



WYDZIAŁ
NAUK O ŻYWNOSCI
I BIOTECHNOLOGII

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY w LUBLINIE
WYDZIAŁ NAUK O ŻYWNOSCI i
BIOTECHNOLOGII

Dyscyplina naukowa: technologia żywności i żywienia

Katarzyna Niedźwiadek

Rozprawa doktorska

Ph.D. thesis

**Otrzymywanie i charakterystyka aktywnych folii
polisacharydowo-żelatynowych wzbogaconych w związki
przeciwutleniające**

***Preparation and characterization of active polysaccharide-
gelatin films enriched with antioxidant compounds***

Rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Biochemii i Chemii Żywności

Promotor: dr hab. inż. Dariusz Kowalczyk, prof. uczelni



Praca częściowo powstała w wyniku realizacji
projektu badawczego o nr 2019/35/N/NZ9/01795
finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki

Lublin, 2024

Podziękowania

*Składam serdeczne podziękowania wszystkim Osobom,
które przyczyniły się do powstania niniejszej pracy,
w szczególności dziękuję*

Pani prof. dr hab. Barbarze Baraniak

i

Pani prof. dr hab. Urszuli Gawlik,
za umożliwienie pracy w zespole, wsparcie i nieocenioną życzliwość

oraz

Panu Promotorowi, dr hab. inż. Dariuszowi Kowalczykowi, prof. uczelni,
*za opiekę, wprowadzenie mnie w temat ekoopakowań,
cenne uwagi i wszelką udzieloną pomoc.*

Dziękuję również
Współautorom publikacji naukowych, z których składa się niniejsza rozprawa
doktorska, za doskonałą współpracę oraz wkład w rozwój mojego warsztatu naukowego

oraz

wszystkim Pracownikom Katedry Biochemii i Chemii Żywności,
za okazaną pomoc i przyjazną atmosferę sprzyjającą pracy naukowej.

Wyrażam również głęboką wdzięczność
mojej Rodzinie i Przyjaciółom za ich nieustanne wsparcie,
motywację oraz empatię i zrozumienie.

Oświadczenie promotora pracy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data15.06.2024.....

Podpis promotora pracyDariusz Kowalczyk.....

Oświadczenie autora pracy

Świadom/a odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora/~~Promotorów/Promotora~~ ~~pomoenniego~~* i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.
- przedstawiona rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.
- niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest tożsama z załączoną na płycie CD wersją elektroniczną.

Data15.06.2024.....

Podpis autora pracyKatarzyna Niedziadek.....

Spis treści

1. Wykaz publikacji składających się na rozprawę doktorską	6
2. Wykaz najważniejszych skrótów	7
3. Streszczenie	9
4. Wstęp	11
4.1. Trendy w opakowaniach żywności.....	11
4.2. Systemy kontrolowanego uwalniania substancji aktywnych oparte na biopolimerach i ich mieszaninach	15
4.3. Charakterystyka wybranych związków przeciwutleniających.....	21
4.4. Charakterystyka wybranych biopolimerów foliotwórczych.....	28
5. Hipoteza i cel badań	34
6. Materiały i metody	35
6.1. Materiał badawczy.....	35
6.2. Otrzymywanie folii.....	36
6.2.1. Folie z polisacharydów, żelatyny i ich mieszanin	36
6.2.2. Folie polisacharydowo-żelatynowe z dodatkiem palmitynianu L-askorbylu.....	36
6.2.3. Folie polisacharydowo-żelatynowe z dodatkiem astaksantyny AstaSana.....	36
6.2.4. Folie polisacharydowo-żelatynowe z dodatkiem kurkuminy	37
6.3. Metody badań roztworów foliotwórczych.....	37
6.4. Metody badań folii	37
6.4.1. Pomiar grubości i aklimatyzacja	37
6.4.2. Właściwości strukturalne.....	38
6.4.3. Właściwości optyczne	38
6.4.4. Właściwości fizykochemiczne	38
6.4.5. Właściwości barierowe.....	39
6.4.6. Właściwości mechaniczne.....	39
6.4.7. Właściwości termiczne	40
6.4.8. Migracja przeciwutleniaczy do płynów modelowych imitujących żywność	40
6.4.9. Aktywność przeciwutleniająca	41
6.5. Analiza statystyczna	42
7. Omówienie wyników i dyskusja	45
7.1. Folie otrzymane z polisacharydów, żelatyny i ich mieszanin	45
7.1.1. Właściwości roztworów foliotwórczych	45

7.1.2. Właściwości strukturalne folii	46
7.1.3. Właściwości fizykochemiczne	49
7.1.4. Szybkość przenikania pary wodnej	49
7.1.5. Właściwości optyczne	50
7.1.6. Właściwości mechaniczne	50
7.2. Folie polisacharydowo-żelatynowe z dodatkiem palmitynianu L-askorbylu.....	53
7.2.1. Mikrostruktura	53
7.2.2. Właściwości fizykochemiczne	54
7.2.3. Właściwości optyczne	55
7.2.4. Właściwości mechaniczne	56
7.2.5. Uwalnianie palmitynianu L-askorbylu	56
7.2.6. Aktywność przeciwutleniająca	58
7.3. Folie polisacharydowo-żelatynowe z dodatkiem astaksantyny AstaSana.....	58
7.3.1. Mikrostruktura roztworów foliotwórczych i folii.....	59
7.3.2. Właściwości optyczne	61
7.3.3. Właściwości fizykochemiczne	63
7.3.4. Właściwości mechaniczne	65
7.3.5. Uwalnianie astaksantyny	66
7.3.6. „Uwolniona” i całkowita aktywność przeciwutleniająca	69
7.4. Folie polisacharydowo-żelatynowe z dodatkiem kurkuminy.....	70
7.4.1. Właściwości strukturalne.....	70
7.4.2. Właściwości fizykochemiczne i szybkość przenikania pary wodnej	73
7.4.3. Właściwości optyczne	74
7.4.4. Właściwości mechaniczne	76
7.4.5. Uwalnianie kurkuminy	76
7.4.6. Właściwości przeciwutleniające.....	77
8. Wnioski.....	79
9. Bibliografia.....	82
10. Publikacje składające się na rozprawę doktorską.....	96
11. Oświadczenia.....	207

1. Wykaz publikacji składających się na rozprawę doktorską

P1. Łupina K., Kowalczyk D., Zięba E., Kazimierczak W., Mężyńska M., Basiura-Cembala M., Wiącek A. E. (2019). Edible films made from blends of gelatin and polysaccharide-based emulsifiers - A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 96, 555–567. (pkt MEiN – 140, IF – 7,053)

P2. Łupina K., Kowalczyk D., Drożłowska E. (2020). Polysaccharide/gelatin blend films as carriers of ascorbyl palmitate - A comparative study. *Food Chemistry*, 333, 127465. (pkt MEiN – 200, IF – 7,514)

P3. Łupina K., Kowalczyk D., Kazimierczak W. (2021). Gum Arabic/gelatin and water-soluble soy polysaccharides/gelatin blend films as carriers of astaxanthin - A comparative study of the kinetics of release and antioxidant properties. *Polymers*, 13(7), 1062. (pkt MEiN – 100, IF – 4,967)

P4. Łupina K., Kowalczyk D., Lis M., Raszowska-Kaczor A., Drożłowska E. (2022). Controlled release of water-soluble astaxanthin from carboxymethyl cellulose/gelatin and octenyl succinic anhydride starch/gelatin blend films. *Food Hydrocolloids*, 123, 107179. (pkt MEiN – 140, IF – 10,700)

P5. Łupina K., Kowalczyk D., Kazimierczak W. (2022). Functional properties and storage stability of astaxanthin-loaded polysaccharide/gelatin blend films - A comparative study. *Polymers*, 14(19), 4001. (pkt MEiN – 100, IF – 5,000)

P6. Łupina K., Kowalczyk D., Lis M., Basiura-Cembala M. (2023). Antioxidant polysaccharide/gelatin blend films loaded with curcumin - A comparative study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 236, 123945. (pkt MEiN – 100, IF – 8,025)

Sumaryczna liczba pkt za publikacje składające się na rozprawę doktorską wg komunikatu MNiSW obowiązującego w roku wydania pracy: **780**

Sumaryczny IF publikacji składających się na rozprawę doktorską zgodnie z rokiem opublikowania: **43,259**

Liczba cytowań (w dniu 3.06.2024) wg Scopus: [P1]:**59**, [P2]:**13**, [P3]:**21**, [P4]:**18**, [P5]:**0**, [P6]:**2**. Sumaryczna liczba cytowań: **113**

Liczba cytowań (w dniu 3.06.2024) wg Web of Science: [P1]:**56**, [P2]:**12**, [P3]:**19**, [P4]:**14**, [P5]:**0**, [P6]:**2**. Sumaryczna liczba cytowań: **103**

2. Wykaz najważniejszych skrótów

2θ	–	kąt dyfrakcji
ΔE	–	całkowita różnica barwy
ABTS	–	2,2'-azyno-bis(etylobenzotiazolino-6-sulfonian)
ABTS ^{*+}	–	kationorodnik kwasu 2,2'-azyno-bis(etylobenzotiazolino-6-sulfonowego)
ADI	–	dopuszczalne dzienne spożycie (pobranie)
AIC	–	kryterium informacyjne Akaikiego
AP	–	palmitynian L-askorbylu
AST	–	astaksantyna-AstaSana
ASX	–	astaksantyna
ATR	–	osłabione odbicie całkowite
B-L	–	model Baker-Lonsdale
CMC	–	karboksymetyloceluloza
cryo-SEM	–	skaningowa kriomikroskopia elektronowa
CUR	–	kurkumina
DIC	–	kontrast różnicowo-interferencyjny
DLS	–	dynamiczne rozpraszanie światła
d _m	–	średnia wielkość cząstek
d _{max}	–	maksymalna wielkość cząstek
DPPH	–	2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl
DPPH [*]	–	rodnik 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu
DS	–	stopień podstawienia
E	–	wydłużenie względne przy zerwaniu
EFSA	–	Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności
EM	–	moduł sprężystości wzdłużnej
FFS	–	roztwór/-y foliotwórcze
F-O	–	model pierwszego rzędu
F-O F_{max}	–	model pierwszego rzędu z parametrem F_{max}
FTIR	–	spektrometria w podczerwieni z transformacją Fouriera
GAR	–	guma arabska
GEL	–	żelatyna
Go_1	–	model Gompertz_1
Go_2	–	model Gompertz_2
Go_4	–	model Gompertz_4
Ho	–	model Hopfenberg
HPMC	–	hydroksypropylometyloceluloza
IR	–	promieniowanie podczerwone
K-P F_0	–	model Korsmeyer-Peppas z parametrem F_0
K-P T_{lag}	–	model Korsmeyer-Peppas z parametrem T_{lag}
Lo_1	–	model logistyczny_1
Lo_2	–	model logistyczny_2
M-B T_{lag}	–	model Makoid-Banakar z parametrem T_{lag}
M-B	–	model Makoid-Banakar
MC	–	metyloceluloza
n	–	współczynnik dyfuzyjny w równaniu Korsmeyer-Peppas
OP	–	nieprzeźroczystość
OSA	–	oktenylobursztynian skrobiowy
OTR	–	szybkość przenikania tlenu

PE	– polietylen
PLA	– polilaktyd
Pr_2	– model Probit_2
P-S_1	– model Peppas-Sahlin_1
P-S T_{lag}	– model Peppas-Sahlin_1 z parametrem T_{lag}
PS	– wytrzymałość na przebicie
R^2 skorygowany	– skorygowany współczynnik determinacji
RH	– wilgotność względna powietrza
Rq	– średnie kwadratowe odchylenie profilu powierzchni od linii średniej (średnia kwadratowa chropowatość)
So	– rozpuszczalność
Sw	– zdolność absorpcji rozpuszczalnika
t _{25%}	– czas ćwiercowania
t _{50%}	– czas półowania
t _{50%DPPH*}	– czas potrzebny do zmniejszenia ilości DPPH* o połowę
T% _{λ400-700}	– przepuszczalność (transmitancja) światła widzialnego
TS	– wytrzymałość na zerwanie
WAXD	– szerokokątowa dyfraktometria rentgenowska
Wb_1	– model Weibull_1
Wb_4	– model Weibull_4
WC	– zawartość wody
WSSP	– wodnorozpuszczalne polisacharydy sojowe
WVP	– szybkość przenikania pary wodnej
Z-O	– model zerowego rzędu
Z-O T_{lag}	– model zerowego rzędu z parametrem T_{lag}
Zp	– potencjał zeta

3. Streszczenie

Otrzymywanie i charakterystyka aktywnych folii polisacharydowo-żelatynowych wzbogaconych w związki przeciwutleniające

Z roztworów mieszanin polisacharydów (karboksymetylocelulozy (CMC), gumy arabskiej (GAR), oktenylobursztynianu skrobiowego (OSA) i wodnorozpuszczalnych polisacharydów sojowych (WSSP)) z żelatyną (GEL) w proporcji 75:25, domieszkowanych palmitynianem L-askorbylu (AP, 1-2%), astaksantyną (ASX) AstaSana (AST, 0,25-1%) i kurkumina (CUR, 0,005-0,02%) otrzymano jadalne folie. W ramach analiz porównano ich właściwości strukturalne, optyczne, barierowe, mechaniczne i przeciwutleniające, a także kinetykę migracji przeciwutleniaczy do płynów modelowych imitujących żywność. Zaobserwowano obecność żelatynowych mikrosfer w układzie CMC75/GEL25, ziarnistość mieszaniny WSSP75/GEL25 i utworzenie koacerwatów OSA/GEL. Folie bardziej homogenne (GAR75/GEL25 i OSA75/GEL25) były bardziej przezroczyste niż materiały mikrostrukturalnie niejednorodne. Polisacharyd liniowy (CMC) umożliwił otrzymanie folii o wyższej wytrzymałości w porównaniu do polisacharydów rozgałęzionych. Folia OSA75/GEL25 była najmniej wytrzymała mechanicznie, ale najbardziej rozciągliwa. Nie udało się uzyskać folii CMC75/GEL25/AP. Zwiększenie zawartości przeciwutleniaczy w foliach prowadziło do zwiększenia ich potencjału przeciwrodnikowego i fotoprotekcyjnego. Folia OSA75/GEL25 najszybciej uwalniała AP (do etanolu), skutecznie neutralizując wolne rodniki. Z kolei folia GAR75/GEL25/AP-1% charakteryzowała się najwolniejszym działaniem przeciwutleniającym, przypominającym kinetykę zerowego rzędu, co może być korzystne dla długo przechowywanych produktów spożywczych. AP zmniejszył rozpuszczalność folii, a w niektórych przypadkach poprawił ich barierowość w stosunku do pary wodnej. AST i CUR nadawały foliom atrakcyjne kolory, odpowiednio czerwony i żółty. CUR na ogół nie spowodowała zmian właściwości fizykochemicznych folii. Folia CMC75/GEL25, jako najbardziej podatna na rozpuszczanie, zapewniała najszybsze i najkompletniejsze uwalnianie ASX do wody i CUR do 50% etanolu. Folia OSA75/GEL25 zapewniała przedłużone i niekompletne uwalnianie tych przeciwutleniaczy. Folia WSSP75/GEL25 charakteryzowała się uwalnianiem ASX w tempie zbliżonym do kinetyki zerowego rzędu. W folii CMC75/GEL25, CUR uległa enkapsulacji w mikrosferach żelatynowych, co przyczyniło się do jej wysokiej stabilności kolorymetrycznej.

Słowa kluczowe: folie jadalne, polisacharydy, żelatyna, przeciwutleniacze, migracja

Summary

Preparation and characterization of active polysaccharide-gelatin films enriched with antioxidant compounds

Edible films were produced from solutions of mixtures of polysaccharides (carboxymethyl cellulose (CMC), gum arabic (GAR), octenyl succinate starch (OSA), and water-soluble soy polysaccharides (WSSP)) with gelatin (GEL) in a 75:25 ratio, enriched with ascorbyl L-palmitate (AP, 1-2%), astaxanthin (ASX) in the form of AstaSana (AST, 0.25-1%), and curcumin (CUR, 0.005-0.02%). Analyses compared their structural, optical, barrier, mechanical, and antioxidant properties, as well as the kinetics of antioxidant migration into food simulants. The presence of GEL microspheres in the CMC/GEL system, granularity of the WSSP/GEL mixture, and the formation of OSA/GEL coacervates were observed. More homogeneous films (GAR75/GEL25 and OSA75/GEL25) were more transparent than those with heterogeneous microstructures. The linear polysaccharide (CMC) enabled the production of films with higher strength compared to the branched polysaccharides. The OSA75/GEL25 film was the least mechanically strong but the most stretchable. It was not possible to obtain a CMC75/GEL25/AP film. Increasing the content of antioxidants in the films led to an increase in their radical-scavenging and photoprotective potential. The OSA75/GEL25 film exhibited the fastest release of AP into ethanol, effectively neutralizing free radicals. In contrast, the GAR75/GEL25/AP-1% film exhibited the slowest antioxidant action, resembling zero-order kinetics, which can be beneficial for long-term food storage. The addition of AP reduced the solubility of the films and, in some cases, improved their barrier properties against water vapor. AST and CUR gave the films attractive colors, red and yellow respectively. CUR generally did not change the films' physicochemical properties. The CMC75/GEL25 film, being the most soluble, provided the fastest and most complete release of ASX into water and CUR into 50% ethanol. The OSA75/GEL25 film provided prolonged and incomplete release of these antioxidants. The WSSP75/GEL25 film exhibited ASX release at a relatively constant rate, similar to zero-order kinetics. In the CMC75/GEL25 film, CUR was encapsulated in GEL microspheres, contributing to its high colorimetric stability.

Keywords: edible films, polysaccharides, gelatin, antioxidants, migration

4. Wstęp

4.1. Trendy w opakowaniach żywności

Nieustanny wzrost liczby ludności na świecie sprawia, że coraz bardziej dotkliwe stają się problemy związane z nadmierną eksploatacją zasobów naturalnych, hiperkonsumpcjonizmem i zagospodarowaniem odpadów. W odpowiedzi na rosnącą dewastację ekosystemów ziemskich pojawiła się koncepcja zrównoważonego rozwoju społeczno-gospodarczego (tzw. ekorozwoju) wymuszająca nowe zasady relacji między człowiekiem i środowiskiem.

Żywność pełni kluczową rolę w życiu człowieka, zarówno pod względem biologicznym, jak i kulturowym. To, co spożywamy, sposób wytwarzania, pakowania i dystrybucji ma ogromny wpływ na zdrowie ludzi, zasoby naturalne i funkcjonowanie społeczeństwa. Większość środków spożywczych, które trafiają na rynek konsumencki wymaga opakowań handlowych (takich jak puszki, kartony, torebki, saszetki, butelki i słoiki), stanowiących fundament ich trwałości i bezpieczeństwa. W obliczu nowych trendów w zachowaniach konsumentów, w tym nakazowym systemem walki z marnotrawstwem zasobów [1] w myśl koncepcji „zero waste”, technologie opakowań ewoluują, aby skuteczniej ograniczać procesy psucia się żywności. Dzięki coraz bardziej zaawansowanym rozwiązaniom, takim jak aktywne materiały opakowaniowe, możliwe staje się „przedłużenie okresu przydatności do sprzedaży lub też zachowanie lub poprawa stanu opakowanej żywności” [2].

Opakowania aktywne, w odróżnieniu od tradycyjnych, są celowo zaprojektowane aby wchodzić w reakcje z opakowaną żywnością lub atmosferą wewnątrz opakowania. Substancje odpowiedzialne za funkcję aktywną mogą być umieszczone w opakowaniu w saszetce lub wkładce, lub też mogą stanowić część materiału opakowaniowego, np. folii czy butelki. Drugie rozwiązanie zwiększa powierzchnię kontaktu substancji aktywnej z produktem i/lub atmosferą wewnętrzną, co zwiększa skuteczność działania opakowania. W zależności od tworzywa i stabilności substancji czynnej, włączenie składnika do materiału opakowaniowego może odbywać się na etapie mieszania składników, ekstruzji, poprzez impregnację, pokrywanie powierzchni, itp. [3]. Ze względu na mechanizm działania, opakowania aktywne dzieli się na dwie grupy: (i) absorbery składników, np. niepożądanych gazów (tlenu, etylenu, pary wodnej, lotnych związków o nieprzyjemnym zapachu) oraz (ii) emitery uwalniające do opakowanej żywności lub na nią, lub do jej otoczenia substancje spełniające określoną korzystną funkcję w stosunku do danego

produktu, np. substancje wspomagające ochronę przed zepsuciem i/lub zwiększające bezpieczeństwo żywności [4].

Od niedawna w Unii Europejskiej (UE) obowiązuje tzw. dyrektywa SUP (z j. ang. single-use-plastic) [5], której celem jest zapobieganie wpływowi jednorazowych produktów z tworzyw sztucznych (w tym niektórych opakowań) na środowisko oraz zachęcanie do przechodzenia na gospodarkę o obiegu zamkniętym, w tym zastępowanie produktów jednorazowego użytku z tworzyw sztucznych, bardziej zrównoważonymi produktami alternatywnymi [6]. Większość opakowań produktów spożywczych jest w dalszym ciągu produkowana z trudnodegradowalnych tworzyw sztucznych pozyskiwanych z surowców petrochemicznych. Warto nadmienić, że obecnie otrzymuje się również plastik z surowców odnawialnych, takich jak trzcina cukrowa [7]. Obecnie do tzw. „wielkiej piątki” tworzyw sztucznych, mających największy udział rynkowy, należą: politereftalan etylenu (PET), polietylen (PE), polipropylen (PP), polichlorek winylu (PVC) oraz polistyren (PS). Pomimo niewątpliwych walorów plastiku, jego nadprodukcja i problem z zagospodarowaniem odpadów, stanowią poważne obciążenie dla środowiska. Czas użytkowania produktów z tworzyw sztucznych, często jednokrotnego użytku, jest niewspółmiernie krótki do czasu ich rozkładu, który według szacunków wynosi od 100 do 1000 lat. Niedawno pojawił się także problem mikroplastiku, którego wpływ na funkcjonowanie organizmów żywych oraz całe ekosystemy nie został jeszcze zbadany. Ponadto nadmienić należy, że zgodnie z unijnym wykazem [8] do wytwarzania materiałów i wyrobów z tworzyw sztucznych przeznaczonych do kontaktu z żywnością można użyć ponad 1000 substancji, nierzadko szkodliwych [9], jak udowodniono na przykładzie bisfenolu A, formaldehydu, czy ftalanów [10].

Biotworzywa stają się kluczowym elementem w dążeniu do stworzenia w pełni zrównoważonej biogospodarki o obiegu zamkniętym. UE czynnie wspiera prace nad rozwojem tych materiałów i ich wykorzystaniem [11, 12, 13]. Biotworzywa stanowią zróżnicowaną grupę materiałów, które różnią się pod względem pochodzenia, właściwości oraz sposobów unieszkodliwiania po użyciu. Na skalę przemysłową otrzymywane są zarówno z surowców odnawialnych, jak i petrochemicznych. W zależności od pochodzenia oraz zdolności do biodegradacji, można je sklasyfikować w trzech grupach:

- tworzywa pochodzące z surowców odnawialnych, lecz nie ulegające biodegradacji, np. bio-poliamid (bio-PA), bio-PE;
- tworzywa pochodzące z surowców kopalnych (nieodnawialnych), ulegające

biodegradacji, np. polikaprolakton (PCL), poli(adypinian-co-tereftalan-butylenu (PBTA);

- tworzywa pochodzące z surowców odnawialnych i ulegające biodegradacji, np. polilaktyd (PLA), poliglikolid (PGA), skrobia, celuloza.

Mając na uwadze konieczność zmniejszania zależności od wyczerpujących się zasobów surowców kopalnych, a także narastający problem z utylizacją frakcji odpadów nie ulegających szybkiej biodegradacji, ostatnia grupa biotworzyw jest potencjalnie najbardziej proekologiczna [14]. Materiały biodegradowalne stanowią istotny element transformacji branży opakowaniowej. Zgodnie z założeniami ekoprojektowania, zużyte bioopakowania powinny nadać się do recyklingu, w tym recyklingu organicznego w warunkach tlenowych (kompostowanie) lub beztlenowych (biometanizacja). Warto zaznaczyć, że choć każdy materiał kompostowalny jest biodegradowalny, nie każde tworzywo biodegradowalne nadaje się do kompostowania. Biodegradacja to proces rozłożenia się materiału pod wpływem mikroorganizmów – bakterii, grzybów, glonów. Nie ma określonego limitu czasu, w którym ma dojść do tego rozpadu. Z kolei zgodnie z normą EN 13432 [15] opisującą wymagania dotyczące opakowań przydatnych do odzysku przez kompostowanie i biodegradację, minimum 90% wyrobu (np. opakowania) powinno ulegać degradacji w ciągu 180 dni kompostowania, a po jego cyklu w kompoście nie ma widocznych jego pozostałości. Rozkładany wyrób nie może wpływać negatywnie na jakość kompostu, co wymaga przeprowadzenia testów ekotoksyczności, np. wg PN-EN ISO 18763:2020 pt. „Jakość gleby - Oznaczanie toksycznego wpływu zanieczyszczeń na wschody i wczesny wzrost roślin wyższych” [16].

Jeżeli do produkcji opakowania zostaną użyte materiały spożywcze, takie jak polisacharydy, białka, czy lipidy, a metody wytwarzania będą odpowiednie, to otrzymane opakowanie będzie można spożyć razem z zapakowanym produktem. Opakowania jadalne stanowią niszową alternatywę w dziedzinie ekoopakowań. Można je stosować wszędzie tam, gdzie wykorzystanie opakowań z tworzyw sztucznych jest ograniczone. Dobrze znanymi przykładami są osłonki kolagenowe do wędlin, kapsułki żelatynowe, pullulanowe, skrobiowe lub hydroksypropylometylocelulozowe oraz niektóre dodatki do żywności o właściwościach powłokotwórczych, stosowane na powierzchnię świeżych owoców (np. estry glicerolu i żywicy roślinnej, estry sacharozy i kwasów tłuszczowych, воск pszczeli, candelilla i carnauba, szelak) [17]. Nowszymi przykładami zastosowań są rozpuszczalne saszetki i torebki do porcjowania żywności (w tym płynów, przypraw i

kawy), jadalne folie rozdzielające poszczególne komponenty w produktach, a także jadalne owinięcia do hamburgerów i kanapek. Do nurtu opakowań jadalnych należą również naczynia z otrąb pszennych [18] lub szklanki Ello Jello wytwarzane z wodorostów [19]. Produkty linii DO EAT firmy Ecolotec, takie jak jadalne pojemniki deserów i kanapek, foremki do wypieku oraz worki na żywność, otrzymywane są ze skrobi ziemniaczanej. Kaloryczność jednego opakowania wynosi tylko 3,7 kcal [20]. Nadmienić należy, że w myśl art. 3 dyrektywy 94/62/WE Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie opakowań i odpadów opakowaniowych [21], wyrób nie uważa się za opakowanie jeżeli „stanowi integralną część produktu oraz jest niezbędny do zawarcia, utrzymania lub zachowania tego produktu przez jego cały cykl żywotności a wszystkie elementy przeznaczone są do wspólnego użycia, spożycia lub usunięcia”. Ponadto zgodnie z art. 1 rozporządzenia nr 1935/2004, „materiałów pokrywających lub powlekających, takich jak materiały pokrywające sery w postaci skórki, przetworzone produkty mięsne lub owocowe, które tworzą część środków spożywczych i mogą być spożywane razem z tymi środkami spożywczym” nie uważa się za materiały i wyroby przeznaczone do kontaktu z żywnością [22]. W domyśle są one bowiem żywnością.

Ekoprojektowanie opakowań zaczyna się od doboru surowców. Fitomasa, zoomasa oraz biomasa mikroorganizmów, stanowi bogate źródło związków chemicznych (m.in. biopolimerów, przeciwutleniaczy, konserwantów), które można wykorzystać do produkcji opakowań aktywnych. Około 80% żywej biomasy Ziemi stanowią rośliny [23]. Ich hodowla zużywa mniej energii niż hodowla zwierząt, a ponadto podczas wzrostu absorbują CO₂, co przyczynia się do równoważenia śladu węglowego. Przykładowo, wyniki metaanalizy wykazały, że w przeliczeniu na 1 kg produktu, owoce i warzywa mają ponad 100-krotnie mniejszy ślad węglowy niż mięso przeżuwaczy [19, 20, 23]. Biopolimery pochodzenia roślinnego są zatem potencjalnie bardziej przyjazne dla środowiska niż biopolimery zwierzęce. Niemniej jednak biopolimery zwierzęce (m.in. kolagen i żelatyna (GEL), chityna i chitozan, keratyna, kwas hialuronowy, fibroina) oferują specyficzne właściwości, które są trudne do zastąpienia w niektórych zastosowaniach, zwłaszcza w medycynie, kosmetyce, inżynierii biomateriałowej i opakowalnictwie. W związku z tym, wybór między biopolimerami roślinnymi a zwierzęcymi powinien zależeć od specyficznych wymagań aplikacji oraz możliwych korzyści ekologicznych i technologicznych.

Rośliny można uprawiać w sposób zrównoważony na bardzo dużą skalę, co pozwala na stały dostęp do surowców. W konsekwencji biopolimery roślinne, głównie polisacharydy (m.in. celuloza, skrobia, hemicelulozy), w tym ich półsyntetyczne pochodne, są powszechnie stosowane w wielu dziedzinach życia i gałęziach przemysłu. Polisacharydy jako składnik żywności są źródłem energii, decydują o teksturze żywności oraz wspomagają zdrowie układu pokarmowego i sercowo-naczyniowego (jako włókno pokarmowe). W produkcji żywności polisacharydy pełnią funkcję dodatków do żywności (m.in. są to substancje zagęszczające i żelujące, emulgatory), substancji pomocniczych, nośników (np. dodatków do żywności, enzymów, środków aromatyzujących, składników odżywczych i leków) [17]. Niektóre z roślinnych polisacharydów, takich jak celuloza i skrobia termoplastyczna, od dawna pełnią kluczową rolę w przemyśle materiałów opakowaniowych. Celuloza jest głównym składnikiem papieru, tektury i celofanu. Natomiast granulaty ze skrobi termoplastycznej, uzyskiwany w procesie ekstrudowania, umożliwia formowanie folii metodą rozdmuchu, jak również produkcję sztywnych opakowań metodą wtrysku wysokociśnieniowego [26].

4.2. Systemy kontrolowanego uwalniania substancji aktywnych oparte na biopolimerach i ich mieszaninach

W ostatnich latach ogromne zainteresowanie wzbudza możliwość wykorzystania biopolimerów w technologiach biomedycznych mających na celu uzyskanie efektu kontrolowanego uwalniania lub dostarczania substancji czynnej, w tym przyspieszonego, przedłużonego, pulsacyjnego lub opóźnionego działania. Hydrokoloidy roślinne posiadające zdolność modyfikacji farmokinetyki substancji czynnych są powszechnie stosowane w formułacjach wielu leków i suplementów diety [22, 23, 24]. Oprócz farmakoterapii, koncepcja kontrolowanego uwalniania znajduje rosnące zainteresowanie w opakowalnictwie w technologii produkcji emiterów [30]. Opakowania aktywne muszą być indywidualnie dostosowane do konkretnych wymagań produktu, a emiter powinien działać zgodnie z zamierzoną funkcją. Dlatego oprócz zaplanowanej wytrzymałości mechanicznej i właściwości barierowych wobec gazów (takich jak para wodna, tlen, CO₂, dym) oraz światła [31], skuteczność opakowań aktywnych zależy także od pożądanej mobilności substancji czynnej. Uważa się, że emiter powinien umożliwiać ciągłą i równomierną migrację składnika aktywnego w całym okresie przechowywania, tak aby zagwarantować utrzymanie stałego efektywnego stężenia w żywności, na niej lub w jej otoczeniu [30].

Tempo i zakres uwalniania substancji czynnej są determinowane przez jej cechy (takie jak lipofilność, rozpuszczalność), rodzaj nośnika, sposób związania z nośnikiem oraz metodę pomiarową, w tym rodzaj medium akceptorowego i czynniki środowiskowe. Wg wytycznych UE dotyczących rozporządzenia Komisji (WE) nr 450/2009 w sprawie aktywnych i inteligentnych materiałów i wyrobów przeznaczonych do kontaktu z żywnością [32], badania migracji substancji aktywnych powinny być przeprowadzone zgodnie z założeniami, które opisano w dyrektywie 82/711/EEC (ustanawiającej podstawowe zasady, niezbędne w badaniach migracji składników materiałów i wyrobów z tworzyw sztucznych przeznaczonych do kontaktu ze środkami spożywczymi) [33] lub też zgodnie z dedykowanymi testami migracyjnymi. Badania migracji są wykonywane głównie w celu wykazania zgodności materiałów i wyrobów z tworzyw sztucznych do kontaktu z żywnością z dopuszczalnymi prawnie limitami w zakresie migracji globalnej i specyficznej [8]. Jest to jedno z wielu działań mających na celu ochronę zdrowia ludzi przed szkodliwym wpływem plastików. Nadmienić należy, że choć zasady pomiaru migracji opisane w ww. aktach prawnych dotyczą zasadniczo tworzyw sztucznych, to stanowią one cenną podstawę proceduralną dla testowania innych rodzajów materiałów, w tym aktywnych bioopakowań. W przypadku materiałów, takich jak papier i karton, metale, guma lub farby drukarskie, zasady testowania migracji są określone w przepisach krajowych lub wytycznych branżowych. W myśl preambuły dyrektywy 82/711/EEC, ze względu na trudności analityczne związane z określaniem poziomów migracji w odniesieniu do produktów spożywczych, zamiast żywności stosowane są płyny umożliwiające symulowanie oddziaływania na materiały i wyroby do kontaktu z żywnością. Dobór płynu modelowego oraz warunki badania (czas i temperatura) powinny jak najlepiej, w miarę możliwości, odtworzyć zjawisko migracji, które może zachodzić na skutek kontaktu między wyrobem i środkiem spożywczym. Uwzględniając przewidywane zastosowanie, należy mieć na uwadze zarówno warunki przechowywania produktu spożywczego jak i ewentualnej jego obróbki termicznej w opakowaniu. Badania migracyjne opakowań z tworzyw sztucznych przeprowadza się zgodnie z rozporządzeniem (UE) nr 10/2011 z dnia 14 stycznia 2011 r. w sprawie materiałów i wyrobów z tworzyw sztucznych przeznaczonych do kontaktu z żywnością [34] oraz normami serii PN-EN 1186 i PN-EN 13130 [33–37]. Załącznik III rozporządzenia nr 10/2011 zawiera wykaz płynów modelowych imitujących żywność, która ma charakter hydrofilowy (10 % etanol, 3% kwas octowy i 20% etanol, oznakowane odpowiednio jako

płyny modelowe A, B i C) i lipofilny (50 % etanol i każdy olej roślinny zawierający mniej niż 1% niezmydlających się substancji, oznakowane odpowiednio jako płyny modelowe D1 i D2) oraz żywności suchej (poli(tlenek 2,6-difenylo-p-fenyleny) oznakowany jako płyn modelowy E). W niektórych przypadkach stosuje się wodę destylowaną, izooktan i 95% etanol. W załączniku III znajduje się także tabela indywidualnego przyporządkowania płynów modelowych do poszczególnych kategorii żywności. W pewnych wykluczeniach, należy stosować warunki badania odzwierciedlające najgorsze przewidywalne warunki stosowania materiału pod względem czasu kontaktu i temperatury [8]. Wg PN-EN 1186-3, -5, -7, -9 [35–38] badania migracji w zależności od rodzaju wyrobu realizowane mogą być poprzez jego całkowite zanurzenie, z zastosowaniem komory pomiarowej, z zastosowaniem torebki lub przez napełnienie wyrobu.

Odpowiedni dobór jakościowy i ilościowy składników, w tym ich mieszanie (kompandowanie), i/lub odpowiednie postępowanie technologiczne pozwala na profilowanie kinetyki uwalniania substancji czynnej. Inaczej mówiąc dzięki odpowiedniej formulacji możliwe jest uzyskanie zarówno materiałów o natychmiastowym, jak i długotrwałym uwalnianiu. W jadalnych foliach aktywnych substancja czynna jest najczęściej równomiernie rozproszona w polimerowej matrycy, co jest wynikiem wcześniejszego mieszania składników. W takim przypadku, podobnie jak w procesach farmakokinetycznych, migracja substancji z nośnika jest determinowana przez tempo dyfuzji oraz podatność nośnika na pęcznienie i erozję. Ww. procesy zawsze współistnieją, a przewaga jednego z nich jest zależna zarówno od właściwości substancji czynnej, jak i nośnika. Kinetykę migracji substancji czynnej z nośnika do płynu akceptorowego można oceniać za pomocą modelowania matematycznego, które pozwala na określenie mechanizmu uwalniania (np. na podstawie wartości współczynnika dyfuzyjnego n modelu Korsmeyer-Peppasa (K-P)) oraz wyznaczenie stałej szybkości uwalniania [39]. Zasadniczo biopolimery mogą ulegać lub nie ulegać pęcznieniu, co zależy m.in. od rodzaju zastosowanego płynu modelowego. Jeśli materiał ulega spęcznieniu, to powstała warstwa żelu o zwiększonej lepkości ogranicza jego wnikanie do matrycy, co hamuje dyfuzję substancji czynnej i w konsekwencji opóźnia jej migrację. Z kolei na skutek erozji nośnika (w kontakcie z płynem akceptorowym) dochodzi do uwalniania substancji na drodze ścierania żelu oraz zmiany powierzchni matrycy, co jest istotnym czynnikiem kontrolującym i modyfikującym uwalnianie [29]. W przypadku folii jadalnych głównym czynnikiem determinującym mechanizm i kinetykę uwalniania jest rodzaj polimeru.

Przykładowo, hydrokoloidy o właściwościach żelujących i/lub zagęszczających, takie jak GEL i skrobia, tworzą pęczniejące folie, które nie są w pełni rozpuszczalne w wodzie. Powoduje to wolniejsze uwalnianie składników aktywnych w porównaniu z łatwo erodującymi foliami otrzymanymi z karboksymetylocelulozy (CMC), izolatu białek sojowych lub pullulanu [28,29,30,31]. Warto zauważyć, że biopolimery posiadają zwykle wiele wariantów różniących się takimi parametrami jak masa cząsteczkowa, stopień podstawienia (DS), stopień rozdrobnienia, czy lepkość roztworu. Taka dywersyfikacja w połączeniu z możliwością stosowania gradientu stężeń zarówno polimeru, jak i substancji czynnej, pozwala na istotną modyfikację profilu uwalniania [29]. Innym sposobem modyfikacji tempa uwalniania jest stosowanie blend polimerowych [30, 31, 32]. Mieszanie umożliwia łączenie zalet różnych polimerów lub niwelowanie ich wad, prowadząc do uzyskania materiału o pożądanych właściwościach, takich jak wytrzymałość, elastyczność, barierowość, odporność na czynniki fizykochemiczne, itp. [45]. Dobrym przykładem jest folia PA/PE, która charakteryzuje się doskonałymi właściwościami barierowymi oraz dużą wytrzymałością mechaniczną. Cechy te sprawiają, że obecnie jest ona jednym z najlepszych materiałów do pakowania produktów spożywczych w atmosferze zmodyfikowanej oraz w próżni [46].

Kompiowanie biopolimerów umożliwia wytwarzanie produktów o ulepszonych lub nowych właściwościach, obniżenie kosztów (np. poprzez mieszanie z tańszymi polimerami) i wspieranie zrównoważonego rozwoju (np. poprzez domieszkowanie materiałami o mniejszym śladzie węglowym). Z tego powodu mieszanki i kompozyty polimerowe stanowią przedmiot zainteresowania wielu gałęzi przemysłu, w tym branży tworzyw opakowaniowych [45, 47]. Blendy polimerowe są jednorodnymi (wzajemnymi) roztworami lub *quasi*-jednorodnymi (koloidalnymi) mieszaninami polimerów o różnorodnej strukturze chemicznej, które zazwyczaj powstają poprzez bezpośrednie mechaniczne mieszanie w stanie ciekłym, uplastycznionym termicznie lub stałym (stapianie mechaniczne), a także w roztworach, lub poprzez współwytwarzanie tych polimerów w procesie ich równoczesnej syntezy w tym samym ośrodku. Wbrew pozorom, dobór składu blend polimerowych wymaga dużej wiedzy z zakresu termodynamiki roztworów oraz mieszanin, reologii i oddziaływań fizykochemicznych między polimerami. Generalnie w przypadku wielu mieszanin polimerów, entropia odgrywa większą rolę niż entalpia. Oznacza to, że wpływ nieuporządkowania (entropii) jest silniejszy niż wpływ energetycznych oddziaływań między cząsteczkami (entalpii). W związku z tym, polimery

mają tendencję do tworzenia oddzielnych faz zamiast mieszać się jednolicie [48]. W pełni homogeniczne mieszaniny polimerów są rzadko spotykane w zastosowaniach praktycznych, a ich wytwarzanie nie jest niezbędne do spełnienia wymogów użytkowych stawianych tworzywom. Konieczne jest jednak wytwarzanie stabilnych blend, które nie ulegają makroskopowemu rozwarstwieniu w trakcie ich otrzymywania i użytkowania. Spełnienie tego warunku wymaga przede wszystkim doboru polimerów, które wykazują zadawalającą współmieszalność w określonych proporcjach, lub też dodatku kompatybilizatorów. W sprzyjających warunkach można uzyskać układy charakteryzujące się silnymi oddziaływaniami międzycząsteczkowymi, takimi jak wiązania kowalencyjne, wodorowe lub wzajemnie przenikające się sieci polimerowe [49].

W organizmach żywych szeroko rozpowszechnione są połączenia białko/polisacharyd. W zależności od specyfiki budowy oraz warunków środowiska, białka i wielocukry mogą wchodzić ze sobą w interakcje, takie jak oddziaływania Van der Waalsa, elektrostatyczne, hydrofobowe, wiązania wodorowe i wiązania chemiczne (np. wskutek reakcji Maillarda). W ich wyniku tworzą się mniej lub bardziej trwałe kompleksy, rozpuszczalne lub nierozpuszczalne w wodzie, lub też dochodzi do wzajemnego wykluczania się polimerów. W efekcie otwiera to szerokie możliwości modyfikacji ich właściwości fizykochemicznych, co umożliwia produkcję tworzyw o specyficznych cechach [45, 46, 47, 48]. Kompleksy polisacharydowo-białkowe, zwłaszcza koacerwaty, są użyteczne w chemicznym mikrokapsułkowaniu substancji aktywnych. Powstałe w ten sposób nośniki zabezpieczają wrażliwe składniki przed niekorzystnymi warunkami środowiskowymi, kontrolują ich (długotrwałe) uwalnianie i poprawiają biodostępność [54]. Racjonalne wykorzystanie technik kapsułkowania wymaga zrozumienia fizykochemicznych mechanizmów, w wyniku których związki czynne są kapsułkowane, a następnie uwalniane [55].

Koacerwacja to proces który zachodzi w roztworach koloidalnych. Polega na asocjacyjnym oddzieleniu się fazy koloidalnej z roztworu zawierającego jeden (koacerwacja prosta) lub więcej polimerów (koacerwacja złożona). Powstała oddzielna faza ciekła (mikroskopijne kropelki lub grudki), bogata w koloid, nazywana jest koacerwatem. W procesie koacerwacji prostej, koacerwaty powstają w wyniku mechanizmu odwodnienia lub „deficytu wody” spowodowanego dodatkiem soli lub cieczy desolvacyjnej (np. etanolu). Koacerwacja złożona polega przede wszystkim na elektrostatycznym oddziaływaniu w medium reakcyjnym polimerów kationowych i

anionowych, ale inne rodzaje oddziaływań również spełniają ważną rolę w procesie asocjacji. Podczas enkapsulacji metodą koacerwacji, koacerwowany polimer osadza się wokół aktywnego składnika (rdzenia), co prowadzi do jego opadania. GEL jest najprawdopodobniej najczęściej wykorzystywanym kationowym polimerem w procesie koacerwacji. Różnorodne polisacharydy, takie jak alginiany, CMC, guma arabska (GAR), oktenylobursztynian skrobiowy (OSA) oraz pektyny, mogą reagować z GEL tworząc złożone koacerwaty, odpowiednie do kapsułkowania zarówno hydrofilowych, jak i hydrofobowych substancji aktywnych. Proces koacerwacji najefektywniej zachodzi w określonych warunkach pH i siły jonowej oraz przy odpowiednich proporcjach biopolimerów [54, 55].

Oprócz asocjacyjnej separacji fazowej do mikrokapsułkowania wykorzystać można przeciwstawną technikę, czyli segregacyjną separację fazową [58]. W tej metodzie różne biopolimery są rozpuszczone we wspólnym rozpuszczalniku, ale z powodu termodynamicznej niekompatybilności nie mieszają się i/lub wzajemnie odpychają tworząc dwie oddzielne fazy ciekłe [49, 57]. Jedna z faz zawiera polimer formujący mikrokapsułki, druga zaś zawiera polimer obecny w układzie tylko po to by utworzyć oddzielną fazę rozpraszającą (ciągłą). Nie przewiduje się obecności polimeru z fazy dyspersyjnej w końcowym składzie kapsułek, jednak może on w niej występować jako nieuniknione zanieczyszczenie [55]. Zjawisko termodynamicznej niezgodności występuje często w mieszaninach białek i polisacharydów obojętnych lub anionowych mających ładunek tego samego znaku co białko, co oczywiście zależy od pH i siły jonowej środowiska. W wyniku autoasocjacji makromolekuł tego samego typu separacja objawia się współistnieniem dwóch faz: bogatej w białko i bogatej w polisacharyd. W takich układach może również dochodzić do flokulacyjnego odseparowania dużych skupisk białek, które zostały zdenaturowane pod wpływem ciepła lub posiadają strukturę micelną (np. kazeina). Niekiedy heterogeniczna struktura układu białkowo-polisacharydowego jest widoczna dopiero pod mikroskopem [51]. Zjawisko rozdziału układów białko-polisacharydowych jest dość powszechne i może zachodzić między różnymi rodzajami białek i polisacharydów w zależności od warunków środowiskowych, takich jak pH. Przykładowo, obserwowano separację między GEL a neutralnymi polisacharydami, takimi jak hydroksyetyloceluloza lub pullulan [58, 40], a także między dekstranem lub hydroksyetylocelulozą a różnymi białkami (albumina surowicy bydlęcej, γ -globulina czy lizozym) różniącymi się punktem izoelektrycznym (pI). Separacja między neutralnymi

polisacharydami (dekstran, maltodekstryna, metyloceluloza (MC)) a białkami serwatkowymi zachodzi tylko w wąskim zakresie pH (5-7). W przypadku polisacharydów anionowych, takich jak pektyny o wysokim stopniu metylacji, alginian sodu czy CMC, obserwuje się separację tylko w przypadku zdenaturowanych białek serwatkowych [53]. Wykazano także niekompatybilność termodynamiczną między CMC a GEL [59]. Warto zaznaczyć, że w niektórych przypadkach, jak np. układ GEL/ κ -karagen, zmieniając czynniki środowiskowe, takie jak pH, można uzyskać przejście między fazową separacją asocjacyjną a segregacyjną [62].

4.3. Charakterystyka wybranych związków przeciwutleniających

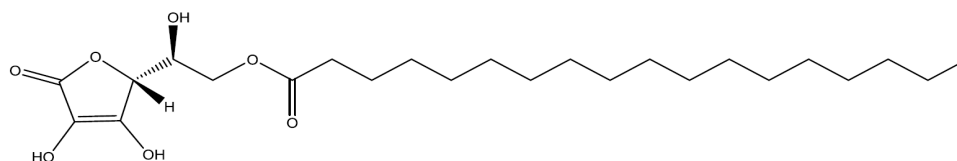
Jedną z głównych przyczyn pogarszania się jakości żywności są reakcje utleniania, które nie tylko negatywnie wpływają na właściwości sensoryczne i wartość odżywczą żywności, ale stwarzają zagrożenie zdrowotne z uwagi na toksyczność niektórych produktów reakcji. Istotną grupę opakowań aktywnych stanowią zatem opakowania inhibujące procesy utleniania. W przypadku pochłaniaczy, działanie takie uzyskuje się m.in. poprzez umieszczenie w opakowaniu absorbenta tlenu lub blokera UV. Z kolei w przypadku emiterów aktywację opakowania zapewnia włączenie w skład materiału jednego lub kilku inhibitorów utleniania przeznaczonych do uwolnienia. Takie przeciwutleniacze powinny być przede wszystkim wysoce skuteczne (wykazywać szerokie spektrum działania już przy niskich stężeniach), akceptowalne przez konsumentów, kompatybilne ze składnikami opakowania, zgodne z wymogami prawnymi, niepowodujące niepożądanych zmian w cechach sensorycznych produktu oraz tanie. Ostateczny wybór przeciwutleniacza zależy od indywidualnych potrzeb, preferencji oraz specyficznego kontekstu użycia. Ważne jest również, aby być świadomym badań naukowych i zaleceń dotyczących stosowania zarówno naturalnych, jak i syntetycznych przeciwutleniaczy.

Obecnie wzrasta zapotrzebowanie na produkty naturalne, organiczne i wolne od sztucznych dodatków. Naturalne przeciwutleniacze, pomimo na ogół ich mniejszej trwałości i skuteczności w porównaniu z przeciwutleniaczami syntetycznymi, uważane są za bezpieczniejsze, gdyż stanowią nieodłączną część diety człowieka. Naturalne przeciwutleniacze, takie jak ekstrakty ziół, przypraw, owoców i warzyw (np. ekstrakt rozmarynu i papryki), związki fenolowe (np. antocyjany, kwasy fenolowe, katechiny, kurkumina, resweratrol), czerwień buraczana (betanina), kwas askorbinowy, tokoferole, karotenoidy (np. beta-karoten, luteina, likopen) cenione są za swoje prozdrowotne

właściwości, w tym działanie przeciwzapalne, przeciwnowotworowe i wspierające układ odpornościowy.

Witamina C (kwas L-askorbinowy (AA) i L-dehydroaskorbinowy) pełni w organizmie szereg funkcji biochemicznych i fizjologicznych, które w dużej mierze wynikają z jej właściwości redukujących. Będąc donorem wodoru lub elektronów, AA jest kofaktorem wielu enzymów, w tym hydroksylaz i oksigenaz, i tym samym uczestniczy w wielu istotnych procesach, takich jak synteza kolagenu, L-karnityny i katecholamin, metabolizm tłuszczów (np. przemiana cholesterolu do kwasów żółciowych). W roztworze wodnym AA łatwo wychwytuje reaktywne formy tlenu i azotu [63]. W związku z powyższym witamina C jest stosowana jako suplement diety [64], produkt leczniczy [65], substancja wzbogacająca [66] i dodatek do żywności [17]. Na skalę przemysłową AA otrzymywany jest z sześciowęglowych cukrów prostych, głównie glukozy [67]. W UE do stosowania w żywności dopuszczone są następujące formy witaminy C: AA, jego sole (sodowa, wapniowa i potasowa) i palmitynian L-askorbylu (AP) [66]. W funkcji dodatków do żywności związki te oznakowane są numerami od E 300 do E 304(i), przy czym E 304 to estry kwasów tłuszczowych i AA. Ponadto stosować można kwas izoaskorbinowy (inaczej kwas erytrobowy) (E 315) i izoaskorbinian sodu (E 316) [17]. W odróżnieniu od pozostałych pochodnych AA, AP, jako ester kwasu tłuszczowego i AA (Rysunek 1), ma charakter amfifilowy, dzięki czemu ma właściwości powierzchniowo-czynne [68]. AP jest praktycznie nierozpuszczalny w wodzie (0,00003 g/l w 25 °C) [69], za to bardzo dobrze rozpuszcza się w etanolu. AP jest powszechnie określany jako lipofilna forma witaminy C, choć dane dotyczące jego rozpuszczalności w oleju nie są dostępne. Dzięki właściwościom amfifilowym, AP łatwiej przenika przez błony lipidowe, przez co może być efektywniej dystrybuowany do tkanek organizmu. Wykazano, że AP chroni przed oksydacyjnym uszkodzeniem DNA i w ten sposób hamuje namnażanie się komórek nowotworowych (ma właściwości antyproliferacyjne) [70]. W porównaniu z AA, AP jest bardziej stabilny i wolniej wydalany z organizmu wraz z moczem [71]. Estryfikowana postać AA może być zatem atrakcyjnym przeciwutleniaczem w produkcji opakowań aktywnych, zwłaszcza jadalnych. Niemniej jednak częściowo hydrofobowy charakter, w połączeniu z wysoką temperaturą topnienia (107–117 °C) [72], utrudnia stosowanie AP w wodnych roztworach foliotwórczych (FFS). Uzyskanie stabilniejszych emulsji wymaga dodatku kosolwenta (etanolu) i/lub emulgatora [63, 64]. Dotychczas AP, w połączeniu z α -tokoferolem, zastosowano jako składnik aktywny jadalnej powłoki wytworzonej z białek serwatkowych.

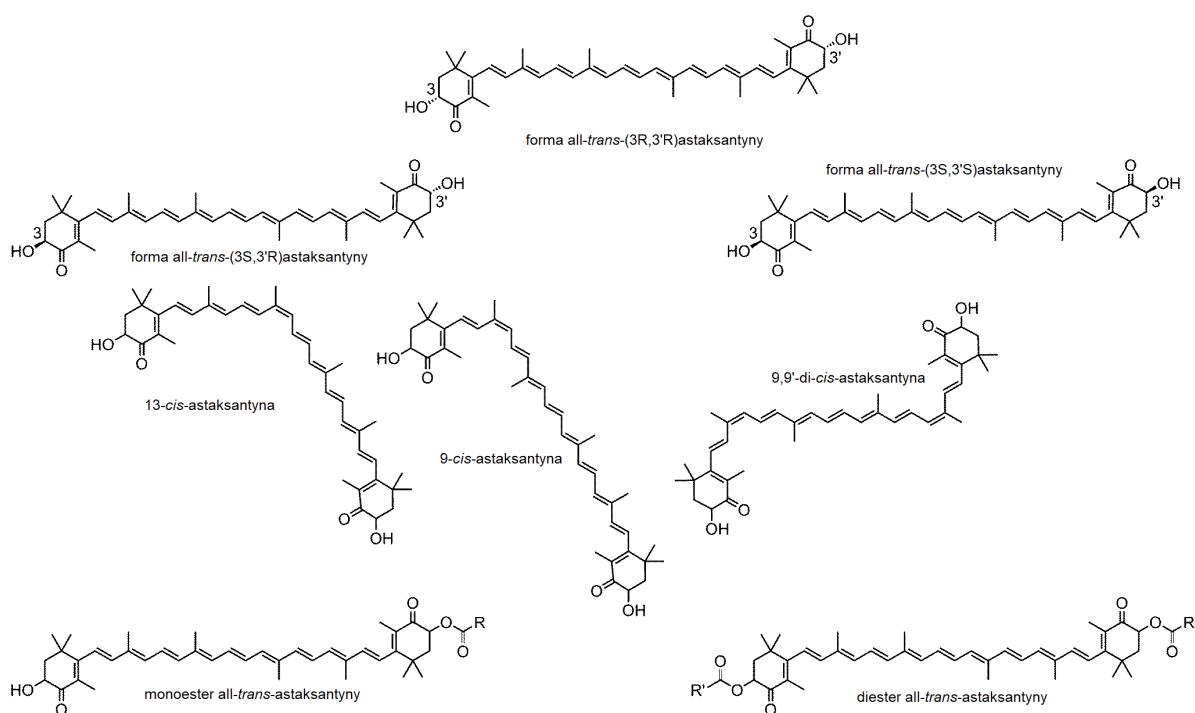
Niemniej jednak, powłoka taka, zarówno z dodatkiem przeciwutleniaczy, jak i bez, w jednakowym stopniu spowolniła proces utleniania tłuszczu w prażonych orzechach ziemnych [74].



Rysunek 1. Struktura chemiczna AP [75].

Karotenoidy to polienowe pigmenty, które wspomagają fotosyntezę i chronią rośliny przed reaktywnymi formami tlenu, dzięki czemu ich spożywanie wspiera fotoprotekcję i ochronę komórek przed wolnymi rodnikami również w organizmach zwierząt i ludzi. Dodatkowo, karotenoidy zawierające pierścień β -jononu są prekursorami witaminy A [76]. Naturalne karotenoidy są pozyskiwane przez ekstrakcję z roślin lub alg. Pomimo wielu korzyści zdrowotnych, ich wadą jest niska stabilność, zmienność składu barwników (co może powodować problemy z standaryzacją barwy) oraz obecność niepożądanych substancji towarzyszących. Zapotrzebowanie rynku na karotenoidy, w tym witaminę A, jest ogromne, dlatego głównym sposobem ich pozyskiwania jest nadal synteza chemiczna. Spośród niemal 700 naturalnie występujących karotenoidów, tylko kilka (likopen, kantaksantyna, astaksantyna (ASX), β , β -karoten, β -apo-8'-karotenal, β -apo-8'-karoten i cytranaksantyna) jest syntetyzowanych na skalę przemysłową [77]. Wśród nich szczególną uwagę zyskała ASX (3,3'-dihydrokso- β , β -karoten-4,4'-dion). Na dowód, roczna liczba publikacji na temat tego ksantofilowego barwnika wzrosła z 29 prac w 2001 roku do 414 prac w 2022 roku. Do tej pory w bazie PubMed zindeksowano ponad 3500 prac dotyczących ASX [78]. Powodem zainteresowania ASX jest jej wielokierunkowa aktywność, w tym działanie kardioprotekcyjne, hepatoprotekcyjne, proimmunologiczne, przeciwzapalne, przeciwneurodegeneracyjne, przeciwnowotworowe oraz poprawiające wzrok i stan skóry. Działanie prozdrowotnie naturalnej ASX wynika głównie z jej silnego działania antyoksydacyjnego. Wg niektórych badań, aktywność przeciwutleniająca ASX jest nawet 54 razy większa niż β -karotenu, 65 razy większa niż witaminy C oraz 500 razy większa niż witaminy E i koenzymu Q10 [79]. ASX ma trzy stereoizomery, w tym dwa enancjomery (3R,3'R) i (3S,3'S) oraz formę mezo (3R, 3'S) (Rysunek 2). ASX posiada również różne izomery geometryczne, wśród których dominuje all-trans ASX. W przyrodzie oraz w ASX uzyskanej drogą syntezy chemicznej występują, co najmniej dwa

izomery cis [80]. Naturalna ASX występuje przeważnie w formie zestryfikowanej cząsteczkami kwasów tłuszczowych (jako monoester lub diester) (Rysunek 2). Trzynaście sprzężonych podwójnych wiązań nadaje ASX czerwoną barwę. Obecność długiego hydrofobowego łańcucha oraz dwóch grup hydroksylowych i dwóch grup karbonylowych sprawiają, że ASX jest amfifilowa, przez co wykazuje duże powinowactwo do błon komórkowych, które z łatwością pokonuje. W ten sposób lepiej chroni komórki przed stresem oksydacyjnym aniżeli β -karoten i luteina [81]. Źródłem ASX w diecie człowieka są niektóre skorupiaki morskie (np. langusta, krab, krewetka) i ryby (łosoś, pstrąg różowy). W EU przemysł farmaceutyczny, kosmetyczny i spożywczy używa wyłącznie naturalnej ASX. „Bogata w ASX oleożywica z alg *Haematococcus pluvialis*” została dopuszczona jako nowa żywność do stosowania w suplementach diety. W myśl rozporządzenia wykonawczego Komisji (UE) 2024/1026 z dnia 8 kwietnia 2024 r. zmieniającego rozporządzenie wykonawcze (UE) 2017/2470 w odniesieniu do specyfikacji nowej żywności „bogata w astaksantynę oleożywica z alg *H. pluvialis*”, ASX jest rozcieńczana i standaryzowana do poziomu 2,5%, 5%, 7%, 10%, 15% lub 20% z zastosowaniem niektórych olejów [82]. Nową żywnością jest także olej ze skorupkiaka *Calanus finmarchicus*, będący źródłem estrów ASX [83]. Barwnik ten obecny jest również w oleju z kryla antarktycznego (*Euphausia superba*).



Rysunek 2. Struktura chemiczna wolnej i zestryfikowanej ASX [84].

Chemiczna synteza ASX jest obecnie najbardziej opłacalna, dlatego jej syntetyczne preparaty zdominowały ponad 95% rynku pasz. Dla porównania koszt produkcji 1 kg syntetycznej ASX szacuje się na około 1000 \$, podczas gdy jej wartość rynkowa wynosi ponad 2000 \$. 1 kg ASX pozyskanej z drożdży *Xanthophyllomyces dendrorhous* (znanych też jako *Phaffia rhodozyma*), kosztuje 2500 \$, natomiast 1 kg ASX z alg *H. pluvialis* to koszt 7000 \$. Syntetyczna ASX charakteryzuje się niższą zdolnością neutralizacji wolnych rodników tlenowych niż naturalna ASX. Wynika to m.in. z faktu, że nie zawiera substancji towarzyszących oraz ma specyficzny skład izomerów. Przykładowo, w mięsie dzikiego łosia dominującym izomerem jest (3S,3'S) (70-85%), a formy (3R,3'R) i mezo stanowią odpowiednio 12-28,2% i 2-6% [78, 79]. Z kolei ASX z *H. pluvialis* składa się w 87,6% z formy (3S,3'S), w 10,1% z formy mezo i w 2,3% z formy (3R,3'R). ASX z *P. rhodozyma* zawiera 98,5% enancjomeru (3R,3'R) i 1,5% formy mezo [87]. ASX syntetyczna zazwyczaj składa się z mieszaniny stereoizomerów (3R,3'R), (3R, 3'S) i (3S,3'S) w proporcji 1:2:1 [81]. Warto zauważyć, że niemal wszystkie badania wykazujące korzystne dla zdrowia efekty działania ASX u ludzi przeprowadzono z wykorzystaniem stereoizomeru (3S,3'S). Chociaż dane dotyczące biodostępności i dystrybucji u ludzi wszystkich izomerów ASX są ograniczone, dostępne dane *in vitro* i *in vivo* sugerują, że to izomer 13-cis ASX, a nie 9-cis ASX, jest selektywnie wchłaniany, tj. ma wyższą biodostępność. Prawdopodobnie powstaje on w wyniku izomeryzacji all-trans ASX. Toksyczność poszczególnych izomerów ASX nie została przebadana indywidualnie. Wg Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) dopuszczalne dzienne spożycie (ADI) dla ASX, tak syntetycznej, jak i pochodzącej z *H. pluvialis*, wynosi 0,2 mg/kg masy ciała (m.c.) [88].

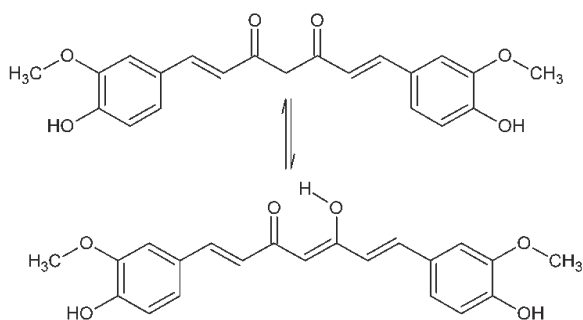
Dimetyldibursztynian ASX (DMDS-ASX) jest dopuszczony do stosowania jako dodatek paszowy dla ryb i skorupiaków. Związek ten nie ma szkodliwych skutków dla zdrowia zwierząt, bezpieczeństwa konsumentów ani środowiska [89]. W jelitach ryb DMDS-ASX jest hydrolizowany i przekształcany w wolną ASX, która następnie jest wchłaniana, metabolizowana i rozprowadzana do tkanek. DMDS-ASX jest wrażliwy na utlenianie, światło i temperaturę, dlatego konieczne jest jego stabilizowanie za pomocą przeciwutleniaczy i ewentualnie dodatkowe osadzenie w matrycy z polisacharydów i/lub GEL. Preparaty syntetycznej ASX są dyspergowalne w zimnej wodzie i mają większą biodostępność niż naturalna ASX [78, 88, 89]. Od 2013 r. na rynku dostępna jest syntetyczna wolna (tj. niezestryfikowana) ASX, która jest identyczna z naturalną, ale ma

inny, jak uprzednio wspomniano, stosunek izomerów [80]. Wg producenta DSM Nutritional Products LLC, zgodnie z przepisami amerykańskiego prawa żywnościowego, taka ASX nie wymaga autoryzacji przez Agencję ds. Żywności i Leków (FDA) [92]. Niemniej jednak w 2020 r. firma złożyła powiadomienie o zamiarze wprowadzenia na rynek amerykański syntetycznie otrzymanej krystalicznej ASX, o handlowej nazwie AstaSana 5% CWS/S-TG (AST), jako nowego składnika dietetycznego (nr zgłoszenia 1173) [93]. Od 2020 r. preparat jest już formalnie dopuszczonym suplementem diety, który można spożywać w bezpiecznej dobowej dawce wynoszącej maksymalnie 12 mg/kg m.c. (czyli 240 mg AST/kg m.c.) [94].

Biorąc pod uwagę niską cenę, brak w składzie oleju oraz zdolność do dyspergowania w wodzie, preparat AST wydaje się być atrakcyjniejszym składnikiem folii aktywnych w porównaniu do oleożywicy z alg lub olejów zawierających ASX. Wykorzystanie ASX o czystości analitycznej, nawet w pilotażowych badaniach laboratoryjnych, z reguły nie jest brane pod uwagę z powodu zbyt wysokiego kosztu zakupu (np. ~2000 zł za 0,5 g estrów ASX z *H. pluvialis*) oraz niską stabilność [95]. Niemniej jednak badania Colín-Chávez i in [2013][96] wykazały, że naturalna ASX o czystości >97% (wzorzec do wysokosprawnej chromatografii cieczowej) może być komponentem folii z PE. Migracja ASX do 95% etanolu, w temperaturach 23-40 °C (w odróżnieniu od 10 °C), przebiegała zgodnie z prawem dyfuzji Ficka. Ze względu na rosnące zainteresowanie opakowaniami fortyfikowanymi ASX [93, 94], można przewidywać, że w nadchodzących latach znacząco wzrośnie liczba badań i publikacji poświęconych temu zagadnieniu.

Kurkumina (CUR) ((1E,6E)-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyfenylo)-1,6-heptadien-3,5-dion) to żółty pigment polifenolowy otrzymywany z korzeni ostryżu długiego (*Curcuma longa*), czyli tzw. kurkumy. Związek może występować w dwóch formach tautomerycznych: ketonowej (dominującej w środowisku kwaśnym i obojętnym) oraz enolowej (występującej tylko w środowisku zasadowym) (Rysunek 3). CUR jest praktycznie nierozpuszczalna w wodzie (maksymalna rozpuszczalność wynosi 3,12 mg/l w temp. 25 °C). Wodne roztwory/dyspersje CUR można jednak otrzymać dzięki dodaniu niektórych biopolimerów, środków powierzchniowo-czynnych, lipidów lub cyklodekstryn [99]. CUR jest odporna na działanie wysokich temperatur, aż do 120°C, ale szybko ulega degradacji pod wpływem takich czynników jak alkalia, tlen, światło i dwutlenek siarki. Największą stabilność CUR wykazuje w roztworach kwaśnych (zwłaszcza w pH od 2,5 do 6,5), w których przyjmuje barwę jaskrawożółtą. W środowisku obojętnym i zasadowym

ulega degradacji zmieniając barwę na czerwono-brązową [100]. Oprócz niestabilności chemicznej, główną wadą CUR jest jej słaba biodostępność związana z ograniczoną absorpcją, szybkim metabolizowaniem i eliminacją z organizmu [101]. CUR jest stosowana jako barwiący dodatek do żywności (E 100) [17]. Wg EFSA, ADI dla CUR wynosi 3 mg/kg m.c. [102]. CUR wykazuje plejotropowe działanie prozdrowotne, m.in. przeciwutleniające, przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, przeciwdrobnoustrojowe i przeciwwirusowe. Unikalne właściwości CUR sprawiły, że jest chętnie wykorzystywana do otrzymywania aktywnych (przeciwutleniających i przeciwmikrobiologicznych) oraz inteligentnych materiałów opakowaniowych (głównie indykatorów pH). Jako nośniki CUR stosowano folie otrzymane z różnych polisacharydów, białek, PLA, polialkoholu winylowego oraz ich mieszanin [103].



Rysunek 3. Forma ketonowa i enolowa CUR [104]

Przy inkorporacji przeciwutleniaczy do żywności należy pamiętać, iż dodatek niektórych z nich w stężeniu wyższym niż optymalne może przyspieszyć utlenianie i spowodować efekt odwrotny od zamierzonego [105]. Oprócz rodzaju i stężenia przeciwutleniacza, na końcowy efekt ochronny wpływa również środowisko, w tym rodzaj nośnika. Przykładowo związki fenolowe mają zdolność tworzenia kompleksów z białkami, co może pozytywnie lub negatywnie wpłynąć na ich dostępność oraz aktywność antyoksydacyjną [106].

Związki zapewniające ochronę przeciwutleniającą żywej komórce, można m.in. podzielić ze względu na środowisko, w którym działają. Zdecydowanie przeważającym objętościowo środowiskiem jest faza wodna, obejmująca cytoplazmę i wnętrza organelli komórkowych. Drugim środowiskiem są warstwy lipidowe błon komórkowych, gdzie zachodzi proces peroksydacji nienasyconych kwasów tłuszczowych. Polarne związki wykazują wiele cech, których nie posiadają związki apolarne, i na odwrót. Antyoksydanty hydrofilowe i hydrofobowe są selektywnie rozpuszczalne odpowiednio w fazie wodnej i

lipidowej. Z kolei związki amfifilowe występują w obydwu fazach lub na ich granicy [107]. Zgodnie z teorią tzw. paradoksu polarnego przeciwutleniaczy, hydrofilowe związki wykazują większą skuteczność w mniej polarnych fazach, takich jak olej czy smalec, a związki lipofilowe wykazują wyższą aktywność w bardziej polarnych fazach, takich jak emulsje typu olej w wodzie, liposomy, błony biologiczne czy tkanki [108]. Wynika to z ukierunkowanego gromadzenia się przeciwutleniaczy na granicy międzyfazowej (olej-powietrze lub olej-woda), która w rzeczywistości jest miejscem kontaktu pomiędzy wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi a tlenem.

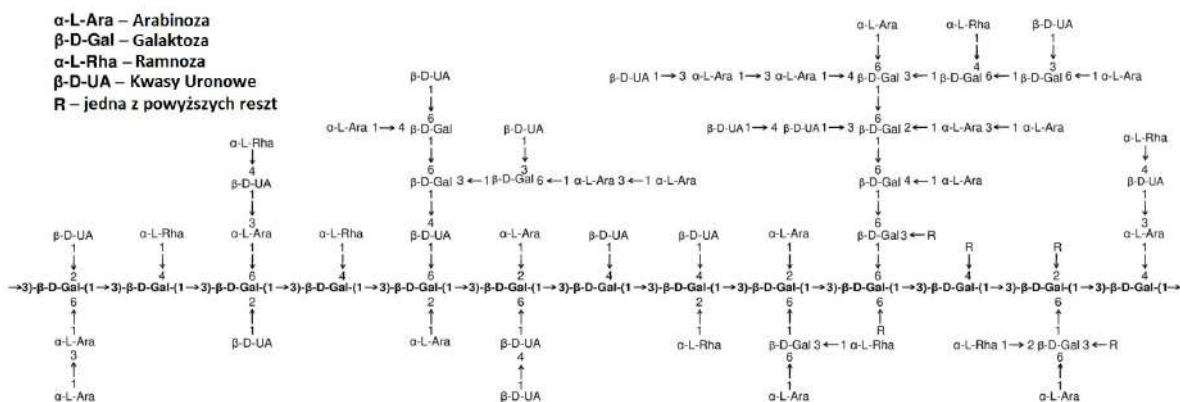
Podejście obejmujące teorię paradoksu polarnego można wykorzystać w projektowaniu emiterów. Innymi słowy, przykładowo dodatek przeciwutleniaczy apolarnych do materiału przeznaczonego do aplikacji na powierzchnię uwodnionej żywności może przynieść więcej korzyści niż zastosowanie związków posiadających wysokie powinowactwo do fazy wodnej. Polarne przeciwutleniacze mogą zbyt szybko i/lub nadmiernie dyfundować, co może niekorzystnie wpłynąć na jakość produktu.

4.4. Charakterystyka wybranych biopolimerów foliotwórczych

Uniwersalny nośnik, czyli przeznaczony do załadowania zarówno hydrofilowymi, jak i hydrofobowymi substancjami, powinien być zaprojektowany z myślą o jego dwufazowości (amfifilowości), możliwościach tworzenia mikroenkapsulantów i/lub porowatej struktury. Odpowiedni dobór biopolimerów i technologii wytwarzania pozwala na stworzenie nośników zdolnych do efektywnego wiązania, stabilizowania i uwalniania różnych substancji czynnych.

GAR, znana też jako guma akacjowa, to silnie rozgałęziony heteropolisacharyd, który dzięki obecności hydrofilowych grup cukrowych oraz pewnej ilości hydrofobowych ugrupowań białkowych posiada właściwości amfifilowe. GAR zaliczana jest do hemiceluloz stanowiących frakcję włókna pokarmowego. Łańcuch główny polisacharydu składa się z jednostek β -D-galaktopiranozyłowych połączonych wiązaniami 1,3-glikozydowymi (Rysunek 4). GAR pozyskiwana jest z żywicy pnia i gałęzi drzew akacji senegalskiej (*Acacia senegal*) oraz innych gatunków z rodziny *Acacia*. GAR charakteryzuje się bardzo dobrą rozpuszczalnością w wodzie i stosunkowo niską lepkością roztworów [109]. Jest dodatkiem do żywności (E 414) [17], wykorzystywanym jako stabilizator, emulgator, zagęszczacz, substancja glazurująca i środek mikroenkapsulujący.

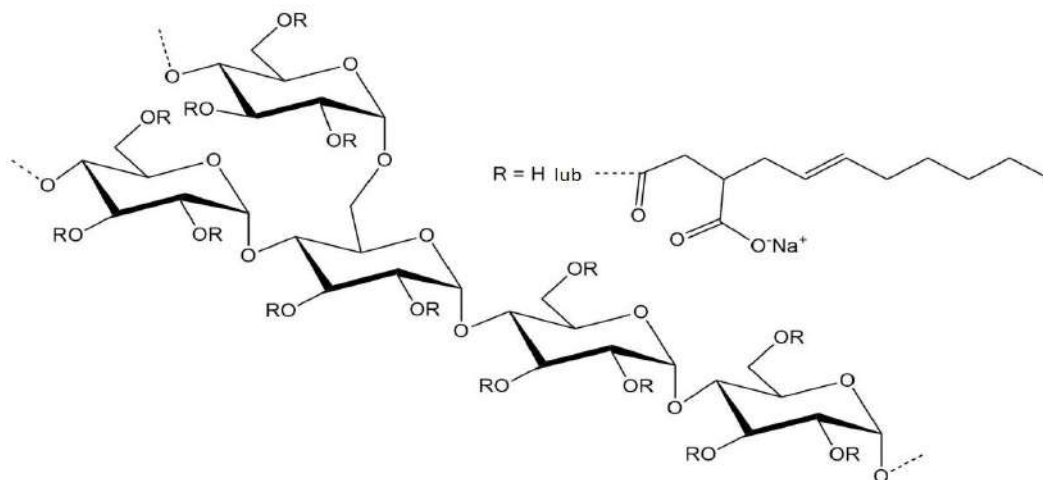
Folie jadalne otrzymywane z GAR są wysoce przezroczyste, jednak ich wadą jest nadmierna kruchość [110].



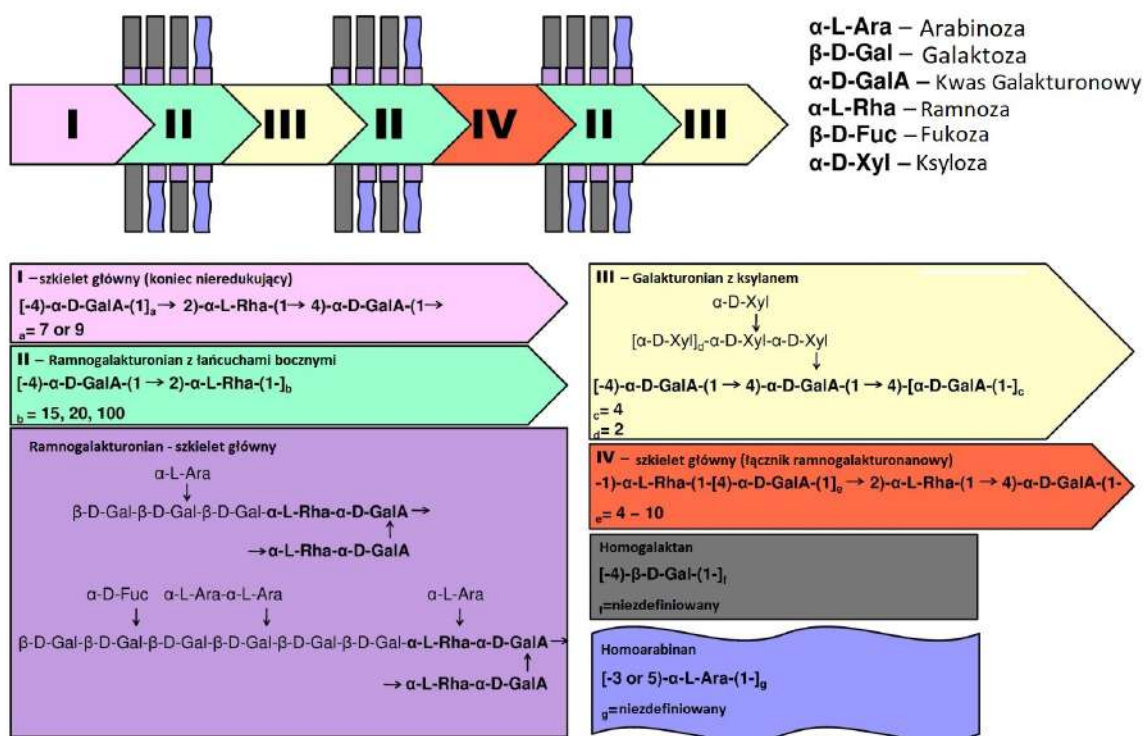
Rysunek 4. Struktura GAR [P6].

Natywna skrobia jest z natury hydrofilowa. Istnieje jednak możliwość nadania jej właściwości amfifilowych na drodze modyfikacji chemicznej. Estryfikowanie skrobi (zazwyczaj woskowej) bezwodnikiem kwasu oktenylobursztynowego umożliwia uzyskanie OSA, który w postaci soli sodowej lub soli glinowej jest dodatkiem do żywności (o numerach odpowiednio E 1450 i E 1452) [17]. OSA stanowi tańszy zamiennik dla naturalnych emulgatorów, w tym GAR. Rozgałęziona struktura amylopektyny w OSA odgrywa istotną rolę, ponieważ przeciwdziała skupianiu się kropli oleju. OSA działa jako surfaktant i stabilizator powodujący wzrost lepkości fazy ciągłej emulsji, co przeciwdziała koalescencji. Podstawnik w OSA może być przyłączony do drugiego, trzeciego i szóstego węgla w cząsteczce glukozy (Rysunek 5), w ilości nieprzekraczającej 3% suchej masy (s.m.) [72], co odpowiada $DS \approx 0,02$. Dzięki obecności grupy oktenylobursztynianowej skrobia uzyskuje charakter anionowy, przez co ma zdolność do elektrostatycznych interakcji, jak już wspomniano w podrozdziale 4.2. OSA jest także używana do mikrokapsułkowania bioaktywnych substancji lipidowych za pomocą procesu suszenia rozpyłowego [111, 112].

Rozpuszczalny polisacharyd sojowy, znany również jako hemiceluloza sojowa lub **wodnorozpuszczalne polisacharydy sojowe (WSSP)** otrzymuje się z soi lub śruty sojowej w wyniku odtłuszczenia, ekstrakcji gorącą wodą, oczyszczania (strącania etanolem), sterylizacji i suszenia. Podobnie jak GAR, WSSP należą do silnie rozgałęzionych hemiceluloz (Rysunek 6) posiadających resztę polipeptydową. WSSP nie



Rysunek 5. Struktura soli sodowej OSA [P6].



Rysunek 6. Struktura WSSP [P6].

