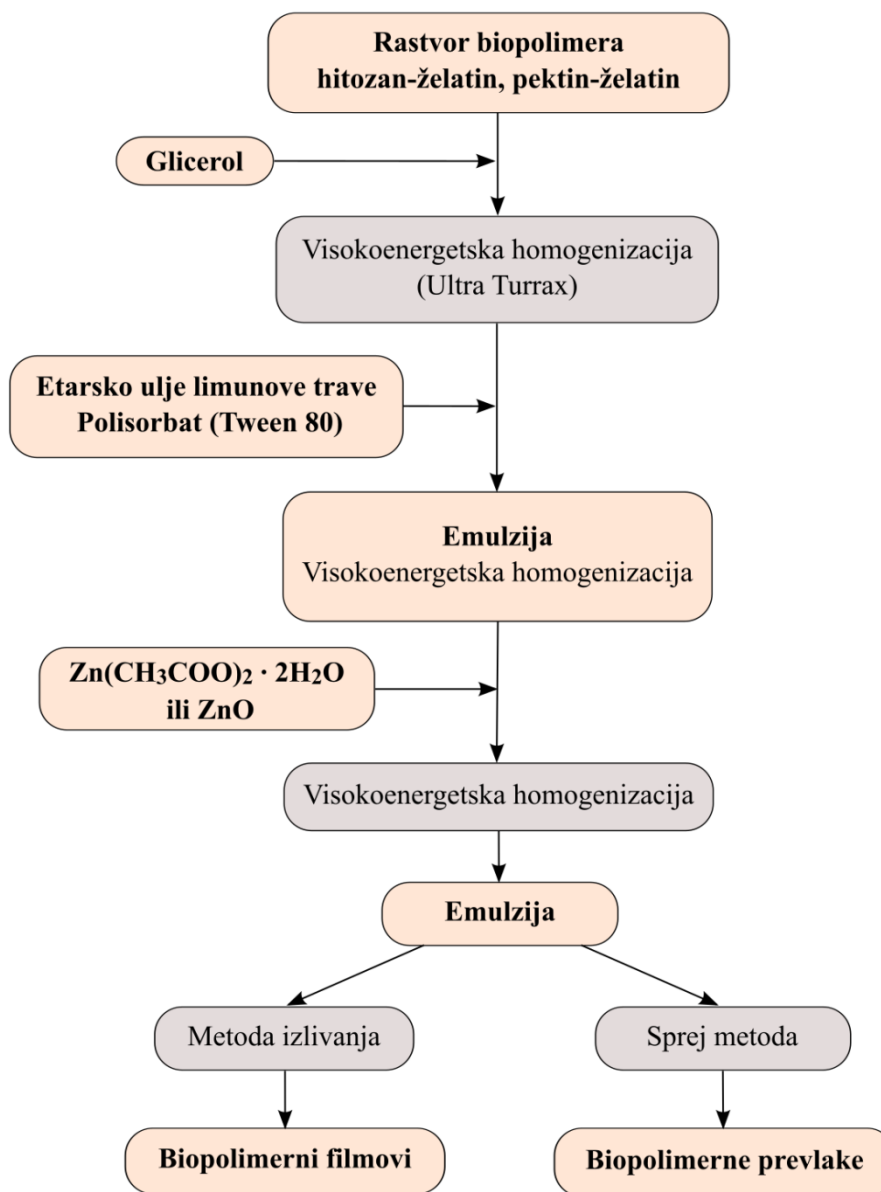
Tabela 2.1. Hemikalije i reagensi

Hemikalije i reagensi	Specifikacija	Proizvođač
Hitozan	male molekulske mase (50,000 – 190,000 Da, na osnovu viskoznosti)	Sigma-Aldrich (Island)
Pektin	proizvod za industrijsku upotrebu, prehrambeni dodatak	Eterika ltd. (Srbija)
Goveđi želatin	želatin iz goveđe kože, tip B, prah, bio-reagens	Sigma-Aldrich (Canada)
Etarsko ulje limunove trave (<i>Cymbopogon citratus</i> L.)	100% čistoće	HerbaOils ltd. (Beograd, Srbija)
Glicerol	za molekularnu biologiju; čistoća $\geq 99\%$, $M = 92,09 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	Sigma-Aldrich (Malezija)
Tween 80 (Polisorbat 80)	$1,064 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$	Alfa Aesar [®] , A Johnson Matthey Company (Karlsruhe, Nemačka)
Glacijalna sirćetna kiselina	ACS reagens, Ph. Eur	AnalaR Normapur [®] , VVR Chemicals (Francuska)
ZnO	99,9% metalne osnove, nanoprah (20 – 30 nm)	Alfa Aesar [®] (Karlsruhe, Nemačka)
$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	puriss p.a., ACS reagens	Sigma-Aldrich (Nemačka)

Različite formulacije biopolimernih emulzija dobijene su mešanjem rastvora hitozana i želatina ili pektina i želatina sa etarskim uljem limunove trave (LT). Rastvor hitozana pripremljen je rastvaranjem praha hitozana u rastvoru sirćetne kiseline (1 mas.%), uz intenzivno mešanje. Odvojeni rastvori pektina i želatina dobijeni su rastvaranjem odgovarajućih prahova u destilovanoj vodi, uz mešanje i zagrevanje. Glicerol je korišćen kao plastifikator, a Tween 80 kao emulgator. Etarsko ulje limunove trave, u koncentraciji do 25 mas.% (u odnosu na ukupnu masu biopolimera), dodato je rastvoru biopolimera uz intenzivno mešanje, primenom uređaja za visokoenergetsku homogenizaciju (Ultra Turrax[®] IKA-Werke, Nemačka), da bi se dobila homogena emulzija. $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ili nanočestice ZnO u koncentraciji do 3 mas.% (u odnosu na ukupnu masu biopolimera) dodati su u pripremljene emulzije. Detaljan postupak pripreme emulzija predmet je objavljenе patentne prijave (broj patentne prijave: WO/2020/055277) [182].

Korišćenjem gore opisanog postupka pripremljeno je šest različitih formulacija emulzija na bazi hitozan-želatin (H-Ž) i pektin-želatin (P-Ž). Šema postupka pripreme emulzija prikazana je na *Slici 2.1.*

Disperzije na bazi hitozan-želatin i pektin-želatin pripremljene su istim postupkom kao i emulzije, s tom razlikom što u postupku nije korišćeno etarsko ulje limunove trave. Sastavi dobijenih emulzija i disperzija predstavljeni su u **Tabeli 2.2**.



Slika 2.1. Šematski prikaz postupka pripreme emulzija na bazi hitozana i pektina

Tabela 2.2. Sastavi formulacija emulzija i disperzija na bazi hitozana i pektina (glicerol i Tween 80 su prisutni u svim formulacijama)

Uzorak	Sastav formulacija
Emulzije	
H-Ž + LT	Hitozan-želatin + etarsko ulje limunove trave
H-Ž + LT + Zn-Ac	Hitozan-želatin + etarsko ulje limunove trave + Zn(CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O
H-Ž + LT + ZnO	Hitozan-želatin + etarsko ulje limunove trave + ZnO
P-Ž + LT	Pektin-želatin + etarsko ulje limunove trave
P-Ž + LT + Zn-Ac	Pektin-želatin + etarsko ulje limunove trave + Zn(CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O
P-Ž + LT + ZnO	Pektin-želatin + etarsko ulje limunove trave + ZnO
Disperzije	
H-Ž	Hitozan-želatin
H-Ž + Zn-Ac	Hitozan-želatin + Zn(CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O
H-Ž + ZnO	Hitozan-želatin + ZnO
P-Ž	Pektin-želatin
P-Ž + Zn-Ac	Pektin-želatin + Zn(CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O
P-Ž + ZnO	Pektin-želatin + ZnO

2.2. Karakterizacija emulzija i aktivnih komponenti

2.2.1. Određivanje hemijskog sastava etarskog ulja limunove trave

Hemijski sastav etarskog ulja limunove trave određen je korišćenjem gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GC-MS), pomoću GCMS-QP2010 plus spektrometra (Shimadzu, Japan), opremljenog AOC 5000 injektorom i ZB-1 kolonom (Phenomenex, L = 30 m, ID = 0,25 mm, df = 0,50 μm). Uzorak u količini od 1 μl ubrizgan je u „split” modu (1:30), sa temperaturom injektora podešenom na 250 °C. Maseni spektri su dobijeni u modu elektronske jonizacije (EI, eng. „*electron ionization*”) (± 70 eV) u opsegu skeniranja m/z (masa/ naelektrisanje) od 40 – 450 amu (eng. „*atomic mass unit*”). Kao gas nosač korišćen je helijum (He, 99,9%), sa brzinom protoka od 1 ml·min⁻¹. Kolona je linearno zagrevana od 40 do 280 °C, pri brzini od 6 °C·min⁻¹ i zadržana 5 min na 280 °C. Temperatura izvora jona je bila podešena na 280 °C, a temperatura interfejsa na 290 °C. Identifikacija izdvojenih sastojaka izvršena je upoređivanjem njihovih masenih spektara sa spektrima iz Wiley8, NIST05 i FFNSC3 biblioteka, korišćenjem različitih pretraživača.

2.2.2. Određivanje veličine kapljica inkapsuliranog etarskog ulja i zeta potencijala

Veličina kapi inkapsuliranog etarskog ulja limunove trave u emulzijama na bazi hitozana i pektina, kao i zeta potencijal (površinsko naelektrisanje) kapi određeni su metodom laserske difrakcije (Particle Analyzer Litesizer 500, Anton Paar, Austrija). Veličina čestica/ kapljica određena je na principu dinamičkog rasipanja svetlosti (DLS, eng. “*dynamic light scattering*”), a zeta potencijal prema elektroforetskom rasipanju svetlosti (ELS, eng. “*electrophoretic light scattering*”). Uzorci emulzija su neposredno pre merenja razblaženi destilovanom vodom (1 ml emulzije u 19 ml destilovane vode). Veličina kapi i zeta potencijal svakog uzorka, mereni su tri puta, a zatim je izračunata i prikazana srednja vrednost merenja. Analize su rađene nakon jednog dana od pripreme uzorka i nakon mesec dana, uz čuvanje na sobnoj (24 °C) i na temperaturi frižidera (4 °C).

2.3. Dobijanje biopolimernih filmova

Tanki i providni biopolimerni filmovi, na bazi hitozan-želatin i pektin-želatin, dobijeni su iz emulzija i disperzija metodom izlivanja. Ova metoda je zasnovana na izlivanju rastvora u kalupe i isparavanju rastvarača iz polimerne matrice, pod ambijentalnim uslovima (24 ± 1 °C, relativna vlažnost vazduha 40%), u cilju stvaranja kompaktnih filmova [9].

2.4. Karakterizacija biopolimernih filmova

2.4.1. Infracrvena spektroskopija sa Furijevom transformacijom (ATR–FTIR)

Za određivanje infracrvenog spektra sa Furijevom transformacijom (FTIR, eng. “*Fourier transform infrared*”), biopolimerni filmovi su izrađeni sa svakom komponentom posebno. Filmovi su najpre napravljeni od čistog hitozana ili pektina, a potom sa dodatkom svake komponente koja je sledila (prema postupku pripreme emulzija prikazanom na *Slici 2.1*). FTIR spektar filmova snimljen je korišćenjem FT-IR spektrofotometra (Spectrum Two FT-IR Spectrometer, PerkinElmer, SAD), u režimu oslabljene ukupne refleksije (ATR, eng. “*attenuated total reflectance*”), u oblasti infracrvenog zračenja talasne dužine od 4000 – 400 cm⁻¹, pri rezoluciji od 4 cm⁻¹, sakupljajući četiri skeniranja po spektru.

2.4.2. Termijska analiza

Termička stabilnost filmova ispitana je pomoću simultanog termijskog analizatora (Simultaneous Thermal Analyzer (STA) 6000, PerkinElmer, SAD) u atmosferi argona, pri brzini protoka od 20 ml·min⁻¹. Uzorci filmova mase oko 16 g zagrevani su pri konstantnoj temperaturi od 40 – 700 °C, pri brzini zagrevanja od 20 °C·min⁻¹.

2.4.3. Mikroskopija atomskih sila (AFM)

Topografija površine biopolimernih filmova okarakterisana je mikroskopijom atomskih sila (AFM, eng. “*Atomic Force Microscope*”) pomoću uređaja Ntegra SPM (NT-MDT, Rusija) u polukontaktom režimu greške. Frekvencija skeniranja tokom merenja održavana je na 1,0 Hz, dok je veličina koraka snimljenih slika bila 100×100 , 50×50 i 20×20 μm . Amplituda oscilacije opruge (tj. “*Set Point*”) tokom merenja bila je 10 V. Snimljene slike u visokom režimu (“*Height mode*”) odgovaraju topografiji površine, dok su slike u režimu magnitude (“*Mag*”) povezane sa signalom greške koji daje veći kontrast za oštre detalje u području skeniranja.

2.4.4. Skanirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Skansirajuće elektronske mikrografije biopolimernih filmova dobijene su upotrebom skansirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM, eng. “*Scanning Electron Microscopy*”), TESCAN Vega TS 5130MM, Br TESCAN (SEMNO, Češka). Snimanja su rađena u sekundarnom režimu snimanja elektrona (SE, eng. “*secondary electron detector*”) i režimu povratno rasejanih elektrona (BSE, eng. “*backscattered electrons detector*”), pri naponu od 10 kV. Neposredno pre SEM analize, uzorci su napareni srebrom u uslovima vakuuma korišćenjem uređaja SC7620 Mini Sputter Coater (Kvantum Design-Kuorum Technologies, Engleska).

2.4.5. Određivanje sadržaja vlage i ukupne rastvorne materije filmova

Sadržaj vlage i ukupne rastvorne materije filmova ispitani su prema metodi opisanoj u literaturi [183,184]. Za svaki uzorak filma isečene su male trake (3×3 cm) i zatim sušene 24 sata u laboratorijskoj sušnici sa cirkulacijom vazduha na 105 °C (Sterimatic ST-11, “*Instrumentaria*”, Zagreb). Mase uzorka pre (m_{vl}) i posle sušenja (m_o) su zabeležene, a sadržaj vlage (ω_{vl} , %) izračunat je kao procentualni gubitak mase u odnosu na početnu masu, korišćenjem formule (1). Nakon toga, trake su direktno uronjene u čašu zapremine 50 ml u kojoj se nalazilo 30 ml destilovane vode (pH 6). Nakon 24 sata stajanja u destilovanoj vodi na 24 °C, trake su profiltrirane, lagano isprane destilovanom vodom i zatim ponovo sušene 24 sata na 105 °C (da bi se utvrdila masa suve materije koja nije rastvorena u vodi). Sadržaj ukupne rastvorne materije (ω_r , %) određen je kao razlika mase početne suve materije (m_o) i nerastvorene suve materije nakon 24 sata stajanja u destilovanoj vodi (m_{so}) i izražena je procentualno u odnosu na masu početne suve materije, prema formuli (2). Za svaki uzorak filma merenja su vršena u tri ponavljanja.

$$\omega_{vl} = \frac{m_{vl} - m_o}{m_{vl}} \cdot 100 \quad (1)$$

$$\omega_r = \frac{m_o - m_{so}}{m_o} \cdot 100 \quad (2)$$

2.4.6. Mehanička svojstva filmova

Za određivanje mehaničkih svojstava, biopolimerni filmovi su isečeni u obliku traka (110 × 15 mm). Merenje debljina traka vršeno je pomoću uređaja za merenje debljine sloja (Easy Check FE, List Magnetic, Nemačka), koji je imao stepen osetljivosti od 0,001 mm. Pet vrednosti debljina je slučajno uzeto na različitim pozicijama, na svakom uzorku filma. Sila potrebna za kidanje traka određena je pomoću mikrokidalice za ispitivanje statičke napetosti i/ ili sabijanje materijala (Tinius Olsen H10KS, Norveška). Prilikom merenja korišćena je brzina od 50 mm·min⁻¹. Mehaničke osobine filmova (zatezna čvrstoća – R_m [MPa], izduženje pri prekidu – A [%], modul elastičnosti – E [MPa]), određene su na osnovu krivi deformacija – napon, a prema sledećim formulama:

$$R_m = \frac{F}{b \cdot h} \quad (3)$$

$$A = \frac{\Delta l}{l} \quad (4)$$

$$E = \frac{R_m}{A} \quad (5)$$

gde su: F [N] – sila pri kojoj dolazi do pucanja filma, b [mm] – širina uzorka, h [mm] – debljina uzorka, Δl [mm] – istežanje, l [mm] – početna dužina filma.

2.5. Ispitivanje antibakterijskih svojstava biopolimernih emulzija i disperzija u *in vitro* uslovima

Korišćenjem agar-difuzione metode ispitana je antibakterijska aktivnost biopolimernih emulzija i disperzija u *in vitro* uslovima prema *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Bacillus subtilis* ATCC 6633 [185]. Starost kultura koje su korišćene za ispitivanje bila je 24 ili 48 sati. Suspenzije bakterijskih sojeva (ukupan broj ćelija 10^8 CFU·ml⁻¹) pomešane su sa „Mueller-Hinton” agarom podlogom (Becton Dickinson GmbH, Nemačka) i izliveno u prethodno sterilizovane Petrijeve posude (ø 90 mm). Ukupan broj ćelija u Mueller-Hinton agaru nakon dodavanja kulture iznosio je $5 \cdot 10^5$ CFU·ml⁻¹. Nakon očvršćavanja agarne podloge, napravljeni su u njenom centru otvori (ø 7 mm), u koje je potom dodato 100 µl biopolimerne emulzije ili disperzije. Petrijeve posude su nakon toga držane 2 sata na 4 °C da bi se omogućila difuzija biopolimernih emulzija ili disperzija, a potom su ostavljene u termostatu na 28 °C, 24 ili 48 sati. Za svaki testirani soj rađena su tri ponavljanja, a nakon inkubacije određeno je prisustvo ili odsustvo zone inhibicije, čiji prečnik je izmeren (mm).

2.6. Primena prevlaka na bazi hitozana i pektina u aktivnom pakovanju

2.6.1. Ispitivanje antimikrobnih svojstava prevlaka na bazi hitozana i pektina u *in vivo* uslovima

Biopolimerne prevlake su formirane nanošenjem emulzija na površinu postojećeg ambalažnog materijala. Na unutrašnje strane kartonskih kutija (zapremine 1 dm³) sprejem su nanete emulzije na bazi hitozana (H-Ž + LT; H-Ž + LT + Zn-Ac; H-Ž + LT + ZnO) i pektina (P-Ž + LT; P-Ž + LT + Zn-Ac; P-Ž + LT + ZnO), koristeći istu količinu aktivnih komponenti po površini pakovanja. Nakon 1 sata sušenja isprskanih kutija u ambijentalnim uslovima (24 ± 1 °C, relativna vlažnost vazduha 40%), emulzije su na površini ambalaže formirale tanke, providne i u vodi nerastvorne prevlake. Antimikrona svojstva prevlaka na bazi hitozana i pektina ispitana su praćenjem rasta i razmnožavanja ćelija epifitnih vrsta kvasaca i plesni na malinama koje su upakovane i skladištene. Uzorci sveže organske maline (*Rubus idaeus* L.) uzeti su iz organskog voćnjaka u severnom delu Srbije i upakovani u prethodno obložene kutije (po 150 g). Maline upakovane u neobložene kutije služile su kao kontrolni uzorci. Mikrobiološka analiza upakovane maline urađena je na dan pakovanja (nulti dan), posle šest i osam dana čuvanja na temperaturi frižidera u SRPS ISO/IEC 17025:2017 i SRPS EN ISO/IEC 17065:2016 akreditovanoj laboratoriji. Analize uzoraka malina vršene su u skladu sa ISO standardima za određivanje ukupnog broja ćelija kvasca i plesni (ISO 21527-1:2008), kao i vrsta bakterija iz roda *Salmonella* (ISO 6579-1:2017), *Listeria monocitogenes* (ISO 11290-2:2017) i *Escherichia coli* (ISO 16649-2:2001).

2.6.2. Ispitivanje zdravstvene bezbednosti ambalažnog materijala

Za ispitivanje zdravstvene ispravnosti i utvrđivanje ukupne migracije komponenti iz prevlaka u hranu, za analize je korišćen materijal u obliku filmova. Zdravstvene analize filmova na bazi hitozana i pektina obuhvatale su senzorne analize, fizička, hemijska i mikrobiološka ispitivanja, koja su rađena u nacionalnoj sertifikovanoj laboratoriji. Fizičko i hemijsko ispitivanje biopolimernih filmova uključivalo je specifičnu migraciju koja je urađena tečnom hromatografijom sa masenom spektrometrijom (LC-MS) i atomskom apsorpcionom spektroskopijom (AAS) (korišćene metode: POM-03-LC MS 02, POM-03-AAS 01, POM-03-AAS 07, POM-03-AAS 08). Mikrobiološko ispitivanje biopolimernih filmova uključivalo je određivanje ukupnog broja ćelija aerobnih mezofilnih bakterija, *Salmonella* spp., koagulaza pozitivnih stafilokoka, sulfitoredukujućih klostridija, vrsta roda *Proteus* i *Escherichia coli*.

2.7. Primena emulzije na bazi pektina kao biopesticida

Efekat emulzije na bazi pektina kao biopesticida ispitan je na krompirovom moljcu (*Phthorimaea operculella* L.) praćenjem stope smrtnosti insekata tokom 7 dana. Tokom eksperimenta insekti su bili izloženi dejstvu čistog i inkapsuliranog (emulzija) etarskog ulja limunove trave.

2.7.1. Određivanje letalnih koncentracija (LC)

Uzgoj insekata za analize je izvršen tako što su odrasli insekti sakupljeni sa krompira u skladištima i njivama u Čačku (Srbija). Sakupljeni insekti su dve godine kontinuirano uzgajani u laboratoriji na krtolama krompira. Temperatura komore za uzgoj insekata održavana je na $24,5 \pm 1$ °C, sa relativnom vlažnošću vazduha od $65 \pm 5\%$, tokom ciklusa dan i noć od 16 : 8 sati (svetlo : mrak). Eksperimenti za testiranje smrtnosti insekata izvedeni su pod istim ovim uslovima, gde su korišćeni moljci bili stari samo 24 sata [186].

Za utvrđivanje efektivnih koncentracija čistog i inkapsuliranog etarskog ulja limunove trave (LT) koje dovode do smrti 50% (LC_{50}) i 95% (LC_{95}) populacije krompirovog moljaca, urađeni su pilot biološki testovi u skladu sa metodom opisanom u literaturi [187,188]. Korišćeno je osam različitih zapremina od 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 i 0,8 μl čistog LT, što je odgovaralo koncentracijama LT od 0,121; 0,242; 0,363; 0,483; 0,604; 0,725; 0,846 i 0,967 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ vazduha. Svaka od ovih odmerenih zapremina etarskog ulja LT naneta je na filter papir (5×1 cm) koji je nakon toga pričvršćen na poklopac od tegle. Deset insekata ubačeno je u staklenu teglu (zapremine 720 ml), a zatim je tegla čvrsto zatvorena poklopcem (na koji je prethodno stavljen filter papir sa LT). Insekti su bili izloženi isparenjima LT tokom 24 sata, bez ishrane u tom periodu. Nakon 24 sata smrtnost insekata je utvrđena uklanjanjem moljaca iz tegle i stavljanjem u Petrijevu posudu. Nakon 30 min provereno je da li su insekti živi (da li se mogu kretati ili leteti). Eksperiment je sproveden u pet ponavljanja za svaku dozu etarskog ulja.

U drugom eksperimentu, šest različitih masa emulzije od 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3 i 0,35 g, što je odgovaralo koncentracijama emulzije od 0,139; 0,208; 0,278; 0,347; 0,417 i 0,486 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ vazduha, korišćeneno je za određivanje vrednosti LC_{50} i LC_{95} . Svaka masa emulzije naneta je na filter papir (5×1 cm) i smeštena u plastičnu bocu (zapremine 25 ml), koja je zatim prekrivena svilenim tilom (da se izbegne direktan kontakt moljaca i emulzije). Nakon toga, plastična boca sa emulzijom je stavljena u staklenu teglu (720 ml), a zatim je u nju ubačeno 10 moljaca. Staklena tegla čvrsto je zatvorena poklopcem i ostavljena da stoji 24 sata. Smrtnost insekata određena je na isti način kao u slučaju tretmana čistim LT, pri čemu su sprovedena četiri ponavljanja za svaku dozu emulzije.

U oba slučaja pripremljen je i kontrolni uzorak, pri čemu je 10 insekata smešteno u staklenu teglu bez emulzije ili čistog LT.

2.7.2. Određivanje smrtnosti insekata

Za određivanje smrtnosti insekata korišćen je postupak sličan onom koji je opisan u **Odeljku 2.7.1**. Kako bi se osigurala dovoljna količina inkapsuliranog LT u emulziji tokom sedam dana trajanja eksperimenta, a na osnovu analize LC_{50} i LC_{95} za čisto etarsko ulje i emulziju, procenjeno je da je za tretman insekta potrebna količina od 1 g emulzije (koja sadrži 12,5 μl LT).

U slučaju tretmana krompirovog moljca emulzijom, korišćen je 1 g emulzije (koncentracija 1,389 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ vazduha). Nakon 24 sata proverena je smrtnost insekata, a plastična boca sa emulzijom prebačena je u novu staklenu teglu u koju je stavljeno 10 novih insekata (moljaci stari 24 sata) i tegla je ponovo čvrsto zatvorena poklopcem. Ovaj postupak je ponavljan na svakih 24 sata, tokom sedam dana, sve dok emulzija nije izgubila insekticidni efekat.

U tretmanu populacije krompirovog moljca čistim etarskim uljem korišćeno je 12,5 μl LT (koncentracija 14,9 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ vazduha), a postupak je bio sličan onome koji je korišćen za određivanje LC_{50} i LC_{95} čistog LT. Smrtnost insekata određena je nakon 24 sata, a zatim je 10 novih moljaca ubačeno u staklenu teglu koja je potom zatvorena poklopcem, sa čije unutrašnje strane je prethodno stavljen etarsko ulje. Ovaj eksperiment je završen nakon 48 sati, jer je nakon tog vremenskog perioda LT potpuno izgubilo insekticidno dejstvo.

U oba slučaja, eksperimenti su sprovedeni u četiri ponavljanja za svaki ispitivani tretman.

2.7.3. Otpuštanje bioaktivnih jedinjenja

Za određivanje koncentracije etarskog ulja limunove trave (LT) u emulziji, tokom 7 dana, korišćen je UV-Vis spektrofotometar (Shimadzu UV-2600, Japan). Merena je apsorbanca citrala kao glavne bioaktivne komponente etarskog ulja limunove trave [189], koja je bila direktno proporcijalna koncentraciji etarskog ulja u emulziji. Vrednost intenziteta na oko 240 nm (najintenzivniji pik u apsorpcionom spektru LT) korišćena je za određivanje sadržaja LT. UV-Vis spektar čistog LT je snimljen za različite koncentracije etarskog ulja, a potom je urađena kalibraciona kriva na osnovu intenziteta pikova na oko 240 nm, u zavisnosti od koncentracije ulja. Koncentracija LT u emulzijama određena je pomoću kalibracione krive. Sporo otpuštanje LT iz polimerne matrice određeno je korišćenjem slične procedure koja je navedena u literaturi [190]. Emulzija je ostavljena na sobnoj temperaturi u otvorenoj laboratorijskoj čaši pod ambijentalnim uslovima. ApSORPCIONI spektar bioaktivne komponente je meren svakih 24 sata tokom narednih 7 dana, rastvaranjem određene količine emulzije u 0,3 mas.% rastvoru Tween 80. Ista procedura je korišćena za čisto LT, koje je prethodno bilo rastvoreno u 0,3 mas.% rastvoru Tween 80. Količina upotrebljenog LT u ovom postupku bila je proporcionalna količini LT inkapsuliranog u emulziji.

2.8. Statistička analiza

Kod određivanje letalnih koncentracija LT i emulzije, kao i verovatnoće smrtnosti insekata po danima, statistička obrada podataka je urađena pomoću SPSS 25.0 statističkog softvera. Za modelovanje zavisnosti verovatnoće stope smrtnosti populacije insekata od vremena ili koncentracije primenjenih doza čistih i inkapsuliranih bioaktivnih komponenti, korišćena je probit regresija:

$$p_i = \Phi(\beta_0 + \beta_1 \log_{10} x_i) \quad (6)$$

gde je p_i verovatnoća realizacije ishoda kodiranog sa 1, na vrednosti promenljive x_i , a Φ je funkcija standardne normalne raspodele.

U slučaju eksperimenata urađenih u ovoj doktorskoj tezi, p_i je verovatnoća smrtnosti populacije insekata, a x_i predstavlja vreme ili koncentraciju. Model naveden u jednačini (6) odnosi se na populaciju i u ovom slučaju primenjuje se u sledećem obliku:

$$\hat{p}_i = \Phi(b_0 + b_1 \log_{10} x_i) \quad (7)$$

Statistička analiza svih ostalih podataka izvršena je analizom varijanse (ONE WAY-ANOVA i TWO WAY-ANOVA), takođe, korišćenjem statističkog softvera SPSS 25.0. Razlike između srednjih vrednosti procenjene su Dankanovim testom višestrukog opsega ($p < 0,05$), a podaci su izraženi kao srednja vrednost \pm SD (standardna devijacija).

3. Rezultati i diskusija

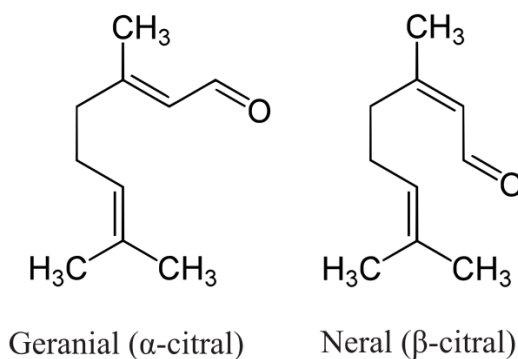
3.1. Karakterizacija emulzija i aktivnih komponenti

3.1.1. Hemijski sastav etarskog ulja limunove trave

Korišćenjem gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GC-MS) određen je hemijski sastav etarskog ulja limunove trave (*Cymbopogon citratus* L). Procentualni sastav bioaktivnih jedinjenja određen je u odnosu na ukupnu površinu dobijenih pikova. Hemijski sastav etarskog ulja limunove trave prikazan je u **Tabeli 3.1**, a hemijske formule glavnih bioaktivnih jedinjenja predstavljene su na **Slici 3.1**.

Tabela 3.1. Hemijski sastav etarskog ulja limunove trave

Naziv jedinjenja	Procentualni sadržaj u uzorku (%)
Geranial (α -citral)	42,32
Neral (β -citral)	22,69
Geraniol	9,79
Geranil acetat	7,36
5-hepten-2-on	3,16
4-nonanon	2,17
Kamfen	1,78
Linalool	1,22
Borneol	1,04
Germakren	0,74
Verbenol	0,45
Limonen	0,38
Ocimen	0,36
α -terpineol	0,27
Eugenol	0,26
δ -kadinen	0,20



Slika 3.1. Hemijske formule glavnih bioaktivnih jedinjenja etarskog ulja limunove trave

GC-MS analizom utvrđeno je 16 različitih bioaktivnih jedinjenja u sastavu etarskog ulja limunove trave, u kome su terpenoidi geranial i neral prisutni u najvećim koncentracijama (**Tabela 3.1**). Ostala bioaktivna jedinjenja zastupljena su u manjem procentu (1 – 20%) ili u tragovima (ispod 1%). Geranial (trans-citral, α -citral) i neral (cis-citral, β -citral) su dva geometrijska izomera citrala [191,192], koja su u ovom slučaju glavna bioaktivna jedinjenja (65,01%), odgovorna za biološku aktivnost etarskog ulja.

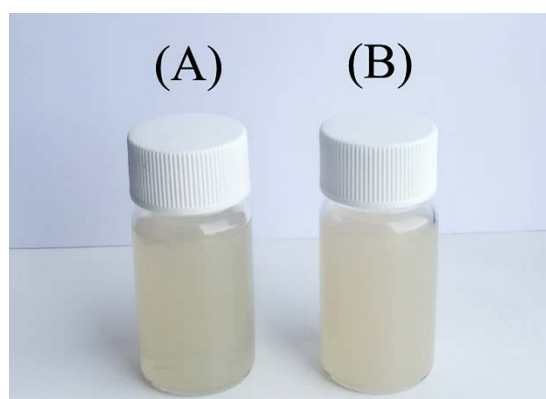
Istraživanja su pokazala da su različita bioaktivna jedinjenja etarskog ulja limunove trave odgovorna za specifične biološke aktivnosti (antibakterijska, antifungalna, antiprotozoalna). Ove karakteristike se najviše pripisuju citralu, kao glavnom bioaktivnom jedinjenju. Takođe, utvrđeno je da su citral i geraniol odgovorni za fungicidno dejstvo, dok su linalol, alkaloidi i fenolna jedinjenja odgovorni za antibakterijsku aktivnost. Smatra se da je antimikrobna aktivnost etarskog ulja limunove trave rezultat kombinovanog delovanja njenih bioaktivnih jedinjenja, a ne samo jednog od njih [137,138].

