

# Kinetika otpuštanja polifenolnih spojeva aronije iz aktivnog biopolimernog materijala

---

Štajhofer, Antonija

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:386876>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#) / [Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-19**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Antonija Štajhofer

**Kinetika otpuštanja polifenolnih spojeva aronije iz aktivnog  
biopolimernog materijala**

Diplomski rad

Osijek, rujan 2023.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek

Zavod za primijenjenu kemiju i ekologiju

Katedra za primijenjenu kemiju, biokemiju i instrumentalne metode

Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski studij: Prehrambeno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Nastavni predmet: Ambalaža i pakiranje hrane

Tema rada je prihvaćena na VIII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2022./2023. održanoj 22. svibnja 2023. godine.

Mentor: prof. dr. sc. Lidija Jakobek Barron

Komentor: doc. dr. sc. Ivana Tomac

### Kinetika otpuštanja polifenolnih spojeva aronije iz aktivnog biopolimernog materijala

Antonija Štajhofer, 0113142278

**Sažetak:** Cilj je bio pripremiti biopolimerni materijal od škroba s dodanim polifenolima aronije te ispitati kinetiku otpuštanja polifenola. Polifenoli su ekstrahirani vodom pomoću ultrazvuka, karakterizirani (visokodjelotvorna tekućinska kromatografija) te adsorbirani na škrob. Materijal je pripremljen od škroba s adsorbiranim polifenolima aronije te od čistog škroba s ekstraktom aronije. U ekstraktu aronije identificirani su antocijanini, fenolne kiseline i flavonoli. Polifenoli aronije su se adsorbirali na škrob, no adsorpcijski kapacitet bio je nizak ( $0,33 \text{ mg g}^{-1}$ ). Polifenoli koji su se nalazili u većem postotku u ekstraktu, adsorbirali su se u većem postotku na škrob ( $r^2 = 0,9967$ ). Materijali od škroba s adsorbiranim polifenolima (5 i 10 % škroba, glicerol 0,5, 1, 2 i 2,5 g) pokazali su nešto veće postotke vode i topljivost u vodi, a količina otpuštenih polifenola bila je niska. Materijali pripremljeni od čistog škroba s ekstraktom aronije (5 i 10 % škroba, glicerol 2,5 i 5 g) pokazali su nešto veće postotke vode i topljivost u vodi no puno bolje otpuštanje polifenola ( $0,645$  do  $2,700 \text{ mg g}^{-1}$ ) (bolja aktivna funkcija). Vrijeme polureakcije ( $t_{1/2}$ ) iznosilo je 30-87 min (prvi red) te 38-130 min (drugi red), a maksimalna količina otpuštenih polifenola  $0,9$ - $2,4 \text{ mg g}^{-1}$  (prvi red),  $1,1$ - $3,1 \text{ mg g}^{-1}$  (drugi red).

**Ključne riječi:** biorazgradiva ambalaža, aktivna ambalaža, *Aronia melanocarpa*

**Rad sadrži:** 41 stranice  
17 slika  
10 tablica  
0 priloga  
27 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:**

- |    |                                                  |               |
|----|--------------------------------------------------|---------------|
| 1. | izv. prof. dr. sc. <i>Dajana Gašo-Sokač</i>      | predsjednik   |
| 2. | prof. dr. sc. Lidija Jakobek Barron              | član-mentor   |
| 3. | doc. dr. sc. <i>Ivana Tomac</i>                  | član          |
| 4. | dr. sc. <i>Petra Matić</i> , znanstveni suradnik | zamjena člana |

**Datum obrane:** 29. rujna 2023.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u** Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek

Faculty of Food Technology Osijek

Department of Applied Chemistry and Ecology

Subdepartment of Applied Chemistry, Biochemistry and Instrumental Methods

Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program: Food Engineering

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Food packaging

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. VIII. held on May 22nd 2023.

Mentor: Lidija Jakobek Barron, PhD, Full Prof.

Comentor: Ivana Tomac PhD, Assistant Professor

### The Release Kinetics of Aronia Phenolic Compounds from Active Biopolymer Material

Antonija Štajhofer, 0113142278

**Summary:** The goal was to prepare a biopolymer material from starch with added aronia polyphenols, and to examine the kinetics of polyphenol release. Polyphenols were extracted with water (ultrasound), characterized (high performance liquid chromatography) and adsorbed onto starch. The material was prepared from starch with adsorbed polyphenols and from pure starch with aronia extract. Anthocyanins, phenolic acids and flavonols were identified in aronia. Aronia polyphenols were adsorbed on starch, but the adsorption capacity was low ( $0.33 \text{ mg g}^{-1}$ ). Polyphenols, which were found in a higher percentage in the extract, were adsorbed in a higher percentage on starch ( $r^2=0.9967$ ). Materials with adsorbed polyphenols onto starch (5 and 10% starch, glycerol 0.5, 1, 2 and 2.5 g) showed higher percentages of water and water solubility, and the amount of released polyphenols was low. Materials prepared from pure starch with aronia extract (5 and 10% starch, glycerol 2.5 and 5 g) showed higher percentages of water and water solubility, but a much better release of polyphenols ( $0.645$  to  $2.700 \text{ mg g}^{-1}$ ) (better active function). The half-life of reaction ( $t_{1/2}$ ) was 30-87 (first-order) and 38-130 min (second-order), and the maximum amount of released polyphenols was  $0.9$ - $2.4 \text{ mg g}^{-1}$  (first order),  $1.1$ - $3.1 \text{ mg g}^{-1}$  (second order).

**Keywords:** biodegradable packaging, active packaging, *Aronia melanocarpa*

**Thesis contains:** 41 pages  
17 figures  
10 tables  
0 supplements  
27 references

**Original in:** hrvatski

#### Defense committee:

- |    |                                                     |              |
|----|-----------------------------------------------------|--------------|
| 1. | <i>Dajana Gašo-Sokač</i> , PhD, Associate Professor | chair person |
| 2. | <i>Lidija Jakobek Barron</i> , PhD, Full Professor  | supervisor   |
| 3. | <i>Ivana Tomac</i> , PhD, Assistant Professor       | member       |
| 4. | <i>Petra Matić</i> , PhD                            | stand-in     |

**Defense date:** September 29, 2023

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

# Sadržaj

<b>1.</b>	<b>Uvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Teorijski dio</b> .....	<b>3</b>
2.1.	Ekološki aspekti ambalaže .....	4
2.2.	Plastične folije od biorazgradivih polimera .....	5
2.3.	Škrob kao biorazgradivi polimer .....	6
2.4.	Aktivna ambalaža .....	7
2.5.	Polifenolni spojevi .....	8
2.6.	Polifenolni spojevi aronije .....	9
2.7.	Polifenolni spojevi kao aktivne komponente u biorazgradivom ambalažnom materijalu .....	10
<b>3.</b>	<b>Eksperimentalni dio</b> .....	<b>11</b>
3.1.	Zadatak.....	12
3.2.	Materijal i metode.....	12
3.2.1.	Aronija .....	13
3.2.2.	Priprema ekstrakta polifenola aronije .....	13
3.2.3.	Adsorpcija polifenola aronije na škrob .....	13
3.2.4.	Analiza polifenola visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom (HPLC) .....	13
3.2.5.	Računanje adsorpcijskog kapaciteta škroba .....	14
3.2.6.	Priprema biopolimernog materijala od škroba s adsorbiranim polifenolima aronije .....	14
3.2.7.	Određivanje debljine materijala, sadržaja vode te topljivosti u vodi .....	14
3.2.8.	Otpuštanje polifenola iz materijala .....	15
3.2.9.	Folin-Ciocalteu metoda za određivanje ukupnih polifenola .....	15
3.2.10.	Priprema materijala s čistim škrobom i ekstraktom aronije .....	16
3.2.11.	Kinetika otpuštanja polifenola .....	16
3.2.12.	Statistička analiza.....	17
<b>4.</b>	<b>Rezultati</b> .....	<b>18</b>
4.1.	Polifenolni spojevi aronije .....	19
4.2.	Adsorpcija polifenolnih spojeva aronije na škrob .....	24
4.3.	Osobine materijala dobivenih od škroba s adsorbiranim polifenolima aronije .....	27
4.4.	Materijal dobiven od čistog škroba s vodenim ekstraktom aronije .....	29
4.5.	Kinetika otpuštanja polifenola.....	31
<b>5.</b>	<b>Rasprava</b> .....	<b>32</b>
5.1.	Identifikacija i kvantifikacija spojeva aronije .....	33
5.2.	Adsorpcija polifenolnih spojeva aronije.....	33
5.3.	Biopolimerni materijal.....	34
<b>6.</b>	<b>Zaključak</b> .....	<b>37</b>
<b>7.</b>	<b>Literatura</b> .....	<b>39</b>

## **1. UVOD**

---

Ambalaža predstavlja proizvod čije su glavne funkcije: zaštita, rukovanje, skladištenje i predstavljanje bilo koje sirovine, poluproizvoda ili gotovog proizvoda krajnjem potrošaču (NN 88/15). Za izradu ambalaže se koriste različiti materijali koji, ovisno o svom podrijetlu, imaju različiti utjecaj na okoliš. Tako se razlikuje ambalaža izrađena od prirodnih materijala (papir, karton, drvo itd.) koja ima neznatan utjecaj na okolinu, te s druge strane polimerna (plastična) ambalaža čija se proizvodnja nastoji smanjiti i/ili zamijeniti ekološki prihvatljivijim materijalima (Hahladakis i sur., 2018).

U novije vrijeme istražuje se biorazgradiva ambalaža koja treba imati manji utjecaj na okolinu. Ovu ambalažu karakterizira brža razgradnja djelovanjem mikroorganizama iz prirode zbog prisutnosti prirodnih polimera u strukturi (Vroman i Tighzert, 2009). Biopolimeri koji se obično koriste za dobivanje biorazgradivog ambalažnog materijala su polisaharidi i proteini. Iako se biorazgradiva ambalaža koristi kao alternativa za plastičnu ambalažu, njena uporaba može biti ograničena zbog slabih mehaničkih svojstava i osjetljivosti na vlagu (Kraśniewska i sur., 2020).

Aktivna ambalaža je također novija vrsta ambalaže i predmet je istraživanja. To je ambalaža koja u svom sastavu ima aktivnu komponentu koja se otpušta u unutrašnjost ambalaže, ili adsorbira nepoželjne tvari, u svrhu produženja trajnosti namirnice. Aktivna ambalaža poboljšava senzorska svojstva i kvalitetu prehrambenog proizvoda bez promjene sastava namirnice (Majid i sur., 2018).

Cilj rada bio je pripremiti biorazgradivi materijal od biopolimera škroba s polifenolima aronije kao aktivnim komponentama te ispitati kinetiku otpuštanja polifenola da bi se dokazala aktivna funkcija materijala.

## **2. TEORIJSKI DIO**

---



### 2.1. Ekološki aspekti ambalaže

Ambalažni materijal, prema Pravilniku o ambalaži i otpadnoj ambalaži (NN 88/15), je svaki materijal koji se koristi u proizvodnji ambalaže. Ambalaža za hranu izrađena je od raznih industrijskih i sintetičkih materijala kao što su: plastika, staklo, metal, papir, karton, drvo, tekstil. Nažalost, većina ambalaže dizajnirana je za jednokratnu upotrebu i ne reciklira se te predstavlja veliki ekološki i globalni problem današnjice (Hahladakis i sur., 2018). Prema američkoj Agenciji za zaštitu okoliša (EPA, 2022), hrana i ambalaža čine gotovo polovicu ukupnog komunalnog krutog otpada.

Prilikom izrade ambalaže i ambalažnih materijala koriste se brojni resursi poput električne energije, vode, nafte, raznih kemikalija itd. Takva proizvodnja dovodi do gomilanja otpada, oštećenja ozonskog omotača, onečišćenja zraka, zagađivanja voda, uništenja i zagađenja prirodnih izvora energije. Zbog navedenih razloga, prilikom proizvodnje ambalaže i ambalažnih materijala, potrebno je voditi računa o utjecaju na prirodu, prirodne resurse, ali i sva bića ekosustava. Prema tome, ekološka funkcija ambalaže podrazumijeva korištenje ambalaže proizvedene od biorazgradivih materijala tzv. „eco friendly“ ambalaže. Takva ambalaža neće imati negativni utjecaj na okoliš, budući da ima sposobnost prirodnog recikliranja. Nešto više ekološki prihvatljivi ambalažni materijali su: papir, karton, drvo te, u manjoj mjeri, staklo i metal. Za razliku od navedenih materijala, polimerna (plastična) ambalaža je nešto manje ekološki prihvatljiva (Muhamedbegović i sur., 2015).