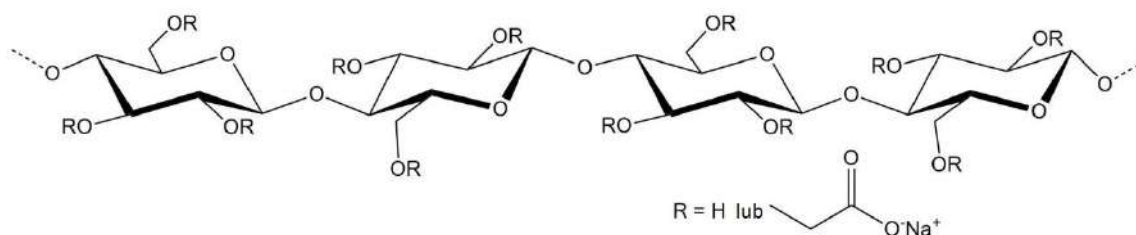
tworzą żelu. Są dodatkiem do żywności z grupy emulgatorów (numer E 426). Stosowane są również w produkcji suplementów błonnikowych [17, 72, 113]. Z powodu obecności cząsteczek kwasu galakturonowego i kwasu ramnodigalakturonowego, WSSP zaliczane są do polisacharydów kwaśnych. Po dodaniu białka do roztworu WSSP, grupy karboksylowe polisacharydu łączą się z grupami aminowymi białka, dzięki czemu powstałe kompleksy są

ujemnie naładowane i odpychają się od siebie, co zapobiega agregacji i wytrącaniu białka. Ma to duże znaczenie praktyczne [114]. Folie otrzymane z WSSP są przezroczyste i rozpuszczalne w wodzie [115].

Celuloza, jako główny składnik ścian komórkowych roślin, jest dominującym polimerem na Ziemi. Polisacharyd ten stanowi kluczowy składnik wielu materiałów roślinnych, takich jak drewno, papier, bawełna, bambus itp. Częsteczka celulozy jest liniowa i składa się z kilkuset lub nawet kilku tysięcy reszt glukozydzonych połączonych wiązaniami β -1,4-glikozydowymi. Dwa główne rodzaje celulozy to celuloza krystaliczna, w której łańcuchy glukozy ułożone są w regularne struktury, oraz celuloza amorficzna, która zawiera mniej uporządkowane struktury. Dodatkowo, w komórkach roślinnych, łańcuchy celulozy często tworzą mikrofibryle, które są poukładane w sieci wzmacniające ściany komórkowe i nadające roślinom ich charakterystyczną sztywność. Ze względu na silne wewnątrz- i międzycząsteczkowe wiązania wodorowe pomiędzy łańcuchami, celuloza jest nierozpuszczalna w wodzie i większości rozpuszczalników organicznych [116]. W związku z tym przeprowadza się chemiczną modyfikację celulozy w celu poprawy jej właściwości fizykochemicznych, w tym wprowadza się nowe grupy funkcyjne w celu nadania rozpuszczalności [117].

MC to eterowa pochodna celulozy, która jest rozpuszczalna w wodzie, jak też w rozpuszczalnikach organicznych. Jest niejonowym hydrofilowym polimerem o właściwościach termozelujących. Obecność grup metyloowych sprawia, że wykazuje ona większą hydrofobowość w porównaniu do czystej celulozy. Dzięki temu ma zdolność redukcji napięcia powierzchniowego i międzyfazowego, co czyni ją użyteczną w różnych zastosowaniach. W przemyśle spożywczym MC jest powszechnie stosowana jako zagęszczacz i emulgator (E 461) [17]. Wysokocząsteczkowe rodzaje MC umożliwiają kontrolowanie uwalniania substancji czynnych z tabletek matrycowych. MC posiada bardzo dobre właściwości foliotwórcze, dzięki czemu może stanowić alternatywę dla GEL w produkcji kapsułek [118]. Obecnie jednak w tym celu wykorzystywana jest głównie hydroksypropylometyloceluloza (HPMC, E 464), która ma właściwości podobne do MC, lecz jest bardziej hydrofilowa [119]. **CMC** jest z kolei polisacharydem anionowym (Rysunek 7), który nie wykazuje właściwości termozelujących. W postaci soli sodowej (E 466) CMC jest wykorzystywana jako zagęstnik, stabilizator emulsji, nośnik, antykrystalizator, środek wiążący/zatrzymujący wilgoć, poprawiający teksturę i folio-

/powłokotwórczy. W połączeniu z innymi polimerami CMC umożliwia kontrolowane uwalnianie substancji czynnych, w tym przeciwutleniaczy [120].



Rysunek 7. Struktura soli sodowej CMC [P6].

Zgodnie z załącznikiem I pkt 7.7. rozporządzenia (WE) nr 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady, GEL „oznacza naturalne rozpuszczalne białko, żelujące lub nie żelujące, uzyskane w wyniku częściowej hydrolizy kolagenu pochodzącego z kości, skóry i skórek oraz ścięgien zwierząt” [121]. Z chemicznego punktu widzenia GEL jest zatem mieszaniną różnych polipeptydów, zasadniczo o takiej samej strukturze pierwszorzędowej jak kolagen. Głównymi aminokwasami GEL są glicyna (~33%), prolina (~12%), alanina (~11%) i hydroksyprolina (~10%). W wyniku hydrolizy kwasowej lub zasadowej, otrzymuje się odpowiednio GEL typu A i typu B. W środowisku alkalicznym łańcuchy boczne asparaginy i glutaminy łatwo hydrolizują do kwasu asparaginowego i glutaminianowego. W konsekwencji GEL typu A i B różnią się niektórymi właściwościami fizykochemicznymi. Przykładowo pI GEL typu A jest wyższy (6-9) niż GEL typu B (4,8-5,2) [122]. Jest to istotne, gdyż elektrostatyczne przyciąganie może występować między GEL a anionowymi polisacharydami przy pH roztworu $<pI$ GEL oraz między GEL a kationowymi polisacharydami przy pH roztworu $>pI$ GEL [123]. Dzięki obecności aminokwasów hydrofilowych i hydrofobowych, GEL jest białkiem powierzchniowo-czynnym, przy czym jej właściwości emulgujące są na ogół słabsze w porównaniu z innymi związkami amfifilowymi, takimi jak białka globularne czy GAR. Niemniej jednak doskonałe właściwości żelujące (10% roztwór zastyga w temperaturze od 24 do 29°C) i zagęszczające GEL [124] pomagają utrzymać stabilność układu olej-woda, zapobiegając separacji faz w czasie formowania folii emulsyjnych [125]. Właściwości folio-/powłokotwórcze GEL wynikają głównie z jej wyjątkowych właściwości żelujących. Proces ten jest postrzegany jako próba powrotu pojedynczych łańcuchów polipeptydowych GEL do postaci natywnego kolagenu. Żel żelatynowy stabilizowany jest głównie wiązaniami wodorowymi, ale w żelowaniu mają także znaczenie oddziaływania

hydrofobowe i jonowe. Siłę żelowania GEL określa się w skali Bloom od 50 do 300 g. Mniejsza ilość GEL o wyższej wartości Bloom jest potrzebna, aby osiągnąć pożądaną siłę żelu. Na ogół folie otrzymywane z GEL wykazują bardzo dobrą wytrzymałość mechaniczną i stanowią doskonałą barierę dla tlenu (w warunkach niskiej wilgotności względnej powietrza (RH)). W kontakcie z wodą początkowo pęcznieją, a następnie ulegają częściowemu lub całkowitemu rozpuszczeniu w zależności od temperatury [122]. Na uwagę zasługuje fakt, że możliwe jest wytłaczanie folii żelatynowych na skalę przemysłową przy użyciu ekstrudera [126]. Produkcja folii żelatynowych z wykorzystaniem ubocznych produktów przemysłu mięsnego i rybnego wpisuje się w koncepcję gospodarki o obiegu zamkniętym. Ponadto GEL posiada właściwości przeciwutleniające, a jej spożywanie korzystnie wpływa na stan tkanki łącznej, w tym skóry, paznokci, chrząstek i ścięgien [127].

Wybór biopolimeru do produkcji opakowań zwykle musi uwzględniać właściwości barierowe, mechaniczne, optyczne, przetwarzalność, dostępność, koszty, regulacje prawne oraz aspekty środowiskowe. Wytypowanie odpowiedniego nośnika dla substancji czynnej jest kluczowym etapem, który wpływa na stabilność składnika aktywnego i kinetykę jego uwalniania, a tym samym na jakość i efektywność całego systemu. W dostępnej literaturze brakuje kompleksowych opracowań dotyczących wpływu rodzaju matrycy biopolimerowej na aktywność osadzonych w nich substancji czynnych. W związku z tym w niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzono szczegółową analizę porównawczą właściwości folii uzyskanych z różnych polisacharydów i ich mieszanin z GEL. Oczekiwać można, że równoczesne porównanie umożliwi pogłębienie, weryfikację i usystematyzowanie wiedzy na temat możliwości uzyskiwania różnych profili i mechanizmów uwalniania poprzez kształtowanie parametrów charakteryzujących właściwości materiałowe.

5. Hipoteza i cel badań

Hipoteza badawcza pracy zakłada, że odpowiedni dobór składników folii, takich jak polisacharydy, GEL i związki o właściwościach przeciwutleniających, oraz ich właściwe proporcje umożliwiają otrzymanie aktywnego materiału opakowaniowego o pożądanych właściwościach użytkowych, m.in. o wysokiej aktywności przeciwrodnikowej, równomiernym uwalnianiu składnika aktywnego, wysokiej foto-protekcji, przezroczystości, wytrzymałości mechanicznej i barierowości dla pary wodnej.

Głównym celem badań było: (i) porównanie właściwości strukturalnych, fizykochemicznych, przeciwutleniających i kinetyki uwalniania substancji aktywnych z folii polisacharydowo-żelatynowych wzbogacanych wzrastającymi ilościami AP, AST i CUR oraz (ii) określenie zależności między strukturą materiału, jego właściwościami a oczekiwaną funkcją.

W oparciu o cel główny sformułowano następujące cele szczegółowe:

- porównanie właściwości strukturalnych i fizykochemicznych folii otrzymanych z polisacharydów (GAR, MC, OSA, WSSP), GEL i ich mieszanin w stosunku 75/25, 50/50, 25/75;

- porównanie właściwości strukturalnych, fizykochemicznych, przeciwutleniających i kinetyki uwalniania substancji czynnej z folii polisacharydowo-żelatynowych (GAR75/GEL25, OSA75/GEL25 i WSSP75/GEL25) wzbogacanych wzrastającymi ilościami AP (0, 1, 2%);

- porównanie właściwości strukturalnych, fizykochemicznych, przeciwutleniających i kinetyki uwalniania substancji czynnej z folii polisacharydowo-żelatynowych (CMC75/GEL75, GAR75/GEL25, OSA75/GEL25 i WSSP75/GEL25) wzbogacanych wzrastającymi ilościami AST (0; 0,25; 0,5; 1%);

- porównanie właściwości strukturalnych, fizykochemicznych, przeciwutleniających i kinetyki uwalniania substancji czynnej z folii polisacharydowo-żelatynowych (CMC75/GEL75, GAR75/GEL25, OSA75/GEL25 i WSSP75/GEL25) wzbogacanych wzrastającymi ilościami CUR (0; 0,005; 0,01; 0,02%).

6. Materiały i metody

6.1. Materiał badawczy

Folie wytwarzano z polisacharydów, GEL, glicerolu (plastyfikator) i przeciwutleniaczy. Charakterystykę surowców, wg opisu producentów, przedstawiono w Tabeli 1. W przypadku folii zawierających AP, zastosowano dodatek emulgatora Tween 80 (znany również jako E 433 lub monooleinian polioksyetylenosorbitolu (polisorbata 80)).

Tabela 1. Ogólna charakterystyka surowców zastosowanych do otrzymywania folii.

Surowiec	Producent	Skrót	Charakterystyka
Guma arabska Agri-Spray Acacia R	Agrigum International, Wielka Brytania	GAR	<ul style="list-style-type: none"> • Zawartość wody: 10% • Węglowodany: 90% • Białko: 2% • Popiół: 4%
Metyloceluloza Methocel A15 LV	Sigma Chemical Co, Stany Zjednoczone	MC	<ul style="list-style-type: none"> • Zawartość wody: <3% • Zawartość chlorku sodu: max. 2% • DS: 27,5–31,5%
Karboksymetyloceluloza WALOCEL CRT 30 GA	Dow Wolff Cellulosics, Niemcy	CMC	<ul style="list-style-type: none"> • DS: 0,82–0,95%
Sól sodowa oktenylobursztynianu skrobiowego PURITY GUM 2000	Ingredion, Niemcy	OSA	<ul style="list-style-type: none"> • Zawartość wody: max. 10% • Węglowodany: min. 97g/100g s.m. • Białko: max. 0,5g/100g s.m. • Tłuszcz: max. 0,15g/100g s.m. • Popiół: 5% • DS: 0,2%
Wodnorozpuszczalne polisacharydy sojowe	Gushen Biological Technology Group Co., Chiny	WSSP	<ul style="list-style-type: none"> • Zawartość wody: ≤7 • Rozpuszczalne polisacharydy sojowe: ≥ 70% • Popiół: ≤ 5%
Żelatyna wieprzowa	McCormick-Kamis Polska S.A, Polska	GEL	<ul style="list-style-type: none"> • Siła żelowania: 240° Blooma
Glicerol	Sigma Chemical, Stany Zjednoczone	-	<ul style="list-style-type: none"> • Zawartość: ≥99,5%
Palmitynian L-askorbylu	Sigma Chemical, Stany Zjednoczone	AP	<ul style="list-style-type: none"> • Zawartość: ≥99%
AstaSana 5% CWS/S-TG	DSM, Holandia	AST	<ul style="list-style-type: none"> • Skład: ASX (5%), skrobia modyfikowana, syrop glukozowy, DL-α-tokoferol, askorbinian sodu
Kurkumina (z <i>Curcuma longa</i>)	Sigma Chemical, Stany Zjednoczone	CUR	<ul style="list-style-type: none"> • Zawartość: ≥ 65%
Tween 80	Sigma Chemical, Stany Zjednoczone	-	<ul style="list-style-type: none"> • Współczynnik równowagi hydrofilowo-lipofilowej (HLB): 15

W celu rozpuszczenia AP i CUR zastosowano 99,8% etanol (POCH, Polska). Do oznaczenia aktywności przeciwutleniających folii, w zależności od rodzaju dodanego przeciwutleniacza, zastosowano 2,2'-azyno-bis(etylobenzotiazolino-6-sulfonian) (ABTS) lub 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl (DPPH) (Sigma Chemical, Stany Zjednoczone).

6.2. Otrzymywanie folii

6.2.1. Folie z polisacharydów, żelatyny i ich mieszanin

Folie otrzymywano z 5% (m/m) wodnych roztworów GAR, OSA, MC, WSSP i GEL, zawierających 1% (m/m) glicerolu. W celu całkowitego rozpuszczenia GAR, OSA i WSSP, FFS ogrzewano w łaźni wodnej (90°C) przez 30 min. Z powodu termożelowania, MC rozpuszczano dwustopniowo, najpierw poprzez ogrzewanie (90°C) z 1/3 wymaganej objętości wody, a następnie mieszanie z pozostałą częścią wody ochłodzonej do temperatury 4°C. FFS polisacharydowo-żelatynowe otrzymano poprzez zmieszanie (40°C, 30 min) 5% (m/m) roztworów polisacharydowych z 5% (m/m) roztworem żelatynowym w proporcjach: 75/25, 50/50 i 25/75. FFS odgazowano, wylano (w ilości 0,0125 g składników niewodnych/cm²) na wypoziomowane płytki pokryte Teflonem (o powierzchni 144 cm² i 4 cm²) i wysuszono (25°C, ~12 h). Uzyskane folie pocięto na próbki do badań.

6.2.2. Folie polisacharydowo-żelatynowe z dodatkiem palmitynianu L-askorbylu

Folie otrzymywano z wodnych roztworów zawierających 7,5% (m/m) polisacharydu (GAR, OSA, lub WSSP); 2,5% (m/m) GEL; 1% glicerolu; 1 lub 2% (m/m) AP; 0,25% (m/m) Tween 80 oraz 20% (v/m) etanolu. Poszczególne polisacharydy mieszano z GEL, glicerolem oraz wodą, a następnie ogrzewano w łaźni wodnej (90°C) przez 30 min. Po ochłodzeniu do ~40°C do FFS dodano AP rozpuszczony w etanolu z dodatkiem Tween 80. Emulgację mieszaniny prowadzono za pomocą homogenizatora H-500 (Pol-Eko-Aparatura, Polska) z prędkością 20 000 obr./min przez 60 s, a następnie 14 000 obr./min przez 40 s. Z FFS uzyskano folie jak w pkt 6.2.1 Folie kontrolne otrzymano z roztworów niezawierających AP.

6.2.3. Folie polisacharydowo-żelatynowe z dodatkiem astaksantyny AstaSana

Folie otrzymywano z wodnych roztworów zawierających 3,75% (m/m) polisacharydu (CMC, GAR, OSA, lub WSSP); 1,25% (m/m) GEL; 1% (m/m) glicerolu oraz 0,25, 0,5 lub 1% (m/m) AST. Poszczególne polisacharydy mieszano z GEL, glicerolem oraz wodą, a następnie ogrzewano w łaźni wodnej (90°C) przez 1 h. FFS ochłodzono do ~40°C, a następnie zmieszano (30 000 obr./min, 2 min) z AST za pomocą

homogenizatora MT-30K (Hangzhou Miu Instruments Co., Ltd., Chiny). Z FFS uzyskiwano folie jak w pkt 6.2.1 Folie kontrolne otrzymano z FFS niezawierających AST.

6.2.4. Folie polisacharydowo-żelatynowe z dodatkiem kurkuminy

Folie otrzymywano z wodnych roztworów zawierających 3,75% (m/m) polisacharydu (CMC, GAR, OSA, lub WSSP); 1,25% (m/m) GEL; 1% (m/m) glicerolu; 0,005, 0,01 lub 0,002% (m/m) CUR oraz 4% (v/m) etanolu. Poszczególne polisacharydy mieszano z GEL, glicerolem oraz wodą, a następnie ogrzewano w łaźni wodnej (90°C) przez 1 h. FFS ochłodzono do ~40°C, a następnie wymieszano za pomocą mieszadła magnetycznego (800 obr./min, 100 min) z etanolem roztworem CUR. Z FFS uzyskano folie jak w pkt 6.2.1 Folie kontrolne otrzymano z roztworów nie zawierających CUR.

6.3. Metody badań roztworów foliotwórczych

W zależności od zasadności przeprowadzenia obserwacji i/lub pomiarów, FFS analizowano za pomocą:

- mikroskopu odwróconego CKX53 (Olympus, Japonia),
- mikroskopu LEICA5500B z polaryzacją i kontrastem różnicowo-interferencyjnym (DIC) (Leica Microsystems GmbH, Niemcy),
- skaningowego mikroskopu elektronowego Carl Zeiss Ultra Plus z komorą krio (Carl Zeiss, Niemcy) (cryo-SEM),
- analizatora ZetaPlus/Bi-MAS (Brookhaven Instruments Co., Stany Zjednoczone) do pomiaru rozmiaru cząstek i potencjału zeta (Zp) metodą dynamicznego rozpraszania światła (DLS),
- pH-metru CPC 401 z elektrodą ERH-11S (Elmetron, Polska).

6.4. Metody badań folii

6.4.1. Pomiar grubości i aklimatyzacja

Grubość próbek folii mierzono za pomocą grubościomierza elektronicznego Mitotuyo 547-401 (Mitotuyo, Japonia). Pomiaru wykonywano w kilku miejscach próbki. Przed badaniami próbki folii aklimatyzowano (25°C, RH 50%, 48 h) w komorze klimatycznej MLR-350H (Sanyo Electric Biomedical Co., Ltd., Japonia).

6.4.2. Właściwości strukturalne

Mikrotopografię folii wizualizowano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego Carl Zeiss Ultra Plus (Carl Zeiss, Niemcy). W uzasadnionych przypadkach mikrostrukturę folii dodatkowo obserwowano za pomocą mikroskopu optycznego (Olympus CKX53 lub LEICA5500B). Widma światła podczerwonego odbitego od folii uzyskano za pomocą spektrometru podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) PerkinElmer SP 100 (PerkinElmer, Stany Zjednoczone) lub Thermo Nicolet 8700 (Thermo Scientific, Stany Zjednoczone), z wykorzystaniem metody osłabionego odbicia całkowitego (ATR). Obecność faz krystalicznych badano metodą szerokokątowej dyfraktometrii rentgenowskiej (WAXD) za pomocą dyfraktometru URD 6 (Seifert-FPM, Niemcy).

6.4.3. Właściwości optyczne

Oznaczenie barwy folii w systemie CIELab lub CIELCh wykonano na białym tle za pomocą kolorymetru NH310 (3nh, Chiny). Przepuszczalność światła UV/VIS przez folie określono za pomocą spektrofotometru Lambda 40 (Perkin-Elmer, Stany Zjednoczone). Nieprzezroczystość (OP, A_{600}/x) folii obliczono ze wzoru (1):

$$OP = A_{600}/x \quad (1)$$

gdzie: A_{600} – absorbancja przy długości fali 600 nm, x – grubość próbki (mm).

W uzasadnionych przypadkach dokumentowano wygląd ogólny otrzymanych folii przy użyciu aparatu fotograficznego.

6.4.4. Właściwości fizykochemiczne

Zawartość wody (WC) w foliach oznaczono metodą suszarkową (105°C, 24 h). W zależności od rodzaju folii, rozpuszczalność (S_o , %) oraz zdolność absorpcji (S_w , %) wody lub płynów modelowych imitujących żywność (pkt 6.4.8) obliczano wg wzoru (2) i (3):

$$S_o = \frac{w_i - w_u}{w_i} \times 100\% \quad (2)$$

gdzie: w_i – początkowa masa próbki, w_u – masa pozostała po rozpuszczeniu próbki.

$$S_w = (w_i - w_s) \times 100\% \quad (3)$$

gdzie: w_i – początkowa masa próbki, w_s – masa próbki po absorpcji pynu.

Hydrofobowość powierzchniową folii z dodatkiem AP (i ich odpowiedników kontrolnych) oznaczono poprzez pomiar kąta zwilżania za pomocą goniometru Phoenix Mini (Surface Electro Optics, Korea).

6.4.5. Właściwości barierowe

Szybkość przenikania pary wodnej przez folie (WVP, $\text{g mm m}^{-2} \text{ d}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$) obliczono ze wzoru (4):

$$\text{WVP} = (\text{WVTR} \times L) / \Delta p \quad (4)$$

gdzie: WVTR – szybkość przenikania pary wodnej przez folię ($\text{g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) zmierzona metodą wagową [128] w temperaturze 25°C; L – grubość folii (mm); Δp – różnica ciśnień pary wodnej (kPa) po obu stronach folii.

Szybkość przenikania tlenu przez folie (OTR, $\text{cm}^3 \mu\text{m m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) oznaczono za pomocą analizatora MultiPerme O₂-CO₂ (Extra Solution Instrument, Włochy). Analizie OTR poddano jedynie folie CMC75/GEL25 i OSA75/GEL25 z dodatkiem AST (oraz ich odpowiedniki kontrolne).

6.4.6. Właściwości mechaniczne

Cechy wytrzymałościowe folii, takie jak wytrzymałość na zerwanie (TS, MPa), wydłużenie względne przy zerwaniu (E, %), moduł sprężystości wzdłużnej (EM, %) i wytrzymałość na przebicie (PS, MPa), określono za pomocą analizatora tekstury TA-XT2i Stable Micro Systems (Wielka Brytania). Parametry obliczono wg następujących wzorów (5-8):

$$\text{TS} = F_{\text{max}} / A \quad (5)$$

gdzie: F_{max} – maksymalna siła rozciągająca (N), A – powierzchnia przekroju początkowego próbki (mm^2)

$$E = (\Delta L / L) \times 100 \quad (6)$$

gdzie: L – długość początkowa próbki (mm), ΔL – przyrost długości próbki

$$\text{EM} = (\sigma_2 - \sigma_1) / (\varepsilon_2 - \varepsilon_1) \quad (7)$$

gdzie: σ_1 - naprężenie (MPa) przy wartości wydłużenia $\varepsilon_1 = 0,2$ (0,67%), σ_2 - naprężenie

(MPa) przy wartości wydłużenia $\varepsilon_2 = 0,4$ (1,33%)

$$PS = F_{\max}/A \quad (8)$$

gdzie: F_{\max} – maksymalna siła przebijająca (N), A – powierzchnia przekroju początkowego próbki (mm^2)

6.4.7. Właściwości termiczne

W celu uzyskania wglądu w zmiany zachodzące w foliach w warunkach podwyższonej temperatury (do 300°C), przeprowadzono badania z wykorzystaniem różnicowego kalorymetru skaningowego DSC 2920 (TA Instrument, Stany Zjednoczone). Analizie poddano jedynie folie z dodatkiem CUR (w tym odpowiedniki kontrolne).

6.4.8. Migracja przeciwutleniaczy do płynów modelowych imitujących żywność

Szczegółowe parametry wykonywania pomiarów migracji przeciwutleniaczy z folii do płynów akceptorowych przedstawiono w Tabeli 2. W przypadku folii z dodatkiem AP jako płyn akceptorowy zastosowano alkohol etylowy. Jest to zamiennik płynu modelowego imitującego żywność D2 (oleju roślinnego) zalecany do stosowania w przypadku, gdy badanie migracji przy użyciu płynu D2 jest technicznie niewykonalne [129]. Próbki folii mieszano z etanolem za pomocą mieszadła magnetycznego. Kinetykę uwalniania AP monitorowano w sposób okresowy za pomocą spektrofotometru płytkowego EPOCH2 (BioTek, Stany Zjednoczone). Migrację CUR badano w sposób ciągły za pomocą spektrofotometru Lambda 40 wyposażonego w kuwetę przepływową i pompę perystaltyczną PESI B2190036 (PerkinElmer, Stany Zjednoczone), przy czym jako płyn akceptorowy zastosowano 50% (v/v) etanol (płyn modelowy D1).

Na podstawie ogólnego przyporządkowania płynów modelowych imitujących żywność do rodzajów żywności, zalecanych do stosowania w badaniach migracji substancji z tworzyw sztucznych przeznaczonych do kontaktu z żywnością, płyny D1 i D2 są przyporządkowane do żywności, która ma charakter lipofilny i z której można uzyskiwać substancje lipofilne. Ponadto, płyn modelowy D1 zastępuje żywność zawierającą $>20\%$ alkoholu oraz żywność typu olej w wodzie. Z kolei płyn modelowy D2 stosuje się w przypadku żywności, która ma warstwę wolnych tłuszczów na powierzchni [34].

Tabela 2. Parametry pomiaru kinetyki uwalniania przeciwutleniaczy z folii do płynów modelowych imitujących żywność.

Parametr	AP	AST	CUR
Płyn akceptorowy	99,8 % etanol	woda	50 % etanol
Objętość płynu akceptorowego (ml)	50	25	20
Powierzchnia próbki (cm ²)	4	4	4
Sposób kontaktu z płynem akceptorowym	mieszanie przy użyciu mieszadła magnetycznego (100 rpm)	wytrzásanie przy użyciu inkubatora laboratoryjnego (170 rpm)	mieszanie przy użyciu mieszadła magnetycznego (170 rpm)
Temperatura płynu akceptorowego (°C)	25	30	25
Czas kontaktu (h)	30	4	0,5
Długość fali zastosowana do detekcji przeciwutleniacza (nm)	247	464	425

Do badania migracji AST jako płyn akceptorowy zastosowano wodę destylowaną. Kinetykę uwalniania AST monitorowano w sposób okresowy za pomocą spektrofotometru płytkowego EPOCH2 (BioTek, Stany Zjednoczone).

Kinetykę uwalniania przeciwutleniaczy analizowano za pomocą solvera obliczeniowego DDSolver 1.0 do arkusza kalkulacyjnego programu Excel [39]. W celu porównania mechanizmów i szybkości uwalniania przeciwutleniaczy (m.in. wyznaczenia czasów ćwierćuwalniania ($t_{25\%}$) i/lub półuwalniania ($t_{50\%}$)) dane eksperymentalne interpretowano za pomocą kilkunastu równań matematycznych o różnej liczbie predyktorów (Tabela 3 i 4). Jako wskaźnik dopasowania modeli zastosowano kryterium informacyjne Akaikego (AIC) i/lub skorygowany współczynnik determinacji ($R^2_{\text{skorygowany}}$) [39].

6.4.9. Aktywność przeciwutleniająca

Aktywność przeciwutleniającą folii określono poprzez pomiar zdolności neutralizacji syntetycznych wolnych rodników, metodą bezpośredniego kontaktu materiału z roztworem rodnika. Szczegółowe parametry wykonywania pomiarów przedstawiono w Tabeli 5. Aktywność przeciwrodnikową folii z dodatkiem AP oraz CUR (i ich odpowiedników kontrolnych) monitorowano w sposób ciągły za pomocą spektrofotometru Lambda 40 wyposażonego w kuetę przepływową i pompę perystaltyczną PESI B2190036 (PerkinElmer, Stany Zjednoczone). Próbki folii mieszano z roztworem rodnika za pomocą

Tabela 3. Jedno- i dwuparametrowe modele matematyczne wykorzystane do opisu profilu uwalniania [39].

Model	Skrót	Równanie	Parametry
Zerowego rzędu	Z-O	$F=k_0 \cdot t$	k_0
Zerowego rzędu z T_{lag}	Z-O T_{lag}	$F=k_0 \cdot (t - T_{lag})$	k_0, T_{lag}
Pierwszego rzędu	F-O	$F = 100 \cdot (1 - e^{-k_1 \cdot t})$	k_1
Pierwszego rzędu z F_{max}	F-O F_{max}	$F = F_{max} \cdot (1 - e^{-k_1 \cdot t})$	k_1, F_{max}
Baker-Lonsdale	B-L	$\frac{2}{3} \left[1 - \left(1 - \frac{F}{100} \right)^{2/3} \right] - \frac{F}{100} = k_{BL} \cdot t$	k_{BL}
Hopfenberg	Ho	$F = 100 \cdot [1 - (1 - k_{HB} \cdot t)^n]$	k_{HB}, n
Logistyczny_1	Lo_1	$F = 100 \cdot \frac{e^{\alpha + \beta \cdot \log(t)}}{1 + e^{\alpha + \beta \cdot \log(t)}}$	α, β
Gompertz_1	Go_1	$F = 100 \cdot e^{-a \cdot e^{-\beta \cdot \log(t)}}$	α, β

Objaśnienia parametrów wspólnych dla wszystkich modeli:

F – ilość substancji aktywnej (%) uwolnionej w czasie t ,

F_{max} – parametr określający maksymalną ilość substancji aktywnej uwolnionej w nieskończonym czasie,

T_{lag} – czas opóźnienia uwalniania substancji aktywnej.

Objaśnienia parametrów charakterystycznych dla danych modeli:

Z-O i **Z-O** T_{lag} : k_0 – stała szybkości uwalniania zerowego rzędu;

F-O i **F-O** F_{max} : k_1 – stała szybkości uwalniania pierwszego rzędu;

B-L: k_{BL} – złożona stała modelu B-L obliczana na podstawie wzoru: $k_{BL} = [3 \cdot D \cdot Cs / (r_0^2 \cdot C_0)]$ gdzie: D – współczynnik dyfuzji, Cs – rozpuszczalność substancji aktywnej w folii, r_0 – promień próbki, C_0 – początkowe stężenie substancji aktywnej w próbce;

Ho: k_{HB} – złożona stała modelu Ho obliczana na podstawie wzoru: $k_{HB} = k_0 / (C_0 \cdot a_0)$ gdzie: k_0 – stała stopnia erozji, C_0 – początkowe stężenie substancji aktywnej w próbce, a_0 – 1/2 grubości próbki; n – zgodnie z formą geometryczną próbki wynosi 1, 2 lub 3 odpowiednio dla folii, cylindra lub kuli;

Lo_1: α – współczynnik skali, β – współczynnik kształtu;

Go_1: α – współczynnik skali, β – współczynnik kształtu.

mieszadła magnetycznego. Kinetykę neutralizacji wolnych rodników przez folie z dodatkiem AST (i ich odpowiedników kontrolnych) monitorowano w sposób okresowy za pomocą spektrofotometru płytkowego EPOCH2 (BioTek, Stany Zjednoczone). Procentową ilość zneutralizowanych wolnych rodników obliczono wg wzoru (9):

$$\text{Neutralizacja wolnych rodników (\%)} = [1 - (\text{Abs}_t / \text{Abs}_0)] \times 100 \quad (9)$$

gdzie: Abs_t – absorbancja mieszaniny reakcyjnej w czasie t ; Abs_0 – absorbancja początkowa roztworu rodnika

6.5. Analiza statystyczna

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu oprogramowania Statistica 6.0 oraz 13.1. (StatSoft Inc., Stany Zjednoczone). Grupy homogene

Tabela 4. Wieloparametrowe modele matematyczne wykorzystane do opisu profili uwalniania [39].

Model	Skrót	Równanie	Parametry
Logistyczny_2	Lo_2	$F = F_{max} \cdot \frac{e^{[\alpha+\beta \cdot \log(t)]}}{1 + e^{\alpha+\beta \cdot \log(t)}}$	α, β, F_{max}
Probit_2	Pr_2	$F = F_{max} \cdot \Phi[a + \beta \cdot \log(t)]$	α, β, F_{max}
Gompertz_2	Go_2	$F = F_{max} \cdot e^{-\alpha \cdot e^{-\beta \cdot \log(t)}}$	α, β, F_{max}
Gompertz_4	Go_4	$F = F_{max} \cdot e^{-\beta \cdot e^{-k \cdot t}}$	β, k, F_{max}
Weibull_1	Wb_1	$F = 100 \cdot \left[1 - e^{-\frac{(t-Ti)^\beta}{\alpha}} \right]$	α, β, Ti
Weibull_4	Wb_4	$F = F_{max} \cdot \left[1 - e^{-\frac{(t-Ti)^\beta}{\alpha}} \right]$	$\alpha, \beta, Ti, F_{max}$
Korsmeyer-Peppas z F_0	K-P F_0	$F = F_0 + k_{KP} \cdot t^n$	k_{KP}, n, F_0
Korsmeyer-Peppas z T_{lag}	K-P T_{lag}	$F = k_{KP} \cdot (t - T_{lag})^n$	k_{KP}, n, T_{lag}
Makoid-Banakar	M-B	$F = k_{MB} \cdot t^n \cdot e^{-k \cdot t}$	k_{MB}, n, k
Makoid-Banakar z T_{lag}	M-B T_{lag}	$F = k_{MB} \cdot (t - T_{lag})^n \cdot e^{-k \cdot (t - T_{lag})}$	k_{MB}, n, k, T_{lag}
Peppas-Sahlin_1	P-S_1	$F = k_1 \cdot t^m + k_2 \cdot t^{2m}$	k_1, k_2, m
Peppas-Sahlin_1 z T_{lag}	P-S T_{lag}	$F = k_1 \cdot (t - T_{lag})^m + k_2 \cdot (t - T_{lag})^{2m}$	k_1, k_2, m, T_{lag}

Opis parametrów wspólnych dla wszystkich modeli:

F – ilość substancji (%) aktywnej uwolnionej w czasie t ,

F_{max} – parametr określający maksymalną ilość substancji aktywnej uwolnionej w nieskończonym czasie,

F_0 – początkowa ilość substancji aktywnej obecnej w roztworze w wyniku natychmiastowego uwolnienia (tzw. „burst release”),

T_{lag} – czas opóźnienia uwalniania substancji aktywnej.

Opis parametrów charakterystycznych dla danych modeli:

Lo_2, Pr_2, Go_2, Go_4: α – współczynnik skali; β – współczynnik kształtu;

Wb_1 i Wb_4: α – parametr skali, określa skalę czasową procesu; β – parametr kształtu charakteryzujący typ krzywej gdzie: $\beta = 1$ (przypadek 1) to krzywa wykładnicza; $\beta > 1$ (przypadek 2) to krzywa esowata; $\beta < 1$ (przypadek 3) to krzywa paraboliczna; Ti – parametr lokalizacji, który reprezentuje czas opóźnienia przed rozpoczęciem procesu rozpuszczania lub uwalniania i w większości przypadków będzie bliski zeru;

K-P F_0 i K-P T_{lag} : k_{KP} – oznacza stałą uwalniania obejmującą cechy strukturalne i geometryczne próbki; n – jest wykładnikiem dyfuzji wskazującym mechanizm uwalniania substancji aktywnej;

M-B: k_{MB}, n, k – parametry empiryczne ($k_{MB}, n, k > 0$)

P-S: k_1 – stała związana z kinetyką Ficka; k_2 – stała związana z kinetyką relaksacji typu Case-II; m – wykładnik dyfuzji nośnika o dowolnym kształcie geometrycznym, które utrudnia kontrolowane uwalnianie.

wyznaczano stosując test post-hoc Fisher’a na poziomie istotności $p=0,05$. W uzasadnionych przypadkach wyznaczono współczynniki korelacji Pearsona (r) w celu zbadania czy istniał związek liniowy między dwoma zmiennymi.

Tabela 5. Parametry pomiaru aktywności przeciwrodnikowej folii wobec rodnika 2,2-difenyl-1-pikrylohydrazylu (DPPH*) i kationorodnika kwasu 2,2'-azyno-bis(etylobenzotiazolino-6-sulfonowego) (ABTS*+).

Parametr	AP	AST	CUR
Wolny rodnik	DPPH*	ABTS*+	DPPH*
Rozpuszczalnik	99,8% etanol	woda	50% (v/v) etanol
Objętość roztworu wolnego rodnika (ml)	50	25	20
Powierzchnia próbki folii (cm ²)	4	4	4
Sposób kontaktu	mieszanie przy użyciu mieszadła magnetycznego (100 rpm)	wytrząsanie przy użyciu inkubatora laboratoryjnego (170 rpm)	mieszanie przy użyciu mieszadła magnetycznego (170 rpm)
Temperatura roztworu (°C)	25	30	25
Czas kontaktu (h)	1	3	2
Długość fali zastosowana do detekcji wolnego rodnika (nm)	517	734	517
Absorbancja początkowa roztworu rodnika	2,70 ± 0,05	0,70 ± 0,05	0,77 ± 0,05

7. Omówienie wyników i dyskusja

7.1. Folie otrzymane z polisacharydów, żelatyny i ich mieszanin

Dobór materiałów to złożony proces, który obejmuje m.in. wybór surowców i ich proporcji, optymalnie dostosowanych do określonych zastosowań. Każdy biopolimer posiada charakterystyczne cechy, które mają kluczowy wpływ na właściwości użytkowe otrzymanego produktu. W artykule P1 – Łupina K., Kowalczyk D., Zięba E., Kazimierczak W., Mężyńska M., Basiura-Cembala M., Wiącek A. E. (2019). Edible films made from blends of gelatin and polysaccharide-based emulsifiers - A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 96, 555–567, porównano właściwości 17 rodzajów folii (5 jednopolimerowych i 12 polisacharydowo-żelatynowych), w tym także właściwości roztworów z których zostały one uzyskane. Pomimo, że OSA uplastyczniony glicerolem utworzył powłokę, to lepka i zbyt rozciągliwa konsystencja otrzymanego materiału skutkowała jego uszkodzeniem (rozciągnięciem, zerwaniem i/lub zlepianiem) podczas próby oddzielenia od podłoża. Z tego powodu można było scharakteryzować tylko niektóre właściwości powłoki otrzymanej z OSA.

7.1.1. Właściwości roztworów foliotwórczych

W celu uzyskania lepszego wglądu we właściwości strukturalno-morfologiczne folii, w pierwszej kolejności dokonano obserwacji mikroskopowych FFS. Roztwory jednopolimerowe (GEL100, GAR100, MC100, OSA100, WSSP100) i polisacharydowo-żelatynowe (50/50) zwizualizowano przy użyciu techniki krio-SEM (P1-Rysunek 1). Dzięki gwałtownemu zamrożeniu (-195,8°C) i sublimacji kryształów lodu, możliwe było zachowanie naturalnych właściwości badanych próbek. W przypadku każdego z analizowanych FFS uwidoczniono charakterystyczną strukturę „plastra miodu” utworzoną przez odwodnioną frakcję biopolimerową. Zaobserwowano, że FFS otrzymywane z MC były najmniej podatne na dehydratację (na zdjęciach widoczny jest niesublimowany lód), co sugeruje, że cząsteczki wody były silnie powiązane z tym polisacharydem. Mikrostruktura utworzona przez roztwór żelatynowy miała najmniejszą wielkość porów (tj. była najbardziej upakowana), co odzwierciedla znakomite właściwości żelujące GEL. W konsekwencji apertura kriożeli polisacharydowo-żelatynowych była mniejsza aniżeli odpowiedników polisacharydowych. Obrazowanie ujawniło dobrą kompatybilność GEL z GAR, OSA i WSSP. W przypadku układu MC/GEL zaobserwowano utworzenie

mikrosfer, co wskazuje na separację fazy polisacharydowej i żelatynowej. Nadmienić należy, iż podobne zjawisko zaobserwowano uprzednio w układach zawierających GEL i HPMC [56, 57]. Potwierdza to, iż roztwór GEL wykazuje złą mieszalność z eterami celulozy.

Wyniki analizy FFS uzyskane za pomocą techniki DLS w dużej mierze potwierdziły obserwacje mikroskopowe. Największą średnią wielkość cząstek (d_m) miały roztwory otrzymane z mieszaniny MC50/GEL50 ($d_m=77,36 \mu\text{m}$) oraz MC75/GEL25 ($d_m=18,74 \mu\text{m}$) (P1-Tabela 1), co przypisać można obecności żelatynowych mikrosfer w tych układach. Stosunkowo duże cząstki ($d_m=25,77 \mu\text{m}$) stwierdzono także w przypadku roztworu MC. Mikroskopowe obserwacje (P1-Rysunek 3) ujawniły niepełną rozpuszczalność tego polisacharydu, co prawdopodobnie wynikało ze znacznej lepkości 5% roztworu MC utrudniającej rozpuszczanie. Nadmienić należy, że w kontakcie z wodą, MC tworzy hydrożelowe agregaty, co opóźnia dyfuzję rozpuszczalnika i hydratację polimeru [131]. Spośród układów jednopolimerowych, roztwór OSA wykazywał najmniejszą d_m , co jest pośrednim dowodem pełnego skleikowania ziaren zmodyfikowanej skrobi.

Zp cząstek w roztworach polisacharydów miał wartość ujemną (od -2,51 do -3,26 mV) (P1-Tabela 1), co jest zgodne z obserwacjami innych autorów [132–134]. Z kolei w roztworze o pH 5,54 (P1-Tabela 1) GEL wykazywała dodatni Zp (1,73 mV), co jest konsekwencją wysokiej wartości punktu izoelektrycznego (pH=7-10), jaki ma GEL typu A [135]. W konsekwencji zaobserwowano, że stopniowe zastępowanie frakcji polisacharydowej GEL, skutkowało stopniowym wzrostem Zp, co potwierdza wyniki uzyskane przez innych autorów [136]. Uwzględniając przeciwstawne wartości Zp roztworów polisacharydów i GEL, można przypuszczać, że w ich mieszaninach występowały elektrostatyczne asocjacje.

7.1.2. Właściwości strukturalne folii

7.1.2.1. Mikrostruktura

Obserwacje mikroskopowe (1000x powiększenie) ujawniły, że folie GEL100 i GAR100 miały jednorodną i gładką mikrostrukturę powierzchni (P1-Rysunek 2). Z kolei powierzchnia folii WSSP100 była drobno uziarniona, a w folii MC100 zwizualizowano niewielkie hydrożelowe cząstki (P1-Rysunki 2-3), co jak uprzednio wspomniano wskazuje na niepełne rozpuszczenie polisacharydu. Folie otrzymane z równoważnych ilości polimerów (1:1), w porównaniu do odpowiedników jednopolimerowych, były bardziej

niejednorodne. W foliach MC/GEL, stwierdzono obecność mikrosfer o różnej wielkości średnicy maksymalnej ($d_{\max} \approx 53-467 \mu\text{m}$), uzależnionej od stosunku polimerów (P1-Rysunek 3).

Folie nie zmieniły wyglądu ogólnego podczas 30-dniowego przechowywania (25°C, RH 50%). Wyjątek stanowiła folia z największym udziałem OSA (tj. OSA75/GEL25), w przypadku której po 7 dniach przechowywania doszło do rekrystalizacji polisacharydu (P1-Rysunek 4), objawiającej się pojawieniem białych wykwitów na powierzchni. Podobne zjawisko było już opisane w literaturze [137].

7.1.2.2. Spektrometria w podczerwieni z transformacją Fouriera z osłabionym odbiciem całkowitym

Analiza widm FTIR poszczególnych komponentów oraz otrzymanych z nich mieszanin może dostarczyć informacji na temat wzajemnej interakcji chemicznej składników. W widmach wszystkich analizowanych folii zaobserwowano szerokie pasmo amidowe A (w zakresie liczb falowych 3000-3600 cm^{-1}). Jest ono manifestacją obecności grup O-H i/lub N-H, a także wiązań wodorowych (P1-Rysunek 5). Pasma amidowe A miało największą intensywność w widmach folii GAR100 i WSSP100, co może wskazywać na dużą ilość wolnych grup -OH w strukturze tych natywnych polisacharydów. Idąc tym tokiem rozumowania, niższą intensywność pasma amidowego A w widmach folii MC100 i OSA100, można przypisać częściowemu podstawieniu grup -OH reszt glukozowych w polisacharydach, odpowiednio przez reszty metylowe i oktenylobursztynianowe [138]. Stosunkowo wysoki poziom metoksylicacji (27,5–31,5%) (Tabela 1) był najprawdopodobniej przyczyną słabej intensywności pasma amidowego A w widmie folii MC100 (P1-Rysunek 5). Zaobserwowano, że zamienienie połowy ilości GEL na GAR, OSA i WSSP skutkowało wzrostem intensywności pasma amidowego A, co poza zmianami w proporcji wspomnianych grup funkcyjnych, można przypuszczalnie wytłumaczyć powstaniem wiązań wodorowych pomiędzy polisacharydami i GEL [139]. Separacja faz zaobserwowana w układach MC/GEL najprawdopodobniej nie sprzyjała takim interakcjom, czego dowodem jest niska intensywność pasma A w widmie FTIR-ATR folii. W widmie folii GEL100 zaobserwowano słabe pasmo amidowe B przy 3075 cm^{-1} (wynikające z drgań rozciągających grupy N-H), a także charakterystyczne piki absorpcji przy 2925 i 2855 cm^{-1} (reprezentujące odpowiednio drgania rozciągające asymetryczne i symetryczne grupy CH_2) [140]. W przypadku widma folii GAR100, pik

przy 2925 cm^{-1} przypisać można obecności wolnych grup karboksylowych [141]. Co ciekawe, pod względem usytuowania głównych pików, widmo folii GAR 100 oraz GAR50/GEL50 było bardzo podobne do widma folii żelatynowej.

W widmie folii GEL100 zaobserwowano występowanie charakterystycznych dla białek pasm amidowych I, II i III, położonych odpowiednio przy 1622, 1583 i 1228 cm^{-1} . Pasma amidowego I (odpowiadającego drganiom rozciągającym C=O, w tym grupom karbonylowym) nie zaobserwowano w widmach folii GEL50/OSA50 i GEL50/WSSP50. W zamian za to występował pik przy 1633 cm^{-1} . Ponieważ absorpcja w zakresie 1630-1695 cm^{-1} jest charakterystyczna dla grupy CONH₂, pojawienie się nowego pików może być konsekwencją interakcji ww. polisacharydów z GEL. Jak uprzednio wspomniano cząstki w roztworach polisacharydów i GEL były przeciwstawnie naładowane (P1-Tabela 1), co mogło sprzyjać ich elektrostatycznej asocjacji. Możliwość interakcji grup -NH₃⁺ obecnych w GEL z grupami -COO⁻ pochodzącymi z OSA wykazano już we wcześniejszych badaniach [133]. Elektrostatyczne oddziaływania stwierdzono także pomiędzy białkami i polisacharydami sojowymi [142]. Również GAR może elektrostatycznie oddziaływać (poprzez grupy -COO⁻) z GEL, przy czym efektywna interakcja zachodzi dopiero w pH <2,2 [136]. Brak skłonności GAR do oddziaływania z GEL, zwiualizowany jako brak zmian/przesunięć w obrębie pasma amidowego I (P1-Rysunek 5), tłumaczyć można zatem wysoką wartością pH FFS (5,25-5,57; P1-Tabela 1) niesprzyjającą jonizacji GAR. Najwyraźniej również MC miała ograniczoną zdolność oddziaływania elektrostatycznego z GEL, co wynikało z niejonowego charakteru tego polisacharydu. Ponadto nadmienić należy, że prawdopodobnie z powodu niejednorodnego rozmieszczenia składników (spowodowanego separacją faz), nie odnotowano obecności pasma amidowego III w widmie folii MC50/GEL50.

7.1.2.3. Szerokokątowa dyfraktometria rentgenowska

Badanie dyfraktometryczne wykazało, że spośród materiałów jednopolimerowych, najbardziej krystaliczną strukturę miały folie GEL100 i MC100, na co wskazuje obecność intensywnych pików usytuowanych przy niskich wartościach kąta dyfrakcji (2θ), odpowiednio przy $\approx 8^\circ$ i $\approx 7,8^\circ$ (P1-Rysunek 6). W przypadku folii żelatynowej obecność ostrego pików odzwierciedla wysoki stopień odtworzenia uporządkowanej struktury przestrzennej kolagenu (tj. potrójnej helisy). Z kolei w przypadku folii otrzymanej z MC pik ten reprezentuje regularne uporządkowanie powtarzających się reszt trimetyloglukozy

[143]. Analiza rentgenowska pozostałych folii jednopolimerowych nie wykazała obecności pików pochodzących od fazy krystalicznej, co wskazuje na ich bardziej amorficzną (nieuporządkowaną) strukturę. Folia (a w zasadzie powłoka) OSA100 posiadała najintensywniejszy i najbardziej rozciągnięty pik charakterystyczny dla fazy amorficznej ($2\theta \approx 20^\circ$). Przypuszczalnie było to spowodowane jej wysokim stopniem uwodnienia [144].

Zastąpienie połowy ilości GEL polisacharydami takimi jak GAR, OSA i WSSP spowodowało 2,5- krotny spadek intensywności pików położonego przy $2\theta \approx 8^\circ$ (P1-Rysunek 6). Oprócz mniejszej zawartości GEL, rezultat ten można przypisać również dobrej kompatybilności GEL z ww. polisacharydami, co mogło utrudniać łańcuchom polipeptydowym GEL powrót do ich natywnej postaci potrójnej helisy [145]. Wysoka krystaliczność folii GEL50/MC50 była wypadkową wysokiej krystaliczności folii jednopolimerowych. Można ponadto przypuszczać, że z powodu termodynamicznej niekompatybilności, MC i GEL tylko w minimalnym stopniu zakłócały tworzenie własnych domen krystalicznych.

7.1.3. Właściwości fizykochemiczne

WC folii zawierała się w przedziale 12,0-17,27% (P1-Tabela 2), przy czym najwyższe wartości miały materiały zawierające największe ilości MC i OSA. Wszystkie folie polisacharydowe były kompletnie rozpuszczalne w wodzie (25°C). Z kolei folia GEL100 wykazywała ograniczoną rozpuszczalność (44,39%) (P1-Tabela 2), co wynika z faktu, że GEL do całkowitego rozpuszczenia wymaga temperatur zbliżonych do temperatury ludzkiego ciała. Częściowe zastąpienie frakcji polisacharydowej GEL umożliwiło uzyskanie folii o zmniejszonej rozpuszczalności. W przypadku folii zawierających MC efekt taki zaobserwowano tylko dla układu z przewagą GEL (tj. MC25/GEL75). Można przypuszczać, że niejednorodna dystrybucja składników w foliach MC75/GEL25 i MC50/GEL50 i jednocześnie duża zawartość łatwo rozpuszczalnej frakcji polisacharydowej, sprzyjała dyspergowaniu folii w wodzie.

7.1.4. Szybkość przenikania pary wodnej

Folie GEL100 i MC100 stanowiły lepszą barierę dla pary wodnej ($\text{WVP} =$ odpowiednio 50,79 i 52,29 $\text{gmm m}^{-2} \text{d}^{-1} \text{kPa}^{-1}$) aniżeli folie WSSP100 i GAR100 ($\text{WVP} =$ odpowiednio 65,04 i 60,15 $\text{g mm m}^{-2} \text{d}^{-1} \text{kPa}^{-1}$) (P1-Tabela 2). Przyczyną mogły być wykazane uprzednio różnice w uporządkowaniu wewnętrznej struktury folii (P1-Rysunek

6). Uważa się, że w materiałach polimerowych para wodna w pierwszej kolejności dyfunduje przez obszary amorficzne, a potem zaś przez krystaliczne [146]. Można zatem wnioskować, że wyższa krystaliczność folii otrzymanych z GEL i MC (P1-Rysunek 6) była czynnikiem ograniczającym transfer pary wodnej. Zastąpienie części frakcji polisacharydowej GEL pozwoliło uzyskać materiały o niższych (o około 4 do 11%) wartościach WVP. Przyczyn tego zjawiska można upatrywać w doskonałych właściwościach barierowych GEL, które wynikają ze zdolności tworzenia gęsto upakowanej struktury (P1-Rysunek 1).

7.1.5. Właściwości optyczne

Wszystkie folie jednopolimerowe cechowała dobra przezroczystość, co potwierdzają wysokie wartości transmitancji (85,04-91,16%) w zakresie długości fal od 400 do 700 nm ($T\%_{\lambda 400-700}$) (P1-Rysunek 7). Spośród materiałów jednopolimerowych, folia GEL100 charakteryzowała się największą przezroczystością (P1-Tabela 2). Z kolei najmniej przezroczysta, najprawdopodobniej w powodu obecności nierozpuszczonych cząstek polimeru (P1-Tabela 2), okazała się folia MC100. Folie dwupolimerowe zawierające MC (bez względu na proporcje MC/GEL) wykazywały od 4 do 13-krotnie mniejszą przezroczystość w porównaniu do pozostałych folii polisacharydowo-żelatynowych. Wynik ten można w prosty sposób wyjaśnić ich niejednorodną strukturą (P1-Rysunek 3), w szczególności obecnością mikrosfer, które absorbowały i/lub odbijały światło. Folia uzyskana z GEL wykazywała najlepszą zdolność blokowania promieniowania UV (P1-Rysunek 7). Jest to głównie spowodowane obecnością aromatycznych aminokwasów i wiązań peptydowych w cząsteczkach białek [147]. Dlatego wraz ze zwiększaniem udziału GEL w foliach, obserwowano wzrost zdolności absorbowania promieniowania UV.

7.1.6. Właściwości mechaniczne

Wartość TS folii jednopolimerowych prezentowała się następująco: GEL100 (65,31 MPa) > MC100 (33,39 MPa) > WSSP100 (12,67 MPa) > GAR100 (4,60 MPa) (P1-Tabela 3). Wiadomym jest, że krystaliczność polimerów przynosi korzyści w zakresie sztywności i wytrzymałości na rozciąganie. W świetle wyników uzyskanych z zastosowaniem techniki WAXD (P1-Rysunek 6), bardzo dobra wytrzymałość mechaniczna folii otrzymanych z GEL i MC była konsekwencją ich wyższego stopnia krystaliczności (bardziej uporządkowanej budowy wewnętrznej). Znakomita wytrzymałość folii żelatynowej

wynika głównie z faktu, że w czasie żelowania białko to częściowo odzyskuje pierwotną strukturę przestrzenną kolagenu, czyli głównego składnika budulcowego tkanki łącznej, w tym ścięgien, mięśni i kości. Potrójna helisa utrzymywana jest przez sieć regularnie występujących wiązań wodorowych, które z kolei występują dzięki regularnie powtarzającym się sekwencjom tripeptydowym w łańcuchach kolagenu [148]. MC to z kolei pochodna głównego składnika budulcowego ściany komórkowej roślin wyższych. Podobnie jak w przypadku kolagenu, wytrzymałość celulozy wynika z licznych wiązań wodorowych utworzonych pomiędzy grupami -OH (oraz metoksyłowymi w przypadku MC) równolegle ułożonych względem siebie łańcuchów glukanu [149]. Na uwagę zasługuje fakt, że MC w odróżnieniu od pozostałych polisacharydów użytych w niniejszej pracy, tj. o strukturze rozgałęzionej (GAR, OSA, WSSP) i/lub heterogennej (GAR, WSSP) (Rysunki 4-6), jest homopolisacharydem liniowym. Oznacza to, że ma ona lepsze predyspozycje do tworzenia ściślej upakowanej i tym samym mocniejszej struktury. Idąc dalej tym tokiem rozumowania bardziej amorficzny charakter, uwarunkowany zróżnicowanym składem cukrowym i/lub silnie rozgałęzioną strukturą (Rysunki 4 i 6), był najprawdopodobniej przyczyną niskiej wytrzymałości mechanicznej folii otrzymanych z GAR i WSSP [73,74,75].

W literaturze naukowej panuje przekonanie, że GAR posiada jedynie właściwości powłokotwórcze i nie jest w stanie tworzyć samodzielnych folii z powodu swojej nadmiernej kruchości [110]. Warto jednak nadmienić, że choć termin "guma arabska" odnosi się do konkretnego polimeru (Rysunek 4), to ze względu na istnienie wielu producentów oferujących różne warianty GAR, nie można jednoznacznie uogólniać jej właściwości foliowótórczych. Udowadniają to niniejsze badania, w których, stosując te same warunki otrzymywania jak w przypadku pozostałych biopolimerów, udało się uzyskać jednolitą folię GAR100. Co istotniejsze, pomimo niskiej elastyczności (około 7-krotnie niższej niż folii GEL100 (P1-Tabela 3)) i tym samym dużej podatności na pękanie, folię z GAR można było poddać badaniom.

Z wyjątkiem układu MC/GEL, stopniowa substytucja polisacharydów przez GEL skutkowałą coraz lepszą wytrzymałością i sztywnością folii (P1-Tabela 3). GEL spowodowała najbardziej spektakularny wzrost TS i PS folii GAR100, co było związane z jej słabą spójnością wewnętrzną, objawiającą się łamliwością. Przykładowo, już zamiana 25% GAR na GEL skutkowałą 5-krotnym wzrostem TS. Brak kompatybilności pomiędzy MC i GEL (P1-Rysunki 2 i 3) spowodowałą, że folie MC75/GEL25 i MC50/GEL50 miały

istotnie mniejszą wytrzymałość mechaniczną w porównaniu do folii MC100. Wskazuje to na osłabioną kohezję fazy ciągłej w układzie zawierającym niekompatybilne składniki. Z kolei w przypadku folii o przeważającej zawartości GEL (tj. MC25/GEL75), jej wytrzymałość na zerwanie i przebicie była zbliżona do folii MC100, ale odpowiednio o 40 i 30% niższa aniżeli folii żelatynowej (P1-Tabela 3).

Spośród folii jednopolimerowych, folia MC100 charakteryzowała się największą podatnością na rozciąganie (59,84% vs. 8,55-23,78%) (P1-Tabela 3). Częściowo mogło być to spowodowane uplastyczniającym działaniem wody [152], której zawartość w folii MC100 była istotnie wyższa w porównaniu do pozostałych analizowanych materiałów (17,27% vs. 12,63-15,27%). Najmniejszą wartość E miała folia GEL100, co w połączeniu z jej wysoką sztywnością ($EM = 1335,32$ MP) i wytrzymałością mechaniczną wskazuje na występowanie znacznych sił spójności pomiędzy sąsiadującymi łańcuchami polipeptydowymi GEL. Folie GAR100 i WSSP100 wykazywały identyczną podatność na rozciąganie ($p > 0,05$). Formułacja zawierająca OSA i GEL w stosunku 3:1 pozwoliła uzyskać folię o największej rozciągliwości (93,46%), co mogło być spowodowane synergistycznym działaniem plastykującym grup oktenylobursztynowych i cząsteczek wody (P1-Tabela 2).

Podsumowując wyniki badań nad optymalizacją proporcji składników folii polisacharydowo-żelatynowych, w pracy P1 wykazano, że OSA uplastyczniany glicerolem formuje bardzo adhezyjną i kleistą powłokę, co w praktyce uniemożliwia wykorzystanie go w produkcji folii. Niekorzystną cechą polisacharydu udało się jednak skutecznie ograniczyć poprzez częściową substytucję GEL. Domieszkowanie GEL umożliwiło również redukcję łamliwości folii otrzymanej z GAR. Już zamiana $\frac{1}{4}$ ilości polisacharydu na GEL przyniosła wymierne wzmocnienie materiału. Mając na uwadze powyższe, oraz dążąc do maksymalnego wykorzystania składników roślinnych w recepturze folii, jako nośniki przeciwutleniaczy wybrano mieszaniny polisacharydów i GEL w stosunku 3:1 (75/25). Zważywszy na nieatrakcyjny wygląd folii MC75/GEL25, spowodowany dużą niekompatybilnością składników, postanowiono wykluczyć ten materiał z dalszych badań, tj. nie wykorzystywać go jako nośnik. W dalszych etapach badań, zamiast MC zastosowano CMC, która wykazuje znacznie lepszą mieszalność z GEL, co dowiodły wstępne obserwacje makro- i mikroskopowe folii CMC75/GEL25.

7.2. Folie polisacharydowo-żelatynowe z dodatkiem palmitynianu L-askorbylu

Badania wstępne wykazały, że w celu otrzymania jednorodnych mieszanin polisacharydowo-żelatynowych zawierających AP, konieczne było podwojenie stężenia frakcji biopolimerowej (tj. zwiększenie jej zawartości z 5 do 10% (m/m)) oraz dodanie emulgatora Tween 80). AP wprowadzano do FFS w postaci roztworu etanolowego. W przypadku układu CMC75/GEL25 podwyższone stężenie biopolimerów znacząco ograniczyło rozlewalność mieszaniny, co uniemożliwiło otrzymanie folii. W konsekwencji nośnikami AP były folie GAR75/GEL25, OSA75/GEL25 i WSSP75/GEL25. Badania wstępne wykazały, że zbyt niskie ($\leq 0,5\%$ w/w), jak i zbyt wysokie ($\geq 2\%$ w/w) stężenie AP w FFS skutkowało otrzymaniem mieszanin niejednorodnych, co dowodzi że istnieje optymalne stężenie AP warunkujące stabilność emulsji, która z kolei warunkuje uzyskanie dobrych jakościowo i wizualnie atrakcyjnych folii. Właściwości folii polisacharydowo-żelatynowych otrzymanych z FFS zawierających 1% i 2% AP scharakteryzowano w pracy P2 – Łupina K., Kowalczyk D., Droźłowska E. (2020). Polysaccharide/gelatin blend films as carriers of ascorbyl palmitate – A comparative study. Food Chemistry, 333, 127465. Folie kontrolne przygotowano z FFS, które oprócz frakcji biopolimerowej i plastyfikatora zawierały etanol i emulgator, ale nie zawierały AP.

7.2.1. Mikrostruktura

Obserwacje przy użyciu mikroskopu optycznego ujawniły niepełną rozpuszczalność WSSP w wodzie, co z kolei utrudniło detekcję frakcji AP w FFS (P2-Rysunek 1), jak i w foliach (P2-Rysunek 2). We wszystkich otrzymanych emulsjach, AP przyjmował formę podłużnych kryształów i mikroglobulek (P2-Rysunek 1). Najdłuższe kryształy ($\approx 174 \mu\text{m}$) stwierdzono w emulsjach GAR75/GEL25. W pozostałych układach, kryształy AP były o około połowę krótsze. Zwiększenie stężenia AP w FFS skutkowało zwiększeniem ilości agregatów krystalicznych (P2-Rysunek 1). W foliach OSA75/GEL25, wykazano obecność mikrocząstek (P2-Rysunek 2), co w szczególności było dobrze widoczne w folii kontrolnej. Przyczyną mogło być zarówno utworzenie koacerwatów OSA/GEL, jak i ograniczona rozpuszczalność OSA w roztworze etanolowym [153]. Przypomnieć należy, że zawartość etanolu (kosolwent) w FFS wynosiła 20% (v/m). Topografia folii emulsyjnych była bardziej heterogenna w porównaniu do folii kontrolnych (P2-Rysunek 2). Co ciekawe, na powierzchni folii GAR75/GEL25 i WSSP75/GEL25 nie stwierdzono

obecności podłużnych kryształów AP, tj. takich jakie obserwowano w FFS (P2-Rysunek 1). Możliwe jest zatem, że w powyższych układach krystaliczna część frakcji AP uległa sedimentacji i tym samym była osadzona w głębszych warstwach folii (P2-Rysunek S2).

7.2.2. Właściwości fizykochemiczne

Inkorporacja AP spowodowała nieznaczne obniżenie pH FFS ($p < 0,05$, P2-Tabela 1), co wskazuje że AA, pomimo zestryfikowania, w dalszym ciągu ma zdolność zakwaszania środowiska. W porównaniu do materiałów inkorporowanych AA [40], spadek pH był jednak bardzo mały.

Z powodu amfifilowego charakteru AP obserwowano różny jego wpływ na właściwości folii związane z powinowactwem do wody. Folie kontrolne nie różniły się pod względem wartości kąta zwilżania ($p > 0,05$) będącego miarą hydrofilności lub hydrofobowości powierzchni materiału. Niezależnie od zawartości AP, wszystkie otrzymane materiały miały kąt zwilżania $< 90^\circ$, co wskazuje na ich hydrofilowy charakter. Wbrew oczekiwaniom, dodatek AP na ogół nie przyczynił się do zwiększenia kąta zwilżania, tj. wzrostu hydrofobowości folii. Najwyraźniej, pomimo obecności hydrofobowych reszt kwasu palmitynowego, hydrofilowe reszty kwasu askorbinowego niwelowały skuteczne odpychanie wody. Wyjątek stanowiła folia GAR75/GEL25 domieszkowana 2% AP (P2-Tabela 1). Niemniej jednak hydrofobowość jej powierzchni była taka sama jak pozostałych folii zawierających AP.

Inkorporacja AP przyczyniła się do wzrostu zawartości wody w foliach, co można wytłumaczyć zaabsorbowaniem wody przez hydrofilową część przeciwutleniacza. Dodatek AP zmniejszył ($p < 0,05$) rozpuszczalność folii w wodzie (P2-Tabela 1), co wynikało najprawdopodobniej z ograniczenia dostępu cząsteczek wody do wodnorozpuszczalnych składników folii przez niepolarne łańcuchy kwasu palmitynowego. Największy spadek rozpuszczalności ($\sim 12\%$) zaobserwowano dla folii WSSP75/GEL25. Nadmienić należy, że niezależnie od zawartości AP, folie zawierające polisacharydy sojowe były najbardziej podatne na rozpuszczanie (67,45-76,93% vs. 51,69-69,22%). Mogło być to spowodowane ich konglomeratową strukturą (utworzoną przez nierozpuszczone cząstki polisacharydu, P2-Rysunek 1), sprzyjającą dyspergowaniu w wodzie. Najmniejszą rozpuszczalność miały folie zawierające OSA (P2-Tabela 1). Należy zauważyć, że wartości S_o folii kontrolnych (GAR75/GEL25, OSA75/GEL25 i WSSP75/GEL25) otrzymanych w pracy P2 były niższe (P2-Tabela 1) w porównaniu do tych uzyskanych w pracy P1 (P1-Tabela 2). Różnice

wytłumaczyć można zwiększonym stężeniem frakcji biopolimerowej (10% vs. 5%), co najwyraźniej umożliwiło uzyskanie lepszej spójności folii, zapewniającej większą integralność w kontakcie z wodą.

Spośród folii kontrolnych, najlepsze właściwości barierowe w stosunku do pary wodnej miała folia OSA75/GEL25 (38,52 vs. 43,04-45,46 g mm m⁻² d⁻¹ kPa⁻¹, P2-Tabela 1). Tylko w przypadku tej folii inkorporacja AP nie przyczynił się obniżenia WVP, co mogło być spowodowane stosunkowo równomierną wertykalną dystrybucją kryształów AP (P2-Rysunek 2), umożliwiającą przenikanie wilgoci pomiędzy nimi. Istnieje pogląd, że jedynie destabilizacja fazy hydrofobowej i wytworzenie dwuwarstwowej struktury biopolimerowo-lipidowej przyczynia się do redukcji WVP folii emulsyjnych. Powyższe zjawisko było najprawdopodobniej odpowiedzialne za poprawę właściwości barierowych dwóch pozostałych folii. Nie bez zaznaczenia może być także fakt, że ulepszeniu uległy materiały o wyjściowo słabszych właściwościach barierowych. Dodanie AP w ilości 1% spowodowało spadek wartości WVP o 26,6 i 31,4%, odpowiednio w przypadku folii GAR75/GEL25 i WSSP75/GEL25 (P2-Tabela 1). Podwojenie stężenia AP nie skutkowało dalszą poprawą właściwości barierowych tych folii.

7.2.3. Właściwości optyczne

Niezależnie od zawartości AP, folie WSSP75/GEL25 charakteryzowały się największym natężeniem barwy żółto-czerwonej (P2-Tabela 1, Rysunek S3), co było konsekwencją „kremowej” barwy WSSP. Ponadto folie zawierające WSSP były najmniej przepuszczalne dla światła VIS ($T\%_{\lambda 400-700\text{nm}} = 10,03-19,52\%$) i UV (P2-Rysunek 3, Tabela 1). Spowodowane było to konglomeratową strukturą folii (P2-Rysunek 2), sprzyjającą absorbowaniu i/lub odbijaniu światła. Najprawdopodobniej z powodu obecności niewielkiej ilości białka w strukturze GAR [154], folie zawierające ten polisacharyd skuteczniej pochłaniały światło UV aniżeli folie zawierające modyfikowaną skrobię. Niemniej jednak zaletą folii OSA75/GEL25 była ich wysoka transparentność ($T\%_{\lambda 400-700\text{nm}} = 38,29-62,50\%$, P2-Rysunek 3, Tabela 1) i bezbarwność.

Żółta barwa etanolowego roztworu AP spowodowała koloryzację folii. Ponadto wraz ze wzrostem udziału AP folie stawały się coraz mniej przepuszczalne dla światła UV/VIS (P2-Rysunek 3), co wytłumaczyć można intensywnym absorbowaniem i/lub odbijaniem światła przez coraz liczniejsze kryształy AP.

7.2.4. Właściwości mechaniczne

Spośród otrzymanych folii kontrolnych najbardziej wytrzymała mechanicznie była folia WSSP75/GEL25 (TS = 43,49 MPa), zaś materiałem o najsłabszej wytrzymałości była folia OSA75/GEL25 (TS = 9,16 MPa) (P2-Tabela 1). Zaobserwowano także, że folie zawierające GAR i OSA były materiałami odpowiednio najmniej i najbardziej rozciągliwymi/sztywnymi (P2-Tabela 1). Wyniki te korelują z rankingiem parametrów mechanicznych uzyskanym w poprzedniej pracy (P1-Tabela 1). Potencjalne przyczyny różnic we właściwościach mechanicznych folii zawierających różne polisacharydy omówiono już w pkt 7.1.6.

Wpływ AP na TS folii był uzależniony od ich rodzaju. Zaobserwowano zarówno poprawę (GAR75/GEL25), spadek (WSSP75/GEL25), jak i brak wpływu (OSA75/GEL25) AP na ten parametr. Niemal dwukrotne zwiększenie TS zaobserwowane dla folii GAR75/GEL25 (wzrost z 17,04 do 30,64 MPa), wskazuje, że sieć zagregowanych kryształów AP, działając jako spoiwo/wypełniacz, skutecznie wzmocniła kruchą strukturę GAR (P2-Rysunek 1). Jak uprzednio wspomniano, GAR ze względu na swój silnie rozgałęziony charakter formuje warstewki o niskiej spójności [110]. W przypadku pozostałych folii, obecność AP była jednak czynnikiem zakłócającym interakcje polimer-polimer, czego dowodzi znaczny spadek ich wartości TS i/lub rozciągliwości (P2-Tabela 1). Podobne zjawisko było już uprzednio obserwowane dla folii z PLA [155]. Nadmienić należy, że w przypadku folii OSA75/GEL25, tj. materiału o bardzo niskiej wartości EM, obecność kryształów AP dwukrotnie zwiększyła jej sztywność, co prawdopodobnie zrekompensowało osłabione siły międzycząsteczkowe pomiędzy łańcuchami makrocząsteczek. Prawdopodobnie z tej przyczyny, nieciągłości w polimerowej strukturze folii OSA75/GEL25 wywołane przez AP nie doprowadziły do pogorszenia jej wytrzymałości mechanicznej (P2-Tabela 1). Powyższe wyniki badań wskazują, że wpływ AP na parametry mechaniczne folii biopolimerowych nie może być generalizowany, gdyż w dużym stopniu zależy od rodzaju biopolimeru.

7.2.5. Uwalnianie palmitynianu L-askorbylu

W zależności od rodzaju nośnika oraz zawartości AP, w czasie 30-godzinnego mieszania folii z etanolem, migracji uległo od 32 do 92% AP (P2-Rysunek 4A). Z wyjątkiem folii GAR75/GEL25, podwojenie zawartości AP skutkowało znacznie szybszym uwalnianiem tego przeciwutleniacza (P2-Tabela 2). Migracja AP z folii

GAR75/GEL25 była powolna i niekompletna, co uniemożliwiło wyznaczenie wartości $t_{50\%}$, nawet przy użyciu modelowania matematycznego. Wartości $t_{25\%}$ obliczone dla wszystkich folii inkorporowanych AP zawierały się w zakresie od 18 do 296 min (P2-Tabela 2). Wykazano, że folia OSA75/GEL25 zapewniała około 2x i 16x szybsze uwalnianie AP, odpowiednio w porównaniu do nośników WSSP75/GEL25 i GAR75/GEL25. Tym samym folia oferowała najbardziej kompletne uwalnianie przeciwutleniacza (71,47 i 92,14%, odpowiednio dla folii zawierających 1 i 2% AP). Jak wspomniano w podrozdziale 4.2, migracja substancji czynnej z nośnika jest procesem wieloczynnikowym, w którym główną rolę odgrywają rozpuszczalność substancji aktywnej, jej desorpcja i dyfuzja, a także rozpuszczalność, zdolność pęcznienia i erozja samego nośnika [156]. Ponieważ użyte w badaniach biopolimery są nierozpuszczalne w stężonym etanolu, można przypuszczać, że uwalnianie AP było kontrolowane głównie poprzez jego dyfuzję. Odmienne tempo uwalniania AP z poszczególnych folii mogło wynikać m.in. z różnic strukturalnych polisacharydów, tj. ich odmiennego składu cukrowego (heteropolisacharydy (GAR i WSSP) vs. homopolisacharyd (OSA)), obecności odmiennych wiązań glikozydowych i grup funkcyjnych. Szybkość uwalniania substancji czynnej jest również kontrolowana przez stopień rozgałęzienia polimeru [157]. Wolniejsza migracja AP z folii zawierających GAR i WSSP mogła być zatem spowodowana mocniejszym fizykochemicznym związaniem kryształów AP z tymi silnie rozgałęzionymi heteropolisacharydami (Rysunek 4 i 6).

Na podstawie wartości AIC stwierdzono, że modele matematyczne cztero- i trzyparametrowe (P-S, Go_2, Wb_1, Wb_4 i M-B T_{lag}) lepiej opisywały kinetykę migracji AP aniżeli modele dwu- i jedno-parametrowe (Z-O, F-O, B-L). Dla większości folii optymalnym modelem był M-B T_{lag} . Ponieważ parametr k tego modelu wynosił zero lub prawie zero (P2-Tabela S4), to parametr n w tym równaniu matematycznym był równoważny z parametrem n modelu K-P. Jego wartość jest istotnym wyznacznikiem wpływu dyfuzji na proces uwalniania. Folie GAR75/GEL25/AP-2% i OSA75/GEL25/AP-2% charakteryzowały się niskimi wartościami n ($n < 0,5$, P2-Tabela S4), co wskazuje, że uwalnianie przeciwutleniacza zachodziło zgodnie z mechanizmem dyfuzji opartym na prawie Ficka [158]. Wartość parametru n dla większości badanych formuacji mieściła się w przedziale $0,5 < n < 1,0$, co świadczy, że o uwalnianiu AP z układów decydowała nie tylko dyfuzja, ale występowały także dodatkowe mechanizmy kontrolujące migrację, np. erozja matrycy. Z kolei w przypadku folii GAR75/GEL25/AP-1% parametr n przekraczał wartość

1, co świadczy o kinetyce uwalniania zgodnej z mechanizmem super II transportu (ang. super case II transport), który jest związany z jednoczesną dyfuzją oraz pęcznieniem lub erozją nośnika [158]. Koreluje to z obserwacją próbek podczas testów uwalniania, tj. zauważono, że tylko folia GAR75/GEL25/AP-1% rozpadła się na kilka kawałków. W konsekwencji częściowa dezintegracja, zwiększyła powierzchnię kontaktu, co mogło sprzyjać szybszej dyfuzji AP do płynu akceptorowego, w porównaniu od układu GAR75/GEL25/AP-2% (P2-Tabela 2).

7.2.6. Aktywność przeciwutleniająca

Folie kontrolne nie posiadały zdolności neutralizacji DPPH*. Wraz ze wzrostem zawartości AP aktywność przeciwrodnikowa folii wzrastała (P2-Rysunek 4B). Zdolność neutralizacji DPPH* uszeregowała folie aktywne w następującym porządku: OSA75/GEL25 > WSSP75/GEL25 > GAR75/GEL25. Aktywność przeciwrodnikowa folii była dodatnio skorelowana z zdolnością uwalniania AP ($r = 0,803$ i $r = 0,705$, odpowiednio dla folii zawierających 1 i 2% AP) (P2-Rysunek S5). Folie OSA75/GEL25 bardzo szybko i niemal całkowicie neutralizowały DPPH* (~96 i 99% neutralizacji po około 6 i 3 min kontaktu z roztworem wolnego rodnika, odpowiednio w przypadku folii z 1 i 2% AP). Z kolei układ GAR75/GEL25/AP-1% zapewniał najpowolniejsze (wydłużone) „zmiatanie” wolnych rodników (P2-Rysunek 4B), o stosunkowo stałej szybkości, najbardziej zbliżonej do kinetyki zerowego rzędu (P2-Tabela S6). Ww. system wykazywał zatem najlepszy potencjał do kontrolowanego uwalniania AP, tj. oferował długotrwałe działanie przeciwutleniające przy jednoczesnym zminimalizowaniu dawki substancji aktywnej.

7.3. Folie polisacharydowo-żelatynowe z dodatkiem astaksantyny AstaSana

Właściwości przeciwutleniające i barwiące ASX umożliwiają otrzymanie atrakcyjnych wizualnie folii aktywnych. Naturalna ASX posiada szereg właściwości prozdrowotnych, niemniej jednak jej ograniczona dostępność i wysoki koszt sprawiają, że w masowej produkcji bardziej opłacalną opcją jest stosowanie syntetycznej ASX. W porównaniu do naturalnej oleozywicy pozyskiwanej z alg *H. pluvialis*, ASX otrzymana na drodze syntezy chemicznej charakteryzuje się nie tylko niższą ceną, ale i większą czystością, stabilnością i dyspergowalnością w wodzie, co sprzyja jej stosowaniu [81]. Z mieszanin polisacharydów (CMC, GAR, OSA lub WSSP) i GEL w stosunku 75/25

otrzymano FFS, które domieszkowano wzrastającymi ilościami AST. Zastosowano trzy poziomy dodatku AST: 0,25, 0,5 i 1% (w/w). Większa zawartość AST (>1%) skutkowała otrzymaniem folii nadmiernie „przeładowanych” barwnikiem (dane nieprzedstawione). Kontrolne FFS nie zawierały dodatku AST. Zbadano mikrostrukturę FFS (techniką klasycznej mikroskopii optycznej, polaryzacyjnej i kriomikroskopii elektronowej). Następnie z FFS otrzymano 16 rodzajów folii. Właściwości otrzymanych materiałów opisano w trzech komplementarnych publikacjach:

P3 – Łupina K., Kowalczyk D., Kazimierczak W. (2021). Gum Arabic/gelatin and water-soluble soy polysaccharides/gelatin blend films as carriers of astaxanthin — A comparative study of the kinetics of release and antioxidant properties. *Polymers*, 13(7), 1062;

P4 – Łupina K., Kowalczyk D., Lis M., Raszkowska-Kaczor A., Drozłowska E. (2022). Controlled release of water-soluble astaxanthin from carboxymethyl cellulose/gelatin and octenyl succinic anhydride starch/gelatin blend films. *Food Hydrocolloids*, 123, 107179;

P5 – Łupina K., Kowalczyk D., Kazimierczak W. (2022). Functional properties and storage stability of astaxanthin-loaded polysaccharide/gelatin blend films — A comparative study. *Polymers*, 14(19), 4001.