Citral (3,7-dimetil-2,6-oktadienal) je aciklični monoterpenski aldehid [189], koji je u prirodi zastupljen u različitim biljnim vrstama i citrusima [189,191,193]. U literaturi se citral, takođe, navodi kao glavno bioaktivno jedinjenje etarskog ulja limunove trave, ekstrahovano iz listova biljke [137,191,194], dok sastav i procentualni odnos ostalih bioaktivnih jedinjenja varira u zavisnosti od geografskog porekla biljke, načina ekstrakcije, kao i uslova čuvanja i skladištenja etarskog ulja [134]. Citral poseduje antifungalno, baktericidno i insekticidno dejstvo; predstavlja ekspektorans (podstiče i ubrzava uklanjanje bronhijalne sluzi iz disajnih puteva), spazmolitik je (potiskuje mišićne spazme), dezodorans; stimuliše apetit i ima antiinflamatorno dejstvo [191,193]. Zbog svojih brojnih bioloških svojstava našao je primenu u prehrambenoj (aditiv u hrani i pićima) i kozmetičkoj industriji [189]. Hemijski je nestabilan i pod normalnim uslovima čuvanja podložan je oksidativnoj degradaciji, što dovodi do gubitka njegove antimikrobne aktivnosti [193]. Do oksidativne degradacije citrala dolazi pri kontaktu sa vazduhom, a može biti pojačana toplotom i zračenjem [191]. Takođe, u vodenim rastvorima, tokom vremena, dolazi do njegove razgradnje zbog reakcija katalizovanih kiselinama i oksidativnih reakcija [189]. U vodi je nerastvoran pri neutralnoj pH vrednosti [193].

U brojnim istraživanjima pokazano je da se brzina hemijske razgradnje citrala može značajno usporiti njegovom ugradnjom u koloidne disperzije, kao što su emulzije [195,196], mikro- i nano-emulzije [193,197] ili micele [192]. Inkapsulacijom se povećava stabilnost citrala, jer se na ovaj način bioaktivno jedinjenje izoluje od reaktivnih molekula prisutnih u vodenoj sredini, kao što su protoni i slobodni radikali [189,196].

3.1.2. Veličina kapljica inkapsuliranog etarskog ulja i zeta potencijal

Za postizanje što veće kinetičke stabilnosti emulzije poželjno je da inkapsulirane kapljice etarskog ulja budu što manjih dimenzija, kao i da postoji ujednačena raspodela njihove veličine [198,199]. Kapljice su podložne gravitacionim silama, bez obzira na njihove dimenzije, s tim što je manja verovatnoća da će doći do sedimentacije nano-kapljica u poređenju sa većim kapljicama. Kada su kapljice etarskog ulja manje, tada postoji neprekidno i intenzivnije Braunovo kretanje, koje dominira u odnosu na gravitacionu silu (koja izaziva destabilizaciju emulzije usled flokulacije, stvaranja krema, kolascencije) [198,200]. Homogenost raspodele veličine kapljica etarskog ulja povezana je sa indeksom polidisperznosti; što je vrednost ovog parametra bliža nuli, to je raspodela ujednačenija. Takođe, elektrostatička stabilnost je veoma bitna za postizanje stabilnosti sistema tokom dužeg vremenskog perioda. Zeta potencijal se koristi za određivanje elektrostatičke stabilnosti emulzija, dajući podatke o površinskom naelektrisanju kapljica i interakcijama u sistemu kapljica–kapljica. Do elektrostatičke stabilnosti dolazi kada postoje dovoljno velike odbojne sile među kapljicama usled velikog površinskog naelektrisanja, koje sprečava aglomeraciju kapljica etarskog ulja [199]. Na **Slici 3.2** predstavljen je izgled emulzija na bazi hitozana i pektina.



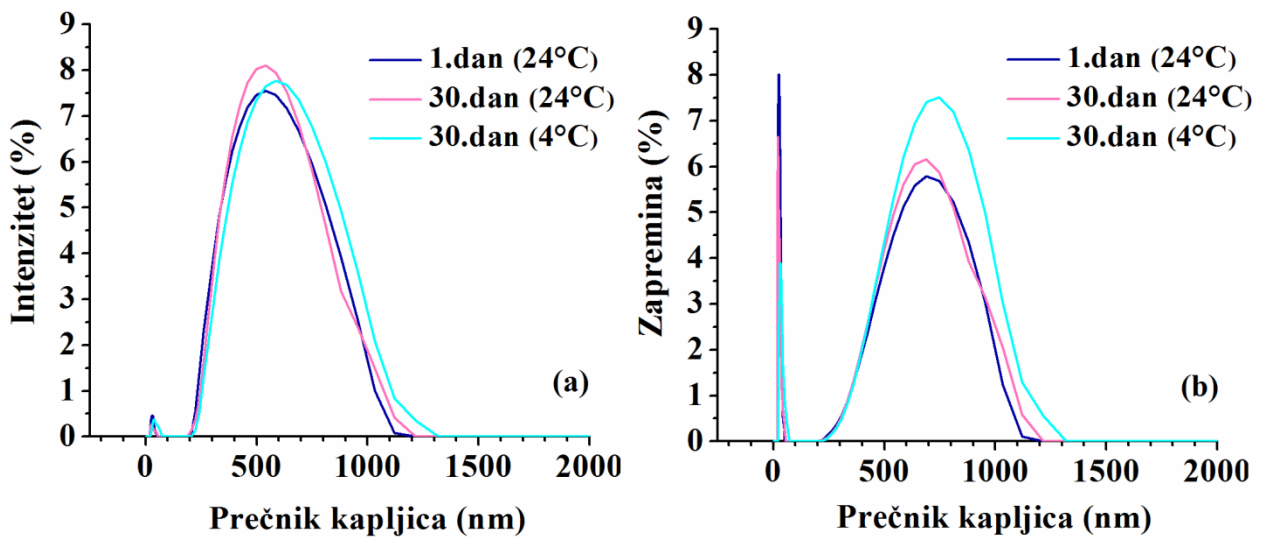
Slika 3.2. Emulzije na bazi (A) hitozana i (B) pektina

U **Tabeli 3.2** date su srednje vrednosti hidrodinamičkog prečnika, indeksa polidisperznosti i zeta potencijala inkapsuliranih kapljica LT u dve različite kontinualne faze (polimerna matrica hitozan-želatin i pektin-želatin). Da bi se utvrdila stabilnost emulzionih sistema, merenja su rađena nakon jednog dana od pripreme uzorka i nakon trideset dana čuvanja na sobnoj i na temperaturi frižidera. Na **Slikama 3.3** i **3.4** prikazane su raspodele veličine hidrodinamičkog prečnika LT u emulzijama u zavisnosti od intenziteta rasipanja svetlosti – (a), kao i raspodele u odnosu na ukupnu zapreminu emulzije – (b).

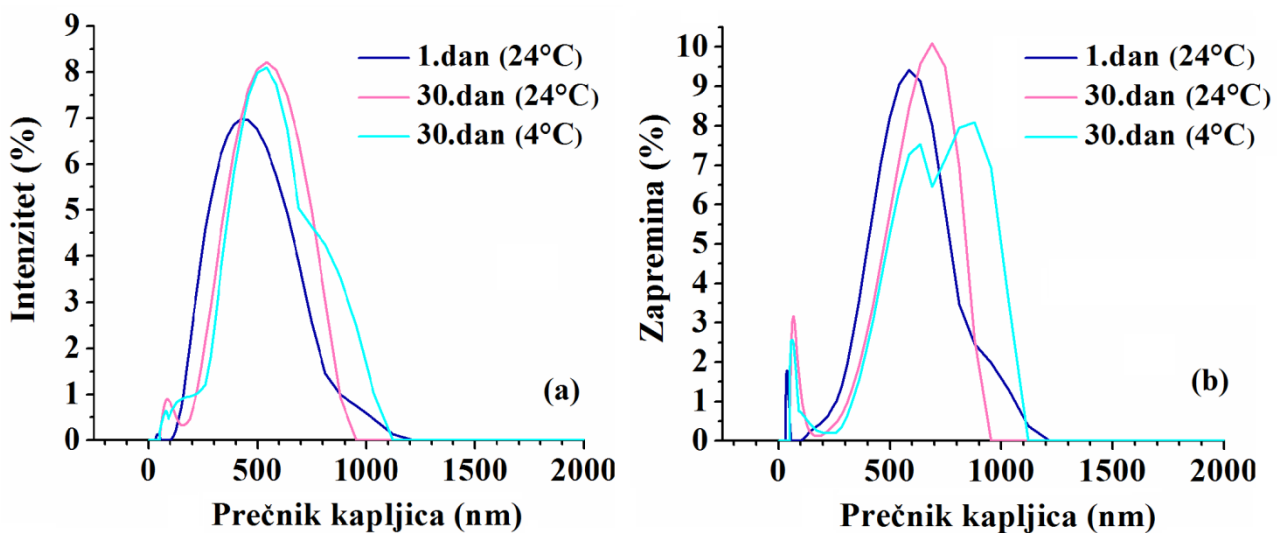
Tabela 3.2. Hidrodinamički prečnik, polidisperzni indeks i zeta potencijal etarskog ulja limunove trave inkapsuliranog u polimernu matricu hitozan-želatin (H-Ž + LT) i pektin-želatin (P-Ž + LT), nakon jednog dana od pripreme uzorka i nakon trideset dana čuvanja na sobnoj i na temperaturi frižidera

Dan	Uzorak	Hidrodinamički prečnik (nm)	Indeks polidisperznosti (%)	Zeta potencijal (mV)
1.dan	H-Ž + LT	488,47 ± 6,03	24,25 ± 2,12	39,00 ± 0,60
	P-Ž + LT	394,44 ± 2,39	24,14 ± 1,59	-28,60 ± 0,21
30. dan (24 °C)	H-Ž + LT	494,16 ± 3,47	22,07 ± 1,51	42,90 ± 0,55
	P-Ž + LT	637,18 ± 11,6	28,78 ± 1,86	-18,60 ± 0,06
30. dan (4 °C)	H-Ž + LT	526,60 ± 8,14	22,93 ± 0,76	42,00 ± 0,33
	P-Ž + LT	787,97 ± 18,2	30,85 ± 0,67	-18,90 ± 0,09

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SD (n = 3)



Slika 3.3. Raspodela veličine hidrodinamičkog prečnika kapljica etarskog ulja limunove trave inkapsuliranog u **emulziji na bazi hitozana**, u zavisnosti od (a) intenziteta svetlosti i (b) ukupne zapremine emulzije, nakon jednog dana od pripreme uzorka i nakon 30 dana čuvanja na sobnoj (24 °C) i na temperaturi frižidera (4 °C)



Slika 3.4. Raspodela veličine hidrodinamičkog prečnika kapljica etarskog ulja limunove trave inkapsuliranog u **emulziji na bazi pektina**, u zavisnosti od (a) intenziteta svetlosti i (b) ukupne zapremine emulzije, nakon jednog dana od pripreme uzorka i nakon 30 dana čuvanja na sobnoj (24 °C) i na temperaturi frižidera (4 °C)

Prvog dana merenja prosečna vrednost hidrodinamičkog prečnika kapljica LT u emulziji na bazi hitozana bila je 488,47 nm, dok je u slučaju emulzije na bazi pektina ova vrednost bila manja i iznosila 394,44 nm. Veličine kapljica LT kod obe emulzije nalazile su se u granicama nanoemulzije (100 – 1000 nm) [65]. Prema nekim autorima nanoemulzijom smatraju se emulzije sa veličinom kapljica manjom od 500 nm [200], tj. u opsegu od 20 – 500 nm [66]. Poznato je da se sve kapljice manje od 1 μm mogu smatrati kinetički stabilnim [200]. Posmatrajući raspodelu veličine kapljica (*Slika 3.3* i *Slika 3.4*), kod obe emulzije (H-Ž + LT; P-Ž + LT) uočava se pojava bimodalne raspodele, s tim što je odziv (intenzitet ili zapremina) bio znatno niži kod kapljica veličine od ~50 nm, u odnosu na one u opsegu oko 400 i 500 nm. O homogenoj raspodeli veličine kapljica govore nam vrednosti indeksa polidisperznosti, koje su kod obe emulzije iznosile oko 24%.

Vrednosti zeta potencijala kod emulzije na bazi hitozana su pozitivne, dok su kod emulzije na bazi pektina negativne, što ukazuje na različitu prirodu disperznih faza, odnosno polimernih matrica. Kod emulzije na bazi hitozana vrednost zeta potencijala bila je veća (39 mV), što ukazuje da je veće rastojanje između kapljica etarskog ulja, a samim tim i da je sistem stabilniji nego u slučaju emulzije na bazi pektina (-28,6 mV). Kada se vrednosti zeta potencijala nalaze u opsegu od 0 do ± 30 mV to ukazuju na privlačenje između kapljica, što dovodi do smanjene stabilnosti emulzije. Emulzija se smatra stabilnom kada vrednosti zeta potencijala prelaze ± 30 mV [199].

Nakon 30 dana čuvanja emulzije na bazi hitozana na sobnoj temperaturi hidrodinamički prečnik inkapsuliranog LT (494,16 nm) je ostao približno iste vrednosti kao prvog dana, dok je pri čuvanju emulzije na temperaturi frižidera bio nešto veći (526,60 nm). Polidisperzni indeks kod emulzije na bazi hitozana, nezavisno od temperature čuvanja, smanjio se u odnosu na prvi dan na oko 22%, što ukazuje da je tokom vremena došlo do povećane ujednačenosti u raspodeli veličine kapljica. Ovo nam potvrđuje i zapreminska raspodela veličine kapljica (*Slika 3.3 (b)*), gde je intenzitet zapremine manjih kapljica (od 21 – 47 nm) nešto smanjen (sa 8,0% na 6,65% – na sobnoj temperaturi i 3,88% – na temperaturi frižidera), a intenzitet većih kapljica (od oko 500 nm) povećan (sa 5,78% na 6,16% – na sobnoj temperaturi i 7,51% – na temperaturi frižidera). Na temperaturi frižidera došlo je i do blagog uvećanja prečnika manjih kapljica (do 73 nm), a takođe, kada se posmatra *Slika 3.3 (a)* i *(b)*, uočava se da je došlo do nešto šireg opsega veličine većih kapljica (posebno na temperaturi frižidera). Sve ovo nam ukazuje da je moglo doći do aglomeracije manjih kapljica u veće, posebno kod uzorka koji je bio na temperaturi frižidera, dok je uzorak na sobnoj temperaturi ostao relativno stabilan. Zeta potencijal nakon 30 dana na obe temperature bio je nešto veći nego prvog dana (42,9 mV – na sobnoj; 42,0 mV – na temperaturi frižidera), što ukazuje da je postojala veća udaljenost između kapljica etarskog ulja, a sami tim povećana stabilnost emulzije na bazi hitozana. U literaturi je navedeno da veličina kapljica različitih etarskih ulja (bosiljka, timijana) inkapsuliranih u kontinualnoj fazi na bazi hitozana u velikoj meri zavisi od načina homogenizacije. Upotrebom homogenizatora po principu rotor-stator dobijene su značajno manje kapljice etarskog ulja (1,3 μm – ulje bosiljka; 1,48 μm – ulje timijana) u odnosu na homogenizaciju pod visokim pritiskom (9,3 μm – ulje bosiljka; 6,6 μm – ulje timijana) [201].

Kod emulzije na bazi pektina nakon 30 dana došlo je do značajnog uvećanja hidrodinamičkog prečnika kapljica inkapsuliranog LT (637,18 nm – na sobnoj temperaturi i 787,97 nm – na temperaturi frižidera). Takođe, došlo je do uvećanja polidisperznog indeksa (28,78% – na sobnoj temperaturi; 30,85% – na temperaturi frižidera), pa samim tim i do manje ujednačenosti raspodele veličine kapljica LT u kontinualnoj fazi što potvrđuju i obe raspodele veličine kapljica (*Slika 3.4 (a)* i *(b)*). Kod raspodele na osnovu intenziteta reflektovane svetlosti vidimo da je došlo do povećanja i intenziteta i prečnika, kako manjih tako i većih kapljica, na obe temperature. Naročito kod uzorka čuvanog na temperaturi frižidera kod koga je uočeno da dolazi do šireg opsega prečnika većih kapljica koje dostižu vrednost 800 – 900 nm. U slučaju zapreminske raspodele veličine kapljica (*Slika 3.4 (b)*), kod emulzije čuvane na temperaturi frižidera primećuje se pojava dva pika u oblastima oko 636 nm i 880 nm. Takođe, dolazi do povećanja prečnika manjih kapljica sa 31 – 51 nm na 51 – 170 nm (sobna temperatura) i 51 – 220 nm (temperatura frižidera). Zeta potencijal emulzije na bazi pektina se nakon mesec dana smanjio (-18,6 mV – na sobnoj temperaturi; -18,9 mV – na temperaturi frižidera), što ukazuje da je došlo do smanjenja rastojanja između kapljica. Sve ovo nam govori da je došlo do narušavanja stabilnosti emulzije na bazi pektina i aglomeracije kapljica etarskog ulja.

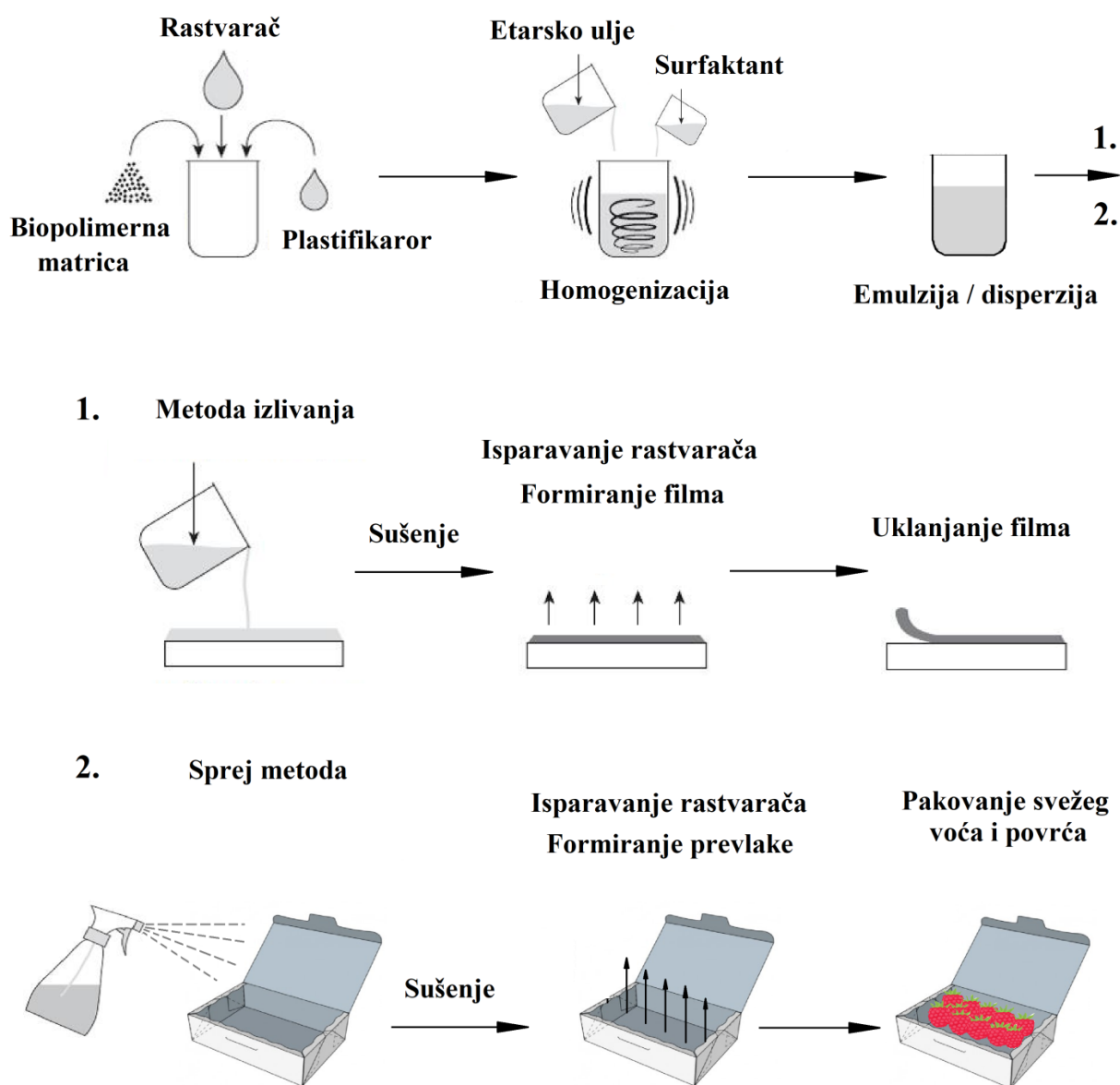
Iako se zeta potencijal emulzije na bazi pektina posle prvog dana merenja nalazio na granici stabilnosti emulzije, ova vrednost je ipak bila veća čak i posle 30 dana u odnosu na onu koju su naveli Mendez (*Mendes*) i saradnici [200] nakon 24 sata. Ovi autori su određivali stabilnost emulzija na bazi pektina sa inkapsuliranim etarskim uljem limunove trave nakon 0 i 24 sata od pripreme emulzije. Za dobijanje emulzija korišćen je homogenizator, Tween 80 je upotrebljen kao surfaktant, a glicerol kao plastifikator. Vrednosti zeta potencijala nakon 24 sata su bile različite u zavisnosti od koncentracije etarskog ulja i imale su negativne vrednosti: -16 mV (0,25 vol.%)

i -14 mV (0,5 vol.%). Indeks polidisperznosti nakon 24 sata, takođe, bio je veći i iznosio 33% (0,25 vol.%) i 47% (0,5 vol.%), dok su veličine kapljica etarskog ulja bile 398 nm (0,25 vol.%) i 1280 nm (0,5 vol.%).

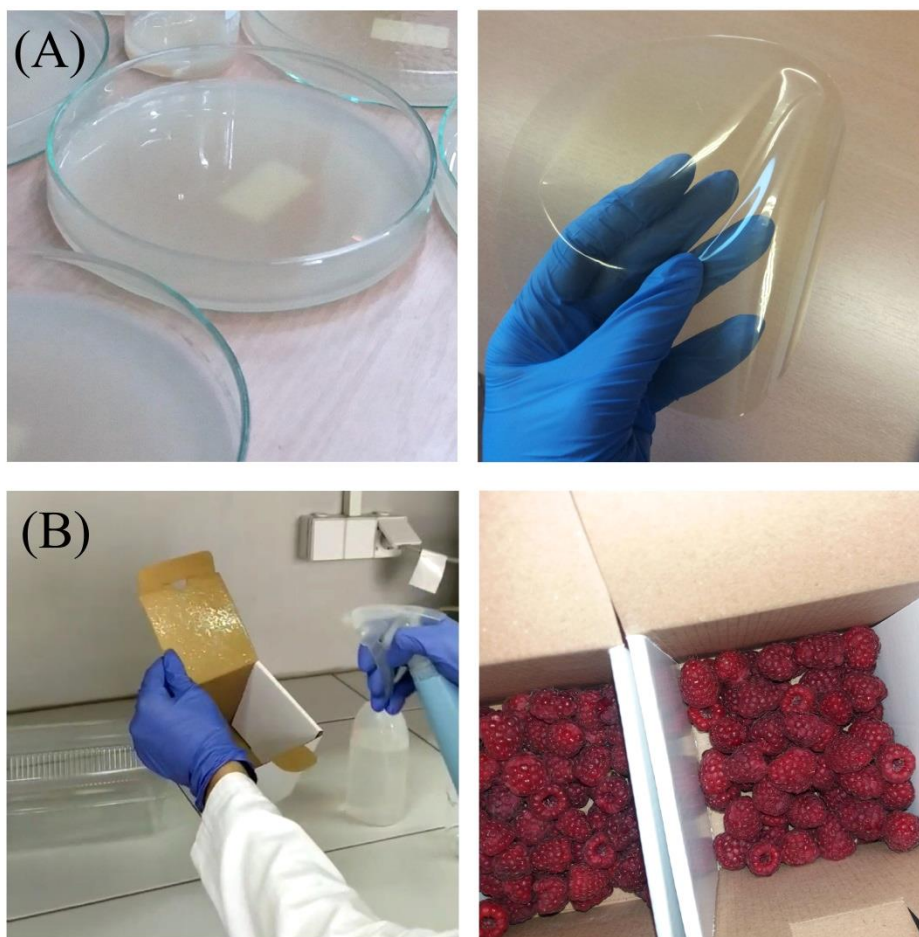
Analize urađene nakon 30 dana čuvanja emulzija nam ukazuju da je H-Ž + LT emulzija stabilnija u odnosu na P-Ž + LT emulziju, i to na obe temperature. Obe emulzije su bile stabilnije na sobnoj temperaturi, nego na temperaturi frižidera.

3.2. Karakterizacija filmova na bazi hitozana i pektina

Tanki i transparentni filmovi su dobijeni iz emulzija i disperzija metodom izlivanja. Prevlake na postojećoj ambalaži za pakovanje su formirane sprej metodom. U oba slučaja sušenje je vršeno na sobnoj temperaturi. Šematski prikazi dobijanja filmova i prevlaka iz emulzija/ disperzija dat je na *Slici 3.5*, a njihov izgled je prikazan na *Slici 3.6*.



Slika 3.5. Šematski prikaz dobijanja filmova metodom izlivanja [169] i prevlaka sprej metodom iz emulzija/ disperzija



Slika 3.6. Izgled (A) filmova (metoda izlivanja) i (B) prevlaka (metoda prskanja) dobijenih iz emulzija/ disperzija

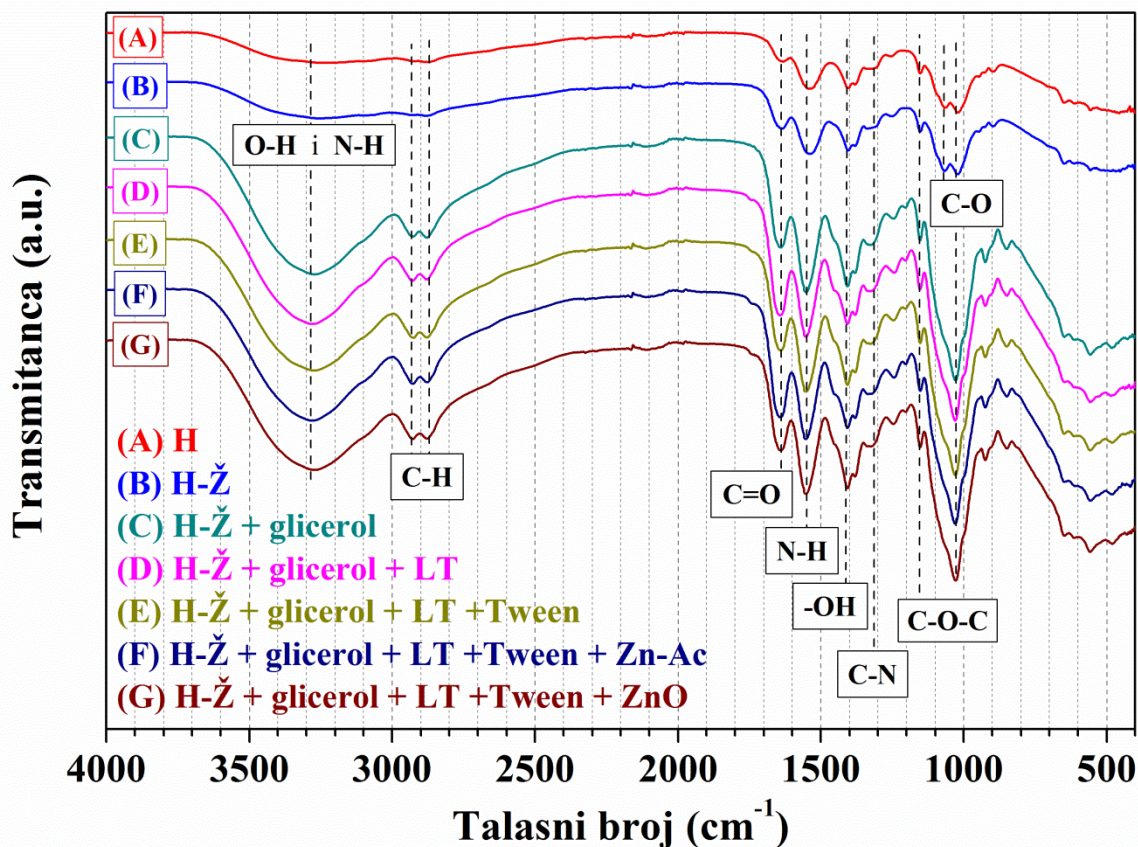
Izgled i transparentnost filmova na bazi hitozana i pektina (bez i sa LT) predstavljeni su na **Slici 3.7.**



Slika 3.7. Filmovi na bazi hitozana i pektina bez i sa dodatkom etarskog ulja limunove trave

3.2.1. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (ATR-FTIR)

Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR) je korišćena za određivanje prisustva određenih funkcionalnih grupa i hemijskih veza u filmovima izređenim od čistog hitozana ili pektina, kao i za utvrđivanje promena do kojih dolazi sa dodatkom svake od navedenih komponenti. Infracrveni spektri filmova prikazani su na *Slici 3.8* i *Slici 3.9*.

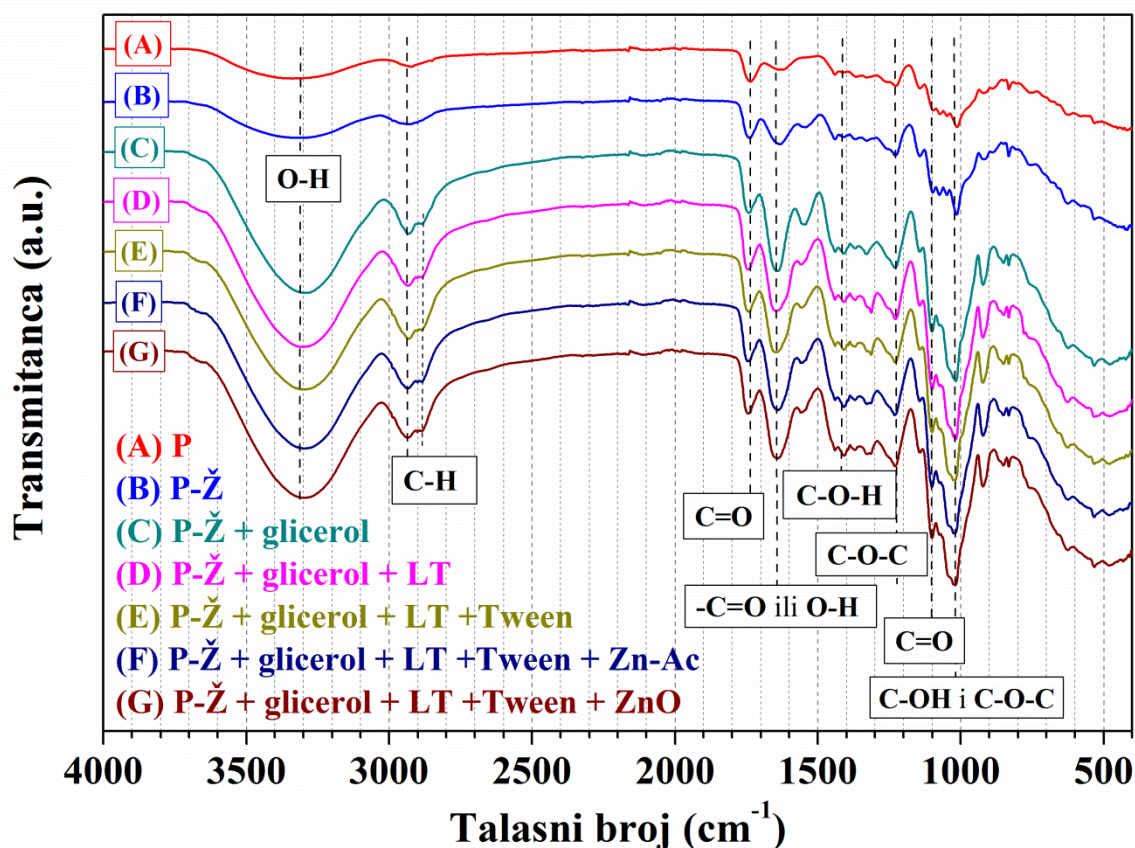


Slika 3.8. FTIR spektri filmova na bazi hitozana

Na FTIR spektru filma na bazi čistog hitozana (*Slika 3.8* (A)) vidljivi su pikovi karakteristični za funkcionalne grupe hitozana, kao i za polisaharide uopšte (3500 – 3200 cm⁻¹; 2878 cm⁻¹; 2926 cm⁻¹ i 1151 cm⁻¹) [183,202,203]. Široka traka u oblasti 3500 – 3200 cm⁻¹ se odnosi na N–H i O–H istezanja i javlja se zbog delimičnog preklapanja traka karakterističnih za vibracije istezanja amina i alkohola, kao i međumolekulskih vodoničnih veza. Apsorpcione trake na oko 2878 cm⁻¹ i 2926 cm⁻¹ su tipične za simetrično i asimetrično C–H istezanje [204,205]. Apsorpcioni pik na 1635 cm⁻¹ karakterističan je za vibracije istezanja C=O grupa kod primarnih amida [206]. Intenzivan pik na 1535 cm⁻¹ predstavlja vibracije savijanja –NH grupe karakteristične za sekundarne amide, a pik na 1405 cm⁻¹ odnosi se na vibracije –OH grupe primarnih alkohola [202]. Prisustvo C–N istezanja amida potvrđeno je trakom na 1312 cm⁻¹. Pik na 1151 cm⁻¹ odgovara asimetričnom istezanju atoma kiseonika kod C–O–C mosta i atoma ugljenika u piranoznom prstenu (glikozidna veza) [31,33]. Pikovi na 1062 cm⁻¹ i 1026 cm⁻¹ odgovaraju C–O istezanju, dok se pojava pika na 900 cm⁻¹ može pripisati amino grupama [183].