Polimerna ambalaža, iako ekološki problematična, vrlo je zastupljena u prehrambenoj industriji zbog svoje cjenovne prihvatljivosti, izdržljivosti i male mase. Također, plastične mase su lagane za oblikovanje u folije i razne druge oblike, propuštaju svjetlost, i u manjoj mjeri plinove. U svima plastičnim materijalima nalaze se različite kemijske tvari, poznate kao aditivi koji se mogu osloboditi tijekom različitih procesa recikliranja te imati nepovoljan utjecaj na okolinu (Hahladakis i sur., 2018). Plastični materijali sadrže polimere, poput polietilena, polipropilena, polistirena i sl., koje je prije recikliranja potrebno razdvojiti, no to je prilično izazovan i skupocjen proces. Prirodna razgradnja polietilena, ali i drugih polimera na manje čestice, vrlo je spora (može trajati do nekoliko stotina godina) tijekom koje se mogu osloboditi otrovne kemikalije ili drugi toksični elementi u tragovima (Sikora i sur., 2020). Upravo zbog toga potrebno je pronaći alternativne metode proizvodnje ambalaže i zbrinjavanja otpada.

Jedna od mogućnosti je sagorijevanje plastike kako bi se dobila energija iz otpada. Pri tome je bitno koristiti tehnologiju koja će otpuštati minimalne koncentracije ispušnih plinova (Muhamedbegović i sur., 2015).

Važan korak u očuvanju okoliša i smanjenju otpada, bila bi povećana proizvodnja biorazgradive ambalaže i korištenje ekološki prihvatljivih materijala. Također, vrlo je važno osigurati dovoljno velike deponije na lokacijama koje neće onečistiti podzemne vode. Između ostalog, naglasak treba staviti i na edukaciju ljudi o važnosti recikliranja i pravilnog zbrinjavanja otpada koja je ključan korak u zaštiti prirode (Jakobek, 2020).

### **2.2. Plastične folije od biorazgradivih polimera**

Posljednjih godina porastao je interes za biorazgradive polimere, koji se pomoću mikroorganizama iz prirode razgrađuju na jednostavnije spojeve. Koriste se kao zamjena za plastiku čime smanjuju negativan utjecaj na okoliš i ovisnost o nafti (Zhong i sur., 2020). Biorazgradiva plastika nudi mnoge prednosti, kao što su povećana plodnost tla, niska akumulacija plastičnih materijala u okolišu i smanjenje troškova gospodarenja otpadom (Tokiwa i sur., 2009). Biorazgradivost ne ovisi samo o podrijetlu polimera već i o njegovoj kemijskoj strukturi i uvjetima okoliša. Biorazgradivi polimeri mogu se podijeliti u dvije kategorije:

- prirodni polimeri (biopolimeri) dobiveni iz prirodnih, obnovljivih izvora i
- sintetski biorazgradivi polimeri dobiveni iz neobnovljivih izvora (nafta) (Vroman i Tighzert, 2009).

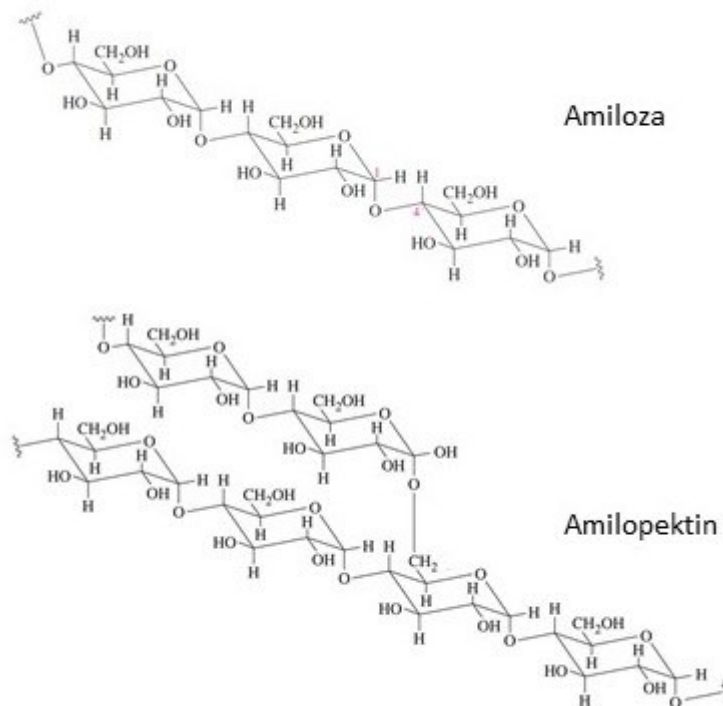
Biorazgradivi polimeri dobiveni iz biomase uključuju polisaharide (škrob, celuloza) i proteine biljnog (zein, gluten) i životinjskog podrijetla (kazein). Važno je spomenuti škrob koji je naišao na široku primjenu u preradi plastike (Sikora i sur., 2020).

Jedan od najznačajnijih primjera polimera sintetiziranih iz obnovljivih izvora je polilaktid (engl. Polylactic acid, PLA). Polilaktid je polimer sastavljen od alfa-hidroksikiselina, koji može biti dobiven različitim metodama, što rezultira spojevima različite molekulske mase i materijalima različitih svojstava. PLA ima veliki potencijal za industrijsku primjenu zbog dobrih mehaničkih svojstava, toplinske otpornosti i biorazgradivosti. Polilaktid se može uspješno preraditi injekcijskim prešanjem, toplinskim oblikovanjem i ekstruzijom, uključujući proizvodnju

plastičnih folija lijevanjem i ekstruzijom (Vroman i Tighertz, 2009). Polikaprolakton (engl. polycaprolacton, PCL) je polimer epsilon-kaprolaktona, termoplastični biorazgradivi poliester dobre toplinske obradivosti, no primjena PCL-a u industriji pakiranja je ograničena zbog slabih mehaničkih svojstava. Miješanjem PCL-a s drugim polimerima povećava se otpornost navedenog materijala (Zhong i sur., 2020). Također, prirodni materijali koji se koriste u pakiranju su i folije na bazi lipida kao što su premazi od masnih kiselina i voska (Wu i sur., 2021).

### 2.3. Škrob kao biorazgradivi polimer

Škrob je polimer prirodnog podrijetla, pripada skupini polisaharida, služi kao pričuva energije u biljkama. Sastoji se od dva međusobno povezana polisaharida,  $\alpha$ -amiloze i amilopektina. Amiloza je linearna molekula, jednostavnije građe od amilopektina, koja  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glikozidnim vezama povezuje molekule  $\alpha$ -D-glukoze. Amilopektin je razgranata molekula koja uz  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glikozidne veze, sadrži i  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-glikozidne veze (**Slika 1**) (Zhong i sur., 2020).



**Slika 1** Kemijska struktura škroba

Mješavine sintetičkih polimera i škroba nude mnogobrojne prednosti budući da je škrob obnovljiv, jeftin i dostupan tijekom cijele godine. Također, lagan je za rukovanje i oblikovanje u folije s niskom propusnošću kisika, no glavni izazov predstavlja njegova hidrofилnost. Kako bi se poboljšala fleksibilnosti i mehanička svojstva škroba, koriste se razni plastifikatori (glicerol, glikol, sorbitol), za stvaranje termoplastičnog škroba primjenom topline i smicanja nad procesima ekstruzije (Zhong i sur., 2020). Škrob može biti u obliku granula, želatinizirani ili kemijski modificiran (Tokiwa i sur., 2009). Može se miješati s alifatskim poliesterima, polivinilnim alkoholom i biopolimerima. Uglavnom se koriste polihidroksialkanoati (engl. Polyhydroxyalkanoate, PHA) te polilaktid (PLA) i polikaprolakton (PCL) dobiveni kemijskom polimerizacijom (Lu i sur., 2009).

### 2.4. Aktivna ambalaža

Tehnologije pakiranja hrane stalno se unaprjeđuju kako bi zadovoljile potrebe modernog društva, kao i trendove industrijske proizvodnje prema svježim, sigurnim, praktičnim i kvalitetnim prehrambenim proizvodima duljeg roka trajanja. Koncepti aktivnih i pametnih tehnologija pakiranja pružaju sve navedene funkcionalnosti i brojna druga inovativna rješenja (Ahmed i sur., 2017). Prema tome, aktivno pakiranje je inovativni koncept u kojem su ambalaža, proizvod i okoliš u interakciji s ciljem produženja roka trajanja, poboljšanja sigurnosti i senzorskih svojstava te kvalitete proizvoda, a da pri tome ne mijenjaju sastav upakirane namirnice (Suppakul i sur., 2003).

Koncept aktivnog pakiranja bazira se na dodavanju određenih komponenti koje se mogu otpustiti ili apsorbirati unutar ili izvan upakiranog proizvoda. Općenito, aktivna ambalaža se dijeli na ambalažu koja sadrži nemigrirajuću komponentu i ambalažu s aktivnim otpuštanjem tvari. Ambalaža koja uključuje nemigrirajuću komponentu, dizajnirana je za uklanjanje neželjenih tvari iz okoliša bez izravnog kontakta s proizvodom. Dok ambalaža s aktivnim otpuštanjem, koristi tvari koje omogućuju kontroliranu migraciju željene tvari da izravno utječe na proizvod (Dirpan i sur., 2023).

Unutar sustava aktivnog pakiranja, ugrađuju se tzv. aktivne komponente, odnosno tvari za uklanjanje kisika, apsorpciju i kontrolu vlage, stvaranje ugljikovog dioksida i etanola te antimikrobnih tvari. Navedene aktivne komponente se pakiraju u vrećice.

---

Prisutnost kisika u zapakiranoj hrani često je ključan faktor koji ograničava rok trajanja prehrambenog proizvoda. Oksidacija može uzrokovati promjene u okusu, boji i mirisu, kao i uništiti hranjive tvari te dovesti do rasta aerobnih bakterija i plijesni. Postojeće tehnologije za uklanjanje kisika temelje se na oksidaciji tvari poput željezovog praha, askorbinske kiseline ili enzima (glukoza oksidaza) (Lourenço i sur., 2019).

Poznato je da ugljikov dioksid suzbija aktivnost mikroba. Međutim, prevelike koncentracije CO<sub>2</sub> mogu uzrokovati organoleptičke promjene u proizvodu. Prema tome, ugradnja tvari koje reguliraju koncentraciju ugljikovog dioksida, poželjna je u proizvodima kao što su svježije meso, riba i sir (Suppakul i sur., 2003).

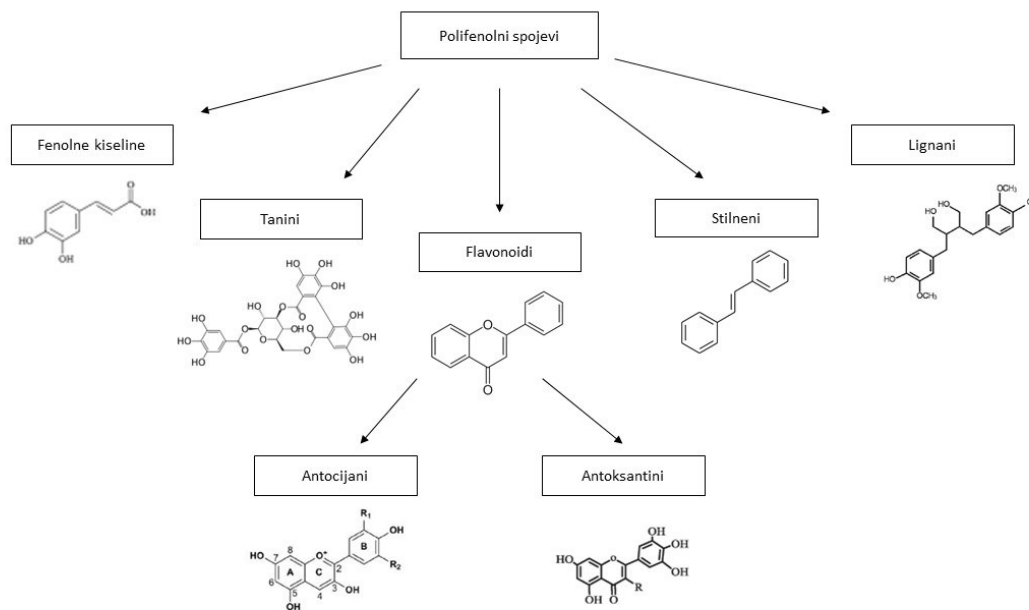
Ugradnjom tvari koje otpuštaju etanol smanjuje se mikrobno kvarenje hrane. Koriste se vrećice koje sadrže inkapsulirani etanol, glukozu, askorbinsku kiselinu, fenolne spojeve i soli željeza, čime se postiže kombinirani učinak uklanjanja kisika i stvaranja etanola u svrhu produljenja trajnosti proizvoda (Salgado i sur., 2021).