7.3.1. Mikrostruktura roztworów foliotwórczych i folii

Badania mikroskopowe wykazały, że spośród kontrolnych FFS, jedynie układ GAR75/GE25L był homogeny (P3-Rysunek 1). W FFS CMC75/GAR25 zwizualizowano obecność licznych mikrosfer żelatynowych ($d \approx 11\text{--}68 \mu\text{m}$, P4-Rysunek 2A i B), co wskazuje, że CMC i GEL rozpuszczone we wspólnym rozpuszczalniku (woda), są niekompatybilne i nie mieszają się. Obserwacja ta jest zgodna z danymi literaturowymi, wg których etery celulozy (niezależnie od ich rodzaju) i GEL odpychają się wzajemnie w roztworze tworząc dwie oddzielne fazy ciekłe. Jedna z faz jest bogata w polisacharyd, druga zawiera niekompatybilną GEL, która zwykle stanowi fazę zdyspergowaną [43]. Podobnie jak w publikacji P2, uwidoczniono obecność koacerwatów w FFS OSA75/GEL25 utworzonych wskutek interakcji przeciwnie naładowanych polielektrolitów [56]. Potwierdzono także ziarnistą mikrostrukturę układu WSSP75/GEL25 (P3-Rysunek 1-B, P4-Rysunek 1). Aby lepiej poznać przyczynę niehomogennej mikrostruktury FFS zawierającego WSSP przeprowadzono dodatkowe badanie mikroskopowe.

Zaobserwowano, że WSSP dysperguje w wodzie do mikrocząsteczek o wielkości $d_{\max} \approx 4$ μm , które następnie tworzą agregaty/kompleksy z GEL [159], co stymulowane jest usunięciem rozpuszczalnika z układu (P5-Rysunek S1 i S2).

Dodatek AST zmienił barwę FFS na intensywnie czerwoną. W roztworach domieszkowanych AST zwizualizowano obecność ziaren skrobi, jako składnika AST (Tabela 1). Jej obecność potwierdzono testem z użyciem płynu Lugola oraz za pomocą mikroskopii polaryzacyjnej. Ziarna skrobi w świetle spolaryzowanym wykazywały charakterystyczny obraz „krzyża maltańskiego” (P3-Rysunek 1, P4-rysunek 2) [160].

Topografia folii polisacharydowo-żelatynowych w dużym stopniu odzwierciedlała mikrostrukturę FFS (P3-Rysunek 1, P4-Rysunek 2). Najbardziej chropowatą powierzchnię miały folie zawierające WSSP i CMC. Obecność skrobi w AST spowodowała, że powierzchnia fortyfikowanych folii była nierówna (P5-Rysunek 1).

Podobnie jak w publikacji P-1, widma FTIR-ATR otrzymanych folii zawierały liczne wspólne pasma reprezentujące wiele drgań deformacyjnych (δ) i rozciągających (walencyjnych) (ν) wzbudzonych przez promieniowanie IR. Ich położenie i intensywność ujawniły szczegóły struktury chemicznej komponentów folii, w tym obecność określonych wiązań i grup funkcyjnych. Pasma najbardziej przesunięte w stronę bliskiej podczerwieni, tj. położone przy ~ 3280 cm^{-1} (pasmo Amid A) (P3-Rysunek 3, P4-Rysunek 3), odpowiadało absorpcji wynikającej z obecności w komponentach folii grup O-H i N-H. Z kolei, dwa pasma o stosunkowo niskiej intensywności położone w zakresie 2872-2930 cm^{-1} (pasmo Amid B) przypisać można symetrycznym (~ 2881 cm^{-1}) i asymetrycznym (2930 cm^{-1}) drganiom ν grupy $-\text{CH}_2$ [140]. Pik położony w zakresie liczb falowych 1633-1647 cm^{-1} , reprezentował pasmo Amid I z dominującym wkładem od drgania $\nu(\text{C}=\text{O})$. Jego źródłem była GEL (P1-Rysunek 5). Prawdopodobnie ze względu na polimerowy rozdział faz prowadzący do nierównomiernej dystrybucji składników (P4-Rysunek 2), pasmo Amid I nie było obserwowane w widmie folii CMC75/GEL25 (P4-Rysunek 3). Mając na uwadze to, że pik w zakresie 1695-1630 cm^{-1} może wskazywać na powstanie grupy CONH_2 , będącej konsekwencją reakcji GEL z polisacharydami [P1], brak pasma Amid I w widmie folii CMC75/GEL25 mógł być także spowodowany brakiem interakcji chemicznej między CMC a GEL. Kolejno występujące po sobie stosunkowo intensywne piki zaobserwowane w widmie folii CMC75/GEL25, położone odpowiednio przy 1589, 1410 i 1321 cm^{-1} , przypisać można obecności grupy karboksylowej CMC [42]. W przypadku folii zawierającej OSA, asymetryczne drganie ν grupy karboksylowej

występowało przy 1555 cm^{-1} . Niewielki pik położony przy 1148 cm^{-1} , widoczny w widmach folii zawierających GAR i OSA, wskazuje na drganie ν wiązania C-O, które jest obecne zarówno w polisacharydach [161], jak i w GEL [162]. Spektra wszystkich folii wykazywały silną absorpcję IR przy $\sim 1020 \text{ cm}^{-1}$, co wskazuje na obecność grupy C-N [163].

Widma FTIR-ATR folii bez i z 1% dodatkiem AST były niemal identyczne. Można to wytłumaczyć stosunkowo małą ilością AST w foliach i/lub efektem zamaskowania AST przez biopolimery. Niemniej jednak zaobserwowano, że dodatek AST nieznacznie zwiększył intensywność pików zlokalizowanych w zakresie 1647-1100 cm^{-1} , co przypuszczalnie mogło być wynikiem interakcji AST z biopolimerami. Jak dotąd brak jest jednoznacznych dowodów wskazujących na interakcje ASX/polimer. Sugerowano jedynie występowanie specyficznych interakcji pomiędzy naturalną ASX i CMC oraz ASX i albuminą surowicy bydlęcej [164, 165].

7.3.2. Właściwości optyczne

Pod względem zdolności przepuszczania światła widzialnego (przezroczystości), folie kontrolne można uszeregować w następującej kolejności: OSA75/GEL25 > GAR75/GEL25 > WSSP75/GEL25 > CMC75/GEL25 (P5-Rysunek 2). Ponieważ przenikalność światła zależy m.in. od ilości cząstek zdyspergowanych w ośrodku, zaobserwowane znaczne zróżnicowanie przezroczystości folii mogło wynikać z ich różnic mikrostrukturalnych. Folie GAR75/GEL25 i OSA75/GEL25 jako mikroskopowo bardziej jednorodne (P5-Rysunek 1) były bardziej przepuszczalne dla światła widzialnego. Z kolei liczne mikrocząstki obecne w foliach CMC75/GEL25 i WSSP75/GEL25 (P5-Rysunek 1) sprawiły, że część światła została odbita, rozproszona i pochłonięta. Z tego powodu jednakże niejednorodne folie stanowiły lepszą barierę dla promieniowania UV. Dla porównania przy $\lambda=280$ transmitancja promieniowania przez folie WSSP75/GEL25, CMC75/GEL25, GAR75/GEL25 i OSA75/GEL25 wynosiła odpowiednio $\sim 8\%$, 11% , 32% i 39% (P5-Rysunek 2). Folia WSSP75/GEL25 okazała się być lepszym blokerem światła UV niż folia CMC75/GEL25, co przypuszczalnie wytłumaczyć można obecnością niewielkiej ilości białka ($\sim 5\text{--}14\%$) przyłączonego do polisacharydu [160, 161]. Dzięki zawartości GEL, wszystkie folie były nieprzepuszczalne dla promieniowania o długości fali krótszej niż $\sim 240 \text{ nm}$.

Wraz ze wzrostem zawartości AST, folie stawały się coraz mniej przepuszczalne dla światła UV/VIS (P5-Rysunek 2). Było to spowodowane coraz intensywniejszym odbijaniem, rozpraszaniem i pochłanianiem promieniowania przez liczniejsze granulki skrobi (P5-Rysunek 1C). Wszystkie folie domieszkowane AST silnie absorbowały promieniowanie widzialne w zakresie 450-500 nm, czyli w zakresie położenia maksimum absorpcji ASX [168]. W porównaniu do folii kontrolnych, folie domieszkowane AST były ciemniejsze, czerwone i bardziej żółte (P5-Rysunki S3-S5). Najmniejszy dodatek AST (tj. 0,25%) umożliwił otrzymanie folii o najwyższych wartościach parametrów a^* i b^* , czyli o najbardziej czerwono-żółtej barwie. W wyniku stosunkowo dużej siły barwienia, wraz ze wzrostem zawartości AST czerwona barwa folii stawała się coraz ciemniejsza (P3-Rysunek S1, P5-Rysunek S3), a tym samym mniej wyrazista (P3-Tabela 1, P4-Rysunek 2).

Wiadomym jest, że materiały biopolimerowe ulegają starzeniu, czego widocznym objawem jest zmiana ich barwy, świadcząca o zmianach w strukturze chemicznej. Porównanie całkowitej różnicy barwy (ΔE) folii kontrolnych przechowywanych w temperaturze 25°C wykazało, że największą tendencję do zmiany barwy miała folia WSSP75/GEL25 (P5-Tabela 2). Przyczyną było głównie jej ciemnienie i żółknięcie (P5-Rysunki S3 i S5), które z kolei mogło być konsekwencją zarówno ciemnienia pigmentów zawartych w WSSP, jak i reakcji brązowienia nieenzymatycznego. Udział WSSP w reakcjach Maillarda został już wcześniej udowodniony [169]. Największą stabilność barwy (czyli najmniejszą wartość ΔE) miały folie kontrolne zawierające CMC i GAR. Po 60 dniach przechowywania, wartości ΔE dla ww. folii wynosiły odpowiednio 0,98 i 1,09. Różne źródła podają różne interpretacje wartości parametru ΔE . Przykładowo, gdy ΔE wynosi od 0 do 1, różnica jest niewidoczna, w zakresie od 1 do 2 – różnica zaczyna być widoczna dla doświadczonego obserwatora, od 2 do 3,5 – różnica jest widoczna również dla niedoświadczonego obserwatora, od 3,5 do 5 – różnica jest dobrze widoczna, natomiast powyżej 5 – obserwator odbiera ją jako dwa różne kolory [170]. A zatem, podczas przechowywania w temperaturze pokojowej, tylko folie CMC75/GEL25 i GAR75/GEL25 zachowały swoją barwę. Na podstawie dodatkowego badania w warunkach przyspieszonego starzenia (60°C) stwierdzono, że zmiana barwy folii CMC75/GEL25 była ponad trzy razy mniejsza niż pozostałych folii kontrolnych (P5-Tabela 2). Przyczyną tego zjawiska była najprawdopodobniej ograniczona zdolność do reakcji Maillarda, wynikająca z niemieszalności CMC i GEL (P3-Rysunek 2A-B).

ASX jest podatna na działanie światła, temperatury oraz czynników utleniających. Stabilność oksydacyjna tego barwnika może być skutecznie zwiększona poprzez osadzenie na różnych nośnikach [171]. Tendencje do zmiany barwy folii domieszkowanych AST przechowywanych w temperaturze pokojowej na ogół pokrywały się z tymi obserwowanymi dla folii kontrolnych (P5-Tabela 2). Niezależnie od stężenia AST, największy spadek wartości parametru a^* obserwowano dla folii WSSP75/GEL25 (P5-Rysunek S4), co sugeruje wysoką niestabilność ASX w tym nośniku. Testy przyspieszonego starzenia ujawniły, że barwa folii zawierających AST była bardziej podatna na zmianę aniżeli folii kontrolnych (P5-Tabela 2, Rysunki S4-S6). Z powodu intensywniejszego przebiegu reakcji Maillarda, pomiary wartości parametru a^* prób przechowywanych w temperaturze 60°C, okazały się nieprzydatne w ocenie stabilności ASX w foliach. Niemniej jednak, w warunkach podwyższonej temperatury, wszystkie folie domieszkowane AST stawały się coraz jaśniejsze wraz z upływem czasu (P5- Rysunek S6), co jednoznacznie wskazuje na degradację barwnika. Na podstawie porównania względnego przyrostu wartości parametru L^* (przyrostu jasności) stwierdzono, że AST była najmniej stabilna w folii WSSP75/GEL25, ale tylko wówczas gdy poziom dodatku wynosił 0,25 i 0,5%. Niezależnie od rodzaju folii, wraz ze wzrostem zawartości AST obserwowano coraz mniejsze rozjaśnienie barwy spowodowane przechowywaniem (P5-Rysunek S6), co sugeruje, że AST jest stabilniejsza jeśli jest dodana w większej ilości.

7.3.3. Właściwości fizykochemiczne

Folie kontrolne zawierające CMC i OSA charakteryzowały się większą WC aniżeli folie zawierające GAR i WSSP (~14% vs. ~11%, P5-Tabela 1). Zaobserwowano tendencję spadku WC wraz ze wzrostem zawartości AST. Przypuszczalnie składniki AST oddziałując z składnikami folii, ograniczyły zdolność tworzenia wiązań wodorowych pomiędzy uplastycznionymi biopolimerami i cząsteczkami wody, co w konsekwencji mogło zmniejszyć retencję wody podczas formowania folii. Spośród folii zawierających AST, najwyższą WC miały folie zawierające CMC, co przypisać można obecności licznych grup hydrofilowych (hydroksylowych i karboksylowych) w strukturze tego polisacharydu. Bardzo dobre powinowactwo folii CMC do wody obserwowano już we wcześniejszych badaniach [59, 166].

Pomiary S_o i S_w zostały przeprowadzone przede wszystkim w celu wyjaśnienia mechanizmów kontrolujących migrację ASX z folii do wody destylowanej (płyn

modelowy imitujący żywność wg pkt 4 załącznika III rozporządzenia Komisji (WE) nr 10/2011) [34]. Badania migracji przeprowadzone w temperaturze 25°C ujawniły, że z wyjątkiem folii CMC75/GEL25 uwalnianie ASX przebiegało bardzo powoli, zwłaszcza w przypadku folii o małej zawartości AST. Obserwowano m.in. opóźniony start uwalniania (tzw. lag time (T_{lag})), a powyżej ~32 h testu oznaki zepsucia próbek [172]. Dla większości badanych folii nie można było wyznaczyć wartości $t_{50\%}$. Zgodnie z pkt 2.1.4. załącznika V rozporządzenia Komisji (WE) nr 10/2011 [34], jeśli konieczny jest długoterminowy czas kontaktu materiału z płynem modelowym w temperaturze pokojowej lub niższej, próby należy analizować w warunkach badania przyspieszonego przy podwyższonej temperaturze. Dlatego też w pracach P3 i P4 badania migracji AST, a tym samym testy rozpuszczalności i pęcznienia, przeprowadzono w wodzie destylowanej o temperaturze 30°C.

W odróżnieniu od wyników rozpuszczalności przedstawionych w pracy P1 (tj. uzyskanych w 25°C), w temperaturze bliższej temperaturze całkowitej rozpuszczalności GEL, wszystkie badane folie, bez względu na zawartość AST, były w 100% rozpuszczalne (P3-Rysunek 4, P4-Rysunek 4). Spośród folii kontrolnych najwolniej rozpuszczała się folia WSSP75/GEL25 (całkowite rozpuszczenie nastąpiło po upływie ~30 min). W przypadku pozostałych folii, czas ich rozpuszczenia wynosił ~10 min. W przypadku większości folii dodatek AST spowolnił ich rozpuszczanie w wodzie (P3-Rysunek 4, P4-Rysunek 4). Przypuszczalnie, składniki AST, w szczególności granulki skrobi, w sposób fizyczny i chemiczny utrudniły dostęp wody do uplastycznionych biopolimerów, co skutkowało ich słabszą solwatacją i tym samym wolniejszą erozją sieci polimerowej. Zaobserwowano, że obecność AST nie ograniczyła rozpuszczalności folii CMC75/GEL25. W świetle wyników poprzednich badań [125], wskazuje to, że niezależnie od rodzaju wprowadzonego dodatku, folie zawierające CMC są szybko i w pełni rozpuszczalne w wodzie. Co ciekawe, dodatek AST w ilości 0,25 i 0,5% istotnie zwiększył zwilżalność folii CMC75/GEL25 (P3-Tabela 2), co jednak przyczyniło się tylko do nieznacznej poprawy rozpuszczalności, nie wpływając na czas potrzebny do całkowitego rozpuszczenia. Nadmienić również należy, że folie OSA75/GEL25/AST ulegały dezintegracji w wodzie tworząc układ dyspersyjny z silną tendencją do separacji faz (P3-Rysunek S2). Obserwacja ta koreluje z wynikami badań Wu i McClements [2015] [133], którzy zaobserwowali, że mieszanie OSA z GEL skutkuje powstaniem słabo rozpuszczalnych polidyspersyjnych mikrosfer o średnicy od 5 do 13 μm .

Ponieważ folie były stosunkowo szybko rozpuszczalne, ich S_w określono jedynie dla 1-minutowego kontaktu z wodą. Kontrolna folia CMC75/GEL25 wykazywała bardzo wysoką wartość S_w (832%) (P3-Tabela 2), co potwierdza poprzednie obserwacje [43]. Spośród folii kontrolnych najniższy stopień uwodnienia (146%) miała folia zawierająca OSA (P3-Tabela 2). Przyczyną były najprawdopodobniej oktenylowe (hydrofobowe) podstawniki polisacharydu [173], które odpychały cząsteczki wody i w ten sposób utrudniały solwatację sieci polimerowej. W przypadku większości folii dodatek AST ograniczył ich wodochłonność (P3-Tabela 2, P4-Tabela 1). Jedynie w przypadku folii zawierającej OSA zaobserwowano wzrost S_w w porównaniu do próby kontrolnej. Ponieważ grupy hydrofobowe unikają kontaktu z cząsteczkami wody i łączą się wzajemnie, co prowadzi do minimalizacji powierzchni, istnieje możliwość, że na skutek oddziaływań z składnikami AST lipofilowość OSA uległa zmniejszeniu. To z kolei mogło prowadzić do osłabienia spójności wewnętrznej materiału i, w konsekwencji, poprawy absorpcji wody. W przypadku pozostałych folii, obecność AST najprawdopodobniej fizycznie i chemicznie utrudniała wiązanie wody przez uplastycznione biopolimery.

7.3.4. Właściwości mechaniczne

Folie CMC75/GEL25, niezależnie od zawartości AST, charakteryzowały się najwyższą wytrzymałością mechaniczną i najmniejszą podatnością na odkształcenie (P5-Tabela 1). Przykładowo ich TS była około 3, 4 i 13 razy większa w porównaniu do odpowiedników zawierających WSSP, GAR i OSA. Potencjalne przyczyny różnic we właściwościach mechanicznych folii zawierających różne polisacharydy omówiono już w pkt 7.1.3. Materiały celulozowe swoją znaczną wytrzymałość mechaniczną zawdzięczają ściśłemu równoległemu przyleganiu łańcuchów polimerowych, stabilizowanemu przez dużą liczbę wewnątrz- i międzycząsteczkowych wiązań wodorowych [174]. Warto nadmienić, że pomimo zakłócenia sieci karboksymetylocelulozowej przez mikrosfery żelatynowe (P3-Rysunek 2B), folia CMC75/GEL25 była równie wytrzymała jak jednopolimerowa folia CMC [175] oraz wytrzymalsza niż folia MC75/GEL25 (43,04 vs. 30,90 MPa) (P1-Tabela 3, P5-Tabela 1). Nadmienić należy, że chociaż bardziej zmodyfikowana celuloza (tj. CMC) pozwoliła na uzyskanie folii o większej wytrzymałości w porównaniu z polisacharydem strukturalnie bardziej zbliżonym do natywnej celulozy (tj. MC), to z uwagi na różnorodność dostępnych wariantów tych polimerów (różniących się

m.in. masą cząsteczkową i stopniem substytucji), nie można jednoznacznie uogólnić tego stwierdzenia.

Wpływ AST na właściwości mechaniczne różnił się w zależności od rodzaju folii (P5-Tabela 1). Dodatek AST istotnie obniżył TS folii CMC75/GEL25. Prawdopodobnie wynikało to z zakłócenia tworzenia wiązań wodorowych, co prowadziło do luźniejszego upakowania łańcuchów CMC. Brak wpływu AST na wytrzymałość i sztywność folii zawierających OSA i WSSP sugeruje, że mniej spójna sieć polimerowa, utworzona przez rozgałęzione i "niepasujące" do siebie łańcuchy polimerowe, jest mniej podatna na osłabienie. Co ciekawe, w przypadku folii GAR75/GEL25, czyli najbardziej łamliwego materiału, dodatek AST na poziomie 1% spowodował wzrost TS z 10,31 do 15,62 MPa. Jednocześnie zaobserwowano, że inkorporacja AST na poziomie 0,5 i 1% skutkowałą wzrostem sztywności folii z 314,90 do 423,41-673,45 MPa. W połączeniu z wcześniej przedstawionymi wynikami (P1-Tabela 3), sugeruje to, że zarówno AST, jak i AP pełniły rolę czynnika wypełniającego sieć polimerową utworzoną przez GAR. W przypadku folii z AST przypuszczalnie najważniejszym napełniaczem były ziarna skrobi. Utworzenie połączeń na granicy faz AST-GAR/GEL mogło zmniejszać objętość pustych przestrzeni wokół łańcuchów bocznych i/lub rozgałęzień polisacharydu, co pozytywnie wpłynęło na charakterystykę wytrzymałościową materiału.

Folie OSA75/GEL25, analogicznie do wyników poprzednich badań (P1-Tabela 3 i P2-Tabela 1), charakteryzowały się większą podatnością na rozciąganie ($E=108,08-139,21\%$ vs. $8,89-39,36\%$) oraz odkształcenie ($EM=16,16-22,98$ MPa vs. $314,90-1302,23$ MPa) niż pozostałe folie. Jak wspomniano uprzednio najprawdopodobniej spowodowane to było silnym plastyfikującym działaniem grup oktenyloburszynowych na łańcuchy amylopektyny, jak i GEL. Dla porównania, folie otrzymywane z natywnej kukurydzianej skrobi woskowej, uplastycznionej glicerolem, mają kilkukrotnie niższe wartości E [176] i kilkudziesięciokrotnie większą sztywność [177]. Dodatek AST na ogół nie miał istotnego wpływu na E folii. Niezależnie od zawartości AST, najmniej podatne na rozciąganie były folie GAR/GEL i CMC/GEL ($E = 8,89-25,20\%$) (P5-Tabela 1).

7.3.5. Uwalnianie astaksantyny

Szybkość i stopień uwalniania ASX uzależnione były zarówno od rodzaju folii i zawartości AST. W czasie 4-godzinne go kontaktu folii z wodą destylowaną stopień migracji ASX wyniósł od 35 do 100% (P3-Rysunek 5, P4-Rysunek 6). Pomimo

przeprowadzenia badań w podwyższonej temperaturze (30°C) oraz przedłużenia badania >4h (dane nieprzedstawione), nie udało się oszacować wartości $t_{50\%}$ dla folii OSA75/GEL25/AST-0,5% i 1%. Niepełne uwalnianie ASX z folii OSA75/GEL25, które w zależności od stężenia AST wynosiło około 35-63% (P3-Rysunek 5), mogło być spowodowane częściową immobilizacją AST w trudno rozpuszczalnych koacerwatach (P3-Rysunek S2). Możliwość taką wykazali Zhao i in. [2019] [56]. Jak wspomniano w pkt 7.3.3., folie OSA75/GEL25/AST, rozpuszczając się, nie tworzyły roztworu właściwego, lecz zawiesinę mikrocząsteczek (P3-Rysunek S2). W związku z powyższym pomimo, że folie te uznano za całkowicie rozpuszczone (P3-Rysunek 4), uwalnianie było niekompletne pomimo, że osiągnęło poziom stałego *plateau* (P3-Rysunek S3 i 5).

Pomiary współczynnika r wykazały, że erozja matrycy polimerowej w płynie akceptorowym była istotnym czynnikiem kontrolującym szybkość migracji ASX ze wszystkich badanych folii (P3-Rysunek S4, P4-Tabela 3). Zwiększenie stężenia AST zazwyczaj powodowało zmniejszenie rozpuszczalności folii (P3-Rysunek 4, P4-Rysunek 4), co prowadziło do spadku szybkości migracji ASX (P3-Tabela 4, P4-Tabela 2). Folie CMC75/GEL25/AST, wykazujące szybkie tempo rozpuszczania (P3-Rysunek 3), uwalniały ASX natychmiastowo ($t_{25\%}=1,20-1,74$ min) z tzw. efektem wyrzutu (ang. burst effect). W przypadku pozostałych folii, tj. zawierających rozgałęzione polisacharydy, start uwalniania ASX następował z opóźnieniem. Folie WSSP75/GEL25/AST, będące najtrudniej erodowalnymi (P4-Rysunek 4), charakteryzowały się najdłuższym opóźnieniem, wynoszącym 20 min (P3-Rysunek S3, P4-Rysunek 6), i tym samym oferowały najwolniejsze uwalnianie ASX ($t_{25\%}=31,64-87,57$ min vs. 1,20-26,46 min, P3-Tabela 4, P4-Tabela 2). W ujęciu porównawczym migracja ASX z folii WSSP75/GEL25 była nawet 4 krotnie wolniejsza niż w przypadku folii zawierających GAR i OSA i aż od 20 do 50 krotnie wolniejsza w porównaniu do folii CMC/GEL, w zależności od zawartości AST. Wiadomym jest, że mechanizm uwalniania substancji aktywnej uzależniony jest od architektury polimerowego nośnika [157]. W związku z tym, wolniejsze uwalnianie ASX z folii WSSP75/GEL25 mogło być również spowodowane silniejszą immobilizacją karotenoidu w rozgałęzionej strukturze polisacharydu. Mikroskopia sił atomowych wykazała, że WSSP mają gwieździsto-grzebieniową strukturę, i w ten sposób są bardziej rozgałęzione niż GAR [178]. Obecnie polimery rozgałęzione, w tym te dendrytyczne i gwieździste, stanowią obiekt badań w kontekście tworzenia nośników i/lub substancji pomocniczych, które modyfikują kinetykę uwalniania leków [179]. Ponieważ profile

uwalniania ASX były w dużym stopniu uzależnione od zawartości AST (P3-Rysunek 6, P4-Rysunek 7), nie można było wytypować jednego modelu matematycznego najlepiej opisującego migrację z poszczególnych rodzajów folii (P3-Table S2, P4-Table S2). W przypadku folii o natychmiastowym uwalnianiu ASX (tj. CMC75/GEL25) modele dwuparametrowe, tj. F-O F_{max} i Ho, oferowały lepsze dopasowanie do danych eksperymentalnych niż modele o większej liczbie parametrów (P3-Tabela S2). Model F-O opisuje kinetykę migracji substancji aktywnej, która nie jest mocno związana z matrycą polimerową, przez co uwalnia się z powierzchni nośnika natychmiast po kontakcie z płynem akceptorowym. Z kolei model Ho najlepiej sprawdza się w przewidywaniu kinetyki uwalniania substancji z łatwo erodowalnych nośników [158]. Przykładowo model ten dobrze opisywał kinetykę uwalniania amoksycyliny z tabletek wytworzonych z HPMC [180]. W przypadku folii zawierających OSA, GAR i WSSP, z powodu zaobserwowanego opóźnionego startu uwalniania ASX, do profili uwalniania na ogół lepiej pasowały bardziej złożone modele matematyczne (P3-Tabela S2, P4-Tabela S2). Wyjątek stanowiła folia WSSP75/GEL25/AST-1%, która jako jedyna oferowała *quasi*-liniowy przebieg uwalniania, czyli zbliżony do kinetyki zerowego rzędu (P4-Rysunek 7). Model Z-O opisuje układ, w którym szybkość uwalniania substancji aktywnej jest niezależna od jej stężenia, przez co uwalnianie zachodzi w stałym tempie i powoli [181]. Wykazano zatem, że folia WSSP75/GEL25/AST-1% ulegając powolnej niemal liniowej erozji (P4-Rysunek 4), umożliwiała migrację ASX do płynu akceptorowego w najbardziej równomiernych dawkach przez najdłuższy czas (P4-Rysunek 7). Na podstawie wartości n modelu K-P ($0,5 < n < 1$, P4-Tabela S4), można wnioskować, że uwalnianie ASX z folii WSSP75/GEL25/AST-1% miało charakter anomalny, tj. różny od dyfuzji Ficka (ang. anomalous (non-Fickian) diffusion). W tym przypadku uwalnianie kontrolowały jednocześnie dwa mechanizmy: dyfuzja składnika aktywnego i pęcznienie matrycy polimerowej [182]. W przypadku pozostałych folii, wartość n wynosiła poniżej 0,5 (P3-Tabela S4, P4 Tabela S4), co wskazuje, że uwalnianie ASX zachodziło głównie drogą tzw. pozornej dyfuzji Ficka (ang. *quasi*-Fickian diffusion) [183]. Mobilność dyfuzyjną ASX potwierdzili także Colín-Chávez i in. [2013] [96], aczkolwiek jak wspomniano w podrozdziale 4.3 badania tych autorów dotyczyły uwalniania naturalnej ASX z folii polietylenowych do etanolu.

W ujęciu całościowym, na podstawie porównania uśrednionych wartości wskaźników dopasowania poszczególnych modeli do wszystkich uzyskanych danych

eksperymentalnych, uwalnianie ASX najlepiej przewidywał model Pr_2 i niemal *ex aequo* Lo_2 (P3-Tabela S2, P4-Tabela S2). Obydwa modele należą do grupy modeli trzyparametrowych (Tabela 4).

7.3.6. „Uwolniona” i całkowita aktywność przeciwutleniająca

Zaobserwowano, że folie bez dodatku AST wykazywały stosunkowo wysoką aktywność przeciwrodnikową. W przypadku analizy potencjału przeciwutleniającego w takich samych warunkach pomiarowych w jakich prowadzono testy migracji (tj. pomiaru „uwolnionej” aktywności przeciwutleniającej), zaobserwowano, że w wyniku bezpośredniego kontaktu z roztworem ABTS⁺, folie kontrolne zneutralizowały od około 58 do 77% jego początkowej ilości (P3-Rysunek 7, P4-Rysunek 9). Z uwagi, że folie polisacharydowe mają znikomą potencjał przeciwrodnikowy w porównaniu do folii białkowych [184], uzyskany rezultat mógł być przede wszystkim konsekwencją aktywności przeciwutleniającej GEL. Reszty aminokwasowe tego białka, m.in. glicyna i prolina, przekazują elektrony na cząsteczki wolnych rodników, doprowadzając tym samym do ich neutralizacji [185]. Spośród folii kontrolnych najlepszą „uwolnioną” aktywność przeciwrodnikową miała folia CMC75/GEL25 (P3-Rysunek 7, P4-Rysunek 9). Przepuszczalność zdecydowała o tym jej szybka rozpuszczalność (P3-Rysunek 4) oraz niehomogenna struktura (P5-Rysunek 1), wynikająca z niemieszalności polimerów (P3-Rysunek 2). W rezultacie reszty aminokwasowe GEL mogły być bardziej reaktywne, przez co efektywniej „zmiatały” wolne rodniki. Zgodnie z oczekiwaniami wraz ze wzrostem zawartości AST folie miały coraz większą aktywność przeciwrodnikową (P3-Rysunek 7, P4-Rysunek 9). Biorąc pod uwagę końcowe wartości neutralizacji ABTS⁺ (tj. po upływie 3h), względne przyrosty „uwolnionej” aktywności przeciwrodnikowej spowodowane obecnością AST nie były duże w porównaniu do przyrostów wywołanych domieszkowaniem AP (P2-Rysunek 4B). Wy tłumaczyć można to niską zawartością ASX w AST (Tabela 1), przez co rzeczywiste stężenie ASX w FFS wynosiło 0,0125; 0,025 i 0,05%. Dla większości folii zaobserwowano występowanie silnej pozytywnej korelacji pomiędzy ilością uwolnionej ASX a „uwolnioną” aktywnością przeciwrodnikową ($r=0,72-0,93$, P3-Tabela S5, P4-Tabela 3). Nadmienić należy, że poza samą ASX, także dodatkowe przeciwutleniacze, takie jak DL- α -tokoferol i askorbinian sodu (Tabela 1), obecne w AST, bez wątpienia wpłynęły na aktywność przeciwutleniającą folii.

Całkowitą aktywność przeciwnokową folii mierzono po ich całkowitym rozpuszczeniu. Aktywność przeciwnokowa folii kontrolnych nie uległa zmianie podczas przechowywania (25°C, 60 dni, brak dostępu światła) (P5-Rysunek 3). Niezależnie od czasu przechowywania i zawartości AST. Najniższą całkowitą aktywność przeciwnokową miały folie WSSP75/GEL25. Przewidywalnie przyczyną była ich wysoka podatność na brązowienie nieenzymatyczne, jak sugerują wyniki pomiaru ΔE (P5-Tabela 2), które zmniejszyło ilość grup funkcyjnych GEL mogących wchodzić w interakcje z wolnymi rodnikami. Zaobserwowano, że folie o najmniejszej zawartości AST miały najbardziej stabilny potencjał przeciwutleniający (w przeważającej większości przypadków nie stwierdzono żadnych zmian). W przypadku folii o większej zawartości AST, istotne zmniejszenie zdolności „zmiatania” wolnych rodników występowało przeważnie dopiero po 60 dniach przechowywania (P5-Rysunek 3).

7.4. Folie polisacharydowo-żelatynowe z dodatkiem kurkuminy

Z mieszanin polisacharydów (CMC, GAR, OSA lub WSSP) i GEL w stosunku 75/25 otrzymano FFS, które domieszkowano wzrastającymi ilościami CUR (0,005, 0,01, 0,02 % w/w) uprzednio rozpuszczonej w etanolu. Większa zawartość CUR (>0,02%) skutkowała otrzymaniem folii pomarańczowo-żółtych, które zostały odebrane jako mniej atrakcyjne wizualnie (dane nieprzedstawione). Próby kontrolne nie zawierały dodatku CUR, ale zawierały etanol (kosolwent). Zbadano pH i mikrostrukturę FFS (techniką mikroskopii optycznej, mikroskopii z kontrastem różnicowo-interferencyjnym oraz kriomikroskopii elektronowej). Następnie z FFS otrzymano 16. rodzajów folii. Właściwości otrzymanych materiałów opisano w publikacji: P6 – Łupina K., Kowalczyk D., Lis M., Basiura-Cembala M. (2023). Antioxidant polysaccharide/gelatin blend films loaded with curcumin - A comparative study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 236, 123945.

7.4.1. Właściwości strukturalne

Wyniki obrazowania mikroskopowego FFS (P6-Rysunek 1) były na ogół zgodne z wcześniejszymi obserwacjami (P3-Rysunek 2, P4-Rysunek 1). Jedynie w przypadku mieszaniny CMC75/GEL25 liczebność mikrosfer była wyraźnie większa, co wskazuje, że dodatek etanolu mógł nasilić niemieszalność polimerów (P6-Rysunek 1A). Jak wykazano za pomocą obrazowania 3D (P6-Rysunek 2B), pomimo niehomogennej mikrostruktury, powierzchnia folii CMC75/GEL25 była mniej chropowata aniżeli folii WSSP75/GEL25

($R_q=16,23$ vs. $21,18$). Folia GAR75/GEL25 była najbardziej gładka ($R_q=4,59$). Brak kryształów i/lub agregatów wskazuje, że CUR była dobrze rozpuszczona/zdyspergowana w FFS (P6-Rysunek 1). W przypadku mieszalnych układów polisacharydowo-żelatynowych (tj. GAR/GEL, OSA/GEL i WSSP/GEL) rozmieszczenie CUR było równomierne (P6-Rysunek 1A-B, P6-Rysunek 2). Z kolei w mieszaninie CMC/GEL CUR uległa całkowitej enkapsulacji w żelatynowych mikrosferach. W konsekwencji średnie rozmiary mikrosfer, określone na podstawie zdjęć mikroskopowych, zwiększyły się z około 50 do 80 μm . Nierówna dystrybucja CUR była najprawdopodobniej wynikiem oddziaływań hydrofobowych między CUR a apolarnymi resztami GEL. Warto także zauważyć, że w przeciwieństwie do GAR, OSA i WSSP, które posiadają właściwości amfifilowe [186], CMC nie zawiera rejonów hydrofobowych, co czyni ją wyjątkowo hydrofilową. W związku z powyższym istotną rolę w enkapsulacji mogła także odegrać niezgodność fizykochemiczna między CUR a CMC, co zostało uprzednio zasugerowane na podstawie obserwacji mikroskopowych [187]. Dodatek CUR nie miał wyraźnego wpływu na zmiany mikrostruktury folii (P6-Rysunek 2A, 2C), niemniej jednak obserwowano nieznaczny spadek lub wzrost chropowatości powierzchni (P6-Rysunek 2B).

Najprawdopodobniej z powodu niskiego poziomu inkorporacji ($\leq 0,02\%$), dodatek CUR nie spowodował zmian w widmach FTIR-ATR folii (P6-Rysunek 3). Warto zaznaczyć, że Reddy i Kim [2019] [188] wykazali, że spektrofotometria FTIR umożliwia obserwację zmiany składu folii po dodaniu CUR w ilości $\geq 1\%$.

Jak w poprzednich badaniach (P1-Rysunek 6), cechą wspólną dyfraktogramów folii polisacharydowo-żelatynowych była obecność dwóch pików położonych przy $2\theta \approx 8^\circ$ i 20° (P6-Rysunek 4), które reprezentują odpowiednio fazę krystaliczną i amorficzną. Ich występowanie świadczy zatem o semikrystalicznej strukturze folii. Pierwszy pik przypisać można głównie obecności GEL a dokładniej, częściowemu powrotowi pojedynczych łańcuchów polipeptydowych GEL do postaci natywnego kolagenu [P1][170,184]. Na uwagę zasługuje fakt, że w porównaniu do wyników wcześniejszych badań [175], pik przy $2\theta \approx 8^\circ$ na dyfraktogramach folii CMC75/GEL25 był słabo dostrzegalny. Prawdopodobnie było to spowodowane nierównomiernym rozrzutem frakcji żelatynowej w folii (P6-Rysunek 2), co skutkowało brakiem powtarzalności wyników analizy rentgenowskiej. CUR to związek o wysokiej krystaliczności, na co wskazują wyraźne i ostre piki dyfrakcyjne [190]. Ich brak w obrazowaniu dyfraktograficznym folii (P6-Rysunek 4), sugeruje, że CUR osiągnęła stan amorficzny. W przypadku większości folii dodatek CUR

(w ilości 0,02%) spowodował zmiany (spadek lub wzrost) intensywności pierwszego pików dyfrakcyjnego, co wskazuje, że CUR mogła mieć wpływ na proces renaturacji kolagenu. Podobne zjawisko obserwowali już inni autorzy [191]. W przypadku wszystkich folii dodatek CUR zwiększył intensywność pików położonych przy $2\theta \approx 20^\circ$, co przypuszczalnie było związane z częściową rekrytalizacją CUR w czasie formowania folii, zwłaszcza wskutek odparowania kosolwenta. W świetle powyższego przypuszczenia folia GAR75/GEL25 mogła wykazywać najlepsze działanie antykrystalizacyjne.

Na wszystkich termogramach folii widoczne były niewielkie pików endotermiczne zlokalizowane w zakresie temperatur od 73 do 98 °C (P6-Rysunek 5). Ich obecność jest najprawdopodobniej objawem fizycznego starzenia się folii [192–194]. Zjawisko to zachodzi gdy amorficzny lub semikrystaliczny polimer przechowywany jest w temperaturze poniżej wartości temperatury zeszklenia (T_g). Proces polega na porządkowaniu się fazy amorficznej, co zmniejsza ruchliwość łańcuchów polimerowych i w konsekwencji prowadzi do wzrostu kruchości. Piki „fizycznego starzenia” zazwyczaj zakrywa T_g polimeru, co uniemożliwia jej określenie. Pomimo tego, na podstawie usytuowania pików „fizycznego starzenia” można wywnioskować, że folie zawierające OSA i GAR miały odpowiednio najniższą i najwyższą T_g . Nadmienić należy, że jest to temperatura w której polimery/materiały przechodzą ze stanu twardego i sztywnego w stan bardziej elastyczny i sprężysty.

Temperatura mięknięcia/topnienia (T_m) folii kontrolnych wynosiła około 192°C (GAR75/GEL25), 214°C (WSSP75/GEL25) i 224°C (CMC75/GEL25 i OSA75/GEL25) (P6-Rysunek 5). Wartości te są wyższe aniżeli np. zaobserwowane dla folii otrzymanych z GEL (~170°C) [195]. Należy jednak zaznaczyć, że T_m folii biopolimerowych zależy od wielu czynników, m.in. od zawartości plastyfikatora [196]. Dodatek CUR zwiększył T_m wszystkich folii. Ponieważ T_m kryształów CUR wynosi około 180°C [197], zaobserwowany wzrost nie był bezpośrednią konsekwencją obecności CUR, a raczej wystąpieniem chemicznych interakcji pomiędzy biopolimerami i CUR (stymulowanych ogrzewaniem), które skutkowały wytworzeniem matrycy odporniejszej na mięknięcie w czasie obróbki termicznej. Piki egzotermiczne usytuowane w zakresie temperatur 250–265°C, zaobserwowane dla folii zawierających CMC i WSSP (P6-Rysunek 5), sugeruje rozpoczęcie procesu ich dekompozycji [174,198–200]. Ponieważ CUR ulega termicznej degradacji w temperaturze powyżej 400°C [201], a próby ogrzewano do temperatury 300°C, na termogramach folii zawierających CUR nie obserwowano „nowych” pików

egzotermicznych. Seria ostrych pików zaobserwowana pod koniec ogrzewania folii GAR75/GEL25 i WSSP75/GEL25, zarówno z dodatkiem CUR, jak i bez, najprawdopodobniej wynikała z drgań szczelnie zamkniętych naczynek pomiarowych (powodowanych przez ciśnienie), a nie z przemian fizycznych i chemicznych badanych materiałów.

7.4.2. Właściwości fizykochemiczne i szybkość przenikania pary wodnej

Folie OSA75/GEL25 na ogół miały wyższą WC w porównaniu do pozostałych otrzymanych materiałów (14,97-17,78% vs. 12,33-14,34% P6-Tabela 1). Co ciekawe, jedynie w przypadku folii OSA75/GEL25 dodatek CUR zmniejszył WC. Przypuszczalnie asocjacja hydrofobowych łańcuchów OSA i CUR, jak również wiązania wodorowe pomiędzy nimi [202, 203] ograniczyły oddziaływania polimer-woda, co skutkowało zmniejszoną retencją wody.

Podobnie jak w przypadku folii z dodatkiem AST [P3, P4], w celu wyjaśnienia mechanizmów kontrolujących uwalnianie CUR z folii wykonano pomiary So i Sw. Ponieważ CUR jest słabo rozpuszczalna w wodzie (~1 mg/ml) [204], jako medium akceptorowe zastosowano 50% etanol, czyli płyn modelowy D1 imitujący żywność. Po upływie 2h kontaktu z 50% etanolem, So folii wynosiła od około 18 do 100% (P6-Rysunek 6A). Podobnie jak w pracy P3, folie CMC75/GEL25, niezależnie od zawartości CUR, uległy całkowitemu rozpuszczeniu, co potwierdza wysoką zdolność solwatacji układu CMC/GEL. Dodatkowo nadmienić należy, że CMC rozpuszcza się w rozpuszczalnikach mieszających się z wodą, takich jak etanol (w stężeniu do 50%) [205]. Ponieważ GAR, OSA i WSSP są nierozpuszczalne w etanolu [115, 206], So otrzymanych z nich folii była niższa aniżeli ta wykazana w testach prowadzonych w wodzie (P3-Rysunek 4, P4-Rysunek 4). W roztworze wodno-etanolowym folie miały również mniejszą zdolność absorpcji płynu (P6-Rysunek 6B). Pomimo tego uzyskane wartości Sw odzwierciedlają kolejność zaobserwowaną w poprzednich badaniach P3 i P4]. W większości przypadków dodatek CUR do folii nie zmienił ich So i Sw (P6-Rysunek 6A-B).

Spośród folii kontrolnych najbardziej przepuszczalne dla pary wodnej były folie zawierające CMC (P6-Tabela 1), co jest niezgodne z wynikami wcześniejszych badań, wskazującymi, że folia CMC75/GEL25 ma istotnie niższą WVP niż folia OSA75/GEL25 (P3-Tabela 2). Rozbieżność ta, może wynikać z obecności etanolu (4%) w FFS, który

przypuszczalnie zmienił spójność sieci polimerowej, np. poprzez częściowe zagregowanie frakcji polisacharydowej i/lub denaturację GEL. Musso i in. [2017] [207] wykazali, że GEL rozpuszczona w ~50% roztworze etanolowym tworzy folie o mniej zwartej strukturze w porównaniu do wodnego roztworu. Zjawisko to tłumaczyć można zakłóceniem w powstawaniu wiązań wodorowych pomiędzy łańcuchami GEL wskutek utworzenia wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami etanolu i GEL. Jak wspomniano w pkt 7.4.1., również porównanie dyfraktogramów folii CMC75/GEL25 uzyskanych z FFF bez [175] i z dodatkiem etanolu (P6-Rysunek 4) sugeruje możliwość wpływu etanolu na wzajemną asocjację łańcuchów polipeptydowych GEL. Zaobserwowano, że jedynie 0,2% dodatek CUR obniżył WVP folii CMC75/GEL25, co mogło być spowodowane zwiększeniem rozmiarów mikrosfer żelatynowych (P6-Rysunek 1A), które mogły skuteczniej blokować przenikanie pary wodnej. W przypadku pozostałych folii dodatek CUR nie zmienił ich WVP (P6-Tabela 1).

7.4.3. Właściwości optyczne

Pomimo, udokumentowanego działania przeciwutleniającego CUR [208], w produkcji żywności związek ten jest głównie wykorzystywany jako substancja barwiąca (E 100) [17]. W konsekwencji wzrastający dodatek CUR umożliwił otrzymanie żółto zabarwionych folii, na ogół coraz ciemniejszych o coraz intensywniejszym żółto-czerwonym odcieniu (P6-Rysunek 7). Pomimo wyraźnej żółtej barwy kontrolnej folii WSSP75/GEL25, odróżniającej ją od pozostałych prób, dodanie CUR skutkowało zatarciem różnic w wartościach parametru b^* poszczególnych rodzajów folii. Jak wspomniano w podrozdziale 4.3 CUR ulega tautomerii keto-enolowej na którą ma wpływ pH. Wyższe pH sprzyja występowaniu większej ilości formy enolowej, która ma odcień bardziej czerwony w porównaniu do żółtej formy ketonowej dominującej w środowisku kwaśnym [209]. Zjawisko tautomerii może zatem tłumaczyć dlaczego przy zastosowaniu największego poziomu dodatku CUR, folia CMC75/GEL25, jako materiał o najwyższym pH (6,31 vs. 4,93-5,29, P6-Tabela 1), charakteryzowała się największym udziałem barwy czerwonej.

Wykazano, że barwa folii kontrolnych oraz domieszkowanych CUR ulegała zmianie w czasie ich 60-dniowego przechowywania (25°C, RH 50%, brak dostępu światła). Na podstawie porównania wartości ΔE zaobserwowano, że spośród folii kontrolnych największą tendencję do zmiany barwy miała folia WSSP75/GEL25 ($\Delta E_{60dni}=3,55$ vs. <2 ;

P6-Rysunek 8), co potwierdzają wyniki uzyskane w pracy P5. Jak uprzednio wyjaśniono (pkt 7.3.2.) mogło być to spowodowane zarówno ciemnieniem pigmentów zawartych w WSSP (P6-Rysunek S1), jaki i zajściem reakcji Maillarda. Niezależnie od stężenia CUR, folie CMC75/GEL25 miały najbardziej stabilną barwę ($\Delta E_{60dni} < 1,6$; P6-Rysunek 8). Oprócz ograniczonej zdolności do reakcji Maillarda, wynikającej z odrębności polimerów tworzących materiał, przyczyną było najprawdopodobniej zamknięcie CUR w mikrosferach żelatynowych (P6-Rysunek 1). W tym względzie istotną rolę ochroną mogło odegrać nie tylko lepsze odizolowanie CUR od środowiska zewnętrznego (na skutek zmniejszenia powierzchni kontaktu), ale także aktywność przeciwutleniająca samej GEL [210]. Wysokie wartości ΔE odnotowane dla folii OSA75/GEL25, sugerują, że nośnik ten najslabiej zabezpieczał CUR przed degradacją. Wynik ten jest nieoczekiwany, ponieważ udowodniono, że OSA skutecznie zwiększa stabilność CUR [211]. W tym względzie należy nadmienić, że powyżej przytoczone badania dotyczyły sypkiej mieszaniny nanokurkuminy z OSA przechowywanej w szczelnie zamkniętym pojemniku. W wodnym roztworze CUR, w szczególności o $pH \geq 7$, CUR ma niską stabilność chemiczną [212], gdyż pod wpływem nukleofilowego ataku jonu OH^- ulega degradacji do feruloilometanu i kwasu ferulowego, a następnie do waniliny i acetonu [213]. W związku z powyższym możliwe jest, że nieco większa wilgotność folii OSA75/GEL25/CUR (14,97-16,46% vs. 12,33-14,34%, P6-Tabela 1) przyczyniła się do ich intensywniejszej dyskoloryzacji.

Przezroczystość folii na ogół malała w następującej kolejności: GAR/GEL < OSA/GEL < CMC/GEL < WSSP/GEL (P6-Tabela 1). Nadmienić należy, że w zależności od zawartości CUR różnice w wartościach OP między „sąsiadującymi” ze sobą w rankingu foliami nie zawsze były statystycznie istotne. Jak wspomniano w pkt 7.3.2., różnice w przezroczystości folii wynikały z ich mikrostruktury (P6-Rysunek 2). Podobnie jak w poprzednich pracach (P1, P2, P5), wszystkie folie bardzo dobrze blokowały promieniowanie UV-C (<280 nm) (P6-Rysunek 6C). W całym zakresie promieniowania UV najlepszą barierę zapewniała folia WSSP75/GEL25, co wynikało z ziarnistej, ściśle upakowanej mikrostruktury tej folii. Widoczne na wykresach transmitancji (P6-Rysunek 6C) zagłębienie w okolicy $\lambda = 430$ nm odpowiada maksimum absorpcji CUR [209]. Z tej przyczyny większy poziom dodatku CUR skutkowało większym spadkiem transmitancji w coraz rozleglejszym zakresie długości fali. Tym samym zaobserwowano także możliwość spadku przezroczystości folii (P6-Tabela 1). Ponieważ CUR silnie absorbuje promieniowanie UV [209], wraz ze wzrostem jej zawartości obserwowano znaczną

poprawę zdolności barierowych folii w stosunku do promieniowania UV, zwłaszcza typu A (315-400 nm) (P6- Rysunek 6C).

7.4.4. Właściwości mechaniczne

Pomiary właściwości mechanicznych folii potwierdziły wcześniej uzyskane wyniki, tj. pod względem wytrzymałości mechanicznej, określonej zarówno za pomocą testu osiowego rozciągania jak i przebicia, poszczególne rodzaje folii można było uszeregować następująco:

- bardzo wytrzymałe: CMC75/GEL25,
- umiarkowanie wytrzymałe: GAR75/GEL25 i WSSP75/GEL25,
- mało wytrzymałe: OSA75/GEL25.

Niezależnie od zawartości CUR, TS folii CMC75/GEL25, była około dwa razy większa w porównaniu do folii zawierających GAR i WSSP oraz ponad 8 razy większa niż folii OSA75/GEL25 (P6-Tabela 2). Podobnie jak w poprzednich badaniach [P1, P2, P5] najbardziej i najmniej rozciągliwe były odpowiednio folie OSA75/GEL25 (125,14-133,55%) i GAR75/GEL25 (<10%) (P6-Tabela 2). Folie zawierające CMC oraz WSSP miały podobną podatność na rozciąganie (~30%). Potencjalne przyczyny różnic we właściwościach mechanicznych folii zawierających różne polisacharydy omówiono już w podpunkcie 7.1.6. Dodatek CUR nie miał istotnego wpływu na parametry mechaniczne folii.

7.4.5. Uwalnianie kurkuminy

Podczas 30-minutowego kontaktu folii z płynem akceptorowym (50% etanol), w zależności od rodzaju folii i zawartości CUR, uwolnieniu uległo od około 42% do blisko 100% CUR (P6-Rysunek 9). Po tym czasie ilość uwolnionej CUR osiągnęła stan *plateau* (dane nie przedstawione). Folia CMC75/GEL25, jako materiał wysoce podatny na erozję w płynie modelowym, zapewniała na ogół najszybsze ($t_{50\%}=4,13-5,61$ min, P6-Tabela 3) i najkompletniejsze uwalnianie CUR (83,36-98,18%). Najprawdopodobniej z powodu podatności układu CMC/GEL na szybką solwatację i dezintegrację, enkapsulacja CUR w żelatynowych mikrosferach nie przyczyniła się do spowolnienia tempa jej uwalniania. Najwolniejsze ($t_{50\%}=4,58-97,95$ min) i najmniej kompletne (42,11–61,61%) uwalnianie CUR zaobserwowano w przypadku folii OSA75/GEL25. Sugeruje to silne związanie CUR z układem OSA/GEL. Wg danych literaturowych polisacharydy modyfikowane

bursztynianem oktenyłu w kontakcie z wodą tworzą hydrofobowy rdzeń, który może silnie wiązać substancje o lipofilne, takie jak CUR [184, 185]. Możliwe jest tym samym, że CUR uległa częściowemu mikrokapsułkowaniu w koacerwatach OSA/GEL, na co wskazują obserwacje mikroskopowe (P6-Rysunek 1A).

W ujęciu całościowym, tj. na podstawie porównania średnich wartości wskaźników dopasowania poszczególnych modeli do wszystkich profili uwalniania, czteroparametrowa wersja modelu Weibull'a (Wb_4) wykazywała najwyższy poziom dopasowania do danych eksperymentalnych (średnia ze wszystkich wartości $R^2_{\text{skorygowany}}$ wynosiła 0,9952) (P6-Tabela S2). Pomimo wysokiego dopasowania, wadą tego modelu była niemożność predykcji wartości $t_{50\%}$ dla folii, która nie osiągnęła poziomu 50% uwalniania (tj. OSA75/GEL25/CUR-0,005%). W tym przypadku w ilościowym oszacowaniu szybkości migracji CUR bardziej przydatny okazał się standardowy (trzyparametrowy) model Wb_1 (Tabela 4). Niezależnie od rodzaju folii, uwalnianie CUR zachodziło drogą tzw. pozornej dyfuzji Ficka (ang. *quasi-Fickian diffusion*), na co wskazują wartości parametru $n < 0,5$ (P6-Tabela 3).

7.4.6. Właściwości przeciwutleniające

Pod względem aktywności przeciwrodnikowej, określonej metodą reakcji z DPPH*, folie kontrolne uszeregować można było w następującej kolejności GAR75/GEL25 > OSA75/GEL25 > WSP75/GEL25 > CMC75/GEL25 (P6-Tabela 3). Wysoki potencjał przeciwrodnikowy folii GAR75/GEL75 mógł być związany z faktem, że GAR zawiera dobrze ekstrahowalne (zwłaszcza alkoholem) związki polifenolowe [215, 216]. Folia CMC75/GEL25 wykazała znikomą zdolność neutralizacji DPPH* (~1,7%, P6-Rysunek 10), co potwierdziło wcześniejsze obserwacje [217, 218]. Niemniej jednak zauważyć należy, że badania przeprowadzone przy użyciu testu z ABTS** (P3-Rysunek 7) [175] wykazały dobrą aktywność przeciwrodnikową folii CMC75/GEL25, co jak uprzednio wyjaśniono było spowodowane działaniem przeciwutleniającym GEL. Rozbieżne wyniki badań przypisać można różnym mediom reakcyjnym zastosowanym w testach, tj. w przypadku DPPH* i ABTS** użyto odpowiednio 50% etanol i wodę destylowaną. Przymuszczalnie etanol uszkodził strukturę wtórną GEL, przez co nie mogła ona pełnić funkcji przeciwutleniacza [219, 220].

Aktywność przeciwrodnikowa folii wzrastała wraz ze wzrostem zawartości CUR (P6-Rysunek 10, Tabela 3). Przykładowo aktywność przeciwrodnikowa folii

zawierających największą ilość CUR (zmierzona po upływie 2 h), w zależności od ich rodzaju, była około 4–40 razy większa w porównaniu do folii kontrolnych (P6-Rysunek 10). Największą poprawę potencjału przeciwutleniającego zaobserwowano w przypadku folii o najsłabszej początkowej aktywności antyoksydacyjnej (tj. CMC75/GEL25). Stwierdzono słabą dodatnią korelację ($r=0,26$) między wartościami $t_{50\%}$ i $t_{50\%DPPH^*}$ (P6-Rysunek S5), co wskazuje, że kinetyka neutralizacji wolnych rodników przez folie nie odzwierciedlała kinetyki migracji CUR. W zastosowanym układzie pomiarowym istotną aktywność przeciwrodnikową miała zatem nie tylko CUR uwolniona, ale także jej frakcja pozostająca w nośniku, w tym również sam nośnik (w większości przypadków). Pomimo, że rodzaj folii różnicował wartości $t_{50\%DPPH^*}$ (P6-Tabela 3), to po osiągnięciu *plateau* folie aktywowane tymi samymi ilościami CUR miały stosunkowo porównywalną zdolność neutralizacji DPPH* (P6-Rysunek 10).

8. Wnioski

1. OSA uplastyczniona glicerolem posiada właściwości powłokotwórcze, ale nie foliotwórcze. Zastąpienie co najmniej 25% OSA przez GEL umożliwia uzyskanie folii, którą można poddać badaniom materiałowym.
2. GEL, MC i CMC, jako polimery o liniowej i semikrystalicznej strukturze, umożliwiają otrzymanie folii o większej wytrzymałości mechanicznej i sztywności w porównaniu do GAR, OSA i WSSP, czyli polimerów o rozgałęzionej, a tym samym bardziej amorficznej strukturze. W ujęciu funkcyjnym, pochodne kolagenu i celulozy, czyli biopolimerów pełniących w organizmach funkcje strukturalne, pozwalają na uzyskanie wytrzymalszych materiałów aniżeli skrobia i WSSP, które przyżyciowo spełniają funkcje magazynujące, czy GAR, która pełni funkcję obronną.
3. Większy udział GEL w recepturze umożliwił otrzymanie folii lepiej chroniących przed promieniowaniem UV, o zmniejszonej rozpuszczalności w wodzie i zwiększonej wytrzymałości (z wyjątkiem folii MC/GEL). GEL znacząco redukuje kruchość folii zawierających GAR, co przekłada się na zmniejszenie problemów związanych z ich wytwarzaniem i obróbką. Podobne działanie wzmacniające wykazuje również dodatek AP i AST w ilości $\geq 1\%$.
4. Pomimo, że zarówno MC, jak i CMC nie mieszają się z GEL (co prowadzi do powstania żelatynowych mikrosfer), mieszanina CMC75/GEL25 jest bardziej jednorodna. Dzięki temu możliwe jest uzyskanie folii lepszej jakości, charakteryzujących się gładszą powierzchnią i większą przezroczystością.
5. Ze względu na bardziej homogeniczną mikrostrukturę, folie polisacharydowo-żelatynowe zawierające GAR i OSA są bardziej przezroczyste niż te, które zawierają pochodne celulozowe i WSSP.
6. Folie OSA75/GEL25, niezależnie od obecności substancji domieszkującej, charakteryzują się wyższą wilgotnością, niższą wytrzymałością mechaniczną oraz lepszą podatnością na rozciąganie w porównaniu do folii zawierających GAR, WSSP oraz pochodne celulozowe. Wadą tych folii jest rekrytalizacja OSA, a przede wszystkim skłonność do sklejanania się, co utrudnia manipulację i potencjalne pakowanie produktów.
7. Zoptymalizowane poziomy domieszkowania AST (0,25-1% w/w) i CUR (0,005-

0,02% w/w) umożliwiają otrzymanie kolorystycznie atrakcyjnych folii, odpowiednio czerwonych i żółtych, bez efektu „przeładowania” barwnikiem. Zwiększająca się zawartość AP, AST i CUR przyczynia się do wzrostu potencjału przeciworodnikowego oraz fotoprotekcyjnego folii. Z reguły, ze względu na niewielką ilość dodatku AST i CUR, ich wpływ na parametry wytrzymałościowe folii jest nieistotny lub znikomy.

8. W płynie modelowym imitującym żywność o charakterze lipofilnym migracja AP z folii OSA75/GAR25 jest około 2x oraz 16x szybsza niż z folii WSSP75/GEL25 i GAR75/GEL25. Folia GAR/GEL/AP-1% zapewnia najpowolniejszą (wydłużoną) neutralizację wolnych rodników, charakteryzującą się stosunkowo stałą szybkością, zbliżoną do kinetyki zerowego rzędu. Ww. system wykazuje zatem najlepszy potencjał do kontrolowania migracji AP, maksymalizując skuteczność działania przeciwutleniającego przy jednoczesnym zminimalizowaniu dawki substancji aktywnej.
9. Enkapsulacja AST i CUR przez koacerwat OSA/GEL spowalnia proces ich uwalniania, co może być korzystne w różnych aplikacjach, takich jak opakowania aktywne czy farmaceutyka. Niekompletne uwalnianie ASX i CUR z folii OSA75/GEL25 sugeruje, że w bezpośrednim kontakcie z żywnością część dawki przeciwutleniacza będzie efektywnie utrzymywana na powierzchni produktu, gdzie reakcje utleniania przebiegają najintensywniej.
10. Gwałtowna migracja ASX z folii CMC75/GEL25 (sięgająca ~80% dodatku) zapewnia jej natychmiastowe działanie w płynie modelowym, ale jednocześnie zmniejsza dawkę podtrzymującą w nośniku. Folia WSSP/GEL/AST-1% uwalnia ASX w najbardziej równomiernych dawkach, co może wydłużyć działanie ochronne folii w warunkach rzeczywistego użytkowania, zwłaszcza w przypadku długotrwałego przechowywania żywności.
11. Modele matematyczne cztero- i trzy-parametrowe zazwyczaj lepiej odzwierciedlają kinetykę migracji przeciwutleniaczy z folii do płynów modelowych w porównaniu do modeli dwu- i jedno-parametrowych. Uwalnianie ASX i CUR z różnych rodzajów folii wynika głównie z procesu dyfuzji. Niemniej jednak jednym z ważniejszych czynników kształtujących profile uwalniania tych przeciwutleniaczy jest szybkość i stopień erozji folii w płynie modelowym. Folia CMC75/GEL25, jako najbardziej podatna na rozpuszczanie, zapewnia na ogół najszybsze i najkompletniejsze

uwalnianie ASX i CUR.

12. Z powodu zastosowania różnych metod pomiarowych, bezpośrednie porównanie aktywności przeciwutleniającej folii domieszkowanych różnymi przeciwutleniaczami jest niemożliwe. Z tego też powodu aktywność przeciwrodnikowa folii kontrolnych (nie zawierających dodatku przeciwutleniacza) może być znaczna, albo w ogóle nie występować. Konieczność zastosowania w układzie pomiarowym wysokiego stężenia DPPH* sugeruje, że spośród otrzymanych materiałów, folie z dodatkiem AP wykazują najwyższą efektywność przeciwutleniającą.
13. W przypadku folii domieszkowanych AP i AST istnieje silna dodatnia korelacja między ich właściwościami przeciwutleniającymi a profilami uwalniania.
14. Potencjał przeciwrodnikowy folii zawierających AST (w ilości 0,5 i 1% w/w) na ogół ulega istotnemu osłabieniu dopiero po 60 dniach przechowywania. Folie WSSP75/GEL25/AST charakteryzują się najniższym potencjałem przeciwrodnikowym i jednocześnie ulegają największej dyskoloryzacji w czasie przechowywania, co prawdopodobnie spowodowane jest ciemnieniem pigmentów i reakcjami Maillarda. Niezależnie od zawartości AST, najlepiej barwę zachowują folie CMC75/GEL25 oraz GAR75/GEL25. Wysoka stabilność barwy folii CMC75/GEL25/CUR sugeruje, że enkapsulacja CUR w mikrosferach żelatynowych przyczynia się do jej ochrony.

9. Bibliografia

1. Ustawa z dnia 19 lipca 2019 r. o przeciwdziałaniu marnowania żywności (Dz. U. 2020 poz. 1645).
2. Rozporządzenie (WE) nr 450/2009 z dnia 29 maja 2009 r. w sprawie aktywnych i inteligentnych materiałów i wyrobów przeznaczonych do kontaktu z żywnością (Dz.U. L 135 z 30.5.2009, str. 1–19).
3. Martyn A., Targoński Z.: Antymikrobiologiczne opakowania żywności. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2010, 17, 33–44.
4. Cierpiszewski R.: Active and intelligent packaging. *Perspectives for development. Packaging Review*, 2024, 3, 12428.
5. Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2019/904 z dnia 5 czerwca 2019 r. w sprawie zmniejszenia wpływu niektórych produktów z tworzyw sztucznych na środowisko (Dz.U. L 155 z 12.6.2019, , str. 1–19).
6. <https://eur-lex.europa.eu/PL/legal-content/summary/single-use-plastics-fighting-the-impact-on-the-environment.html> (dostęp 3.06.2024).
7. <https://www.braskem.com.br/imgreen/> (dostęp 3.06.2024).
8. Rozporządzenie Komisji (UE) nr 10/2011 z dnia 14 stycznia 2011 r. w sprawie materiałów i wyrobów z tworzyw sztucznych przeznaczonych do kontaktu z żywnością (tekst skonsolidowany 02011R0010 – PL – 31.08.2023 – 017.001).
9. Albazoni H.J., Al-Haidarey M.J.S., Nasir A.S.: A review of microplastic pollution: Harmful effect on environment and animals, remediation strategies. *Journal of Ecological Engineering*, 2024, 25, 140–157.
10. Zalecenie Komisji (UE) 2019/794 z dnia 15 maja 2019 r. w sprawie skoordynowanego planu kontroli w celu ustalenia rozpowszechnienia niektórych substancji migrujących z materiałów i wyrobów przeznaczonych do kontaktu z żywnością (Dz.U. L 129 z 17.5.2019, str. 37–42).
11. <https://cordis.europa.eu/article/id/400694-sustainable-materials-for-a-strong-and-circular-european-bio-economy/pl> (dostęp 3.06.2024).
12. <https://cordis.europa.eu/article/id/88581-biomass-as-an-alternative-to-plastics/pl> (dostęp 3.06.2024).
13. <https://cordis.europa.eu/article/id/447093-novel-bio-based-food-packaging-supports-home-composting-and-recycling/pl> (dostęp 3.06.2024).
14. Zespół Energy, Sustainability and Economics, Deloitte: Ekoprojektowanie opakowań. *Poradnik Przedsiębiorcy*. Polska Agencja Rozwoju Przedsiębiorczości, 2019.
(https://smart.gov.pl/images/EkoprojektowanieOpakowan_PoradnikPrzedsiębiorcy_101219.pdf) (dostęp 3.06.2024).
15. PN-EN 13432:2002. Opakowania. Wymagania dotyczące opakowań przydatnych do odzysku przez kompostowanie i biodegradację. Program badań i kryteria oceny do ostatecznej akceptacji opakowań.
16. PN-EN ISO 18763:2020-10. Jakość gleby - Oznaczanie toksycznego wpływu zanieczyszczeń na wschody i wczesny wzrost roślin wyższych.
17. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1333/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie dodatków do żywności (tekst skonsolidowany 02008R1333 – PL – 23.04.2024 – 056.001).
18. <https://biotrem.pl> (dostęp 3.06.2024).
19. <https://rethink-plastic.com/home/product/ello-jello-cup> (dostęp 3.06.2024).
20. <https://www.ecolotec.com/do-eat/> (dostęp 3.06.2024).
21. Dyrektywa 94/62/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 20 grudnia 1994 r. w

- sprawie opakowań i odpadów opakowaniowych (tekst skonsolidowany 01994L0062 – PL – 04.07.2018 – 007.001).
22. Rozporządzenie (WE) nr 1935/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 27 października 2004 r. w sprawie materiałów i wyrobów przeznaczonych do kontaktu z żywnością oraz uchylające dyrektywy 80/590/EWG i 89/109/EWG (tekst skonsolidowany 02004R1935 PL – 27.03.2021 – 002.001).
 23. Bar-On Y.M., Phillips R., Milo R.: The biomass distribution on Earth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018, 115(25), 6506-6511.
 24. Xu X., Lan Y.: A comparative study on carbon footprints between plant- and animal-based foods in China. *Journal of Cleaner Production*, 2016, 112, 2581–2592.
 25. Żyłowski T.: Ślad węglowy głównych roślin uprawnych w Polsce. *Studia i Raporty IUNG-PIB*, 2022, 67(21), 25-35.
 26. Rahardiyani D., Moko E.M., Tan J.S., Lee C.K.: Thermoplastic starch (TPS) bioplastic, the green solution for single-use petroleum plastic food packaging – A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 2023, 168, 110260.
 27. Fazal T., Murtaza N., Shah M., Iqbal S.: Recent developments in natural biopolymer based. *Royal Society of Chemistry*, 2023, 13, 23087–23121.
 28. Opreş O., Mormile C., Lung I., Stegarescu A., Soran M.: An overview of biopolymers for drug delivery applications. *Applied Sciences*, 2024, 14(4), 1383.
 29. Haznar D., Garbacz G.: Wybrane aspekty technologii leków o modyfikowanym uwalnianiu. *Technologia Postaci Leku*, 2009, 65, 749–757.
 30. Malekjani N., Karimi R., Assadpour E., Jafari S.M.: Control of release in active packaging/coating for food products; approaches, mechanisms, profiles, and modeling. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2023, 1–23.
 31. Pająk P., Fortuna T., Przetaczek-Rożnowska I.: Opakowania jadalne na bazie białek i polisacharydów - charakterystyka i zastosowanie. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2013, 2(87), 5–18.
 32. EFSA CEF Panel. Guidelines of the Panel of Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF) on the Submission of a Dossier for the safety evaluation by the EFSA of active or intelligent substances present in active and intelligent materials and articles intended to come into contact with food. *The EFSA Journal*, 2009, 1208, 1–11.
 33. Dyrektywa Rady z dnia 18 października 1982 r. ustanawiająca podstawowe zasady, niezbędne w badaniach migracji składników materiałów i wyrobów z tworzyw sztucznych przeznaczonych do kontaktu ze środkami spożywczymi (tekst skonsolidowany 1982L0711 – PL – 01.09.1997 – 002.001).
 34. Rozporządzenie Komisji (UE) nr 10/2011 z dnia 14 stycznia 2011 r. w sprawie materiałów i wyrobów z tworzyw sztucznych przeznaczonych do kontaktu z żywnością (tekst skonsolidowany 02011R0010 – PL – 31.08.2023 – 017.001).
 35. PN-EN 1186-3:2023-01. Materiały i wyroby przeznaczone do kontaktu z produktami spożywczymi – Tworzywa sztuczne – Część 3: Metody badań ogólnej migracji w wyparowujących płynach modelowych.
 36. PN-EN 1186-5:2005, Materiały i wyroby przeznaczone do kontaktu z produktami spożywczymi – Tworzywa sztuczne – Część 5. Metody badań migracji globalnej do wodnych płynów modelowych przy zastosowaniu komory.
 37. PN-EN 186-7:2006. Materiały i wyroby przeznaczone do kontaktu z produktami spożywczymi – Tworzywa sztuczne – Część 7. Metody badań migracji globalnej do wodnych płynów modelowych przy zastosowaniu torebki.
 38. PN-EN 1186-9:2006. Materiały i wyroby przeznaczone do kontaktu z produktami spożywczymi – Tworzywa sztuczne – Część 9. Metody badań migracji globalnej do

- wodnych płynów modelowych przez napełnienie wyrobu.
39. Zhang Y., Huo M., Zhou J., Zou A., Li W., Yao C., Xie S.: DDSolver: An add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *The AAPS Journal*, 2010, 12, 263–271.
 40. Kowalczyk D.: Biopolymer/candelilla wax emulsion films as carriers of ascorbic acid - A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 2016, 52, 543–553.
 41. Kowalczyk D., Kordowska-Wiater M.: Physicochemical and antimicrobial properties of biopolymer-candelilla wax emulsion films containing potassium sorbate – A comparative study. *Food and Bioprocess Technology*, 2015, 567–579.
 42. Kowalczyk D., Kordowska-Wiater M., Karaś M., Zięba E., Mężyńska M., Wiącek A.E.: Release kinetics and antimicrobial properties of the potassium sorbate-loaded edible films made from pullulan, gelatin and their blends. *Food Hydrocolloids*, 2020, 101, 105539.
 43. Kowalczyk D., Pytka M., Szymanowska U., Skrzypek T., Katarzyna Ł., Biendl M.: Release kinetics and antibacterial activity of potassium salts of iso- α -acids loaded into the films based on gelatin, carboxymethyl cellulose and their blends. *Food Hydrocolloids*, 2020, 109.
 44. Kowalczyk D., Karaś M., Kordowska-Wiater M., Skrzypek T., Kazimierczak W.: Inherently acidic films based on chitosan lactate-doped starches and pullulan as carriers of nisin: A comparative study of controlled-release and antimicrobial properties. *Food Chemistry*, 2023, 404, 134760.
 45. Ramesh M., Muthukrishnan M.: 25 - Biodegradable polymer blends and composites for food-packaging applications. In: *Woodhead Publishing Series in Composites Science and Engineering*. Eds. S. M. Rangappa, J. Parameswaranpillai, S. Siengchin, M. Ramesh. Woodhead Publishing, 2022, pp. 693–716.
 46. Wójtowicz A.: Selected properties of multilayer films applied for vacuum and modified atmosphere packaging systems. *Agricultural Engineering*, 2018, 22(4), 89–98.
 47. Morris B.A.: Chapter 12 - Polymer blending for packaging applications. In: *Plastics Design Library, Multilayer Flexible Packaging*. Ed. J. R. Wagner. William Andrew Publishing, 2010, pp. 137–162.
 48. Doublier J.-L., Garnier C., Renard D., Sanchez C.: Protein–polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2000, 5, 202–214.
 49. Zieliński J.: Blendy i kompozyty polimerowe. *Polimery*, 2002, 47(5), 305–3095.
 50. Gentile, L.: Protein–polysaccharide interactions and aggregates in food formulations. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2020, 48, 18–27.
 51. Surówka, K., Maciejaszek, I.: Oddziaływania białkowo-polisacharydowe i ich praktyczne wykorzystanie. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2007, 4, 17–35.
 52. Bealer, E.J., Onissem-Karimu, S., Rivera-Galletti A., Francis M., Wilkowski J., Hu X.: Protein–polysaccharide composite materials: Fabrication and applications. *Polymers*, 2020, 12, 1–28.
 53. Doublier J., Garnier C., Renarda D., Sanchezb C.: Protein-polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 2000, 5, 202–214.
 54. Yan C., Kim S., Ruiz D.R., Farmer J.R.: Microencapsulation for food applications: A review. *ACS Applied Bio Materials*, 2022, 5(12), 5497–5512.
 55. Lason E., Ogonowski J.: Kapsułkowanie – metoda immobilizacji materiałów bioaktywnych. *LAB Laboratoria, Aparatura, Badania*, 2010, 15(1), 29–35.
 56. Zhao Y., Khalid N., Shu G., Neves M.A., Kobayashi I., Nakajima M.: Complex coacervates from gelatin and octenyl succinic anhydride modified kudzu starch: Insights of formulation and characterization. *Food Hydrocolloids*, 2018, 86, 1–8.

57. Devi N., Sarmah M., Khatun B., Maji T.K.: Encapsulation of active ingredients in polysaccharide – protein complex coacervates. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2017, 239, 136–145.
58. Mi F., Lin Y., Wu Y., Shyu S., Tsai Y.: Chitin/PLGA blend microspheres as a biodegradable drug-delivery system: phase-separation, degradation and release behavior. *Biomaterials*, 2002, 23, 3257–3267.
59. Shi W., Weitz D.A.: Polymer phase separation in a microcapsule shell. *Macromolecules*, 2017, 50, 7681–7686.
60. Tedesco M.P., Monaco-Lourenço C.A., Carvalho R.A.: Gelatin/hydroxypropyl methylcellulose matrices – Polymer interactions approach for oral disintegrating films. *Materials Science & Engineering C*, 2016, 69, 668–674.
61. Kowalczyk D., Pytka M., Szymanowska U., Skrzypek T., Katarzyna Ł., Biendl M.: Release kinetics and antibacterial activity of potassium salts of iso- α -acids loaded into the films based on gelatin, carboxymethyl cellulose and their blends. *Food Hydrocolloids*, 2020, 109, 106104.
62. Fang Y., Li, L., Inoue C., Lundin L., Appelqvist I.: Associative and segregative phase separations of gelatin/ κ -carrageenan aqueous mixtures. *Lagmuir*, 2006, 9532–9537.
63. EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies): Scientific opinion on dietary reference values for vitamin C. *EFSA Journal*, 2013, 11(11), 3418, 1-68.
64. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1170/2009 z dnia 30 listopada 2009 r. zmieniające dyrektywę 2002/46/WE Parlamentu Europejskiego i Rady oraz rozporządzenie (WE) nr 1925/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady w odniesieniu do wykazów witamin i składników mineralnych oraz ich form chemicznych, które można dodawać do żywności, w tym do suplementów żywnościowych (Dz.U. L 314 z 1.12.2009, str. 36–42)
65. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 21 grudnia 2021 r. w sprawie wykazu substancji czynnych wchodzących w skład produktów leczniczych, które mogą być dopuszczone do obrotu w placówkach obrotu pozaaptecznego oraz punktach aptecznych, oraz kryteriów klasyfikacji tych produktów do poszczególnych wykazów (Dz.U. 2023 poz. 2533).
66. Rozporządzenie (WE) nr 1925/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 20 grudnia 2006 r. w sprawie dodawania do żywności witamin i składników mineralnych oraz niektórych innych substancji (tekst skonsolidowany 02006R1925 – PL – 22.06.2023 – 012.001).
67. Pappenberger G., Hohmann HP.: Industrial production of L-ascorbic acid (vitamin C) and D-isoascorbic acid. In: *Biotechnology of Food and Feed Additives. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology vol 143*. Eds. Zorn H., Czermak P., 2013, Springer, Berlin, Heidelberg.
68. Palma S., Lo Nostro P., Manzo R., Allemandi D.: Evaluation of the surfactant properties of ascorbyl palmitate sodium salt. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2002, 16, 37–43.
69. <https://www.sigmaaldrich.com/PL/pl/sds/sial/a1968?userType=anonymous> (dostęp 3.06.2024).
70. Zhou M., Li X., Li Y., Ming Y., Li Z., Lu L., Shi S. Ascorbyl palmitate-incorporated paclitaxel-loaded composite nanoparticles for synergistic anti-tumoral therapy. *Drug Delivery*, 2017, 24(1), 1230–1242.
71. Gosenca M., Obreza A., Pečar S., Gašperlin M.: A new approach for increasing ascorbyl palmitate stability by addition of non-irritant co-antioxidant. *AAPS*

- PharmSciTech, 2010, 11, 1485–1492.
72. Rozporządzenie Komisji (UE) nr 231/2012 z dnia 9 marca 2012 r. ustanawiające specyfikacje dla dodatków do żywności wymienionych w załącznikach II i III do rozporządzenia (WE) nr 1333/2008 Parlamentu Europejskiego i Rady (tekst skonsolidowany 02012R0231 – PL – 23.04.2024 – 032.001).
 73. López-Martínez A., Rocha-Uribe A.: Antioxidant hydrophobicity and emulsifier type influences the partitioning of antioxidants in the interface improving oxidative stability in O/W emulsions rich in n-3 fatty acids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2018, 120(1), 1700277 ref. 35.
 74. Han J.H., Hwang H.M., Min S., Krochta J.M.: Coating of peanuts with edible whey protein film containing alpha-tocopherol and ascorbyl palmitate. *Journal of Food Science*, 2008, 73(8), E349–E355.
 75. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food: Scientific opinion on the re-evaluation of ascorbyl palmitate (E 304(i)) and ascorbyl stearate (E 304(ii)) as food additives. *EFSA Journal*, 2015, 13(11), 4289, 1–57.
 76. Stahl W., Sies H.: Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 2003, 24(6), 345–351.
 77. Bogacz-Radomska L.; Harasym, J.: β -Carotene – properties and production methods. *Food Quality and Safety*, 2018, 2, 69–74.
 78. Nishida Y., Berg P.C., Shakersain B., Hecht K., Takikawa A., Tao R., Kakuta Y., Uragami C., Hashimoto H., Misawa N., et al.: Astaxanthin: past, present, and future. *Marine Drugs*, 2023, 21(10), 514.
 79. Lim G., Lee S., Lee E., Haam S., Kim W.: Separation of astaxanthin from red yeast *Phaffia rhodozyma* by supercritical carbon dioxide extraction. *Biochemical Engineering Journal*, 2002, 11, 181–187.
 80. <https://downloads.regulations.gov/FDA-2020-S-0023-0102/content.pdf> (dostęp 3.06.2024).
 81. Stachowiak B., Szulc P.: Astaxanthin for the food industry. *Molecules*, 2021, 26(9), 2666.
 82. Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2023/1581 z dnia 1 sierpnia 2023 r. zmieniające rozporządzenie wykonawcze (UE) 2017/2470 w odniesieniu do warunków stosowania nowej żywności "bogata w astaksantynę oleożywica z alg *Haematococcus pluvialis*" (tekst skonsolidowany 02023R1581 – PL – 21.08.2023 – 001.001).
 83. Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2017/2470 z dnia 20 grudnia 2017 r. ustanawiające unijny wykaz nowej żywności zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2015/2283 w sprawie nowej żywności (tekst skonsolidowany 02017R2470 – PL – 01.05.2024 – 046.001).
 84. Subramanian B., Thibault M.H., Djaoued Y., Pelletier C.S., Touaibia M., Tchoukanova N.: Chromatographic, NMR and vibrational spectroscopic investigations of astaxanthin esters: application to 'Astaxanthin-rich shrimp oil' obtained from processing of Nordic shrimps. *The Analyst*, 2015, 140(21), 7423–7433.
 85. Moeseneder J., Briviba K., Rechkemmer G., Bub A., Ru C.E.: Bioavailability of astaxanthin stereoisomers from wild (*Oncorhynchus* spp.) and aquacultured (*Salmo salar*) salmon in healthy men: a randomised, double-blind study, *British Journal of Nutrition*, 99(5), 2008, 1048–1054.
 86. Schiedt K., Leuenberger F.J., Vecchia M.: Natural occurrence of enantiomeric and meso-astaxanthin. 5. Ex wild salmon (*Salmo salar* and *Oncorhynchus*). **1981**, 64(2), 449-457.