Dodavanje želatina filmu na bazi hitozana (*Slika 3.8* (B)) nije bitno uticalo na promene u FTIR spektru, jer se uočavaju isti karakteristični pikovi, sa sličnim intenzitetom kao i kod filma na bazi čistog hitozana (A). Primetne promene u spektru zapažaju se sa dodatkom glicerola (C), kada su svi

pikovi karakteristični za hitozan postali intenzivniji. Trake na $3289 - 3322 \text{ cm}^{-1}$, 2875 cm^{-1} i 2947 cm^{-1} šire su i većeg intenziteta, bez pojave novih pikova, kao što je navedeno i u literaturi [207]. Karoni (Caroni) i saradnici [207] su za dobijanje filmova na bazi hitozan-glicerol koristili različite koncentracije glicerola (0, 10, 30 i 50 mas.% u odnosu na masu hitozana) i na osnovu FTIR spektra utvrdili su da sa dodatkom glicerola dolazi do povećanja intenziteta pikova, bez pojave novih pikova. Takođe, intenzitet pika na 1062 cm^{-1} se smanjio, dok se intenzitet pika na 1028 cm^{-1} povećao. Ove promene se mogu objasniti stvaranjem novih vodoničnih veza između glicerola i kompozita hitozan-želatin. Dodatak etarskog ulja limunove trave (D), Tween 80 (E), kao i $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (F) ili nanočestica ZnO (G) nisu imali značajan uticaj na promenu FTIR spektra.



Slika 3.9. FTIR spektri filmova na bazi pektina

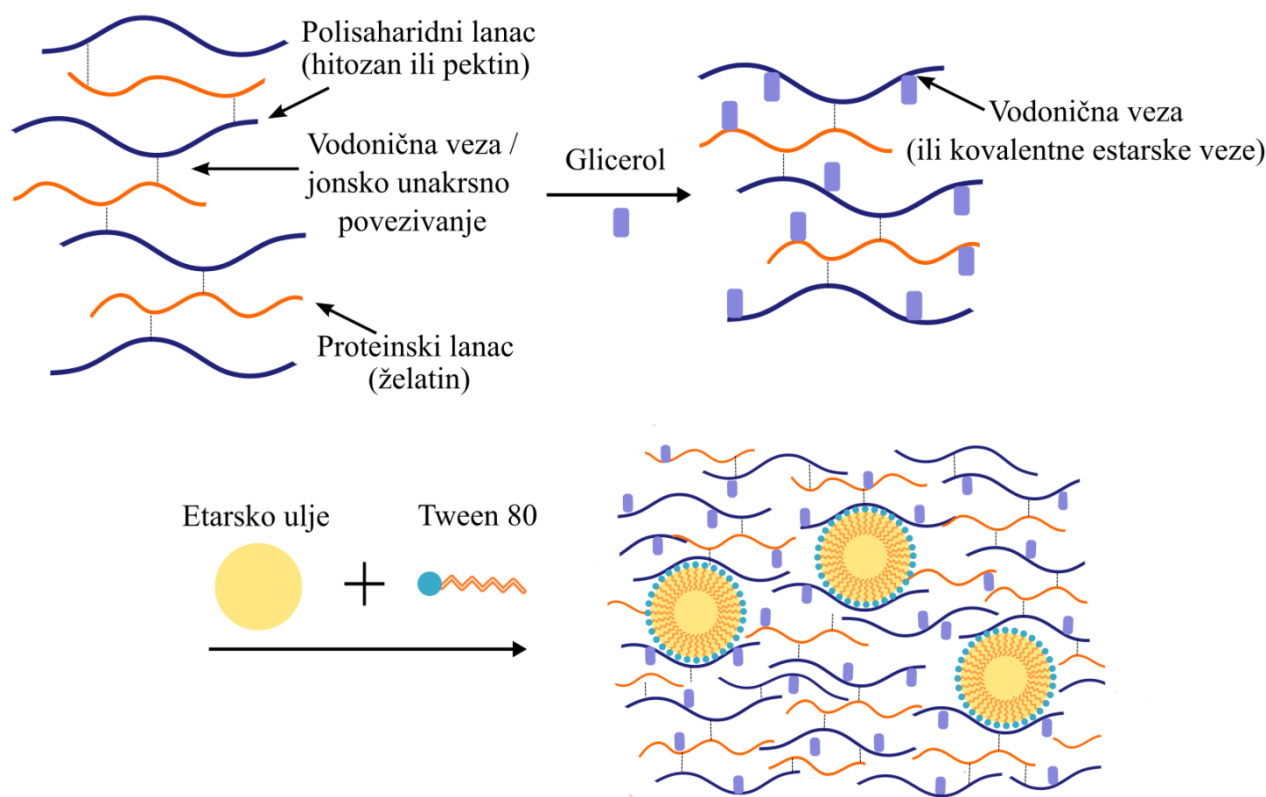
FTIR spektar filma na bazi čistog pektina (Slika 3.9 (A)) pokazao je karakteristične apsorpcione pikove za polisaharide (na 3344 , 2933 i 1152 cm^{-1}) [208,209]. Široka traka na $3500 - 3200 \text{ cm}^{-1}$ odgovara prisustvu slobodnih i intermolekulski vezanih hidroksilnih grupa (O-H). Apsorpcioni pik na 2933 cm^{-1} može se pripisati C-H rastezanju $-\text{CH}_2$ grupe [210]. Zatezne vibracije metilestrifikovanih karboksilnih grupa (C=O) uzrokovale su pojavljivanje pika na 1744 cm^{-1} . Pik na 1633 cm^{-1} se može povezati sa C=O vibracijama istežanja slobodnih karboksilnih grupa [208,209], dok ih neki autori pripisuju vibracijama istežanja hidroksilnih grupa ($-\text{OH}$) [211]. Vibracije istežanja C-O-H i C-O-C dovele su do stvaranja pikova na 1456 cm^{-1} , odnosno 1239 cm^{-1} [212]. Apsorpcioni pik na 1152 cm^{-1} odgovara vibracijama istežanja karbonilne grupe (C=O), dok su vibracije istežanja bočnih grupa C-OH i glikozidne veze C-O-C dovele do pojave pika u opsegu od $1000 - 1050 \text{ cm}^{-1}$ [210]. Pikovi apsorpcije između 1010 i 1152 cm^{-1} ukazuju da uzorak sadrži piranozu i furanozu [208,209].

Dodatak želatina u film na bazi pektina (B) doveo je do pojave istih pikova u FTIR spektru kao i u slučaju filma na bazi čistog pektina, samo sa nešto intenzivnijim pikom na 1633 cm^{-1} . Dodavanje

glicerola (C) uticalo je na pojavu istih pikova, samo većeg intenziteta u poređenju sa (B), kao što je ranije primećeno i u slučaju filмова na bazi hitozana, a takođe, je potvrđeno i u do sada objavljenoj literaturi [126]. Kao i u slučaju filмова na bazi hitozana, FTIR spektri filмова sa dodatkom ostalih komponenti (etarsko ulje limunove trave (D), Tween 80 (E), $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (F) i nanočestica ZnO (G)) poklapaju su se sa (C) P-Ž + Gli.

Glavne promene u strukturi filмова na bazi hitozana i pektina nastale su sa dodatkom glicerola. Glicerol je jednostavno alkoholno jedinjenje sa tri hidroksilne grupe i zbog male veličine molekula može da zauzme međumolekulski prostor između polisaharidnih lanaca, narušavajući tom prilikom vodonične veze, smanjujući interakcije polimer-polimer, a samim time povećavajući pokretljivost polimernih lanaca. Glicerol se može vezati za hidroksilne i amino grupe hitozanskog lanca [207], a u slučaju pektina, hidroksilne grupe na glicerolu mogu da formiraju kovalentne estarske veze putem hidroksil-hidroksil ili hidroksil-karbonil reakcija [126]. Na osnovu prikazanih FTIR spektara uočava se da je uloga glicerola u oba slučaja presudna zbog uspostavljanja jakih vodoničnih veza sa kompozitima hitozan-želatin ili pektin-želatin, što dovodi do povećanja međumolekulskog prostora u polimernim matricama olakšavajući grananje i bolje umrežavanje lanaca biopolimera, što je od velikog značaja za inkapsulaciju. To omogućava formiranje polimernog „zida” oko aktivnih komponenti, posebno etarskog ulja, kao i postojanost i elastičnost filмова.

Upoređivanjem FTIR spektara za filmove na bazi hitozana i pektina, primećuje se pojava intenzivnih pikova oko 1535 cm^{-1} (predstavljaju vibraciju savijanja $-\text{NH}$ grupe) i 1405 cm^{-1} (vibracije primarne alkoholne $-\text{OH}$ grupe) koji su karakteristični za filmove na bazi hitozana, dok su kod filмова na bazi pektina ti pikovi veoma slabih intenziteta. Intenzivni pikovi na 1239 cm^{-1} (vibracije istezanja $\text{C}-\text{O}-\text{C}$) i 1744 cm^{-1} (vibracije istezanja metilestrifikovanih karboksilnih grupa ($\text{C}=\text{O}$)) su karakteristični za filmove na bazi pektina. Na *Slici 3.10* dat je šematski prikaz umrežavanja komponenti tokom formiranja filмова.

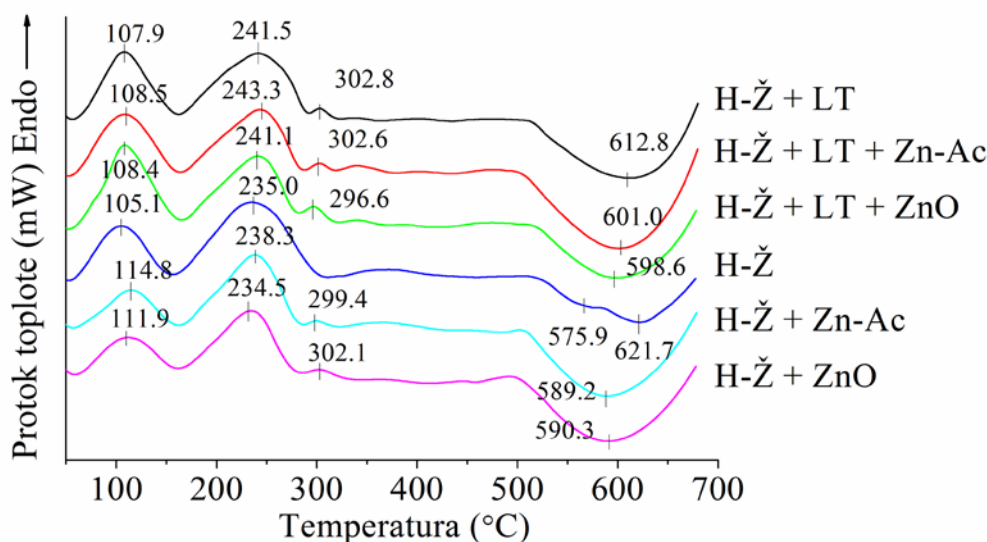


Slika 3.10. Šematski prikaz umrežavanja komponenti u filmovima na bazi hitozana i pektina

3.2.2. Termijska analiza

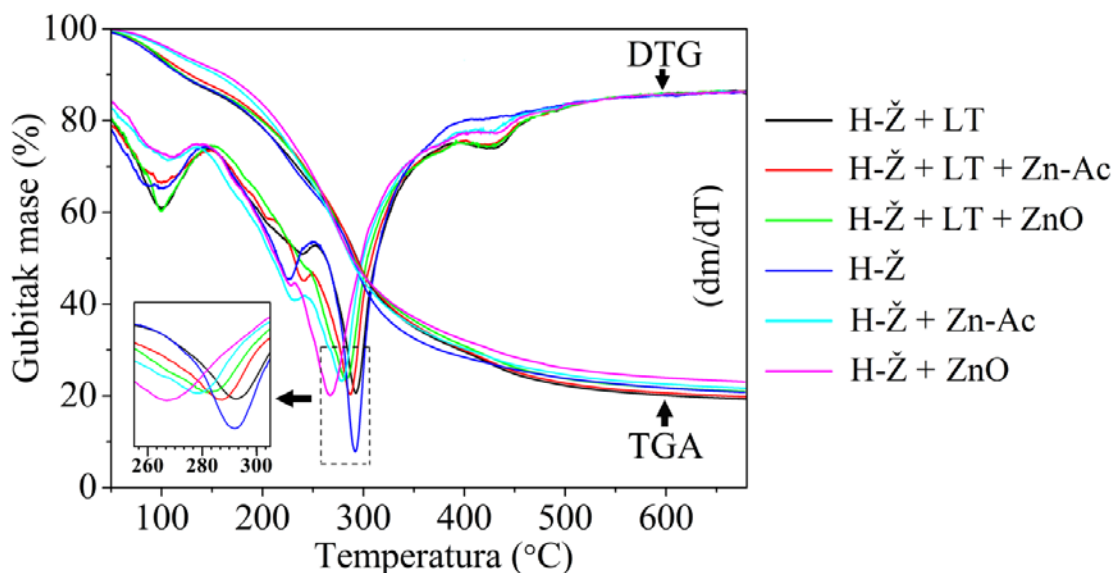
Termogravimetrija omogućava bolje upoznavanje termičke otpornosti materijala na osnovu određivanja promenljivosti mase ispitivanog materijala (gubitka ili dobitka) u zavisnosti od temperature i/ ili vremenskog perioda tokom koga je uzorak podvrgnut kontrolisanom povećanju temperature. Termogravimetrijska analiza (TGA) omogućava poznavanje temperaturnog opsega pri kome materijal počinje da se raspada [22].

Temperature staklenog prelaza (T_g) filmova na bazi hitozan-želatin i pektin-želatin su određene pomoću diferencijalne skanirajuće kalorimetrije (DSC, eng. "differential scanning calorimetry"). Gubici mase sa odgovarajućim maksimalnim temperaturama razgradnje (T_d) su određeni korišćenjem termogravimetrijske/ diferencijalne termogravimetrijske analize (TGA/ DTG, eng. "thermogravimetric/ differential thermogravimetry analysis"). Rezultati termijske analize filmova na bazi hitozana su predstavljeni na **Slikama 3.11** i **3.12**, a na bazi pektina na **Slikama 3.13** i **3.14**.



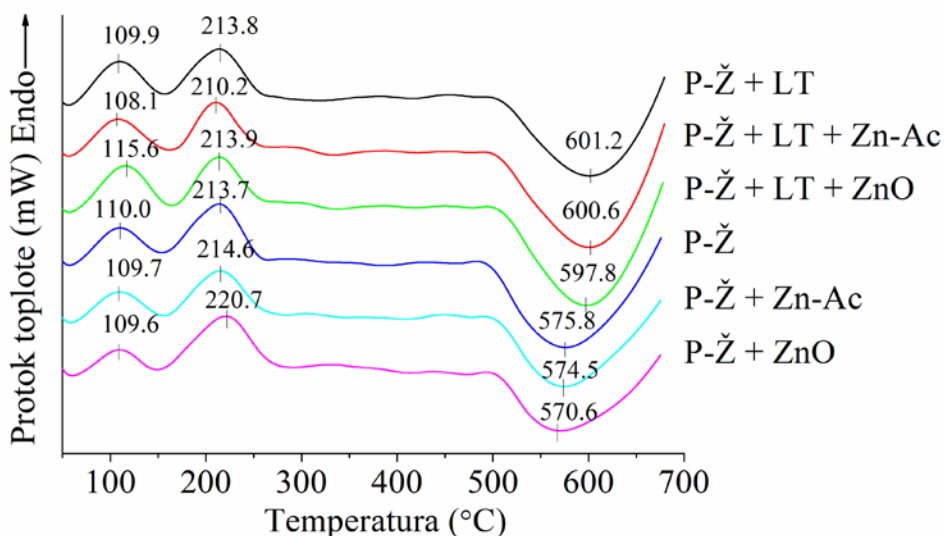
Slika 3.11. DSC termogrami filmova na bazi hitozana

Na DSC termogramima filmova na bazi hitozana (**Slika 3.11.**) vidljiva su dva endotermna i jedan egzotermni pik kod svih analiziranih uzoraka. Prvi endotermni DSC pikovi (105,1 – 114,8 °C) odgovaraju isparavanju tragova rastvarača (voda, sirćetna kiselina) korišćenih u pripremi filmova [213]. Pojava ovih pikova, takođe, može se pripisati istovremenoj pojavi različitih promena do kojih dolazi u želatinu, kao što su isparavanje, topljenje i rekristalizacija kristala [23]. Drugi endotermni pikovi (234,5 – 243,3 °C) se mogu pripisati degradaciji glicerola [213,214] i razgradnji komponenti male molekulske mase ili onih komponenti koje su strukturno vezane za vodu u hitozanskoj polimernoj matrici [215]. Kod drugog endotermnog pika uočljiva je razlika između hitozanskih filmova sa i bez LT. Filmovi koji sadrže LT imali su pikove na višim temperaturama (241,1 – 243,3 °C) u poređenju sa filmovima bez etarskog ulja (234,3 – 238,4 °C). Ovo se može pripisati delovanju etarskog ulja kao plastifikatora i povećanju količine slobodnog prostora unutar polimerne matrice, kao i većoj opuštenosti i segmentnoj pokretljivosti polimernih lanaca [23,214]. Do sličnih rezultata došli su Hoseni (*Hosseini*) i saradnici [23], kao i Liu (*Liu*) i saradnici [216], koji su tom prilikom zaključili da dodavanje etarskog ulja, takođe, poboljšava termičku stabilnost filmova na bazi hitozana. Egzotermni pik na oko 589,2 – 621,8 °C najverovatnije potiče od potpune razgradnje hitozanskog prstena [217].



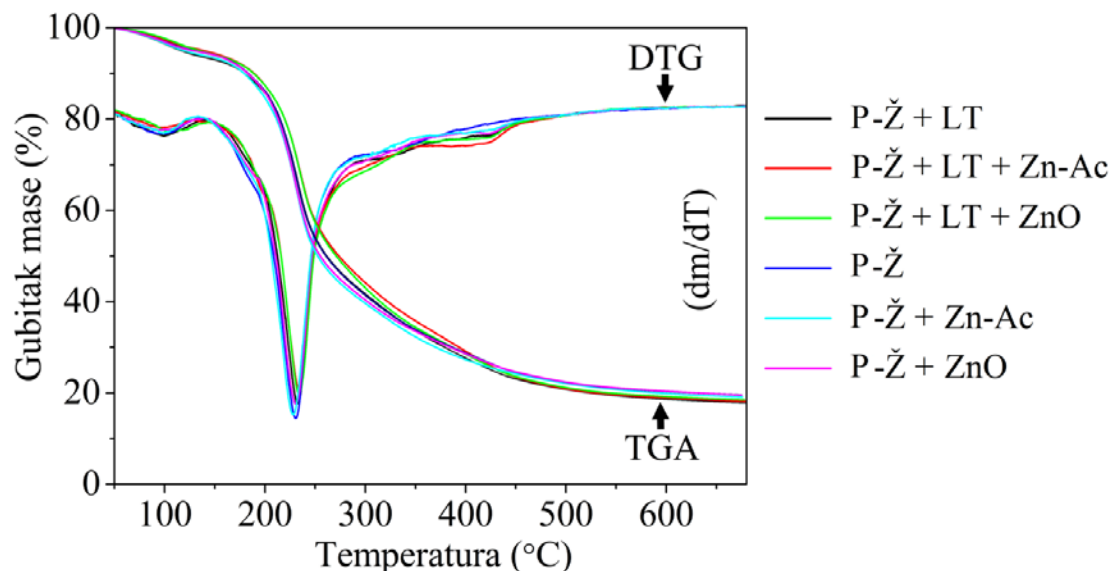
Slika 3.12. TGA i DTG termogrami filmova na bazi hitozana

Prema TGA i DTG termogramima, kod svih filmova na bazi hitozana (**Slika 3.12**) početni gubitak mase (7,7 – 14,5%) se javlja na temperaturama između 99,7 – 114,3 °C, usled uklanjanja vlage i isparljivih materija. Sledeći gubitak mase kod filmova na bazi hitozana sa LT primećen je u temperaturnom opsegu od 241,1 – 242,4 °C (18,2 – 21,8%), dok se kod filmova na bazi hitozana bez LT gubitak mase uočava u pri nižim temperaturama, u opsegu od 226,4 – 235,0 °C (19,1 – 24,4%). Ovaj gubitak mase može se povezati sa degradacijom glicerola i delimično hitozana. Najintenzivniji pik i najveći gubitak mase (35,5 – 38,2%) zapaža se na oko 290 °C, što je povezano sa razgradnjom hitozana, kao glavnog sastojka ovih kompozitnih filmova. Narušavanje strukture hitozana pod dejstvom visoke temperature potiče od dehidracije saharidnog prstena, depolimerizacije i pirolitičke razgradnje acetilovanih ili deacetilovanih hitozanskih jedinica [215]. Gubitak mase kod uzoraka sa ZnO i Zn-Ac primećuje se na nižoj temperaturi (~ 270 – 285 °C) što doprinosi blagom smanjenju termčke stabilnosti filmova na bazi hitozana. Takođe, završna faza razgradnje (428,9 – 434,1 °C) je izostala kod filmova na bazi hitozana bez aktivnih komponenti, pa se prema tome pojava ovog pika može pripisati razgradnji termički stabilnih jedinjenja u aktivnim komponentama (LT, ZnO i Zn-Ac).



Slika 3.13. DSC termogrami filmova na bazi pektina

Kod filmova na bazi pektina na DSC termogramima (*Slika 3.13*), takođe, uočavaju se dva glavna endotermna i jedan egzotermni pik. Pojava prvog endoternog pika (108,1 – 115,6 °C) povezana je se isparavanjem adsorbovane i vezane vode iz filmova na bazi pektina, kao i promenama do kojih dolazi u strukturi želatina (kao što je prethodno opisano kod hitozanskih filmova). Drugi pik javlja se na temperaturama između 210,2 – 220,7 °C i može se pripisati razgradnji pektina i glicerola. Široki egzotermni pikovi na oko 570,6 – 601,2 °C povezani su sa potpunom razgradnjom materijala, kako polisaharidne matrice, tako i aktivnih komponenti.



Slika 3.14. TGA i DTG termogrami filmova na bazi pektina

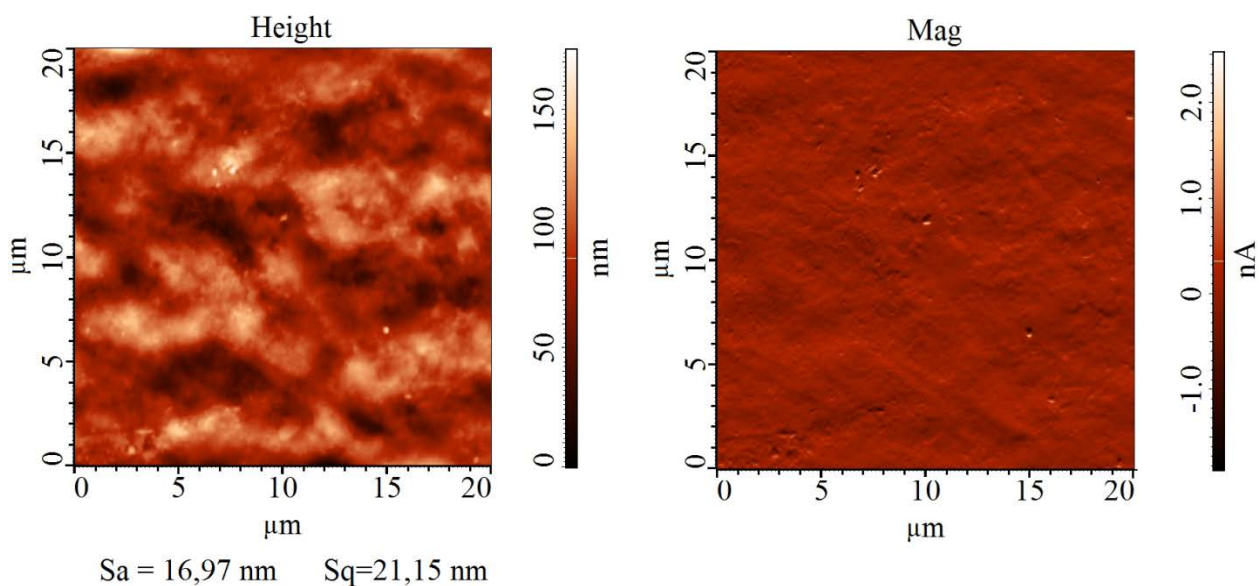
TGA i DTG termogrami filmova na bazi pektina (*Slika 3.14*) pokazali su da se najveći stepen razgradnje filmova (gubitak mase od 49,1 – 52,6%) događa na temperaturama između 210,2 – 220,7 °C. Ovaj gubitak mase može biti povezan sa razgradnjom pektina, kao što je i potvrđeno u do sada objavljenoj literaturi [218]. Za razliku od filmova na bazi hitozana, kod filmova na bazi pektina nije primećen uticaj aktivnih komponenti na maksimalne temperature razgradnje. Takođe, primećeni su pikovi sa manjim intenzitetom nego kod filmova na bazi hitozana. Kod filmova na bazi pektina pikovi se javljaju na oko 100 °C (isparavanje vode) sa gubitkom mase od 5,2 – 7,7% i na 400 °C sa gubitkom mase od 12,6 – 21,2% (što se takođe može odnositi na razgradnju termčki stabilnih jedinjenja u aktivnim komponentama, kao i u slučaju filmova na bazi hitozana). Temperature razgradnje filmova na bazi hitozana bile su više u poređenju sa filmovima na bazi pektina, što ukazuje na jače veze u ovim filmovima i na njihovu veću termičku stabilnost.

3.2.3. Mikroskopija atomskih sila (AFM)

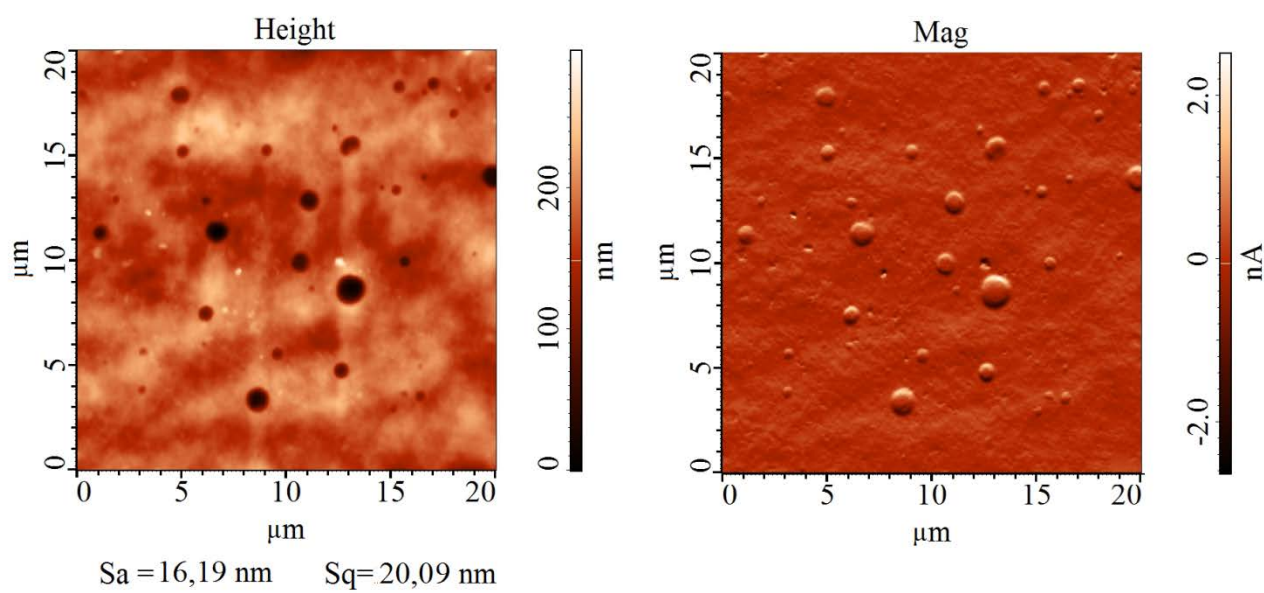
Promene koje se javljaju na površini ambalažnog materijala mogu u velikoj meri uticati na kontakt između ambalaže za pakovanje hrane (izrađene od polimernih materijala) i njenog okruženja [219,220]. AFM analiza se smatra pogodnom metodom za karakterizaciju polimernih filmova koji se koriste za aktivno pakovanje, zbog mogućnosti praćenja njihove topografske modifikacije do koje dolazi nakon ugradnje aktivnih supstanci u njihovu strukturu [219,221]. AFM analiza nam daje uvid u morfološku strukturu (kvalitativni parametar) i hrapavost (kvantitativni parametar) površine biokompozitnih filmova [222]. Podaci o povećanju hrapavosti se smatraju značajnim u oblasti aktivnog pakovanja, jer mogu uticati na prijanjanje materijala, kvašenje, hemijsku i biološku funkcionalnost [221]. Srednja kvadratna hrapavost (S_q ili R_q) predstavlja standardnu devijaciju vrhova i daje meru amplitude vrhova i dolina, prepoznatljivih na površini materijala. Drugi parametar hrapavosti je prosečna hrapavost S_a (R_a) koja predstavlja aritmetičku srednju vrednost vrhova na površini i izražava se kao apsolutna vrednost razlika u visini svake pozicije u poređenju sa aritmetičkom sredinom površine. Parametar S_a je manje osetljiv na velike vrhove ili duboke doline u poređenju sa parametrom S_q [219].

Na *Slikama 3.15 – 3.26* predstavljene su morfologije površine filmova na bazi hitozana i pektina, sa i bez dodatka aktivnih komponenti, sa odgovarajućim vrednostima parametara hrapavosti (S_a i S_q). Prikazane su slike topografije površine (gde je predstavljena visina signala – “*Height*”) i slike signala greški (signal “*Mag*”). Kontrast na AFM slikama u “*Height*” modu nam omogućava uvid o homogenosti površine uzorka. “*Mag*” signal se koristi za identifikaciju sitnih detalja na pozadini velikih i relativno glatkih površina.

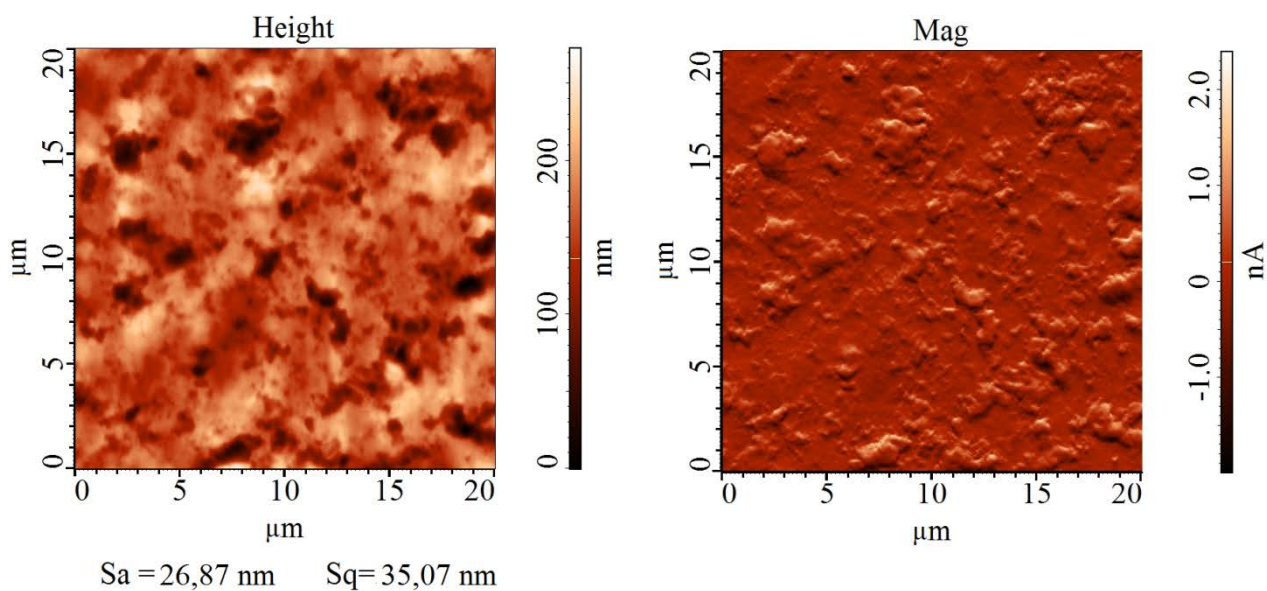
Kod ovakve vrste materijala, AFM snimanje se koristi za uočavanje inkapsuliranih lipidnih kapljica u polimernoj matrici [222,223]. Kapljice etarskog ulja se na tako dobijenim mikrografijama primećuju kao prazan prostor (šupljine), jer se ulje nalazi u tečnom agregatnom stanju [223]. Ovo se može zapaziti i na prikazanim mikrografijama (*Slike 3.15 – 3.26*) na kojima se uočava očigledna razlika između filmova sa i bez etarskog ulja limunove trave, kod kojih se kapljice etarskog ulja uočavaju kao šupljine, relativno pravilnog okruglog oblika. U slučaju svih filmova na bazi hitozana sa inkapsuliranim LT (*Slike 3.16, 3.20 i 3.24*) primećuju se šupljine znatno pravilnijeg okruglog oblika, u odnosu na filmove na bazi pektina sa LT. Takođe, zapaža se da je dodatak Zn-Ac i nanočestica ZnO doprineo pojavi manjih i pravilnijih šupljina, koje su homogeno raspoređene po celoj površini filmova na bazi hitozana. Kod filmova na bazi pektina ovakva struktura se uočava kod filma sa nanočesticama ZnO (*Slika 3.26*). Pojava pravilnog oblika i homogene raspodele inkapsuliranih kapljica etarskog ulja ukazuju na to da etarsko ulje ima tendenciju da ostane integrisano u polimernoj matrici tokom sušenja [223]. Na prikazanim mikrografijama uočava se da je dodatak jona metala i metal-oksida doprineo boljoj inkapsulaciji, kao i homogenijoj raspodeli kapljica inkapsuliranog LT.