Antimikrobne tvari se implementiraju u samu ambalažu u svrhu smanjenja rasta mikroorganizama kako bi se produžio rok trajanja te se održala sigurnost i kvaliteta proizvoda (Suppakul i sur., 2003).

### 2.5. Polifenolni spojevi

Fenolni spojevi, odnosno polifenoli, velika su skupina fitokemikalija koje proizvode biljke kao sekundarne metabolite. Ovi spojevi zauzimaju posebno mjesto među prirodnim proizvodima zbog svoje prisutnosti u širokom spektru hrane, uključujući voće, povrće, bilje, čaj, kavu, čokoladu i vino. Kemijski gledano, fenolni spojevi su skupina aromatskih organskih spojeva koji imaju najmanje jednu hidroksilnu skupinu izravno povezanu s benzenskim prstenom. Imaju potencijalnu važnu ulogu u ljudskom zdravlju, budući da se istražuje njihovo sudjelovanje u prevenciji degenerativnih bolesti, posebice karcinoma, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti (Tsao, 2010). Zbog svojih antioksidativnih i protuupalnih svojstava, polifenoli doprinese obrani od oksidativnog stresa. Međutim, učinci polifenola na zdravlje ovise o konzumiranoj količini i njihovoj bioraspoloživosti (Manach i sur., 2004).

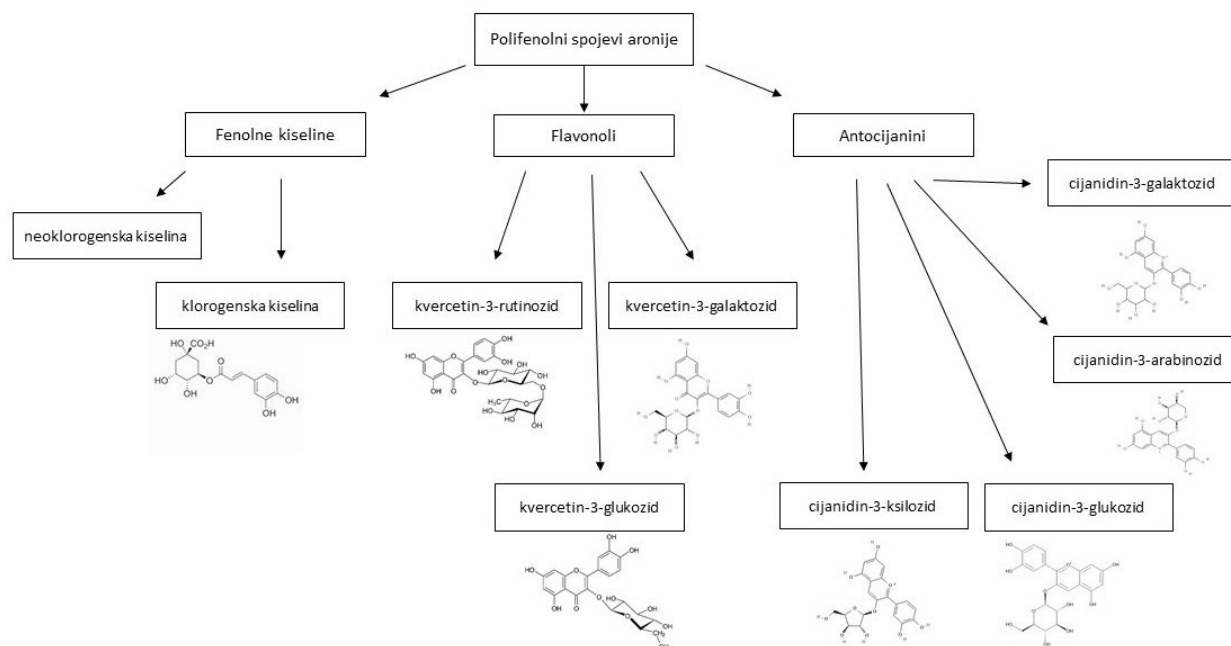
Polifenoli se klasificiraju na fenolne kiseline, stilbene, flavonoide, tanine i lignane (**Slika 2**) (Tijjani i sur., 2020).



**Slika 2** Podjela i kemijska struktura polifenolnih spojeva

## 2.6. Polifenolni spojevi aronije

Aronija (*Aronia melanocarpa*) sadrži visoke koncentracije fenolnih spojeva, posebno antocijanina. Fenoli aronije imaju potencijalni blagotvorni učinak na zdravlje jer imaju potencijal za prevenciju pretilosti, dijabetesa, hipertenzije i hiperkolesterolemije (Jakobek i sur., 2021). Najdominantnije podskupine polifenolnih spojeva sadržanih u aroniji su fenolne kiseline (neoklorogenska i klorogenska kiselina), flavonoli (kvercetin-3-rutinozid, kvercetin-3-galaktozid, kvercetin-3-glukozid) i antocijanini (cijanidin-3-galaktozid, cijanidin-3-glukozid, cijanidin-3-arabinozid, cijanidin-3-ksilozid) (**Slika 3**).



Slika 3 Podjela i kemijska struktura polifenolnih spojeva u aroniji

## 2.7. Polifenolni spojevi kao aktivne komponente u biorazgradivom ambalažnom materijalu

Poznato je da polifenolni spojevi mogu poboljšati svojstva ambalažnog materijala. Uključivanjem flavonoida u ambalažne materijale, povećava se sigurnost i kvaliteta hrane. Ovi spojevi mogu inhibirati rast mikroba. Flavonoidi se sve više upotrebljavaju u aktivnoj ambalaži, kao i u jestivim folijama ili premazima. Međutim, uporaba flavonoida kao aktivnih komponenti vrlo je izazovna zbog procesa ekstrakcije i uvjeta skladištenja. Tanini pokazuju antimikrobna, antifungalna, antioksidacijska i UV apsorpcijska svojstva te su se pokazali vrlo učinkovitim u razvoju aktivnih folija za pakiranje hrane. Filmovi koji sadrže tanine sastavljeni od kitozana i celuloze pokazali su značajno antioksidativno i antibakterijsko djelovanje. Brojne fenolne kiseline korištene su kao vrijedne komponente u aktivnom pakiranju i jestivim filmovima/premazima kako bi se postigla trajna antimikrobna, antioksidacijska i druga funkcionalna svojstva. Upotreba stilbena privlači pozornost zbog potencijalnih bioaktivnih komponenti. Na primjer, pokazalo se da stilben resveratrol posjeduje niz bioaktivnih svojstava, kao što su antioksidativno, protuupalno i antibakterijsko djelovanje (Singh i sur., 2022).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

---



#### 3.1. Zadatak

U ovom radu cilj je bio pripremiti biopolimerni materijal od škroba s polifenolima aronije kao aktivnim komponentama te ispitati kinetiku otpuštanja polifenola. U tu svrhu zadatak je bio:

- ekstrahirati polifenole iz aronije vodom pomoću ultrazvuka,
- analizirati ekstrakt pomoću visokodjelotvorne tekućinske kromatografije da bi se identificirali i kvantificirali polifenolni spojevi u ekstraktu,
- provesti adsorpciju polifenola na škrob,
- odrediti adsorpcijski kapacitet škroba ( $q_e$ ) za pojedine polifenole i polifenolne skupine,
- pripremiti biopolimernu aktivnu foliju na dva načina: od škroba koji ima već adsorbirane polifenole te od čistog škroba i vodenog ekstrakta polifenola,
- ispitati debljinu folije, sadržaj vode, topljivost u vodi,
- ispitati aktivnu funkciju otpuštanjem polifenola u 50 % etanolu te u 75 % etanolu,
- ovisnost količine otpuštenih polifenola o vremenu ( $c_t$  vs  $t$ ) analizirati nelinearnom regresijom jednadžbi prvog i drugog reda.

#### 3.2. Materijal i metode

Za izradu ovog rada korištene su sljedeće kemikalije:

- Orto-fosforna kiselina 85 % (Fluka, Buchs, Švicarska)
- Acetonitril (Fischer Scientific, Loughborough, UK)
- Klorogenska kiselina (Sigma - Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- Kvercetin-3-rutinozid (Sigma - Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- Kvercetin-3-glukozid (Sigma- Aldrich, St.Louis , MO, USA)
- Cijanidin-3-galaktozid klorid ( Extrasynthese, Genay, Francuska )
- Cijandin-3-glukozid klorid (Extrasynthese, Genay, Francuska )
- Kvercetin-3-galaktozid (Extrasynthese, Genay, Francuska)

#### 3.2.1. Aronija

Aronija je ubrana u voćnjaku u Orahovici. Homogenizirana je štapnim mikserom. Uzorak je uskladišten u zamrzivaču na -18 °C jedan dan.

#### 3.2.2. Priprema ekstrakta polifenola aronije

U laboratorijsku čašu odvagano je 35 g homogenizirane aronije te otpipetirano 250 ml destilirane vode. Reakcijska smjesa stavljena je u ultrazvučnu kupelj (Bandelin Sonorex RK 100, Berlin, Njemačka) na 30 min. Nakon ultrazvučne ekstrakcije, ekstrakt je profiltriran kroz filter papir. Ekstrakcija je ponovljena sa svježom, odvaganom količinom aronije 35 g. Dva pripremljena ekstrakta su spojena u konačan ekstrakt (oko 500 ml). Pripremljen ekstrakt upotrijebljen je za adsorpciju polifenola aronije na škrob. Da bi se identificirali i kvantificirali polifenoli aronije u ekstraktu prije adsorpcije na škrob ( $c_0$  (mg l<sup>-1</sup>)), otpipetiran je 1 ml te filtriran kroz PTFE filter (0,2 μm) prije analize na HPLC uređaju.

#### 3.2.3. Adsorpcija polifenola aronije na škrob

U laboratorijsku čašu stavljeno je 100 g škroba, 500 ml ekstrakta aronije, čaša je stavljena na tresilicu (IKA KS 130 Basic, Staufen, Njemačka) 24 h, nakon čega je ekstrakt dekantiran. 1 ml ekstrakta filtriran je kroz PTFE filter (0,2 μm) te analiziran na HPLC uređaju da bi se odredila količina polifenolnih spojeva nakon adsorpcije na škrob ( $c_e$  (mg l<sup>-1</sup>)). Zaostali škrob s adsorbiranim polifenolima je sušen u inkubatoru (IN 30 Memmert, Schwabach, Njemačka) na 50° C do konstantne mase te upotrijebljen za pripravu biopolimernog materijala.

#### 3.2.4. Analiza polifenola visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom (HPLC)

Ekstrakti polifenola aronije prije i nakon adsorpcije na škrob analizirani su na uređaju 1260 Infinity II (Agilent Technology, Santa Clara, Kalifornija, Sjedinjene Američke Države). Uređaj se sastoji od kvarterne pumpe, PDA detektora (engl. photodiodearray detector, PDA) i vialsamplera. Kolona korištena za razdvajanje polifenola bila je Poroshell 120 EC C-18 (unutrašnjeg promjera 4,6 x 100 mm, promjer čestica 2,7 μm koja je zaštićena pretkolonom (Poroshell 120 EC-C18, 4,6 mm) (Agilent technology, Santa Clara, Kalifornija, Sjedinjene Američke Države). Kao mobilne faze upotrijebljene su 0,5 % fosforna kiselina (A) te 100 %-ni

acetonitril (B). Polifenoli su razdvojeni prema gradijentu: 5 % B 0 min, 11 % B 5 min, 15 % B 7,5 min, 17,5 % B 17,5 min, 20 % B 20 min, 30 % B 30 min, 70 % B 32 min, 70 % B 34 min, 5 % B 36 min, 5 % B 38 min. Protok je iznosio  $0,8 \text{ ml min}^{-1}$ , a volumen injektiranja  $10 \mu\text{l}$ . Polifenolni spojevi karakterizirani su na osnovi usporedbe UV/Vis spektara te vremena zadržavanja s onima autentičnih standarda.