87. Moretti V.M., Mentasti T., Bellagamba F., Luzzana U., Caprino F., Turchini G.M., Giani I., Valfrè F.: Determination of astaxanthin stereoisomers and colour attributes in flesh of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a tool to distinguish the dietary pigmentation source. *Food Additives & Contaminants*, 2006, 23(11), 1056-1063.
88. EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens): Safety of a change in specifications of the novel food oleoresin from *Haematococcus pluvialis* containing astaxanthin pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal*, 2023, 21(11), 1–15.
89. Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2020/998 z dnia 9 lipca 2020 r. dotyczące odnowienia zezwolenia na stosowanie dimetylodibursztynianu astaksantyny jako dodatku paszowego dla ryb i skorupiaków oraz uchylające rozporządzenie (WE) nr 393/2008 (Dz.U. L 221 z 10.7.2020, str. 96–98).
90. <https://www.dsm.com/human-nutrition/en/products/carotenoids/astasana.html#> (dostęp 3.06.2024).
91. https://nutrition.basf.com/global/en/animal-nutrition/our-products/feed-ingredients/carotenoids/lucantin-pink.html#accordion_v2-56012ed64b-item-cf953a8e73 (dostęp 3.06.2024).
92. <https://www.nutritionaloutlook.com/view/fdas-no-synthetics-ndi-provision-selling-point-natural-botanical-firms> (dostęp 3.06.2024).
93. <https://www.regulations.gov/document/FDA-2020-S-0023-0102> (dostęp 3.06.2024).
94. <https://www.fda.gov/media/160660/download> (dostęp 3.06.2024).
95. <https://www.sigmaaldrich.com/PL/pl/search/astaxanthine?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=astaxanthine&type=product> (dostęp 3.06.2024).
96. Colín-Chávez C., Soto-Valdez H., Peralta E., Lizardi-Mendoza J., Baladrán-Quintana R.: Diffusion of natural astaxanthin from polyethylene active packaging films into a fatty food simulant. *Food Research International*, 2013, 54(1), 873–880.
97. Inthamat P., Boonsiriwit A., Siripatrawan U., Lee Y.S.: Effects of genipin as natural crosslinker on barrier and mechanical properties of chitosan-astaxanthin film. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2022, 46(8), e15707.
98. Nasution A., Wahyuni I.: Antioxidant activity of edible film made from catfish (*Pangasius hypophthalmus*) gelatin supplemented with astaxanthin using DPPH method. *JPK: Jurnal Proteksi Kesehatan*, 2023, 12(2), 208-213.
99. Surma S., Sahebkar A., Urbański J., Penson P.E., Banach M.: Curcumin - the nutraceutical with pleiotropic effects? Which cardiometabolic subjects might benefit the most? *Frontiers in Nutrition*, 2022, 17(9), 865497.
100. Kuźmińska J., Sobczak A., Wierzchowski M., Gośliński T., Jelinska A.: Historia i chemia kurkuminy. *Farmacja Współczesna*, 2021, 14, 140–145.
101. Lopresti A.L.: The problem of curcumin and its bioavailability: Could its gastrointestinal influence contribute to its overall health-enhancing effects? *Advances in Nutrition*, 2018, 9(1), January, 41–50.
102. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS); Scientific opinion on the re-evaluation of curcumin (E 100) as a food additive. *EFSA Journal*, 2010, 8(9), 1679, 1–46.
103. Oliveira F.J.G. de, Bertolo M.R.V., Rodrigue M.Á.V., Marangon C.A., Silva G. da C., Odoni F.C.A., Egea M.B.: Curcumin: A multifunctional molecule for the development of smart and active biodegradable polymer-based films. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 118, 840–849.
104. Al-Ali K., Abdel, S., El-Badry Y.A.: Dual effect of curcumin – zinc complex in controlling diabetes mellitus in experimentally induced diabetic rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2016, 39, 1774–1780.

105. Sotler R., Poljšak B., Dahmane R., Jukić T., Jukić D.P., Rotim C., Trebše P., Starc A.: Prooxidant activities of antioxidants and their impact on health. *Acta Clinica Croatica*, 2019, 58, 726–736.
106. Yildirim-Elikoglu S., Erdem Y.K.: Interactions between milk proteins and polyphenols: Binding mechanisms, related changes, and the future trends in the dairy industry. *Food Reviews International*, **2018**, 34(7), 665–697.
107. Bialek M., Czauderna M.: Budowa chemiczna oraz funkcje fizjologiczne wybranych antyoksydantów. Monografia. Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk, 2016.
108. Laguerre M., Bayrasy C., Panya A., Weiss J., Julian D., Lecomte J., Decker E.A., Villeneuve P.: What makes good antioxidants in lipid-based systems? The next theories beyond the polar paradox. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2015, 55(2), 183-201.
109. Montenegro M.A., Boiero M.L., Valle, L., Borsarelli C. D.: Gum Arabic: more than an edible emulsifier. In: *Products and Applications of Biopolymers*. Ed. Verbeek C. J. R. IntechOpen, 2012, pp. 1–26.
110. Nieto M.B.: Structure and function of polysaccharide gum-based edible films and coatings. In: *Edible Films and Coatings for Food Applications*. Eds. Huber K., Embuscado M. Springer, New York, NY.
111. Zhou R., Xu Y., Dong D.: The effects of microcapsules with different protein matrixes on the viability of probiotics during spray drying, gastrointestinal digestion, thermal treatment, and storage. *eFood*, 2023, 4(4), e98.
112. Domian E., Świrydow E., Cenker J.: Skrobia modyfikowana typu OSA w mikrokapsułkowaniu lipidów metodą suszenia rozpyłowego - stan badań. *Nauki Inżynierskie i Technologiczne*, 2013, 3(10), 45-61.
113. EFSA ANS Panel (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food): Scientific opinion on the re-evaluation of soybean hemicellulose (E 426) as a food additive. *EFSA Journal*, 2017, 15(3), 4721, 1–27.
114. Tran T., Rousseau D.: Stabilization of acidic soy protein-based dispersions and emulsions by soy soluble polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 2013, 30, 382–392.
115. Maeda H., Nakamura A.: Chapter 14 - Soluble soybean polysaccharide. In: *Handbook of Hydrocolloids (Third Edition)*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Eds.: Phillips G. O., Williams P.A., Woodhead Publishing, 2021, pp. 463–480.
116. Gautam S.P., Bundela P.S., Pandey A.K., Awasthi M.K., Sarsaiya S.: A review on systematic study of cellulose. *Journal of Applied and Natural Science*, 2010, 2(2), 330–343.
117. Nussinovitch A.: Cellulose derivatives. In: *Hydrocolloid Applications*. Springer, Boston, MA. 1997, pp.105–124.
118. Nasatto P.L., Pignon F., Silveira J.L.M., Duarte M.E.R., Nosedá M.D., Rinaudo M.: Methylcellulose, a cellulose derivative with original physical properties and extended applications, *Polymers*, 2015, 7(5), 777–803.
119. Bourtoom T.: Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal*, 2008, 15(3), 237–248.
120. Rahman S., Hasan S., Nitai A.S., Nam S., Ahmed M.B.: Recent developments of carboxymethyl cellulose. *Polymers (Basel)*, 2021,13(8), 1345.
121. Rozporządzenie (WE) nr 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. ustanawiające szczególne przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego (tekst skonsolidowany 02004R0853 – PL – 15.02.2023 – 024.001).

122. Benjakul S., Kittiphattanabawon P. Gelatin. In: *Encyclopedia of Food Chemistry*. Elsevier, 2018, pp. 121-127.
123. Zhang T., Xu J., Zhang Y., Wang X., Lorenzo J.M., Zhong J.: Gelatins as emulsifiers for oil-in-water emulsions: Extraction, chemical composition, molecular structure, and molecular modification. *Trends in Food Science & Technology*, 2020, 106, 113–131.
124. Kowalski Z., Banach M., Makara, A.: Otrzymywanie białka niskotemperaturowego mocno żelującego (żelatyny) metodami chemicznymi. *Chemik*, 2011, 65, 1085–1092.
125. Kowalczyk D., Baraniak B.: Effect of candelilla wax on functional properties of biopolymer emulsion films: A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 2014, 41, 195–209.
126. Nur Hanani Z.A., O'Mahony J.A., Roos Y.H., Oliveira P.M., Kerry J.P.: Extrusion of gelatin-based composite films: Effects of processing temperature and pH of film forming solution on mechanical and barrier properties of manufactured films. *Food Packaging and Shelf Life*, 2014, 2, 91–101.
127. Liu D., Nikoo M.: Collagen and gelatin. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2015, 6, 527–557.
128. PN-ISO 2528:2000. Materiały w postaci arkuszy - Oznaczanie szybkości przenikania pary wodnej - Metoda wagowa (miscozkowa).
129. Rozporządzenie Komisji (UE) 2016/1416 z dnia 24 sierpnia 2016 r. w sprawie zmiany i sprostowania rozporządzenia (UE) nr 10/2011 w sprawie materiałów i wyrobów z tworzyw sztucznych przeznaczonych do kontaktu z żywnością (Dz.U. L 230 z 25.8.2016, str. 22-42).
130. Esteghlal S., Niakosari M., Mohammad S., Hosseini H., Reza G., Hossein G.: Gelatin-hydroxypropyl methylcellulose water-in-water emulsions as a new bio-based packaging material. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 86, 242–249.
131. Nasatto P.L., Pignon F., Silveira J.L.M., Duarte M.E.R., Nosedo M.D., Rinaudo M.: Methylcellulose, a cellulose derivative with original physical properties and extended applications, *Polymers*, 2015, 7(5), 777–803.
132. Klein M., Aserin A., Ishai P. B., Garti N.: Interactions between whey protein isolate and gum Arabic. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010, 79, 377–383.
133. Wu B., McClements D.J.: Microgels formed by electrostatic complexation of gelatin and OSA starch: Potential fat or starch mimetics. *Food hydrocolloids*, 2015, 47, 87–93.
134. Nemazifard M., Kavosi G., Marzban Z.: Physical, mechanical, water binding, and antioxidant properties of cellulose dispersions and cellulose film incorporated with pomegranate seed extract. *International Journal of Food Properties*, 2017, 20, 1501–1514.
135. Kirk R. E., Othmer D. F.: Gelatin. In: *Food and Feed Technology Vol. 1*. Eds. Kirk R. E., Othmer D. F., Seidel A. Wiley, 2007.
136. Yang Y., Anvari M., Pan C., Chung D.: Characterisation of interactions between fish gelatin and gum arabic in aqueous solutions. *Food Chemistry*, 2012, 135, 555–561.
137. Santos A.E.F., Bastos D.C., Silva M.L.V.J., Thiré R.M.S.M., Simão R.A.: Chemical analysis of a cornstarch film surface modified by SF 6 plasma treatment. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 87, 2217–2222.
138. Hu H., Liu W., Shi J., Huang Z., Zhang Y., Huang A., Yang M., Qin X.: Structure and functional properties of octenyl succinic anhydride modified starch prepared by

- a non-conventional technology. *Starch*, 2016, 151–159.
139. Turhan K., Sahbaz F., Guner A.: A spectrophotometric study of hydrogen bonding in methylcellulose-based edible films plasticized by polyethylene glycol. *Journal of Food Science*, 2001, 66, 59–62.
 140. Staroszczyk H., Sztuka K., Wolska J., Wojtasz-Paja A.: Interactions of fish gelatin and chitosan in uncrosslinked and crosslinked with EDC films: FT-IR study. *Spectrochimica Acta - Part A. Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014, 117, 707–712.
 141. Shaddel R., Hesari J., Azadmard-Damirchi S., Hamishehkar H.: Use of gelatin and gum Arabic for encapsulation of black raspberry anthocyanins by complex coacervation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 107, 1800–1810.
 142. Tran T.: Stabilization of oil-in-water emulsions via soy protein and soy soluble polysaccharide interactions. Toronto Metropolitan University. Thesis. 2011.
 143. Layek R.K., Ramakrishnan K., Sarlin E., Orell O., Kanerva M., Vuorinen J., Honkanen M.: Layered structure graphene oxide/methylcellulose composites with enhanced mechanical and gas barrier properties. *Journal of Materials Chemistry A* 2018, 6, 13203-13214.
 144. Yakimets I., Paes S.S., Wellner N., Smith A.C., Wilson R.H., Mitchell J.R.: Effect of water content on the structural reorganization and elastic properties of biopolymer films : A comparative study. *Biomacromolecules*, 2007, 8, 1710–1722.
 145. Soliman E.A., Furuta M.: Influence of phase behavior and miscibility on mechanical, thermal and micro-structure of soluble starch-gelatin thermoplastic biodegradable blend films. *Food and Nutrition Sciences*, 2014, 5, 1040–1055.
 146. Jenkins M., Stamboulis A.: *Durability and Reliability of Medical Polymers*, 1st Edition. Woodhead Publishing, 2012.
 147. Banga A.K.: *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems*, Second Edition (2nd ed.). CRC Press. 2005.
 148. Arvanitoyannis I.S.: Formation and properties of collagen and gelatin films and coatings. In: *Protein-Based Films and Coatings*. Eds. Gennadios A., Gennadios G., 2002, pp. 275–304.
 149. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.: *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. Garland Science Inc., New York 2002.
 150. Musa H.H., Ahmed A.A.: Chemistry, biological, and pharmacological properties of gum Arabic. *Bioactive Molecules in Food*, 2018, 797–814.
 151. Nakamura A., Furuta H., Maeda H., Nagamatsu Y., Yoshimoto A.: Analysis of structural components and molecular construction of soybean soluble polysaccharides by stepwise enzymatic degradation. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, 2001, 65, 2249–2258.
 152. Gurgel M., Vieira A., Altenhofen M., Oliveira L., Beppu M.M.: Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *European Polymer Journal*, 2011, 47, 254–263.
 153. EFSA ANS Panel (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food). Scientific opinion on the re-evaluation of oxidised starch (E 1404), monostarch phosphate (E 1410), distarch phosphate (E 1412), phosphated distarch phosphate (E 1413), acetylated distarch phosphate (E 1414), acetylated starch (E 1420), acetylated distarch adipate (E 1422), hydroxypropyl starch (E 1440), hydroxypropyl distarch phosphate (E 1442), starch sodium octenyl succinate (E 1450), acetylated oxidised starch (E 1451) and starch aluminium octenyl succinate (E 1452) as food additives. *EFSA Journal*, 2017, 15(10), 4911, 1-96

154. Comunian T.A., Gomez-Estaca J., Ferro-Furtado R., Conceição G.J.A., Moraes I.C.F., de Castro I.A., Favaro-Trindade C.S.: Effect of different polysaccharides and crosslinkers on echium oil microcapsules. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 150, 319–329.
155. Jamshidian M., Arab E., Imran M., Javeed M., Cleymand F., Desobry S.: Structural, mechanical and barrier properties of active PLA – antioxidant films. *Journal of Food Engineering*, 2012, 110, 380–389.
156. Zoraida A. P.: Targeted drug delivery. In: *Nanomaterials for Medical Applications*. Elsevier, 2012.
157. Podzimek S.: Characterization of branched polymers. In: *Light Scattering, Size Exclusion Chromatography and Asymmetric Flow Field Flow Fractionation*. John Wiley & Sons, 2011, pp. 307–345.
158. Paarakh M.P., Jose P.A., Setty C.M., Christofer G.V.P: Release kinetics – concept and applications. *International Journal of Pharmacy Research & Technology*, 2018, 8, 12–20.
159. Liu C., Huang J., Zheng X., Liu S., Lu K., Tang K., Liu J.: Heat sealable soluble soybean polysaccharide/gelatin blend edible films for food packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life*, 2020, 24, 100485.
160. Łupina K., Kowalczyk D., Skrzypek T., Baraniak B.: Mathematical modeling of water-soluble astaxanthin release from binary polysaccharide/gelatin blend matrices. *Colloids and Interfaces*, 2021, 5(3), 41.
161. Hejna A., Lenza J., Formela K., Korol J.: Studies on the combined impact of starch source and multiple processing on selected properties of thermoplastic starch/ethylene-vinyl acetate blends. *Journal of Polymers and the Environment*, 2019, 27, 1112–1126.
162. Jafari J., Hojjati S., Samadikuchaksaraei A., Ali M.: Electrospun chitosan–gelatin nanofibrous scaffold: Fabrication and in vitro evaluation. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 2011, 21, 99–112.
163. Coates J.: Interpretation of infrared spectra, a practical approach. In: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Eds. Meyers R.A., McKelvy M.L. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2006.
164. Feng Z., Li M., Wang Y., Zhu M.: Astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*: Microencapsulation with carboxymethyl cellulose sodium and microcrystalline cellulose and effects of microencapsulated astaxanthin on yogurt properties. *LWT*, 2018, 96, 152–160.
165. Liu Y., Huang L., Li D., Wang Y., Chen Z., Zou C., Liu W., Ma Y., Cao M., Liu G.: Re-assembled oleic acid-protein complexes as nano-vehicles for astaxanthin: Multispectral analysis and molecular docking. *Food hydrocolloids* 2020, 103, 105689.
166. Matsumura Y., Egami M., Satake C., Maeda Y., Takahashi T., Nakamura A.: Inhibitory effects of peptide-bound polysaccharides on lipid oxidation in emulsions. *Food Chemistry*, 2003, 83, 107–119.
167. Nakamura A., Yoshida R., Maeda H., Furuta H.; Corredig M.: Study of the role of the carbohydrate and protein moieties of soy soluble polysaccharides in their emulsifying properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 5506–5512.
168. Elde A.C., Pettersen R., Bruheim P., Järnegren J., Johnsen G.: Pigmentation and spectral absorbance signatures in deep-water corals from the Trondheimsfjord, Norway. *Marine Drugs*, 2012, 10(6), 1400–1411.
169. Yang Y., Cui S.W., Gong J., Guo, Q., Wang Q., Hua Y.: A soy protein-

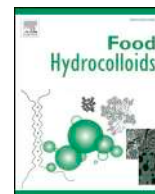
- polysaccharides Maillard reaction product enhanced the physical stability of oil-in-water emulsions containing citral. *Food Hydrocolloids*, 2015, 48, 155–164.
170. Mokrzycki W., Tatol M.: Color difference ΔE - A survey. *Machine Graphics and Vision*, 2011, 20(4), 383-411.
 171. Pogorzelska E., Hamulka J., Wawrzyniak A.: Astaksantyna – budowa, właściwości i możliwości zastosowania w żywności funkcjonalnej. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2016, 104(1), 5-16.
 172. Gökkaya B., Sevgin E., Sevim D.: A comprehensive study on sorption, water barrier, and physicochemical properties of some protein- and carbohydrate-based edible films. *Food and Bioprocess Technology*, 2021, 14, 2161–2179.
 173. Tesch S., Gerhards C., Schubert H.: Stabilization of emulsions by OSA starches. *Journal of Food Engineering*, 2002, 54, 167–174.
 174. Poletto M., Pistor V., Zattera A.J.: Structural characteristics and thermal properties of native cellulose. *Materials (Basel)*, 2014, 7(9), 6105–6119.
 175. Kowalczyk D., Szymanowska U., Skrzypek T., Basiura-Cembala M., Katarzyna Ł., Biendl M.: Edible films based on gelatin, carboxymethyl cellulose, and their blends as carriers of potassium salts of iso- α -acids: Structural, physicochemical and antioxidant properties. *Food Hydrocolloids*, 2021, 115, 106574.
 176. Mathew A.P., Dufresne A.: Plasticized waxy maize starch : effect of polyols and relative humidity on material properties plasticized waxy maize starch : effect of polyols and relative humidity on material properties. *Biomacromolecules*, 2002, 3(5), 1101-1108.
 177. Almeida V. S. de, Barretti B. R. V., Ito V. C., et al.: Thermal, morphological, and mechanical properties of regular and waxy maize starch films reinforced with cellulose nanofibers (CNF). *Materials Research*, 2020, 23(2).
 178. Ikeda S., Funami, T. Zhang G.: Visualizing surface active hydrocolloids by atomic force microscopy. *Carbohydrate Polymers*, 2005, 62, 192–196.
 179. Lutz P. J., Peruch F.: Chapter: 6.14 – Graft copolymers and comb-shaped homopolymers. In: *Polymer Science: A Comprehensive Reference*, Volume 6. Eds. Matyjaszewski K., Möller M., Elsevier, 2012, pp. 511–542.
 180. Katzendler I., Hoffman A., Goldberger A., Friedman M.: Modeling of drug release from erodible tablets. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1997, 86, 6–11.
 181. Laracuenta M., Yu M.H., Mchugh K.J.: Zero-order drug delivery: State of the art and future prospects. *Journal of Controlled Release*, 2020, 327, 834-856.
 182. Bruschi, M.L. *Mathematical models of drug release in Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*. Woodhead Publishing, 2015.
 183. Malekjani N., Mahdi Jafari S.: Modeling the release of food bioactive ingredients from carriers/nanocarriers by the empirical, semiempirical, and mechanistic models. *Compreh Enensive Reviews in Food Science And Food Safety*, 2021, 20, 3–47.
 184. Kowalczyk D., Biendl, M.: Physicochemical and antioxidant properties of biopolymer / candelilla wax emulsion films containing hop extract: A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 2016, 60, 384–392.
 185. Chun-hui, L.; Chang-hai, W.; Zhi-liang, X.; Yi, W. Isolation , chemical characterization and antioxidant activities of two polysaccharides from the gel and the skin of *Aloe barbadensis* Miller irrigated with sea water. *Process Biochemistry*, 2007, 42(6), 961–970.
 186. Masbernat O., Roger K.: Emulsions stabilized by gum Arabic: How diversity and interfacial networking lead to metastability. *Lagmuir*, 2019, 35, 14553–14565.
 187. Roy S., Rhim J.: Carboxymethyl cellulose-based antioxidant and antimicrobial active packaging film incorporated with curcumin and zinc oxide. *International*

- Journal of Biological Macromolecules, 2020, 148, 666–676.
188. Reddy T.R.K., Kim H.: Mechanical, optical, thermal, and barrier properties of poly(lactic acid)/curcumin composite films prepared using twin-screw extruder. *Food Biophysics*, 2019, 14, 22–29.
 189. Kowalczyk D., Skrzypek T., Basiura-Cembala M., Katarzyna Ł., Monika M.: The effect of potassium sorbate on the physicochemical properties of edible films based on pullulan, gelatin and their blends. *Food Hydrocolloids*, 2020, 105, 105837.
 190. Li Z., Lin Q., Julian D., Fu Y., Xie H., Li T., Chen G.: Curcumin-loaded core-shell biopolymer nanoparticles produced by the pH-driven method: Physicochemical and release properties. *Food Chemistry*, 2021, 355, 129686.
 191. Etxabide A., Mat J.I., Kilmartin P.A.: Effect of curcumin, betanin and anthocyanin containing colourants addition on gelatin films properties for intelligent films development. *Food Hydrocolloids*, 2021, 115, 106593.
 192. Kim Y.J., Hagiwara T., Kawai K., Suzuki T., Takai R.: Kinetic process of enthalpy relaxation of glassy starch and effect of physical aging upon its water vapor permeability property. *Carbohydrate Polymers*, 2003, 53, 289–296.
 193. Badii F., Martinet C., Mitchell J.R., Farhat I.A.: Enthalpy and mechanical relaxation of glassy gelatin films. *Food Hydrocolloids*, 2006, 20, 879–884.
 194. Karaipekli A., Sarı A.: Preparation, thermal properties and thermal reliability of eutectic mixtures of fatty acids/expanded vermiculite as novel form-stable composites for energy storage. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2010, 16, 767–773.
 195. Staroszczyk H., Pielichowska J., Sztuka K., Stangret J., Kołodziejaska I.: Molecular and structural characteristics of cod gelatin films modified with EDC and TGase. *Food Chemistry*, 2012, 130, 335–343.
 196. Shulga O.S., Chorna A., Kobylinskyi S.: Differential scanning calorimetry research of biodegradable films for confectionery and bakery products. *Chemistry & Chemical Technology*, 2017, 11, 497–502.
 197. Rozporządzenie Komisji (UE) nr 231/2012 z dnia 9 marca 2012 r. ustanawiające specyfikacje dla dodatków do żywności wymienionych w załącznikach II i III do rozporządzenia (WE) nr 1333/2008 Parlamentu Europejskiego i Rady (tekst skonsolidowany 02012R0231 – PL – 23.04.2024 – 032.001).
 198. Weerasooriya P.R.D., Nadhilah R., Owolabi, F.A.T., Hashim, R., Khalil H.P.S.A., Syahariza Z.A., Hussin M.H., Hiziroglu S., Haa M.K.M.: Exploring the properties of hemicellulose based carboxymethyl cellulose film as a potential green packaging. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 2020, 1-2, 20–28.
 199. Jamaludin, J., Adam, F., Rasid R.A., Hassan Z.: Thermal studies on polysaccharides film Arabic gum carrageenan. *Chemical Engineering Research Bulletin*, 2017, 19, 80–86.
 200. Gomaa, M.M.; El, E.; Mohamed, F.; Salama, A.; Abdin, M. Production of bio-composite films from gum Arabic and galangal extract to prolong the shelf life of *Agaricus bisporus*. *Journal of Polymers and the Environment*, 2022, 30, 4787–4799.
 201. Zebib B., Noirot V.: Stabilization of curcumin by complexation with divalent cations in glycerol/water system. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2010, 2010, 292760.
 202. Athira G.K., Jyothi A.N., Vishnu V.R.: Water soluble octenyl succinylated cassava starch-curcumin nanoformulation with enhanced bioavailability and anticancer potential. *Starch*, 2018, 70(7-8), 1700178.
 203. Liang S., Du J., Yan H., Cheng L., Gu Z., Li Z., Li C.: Octenyl succinate anhydride debranched starch-based nanocarriers for curcumin with improved stability and

- antioxidant activity. *Food Hydrocolloids*, 2022, 135, 108118.
204. Carvalho D.D.M., Takeuchi K.P., Geraldine R.M.: Production, solubility and antioxidant activity of curcumin nanosuspension. *Food Science and Technology (Campinas)*, 2015, 35(1), 115-119.
 205. Michelin M., Marques A.M., Pastrana L.M., Teixeira, A.: Carboxymethyl cellulose-based films: Effect of organosolv lignin incorporation on physicochemical and antioxidant properties. *Journal of Food Engineering*, 2020, 285, 110107.
 206. Viscione L.: 18 - Fibre-enriched beverages. In: *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Fibre-Rich and Wholegrain Foods*. Eds: Delcour J. A., Poutanen K. Woodhead Publishing, 2013, pp. 369-388.
 207. Musso Y.S., Salgado P.R., Mauri A.N.: Smart edible films based on gelatin and curcumin. *Food Hydrocolloids*, 2017, 66, 8–15.
 208. Jakubczyk K., Drużga A., Katarzyna J., Skonieczna-Żydecka K.: Antioxidant potential of curcumin - A meta-analysis of randomized clinical trials. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9(11), 1092.
 209. Atloo T., Mohammadkhani R., Mohammadi A., et al.: The bovine serum albumin coated copper oxide nanoparticle for curcumin delivery in biological environment: In-vitro drug release. *Journal of Polymers and the Environment*, 2022, 30, 3203–3208.
 210. Sanidad K.Z., Sukamtoh E., Xiao H., McClements D.J., Zhang G.: Curcumin: Recent advances in the development of strategies to improve oral bioavailability. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2019, 10, 597–617.
 211. Athira G.K., Jyothi A.N., V.R V.: Water soluble octenyl succinylated cassava starch-curcumin nanoformulation with enhanced bioavailability and anticancer potential. *Starch*, 2018, 70, 1–28.
 212. Le-Tan H., Fauster T., Haas K., Jaeger H.: Aqueous extraction of curcuminoids from *curcuma longa*: Effect of cell disintegration pre-treatment and extraction condition. *Food and Bioprocess Technology*, 2022, 15, 1359–1373.
 213. Mondal S., Ghosh S., Moulik S.P.: Stability of curcumin in different solvent and solution media : UV–visible and steady-state fluorescence spectral study. *Journal of Photochemistry & Photobiology B: Biology*, 2016, 158, 212–218.
 214. Hu Z., Feng T., Zeng X., Janaswamy S., Wang H.: Structural characterization and digestibility of curcumin loaded octenyl succinic nanoparticles. *Nanomaterials (Basel)*, 2019, 9(8), 1073.
 215. Elnour A.A.M., Mirghani M.E.S., Kabbashi N.A., Musa K.H., Shahabipour F., Ashammakhi N., Abdurahman N.H.: Comparative study of the characterisation and extraction techniques of polyphenolic compounds from *Acacia seyal* gum. *Food Quality and Safety*, 2022, 6, 1–10.
 216. Mirghani M.E.S., Elnour A.A.M., Kabbashi N.A.: Determination of antioxidant activity of gum arabic: An exudation from two different locations. *Science Asia*, 2018, 44, 179–186.
 217. Lin Y., Lu S., Gao R., Kuo C., Chung W., Lien W., Wu C., Diao Y., Wang H.D.: A novel biocompatible herbal extract-loaded hydrogel for acne treatment and repair. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 1, 5598291.
 218. Belan D.L., Flores F.P., Mopera L.E.: Optimization of antioxidant capacity and tensile strength of gelatin-carboxymethylcellulose film incorporated with bignay (*Antidesma bunius* (L.) Spreng.) crude phenolic extract. *AIP Conference Proceedings*, 2018, 2030, 020184.
 219. Villasante J., Martin-Lujano A., Almajano M.P.: Characterization and application of gelatin films with pecan walnut and shell extract (*Carya illinoensis*). *Polymers*.

- 2020, 12(6), 1424.
220. Li J., Miao J., Wu J., Chen S., Zhang Q.: Preparation and characterization of active gelatin-based films incorporated with natural antioxidants. *Food Hydrocolloids*, 2014, 37, 166–173.

10. Publikacje składające się na rozprawę doktorską



Edible films made from blends of gelatin and polysaccharide-based emulsifiers - A comparative study



Katarzyna Łupina^a, Dariusz Kowalczyk^{a,*}, Emil Zięba^b, Waldemar Kazimierczak^c,
Monika Mężyńska^d, Monika Basiura-Cembala^e, Agnieszka Ewa Wiącek^f

^a Department of Biochemistry and Food Chemistry, Faculty of Food Sciences and Biotechnology, University of Life Sciences in Lublin, Skromna 8, 20-704, Lublin, Poland

^b Confocal and Electron Microscopy Laboratory, Centre for Interdisciplinary Research, John Paul II Catholic University of Lublin, Al. Kraśnicka 102, Lublin, 20-718, Poland

^c Laboratory of Biocontrol, Application and Production of EPN, Department of Biotechnology and Environmental Sciences, Centre for Interdisciplinary Research, John Paul II Catholic University of Lublin, ul. Konstantynów 1J, 20-708, Lublin, Poland

^d Center of Bioimobilisation and Innovative Packaging Materials, Faculty of Food Sciences and Fisheries, West Pomeranian University of Technology, ul. Kłemenasa Janickiego 35, 71-270, Szczecin, Poland

^e Institute of Textile Engineering and Polymer Materials, Faculty of Materials, Civil and Environmental Engineering, University of Bielsko-Biala, ul. Willowa 2, Bielsko-Biala, 43-309, Poland

^f Department of Physical Chemistry-Interfacial Phenomena, Faculty of Chemistry, Maria Curie-Skłodowska University, Maria Curie-Skłodowska Sq.3, 20-031, Lublin, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Edible films
Pork gelatin
Gum Arabic
Methylcellulose
Octenyl succinic anhydride modified starch
Water soluble soy polysaccharides

ABSTRACT

The properties of binary blend films (100/0, 75/25, 50/50, 25/75 and 0/100) based on gelatin (GEL) and polysaccharides exhibiting emulsifying activity: gum Arabic (GAR), methylcellulose (MC), octenyl succinic anhydride modified starch (OSA) and water soluble soy polysaccharides (WSSP) were investigated. The micrographs showed that among the polysaccharides only MC was not miscible with GEL. Consequently, GEL/MC blend films were non-homogenous, opaque and susceptible to dissolution. The dynamic light scattering (DLS), microscopic, optical and mechanical measurements revealed that the polymer incompatibility tended to be the highest at mass ratio GEL:MC = 50:50. As verified by Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy, OSA and WSSP interacted stronger with GEL than MC and GAR. Among the blend films, the MC-containing films had the most crystalline structure. Substituting part of GAR, MC and WSSP for GEL decreased the water vapor permeability of the blend films. Apart from MC, the increasing level of polysaccharides in the films resulted in gradual decrease of mechanical parameters. The most stretchable film was achieved by mixing of GEL with OSA at ratio of 25/75. This film, however, exhibited noticeable symptoms of recrystallization during storage.

1. Introduction

The functioning of the living things is based on biopolymers. Consequently, natural polymers and their derivatives are widely used in many areas of people's lives and industries. In food production, the macromolecular compounds are used as functional ingredients (thickeners, gelling agents, stabilizers, humectants, emulsifiers), bulking agents (fillers), carriers, glazing agents, and packaging materials. Currently, food polysaccharides and proteins are intensively explored for use in edible packaging. Most of these polymers exhibit inherently poor moisture vapor barrier properties, but mixing them with lipids is one way to circumvent this problem (Aydin, Kahve, & Ardic, 2017; Zhang, Simpson, & Dumont, 2018). With such an approach it would be

preferable to use polymer-stabilized emulsion systems in order to obtain the homogenous packaging material (Cecchini, Spotti, Piagentini, Milt, & Carrara, 2017; Galus, 2018).

Gelatin (GEL) is a powerful colloid stabilizer with some surface-active properties. With an excellent gelling properties, GEL forms a three-dimensional network which traps the oil droplets and prevents them from moving (Dickinson, 2009; Kowalczyk & Baraniak, 2014). The certain types of polysaccharides, such as gum Arabic (GAR), methylcellulose (MC), starch modified with octenyl succinic anhydride (OSA) and water soluble soy polysaccharides (WSSP) are also commonly used as effective emulsifiers (Dłużewska, Panasiewicz, & Leszczyński, 2004; Gullapalli & Sheth, 1997; Lin, Liang, Zhong, Ye, & Singh, 2018; Nakamura, Yoshida, Maeda, & Corredig, 2006).

* Corresponding author.

E-mail address: dariusz.kowalczyk@up.lublin.pl (D. Kowalczyk).

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.05.053>

Received 8 March 2019; Received in revised form 19 May 2019; Accepted 30 May 2019

Available online 31 May 2019

0268-005X/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

The blending of different types of biopolymers is a common technique used in the manufacture of edible films and coatings. This approach allows counterbalancing the advantages and the drawbacks of each component in a heterogeneous film matrix. Mixing of two different hydrocolloids could change significantly the functional properties of the final product by adjusting the structure or morphology alteration. Protein-polysaccharide interactions may occur via physical bonding such as van der Waals, electrostatic, hydrophobic, hydrogen bonding, and excluded volume effects, or by chemical bonding as in the case of Maillard reaction (Semenova et al., 2014). Attractive interactions between protein and polysaccharide can lead to the formation of soluble and insoluble complexes. The latter phenomenon leads to phase separation called coacervation or associative phase separation. In turn, repulsive interactions between segments of chemically different polymers in solution leads to a high probability of the mutual exclusion of each polymeric solute component from the local vicinity of the other (Patino & Pilosof, 2011).

The objective of this paper was to characterize and compare the structural, morphological and physicochemical properties of edible films based on GEL, polysaccharide-based emulsifiers (GAR, MC, OSA and WSSP) and their binary blends with different ratios of 75/25, 50/50 and 25/75. Moreover, the electrokinetic properties of the film-forming solutions (FFSs) were investigated taking into account the diameter and polydispersity (PD) of the particles as well as the zeta-potential (Z_p) using the dynamic light scattering (DLS) technique.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Commercial food-grade polymers were used in this study: pork gelatin type A ($pI \approx 9$, moisture: 10.5%) with a Bloom strength of 240 (McCormick-Kamis Polska S.A, Poland), gum Arabic Agri-Spray Acacia R (purity: $\geq 99.9\%$, moisture: 10%, carbohydrates: 90%, protein: 2%, ash: 4%) (Agrigum International, United Kingdom), methylcellulose Methocel A15 LV (moisture: $< 3\%$, sodium chloride: max 2%) with 27.5–31.5% methoxy substitution (Sigma Chemical Co., St. Luis, MO, USA), starch sodium octenyl succinate Purity Gum 2000 (moisture: max 10%, carbohydrates: min 97 g/100 g dry basis, protein: max 0.5 g/100 g dry basis, fat: max 0.15 g/100 g dry basis, ash: 5%) with substitution degree of the starch backbone with octenyl succinic acid of 0.2% (Ingredient, Germany), and water soluble soy polysaccharides (moisture: $\leq 7\%$, soluble soy polysaccharides $\geq 70\%$, ash $\leq 5\%$) (Gushen Biological Technology Group Co., LTD, China). Glycerol (Sigma Chemical Co., St. Luis, MO, USA) was used as a plasticizer.

2.2. Film preparation

The GEL, GAR, OSA and WSSP were mixed with water and glycerol. The final concentrations of polymer and plasticizer in the FFSs were 5% and 1% (w/w), respectively. The FFSs (150 g) were heated in a water bath at 90 °C for 30 min with constant stirring, then cooled to 40 °C, degassed by sonication and cast (30 g) on the leveled teflon-coated trays with the area of 144 cm². In the case of MC, the polymer was mixed with glycerol and 1/3 of the required volume of hot water (90 °C). The mixture was stirred until the particles were thoroughly wetted and dispersed. For complete dissolution, the remained part of water (4 °C) was added and the mixture was stirred for another 30 min. The blend GEL/polysaccharide FFSs were obtained by mixing (30 min) of the solutions at the following ratios: 75/25, 50/50 and 25/75. All the FFSs were cast at 30 °C, then dried at 25 ± 2 °C and $50 \pm 5\%$ relative humidity (RH) for 24 h (in a room equipped with an electric air conditioner and a humidifier coupled with a digital air humidity controller). The films were peeled from the trays and cut prior to the testing.

2.3. Characterization of FFSs

Cryogenic scanning electron microscopy (cryo-SEM) was used to examine the freshly prepared FFSs. The samples (frozen in liquid nitrogen) were fractured in the preparation chamber, sublimed for 15 min at -95 °C and observed at -145 °C using a scanning electron microscope Carl Zeiss Ultra Plus (Oberkochen, Germany). The particle size (mean diameter (d_m), effective diameter (d_{eff}) and PD of the FFSs were measured by DLS technique using a ZetaPlus/Bi-MAS instrument (Brookhaven Instruments, Holtville, USA). d_{eff} is the diameter including of the electrical double layer, while PD determines how many types of particles (in terms of size) are present in the system. The Z_p s of the FFSs were measured by electrophoretic light scattering with the same instrument. Z_p s were calculated from the electrophoretic mobility data using the Smoluchowski equation. The Z_p was an average value obtained by five readings per sample. The DLS and Z_p measurements were conducted at 30 °C. A glass electrode (Elmetron ERH-11S, Poland) connected to a pH meter (Elmetron CPC 401, Poland) was used for pH measurement of the FFSs at 25 °C.

2.4. Film thickness and conditioning

Thickness of the films was determined using a manual micrometer (Mitotuyo No. 7327, Tokyo, Japan). Before testing, the film specimens were conditioned for 48 h in a test chamber (MLR-350, Sanyo Electric Biomedical Co. Ltd., Japan) at 50% RH and 25 °C.

2.5. Microscopic analysis

The microphotographs of surface of the films were taken with a Carl Zeiss Ultra Plus scanning electron microscope (Oberkochen, Germany). Imaging of samples was performed in high vacuum (5×10^{-3} Pa) using a secondary electron detector at 20 kV. Additionally, the surface of films was observed using a LEICA 5500B light microscope connected to a Leica DFC500 camera (Leica Microsystems GmbH, Germany) with use of Nomarski differential interference contrast (DIC) technique.

2.6. Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy

FTIR tests were carried out by using a PerkinElmer infrared spectrometer (PerkinElmer SP 100, USA). Attenuated Total Reflectance (ATR) spectra were obtained in the 4000–600 cm⁻¹ region using 16 scans and 1 cm⁻¹ resolution. All the readings were performed at room temperature (20 °C, 50% RH).

2.7. Wide-angle X-ray diffraction (WAXD)

WAXD measurements were carried out on an URD 6 Seifert X-ray diffractometer (FPM-Seifert, Freiberg, Germany), with Cu K α radiation source ($\lambda = 1.543$ Å), operating at room temperature, 40 kV and 30 mA current. Samples were analyzed between $2\theta = 3^\circ$ and $2\theta = 60^\circ$ with a step size 0.1° , and scanning speed of 0.1° per 15 s.

2.8. Water content (WC) and total soluble matter (TSM)

Film specimens (4 cm²) were weighed (± 0.0001 g) and dried in an oven at 105 °C for 24 h to a constant weight. The weight loss of each sample was determined, and the WC was calculated as the percentage of water removed from system. The TSM was expressed as the percentage of film dry matter solubilized after 24 h immersion in water. The conditioned film specimens were shaken in 30 ml of distilled water at 25 ± 1 °C for 24 h, then the undissolved film residues were removed from water and dried at 105 °C for 24 h to determine solubilized dry matter. Initial dry matter values needed for TSM calculations were obtained from WC measurements. Analyses were performed in triplicate.

2.9. Water vapor permeability (WVP)

The water vapor transmission rate (WVTR, $\text{g m}^{-2} \text{d}^{-1}$) of the films was measured gravimetrically based on ISO 2528 (1995) method. The permeation cell (poly(methyl methacrylate)) cups had an internal diameter of 7.98 cm (exposed film area = 50 cm^2) and an internal depth of 2 cm. Distilled water (30 ml) was added into each test cup and the film samples were placed over the circular opening and secured by a screw top. The cups were placed in a test chamber set at 25°C and 50% RH. The weight loss from the samples with 3 replicates was monitored for 10 h period with weights recorded at 2 h intervals. The slopes of the steady state (linear) portion of weight loss versus time curves were used to calculate WVTR. The WVP ($\text{g mm m}^{-2} \text{d}^{-1} \text{kPa}^{-1}$) was calculated as:

$$\text{WVP} = (\text{WVTR} \times L) / \Delta p \quad (1)$$

where L is the mean of film thickness (mm), Δp is the water vapor pressure difference (kPa) between two sides of the film.

2.10. Optical parameters

The light transmission (T%) of films was measured in the wavelength range 200–700 nm. The opacity of the films was calculated by Eq. (2) (Han & Floros, 1997):

$$\text{Opacity} = A_{600}/x \quad (2)$$

where A_{600} is the absorbance at 600 nm and x is the film thickness (mm).

Analyses were performed using a spectrophotometer (Lambda 40, Perkin–Elmer, Shelton, CT, USA). Five replicates of each film type were tested for the optical properties.

2.11. Mechanical properties

The mechanical properties of films were evaluated using a TA-XT2i texture analyzer equipped with a 50 kg load cell (Stable Micro Systems, UK). The initial grip separation was set to 30 mm, and film samples ($2 \text{ cm} \times 5 \text{ cm}$) were stretched at speed of 1 mm s^{-1} . At least eight replicates of each film type were tested for tensile properties. Tensile strength (TS, MPa), elongation at break (E, %), and elastic modulus (EM, MPa) were calculated by Eqs. (3)–(5), respectively:

$$\text{TS} = F_{\text{max}}/A \quad (3)$$

where F_{max} is the maximum load for breaking film (N) and A is the initial specimen cross-sectional area (thickness \times width, mm^2).

$$E = (\Delta L/L) \times 100 \quad (4)$$

where L is the initial gage length (mm) and ΔL is the difference in the length at the moment of fracture.

$$\text{EM} = (\sigma_2 - \sigma_1) / (\varepsilon_2 - \varepsilon_1) \quad (5)$$

where ε_1 is a strain of 0.2 (0.67%), ε_2 is a strain of 0.4 (1.33%), σ_1 (MPa) is the stress at ε_1 , and σ_2 (MPa) is the stress at ε_2 .

A steel ball-ended probe (3 mm diameter) was used for determining puncture strength (PS, MPa). The probe moved perpendicularly at the film surface at constant speed (1 mm s^{-1}) until it passed through the film. The PS was calculated by Eq. (6):

$$\text{PS} = F/A \quad (6)$$

where F is the maximum force (N) and A is the cross-sectional area of the probe (thickness \times diameter of the opening of film holder, mm^2). PS was measured in quadruplicate.

2.12. Storage test

Film samples ($1 \text{ cm} \times 4 \text{ cm}$) were stored in triplicate in a versatile

environmental test chamber (MLR-350, Sanyo Electric Biomedical Co. Ltd., Japan) at 50% RH and 25°C for one month. In order to investigate the film's stability, the visual and microscopic inspections using a LEICA 5500B light microscope were performed every week from date of peeling. Where justified, further SEM analyses were performed.

2.13. Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm standard deviation ($n \geq 3$). Differences among data mean values were tested for statistical significance at the $p < 0.05$ level using analysis of variance (STATISTICA 6.0, StatSoft Inc., Tulsa, USA) and the Fisher's test.

3. Results and discussion

The study showed that it is possible to obtain the films based on GEL and different polysaccharide-based emulsifiers under the same conditions (polymer and plasticizer concentration, casting technique, thickness, drying conditions, etc.). The GAR100 film was easily breakable material; however, at RH = 50% its cohesiveness was sufficient to prepare and analyze the samples. In turn, the high adherence and stickiness of pure OSA films made it impossible to peel them off from the casting surface. Although it was not possible to analyze the physicochemical properties of OSA100 film, its structural and morphological properties (in the form of coating layer) were tested for the comparative purposes. The addition of GEL into GAR and OSA helped to obtain the films with more satisfactory handling properties.

3.1. Cryo-SEM

Fig. 1 presents images of freeze-fractured FFSSs obtained from the pure polymers and GEL/polysaccharide 1:1 mixtures. In all cases, it was possible to visualize the honeycomb-like structure of dehydrated FFSSs. The MC-containing FFSSs were the least susceptible to freeze-drying process; i.e. the ice crystals trapped between the walls of polymer scaffold were observed. Depending on polymer type, the structures of freeze-fractured FFSSs differed in terms of their shape and dimension. In the case of GAR100 FFSS, many of the walls were not interconnected. The OSA100 FFSS created structure with the highest pore aperture. In turn, the smallest hollow cells were observed for the GEL100 FFSS.

The scaffolds of blend FFSS differed from those of single polymer-based. Since GEL produced the tightly packed cryogel (Fig. 1), the aperture sizes of the blends of GEL with GAR, MC and OSA were smaller and more angular compared with the pure polysaccharide cryogels. Consequently, the blends appeared more dense. The images revealed that with the exception of MC, the polysaccharides exhibited a good compatibility with GEL (no phase separation). In contrast, the round compact regions with average diameter size (d) of $\sim 52.84 \mu\text{m}$ were present in the GEL50/MC50 cryogel (Fig. 1), which reveals the immiscibility between the biopolymers. Similar phenomenon have been observed previously for the GEL/hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) dispersions (Esteghlal et al., 2016; Tedesco, Monaco-lourenço, & Carvalho, 2016). Based on the results of Esteghlal et al. (2016), the large spherical areas could be aqueous phases rich in MC entrapped in continuous GEL-rich phase. The observed segregation of the FFSSs may be explained by the fact that GEL and MC are two thermodynamically incompatible polymers. Whilst GEL is easily dissolved in water by heating the solution above 40°C , the MC solution forms stable gels $> 32^\circ\text{C}$ (Thirumala, Gimble, & Devireddy, 2013). Another possible explanation for the polymer's immiscibility could be an inadequate mixing of the FFSSs. As previously indicated, the more share rate, the less particle size of dispersed phase and hence better mixture homogeneity between GEL and HPMC (Esteghlal et al., 2016).

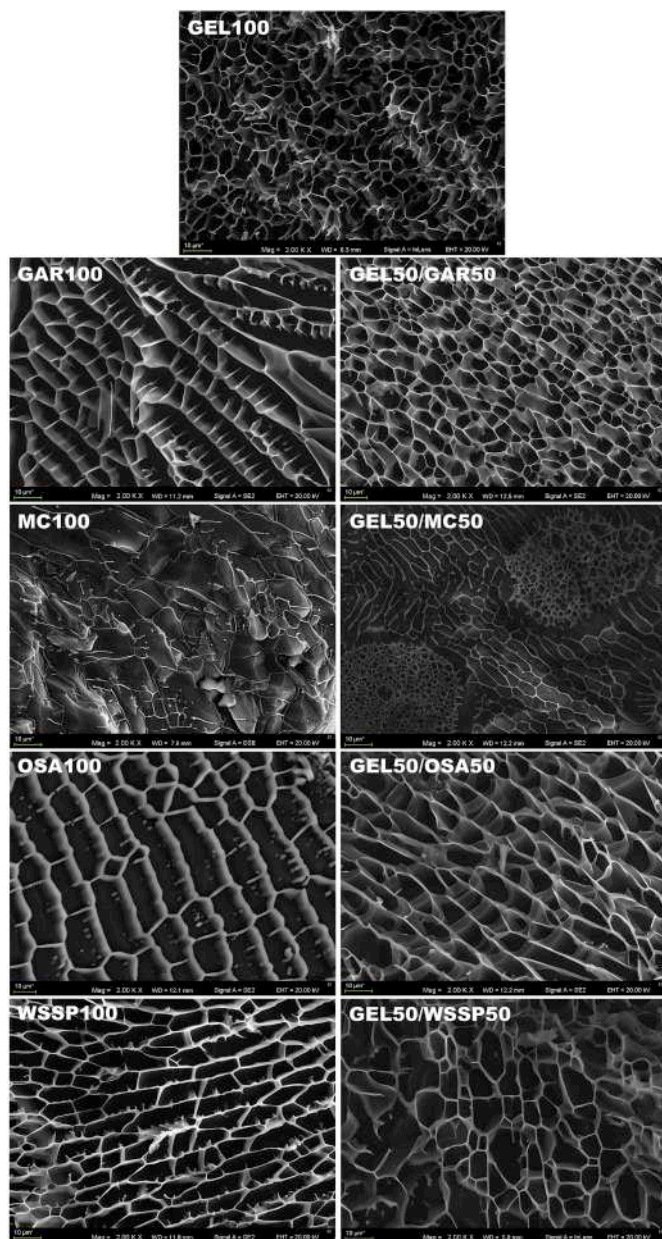


Fig. 1. Cryo-SEM images of the film-forming solutions based on gelatin (GEL), gum Arabic (GAR), methylcellulose (MC), octenyl succinyl anhydride modified starch (OSA) and water soluble soy polysaccharides (WSSP).

3.2. Particle size and zeta-potential of the FFSs

DLS is essentially useful at measuring particle size across the range ~ 0.1 nm– ~ 10 μ m. As can be seen from Table 1, the d_m values recorded for some FFSs (GEL100, MC100, GEL25/MC75 and GEL50/MC50) exceeded the permissible range for the DLS technique. The obtained results therefore need to be interpreted with caution. Among the single-polymer FFSs, the MC100 had the largest particle sizes ($d_m = 25.77$ μ m). This result may be explained by the solubility problems caused by the relatively high concentration of MC (5%) in the FFS. Despite the fact that MC is water-soluble, its dissolution is very slow since a gel layer formed in contact with water decreases the further diffusion of water into the powder, resulting in formation of macro-gelled particles with a very low dissolution rate (Nasatto et al., 2015). It was found that among the single-polymer FFSs, the OSA100 exhibited the lowest particle diameter as well as the lowest diversity of the particle sizes described by the standard deviation (Table 1). As a

consequence, the OSA-containing blend FFSs tended to have the smallest and the most uniform particles. The largest particles were found for the GEL50/MC50 system ($d_m = 77.36$ μ m), which supports the cryo-SEM observations (Fig. 1). Furthermore, the GEL50/MC50 dispersion had larger particle size and higher particle size range compared to the other MC-containing blend FFSs. It suggests that GEL and MC form the most incompatible system at 1:1 mix ratio. Nevertheless, it was found that the PD of the over mentioned system was the lowest, i.e. the smallest non-uniformity existed in the particle size distribution (Table 1). This result is difficult to interpret, but it may have something to do with very large sizes of the particles, about eight times higher than the measuring range of the instrument. The cryo-SEM images revealed that GEL and MC phases were to a high extent independent in the FFS (Fig. 1). So, it is possible that the laser light was scattered by the single-phase regions of the sample.

Zp is an analytical tool that could point to the existence of charge-charge interactions between the two biopolymers (Klein, Aserin, Ishai, & Garti, 2010). The measurements of the Zp revealed that the particles in the FFSs had relatively low surface charges ranging from -3.26 to 1.73 mV (Table 1). From a theoretical viewpoint, the Zp characterizes the electrical double layer on the solid-liquid interface. Accordingly, the Zp of around 0 could explain why the d_m and d_{eff} in the most cases were very comparable (Table 1). For all the single-polysaccharide dispersions the Zp values were slightly negative. These results are in agreement with earlier findings (Klein et al., 2010; Nemazifard, Kavooosi, Marzban, & Ezedi, 2017; Wu & McClements, 2015). The GEL type A has an isoelectric point (pI) between pH 7 and pH 10 (Kirk, Othmer, & Seidel, 2008), which explains the positive charge (1.73 mV) on the GEL molecules at pH = 5.54 (Table 1). Consequently, the increase in GEL concentration tended to shift the Zp of GEL/polysaccharide dispersions towards positive values. This finding was also reported previously (Yang, Anvari, Pan, & Chung, 2012; Wu & McClements, 2015). It suggests that the positive charges on the GEL molecules were balanced by the electrostatic associations with the negatively charged polysaccharides.

3.3. Film surface microstructure

The differences in the topography of the single-polymer and GEL/polysaccharide 1:1 blend films were observed by SEM (Fig. 2). The surfaces of GEL and GAR films were homogeneous and smooth. In turn, the WSSP100 film was slightly rough and uneven. The small particles with different geometric shapes were noticed in the MC film. As previously discussed, these objects were likely non-dissolved MC particles (Fig. 3). The mixing of polysaccharides with GEL resulted in an increased film's surface inhomogeneity. The surface of WSSP blend film was more granular when compared to the pure WSSP film, while small round particles ($d \approx 0.36$ μ m) were noticed on the surface of GAR and OSA composite films. The large spherical droplets were observed on the surface of the GEL50/MC50 film ($d = 8.50$ – 37.47 μ m), which is in agreement with the results of cryo-SEM and particle size analyses (Fig. 1 and Table 1). It proves that GEL and MC are two incompatible biopolymers that cannot form the homogeneous composite films. An additional analysis of the GEL/MC blend films by Nomarski DIC technique enabled better visualization of the morphology of the dispersed phases (Fig. 3). The largest droplets ($d_{max} \approx 467$ μ m) were observed on the surface of GEL75/MC25 film. In turn, the smallest ones ($d_{min} \approx 53$ μ m) were on the surface of GEL50/MC50 film (Fig. 3). It is worth mentioning, that only in the case of GEL50/MC50 film the microscopic (Fig. 3) and DLS data (Table 1) were comparable. The mean size of particles visualized in the other GEL/MC blend films were much bigger than the hydrodynamic particle size calculated from DLS. There are several possible explanations for this result. The discrepancy could be attributed to the presence of very large particles that were beyond the measurement range of DLS technique; i.e. the samples did not give a reliable DLS readings. Moreover, it is possible that the DLS results were

Table 1

Mean diameter (d_m), effective diameter (d_{eff}), polydispersity (PD), pH and zeta potential (Zp) of film-forming solutions obtained from gelatin (GEL), gum Arabic (GAR), methylcellulose (MC), octenyl succinic anhydride modified starch (OSA) and water soluble soy polysaccharides (WSSP).

GEL/polysaccharideblend ratio	d_m (μm)	d_{eff} (μm)	PD	pH	Zp (mV)
GEL100	6.18 \pm 0.96	10.87	0.224	5.54 \pm 0.01 ^j	1.73 \pm 1.05 ⁱ
GEL75/GAR25	1.20 \pm 0.06	1.22	0.320	5.57 \pm 0.01 ^j	1.13 \pm 1.30 ^{hi}
GEL50/GAR50	7.32 \pm 1.35	8.52	0.363	5.47 \pm 0.01 ⁱ	0.25 \pm 0.39 ^{gh}
GEL25/GAR75	0.77 \pm 0.03	0.80	0.322	5.25 \pm 0.01 ^f	-0.61 \pm 1.33 ^{defg}
GAR100	1.35 \pm 0.05	1.37	0.324	4.93 \pm 0.01 ^d	-3.26 \pm 0.35 ^a
GEL75/MC25	1.71 \pm 0.10	1.86	0.307	5.64 \pm 0.01 ^k	0.18 \pm 0.82 ^{gh}
GEL50/MC50	77.36 \pm 16.70	62.67	0.005	5.73 \pm 0.01 ^l	-0.10 \pm 0.29 ^{fg}
GEL25/MC75	18.74 \pm 5.22	10.78	0.542	5.97 \pm 0.01 ^m	-1.36 \pm 0.10 ^{cde}
MC100	25.77 \pm 1.20	28.45	0.348	6.86 \pm 0.03 ⁿ	-2.22 \pm 0.73 ^{abc}
GEL75/OSA25	2.12 \pm 0.13	2.15	0.399	5.32 \pm 0.01 ^g	-0.01 \pm 0.43 ^{fg}
GEL50/OSA50	1.03 \pm 0.03	1.03	0.386	5.17 \pm 0.01 ^e	-0.26 \pm 1.32 ^{fg}
GEL25/OSA75	1.27 \pm 0.03	1.27	0.334	4.81 \pm 0.01 ^c	-0.32 \pm 1.08 ^{efg}
OSA100	0.82 \pm 0.02	0.84	0.310	4.30 \pm 0.00 ^a	-2.51 \pm 0.27 ^{ab}
GEL75/WSSP25	7.12 \pm 0.32	8.50	0.375	5.40 \pm 0.00 ^h	0.24 \pm 0.43 ^{gh}
GEL50/WSSP50	4.04 \pm 0.28	4.06	0.331	5.22 \pm 0.01 ^f	-0.95 \pm 0.51 ^{def}
GEL25/WSSP75	6.89 \pm 0.76	6.49	0.414	4.96 \pm 0.01 ^d	-1.53 \pm 1.00 ^{bcd}
WSSP100	3.63 \pm 0.79	3.59	0.248	4.71 \pm 0.02 ^b	-2.95 \pm 0.60 ^a

^{a-n} Values with the different superscript letters within one column are significantly different ($P > 0.05$).

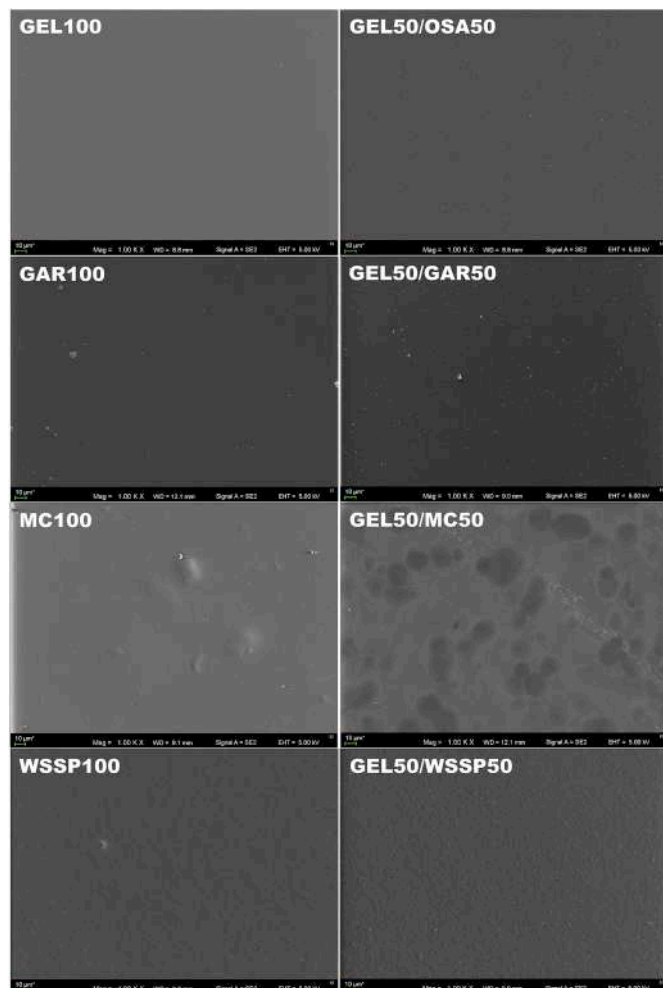


Fig. 2. SEM micrographs of the surfaces of the films obtained from gelatin (GEL), gum Arabic (GAR), methylcellulose (MC), octenyl succinic anhydride modified starch (OSA) and water soluble soy polysaccharides (WSSP).

inaccurate due to the phase separation and/or sedimentation of the non-compatible binary liquid mixture. Another possible explanation for this inconsistency is that the particle sizes were raised as a result of aggregating induced by solvent evaporation (when the FFSs were

dried).

In order to investigate the film's stability, the one-month storage tests were performed. One week after the peeling the initially transparent GEL25/OSA75 film, turned into an unattractive material covered in many white spots visible to naked eye. The observed crystals (Fig. 4) were likely starchy component. The possibility of starch re-crystallization in the films, detected on the basis of the microscopic analyses, was previously reported (Santos, Bastos, Silva, Thiré, & Simão, 2012). Moreover, the recrystallization of starch in the films during storage has been repeatedly proved by X-rite diffraction analyses (Ahmed, Bilal, Niazi, Hussain, & Jahan, 2017). The visual aspects of the other tested films did not change during storage.

3.4. ATR-FTIR spectroscopy

Fig. 5 shows the ATR-FTIR spectra of the films obtained from the pure polymers and GEL/polysaccharide 1:1 mixtures. A strong broad band at $\sim 3290\text{ cm}^{-1}$, resulting from amide A ($-\text{OH}$ and/or $-\text{NH}_2$) stretching, can be seen in the spectra of all samples. Amide A peak found in the spectra of GAR100 and WSSP100 films was higher and broader compared to the GEL100 film, which may be explained in terms of higher number of free hydroxyl groups in structure of these polysaccharides. On the other hand, the relatively low amide A peak intensities were observed in the spectra of films based on OSA and MC. This result may be explained by the fact that $-\text{OH}$ groups in these polysaccharides were partially substituted. The succinilation of starch as well as methylation of cellulose lead to decreases in the intensity of band profile attributed to stretching of the O–H bond (Hu et al., 2015; Oliveira et al., 2015). Probably because of high methoxyl substitution (27.5–31.5%) of MC used in this study, the MC100 film exhibited the weakest amide A peak (Fig. 5).

It was found that the intensity of amide A peak became higher after mixing GEL with GAR, OSA and WSSP. This change could indicate increase in hydrogen-bound hydroxyl group in the polysaccharides as a result of interactions with GEL (Turhan, Sahbaz, & Güner, 2001). Among the tested blend films, the GEL50/MC50 film had the lowest amide A peak. It seems possible that this results was due to the phase separation (Fig. 1), that did not favor formation of additional hydrogen bounding interactions between GEL and MC.

A weak band of amide B at 3075 cm^{-1} related with the νNH vibrations, and characteristic absorption peaks at 2925 and 2855 cm^{-1} corresponding, respectively, to CH_2 asymmetrical and CH_2 symmetrical stretches (Staroszczyk, Sztuka, Wolska, Wojtasz-Pająk, & Kołodziejaska, 2014) were observed for the GEL100 film spectrum. What is surprising

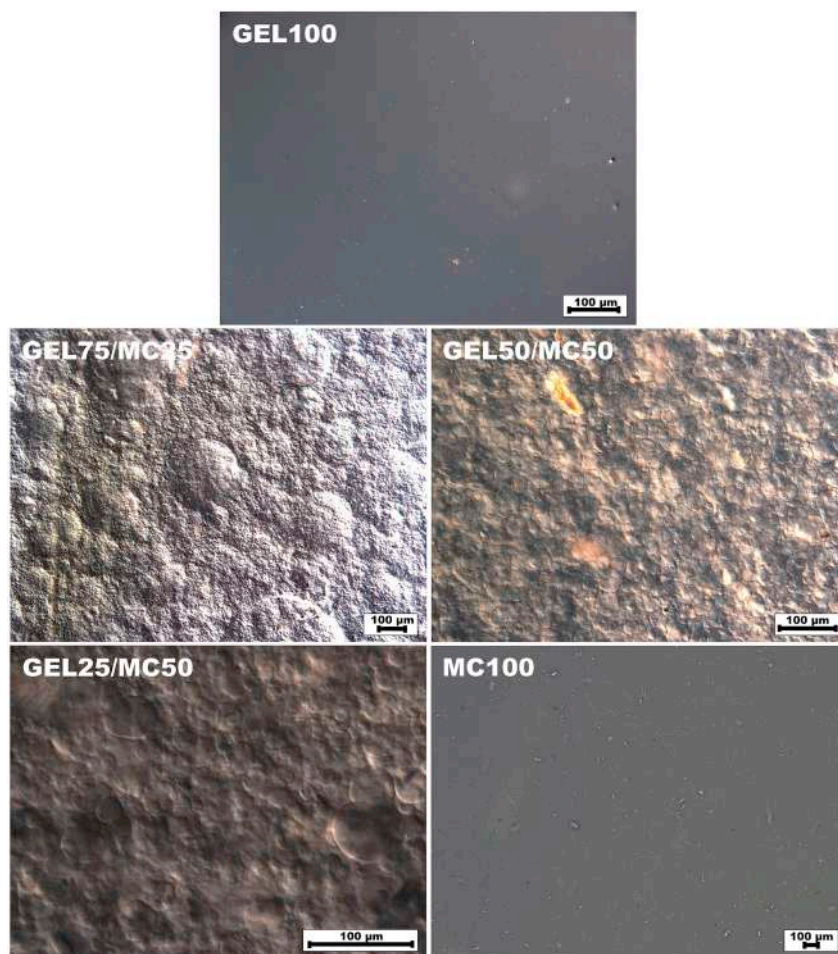


Fig. 3. Surface of the films based on gelatin (GEL), methylcellulose (MC) and their blends examined using Nomarski DIC microscopy.

is that among the blend films, the spectrum of GEL50/GAR50 film was the most similar to the spectrum of pure GEL film (Fig. 5). Nevertheless, in contrast to GEL, the peaks observed at $2925\text{--}2855\text{ cm}^{-1}$ indicate presence of sugars in GAR structure (Daoub, Elmubarak, Misran, Hassan, & Osman, 2016). The chemical composition of GAR consists of a high proportion of carbohydrates ($\sim 97\%$), which are predominantly composed of D-galactose and L-arabinose units and a low proportion of proteins ($< 3\%$) (Montenegro, Boiero, Valle, & Borsarelli, 2012). The peak that appear at 2925 cm^{-1} in the spectra of GAR100 film is characteristic of free carboxyl (Shaddel et al., 2017).

The spectrum of GEL100 film displayed the characteristic absorption bands of proteins at 1622 cm^{-1} (amide I), 1583 cm^{-1} (amide II) and 1228 cm^{-1} (amide III). Amide-I represents C=O stretching/

hydrogen bonding coupled with COO, amide-II arises from the bending vibration of N–H groups and stretching vibrations of C–N groups, while amide-III is related to vibrations in the plane of C–N and N–H groups of bound amide or vibrations of CH_2 groups of glycine (Nur Hanani, Beatty, Roos, Morris, & Kerry, 2013). It was found that the peak at 1622 cm^{-1} owing to the carbonyl groups almost completely disappeared in the spectra of GEL50/OSA50 and GEL50/WSSP50 films. In return, the new strong peak at 1633 cm^{-1} was noticed. The band at $1630\text{--}1695\text{ cm}^{-1}$ is characteristic for the $-\text{CONH}_2$ group, thus its formation suggests that the polysaccharides could be strongly associated with GEL. The measurement of Z_p of FFSs (Table 1) showed that GEL and the polysaccharides carried opposite charges when they were mixed. The electrostatic interaction between positively charged amine

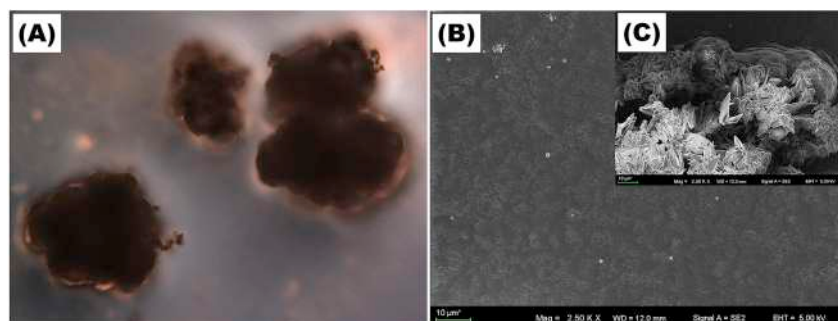


Fig. 4. (A) Nomarski micrograph of the recrystallized octenyl succinic anhydride modified starch (OSA) visible to the naked eye, (B) SEM image of recrystallized OSA invisible to the naked eye, and (C) SEM image of the recrystallized OSA visible to the naked eye found in the GEL25/OSA75 blend film on the 7th day after peeling.

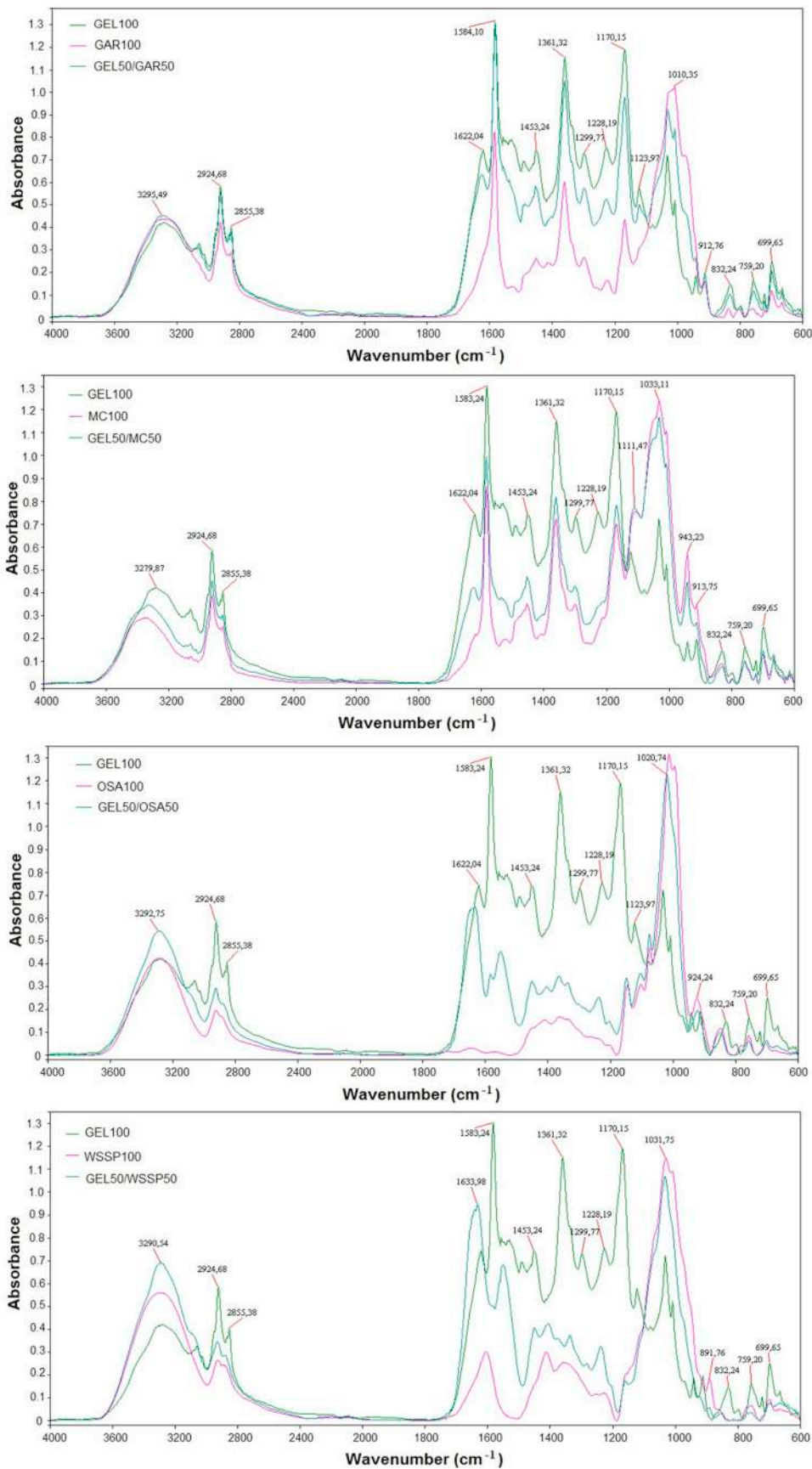


Fig. 5. ATR-FTIR spectra of the films obtained from gelatin (GEL), gum Arabic (GAR), methylcellulose (MC), octenyl succinic anhydride modified starch (OSA) and water soluble soy polysaccharides (WSSP).

groups on GEL molecules and negatively charged carboxylic groups (–COO–) on OSA were described previously (Wu & McClements, 2015). Also WSSP, another negatively charged polysaccharide, has a proven ability to form complexes with proteins through electrostatic interactions (Li et al., 2015; Tran, 2011). GAR is a weak polyelectrolyte that carries a net negative charge above pH 2.2 due to its carboxyl groups (Yang et al., 2012), thus also has been recognized to undergo complex coacervation with GEL (Lv, Zhang, Zhang, Abbas, & Eric, 2013; Shaddel et al., 2017; Yang et al., 2012). Nevertheless, the adjustment of the pH is necessary to allow the effective electrostatic interaction between the GAR and proteins. The amide I band ($1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$) is the most sensitive spectral region of GEL, thus absence of peak displacement in this region of the GEL50/GAR50 film spectrum, suggests that the interaction between the GEL's amine groups and the GAR's carboxylic groups was not generated.

Since the MC is non-ionic cellulose ether, its electrostatically mediated interaction with GEL should be limited. Nevertheless, the increase in MC content resulted in a reduction of Z_p of the blend FFS (Table 1). This could be ascribed to the fact that the negatively charged polysaccharide began to dominate as the GEL content was decreasing. Another possible explanation for this is a charge screening effect of the MC. This behavior of the cellulose ethers has been reported previously by Bouville and Deville (2014). It is somewhat surprising that no amide III peak was noted in the spectrum of the GEL/MC film (Fig. 5). It is difficult to explain this result, but it might be related to non-homogeneous distribution of the ingredients in the heterogeneous matrix (Figs. 2 and 3). The separation of the FFS into two different distinct immiscible phases likely disturbed valid identification of all amide peaks originated from the proteinaceous component.

It should be noted that between 1700 and 1100 cm^{-1} the main absorption peaks observed for GEL100 film were also visible in the spectra of GAR- and MC-containing blend films; however, on account of the smaller proportion of GEL, their intensities were lower (Fig. 5). Mixing of GEL with OSA and WSSP generated the opposite result of significantly changed profile band, demonstrating a strong interaction between the biopolymers.

The spectra of all single-polysaccharide films exhibited the most intensive peak at $\sim 1100\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$. This absorption band is assigned to the stretching vibrations of –C–O–C– glycosidic bonds (Bashi et al., 2017; Gopi et al., 2018; Hu et al., 2015; Romano & Gómez-Zavaglia, 2014). The peak near 925 cm^{-1} detected in the spectra of OSA-containing films could be attributed to the skeletal mode vibrations of α -1,4 linkage, while the peak around 1030 cm^{-1} indicates the presence of the α -1,6 linkage (Zhang, Huang, Luo, Fu, & Jiang, 2011). In turn, the peak at 944 cm^{-1} observed for the MC-containing films is related to OCH₃ groups (Nadour, Daoud, Ouradi, & Benaboura, 2017; Oliveira et al., 2015). Finally, from the literature review, the bands lying at low wave numbers (below 800 cm^{-1}) in the spectra of the polysaccharide-based films were attributed to the skeletal mode vibrations of the pyranose rings (Kizil, Irudayaraj, & Seetharaman, 2002).

3.5. WAXD

WAXD patterns of the single-polymer and 50/50 blend films are presented in Fig. 6. The typical diffractogram with two characteristic peaks at $2\theta \approx 8^\circ$ and $2\theta \approx 20^\circ$ was obtained for the pure GEL film. These peaks are assigned to the partially reconstituted crystalline triple-helical crystalline structure of collagen (Asma, Meriem, Mahmoud, & Djafer, 2014; Wang, Wang, Ye, Xiao, & Liu, 2017). The first peak is related to the diameter of the triple helix and its intensity could be associated with the triple helix content in the film. The second broad peak corresponds to the amorphous fraction of GEL (Bigi, Panzavolta, & Rubini, 2004). The pure GAR and OSA films exhibited an amorphous structure and showed a broad peak at $2\theta = 19.6^\circ$. The similar patterns were previously reported (Liu et al., 2013; Sarika & James, 2015). Likewise, the WAXD pattern with the maximum intensity at $2\theta = 20.0^\circ$

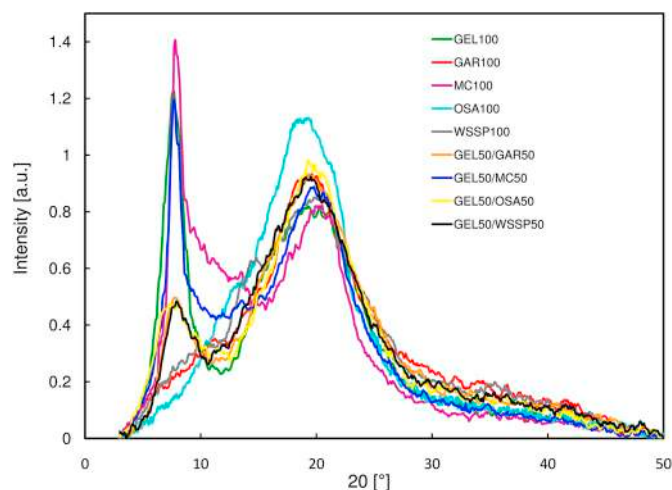


Fig. 6. WAXD diffractograms of the films obtained from gelatin (GEL), gum Arabic (GAR), methylcellulose (MC), octenyl succinic anhydride modified starch (OSA) and water soluble soy polysaccharides (WSSP).

and smaller peak located at $2\theta = 14.8^\circ$ revealed the amorphous nature of WSSP100 film. The spectrum of MC100 film showed a sharp peak at $2\theta = 7.8^\circ$ and a broad peak centered at $2\theta = 20.5^\circ$, indicating a semi-crystalline structure of the sample (Rangelova et al., 2011). The first diffraction peak corresponds to the trimethylglucose repeating unit of methyl cellulose and its presence is an evidence of cellulose modification (Layek et al., 2018).