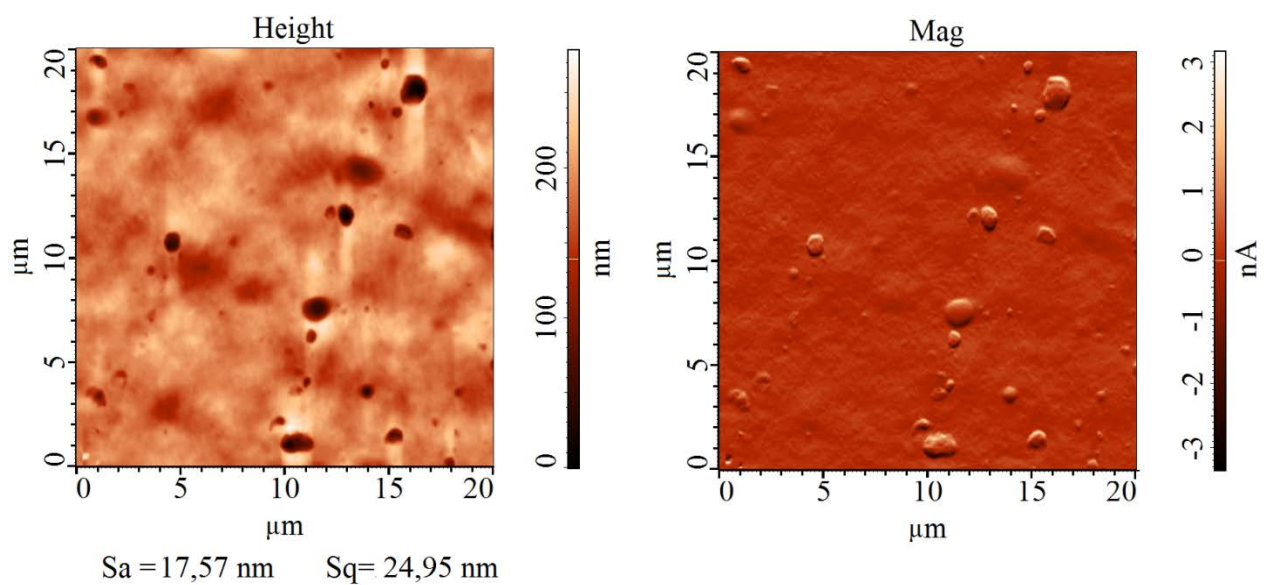
Slika 3.15. AFM mikrografija filma na bazi H-Ž



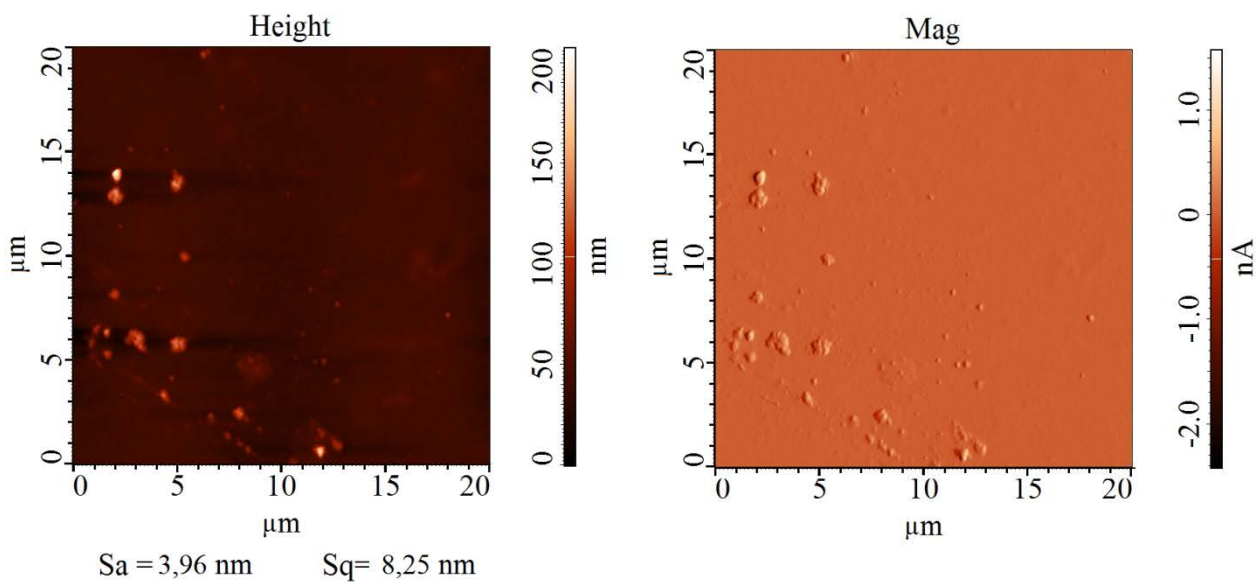
Slika 3.16. AFM mikrografija filma na bazi H-Ž + LT



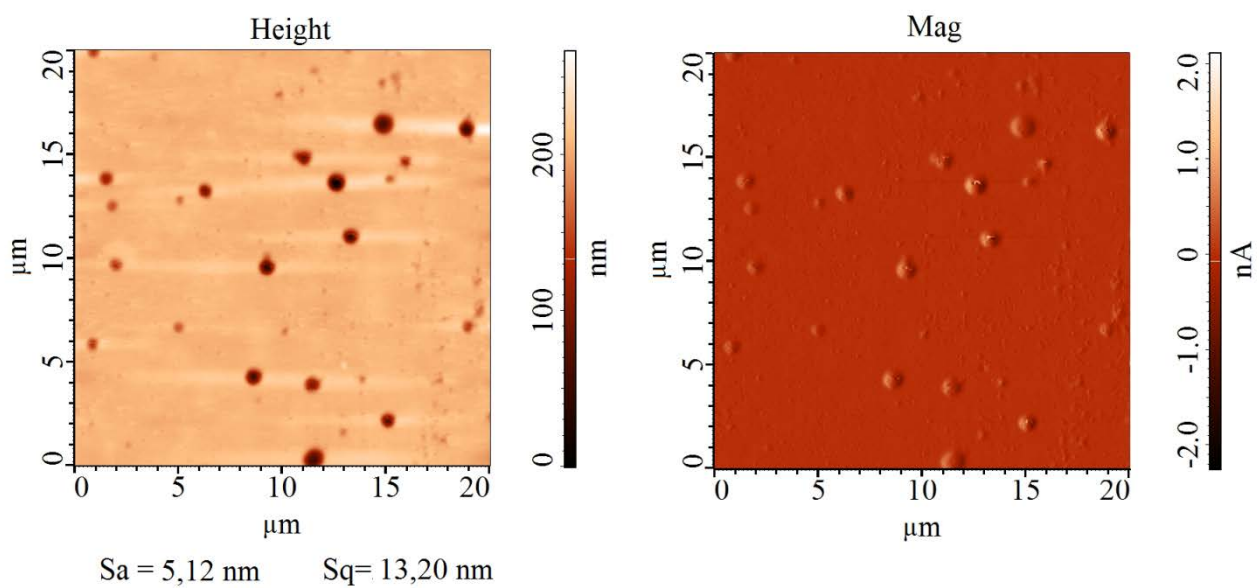
Slika 3.17. AFM mikrografija filma na bazi P-Ž



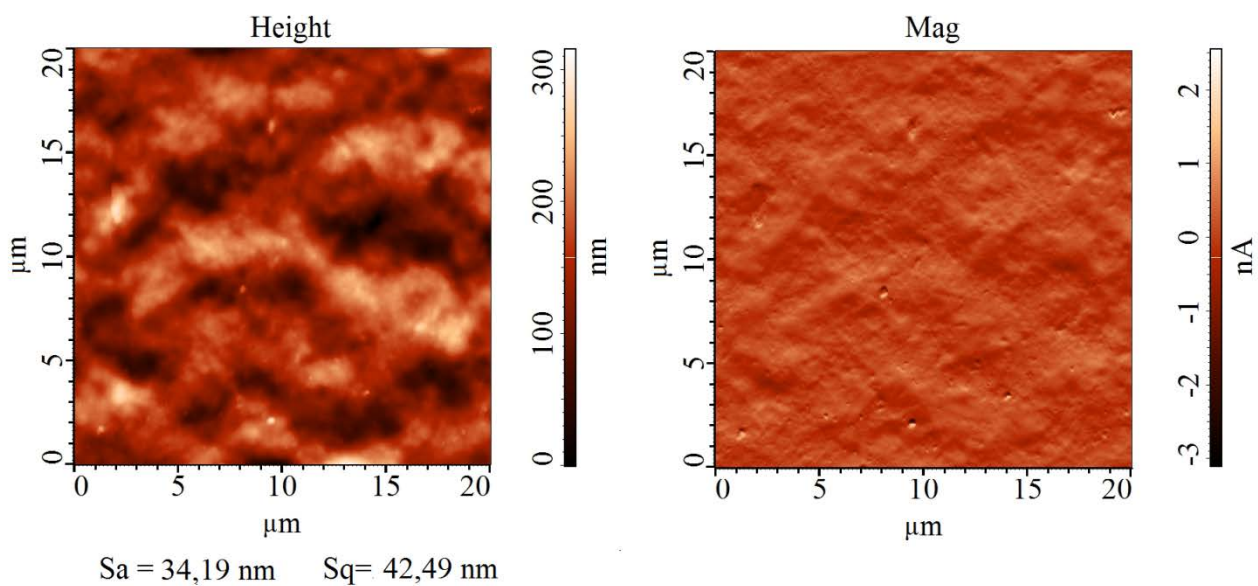
Slika 3.18. AFM mikrografija filma na bazi P-Ž + LT



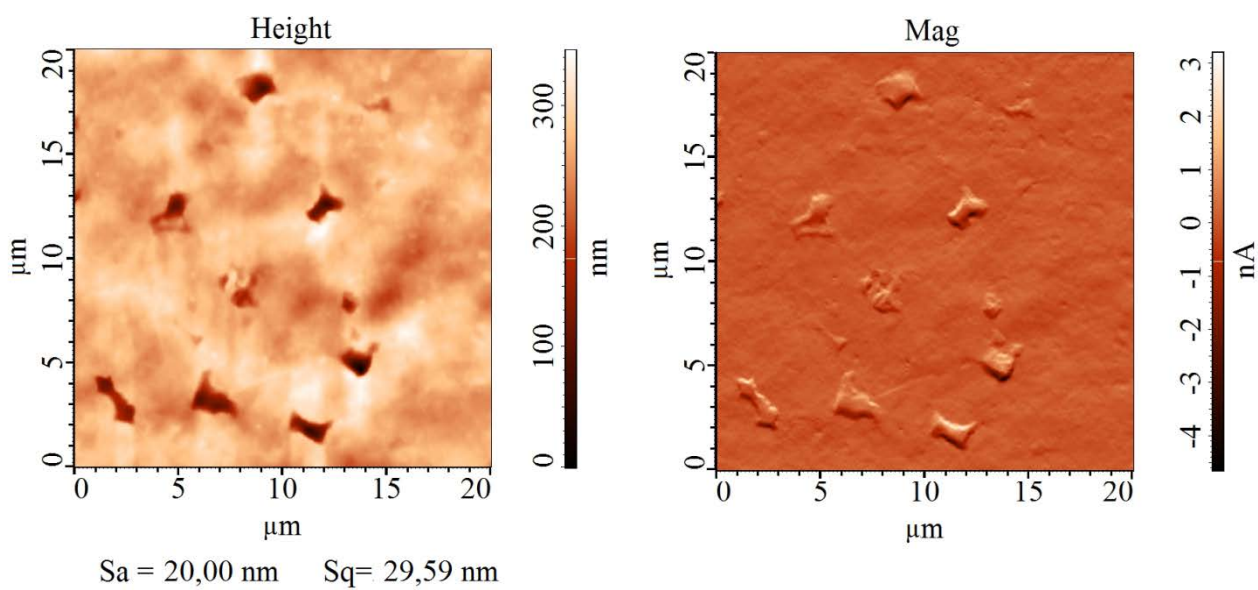
Slika 3.19. AFM mikrografija filma na bazi H-Ž + Zn-Ac



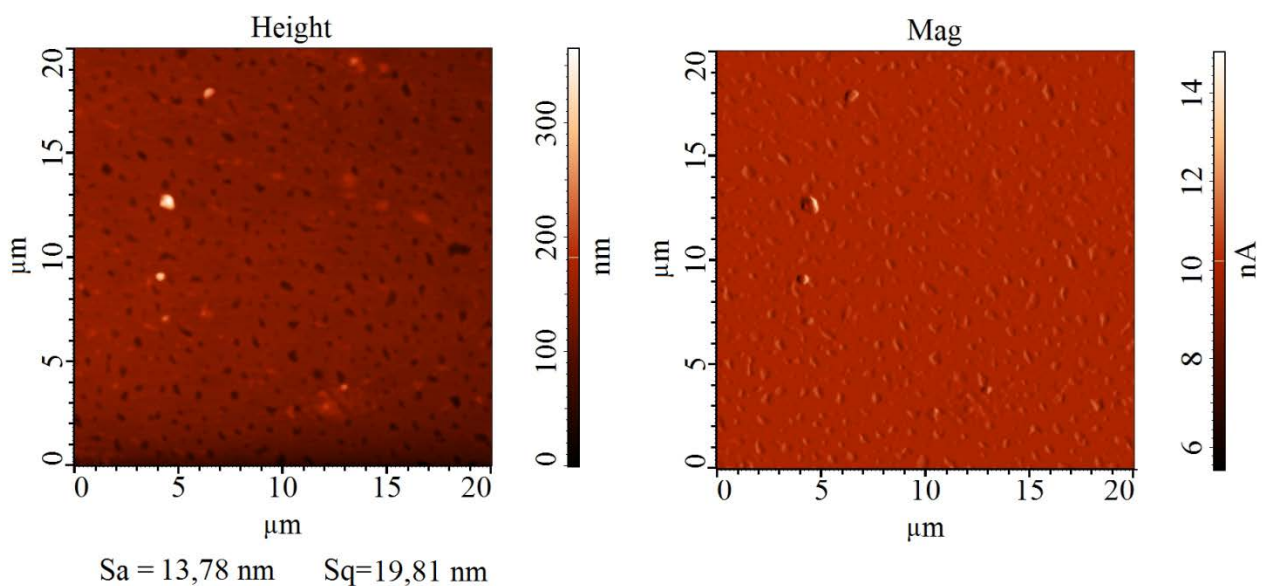
Slika 3.20. AFM mikrografija filma na bazi H-Ž + LT + Zn-Ac



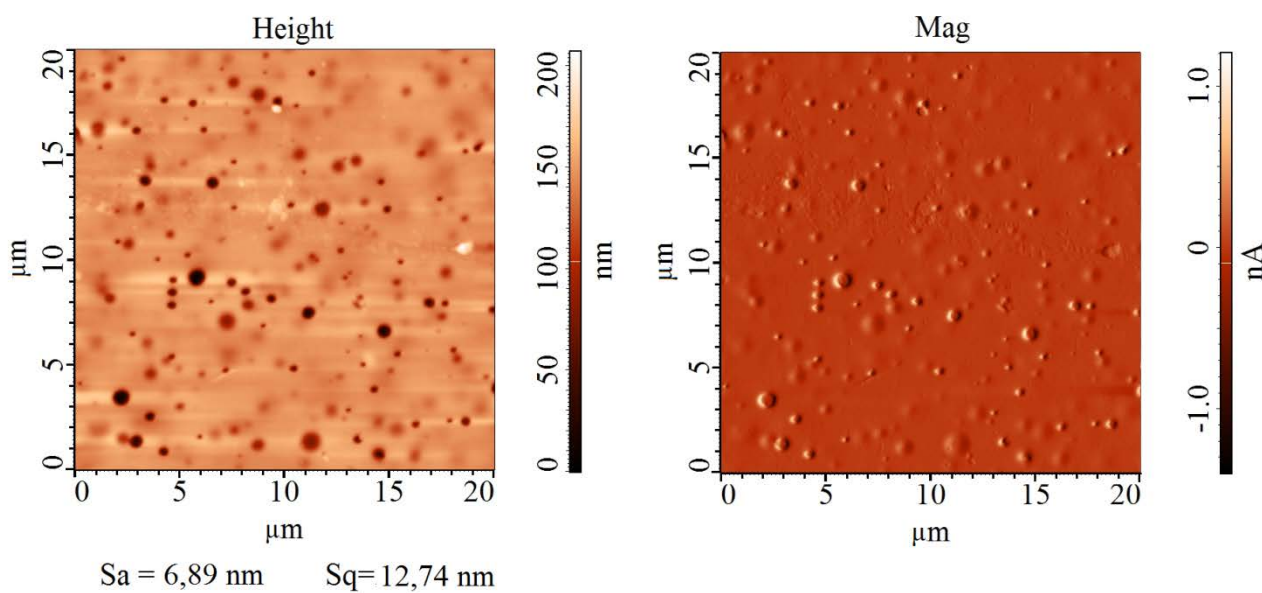
Slika 3.21. AFM mikrografija filma na bazi P-Ž + Zn-Ac



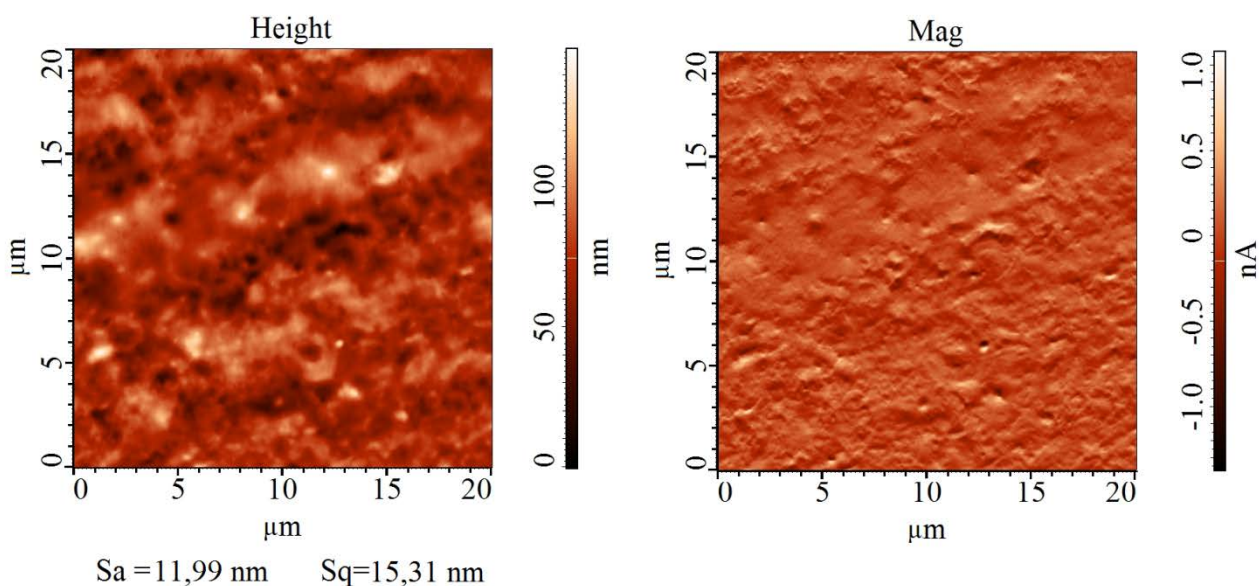
Slika 3.22. AFM mikrografija filma na bazi P-Ž + LT + Zn-Ac



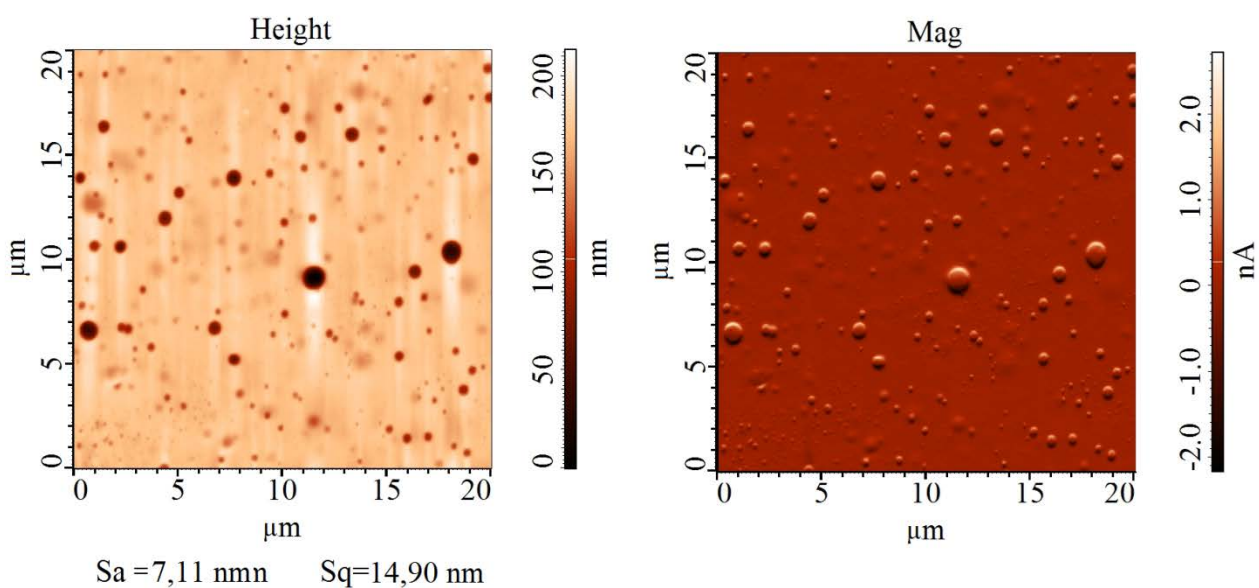
Slika 3.23. AFM mikrografija filma na bazi H-Ž + ZnO



Slika 3.24. AFM mikrografija filma na bazi H-Ž + LT + ZnO



Slika 3.25. AFM mikrografija filma na bazi P-Ž + ZnO



Slika 3.26. AFM mikrografija filma na bazi P-Ž + LT + ZnO

Prisustvo etarskog ulja limunove trave doprinelo je smanjenju hrapavosti skoro svih filmova (negde u većoj, a negde u manjoj meri), što potvrđuju i niže vrednosti Sa i Sq. Ovo je posebno uočljivo kod svih filmova na bazi pektina, koji su imali hrapavije površine, dok je u slučaju filmova na bazi hitozana uticaj etarskog ulja na smanjenje hrapavosti najbolje vidljiv kod filmova koji su sadržali Zn-Ac ili nanočestice ZnO. Poznato je da tečno stanje etarskog ulja doprinosi širenju kapljica po površini filma nakon sušenja, popunjavajući neravnine na površini biopolimerne matrice, čineći je tako više glatkom [223]. U literaturi postoje podaci koji potvrđuju ovakav trend uočen AFM analizom kompozitnih biopolimernih filmova sa inkapsuliranim etarskim uljima. Hoseni (*Hosseini*) i saradnici [222] su koristeći metodu izlivanja razvili biokompozitne filmove na bazi ribljeg želatina i hitozana, sa različitim sadržajem etarskog ulja *Origanum vulgare* L. (koncentracije 0,4, 0,8 i 1,2 mas./vol.%). Njihova AFM analiza je pokazala da je dodatak etarskog

ulja uticao na hrapavost površine filmova. Film bez etarskog ulja pokazao je relativno hrapaviju površinu (S_a i S_q od 50,6 – 66,1 nm), dok je prisustvo etarskog ulja u koncentraciji od 0,4% značajno umanjilo hrapavost filmova. Međutim, sa daljim povećanjem sadržaja etarskog ulja uočeno je da dolazi do povećanja vrednosti za S_a i S_q , što je u ovom radu objašnjeno stvaranjem većih agregata etarskog ulja i formiranja kreme tokom sušenja, što je dovelo do pojave nepravilnosti na površini filma. Atares (*Atarés*) i saradnici [223] su metodom izlivanja emulzija dobili biopolimerne filmove gde je u kontinualnoj fazi emulzije bio rastvor izolata sojinog proteina, dok je u dispergovanoj fazi bila različita kombinacija etarskog ulja cimeta i đumbira. Na osnovu AFM analize zaključili su da su filmovi bez etarskog ulja hrapaviji i da je dodatak oba etarska ulja smanjio vrednosti za S_a i S_q .

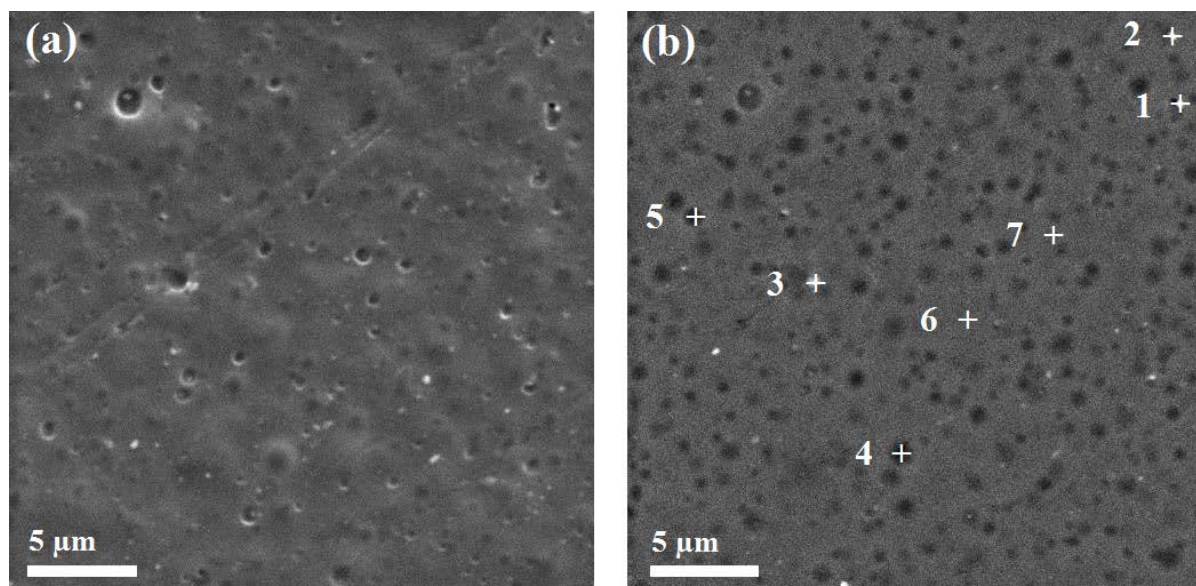
Prisustvo Zn-Ac ili nanočestica ZnO nije vidljivo na mikrografijama površine filmova (*Slike 3.19 – 3.26*), ali je primećeno da utiče na smanjenje hrapavosti površine, kako kod filmova na bazi hitozana tako i kod filmova na bazi pektina. Ovo nije uobičajena pojava kod polimernih filmova, jer prisustvo čestica metala i metal-oksida obično utiče na povećanje hrapavosti površine filmova. Analizom filmova dobijenih metodom izlivanja na bazi poli(ϵ -kaprolaktona) (PCL) sa ugrađenim nanočesticama ZnO [221] primećeno je da dolazi do povećanja prosečne i kvadratne hrapavosti filmova nakon dodavanja ZnO, posebno u uzorcima koji su sadržali 10% i 15% ZnO. Glatkoća filmova sa nanočesticama prikazanih u ovom radu može se pripisati njihovoj homogenoj raspodeli i veoma malim koncentracijama.

Urađene AFM analize ukazale su na raspodelu kapljica etarskog ulja u biopolimernoj matrici i njihovom uticaju na glatkoću filmova. Za ispitivanje homogenosti raspodele nanočestica metala u filmovima urađena je SEM analiza.

3.2.4. Skanirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Da bi se obezbedilo efikasno dejstvo aktivnih komponenti potrebno je da one budu homogeno raspoređene u materijalu. Homogenost raspodele nanočestica ZnO u filmovima na bazi hitozana i pektina određena je pomoću energetske disperzivne rendgenske spektroskopije (EDS) na osnovu SEM mikrofografija.

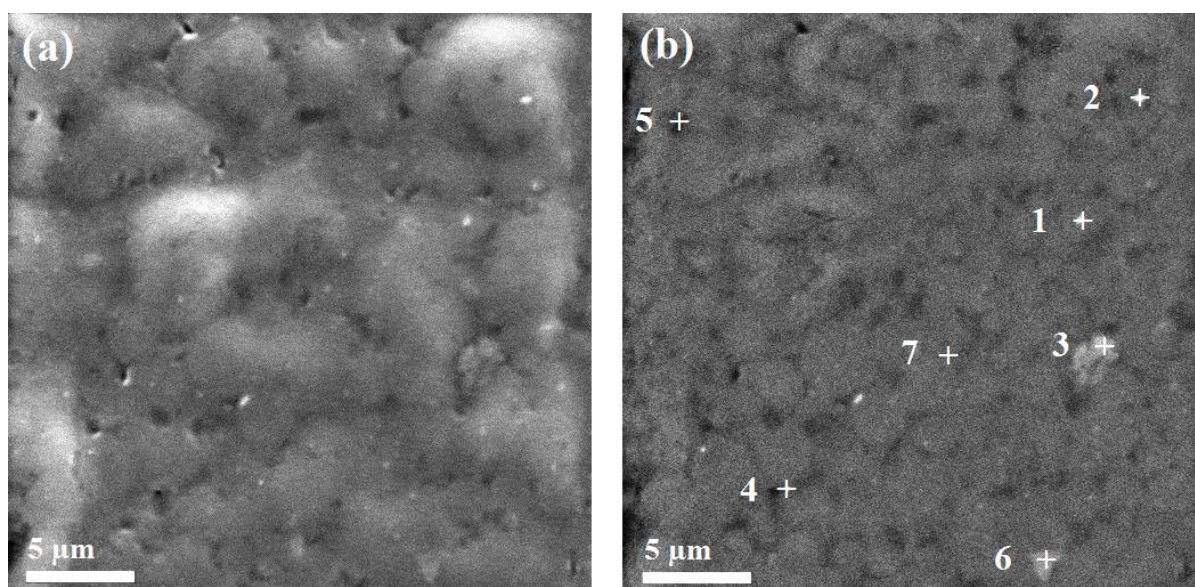
Na *Slikama 3.27* i *3.28* predstavljene su SEM mikrofografije filmova, dobijene korišćenjem sekundarnog elektronskog detektora (SE, eng. “secondary electron detector”) i detektora povratnog rasejanja (BSE, eng “back-scatter detector”). U *Tabelama 3.3* i *3.4* predstavljen je procentualni sastav elemenata (izrežen u atomskim %) detektovanih u sastavu biopolimernih filmova.



Slika 3.27. SEM mikrografska analiza H-Ž + LT + ZnO filmova: a) SE detektor; b) BSE detektor. Na mestima označenim krstićima određen je sastav elemenata površine filmova korišćenjem EDS analize

Tabela 3.3. EDS analiza površine H-Ž + LT + ZnO filmova

H-Ž + LT + ZnO	Atomska masa (%)			
	Spektar	C	O	Zn
1	72,74	26,73	0,52	
2	72,07	27,39	0,54	
3	72,08	27,46	0,46	
4	72,30	27,23	0,46	
5	72,19	27,22	0,59	
6	71,67	27,71	0,62	
7	71,93	27,46	0,61	
Srednja vrednost ± SD	72,14 ± 0,33	27,32 ± 0,30	0,54 ± 0,07	



Slika 3.28. SEM mikrografska analiza P-Ž + LT + ZnO filmova: a) SE detektor; b) BSE detektor. Na mestima označenim krstićima određen je sastav elemenata površine filmova korišćenjem EDS analize

Tabela 3.4. EDS analiza površine P-Ž + LT + ZnO filmova

P-Ž + LT + ZnO	Atomska masa (%)			
	Spektar	C	O	Zn
1	65,66	33,81	0,53	
2	71,52	27,74	0,75	
3	60,17	39,36	0,47	
4	71,43	28,03	0,54	
5	73,25	26,04	0,71	
6	64,30	34,98	0,72	
7	65,92	33,38	0,70	
Srednja vrednost ± SD	67,48 ± 4,73	31,89 ± 4,79	0,63 ± 0,12	

Na osnovu EDS analiza površine filmova (**Tabela 3.3** i **3.4**) utvrđeno je prisustvo cinka u svim ispitivanim oblastima od interesa, takođe, zapaženo je da koncentracija cinka nije značajno varirala u ovim nasumično odabranim mestima. Na osnovu dobijenih rezultata može se primetiti da je cink homogeno raspoređen u obe vrste kompozitnih filmova (hitozan-želatin i pektin-želatin).