#### 3.2.5. Računanje adsorpcijskog kapaciteta škroba

Količina polifenola adsorbiranih na škrob predstavlja adsorpcijski kapacitet ( $q_e$  ( $\text{mg g}^{-1}$ )). Izračunat je pomoću **formule (1)**:

$$q_e = \frac{(c_0 - c_e) \times V_m}{m}$$

gdje je  $c_0$  masena koncentracija polifenola aronije u ekstraktu prije adsorpcije na škrob ( $\text{mg l}^{-1}$ ),  $c_e$  masena koncentracija polifenola aronije u ekstraktu nakon adsorpcije na škrob ( $\text{mg l}^{-1}$ ),  $V_m$  je ukupan volumen reakcijske smjese (l),  $m$  je masa škroba (g) u reakcijskoj smjesi.

#### 3.2.6. Priprema biopolimernog materijala od škroba s adsorbiranim polifenolima aronije

Biopolimerni materijali od škroba pripremljeni su u dva seta eksperimenata. Četiri reakcijske smjese činile su prvi set eksperimenata, a svaka se sastojala od 2,5 g škroba s adsorbiranim polifenolima aronije i 50 ml vode. Reakcijske smjese u laboratorijskoj čaši miješane su na vodenoj kupelji (Grant JB Academy, Shepreth Cambridgeshire, Ujedinjeno Kraljevstvo) na  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  15 min. Nakon 15 minuta, u pojedinu reakcijsku smjesu dodan je plastifikator glicerol u različitoj količini (0,5, 1, 2 i 2,5 glicerola), reakcijske smjese miješane su dodatnih 5 min te nakon toga izlivena u staklenu Petrijevu zdjelicu. U drugom setu eksperimenata, u četiri laboratorijske čaše stavljene su veće količine škroba s adsorbiranim polifenolima aronije (5 g) i 50 ml vode, smjese su miješane na vodenoj kupelji na  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  15 min, nakon čega je u smjesu dodan plastifikator glicerol u različitoj količini (0,5, 1, 2 i 2,5 glicerola). Nakon dodatnog miješanja na vodenoj kupelji (5 min), smjese su izlivena u staklenu Petrijevu zdjelicu. Nakon sušenja na zraku, određena je debljina svih osam folija, sadržaj vode te topljivost u vodi.

#### 3.2.7. Određivanje debljine materijala, sadržaja vode te topljivosti u vodi

Debljina pripremljenih materijala određena je pomoću mjerača debljine (Mini digital thickness gauge). Nakon toga, odrezani su komadi  $1 \times 1 \text{ cm}$  od svakog pripremljenog materijala, izvagani

( $m_0$ ), sušeni na 80 °C 24 h u inkubatoru i ponovo izvagani ( $m_1$ ). Osušeni materijali stavljani su u 2 ml 50 % etanola na 24 h, sušeni u inkubatoru na 80 °C 24 h i izvagani ( $m_2$ ).

Sadržaj vode određen je prema **formuli (2)**:

$$\text{sadržaj vode} = \frac{m_0 - m_1}{m_0} * 100$$

Topljivost u vodi određen je prema **formuli (3)**:

$$\text{toplјivost u vodi} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} * 100$$

#### 3.2.8. Otpuštanje polifenola iz materijala

Otpuštanje polifenola iz materijala u 50 % etanol praćeno je u jednom pripremljenom materijalu, materijalu pripremljenom od 5 g škroba i 2,5 g glicerola. Izrezan je 1 g odabranog materijala na male komadiće, stavljen u plastičnu kivetu i pomiješan s 3 ml 50 % etanola. Kiveta je stavljena na tresilicu, a iz otopine su uzimani alikvoti od 30  $\mu$ l nakon 5, 10, 20, 30, 60, 120, 180, 240 i 300 min. Alikvoti su analizirani Folin-Ciocalteu metodom.

U istom materijalu određena je ukupna količina otpuštenih polifenola u 75 % etanolu. 1 g istog materijala izrezan je na manje komadiće te stavljen u plastičnu kivetu. Na materijal je dodano 3 ml 75 % etanola. Kiveta je stavljena u ultrazvučnu kupelj na 30 minuta. Ekstrakt je odekantiran, a alikvot od 30  $\mu$ l je upotrijebljen za određivanje polifenola Folin-Ciocalteu metodom.

#### 3.2.9. Folin-Ciocalteu metoda za određivanje ukupnih polifenola

U staklene kivete otpipetirano je redoslјedom: 2370  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 30  $\mu$ l uzorka, 150  $\mu$ l Folin-Ciocalteu reagensa te 450  $\mu$ l natrijevog karbonata (200 g l<sup>-1</sup>). Nakon što su se reakcijske smjese inkubirale u inkubatoru na 40 °C 30 min, izmjerena je A na 765 nm na spektrofotometru prema slijepoj probi. Pomoću kalibracijske krivulje galne kiseline, određena je ukupna količina polifenola u ekstraktu (mg l<sup>-1</sup>).

### 3.2.10. Priprema materijala s čistim škrobom i ekstraktom aronije

Ekstrakt aronije pripremljen je na već opisani način. Da bi se pripremili biorazgradivi materijali, u dvije laboratorijske čaše pomiješani su 2,5 g čistog škroba i 50 ml ekstrakta aronije. Reakcijske smjese miješane su na vodenoj kupelji na 100 °C 15 min. Nakon 15 minuta, u dvije reakcijske smjese dodan je plastifikator glicerol u različitoj količini (2,5 i 5 g glicerola). Slijedilo je dodatno miješanje 5 minuta, nakon čega su smjese izliven u staklenu Petrijevu zdjelicu. U dodatne dvije laboratorijske čaše, reakcijske smjese sastojale su se od veće količine čistog škroba (5 g) i 50 ml ekstrakta aronije. Smjese su miješane na vodenoj kupelji (100 °C, 15 min), u svaku je dodan plastifikator u različitoj količini (2,5 i 5 g glicerola). Smjese su miješane još 5 minuta te nakon toga izliven u staklenu Petrijevu zdjelicu. Materijali su sušeni na zraku. Svakom materijalu određena je debljina, sadržaj vode te topljivost u vodi prema prije opisanom postupku. Također je proveden eksperiment otpuštanja polifenola u 50 % etanol tijekom 240 min te ukupnog otpuštanja polifenola u 75 % etanol, prema prije opisanom postupku, u svakom od četiri pripremljena materijala.

### 3.2.11. Kinetika otpuštanja polifenola

Rezultati otpuštanja polifenola iz materijala pripremljenih od čistog škroba s ekstraktom aronije (4 materijala) analizirani su pomoću modificiranih jednadžbi prvog i drugog reda. Jednadžbe su objašnjene i objavljene u radu (Jakobek i sur., 2023).

Jednadžba za prvi red:

$$c_t = (c_0 - c_\infty)e^{-kt} + c_\infty$$

Jednadžba za drugi red:

$$c_t = \frac{c_0 - c_\infty}{1 + |c_0 - c_\infty|kt} + c_\infty$$

Jednadžba vremena polureakcije prvog reda:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k}$$

Jednadžba vremena polureakcije drugog reda:

$$t_{1/2} = \frac{1}{k|c_0 - c_\infty|}$$

gdje je  $c_t$  koncentracija otpuštenih polifenola ( $\text{mg g}^{-1}$ ) u vremenu  $t$ ,  $c_0$  početna koncentracija polifenola ( $\text{mg g}^{-1}$ ) u vremenu  $t=0$ ,  $c_\infty$  koncentracija polifenola ( $\text{mg g}^{-1}$ ) na kraju reakcije,  $k$  konstanta brzine reakcije otpuštanja polifenola,  $t$  vrijeme (min),  $t_{1/2}$  vrijeme polureakcije ili vrijeme u kojem otpuštanje polifenola postiže polovicu svoje vrijednosti (min).

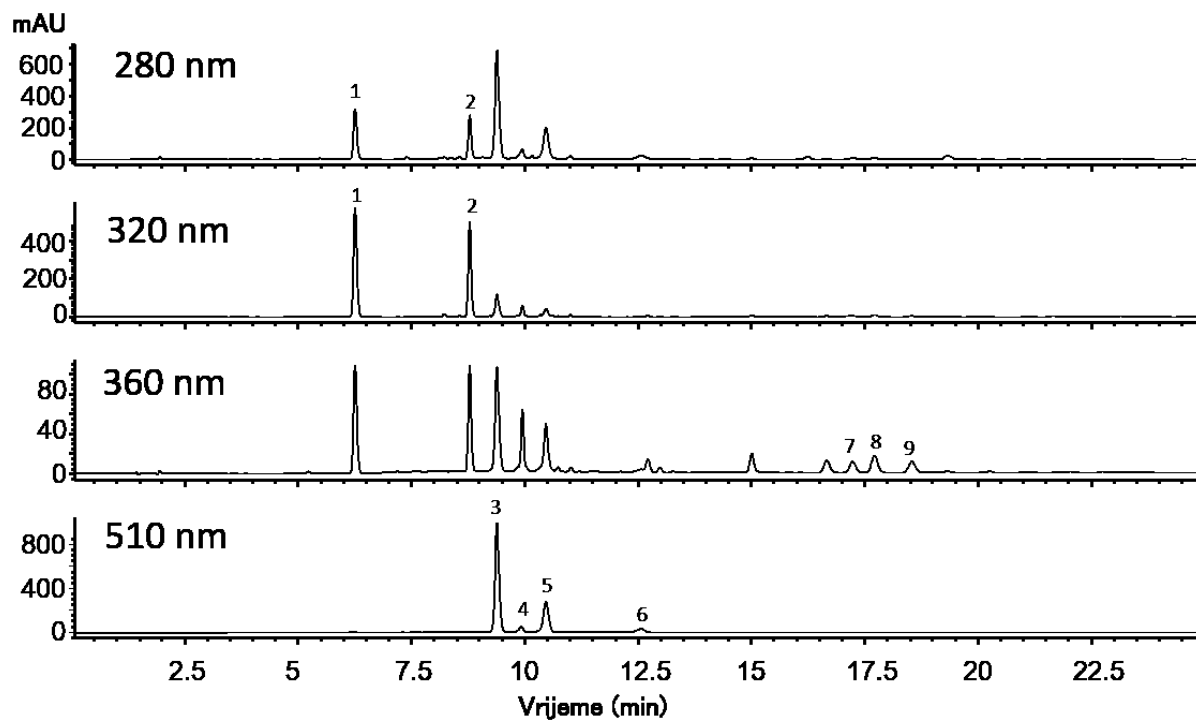
#### 3.2.12. Statistička analiza

Ekstrakt aronije prije i nakon adsorpcije na škrob analiziran je dva puta na HPLC uređaju ( $n=2$ ). Otpuštanje polifenola iz materijala pripremljenog od škroba s adsorbiranim polifenolima i vodom ispitano je u dvije paralele, svaka mjerena dva puta na spektrofotometru ( $n=4$ ). U slučaju ispitivanja otpuštanja polifenola iz materijala pripremljenog od čistog škroba s ekstraktom aronije, otpuštanje polifenola ispitano je jednom, a mjerenje Folin-Ciocalteu metodom izvedeno je dva puta ( $n=2$ ). Svi rezultati prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardno odstupanje. Nelinearna regresija podataka prema jednadžbama prvog i drugog reda izvedena je pomoću alata Solver (MS Office, Excel) (Microsoft Corporation, Redmond, WA, Sjedinjene Američke Države).