Among the tested films, the pure OSA film exhibited the highest intensity of peak centered at $2\theta \approx 20^\circ$. It is difficult to explain this result, but it might indicate the presence of large quantities of water in the sample. The XRD patterns are strongly dependent on the appearance of water molecules and according to a study by Yakimets et al. (2007) the higher hydration level of biopolymeric films, the broader and larger intensity of the over mentioned peak. Although it was not possible to analyze the WC of OSA100 film, its sticky nature suggests very high moisture content. This hypothesis is supported partially on the basis of the high WC of the OSA-containing films (Table 2). The diffractogram of OSA100 film, however, should be interpreted with caution because, unlike the other films, the sample was prepared and tested in the form of coating, thus the remaining portion of not evaporated water could be present in the polymer layer.

The spectra of blend films showed that the replacement of half of the GEL amount by GAR, OSA or WSSP decreased the intensity of the characteristic peak of crystalline region of GEL (at $2\theta \approx 8^\circ$) by 2.5 times (Fig. 6). This result can be easily explained on the basis of smaller proportion of GEL in the blend systems; however, it is also possible that the polysaccharides interfered with the crystalline arrangement of GEL helical structure (Soliman & Furuta, 2014). Hindered formation of the collagen-like structure could be the result of good compatibility of GEL with GAR, OSA and WSSP (Fig. 1). On the other hand, as a result of immiscibility between GEL and MC (Fig. 1), the crystalline peak intensity of the GEL50/MC50 blend film was almost unchanged as compared to the GEL100 formulation. The microscopic images revealed that the network structure of the blend films was formed separately by GEL and MC (Figs. 2 and 3), thus a two-phase structure could marginally affect the crystalline domain formation for each of pure polymer. Since the MC100 film exhibited the highest crystallinity, the partial replacement of MC with GEL decreased the peak intensity at $2\theta \approx 8^\circ$ (Fig. 6).

3.6. Water affinity

The WC of single-polymer films increased with the following ranked order: WSSP < GEL < GAR < MC (Table 2). Replacement of part of the GEL amount by the GAR or WSSP did not affect WC of the films

Table 2

Water content (WC), total soluble matter (TSM), water vapor permeability (WVP) and opacity (OP) of the films obtained from gelatin (GEL), gum Arabic (GAR), methylcellulose (MC), octenyl succinic anhydride modified starch (OSA) and water soluble soy polysaccharides (WSSP).

GEL/polysaccharideblend ratio	WC (%)	TSM (%)	WVP ($\text{g mm m}^{-2} \text{d}^{-1} \text{kPa}^{-1}$)	OP (A_{600}/mm)
GEL100	13.47 ± 0.88 ^{bc}	44.39 ± 1.90 ^a	50.79 ± 0.79 ^{def}	0.42 ± 0.02 ^a
GEL75/GAR25	13.51 ± 0.59 ^{bc}	45.19 ± 2.93 ^{ab}	48.66 ± 0.18 ^{cde}	0.45 ± 0.01 ^{ab}
GEL50/GAR50	12.02 ± 0.64 ^a	47.02 ± 0.11 ^{ab}	48.76 ± 0.27 ^{abc}	0.46 ± 0.04 ^{ab}
GEL25/GAR75	12.71 ± 0.70 ^{ab}	82.95 ± 3.96 ^f	51.76 ± 1.42 ^{ef}	0.52 ± 0.02 ^{bcd}
GAR100	15.27 ± 0.56 ^{fg}	100 ^g	60.15 ± 1.99 ^g	0.51 ± 0.03 ^{bcd}
GEL75/MC25	14.13 ± 0.83 ^{cde}	47.88 ± 0.87 ^b	47.28 ± 1.78 ^{ab}	3.15 ± 0.09 ^g
GEL50/MC50	14.06 ± 1.18 ^{cde}	98.02 ± 2.69 ^g	45.42 ± 1.35 ^a	6.01 ± 0.19 ^j
GEL25/MC75	15.04 ± 0.46 ^{efg}	99.90 ± 0.19 ^g	48.86 ± 1.97 ^{bcd}	4.08 ± 0.15 ^h
MC100	17.27 ± 0.64 ^h	100 ^g	52.29 ± 3.08 ^f	0.64 ± 0.04 ^e
GEL75/OSA25	14.87 ± 0.33 ^{def}	51.42 ± 1.88 ^c	49.62 ± 1.67 ^{cde}	0.47 ± 0.05 ^{ab}
GEL50/OSA50	14.69 ± 0.48 ^{def}	53.54 ± 2.10 ^{cd}	51.35 ± 0.56 ^{def}	0.52 ± 0.02 ^{bcd}
GEL25/OSA75	16.01 ± 0.87 ^g	74.79 ± 4.07 ^e	46.57 ± 0.73 ^a	0.48 ± 0.03 ^{abc}
OSA100	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
GEL75/WSSP25	13.47 ± 0.36 ^{bc}	47.41 ± 2.92 ^{ab}	46.98 ± 0.36 ^{ab}	0.47 ± 0.01 ^{ab}
GEL50/WSSP50	13.22 ± 0.51 ^{bc}	54.73 ± 2.07 ^d	51.74 ± 0.62 ^{ef}	0.56 ± 0.02 ^{cd}
GEL25/WSSP75	13.91 ± 0.55 ^{cd}	81.75 ± 2.92 ^f	51.97 ± 0.98 ^f	0.94 ± 0.03 ^f
WSSP100	12.63 ± 1.09 ^{ab}	100 ^g	65.04 ± 1.69 ^h	0.58 ± 0.03 ^{de}

a–n Values with the different superscript letters within one column are significantly different ($P > 0.05$).

n.a. – not analysed.

($p > 0.05$). Among the tested blend samples the OSA- and MC-containing films exhibited the highest moisture content.

Since GEL swell in water at 25 °C (i.e. heat is required for its complete dissolution), the GEL100 film was only partially soluble (44.39%). In turn, the pure polysaccharide films were fully soluble in water (Table 2). Generally, the increasing level of polysaccharides resulted in an increase in the TSM of blend films. The GEL50/MC50 and GEL25/MC75 films were almost completely soluble (98.02–99.90%). This result may be explained in terms of non-homogeneous structure of these films (Fig. 3), that presumably facilitated their dispersion in contact with water.

A comparison of the water vapor barrier properties showed that the pure GEL and MC films exhibited significantly lower WVP (50.79 and 52.29 $\text{g mm m}^{-2} \text{d}^{-1} \text{kPa}^{-1}$, respectively) than the pure WSSP and GAR films (65.04 and 60.15 $\text{g mm m}^{-2} \text{d}^{-1} \text{kPa}^{-1}$, respectively) (Table 2). It is important to mention that in the case of polymeric materials water diffuses into the amorphous regions first because they are less organized, allowing water to penetrate more easily than the highly ordered, densely packaged crystalline regions (Jenkins & Stamboulis, 2012, p. 105). On the basis of the above, it can be concluded that the semi-crystalline character of the GEL100 and MC100 films (Fig. 6) was responsible for their better resistance to water vapor diffusion. Both WSSP and GAR are mixtures of different polysaccharides; i.e. WSSP are primarily mixture of rhamnogalacturonans and arabinogalactans (Chen, Duizer, Corredig, & Goff, 2010), while GAR is a complicated mixture of long and short chains of sugars (arabinogalactan oligosaccharides and polysaccharides) and glycoproteins (Montenegro et al., 2012). The complex composition of polymer results in weaker cohesion forces between its constituents and, consequently, less ordered crystal structure. In the light of this information, the amorphous structure of WSSP100 and GAR100 films (Fig. 6) was the cause of their high WVP.

Depending on polysaccharide type and concentration, the blend films had not changed or decreased WVP compared to the GEL100 film. The WVP reduction level ranged from 4.00% to 10.57%. Replacement of part of the polysaccharide amount (GAR, MC, WSSP) by the GEL decreased the WVP of the films ($p < 0.05$). This result could be attributed to more tightly packed structure of the GEL/polysaccharide film matrix as compared to the single-polysaccharide films (Fig. 1). Furthermore, it is known that GEL is a component with a relatively good water vapor diffusion resistance (Table 2; Kowalczyk & Baraniak, 2014; Kowalczyk, Kordowska-Wiater, Nowak, & Baraniak, 2015). This could be attributed to its ability to form coherent semi-crystalline films

(Figs. 1 and 6) with excellent hydration properties (Kowalczyk, 2016). The analysis of moisture sorption isotherms demonstrated that the water binding capacity of GEL film is significantly higher than the films based on starch or hydroxypropyl cellulose (Yakimets et al., 2007). Moreover, the moisture sorption/desorption characteristic of GEL revealed that more water is being held for the desorption curve than for the absorption (Aguirre-Álvarez, Foster, & Hill, 2012). It can therefore be concluded that GEL film could just immobilize the passing aqueous vapor.

3.7. Optical properties

Among the single-polymer films, the GEL film was the most transparent to visible light ($T\%_{\lambda 400-700} = 88.03\text{--}91.16\%$), whereby the GAR film demonstrated the worst translucence ($T\%_{\lambda 400-700} = 85.04\text{--}89.90\%$) (Fig. 7). The MC100 and WSSP100 films showed the comparable visible light transmittance. It was noticed that, the GEL100 film tended to have the best UV-blocking properties, which may be explained by the fact that proteins are excellent UV-absorbing compounds due to presence of carbonyl groups of peptide bonds, disulfide bonds as well as aromatic amino acids (Banga, 2006). Furthermore, in the spectra of GEL-containing films the transmittance band centered at ~255 nm was observed, which was a consequence of light absorption near 275 nm (Fig. S1). This finding is consistent with results of earlier studies (Łopusiewicz, Jędra, & Bartkowiak, 2018; Xu, Wei, Xiao, Bi, & Yang, 2017) and could be attributed to the light absorption by aromatic residues (250–320 nm) and S–S bonds (250–300 nm) (Banga, 2006). Among the single-polysaccharide films, the WSSP100 film offered the best UV protection against UVA radiation (315–400 nm). Nevertheless, in the range of 200–220 nm the best UV blocker was the GAR100 film (Fig. S1). A little absorption at the region of 270–280 nm was observed for the pure GAR sample (Fig. S1), which may be attributed to presence of small portion of proteins in the polymer (Comunian & Favaro-Trindade, 2016). In the UVC light region (< 280 nm) the MC100 film had the weakest UV barrier properties.

The gradual increase in GAR concentration resulted in gradual decrease in $T\%_{\lambda 400-700}$ of the blend films. The contrasting findings, however, were observed for the other polysaccharides. For example, the high concentration of OSA increased the $T\%_{\lambda 400-700}$. In the case of MC-based films, the polysaccharide content had no clear effect on the $T\%_{\lambda 400-700}$; i.e. the GEL50/MC50 film blocked visible light more than the other MC-containing blend films. This result may be explained by the fact that GEL and MC formed the most incompatible system at 1:1

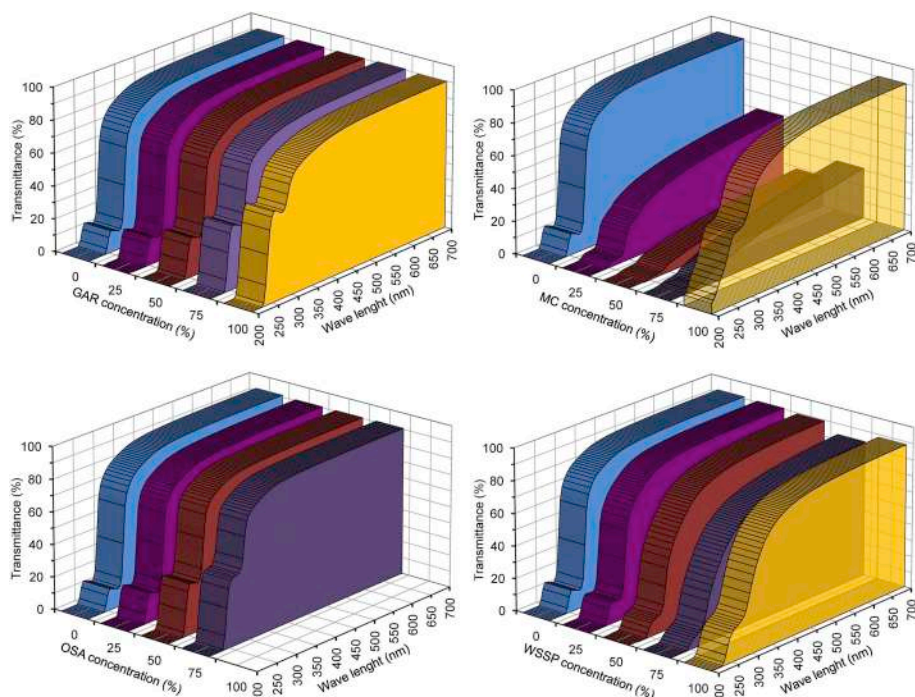


Fig. 7. Light transmission of the films obtained from gelatin (GEL), gum Arabic (GAR), methylcellulose (MC), octenyl succinic anhydride modified starch (OSA) and water soluble soy polysaccharides (WSSP).

mix ratio, i.e. the blend had the highest number of dispersed phase particles per unit area (Fig. 3). It is known that the optical properties of bioplastics are consequence of their morphology (Chen, 1995). In view of the above, the MC spheres embedded in the GEL matrix most likely scattered, reflected or absorbed light, therefore the blend films exhibited significantly lower $T\%_{\lambda,400-700}$ values as compared to the single-polymer films (Fig. 7). The higher $T\%_{\lambda,400-700}$ values of the GEL75/MC25 film, compared to the other MC-containing samples, might be related to the presence of smaller number of MC-rich droplets as well as to their large size (Fig. 3).

The increase in GAR and OSA concentration worsened the UV barrier properties (at $\lambda < 300$ nm) of the blend films (Fig. S1). The $T\%_{\lambda,200-300}$ values of the blend films with the medium (50%) and the highest (75%) MC and WSSP contents were lower than those of single-polymer (Fig. 7).

Among the single-polymer films, the GEL100 film exhibited the highest transparency (the lowest OP value), which is consistent with previous study (Kowalczyk & Biendl, 2016). No significant differences were found between the OP of GAR100 and WSSP100 film ($p > 0.05$). The MC100 film tended to be the most opaque among the single-polymer films (Table 2), most likely due to the presence of undissolved MC particles (Figs. 2 and 3). The OP of WSSP-based blend films increased gradually as the concentration of polysaccharide increased. It seems that the interactions between GEL and WSSP (Fig. 5) caused morphological heterogeneity of the films (Fig. 2), thus visible light scatter through the film, resulting in its opaqueness. In turn, the increasing level of GAR and OSA in the blend films did not affect the OP ($p > 0.05$). The MC-based blend films were the most opaque among all tested materials (the OP was $\sim 4\text{--}13$ times higher than the other blend systems) (Table 2). As mentioned before, it was a result of the thermodynamic incompatibility between GEL and MC.

3.8. Mechanical properties

The edible films can be processed to form pouches, bags, wraps, casing, etc., thus their adequate mechanical properties are essential feature influencing the usefulness in food industry. It can be seen from

the data in Table 3 that the TS, EM and PS values of GEL100 film were significantly higher than those observed for the pure polysaccharide films. Similar finding was also reported previously (Kowalczyk, 2016; Tedesco et al., 2016; Mohammadi et al., 2017). The excellent mechanical strength of GEL-based films is associated with a fibrillar three-dimensional network of GEL gels (Arvanitoyanni, 2002). It should be noted that relatively strong films were also obtained from MC; i.e. the TS of MC100 film was about 2.5 and 7 times higher than WSSP100 and GAR100 film, respectively. Like collagen in animals, the cellulose molecules provide TS to the plant cell wall. Numerous intermolecular H-bonds between adjacent cellulose molecules cause them to adhere strongly to one another, which results in formation of highly ordered crystalline aggregates (cellulose microfibrils) with high chemical and mechanical resistance (Alberts et al., 2002, pp. 1131–1204). The excellent mechanical strength of the GEL- and MC-based films could be explained partly in terms of their semi-crystalline structure (Fig. 6). It is known that the greater the crystallinity, the harder the polymer, or the greater the strength as compared to the totally amorphous structure. The reason is that the crystallinity reduces the degree of freedom for the molecular chains to move (Rubin, 1991).

The weakest mechanical resistance of the GAR100 film may be explained in terms of highly-branched character of the polymer (Montenegro et al., 2012; Musa, Ahmed, & Musa, 2018). The presence of side chains makes the polymers less dense, because short chains do not bridge from one longer backbone to another (Soutsos & Domone, 2017). For this reason it is generally stated that GAR forms the films with insufficient mechanical integrity, that flake rather than peel when removed from the casting surface (Nieto, 2009). This work, however, demonstrates that despite the relatively low elasticity (about 7-times lower than the GEL film), it is possible to obtain the GAR film in one piece by using the same methodology as for the other polymers.

As in the case of the GAR, the main sugar components in WSSP also have a branched structure (Nakamura, Furuta, Maeda, Nagamatsu, & Yoshimoto, 2001). SEM microphotographs of WSSP100 film revealed its non-homogenous structure (Fig. 2). As mentioned before, the complex composition of the polysaccharides can limit the cohesion force between the sugar fractions. Consequently, the less packed polymer

Table 3

Puncture strength (PS), tensile strength (TS), elongation at break (E) and elastic modulus (EM) of the films obtained from gelatin (GEL), gum Arabic (GAR), methylcellulose (MC), octenyl succinyl anhydride modified starch (OSA) and water soluble soy polysaccharides (WSSP).

GEL/polysaccharideblend ratio	PS (MPa)	TS (MPa)	E (%)	EM (MPa)
GEL100	10.91 ± 0.09 ^j	65.31 ± 1.75 ^l	8.55 ± 1.73 ^a	1335.32 ± 74.19 ^l
GEL75/GAR25	8.32 ± 0.68 ^h	45.81 ± 3.02 ^j	5.68 ± 1.0 ^a	1185 ± 124.89 ^k
GEL50/GAR50	5.51 ± 0.54 ^e	35.35 ± 2.95 ^h	8.62 ± 5.46 ^a	1005.65 ± 101.77 ^l
GEL25/GAR75	4.58 ± 0.27 ^c	23.71 ± 1.46 ^d	11.64 ± 3.95 ^{ab}	659.26 ± 44.58 ^e
GAR100	2.61 ± 0.20 ^a	4.60 ± 1.53 ^a	23.47 ± 6.71 ^{de}	196.43 ± 38.39 ^b
GEL75/MC25	7.67 ± 0.32 ^g	38.12 ± 2.05 ^j	19.13 ± 2.17 ^{cde}	952.47 ± 58.93 ^{ij}
GEL50/MC50	3.18 ± 0.35 ^b	24.34 ± 2.51 ^d	6.70 ± 2.44 ^a	706.94 ± 94.59 ^{ef}
GEL25/MC75	6.66 ± 0.32 ^f	30.90 ± 1.56 ^f	38.97 ± 4.55 ^f	772.31 ± 35.10 ^{fg}
MC100	8.69 ± 0.58 ^{hi}	33.39 ± 1.60 ^g	59.84 ± 5.20 ^g	819.60 ± 32.39 ^{gh}
GEL75/OSA25	9.01 ± 0.53 ⁱ	33.10 ± 2.55 ^g	17.44 ± 3.24 ^{bcd}	561.28 ± 31.07 ^d
GEL50/OSA50	4.83 ± 0.33 ^{cd}	15.69 ± 1.71 ^c	27.13 ± 5.42 ^c	187.67 ± 13.32 ^b
GEL25/OSA75	2.28 ± 0.15 ^a	4.50 ± 1.05 ^a	93.46 ± 29.04 ^h	26.84 ± 3.14 ^a
OSA100	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
GEL75/WSSP25	7.59 ± 0.73 ^g	48.18 ± 1.08 ^k	4.97 ± 0.84 ^a	992.81 ± 56.77 ^j
GEL50/WSSP50	6.26 ± 0.29 ^f	37.42 ± 2.34 ⁱ	7.17 ± 1.21 ^a	882.07 ± 70.72 ^{hi}
GEL25/WSSP75	5.51 ± 0.22 ^{de}	26.88 ± 1.72 ^e	11.82 ± 1.25 ^{abc}	533.55 ± 48.31 ^d
WSSP100	4.52 ± 0.39 ^c	12.67 ± 1.55 ^b	23.78 ± 3.77 ^{de}	332.86 ± 45.61 ^c

^{a-l} Values with the different superscript letters within one column are significantly different (P > 0.05).

n.a. – not analysed.

network with higher susceptibility to mechanical damage is formed.

The increasing level of GEL in the GAR-, OSA- and WSSP-based blend films resulted in a gradual improvement in the mechanical strength and stiffness (Table 3). As regards the MC blend films, the mechanical properties of films containing 50% and 75% of MC were significantly lower than the GEL75/MC25 and MC100 films. It is highly likely that the high level of incompatibility between GEL and MC observed at 1:1 mix ratio (Fig. 3) was responsible for the lowest values of the mechanical parameters of GEL50/MC50 film. In turn, the quite good mechanical performance observed for the GEL75/MC25 film could be explained in terms of dominant amount of GEL – the component with the superior mechanical strength.

Among the single-polymer samples, the MC film had the highest E value (59.84%) (Table 3), which could be partially related to the fact that this film had significantly higher WC than its counterparts (Table 2). As has been widely reported, water is very powerful plasticizer increasing flexibility of many biopolymers (Gurgel, Vieira, Altenhofen, Oliveira, & Beppu, 2011). The GEL100 film demonstrated the lowest elongation value (8.55%) probably due to adjacent polypeptide chains interactions resulting in a high cohesion. The GAR100 and WSSP100 films exhibited the identical E values (p > 0.05). It was found that, the E of the OSA-based films increased gradually with increasing polysaccharide concentration. In turn, the polysaccharide content did not affect the E of GAR- and WSSP-based films (p > 0.05). Apart from the GEL50/MC50 film, the incorporation of MC into GEL matrix improved the E. From Table 3, it can be seen that mixing of GEL with OSA at 1:3 ratio produced the film with the highest stretchability (93.46%). The observed result can be explained in part by the relatively high WC of this blend system (Table 2).

4. Conclusion

This study has identified that it is possible to obtain the GEL, GAR, OSA, MC and WSSP films by using the same solvent/casting evaporation methodology (polymer and plasticizer concentration, thickness, drying conditions). The pure OSA FFS formed non removable adhesive film (coating), while the pure GAR film was weak and easily breakable. These shortcomings, however, had been overcome by the blending process. GEL and MC as the semi-crystalline polymers offered better resistance to water vapor diffusion and higher mechanical strength compared to the other polymers. When GAR, MC and WSSP were partially replaced with GEL, the WVP of blend films was reduced. Moreover, because the pure GEL-based film exhibited the best

durability and stiffness, the gradual replacement of the polysaccharides (apart from MC) with GEL improved the mechanical strength and reduced stretchability of the films. This was particularly visible for the GAR-containing films. The GEL25/OSA75 film was the most stretchable material but its serious drawback was the recrystallization during storage. As a result of immiscibility between GEL and MC, their blend films were non-homogenous, opaque and susceptible to dissolution. The polymer incompatibility was the highest at mass ratio GEL:MC = 50:50. The two-phase structure did not favor interaction between GEL and MC. FTIR studies suggested that OSA and WSSP interact stronger with GEL than MC and GAR.

In summary, depending on the intended film application, the type of polysaccharide-based emulsifier and its content in the binary GEL-containing systems can be strictly adjusted in order to establish the best compromise between conflicting film property demands. Since this work was limited to a comparison of the properties of the GEL/polysaccharide blend films, further studies need to be carried out in order to validate whether the proposed binary materials could be used as effective fat-emulsifying polymer network systems or carriers of hydrophobic biologically active substances (e.g., fat-soluble vitamins, lipophilic antioxidants, essential oils, etc.) of varied origin.

Acknowledgements

This work was (partly) supported by the European Union through the European Regional Development Fund under the Operational Programme Development of Eastern Poland 2007–2013 (POPW.01.03.00-06-003/09-00).

Appendix A. Supplementary data

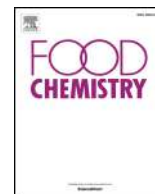
Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.05.053>.

References

- Aguirre-Álvarez, G., Foster, T., & Hill, S. (2012). Modelling of isotherms and their hysteresis analysis in gelatin from different sources. *CyTA - Journal of Food*, 11(1), 68–74.
- Ahmed, I., Bilal, M., Niazi, K., Hussain, A., & Jahan, Z. (2017). Influence of amphiphilic plasticizer on properties of thermoplastic starch films. *Polymer - Plastics Technology & Engineering*, 57(1), 17–27.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell* (4th ed.). New York: Garland Science (Chapter 19).
- Arvanitoyanni, I. S. (2002). Formation and properties of collagen and gelatin films and

- coatings. In A. Gennadios (Ed.). *A protein-based films and coatings* (pp. 275–304). New York: CRC Press.
- Asma, C., Meriem, E., Mahmoud, B., & Djafer, B. (2014). Physicochemical characterization of gelatin-cmc composite edibles films from polyion-complex hydrogels. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 59(1), 2279–2283.
- Aydin, F., Kahve, H. I., & Ardic, M. (2017). Lipid-based edible films. *The Journal of Scientific and Engineering Research*, 4(9), 86–92.
- Banga, A. K. (2006). *Therapeutic peptides and proteins: Formulation, processing, and delivery systems* (2nd ed.). CRC Press.
- Bashi, D., Shahidi Noghabi, M., Fazly Bazzaz, B. S., Shahabi-Ghahfarrokhi, I., Jafari, B., & Ahmadi, R. (2017). Eco-friendly soluble soybean polysaccharide/nanoclay Na⁺ bionanocomposite: Properties and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 169, 524–532.
- Bigi, A., Panzavolta, S., & Rubini, K. (2004). Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials*, 25, 5675–5680.
- Bouville, F., & Deville, S. (2014). Dispersion of boron nitride powders in aqueous suspensions with cellulose. *Journal of the American Ceramic Society*, 97, 394–398.
- Cecchini, J. P., Spotti, J., Piagentini, A. M., Milt, V. G., & Carrara, C. R. (2017). Development of edible films obtained from submicron emulsions based on whey protein concentrate, oil/beeswax and brea gum. *Food Science and Technology International*, 23(4), 371–381.
- Chen, H. (1995). Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 78(11), 2563–2583.
- Chen, W., Duizer, L., Corredig, M., & Goff, H. D. (2010). Addition of soluble soybean polysaccharides to dairy products as a source of dietary fiber. *Journal of Food Science*, 75(6), 478–484.
- Comunian, T. A., & Favaro-Trindade, C. S. (2016). Microencapsulation using biopolymers as an alternative to produce food enhanced with phytoosterols and omega-3 fatty acids: A review. *Food Hydrocolloids*, 61, 442–457.
- Daoub, R. M. A., Elmubarak, A. H., Misran, M., Hassan, E., & Osman, M. E. (2016). Characterization and functional properties of some natural acacia gums. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17, 241–249.
- Dickinson, E. (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 23(6), 1473–1482.
- Dłużewska, E., Panasiewicz, M., & Leszczyński, K. (2004). Effect of gum Arabic and modified starch on stability of beverage emulsions. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 7(2), 1–9.
- Esteghlal, S., Niakosari, M., Mohammad, S., Hosseini, H., Reza, G., & Hossein, G. (2016). Gelatin-hydroxypropyl methylcellulose water-in-water emulsions as a new bio-based packaging material. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 242–249.
- Galus, S. (2018). Functional properties of soy protein isolate edible films as affected by rapeseed oil concentration. *Food Hydrocolloids*, 85, 233–241.
- Gopi, S., Amalraj, A., Kalarikkal, N., Zhang, J., Thomas, S., & Guo, Q. (2018). Preparation and characterization of nanocomposite films based on gum Arabic, maltodextrin and polyethylene glycol reinforced with turmeric nanofiber isolated from turmeric spent. *Materials Science and Engineering: C*, 97, 723–729.
- Gullapalli, R. P., & Sheth, B. B. (1997). Effect of methylcellulose on the stability of oil-in-water emulsions: Influence of the disperse phase. *International Journal of Pharmaceutics*, 151, 249–253.
- Gurgel, M., Vieira, A., Altenhofen, M., Oliveira, L., & Beppu, M. M. (2011). Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *European Polymer Journal*, 47(3), 254–263.
- Han, J. H., & Floros, J. D. (1997). Casting antimicrobial packaging films and measuring their physical properties and antimicrobial activity. *Journal of Plastic Film and Sheeting*, 13(4), 287–298.
- Hu, H., Liu, W., Shi, J., Huang, Z., Zhang, Y., Huang, A., et al. (2015). Structure and functional properties of octenyl succinic anhydride modified starch prepared by a non-conventional technology. *Starch - Stärke*, 68, 151–159.
- Jenkins, M., & Stamboulis, A. (2012). *Durability and reliability of medical polymers*. Cambridge: Elsevier Science.
- Kirk, R. E., Othmer, D. F., & Seidel, A. (2008). Gelatin. In R. E. Kirk, D. F. Othmer, & A. Seidel (Vol. Eds.), *Kirk-othmer food and feed Technology: 2 volume set: Vol. 1*, (pp. 856–865). Hoboken, NJ: John Wiley and Sons Ltd.
- Kizil, R., Irudayaraj, J., & Seetharaman, K. (2002). Characterization of irradiated starches by using FT-Raman and FTIR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3912–3918.
- Klein, M., Aserin, A., Ishai, P. B., & Garti, N. (2010). Interactions between whey protein isolate and gum Arabic. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79, 377–383.
- Kowalczyk, D. (2016). Biopolymer/candelilla wax emulsion films as carriers of ascorbic acid – a comparative study. *Food Hydrocolloids*, 52, 543–553.
- Kowalczyk, D., & Baraniak, B. (2014). Effect of candelilla wax on functional properties of biopolymer emulsion films – a comparative study. *Food Hydrocolloids*, 41, 195–209.
- Kowalczyk, D., & Biendl, M. (2016). Physicochemical and antioxidant properties of biopolymer/candelilla wax emulsion films containing hop extract - a comparative study. *Food Hydrocolloids*, 60, 384–392.
- Kowalczyk, D., Kordowska-Wiater, M., Nowak, J., & Baraniak, B. (2015). Characterization of films based on chitosan lactate and its blends with oxidized starch and gelatin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 77, 350–359.
- Layek, R. K., Ramakrishnan, K. R., Sarlin, E., Orell, O., Kanerva, M., Vuorinen, J., et al. (2018). Layered structure graphene oxide/methylcellulose composites with enhanced mechanical and gas barrier properties. *Journal of Materials Chemistry*, 6(27), 13203–13214.
- Lin, Q., Liang, R., Zhong, F., Ye, A., & Singh, H. (2018). Effect of degree of octenyl succinic anhydride (OSA) substitution on the digestion of emulsions and the bioaccessibility of β -carotene in OSA-modified-starch-stabilized-emulsions. *Food Hydrocolloids*, 84, 303–312.
- Liu, Z., Liu, X., Cao, Y., Xie, W., Ma, X., & Yu, X. (2013). Edible starch sodium octenyl succinate film formation and its physical properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 127, 2922–2927.
- Li, Y., Xu, X., Meng, Y., Chen, J., Wang, W., & Qiu, R. (2015). Interaction between casein and soybean soluble polysaccharide during acidification. *Journal of Food Science & Technology*, 9(7), 514–518.
- Lv, Y., Zhang, X., Zhang, H., Abbas, S., & Eric, K. (2013). The study of pH-dependent complexation between gelatin and gum Arabic by morphology evolution and conformational transition. *Food Hydrocolloids*, 30, 323–332.
- Mohammadi, R., Mohammadifar, M. A., Rouhi, M., Kariminejad, M., Mortazavian, A. M., Sadeghi, E., et al. (2017). Physico-mechanical and structural properties of eggshell membrane gelatin-chitosan blend edible film. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 406–412.
- Montenegro, M. A., Boiero, L., Valle, L., & Borsarelli, C. (2012). Gum Arabic: More than an edible emulsifier. In C. J. R. Verbeek (Ed.). *Products and applications of biopolymers* (pp. 3–26). Croatia: Intech.
- Musa, H., Ahmed, A., & Musa, T. (2018). Chemistry, biological, and pharmacological properties of gum Arabic. In J. Mérillon, & K. G. Ramawat (Eds.). *Bioactive molecules in food*. Cham: Springer.
- Nadour, M., Daoud, F., Ouradi, A., & Benaboura, A. (2017). Effects of methylcellulose on the properties and morphology of polysulfone membranes prepared by phase inversion. *Materials Research*, 20.
- Nakamura, A., Furuta, H., Maeda, H., Nagamatsu, Y., & Yoshimoto, A. (2001). Analysis of structural components and molecular construction of soybean soluble polysaccharides by stepwise enzymatic degradation. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 65(10), 2249–2258.
- Nakamura, A., Yoshida, R., Maeda, H., & Corredig, M. (2006). Soy soluble polysaccharide stabilization at oil-water interfaces. *Food Hydrocolloids*, 20, 277–283.
- Nasatto, P. L., Pignoni, F., Silveira, J., Duarte, M. E., Noseda, M., & Rinaudo, M. (2015). Methylcellulose, a cellulose derivative with original physical properties and extended applications. *Polymers*, 7, 777–803.
- Nemazifard, M., Kavousi, G., Marzban, Z., & Ezedi, N. (2017). Physical, mechanical, water binding, and antioxidant properties of cellulose dispersions and cellulose film incorporated with pomegranate seed extract. *International Journal of Food Properties*, 20, 1501–1514.
- Nieto, M. B. (2009). Structure and function of polysaccharide gum-based edible films and coatings. In K. C. Huber, & M. E. Embuscado (Eds.). *Edible films and coatings for food applications* (pp. 57–112). Springer Nature.
- Nur Hanani, A. Z., Beatty, E., Roos, Y., Morris, M., & Kerry, J. (2013). Development and characterization of biodegradable composite films based on gelatin derived from beef, pork and fish sources. *Food*, 2, 1–17.
- Oliveira, R. L., Vieira, J. G., Barud, H. S., Assunção, R. M. N., Filho, G. R., Ribeiro, S. J. L., et al. (2015). Synthesis and characterization of methylcellulose produced from bacterial cellulose under heterogeneous condition. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 26(9), 1861–1870.
- Patino, J. M. R., & Pilosof, A. M. R. (2011). Proteine-polysaccharide interactions at fluid interfaces. *Food Hydrocolloids*, 25, 1925–1937.
- Rangelova, N., Radev, L., Nenkova, S., Salvado, I. M. M., Fernandes, M. H. V., & Herzog, M. (2011). Methylcellulose/SiO₂ hybrids: Sol-gel preparation and characterization by XRD, FTIR and AFM. *Central European Journal of Chemistry*, 9(1), 112–118.
- Romano, N., & Gómez-Zavaglia, A. (2014). Edible methylcellulose-based films containing fructo-oligosaccharides as vehicles for lactic acid bacteria. *Food Research International*, 64, 560–566.
- Rubin, I. I. (1991). Injection molding of thermoplastics. In M. L. Berings (Ed.). *SPI plastics engineering handbook of the society of the plastics industry, Inc* (pp. 133–178). Springer International Publishing.
- Santos, A. E. F., Bastos, D. C., Silva, M. L. V. J., Thiré, R. M. S. M., & Simão, R. A. (2012). Chemical analysis of a cornstarch film surface modified by SF₆ plasma treatment. *Carbohydrate Polymers*, 87(3), 2217–2222.
- Sarika, P. R., & James, N. R. (2015). Preparation and characterisation of gelatin-gum Arabic aldehyde nanogels via inverse miniemulsion technique. *International Journal of Biological Macromolecules*, 76, 1–7.
- Semenova, M. G., Moiseenko, D. V., Grigorovich, N. V., Anokhina, M. S., Antipova, A. S., Belyakova, L. E., et al. (2014). Protein and polysaccharide interactions and digestion of the complex particles. *Food Structures, Digestion and Health*, 6, 169–192.
- Shaddel, R., Hesari, J., Azadmard-Damirchi, S., Hamishehkar, H., Fathi Achachlouei, B., & Huang, Q. (2017). Use of gelatin and gum Arabic for encapsulation of black raspberry anthocyanins by complex coacervation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 1800–1810.
- Soliman, E. A., & Furuta, M. (2014). Influence of phase behavior and miscibility on mechanical, thermal and micro-structure of soluble starch-gelatin thermoplastic biodegradable blend films. *Food and Nutrition Sciences*, 5, 1040–1055.
- Soutsos, M., & Domone, P. (2017). *Construction materials: Their nature and behaviour* (5th ed.). New York: CRC Press.
- Staroszczyk, H., Sztuka, K., Wolska, J., Wojtasz-Pająk, A., & Kolodziejka, I. (2014). Interactions of fish gelatin and chitosan in uncrosslinked and crosslinked with EDC films: FT-IR study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 3, 707–712.
- Tedesco, M. P., Monaco-lourenço, C. A., & Carvalho, R. A. (2016). Gelatin/hydroxypropyl methylcellulose matrices - polymer interactions approach for oral disintegrating films. *Materials Science and Engineering: C*, 69, 668–674.
- Thirumala, S., Gimble, J. M., & Devireddy, R. V. (2013). Methylcellulose based thermally reversible hydrogel system for tissue engineering applications. *Cells*, 2(3), 460–475.
- Tran, T. (2011). Stabilization of oil-in-water emulsions by soy protein and soy soluble polysaccharide interactions. *Molecular science*. Toronto: Ryerson University.
- Turhan, K., Sahbaz, F., & Güner, A. (2001). A Spectrophotometric study of hydrogen

- bonding in methylcellulose-based edible films plasticized by polyethylene glycol. *Journal of Food Science*, 66, 59–62.
- Wang, K., Wang, W., Ye, R., Xiao, J., & Liu, Y. (2017). Mechanical and barrier properties of maize starch-gelatin composite film: Effects of amylose content. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 11, 3613–3622.
- Wu, B., & McClements, D. (2015). Microgels formed by electrostatic complexation of gelatin and OSA starch: Potential fat or starch mimetics. *Food Hydrocolloids*, 47, 87–93.
- Xu, M., Wei, L., Xiao, Y., Bi, H., & Yang, H. (2017). Physicochemical and functional properties of gelatin extracted from Yak skin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 1246–1253.
- Yakimets, I., Paes, S. S., Wellner, N., Smith, A. C., Wilson, R. H., & Mitchell, J. (2007). Effect of water content on the structural reorganization and elastic properties of biopolymer films: A comparative study. *Biomacromolecules*, 8, 1710–1722.
- Yang, Y., Anvari, M., Pan, C. H., & Chung, D. (2012). Characterisation of interactions between fish gelatin and gum Arabic in aqueous solutions. *Food Chemistry*, 135, 555–561.
- Zhang, B., Huang, Q., Luo, F., Fu, X., Jiang, H., & Jane, J. L. (2011). Effects of octenylsuccinylation on the structure and properties of high-amylose maize starch. *Carbohydrate Polymers*, 84, 1276–1281.
- Zhang, Y., Simpson, B. K., & Dumont, M. (2018). Effect of beeswax and carnauba wax addition on properties of gelatin films: A comparative study. *Food Bioscience*, 26, 88–95.
- Łopusiewicz, Ł., Jędra, F., & Bartkowiak, A. (2018). New active packaging films made from gelatin modified with fungal melanin. *World Scientific News An International Scientific Journal*, 101, 1–30.



Polysaccharide/gelatin blend films as carriers of ascorbyl palmitate – A comparative study



Katarzyna Łupina^a, Dariusz Kowalczyk^{a,*}, Emilia Drożdżowska^b

^a Department of Biochemistry and Food Chemistry, Faculty of Food Sciences and Biotechnology, University of Life Sciences in Lublin, Skromna 8, 20-704 Lublin, Poland

^b Center of Bioimmobilisation and Innovative Packaging Materials, Faculty of Food Sciences and Fisheries, West Pomeranian University of Technology, Klemensa Janickiego 35, 71-270 Szczecin, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Ascorbyl palmitate
Edible films
Controlled release
Gum Arabic
Octenyl succinic anhydride modified starch
Water soluble soy polysaccharides

ABSTRACT

The comparative study was performed in order to assess the most suitable matrix polymer for ascorbyl palmitate (AP). The antioxidant (1 and 2% w/w) was loaded into the 75/25 blend films based on polysaccharides (gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride modified starch (OSA), water soluble soy polysaccharides (WSSP)) and gelatin (GEL). The AP was present in the films both in the form of longitudinal crystals and microglobules. Because of amphiphilic character, the AP had the moisturizing action on the films; however, its addition reduced film solubility in water. AP did not affect the water vapor permeability and tensile strength of the OSA-based carrier. The Makoid-Banakar with T_{lag} model was suitable for the efficient simulation of AP release from the films. The OSA-based system offered the fastest release of AP and, consequently, had the best initial antiradical activity. The 1%AP-added GAR75/GEL25 film provided the most extended release of antioxidant capacity.

1. Introduction

In recent years, the concept of controlled release has attracted growing interest in terms of its use in the production of emitters – a group of modern active packaging whose task is to extend the shelf life or to preserve and improve the quality of food. Since many food products contain oxylabile compounds, the active antioxidant materials are one of the most important innovations of packaging technologies. The design of carrier material should enable releasing the active substance continuously and uniformly throughout the entire storage period, maintaining an effective concentration of the active ingredient on the surface of the packaged food, where the spoilage reactions run most intensively. The effectiveness of active packaging depends on the ability of an active substance to penetrate to or to stay in the reaction site. Both polar and non-polar antioxidants have predispositions to accumulate at the oil/air or O/W interfaces. These interfaces are in fact the sites where contact between the substrate and oxygen is facilitated. According to the theory of the so-called polar paradox, hydrophilic antioxidants are more effective in the less polar phase (e.g. oil, lard), whereas lipophilic compounds exhibit higher activity in the more polar phase (e.g. O/W emulsions, liposomes, biological membranes, tissues) (Laguerré et al., 2015). Furthermore, it can be assumed that in water-containing products, the polar antioxidants incorporated in films/coating may diffuse too readily into the aqueous phase, which in turn may lead to a decline in their effective concentration at the oil/air interface. Non-polar active

substances could improve the water vapor barrier properties of packaging materials. Therefore, non-polar antioxidants can be a potentially more beneficial component of active packaging systems, than the polar ones.

Ascorbyl palmitate (AP) is a fatty acid ester of ascorbic acid (AA) often used as a strong antioxidant in fat-containing foods, e.g. flavoured fermented milk products, dehydrated milk, creams, cheese products, fats and oils, spreads and emulsions, nut butters and nut spreads (EFSA, 2015a). AP can be used as additive (E304(i)) mostly according to *quantum satis* except for foods for infants and young children. It is generally recognized as safe for human consumption and can be used legally as a human dietary supplement (CFR, 2020). According to the European Food Safety Authority (EFSA) Panel the available toxicological data are too limited to establish an ADI for AP, but there is no safety concern for its use at the reported uses and use levels (exposure estimates based on the high percentile for the maximum level exposure scenario range from 0.4 to 10.8 mg/kg body weight (bw)/day across all population groups). The presence of AP in oral supplements contributes to the AA content and helps protect fat-soluble antioxidants in the supplement. In the human digestive tract, the AP is fully hydrolyzed in the hepatic portal plasma and/or liver to AA and its respective fatty acid (EFSA, 2015a). Compared to water-soluble AA, AP is more stable (the esterification reduces the hydrolysis of AA) (Austria, Semenzato, & Bettero, 1997) and may be less easily lost in the urine. It could be assumed, the use of AP as a component of edible packaging would not

* Corresponding author.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127465>

Received 14 March 2020; Received in revised form 4 June 2020; Accepted 28 June 2020

Available online 04 July 2020

0308-8146/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

only improve food quality but also the vitamin C nutriture of consumers (Johnston et al., 1994). Recently, AP has attracted extensive interest as an anticancer compound because of its lipophilic nature (Zhou et al., 2017).

Because of hydrophobic character of AP, the obtaining of stable emulsion is extremely difficult and requires addition of emulsifiers (e.g. Tween) (López-Martínez & Rocha-Urbe, 2017) and/or ethanol as a cosolvent (Han, Hwang, Min, & Krochta, 2008). Gelatin (GEL) is a surface-active protein that is capable of acting as an emulsifier. Moreover, because of excellent gelling properties, GEL can be used to prepare emulsions that are physically stable (Kowalczyk & Baraniak, 2014). Nevertheless, when used on its own GEL often produces relatively large droplet sizes during homogenization, so it has to be used in conjunction with other surfactants to improve its effectiveness as an emulsifier (Totre, Ickowicz, & Domb, 2011). The certain types of polysaccharides, such as gum Arabic (GAR), starch modified with octenyl succinic anhydride (OSA), and water soluble soy polysaccharides (WSSP) are commonly used as effective emulsifiers. A recent study by Lupina et al. (2019) suggests that the edible films based on the blends of GEL and the above mentioned polysaccharides could be used as effective emulsifying polymer network systems and carriers for hydrophobic biologically active substances. Combination of GEL with other polymers affects the release of active compounds. A high concentration of GEL in the carrier can significantly limit the diffusion mobility of the polymer-embedded substance (Kanth et al., 2017; Kowalczyk et al., 2020), which is not desirable since oxidation reactions on the food surface may start if the release of the antioxidant from the packaging film is too slow. Therefore, the aim of the present study was to assess the functional properties of edible 75/25 blend films based on polysaccharides (GAR, OSA, WSSP) and GEL incorporated with increasing AP contents (1% and 2%). Microstructure, water affinity, optical and mechanical properties, as well as AP release profiles and antioxidant activities of the films were investigated and compared.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Pork GEL (bloom strength of 240; McCormick-Kamis, Poland), GAR Agri-Spray Acacia R (Agrigum International, United Kingdom), starch sodium octenylsuccinate PurityGum®2000 (Ingredion, Germany), and WSSP (Gushen Biological Technology Group Co., China) were used in this study. AP, glycerol, Tween 80, and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) were purchased from Sigma Chemical (USA), while ethanol (99.8%) and methanol (99.8%) were purchased from POCH (Poland).

2.2. Film preparation

Films were obtained from aqueous-ethanolic solutions (20%) containing polysaccharide/GEL blend (10% w/w), glycerol (1% w/w), Tween 80 (0.25% w/w) and AP (1 and 2% w/w). Powder blends of polysaccharide (GAR, OSA, or WSSP) with GEL at the ratio of 75/25 were mixed with water and glycerol, then heated in a water bath at 90 °C for 30 min with constant stirring. AP/Tween 80 ethanolic solution was added to the cooled (~40 °C) film-forming solutions (FFSs). Afterward, the FFSs were emulsified with a homogenizer (H-500, Pol-Eko Aparatura, Poland) at 20,000 rpm for 60 s; then, at 14,000 rpm for 40 s. The AP-free aqueous-ethanolic FFSs containing biopolymers, plasticizer, and Tween 80 served as the controls. The freshly prepared and degassed FFSs were cast on the polycarbonate trays with the area of 144 and 4 cm², depending on the test. A constant amount total solids (0.0125g/cm²) was cast onto the tray area in order to maintain film thickness. Therefore, with the increase in AP content, the amounts of FFSs cast onto the trays were gradually reduced; i.e. were 15.62, 14.40, and 13.33 g/144 cm² for the AP-free, AP1%, and AP2% films, respectively. The FFSs were dried at 25 ± 2 °C and 50 ± 5% relative

humidity (RH) for 24 h. The films were peeled from the trays and cut prior to the testing.

2.3. Film thickness and conditioning

Before conditioning (50% RH, 25 °C, 48 h) in a test chamber (MLR-350, Sanyo Electric Biomedical Co. Ltd., Japan), the thickness of the film specimens was determined using a micrometer (Mitutoyo No. 7327, Tokyo, Japan).

2.4. pH

A glass electrode (Elmetron ERH-11S, Poland) connected to a pH meter (Elmetron CPC 401, Poland) was used for pH measurement of the FFSs at 40 °C.

2.5. Microscopy

The FFSs and films were observed using an Olympus Microscope CKX53. The surface of the films was also examined using a scanning electron microscope (Tescan Vega Imu, Czech Republic).

2.6. Contact angle (CA)

A droplet of distilled water was deposited on the film surface. The measurements of CA were carried out on the “air-side” of the films using a goniometer (Phoenix Mini, Surface Electro Optics, Gyeonggi-do, Korea).

2.7. Moisture content (MC) and total soluble matter (TSM)

Film specimens (4 cm²) were dried in an oven at 105 °C for 24 h. The MC was calculated as the percentage of water removed from the system. The TSM was expressed as the percentage of film dry matter solubilized after 24 h immersion in water. Film specimens were shaken in 30 ml of distilled water at 25 ± 1 °C for 24 h, then the undissolved film residues were removed from the water and dried at 105 °C for 24 h to determine the solubilized dry matter. Initial dry matter values needed for TSM calculations were obtained from MC measurements. Analyses were performed in triplicate.

2.8. Water vapor permeability (WVP)

The WVP (g mm m⁻² d⁻¹ kPa⁻¹) was calculated as:

$$WVP = (WVTR \times L) / \Delta p \quad (1)$$

where WVTR is the water vapor transmission rate of the film (g m⁻² d⁻¹) determined gravimetrically based on ISO 2528 (1995) method, L is the mean of film thickness (mm), Δp is the water vapor pressure difference (kPa) between two sides of the film.

The permeation cell (poly(methyl methacrylate)) cups had an internal diameter of 7.98 cm (exposed film area = 50 cm²) and an internal depth of 2 cm. Distilled water (30 ml) was added into each test cup and film samples were placed over the circular opening and secured by a screw top. The cups were placed in the test chamber set at 25 °C and 50% RH. The weight loss from the cups with 3 replicates was monitored for 10 h period with weights recorded at 2 h intervals.

2.9. Optical parameters

Color values of the films were measured with a colorimeter (NH310, 3nh, China) on the white background ($L^* = 94.83$, $a^* = 0.72$, $b^* = -9.89$). The light transmission (T%) of films was measured using a spectrophotometer (Lambda 40, Perkin-Elmer, Shelton, CT, USA) at selected wavelengths between 200 and 700 nm. The opacity of the films was calculated by Eq. (2):

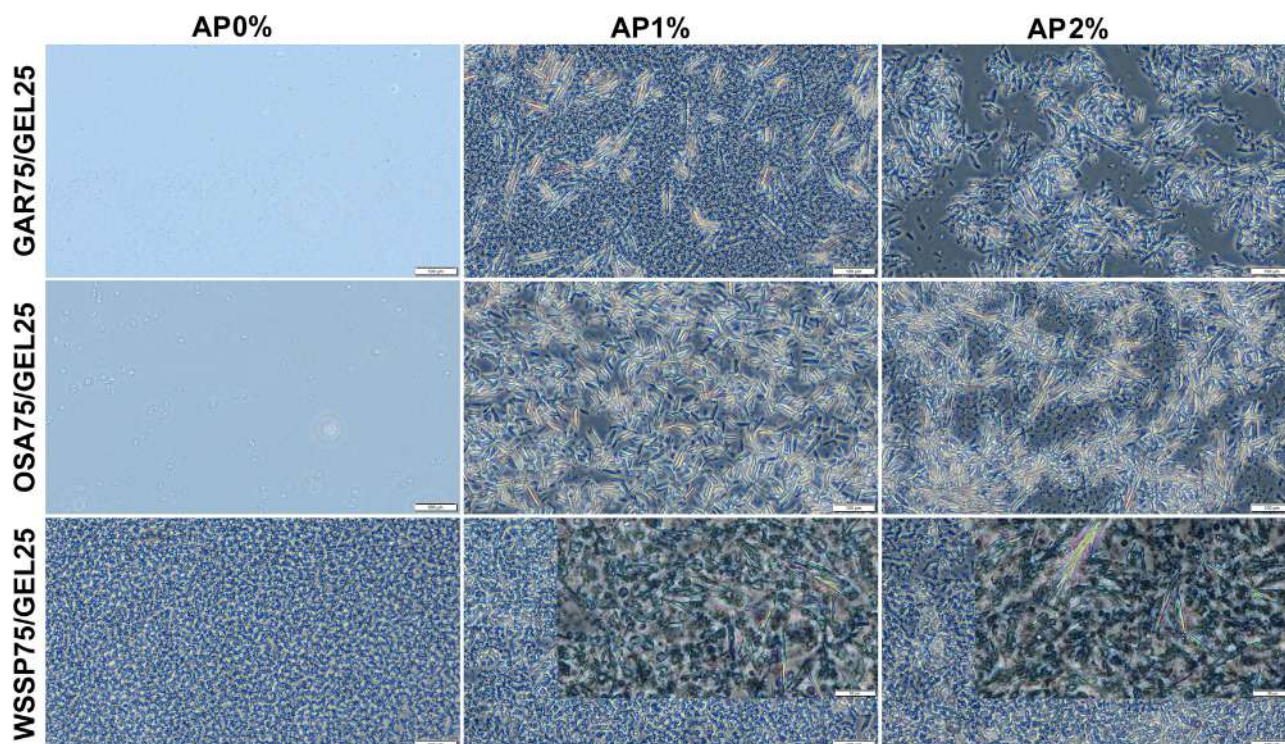


Fig. 1. Images of the AP-free and AP-added 75/25 blend film-forming solutions based on polysaccharides (GAR, OSA, WSSP) and gelatin (GEL) examined using a light microscope.

$$\text{Opacity} = A_{600}/x \quad (2)$$

where A_{600} is the absorbance at 600 nm and x is the film thickness (mm). The optical analyses were performed in fivefold.

2.10. Mechanical properties

The mechanical properties of films were evaluated using a TA-XT2i texture analyzer equipped with a 50 kg load cell (Stable Micro Systems, UK). The initial grip separation was set to 30 mm, and the film samples (2×5 cm) were stretched at speed of 1 mm s^{-1} . At least eight replicates of each film type were analyzed. Tensile strength (TS, MPa), elongation at break (E, %), and elastic modulus (EM, MPa) were calculated by Eqs. (3), (4), and (5), respectively:

$$\text{TS} = F_{\text{max}}/A \quad (3)$$

where F_{max} is the maximum load for breaking film (N) and A is the initial specimen cross-sectional area (thickness \times width, mm^2).

$$E = (\Delta L/L) \times 100 \quad (4)$$

where L is the initial gage length (mm) and ΔL is the difference in the length at the moment of fracture.

$$\text{EM} = (\sigma_2 - \sigma_1)/(\varepsilon_2 - \varepsilon_1) \quad (5)$$

where ε_1 is a strain of 0.02 (0.067%), ε_2 is a strain of 0.14 (0.47%), σ_1 (MPa) is the stress at ε_1 , and σ_2 (MPa) is the stress at ε_2 .

2.11. Release of AP from the films

The film samples (4 cm^2) were immersed in 50 ml of ethanol and mixed using a magnetic stirrer (100 rpm). The release media samples (250 μl) were taken at different time points and the absorbance was read at 247 nm using a microplate spectrophotometer (EPOCH 2 Microplate Spectrophotometer, BioTek, USA). DDSolver: an add-in software for Microsoft Excel was used for modeling of AP release kinetics. Several mathematical models were chosen to fit the data. Since

the models taken for comparison (Table S1) have different numbers of parameters, the Akaike Information Criterion (AIC) was used for selecting optimal model. On the basis of the best-fitted model, the quarter- and half-release time values ($t_{25\%}$ and $t_{50\%}$) were calculated. Additionally, the adjusted coefficient of determination (R_{adjusted}^2) values were determined in order to present an accuracy of the $t_{25\%}$ and $t_{50\%}$ measurements (Zhang et al., 2010).

2.12. Antioxidant properties

The film discs (4 cm^2) were thrown into 50 ml of the $282 \mu\text{M}$ methanolic solution of DPPH at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ and mixed using a magnetic stirrer (100 rpm). The absorbance of acceptor solution was monitored as a function of time using a set of flow-through curette with a peristaltic sipper ("PESI" B2190036, Perkin-Elmer, USA) connected to the spectrophotometer at a flow rate of 120 min^{-1} . The absorbance at 517 nm was measured until the reaction reached a plateau. The affinity of films to quench DPPH free radicals was calculated by Eq. (6).

$$\text{Scavenging\%} = [1 - (\text{Abs}/\text{Abs}_{\text{DPPH}})] \times 100 \quad (6)$$

where Abs is the absorbance of sample and Abs_{DPPH} is the absorbance of the solution of DPPH (2.70 ± 0.05). The tests were performed in triplicate. Mathematical modeling of kinetics of released antiradical activity was conducted as described in Section 2.11.

2.13. Statistical analysis

Differences among data mean values were tested for statistical significance at the $p < 0.05$ level using analysis of variance (STATISTICA 6.0, StatSoft Inc., Tulsa, USA) and the Fisher's test.

3. Results and discussion

3.1. Microstructure

Microscopic imaging showed that the GAR- and OSA-based FFSs were relatively homogenous (Fig. 1), indicating good solubility of the polymers in the water–ethanol mixture. In turn, the FFSs containing WSSP showed the grainy structure, which reveals the limited solubility of the WSSP and confirms the globular nature of soy polysaccharides in solution (Wang, Huang, Nakamura, Burchard, & Hallett, 2005). The AP was present in the emulsions both in the form of longitudinal crystals and microglobules. Interestingly, the AP formed the biggest spheroidal particles ($d_{\max} = 17 \mu\text{m}$) in the WSSP-based emulsions. The length (l) of AP crystals formed in the FFSs was greater ($l_{\max} \approx 82\text{--}174 \mu\text{m}$) than in the powder ($l_{\max} \approx 76 \mu\text{m}$) (Fig. S1), which may be explained by the fact that the presence of hydrocolloids significantly modify the nucleation and crystal habit (Goto, Oaki, & Imai, 2016). The longest crystals were observed in the AP1%-added GAR-based emulsion ($l_{\max} \approx 174 \mu\text{m}$, Fig. 1). The l_{\max} of AP crystals in the WSSP- and OSA-based FFSs was comparable (≈ 90 and $82 \mu\text{m}$, respectively). It was found, that the doubling level of AP in the GAR- and OSA-based FFSs resulted in the formation of crystal aggregates (Fig. 1). This result was hardly noticeable for the WSSP-based system, likely due to the fact that the polysaccharide particles screened the AP fraction.

The surfaces of AP-free OSA- and WSSP-based films were rough, while the GAR-based film was smooth and uniform (Fig. 2). Since OSA is insoluble in ethanol (EFSA, 2017b), it can be assumed that partial precipitation of the polysaccharide (Fig. 1) was responsible for the uneven surface of the OSA75/GEL25 film. The comparison of the FFS and film images (Fig. 1 and S2) suggests that the prolonged contact time (during drying of FFS) between OSA and water–ethanol mixture resulted in formation of polymer aggregates. The uneven surface of the control WSSP75/GEL25 film can be explained in terms of lack of complete dissolution of the polysaccharide (Fig. 1). As can be seen in Fig. S2, the above-mentioned film is agglomerate of the polysaccharide particles linked by GEL into the form of a continuous matrix.

The AP-added films were more heterogeneous as compared to the controls (Fig. 2). Interestingly, the longitudinal AP crystals were observed only on the surface of the OSA-based films. It may indirectly indicate that the OSA75/GEL25 emulsion system had the best stability. Regarding the GAR- and WSSP-based systems, it is possible that the AP crystals underwent sedimentation and, consequently were located inside the matrix (Fig. S2). Also, microscopic observations suggest that the incorporation of AP at 2% resulted in more intense flocculation and sedimentation, thus the AP microglobules were less visible on the film's surface as compared to the surface of 1%AP-added samples (Fig. 2). The explanation for the irregular AP structures observed in the films (Fig. S2) might be that the individual microglobules and crystals (Fig. 1) were linked into the conglomerates due to strong cohesion forces appearing during drying of the emulsions. A noteworthy is fact that the topography of 1%AP-added WSSP75/GEL25 film was the most granular among all samples (Fig. 2). It is difficult to explain this result, but it may be an indicator of the tendency for phase separation by the creaming of the emulsion.

3.2. pH, MC, TSM, and WVP

Among the control FFSs, the highest pH was reported for the GAR-based system, while the lowest for the WSSP-based FFS (Table 1). The incorporation of AP significantly decreased the pH of FFSs. It indicates that despite its esterified form, the AA still has the ability to acidification of the medium, which could negatively affect taste of the food, but on the other hand it can be considered as a positive aspect from a microbial point of view. On account of the fact that only 42% of the molecular mass of AP corresponds to the AA, the decreases in the pH values were relatively low as compared to the previous works on the

AA-added films (Kowalczyk, 2016; Kowalczyk et al., 2018). Apart from the OSA-based FFS, an increase in the concentration of AP led to a decrease in the pH of FFS ($p < 0.05$). The OSA-containing carrier, likely due to the presence of sodium ions, tended to be the least sensitive to the AP-induced decrease in pH.

Because of the amphiphilic nature of AP its addition significantly increased the MC of the films (Table 1). As the hydrophilic regions of the ester could easily absorb moisture (Benedini et al., 2011), the doubling level of antioxidant resulted in a further increase in the MC. In accordance with the present results, the previous studies have also demonstrated the increased hygroscopicity of the AA-added films (Kowalczyk, 2016; Kowalczyk et al., 2018). The OSA-based films tended to have the highest MC, which agrees with data from earlier study (Lupina et al., 2019).

The TSM values of the control films were much lower (Table 1) than reported previously (Lupina et al., 2019), which may be easily explained in terms of higher concentration of the polymers in FFS (10% vs. 5%). It can be assumed, that on doubling the amount of polymers, the greater number of the non-covalent associations was formed between the polymer chains, which improved the cohesion of the film network.

It was found that the OSA-based films had significantly lower TSM as compared to the other carriers. This result might be related to the presence of linear component (amylose) in the starch derivative. It can be generalized that any polysaccharide structure that promotes intermolecular association (such as linear chains, large molecular weight, and other regular structural characteristics) results in poor solubility; on the other hand, structural characteristics that hinder intermolecular interactions (such as branching or charged groups) usually leads to higher solubility. In the light of the microstructural features (Fig. 2), the high TSM of WSSP-based films could be attributed to the conglomerated structure and, consequently, low cohesive strength that promoted the dissolution.

The measurement of CA of the films revealed that their wetting was very favorable ($\theta < 90^\circ$, Table 1). The addition of AP tended to increase the surface hydrophobicity of the films; however, the statistically significant changes were observed only for the GAR75/GEL25 film at the 2% level of incorporation. Nevertheless, the presence of AP reduced ($p < 0.05$) the TSM of all films (Table 1). This result reflects that of Nor Amalini et al. (2018) who found that palmitic acid sucrose ester (PASE) significantly reduced solubility of GEL films. According to these authors the PASE addition reduces the exposure of polar polymer groups for interaction with water due to the formation of the polymer-PASE network. Meanwhile, the non-polar tails of the esters increased film hydrophobicity thus reducing the film solubility. It was found that the AP was the most effective in reduction (by $\sim 12\%$) of TSM of the WSSP-based films (Table 1).

As illustrated in Table 1, among the control samples, the OSA-based film exhibited the lowest WVP ($p < 0.05$). This result reflects findings of the previous study (Lupina et al., 2019). The differences in WVP likely reflect the differences in the structure and composition of the polysaccharides. Starch (a polymer of glucose) is a mixture of two fractions: linear amylose (10–20%) and branched amylopectin (80–90%). In turn, both GAR and WSSP are mixtures of various polysaccharides; i.e. GAR consists mainly of high molecular weight branched polysaccharides made of arabinose, galactose, rhamnose, and glucuronic acid (Williams & Phillips, 2009), while WSSP backbone consists long-chain rhamnogalacturonan and short-chain homogalacturonan, as well as side chains of β -1,4-galactans, branched with fucose and arabinose residues, and α -1,3- or 1,5-arabinans that are linked to the C-4 side of rhamnose residues in the rhamnogalacturonan (Maeda & Nakamura, 2009). It could be speculated, that the complex composition of the heteropolysaccharides resulted in weaker cohesion forces between its constituents and, consequently, the films were more permeable to water vapor compared to the homopolysaccharide-based matrix. Another possible explanation for the relatively low values of

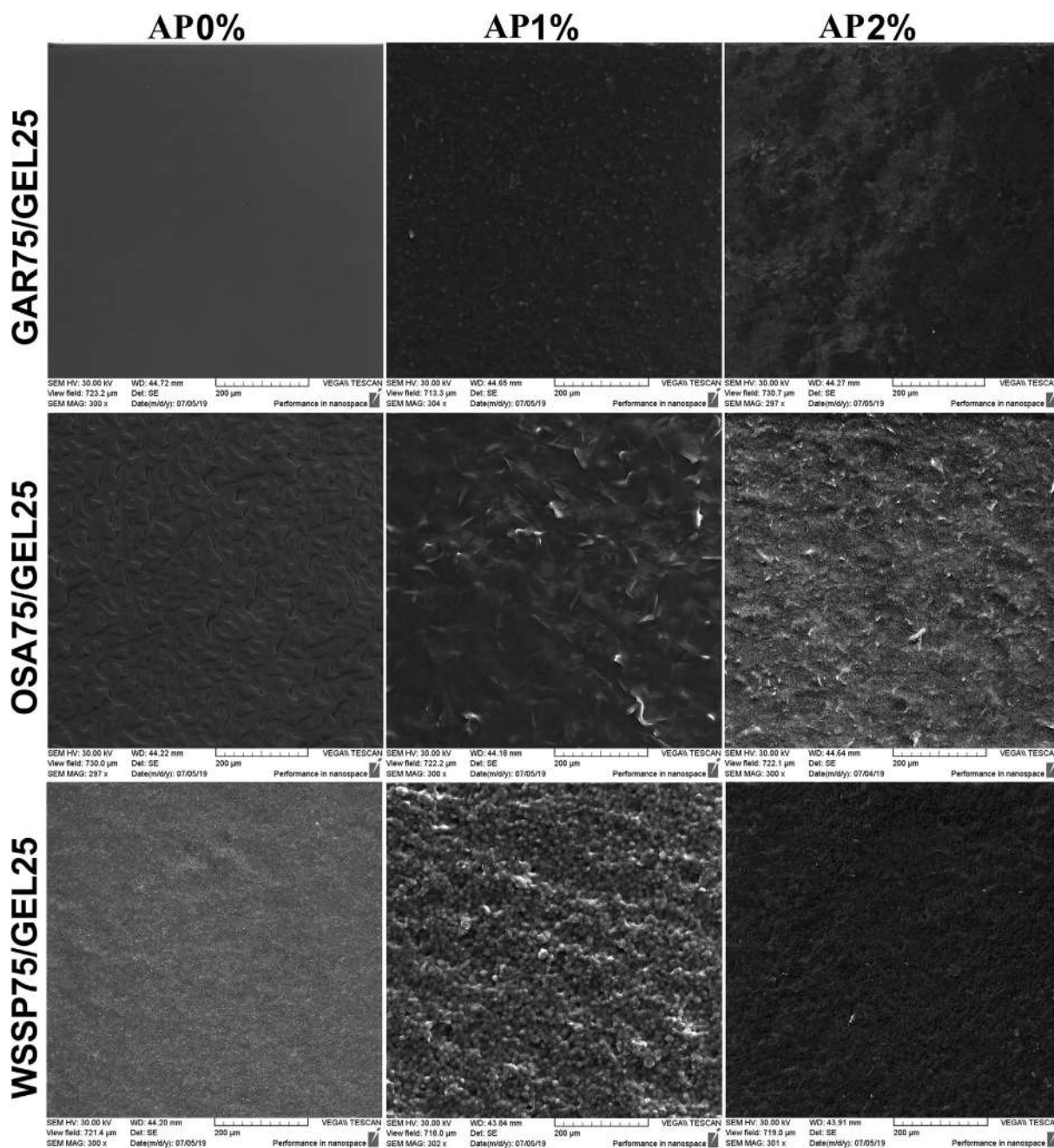


Fig. 2. SEM images of the surfaces of the AP-free and AP-added 75/25 blend films based on polysaccharides (GAR, OSA, WSSP) and gelatin (GEL).

WVP of the control OSA-based film is that the presence of hydrophobic octenyl side chains in the modified starch (Tesch, Gerhards, & Schubert, 2002) limited the permeation of water vapor.

Since the amphiphilic substances have a hydrophobic component, its addition should potentially provoke decrease of WVP. As can be seen from Table 1, the AP decreased the WVP of GAR-based film. Namely, the WVP of AP1%-added GAR-based film was lower by 26.6% compared to the control film but the doubling antioxidant concentration did not further improve the barrier properties ($p > 0.05$). It was found that the low AP addition (1%) was very efficient in reducing (by 31.4%) the WVP of WSSP-based film; however, the higher level of AP did not affect the water vapor barrier properties when compared to the control film. It is worth mentioning that among the tested samples, the AP1%-added WSSP75/GEL25 exhibited the lowest WVP. It is difficult to explain this result but it might be related to the specific microstructural properties of this system. As mention before, the highly granular

topography of this film was likely the consequence of emulsion destabilization. So, it is possible that the creaming of the emulsion resulted in the formation of a “bilayer-like” structure, which reduced the WVP of film. Another remarkable fact is that the addition of AP was effective in improving water vapor barrier properties only in the case of systems with the initially high WVP (i.e., GAR- and WSSP-based films). The inefficiency of AP in limiting the transfer of water vapor through the OSA-based carrier may be attributed to the relatively good stability of this system. It seems possible that the homogeneous distribution of AP did not offer a successful barrier to water molecules; i.e. the moisture penetrated between AP crystals trapped inside the continuous hydrocolloid network.

3.3. Optical properties

Among the control samples, the WSSP-based films were the most

Table 1

The effect of ascorbyl palmitate (AP) concentration on pH of film-forming solutions (FFSs) and moisture content (MC), total soluble matter (TSM), contact angle (CA), water vapor permeability (WVP), tensile strength (TS), elongation at break (E), elastic modulus (EM), color parameters (L^* , a^* , b^*) and opacity (OP) of the 75/25 blend films based on polysaccharides (gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride modified starch (OSA), water soluble soy polysaccharides (WSSP)) and gelatin (GEL).

Parameters	GAR75/GEL25			OSA75/GEL25			WSSP75/GEL25		
	AP 0%	AP 1%	AP 2%	AP 0%	AP 1%	AP 2%	AP 0%	AP 1%	AP 2%
	pH of FFSs	5.32 ± 0.04 ^a	4.97 ± 0.06 ^c	4.84 ± 0.01 ^a	5.21 ± 0.02 ^f	5.07 ± 0.03 ^b	5.12 ± 0.05 ^b	4.90 ± 0.02 ^d	4.82 ± 0.01 ^a
MC (%)	8.43 ± 0.25 ^b	10.33 ± 0.36 ^c	11.20 ± 0.22 ^d	10.31 ± 0.29 ^c	11.67 ± 0.35 ^e	15.52 ± 0.59 ^g	8.95 ± 0.19 ^b	11.39 ± 0.39 ^{de}	12.35 ± 0.29 ^f
TSM (%)	69.22 ± 0.50 ^d	62.58 ± 2.15 ^b	61.56 ± 0.42 ^b	57.87 ± 0.38 ^c	51.89 ± 2.11 ^a	51.69 ± 1.19 ^a	76.93 ± 0.84 ^f	67.45 ± 0.91 ^c	67.65 ± 0.82 ^{cd}
CA (°)	41.37 ± 7.15 ^a	47.13 ± 6.12 ^{ab}	52.21 ± 5.83 ^b	46.86 ± 6.52 ^{ab}	49.41 ± 4.93 ^{ab}	53.90 ± 3.48 ^b	40.22 ± 5.88 ^a	49.23 ± 5.20 ^{ab}	49.31 ± 3.88 ^{ab}
WVP (°)	45.46 ± 0.45 ^b	33.39 ± 1.73 ^b	35.18 ± 1.15 ^b	38.32 ± 1.08 ^c	38.51 ± 1.34 ^c	39.65 ± 1.49 ^c	43.04 ± 1.63 ^{de}	29.53 ± 2.10 ^d	40.40 ± 1.59 ^{cd}
TS (MPa)	17.04 ± 1.55 ^b	28.94 ± 2.79 ^c	30.64 ± 2.07 ^c	9.16 ± 0.82 ^a	9.61 ± 0.32 ^a	8.90 ± 0.31 ^a	43.49 ± 1.82 ^e	33.50 ± 2.54 ^d	30.07 ± 2.40 ^c
E (%)	0.60 ± 0.20 ^b	1.26 ± 0.23 ^a	1.36 ± 0.16 ^a	73.81 ± 6.20 ^c	37.81 ± 3.79 ^c	30.18 ± 6.58 ^c	6.28 ± 0.79 ^b	2.47 ± 0.14 ^b	1.76 ± 0.28 ^a
EM (MPa) · 10 ²	21.09 ± 1.70 ^d	20.41 ± 1.39 ^d	22.47 ± 1.42 ^e	2.16 ± 0.08 ^a	4.39 ± 0.28 ^b	4.67 ± 0.23 ^b	17.84 ± 2.40 ^c	17.56 ± 0.62 ^c	16.29 ± 5.13 ^c
L*	92.79 ± 0.24 ^a	92.03 ± 0.80 ^{cd}	89.90 ± 1.23 ^b	93.58 ± 0.14 ^a	93.53 ± 0.12 ^a	93.15 ± 0.23 ^a	91.41 ± 0.80 ^c	89.92 ± 0.71 ^b	89.45 ± 0.21 ^b
a*	-0.33 ± 0.12 ^a	-0.17 ± 0.05 ^a	1.03 ± 0.53 ^{cd}	-0.13 ± 0.10 ^{ab}	-0.20 ± 0.07 ^a	-0.30 ± 0.03 ^a	0.12 ± 0.10 ^b	0.84 ± 0.11 ^c	1.16 ± 0.08 ^d
b*	-5.09 ± 0.25 ^b	-3.02 ± 0.20 ^c	-1.63 ± 1.02 ^a	-7.05 ± 0.11 ^d	-6.11 ± 0.20 ^c	-5.20 ± 0.16 ^b	-2.56 ± 0.15 ^c	-1.36 ± 0.33 ^a	-1.59 ± 0.30 ^a
OP (A ₆₀₀ /mm)	5.52 ± 0.59 ^a	7.24 ± 0.23 ^b	7.55 ± 0.19 ^b	2.62 ± 0.27 ^d	4.00 ± 0.25 ^c	5.13 ± 0.33 ^a	9.21 ± 0.37 ^c	9.57 ± 0.42 ^c	10.68 ± 0.55 ^f

* (g mm m⁻² d⁻¹ kPa⁻¹).

^{a-g} Values with the different superscript letters within one row are significantly different (P > 0.05).

dark and yellowish (had the lowest L* and b*) (Table 1, Fig. S3). This result was likely due to the cream color of the WSSP. With the exception of OSA-based film, the incorporation of AP resulted in lower L* and higher a* color parameters. Moreover, regardless of the polymer type, the AP-added films were more yellow compared to the controls, which could be explained in terms of the inherent yellow color of the AP in ethanolic solution. Considering that colorless is highly desirable feature of the packaging, the AP-added OSA-based films could be a prominent candidate for food-packaging applications.

Among the control films, the OSA-based carrier was the most transparent to visible light (T%λ₄₀₀₋₇₀₀ = 38.29–62.50%) (Fig. 3). Since the WSSP-based film contained the undisclosed polymer particles (Fig. 1, Fig. S2), that likely scattered, reflected or absorbed light, its T% was significantly lower (T%λ₄₀₀₋₇₀₀ = 10.03–19.52%) as compared to the other films. Generally, as the AP concentration increased, the T% successively decreased (Fig. 3). This could be easily explained in terms of increasing light reflection by increasing numbers of AP particles; thereby, at higher AP incorporation levels, the films were more opaque (Table 1) and less permeable for UV light (Fig. 3). The WSSP-based films had the best UV-blocking properties, most likely as a result of the presence of the polymer particles. In turn, the OSA75/GEL25 films were the most UV light-permeable (Fig. 3). The GAR-based films were better UV blockers as compared to the OSA-containing samples (Fig. 3), which could be attributed to the presence of a small portion of proteins (0.99%) in the polymer (Comunian et al., 2016).

3.4. Mechanical properties

Comparison among the control films showed that the WSSP75/GEL25 film exhibited up to two and four times higher TS compared to that of the GAR- and OSA-based films, respectively (Table 1). This result may be related to the conglomerated structure of this carrier; i.e. it is possible that the WSSP particles (suspended in the GEL matrix, Fig. 2 and S2) disturbed formation of the strong proteinaceous network to a lesser extent than other polysaccharides (being considered as relatively well-dispersed in the FFSs).

It was found that the incorporation of AP into the GAR-based films, resulted in a significant increase (by ~ 70%) in the TS. This result may be related to the fact that the GAR exhibits very weak elasticity due to its highly branched nature (Nieto, 2009), which does not provide mechanical resistance. For this reason, the pure GAR films are very fragile (Lupina et al., 2019), do not have mechanical cohesiveness, and flake rather than peel when removed from the casting surface (Nieto, 2009). It is possible, therefore, that the AP acted a binder/filler for the GAR. Consequently, the polysaccharide-GEL network with an improved cohesiveness was able to be bearing the load of stress on the material. As can be seen from Table 1, in spite of the fact that statistical analysis showed no significant effect of the AP on the E of GAR75/GEL25 film (presumably due to the large data range), the AP tended to increase the film stretchability.

Unlike the GAR-based carrier system, the AP decreased TS and E of the WSSP75/GEL25 film (Table 1). It is possible that in this case, the AP distributed the entire matrix structure by the weakening of intermolecular forces among the chains of macromolecules. In accordance with these results, a previous study has demonstrated that AP decreased the mechanical parameters of poly-(lactic acid) acid film (Jamshidian et al., 2012). Just as in the case of WSSP75/GEL25 film, the AP decreased the E of OSA-based film, but no significant change in the TS was observed (Table 1). This result implies that the OSA-based carrier maintained the strength despite of the discontinuities introduced in the matrix. Moreover, it was found that the addition of AP made the OSA75/GEL25 film stiffer. This result could be attributed to the initially low EM of the OSA-based system, so it is possible that in this case, the presence of AP crystals resulted in enhanced structural rigidity.

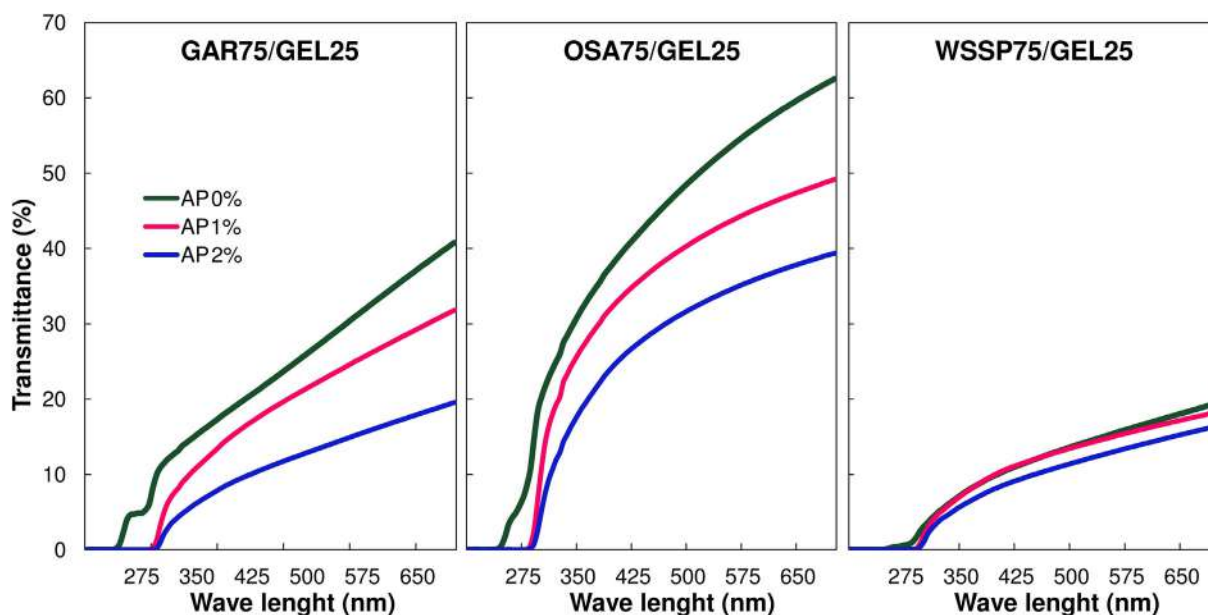


Fig. 3. Effect of AP on the light transmission of 75/25 blend films based on polysaccharides (GAR, OSA, WSSP) and gelatin (GEL).