3.2.5. Sadržaj vlage i ukupne rastvorne materije filmova

Sadržaj vlage i rastvorljivost materijala su veoma bitni parametri za filmove koji imaju potencijalnu primenu u pakovanju hrane. Oni sa jedne strane, u velikoj meri utiču na fizička svojstva materijala, a sa druge strane, predstavljaju bitan faktor koji može uticati na rast i razmnožavanje mikroorganizama (na površini materijala za pakovanje i hrane koja se pakuje) [224]. Obično biopolimeri i plastifikatori imaju higroskopni karakter, tako da na vlažnost filmova u velikoj meri utiču uslovi prisutni u spoljnoj sredini. Za prirodne biopolimere, voda sa jedne strane predstavlja glavni rastvarač, a sa druge strane njeni molekuli smanjuju temperaturu staklenog prelaza i povećavaju slobodnu zapreminu biopolimera, pa se ona smatra i plastifikatorom [122].

Sadržaj vlage (ω_v , %) i ukupne rastvorne materije (ω_r , %) filmova na bazi hitozana i pektina, sa dodatkom aktivnih komponenti (etarsko ulje limunove trave, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ili nanočestice ZnO) predstavljeni su u **Tabeli 3.5**.

Tabela 3.5. Sadržaj vlage i ukupne rastvorne materije u biopolimernim filmovima na bazi hitozana i pektina sa dodatkom LT, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ili ZnO nanočestica

Uzorak	ω_v (%)	ω_r (%)
H-Ž + LT	31,35 ± 0,43 ^{b,c}	31,50 ± 0,82 ^c
H-Ž + LT + Zn-Ac	34,68 ± 1,44 ^c	26,64 ± 2,21 ^d
H-Ž + LT + ZnO	27,81 ± 0,82 ^{a,b}	31,21 ± 1,46 ^c
H-Ž	31,17 ± 0,65 ^{b,c}	26,04 ± 1,05 ^d
H-Ž + Zn-Ac	32,92 ± 1,19 ^c	21,73 ± 0,43 ^e
H-Ž + ZnO	28,49 ± 0,94 ^{a,b}	22,73 ± 2,73 ^{d,e}
P-Ž + LT	25,76 ± 0,72 ^a	67,27 ± 2,64 ^a
P-Ž + LT + Zn-Ac	27,88 ± 1,05 ^{a,b}	66,18 ± 1,03 ^a
P-Ž + LT + ZnO	20,55 ± 1,92 ^d	67,43 ± 1,53 ^a
P-Ž	27,49 ± 0,53 ^a	66,62 ± 0,92 ^a
P-Ž + Zn-Ac	26,39 ± 1,35 ^a	69,11 ± 2,68 ^{a,b}
P-Ž + ZnO	28,78 ± 0,70 ^{a,b}	71,91 ± 2,04 ^b

Vrednosti su date kao srednje vrednosti ± SD (n=3). Različita mala slova u istoj koloni ukazuju na statistički značajne razlike ($p < 0,05$).

Sadržaj vlage je definisan kao parametar koji se odnosi na ukupnu praznu zapreminu koju molekuli vode zauzimaju u mrežnoj mikrostrukturi filmova [183]. Kod filmova na bazi pektina sadržaj vlage bio je niži (20,6 – 28,8%) u odnosu na filmove na bazi hitozana (27,8 – 32,9%). Dodatak LT, ZnO ili Zn-Ac nije značajno uticao na sadržaj vlage u filmovima na bazi hitozana i pektina, najveći uticaj na ovaj parametar imao je odabir biopolimerne matrice.

Na rastvorljivost filmova, takođe, najviše je uticala vrsta biopolimera od kojih su filmovi izrađeni. Filmovi na bazi hitozana su pokazali znatno veću otpornost prema vodi, gde je procenat rastvorljivosti bio u opsegu od 21,7 – 31,5%, dok je u slučaju filmova na bazi pektina rastvorljivost bila u opsegu od 66,2 – 71,9%. Kod filmova na bazi pektina ne zapaža se značajna međusobna razlika u vrednostima za sadržaj ukupne rastvorne materije; bez obzira na dodatak etarskog ulja, nanočestica ZnO ili Zn-Ac. U slučaju filmova na bazi hitozana, dodatak nanočestica ZnO ili Zn-Ac doprineo je smanjenju rastvorljivosti, dok je prisustvo LT uticalo na blago povećanje rastvorljivosti. Najveći uticaj na smanjenje rastvorljivosti kod filmova na bazi hitozana imao je dodatak Zn-Ac.

Rastvorljivost hitozan-želatin kompozitnih filmova, takođe, zabeležena je u literaturi, sa navedenim vrednostima od oko 25% [99] ili 26% [224]. Niska rastvorljivost filmova na bazi hitozana može se objasniti strukturom samog biopolimera, kao i činjenicom da čist hitozan predstavlja slabu bazu, nerastvornu u vodi i organskim rastvaračima [81], dok je pektin složeni heterogeni polisaharid, rastvoran u vodi [126]. Na osnovu rezultata rastvorljivosti, filmovi na bazi hitozana su se pokazali kao bolji izbor sa aspekta praktične primene nego filmovi na bazi pektina.

3.2.6. Mehanička svojstva filmova

Mehanička svojstva, kao i rastvorljivost filmova i prevlaka, u velikoj meri utiču na efikasnost barijernih svojstava, koja ambalažni materijal treba da poseduje [225]. Fleksibilnost, elastičnost i obradivost su bitne karakteristike koje treba da poseduje materijal za pakovanje na bazi polimera [123]. Kod kompozitnih biopolimernih filmova ove osobine u velikoj meri zavise od odabira biopolimera, njihovih procentualnih odnosa i kompatibilnosti [75]. Takođe, odabir plastifikatora za njihovo umrežavanje i njegova kompatibilnost sa polimerima mogu uticati na navedene osobine [122]. Zatezna čvrstoća (R_m), izduženje pri kidanju (A) i modul elastičnosti (E) filmova na bazi hitozana i pektina predstavljeni su u **Tabeli 3.6**.

Tabela 3.6. Zatezna čvrstoća (R_m), izduženje pri kidanju (A) i modul elastičnosti (E) filmova na bazi hitozana i pektina

Uzorak	R_m (MPa)	A (%)	E (MPa)
H-Ž + LT	43,51 ± 0,32 ^c	84,78 ± 2,05 ^e	312,13 ± 16,7 ^e
H-Ž + LT + Zn-Ac	45,72 ± 0,47 ^c	89,13 ± 2,04 ^e	393,16 ± 18,9 ^g
H-Ž + LT + ZnO	50,60 ± 1,33 ^d	73,91 ± 6,65 ^a	543,09 ± 20,3 ^f
H-Ž	46,64 ± 1,19 ^c	65,15 ± 2,10 ^b	415,09 ± 25,5 ^h
H-Ž + Zn-Ac	46,31 ± 1,52 ^c	100,00 ± 3,50 ^f	286,60 ± 17,7 ^j
H-Ž + ZnO	58,62 ± 2,80 ^e	84,78 ± 2,22 ^e	440,00 ± 20,5 ⁱ
P-Ž + LT	19,01 ± 1,23 ^{a,b}	69,56 ± 4,07 ^a	180,82 ± 10,3 ^a
P-Ž + LT + Zn-Ac	21,78 ± 1,06 ^b	66,95 ± 6,5 ^b	172,67 ± 14,02 ^b
P-Ž + LT + ZnO	19,65 ± 0,94 ^{a,b}	62,17 ± 4,44 ^b	206,09 ± 12,2 ^d
P-Ž	16,87 ± 2,21 ^a	73,04 ± 3,63 ^a	132,41 ± 8,88 ^c

P-Ž + Zn-Ac	18,84 ± 0,88 ^{a,b}	55,21 ± 2,45 ^d	176,97 ± 11,5 ^{a,b}
P-Ž + ZnO	16,70 ± 0,54 ^a	48,69 ± 3,86 ^c	168,13 ± 12,4 ^b

Vrednosti su date kao srednja vrednost ± SD (n = 3). Različita mala slova u istoj koloni ukazuju na statistički značajne razlike (p < 0,05).

Filmovi na bazi hitozana pokazali su znatno veće vrednosti (p < 0,05) zatezne čvrstoće, izduženja pri kidanju i modula elastičnosti u poređenju sa filmovima na bazi pektina. U slučaju filmova na bazi pektina, dodatak Zn-Ac neznatno je poboljšao zateznu čvrstoću, dok etarsko ulje limunove trave nije pokazalo značajniji efekat. Kod filmova na bazi hitozana, znatan uticaj na zateznu čvrstoću uočen je dodavanjem ZnO, kada su i zabeležene najveće vrednosti, 50,6 MPa (H-Ž + LT + ZnO) i 58,6 MPa (H-Ž + ZnO).

Vrednosti izduženja pri kidanju bile su prilično različite za sve ispitane filmove. Za filmove na bazi pektina vrednosti izduženja pri kidanju bile su u rasponu od 48,7% do 73,04%, a za filmove na bazi hitozana od 65,2% do 100,0%. Takođe, vrednosti modula elastičnosti bile su različite za sve ispitane uzorke, ali se značajno niži stepen deformacije uočava u svim filmovima na bazi hitozana u poređenju sa filmovima na bazi pektina. Najvišu vrednost modula elastičnosti pokazali su H-Ž + LT + ZnO (543,1 MPa) i H-Ž + ZnO (440,0 MPa) filmovi, na osnovu čega se može zaključiti da je dodavanje ZnO poboljšalo elastičnost filmova.

Mehanička svojstva kompozitnih filmova hitozan-želatin i pektin-želatin zabeležena su u literaturi, gde je takođe, glicerol korišćen kao plastifikator. Za kompozitne filmove na bazi hitozan-želatin Pereda (*Pereda*) i saradnici [183] su dobili vrednosti zatezne čvrstoće od 6,27 ± 1,17 MPa i izduženja pri kidanju od 85,4 ± 14,5%. Takođe, za kompozitne filmove hitozan-želatin Hagigi (*Haghighi*) i saradnici [224] zabeležili su vrednosti od 31,87 ± 1,58 MPa (R_m), 29,77 ± 0,34% (A) i 592,17 ± 5,75 MPa (E). Što se tiče kompozitnih pektin-želatin filmova, ove parametre, takođe, ispitivali su Faris (*Farris*) i saradnici [226] i tom prilikom su dobijene vrednosti od 11,09 ± 1,51 MPa (R_m), 151,57 ± 10,24% (A) i 0,28 ± 0,07 MPa (E).

Na vrednosti zatezne čvrstoće, izduženja pri kidanju i modula elastičnosti ispitivanih filmova, na bazi hitozana i pektina, u ovom radu u najvećoj meri uticao je izbor biopolimera, tako da su filmovi na bazi hitozana pokazali znatno bolje mehaničke karakteristike i to posebno oni sa dodatkom ZnO u čijem prisustvu su poboljšani elastičnost i zatezna čvrstoća filmova.

3.3. Antibakterijska svojstva biopolimernih emulzija i disperzija u *in vitro* uslovima

Antibakterijska aktivnost emulzija i disperzija na bazi hitozana i pektina ispitana je u *in vitro* uslovima prema vrstama bakterija koje su najčešći uzročnici kvarenja i trovanja hranom. Osetljivost vrsta bakterija *Escherichia coli* (Gram-negativna bakterija), *Bacillus subtilis* (Gram-pozitivna sporogena bakterija) i *Staphylococcus aureus* (Gram-pozitivna bakterija) na biopolimerne emulzije i disperzije utvrđena je agar difuzionom metodom. Rezultati antibakterijske aktivnosti su predstavljeni u **Tabeli 3.7**.

Tabela 3.7. Antibakterijska aktivnost emulzija i disperzija na bazi hitozana i pektina prema vrstama bakterija *E. coli*, *B. subtilis* i *S. aureus*

Uzorak	Prečnik zone inhibicije rasta (mm)		
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
H-Ž + LT	17,17 ± 1,26 ^{cA}	20,33 ± 0,58 ^{cB}	20,00 ± 1,73 ^{bcB}
H-Ž + LT + Zn-Ac	16,33 ± 0,58 ^{bcA}	17,17 ± 1,26 ^{ba}	20,13 ± 1,04 ^{bcB}
H-Ž + LT + ZnO	15,00 ± 0,50 ^{ba}	19,33 ± 1,53 ^{cB}	21,00 ± 1,50 ^{cB}
H-Ž	15,33 ± 1,53 ^{bcA}	19,33 ± 0,58 ^{cB}	18,17 ± 0,76 ^{bb}
H-Ž + Zn-Ac	15,33 ± 1,15 ^{bcA}	17,17 ± 0,29 ^{bb}	20,00 ± 0,50 ^{bcC}
H-Ž + ZnO	17,17 ± 0,76 ^{cA}	19,00 ± 0,5 ^{cB}	20,33 ± 0,58 ^{bcC}
P-Ž + LT	12,67 ± 1,26 ^{aA}	11,17 ± 1,26 ^{aA}	ne
P-Ž + LT + Zn-Ac	12,00 ± 1,73 ^{aA}	11,33 ± 0,58 ^{aA}	11,33 ± 2,02 ^{aA}
P-Ž + LT + ZnO	13,20 ± 0,50 ^{aA}	12,18 ± 1,26 ^{aA}	12,15 ± 1,61 ^{aA}
P-Ž	ne	ne	ne
P-Ž + Zn-Ac	ne	ne	ne
P-Ž + ZnO	ne	ne	ne

Vrednosti su date kao srednja vrednost ± SD (n = 3); ne- nema efekta. Različita mala slova u istoj koloni ukazuju na statistički značajne razlike (p < 0,05). Različita velika slova u istom redu ukazuju na statistički značajne razlike (p < 0,05).

Sve emulzije i disperzije na bazi hitozana pokazale su bolju antibakterijsku aktivnost u poređenju sa emulzijama na bazi pektina. Biopolimerna matrica H-Ž pokazala je dobru antibakterijsku aktivnost prema svim ispitivanim vrstama bakterija, nezavisno od dodatka aktivnih komponenti (LT, Zn-Ac i nanočestice ZnO), što se može pripisati samom hitozanu koji poseduje dobra antibakterijska svojstva [12,46,55]. Iz literature je poznato da hitozan može inhibirati rast i

razmnožavanje mikroorganizama, jer njegova pozitivno naelektrisana struktura (amino grupe) može da reaguje sa negativno naelektrisanom citoplazmatičnom membranom mikroorganizama, uzrokujući izlazak intraćelijskih sastojaka iz nje [24,56]. Takođe, poznati su i drugi antimikrobni mehanizmi hitozana, tokom kojih hitozan manje molekulske mase može da difunduje kroz citoplazmatičnu membranu u unutrašnjost ćelije i tom prilikom reaguje sa DNK molekulom ćelije mikroorganizma [81,85,90], ili na površini ćelije može da formira polimerni sloj i tako sprečiti ulazak hranljivih materija [81,85]. Antimikrobno dejstvo hitozana do sada je pokazano prema brojnim Gram-pozitivnim i Gram-negativnim vrstama bakterija, kao i vrstama plesni i kvasaca [21,81,89]. Pereda (*Pereda*) i saradnici [99] su potvrdili antimikrobni efekat hitozana, radeći na razvoju kompozitnih (H-Ž) i dvoslojnih (H/Ž) jestivih i biorazgradivih filmova, a Ponce (*Ponce*) i saradnici [229] su ispitali antimikrobno dejstvo rastvora za formiranje filmova na bazi hitozana, karboksimetil celuloze i kazeina u *in vitro* uslovima prema autohtonj mikroflori prisutnoj na površini tikvica i vrsti *Listeria monocytogenes*. Sva ova istraživanja potvrdila su da biopolimerni rastvori za formiranje prevlaka, koji sadrže hitozan pokazuju značajnu antimikrobnu aktivnost zbog sposobnosti samog hitozana da inhibira rast i razmnožavanje različitih vrsta mikroorganizama, u poređenju sa drugim biopolimerima poput pektina i želatina. Zbog toga, hitozan ne predstavlja samo nosač aktivnih komponenti, već i sam poseduje antimikrobna svojsva.

Kod antibakterijske aktivnosti disperzija i emulzija na bazi pektina, uočava se očigledan uticaj etarskog ulja limunove trave. Emulzija na bazi pektina pokazale su određeno antibakterijsko dejstvo, dok disperzije na bazi pektina, sa i bez dodatka soli metala ili metal-oksida, nisu ispoljile efekat prema testiranim vrstama bakterija. Ovo potvrđuje antimikrobnu aktivnost čistog LT, koja je u literaturi pokazana prema mnogim vrstama bakterija, plesni i kvasaca [51-54]. Sve emulzija na bazi pektina pokazale su sličan antibakterijski efekat prema vrstama *E. coli* i *B. subtilis*. Međutim, antibakterijski efekat prema *S. aureus* uočen je samo kod emulzija na bazi pektina sa dodatkom Zn-Ac ili nanočestica ZnO. Do ovoga najverovatnije dolazi zbog sinergističkog efekta etarskog ulja limunove trave i Zn-Ac ili nanočestica ZnO. Ovo je od posebnog značaja kod polimernih matrica koje ne pokazuju antimikrobnu aktivnost, čime se može proširiti njihov efekat prema različitim vrstama patogenih mikroorganizama. Sinergističko dejstvo različitih etarskih ulja i nanočestica ZnO inkapsuliranih u biopolimerne matrice namenjene za izradu antimikrobnog pakovanja, takođe, potvrđeno je od strane nekih autora. Idžaz (*Ejaz*) i saradnici [32] su pokazali da filmovi na bazi govedeg želatina tipa B sa inkorporiranim etarskim uljem karanfilića, posebno u kombinaciji sa nanočesticama ZnO, poseduju dobru antibakterijsku aktivnost tokom skadištenja škampi u frižideru prema vrstama *Listeria monocytogenes* i *Salmonella Tiphimurium* sa kojima su škampi bili kontaminirani. Takođe, sinergistički efekat ZnO/ Ag nanočestica, etarskog ulja citronele i hitozana obezbedio je širi spektar antimikrobne aktivnosti prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim vrstama bakterija i vrstama kvasaca i plesni [35].

3.4. Primena prevlaka na bazi hitozana i pektina u aktivnom pakovanju

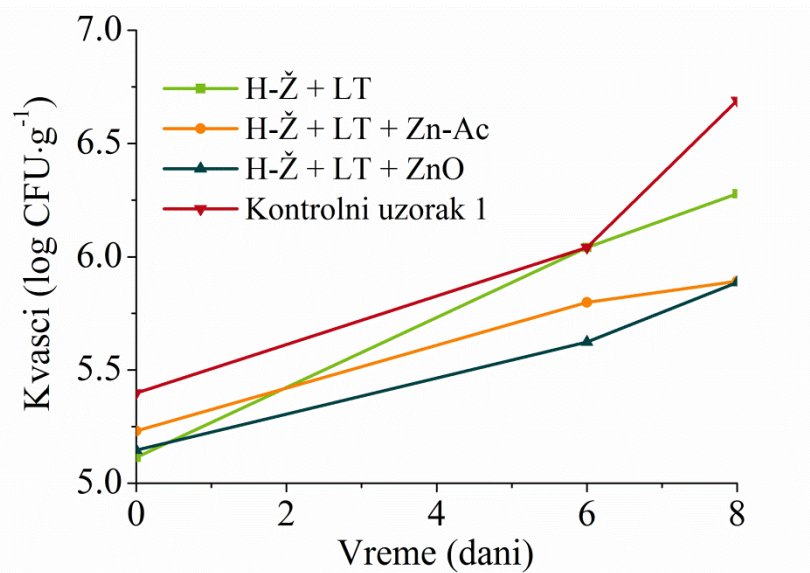
Mnogi sistemi za pakovanje hrane koji su pokazali antimikrobnu aktivnost u *in vitro* uslovima ili na određenim model sistemima, nisu pokazali ovu aktivnost kada su testirani u realnim uslovima, na prehrambenim proizvodima u *in vivo* uslovima [9]. Stoga je u ovom istraživanju bilo važno razviti sistem aktivnog pakovanja koji se može i praktično primeniti. Kod primene biopolimernih materijala za izradu ambalažnog materijala postoji tehnološki problem povezan sa poteškoćama prerade biopolimera, koji nemaju termoplastično ponašanje. U ovom slučaju metoda izlivanja se ne može praktično primenjivati u većem obimu [14,231,232] i zato je posebno bilo važno uzeti u razmatranje prednosti drugih metoda, kao što je nanošenje biopolimernih prevlaka direktno na postojeći, ekološki prihvatljiv materijal za pakovanje hrane. Ovo je podrazumevalo primenu biopolimernih matrica rastvorljivih u vodi, koje nakon primene i sušenja na određenoj površini mogu formirati nerastvornu prevlaku iz koje će se kontrolisano otpuštati aktivne komponente. Nerastvorljivost prevlaka u velikoj meri sprečava neželjenu razmenu materija između aktivnih komponenti i hrane.

Emulzije na bazi hitozana i pektina su nanete na postojeći ambalažni materijal (kartonske kutije) metodom prskanja sprejem. Nakon sušenja, na ambalažnom materijalu formirane su tanke i providne prevlake.

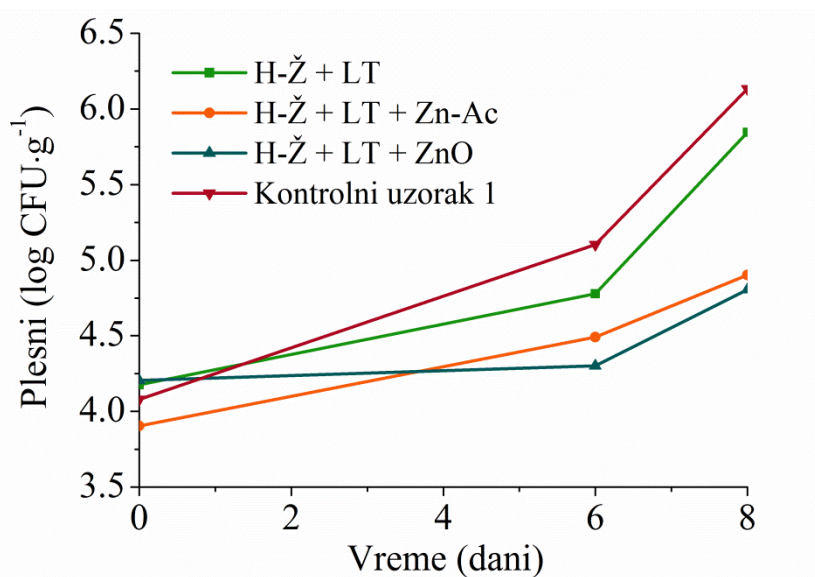
Antimikrobna aktivnost prevlaka ispitana je na uzorku sveže maline (*Rubus idaeus* L.), koja ubrzo nakon berbe omekšava i propada. Svo bobičasto voće ima kratak period skladištenja zbog biohemijskih procesa koji dovode do omekšavanja ploda, kao i podložnosti mehaničkim oštećenjima i truljenju [233]. Rok trajanja sveže maline je najčešće ograničen usled truljenja, prouzrokovanog plesnima, kao što je siva trulež koju izaziva vrsta *Botrytis cinerea* Pers., kao i vrstama plesni iz rodova *Rhizopus* (*Rhizopus stolonifer* Ehrenb.) i *Cladosporium* (*Cladosporium herbarum* Fr.) [234]. Malina predstavlja ekonomski najvažnije bobičasto voće i prirodni nacionalni brend, sa dugom tradicijom proizvodnje u Republici Srbiji [235,236]. Gajenje maline je karakteristično za područja sa umerenim klimatskim uslovima i kvalitet voća koje se stavlja u promet u velikoj meri zavisi od načina i uslova skladištenja. Do sada, maline su uglavnom bile pakovane i skladištene u plastičnoj ambalaži i nisu ulagani značajniji naponi za pronalaženje alternativnih načina, kao što je aktivna ambalaža koja bi mogla da produži njihov rok trajanja.

3.4.1. Antimikrobna svojstva prevlaka na bazi hitozana i pektina u *in vivo* uslovima

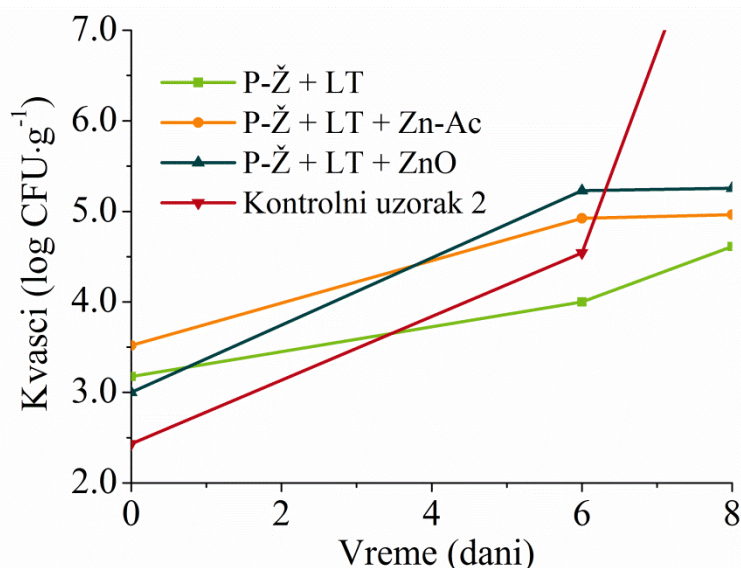
Uticaj prevlaka na bazi hitozana i pektina sa inkapsuliranim aktivnim komponentama (etarsko ulje limunove trave, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ ili nanočestice ZnO) na održivost svežih malina ispitan je u akreditovanoj laboratoriji. Efekat pomenutih prevlaka na rast i razmnožavanje ćelija epifitnih vrsta kvasaca i plesni (izražen kao broj formiranih kolonija po gramu uzorka, $CFU \cdot g^{-1}$ – eng. “*colony-forming unit per gram*”) na malinama, tokom osam dana skladištenja na temperaturi frižidera predstavljen je na *Slikama 3.29 – 3.32*.



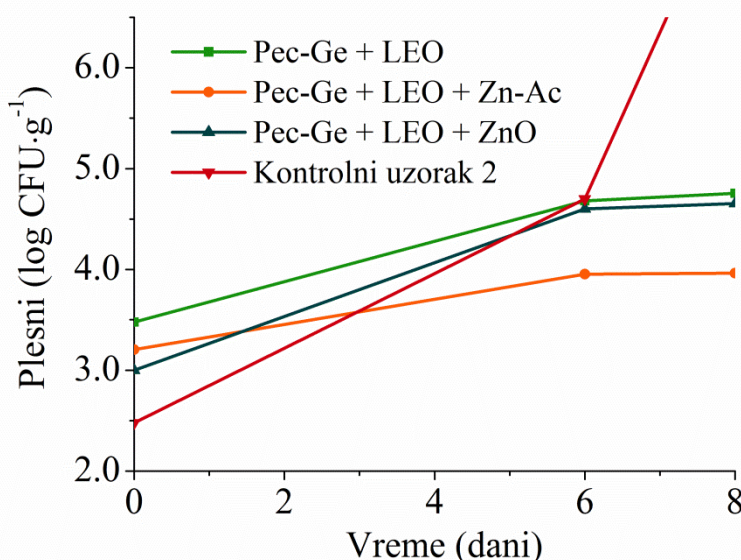
Slika 3.29. Efekat prevlaka na bazi hitozana na rast i razmnožavanje epifitnih vrsta kvasaca ($\log \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$) na malinama (*Rubus idaeus* L.) skladištenim osam dana na temperaturi frižidera



Slika 3.30. Efekat prevlaka na bazi hitozana na rast i razmnožavanje epifitnih vrsta plesni ($\log \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$) na malinama (*Rubus idaeus* L.) skladištenim osam dana na temperaturi frižidera



Slika 3.31. Efekat prevlaka na bazi pektina na rast i razmnožavanje epifitnih vrsta kvasaca ($\log \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$) na malinama (*Rubus idaeus* L.) skladištenim osam dana na temperaturi frižidera*



Slika 3.32. Efekat prevlaka na bazi pektina na rast i razmnožavanje epifitnih vrsta plesni ($\log \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$) na malinama (*Rubus idaeus* L.) skladištenim osam dana na temperaturi frižidera*

*Analize kontrolnog uzorka 2 završene su šestog dana, jer je upotrebljivost ovog kontrolnog uzorka, na osnovu mikrobioloških i senzornih testova, bila ograničena na šest dana.

Kvasci i plesni mogu sintetisati brojne enzime koji doprinose kvarenju hrane, narušavajući senzorne karakteristike proizvoda [237]. Takođe, utvrđeno je da brojne vrste plesni sintetišu toksične metabolite (mikotoksine) u hrani, posebno kada je ukupan broj njihovih ćelija veći od $10^6 \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ [238]. Zbog toga je važno da se tokom skladištenja voća ukupan broj ćelija plesni održi što je moguće niži. Takođe, prema Institutu za prehrambenu nauku i tehnologiju (IFST – eng. “*Institute of Food Science and Technology*”), ukupan broj ćelija mikroorganizama od $10^6 \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ smatra se gornjom prihvatljivom granicom za proizvode na bazi voća da bi mogli da se koriste u ljudskoj ishrani [239].

Na osnovu predstavljenih rezultata (*Slike 3.29 – 3.32*), početni ukupan broj ćelija epifitnih vrsta kvasaca i plesni na dan pakovanja (nulti dan) značajno se razlikovao kod svih ispitivanih uzoraka.

Sve tri prevlaka na bazi hitozana pokazale su dobro inhibitorno dejstvo na rast i razmnožavanje epifitnih vrsta kvasca i plesni, u poređenju sa kontrolnim uzorkom 1. U trenutku pakovanja maline (nulti dan), ukupan početni broj ćelija epifitnih vrsta kvasaca na uzorcima maline bio je visok (10^5 CFU·g⁻¹), ali je ostao bitno nepromenjen tokom svih osam dana skladištenja. Kod prevlaka na bazi hitozana, prisustvo Zn-Ac i nanočestica ZnO imalo je značajan efekat na sporiji rast i razmnožavanje mikroorganizama, tako da u uzorcima ni posle osam dana skladištenja ukupan broj ćelija epifitnih vrsta kvasaca i plesni nije bio veći od 10^5 CFU·g⁻¹ (kvasci: 10^5 CFU·g⁻¹; plesni: 10^3 – 10^4 CFU·g⁻¹). Takođe, tokom osam dana skladištenja u testiranim uzorcima maline, uključujući i kontrolni uzorak, ukupan broj ćelija patogenih vrsta bakterija *L. monocytogenes* bio je niži od 10 CFU·g⁻¹, a *E. coli* ispod 100 CFU·g⁻¹. U svim ispitivanim uzorcima nije uočeno prisustvo vrsta roda *Salmonella*.

Prevlake na bazi pektina, takođe, pokazale su značajano inhibitorno dejstvo na rast i razmnožavanje epifitnih vrsta kvasca i plesni na malinama tokom perioda skladištenja. Prevlaka P-Ž + LT + Zn-Ac pokazala je nešto bolji inhibitorni efekat na rast i razmnožavanje plesni, u poređenju sa P-Ž + LT i P-Ž + LT + ZnO prevlakama. U svim ovim uzorcima ukupan početni broj ćelija povećao se za oko dva reda veličine i zadržao se u opsegu od 10^4 – 10^5 CFU·g⁻¹ za kvasce i u opsegu od 10^3 – 10^4 CFU·g⁻¹ za plesni. Prisustvo ćelija bakterijskih vrsta *L. monocytogenes* i *E. coli* u testiranim uzorcima maline bio je niži od 10 CFU·g⁻¹, nakon posmatranog perioda od osam dana. Kod ovih uzoraka, takođe, nije uočeno prisustvo vrsta roda *Salmonella*.

Kod prevlaka na bazi hitozana može se uočiti sinergističko dejstvo između etarskog ulja limunove trave i nanočestica ZnO ili Zn-Ac, gde je kombinacija ovih aktivnih komponenti dovela do najvećeg inhibitornog efekata na rast i razmnožavanje epifitnih vrsta plesni i kvasaca, dok je kod prevlaka na bazi pektina sličan efekat uočen između etarskog ulja limunove trave i Zn-Ac prema plesnima.

3.4.1.1. Senzorna svojstava malina tokom skladištenja u aktivnom pakovanju

Analizom senzornih svojstava malina tokom osam dana skladištenja u aktivnom pakovanju zapažene su sledeće promene:

0' dan: Za razliku od mikrobiološke analize, senzorna svojstva svih ispitivanih uzoraka bila su veoma ujednačena na samom početku eksperimenta. Analizirani su celi, zreli plodovi maline, ujednačene veličine, tamnocrvene boje, karakterističnog kupolastog oblika, bez stranih materija mineralnog ili organskog porekla, karakterističnog mirisa i slatko-kiselog, osvežavajućeg ukusa.