## **4. REZULTATI**

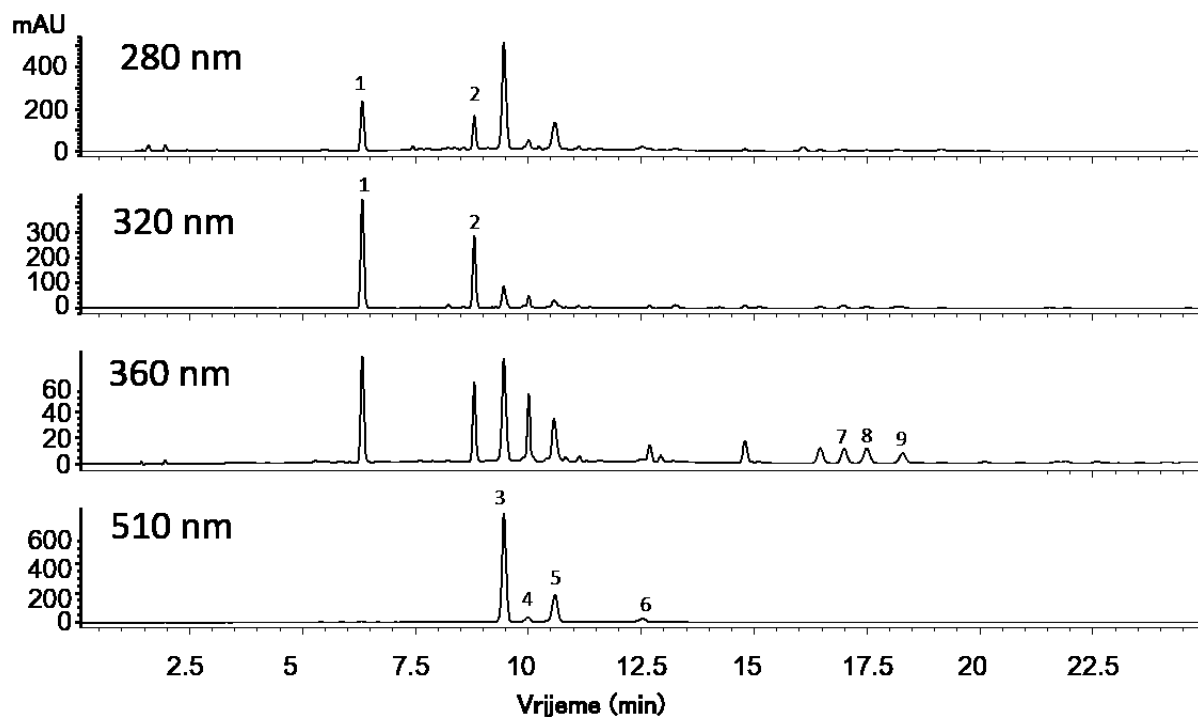
---

## 4.1. Polifenolni spojevi aronije

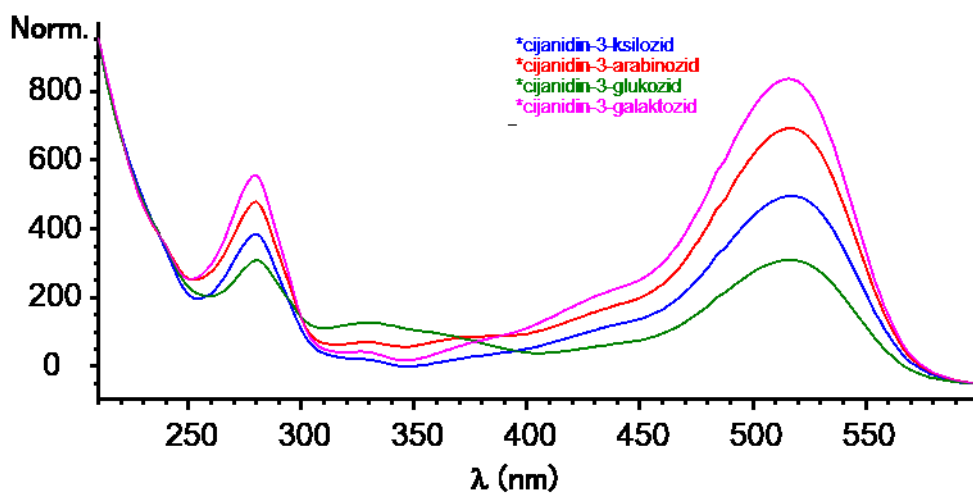


**Slika 4** Kromatogram ekstrakta aronije sniman na 280, 320, 360 i 510 nm s identificiranim spojevima 1\* – neoklorogenska kiselina, 2 – klorogenska kiselina, 3 – cijanidin-3-galaktozid, 4 – cijanidin-3-glukozid, 5\* – cijanidin-3-arabinozid, 6\* – cijanidin-3-ksilozid, 7 – kvercetin-3-rutinozid, 8 – kvercetin-3-galaktozid, 9 – kvercetin-3-glukozid (\* djelomična identifikacija)

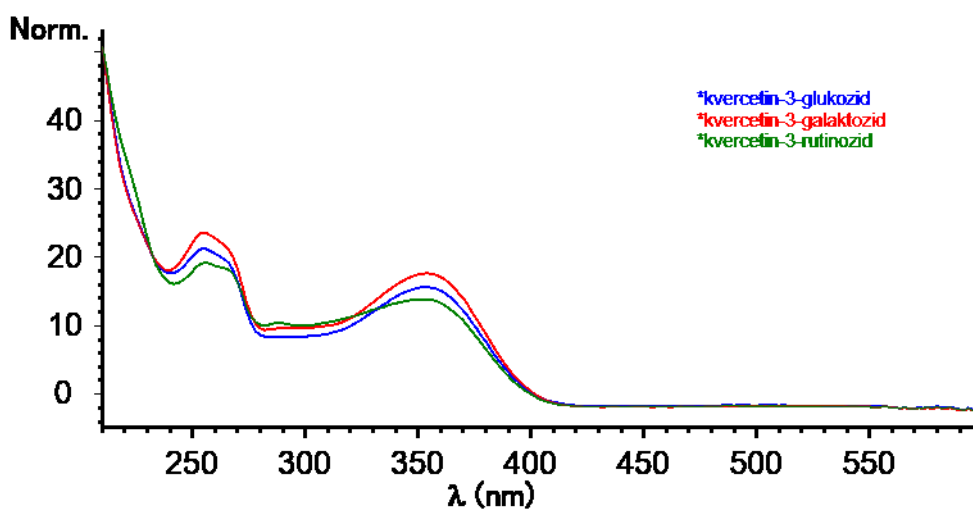




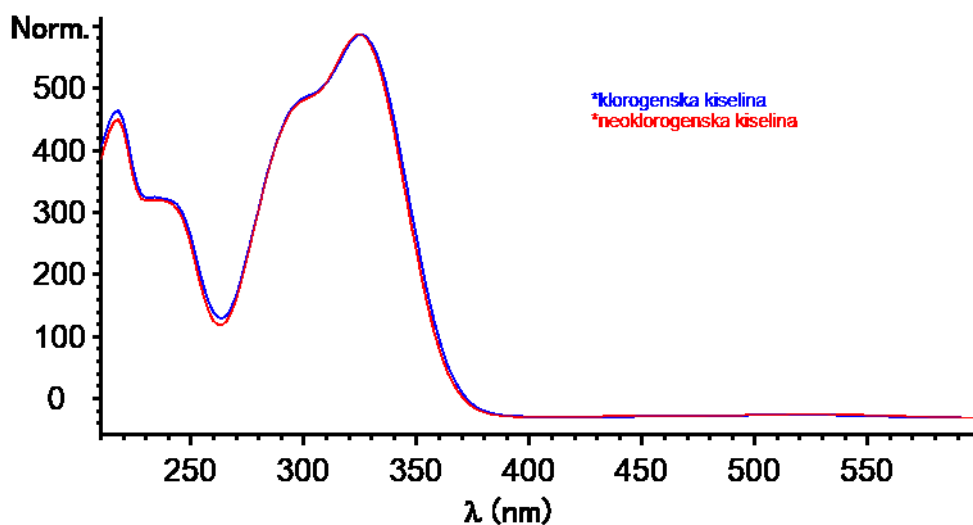
**Slika 5** Kromatogram ekstrakta aronije nakon adsorpcije na škrob sniman na 280, 320, 360 i 510 nm s identificiranim spojevima 1\* – neoklorogenska kiselina, 3 – cijanidin-3-galaktozid, 4 – cijanidin-3-glukozid, 5\* – cijanidin-3-arabinozid, 6\* – cijanidin-3-ksilozid, 7 – kvercetin-3-rutinozid, 8 – kvercetin-3-galaktozid, 9 – kvercetin-3-glukozid (\* djelomična identifikacija)



Slika 6 UV/Vis spektri antocijanina iz ekstrakta aronije



Slika 7 UV/Vis spektri flavonola iz ekstrakta aronije



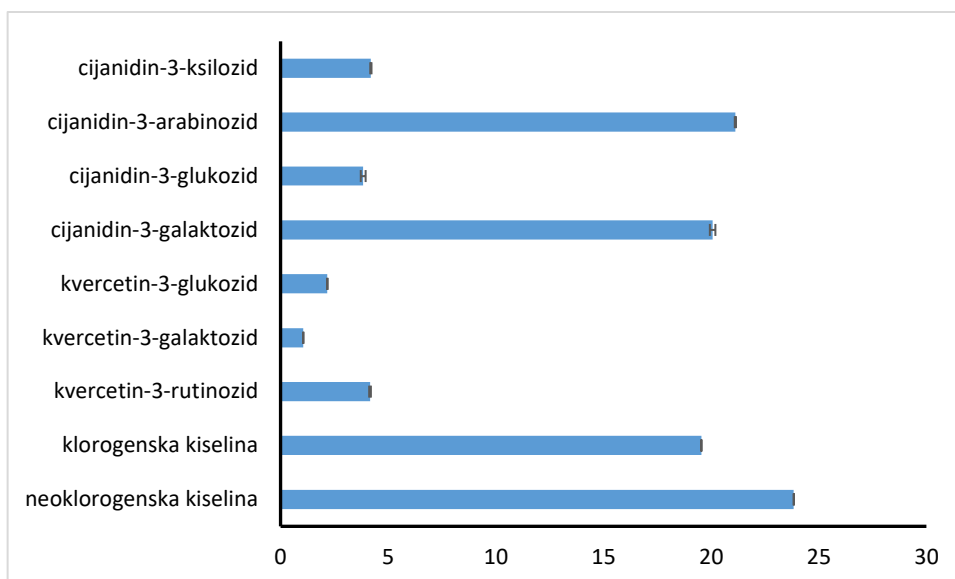
Slika 8 UV/Vis spektri fenolnih kiselina iz ekstrakta aronije

**Tablica 1** Količina polifenolnih spojeva u aroniji(mg kg<sup>-1</sup> svježe mase)

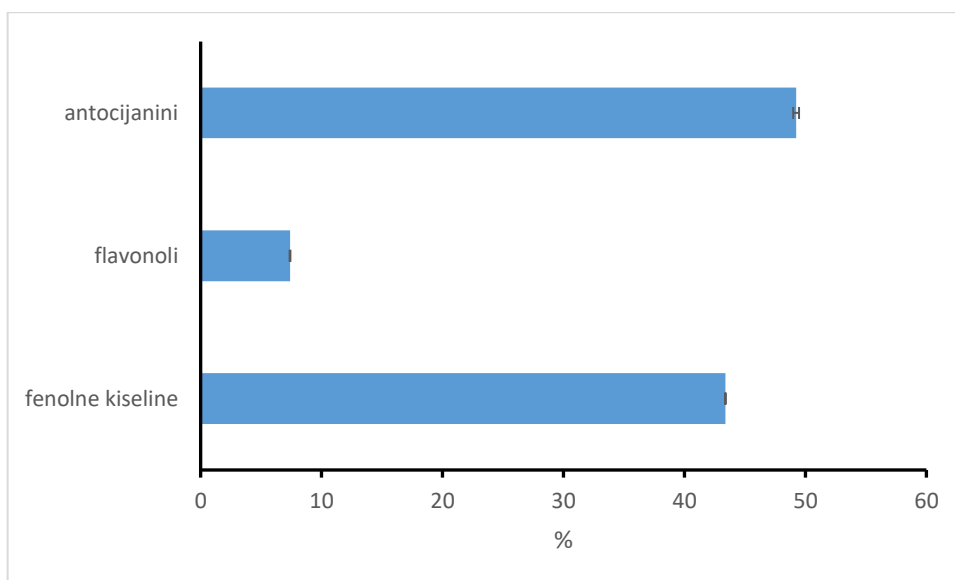
Polifenolni spoj	Količina mg kg <sup>-1</sup>
<b>Fenolne kiseline</b>	
neoklorogenska kiselina*	254,63 ± 0,10
klorogenska kiselina	208,79 ± 0,14
Ukupno	463,42 ± 0,24
<b>Flavonoli</b>	
kvercetin-3-rutinozid	44,40 ± 0,43
kvercetin-3-galaktozid	11,29 ± 0,00
kvercetin-3-glukozid	23,23 ± 0,07
Ukupno	78,91 ± 0,50
<b>Antocijanini</b>	
cijanidin-3-galaktozid	214,37 ± 1,37
cijanidin-3-glukozid	41,01 ± 1,20
cijanidin-3-arabinozid*	225,66 ± 0,30
cijanidin-3-ksilozid*	44,80 ± 0,31
Ukupno	525,84 ± 3,19
UKUPNO	1068,18 ± 3,93