3.5. Release of AP

AP has some advantages as a food preservative because it is fat-soluble and practically insoluble in water ($8.1 \text{ mM} \times 10^{-4}$ at $25 \text{ }^\circ\text{C}$) (Palma, Lo Nostro, Manzo, & Allemandi, 2002). Considering that AP is freely soluble in ethanol (185.8 mM) the 99.8% ethanol has been chosen for the determination of its migration from the carriers. Fig. 4A and S4 show the cumulative amount (mg/cm^2) and percentage of AP released from the films as a function of time, respectively. Depending on polymer type and AP concentration, c.a. 32–92% of the AP was released from the carriers during the 30-h dissolution test (Fig. S4). Since the release of AP from the GAR carrier was very slow and incomplete, it was impossible to predict the $t_{50\%}$ for the AP-added GAR systems. The $t_{25\%}$ values ranged from 18 to 296 min (Table 2). Regardless of the AP concentration, the OSA-based carrier offered the fastest release of AP (Fig. 4A, S4). According to $t_{25\%}$, at 2% of AP the OSA film exhibited 2.2 and 16.2 times faster release compared to the WSSP- and GAR-based carriers, respectively. In general, the release of the active substance from a biopolymeric matrix is due to drug solubility, desorption of the surface-bound or adsorbed drug, drug diffusion out of the matrix into the acceptor solution, matrix erosion or degradation, and the combination of erosion and diffusion processes (Zoraida, 2013). Since the polysaccharides used in the study were insoluble in the acceptor solution, it can be assumed that the release of AP was mainly controlled by the diffusion-driven processes. The diversity in the AP release rate profiles could reflect differences in the structural features of the polysaccharides, such as monosaccharide composition (simple versus complex), linkage patterns, chain shapes (linear versus branched), functional groups, and conformations, that directly affect the physical properties including solubility, rheological properties (viscosity), and gelling properties. It is known that the drug release rate can be controlled by the degree of branching of a polymer (Podzimek, 2011). In this way, the weak AP migration from the GAR- and WSSP-containing carriers may be due to chemical attachment of AP to the heteroglycan backbone. On the other hand, the fast release rate observed for OSA-based films was likely related to weaker physicochemical entrapment of the AP in the partially linear homopolisaccharide matrix.

It was found that the cumulative concentration of AP in the acceptor solution markedly increased by the increase of AP concentration in the films (Fig. 4A). The OSA- and WSSP-based films with higher AP load

offered a faster release rate than the systems with lower fortification level. The same result was observed for the GAR-based system, but only up to 240 min of the test. Surprisingly, for the further release period the opposite tendency was observed, i.e. the GAR film with lower AP level exhibited higher susceptibility to antioxidant release (Fig. S4).

Fig. S4 shows the experimental and predicted data points, while Tables S2–S4 provide AIC and parameter values estimated for the eight mathematical models (Table S1). It was found that the multi-parameter models (P–S, Gz, Wb, and 4-MB) approximated the experimental points better than the single- and two-parameter models (Tables S3 and S4). The 4-MB model provided the best fit (the lowest AIC values) for almost all the formulations. However, an exception was the GAR-based film with the AP level of 2%, for which the best kinetic model was the Gz equation. This discrepancy could reflect the differences in the mechanisms (speed) of AP release from the carriers. As can be seen in Fig. S4, the Gz model shows a steep increase in the beginning and converges slowly to the asymptotic maximal dissolution (Dash, Murthy, Nath, & Chowdhury, 2010).

As the k parameter of the Makoid–Banakar model was zero or almost zero, the n parameter of this expression becomes identical to the release exponent of the Korsmeyer–Peppas expression. Depending on its value, the release process can be driven by Fickian diffusion ($n = 0.5$), polymeric matrix erosion or the combination of both mechanisms. It was found that the release of AP from the 2%AP-added GAR- and OSA-based films was characterized by low values of n ($n < 0.5$, Table S4), which is indicative of a Quasi-Fickian diffusion-controlled mechanism (Paarakh, Jose, Setty, & Peter, 2018). In turn, $n > 1$ was observed for the 1% AP-added GAR-based film, which is indicative of an extreme form of transport; i.e. during the dissolution process, tension and breaking of the polymer (solvent crazing) occurs. This result seems to match the visual observation of the samples during the release test, which revealed that only 1%AP-added GAR-based film underwent disintegration (into a few pieces) after prolonged contact with the acceptor medium. In the light of this information the more complete release of AP from the GAR film with lower AP level (1%), as compared to the system with doubled AP content (Fig. S4), could be explained by the disconnection of the film matrix, which accelerated the AP dissolution rate. In the case of other films, non-Fickian behavior ($0.5 < n < 1.0$) was observed. The β parameter of the Weibull equation characterizes the type of dissolution curve. For all matrix systems, the AP release rate profile (curve shape) was parabolic, displaying a high initial slope and a

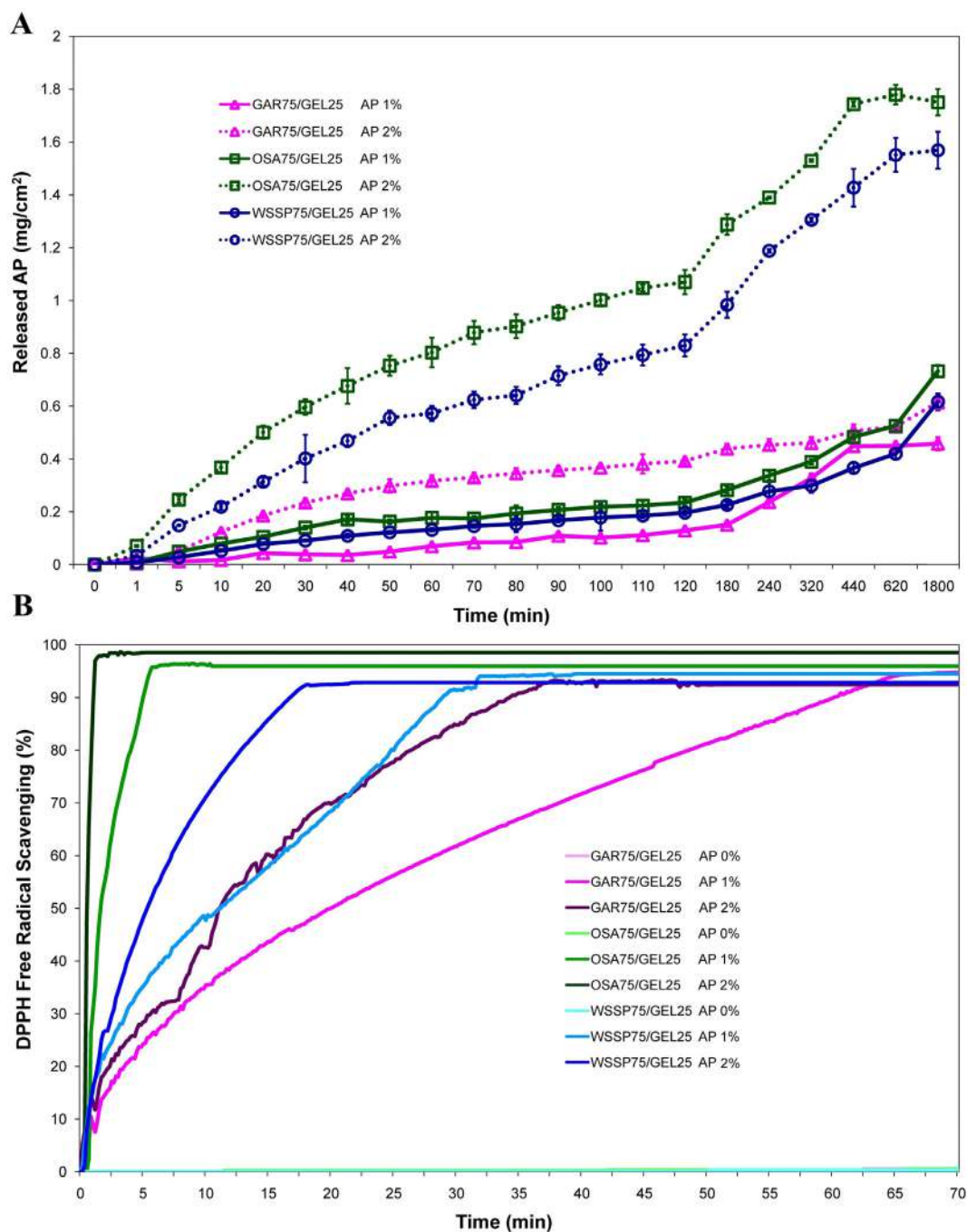


Fig. 4. Kinetics of cumulative release of AP (A) and kinetics of released antiradical activity (B) of the 75/25 blend films based on polysaccharides (GAR, OSA, WSSP) and gelatin (GEL).

consistent exponential character ($\beta < 1$) (Bruschi, 2015).

3.6. Released antioxidant properties

The main use of AP in processed foods is as a preservative, which capitalizes on the antioxidant functions of the compound. The AP-free films did not show scavenging activity on DPPH* (Fig. 4B), which could be associated with the fact that the carrier polymers are not soluble in the alcohol (Gurin & Clarke, 1934; Viscione, 2013; EFSA, 2017a; Wang et al., 2019). The antioxidant activity markedly increased by the increase of AP content in the films. The type of carrier had a great influence on the antiradical properties of the films. The DPPH* scavenging activity of the films increased with the following ranked order:

GAR75/GEL25 < WSSP75/GEL25 < OSA75/GEL25, which primarily reflect the different release abilities of the carriers. As shown in Fig. S5 a strong positive correlation ($r = 0.803$ and $r = 0.705$ for the 1 and 2%-added films, respectively) existed between antiradical activity and concentration of AP in the acceptor solvent.

The OSA75/GEL25 carrier exhibited the most complete release of AP (71.47 and 92.14% for the 1 and 2%-added films, respectively (Fig. 4B) and, consequently, almost immediately demonstrated the potent radical quenching capacity. Namely, at 1 and 2% of AP concentration, the DPPH scavenging reached ~ 96% and ~ 99 at about 6 min and 3 min, respectively. These results show that the OSA-based carrier does not offer a controlled release of AP. It can be assumed that in the case of antioxidant packaging systems, rapid release ("burst

Table 2

Times required for 25% ($t_{25\%}$) and 50% ($t_{50\%}$) ascorbyl palmitate (AP) release obtained from the best fitting mathematical models.

Polysaccharide/GEL blend ratio	AP (%)	$t_{25\%}$ (min)	$t_{50\%}$ (min)	$R^2_{adjusted}$ ***
GAR75/GEL25	1	252.067	n.d.	0.9828*
	2	295.875	n.d.	0.9975**
OSA75/GEL25	1	130.160	589.787	0.9939*
	2	18.293	88.600	0.9980*
WSSP75/GEL25	1	215.897	1005.806	0.9989*
	2	40.931	160.002	0.9984*

*obtained from the Makoid-Banakar with T_{lag} model.

**obtained from the Gompertz model.

***the goodness of fit of the models.

n.d. – no data.

effect”) is undesirable since it causes loss of the active agent within a short period of time. Consequently, the appropriate amount of antioxidant is not maintained on the product surface, where the oxidative processes are the most intensive. As in the case of the OSA-containing carrier, the other two films also showed a high antioxidant potential (92.44–94.76%) but they were more useful in a prolonged increase in the antioxidant activity (Fig. 4B). The single-parameter F-O model was suitable for the efficient simulation of kinetics of released antiradical activity (Table S5). It is worth mentioning that among the all samples, the 1%AP-added GAR75/GEL25 film provided the most linear and continuous sustained growth of antiradical activity that fits best to Z-O kinetics (Table S6), which accords with the AP release data (Table S2). Since Z-O model describe systems where the drug release rate is constant over a period of time, it can be concluded that this system has the best potential for maximizing AP efficacy while minimizing the dose necessary for the protective action.

3.7. Safety aspects

The information provided in this article could help to improve the design, development and applicability of edible antioxidant films. However, some determinations relating to the safety aspects of edible films/coatings should be taken into account while planning their use as a preservation technique to enhance the shelf life of the food products. All film components used in this study are approved food additives. The ADIs of GAR, OSA, WSSP, and GEL are “not specified”. The toxicological studies have shown that oral intake of large amounts of GAR (up to 30 000 mg/person per day, for up to 18 days) and OSA (up to a single dose of 25 000 mg) were well tolerated in adults (EFSA, 2017b, 2019). The EFSA Panel, however, noted reports on gastrointestinal symptoms conducted in infants with hypoallergenic formula containing 2% OSA (24 000 mg/person) (EFSA, 2017b). Regarding WSSP (synonym: soybean hemicelluloses), no adverse effects were reported in a 90-day dietary toxicity study in rats at 2 430–2 910 mg/kg bw/day. It is recommended that consumers should be informed of the presence of potentially allergenic proteins in the WSSP (EFSA, 2017c). From the studies on mice and rats, it appears that AP had a very low acute toxicity, i.e. LD_{50} in mice of 2 000 mg/kg bw and in rats of > 5 000 mg/kg bw for AP was reported (EFSA, 2015a). Since glycerol is a normal constituent in the body and a regular component of the diet there is no need for a numerical ADI (EFSA, 2017a). In turn, an ADI of 25 mg/kg bw/day was established for Tween 80. Nevertheless, the acute toxicity of Tween 80 is very low and there is no concern regarding its genotoxicity, carcinogenicity or chronic toxicity (EFSA, 2015b).

4. Conclusion

The AP, as an ester formed from AA, slightly decreased the pH of the films. Although, in general, the AP did not improve surface hydrophobicity of most films, its presence reduced the water solubility. The

amphiphilic character of AP increased the MC of the films. The WVP and TS of the OSA-based carrier were not affected by AP. In the case of the GAR-based system, the fortification with AP had beneficial effects by improving water vapor barrier properties and TS. The increase in AP concentration enhanced the barrier properties of films against UV light. This finding identifies useful applications of the AP-added films as UV filters in food packaging. According to $t_{25\%}$, at 2% of AP the OSA75/GEL25 film offered 2.2 and 16.2 times faster release compared to the WSSP- and GAR-based carriers, respectively. It suggests that AP was weakly bound or adsorbed to the partially linear homopolysaccharide-based matrix. On the other hand, the weak migration of AP from the GAR- and WSSP-containing carriers could be due to the entrapment of the antioxidant to the branched heteroglycan backbones. The GAR-based carrier exhibited the slowest release of AP and, consequently provided prolonged antiradical activity. In conclusion, this study showed that the 1%AP-added GAR75/GEL25 system had the best potential for controlling AP release, thus maximizing its efficacy while minimizing the dose necessary for the protective antioxidant action.

Further experimental investigations are needed to estimate the storage stability of AP in the films, as well as the ability of selected material (applied in the form of a coating) to control oxidation in food, e.g., nuts, cheese or sausages, in order to assess its performance in relation to product quality and consumer acceptance.

CRedit authorship contribution statement

Katarzyna Lupina: Conceptualization, Methodology, Data curation, Formal analysis, Visualization, Investigation, Writing - original draft. **Dariusz Kowalczyk:** Conceptualization, Methodology, Supervision, Validation, Writing - original draft. **Emilia Drozłowska:** Investigation, Visualization, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work was financially supported by the National Science Centre (Poland) under grant number 2019/35/N/NZ9/01795.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127465>.

References

- Austria, R., Semenzato, A., & Bettero, A. (1997). Stability of vitamin C derivatives in solution and in topical formulations. *Journal of Pharmacology and Biomedical Analysis*, 155, 795–801. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(96\)01904-8](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(96)01904-8).
- Benedini, L., Schulz, E. P., Messina, P. V., Palma, S. D., Allemanni, D. A., & Schulz, P. C. (2011). The ascorbyl palmitate-water system: Phase diagram and state of water. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 375(1–3), 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.11.083>.
- Bruschi, M. (2015). Mathematical models of drug release. In M. Bruschi (Eds.) *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems* (pp. 63–86). <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100092-2.00005-9>.
- Code of Federal Regulations. (2020). Food and Drug Administration, Title 21, Par. 182.3149.
- Comunian, T. A., Gomez-Estaca, J., Ferro-Furtado, R., Conceição, G. J. A., Moraes, I. C. F., De Castro, I. A., & Favaro-Trindade, C. S. (2016). Effect of different polysaccharides and crosslinkers on echium oil microcapsules. *Carbohydrate Polymers*, 150, 319–329. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.044>.
- Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L., & Chowdhury, P. (2010). Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 67(3), 217–223.
- EFSA (2015b). Re-evaluation of polyoxyethylene sorbitan monolaurate (E432),

- polyoxyethylene sorbitan monooleate (E433), polyoxyethylene sorbitan monopalmitate (E434), polyoxyethylene sorbitan monostearate (E435) and polyoxyethylene sorbitan tristearate (E436) as food additives. *EFSA Journal*, 13(7), 1–74. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4152>.
- EFSA (2015a). Re-evaluation of ascorbyl palmitate (E 304(i)) and ascorbyl stearate (E 304(ii)) as food additives. *EFSA Journal*, 13(11), 1–57. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4289>.
- EFSA (2017a). Re-evaluation of glycerol (E 422) as a food additive. *EFSA Journal*, 15(3), 1–64. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4720>.
- EFSA (2017b). Re-evaluation of oxidised starch (E 1404), monostarch phosphate (E 1410), distarch phosphate (E 1412), phosphated distarch phosphate (E 1413), acetylated distarch phosphate (E 1414), acetylated starch (E 1420), acetylated distarch adipate (E 1422), hydroxypropyl starch (E 1440), hydroxypropyl distarch phosphate (E 1442), starch sodium octenyl succinate (E 1450), acetylated oxidised starch (E 1451) and starch aluminium octenyl succinate (E 1452) as food additives. *EFSA Journal*, 15(10). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4911>.
- EFSA (2017c). Re-evaluation of soybean hemicellulose (E 426) as a food additive. *EFSA Journal*, 15(3) 1–27. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4721>.
- EFSA (2019). Opinion on the re-evaluation of acacia gum (E 414) as a food additive in foods for infants below 16 weeks of age and the follow-up of its re-evaluation as a food additive for uses in foods for all population groups. *EFSA Journal*, 17(12), 1–23. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5922>.
- Goto, M., Oaki, Y., & Imai, H. (2016). Dendritic growth of NaCl crystals in a gel matrix: Variation of branching and control of bending. *Crystal Growth and Design*, 16(8), 4278–4284. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.6b00323>.
- Gurin, S., & Clarke, H. T. (1934). Amino groups in proteins and peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 107, 395–419.
- Han, J. H., Hwang, H. M., Min, S., & Krochta, J. M. (2008). Coating of peanuts with edible whey protein film containing α -tocopherol and ascorbyl palmitate. *Journal of Food Science*, 73(8), 349–355. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00910.x>.
- Jamshidian, M., Tehrani, E. A., Imran, M., Akhtar, M. J., Cleymand, F., & Desobry, S. (2012). Structural, mechanical and barrier properties of active PLA-antioxidant films. *Journal of Food Engineering*, 110(3), 380–389. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.12.034>.
- Johnston, C. S., Monte, W. C., Bolton, R. S., & Chard, M. H. (1994). A Comparison of L-ascorbic acid and L-Ascorbyl 6-palmitate utilization in guinea pigs and humans. *Nutrition Research*, 14(10), 1465–1471. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- Kanth, V. R., Kajari, P. B., Madalageri, P. M., Ravindra, S., Manjeshwar, L. S., & Aminabhavi, T. M. (2017). Blend hydrogel microspheres of carboxymethyl chitosan and gelatin for the controlled release of 5-fluorouracil. *Pharmaceutics*, 9(2), 1–13. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9020013>.
- Kowalczyk, D. (2016). Biopolymer/candelilla wax emulsion films as carriers of ascorbic acid - A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 52, 543–553. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.07.034>.
- Kowalczyk, D., & Baraniak, B. (2014). Effect of candelilla wax on functional properties of biopolymer emulsion films - A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 41, 195–209. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.04.004>.
- Kowalczyk, D., Kazmierczak, W., Zięba, E., Meżyńska, M., Basiura-Cembala, M., Lisiecki, S., ... Baraniak, B. (2018). Ascorbic acid- and sodium ascorbate-loaded oxidized potato starch films: Comparative evaluation of physicochemical and antioxidant properties. *Carbohydrate Polymers*, 181, 317–326. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.10.063>.
- Kowalczyk, D., Kordowska-Wiater, M., Karaś, M., Zięba, E., Meżyńska, M., & Wiącek, A. E. (2020). Release kinetics and antimicrobial properties of the potassium sorbate-loaded edible films made from pullulan, gelatin and their blends. *Food Hydrocolloids*, 101, 105539. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105539>.
- Laguerre, M., Bayrass, C., Panya, A., Weiss, J., McClements, D. J., Lecomte, J., ... Villeneuve, P. (2015). What makes good antioxidants in lipid-based systems? The next theories beyond the polar paradox. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(2), 183–201. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.650335>.
- López-Martínez, A., & Rocha-Urbe, A. (2017). Antioxidant Hydrophobicity and Emulsifier type Influences the Partitioning of Antioxidants in the Interface Improving Oxidative Stability in O/W Emulsions rich in n-3 fatty acids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 121(9).
- Łupina, K., Kowalczyk, D., Zięba, E., Kazmierczak, W., Meżyńska, M., Basiura-cembala, M., & Ewa, A. (2019). Food Hydrocolloids Edible films made from blends of gelatin and polysaccharide-based emulsifiers - A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 96, 555–567. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.05.053>.
- Maeda, H., & Nakamura, A. (2009). Soluble soybean polysaccharide. In G. O. Phillips, & P. A. Williams (Eds.), *Handbook of hydrocolloids: Second Edition* (pp. 693–709). <https://doi.org/10.1533/9781845695873.693>.
- Nieto, M. B. (2009). Structure and function of polysaccharide gum-based edible films and coatings. In M. Embuscado, & K. C. Huber (Eds.), *Edible films and coatings for food applications* (pp.57-112). New York: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1>.
- Nor Amalini, A., Norziah, M. H., Khan, I., & Haafiz, M. K. M. (2018). Exploring the properties of modified fish gelatin films incorporated with different fatty acid sucrose esters. *Food Packaging and Shelf Life*, 15, 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.foodp.2017.12.003>.
- Paarakh, M. P., Jose, P. A. N., Setty, C. M., & Peter, G. V. (2018). Release kinetics - Concepts and applications. *International Journal of Pharmacy Research & Technology*, 8(1), 12–20. <https://doi.org/10.31838/ijprt/08.01.02>.
- Palma, S., Lo Nostro, P., Manzo, R., & Allemandi, D. (2002). Evaluation of the surfactant properties of ascorbyl palmitate sodium salt. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16(1–2), 37–43. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(02\)00054-4](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(02)00054-4).
- Podzimek, S. (2011). Characterization of branched polymers. In S. Podzimek (Eds.), *Light scattering, size exclusion chromatography and asymmetric flow field flow fractionation: Powerful tools for the characterization of polymers, proteins and nanoparticles* (pp. 154–157). New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1295/kobunshi.38.154>.
- Tesch, S., Gerhards, C., & Schubert, H. (2002). Stabilization of emulsions by OSA starches. *Journal of Food Engineering*, 54(2), 167–174. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(01\)00206-0](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(01)00206-0).
- Totre, J., Ickowicz, D., Domb, A.J. Properties and hemostatic application of gelatin. In: A. J. Domb, N. Kumar, & A. Ezra (Eds.), *Biodegradable polymers in clinical use and clinical development*. NJ: Wiley; 2011. p 91–109.
- Viscione, L. (2013). Fibre-enriched beverages. In J. A. Delcour, & K. Poutanen (Eds.), *Fibre-rich and wholegrain foods: Improving quality* (pp. 369–388). UK: Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857095787.4.369>.
- Wang, Q., Huang, X., Nakamura, A., Burchard, W., & Hallett, F. R. (2005). Molecular characterisation of soybean polysaccharides: An approach by size exclusion chromatography, dynamic and static light scattering methods. *Carbohydrate Research*, 340(17), 2637–2644. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.08.012>.
- Wang, S., Zhao, L., Li, Q., Liu, C., Han, J., Zhu, L., ... Liu, H. (2019). Rheological properties and chain conformation of soy hull water-soluble polysaccharide fractions obtained by gradient alcohol precipitation. *Food Hydrocolloids*, 91, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.12.054>.
- Williams, P. A., & Phillips, G. O. (2009). Gum Arabic. In P. A. Williams, & G. O. Phillips (Eds.), *Handbook of Hydrocolloids* (pp. 155–168). (Second ed.). Boca Raton: CRC Press.
- Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C., & Xie, S. (2010). DDSolver: An add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *AAPS Journal*, 12(3), 263–271. <https://doi.org/10.1208/s12248-010-9185-1>.
- Zhou, M., Li, X., Li, Y., Yao, Q., Ming, Y., Li, Z., ... Shi, S. (2017). Ascorbyl palmitate-incorporated paclitaxel-loaded composite nanoparticles for synergistic anti-tumoral therapy. *Drug Delivery*, 24(1), 1230–1242. <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1370619>.
- Zoraida, P. A. (2013). Targeted drug delivery. In A. Zoraida (Eds.), *Nanomaterials for medical applications* (pp. 181–234). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-385089-8.00005-4>.

Table S1. Mathematical models used to describe the dissolution curves (Zhang et al. 2010).

Model	Equation	Parameters
Zero order (Z-O)	$F = k_0 \cdot t$	k_0
First order (F-O)	$F = 100 \cdot (1 - e^{-k_1 \cdot t})$	k_1
Baker–Lonsdale (B-L)	$\frac{3}{2} \left[1 - \left(1 - \frac{F}{100} \right)^{2/3} \right] - \frac{F}{100} = k_{BL} \cdot t$	k_{BL}
Logistic (Lo)	$F = 100 \cdot \frac{e^{\alpha + \beta \cdot \log(t)}}{1 + e^{\alpha + \beta \cdot \log(t)}}$	α, β
Peppas–Sahlin (P-S)	$F = k_1 \cdot t^m + k_2 \cdot t^{2m}$	k_1, k_2, m
Gompertz (Gz)	$F = 100 \cdot e^{-\alpha \cdot e^{-\beta \cdot \log(t)}}$	α, β, F_{max}
Weibull (Wb)	$F = 100 \cdot \left[1 - e^{-\frac{(t-Ti)^\beta}{\alpha}} \right]$	α, β, Ti
Makoid–Banakar with T_{lag} (4-MB)	$F = k_{MB} \cdot (t - T_{lag})^n \cdot e^{[-k \cdot (t - T_{lag})]}$	k_{MB}, n, k, T_{lag}

F is the fraction (%) of drug released in time t

k_0 is the zero-order release constant

k_1 is the first-order release constant

k_{BL} is the combined constant in Baker–Lonsdale model, $k_{BL} = [3 \times D \times Cs / (r_0^2 \times C_0)]$, where D is the diffusion coefficient, Cs is the saturation solubility, r_0 is the initial radius for a sphere or cylinder or the half-thickness for a slab, and C_0 is the initial drug loading in the matrix

α is the scale factor in Logistic and Gompertz ; β is the shape factor in Logistic and Gompertz

k_1 is the constant related to the Fickian kinetics; k_2 is the constant related to Case-II relaxation kinetics; m is the diffusional exponent for a device of any geometric shape which inhibits controlled release

F_{max} is the maximum fraction of the drug released at infinite time

α is the scale parameter which defines the time scale of the process; β is the shape parameter which characterizes the curve as either exponential ($\beta=1$; case 1), sigmoid, S-shaped, with upward curvature followed by a turning point ($\beta>1$; case 2), or parabolic, with a higher initial slope and after that consistent with the exponential ($\beta<1$; case 3) (Weibull model)

Ti is the location parameter which represents the lag time before the onset of the dissolution or release process and in most cases will be near zero

k_{MB} , n , and k are empirical parameters in Makoid–Banakar model (k_{MB} , n , $k>0$)

T_{lag} is the lag time prior to drug release

Table S2. Comparison of AIC values obtained from fitting experimental ascorbyl palmitate (AP) release data to the different mathematical models.

Polysaccharide/GEL blend ratio	AP (%)	Z-O	F-O	B-L	Lo	P-S	Gz	Wb	4-MB	Best fit
GAR75/GEL25	1	166.82	153.08	138.65	132.51	97.92	118.10	138.97	95.10	4-MB
	2	175.55	171.20	140.91	98.12	86.23	32.94	72.04	64.22	Gz
OSA75/GEL25	1	179.87	152.84	83.35	93.18	79.99	87.26	81.92	79.75	4-MB
	2	220.11	151.07	174.06	123.29	79.24	129.31	108.16	76.18	4-MB
WSSP75/GEL25	1	168.32	150.32	54.35	55.33	37.76	39.91	35.04	36.24	4-MB
	2	209.00	150.07	132.22	107.24	71.57	122.79	117.65	68.19	4-MB

Table S3. Parameters obtained from fitting experimental data to the single-parameter release models.

Polysaccharide/GEL blend ratio	AP (%)	Z-O	F-O	B-L
		k_0 (%/min)	k_1 (1/min)	k_{BL}
GAR75/GEL25	1	0.039	0.001	0.000036
	2	0.030	0.001	0.000031
OSA75/GEL25	1	0.056	0.002	0.000088
	2	0.091	0.008	0.000287
WSSP75/GEL25	1	0.046	0.001	0.000053
	2	0.078	0.005	0.000287

Table S4. Kinetic parameters obtained from multi-parameter modeling.

Polysaccharide/GEL blend ratio	AP (%)	Lo		P-S			Gz			Wb			4-MB			
		α	β	k_1 (1/min)	k_2	m	α	β	F_{max}	α	β	T_i	k_{MB} (%/min)	n	k	T_{lag}
GAR75/GEL25	1	-5.499	1.781	0.130	0.000	0.970	89.356	2.002	56.328961	127.596	0.625	0.895	0.036	1.227	0.001	-11.677
	2	-3.049	0.765	3.423	-0.092	0.408	4.834	0.975	38.62057	13.615	0.232	9.444	5.176	0.287	0.000	4.917
OSA75/GEL25	1	-4.541	1.642	1.909	-0.012	0.547	7.443	0.240	2237.0489	55.758	0.571	0.000	2.133	0.510	0.000	0.587
	2	-3.852	2.030	6.159	-0.094	0.502	5.124	0.828	144.82944	22.763	0.622	-0.005	6.949	0.450	0.000	0.747
WSSP75/GEL25	1	-4.682	1.551	1.412	-0.007	0.555	7.686	0.257	1710.8068	69.385	0.558	0.780	1.583	0.519	0.000	0.847
	2	-4.340	1.994	3.164	-0.028	0.578	7.790	0.986	124.17071	33.243	0.618	0.654	3.365	0.548	0.001	0.680

Table S5. AIC and $R^2_{adjusted}$ values obtained from fitting experimental DPPH free radical scavenging data to the first-order (F-O) model.

Polysaccharide/GEL blend ratio	AP (%)	F-O	
		AIC	$R^2_{adjusted}$
GAR75/GEL25	1	3666.23	0.9742
	2	3555.35	0.9804
OSA75/GEL25	1	3731.21	0.9052
	2	3383.16	0.9034
WSSP75/GEL25	1	3737.97	0.9687
	2	3948.45	0.9193

Table S6. AIC values obtained from fitting experimental DPPH free radical scavenging data to the zero-order (Z-O) model.

Polysaccharide/GEL blend ratio	AP (%)	Z-O
		AIC
GAR75/GEL25	1	4684.34
	2	5219.87
OSA75/GEL25	1	5731.88
	2	5808.74
WSSP75/GEL25	1	5261.16
	2	5538.94

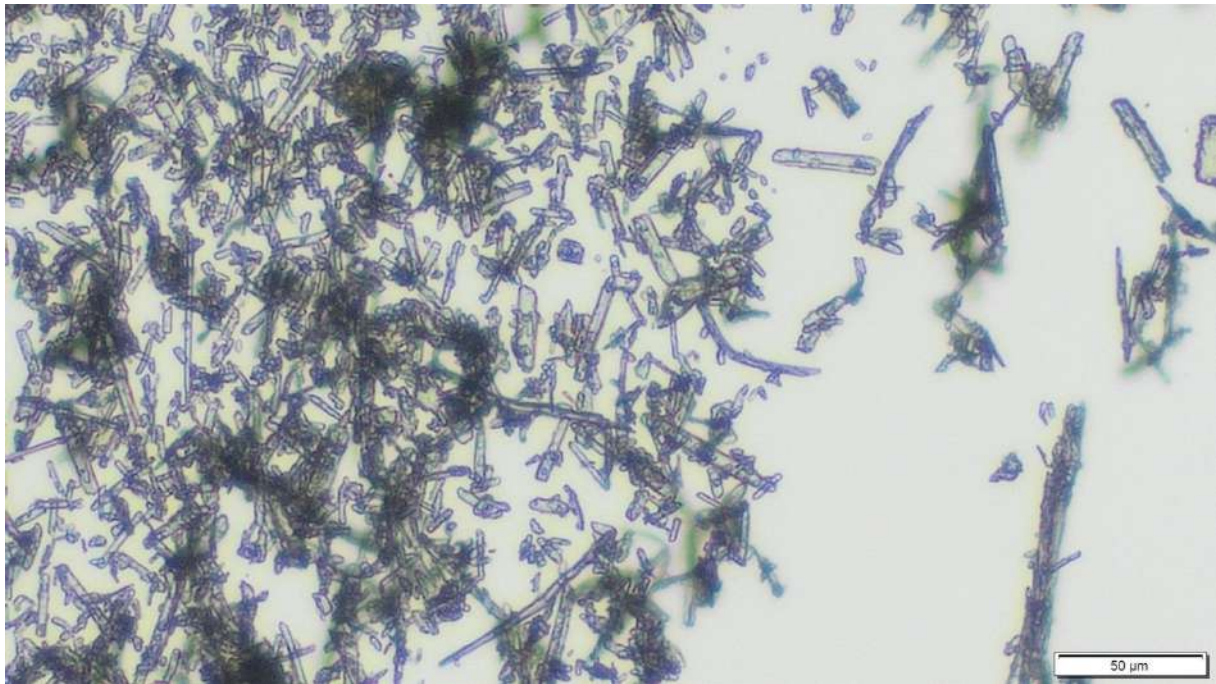


Figure S1. Light micrograph of ascorbyl palmitate powder crystals (x10 magnification).

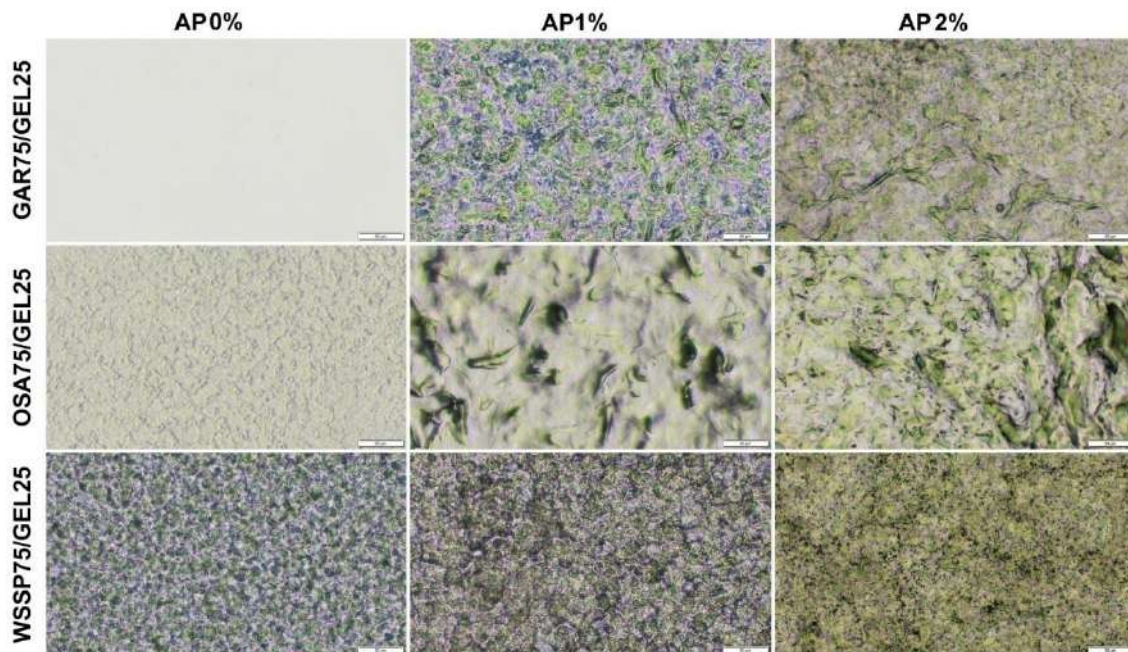


Figure S2. Images of the ascorbyl palmitate (AP)-free and AP-added 75/25 blend films based on polysaccharides (gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride modified starch (OSA), water soluble soy polysaccharides (WSSP)) and gelatin (GEL) examined using a light microscope (x10 magnification).

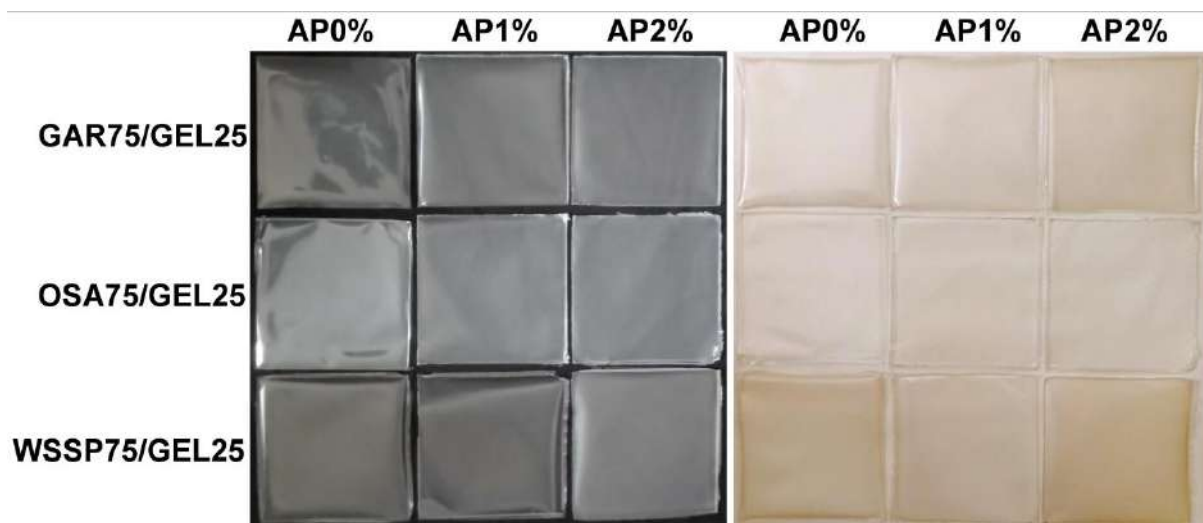


Figure S3. Photographs of the ascorbyl palmitate (AP)-free and AP-added 75/25 blend films (12 x12 cm) based on polysaccharides (gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride modified starch (OSA), water soluble soy polysaccharides (WSSP)) and gelatin (GEL).

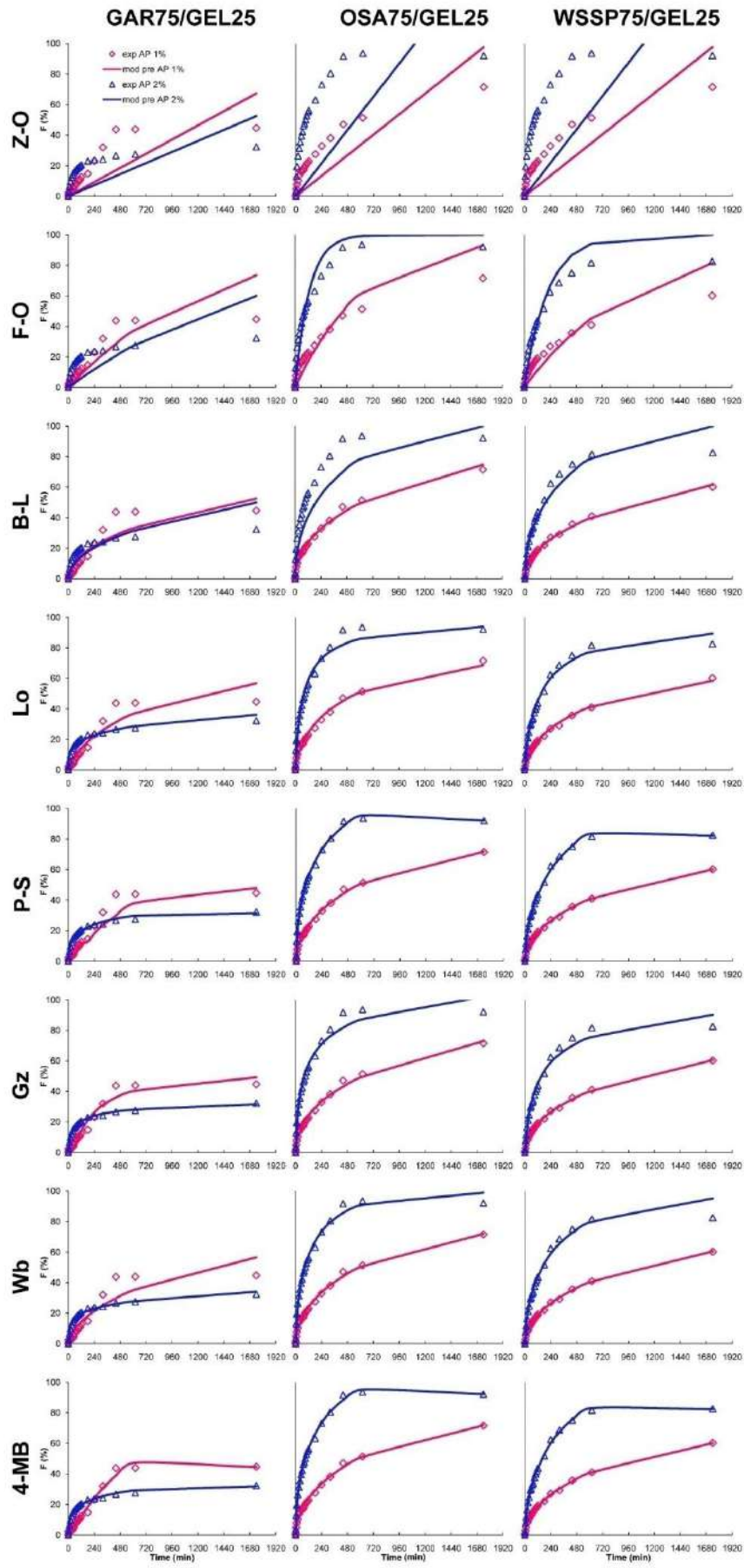


Fig. S4. Fraction (F) of AP released from the 75/25 blend films based on polysaccharides (gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride modified starch (OSA), water soluble soy polysaccharides (WSSP)) and gelatin (GEL) according to zero-order kinetics (Z-O), first-order kinetics (F-O), the Baker-Lonsdale (B-L), the Logistic (Lo), the Peppas-Sahlin (P-S), the Gompertz (Gz), the Weibull (Wb), the Makoid-Banakar with T_{lag} (4-MB) models; experimental (Δ , \diamond) and theoretical data (lines).

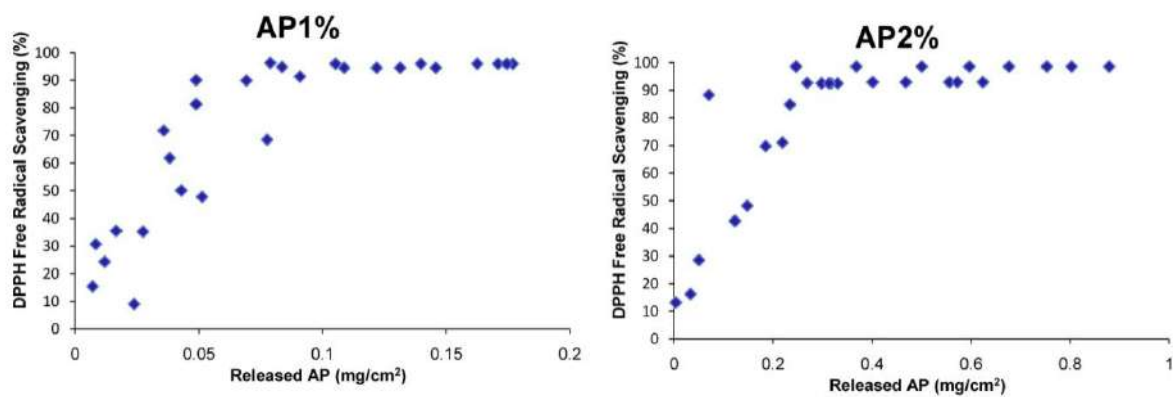


Fig. S5. Correlation between DPPH free radical scavenging (%) and AP release (mg/cm^2) data collected for 70 min.

Article

Gum Arabic/Gelatin and Water-Soluble Soy Polysaccharides/Gelatin Blend Films as Carriers of Astaxanthin—A Comparative Study of the Kinetics of Release and Antioxidant Properties

Katarzyna Łupina ¹, Dariusz Kowalczyk ^{1,*}  and Waldemar Kazimierczak ² 

¹ Department of Biochemistry and Food Chemistry, Faculty of Food Sciences and Biotechnology, University of Life Sciences in Lublin, Skromna 8, 20-704 Lublin, Poland; katarzyna.lupina@gmail.com

² Laboratory of Biocontrol, Application and Production of EPN, Faculty of Natural Sciences and Health, Center for Interdisciplinary Research, John Paul II Catholic University of Lublin, Konstantynów 1J, 20-708 Lublin, Poland; waldemar.kazimierczak@kul.pl

* Correspondence: dariusz.kowalczyk@up.lublin.pl

Abstract: Polymer blending and incorporation of active substances offer a possibility of generation of novel packaging materials with interesting features. Astaxanthin is one of the most powerful antioxidants. Hence, in this study, water-soluble AstaSana astaxanthin (AST) was incorporated into 75/25 gum arabic/gelatin (GAR75/GEL25) and water-soluble soy polysaccharides/gelatin (WSSP75/GEL25) blend films in different concentrations (0, 0.25%, 0.5%, 1%). Microscope images showed good compatibility between the polysaccharides and GEL. Basing on time required for 50% release, the WSSP-based film exhibited an approximately four-fold slower release rate ($t_{50\%} = 65.16\text{--}142.80$ min) than the GAR-based film ($t_{50\%} = 14.64\text{--}34.02$ min). This result was mainly ascribed to the slower dissolution of the WSSP-based carrier. The faster release rate of the GAR-based films resulted in stronger antioxidant activity (quarter-scavenging time ($t_{25\%ABTS}$) = 0.22–7.51 min) in comparison to the WSSP-based films ($t_{25\%ABTS} = 0.91\text{--}12.94$ min). The increase in the AST concentration was accompanied by gradually reduced solubility and the release rate. It is possible that the increasing number of starch granules (from the AST formulation) acted as a dissolution blocking agent. In general, the WSSP75/GEL25 film displayed the most linear (the Zero-order similar) release profile. So, this carrier has potential for release of AST at a quasi-constant speed.

Keywords: edible films; gum arabic; water-soluble soy polysaccharides; gelatin; FTIR; solubility; swelling; release rate; mathematical models; 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS)



Citation: Łupina, K.; Kowalczyk, D.; Kazimierczak, W. Gum Arabic/Gelatin and Water-Soluble Soy Polysaccharides/Gelatin Blend Films as Carriers of Astaxanthin—A Comparative Study of the Kinetics of Release and Antioxidant Properties. *Polymers* **2021**, *13*, 1062. <https://doi.org/10.3390/polym13071062>

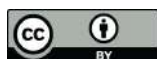
Academic Editor: Sergio Torres-Giner

Received: 3 March 2021

Accepted: 25 March 2021

Published: 28 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The growing demand for biodegradable packaging formats/types has increased the interest in eco-friendly films prepared from polysaccharides, proteins, and their blends. This type of materials can be applied as thin edible coatings, casing, wraps, layers separating various components in complex food products, dosage forms for packaging pre-weighed quantities of food, etc. Moreover, biopolymeric films can be used as carriers of a wide range of food preservatives. Antioxidant packaging is designed to delay food deterioration by slow release of antioxidants from the packaging material into the food surface, where the oxidation reactions mainly occur [1]. The designed migration of antioxidants from the active packaging system is a key determinant of its effectiveness in contact with water-rich foods. There are many mechanisms by which the release of active substances can be controlled in a system: dissolution, diffusion, osmosis, swelling, and erosion. They are dependent on the carrier type and may act simultaneously or at different stages of a migration process [2,3]. Biopolymers differ in their water affinities and, consequently,

release profiles [4,5]. For instance, the water-swollen gelatin (GEL) films can be fabricated for controlled-release purposes, while the fast-dissolving carrier matrices based on linear polysaccharides offer quick release (“burst effect”) [6,7]. The release rate should closely match the requirement of the kinetics of food spoilage. Too slow a rate would result in an insufficient amount of the active compounds to retard food deterioration, whereas too fast a rate would result in an excessive amount and loss of the active compounds due to degradation [8].

Branched polymers, due to a large variety of available shapes, topologies, and compositions, have numerous and various applications. Compared to linear polymers, branched polymers display lower density due to the reduced packing efficiency of their chains. This imparts a number of favorable properties, including low intrinsic viscosities, high solubilities, globular conformation, and high surface functionality (the high number of functionalizable groups on the periphery of the constructs), which allow drug attachment [9]. Currently, branched, grafted, dendritic, and star polymers are being intensively explored as future carriers owing to advances in polymer chemistry [10].

Hemicelluloses (a mixture of highly branched low-molecular-weight homo- and heteropolymers) are the second most abundant polysaccharides in nature, representing about 20–35% of lignocellulosic biomass [11]. Hemicelluloses can be novel promising vehicles for delayed release of food additives. In support, a recent study conducted by Łupina, Kowalczyk, and Drożdowska [12] showed that hemicelluloses, such as gum arabic (GAR) and water-soluble soy polysaccharides (WSSP), ensured a controlled rate of lipophilic vitamin C release. The GAR- and soy polysaccharide-based systems have also been used for targeted and sustained release of various pharmacological substances. Unfortunately, branching makes the polymers less dense, which results in low mechanical strength. However, reinforcement of hemicelluloses with stronger polymers, such as GEL and chitosan [13,14], can overcome this problem.

Carotenoids have been described not only as coloring agents but also as antioxidant compounds. Astaxanthin (ASX) is a pigment with higher antioxidant activity than other known natural antioxidants. ASX is contained in green algae *Haematococcus pluvialis* and red yeast *Phaffia rhodozyma* [15]. The oldest approach to obtain carotenoids is extraction from biological material [16]. The main disadvantage of this production method is the high cost, geographic determinants, and seasonality of the raw material. Moreover, natural carotenoids exhibit low resistance to external factors, a variable dye composition, and it is not easy to standardize their color. Chemical synthesis has been used in production of carotenoids since 1950. Of the nearly 700 naturally occurring carotenoids, only a few are synthesized on an industrial scale. Among them is ASX [17].

The available synthetic forms of ASX esters differ in their molecular profile from ASX obtained from extracts of living organisms [4]. First of all, synthetic ASX is an exclusively “free” compound (i.e., it is non-esterified and has no fatty acids attached to the ends of the molecule). Moreover, it contains no supporting carotenoids. Therefore, synthetic ASX has lower antioxidant potential than the natural one [18]. Nevertheless, the synthetic compound is much cheaper (US\$2500/kg) than the natural one (>US\$7000/kg) [19]. Consequently, over 95% of the ASX available on the market is produced synthetically, whereas natural ASX from *Haematococcus* represents <1% of the commercial product [20].

The 11 conjugated double bonds in the structure of ASX make it unstable, which seriously restricts its applications in functional foods and pharmaceutical and cosmetic products [9]. Addition of co-antioxidants to the ASX formulation reduces its decomposition, thus, this practice is commonly applied by large chemical companies.

The scientific literature is increasingly reporting the antioxidant and pro-health effects of synthetic ASX. Santocomo et al. [21] showed that synthetic ASX was capable of protecting the DNA of neuroblastoma cells exposed to reactive nitrogen species. Also, in human dermal fibroblasts exposed to moderate doses of UVA, synthetic ASX exhibited a pronounced photoprotective effect. In comparison with irradiated control cells, the formation of thiobarbituric acid reactive substances decreased to approximately 70% [22].

Gross and Lockwood [23] found that the water-dispersible disodium disuccinate derivative of synthetic ASX (Cardax™) exhibited a cardioprotective effect in Sprague Dawley rats.

The poor water solubility of natural ASX greatly reduces its bioavailability, which also has a negative effect on its practical applications. Therefore, the aim of this study was to characterize the release and antioxidant properties of binary 75/25 GAR/GEL (GAR75/GEL25) and WSSP/GEL (WSSP75/GEL25) blend films incorporated with increasing concentrations (0, 0.25, 0.5, 1%) of synthetic water-soluble AstaSana ASX (AST). The microstructure, pH, and water affinities (dissolution and swelling) of the films were determined to provide insight into the AST release mechanisms.

To the best of our knowledge, this is the first study on the release of water-soluble ASX from active packaging films.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Pork GEL (with a bloom strength of 240; McCormick-Kamis S.A., Stefanowo, Poland), GAR (Agri-Spray Acacia R, Agrigum International, Old Amersham, UK), WSSP (Gushen Biological Technology Group Co., LTD, Dezhou, China), glycerol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), and AST (gifted from DSM, Heerlen, Netherlands; composition: ASX, modified starch, glucose syrup, DL- α -tocopherol, and sodium ascorbate) were used for film preparation. 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) was purchased from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO (USA).

2.2. Film Preparation

The film-forming solutions (FFSs) were composed of a polysaccharide/GEL blend (5% *w/w*), glycerol (1% *w/w*), and increasing amounts of AST (0, 0.25, 0.5, 1% *w/w*). Powder polysaccharide/GEL 75/25 blends (3.75 g of polysaccharide blended with 1.25 g of GEL) were mixed with water (94 g) and glycerol (1 g), and then heated in a water bath at 90 °C for 1 h with constant stirring. The FFSs were cooled (to ~40 °C) and the AST was subsequently added (at the expense of reducing the amount of water). After degassing, the FFSs were placed on polycarbonate trays with an area of 4 cm². A constant amount of total solids (0.0125 g/cm²) was placed on the tray to keep the film thickness. The FFSs were dried at 25 ± 2 °C and 50 ± 5% relative humidity (RH) for 24 h.

2.3. pH

A glass electrode (Elmetron ERH-11S, Zabrze, Poland) connected to a pH meter (Elmetron CPC 401, Zabrze, Poland) was used for measurement of pH of the FFSs at 40 °C. The analyses were performed in triplicate.

2.4. Film Thickness

The thickness of the film samples was determined using a micrometer (Mitotuyo 547-401, Tokyo, Japan).

2.5. Film Conditioning

The film samples were conditioned (50% RH, 25 °C, 48 h) in a test chamber (MLR-350, Sanyo Electric Biomedical Co. Ltd., Osaka, Japan).

2.6. Microscopy

The FFSs were examined using an inverted microscope (Olympus CKX53, Tokyo, Japan), a polarized light microscope LEICA 5500B (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany), and a scanning electron microscope Carl Zeiss Ultra Plus (Oberkochen, Germany) using a cryogenic technique (cryo-SEM).

2.7. Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy

FTIR tests were carried out using a Thermo Nicolet 8700 FTIR spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) with a Smart Orbit accessory.

2.8. Water Affinities

The total soluble matter (TSM) was expressed as the percentage of film dry matter solubilized after immersion in water. The film specimens (4 cm²) were weighed (± 0.0001 g) and shaken with distilled water (25 mL, 30 \pm 1 °C, and 170 rpm) using a shaking incubator (ES-60, MIULAB, Hangzhou, China). Then, undissolved residues taken at different time points were removed from the water and dried (105 °C, 24 h). The initial dry matter content of the films, necessary for calculation of the TSM, was determined by drying at 105° for 24 h. Swelling (Sw) was evaluated by immersing the pre-weighed films (4 cm²) in distilled water (25 mL, 30 \pm 1 °C, 1 min). The weight of swollen films was measured, after blotting the surface gently with filter paper until equilibrium was reached. Sw was calculated as the percentage of water absorbed by the sample. The tests were performed in triplicate.

2.9. Release Test

The film discs (4 cm²) were shaken with distilled water (25 mL, 30 \pm 1 °C, 170 rpm, 4 h) in the shaking incubator. Two hundred and fifty microliters of the release media samples were taken at different time points and the absorbance was read at 464 nm using a microplate spectrophotometer (EPOCH 2 Microplate Spectrophotometer, BioTek, Winooski, USA). The analyses were performed in triplicate. DDSolver, i.e., add-in software for Microsoft Excel, was used for modeling the AST release kinetics. Ten mathematical models were chosen to fit the experimental data. The Akaike Information Criterion (AIC) was used for selection of the optimal mathematical models, which were used for determination of the quarter- and half-release times ($t_{25\%}$ and $t_{50\%}$). A lower AIC value indicates a better fit. The adjusted coefficient of determination (R^2_{adjusted}) values were estimated in order to present the accuracy of the $t_{25\%}$ and $t_{50\%}$ calculations [24].

2.10. Antiradical Activity

The film discs (4 cm²) were shaken with ABTS reagent (25 mL, 30 \pm 1 °C, 170 rpm) in the shaking incubator. Two hundred and fifty microliters of the mixture samples were taken at different time points and the absorbance was read at 734 nm using a spectrophotometer (Lambda 40, Perkin–Elmer, Shelton, CT, USA). The absorbance was measured until the reaction reached a plateau (3 h). The ability of the films to quench ABTS free radicals was calculated using Equation (1).

$$\text{Scavenging\%} = [1 - (\text{Abs}/\text{Abs}_{\text{ABTS}})] \times 100 \quad (1)$$

where Abs is the absorbance of the sample and Abs_{ABTS} is the absorbance of the ABTS solution (0.70 \pm 0.05). The tests were performed in triplicate.

The Weibull with F_{max} ($Wb F_{\text{max}}$) model was used for determination of quarter- and half-scavenging times ($t_{25\% \text{ABTS}}$ and $t_{50\% \text{ABTS}}$). The values of the adjusted coefficient of determination (R^2_{adjusted}) were estimated in order to present the accuracy of the $t_{25\% \text{ABTS}}$ and $t_{50\% \text{ABTS}}$ calculations.

2.11. Statistical Analysis

Differences among the data mean values were tested for statistical significance at the $p < 0.05$ level using analysis of variance (STATISTICA 13.1, StatSoft Inc., Tulsa, USA) and Fisher's test. The data were evaluated using Pearson's correlation coefficients to identify relationships between the TSM, the AST release, and the ABTS free radical scavenging ability.

3. Results and Discussion

3.1. Microstructure

Microscope images showed good compatibility between the polysaccharides and GEL (lack of aggregates/complexes) (Figure 1A,B), which agreed with our earlier observation [12]. As in previous study [12], the control GAR-based FFS had a uniform and smooth structure, while the WSSP-containing FFS showed a sandy topography (Figure 1B). The globular nature of the WSSP [25] and their limited solubility were probably responsible for the grainy microstructure of the WSSP75/GEL25 FFS. The AST-loaded FFSs and, consequently, the films were intensively red (Figure 2). The AST was more uniformly distributed in the GAR-based system as compared to the WSSP-based FFS (Figure 1B). In the latter carrier, many of the polysaccharide particles were not colorized by AST. It suggests that the WSSP are poorly wettable, which is partially confirmed by the Sw results (Table 1). Since the starch system was a carrier of ASX in the AST formulation, the starch granules, mainly with a diameter of ~ 15–70 μm , were observed in the AST-supplemented FFSs, as evidenced by the presence of Maltese crosses (Figure 1C). The cryogenic treatment of the FFSs resulted in formation of the porous polymeric scaffolds (Figure 1A). As can be seen, there were differences in the pore apertures of the control and AST-supplemented freeze-dried FFSs. It suggests that presence of AST affects process of cryogelation. It is known that incorporation of additional constituents significantly affects the appearance of the polymeric cryogels [6,7]. Lower molecular weight monomers are expected to form larger pores when compared to larger monomers, while an increase in the amount of reaction constituents raises the rigidity of cryogels, thickness of cryogel walls, and elasticity [26]. Interestingly, it was found that the AST could improve the cryo-cross-linking ability of the GAR-based FFS (more interconnected pores were formed) while destroying the structure of the WSSP-based cryo-gel. The observed changes, however, need to be interpreted with caution since other factors, such as temperature and freezing rate (which are not always easy to keep the same), as well as fracture-dependent pore orientation (longitudinal vs. cross-sectional), could significantly affect the quality of the prepared cryo-gels. The observation of the AST-loaded GAR-based cryo-gel showed that the starch grains were anchored in the polymeric scaffolds. Since only a small part of the sample was analyzed using the SEM techniques it was hard to detect and visualize the starch granules in the WSSP75/GEL25 FFS.

Table 1. Effect of the AstaSana (AST) concentration on pH of film-forming solutions (FFSs), thickness, and swelling (Sw) of 75/25 blend films obtained from polysaccharides: gum arabic (GAR), water-soluble soy polysaccharides (WSSP), and gelatin (GEL).

Film	AST (%)	pH of FFSs	Thickness (μm)	Sw (%)
GAR75/GEL25	0	5.31 \pm 0.01 ^g	85.27 \pm 2.77 ^a	499.40 \pm 25.88 ^d
	0.25	5.28 \pm 0.01 ^f	86.65 \pm 3.75 ^a	416.05 \pm 24.58 ^c
	0.5	5.25 \pm 0.01 ^e	87.65 \pm 3.12 ^a	416.51 \pm 20.07 ^c
	1	5.15 \pm 0.00 ^d	86.96 \pm 3.80 ^a	381.66 \pm 15.49 ^c
WSSP75/GEL25	0	5.01 \pm 0.01 ^c	85.53 \pm 3.84 ^a	301.32 \pm 26.52 ^b
	0.25	4.91 \pm 0.01 ^a	87.09 \pm 2.93 ^a	269.96 \pm 18.86 ^{ab}
	0.5	4.94 \pm 0.00 ^b	89.90 \pm 3.77 ^a	262.19 \pm 28.58 ^a
	1	4.94 \pm 0.01 ^b	89.02 \pm 2.53 ^a	255.86 \pm 14.63 ^a

^{a–g} Values with the different superscript letters within one column are significantly different ($p < 0.05$).

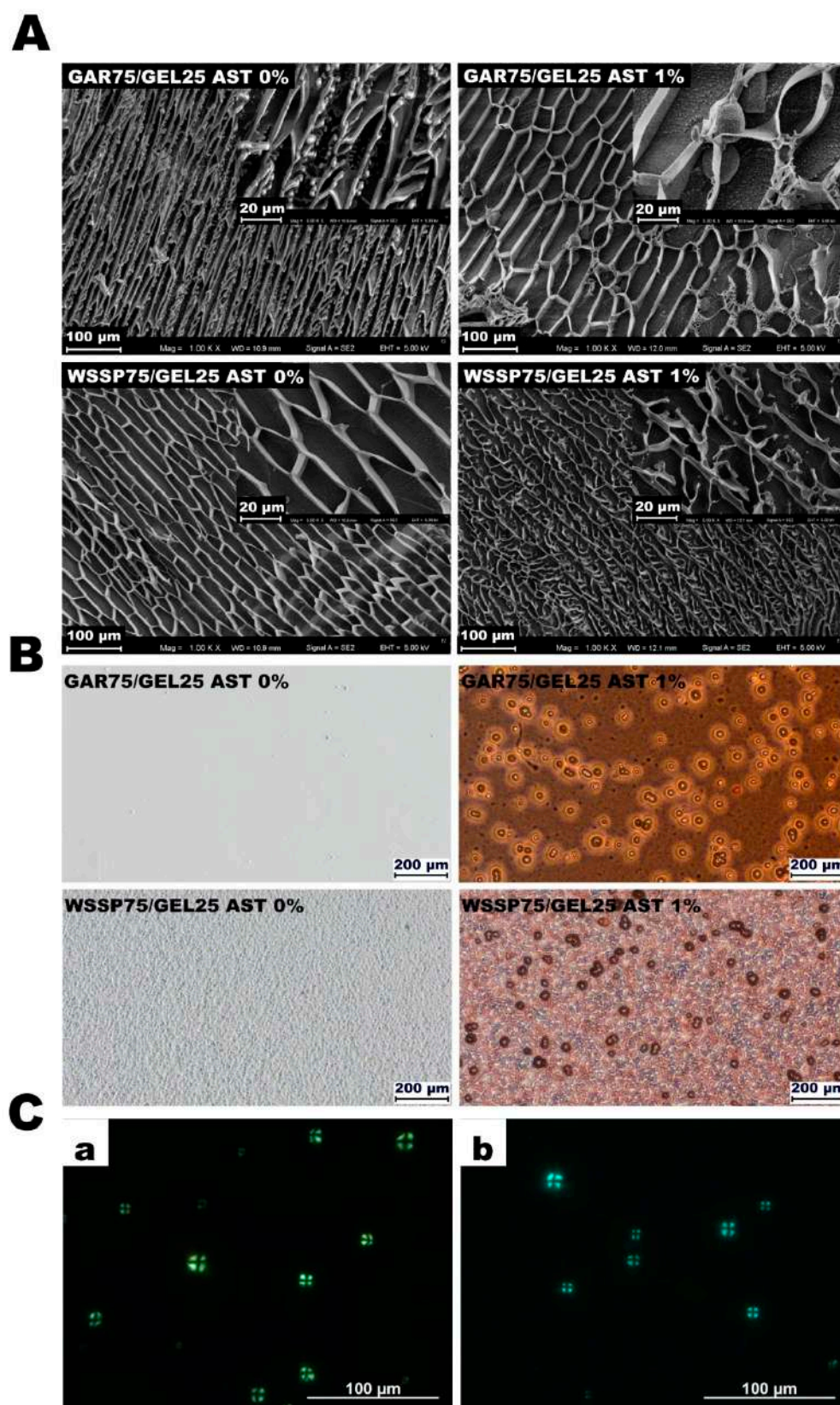


Figure 1. Images of AstaSana astaxanthin (AST)-free and 1%AST-supplemented film-forming solutions examined using the cryo-SEM technique (A) and the light microscope (B). Images of 0.5% AST-supplemented 75/25 gum arabic/gelatin (GAR75/GEL25) (a) and water-soluble soy polysaccharides/gelatin (WSSP75/GEL25) film-forming solutions (b) taken with the polarizing microscope (C).

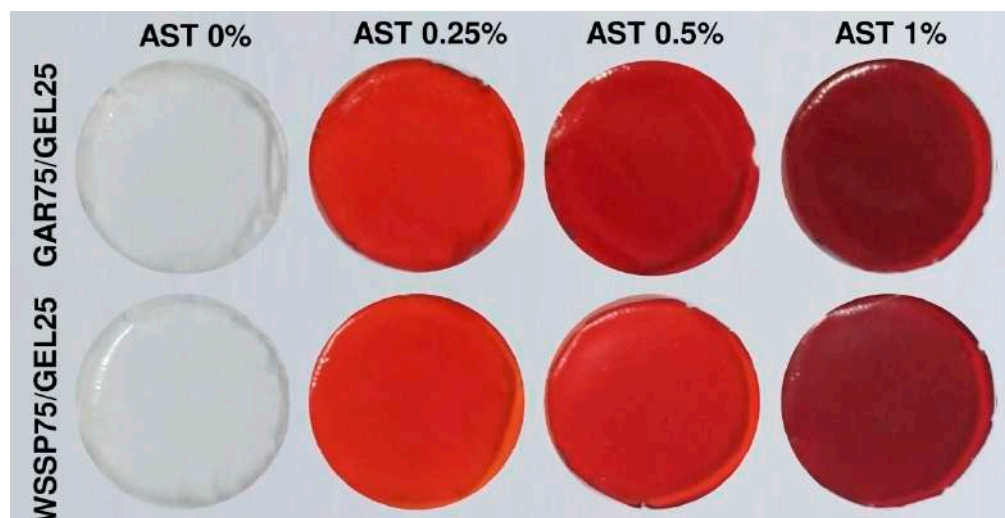


Figure 2. Images of AST-free and AST-supplemented polysaccharide75/GEL25 films.

3.2. FTIR

The infrared spectra of the control and 1%AST-supplemented films are presented in Figure 3. The peaks at 3272 cm^{-1} and 3287 cm^{-1} are attributed to amide A ($-\text{OH}$ and/or $-\text{NH}_2$) stretching. The broad absorption band at ~ 2930 and $\sim 2880\text{ cm}^{-1}$ represents the stretches in Amide B attributed to the stretching vibrations of asymmetric and symmetric methyl groups (CH_2). The spectra exhibited an intensive absorption at $1646\text{--}1633\text{ cm}^{-1}$ corresponding to the $\text{C}=\text{O}$ stretching vibration in Amide 1 band. The peak at $1695\text{--}1630\text{ cm}^{-1}$ is characteristic of the presence of the $-\text{CONH}_2$ group, which was most likely formed as the result of the interaction between GEL and polysaccharides [14]. The GAR- and WSSP-based films exhibited the asymmetric stretching vibration of carboxylate at 1554 and 1556 cm^{-1} , respectively. The set of vibrations (1454 , ~ 1337 , $\sim 1240\text{ cm}^{-1}$, 1148 cm^{-1}) is associated with hemicelluloses in the films [27]. The FTIR spectra of all samples showed a strong signal at $\sim 1020\text{ cm}^{-1}$, which suggests the presence of the $\text{C}-\text{N}$ group [28]. Surprisingly, the spectral profiles of the control and 1%AST-supplemented films were similar, which may be explained by the low amount of AST in the systems. Nevertheless, the AST-supplemented GAR75/GEL25 film showed a small new peak at 1148 cm^{-1} coming from $\nu(\text{C}-\text{O})$ stretching vibrations. Moreover, it was found that the presence of AST in the GAR- and WSSP-based films slightly decreased the intensity of peaks in the region of $1646\text{--}1554\text{ cm}^{-1}$. In accordance with the present results, previous studies have also demonstrated a decrease in the intensity of peaks (e.g., at 1634 and 1548 cm^{-1}), which was attributed to the fact that ASX inhibited electrostatic interactions with regard to amino and carbonyl groups within the composite chitosan/GEL film [29].

To date, limited data are available on the possible interactions of the water-soluble ASX with biopolymers. This study was unable to demonstrate the interaction mechanisms between the ASX and the polysaccharide/GEL binary complexes on the molecular level. Nevertheless, based on the fluorescence spectra, the specific interactions between natural ASX and biopolymers (mainly proteins) has been suggested. According to Li and Yan [30], the major part of the action force between ASX and ovalbumin are hydrophobic interactions. In turn, ASX binding to the oleic acid-loaded bovine serum albumin (BSA) complexes is mainly through hydrogen binding and van der Waals interactions [31]. Results of thermodynamic investigations conducted by Li and Li [32] suggested that hydrophobic forces and electrostatic attraction have a significant role in the interaction between ASX and the proteases.

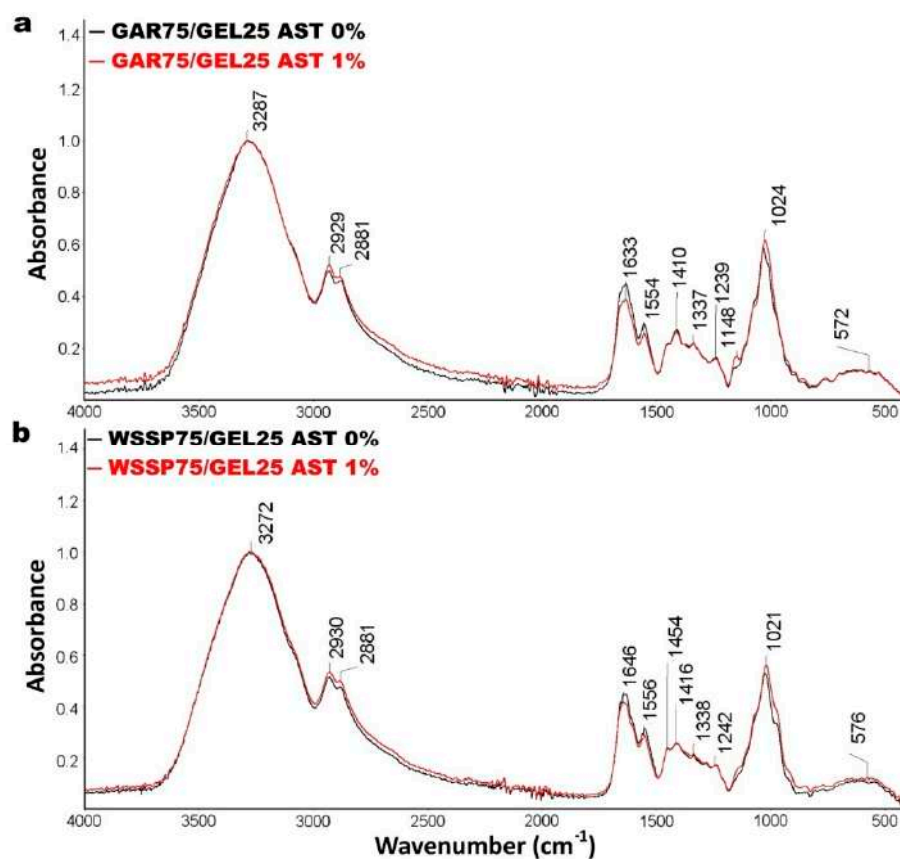


Figure 3. ATR-FTIR spectra of AST-free and 1%AST-supplemented GAR75/GEL25 (a) and WSSP75/GEL25 films (b).

In conclusion, methods other than FTIR should be used in order to get better insight into the possible AST-carrier interactions.

3.3. pH, Film Thickness, and Water Affinities

The GAR-based FFSs exhibited higher pH values than the FFSs based on WSSP (Table 1). This result agrees with previous findings [14] and can be explained by the presence of free carboxyl groups of D-glucuronic acid and 4-O-methyl D-glucuronic acid residues in the GAR [33]. As shown by Daoub et al. [34], the pH values for GAR are in the range from 4.45 to 4.94. According to the previous observations [14], the addition of GEL into GAR-based FFS results in reduction of acidity, which explains the pH values (5.15–5.31) observed in this study (Table 1). The incorporation of AST caused acidification of the FFSs. Since the pH of the commercial ASX formulations ranges from 4.50 to 5.00 [35] (i.e., is very similar to the GAR- and WSSP-based FFSs), only a slight decrease in pH was observed.

Since a constant amount of total solids (0.0125 g/cm²) was placed on the tray (i.e., with increasing the AST content, the smaller amount of FFSs was cast), the thickness of the films with and without AST was the same ($p > 0.05$, Table 1).

The analysis of water affinities (Table 1, Figure 4) demonstrated that the WSSP75/GEL25 film (less swellable and soluble) was less hydrophilic than the GAR-based carrier. As shown by Madea and Nakamura [36], WSSP contains higher hydrophobic peptide levels than GAR, which may affect its dissolution behavior. Due to the elevated incubation temperature (30 °C), the control GAR- and WSSP-based films were completely soluble after 10 and 30 min, respectively. In turn, the previous study [14] demonstrated that, at a lower dissolution temperature (25 °C), the TSM values of these films were ~82%. The temperature-dependent solubility of GEL (melting point \approx 32 °C [37]) was likely responsible for the

100% dissolution of the films. The presence of AST in the films reduced the solubility (Figure 4) and the S_w ability (Table 1). There are several possible explanations for this result. It is possible that, due to the presence of starch granules in the films (Figure 1), the water molecules with difficulty penetrated the blend polymeric network. Therefore, as the AST concentration increased, the S_w of the films tended to decrease (Table 1). Additionally, other components of the AST formulation may have developed hydrogen bonds with the bi-polymeric network, which hindered formation of polymer-water hydrogen bonds, resulting in a limited ability to absorb water.

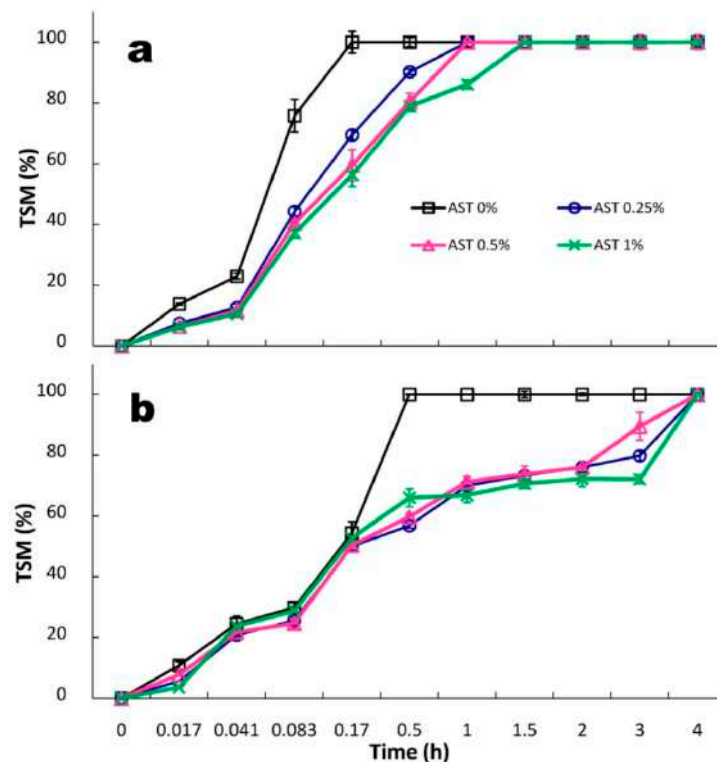


Figure 4. Kinetics of total soluble matter (TSM) of GAR75/GEL25 (a) and WSSP75/GEL25 films (b) loaded with increasing AST content.

3.4. Release of ASX

The elevated temperature (30 °C) was used to accelerate AST release from the films. This decision was made based on the preliminary study, which showed that the migration of AST from the carriers at 25 °C was incomplete although the compound was released for several days. The cumulative (mg/cm²) amounts of AST released from the GAR- and WSSP-based carriers are shown in Figure 5. In turn, Figure 6 presents the percentage of AST release. For both carriers, the lag times (T_{lag}) of the AST release were observed. The WSSP75/GEL25 film ensured a longer T_{lag} (thus, slower release) than the GAR-containing carrier (Figures 5 and 6). The values of $t_{50\%}$, calculated according to the best fitting kinetic models, showed that the WSSP75/GEL25 film exhibited ~4 times slower release compared to the GAR-based film (Table 2). Nevertheless, depending on the AST concentration, c.a. 95–97% and 77–99% of the AST was finally released from the GAR- and WSSP-based films, respectively.

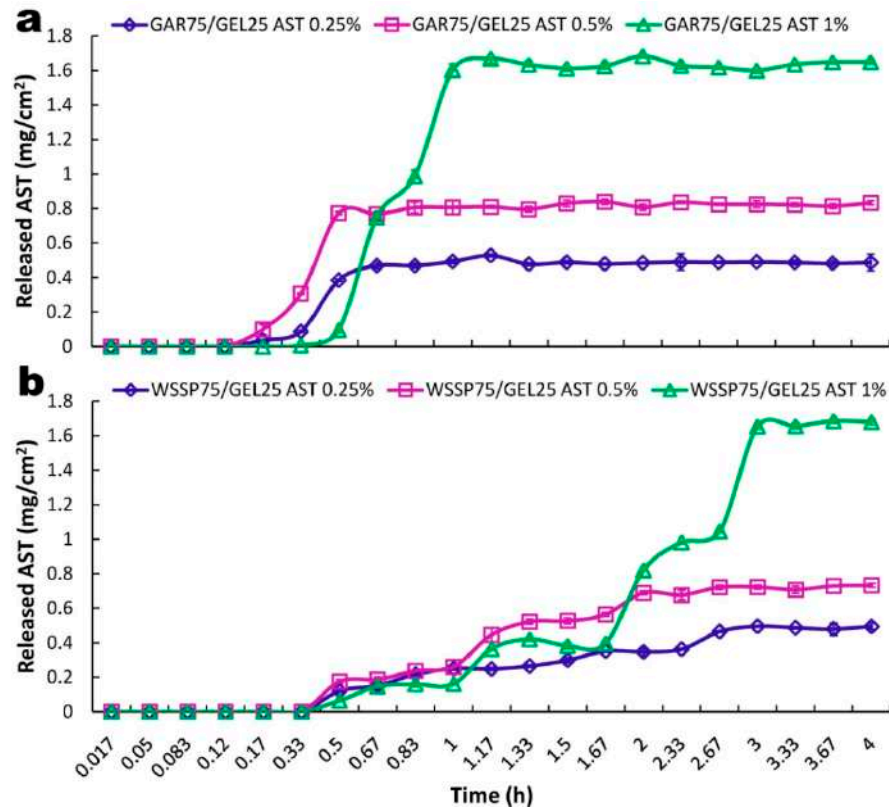


Figure 5. Kinetics of cumulative release (mg/cm²) of AST from GAR75/GEL25 (a) and WSSP75/GEL25 films (b).