6. dan: Svi uzorci malina, upakovani u kutije sa prevlakama na bazi hitozana i pektina, i dalje su zadržali svojstvene senzorne karakteristike sa početka ispitivanja, sa blagim znacima sušenja i omekšavanja ploda. U slučaju kontrolnog uzorka 1, na plodovima maline primećeni su prvi znaci razvoja micelijuma plesni. U slučaju kontrolnog uzorka 2, na plodovima maline došlo je do obilnog obrazovanja micelijuma, kao i do značajnog omekšavanja plodova (verovatno zbog aktivnosti kvasca) i takav proizvod više nije bio za ljudsku upotrebu.

8. dan: Osmog dana nakon berbe, pakovanja i skladištenja u kutijama obloženim prevlakama na bazi hitozana na uzorcima maline uočeni su prvi znaci razvoja micelijuma plesni, sa neznatno izraženim znacima isušivanja i razmekšavanja ploda. Slične promene uočene su i kod malina pakovanih u kutijama sa prevlakom na bazi P-Ž + LT + ZnO, dok u slučaju ostalih prevlaka na bazi pektina razvoj plesni nije bio vidljiv, a primećeni su samo blagi znaci isušivanja i omekšavanja plodova. U kontrolnom uzorku 1 i kontrolnom uzorku 2, na plodovima maline formiran je obilan micelijum plesni praćen omekšavanjem plodova usled aktivnosti kvasaca.

Na osnovu određenih senzornih svojstava i rezultata iz akreditovanih laboratorija, može se primetiti da je rok upotrebe ispitivanih uzoraka maline produžen sa četiri na osam dana nanošenjem aktivnih prevlaka na postojeću ambalažu. Primenom ovakvog tipa aktivnog pakovanja značajno je produžen roka trajanja ove vrste voća, što može smanjiti ekonomske gubitke. Takođe, svi ispitani uzorci maline ispunili su zahteve propisane “Zakonom o bezbednosti hrane”, a prema “Uredbi o opštim i posebnim higijenskim zahtevima hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i trgovine”, br. 72/2010 C.F.R. (2010).

U literaturi je navedeno puno primera kada su formulacije za antimikrobne prevlake uglavnom dobijene kombinovanjem različitih biopolimera sa različitim aktivnim komponentama, a zatim primenjivane direktno na voću u tečnom obliku, upotrebom različitih tehnika, kao što su prskanje ili potapanje [240-243]. Vu (*Vu*) i saradnici [241] su formirali bioaktivne prevlake direktno na plodu jagode i testirali efekat prevlaka na produženje roka trajanja ploda, tokom 14 dana skladištenja na temperaturi od 4 °C. U ovom istraživanju prevlake su bile izrađene od modifikovanog hitozana sa ugrađenim aktivnim komponentama kao što su limonen i etarsko ulje pepermint, a najbolji efekat na produženje roka trajanja jagoda imale su prevlake sa limonenom. Efekat različitih koncentracija (0,1; 0,3 i 0,5 mas./vol.%) etarskog ulja limunove trave ugrađenog u jestive prevlake na bazi alginata ispitan je na održivost sveže isečenog ananasa, tokom 16 dana skladištenja na temperaturi od 10 °C [243]. Ovi primeri pokazuju da bioaktivne prevlake na bazi biopolimera i etarskih ulja imaju potencijal u zaštiti sveže hrane, omogućavajući im produženi rok trajanja.

U navedenim primerima, prevlake su nanošene direktno na površinu voća, što bi moglo uticati na prihvatljivost takvog proizvoda od strane potrošača. Prevlake primenjene na ambalaži imaju prednost zbog jednostavnosti primene i ekonomičnosti. Vreme sušenja materijala za oblaganje je kraće i nema potrebe za dodatnim pakovanjem, kao što je to najčešće kod obloženog voća. Takođe, primenom aktivnih biopolimernih emulzija na ambalažnom materijalu, umesto direktno na voću, smanjuje se mogućnost promene senzornih svojstava voća, poput ukusa i mirisa.

3.4.2. Zdravstvena bezbednost ambalažnog materijala

Filmovi na bazi hitozana (H-Ž + LT + ZnO) i pektina (P-Ž + LT + ZnO) su testirani sa aspekta zdravstvene ispravnosti prema važećem Pravilniku o predmetima opšte upotrebe (Službeni glasnik RS 25/19). U **Tabeli 3.8** prikazani su rezultati fizičke i hemijske, a u **Tabeli 3.9** mikrobiološke analize biopolimernih filmova.

Tabela 3.8. Fizička i hemijska analiza biopolimernih filmova

Parametar	H-Ž + LT + ZnO*	P-Ž + LT + ZnO*
Migracija primarnih aromatičnih amina	Sadržaj sastojka u migracionom rastvoru (mg·dm ⁻³)	
Anilin	<0,001	<0,001
o-toluidin	<0,001	<0,001
2,4-toluendiamin	<0,001	<0,001
2,6-toluendiamin	<0,001	<0,001
4,4-metilendianilin	<0,001	<0,001
1,3-fenilendiamin	<0,001	<0,001
4,4-oksidianilin	<0,001	<0,001

Specifična migracija		
Kadmijum	<0,01	<0,01
Kobalt	<0,01	<0,01
Bakar	<0,05	<0,05
Gvožđe	<0,05	0,10
Hrom	<0,02	<0,02
Mangan	<0,01	<0,01
Arsen	<0,005	<0,005
Olovo	<0,05	<0,05
Nikl	<0,01	/
Živa	<0,005	<0,005
Cink	<0,01	0,05
Litijum	<0,00125	0,0094
Barijum	<0,00125	0,0056
Aluminijum	<0,0025	0,018

*Opis uzoraka: Providni biopolimerni filmovi, izliveni u obliku kruga, prečnika 15,5 cm, providne žute boje i debljine 0,09 mm; predviđeni za kontakt sa određenom vrstom hrane - probni (pilot) uzorci izrađeni su od sirovina predviđenih za upotrebu u prehrambenoj industriji. Miris uzorka je veoma slabo izražen.

Tabela 3.9. Mikrobiološka analiza biopolimernih filmova

Parametar (merna jedinica)	H-Ž + LT + ZnO	P-Ž + LT + ZnO
Broj aerobnih mezofilnih bakterija (CFU·cm ⁻²)	<10	<10
<i>Salmonella</i> spp. (CFU·g ⁻¹)	nije nađeno	nije nađeno
Koagulaza pozitivne stafilokoke (CFU·ml ⁻¹)	nije nađeno	nije nađeno
Sulfitoredukujuće klostridije (CFU·ml ⁻¹)	<10	<10
Vrste roda <i>Preoteus</i> (CFU·ml ⁻¹)	nije nađeno	nije nađeno
<i>Escherichia coli</i> (CFU·ml ⁻¹)	nije nađeno	nije nađeno

Na osnovu rezultata laboratorijskih ispitivanja i veštačenja, utvrđeno je da uzorci biopolimernih filmova sa aspekta ispitivanih parametara ispunjavaju uslove propisane Zakonom o predmetima opšte upotrebe (Službeni glasnik RS 25/19), a u vezi sa Pravilnikom o uslovima u pogledu zdravstvene ispravnosti predmeta opšte upotrebe koji se mogu stavlјati u promet (Službeni list SFRJ 26/83, 61/84, 56/86, 50/86, 50/89 i 18/91).

Ovi rezultati su doprineli glavnim ciljevima ovog istraživanja, a to je da se upotrebom prirodnih supstanci, iz obnovljivih izvora, koje su bezbedne po zdravlje ljudi i životnu sredinu, formira oblik aktivnog pakovanja koje će produžiti rok trajanja svežeg voća kao što su to maline. Isti pristup se može primeniti da bi se produžio rok trajanja drugog voća i povrća.

3.5. Primena emulzije kao biopesticida

Kao što je već spomenuto, različite vrste etarskih ulja iz roda *Cimbopogon* (*Poaceae*) imaju široku upotrebu zbog svoje efikasnosti prema plesnima, kvascima i bakterijama, ali takođe, pokazano je da poseduju dobro insekticidno i repelentno dejstvo [38]. Ova etarska ulja su pokazala potencijalnu primenu u različitim metodama suzbijanja štetočina u nekim zemljama koje nisu članice Evropske unije, što je uticalo na razvoj alternativnih rešenja koja bi zamenila sintetičke hemijske pesticide [39,40]. Glavni nedostatak kod primene etarskih ulja je visok stepen njihove isparljivosti i nestabilnost pod dejstvom spoljnih faktora (svetlost, vlaga, temperatura i oksidacija) [11,244]. Zbog toga se etarska ulja ne koriste u zaštiti poljoprivrednih useva, već se uglavnom razmatra njihova primena u skladištima u kojima skladišni uslovi uglavnom ne zavise mnogo od nepredvidljivih atmosferskih prilika. U skladištima je moguće podešavati uslove čuvanja određenih proizvoda, pa su ona pogodnija za primenu preparata na bazi etarskih ulja u cilju suzbijanja štetočina.

3.5.1. Primena emulzije na bazi pektina u suzbijanju krompirovog moljca

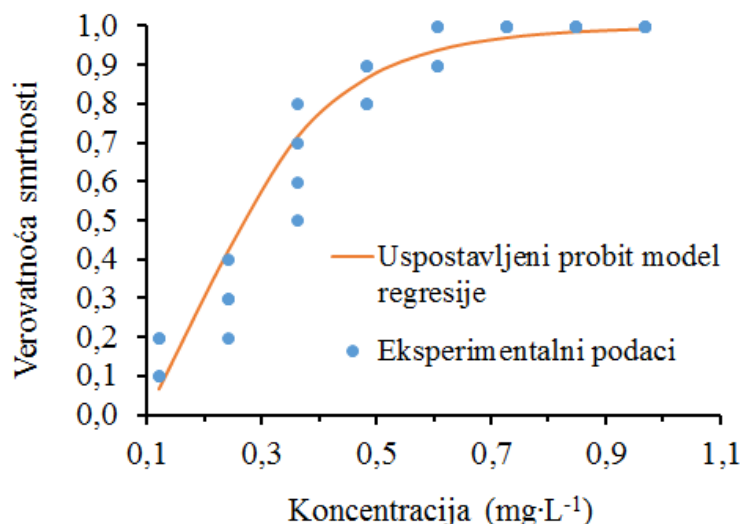
Krompirov moljac, *Phthorimaea operculella* (Zeller, 1873) (*Lepidoptera: Gelechiidae*) predstavlja jednu od najopasnijih štetočina za krompir (*Solanum tuberosum* L.), duvan (*Nicotiana tabacum* L.) i paradajz (*Solanum lycopersicon* L.), napadajući useve kako u skladištima, tako i na poljima. Takođe, on može izazvati oštećenja na plavom patlidžanu (*Solanum melongena* L.), paprici (*Capsium annuum* L.), ogrozdu (*Physalis peruviana* L.) i šećernoj repi (*Beta vulgaris* L.) [186,245]. Prva pojava ove štetočine u Srbiji zabeležena je 2008. godine u Leskovcu, a prve veće štete na krompiru su prijavljene 2011. godine. Nakon par godina, njihovo prisustvo u Srbiji je registrovano u gotovo svim ravničarskim predelima gde se uzgajao krompir. Prema literaturnim podacima [246], najveća šteta (od 60%) bila je zabeležena u Čačanskom regionu, kada oštećene krtole više nisu imale tržišnu vrednost. Stoga je pokrenuta intenzivna potraga za načinima kontrole i suzbijanja ove štetočine. Hemijska kontrola predstavlja ozbiljnu opasnost za potrošače, a preterana upotreba hemijskih insekticida zagađuje životnu sredinu [247]. Kontrola ove štetočine, takođe, otežana je zbog njene velike reproduktivne sposobnosti i prilagodljivosti različitim klimatskim uslovima [245,248]. Od nedavno, došlo je do povećanog interesovanja za prirodnim pesticidima zbog toksikološkog uticaja sintetičkih pesticida na zdravlje ljudi i povećanog zagađenja životne sredine [4,5,6].

U ovim istraživanjima je ispitano dejstvo inkapsuliranog etarskog ulja limunove trave u suzbijanju populacije krompirovog moljca, a kao polimerna matrica korišćena je formulacija na bazi pektina. Emulzija (inkapsulirano etarsko ulje), kao i čisto etarsko ulje, primenjivani su u različitim koncentracijama kako bi se utvrdila optimalna letalna doza tokom sedam dana ispitivanja. Takođe, ispitano je da li inkapsulirano etarsko ulje pokazuje bolju efikasnost prema krompirovom moljcu u poređenju sa čistim etarskim uljem, kako u pogledu koncentracije etarskog ulja i tako i po vremenskom periodu izloženosti insekata.

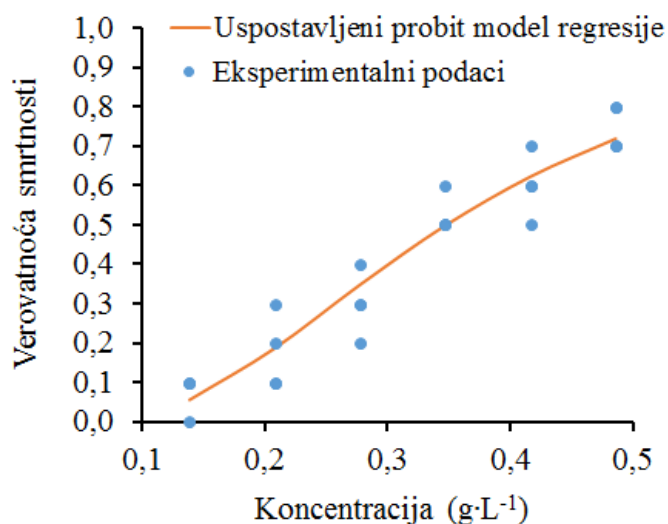
3.5.2. Letalne koncentracije (LC) i smrtnost insekata

Statističkom analizom podataka određena je verovatnoća smrtnosti krompirovog moljca izloženog dejstvu čistog LT ili emulzije, a u zavisnosti od različitih koncentracija čistog LT ili emulzije. Probit analiza je korišćena za određivanje koncentracija čistog LT i emulzije koje su bile letalne za 50% (LC_{50}) i 95% (LC_{95}) krompirovog moljaca nakon 24 sata izlaganja uzorcima.

Nakon dvadesetčetvoročasovnog izlaganja insekata dejstvu osam različitih koncentracija čistog LT (*Slika 3.33*) i šest različitih koncentracija emulzije (*Slika 3.34*) primećeno je da se verovatnoća smrtnosti povećavala sa porastom koncentracije, kako čistog LT, tako i emulzije.



Slika 3.33. Verovatnoća smrtnosti krompirovog moljca nakon 24 sata izlaganja dejstvu čistog etarskog ulja limunove trave koncentracije od 0,121 do 0,967 $mg \cdot l^{-1}$ vazduha



Slika 3.34. Verovatnoća smrtnosti krompirovog moljca nakon 24 sata izlaganja dejstvu emulzije na bazi pektina koncentracije od 0,139 do 0,486 $g \cdot l^{-1}$ vazduha

U slučaju tretmana sa čistim etarskim uljem limunove trave LC_{50} vrednost je bila $0,268 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (sa intervalom pouzdanosti: $0,237 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (donja granica) i $0,299 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (gornja granica)), dok je LC_{95} vrednost bila $0,643 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (sa intervalom pouzdanosti: $0,559 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (donja granica) i $0,775 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (gornja granica)). Kod tretmana emulzijom, LC_{50} vrednost je bila $0,348 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (sa intervalom pouzdanosti: $0,314 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (donja granica) i $0,391 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (gornja granica)), a LC_{95} vrednost $0,897 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (sa intervalom pouzdanosti: $0,703 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (donja granica) i $1,360 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (gornja granica)) (**Tabela 3.10**).

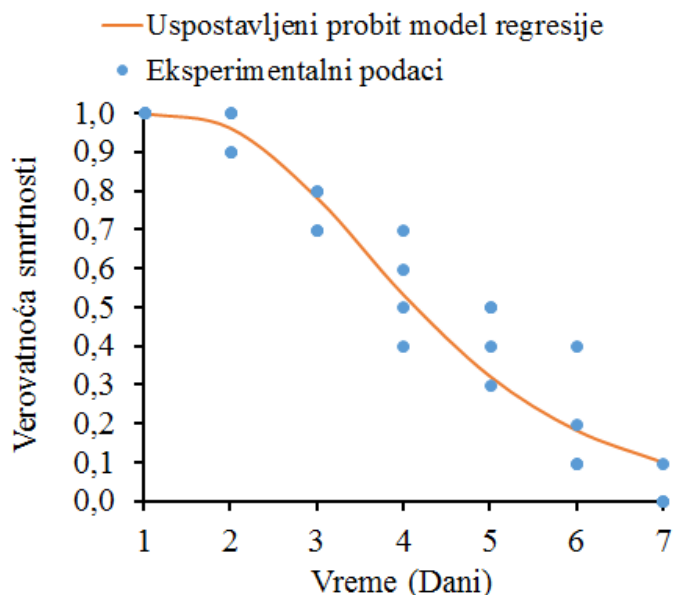
Tabela 3.10. Koncentracije (za čisto LT izražene u $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ vazduha, za emulziju izražene u $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ vazduha koje su usmratile 50% (LC_{50}), odnosno 95% (LC_{95}) populacije insekata, sa odgovarajućim intervalom pouzdanosti (CI_{95}), chi- i p-vrednostima

Uzorak	$LC_{50} \pm \text{S.E.}$	CI_{95}	$LC_{95} \pm \text{S.E.}$	CI_{95}	Chi	p
Čisto LT	$0,268 \pm 0,069$	0,237 – 0,299	$0,644 \pm 0,238$	0,559 – 0,775	17,574	0,965
Emulzija	$0,348 \pm 0,079$	0,314 – 0,391	$0,897 \pm 0,676$	0,703 – 1,360	6,894	0,999

Statističkom analizom, takođe, utvrđene su koncentracije emulzije i čistog LT koje su usmratile 99% insekata: za emulziju koncentracija je bila $1,328 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (sa intervalima pouzdanosti: $0,960 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (donja granica) i $2,332 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (gornja granica)), dok je za čisto LT ova vrednost iznosila $0,924 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (sa intervalima pouzdanosti: $0,768 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (donja granica) i $1,195 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (gornja granica)).

Na osnovu analize rezultata vrednosti za LC_{50} i LC_{95} za čisto LT i emulziju, procenjeno je da bi koncentracija emulzije od $1,398 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ obezbedila dovoljnu količinu inkapsuliranog LT za postepeno oslobađanje bioaktivnog jedinjenja u period od 7 dana.

Podaci dobijeni iz laboratorijskih eksperimenata o smrtnosti insekata obrađivani su pomoću SPSS 25.0 statističkog softvera, korišćenjem probit analize, da bi se utvrdila verovatnoća smrtnosti populacije insekata tokom sedam dana (**Slika 3.35**).



Slika 3.35. Verovatnoća smrtnosti krompirovog moljaca izloženog dejstvu emulzije tokom 7 dana sa regresijom vreme – stopa smrtnosti

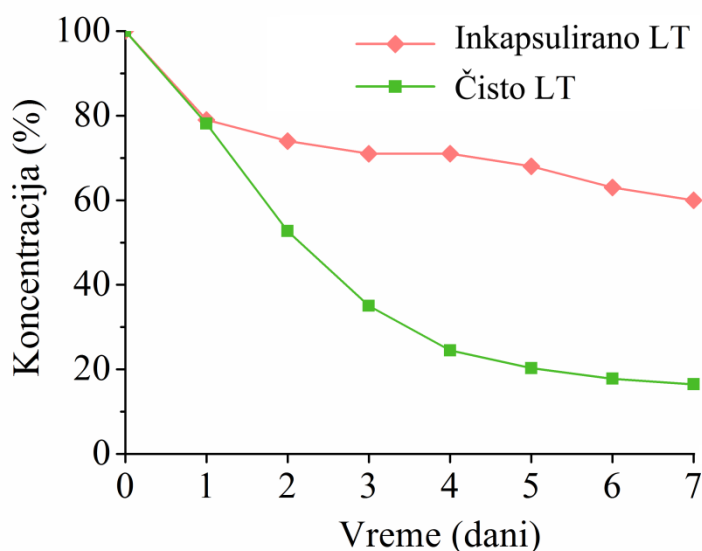
Statistička analiza smrtnosti populacije insekata pokazala je sledeću smrtnost po danima: 1,000; 0,961; 0,782; 0,532; 0,322; 0,183 i 0,100; (sa chi-vrednošću od 16,362 i p-vrednošću od 0,927), tokom 7 dana izlaganja insekata koncentraciji emulzije od 1,398 g·l⁻¹ vazduha. Smrtnost krompirovog moljca nakon 24 sata izlaganja dejstvu čistog LT bila je ista kao i u slučaju inkapsuliranog LT. Nakon izloženosti od 48 sati, njegov efekat je potpuno nestao (0% smrtnosti), jer su bioaktivna jedinjenja LT koja imaju letalni efekat na populaciju krompirovog moljca potpuno isparila nakon 24 sata. S druge strane, LT inkapsulirano u emulziji pokazalo je produženi efekat na krompirovom moljcu sve do sedmog dana. Tokom izlaganja insekata koncentraciji emulzije od 1,398 g·l⁻¹ vazduha, smrtnost se postepeno smanjivala od 100% (nakon prva 24 sata) do 10% (nakon 7 dana). Posle četvrtog dana verovatnoća smrtnosti populacije insekata i dalje je bila veća od 50%.

U literaturi do sada nije istraženo insekticidno dejstvo inkapsuliranog LT prema krompirovom moljcu. Proučavan je fumigantni efekat mnogih različitih etarskih ulja (*Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus leucoxydon*, *Mentha pulegium*, *Thymus mastichina*, *Nepeta cataria* i mnoga druga) prema različitim štetočinama [187,249,250]. Tejob (*Tayoub*) i saradnici [251] su ispitali fumigantnu toksičnost etarskih ulja (majčine dušice i mirte) prema populaciji krompirovog moljca u različitim fazama njihovog razvića, koristeći različite koncentracije etarskog ulja kada su ustanovili da se smrtnost značajno povećava sa povećanjem koncentracije etarskog ulja, što se poklapa sa rezultatima dobijenim u ovom radu. Smrtnost od 100% kod odraslih insekata, nakon 24 sata izlaganja, postignuta je primenom etarskog ulja majčine dušice i mirte u koncentracijama od 2 µl·l⁻¹ vazduha. U ovom radu, utvrđena je koncentracija čistog LT neophodna za usmrćivanje 99% populacije krompirovih moljaca i iznosila je 0,931 mg·l⁻¹ vazduha ili 0,883 µl·l⁻¹ vazduha. Upoređivanjem podataka iz literature sa rezultatima iz ovog rada, etarsko ulje limunove trave pokazalo je veću efikasnost u suzbijanju krompirovog moljca u poređenju sa etarskim uljima majčine dušice i mirte.

Za razliku od eksperimentalnog pristupa u gore pomenutim istraživanjima iz literature, gde je primenjena kumulativna efikasnost fumiganta (svi ispitivani insekti su bili zatvoreni u tegli i izloženi dejstvu čistog etarskog ulja sve dok je ono pokazivalo aktivnost), cilj ovog istraživanja je bio da se ispita produženi insekticidni efekat etarskog ulja iz emulzije tokom perioda od 7 dana, uz promenu insekata na svakih 24 sata.

3.5.3. Otpuštanje bioaktivnih jedinjenja

Praćenje postepenog oslobađanja bioaktivnog jedinjenja je važno za dinamiku delovanja etarskog ulja. Praćenje otpuštanja bioaktivnog jedinjenja iz čistog i inkapsuliranog etarskog ulja limunove trave, tokom 7 dana, urađeno je korišćenjem UV-Vis spektrofotometrije na primeru pektinske emulzije (*Slika 3.36*). Merena je apsorbancija citrala, kao glavnog bioaktivnog jedinjenja etarskog ulja limunove trave, što je prethodno utvrđeno GC-MS analizom (*Odeljak 3.1.1.*). Apsorbancija citrala je bila direktno proporcijalna njegovoj koncentraciji u čistom i inkapsuliranom etarskom ulju limunove trave.

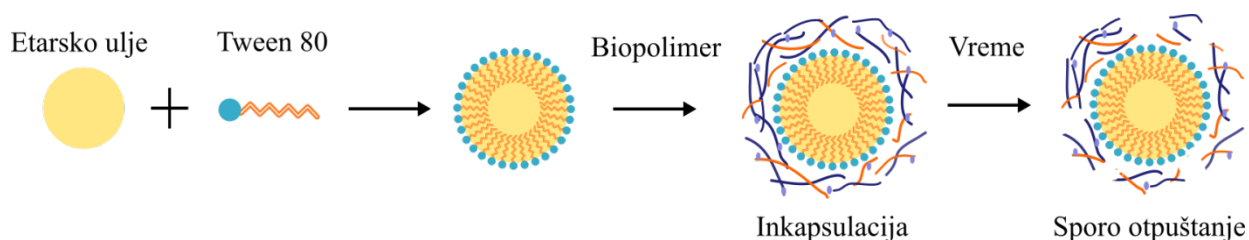


Slika 3.36. Koncentracija citrala u inkapsuliranom i čistom LT tokom perioda od 7 dana

Praćenjem apsorbancije citrala prisutnog u inkapsuliranom i čistom LT na svakih 24 sata tokom perioda od 7 dana, primećeno je da se koncentracija citrala postepeno smanjuje, proporcionalno njegovoj apsorbanciji. Posle 24 sata, koncentracije citrala u inkapsuliranom i čistom LT imale su približno slične vrednosti od 79% (inkapsulirano ulje), odnosno 78,1% (čisto ulje). Međutim, nakon 48 sati koncentracija citrala u čistom LT se značajno smanjila (52,7%), da bi nakon sedam dana opala do 20%, sa tendencijom daljeg opadanja. U slučaju inkapsuliranog etarskog ulja, koncentracije citrala bile su veće tokom celog posmatranog perioda i čak nakon sedam dana merenja iznosila je 60%. Na osnovu dobijenih rezultata može se primetiti da je polimerna matrica pektin-želatin usporila brzinu oslobađanja bioaktivnog jedinjenja i tako obezbedila njen produženi efekat. Ovim je potvrđeno da se ugradnjom LT u biopolimernu matricu pektina postižu glavni ciljevi inkapsulacije, a to je zadovoljavajuća stabilnosti i zaštita bioaktivnog jedinjenja od isparavanja, kao i njeno postepeno i kontrolisano oslobađanje tokom dužeg vremenskog perioda.

Na *Slici 3.37* prikazan je predloženi model otpuštanja bioaktivnih jedinjenja etarskog ulja iz umrežene polimerne matrice tokom vremena. Tween 80 deluje kao nejonski surfaktant koji formira „film” oko dispergovane faze, odnosno etarskog ulja limunove trave, čime smanjuje napetost u međufaznoj oblasti ulje-voda i obezbeđuje stabilnost emulzionog sistema „ulje u vodi“. Umrežena polimerna matrica, koja predstavlja disperznu fazu emulzije, deluje kao „omotač” oko etarskog ulja. Na osnovu rezultata dobijenih u *Odeljku 3.1.2.*, uočava se da izbor polimerne matrice za inkapsulaciju etarskog ulja limunove trave određuje kinetičku i elektrostatičku stabilnosti emulzije i da utiče na veličinu i homogenost raspodele veličine inkapsuliranih kapljica etarskog ulja. Polimerna matrica drži kapljice etarskog ulja na dovoljno velikom rastojanju da spreči njihovu aglomeraciju, održavajući stabilnost emulzionog sistema tokom dužeg vremenskog perioda.

Glavna uloga polimerne matrice, kao inkapsulacionog materijala, jeste da izoluje i štiti aktivnu komponentu od dejstva spoljašnjih uticaja i time omogući njeno produženo dejstvo. Do postepenog oslobađanja bioaktivnih jedinjenja etarskog ulja iz polimerne matrice dolazi tokom vremena pod uticajem različitih hemijskih, fizičkih ili mehaničkih faktora.



Slika 3.37. Model otpuštanja bioaktivnih jedinjenja etarskog ulja iz umrežene polimerne matrice tokom vremena

Dobijeni rezultati smrtnosti insekata u skladu su sa rezultatima sporog otpuštanja glavnog bioaktivnog jedinjenja etarskog ulja limunove trave (citrala) u čistom i inkapsuliranom obliku. Koncentracije citrala u čistom i inkapsuliranom LT nakon 24 sata imale su približno iste vrednosti. Do značajnog smanjenja koncentracije citrala u čistom LT (52,7%) dolazi nakon 48 sati, dok u slučaju inkapsuliranog LT koncentracija citrala ostaje visoka (60%) i posle sedam dana. Kod određivanja smrtnosti populacije insekata, produženi efekat emulzije potvrđen je prema krompirovom moljcu i nakon 48 sati. Smrtnost insekata izloženih čistom LT nakon 48 sati iznosila je 0%, dok je u slučaju emulzije smrtnost produžena sve do sedmog dana (2,5%). Ovaj rezultat ukazuje na povoljan efekat inkapsulacije i mogućnost dejstva etarskog ulja limunove trave tokom dužeg vremenskog perioda

Rezultati su pokazali da je inkapsulirano LT imalo visoku efikasnost prema krompirovom moljcu u uslovima skladišta i to u dužem vremenskom periodu. Na osnovu prikazanih rezultata (vrednosti LC_{95} , efekta sporog oslobađanja), predviđeno je da se efikasna zaštita skladištenih useva može postići primenom ove emulzije neposredno nakon skladištenja useva, ili ponoviti još jednom najkasnije nakon 7 – 10 dana u slučaju većih zaraza useva na polju (što se može utvrditi upotrebom feromonskih zamki). Sporo oslobađanje bioaktivnog jedinjenja ukazuje na isplativost i veći tržišni potencijal inkapsuliranog LT u poređenju sa čistim LT. Uzimajući u obzir sve načine kako se emulzija može primenjivati, direktno na zidove prostora za skladištenje ili na materijal za pakovanje, ovakvim korišćenjem omogućeno je da se izbegne direktan kontakt sa usevom. Fumigantni i produženi efekat emulzije, visoka efikasnost i način na koji se može primeniti ukazuju na isplativost, jer nema potrebe za kontinuiranom primenom.

4. Zaključak

Predmet ove doktorske disertacije bio je inkapsulacija aktivnih komponenti u biopolimerne matrice pektina i hitozana radi produženja njihovog antimikrobnog i insekticidnog dejstva. Pripremljene su biopolimerne emulzije i disperzije, koje su dalje obrađene u tanke filmove (metodom izlivanja) i prevlake (sprej metodom).

Dobijene formulacije su primenjene u zaštiti namirnica u obliku aktivnog pakovanja i biopesticida, kao alternative komercijalnim ambalažnim materijalima za pakovanje (svežeg voća i povrća) i komercijalnim hemijskim pesticidima.

Ekperimentalni deo je obuhvatao pripremu emulzija, gde je u rastvore biopolimernih kompozita (hitozan-želatin ili pektin-želatin) inkapsulirano etarsko ulje limunove trave (*Cymbopogon citratus* L). $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ i nanočestice ZnO su korišćeni kao dodatne aktivne komponente sa antimikrobnim dejstvom. Takođe, pripremljene su biopolimerne disperzije (koje nisu sadržale etarsko ulje), radi boljeg poređenja efekta aktivnih komponenti i različitih biopolimera sa aspekta fizičko-hemijskih i funkcionalnih svojstava.

Pomoću gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom određen je hemijski sastav etarskog ulja limunove trave i tom prilikom utvrđeno je da je glavno bioaktivno jedinjenje citral, koje je zaslužno za biološku aktivnost ovog etarskog ulja.

Na osnovu analiza stabilnosti emulzija i veličina inkapsuliranih kapljica etarskog ulja metodom laserske difrakcije (Particle Analyzer), utvrđeno je da su emulzije na bazi hitozana stabilnije od emulzija na bazi pektina. Prečnik kapljica inkapsuliranog etarskog ulja kod emulzije na bazi hitozana je ostao u opsegu nanoemulzije i nakon 30 dana čuvanja na sobnoj temperaturi (494 nm) i na temperaturi frižidera (526 nm), dok se kod emulzije na bazi pektina povećao sa 394 nm (1. dan) na 637 nm (sobna temperatura) i 787 nm (temperatura frižidera) nakon 30 dana. Takođe, zeta potencijal kod emulzije na bazi hitozana se povećao sa 39 mV na 42 mV, a kod emulzije na bazi pektina smanjio sa -28,6 mV na -18,9 mV, čime je potvrđena znatno veća stabilnost emulzije na bazi hitozana.

Biopolimerni filmovi su dobijeni iz emulzija i disperzija metodom izlivanja. Prisustvo određenih funkcionalnih grupa i hemijskih veza u filmovima potvrđeno je pomoću infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom (ATR-FTIR). Infracrveni spektar filmova pokazao je da je do najveće strukturne promene u filmovima došlo sa dodatkom glicerola, kada su formirane jake vodonične veze između glicerola i kompozita hitozan-želatin ili pektin-želatin čime se povećava međumolekulski prostor u polimernim matricama olakšavajući grananje polimera, što je od velike važnosti za inkapsulaciju.