\* djelomično identificirani spojevi

Ekstrakta analiziran dva puta na RP-HPLC uređaju (n=2)



**Slika 9** Postotna raspodjela pojedinih polifenolnih spojeva u ekstraktu aronije



**Slika 10** Postotna raspodjela polifenolnih skupina u ekstraktu aronije

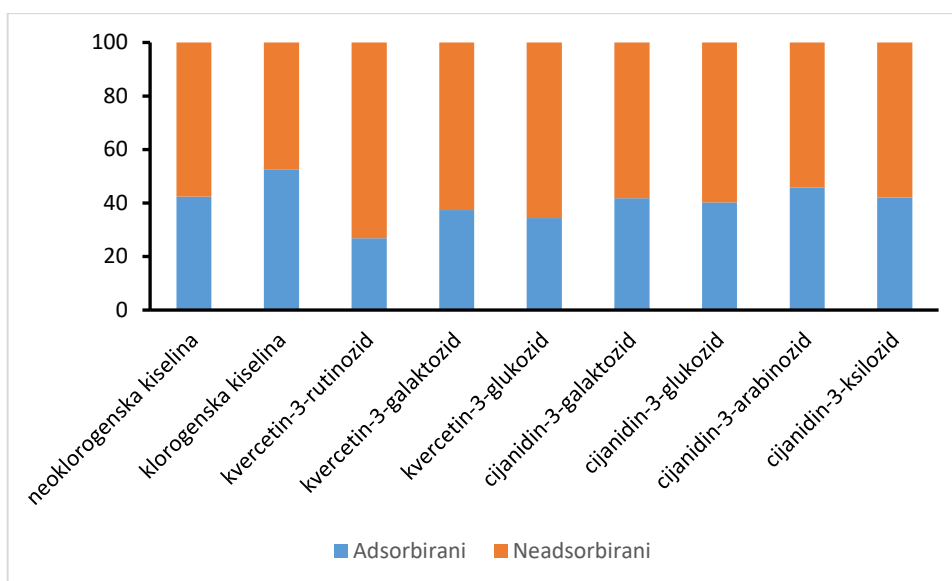
## 4.2. Adsorpcija polifenolnih spojeva aronije na škrob

**Tablica 2** Koncentracija polifenolnih spojeva nakon adsorpcije na škrob

Polifenolni spoj	Količina mg kg <sup>-1</sup>
<b>Fenolne kiseline</b>	
neoklorogenska kiselina*	146,70 ± 0,54
klorogenska kiselina	99,41 ± 0,07
Ukupno	246,11 ± 0,61
<b>Flavonoli</b>	
kvercetin-3-rutinozid	32,47 ± 0,39
kvercetin-3-galaktozid	7,07 ± 0,04
kvercetin-3-glukozid	15,23 ± 0,01
Ukupno	54,77 ± 0,44
<b>Antocijanini</b>	
cijanidin-3-galaktozid	124,90 ± 0,49
cijanidin-3-glukozid	24,51 ± 0,68
cijanidin-3-arabinozid*	122,34 ± 0,16
cijanidin-3-ksilozid*	25,98 ± 0,42
Ukupno	297,72 ± 1,74
UKUPNO	598,61 ± 2,79

\* djelomično identificirani spojevi

Ekstrakt analiziran dva puta na RP-HPLC uređaju (n=2)



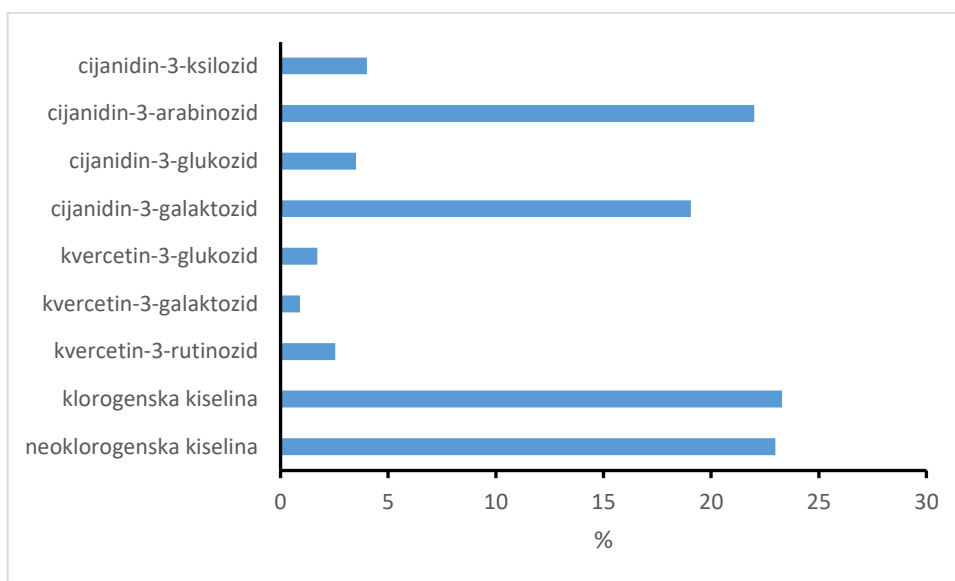
**Slika 11** Postotna raspodjela adsorbiranih i neadsorbiranih polifenolnih spojeva

**Tablica 3** Količina polifenolnih spojeva prije i nakon adsorpcije na škrob i adsorpcijski kapacitet škroba ( $\text{mg g}^{-1}$  škroba)

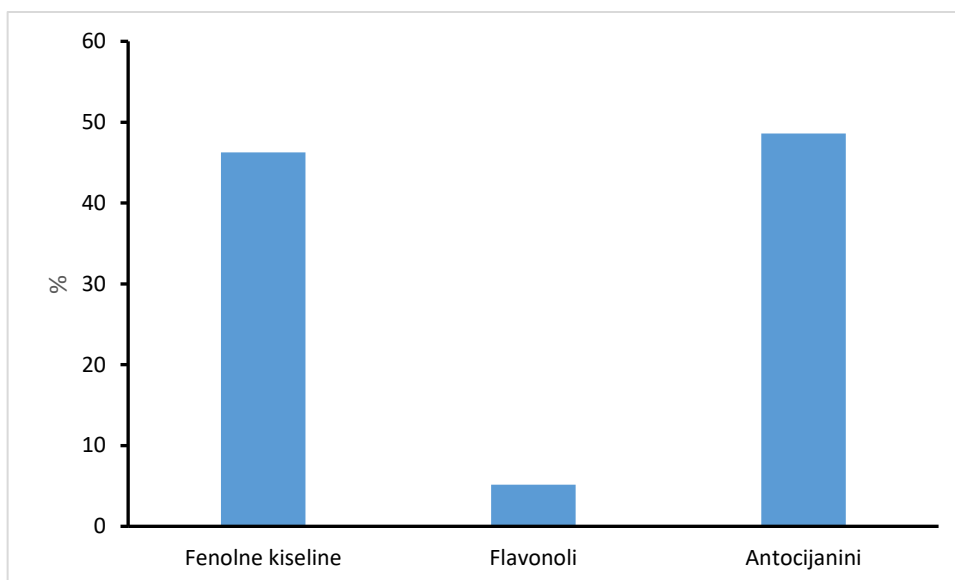
Polifenolni spojevi	Prije adsorpcije mg	Nakon adsorpcije mg	Adsorpcijski kapacitet mg/g
<b>Fenolne kiseline</b>			
neoklorogenska kiselina	17,916 $\pm$ 0,007	10,322 $\pm$ 0,038	0,076
klorogenska kiselina	14,690 $\pm$ 0,010	6,994 $\pm$ 0,005	0,077
Ukupno	32,606 $\pm$ 0,017	17,316 $\pm$ 0,043	0,153
<b>Flavonoli</b>			
kvercetin-3-rutinozid	3,124 $\pm$ 0,030	2,285 $\pm$ 0,028	0,008
kvercetin-3-galaktozid	0,794 $\pm$ 0,000	0,498 $\pm$ 0,003	0,003
kvercetin-3-glukozid	1,634 $\pm$ 0,005	1,072 $\pm$ 0,001	0,006
Ukupno	5,552 $\pm$ 0,035	3,854 $\pm$ 0,031	0,017
<b>Antocijanini</b>			
cijanidin-3-galaktozid	15,083 $\pm$ 0,097	8,788 $\pm$ 0,034	0,063
cijanidin-3-glukozid	2,885 $\pm$ 0,085	1,724 $\pm$ 0,048	0,012
cijanidin-3-arabinozid	15,877 $\pm$ 0,021	8,607 $\pm$ 0,011	0,073
cijanidin-3-ksilozid	3,152 $\pm$ 0,022	1,828 $\pm$ 0,029	0,013
Ukupno	36,998 $\pm$ 0,224	20,947 $\pm$ 0,123	0,161
UKUPNO	75,155 $\pm$ 0,276	42,117 $\pm$ 0,196	0,330

\* djelomično identificirani spojevi

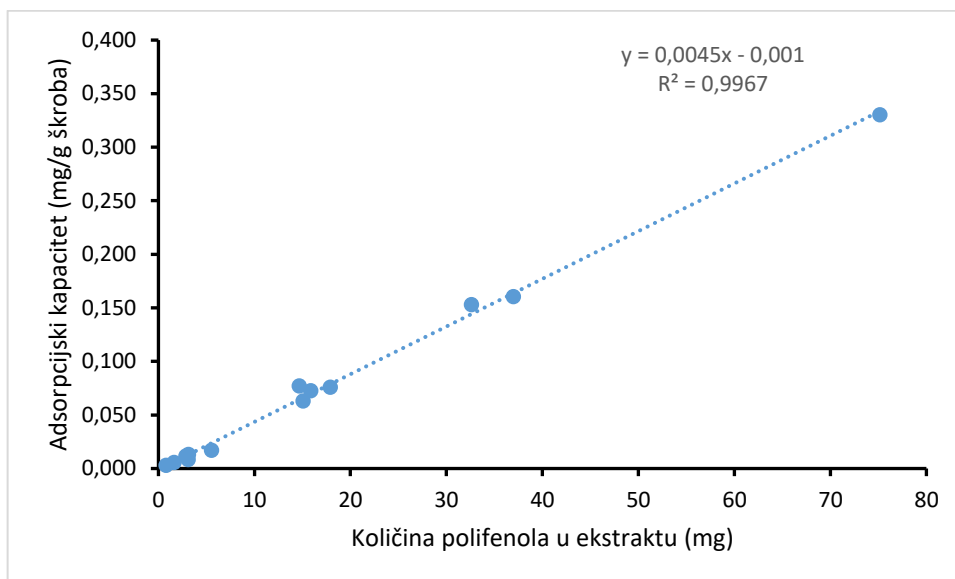
Ekstrakt analiziran dva puta na RP-HPLC uređaju (n=2)



**Slika 12** Postotna raspodjela polifenolnih spojeva iz aronije u ukupnom adsorpcijskom kapacitetu



**Slika 13** Postotna raspodjela polifenolnih skupina iz aronije adsorbiranih na škrob. Postotci su izračunati s obzirom na ukupnu adsorbiranu količinu polifenola



**Slika 14** Korelacija između količine svih pojedinih i ukupnih polifenolnih spojeva prisutnih u otopini prije adsorpcije (mg) i njihove količine adsorbirane na škrob ( $\text{mg g}^{-1}$  škroba)

#### 4.3. Osobine materijala dobivenih od škroba s adsorbiranim polifenolima aronije

**Tablica 4** Debljina materijala

Škrob %	Glicerol G	Debljina filma mm
5	0,5	<b>0,57</b>
5	1	<b>0,22</b>
5	2	<b>0,40</b>
5	2,5	<b>0,46</b>
10	0,5	<b>0,29</b>
10	1	<b>1,33</b>
10	2	<b>0,42</b>
10	2,5	<b>0,55</b>

Materijal dobiven različitim udjelima škroba s adsorbiranim polifenolima (%) u vodi (50 ml) te različitom masom plastifikatora glicerola (g)