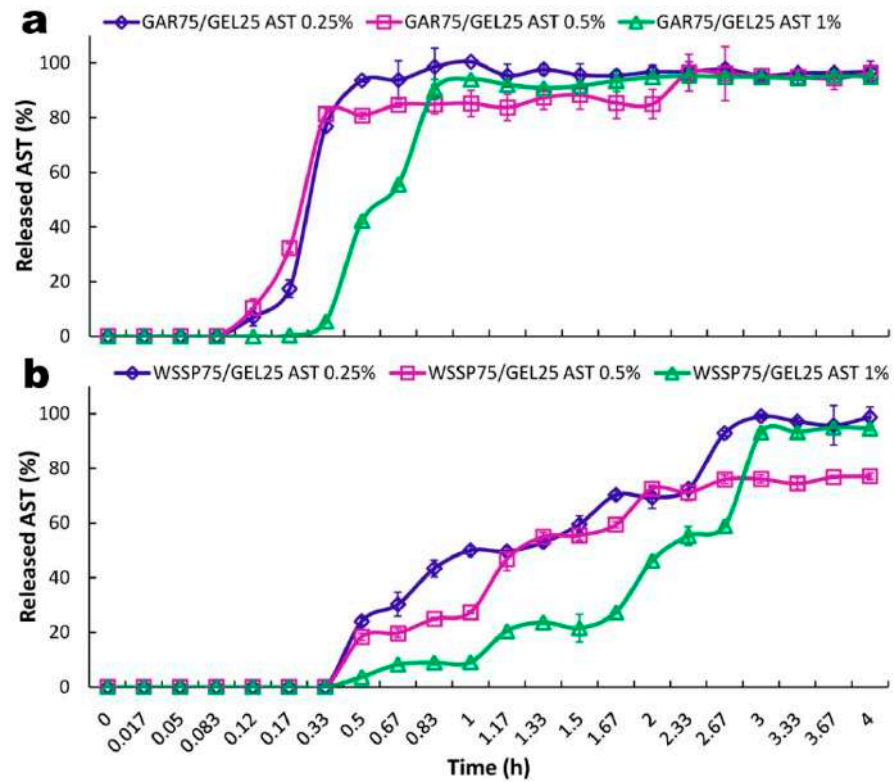


Figure 6. Kinetics of percentage release of AST from GAR75/GEL25 (a) and WSSP75/GEL25 films (b).

Table 2. Times required for 25% ($t_{25\%}$) and 50% ($t_{50\%}$) AST release from 75/25 blend films obtained from polysaccharides: gum arabic (GAR), water-soluble soy polysaccharides (WSSP), and gelatin (GEL). The quarter- and half-scavenging times ($t_{25\%ABTS}$ and $t_{50\%ABTS}$) of the films are shown.

Film	AST (%)	$t_{25\%}$ (min)	$t_{50\%}$ (min)	$R^2_{adjusted}$ ^	$t_{25\%ABTS}$ * (min)	$t_{50\%ABTS}$ * (min)
GAR75/GEL25	0	n.d	n.d	n.d.	42.10	120.76
	0.25	11.28	14.64	0.999 (Lo 2)	7.51	101.47
	0.5	10.2	21.72	0.992 (K-P Tlag)	0.64	1.94
	1	26.46	34.02	0.993 (Pr 2)	0.22	0.53
WSSP75/GEL25	0	n.d	n.d	n.d.	31.23	101.01
	0.25	31.68	65.16	0.988 (K-P Tlag)	12.94	54.95
	0.5	48.48	78.60	0.989 (Go 4)	2.34	30.21
	1	87.54	142.80	0.983 (Ho)	0.91	1.23

(K-P Tlag) obtained from the Korsmeyer–Peppas with T_{lag} model. (Ho) obtained from the Hopfenberg model. (Lo 2) obtained from the Logistic 2 model. (Go 4) obtained from the Gompertz 4 model. (Pr 2) obtained from the Probit 2 model. ^ the goodness of fit of the models. * data obtained from the Weibull with F_{max} model ($R^2 = 0.990$ – 1.000). n.d.—no data.

Generally, the release of an active substance from a polymer matrix can be categorized in three main processes: (i) diffusion from a non-degraded polymer (diffusion-controlled system); (ii) enhanced drug diffusion due to polymer swelling (swelling-controlled system); (iii) release via polymer degradation and erosion (erosion-controlled system) [38]. Since the carriers used in this study were fully water soluble (at 30 °C), it can be concluded that the AST release was mainly controlled by an erosion-driven process. Therefore, the less erodible character of the WSSP-containing film was probably responsible for the delayed AST release. As can be seen from Table 3, there was a high positive correlation ($R^2 = 0.70$ – 0.96) between the TSM and AST release.

Table 3. Correlation (R^2 *) between total soluble matter (TSM) and cumulative AST release (mg/cm^2) and correlation (R^2 **) between cumulative AST release (mg/cm^2) and antiradical activity of the GAR75/GEL25 and WSSP75/GEL25 blend films.

Film	AST (%)	R^2 *	R^2 **
GAR75/GEL25	0.25	0.93	0.87
	0.5	0.96	0.83
	1	0.91	0.34
WSSP75/GEL25	0.25	0.89	0.93
	0.5	0.88	0.89
	1	0.70	0.72
All formulations		0.89	0.47

There is, however, other possible explanation for the delayed release of AST from the WSSP-based carrier. It is known that drug release depends on the branching architecture of the polymers [39]. The atomic force microscopy revealed that WSSP has more highly branched star- or comb-shaped structures in comparison with GAR [40]. In this way, the slower release of AST from the WSSP-based film may be related to stronger physicochemical entrapment of the carotenoid in the matrix with a higher branching degree.

In general, there is a negative correlation between the drug release rate and the matrix swelling rate [41], mainly because a gel network in the swollen state entraps the drug and, thus, increases its diffusion pathway. Nevertheless, in this study, the release of AST from the more swellable matrix system (GAR-based film) was faster than from the less swellable WSSP-based film. It confirms that the matrix swelling was less involved in the AST release. A possible explanation for this might be that at 30°C the swelling of the thin-film carriers was slower than their erosion.

Generally, the increase in the AST concentration resulted in a slower release rate, as indicated by comparison of the $t_{50\%}$ values (Table 2). This trend reflects the solubility behavior of the films; i.e., as the AST content increased, the samples tended to be less soluble.

3.5. Mathematical Modeling

In this study, ten mathematical equations (Table S1) were used to determine the kinetics of the AST release from the films (Figures 7 and 8). The identification of the best fitting models with the use of AIC is presented in Table S2, while the parameter values obtained from the mathematical modeling are shown in Table S3 and Table S4. It was impossible to fit one optimal model to describe the migration of AST from the particular carrier types (Table S2). As can be seen from Figures 7 and 8, the WSSP-based carrier had a more linear release profile than the GAR-containing film. Consequently, the Zero-order (Z–O) and Z–O with T_{lag} models had a quite good prediction accuracy for this carrier (Figure 7). The Z–O model describes the system in which a drug is released at a constant rate. Therefore, it can be concluded that the WSSP75/GEL25 carrier may be useful as an extended-release AST system. In particular, the 1% AST-supplemented WSSP75/GEL25 film has the best potential for controlling AST release. According to the Korsmeyer–Peppas with T_{lag} model (K–P with T_{lag}), AST in this system was transported via a non-Fickian system (n value between 0.5 and 1), suggesting coupling of the diffusion and erosion release mechanisms (anomalous diffusion). In the non-Fickian type, the swelling or polymeric chain or relaxation is the governing release mechanism, and the migration kinetics obeys the Z–O equation. In the case of the other films, the n values were below 0.5 ($n = 0.006–0.451$), which was indicative of a quasi-Fickian-controlled mechanism [42]. This suggests that diffusion was the dominant mechanism of AST release from most of the samples. This finding is consistent with that reported by Colín-Chávez et al. [43], who analyzed diffusion of natural ASX from polyethylene active packaging films into ethanol.

3.6. Antioxidant Properties

Various encapsulating agents have been recently proposed as delivery systems for ASX [44]. It was found that encapsulation of ASX in biopolymers protects it from degradation and improves its bioaccessibility and bioavailability. So far, limited data are available on the effect of biopolymers on the antioxidant activity of ASX. Figure 9 presents the kinetics of the free radical scavenging capacity of the films. Both the bi-polymeric carriers exhibited quite good antiradical activity (Figure 9). The comparison of the $T_{25\%ABTS}$ values of the control films revealed that the WSSP75/GEL25 carrier had higher antioxidant potential than the GAR75/GEL25 film (31.23 vs. 42.10 min, Table 2). Some authors link the antioxidant activity of polysaccharides to the bounded protein fraction [45,46]. Following this understanding, it may be assumed that GEL (in spite of its lower concentration in the films) had a greater contribution to the antiradical potential of the carriers than polysaccharides. Numerous studies showed that GEL films exhibited fine antiradical activity [47,48]. The antioxidant properties of proteins are closely related to specific amino acids and/or their sequences, structure, and hydrophobic properties. As reported by Nurilmala et al. [49], fish skin gelatin has higher levels of antioxidants than meat protein due to the high concentration of glycine and proline, which are able to donate electrons, thus, neutralizing free radicals.

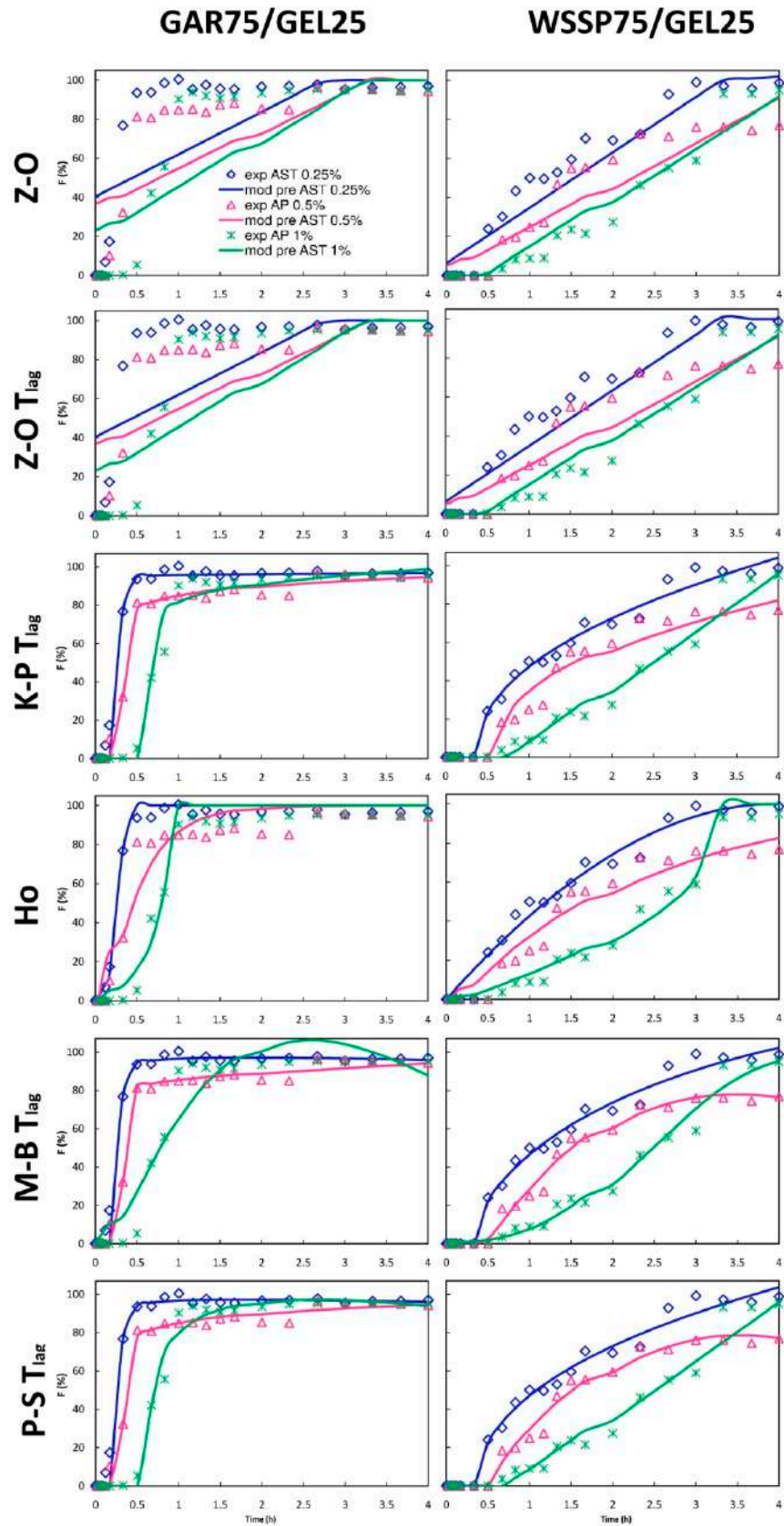


Figure 7. Fraction (F) of AST released from polysaccharide75/GEL25 films according to the Zero-order (Z-O), Zero-order with T_{lag} (Z-O T_{lag}), Korsmeyer–Peppas with T_{lag} (K-P T_{lag}), Hopfenberg (Ho), Makoid–Banakar with T_{lag} (M-B T_{lag}), and Peppas–Sahlin 1 with T_{lag} (P-S T_{lag}) models; experimental (exp) and model predicted data (mod pre).

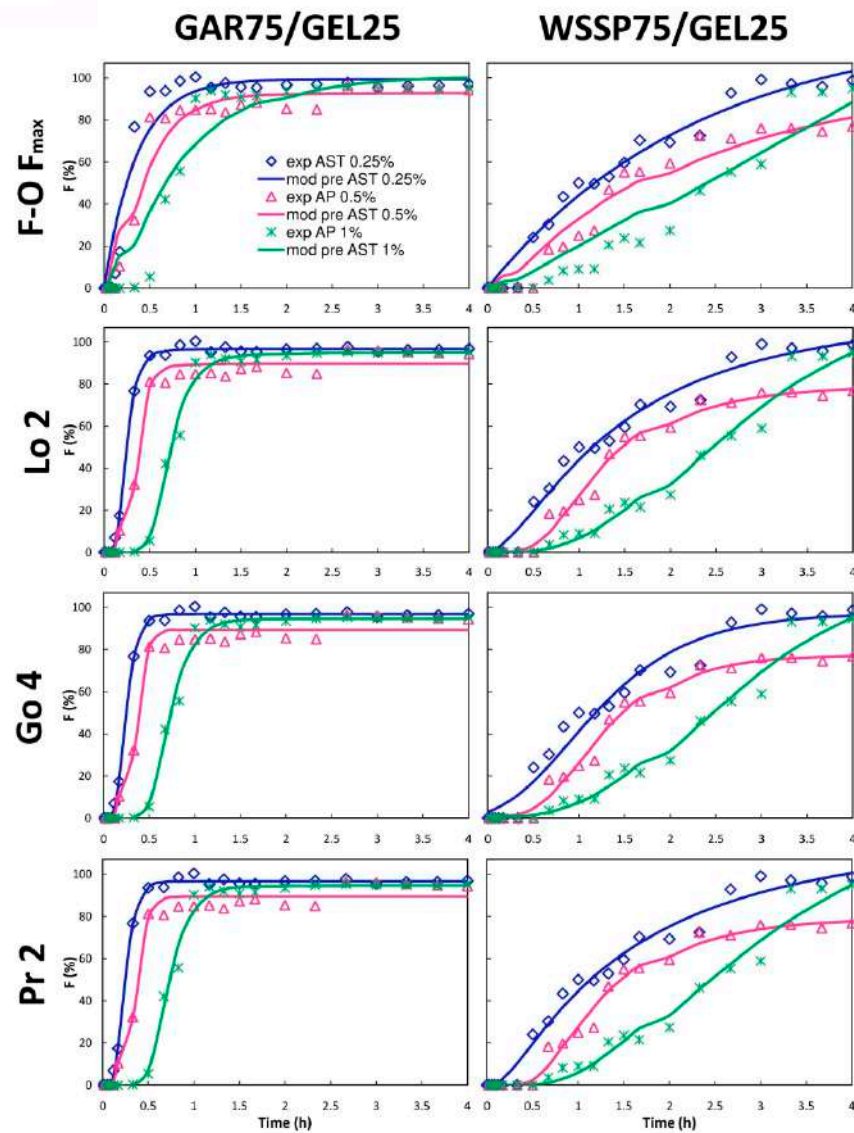


Figure 8. Fraction (F) of AST released from polysaccharide75/GEL25 films according to the First order with F_{\max} (F-O F_{\max}), Logistic 2 (Lo 2), Gompertz 4 (Go 4), and Probit 2 (Pr 2) models; experimental (exp) and model predicted data (mod pre).

A dose-dependent relationship was found between the ABTS⁺ scavenging activity and the AST content in the films (Figure 9). The addition of AST more efficiently increased the antioxidant potential of the GAR-based film than the WSSP-containing film. Initially (up to 30 min), the GAR-based systems (regardless of the AST concentration), exhibited stronger antioxidant potential than the WSSP-based films, as evidenced by their lower $t_{25\%ABTS}$ values (Table 2). This result reflects the AST release profiles (Figure 5), i.e., the faster release rate of the GAR-based film (Figure 6) resulted in stronger antioxidant activity (Figure 9). The data obtained for the longer incubation periods showed that this behavior was noted only for the 0.5 and 1% AST-supplemented films (Figure 9). Surprisingly, the 0.25% AST-supplemented WSSP-based system exhibited higher antioxidant activity than the GAR-containing film. It is difficult to explain this result, but it might be related to the fact that the control WSSP-based carrier had natively higher antioxidant potential compared to the GAR-based film. In the case of most systems (with the exception of the 1% AST-supplemented GAR-based film), a high positive correlation was found between the antioxidant activity and cumulative AST release ($R^2 = 0.72\text{--}0.93$; Table 3). Interestingly,

weaker correlations between the data were found as the AST concentration increased. It can be assumed that other antioxidants (DL- α -tocopherol and sodium ascorbate) present in the AST formulation altered the antioxidative capacity of the films, especially the systems containing the highest AST load.

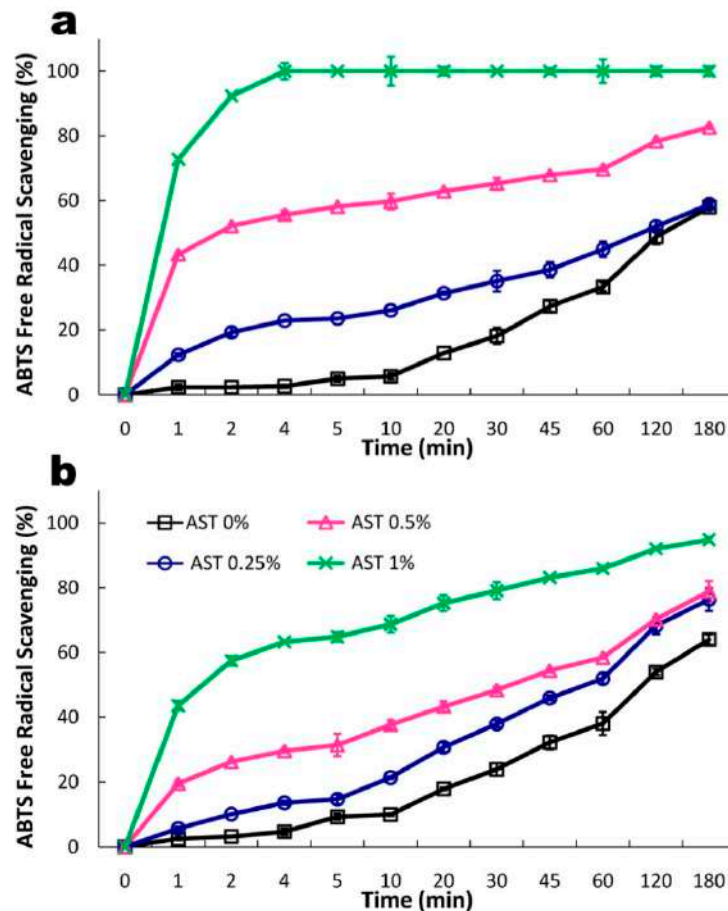


Figure 9. Kinetics of antioxidant activity of GAR75/GEL25 (a) and WSSP75/GEL25 films (b) loaded with increasing AST content.

4. Conclusions

One of the most important characteristics of biopolymers is the possibility to act as carriers to ensure controlled release active of substances. Polymer selection provides the easiest approach by which the active compound migration can be adjusted to the specific needs. The branched polymer systems have the potential to overcome the issues facing immediate-release. As expected, the concept of blending GEL with different branched polysaccharides was found useful in the development of delayed release carrier systems exhibiting a period without AST release (time lag). The WSSP-based carrier (less erodible in water) ensured higher AST trapping efficiency than the GAR-based film (more erodible). Since the WSSP-based carrier demonstrated more proportional AST release rate (close to the Z-O kinetics), it can be assumed that, when this active system is applied in foods (high in moisture content) in the form of coating, casing, or wrap, the AST will persist on the food surface for an extended period of time. The partial immobilization of antioxidant in the packaging material is beneficial since many foods oxidize primarily on the surface.

Likely due to the increasing number of starch granules (from the AST formulation) in the film matrix, the increase in the AST concentration was accompanied by gradually reduced solubility and, consequently, reduced the release rate. This implies that native

starch, acting as a potential binder and/or dissolution blocking agent, is helpful in retarding AST release.

A further study should assess the effect of AST on the optical, mechanical, and barrier properties of the obtained films to provide a more useful guide in establishing the best compromise between conflicting demands for film properties.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/polym13071062/s1>, Table S1: Mathematical models used to describe the dissolution curves [24], Table S2: Comparison of AIC values obtained from fitting experimental data to the different release models, Table S3: Parameters obtained from fitting experimental data to the release models with the F_{\max} parameter, Table S4: Kinetic parameters obtained from modeling without the F_{\max} parameter.

Author Contributions: Conceptualization, K.Ł. and D.K.; methodology, D.K.; validation, K.Ł. and D.K.; formal analysis, K.Ł.; investigation, K.Ł. and W.K.; data curation, K.Ł.; writing—original draft preparation, K.Ł.; writing—review and editing, D.K.; visualization, K.Ł. and W.K.; supervision, D.K.; project administration, K.Ł.; funding acquisition, K.Ł. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was financially supported by the National Science Centre (Poland) under grant number 2019/35/N/NZ9/01795.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data present in this study are available on request from the first author (Katarzyna Łupina).

Acknowledgments: We thank Emil Zięba (Laboratory of Confocal and Electron Microscopy, Centre for Interdisciplinary Research Faculty of Science and Health, John Paul II Catholic University of Lublin, Konstantynów 1J, 20-708 Lublin, Poland) for assistance with cryo-SEM observation of the samples.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kontominas, M. *Bioactive Food Packaging: Strategies, Quality, Safety*; Kontominas, M., Ed.; DEStech Publications, Inc.: Lancaster, PA, USA, 2017.
2. Cardea, S.; Baldino, L.; Reverchon, E. Comparative study of PVDF-HFP-curcumin porous structures produced by supercritical assisted processes. *J. Supercrit. Fluids* **2018**, *133*, 270–277. [[CrossRef](#)]
3. Bruschi, M.L. Main mechanisms to control the drug release. In *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*; Woodhead Publishing: Cambridge, UK, 2015; pp. 37–62; ISBN 9780081000922.
4. Kowalczyk, D.; Baraniak, B. Effect of candelilla wax on functional properties of biopolymer emulsion films—A comparative study. *Food Hydrocoll.* **2014**, *41*, 195–209. [[CrossRef](#)]
5. Kowalczyk, D.; Kazimierczak, W.; Zięba, E.; Mężyńska, M.; Basiura-Cembala, M.; Lisiecki, S.; Karaś, M.; Baraniak, B. Ascorbic acid- and sodium ascorbate-loaded oxidized potato starch films: Comparative evaluation of physicochemical and antioxidant properties. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *181*, 317–326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Kowalczyk, D.; Kordowska-Wiater, M.; Karaś, M.; Zięba, E.; Mężyńska, M.; Wiącek, A.E. Release kinetics and antimicrobial properties of the potassium sorbate-loaded edible films made from pullulan, gelatin and their blends. *Food Hydrocoll.* **2020**, *101*, 105539. [[CrossRef](#)]
7. Kowalczyk, D.; Pytka, M.; Szymanowska, U.; Skrzypek, T.; Łupina, K.; Biendl, M. Release kinetics and antibacterial activity of potassium salts of iso- α -acids loaded into the films based on gelatin, carboxymethyl cellulose and their blends. *Food Hydrocoll.* **2020**, *109*, 106104. [[CrossRef](#)]
8. Chen, X.; Chen, M.; Xu, C.; Yam, K.L. Critical review of controlled release packaging to improve food safety and quality. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2019**, *59*, 2386–2399. [[CrossRef](#)]
9. Cook, A.B.; Perrier, S. Branched and dendritic polymer architectures: Functional nanomaterials for therapeutic delivery. *Adv. Funct. Mater.* **2020**, *30*, 1–24. [[CrossRef](#)]
10. Lutz, P.J.; Peruch, F. Graft copolymers and comb-shaped homopolymers. In *Polymer Science: A Comprehensive Reference*, 10 Volume Set; Moeller, M., Matyjaszewski, K., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2012; Volume 6, pp. 511–542; ISBN 9780080878621.
11. Sorieul, M.; Dickson, A.; Hill, S.J.; Pearson, H. Plant fibre: Molecular structure and biomechanical properties, of a complex living material, influencing its deconstruction towards a biobased composite. *Materials* **2016**, *9*, 618. [[CrossRef](#)]

12. Łupina, K.; Kowalczyk, D.; Drożdżowska, E. Polysaccharide/gelatin blend films as carriers of ascorbyl palmitate—A comparative study. *Food Chem.* **2020**, *333*. [[CrossRef](#)]
13. Rezaie, A.; Rezaei, M.; Alboofetileh, M. Preparation of biodegradable carboxymethyl cellulose-Arabic gum composite film and evaluation of the physical, mechanical and thermal properties (in persian). *Food Sci. Technol. Res.* **2021**, *17*, 287–297. [[CrossRef](#)]
14. Łupina, K.; Kowalczyk, D.; Zięba, E.; Kazimierczak, W.; Meżyńska, M.; Basiura-Cembala, M.; Wiącek, A.E. Edible films made from blends of gelatin and polysaccharide-based emulsifiers—A comparative study. *Food Hydrocoll.* **2019**, *96*, 555–567. [[CrossRef](#)]
15. Ambati, R.R.; Moi, P.S.; Ravi, S.; Aswathanarayana, R.G. Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications—A review. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 128–152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Dasgupta, A.; Klein, K. Fruits, Vegetables, and nuts good sources of antioxidant. In *Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2014; pp. 209–235; ISBN 9780124058729.
17. Bogacz-Radomska, L.; Harasym, J. β -Carotene-properties and production methods. *Food Qual. Saf.* **2018**, *2*, 69–74. [[CrossRef](#)]
18. Capelli, B.; Bagchi, D.; Cysewski, G.R. Synthetic astaxanthin is significantly inferior to algal-based astaxanthin as an antioxidant and may not be suitable as a human nutraceutical supplement. *Nutrafoods* **2013**, *12*, 145–152. [[CrossRef](#)]
19. Hu, I.-C. Production of potential coproducts from microalgae. In *Biomass, Biofuels, Biochemicals*; Pandey, A., Chang, J.-S., Soccol, C.R., Lee, D.-J., Chisti, Y.B.T.-B., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 345–358; ISBN 9780444641922.
20. Koller, M.; Muhr, A.; Braunegg, G. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Res.* **2014**, *6*, 52–63. [[CrossRef](#)]
21. Santocono, M.; Zurria, M.; Berrettini, M.; Fedeli, D.; Falcioni, G. Lutein, zeaxanthin and astaxanthin protect against DNA damage in SK-N-SH human neuroblastoma cells induced by reactive nitrogen species. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2007**, *88*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Camera, E.; Mastrofrancesco, A.; Fabbri, C.; Daubrawa, F.; Picardo, M.; Sies, H.; Stahl, W. Astaxanthin, canthaxanthin and β -carotene differently affect UVA-induced oxidative damage and expression of oxidative stress-responsive enzymes. *Exp. Dermatol.* **2009**, *18*, 222–231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Gross, G.J.; Lockwood, S.F. Acute and chronic administration of disodium disuccinate astaxanthin (CardaxTM) produces marked cardioprotection in dog hearts. *Mol. Cell. Biochem.* **2005**, *272*, 221–227. [[CrossRef](#)]
24. Zhang, Y.; Huo, M.; Zhou, J.; Zou, A.; Li, W.; Chengli, Y.; Xie, S. DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. *AAPS J.* **2010**, *12*, 263–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Wang, Q.; Huang, X.; Nakamura, A.; Burchard, W.; Hallett, F.R. Molecular characterisation of soybean polysaccharides: An approach by size exclusion chromatography, dynamic and static light scattering methods. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 2637–2644. [[CrossRef](#)]
26. Bakhshpour, M.; Idil, N.; Perçin, I.; Denizli, A. Biomedical applications of polymeric cryogels. *Appl. Sci.* **2019**, *9*, 553. [[CrossRef](#)]
27. Mazurek, S.; Mucciolo, A.; Humbel, B.M.; Nawrath, C. Transmission Fourier transform infrared microspectroscopy allows simultaneous assessment of cutin and cell-wall polysaccharides of Arabidopsis petals. *Plant. J.* **2013**, *74*, 880–891. [[CrossRef](#)]
28. Coates, J. Interpretation of infrared spectra, a practical approach. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*; Meyers, R., Ed.; John Wiley & Sons, Ltd.: Hoboken, NJ, USA, 2006; pp. 1–23; ISBN 9780470027318.
29. Xu, J.; Wei, R.; Jia, Z.; Song, R. Characteristics and bioactive functions of chitosan/gelatin-based film incorporated with ϵ -polylysine and astaxanthin extracts derived from by-products of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Food Hydrocoll.* **2020**, *100*, 105436. [[CrossRef](#)]
30. Li, X.; Yan, Y. Comparative Study of the Interactions between Ovalbumin and five Antioxidants by Spectroscopic Methods. *J. Fluoresc.* **2017**, *27*, 213–225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Liu, Y.; Huang, L.; Li, D.; Wang, Y.; Chen, Z.; Zou, C.; Liu, W.; Ma, Y.; Cao, M.J.; Liu, G.M. Re-assembled oleic acid-protein complexes as nano-vehicles for astaxanthin: Multispectral analysis and molecular docking. *Food Hydrocoll.* **2020**, *103*. [[CrossRef](#)]
32. Li, X.; Li, P. Study on the interaction of β -carotene and astaxanthin with trypsin and pepsin by spectroscopic techniques. *Luminescence* **2016**, *31*, 782–792. [[CrossRef](#)]
33. Karamalla, K.A.; Siddig, N.E.; Osman, M.E. Analytical data for Acacia senegal var. senegal gum samples collected between 1993 and 1995 from Sudan. *Food Hydrocoll.* **1998**, *12*, 373–378. [[CrossRef](#)]
34. Daoub, R.M.A.; Elmubarak, A.H.; Misran, M.; Hassan, E.A.; Osman, M.E. Characterization and functional properties of some natural Acacia gums. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* **2018**, *17*, 241–249. [[CrossRef](#)]
35. Eren, B.; Tuncay Tanrıverdi, S.; Aydın Köse, F.; Özer, Ö. Antioxidant properties evaluation of topical astaxanthin formulations as anti-aging products. *J. Cosmet. Dermatol.* **2019**, *18*, 242–250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Maeda, H.; Nakamura, A. Soluble soybean polysaccharide. In *Handbook of Hydrocolloids: Second Edition*; Williams, P.A., Phillips, G.O., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridge, UK, 2009; pp. 693–709; ISBN 9781845694142.
37. Ninan, G.; Joseph, J.; Aliyamveetil, Z.A. A comparative study on the physical, chemical and functional properties of carp skin and mammalian gelatins. *J. Food Sci. Technol.* **2014**, *51*, 2085–2091. [[CrossRef](#)]
38. Martínez-Álvarez, Ó.; Calvo, M.M.; Gómez-Estaca, J. Recent advances in astaxanthin micro/nanoencapsulation to improve its stability and functionality as a food ingredient. *Mar. Drugs* **2020**, *18*, 406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Podzimek, S. Characterization of branched polymers. In *Light Scattering, Size Exclusion Chromatography and Asymmetric Flow Field Flow Fractionation: Powerful Tools for the Characterization of Polymers, Proteins and Nanoparticles*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2011; pp. 154–157.

40. Ikeda, S.; Funami, T.; Zhang, G. Visualizing surface active hydrocolloids by atomic force microscopy. *Carbohydr. Polym.* **2005**, *62*, 192–196. [[CrossRef](#)]
41. Bettini, R.; Santi, P.; Peracchia, M.T.; Catellani, P.L.; Colombo, P. Relationship between swelling and drug release in hydrogel matrices. *Proc. Control. Release Soc.* **1993**, *19*, 218–219.
42. Malekjani, N.; Jafari, S.M. Modeling the release of food bioactive ingredients from carriers/nanocarriers by the empirical, semiempirical, and mechanistic models. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2021**, *20*, 3–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Colín-Chávez, C.; Soto-Valdez, H.; Peralta, E.; Lizardi-Mendoza, J.; Balandrán-Quintana, R. Diffusion of natural astaxanthin from polyethylene active packaging films into a fatty food simulant. *Food Res. Int.* **2013**, *54*, 873–880. [[CrossRef](#)]
44. Edelman, R.; Engelberg, S.; Fahoum, L.; Meyron-Holtz, E.G.; Livney, Y.D. Potato protein-based carriers for enhancing bioavailability of astaxanthin. *Food Hydrocoll.* **2019**, *96*, 72–80. [[CrossRef](#)]
45. Yang, X.; Zhao, Y.; Lv, Y.; Yang, Y.; Ruan, Y. Protective effect of polysaccharide fractions from *Radix A. sinensis* against tert-butylhydroperoxide induced oxidative injury in murine peritoneal macrophages. *J. Biochem. Mol. Biol.* **2007**, *40*, 928–935. [[CrossRef](#)]
46. Kong, H.; Yang, J.; Zhang, Y.; Fang, Y.; Nishinari, K.; Phillips, G.O. Synthesis and antioxidant properties of gum arabic-stabilized selenium nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *65*, 155–162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Kchaou, H.; Benbettaïeb, N.; Jridi, M.; Abdelhedi, O.; Karbowiak, T.; Brachais, C.H.; Léonard, M.L.; Debeaufort, F.; Nasri, M. Enhancement of structural, functional and antioxidant properties of fish gelatin films using Maillard reactions. *Food Hydrocoll.* **2018**, *83*, 326–339. [[CrossRef](#)]
48. Kowalczyk, D.; Szymanowska, U.; Skrzypek, T.; Basiura-Cembala, M.; Łupina, K.; Biendl, M. Edible films based on gelatin, carboxymethyl cellulose, and their blends as carriers of potassium salts of iso- α -acids: Structural, physicochemical and antioxidant properties. *Food Hydrocoll.* **2021**, *115*. [[CrossRef](#)]
49. Nurilmala, M.; Hizbullah, H.H.; Karnia, E.; Kusumaningtyas, E.; Ochiai, Y. Characterization and antioxidant activity of collagen, gelatin, and the derived peptides from Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) skin. *Mar. Drugs* **2020**, *18*, 98. [[CrossRef](#)]

Table 1. Mathematical models used to describe the dissolution curves [24].

Model.	Equation	Parameters
Zero-order (Z-O)	$F = k_0 \cdot t$	k_0
Zero-order with T_{lag} (Z-O T_{lag})	$F = k_0 \cdot (t - T_{lag})$	k_0, T_{lag}
First order with F_{max} (F-O F_{max})	$F = F_{max} \cdot (1 - e^{-k_1 \cdot t})$	k_1, F_{max}
Korsmeyer–Peppas with T_{lag} (K-P T_{lag})	$F = k_{KP} \cdot (t - T_{lag})^n$	k_{KP}, n, T_{lag}
Hopfenberg (Ho)	$F = 100 \cdot [1 - (1 - k_{HB} \cdot t)^n]$	k_{HB}, n
Makoid–Banakar with T_{lag} (M-B T_{lag})	$F = k_{MB} \cdot (t - T_{lag})^n \cdot \text{Exp}[-k \cdot (t - T_{lag})]$	k_{MB}, n, k, T_{lag}
Peppas–Sahlin 1 with T_{lag} (P-S T_{lag})	$F = k_1 \cdot (t - T_{lag})^m + k_2 \cdot (t - T_{lag})^{2m}$	k_1, k_2, m, T_{lag}
Logistic 2 (Lo 2)	$F = F_{max} \frac{[e^{a+\beta \cdot \log(t)}]}{1 + e^{a+\beta \cdot \log(t)}}$	α, β, F_{max}
Gompertz 4 (Go 4)	$F = F_{max} \cdot e^{-\beta \cdot e^{-k \cdot t}}$	k, β, F_{max}
Probit 2 (Pr 2)	$F = F_{max} \cdot \Phi[a + \beta \cdot \log(t)]$	α, β, F_{max}
Weibull with F_{max} (Wb F_{max})	$F = F_{max} \cdot \left[1 - e^{-\frac{(t-Ti)^\beta}{\alpha}} \right]$	$\alpha, \beta, Ti, F_{max}$

F is the fraction (%) of drug released in time t .

k_0 is the Zero-order release constant

T_{lag} is the lag time prior to drug release

k_1 is the First-order release constant

F_{max} is the maximum fraction of the drug released at infinite time

k_{KP} is the release constant incorporating structural and geometric characteristics of the drug-dosage form; n is the diffusional exponent indicating the drug-release mechanism

k_{HB} is the combined constant in Hopfenberg model, $k_{HB} = k_0/(C_0 \times a_0)$, where k_0 is the erosion rate constant, C_0 is the initial concentration of drug in the matrix, and a_0 is the initial radius for a sphere or cylinder or the half thickness for a slab; n is 1, 2, and 3 for a slab, cylinder, and sphere, respectively

$k_{MB}, n,$ and k are empirical parameters in Makoid–Banakar model ($k_{MB}, n, k > 0$)

k_1 is the constant related to the Fickian kinetics; k_2 is the constant related to Case-II relaxation kinetics; m is the diffusional exponent for a device of any geometric shape which inhibits controlled release

α is the scale factor in Logistic 1 and 2 models; β is the shape factor in Logistic 1 and 2 models

β is the scale factor in Gompertz 4 model; k is the shape factor in Gompertz 4 model

Φ is the standard normal distribution; α is the scale factor in Probit model; β is the shape factor in Probit model

α is the scale parameter which defines the time scale of the process; β is the shape parameter which characterizes the curve as either exponential ($\beta = 1$; case 1), sigmoid, S-shaped, with upward curvature followed by a turning point ($\beta > 1$; case 2), or parabolic, with a higher initial slope and after that consistent with the exponential ($\beta < 1$; case 3)

T_i is the location parameter which represents the lag time before the onset of the dissolution or release process and in most cases will be near zero

Table 2. Comparison of AIC values obtained from fitting experimental data to the different release models.

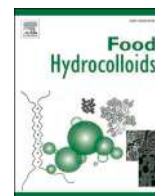
Film	AST (%)	F-O F_{max}	Lo 2	Go 4	Pr 2	Z-O	Z-O T_{lag}	K-P T_{lag}	Ho	M-B T_{lag}	P-S T_{lag}	Best fit
GAR75/GEL25	0.25	175.26	86.82	87.41	89.11	222.56	222.56	137.44	129.030	139.039	138.932	Lo 2
	0.5	168.83	138.28	139.56	139.18	215.26	215.26	125.69	174.424	127.434	127.607	K-P T_{lag}
	1	180.33	129.37	127.75	127.47	216.02	216.02	151.965	154.789	181.196	143.119	Pr 2
WSSP75/GEL25	0.25	149.35	143.80	154.43	141.47	176.89	176.89	133.377	146.982	133.939	135.041	K-P T_{lag}
	0.5	154.90	126.74	124.75	127.73	178.98	178.98	150.131	155.017	127.992	130.596	Go 4
	1	168.53	142.45	141.21	144.66	160.14	160.14	150.706	137.260	139.295	152.451	Ho

Table 3. Parameters obtained from fitting experimental data to the release models with F_{max} parameter.

Film	AST (%)	F-O F_{max}		Lo 2		Go 4			Pr 2			
		k_t (1/min)	F_{max}	α	β	F_{max}	k	β	F_{max}	α	β	F_{max}
CMC75/GEL25	0.25	13.286	100.539	4.860	3.776	101.227	21.933	2.569	100.288	2.927	2.258	100.750
	0.5	15.049	97.169	4.129	2.991	98.744	22.563	2.233	96.934	2.535	1.826	97.994
	1	10.310	100.207	4.108	3.471	101.475	17.391	2.511	99.841	2.473	2.072	100.817
OSA75/GEL25	0.25	1.938	64.609	3.486	8.218	62.397	6.621	8.717	62.033	2.051	4.832	62.219
	0.5	2.970	49.637	5.404	7.753	48.157	13.556	10.120	47.818	3.263	4.677	48.025
	1	2.392	36.161	7.706	14.278	34.698	14.686	45.899	34.682	4.449	8.179	34.667

Table 4. Kinetic parameters obtained from modeling without F_{max} parameter. .

Film	AST (%)	Z-O			Ho		K-P T_{lag}			M-B T_{lag}			P-S T_{lag}				
		k_0	k_0	T_{lag}	k_{HB}	n	k_{KP}	n	T_{lag}	k_{MB}	n	k	T_{lag}	k_1	k_2	m	T_{lag}
CMC75/GEL 25	0.25	37.66 2	21.65 6	-1.86 4	4.379	2.354	97.282	0.051	0.050	114.028	0.173	0.107	0.017	184.585	-82.13 0	0.264	0.017
	0.5	35.92 4	21.21 6	-1.75 0	0.006	2236.48 0	93.319	0.082	0.017	106.377	0.148	0.080	0.017	174.082	-75.80 5	0.238	0.017
	1	35.71 3	26.42 1	-0.88 9	1.092	8.920	95.543	0.079	0.050	115.907	0.225	0.130	0.017	175.899	-74.31 8	0.307	0.016
OSA75/GEL 25	0.25	30.91 2	28.36 7	-0.22 7	0.000	5041.12 1	59.327	0.067	0.330	69.974	0.215	0.120	0.319	106.128	-44.16 9	0.310	0.313
	0.5	25.51 7	23.35 3	-0.23 4	0.000	2046.78 5	45.349	0.077	0.170	58.819	0.396	0.203	0.091	68.554	-21.62 2	0.103	0.170
	1	24.11 1	27.09 0	0.277	0.000	1773.11 9	34.396	0.026	0.330	35.823	0.060	0.029	0.328	63.175	-28.35 0	0.149	0.320



Controlled release of water-soluble astaxanthin from carboxymethyl cellulose/gelatin and octenyl succinic anhydride starch/gelatin blend films

Katarzyna Łupina^a, Dariusz Kowalczyk^{a,*}, Magdalena Lis^b, Aneta Raszewska-Kaczor^c, Emilia Drozłowska^d

^a Department of Biochemistry and Food Chemistry, Faculty of Food Sciences and Biotechnology, University of Life Sciences in Lublin, Skromna 8, 20-704, Lublin, Poland

^b Laboratory of Biocontrol, Application and Production of EPN, Faculty of Natural Sciences and Health, Center for Interdisciplinary Research, John Paul II Catholic University of Lublin, Konstantynów 1J, 20-708, Lublin, Poland

^c Łukasiewicz Research Network - Institute for Engineering of Polymer Materials and Dyes, Marii Skłodowskiej-Curie 55, 87-100, Toruń, Poland

^d Center of Bioimmobilisation and Innovative Packaging Materials, Faculty of Food Sciences and Fisheries, West Pomeranian University of Technology, Klemensa Janickiego 35, 71-270, Szczecin, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Polysaccharides
Edible films
Astaxanthin
Release kinetics
Antioxidant activity

ABSTRACT

The effect of increasing concentrations (0, 0.25, 0.5, 1%) of commercial water-soluble AstaSana astaxanthin (AST) on the physicochemical properties, release kinetics and antioxidant activity of binary 75/25 carboxymethyl cellulose/gelatin (CMC75/GEL25) and octenyl succinic anhydride starch/gelatin (OSA75/GEL25) blend films was investigated. The microscopic observations showed that the obtained blends were phase-separated systems. Regardless of the AST concentration, the CMC-based films were more opaque, stronger, and less stretchable than the OSA-based films. The AST-supplemented films exhibited an intensive red color. The starch granules (from the AST formulation) contributed to high roughness and opacity of the films. The presence of AST contributed to a significant decrease of the puncture strength and oxygen permeability of the CMC-based film. The AST-supplemented films did not differ in terms of the water vapour barrier properties. Due to the low quantity of astaxanthin in the systems, the Fourier-transform infrared spectra of the control and AST-supplemented films were similar. The increase in the AST concentration was accompanied by reduced solubility and increased swelling of the OSA-based films, while an opposite result was observed for the CMC-based films. According to the Korsmeyer-Peppas with time lag model, the AST release kinetics exhibited quasi-Fickian behaviour. Due to their weaker solubility, the OSA75/GEL25 films offered at least 7 times slower release of AST than the CMC-based carrier. The times required for 25% AST release from the CMC75/GEL25 and OSA75/GEL25 films were 1.20–1.74 and 12.60–20.04 min, respectively. A high positive correlation ($R^2 = 0.78\text{--}0.91$) was found between the AST release and antiradical activity of the films.

1. Introduction

The dynamic development of the packaging market is closely related to the necessity of extension of the shelf life of food products in response to the demands of both producers and consumers. Hence, efforts are being made to expand the functions of traditional packaging, e.g. through fortification thereof with food preservatives whose action and/or release from the packaging take place in a controlled manner.

The depletion of crude oil resources generates increasing pressure from environmentalists aimed at the replacement of plastic packaging with materials made of natural biodegradable polymers. Cellulose and

starch are abundant and cheap biopolymers that can serve as more eco-friendly alternatives to synthetic polymers. Both these polymers have numerous derivatives with modified functionalities, which can be used to produce packaging materials with desired properties. Films produced from cellulose derivatives (e.g. carboxymethyl cellulose (CMC), methylcellulose, or hydroxypropyl methylcellulose) are highly transparent, mechanically strong, and easily soluble in water (Bourtoom, 2008). In turn, hydrophobised starch, such as octenyl succinic anhydride starch (OSA), is an effective film-forming emulsifier and encapsulation agent for active substances (Aćkar et al., 2015; Łupina, Kowalczyk, & Drozłowska, 2020).

* Corresponding author.

E-mail address: dariusz.kowalczyk@up.lublin.pl (D. Kowalczyk).

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107179>

Received 2 March 2021; Received in revised form 2 August 2021; Accepted 5 September 2021

Available online 7 September 2021

0268-005X/© 2021 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Polymer blend composites are versatile materials offering synergism in properties for a wide array of phenomenal applications, including packaging and controlled release purposes. Previous studies (Kowalczyk, Kordowska-Wiater, et al., 2020; Kowalczyk, Pytko, et al., 2020; Lupina et al., 2020) have shown that a combination of some polysaccharides and gelatin (GEL) yields materials with improved properties and modified profiles of active compound release. For instance, the CMC/GEL films offered the quick release of active substances ('burst effect') (Kowalczyk, Pytko, et al., 2020). In turn, the OSA/GEL blend system ensured the encapsulation of active compounds through the formation of complex coacervates (Zhao et al., 2019).

Since food products contain many oxidation-susceptible substances, packaging materials with incorporated antioxidants arouse great interest. Carotenoids are pigments that perform a variety of critical functions in plants including the protection against photooxidative processes (Stahl & Sies, 2003). For industry needs, carotenoids are obtained by chemical synthesis or extraction from plants or algae. Natural carotenoids exhibit low stability, variable dye composition (it is not easy to standardize their color), the specific taste and smell, and auxiliaries. These disadvantages can be avoided by the use of synthetic dyes, which exhibit significantly higher resistance and dye strength. In addition, chemical synthesis does not require a large amount of raw material. Of the nearly 700 naturally occurring carotenoids, only a few (lycopene, canthaxanthin, astaxanthin (ASX), β,β -carotene, β -apo-8'-carotene, β -apo-8'-carotene, and cytranaxanthin) are synthesized on an industrial scale (Bogacz-Radomska & Harasym, 2018). Among them especially ASX is gaining enormous popularity because of reports on its multidirectional biological activity, in particular the high antioxidant effect, which (in the case of natural ASX) can be up to 100 times greater than that of α -tocopherol (Ambati, Moi, Ravi, & Aswathanarayana, 2014).

ASX (3,3'-dihydroxy- β,β' -carotene-4,4'-dione) comprises a non-polar polyene carbon chain terminated on both sides by β -ionone rings. The structure of the pigment is very similar to that of other carotenoids; however, the presence of hydroxyl and ketone groups in each ring is responsible for its partially hydrophilic nature. Its polar ends provide the molecule with esterification capacity, an affinity for phospholipids, and higher antioxidant activity. The specific polar-non-polar structure of ASX is analogous to the structure of the cell membrane, which facilitates the removal of reactive oxygen species and free radicals both on the outer and inner membrane surface (Santos-Sánchez, Hernández-Carlos, Torres-Ariño, & Salas-Coronado, 2020). The ASX molecule has two asymmetric carbon atoms in positions 3,3' of the β -ionone ring; hence, the pigment can exist as two enantiomers (3R, 3'R, and 3S, 3'S) and a meso compound (3R, 3'S) (Ye, Fan, Keen, & Han, 2019). The thirteen conjugated double bonds present in the ASX molecule are responsible for its red colour and, to some extent, for its antioxidant activity (Higuera-Ciajara, Félix-Valenzuela, & Goycoolea, 2006; Santos-Sánchez et al., 2020).

Microalgae (mainly *Haematococcus pluvialis*) is expected to be one of the largest and fastest-growing natural sources of ASX. These organisms are at the base of the food web of marine species; hence, the pigment is eventually accumulated in tissues of various fish species (salmon, trout, red bream) and crustaceans (shrimp, lobster). Natural ASX is highly susceptible to degradation during processing and storage, i.e. it is decomposed upon contact with oxygen, light, low pH, some enzymes, or certain food ingredients (Liu, Zhang, McClements, Wang, & Xu, 2019). ASX degradation has been reported to be reduced by the addition of other antioxidants (Martínez-Delgado, Khandual, & Villanueva-Rodríguez, 2017). Meléndez Martínez, Vicario Romero, and Heredia Mira (2004) have found that carotenoids are better preserved in tocopherol- and vitamin C-containing foods; hence, the presence of these antioxidants in ASX-rich formulations seems to be advisable. A complementary form of ASX protection against degradation is microencapsulation (e.g. in the chitosan matrix, OSA/GEL coacervates, polymer-based nanospheres, emulsions, and liposomes) or formation of complexes with β -cyclodextrins.

Despite the possibilities of enhancing the stability of the natural ASX, the most serious obstacle preventing its industrial-scale application is associated with its high production costs. The market value of natural ASX varies usually from \$2500–7000/kg, while synthetically derived ASX costs around \$1000/kg (Panis & Carreon, 2016). Additionally, the natural ASX is very poorly soluble in water, which also considerably limits its application. Natural and synthetic ASX is not exactly the same, as they differ in the esterification degree and stereochemistry. Currently, two forms of synthetic ASX can be produced: disodium disuccinate ASX (DDA) and Cardax's proprietary ASX prodrug (CDX-085). DDA is a mixture of three isomers. This form is used in studies on cardiovascular system diseases. It can be served by the oral or intravenous route and its advantage is good water solubility. The CDX-085 ASX has better dispersion in water and greater bioavailability than the DDA. The modified structure makes synthetic ASX much more convenient for commercial use. However, a significant drawback of chemically produced ASX is its lower antioxidant activity, in comparison with that of the natural pigment. It also raises controversial issues related to the production technique thereof (Capelli, Bagchi, & Cysewski, 2013). Nevertheless, it is estimated that the synthetic compound accounts for approximately 95% of ASX contained in various types of formulations available on the global market (Panis & Carreon, 2016; Shah, Liang, Cheng, & Daroch, 2016; Sieradzka & Kołodziejczyk-Czepas, 2016). ASX is available in the form of biomass, oils, extracts, powders, capsules, gels, and tablets (Ambati et al., 2014).

Both natural and synthetic ASX has been assessed for safety and found safe for human consumption in a number of jurisdictions and in various regulatory categories (Brendler & Williamson, 2019). European Food Safety Authority (EFSA) estimated the acceptable daily intake of natural ASX at 0.034 mg/kg body weight, i.e. approximately 2 mg per day for an adult with a bodyweight of 60 kg (an analogous dose was established for synthetic ASX) (EFSA, 2014).

So far, limited studies were conducted on the fabrication of ASX-added packaging materials. Colín-Chávez, Soto-Valdez, Peralta, Lizardi-Mendoza, and Baladrán-Quintana (2013b) incorporated Aztec marigold (*Tagetes erecta*) extract (source of ASX) into the polyethylene active packaging films in order to assess the ASX migration into a fatty food stimulant (95% ethanol) at different temperatures (10, 23, 30, and 40 °C). As expected, the increase in temperature resulted in higher ASX diffusion coefficients. In another study, Gómez-Estaca, Calvo, Sánchez-Faure, Montero, and Gómez-Guillén (2015) obtained the shrimp muscle protein film incorporated with an oil extract of shrimp wastes (source of ASX). The active film exhibited a faster release of carotenoids and, consequently, higher antioxidant activity as compared to the films containing tomato extract (source of lycopene) or β -carotene. Furthermore, ASX showed the slowest degradation during storage. The addition of the extract caused a significant improvement of water vapour barrier properties of the film, but at the same time worsening the opacity, which was due to the presence of the emulsified lipid phase in the film matrix.

In this study, synthetic ASX was used not only to reduce the costs of active film production but also to avoid incorporation of the solvent (oil) into biopolymer carriers, which could prevent the formation of coherent films or yielded emulsion materials with reduced functional properties. Therefore, a commercial AstaSana™ 5% CWS/S-TG (AST) formulation containing water-soluble ASX was used in the experiments. The main objective of this study was to characterise the physicochemical, release and antioxidant properties of binary 75/25 carboxymethyl cellulose/gelatin (CMC75/GEL25) and 75/25 octenyl succinic anhydride starch/gelatin (OSA75/GEL25) blend films supplemented with increasing concentrations (0, 0.25, 0.5, 1%) of AST. The release properties are discussed in terms of the microstructure and water affinities (dissolution and swelling) of the films.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The following commercial food-grade biopolymers were used in this study: sodium CMC WALOCEL CRT 30 GA (with substitution degree of 0.82–0.95; Dow Wolff Cellulosics, Germany), starch sodium octenyl succinate Purity Gum® 2000 (Ingredient, Germany), and pork GEL (with bloom strength of 240; McCormick-Kamis S.A., Poland). AstaSana™ 5% CWS/S-TG (containing astaxanthin, modified food starch, corn starch, glucose syrup, sodium ascorbate, and DL- α -tocopherol) was gifted by DSM Nutritional Products (Netherlands). Glycerol and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) were purchased from Sigma Chemical Co. (USA).

2.2. Film preparation

Films were obtained from aqueous solutions containing the polysaccharide/GEL blend (5% w/w), glycerol (1% w/w), and increasing amounts of AST (0.25, 0.5, 1% w/w). The film-forming solution (FFS) without added AST served as the control. Powder blends of polysaccharides with GEL at the ratio of 75/25 were mixed with water and glycerol and then heated in a water bath at 90 °C for 1 h with constant stirring. The FFSs were allowed to cool (to ~40 °C) and the AST was subsequently added (Fig. 1). The degassed FFSs were placed on the

polycarbonate trays with an area of 144 and 4 cm². A constant amount of total solids (0.0125g/1 cm²) was placed on the trays in order to maintain film thickness. The FFSs were dried at 25 ± 2 °C and 50 ± 5% relative humidity (RH) for 24 h. The films were peeled from the trays, cut into sample pieces, and conditioned.

2.3. pH

A glass electrode (Elmetron ERH-11S, Poland) connected to a pH meter (Elmetron CPC 401, Poland) was used for measurement of pH of the FFSs at 40 °C. The tests were performed in triplicate.

2.4. Film thickness and conditioning

The thickness of the film samples was determined using a 547-401 ABSOLUTE digimatic thickness gauge (Mitotuyo, Japan). The samples were conditioned (50% RH, 25 °C, 48 h) in a test chamber (MLR-350, Sanyo Electric Biomedical Co. Ltd., Japan).

2.5. Microscopy

The morphology of the FFSs was examined using an inverted microscope (CKX53, Olympus, Japan) at 40 °C as well as a Carl Zeiss Ultra Plus scanning electron microscope (Oberkochen, Germany) using a cryo-scanning electron microscope (cryo-SEM). Additionally, the 1% aqueous

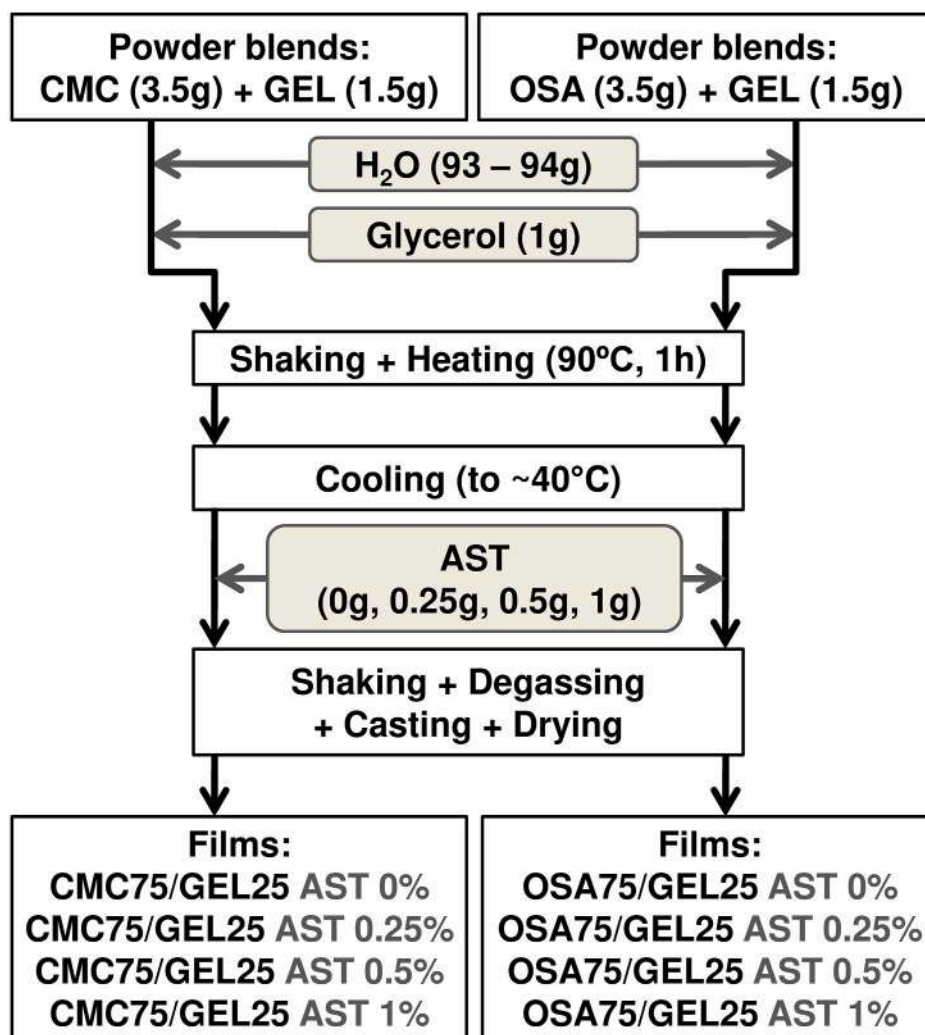


Fig. 1. Schematic diagram showing the procedure for obtaining the 75/25 carboxymethyl cellulose/gelatin (CMC75/GEL25) and 75/25 octenyl succinic anhydride starch/gelatin (OSA75/GEL25) blend films.

solution of AST was observed using these microscopes and a polarised light microscope LEICA 5500B (Leica Microsystems GmbH, Germany). Moreover, SEM was used for inspection of the surface of the AST powder.

2.6. Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy

ATR-FTIR tests were carried out by using a Thermo Nicolet 8700 FTIR spectrometer with a Smart Orbit accessory.

2.7. Color and opacity

Lightness (L^*), chroma (C^*), and hue angle (h) of the film samples (1×4 cm) were measured with a colorimeter (NH310, 3nh, China) on the white background ($L^* = 93.84$, $C^* = 10.42$, $h = 271.96^\circ$). The opacity (Op) of the film samples (1×4 cm) was measured at 600 nm using a spectrophotometer (Lambda 40, Perkin-Elmer, USA), and calculated with the following formula (Han & Floros, 1997):

$$Op = A_{600} / x \quad (1)$$

where A_{600} is the absorbance at 600 nm and x is the film thickness (mm).

The optical analyses were performed in fivefold.

2.8. Mechanical properties

The mechanical properties of films were evaluated using a TA-XT2i texture analyzer equipped with a 50 kg load cell (Stable Micro Systems, UK). A steel ball-ended (2 mm diameter) probe was moved perpendicularly at the film surface at a constant speed (1 mm s^{-1}) until it passed through the film. The puncture strength (PS, MPa) was calculated by Eq. (2):

$$PS = F/A \quad (2)$$

where F is the maximum force (N) and A is the cross-sectional area of the probe (films thickness \times diameter of the opening of film holder, mm^2).

A puncture deformation (PD, mm) was read at the sample breaking point.

2.9. Contact angle (CA)

The water wetting properties of the samples were measured using a goniometer (Phoenix Mini, Surface Electro Optics, Korea). A droplet of distilled water was deposited on the film surface. The CA measurements were carried out on the "air-side" of the films. The measurements were performed at least three times at random positions on samples.

2.10. Swelling (Sw) and total soluble matter (TSM)

Sw was evaluated by immersing the pre-weighed films (4 cm^2) into 25 ml of distilled water at $30 \pm 1^\circ \text{C}$ for 1 min. The weight of the swollen films was measured after blotting the surface gently with filter paper until equilibrium was reached. Sw was calculated as the percentage of water absorbed by the sample. TSM was expressed as the percentage of film dry matter solubilised after immersion in water. The film specimens (4 cm^2) were weighed ($\pm 0.0001 \text{ g}$) and shaken (Shaking Incubator ES-60, MIULAB, China) in 25 ml of distilled water at $30 \pm 1^\circ \text{C}$ and 170 rpm. Then, undissolved residues taken at 10 different time points were removed from the water and dried (105°C , 24 h). The initial dry matter content of the films, necessary for the calculation of TSM, was determined by drying at 105°C for 24 h. The tests were performed in triplicate.

2.11. Water vapour permeability (WVP)

The WVP ($\text{g mmm}^{-2} \text{d}^{-1} \text{kPa}^{-1}$) was calculated as:

$$WVP = (WVTR \times L) / \Delta p \quad (3)$$

where WVTR is the water vapour transmission rate of film ($\text{g m}^{-2} \text{d}^{-1}$) measured gravimetrically based on ISO 2528 (1995) method, L is the mean of film thickness (mm), Δp is the water vapour pressure difference (kPa) between two sides of the film.

The permeation cell (poly(methyl methacrylate)) cups had an internal diameter of 7.98 cm (exposed film area = 50 cm^2) and an internal depth of 2 cm. Distilled water (30 ml) was added into each test cup and film samples were placed over the circular opening and secured by a screw top. The cups were placed in the test chamber set at 25°C and 50% RH. The weight loss from the samples with 3 replicates was monitored for 10 h period with weights recorded at 2 h intervals.

2.12. Oxygen transmission rate (OTR)

OTR was measured using a MultiPermeO₂-CO₂ (Extra Solution Instrument, Italy) instrument. Permeability measurements through film area (50 cm^2) were conducted at 23°C and RH $50 \pm 3\%$. The test gas was oxygen (purity $\geq 99.95\%$), while the carrier gas was a nitrogen (5.0) containing 1% of hydrogen. The tests were done by obtaining a steady line for transmission rate. Three samples were tested for each type of material and average results of OTR (expressed as the volume of permeant passing through a film, per unit area and time, normalized on the thickness ($\text{cm}^3 \mu\text{m}/(\text{m}^2 \text{d})$) are presented.

2.13. Release test

The film discs (4 cm^2) were immersed in 25 ml of distilled water at $30 \pm 1^\circ \text{C}$ and shaken (170 rpm; $30 \pm 1^\circ \text{C}$) in a shaking incubator. Samples of the release media (250 μl) were taken at different time points, and the absorbance was read at 464 nm using a microplate spectrophotometer (EPOCH 2 Microplate Spectrophotometer, BioTek, USA). The tests were performed in triplicate. The AST release kinetics was modeled using DDSolver: add-in software for Microsoft Excel. Several mathematical models were chosen to fit the data (Table S1). The adjusted coefficient of determination (R^2_{adjusted}) was used for the selection of the optimal model. On the basis of the best-fitted model, the quarter- and half-release time values ($t_{25\%}$ and $t_{50\%}$) were calculated (Zhang et al., 2010).

2.14. ABTS free radical scavenging ability

The film discs (4 cm^2) were immersed in 25 ml of the ABTS reagent at 30°C and mixed using a laboratory shaker (170 rpm). The mixture samples (250 μl) were taken at different time points, and the absorbance was read at 734 nm using a spectrophotometer (Lambda 40, Perkin-Elmer, Shelton, CT, USA) in order to determine the degree of scavenging of ABTS free radicals. The absorbance was measured until the reaction reached a plateau. The ability of the films to quench ABTS free radicals was calculated using Eq. (4).

$$\text{Scavenging\%} = [1 - (\text{Abs}/\text{Abs}_{\text{ABTS}})] \times 100 \quad (4)$$

where Abs is the absorbance of the sample and Abs_{ABTS} is the absorbance of the ABTS solution (0.70 ± 0.05). The tests were performed in triplicate.

2.15. Statistical analysis

Differences among the mean values of the data were tested for statistical significance at the $p < 0.05$ level using analysis of variance (STATISTICA 13.1, StatSoft Inc., Tulsa, USA) and Fisher's test.

Additionally, the data were evaluated using Pearson's correlation coefficients to identify relationships between the TSM, the AST release, and the ABTS free radical scavenging ability.

3. Results and discussion

3.1. Microstructure

The micrographs (prepared both using a cryo-SEM technique and an optical microscope) of the CMC75/GEL25 FFSs revealed the presence of spherical structures with various diameters (11–68 μm , Fig. 2A and B). As demonstrated in a previous study (Kowalczyk, Pytka, et al., 2020), the microspheres (rich in GEL) are indicator of the phase separation between the polymers. The OSA-based FFSs had a sandy structure (Fig. 2B), which supports our earlier findings (Lupina et al., 2020). The observed inhomogeneity of this system may be explained by the fact that anionic OSA and cationic GEL form complex coacervates through electrostatic interactions (Wu & McClements, 2015; Zhao et al., 2019). Fig. 2C–a shows that AST consists of free-flowing particles. The round objects with different sizes (8–48 μm) were found both in the AST-supplemented FFSs (Fig. 2B) and the aqueous AST solution (Fig. 2C–b). Since starch is the carrier in the AST formulation, it is easy to conclude that the observed particles were starch granules. The observation of the AST solution under a polarised optical microscope revealed the presence of Maltese crosses, which are characteristic of starch granules (Fig. 2C–c). It is worth mentioning here that it was hard to detect the starch granules in the samples using the SEM technique (Fig. 2A; Fig. 2C–a; Fig. 2C–d). which may be explained by the fact that only a small part of the samples was analysed at higher magnifications.

3.2. ATR-FTIR Spectroscopy

Fig. 3 shows the ATR-FTIR spectra of the control and 1%AST-supplemented films. Strong broadband at 3272–3287 cm^{-1} resulting from amide A (-OH and/or -NH₂) stretching can be seen in the spectra of all samples. The absorption peaks at ~ 2930 and ~ 2880 cm^{-1} (in the Amide B band) are related to CH₂ asymmetrical and CH₂ symmetrical stretching (Lupina et al., 2019). The peak in the 1633–1646 cm^{-1} region originates from C=O stretching vibration in the Amide 1 band (Kowalczyk, Pytka, et al., 2020). According to the previous study (Lupina et al., 2019), the peak at 1630–1695 cm^{-1} is characteristic for the -CONH₂ group and its occurrence suggests that the polysaccharides and GEL were strongly associated in the blend films. The peaks centered at 1589, 1410, and 1321 cm^{-1} are attributed to the COO⁻ (carboxyl) group in the CMC (Kowalczyk, Pytka, et al., 2020). In the case of the OSA-based films, the asymmetric stretching vibration of carboxylate appeared at 1555 cm^{-1} . The signal at 1148 cm^{-1} in the spectrum of the OSA75/GEL25 film is related to C–O stretching present both in the structure of starch (Hejna, Lenza, Formela, & Korol, 2019) and in GEL (Jafari, Emami, Samadikuchaksaraei, Bahar, & Gorjipour, 2011). The spectra of all films showed a strong absorption band at ~ 1020 cm^{-1} indicating the presence of the C–N group (Coates, 2006). The locations of peaks in the spectra of the 1%AST-supplemented films were similar to those of the control (Fig. 3), which could be explained by the relatively low quantity of AST in the systems. These results support evidence from previous observations (Yuan, Jin, & Xu, 2012). Generally, no new peaks occurred in the spectra. Nevertheless, it was found that the presence of AST in the film matrix slightly increased the intensity of peaks located at 1647–1100 cm^{-1} , which may have resulted from some AST/polymer interactions. To date, limited data are available on the possible interactions of the water-soluble (synthetic) ASX with biopolymers. Nevertheless, the specific interactions between natural ASX and CMC as well as proteins (bovine serum albumin) have been previously suggested (Feng, Li, Wang, & Zhu, 2018; Y.; Liu et al., 2020).

3.3. Optical properties

The AST-free CMC- and OSA-based films were colourless to the naked eye (Fig. S1) and had similar L*C*h coordinates, according to which were bright ($L^* \approx 94$) with a blue shade ($h \approx 270^\circ$) of very low saturation ($C^* \approx 9$) (Table 1). Likely due to the presence of phase-separated microspheres (Fig. 2A and B), the CMC75/GEL25 films exhibited higher Op than the OSA-based counterparts ($p < 0.05$, Table 1). The incorporation of AST resulted in the red-colour and less transparent films (Fig. S1, Table 1). AST decreased the L*C*h parameters in a concentration-dependent manner (Table 1); i.e. the color of the films became darker, less deep (more neutral), and more shifted toward red hue ($h = 0^\circ$). Furthermore, with an increase in the AST concentration, the gradual decrease in film transparency was observed (Table 1), which could be primarily explained by the increasing number of starch granules (from the AST formulation (Fig. 2B)), that could reflect or scatter a significant amount of light. Surprisingly, the 0.25%AST-added films exhibited the most intense colour saturation (the highest C* values, Table 1). This result can be attributed to the fact that among all AST-supplemented films, these films were the most transparent and, consequently, the lightest (Table 1). Because of higher ASX content, the films obtained in our study (the amount of pure ASX added was 0.0025–0.01 g/g polymer fraction) were nearly two times darker and approximately two to four times more red (based on L* and h values) as compared to the shrimp protein-based film enriched with shrimp extract (0.001g ASX/g protein) (Gómez-Estaca et al., 2015).

3.4. Mechanical properties

According to the PS test, the CMC-based films were ~ 4 –5 times stronger than the OSA-based counterparts (8.75–11.80 vs 1.96–2.32 MPa, Table 2). The possible causes for this behavior have been suggested previously (Kowalczyk & Baraniak, 2014; Lupina et al., 2019). Briefly, the linear backbone of cellulose results in more extensive hydrogen intermolecular bonds than in starch, which is a mixture of branched amylopectin and linear amylose. Branches make it difficult for the amylopectin molecules to pack in a regular array and therefore make the starchy network less tough. The presence of AST did not affect the PS of OSA-based films, whereas contributed to a significant decrease of the mechanical strength of the CMC-based film (Table 2). This result supports evidence from previous observations (Kowalczyk & Biendl, 2016), which showed that the less organized network of oxidised potato starch-based film was not susceptible to mechanical changes in the presence of hop phytoconstituents, while the more cohesive network of the CMC-based film was weakened, likely due to interruption of hydrogen bonding networks of the polysaccharide by the active compounds.

The OSA-based films were at least two times more deformable compared to the CMC-containing films (Table 2). This result reflects earlier studies (Kowalczyk et al., 2021; Lupina et al., 2019), which showed that OSA/GEL blends form several times more stretchable films than the methylcellulose/GEL or CMC/GEL blends. It was found that at the smallest addition level (0.25%), AST significantly increased the elasticity of the CMC75/GEL25 film (Table 2). It shows that when incorporated into the CMC/GEL blend system at low concentration, AST can increase the free volume between the polymer segments which allows for increased movement of chain chains with respect to each other, consequently, increasing the film ability for being stretched.

3.5. pH, CA, Sw, and TSM

The FFSs based on CMC (more exactly: the sodium salt of CMC) exhibited higher pH values than the FFSs based on OSA (more exactly: starch sodium octenyl succinate) (6.10–6.35 vs. 4.80–4.89, Table 2). This finding was unexpected since both polysaccharides contain an alkali metal in the structure. However, the higher acidity of OSA-based

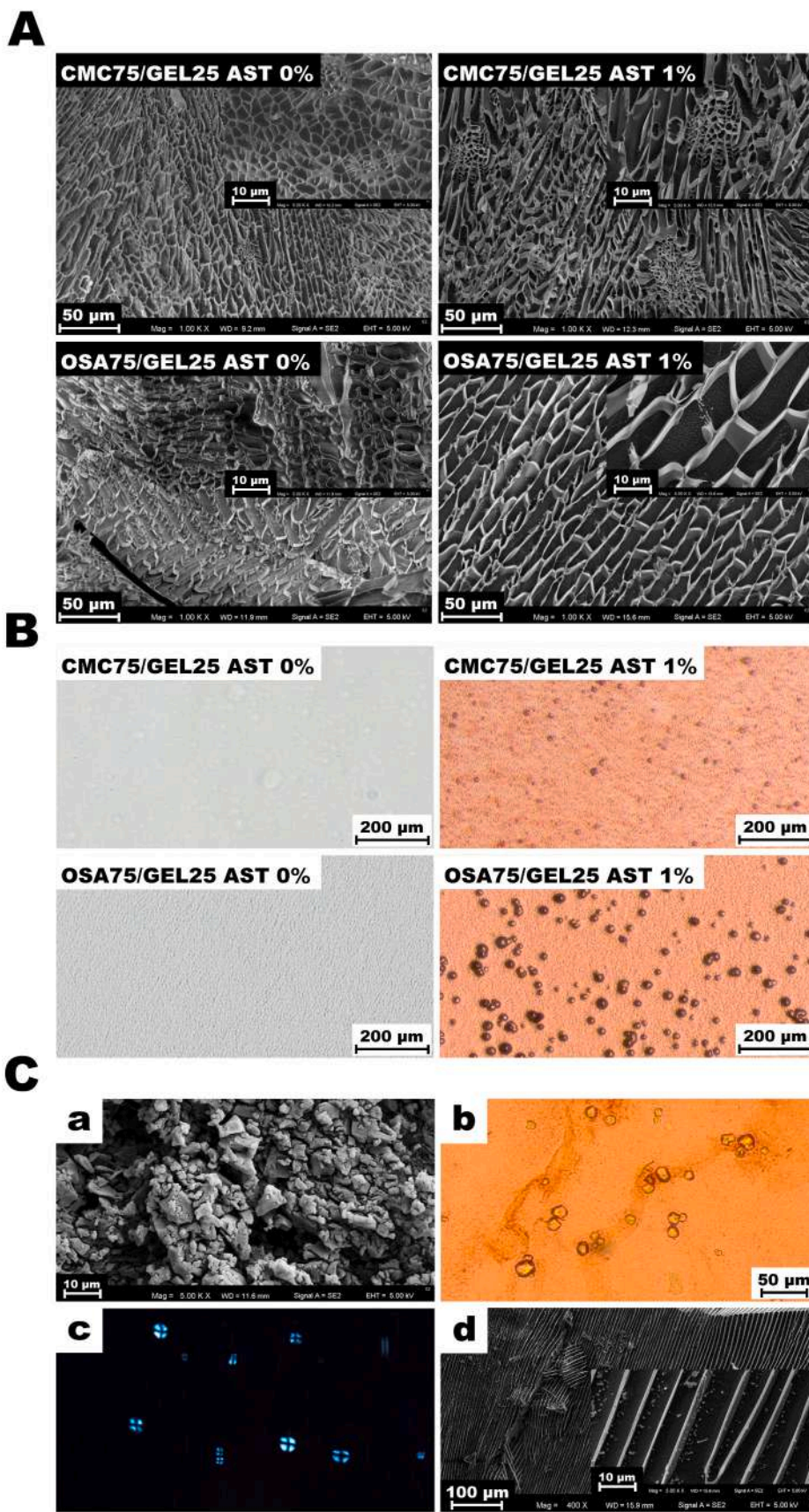


Fig. 2. Images of 75/25 carboxymethyl cellulose/gelatin (CMC75/GEL25) and 75/25 octenyl succinic anhydride starch/gelatin (OSA75/GEL25) film-forming solutions with and without Astasana (AST) addition examined using the cryo-SEM technique (A) and the light microscope (B). Microstructure of AST powder (C-a). Images of the 1% (w/v) aqueous solution of AST taken with the light microscope (C-b), the polarising microscope (C-c), and the cryo-SEM technique (C-d).

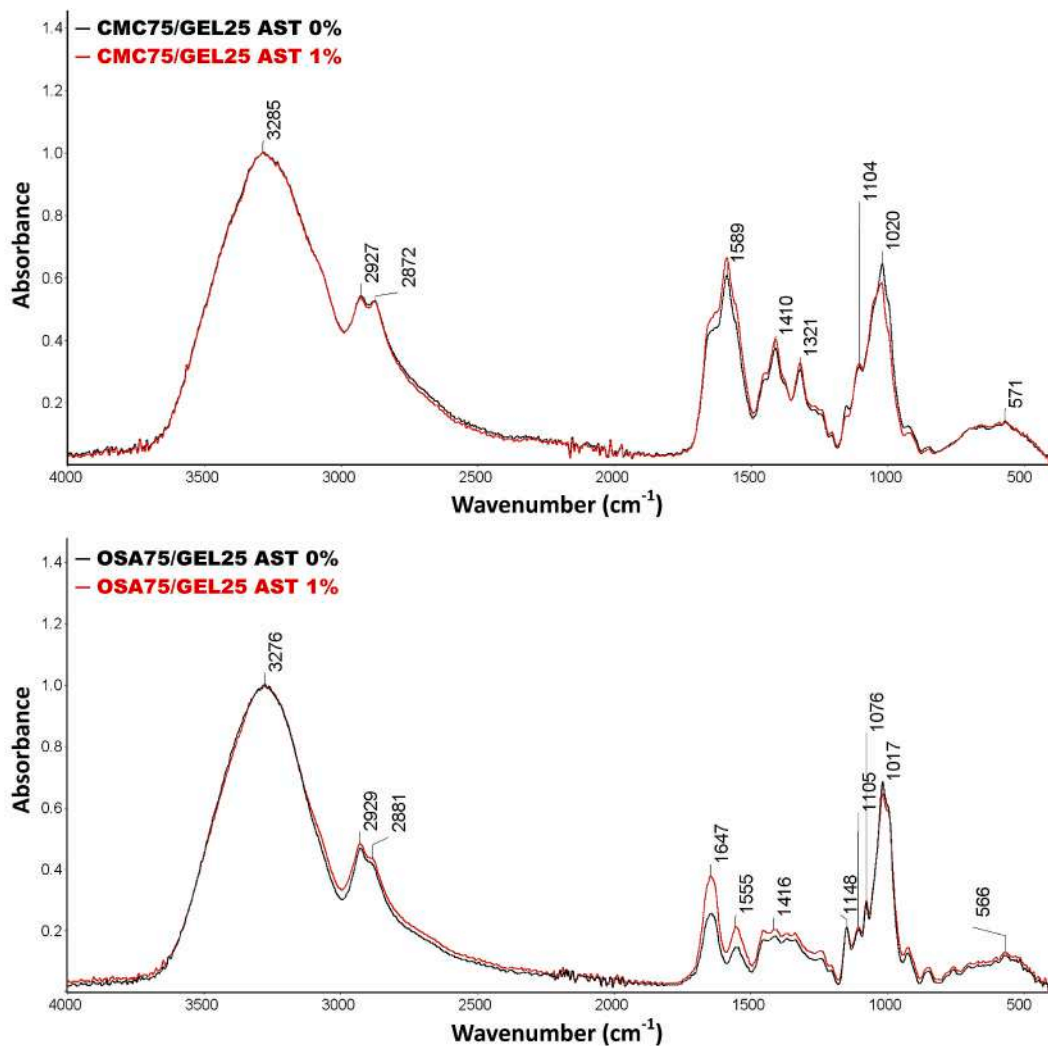


Fig. 3. Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared spectra of the 75/25 carboxymethyl cellulose/gelatin (CMC75/GEL25) and 75/25 octenyl succinic anhydride starch/gelatin (OSA75/GEL25) blend films with and without Astasana (AST) addition.