Termijska analiza filmova na bazi hitozana i pektina ukazala je na karakteristične promene: isparavanje vode i promene u strukturi želatina na 110 °C, kao i razgradnju polisaharida i glicerola u temperaturnom opsegu od 210 – 243 °C. Najveći gubici mase primećeni su na 290 °C (filmovi na bazi hitozana) i 215 °C (filmovi na bazi pektina), koji se mogu pripisati razgradnji hitozana, odnosno pektina, kao glavnih sastojka ovih kompozitnih filmova.

Na osnovu analize morfologije i mikrostrukture površine filmova, AFM analizom pokazana je homogenost raspodele etarskog ulja inkapsuliranog u hitozansku i pektinsku matricu, kao i uticaj etarskog ulja na povećanje glatkoće filmova. Takođe, uočen je uticaj nanočestica ZnO na pravilniju raspodelu i oblik kapljica inkapsuliranog ulja, kao i pojavu kapljica manjih dimenzija. SEM/ EDS analizom je pokazana homogena raspodela nanočestica ZnO u filmovima na bazi hitozana i pektina.

Na mehanička svojstva biopolimernih filmova (zatezna čvrstoća, izduženje pri prekidu, modul elastičnosti), kao i na rastvorljivost, najveći uticaj je imao odabir biopolimerne matrice, dok je uticaj aktivnih komponenti bio znatno manji. Filmovi na bazi hitozana su pokazali bolja mehanička svojstva i manji stepen rastvorljivosti (31 – 21%) u poređenju sa filmovima na bazi pektina.

Antibakterijsko dejstvo emulzija i disperzija u *in vitro* uslovima testirano je na vrstama bakterija koje su česti uzročnici kvarenja i trovanja hranom (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* i

Staphylococcus aureus). Emulzije na bazi hitozana pokazale su jači antibakterijski efekat prema svim testiranim vrstama bakterija. Kod emulzija na bazi pektina, uticaj etarskog ulja limunove trave na njihovo antibakterijsko dejstvo bio je očigledan, s obzirom da disperzije na bazi pektina nisu ispoljile antibakterijsku aktivnost. Kod emulzija na bazi pektina uočeno je sinergističko dejstvo između etarskog ulja limunove trave i nanočestica ZnO ili Zn-Ac prema vrsti *Staphylococcus aureus*.

Biopolimerne prevlake su dobijene nanošenjem emulzija sprej metodom na postojeći ambalažni materijal. Ovako dobijene prevlake su testirane kao aktivno pakovanje u *in vivo* uslovima na svežim malinama (*Rubus idaeus* L.), tokom osam dana njihovog skladištenja i čuvanja na temperaturi frizidera. Prevlake su produžile rok trajanja maline sa četiri na osam dana. Kod prevlaka na bazi hitozana uočeno je sinergističko dejstvo između etarskog ulja limunove trave i nanočestica ZnO ili Zn-Ac, kada je kombinacija ovih aktivnih komponenti dovela do jačeg inhibitornog efekata na rast i razmnožavanje epifitnih vrsta plesni i kvasaca. Kod prevlaka na bazi pektina sličan efekat je uočen između etarskog ulja limunove trave i Zn-Ac na rast i razmnožavanje plesni.

Dejstvo emulzije na bazi pektina kao biopesticida ispitano je na krompirovom moljcu (*Phthorimaea operculella* L.). Primećen je efekat sporog otpuštanja i produženog dejstva inkapsuliranog LT u odnosu na čisto LT, kao i visoka efikasnost emulzije u suzbijanju krompirovog moljca. Nakon 48 sati izlaganja insekata čistom etarskom ulju, njegov efekat je potpuno nestao (0% verovatnoća smrtnosti), dok je kod etarskog ulja inkapsuliranog u emulziji posle četvrtog dana verovatnoća smrtnosti insekata bila i dalje veća od 50%. Tokom izlaganja insekata dejstvu emulzije ($1,398 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ vazduha), smrtnost se postepeno smanjivala od 100% (nakon prva 24 sata) do 10% (nakon 7 dana). Sporo otpuštanje glavnog bioaktivnog jedinjenja etarskog ulja (citrala) praćeno je tokom 7 dana u čistom i inkapsuliranom etarskom ulju, pomocu UV-Vis spektrofotometrije. Utvrđeno je da je koncentracija citrala u čistom etarskom ulju značajno opala tokom 48 sati (52,7%) i ovaj trend se zadržao sve do sedmog dana (20%). U inkapsuliranom etarskom ulju značajna količina citrala (60%) ostala je i nakon 7 dana zahvaljujući pektinskoj polimernoj matrici koja je smanjila brzinu oslobađanja aktivne komponente i tako obezbedila njen produženi efekat. Rezultati sporog otpuštanja glavnog bioaktivnog jedinjenja u skladu sa rezultatima smrtnosti insekata.

U okviru ove doktorske disertacije razvijene su formulacije kojima je obezbeđeno sporo otpuštanje i produženo dejstvo aktivnih komponenti. Razvijen je novi oblik aktivnog pakovanja na bazi prirodnih materijala iz obnovljivih izvora, koji su bezbedni po zdravlje ljudi i životnu sredinu. Zbog rastvorljivost i slabijih mehanička svojstva biopolimernih filmova u odnosu na komercijalnu plastičnu ambalažu, formiranje prevlake na postojećem ambalažnom materijalu se smatra povoljnijim sa aspekta praktične primene ovakve vrste materijala. Ovakav vid pakovanja je pokazao antimikrobno dejstvo prema epifitnim vrstama plesni i kvasaca na svežim malinama. Sve prevlake na bazi hitozana i pektina su produžile rok trajanja malina sa četiri na osam dana tokom skladištenja, što ukazuje na dobre izgleda za praktičnu primenu. Materijal je potvrđen kao bezbedan sa aspekta zdravstvene ispravnosti. Sinergistički efekat etarskog ulja limunove trave i nanočestica ZnO ili Zn-Ac doveli su do najjačeg antimikrobnog dejstva u *in vitro* i *in vivo* uslovima. Takođe, primena ovakvog inkapsulacionog sistema, kao biopesticida, pokazala se efikasnom u kontroli štetočina. Etarsko ulje limunove trave inkapsulirano u matrici pektin-želatin pokazalo je dobar insekticidni efekat prema štetočini krompirovom moljcu i produženo dejstvo do 7 dana u poređenju sa čistim etarskim uljem. Primena ovakvih formulacija u zaštiti namirnica u potpunosti zadovoljava koncept održivosti.

Literatura

- [1] Ibrahim S, Riahi O, Said SM, Sabri MFM, Rozali S. Biopolymers From Crop Plants. Reference Module in Materials Science and Materials Engineering 2019:1–10. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803581-8.11573-5>.
- [2] Ncube LK, Ude AU, Ogunmuyiwa EN, Zulkifli R, Beas IN. An overview of plasticwaste generation and management in food packaging industries. *Recycling* 2021;6:1–25. <https://doi.org/10.3390/recycling6010012>.
- [3] Sukumaran NP, Gopi S. Overview of biopolymers. *Biopolymers and their Industrial Applications*, Elsevier; 2021, p. 1–19. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819240-5.00001-8>.
- [4] Singh NS, Sharma R, Parween T, Patanjali PK. Pesticide Contamination and Human Health Risk Factor. *Modern Age Environmental Problems and their Remediation*, Cham: Springer International Publishing; 2018, p. 49–68. https://doi.org/10.1007/978-3-319-64501-8_3.
- [5] Hernández AF, Parrón T, Tsatsakis AM, Requena M, Alarcón R, López-Guarnido O. Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: Their relevance to human health. *Toxicology* 2013;307:136–45. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.06.009>.
- [6] Batish DR, Singh HP, Kohli RK, Kaur S. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management* 2008;256:2166–74. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2008.08.008>.
- [7] Poore J, Nemecek T. Reducing food’s environmental impacts through producers and consumers. *Science* 2018;360:987–92. <https://doi.org/10.1126/science.aag0216>.
- [8] Mousavi Khaneghah A, Hashemi SMB, Limbo S. Antimicrobial agents and packaging systems in antimicrobial active food packaging: An overview of approaches and interactions. *Food and Bioproducts Processing* 2018;111:1–19. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.05.001>.
- [9] Ribeiro-Santos R, Andrade M, Melo NR de, Sanches-Silva A. Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends. *Trends in Food Science & Technology* 2017;61:132–40. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.11.021>.
- [10] Gutierrez-Pacheco MM, Ortega-Ramirez LA, Cruz-Valenzuela MR, Silva-Espinoza BA, Gonzalez-Aguilar GA, Ayala-Zavala JF. Combinational Approaches for Antimicrobial Packaging. *Antimicrobial Food Packaging*, Elsevier; 2016, p. 609–17. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800723-5.00050-4>.
- [11] Ribeiro-Santos R, Andrade M, Sanches-Silva A. Application of encapsulated essential oils as antimicrobial agents in food packaging. *Current Opinion in Food Science* 2017;14:78–84. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.01.012>.
- [12] Cutter CN. Opportunities for bio-based packaging technologies to improve the quality and safety of fresh and further processed muscle foods. *Meat Science* 2006;74:131–42. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.04.023>.
- [13] Aider M. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT - Food Science and Technology* 2010;43:837–42. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.01.021>.
- [14] Alavi ES, Thomas S, Sandeep KP, Kalarikkal N. Polymers for packaging application. *Apple*

Academic Press; 2015.

- [15] Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* 2004;94:223–53. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>.
- [16] Ribeiro-Santos R, Andrade M, Sanches-Silva A. Application of encapsulated essential oils as antimicrobial agents in food packaging. *Current Opinion in Food Science* 2017;14:78–84. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.01.012>.
- [17] Silva PT da, Fries LLM, Menezes CR de, Holkem AT, Schwan CL, Wigmann ÉF, et al. Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. *Ciência Rural* 2014;44:1304–11. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20130971>.
- [18] Atarés L, Chiralt A. Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends in Food Science & Technology* 2016;48:51–62. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.12.001>.
- [19] Jovanović J, Krnjajić S, Ćirković J, Radojković A, Popović T, Branković G, et al. Effect of encapsulated lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against potato tuber moth *Phthorimaea operculella*. *Crop Protection* 2020:105109. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105109>.
- [20] Matalanis A, Jones OG, McClements DJ. Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocolloids* 2011;25:1865–80. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.04.014>.
- [21] Elsabee MZ, Abdou ES. Chitosan based edible films and coatings: A review. *Materials Science and Engineering C* 2013;33:1819–41. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.010>.
- [22] Espitia PJP, Du W-X, Avena-Bustillos R de J, Soares N de FF, McHugh TH. Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties - A review. *Food Hydrocolloids* 2014;35:287–96. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.06.005>.
- [23] Hosseini SF, Rezaei M, Zandi M, Farahmandghavi F. Bio-based composite edible films containing *Origanum vulgare* L. essential oil. *Industrial Crops and Products* 2015;67:403–13. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.062>.
- [24] Llorens A, Lloret E, Picouet PA, Trbojevich R, Fernandez A. Metallic-based micro and nanocomposites in food contact materials and active food packaging. *Trends in Food Science & Technology* 2012;24:19–29. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.10.001>.
- [25] Bajpai VK, Kamle M, Shukla S, Mahato DK, Chandra P, Hwang SK, et al. Prospects of using nanotechnology for food preservation, safety, and security. *Journal of Food and Drug Analysis* 2018;26:1201–14. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.06.011>.
- [26] Hoseinnejad M, Jafari SM, Katouzian I. Inorganic and metal nanoparticles and their antimicrobial activity in food packaging applications. *Critical Reviews in Microbiology* 2018;44:161–81. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1332001>.
- [27] Becerril R, Nerín C, Silva F. Encapsulation Systems for Antimicrobial Food Packaging Components: An Update. *Molecules* 2020;25:1134. <https://doi.org/10.3390/molecules25051134>.
- [28] Espitia PJP, Soares N de FF, Coimbra JS dos R, de Andrade NJ, Cruz RS, Medeiros EAA.

Zinc Oxide Nanoparticles: Synthesis, Antimicrobial Activity and Food Packaging Applications. *Food and Bioprocess Technology* 2012;5:1447–64. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0797-6>.

- [29] Rahman PM, Mujeeb VMA, Muraleedharan K. Flexible chitosan-nano ZnO antimicrobial pouches as a new material for extending the shelf life of raw meat. *International Journal of Biological Macromolecules* 2017;97:382–91. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.052>.
- [30] La DD, Nguyen-Tri P, Le KH, Nguyen PTM, Nguyen MD-B, Vo ATK, et al. Effects of antibacterial ZnO nanoparticles on the performance of a chitosan/gum arabic edible coating for post-harvest banana preservation. *Progress in Organic Coatings* 2021;151:106057. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2020.106057>.
- [31] Ngo TMP, Dang TMQ, Tran TX, Rachtanapun P. Effects of Zinc Oxide Nanoparticles on the Properties of Pectin/Alginate Edible Films. *International Journal of Polymer Science* 2018;2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5645797>.
- [32] Ejaz M, Arfat YA, Mulla M, Ahmed J. Zinc oxide nanorods/clove essential oil incorporated Type B gelatin composite films and its applicability for shrimp packaging. *Food Packaging and Shelf Life* 2018;15:113–21. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.12.004>.
- [33] Heydari-Majd M, Ghanbarzadeh B, Shahidi-Noghabi M, Najafi MA, Hosseini M. A new active nanocomposite film based on PLA/ZnO nanoparticle/essential oils for the preservation of refrigerated *Otolithes ruber* filets. *Food Packaging and Shelf Life* 2019;19:94–103. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.12.002>.
- [34] Alizadeh-Sani M, Moghaddas Kia E, Ghasempour Z, Ehsani A. Preparation of Active Nanocomposite Film Consisting of Sodium Caseinate, ZnO Nanoparticles and Rosemary Essential Oil for Food Packaging Applications. *Journal of Polymers and the Environment* 2021;29:588–98. <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01906-5>.
- [35] Motelica L, Fikai D, Fikai A, Trușcă R-D, Ilie C, Oprea O, et al. Innovative Antimicrobial Chitosan/ZnO/Ag NPs/Citronella Essential Oil Nanocomposite—Potential Coating for Grapes. *Foods* 2020;9:1801. <https://doi.org/10.3390/foods9121801>.
- [36] Attia S, Grissa KL, Lognay G, Bitume E, Hance T, Mailleux AC. A review of the major biological approaches to control the worldwide pest *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) with special reference to natural pesticides. *Journal of Pest Science* 2013;86:361–86. <https://doi.org/10.1007/s10340-013-0503-0>.
- [37] Rattan RS. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection* 2010;29:913–20. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.05.008>.
- [38] Boukhatem MN, Ferhat MA, Kameli A, Saidi F, Kebir HT. Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. *Libyan Journal of Medicine* 2014;9:25431. <https://doi.org/10.3402/ljm.v9.25431>.
- [39] KUMAR R, SRIVASTAVA M, DUBEY NK. Evaluation of *Cymbopogon martinii* Oil Extract for Control of Postharvest Insect Deterioration in Cereals and Legumes. *Journal of Food Protection* 2007;70:172–8. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.1.172>.
- [40] Alves M de S, Campos IM, Brito D de MC de, Cardoso CM, Pontes EG, Souza MAA de. Efficacy of lemongrass essential oil and citral in controlling *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae), a post-harvest cowpea insect pest. *Crop Protection*

2019;119:191–6. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.02.007>.

- [41] FDA - Code of Federal Regulations (CFR), Title 21: Food and Drugs, Chapter I, Department of Health and Human Service, Subchapter B, Part 182–Subst. Gen. Recognized as Safe (GRAS). 2020;Volume 3.
- [42] Vigneswaran C, Ananthasubramanian M, Kandhavadi P. Biotechnology and biomaterials for hygienic and health care textiles. *Bioprocessing of Textiles* 2014;398–433. <https://doi.org/10.1016/b978-93-80308-42-5.50008-1>.
- [43] Singh R, Gautam S, Sharma B, Jain P, Chauhan KD. Biopolymers and their classifications. Elsevier Inc.; 2021. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819240-5.00002-x>.
- [44] Ferreira ARV, Alves VD, Coelho IM. Polysaccharide-based membranes in food packaging applications. *Membranes* 2016;6:1–17. <https://doi.org/10.3390/membranes6020022>.
- [45] Sharma B, Malik P, Jain P. Biopolymer reinforced nanocomposites: A comprehensive review. *Materials Today Communications* 2018;16:353–63. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2018.07.004>.
- [46] Román T, Larcher R, Slaghenaufi D, Tonidandel L, Moser S, Nicolini G. Biodegradable packaging and edible coating for fresh-cut fruits and vegetables. *Italian Journal of Food Science* 2016;28:744–8. <https://doi.org/10.14674/1120-1770>.
- [47] Wankhade V. Animal-derived biopolymers in food and biomedical technology. Elsevier Inc.; 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816897-4.00006-0>.
- [48] Mensitieri G, Di Maio E, Buonocore GG, Nedi I, Oliviero M, Sansone L, et al. Processing and shelf life issues of selected food packaging materials and structures from renewable resources. *Trends in Food Science and Technology* 2011;22:72–80. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.10.001>.
- [49] Moradali MF, Rehm BHA. Bacterial biopolymers: from pathogenesis to advanced materials. *Nature Reviews Microbiology* 2020;18:195–210. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0313-3>.
- [50] Devi N, Sarmah M, Khatun B, Maji TK. Encapsulation of active ingredients in polysaccharide–protein complex coacervates. *Advances in Colloid and Interface Science* 2017;239:136–45. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.05.009>.
- [51] Tester RF, Karkalas J. CARBOHYDRATES | Classification and Properties. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* 2003:862–75. <https://doi.org/10.1016/b0-12-227055-x/00166-8>.
- [52] Gupta P, Nayak KK. Characteristics of protein-based biopolymer and its application. *Polymer Engineering & Science* 2015;55:485–98. <https://doi.org/10.1002/pen.23928>.
- [53] Đorđević V, Balanč B, Belščak-Cvitanović A, Lević S, Trifković K, Kalušević A, et al. Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. *Food Engineering Reviews* 2015;7:452–90. <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9106-7>.
- [54] Sonawane SH, Bhanvase BA, Sivakumar M, Potdar SB. Current overview of encapsulation. *Encapsulation of Active Molecules and Their Delivery System*, Elsevier; 2020, p. 1–8. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819363-1.00001-6>.
- [55] Becerril R, Nerín C, Silva F. Encapsulation Systems for Antimicrobial Food Packaging

Components: An Update. *Molecules* 2020;25:1134.
<https://doi.org/10.3390/molecules25051134>.

- [56] Bakry AM, Abbas S, Ali B, Majeed H, Abouelwafa MY, Mousa A, et al. Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2016;15:143–82. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12179>.
- [57] Aksoylu Z, Günc Ergönül P. A Review on Encapsulation of Oils. *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi* 2017. <https://doi.org/10.18466/cbayarfbe.313358>.
- [58] Ribeiro-Santos R, Andrade M, Sanches-Silva A. Application of encapsulated essential oils as antimicrobial agents in food packaging. *Current Opinion in Food Science* 2017;14:78–84. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.01.012>.
- [59] Sweeta Akbari, Abdurahman Hamid Nour. Emulsion types, stability mechanisms and rheology: A review. *International Journal of Innovative Research and Scientific Studies* 2018;1:14–21.
- [60] Goodarzi F, Zendehboudi S. A Comprehensive Review on Emulsions and Emulsion Stability in Chemical and Energy Industries. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 2019;97:281–309. <https://doi.org/10.1002/cjce.23336>.
- [61] El-Sayed M. Factors Affecting the Stability of Crude Oil Emulsions. *Crude Oil Emulsions-Composition Stability and Characterization, InTech*; 2012. <https://doi.org/10.5772/35018>.
- [62] Zhu Q, Pan Y, Jia X, Li J, Zhang M, Yin L. Review on the Stability Mechanism and Application of Water-in-Oil Emulsions Encapsulating Various Additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2019;18:1660–75. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12482>.
- [63] Li M, McClements DJ, Liu X, Liu F. Design principles of oil-in-water emulsions with functionalized interfaces: Mixed, multilayer, and covalent complex structures. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2020;19:3159–90. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12622>.
- [64] McClements DJ. *Biopolymers in Food Emulsions. Modern Biopolymer Science. First Edit, Elsevier*; 2009, p. 129–66. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374195-0.00004-5>.
- [65] Maali A, Mosavian MTH. Preparation and Application of Nanoemulsions in the Last Decade (2000-2010). *Journal of Dispersion Science and Technology* 2013;34:92–105. <https://doi.org/10.1080/01932691.2011.648498>.
- [66] Mustafa IF, Hussein MZ. Synthesis and Technology of Nanoemulsion-Based Pesticide Formulation. *Nanomaterials* 2020;10:1608. <https://doi.org/10.3390/nano10081608>.
- [67] Dordević SM, Cekić ND, Isailović TM, Milić JR, Vuleta GM, Lazić ML, et al. Nanoemulzije dobijene variranjem tipa emulgatora i udela masne faze: Uticaj formulacije i procesnih parametara na karakteristike i fizičku stabilnost. *Hemijska Industrija* 2013;67:795–809. <https://doi.org/10.2298/HEMIND120905005D>.
- [68] Tadros TF. *Emulsion Formation, Stability, and Rheology. Emulsion Formation and Stability, Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*; 2013, p. 1–75. <https://doi.org/10.1002/9783527647941.ch1>.

-
- [69] Ravera F, Dziza K, Santini E, Cristofolini L, Liggieri L. Emulsification and emulsion stability: The role of the interfacial properties. *Advances in Colloid and Interface Science* 2021;288:102344. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102344>.
- [70] Capek I. Preparation of polymer-based nanomaterials. 2019. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63748-2.00003-1>.
- [71] Tadros TF. *Applied Surfactants*. Wiley; 2005. <https://doi.org/10.1002/3527604812>.
- [72] Miyazawa T, Itaya M, Burdeos GC, Nakagawa K, Miyazawa T. A Critical Review of the Use of Surfactant-Coated Nanoparticles in Nanomedicine and Food Nanotechnology. *International Journal of Nanomedicine* 2021;Volume 16:3937–99. <https://doi.org/10.2147/IJN.S298606>.
- [73] Gregory J, Engineering G. *Encyclopedia of Colloid and Interface Science*. 2013. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-20665-8>.
- [74] Cortés H, Hernández-Parra H, Bernal-Chávez SA, Prado-Audelo ML Del, Caballero-Florán IH, Borbolla-Jiménez F V., et al. Non-Ionic Surfactants for Stabilization of Polymeric Nanoparticles for Biomedical Uses. *Materials* 2021;14:3197. <https://doi.org/10.3390/ma14123197>.
- [75] Qiao C, Ma X, Zhang J, Yao J. Molecular interactions in gelatin/chitosan composite films. *Food Chemistry* 2017;235:45–50. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.045>.
- [76] K. A, Bandyopadhyay P. Polysaccharide-Protein Interactions and Their Relevance in Food Colloids. *The Complex World of Polysaccharides* 2012. <https://doi.org/10.5772/50561>.
- [77] de Oliveira FC, Coimbra JS dos R, de Oliveira EB, Zuñiga ADG, Rojas EEG. Food Protein-polysaccharide Conjugates Obtained via the Maillard Reaction: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2016;56:1108–25. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.755669>.
- [78] McClements DJ. Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. *Biotechnology Advances* 2006;24:621–5. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.07.003>.
- [79] Jayakumar R, Prabakaran M, Sudheesh Kumar PT, V. S, Furuike T, Tamur H. Novel Chitin and Chitosan Materials in Wound Dressing. *Biomedical Engineering, Trends in Materials Science*, InTech; 2011. <https://doi.org/10.5772/13509>.
- [80] Younes I, Rinaudo M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine Drugs* 2015;13:1133–74. <https://doi.org/10.3390/md13031133>.
- [81] Hosseinnejad M, Jafari SM. Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules* 2016;85:467–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.022>.
- [82] Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science* 2011;36:981–1014. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.02.001>.
- [83] Kumirska J, X. M, Czerwicka M, Kaczyski Z, Bychowska A, Brzozowski K, et al. Influence of the Chemical Structure and Physicochemical Properties of Chitin- and Chitosan-Based Materials on Their Biomedical Activity. *Biomedical Engineering, Trends in Materials*

Science 2011. <https://doi.org/10.5772/13481>.

- [84] Pillai CKS, Paul W, Sharma CP. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science (Oxford)* 2009;34:641–78. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.04.001>.
- [85] Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology* 2010;144:51–63. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012>.
- [86] Xing Y, Xu Q, Li X, Chen C, Ma L, Li S, et al. Chitosan-Based Coating with Antimicrobial Agents: Preparation, Property, Mechanism, and Application Effectiveness on Fruits and Vegetables. *International Journal of Polymer Science* 2016;2016:1–24. <https://doi.org/10.1155/2016/4851730>.
- [87] Reddy N, Reddy R, Jiang Q. Crosslinking biopolymers for biomedical applications. *Trends in Biotechnology* 2015;33:362–9. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.03.008>.
- [88] Suyatma NE, Tighzert L, Copinet A, Coma V. Effects of hydrophilic plasticizers on mechanical, thermal, and surface properties of chitosan films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005;53:3950–7. <https://doi.org/10.1021/jf048790+>.
- [89] Nasreen Z, Khan MA, Mustafa AI. Improved Biodegradable Radiation Cured Polymeric Film Prepared from Chitosan-Gelatin Blend. *Journal of Applied Chemistry* 2016;2016:1–11. <https://doi.org/10.1155/2016/5373670>.
- [90] Khaled F. El-tahlawy, Magda A. El-bendary, Adel G. Elhendawy SMH. The antimicrobial activity of cotton fabrics treated with different crosslinking agents and chitosan. *Carbohydrate Polymers* 2005;60:421–30. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.02.019>.
- [91] Hernández-Lauzardo AN, Bautista-Baños S, Velázquez-del Valle MG, Méndez-Montealvo MG, Sánchez-Rivera MM, Bello-Pérez LA. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Carbohydrate Polymers* 2008;73:541–7. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.12.020>.
- [92] Chung YC, Su YP, Chen CC, Jia G, Wang HL, Wu JCG, et al. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacologica Sinica* 2004;25:932–6.
- [93] TSAI G-J, SU W-H. Antibacterial Activity of Shrimp Chitosan against *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection* 1999;62:239–43. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.3.239>.
- [94] Bayer ME, Sloyer JL. The electrophoretic mobility of Gram-negative and Gram-positive bacteria: an electrokinetic analysis. *Journal of General Microbiology* 1990;136:867–74. <https://doi.org/10.1099/00221287-136-5-867>.
- [95] Foox M, Zilberman M. Drug delivery from gelatin-based systems. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2015;12:1547–63. <https://doi.org/10.1517/17425247.2015.1037272>.
- [96] Poppe J. Gelatin. In: Imeson A, editor. *Thickening and Gelling Agents for Food*, Boston, MA: Springer US; 1992, p. 98–123. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3552-2>.
- [97] Wang X, Ao Q, Tian X, Fan J, Tong H, Hou W, et al. Gelatin-based hydrogels for organ 3D bioprinting. *Polymers* 2017;9. <https://doi.org/10.3390/polym9090401>.

-
- [98] Jacob J, Gopi S. Isolation and physicochemical characterization of biopolymers. Elsevier Inc.; 2021. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819240-5.00003-1>.
- [99] Pereda M, Ponce AG, Marcovich NE, Ruseckaite RA, Martucci JF. Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids* 2011;25:1372–81. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.01.001>.
- [100] Roy S, Rhim J-W. Fabrication of bioactive binary composite film based on gelatin/chitosan incorporated with cinnamon essential oil and rutin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2021;204:111830. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111830>.
- [101] Samimi Gharaie S, Habibi S, Nazockdast H. Fabrication and characterization of chitosan/gelatin/thermoplastic polyurethane blend nanofibers. *Journal of Textiles and Fibrous Materials* 2018;1:251522111876932. <https://doi.org/10.1177/2515221118769324>.
- [102] Kulkarni AS, Sajjan AM, Khan TMY, Badruddin IA, Kamangar S, Banapurmath NR, et al. Development and Characterization of Biocompatible Membranes from Natural Chitosan and Gelatin for Pervaporative Separation of Water–Isopropanol Mixture. *Polymers* 2021;13:2868. <https://doi.org/10.3390/polym13172868>.
- [103] Gómez-Estaca J, López de Lacey A, López-Caballero ME, Gómez-Guillén MC, Montero P. Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology* 2010;27:889–96. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.012>.
- [104] Zhang H, Liang Y, Li X, Kang H. Effect of chitosan-gelatin coating containing nano-encapsulated tarragon essential oil on the preservation of pork slices. *Meat Science* 2020;166:108137. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108137>.
- [105] Amjadi S, Emaminia S, Heyat Davudian S, Pourmohammad S, Hamishehkar H, Roufegarinejad L. Preparation and characterization of gelatin-based nanocomposite containing chitosan nanofiber and ZnO nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* 2019;216:376–84. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.03.062>.
- [106] Liu Z, Lv M, Li F, Zeng M. Development, Characterization, and Antimicrobial Activity of Gelatin/Chitosan/ZnO Nanoparticle Composite Films. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 2016;25:1056–63. <https://doi.org/10.1080/10498850.2014.923081>.
- [107] Ahmad M Bin, Lim JJ, Shameli K, Ibrahim NA, Tay MY. Synthesis of silver nanoparticles in chitosan, gelatin and chitosan/gelatin bionanocomposites by a chemical reducing agent and their characterization. *Molecules* 2011;16:7237–48. <https://doi.org/10.3390/molecules16097237>.
- [108] Ediyilyam S, George B, Shankar SS, Dennise TT, Waclawek S, Cerník M, et al. Chitosan/gelatin/silver nanoparticles composites films for biodegradable food packaging applications. *Polymers* 2021;13. <https://doi.org/10.3390/polym13111680>.
- [109] Kumar S, Shukla A, Baul PP, Mitra A, Halder D. Biodegradable hybrid nanocomposites of chitosan/gelatin and silver nanoparticles for active food packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life* 2018;16:178–84. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.03.008>.
- [110] Nie L, Wu Q, Long H, Hu K, Li P, Wang C, et al. Development of chitosan/gelatin hydrogels incorporation of biphasic calcium phosphate nanoparticles for bone tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 2019;30:1636–57.

<https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1654210>.

- [111] Flutto L. PECTIN | Properties and Determination. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, Elsevier; 2003, p. 4440–9. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00901-9>.
- [112] Gałkowska D, Długosz M, Juszczak L, Takamine K, Abe J, Shimono K, et al. Chemistry of Pectin and Its Pharmaceutical Uses : A Review. *Silpakorn University Open Journal Systems* 2003;3:206–28.
- [113] Leclere L, Cutsem P Van, Michiels C. Anti-cancer activities of pH- or heat-modified pectin. *Frontiers in Pharmacology* 2013;4 OCT:1–8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00128>.
- [114] Fraeye I, Duvetter T, Doungla E, Van Loey A, Hendrickx M. Fine-tuning the properties of pectin-calcium gels by control of pectin fine structure, gel composition and environmental conditions. *Trends in Food Science and Technology* 2010;21:219–28. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.02.001>.
- [115] Mishra RK, Majeed ABA, Banthia AK. Development and characterization of pectin/gelatin hydrogel membranes for wound dressing. *International Journal of Plastics Technology* 2011;15:82–95. <https://doi.org/10.1007/s12588-011-9016-y>.
- [116] Saravanan M, Rao KP. Pectin-gelatin and alginate-gelatin complex coacervation for controlled drug delivery: Influence of anionic polysaccharides and drugs being encapsulated on physicochemical properties of microcapsules. *Carbohydrate Polymers* 2010;80:808–16. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.12.036>.
- [117] Devi N, Deka C, Nath P, Kakati DK. Encapsulation of theophylline in gelatin a–pectin complex coacervates. vol. 1052. Springer Singapore; 2018. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7572-8_6.
- [118] McMullen JN, Newton DW, Becker CH. Pectin-Gelatin Complex Coacervates 2000;71.
- [119] Liu LS, Tunick M, Fishman ML, Hicks KB, Cooke PH, Coffin DR. Pectin-based networks for non-food applications. *ACS Symposium Series*, vol. 935, 2006, p. 272–83. <https://doi.org/10.1021/bk-2006-0935.ch019>.
- [120] Liu LS, Liu CK, Fishman ML, Hicks KB. Composite films from pectin and fish skin gelatin or soybean flour protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007;55:2349–55. <https://doi.org/10.1021/jf062612u>.
- [121] Aitboulahsen M, Chairi H, Laglaoui A, Zantar S, Abdelhay A, Bakkali M, et al. Gelatin/pectin-based film incorporated with essential oils: Functional characteristics and shelf life extension of tilapia fillets under refrigeration. *Journal of Food Safety* 2020;40. <https://doi.org/10.1111/jfs.12774>.
- [122] Vieira MGA, Da Silva MA, Dos Santos LO, Beppu MM. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *European Polymer Journal* 2011;47:254–63. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.12.011>.
- [123] Arfat YA. Plasticizers for Biopolymer Films. *Glass Transition and Phase Transitions in Food and Biological Materials*, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2017, p. 159–82. <https://doi.org/10.1002/9781118935682.ch6>.
- [124] Bocqué M, Voirin C, Lapinte V, Caillol S, Robin JJ. Petro-based and bio-based plasticizers: Chemical structures to plasticizing properties. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer*

Chemistry 2016;54:11–33. <https://doi.org/10.1002/pola.27917>.