**Tablica 5** Sadržaj vode i topljivost u vodi dobivenih materijala

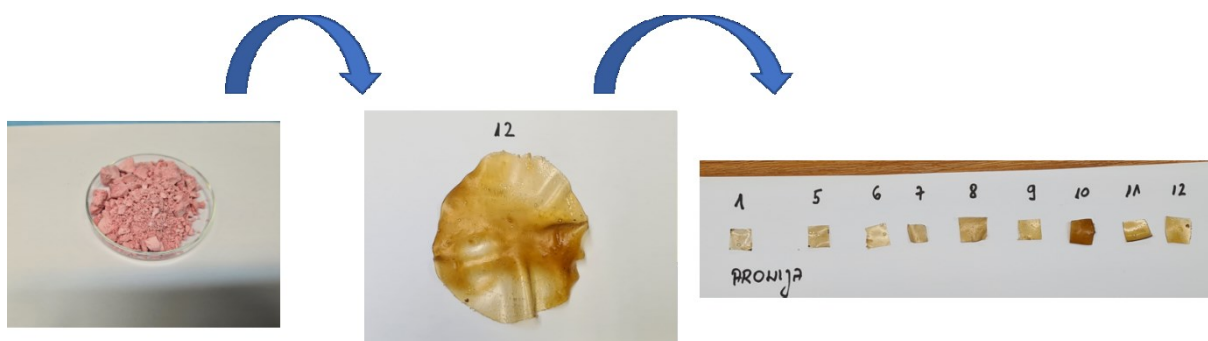
Škrob	Glicerol	Sadržaj vode	Topljivost u vodi
%	g	%	%
5	0,5		
5	1	1,7	40,3
5	2	3,1	26,2
5	2,5	7,2	45,5
10	0,5	5,2	16,4
10	1	9,0	20,5
10	2	4,5	38,8
10	2,5	2,1	43,2

Materijal dobiven različitim udjelima škroba s adsorbiranim polifenolima (%) u vodi (50 ml) te različitom masom plastifikatora glicerola (g)

**Tablica 6** Otpuštanje ukupnih polifenola u 50 % etanolu tijekom vremena

Vrijeme	Prva paralela	Druga paralela
Min	mg g <sup>-1</sup>	mg g <sup>-1</sup>
5	0,000 ± 0,000	0,025 ± 0,000
10	0,034 ± 0,001	0,119 ± 0,003
20	0,000 ± 0,003	-0,007 ± 0,000
30	0,050 ± 0,001	0,032 ± 0,000
60	0,053 ± 0,000	0,049 ± 0,001
120	0,038 ± 0,000	0,021 ± 0,001
180	0,071 ± 0,001	0,032 ± 0,001
240	0,014 ± 0,004	0,007 ± 0,000
300	0,019 ± 0,000	0,049 ± 0,004

Otpuštanje tijekom vremena provedeno je u 50 % etanolu.



**Slika 15** Priprava biorazgradivog materijala na bazi škroba s adsorbiranim polifenolima aronije

#### 4.4. Materijal dobiven od čistog škroba s vodenim ekstraktom aronije

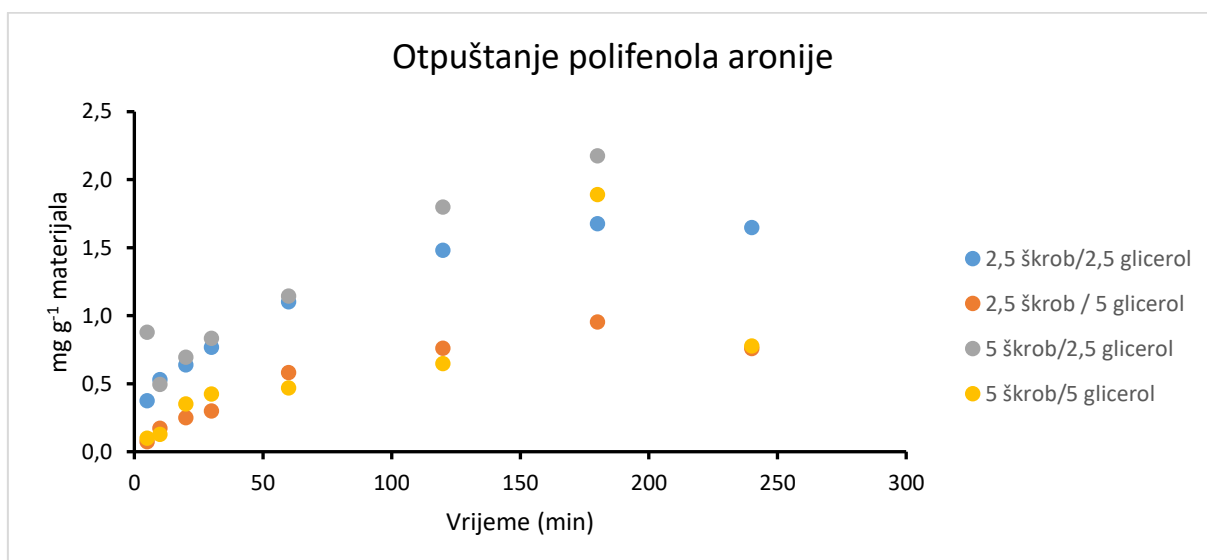
**Tablica 7** Debljina materijala

Škrob %	Glicerol g	Debljina mm
5	2,5	1,0
5	5	1,6
10	2,5	1,1
10	5	1,0

**Tablica 8** Sadržaj vode i topljivost u vodi dobivenih materijala

Škrob %	Glicerol g	Sadržaj vode %	Topljivost u vodi %
5	2,5	4,3	62,2
5	5	5,0	36,3
10	2,5	5,4	70,5
10	5	4,9	49,1

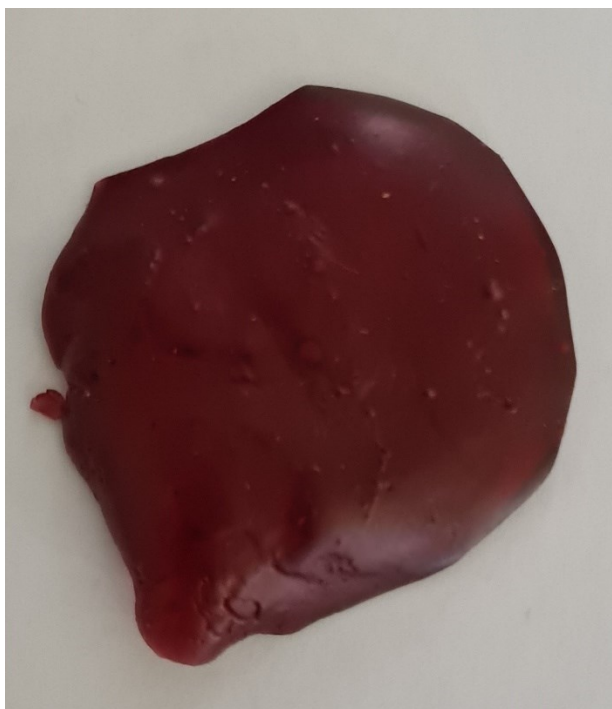
Materijali dobiveni različitim udjelima škroba (%) u ekstraktu aronije (50 ml) te različitom masom plastifikatora glicerola (g)



**Slika 16** Otpuštanje ukupnih polifenola u 50 % etanolu u vremenskom periodu 240 min iz materijala. Materijali su dobiveni različitim udjelima škroba (%) u ekstraktu aronije (50 ml) te različitom masom plastifikatora glicerola (g)

**Tablica 9** Ukupno otpušteni polifenoli u 75 % etanolu uz pomoć ultrazvuka

škrob %	glicerol g	Ukupni polifenoli mg g <sup>-1</sup> materijala
5	2,5	1,399 ± 0,000
5	5	0,645 ± 0,003
10	2,5	2,700 ± 0,003
10	5	1,095 ± 0,000



Slika 17 Primjer pripremljenog biopolimernog materijala

#### 4.5. Kinetika otpuštanja polifenola

Tablica 10 Parametri jednadžbi prvog i drugog reda

	Prvi red				Drugi red				
	$k$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (min)	$c_{\infty}$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )	SE	$k$ ( $\text{g mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (min)	$c_{\infty}$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )	SE	$C_{\text{exp}}$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )
5 % škrob 2,5 g glicerol	0,02	29,8	1,63	0,13	0,014	38,1	1,94	0,10	1,65
5 % škrob 5 g glicerol	0,02	39,8	0,87	0,07	0,015	61,8	1,11	0,08	0,76
10 % škrob 2,5 g glicerol	0,01	86,9	2,38	0,34	0,003	129,8	3,07	0,32	2,17
10 % škrob 5 g glicerol	0,01	63,4	1,30	0,39	0,005	112,2	1,80	0,39	0,78

SE – standardna greška (engl. standard error)

## **5. RASPRAVA**

---

### 5.1. Identifikacija i kvantifikacija spojeva aronije

**Slike 4 i 5** prikazuju kromatograme ekstrakta aronije s identificiranim spojevima prije i nakon adsorpcije na škrob. **Slika 4** prikazuje da su u aroniji identificirane fenolne kiseline (neoklorogenska kiselina i klorogenska kiselina), antocijanini (cijanidin-3-galaktozid, cijanidin-3-glukozid, cijanidin-3-arabinozid, cijanidin-3-ksilozid) i flavonoli (kvercetin-3-rutinozid, kvercetin-3-galaktozid, kvercetin-3-glukozid). Nakon adsorpcije (**Slika 5**) identificirani su isti spojevi. **Slike 6, 7 i 8** prikazuju spektre identificiranih spojeva. Prikazani su tipični maksimumi u UV/Vis spektrima. Antocijanini prikazuju dva tipična maksimuma na oko 280 nm i 520 nm. Flavonoli pokazuju maksimum na 260 nm i 350-360 nm, dok fenolne kiseline pokazuju tipičan maksimum na 330nm. U ranijim istraživanjima, Kaloudi i sur. (2022.) identificirali su identične spojeve u aroniji.

Također, polifenolni spojevi su i kvantificirani te su podaci prikazani u **Tablici 1**. U aroniji je prisutno 1068,18 mg kg<sup>-1</sup> polifenolnih spojeva, od toga 463,42 mg kg<sup>-1</sup> fenolnih kiselina, 78,91 mg kg<sup>-1</sup> flavonola i 525,84 mg kg<sup>-1</sup> antocijanina. Količine polifenolnih spojeva su nešto niže u usporedbi s podacima iz literature (Jakobek i sur., 2021; Kaloudi i sur., 2022) zbog ekstrahiranja s vodom. Veće količine bile bi dobivene kombinacijom vode i nekog organskog otapala kao što je metanol ili etanol. U ovom radu polifenoli aronije ekstrahirani su vodom jer je ekstrakt upotrijebljen za pripravu biorazgradivog materijala te je odabrano otapalo za ekstrakciju koje je prirodno i ne šteti okolišu. Vodeni ekstrakt polifenola može se s većom sigurnošću upotrijebiti za pripremanje biorazgradivog materijala. **Slike 9 i 10** opisuju postupnu raspodjelu pojedinačnih polifenola i polifenolnih skupina u ekstraktu aronije. Od pojedinačnih polifenola, najviše zastupljene su fenolne kiseline - neoklorogenska kiselina (23,84 %) i klorogenska kiselina (19,56 %) te od antocijanina - cijanidin-3-galaktozid (20,16 %) i cijanidin-3-arabinozid (21,15 %). Prema tome i u polifenolnim skupinama najzastupljeniji su antocijanini (49,40 %) i fenolne kiseline (43,40 %).

### 5.2. Adsorpcija polifenolnih spojeva aronije

Polifenolni spojevi aronije adsorbirani su na škrob. **Tablica 2** prikazuje koncentraciju polifenola nakon adsorpcije na škrob u kojoj je vidljivo da su količine polifenola niže nakon adsorpcije na škrob. **Slika 8** prikazuje prostornu raspodjelu adsorbiranih i neadsorbiranih polifenolnih spojeva. Polifenolni spojevi adsorbirali su se od 26,86 do 52,39 %, pri čemu se s najvećim

---

postotkom adsorpcije ističe klorogenska kiselina (52,39 %) i cijanidin-3-arabinozid (45,79 %). **Tablica 3** prikazuje količine polifenola aronije prije adsorpcije te nakon adsorpcije. Nakon adsorpcije količine svih polifenola bile su niže što ukazuje na to da su se polifenoli adsorbirali na škrob. No adsorpcijski kapacitet bio je nizak, a ukupno je iznosio 0,330 mg g<sup>-1</sup> škroba. U eksperimentu adsorpcije polifenoli aronije adsorbirali su se na 100 g škroba. Može se pretpostaviti da bi se adsorbiralo više polifenola na manju količinu škroba. U ukupnom adsorpcijskom kapacitetu (**Slika 12**), najveći postotak zauzimali su pojedinačni polifenoli klorogenska i neklorogenska kiselina te cijanidin-3-galaktozid i cijanidin-3-arabinozid, a od polifenolnih skupina antocijanini i fenolne kiseline (**Slika 13**). Vidljivo je da su u adsorpcijskom kapacitetu najviše bili zastupljeni pojedinačni polifenoli i polifenolne skupine koje su također najprisutnije i u ekstraktu. Između ostalog, to je prikazano i na **Slici 14** gdje je u odnos stavljen količina polifenola u ekstraktu i adsorpcijski kapacitet. Porastom količine polifenola u ekstraktu, rastao je i adsorpcijski kapacitet. Koeficijent korelacije je visok i iznosi 0,9967. Ovaj trend slaže se s adsorpcijom polifenola jabuke na  $\beta$ -glukan (Jakobek i sur., 2020).