- [125] Di Gioia L, Guilbert S. Corn protein-based thermoplastic resins: Effect of some polar and amphiphilic plasticizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999;47:1254–61. <https://doi.org/10.1021/jf980976j>.
- [126] Costanza V, Bonanomi L, Moscato G, Wang L, Choi YS, Daraio C. Effect of glycerol on the mechanical and temperature-sensing properties of pectin films. *Applied Physics Letters* 2019;115. <https://doi.org/10.1063/1.5121710>.
- [127] Natrajan D, Srinivasan S, Sundar K, Ravindran A. Formulation of essential oil-loaded chitosan–alginate nanocapsules. *Journal of Food and Drug Analysis* 2015;23:560–8. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.01.001>.
- [128] Perricone M, Arace E, Corbo MR, Sinigaglia M, Bevilacqua A. Bioactivity of essential oils: A review on their interaction with food components. *Frontiers in Microbiology* 2015;6:1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00076>.
- [129] Bilia AR, Guccione C, Isacchi B, Righeschi C, Firenzuoli F, Bergonzi MC. Essential oils loaded in nanosystems: A developing strategy for a successful therapeutic approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014;2014. <https://doi.org/10.1155/2014/651593>.
- [130] Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 2008;46:446–75. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>.
- [131] Turek C, Stintzing FC. Stability of Essential Oils: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2013;12:40–53. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12006>.
- [132] Regnault-Roger C, Vincent C, Arnason JT. Essential oils in insect control: Low-risk products in a high-stakes world. *Annual Review of Entomology* 2012;57:405–24. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120710-100554>.
- [133] Stoleru E, Brebu M. Stabilization techniques of essential oils by incorporation into biodegradable polymeric materials for food packaging. *Molecules* 2021;26. <https://doi.org/10.3390/molecules26206307>.
- [134] Lawal OA, Ogundajo AL, Avoseh NO, Ogunwande IA. *Cymbopogon citratus*. Elsevier Inc.; 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6.00018-2>.
- [135] Ganjewala D. *Cymbopogon* essential oils: Chemical compositions and bioactivities. *International Journal of Essential Oil Therapeutics* 2009;3:56–65.
- [136] Mogoşanu GD, Grumezescu AM, Bejenaru C, Bejenaru LE. Natural products used for food preservation. 2017. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804303-5.00011-0>.
- [137] Haque ANMA, Remadevi R, Naebe M. Lemongrass (*Cymbopogon*): a review on its structure, properties, applications and recent developments. *Cellulose* 2018;25:5455–77. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-1965-2>.
- [138] Ekpenyong CE, Akpan E, Nyoh A. Ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf extracts. *Chinese Journal of Natural Medicines* 2015;13:321–37. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(15\)30023-6](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(15)30023-6).

-
- [139] Sun X, Wang J, Zhang H, Dong M, Li L, Jia P, et al. Development of functional gelatin-based composite films incorporating oil-in-water lavender essential oil nano-emulsions: Effects on physicochemical properties and cherry tomatoes preservation. *Lwt* 2021;142:110987. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110987>.
- [140] Jovanović J, Ćirković J, Radojković A, Mutavdžić D, Tanasijević G, Joksimović K, et al. Chitosan and pectin-based films and coatings with active components for application in antimicrobial food packaging. *Progress in Organic Coatings* 2021;158:106349. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2021.106349>.
- [141] Li J, Ye F, Lei L, Zhao G. Combined effects of octenylsuccination and oregano essential oil on sweet potato starch films with an emphasis on water resistance. *International Journal of Biological Macromolecules* 2018;115:547–53. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.093>.
- [142] Xu T, Gao CC, Feng X, Wu D, Meng L, Cheng W, et al. Characterization of chitosan based polyelectrolyte films incorporated with OSA-modified gum arabic-stabilized cinnamon essential oil emulsions. *International Journal of Biological Macromolecules* 2020;150:362–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.108>.
- [143] Mahcene Z, Khelil A, Hasni S, Akman PK, Bozkurt F, Birech K, et al. Development and characterization of sodium alginate based active edible films incorporated with essential oils of some medicinal plants. *International Journal of Biological Macromolecules* 2020;145:124–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.093>.
- [144] Sogut E. Active whey protein isolate films including bergamot oil emulsion stabilized by nanocellulose. *Food Packaging and Shelf Life* 2020;23:100430. <https://doi.org/10.1016/j.foodpsl.2019.100430>.
- [145] Xu Y, Chu Y, Feng X, Gao C, Wu D, Cheng W, et al. Effects of zein stabilized clove essential oil Pickering emulsion on the structure and properties of chitosan-based edible films. *International Journal of Biological Macromolecules* 2020;156:111–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.027>.
- [146] Almasi H, Azizi S, Amjadi S. Development and characterization of pectin films activated by nanoemulsion and Pickering emulsion stabilized marjoram (*Origanum majorana* L.) essential oil. *Food Hydrocolloids* 2020;99:105338. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105338>.
- [147] Mohammadi M, Mirabzadeh S, Shahvalizadeh R, Hamishehkar H. Development of novel active packaging films based on whey protein isolate incorporated with chitosan nanofiber and nano-formulated cinnamon oil. *International Journal of Biological Macromolecules* 2020;149:11–20. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.083>.
- [148] Costa C, Conte A, Alessandro M, Nobile D. *Use of Metal Nanoparticles for Active Packaging Applications*. Elsevier Inc.; 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800723-5.00031-0>.
- [149] Gold K, Slay B, Knackstedt M, Gaharwar AK. Antimicrobial Activity of Metal and Metal-Oxide Based Nanoparticles. *Advanced Therapeutics* 2018;1:1–15. <https://doi.org/10.1002/adtp.201700033>.
- [150] Nathan C, Cunningham-Bussel A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nature Reviews Immunology* 2013;13:349–61. <https://doi.org/10.1038/nri3423>.

-
- [151] Pagno CH, Costa TMH, De Menezes EW, Benvenuti E V., Hertz PF, Matte CR, et al. Development of active biofilms of quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) starch containing gold nanoparticles and evaluation of antimicrobial activity. *Food Chemistry* 2015;173:755–62. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.068>.
- [152] Cárdenas G, Díaz V. J, Meléndrez MF, Cruzat C. C, García Cancino A. Colloidal Cu nanoparticles/chitosan composite film obtained by microwave heating for food package applications. *Polymer Bulletin* 2009;62:511–24. <https://doi.org/10.1007/s00289-008-0031-x>.
- [153] Chaudhary P, Fatima F, Kumar A. Relevance of Nanomaterials in Food Packaging and its Advanced Future Prospects. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials* 2020;30:5180–92. <https://doi.org/10.1007/s10904-020-01674-8>.
- [154] Chawengkijwanich C, Hayata Y. Development of TiO₂ powder-coated food packaging film and its ability to inactivate *Escherichia coli* in vitro and in actual tests. *International Journal of Food Microbiology* 2008;123:288–92. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.017>.
- [155] Palza H. Antimicrobial Polymers with Metal Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences* 2015;16:2099–116. <https://doi.org/10.3390/ijms16012099>.
- [156] Qin Y, Liu Y, Yuan L, Yong H, Liu J. Preparation and characterization of antioxidant, antimicrobial and pH-sensitive films based on chitosan, silver nanoparticles and purple corn extract. *Food Hydrocolloids* 2019;96:102–11. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.05.017>.
- [157] Yu Z, Wang W, Kong F, Lin M, Mustapha A. Cellulose nanofibril/silver nanoparticle composite as an active food packaging system and its toxicity to human colon cells. *International Journal of Biological Macromolecules* 2019;129:887–94. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.084>.
- [158] Arfat YA, Ahmed J, Jacob H. Preparation and characterization of agar-based nanocomposite films reinforced with bimetallic (Ag-Cu) alloy nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* 2017;155:382–90. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.08.097>.
- [159] Arfat YA, Ahmed J, Hiremath N, Auras R, Joseph A. Thermo-mechanical, rheological, structural and antimicrobial properties of bionanocomposite films based on fish skin gelatin and silver-copper nanoparticles. *Food Hydrocolloids* 2017;62:191–202. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.009>.
- [160] Shankar S, Wang L-F, Rhim J-W. Preparation and properties of carbohydrate-based composite films incorporated with CuO nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* 2017;169:264–71. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.025>.
- [161] Amjadi S, Almasi H, Ghorbani M, Ramazani S. Preparation and characterization of TiO₂NPs and betanin loaded zein/sodium alginate nanofibers. *Food Packaging and Shelf Life* 2020;24:100504. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100504>.
- [162] Alizadeh Sani M, Ehsani A, Hashemi M. Whey protein isolate/cellulose nanofibre/TiO₂ nanoparticle/rosemary essential oil nanocomposite film: Its effect on microbial and sensory quality of lamb meat and growth of common foodborne pathogenic bacteria during refrigeration. *International Journal of Food Microbiology* 2017;251:8–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.018>.
- [163] Jamróz E, Kopel P, Juszczak L, Kawecka A, Bytesnikova Z, Milosavljevic V, et al. Development of furcellaran-gelatin films with Se-AgNPs as an active packaging system for

extension of mini kiwi shelf life. *Food Packaging and Shelf Life* 2019;21:100339.
<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100339>.

- [164] Bi F, Zhang X, Liu J, Yong H, Gao L, Liu J. Development of antioxidant and antimicrobial packaging films based on chitosan, D- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate and silicon dioxide nanoparticles. *Food Packaging and Shelf Life* 2020;24:100503.
<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100503>.
- [165] Liu Y, Li Y, Deng L, Zou L, Feng F, Zhang H. Hydrophobic Ethylcellulose/Gelatin Nanofibers Containing Zinc Oxide Nanoparticles for Antimicrobial Packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2018;66:9498–506.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03267>.
- [166] Vizzini P, Beltrame E, Zanet V, Vidic J, Manzano M. Development and Evaluation of qPCR Detection Method and Zn-MgO/Alginate Active Packaging for Controlling *Listeria monocytogenes* Contamination in Cold-Smoked Salmon. *Foods* 2020;9:1353.
<https://doi.org/10.3390/foods9101353>.
- [167] Xing Y, Li W, Wang Q, Li X, Xu Q, Guo X, et al. Antimicrobial nanoparticles incorporated in edible coatings and films for the preservation of fruits and vegetables. *Molecules* 2019;24.
<https://doi.org/10.3390/molecules24091695>.
- [168] Bourtoom T. Edible films and coatings: Characteristics and properties. *International Food Research Journal* 2008;15:237–48.
- [169] De Azeredo HMC, Rosa MF, De Sá M, Souza Filho M, Waldron KW. The use of biomass for packaging films and coatings. *Advances in Biorefineries*, Elsevier; 2014, p. 819–74.
<https://doi.org/10.1533/9780857097385.2.819>.
- [170] Ruban S. Biobased Packaging - Application in Meat Industry. *Veterinary World* 2009;2:79.
<https://doi.org/10.5455/vetworld.2009.79-82>.
- [171] Conte A, Angiolillo L, Mastromatteo M, Del Nobile MA. Technological Options of Packaging to Control Food Quality. *Food Industry*, vol. 32, InTech; 2013, p. 137–44.
<https://doi.org/10.5772/53151>.
- [172] Agriopoulou S, Stamatelopoulou E, Skiada V, Tsarouhas P, Varzakas T. Emerging Nanomaterial Applications for Food Packaging and Preservation: Safety Issues and Risk Assessment. *Proceedings* 2020;70:7. https://doi.org/10.3390/foods_2020-07747.
- [173] Yildirim S, Röcker B, Pettersen MK, Nilsen-Nygaard J, Ayhan Z, Rutkaite R, et al. Active Packaging Applications for Food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2018;17:165–99. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12322>.
- [174] Otoni CG, Espitia PJP, Avena-Bustillos RJ, McHugh TH. Trends in antimicrobial food packaging systems: Emitting sachets and absorbent pads. *Food Research International* 2016;83:60–73. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.02.018>.
- [175] Mehlhorn H. Food-Borne Disease Burden Epidemiology Reference Group. *Encyclopedia of Parasitology* 2015:1–1. https://doi.org/10.1007/978-3-642-27769-6_3884-1.
- [176] FDA: Code Fed. Regul. (CFR). Title 21 Food Drugs. Chapter I – Food Drug Adm. Dep. Heal. Hum. Serv. Subchapter B – Food Hum. Consum. (Continued), Part 182–Subst. Gen. Recognized as Safe (GRAS). 2016: [no volume]. n.d.

-
- [177] Maes, Bouquillon, Fauconnier. Encapsulation of Essential Oils for the Development of Biosourced Pesticides with Controlled Release: A Review. *Molecules* 2019;24:2539. <https://doi.org/10.3390/molecules24142539>.
- [178] Feng J, Chen Q, Wu X, Jafari SM, McClements DJ. Formulation of oil-in-water emulsions for pesticide applications: impact of surfactant type and concentration on physical stability. *Environmental Science and Pollution Research* 2018;25:21742–51. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2183-z>.
- [179] Palermo D, Giunti G, Laudani F, Palmeri V, Campolo O. Essential oil-based nano-biopesticides: Formulation and bioactivity against the confused flour beetle *tribolium confusum*. *Sustainability (Switzerland)* 2021;13. <https://doi.org/10.3390/su13179746>.
- [180] Adak T, Barik N, Patil NB, Govindharaj GPP, Gadratagi BG, Annamalai M, et al. Nanoemulsion of eucalyptus oil: An alternative to synthetic pesticides against two major storage insects (*Sitophilus oryzae* (L.) and *Tribolium castaneum* (Herbst)) of rice. *Industrial Crops and Products* 2020;143:111849. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111849>.
- [181] Tia VE, Gueu S, Cisse M, Tuo Y, Gnago AJ, Konan E. Bio-insecticidal effects of essential oil nano-emulsion of *Lippia multiflora* Mold. On major cabbage pests. *Journal of Plant Protection Research* 2021;61:103–9. <https://doi.org/10.24425/jppr.2021.136270>.
- [182] Branković Z, Ćirković J, Radojković A, Branković G, Jovanović J, Krnjajić S, et al. WO2020055277 - Biopolymer emulsion for active packaging, uses and method of manufacturing 2020.
- [183] Pereda M, Ponce AG, Marcovich NE, Ruseckaite RA, Martucci JF. Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids* 2011;25:1372–81. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.01.001>.
- [184] Abdollahi M, Rezaei M, Farzi G. A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. *Journal of Food Engineering* 2012;111:343–50. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.02.012>.
- [185] Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2001;48:5–16.
- [186] Aryal S, Jung C. A potential threat to tomato, a congener crop to potato from invaded potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller). *Journal of Asia-Pacific Entomology* 2019;22:77–82. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2018.12.008>.
- [187] Ben Jemâa JM, Haouel S, Bouaziz M, Khouja ML. Seasonal variations in chemical composition and fumigant activity of five Eucalyptus essential oils against three moth pests of stored dates in Tunisia. *Journal of Stored Products Research* 2012;48:61–7. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2011.10.001>.
- [188] Negahban M, Moharramipour S, Sefidkon F. Fumigant toxicity of essential oil from *Artemisia sieberi* Besser against three stored-product insects. *Journal of Stored Products Research* 2007;43:123–8. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2006.02.002>.
- [189] Maswal M, Dar AA. Inhibition of citral degradation in an acidic aqueous environment by polyoxyethylene alkylether surfactants. *Food Chemistry* 2013;138:2356–64. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.12.031>.
- [190] Ocak B. Complex coacervation of collagen hydrolysate extracted from leather solid wastes

and chitosan for controlled release of lavender oil. *Journal of Environmental Management* 2012;100:22–8. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.01.026>.

- [191] Saddiq AA, Khayyat SA. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2010;98:89–93. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.05.004>.
- [192] Choi SJ, Decker EA, Henson L, Popplewell LM, McClements DJ. Inhibition of citral degradation in model beverage emulsions using micelles and reverse micelles. *Food Chemistry* 2010;122:111–6. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.025>.
- [193] Lu WC, Huang DW, Wang CCR, Yeh CH, Tsai JC, Huang YT, et al. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. *Journal of Food and Drug Analysis* 2018;26:82–9. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.12.018>.
- [194] Shah G, Shri R, Panchal V, Sharma N, Singh B, Mann AS. Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass). *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research* 2011;2:3–8. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.79796>.
- [195] Djordjevic D, Cercaci L, Alamed J, McClements DJ, Decker EA. Stability of citral in protein- and gum arabic-stabilized oil-in-water emulsions. *Food Chemistry* 2008;106:698–705. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.033>.
- [196] Yang X, Tian H, Ho C-T, Huang Q. Stability of Citral in Emulsions Coated with Cationic Biopolymer Layers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2012;60:402–9. <https://doi.org/10.1021/jf203847b>.
- [197] Yang X, Tian H, Ho C-T, Huang Q. Inhibition of Citral Degradation by Oil-in-Water Nanoemulsions Combined with Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2011;59:6113–9. <https://doi.org/10.1021/jf2012375>.
- [198] Kumar N, Mandal A. Oil-in-water nanoemulsion stabilized by polymeric surfactant: Characterization and properties evaluation for enhanced oil recovery. *European Polymer Journal* 2018;109:265–76. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.09.058>.
- [199] Campelo PH, Junqueira LA, Resende JV de, Zacarias RD, Fernandes RV de B, Botrel DA, et al. Stability of lime essential oil emulsion prepared using biopolymers and ultrasound treatment. *International Journal of Food Properties* 2017;20:S564–79. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1303707>.
- [200] Mendes JF, Norcino LB, Martins HHA, Manrich A, Otoni CG, Carvalho EEN, et al. Correlating emulsion characteristics with the properties of active starch films loaded with lemongrass essential oil. *Food Hydrocolloids* 2020;100:105428. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105428>.
- [201] Bonilla J, Atarés L, Vargas M, Chiralt A. Physicochemical properties of chitosan-essential oils filmforming dispersions. Effect of homogenization treatments. *Procedia Food Science* 2011;1:44–9. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.008>.
- [202] Sionkowska A. Molecular interactions in collagen and chitosan blends. *Biomaterials* 2004;25:795–801. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00595-7](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00595-7).
- [203] Shanmugam A, Kathiresan K, Nayak L. Preparation, characterization and antibacterial activity of chitosan and phosphorylated chitosan from cuttlebone of *Sepia kobeensis* (Hoyle,

-
- 1885). *Biotechnology Reports* 2016;9:25–30. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.10.007>.
- [204] Anicuta S, Dobre L, Stroescu M, Jipa I. Fourier transform infrared (ftir) spectroscopy for characterization of antimicrobial films containing chitosan. *Analele Universitatii Din Oradea Fascicula: Ecotoxicologie, Zootehnie Si Tehnologii de Industrie Alimentara* 2010:1234–40.
- [205] Fernandes Queiroz M, Melo K, Sabry D, Sasaki G, Rocha H. Does the Use of Chitosan Contribute to Oxalate Kidney Stone Formation? *Marine Drugs* 2014;13:141–58. <https://doi.org/10.3390/md13010141>.
- [206] Liao J, Li Y, Li H, Liu J, Xie Y, Wang J, et al. Preparation, bioactivity and mechanism of nano-hydroxyapatite/sodium alginate/chitosan bone repair material. *Journal of Applied Biomaterials and Functional Materials* 2018;16:28–35. <https://doi.org/10.5301/jabfm.5000372>.
- [207] Caroni JG, de Almeida Mattos AV, Fernandes KR, Balogh DT, Renno ACM, Okura MH, et al. Chitosan-based glycerol-plasticized membranes: bactericidal and fibroblast cellular growth properties. *Polymer Bulletin* 2020. <https://doi.org/10.1007/s00289-020-03310-4>.
- [208] Li WJ, Fan ZG, Wu YY, Jiang ZG, Shi RC. Eco-friendly extraction and physicochemical properties of pectin from jackfruit peel waste with subcritical water. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2019;99:5283–92. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9729>.
- [209] Wang W, Ma X, Xu Y, Cao Y, Jiang Z, Ding T, et al. Ultrasound-assisted heating extraction of pectin from grapefruit peel: Optimization and comparison with the conventional method. *Food Chemistry* 2015;178:106–14. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.080>.
- [210] Aburto J, Moran M, Galano A, Torres-García E. Non-isothermal pyrolysis of pectin: A thermochemical and kinetic approach. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 2015;112:94–104. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2015.02.012>.
- [211] Güzel M, Akpınar Ö. Valorisation of fruit by-products: Production characterization of pectins from fruit peels. *Food and Bioproducts Processing* 2019;115:126–33. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.03.009>.
- [212] Govindaraj D, Rajan M, Hatamleh AA, Munusamy MA. From waste to high-value product: Jackfruit peel derived pectin/apatite bionanocomposites for bone healing applications. *International Journal of Biological Macromolecules* 2018;106:293–301. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.017>.
- [213] Kaya M, Khadem S, Cakmak YS, Mujtaba M, Ilk S, Akyuz L, et al. Antioxidative and antimicrobial edible chitosan films blended with stem, leaf and seed extracts of *Pistacia terebinthus* for active food packaging. *RSC Advances* 2018;8:3941–50. <https://doi.org/10.1039/C7RA12070B>.
- [214] Sakurai K. Glass transition temperature of chitosan and miscibility of chitosan/poly(N-vinyl pyrrolidone) blends. *Polymer* 2000;41:7051–6. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00067-7](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00067-7).
- [215] Souza VGL, Pires JRA, Rodrigues C, Rodrigues PF, Lopes A, Silva RJ, et al. Physical and Morphological Characterization of Chitosan/Montmorillonite Films Incorporated with Ginger Essential Oil. *Coatings* 2019;9:700. <https://doi.org/10.3390/coatings9110700>.
- [216] Liu T, Wang J, Chi F, Tan Z, Liu L. Development and characterization of novel active chitosan films containing fennel and peppermint essential oils. *Coatings* 2020;10:1–10.

<https://doi.org/10.3390/coatings10100936>.

- [217] Martínez-Camacho AP, Cortez-Rocha MO, Ezquerro-Brauer JM, Graciano-Verdugo AZ, Rodríguez-Félix F, Castillo-Ortega MM, et al. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers* 2010;82:305–15. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.069>.
- [218] Gohil RM. Synergistic blends of natural polymers, pectin and sodium alginate. *Journal of Applied Polymer Science* 2011;120:2324–36. <https://doi.org/10.1002/app.33422>.
- [219] Marinello F, La Stora A, Mauriello G, Passeri D. Atomic Force microscopy techniques to investigate activated food packaging materials. *Trends in Food Science and Technology* 2019;87:84–93. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.028>.
- [220] Barish JA, Goddard JM. Topographical and chemical characterization of polymer surfaces modified by physical and chemical processes. *Journal of Applied Polymer Science* 2011;120:2863–71. <https://doi.org/10.1002/app.33310>.
- [221] Pina HDV, Farias AJA De, Barbosa FC, William De Lima Souza J, De Sousa Barros AB, Batista Cardoso MJ, et al. Microbiological and cytotoxic perspectives of active PCL/ZnO film for food packaging. *Materials Research Express* 2020;7. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab7569>.
- [222] Hosseini SF, Rezaei M, Zandi M, Farahmandghavi F. Bio-based composite edible films containing *Origanum vulgare* L. essential oil. *Industrial Crops and Products* 2015;67:403–13. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.062>.
- [223] Atarés L, De Jesús C, Talens P, Chiralt A. Characterization of SPI-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering* 2010;99:384–91. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.03.004>.
- [224] Haghghi H, De Leo R, Bedin E, Pfeifer F, Siesler HW, Pulvirenti A. Comparative analysis of blend and bilayer films based on chitosan and gelatin enriched with LAE (lauroyl arginate ethyl) with antimicrobial activity for food packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life* 2019;19:31–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodpack.2018.11.015>.
- [225] Sothornvit R, Krochta JM. Plasticizers in edible films and coatings. *Innovations in Food Packaging* 2005:403–33. <https://doi.org/10.1016/B978-012311632-1/50055-3>.
- [226] Farris S, Schaich KM, Liu L, Cooke PH, Piergiovanni L, Yam KL. Gelatin–pectin composite films from polyion-complex hydrogels. *Food Hydrocolloids* 2011;25:61–70. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.05.006>.
- [227] QIN C, LI H, XIAO Q, LIU Y, ZHU J, DU Y. Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers* 2006;63:367–74. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.09.023>.
- [228] Dutta PK, Tripathi S, Mehrotra GK, Dutta J. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry* 2009;114:1173–82. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.047>.
- [229] Ponce AG, Roura SI, del Valle CE, Moreira MR. Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: In vitro and in vivo studies. *Postharvest Biology and Technology* 2008;49:294–300. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.02.013>.

-
- [230] De Silva BCJ, Jung W-G, Hossain S, Wimalasena SHMP, Pathirana HNKS, Heo G-J. Antimicrobial property of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against pathogenic bacteria isolated from pet turtles. *Laboratory Animal Research* 2017;33:84. <https://doi.org/10.5625/lar.2017.33.2.84>.
- [231] García Ibarra V, Sendón R, Rodríguez-Bernaldo de Quirós A. Antimicrobial Food Packaging Based on Biodegradable Materials. *Antimicrobial Food Packaging*, Elsevier; 2016, p. 363–84. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800723-5.00029-2>.
- [232] Siracusa V. Packaging Material in the Food Industry. *Antimicrobial Food Packaging*, Elsevier; 2016, p. 95–106. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800723-5.00007-3>.
- [233] Horvitz S. Postharvest Handling of Berries. *Postharvest Handling*, InTech; 2017. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69073>.
- [234] Wang CY. Maintaining postharvest quality of raspberries with natural volatile compounds. *International Journal of Food Science and Technology* 2003;38:869–75. <https://doi.org/10.1046/j.0950-5423.2003.00758.x>.
- [235] Cvijanović D., Ignjatijević S. JVT. Raspberry Trade as a Strategic Export Potential of The Republic of Serbia. *International Conference on Competitiveness of Agro-Food and Environmental Economy Proceedings*, The Bucharest University of Economic Studies 2017:74–85.
- [236] Grčak D, Grčak M, Grčak D, Đekić V, Aksić M, Nikolić K, et al. The raspberry: An analysis of production in the Republic of Serbia from 2006 to 2016. *Acta Agriculturae Serbica* 2019;24:19–25. <https://doi.org/10.5937/AASer1947019G>.
- [237] Bierhals VS, Chiumarelli M, Hubinger MD. Effect of Cassava Starch Coating on Quality and Shelf Life of Fresh-Cut Pineapple (*Ananas Comosus* L. Merrill cv “Pérola”). *Journal of Food Science* 2011;76:62–72. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01951.x>.
- [238] Lee JY, Park HJ, Lee CY, Choi WY. Extending shelf-life of minimally processed apples with edible coatings and antibrowning agents. *LWT - Food Science and Technology* 2003;36:323–9. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(03\)00014-8](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(03)00014-8).
- [239] Azarakhsh N, Osman A, Ghazali HM, Tan CP, Mohd Adzahan N. Effects of Gellan-Based Edible Coating on the Quality of Fresh-Cut Pineapple During Cold Storage. *Food and Bioprocess Technology* 2014;7:2144–51. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1261-6>.
- [240] Valdés A, Ramos M, Beltrán A, Jiménez A, Garrigós MC. State of the art of antimicrobial edible coatings for food packaging applications. *Coatings* 2017;7:1–23. <https://doi.org/10.3390/coatings7040056>.
- [241] Vu KD, Hollingsworth RG, Leroux E, Salmieri S, Lacroix M. Development of edible bioactive coating based on modified chitosan for increasing the shelf life of strawberries. *Food Research International* 2011;44:198–203. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.037>.
- [242] Guerreiro AC, Gago CML, Miguel MGC, Faleiro ML, Antunes MDC. The influence of edible coatings enriched with citral and eugenol on the raspberry storage ability, nutritional and sensory quality. *Food Packaging and Shelf Life* 2016;9:20–8. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2016.05.004>.
- [243] Azarakhsh N, Osman A, Ghazali HM, Tan CP, Mohd Adzahan N. Lemongrass essential oil

incorporated into alginate-based edible coating for shelf-life extension and quality retention of fresh-cut pineapple. *Postharvest Biology and Technology* 2014;88:1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.09.004>.

- [244] Lis Arias M, Coderch L, Martí M, Alonso C, García Carmona O, García Carmona C, et al. Vehiculation of Active Principles as a Way to Create Smart and Biofunctional Textiles. *Materials* 2018;11:2152. <https://doi.org/10.3390/ma11112152>.
- [245] Kroschel J., Sporleder M., Carhuapoma, P. (2016). Potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller 1873). In: Kroschel, J.; Mujica, N.; Carhuapoma, P.; Sporleder M. Potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller 1873). International Potato Center; 2017.
<https://doi.org/10.4160/9789290604761-1>.
- [246] Drago Milošević, Živko Bugarčić, Slobodan Milenković ZB, Jovović Z. INCIDENCE, HARMFULNESS AND CONTROL OF POTATO TUBER MOTH (*Phthorimaea operculella*). “XXI SAVETOVANJE O BIOTEHNOLOGIJI”, Zbornik Radova 2016;21:319–25.
- [247] Chavez R, Schmiediche PE, Jackson MT, Raman K V. The breeding potential of wild potato species resistant to the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller). *Euphytica* 1988;39:123–32. <https://doi.org/10.1007/BF00039864>.
- [248] Vaneva-Gancheva T, Dimitrov Y. Chemical Control of the potato tuber moth *Phthorimaea Operculella* (Zeller) on tobacco. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 2013;19:1003–8.
- [249] Campolo O, Giunti G, Russo A, Palmeri V, Zappalà L. Essential Oils in Stored Product Insect Pest Control. *Journal of Food Quality* 2018;2018:1–18.
<https://doi.org/10.1155/2018/6906105>.
- [250] Stepanycheva E, Petrova M, Chermenskaya T, Pavela R. Fumigant effect of essential oils on mortality and fertility of thrips *Frankliniella occidentalis* Perg. *Environmental Science and Pollution Research* 2019;26:30885–92. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06239-y>.
- [251] Tayoub G, Alorfi M, Ismail H. Fumigant toxicities of essential oils and two monoterpenes against potato tuber moth (*Phthorimaea operculella* Zeller). *Herba Polonica* 2016;62:82–96.
<https://doi.org/10.1515/hepo-2016-0024>.

Biografija autora

Jelena N. Jovanović je rođena 20.08.1988. godine u Kruševcu, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Diplomirala je na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na smeru Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija 2013. godine. Master studije završila je 2014. godine na istom fakultetu, na smeru Hemijsko inženjerstvo. Doktorske akademske studije upisala je 2016. godine na Tehnološko-metalurškom fakultetu, na smeru Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija. Od aprila 2017. godine zaposlena je u Institutu za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu.

Bila je angažovana na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod nazivom „0-3D nanostrukture za primenu u elektronici i obnovljivim izvorima energije: sinteza, karakterizacija i procesiranje“ (III 45007) (2017-2020.). Učestvovala je na projektu Fonda za inovacionu delatnost pod nazivom „Aktivno pakovanje: Biorazgradive prevlake/ filmovi na bazi poljoprivrednih nusproizvoda“ (2018.). Bila je angažovana na bilateralnom projektu sa Republikom Hrvatskom pod nazivom „Mikrostrukturne i mehaničke karakteristike betona sa recikliranim materijalima“ (2019-2021.), kao i na projektu Fonda za inovacionu delatnost pod nazivom „Ispitivanje modifikovanja materijala za plastifikaciju Al-profila za dobijanje fotonaponske prevlake“ (2019-2020.).

U toku svog dosadašnjeg naučno-istraživačkog rada objavila je 1 rad u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti (M21a) i 1 u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21). Koautor je objavljenog patenta na međunarodnom nivou (M93), i na 4 saopštenja štampana u izvodu na naučnim skupovima međunarodnog značaja (M34).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Јелена Јовановић

Број индекса: 4018/2016

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Инкапсулација активних компоненти у пектин и хитозан за примену у активном паковању и биопестицидима

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Јелена Јовановић

Број индекса: 4018/2016

Студијски програм: Биохемијско инжењерство и биотехнологија

Наслов рада: Инкапсулација активних компоненти у пектин и хитозан за примену у активном паковању и биопестицидима

Ментор: проф. др Маја Вукашиновић-Секулић, др Јована Ћирковић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Инкапсулација активних компоненти у пектин и хитозан за примену у активном паковању и биопестицидима

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

ОЦЕНА ИЗВЕШТАЈА О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „**Инкапсулација активних компоненти у пектин и хитозан за примену у активном паковању и биопестицидима**”, аутора **Јелене Н. Јовановић 4018/16**, констатујем да утврђено подударање текста износи 5%. Овај степен подударности последица је општих места, личних имена и назива, дефиниција, устаљених фраза и стручних термина и израза, као што су називи инструмената и техника на српском и енглеском језику. Осим тога, део подударности обухвата и податке и називе/номенклатуру узорака из претходно публикованих резултата докторандових истраживања, која су проистекла из ове докторске дисертације и чине њен саставни део, што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујем да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

У Београду, 26.09.2022. године

Ментор

проф. др Маја Вукашиновић Секулић