### 5.3. Biopolimerni materijal

Od škroba s adsorbiranim polifenolima pripremljeni su biorazgradivi aktivni materijali, a primjer se može vidjeti na **Slici 15**. Određena je njihova debljina (**Tablica 4**), sadržaj vode i topljivost u vodi (**Tablica 5**). Debljina filmova bila je u rasponu od 0,22 mm (5 % škroba i 1 g glicerola) do 1,33 mm (10 % škroba i 1 g glicerola), što je nešto više od materijala pripremljenih od škroba u ranijim istraživanjima (Luo i sur., 2022; Miao i sur., 2021). Sadržaj vode iznosio je od 1,7 % (5 % škroba i 1 g glicerola) do 9,0 % (10 % škroba i 1 g glicerola). U ranijim istraživanjima sadržaj vode pripremljenih materijala od škroba bio je nešto viši, do 15 (Luo i sur., 2022) ili 24 % (Miao i sur., 2021). Topljevost je iznosila od 16,4 % (10 % škroba i 0,5 g glicerola) do 45,5 % (5 % škroba i 2,5 g glicerola) što je nešto više od podataka iz ranijih istraživanja u kojima je topljivost pripremljenih materijala bila do 20 (Luo i sur., 2022) ili 16 % (Miao i sur., 2021). Materijali iz ranijih istraživanja pripremljeni su od poroznog škroba (Miao i sur., 2021) ili škroba s dodanim nanočesticama MgO (Luo i sur., 2022), a aktivne komponente bili su polifenoli čaja. Razlike u pripremi tih materijala i materijala u ovom istraživanju doveli su do razlika u sadržaju vode i topljivosti u vodi. Osim toga, u ovom radu materijal napravljen

od 5 % škroba i 0,5 g glicerola bio je vrlo krhak zbog čega nije bilo moguće odrediti sadržaj vode i topljivost u vodi.

Izveden je eksperiment otpuštanja polifenola u 50 % etanolu kako bi se vidjela aktivna funkcija materijala. **Tablica 6** prikazuje količinu otpuštenih polifenola. Količine otpuštenih polifenola bile su vrlo niske.

Zbog niskih otpuštenih količina polifenola, cilj je bio poboljšati materijal i njegovu aktivnu funkciju. U tu svrhu, pripremljeni su novi materijali u kojima se koristio čisti škrob i ekstrakt aronije. **Tablice 7 i 8** sadrže debljine novih materijala, sadržaj vode i topljivost u vodi. Debljina novo pripremljenih materijala iznosila je od 1,0 mm (5 % škrob i 2,5 g glicerol, 10 % škrob i 5 g glicerol) do 1,6 mm (5 % škrob i 5 g glicerol), sadržaj vode od 4,3 % (5 % škrob i 2,5 g glicerol) do 5,4% (10 % škrob i 2,5 g glicerol), a topljivost u vodi od 36,3 % (5 % škrob i 5 g glicerol) do 70,5 % (10 % škrob i 2,5 g glicerol). Kao što je ranije napomenuto, debljine materijala, sadržaj vode te topljivost u vodi razlikuju se od materijala pripremljenih ranijim istraživanjima (Luo i sur., 2022; Miao i sur., 2021). Može se napomenuti da se topljivost u vodi smanjivala kako se povećavala količina glicerola.

Ovi materijali pokazali su puno bolju mogućnost otpuštanja polifenola. **Slika 16** prikazuje otpuštanje ukupnih polifenola u 50 % etanolu u vremenskom periodu 240 min. Vidljivo je da se više polifenola otpušta s duljim vremenom reakcije. **Tablica 9** prikazuje ukupno otpuštene polifenole iz materijala u 75 % etanolu. Količine ukupno otpuštenih polifenola iznosile su za materijal s 5 % škroba od 0,645 do 1,399 mg g<sup>-1</sup> materijala, a za materijal s 10 % škroba od 1,095 do 2,700 mg g<sup>-1</sup> materijala. Veće količine otpuštene iz materijala koji ima manje količine glicerola. **Slike 17** prikazuju primjer pripravljenog materijala.

Nakon toga, ispitana je kinetika otpuštanja polifenola, a rezultati su prikazani u **Tablici 10**. Vrijeme polureakcije ( $t_{1/2}$ ) otpuštanja polifenola iznosilo je od 29,8 min do 86,9 min prema prvom redu reakcije, te od 38,1 min do 129,8 min prema drugom redu reakcije. Teorijska maksimalna količina otpuštenih polifenola ( $c_{\infty}$ ) iznosila je od 0,87 do 2,38 mg g<sup>-1</sup> (prvi red), te od 1,11 do 3,07 mg g<sup>-1</sup> (drugi red). Prema tome, vrijednosti teorijske maksimalne količine otpuštenih polifenola su slične eksperimentalnim vrijednostima.



Rezultati u ovom radu pokazali su da se može pripremiti materijal od škroba s polifenolima aronije koji pokazuju aktivne funkcije, no potrebna su daljnja istraživanja koja trebaju poboljšati karakteristike materijala.

## **6. ZAKLJUČAK**

---

S obzirom na provedeno istraživanje u ovom radu, može se zaključiti sljedeće:

1. Identificirani polifenoli u aroniji su: fenolne kiseline (neoklorogenska kiselina i klorogenska kiselina), antocijanini (cijanidin-3-galaktozid, cijanidin-3-glukozid, cijanidin-3-arabinozid, cijanidin-3-ksilozid) i flavonoli (kvercetin-3-rutinozid, kvercetin-3-galaktozid, kvercetin-3-glukozid).
2. Od polifenolnih skupina u aroniji su najzastupljeniji bili antocijanini (49,40 %) i fenolne kiseline (43,40 %).
3. Nakon adsorpcije na škrob identificirani su isti polifenoli.
4. Polifenoli aronije adsorbirali su se na škrob od 26,86 do 52,39 %, pri čemu se s najvećim postotkom adsorpcije ističe klorogenska kiselina (52,39 %) i cijanidin-3-arabinozid (45,79 %). One polifenolne skupine koje su se u ekstraktu nalazile u većem postotku, adsorbirale su se u većem postotku na škrob ( $r^2 = 0,9967$ ). No adsorpcijski kapacitet je bio nizak vjerojatno zbog visokog udjela škroba u reakcijskoj smjesi.
5. Materijali pripremljeni od škroba s adsorbiranim polifenolima aronije (5 i 10 % škroba, glicerol 0,5, 1, 2 i 2,5 g) u vodi pokazali su nešto veće postotke vode i topljivost u vodi u usporedbi s podacima iz literature. Osim toga, količina otpuštanih polifenola iz pripremljenih materijala bila je niska.
6. Radi poboljšanja aktivne funkcije materijala, pripremljen je materijal od čistog škroba s ekstraktom aronije (5 i 10 % škroba, glicerol 2,5 i 5 g). I ovi materijali pokazali su nešto veće postotke vode i topljivost u vodi u usporedbi s podacima iz literature, no puno bolje otpuštanje polifenola (0,645 do 2,700 mg g<sup>-1</sup> materijala) što pokazuje puno bolju aktivnu funkciju
7. Nakon ispitivanja kinetike otpuštanja polifenola, vidljivo je da primijenjene modificirane jednadžbe brzine reakcije dobro simuliraju proces otpuštanja polifenola.
8. Buduća istraživanja trebaju biti usmjerena na poboljšanje karakteristika materijala i aktivne funkcije

## **7. LITERATURA**

---

- Ahmed I, Lin, H, Zou L, Brody LA, Zhenxing L, Qazi MI, Liangtao L: A comprehensive review on the application of active packaging technologies to muscle foods. *Food Control* 82:163-178, 2017.
- Dirpan A, Ainani FA, Djalal M: A bibliometrics visualization analysis of active packaging system for food packaging. *Heliyon* 9:e18457, 2023.
- EPA, United States Environmental Protection Agency: *National Overview: Facts and Figures on Materials, Wastes and Recycling*. EPA, Sjedinjene Američke Države, 2022.
- Hahladakis NJ, Velis C, Weber R, Iacovidou I, Purnell P: An overview of chemical additives present in plastics: Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling. *Journal of Hazardous Materials* 344:179-199, 2018.
- Jakobek L, Matić P, Ištuk J, Barron AR: Study of interactions between individual phenolics of aronia with barley beta-Glucan. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 71:187-196, 2021.
- Jakobek L: Potrošači i polimerna ambalaža. *Meso* 22:340-342, 2020.
- Jakobek L, Buljeta I, Ištuk, J, Barron AR: Polyphenols of traditional apple varieties in interaction with barley  $\beta$ -glucan: A study of the adsorption process. *Foods* 9:1278, 2020.
- Kaloudi T, Tsimogiannis D, Oreopoulou V: Aronia Melanocarpa: Identification and exploitation of its phenolic components. *Molecules* 27:4375, 2022.
- Kraśniewska K, Galus S, Gniewosz M: Biopolymers-based materials containing silver nanoparticles as active packaging for food applications—A review. *International Journal of Molecular Sciences* 21:698, 2020.
- Lourenço SC, Moldão-Martins M, Alves VD: Antioxidants of Natural Plant Origins: From Sources to Food Industry Applications. *Molecules* 24:4132, 2019.
- Lu DR, Xiao DR, Xu SJ: Starch-based completely biodegradable polymer materials. *eXPRESS Polymer Letters* 3:366-375, 2009.
- Luo D, Xie Q, Gu S, Xue W: Potato starch films by incorporating tea polyphenol and MgO nanoparticles with enhanced physical, functional and preserved properties. *International Journal of Biological Macromolecules* 221:108-120, 2022.
- Majid N, Nayik GA, Dar SM, Nanda V: Novel food packaging technologies: Innovations and future prospective. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 17:454-462, 2018.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L: Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 79:727-747, 2004.

- Miao Z, Zhang Y, Lu P: Novel active starch films incorporating tea polyphenols-loaded porous starch as food packaging materials. *International Journal of Biological Macromolecules* 192:1123-1133, 2021.
- Ministarstvo zaštite okoliša i prirode: *Pravilnik o ambalaži i otpadnoj ambalaži*. Narodne novine 88/15, 2015.
- Muhamedbegović B, Jašić MV, Juul N: *Ambalaža i pakiranje hrane*. OFF-SET d.o.o, Tuzla, 2015.
- Salgado PR, Di Giorgio L, Musso YS, Mauri AN: Recent Developments in Smart Food Packaging Focused on Biobased and Biodegradable Polymers. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 5:630393, 2021.
- Sikora J, Majewski L, Puszka A: Modern biodegradable plastics—Processing and properties: Part I. *Materials* 13:1986, 2020.
- Singh AK, Kim JY, Lee YS: Phenolic compounds in active packaging and edible films/coatings: Natural bioactive molecules and novel packaging ingredients. *Molecules* 27:7513, 2022.
- Suppakul P, Miltz J, Sonneveld K, Bigger SW: Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *Journal of Food Science* 68:408-420, 2003.
- Tijjani H, Zangoma MH, Mohammed ZS, Obidola SM, Egbuna C, Abdulai SI: Polyphenols: Classifications, biosynthesis and bioactivities. U *Functional Foods and Nutraceuticals*, str.389-414. Springer, Cham, 2020.
- Tokiwa Y, Calabia BP, Ugwu CU, Alba S: Biodegradability of plastics. *International Journal of Molecular Sciences* 10:3722-3742, 2009.
- Tsao R: Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2:1231-1246, 2010.
- Vroman I, Tighzert L: Biodegradable polymers. *Materials* 2:307-344, 2009.
- Wu F, Misra M, Mohanty AK: Challenges and new opportunities on barrier performance of biodegradable polymers for sustainable packaging. *Progress in Polymer Science* 117:101395, 2021.
- Zhong Y, Godwin P, Jin Y, Xiao H: Biodegradable polymers and green-based antimicrobial packaging materials: A mini-review. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research* 3:27-35, 2020.