Table 1

The effect of Astasana (AST) concentration on the color parameters (L^*C^*h) and opacity (Op) of the 75/25 carboxymethyl cellulose/gelatin (CMC75/GEL25) and 75/25 octenyl succinic anhydride starch/gelatin (OSA75/GEL25) films.

Film	AST (%)	L^*	C^*	h	Op (A_{600}/mm)
CMC75/ GEL25	0	93.74 ± 0.11 ^f	8.21 ± 0.08 ^a	270.17 ± 0.65 ^f	1.38 ± 0.06 ^b
	0.25	44.01 ± 0.46 ^c	55.64 ± 0.28 ^h	27.56 ± 0.40 ^e	5.82 ± 0.42 ^d
	0.5	38.80 ± 0.57 ^c	47.83 ± 0.75 ^f	21.44 ± 0.98 ^e	9.62 ± 0.69 ^f
	1	33.79 ± 0.33 ^a	35.37 ± 1.04 ^d	15.00 ± 0.40 ^a	16.74 ± 0.77 ^h
OSA75/ GEL25	0	94.15 ± 0.20 ^f	9.69 ± 0.20 ^b	272.61 ± 0.72 ^e	0.61 ± 0.05 ^a
	0.25	43.14 ± 0.63 ^d	54.63 ± 0.77 ^g	25.54 ± 0.68 ^d	4.42 ± 0.36 ^c
	0.5	38.06 ± 0.12 ^b	44.16 ± 0.32 ^e	18.87 ± 0.14 ^b	8.12 ± 0.20 ^e
	1	34.09 ± 0.37 ^a	32.40 ± 0.57 ^c	14.47 ± 0.40 ^a	14.54 ± 0.16 ^g

^{a-h} Values with the different superscript letters within one column are significantly different ($p < 0.05$).

FFSs could be explained by the presence of acid anhydride residues. In the case of all FFSs, the pH value was reduced after the incorporation of AST.

The wetting properties of the solid surface can be identified by analysis of the value of the CA. Materials with $CA < 90^\circ$ are defined as hydrophilic; in turn, the $CA > 90^\circ$ reflect the hydrophobic properties. It was found that the control films did not differ in terms of wetting properties (Table 2). In the case of CMC-based film the addition of AST at the level of 0.25–0.5% decreased the CA; i.e. made the surface more wettable. In turn, in the case of OSA-based film, the incorporation of AST at the level of 1% increased the surface hydrophobicity.

Since the obtained films were water-soluble (Fig. 4), their Sw values were determined only for the first 1-min contact with water. The control CMC film exhibited significantly higher Sw (831.60%) than the OSA/GEL blend films are highly hydrophilic and can absorb substantial amounts of water before they start to dissolve (Kowalczyk, Pytko, et al., 2020). The low Sw of the OSA-based films could be partially attributed to the presence of hydrophobic octenyl side chains in the polysaccharide (Tesch, Gerhards, & Schubert, 2002), which limited the permeation of water into the polymeric matrix. In the case of the CMC75/GEL25 carrier, the incorporation of AST yielded films with reduced Sw. A possible explanation for this is that starch granules present in the films (Fig. 2B) slowed down the access of water molecules to the polymer matrix.

Table 2

The effect of Astasana (AST) concentration on the pH of film-forming solutions (FFSs), puncture strength (PS), puncture deformation (PD), contact angle (CA), swelling (Sw), and water vapour permeability (WVP), of the 75/25 carboxymethyl cellulose/gelatin (CMC75/GEL25) and 75/25 octenyl succinic anhydride starch/gelatin (OSA75/GEL25) films.

Film	AST (%)	pH of FFSs	PS (MPa)	PD (mm)	CA (°)	Sw (%)	WVP (°)
CMC75/ GEL25	0	6.35	11.80	5.55	69.2	831.60	51.07
		±	±	±	±	±	±
		0.02 ^f	1.34 ^c	0.34 ^{ab}	0.42 ^{cd}	28.68 ^e	1.07 ^a
	0.25	6.26	9.43	7.16	47.25	557.58	51.25
		±	±	±	±	±	±
		0.03 ^e	1.00 ^b	0.96 ^c	0.35 ^a	21.47 ^d	1.13 ^{ab}
	0.5	6.29	8.67	6.78	55.50	557.06	52.20
		±	±	±	±	±	±
		0.01 ^e	0.83 ^b	0.69 ^{bc}	0.71 ^b	11.03 ^d	1.73 ^{ab}
	1	6.10	8.75	5.40	63.25	524.76	52.09
		±	±	±	±	±	±
		0.01 ^d	0.45 ^b	0.71 ^a	1.77 ^c	22.64 ^c	1.74 ^{ab}
OSA75/ GEL25	0	4.89	2.20	14.85	64.25	146.17	54.27
		±	±	±	±	± 4.35 ^a	±
		0.01 ^c	0.29 ^a	1.11 ^d	1.06 ^c	0.61 ^b	
	0.25	4.86	1.96	14.95	68.40	186.51	52.25
		±	±	±	±	± 3.45 ^b	±
		0.00 ^b	0.09 ^a	1.11 ^d	0.85 ^c	2.44 ^{ab}	
	0.5	4.85	2.16	14.74	64.25	178.27	51.92
		±	±	±	±	±	±
		0.01 ^b	0.22 ^a	0.73 ^d	1.06 ^c	14.00 ^b	0.52 ^{ab}
	1	4.80	2.32	14.50	73.09	182.45	51.11
		±	±	±	±	±	±
		0.01 ^a	0.17 ^a	1.05 ^d	2.83 ^d	10.17 ^b	1.82 ^{ab}

^{a-f} Values with the different superscript letters within one column are significantly different ($p < 0.05$).

^a ($\text{g mm m}^{-2} \text{d}^{-1} \text{kPa}^{-1}$).

Moreover, it can be hypothesised that AST components may have interfered with the polymer network packaging, e.g. through the development of polymer-ASX hydrogen bonds (Liu et al., 2020), which inhibited the formation of polymer-water hydrogen bonds and consequently resulted in limited water absorption ability.

Contrary to the CMC-based system, the AST increased the Sw value in the OSA-containing film (Table 2). This result is difficult to explain, but it might be related to the initially low Sw of the OSA75/GEL25 system. It is possible that, in this case, the AST ingredients caused the films to be more porous (less coherent), thus larger amounts of water molecules were immobilised in the film matrix.

All the films obtained were totally water-soluble (Fig. 4). This outcome is in contrast to results reported in previous studies (Kowalczyk, Pytka, et al., 2020; Lupina et al., 2019), which demonstrated incomplete solubility of the polysaccharide75/GEL25 systems. This inconsistency may be easily explained by the differences in the sample incubation conditions (30 °C vs. 25 °C), i.e. the temperature closer to the GEL melting point (~32 °C) (Ninan, Joseph, & Aliyamveettil, 2014) favoured the dissolution of the samples. A comparison between the control samples showed that the time required for 100% solubility of the CMC- and OSA-containing films were ~10 min. The initial dissolution profiles (up to 5 min) revealed that the CMC-based films were more soluble than the OSA-containing samples. The strong affinity of the CMC-based film for water (the highest Sw and the fastest solubility) could be explained by the presence of numerous hydrophilic carboxyl groups in the polymer (Kowalczyk & Baraniak, 2014). The presence of the AST in the OSA-containing films reduced the TSM (Fig. 4), which might be related to the fact that insoluble starch granules hindered the penetration of water molecules between the polymeric network. It should be mentioned here that, although 100% solubility was estimated for the AST-supplemented OSA-based films, the visual observations of the aqueous medium revealed that the samples were not fully solubilised but disintegrated into small-size insoluble particles, which were

sediment-prone (Fig. S2). Nevertheless, in the TSM test, these particles were considered as the dissolved fraction. In general, the higher the AST content, the lower the solubility was observed. It was found that the AST was ineffective in the reduction of the TSM of CMC-containing film. A similar result was reported for CMC films incorporated with candelilla wax (Kowalczyk & Baraniak, 2014). This indicates that it is difficult to reduce the water affinity of such a rapidly soluble material as CMC. Interestingly, this study showed that the AST acted as a solubility enhancer for the CMC-based film (Fig. 4); however, an increase in the AST concentration resulted in less soluble films.

It should be noted here, that the TSM results partially support the findings of CA analyses; i.e. the AST increased wettability and, consequently, the solubility of the CMC-based carrier, while the opposite possibility was observed for the OSA-based film (Table 2, Fig. 4).

In summary, the differential effect of AST on the CA, Sw, and TSM of CMC- and OSA-containing films suggests that native starch could show both binder and disintegrant action in a carrier (Builders & Arhewoh, 2016).

3.6. Water vapour/oxygen barrier properties

The comparison of the WVP values revealed that the control CMC75/GEL25 film exhibited slightly better water vapour barrier properties than the control OSA75/GEL25 carrier (51.07 vs. 54.27 $\text{g mm m}^{-2} \text{d}^{-1} \text{kPa}^{-1}$, Table 2). A possible explanation for this might be that the CMC-based film, due to its excellent water absorption capacity (Table 2), could just immobilize passing aqueous vapour, thus WVP seemed reduced. The incorporation of AST did not affect the WVP of the films. This outcome is contrary to that of Gomez-Estela et al. (2015). As mentioned in Section 1, the decrease in WVP observed by the cited authors was primarily due to the incorporation of the oil phase (used for extraction of ASX from shrimp wastes) into the film matrix. In accordance with the present results, a previous study (Queiroz Assis, D'Angelo Rios, de Oliveira Rios, & Olivera, 2020) has demonstrated that the presence of norbixin (a water-soluble carotenoid) at the level of 0.03–0.05% had no significant effect on the WVP of cellulose acetate film; nevertheless, the bulky amounts of the carotenoid (0.1%) contributed to a greater diffusion of water vapour through the film.

Table 3 demonstrates the OTR of the CMC75/GEL25 films (control and film containing the maximum level of AST). Unfortunately, it was impossible to obtain reliable data on the OTR of the OSA75/GEL25 films. The reason was a significant deformation of the films during the test; i.e. the samples were extremely stretched under the gas flow and, consequently, clogged the oxygen detector of the instrument. It was found that the incorporation of AST resulted in about a 5-fold reduction in OTR of the CMC-based film. It clearly shows that AST contains sealing and/or oxygen scavenging agents. It is possible that the starch granules and/or ASX molecules, acting as a filler between the immiscible polymer phases, hindered the oxygen molecules permeation across the non-homogenous blend matrix. Moreover, results from previous studies showed the incorporation of ascorbic acid and its salts (Brody, Strupinsky, & Kline, 2001; Janjarasskul, Min, & Krochta, 2013) or tocopherol (Scarfato, Avallone, Galdi, Di Maio, & Incarnato, 2015), i.e. the antioxidants that are present in the AST formulation, can induce the oxygen-scavenging function of the biopolymeric materials.

3.7. Release of AST

The preliminary release tests (data not shown) and other research (Colín-Chávez, Soto-Valdez, Peralta, Lizardi-Mendoza, & Balandrán-Quintana, 2013a) have shown that the migration of the ASX from the polymeric carriers to the acceptor solution at 25 °C is a several-day long process. Therefore, in this work, accelerated release testing conditions with elevated temperature (30 °C) were employed. Fig. 5 and Fig. S3 show cumulative (mg/cm^2) and percentage amounts of AST released from the composite films as a function of time, respectively. Depending

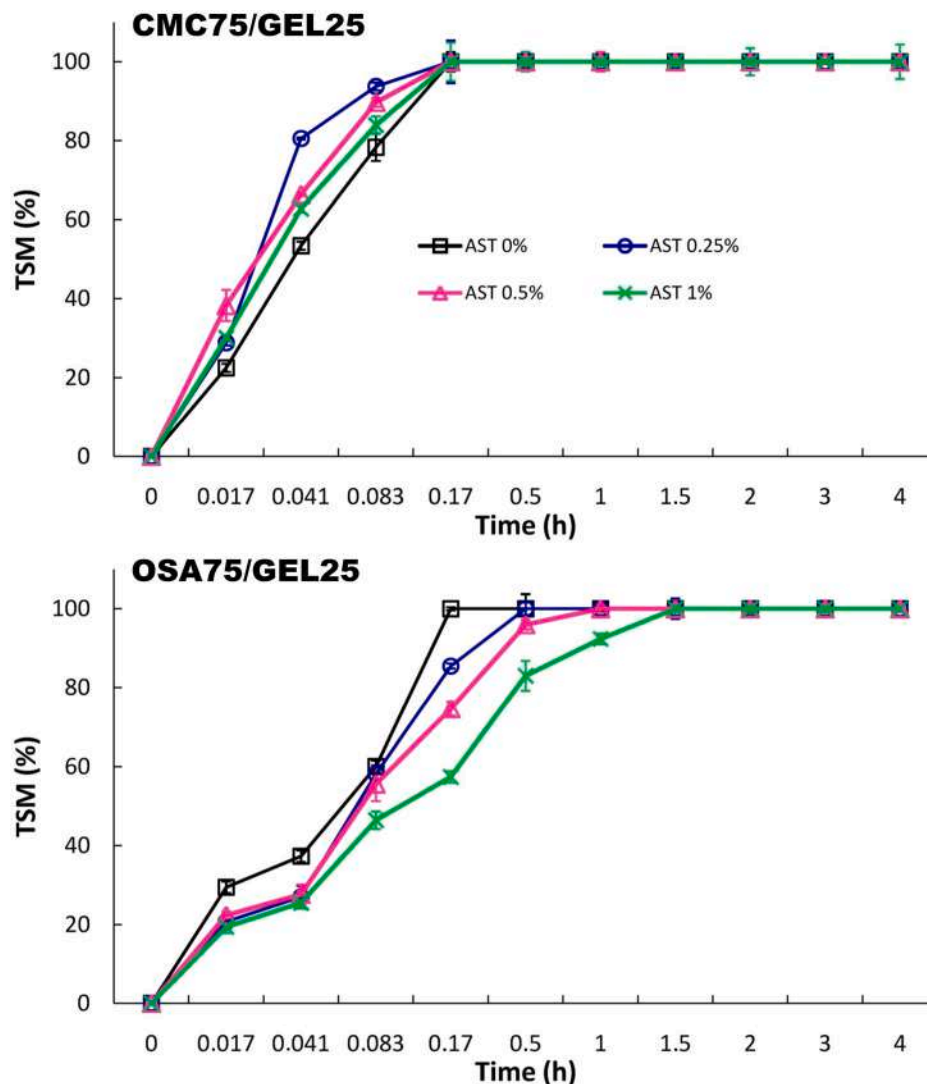


Fig. 4. Effect of increasing Astasana (AST) concentration on the kinetics of total soluble matter (TSM) of the 75/25 carboxymethyl cellulose/gelatin (CMC75/GEL25) and 75/25 octenyl succinic anhydride starch/gelatin (OSA75/GEL25) films.

Table 3

The effect of Astasana (AST) addition on the oxygen transmission rate (OTR) of the 75/25 carboxymethyl cellulose/gelatin (CMC75/GEL25) and 75/25 octenyl succinic anhydride starch/gelatin (OSA75/GEL25) films.

Films	AST (%)	OTR ($\text{cm}^3 \mu\text{m}/(\text{m}^2 \text{d})$)
CMC75/GEL25	0	$174.12 \pm 24.83^{\text{b}}$
	1	$34.06 \pm 7.25^{\text{a}}$
OSA75/GEL25	0	n.d.
	1	n.d.

^{a-f} Values with the different superscript letters within one column are significantly different ($p < 0.05$).

n.d. – no data (the films were deformed during the test and clogged the oxygen detector of the instrument).

on the carrier type and AST concentration, ~35–100% of the AST was released from the films during the 4-h dissolution test. Since the release of AST from the OSA75/GEL25 carrier was incomplete, it was impossible to predict the $t_{50\%}$ for the 0.5%AST- and 1%AST-supplemented systems. The $t_{25\%}$ values ranged from 1.20 to 19.86 min (Table 4). The rapid diffusion process ('burst effect') was observed for the CMC-containing films ($t_{25\%} = 1.20$ – 1.74 min). This finding is consistent with that reported by Kowalczyk, Pytko, et al. (2020), who analysed the

migration of iso- α -acids from films based on the CMC/GEL blends. These results are likely to be related to the fast disintegration of the bi-polymeric matrix in contact with water (Fig. 4). In the case of the OSA-based carrier, the lag time was observed for the AST release (Fig. 5). The comparison of the $t_{25\%}$ values showed that, at the 1% AST incorporation level, the OSA-based film exhibited more than 10 times slower release of AST compared to the CMC-based carrier. As suggested by Zhao et al., (2019), the incomplete release of AST from the OSA/GEL system (~35–63%, depending on the AST concentration (Fig. S3)) may be related to the partial encapsulation of this carotenoid in the complex bi-polymeric coacervates. As mentioned previously, the AST-supplemented OSA75/GEL25 films did not dissolve completely, i.e. they were disintegrated into fine solid particles (Fig. S2). This finding is partially consistent with that shown by Wu and McClements (2015), who observed that mixing of OSA with GEL resulted in hydrogel particles with a mean diameter ranging from 5 to 13 μm . Therefore, it is possible that, despite the complete erosion of the film matrix, the AST was permanently immobilised in the hydrogel coacervates and, therefore, the release process reached a plateau, although it was incomplete (Fig. 5; Fig. S3). Wu and McClements (2015) suggested that OSA/GEL coacervates may be used to encapsulate functional ingredients. The result of the present work indirectly confirms this assumption.

In contrast to the CMC-based carrier, the increasing AST

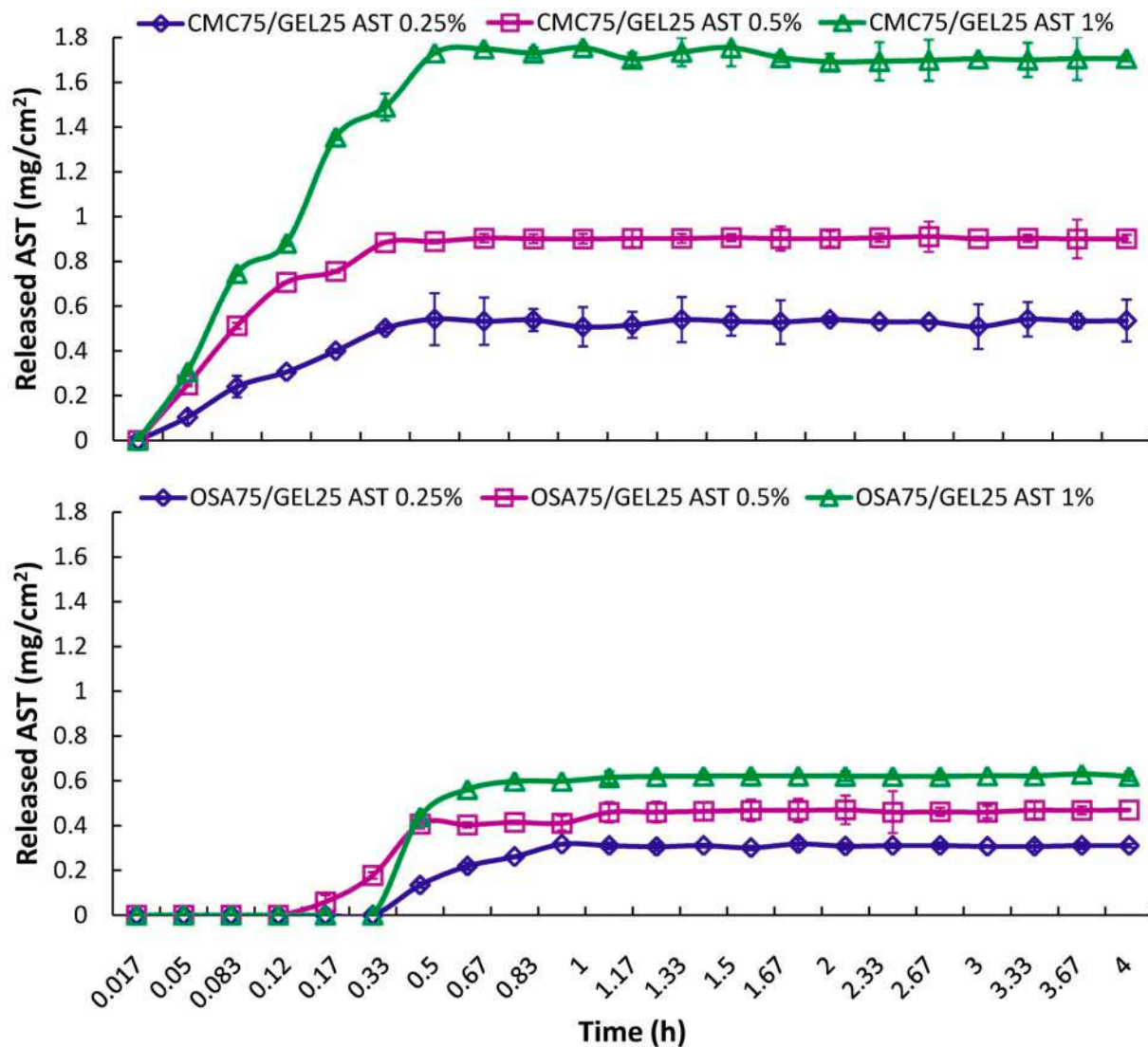


Fig. 5. Kinetics of cumulative release (mg/cm²) of Astasana (AST) from the 75/25 carboxymethyl cellulose/gelatin (CMC75/GEL25) and 75/25 octenyl succinyl anhydride starch/gelatin (OSA75/GEL25) blend films.

Table 4

Times required for 25% (t_{25%}) and 50% (t_{50%}) Astasana (AST) release from the 75/25 carboxymethyl cellulose/gelatin (CMC75/GEL25) and 75/25 octenyl succinyl anhydride starch/gelatin (OSA75/GEL25) films obtained from the best fitting mathematical models.

Film	AST (%)	t _{25%} (min)	t _{50%} (min)
CMC75/GEL25	0	–	–
	0.25	1.56 ^(Ho)	3.48 ^(Ho)
	0.5	1.20 ^(F-O F_{max})	2.88 ^(F-O F_{max})
	1	1.74 ^(Ho)	4.08 ^(Ho)
OSA75/GEL25	0	–	–
	0.25	20.04 ^(Pr2)	33.9 ^(Pr2)
	0.5	12.36 ^(Lo2)	n.d. ^(Lo2)
	1	19.86 ^(P-S Tlag)	n.d. ^(P-S Tlag)

(F-O F_{max}) First order with F_{max} model.

(Ho) Korsmeyer–Peppas with T_{lag} model.

(P-S Tlag) Peppas–Sahlin 1 with T_{lag} model.

(Lo 2) Logistic 2 model.

(Pr 2) Probit 2 model.

n.d. – no data.

concentration tended to slow down the release rate in the OSA-based system (Fig. S3; Table 4), which could be explained by the gradually decreasing solubility (Fig. 4). As can be seen from Fig. S4, there was a strong positive correlation (R² = 0.78) between the AST release rate and the TSM. Since the AST concentration strongly affected the release profiles, various mathematical models were required to predict the rate of AST release from the CMC- and OSA-based films (Fig. 6).

Eight mathematical equations (Table S1) were used for the quantitative interpretation of the data obtained from the ASTA release assay. The R²_{adjusted} and parameter values estimated for the models are presented in Tables S2, S3, and S4. It was impossible to fit one optimal model to describe the migration of AST from the particular carrier types; however, based on R²_{adjusted} averages, the Probit 2 (Pr 2) model provided the best fit for all release series data (R²_{adjusted} mean = 0.9915). It was found that, in the case of the CMC-based carrier, two-parameter models: First order with F_{max} (F-O F_{max}) and Hopfenberg (Ho) approximated the experimental points better than the three- and four-parameter equations (Table S2). A possible explanation for this result may be the lack of time lag for these systems. The F-O model describes the dissolution of a drug that is not effectively enclosed in the polymeric matrix and is ready to dissolve from the carrier surface intermediately after contact with the release medium. In turn, the Ho model correlates the

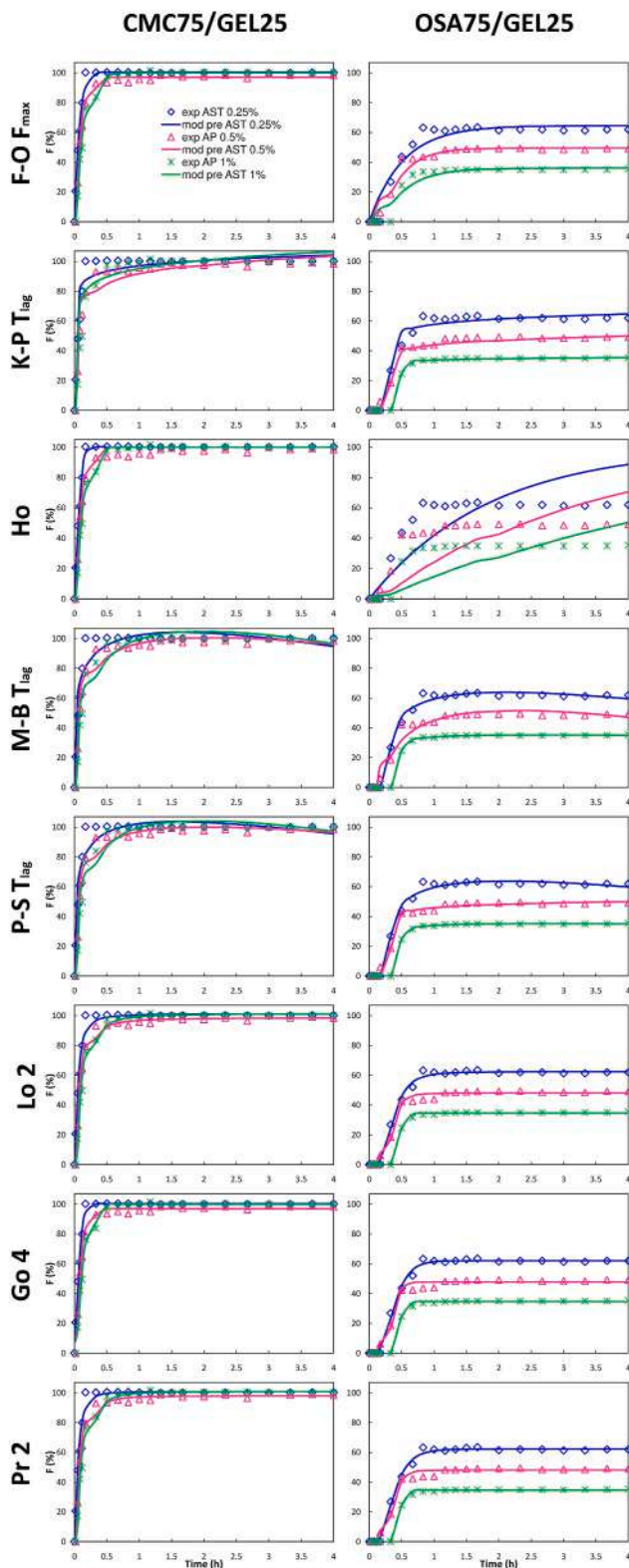


Fig. 6. Fraction (F) of Astasana (AST) released from the 75/25 carboxymethyl cellulose/gelatin (CMC75/GEL25) and 75/25 octenyl succinic anhydride starch/gelatin (OSA75/GEL25) films according to the First order with F_{max} ($F-O F_{max}$), Korsmeyer–Peppas with T_{lag} (K–P T_{lag}), Hopfenberg (Ho), Makoid–Banakar with T_{lag} (M–B T_{lag}), Peppas–Sahlin 1 with T_{lag} (P–S T_{lag}), Logistic 2 (Lo 2), Gompertz 4 (Go 4), and Probit 2 (Pr 2) models; experimental (points) and theoretical data (lines).

substance release from surface eroding polymers (Paarakh, Jose, Setty, & Peter, 2018). The Ho model, for example, has been used for successful modeling the release of amoxicillin from erodible hydroxypropyl methylcellulose tablets (Katzhendler, Hoffman, Goldberger, & Friedman, 1997). The release profile obtained for the OSA-based system was an “S-shaped” curve (Fig. 5; Fig. S3). Consequently, in the case of this carrier system, the more complex models (i.e. with at least three parameters) approximated the experimental points better than the two-parameter ones (Table S2).

According to the Korsmeyer–Peppas with T_{lag} (K–P T_{lag}) model, the n values were below 0.5 ($n = 0.006–0.082$, Table S4), which shows that the AST was transported via a quasi-Fickian diffusion-controlled mechanism (Malekjani & Jafari, 2021). This finding is consistent with that reported by Colín-Chávez et al., (2013a), who analysed the diffusion of natural ASX from polyethylene active packaging films into ethanol.

3.8. Antioxidant properties

So far, ASX has two main potential technological applications, i.e. in food colouring and antioxidant protection. It was found that the control polysaccharide/GEL films (without AST) showed relatively high ABTS⁺⁺ scavenging activity (~62–77% at 180 min of incubation; Fig. 7). Since the films based only on the polysaccharides have poor antioxidant potential (Kowalczyk & Biendl, 2016), this result may be ascribed to the presence of the GEL fraction in the carriers. As suggested previously (Kowalczyk et al., 2021), some amino acid residues of GEL (including glycine and proline) could donate electrons and neutralise free radicals. The control CMC-based film exhibited higher antiradical ability than the OSA-based carrier, which might be related to its faster initial dissolution (Fig. 7). As expected, the increasing level of AST in the films resulted in a gradual increase in the ABTS⁺⁺ scavenging capacity (Fig. 7). The CMC75/GEL25 system, regardless of the AST concentration, offered higher antioxidant activity than the OSA75/GEL25 film. This result can be explained in terms of the release profiles of the films (Fig. 5). As can be seen from Table S5, a high positive correlation was found between the cumulative AST release (mg/cm^2) and the ABTS scavenging ($R^2 = 0.78–0.91$).

4. Conclusion

Although CMC75/GEL25 and OSA75/GEL25 are immiscible phase-separated systems, they possess good film-forming abilities. The comparison of the physicochemical properties of the films revealed that the AST-supplemented CMC75/GEL25 and OSA75/GEL25 films had similar color; nevertheless, the CMC-containing films were stronger, less stretchable, and more opaque, than the OSA-based films. A five-fold decrease in the oxygen permeability of the CMC75/GEL25 film, as a result of AST incorporation (at a level of 1%) was observed. It suggests that the obtained film could protect the food against oxidation as effective oxygen barrier material.

The droplet-type microstructures (likely coacervates) formed by the OSA-based system showed the AST encapsulation efficiency, as indicated by the incomplete AST release (with a lag time) and the particle sedimentation behaviour. The slower release of AST from the OSA-based carrier, compared to the CMC-containing systems, was mainly influenced by its slower initial dissolution rate. Nevertheless, the sigmoid release profile observed for the OSA-containing carrier might be considered beneficial. It can be assumed that when this system is used as the coating material for high-moisture food, the major dose of the antioxidant will be maintained on the food surface, where the oxidation reactions mainly occur. In turn, the released AST fraction will inhibit oxidation in the surface layer of the product, which is also favourable. By that logic, the rapid release (‘burst effect’) of AST from the CMC75/GEL25 carrier is not advantageous, as it may lead to quick depletion of the protective action of the antioxidant on the surface.

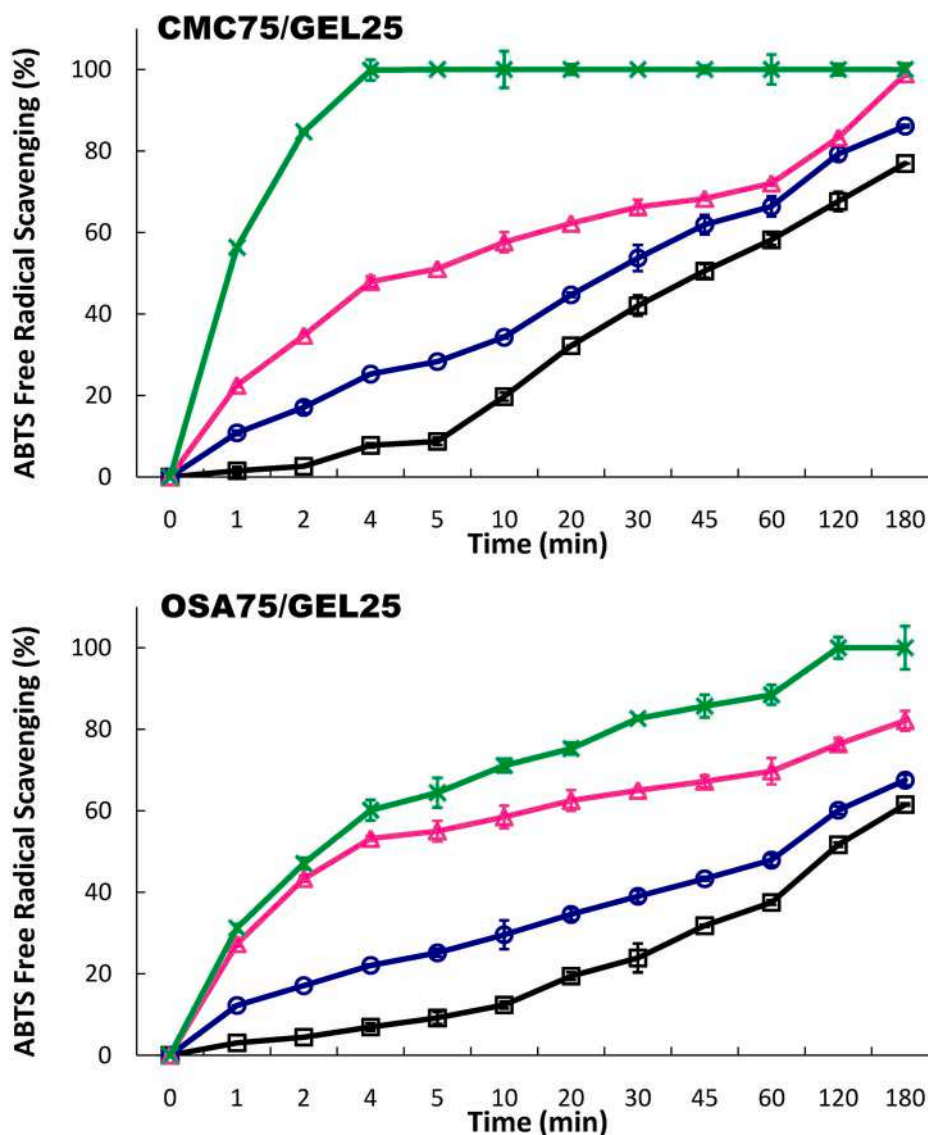


Fig. 7. Effect of increasing Astasana (AST) concentration on the kinetics of antiradical activity of the 75/25 carboxymethyl cellulose/gelatin (CMC75/GEL25) and 75/25 octenyl succinic anhydride starch/gelatin (OSA75/GEL25) films.

In summary, the 1%AST-supplemented OSA75/GEL25 films offered controlled diffusion-limited release and simultaneously maximised the antioxidant potential of AST. The AST-added films, owing to their red color, good oxygen barrier and enhanced free radical scavenging properties could be a preferred choice for the active antioxidant packaging development for specific applications, e.g. edible coatings for cheese, nuts, red meat, surimi sticks, etc.

CRedit authorship contribution statement

Katarzyna Łupina: Conceptualization, Methodology, Data curation, Formal analysis, Visualization, Investigation, Writing – original draft. **Dariusz Kowalczyk:** Conceptualization, Methodology, Supervision, Validation. **Magdalena Lis:** Investigation. **Aneta Raszewska-Kaczor:** Investigation. **Emilia Droźłowska:** Investigation.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work was financially supported by the National Science Centre (Poland) under grant number 2019/35/N/NZ9/01795. We thank Emil Zięba (Laboratory of Confocal and Electron Microscopy, Centre for Interdisciplinary Research Faculty of Science and Health, John Paul II Catholic University of Lublin, Konstanyńów 1J, 20–708 Lublin, Poland) for assistance with cryo-SEM observation of the samples.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107179>.

List of abbreviations

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt
AST	AstaSana™ 5% CWS/S-TG; ASX-astaxanthin
ATR-FTIR	attenuated total reflection Fourier transform infrared
CA	contact angle

CDX–085	Cardax's proprietary astaxanthin prodrug
CMC	carboxymethyl cellulose
cryo-SEM	cryogenic scanning electron microscopy
DDA	disodium disuccinate astaxanthin
EFSA	European Food Safety Authority
FFS	film-forming solution
F-O F_{max}	First order with F _{max} model
GEL	gelatin
Go 4	Gompertz 4 model
Ho	Hopfenberg model
K-P T_{lag}	Korsmeyer–Peppas with time lag model
Lo 2	Logistic 2 model
RH	relative humidity
M-B T_{lag}	Makoid–Banakar with time lag model
Op	opacity
OSA	octenyl succinic anhydride starch
OTR	oxygen transmission rate
PD	puncture deformation
Pr 2	Probit 2 model
PS	puncture strength
P-S T_{lag}	Peppas–Sahlin 1 with time lag model
SEM	scanning electron microscopy
Sw	swelling
TSM	total soluble matter
WVP	water vapour permeability

References

- Ačkar, D., Babić, J., Jozinović, A., Miličević, B., Jokić, S., Miličević, R., Jokić, S., & Šubarić, D. (2015). Starch modification by organic acids and their derivatives: A review. *Molecules*, 20(10), 19554–19570. <https://doi.org/10.3390/molecules201019554>
- Ambati, R. R., Moi, P. S., Ravi, S., & Aswathanarayana, R. G. (2014). Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications - a review. *Marine Drugs*, 12(1), 128–152. <https://doi.org/10.3390/md12010128>
- Bogacz-Radomska, L., & Harasym, J. (2018). β -Carotene-properties and production methods. *Food Quality and Safety*, 2(2), 69–74. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy004>
- Bourtoom, T. (2008). Edible films and coatings : Characteristics and properties. *International Food Research Journal*, 15(3), 237–248.
- Brendler, T., & Williamson, E. M. (2019). Astaxanthin: How much is too much? A safety review. *Phytotherapy Research*, 33(12), 3090–3111. <https://doi.org/10.1002/ptr.6514>
- Brody, A., Strupinsky, E., & Kline, L. (2001). *Active packaging for food applications*. Boca Raton: CRC Press.
- Builders, P. F., & Arhewoh, M. I. (2016). Pharmaceutical applications of native starch in conventional drug delivery. *Starch/Stärke*, 68, 864–873. <https://doi.org/10.1002/star.201500337>
- Capelli, B., Bagchi, D., & Cysewski, G. R. (2013). Synthetic astaxanthin is significantly inferior to algal-based astaxanthin as an antioxidant and may not be suitable as a human nutraceutical supplement. *Nutrafods*, 12(4), 145–152. <https://doi.org/10.1007/s13749-013-0051-5>
- Coates, J. (2006). Interpretation of infrared spectra, A practical approach. In R. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of analytical chemistry* (pp. 1–23). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a5606>
- Colín-Chávez, C., Soto-Valdez, H., Peralta, E., Lizardi-Mendoza, J., & Balandrán-Quintana, R. (2013a). Diffusion of natural astaxanthin from polyethylene active packaging films into a fatty food simulant. *Food Research International*, 54(1), 873–880. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.08.021>
- Colín-Chávez, C., Soto-Valdez, H., Peralta, E., Lizardi-Mendoza, J., & Balandrán-Quintana, R. (2013b). Fabrication and properties of antioxidant polyethylene-based films containing marigold (*Tagetes erecta*) extract and application on soybean oil stability. *Packaging Technology and Science*, 29, 399–412. <https://doi.org/10.1002/pts>
- EFSA. (2014). Panel on dietetic products, Nutrition and Allergies (NDA) Scientific opinion on the safety of astaxanthin-rich ingredients (AstaREAL A1010 and AstaREAL L10) as novel food ingredients. *EFSA Journal*, 3757, 1–35.
- Feng, Z. Z., Li, M. Y., Wang, Y. T., & Zhu, M. J. (2018). Astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*: Microencapsulation with carboxymethyl cellulose sodium and microcrystalline cellulose and effects of microencapsulated astaxanthin on yogurt properties. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 96, 152–160. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.084>
- Gómez-Estaca, J., Calvo, M. M., Sánchez-Faure, A., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2015). Development, properties, and stability of antioxidant shrimp muscle protein films incorporating carotenoid-containing extracts from food by-products. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 64(1), 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.052>
- Han, & Floros, J. D. (1997). Casting antimicrobial packaging films and measuring their physical properties and antimicrobial activity. *Journal of Plastic Film and Sheeting*, 13(4), 287–298. <https://doi.org/10.1177/875608799701300405>
- Hejna, A., Lenža, J., Formela, K., & Korol, J. (2019). Studies on the combined impact of starch source and multiple processing on selected properties of thermoplastic starch/ethylene-Vinyl acetate blends. *Journal of Polymers and the Environment*, 27(5), 1112–1126. <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01406-1>
- Higuera-Ciajara, I., Félix-Valenzuela, L., & Goycoolea, F. M. (2006). Astaxanthin: A review of its chemistry and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(2), 185–196. <https://doi.org/10.1080/10408690590957188>
- ISO 2528. (1995). *Sheet materials - determination of water vapour transmission rate - gravimetric (dish) method*.
- Jafari, J., Emami, S. H., Samadikuchaksaraei, A., Bahar, M. A., & Gorjipour, F. (2011). Electrospun chitosan-gelatin nanofibrous scaffold: Fabrication and in vitro evaluation. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 21(2), 99–112. <https://doi.org/10.3233/BME-2011-0660>
- Janjarasskul, T., Min, S. C., & Krochta, J. M. (2013). Triggering mechanisms for oxygen-scavenging function of ascorbic acid-incorporated whey protein isolate films. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(12), 2939–2944. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6120>
- Katzhendler, I., Hoffman, A., Goldberger, A., & Friedman, M. (1997). Modeling of drug release from erodible tablets. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86(1), 110–115. <https://doi.org/10.1021/js9600538>
- Kowalczyk, D., & Baraniak, B. (2014). Effect of candelilla wax on functional properties of biopolymer emulsion films - a comparative study. *Food Hydrocolloids*, 41, 195–209. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.04.004>
- Kowalczyk, D., & Biendl, M. (2016). Physicochemical and antioxidant properties of biopolymer/candelilla wax emulsion films containing hop extract - a comparative study. *Food Hydrocolloids*, 60, 384–392. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.010>
- Kowalczyk, D., Kordowska-Wiater, M., Karaś, M., Zięba, E., Mężyńska, M., & Wiącek, A. E. (2020). Release kinetics and antimicrobial properties of the potassium sorbate-loaded edible films made from pullulan, gelatin and their blends. *Food Hydrocolloids*, 101, 105539. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105539>
- Kowalczyk, D., Pytka, M., Szymanowska, U., Skrzypek, T., Lupina, K., & Biendl, M. (2020). Release kinetics and antibacterial activity of potassium salts of iso- α -acids loaded into the films based on gelatin, carboxymethyl cellulose and their blends. *Food Hydrocolloids*, 109, 106104. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106104>
- Kowalczyk, D., Szymanowska, U., Skrzypek, T., Basiura-Cembala, M., Lupina, K., & Biendl, M. (2021). Edible films based on gelatin, carboxymethyl cellulose, and their blends as carriers of potassium salts of iso- α -acids: Structural, physicochemical and antioxidant properties. *Food Hydrocolloids*, 115. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106574>. December 2020.
- Liu, Y., Huang, L., Li, D., Wang, Y., Chen, Z., Zou, C., Liu, W., Ma, Y., Cao, M. J., & Liu, G. M. (2020). Re-assembled oleic acid-protein complexes as nano-vehicles for astaxanthin: Multispectral analysis and molecular docking. *Food Hydrocolloids*, 103. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105689>. January.
- Liu, C., Zhang, S., McClements, D. J., Wang, D., & Xu, Y. (2019). Design of astaxanthin-loaded core-shell nanoparticles consisting of chitosan oligosaccharides and poly(lactic-co-glycolic acid): Enhancement of water solubility, stability, and bioavailability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(18), 5113–5121. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06963>
- Malekjani, N., & Jafari, S. M. (2021). Modeling the release of food bioactive ingredients from carriers/nanocarriers by the empirical, semiempirical, and mechanistic models. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(1), 3–47. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12660>
- Martínez-Delgado, A. A., Khandual, S., & Villanueva-Rodríguez, S. J. (2017). Chemical stability of astaxanthin integrated into a food matrix: Effects of food processing and methods for preservation. *Food Chemistry*, 225, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.092>
- Meléndez Martínez, A. J., Vicario Romero, I., & Heredia Mira, F. J. (2004). Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(2).
- Ninan, G., Joseph, J., & Aliyamveetil, Z. A. (2014). A comparative study on the physical, chemical and functional properties of carp skin and mammalian gelatins. *Journal of Food Science & Technology*, 51(9), 2085–2091. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0681-4>
- Paarakh, M. P., Jose, P. A. N., Setty, C. M., & Peter, G. V. (2018). Release kinetics - concepts and applications. *International Journal of Pharmacy Research & Technology*, 8(1), 12–20. <https://doi.org/10.31838/ijprt/08.01.02>
- Panis, G., & Carreon, J. R. (2016). Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: A microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line. *Algal Research*, 18, 175–190. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.06.007>
- Queiroz Assis, R., D'Angelo Rios, P., de Oliveira Rios, A., & Olivera, F. C. (2020). Biodegradable packaging of cellulose acetate incorporated with norbixin, lycopene or zeaxanthin. *Industrial Crops and Products*, 147, 112212. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112212>
- Santos-Sánchez, N. F., Hernández-Carlos, B., Torres-Ariño, A., & Salas-Coronado, R. (2020). Astaxanthin and its formulations as potent oxidative stress inhibitors. *Pharmacology Reviews*, 14(27), 8–15.
- Scarfato, P., Avallone, E., Galdi, M. R., Di Maio, L., & Incarnato, L. (2015). Preparation, characterization, and oxygen scavenging capacity of biodegradable a-tocopherol/PLA microparticles for active food packaging applications. *Polymer Composites*, 38(5), 981–986. <https://doi.org/10.1002/pc>

- Shah, M. M. R., Liang, Y., Cheng, J. J., & Daroch, M. (2016). Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: From single cell to high value commercial products. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1–28. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00531>
- Sieradzka, M., & Kolodziejczyk-Czepas, J. (2016). Astaksantyna-karotenoidowy przeciwutleniacz o właściwościach kardioprotekcyjnych Astaxanthin-a carotenoid antioxidant with cardioprotective properties. *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 97(3), 197–206.
- Stahl, W., & Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24(6), 345–351. [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(03\)00030-X](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(03)00030-X)
- Tesch, S., Gerhards, C., & Schubert, H. (2002). Stabilization of emulsions by OSA starches. *Journal of Food Engineering*, 54(2), 167–174. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(01\)00206-0](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(01)00206-0)
- Wu, B., & McClements, D. (2015). Microgels formed by electrostatic complexation of gelatin and OSA starch: Potential fat or starch mimetics. *Food Hydrocolloids*, 47, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.01.021>
- Ye, K. X., Fan, T. T., Keen, L. J., & Han, B. N. (2019). A review of pigments derived from marine natural products. *Israel Journal of Chemistry*, 59(5), 327–338. <https://doi.org/10.1002/ijch.201800154>
- Yuan, C., Jin, Z., & Xu, X. (2012). Inclusion complex of astaxanthin with hydroxypropyl- β -cyclodextrin: UV, FTIR, ¹H NMR and molecular modeling studies. *Carbohydrate Polymers*, 89(2), 492–496. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.033>
- Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C., & Xie, S. (2010). DDSolver: An add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *The AAPS Journal*, 12(3), 263–271. <https://doi.org/10.1208/s12248-010-9185-1>
- Zhao, Y., Khalid, N., Shu, G., Neves, M. A., Kobayashi, I., & Nakajima, M. (2019). Complex coacervates from gelatin and octenyl succinic anhydride modified kudzu starch: Insights of formulation and characterization. *Food Hydrocolloids*, 86, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.01.040>
- Łupina, K., Kowalczyk, D., & Drożdowska, E. (2020). Polysaccharide/gelatin blend films as carriers of ascorbyl palmitate – a comparative study. *Food Chemistry*, 333, 127465. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127465>
- Łupina, K., Kowalczyk, D., Zięba, E., Kazimierzczak, W., Mężyńska, M., Basiura-Cembala, M., & Ewa, A. (2019). Edible films made from blends of gelatin and polysaccharide-based emulsifiers - a comparative study. *Food Hydrocolloids*, 96, 555–567. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.05.053>

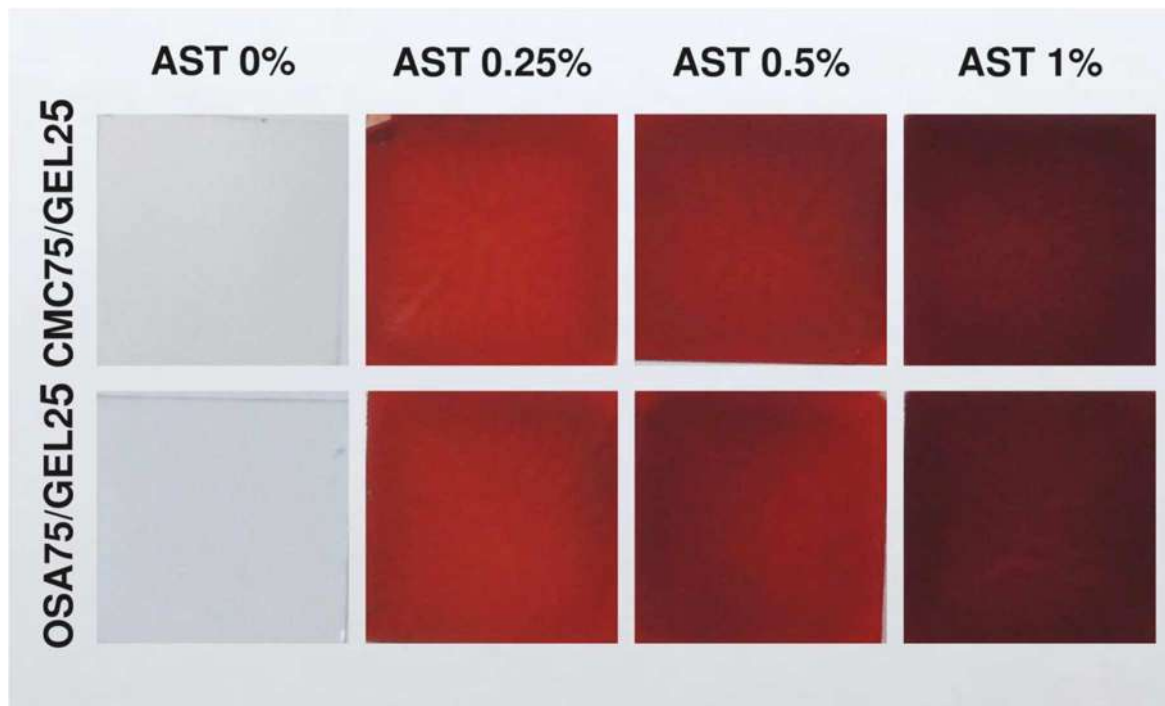


Fig. S1. Photographs of the 75/25 carboxymethyl cellulose/gelatin (CMC75/GEL25) and 75/25 octenyl succinic anhydride starch/gelatin (OSA75/GEL25) films incorporated with increasing concentration of Astasana (AST).

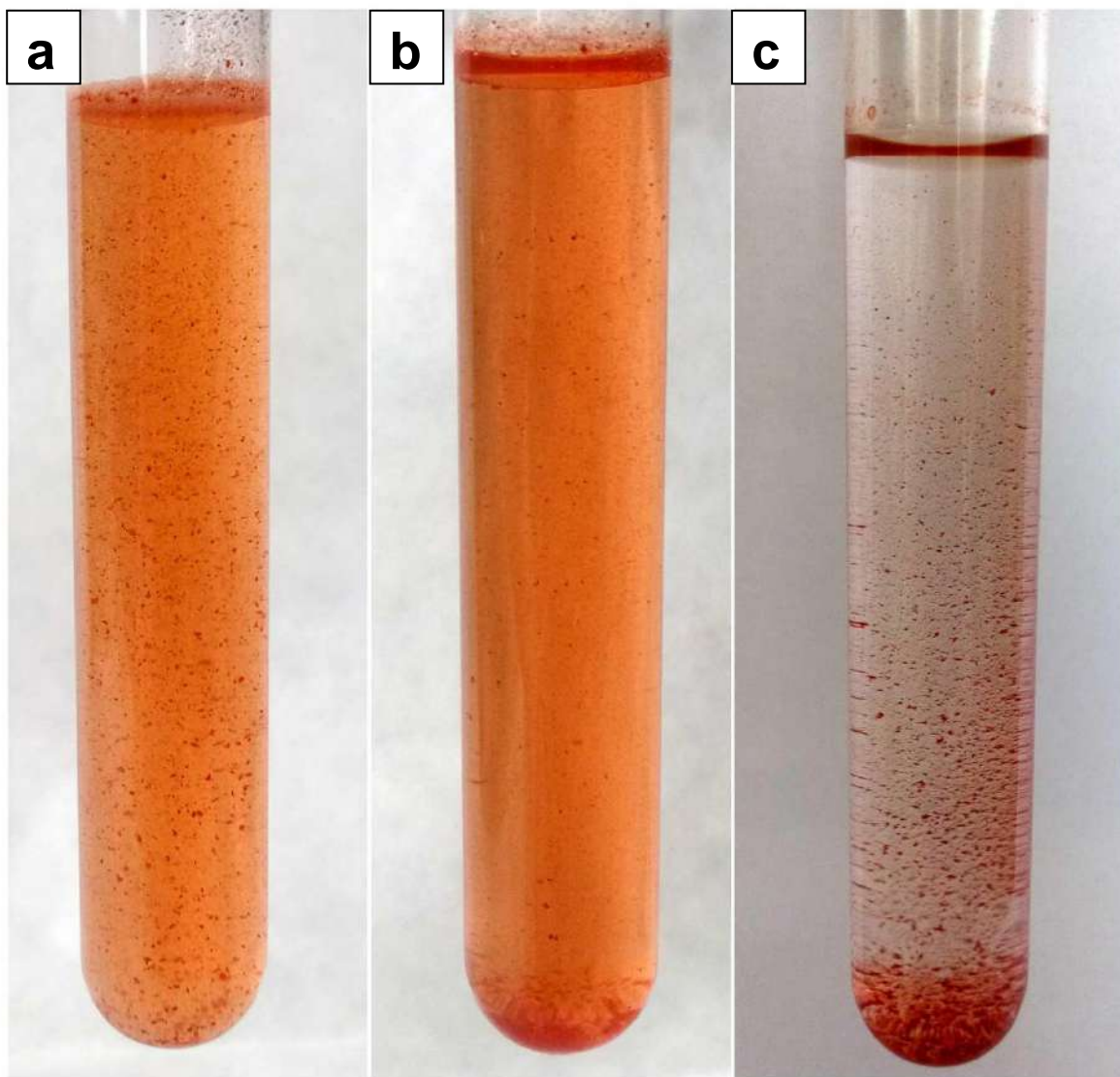


Fig. S2. Images of the 0.5% Astasana-added 75/25 octenyl succinic anhydride starch/gelatin film ($4 \text{ cm}^2 + 25 \text{ ml}$ of water) captured 0 min (a), 45 min (b), and 24 h (c) after the end of the dissolution test.

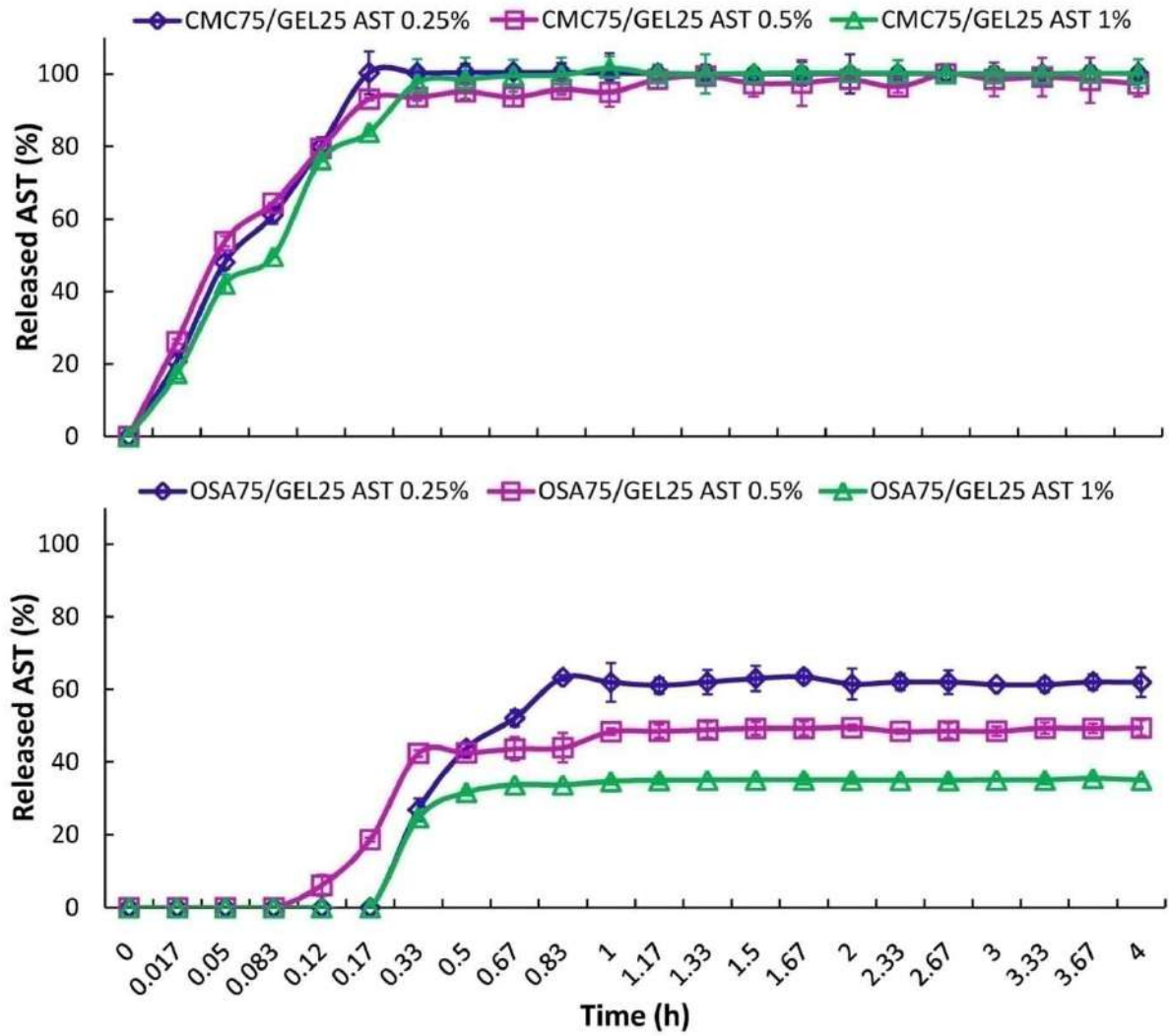


Fig. S3. Kinetics of cumulative release (%) of Astasana (AST) from the 75/25 carboxymethyl cellulose/gelatin (CMC75/GEL25) and 75/25 octenyl succinic anhydride starch/gelatin (OSA75/GEL25) films.

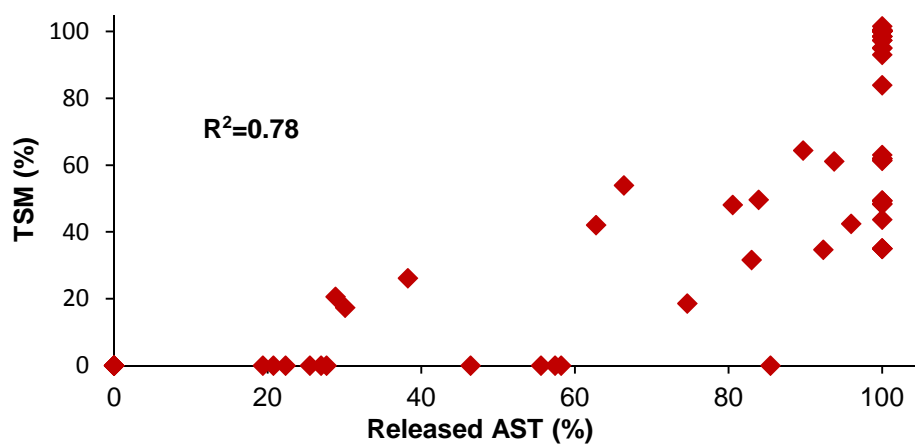


Fig. S4. Correlation (R^2) between the total soluble matter (TSM) and the percentage amount of Astasana (AST) released from the 75/25 carboxymethyl cellulose/gelatin and 75/25 octenyl succinic anhydride starch/gelatin films.

Table S1. Mathematical models used to describe the dissolution curves (Zhang et al. 2010).

Model	Equation	Parameters
First order with F_{max} (F-O F_{max})	$F = F_{max} \cdot (1 - e^{-k_1 \cdot t})$	k_1, F_{max}
Korsmeyer-Peppas with T_{lag} (K-P T_{lag})	$F = k_{KP} \cdot (t - T_{lag})^n$	k_{KP}, n, T_{lag}
Hopfenberg (Ho)	$F = 100 \cdot [1 - (1 - k_{HB} \cdot t)^n]$	k_{HB}, n
Makoid-Banakar with T_{lag} (M-B T_{lag})	$F = k_{MB} \cdot (t - T_{lag})^k \cdot \text{Exp}[-k \cdot (t - T_{lag})]$	k_{MB}, n, k, T_{lag}
Peppas-Sahlin 1 with T_{lag} (P-S T_{lag})	$F = k_1 \cdot (t - T_{lag})^m + k_2 \cdot (t - T_{lag})^{2m}$	k_1, k_2, m, T_{lag}
Logistic 2 (Lo 2)	$F = F_{max} \frac{[e^{\alpha + \beta \cdot \log(t)}]}{1 + e^{\alpha + \beta \cdot \log(t)}}$	α, β, F_{max}
Gompertz 4 (Go 4)	$F = F_{max} \cdot e^{-\beta \cdot e^{-k \cdot t}}$	k, β, F_{max}
Probit 2 (Pr 2)	$F = F_{max} \cdot \Phi[\alpha + \beta \cdot \log(t)]$	α, β, F_{max}

F is the fraction (%) of drug released in time t

k_1 is the first-order release constant

F_{max} is the maximum fraction of the drug released at infinite time

T_{lag} is the lag time prior to drug release

k_{KP} is the release constant incorporating structural and geometric characteristics of the drug-dosage form; n is the diffusional exponent indicating the drug-release mechanism

k_{HB} is the combined constant in Hopfenberg model, $k_{HB} = k_0 / (C_0 \times a_0)$, where k_0 is the erosion rate constant, C_0 is the initial concentration of drug in the matrix, and a_0 is the initial radius for a sphere or cylinder or the half thickness for a slab; n is 1, 2, and 3 for a slab, cylinder, and sphere, respectively

k_{MB} , n , and k are empirical parameters in Makoid-Banakar model (k_{MB} , n , $k > 0$)

k_1 is the constant related to the Fickian kinetics; k_2 is the constant related to Case-II relaxation kinetics; m is the diffusional exponent for a device of any geometric shape which inhibits controlled release

α is the scale factor in Logistic 1 and 2 models; β is the shape factor in Logistic 1 and 2 models

β is the scale factor in Gompertz 4 model; k is the shape factor in Gompertz 4 model

Φ is the standard normal distribution; α is the scale factor in Probit model; β is the shape factor in Probit model

Table S2. Comparison of the adjusted coefficient of determination (R^2_{adjusted}) values obtained from fitting experimental data to the different release models.

Film	AST (%)	F-O F_{max}	K-P T_{lag}	Ho	M-B T_{lag}	P-S T_{lag}	Lo 2	Go 4	Pr 2	Best fit
CMC75/GEL25	0.25	0.9910	0.9160	0.9952	0.9343	0.9443	0.9823	0.9886	0.9838	Ho
	0.5	0.9914	0.9339	0.9821	0.9640	0.9706	0.9899	0.9790	0.9902	F-O F_{max}
	1	0.9943	0.9200	0.9945	0.9514	0.9587	0.9889	0.9890	0.9894	Ho
OSA75/GEL25	0.25	0.9392	0.9857	0.6678	0.9939	0.9943	0.9956	0.9957	0.9966	Pr 2
	0.5	0.9509	0.9873	0.3178	0.9654	0.9915	0.9920	0.9901	0.9911	Lo 2
	1	0.9192	0.9992	0.3135	0.9997	0.9998	0.9981	0.9982	0.9978	P-S T_{lag}
Average		0.9643	0.9570	0.7118	0.9681	0.9765	0.9911	0.9901	0.9915	Pr 2

Table S3. Parameters obtained from fitting experimental data to the release models with F_{max} parameter.

Film	AST (%)	F-O F_{max}		Lo 2			Go 4			Pr 2		
		k_l (1/min)	F_{max}	α	β	F_{max}	k	β	F_{max}	α	β	F_{max}
CMC75/GEL25	0.25	13.286	100.539	4.860	3.776	101.227	21.933	2.569	100.288	2.927	2.258	100.750
	0.5	15.049	97.169	4.129	2.991	98.744	22.563	2.233	96.934	2.535	1.826	97.994
	1	10.310	100.207	4.108	3.471	101.475	17.391	2.511	99.841	2.473	2.072	100.817
OSA75/GEL25	0.25	1.938	64.609	3.486	8.218	62.397	6.621	8.717	62.033	2.051	4.832	62.219
	0.5	2.970	49.637	5.404	7.753	48.157	13.556	10.120	47.818	3.263	4.677	48.025
	1	2.392	36.161	7.706	14.278	34.698	14.686	45.899	34.682	4.449	8.179	34.667

Table S4. Kinetic parameters obtained from modeling without F_{max} parameter.

Film	AST (%)	Ho		K-P T_{lag}			M-B T_{lag}				P-S T_{lag}			
		k_{HB}	n	k_{KP}	n	T_{lag}	k_{MB}	n	k	T_{lag}	k_1	k_2	m	T_{lag}
CMC75/GEL25	0.25	4.379	2.354	97.282	0.051	0.050	114.028	0.173	0.107	0.017	184.585	-82.130	0.264	0.017
	0.5	0.006	2236.480	93.319	0.082	0.017	106.377	0.148	0.080	0.017	174.082	-75.805	0.238	0.017
	1	1.092	8.920	95.543	0.079	0.050	115.907	0.225	0.130	0.017	175.899	-74.318	0.307	0.016
OSA75/GEL25	0.25	0.000	5041.121	59.327	0.067	0.330	69.974	0.215	0.120	0.319	106.128	-44.169	0.310	0.313
	0.5	0.000	2046.785	45.349	0.077	0.170	58.819	0.396	0.203	0.091	68.554	-21.622	0.103	0.170
	1	0.000	1773.119	34.396	0.026	0.330	35.823	0.060	0.029	0.328	63.175	-28.350	0.149	0.320

Table. S5. Correlations (R^2) between the cumulative release (mg/cm^2) of AstaSana (AST) and the antiradical activity of the 75/25 carboxymethyl cellulose/gelatin (CMC75/GEL25) and 75/25 octenyl succinic anhydride starch/gelatin (OSA75/GEL25) films.

Polysaccharide/GEL blend ratio	AST (%)	R^2
CMC75/GEL25	0.25	0.87
	0.5	0.82
	1	0.78
OSA75/GEL25	0.25	0.91
	0.5	0.87
	1	0.87
All formulations		0.73

Article

Functional Properties and Storage Stability of Astaxanthin-Loaded Polysaccharide/Gelatin Blend Films—A Comparative Study

Katarzyna Łupina ¹, Dariusz Kowalczyk ^{1,*}  and Waldemar Kazimierczak ² 

¹ Department of Biochemistry and Food Chemistry, Faculty of Food Sciences and Biotechnology, University of Life Sciences in Lublin, Skromna 8, 20-704 Lublin, Poland

² Department of Biomedicine and Environmental Research, Faculty of Natural Sciences and Health, The John Paul II Catholic University of Lublin, Konstantynów 1J, 20-708 Lublin, Poland

* Correspondence: dariusz.kowalczyk@up.lublin.pl; Tel.: +48-81-462-33-96; Fax: +48-81-462-33-24

Abstract: Edible films were obtained from the aqueous binary 75/25 blends of polysaccharides (carboxymethyl cellulose (CMC), gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride starch (OSA), and water-soluble soy polysaccharides (WSSP)) and gelatin (GEL) supplemented with increasing concentrations (0, 0.25, 0.5, and 1% *w/w*) of water-soluble AstaSana (AST) astaxanthin. The AST-loaded films were red and exhibited a grainy microstructure and reduced transparency. The CMC- and WSSP-based films were the best UV-C blockers. After the incorporation of 1% AST, the antiradical activity of the films increased by 1.5 times (~25 percentage points) compared to the controls. The tensile strength (TS) of the CMC-containing films was much higher than those of the other films (36.88–43.04 vs. 2.69–15.62 MPa). AST decreased the TS of the CMC/GEL film (by ~11–14%) but improved the mechanical cohesiveness of the GAR/GEL film (by ~50%). The storage test (at 25 °C and 60 °C, no light access) revealed that the CMC- and GAR-based films exhibited the lowest colour change. Furthermore, at the elevated temperature, the films with higher AST concentration exhibited a better ability to maintain their colour. The WSSP/GEL films were the most prone to darkening and yellowing, possibly due to the Maillard reaction. Moreover, these films had the weakest antiradical activity.

Keywords: edible films; polysaccharides; gelatin; astaxanthin; colour stability; antioxidant activity



Citation: Łupina, K.; Kowalczyk, D.; Kazimierczak, W. Functional Properties and Storage Stability of Astaxanthin-Loaded Polysaccharide/Gelatin Blend Films—A Comparative Study. *Polymers* **2022**, *14*, 4001. <https://doi.org/10.3390/polym14194001>

Academic Editor: Yury A. Skorik

Received: 25 August 2022

Accepted: 21 September 2022

Published: 24 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Active packaging refers to the incorporation of certain additives into packaging to maintain and extend product shelf life. As there are many oxidation-susceptible components in food, packages with an antioxidant effect are an important group of active packaging. In response to the growing problem with the disposal of used plastic packaging, many formulations of active packaging materials obtained from renewable raw materials, e.g., polysaccharides and proteins, have been developed. Depending on the method used, such packaging is biodegradable and edible, which creates a new application potential (e.g., edible coatings, casings, capsules, and microcapsules). Antioxidants introduced into food and edible packaging should primarily be highly effective (i.e., active at low concentrations), acceptable to consumers, and cheap. The current antioxidant market is very rich and offers newer and stronger substances. One of the most effective antioxidants is astaxanthin (ASX), i.e., a red carotenoid extracted from *Haematococcus pluvialis* algae or obtained with the use of synthetic methods due to the high demand. Studies have shown that natural astaxanthin is 54 times more potent than β -carotene, 65 times more potent than vitamin C, and 500 times more active than vitamin E and coenzyme Q10 [1]. With its antioxidant properties, ASX exerts a positive effect on human health [2–4]. Its values are appreciated by an increasing number of industries, including the research and development sector of the

packaging industry [5–7]. It can be assumed that, owing to its red colour and antioxidant properties, ASX-supplemented packaging may be suitable for specific applications, e.g., red coatings for cheese, nuts, pork, beef, and surimi sticks [8].

As ASX is commercially available as a hydrophobic (e.g., oleoresin) as well as a hydrophilic (e.g., ASX derivatives) compound, the dual hydrophobic–hydrophilic behaviour of the carrier material could be a rational approach to the development of active packaging systems. Consequently, in this study, the polymers with emulsion-stabilizing effects were used as the ASX carriers. Due to certain advantages, AstaSana (AST)—a commercial formulation of water-soluble ASX—was used as the active ingredient.

In materials science, a polymer blend, or a polymer mixture, is a member of a class of materials with extended useful properties beyond the range that can be obtained from a single polymer. Previous studies [9,10] have shown that a combination of polysaccharides and gelatin (GEL) yields materials with modified properties, including changed profiles of active compound release, which is extremely important for the efficiency of the active packaging. Our recent study showed that blend films based on carboxymethyl cellulose (CMC) and GEL offered quick release of ASX ('burst effect'), while the octenyl succinic anhydride starch (OSA)/GEL system ensured ASX release with a time lag [8]. Another study showed that films based on water-soluble soy polysaccharides (WSSPs) and GEL demonstrated a more proportional ASX release rate in comparison to the gum Arabic (GAR)/GEL system. As oxidation reactions occur mostly on food surfaces, the controlled release of ASX may be beneficial, as the antioxidant will persist on the food surface (where it is most needed) for an extended period of time [11]. Depending on the concentration, the active substances incorporated into biopolymer-based packaging materials may improve or worsen their functionality. Furthermore, the different packaging materials may ensure various degrees of stability of active ingredients.

Therefore, this study aimed to assess the influence of carrier type (75/25 blends of CMC/GEL, GAR/GEL, OSA/GEL, and WSSP/GEL) and AST concentration (0, 0.25, 0.5, and 1% *w/w*) on the functional (light transmission, tensile properties, stability of colour, and stability of antioxidant activity) characteristics of the resulting edible active films. The data given here complement the previous publications [8,11], which mainly focused on the kinetics and mechanisms of AST release from the films.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

The following food-grade polymers were used in this study: sodium CMC WALOCEL CRT 30 GA (viscosity: 25–35 cP (2% solution 25 °C), a substitution degree of 0.82–0.95; Dow Wolff Cellulosics, Bomlitz, Germany), GAR Agri-Spray Acacia R (Agrigum International, High Wycombe, UK), waxy maize starch sodium octenyl succinate Purity Gum[®] 2000 (Ingredion, Hamburg, Germany), WSSP (Gushen Biological Technology Group Co., Dezhou, China), and pork GEL type A (pI ≈ 9, moisture content: 10.5%) with a Bloom strength of 240 (McCormick-Kamis S.A., Stefanowo, Poland). The AstaSana[™] 5% CWS/S-TG formulation (containing astaxanthin, modified starch, corn starch, glucose syrup, sodium ascorbate, and DL- α -tocopherol) was supplied by DSM Nutritional Products (Venlo, The Netherlands). Glycerol (purity > 99%, used as a plasticizer) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA).

2.2. Film Preparation

Films were prepared from aqueous biopolymer solutions containing a mixture of polysaccharides (3.75% *w/w*), GEL (1.25% *w/w*), glycerol (1% *w/w*), and increasing amounts of AST (0, 0.25, 0.5, and 1% *w/w*). Initially, powder blends of polysaccharides with GEL were weighed in ratios of 75/25, dissolved in water, and mixed with glycerol. The obtained film-forming solutions (FFSs, 150 g) were heated in closed 250 mL glass bottles placed in a water bath at 90 °C for 1 h with regular mixing by vigorous manual shaking.

After removing from the bath, the FFSs were continuously shaken (200 rpm, Heidolph Unimax 1010, Schwabach, Germany) to cool them down to ~ 40 °C. Then, the AST was introduced and the FFSs were mixed (30,000 rpm, 2 min) using an MT-30K hand-held homogenizer (Hangzhou Miu Instruments Co., Ltd., Hangzhou, China). Afterward, the FFSs were degassed (with 115-mesh stainless-steel sieve) and placed on polycarbonate trays with the area of 144 and 4 cm². A constant amount of total solids (0.0125 g/cm²) was cast and placed on the trays. The FFSs were dried at 25 ± 2 °C and $50 \pm 5\%$ relative humidity (RH) for 24 h. Then, the films were cut into samples and conditioned (25 °C, 50 RH, 48 h; MLR-350, Sanyo Electric Biomedical Co., Ltd., Oizumi-machi, Japan).

2.3. Microscopic Analysis

The microstructure of the films was observed using a light microscope (Leica5500B Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) with the use of a differential interference contrast (DIC) optical system and polarised light.

2.4. Moisture Content (MC)

The specimens (4 cm²) were dried in an oven at 105 °C for 24 h. The MC was calculated as the percentage of water removed from the system.

2.5. Mechanical Properties

Tensile strength (TS), elongation at break (E), and elastic modulus (EM) were determined using a TA-XT2i texture analyser equipped with a 50 kg load cell (Stable Micro Systems, Godalming, UK). Film samples (20 mm \times 50 mm) were mounted on the analyser with an initial grip separation at 30 mm and stretched with a speed of 1 mm s⁻¹. TS (MPa), E (%), and EM (MPa) were calculated using Equations (1)–(3), respectively:

$$TS = F_{\max} / A \quad (1)$$

where F_{\max} is the maximum load for breaking the film (N) and A is the initial specimen cross-sectional area (thickness \times width, mm²).

$$E = (\Delta L / L) \times 100 \quad (2)$$

where L is the initial gage length (mm) and ΔL is the difference in the length at the moment of fracture.

$$EM = (\sigma_2 - \sigma_1) / (\varepsilon_2 - \varepsilon_1) \quad (3)$$

where ε_1 is a strain of 0.2 (0.67%), ε_2 is a strain of 0.4 (1.33%), σ_1 (MPa) is the stress at ε_1 , and σ_2 (MPa) is the stress at ε_2 .

2.6. Light Transmission (T)

The T (%) of films (10 mm \times 50 mm) was measured in the wavelength range of 200–700 nm using a spectrophotometer (Lambda 40, Perkin-Elmer, Shelton, CT, USA). Five replicates of each film type were tested for the determination of T.

2.7. Colour Stability

Films (10 mm \times 50 mm) were stored without light at 25 ± 1 °C and $\sim 50\%$ RH for 60 days in the test chamber (MLR-350, Sanyo Electric Biomedical Co., Ltd., Oizumi-machi Japan). The colour parameters ($L^*a^*b^*$) of the films were measured with a colorimeter (NH310, 3nh, China) at three different time points (0, 30, and 60 days) using a white background ($L^* = 93.83$, $a^* = 0.34$, $b^* = -10.41$). Moreover, the accelerated storage condition (at 60 °C, three time points: 0, 15, and 30 days) was employed. The analyses were performed in five replications.

Changes in the total colour differences (ΔE) of the films during storage were calculated using Equation (4).

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2} \quad (4)$$

2.8. Impact of Storage on the Antioxidant Activity of the Films

The antiradical activity of the films (4 cm²) during storage (without light, 25 ± 1 °C, 50% RH; three time points: 0, 30, and 60 days) was determined according to a modified procedure proposed by Re et al. [12]. Fifty milligrams of film were dissolved in 1.5 mL of H₂O (40 °C). An amount of 40 µL of the sample solution was added to 1.96 µL of the ABTS^{•+} solution and the absorbance was measured using the spectrophotometer (Lambda 40, Perkin-Elmer, Shelton, CT, USA) at 734 nm after 60 min. ABTS^{•+} scavenging was calculated according to Equation (5).

$$\text{Scavenging (\%)} = [1 - (\text{Abs}/\text{Abs}_{\text{ABTS}})] \times 100 \quad (5)$$

where Abs is the absorbance of the sample and Abs_{ABTS} is the absorbance of the ABTS^{•+} solution (0.70 ± 0.05). The tests were performed in triplicate.

2.9. Statistical Analysis

Differences among the mean values of the data were tested for statistical significance at the $p < 0.05$ level using analysis of variance (STATISTICA 13.1, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) and Fisher's test.

3. Results and Discussion

3.1. Microstructure

Figure 1 shows micrographs of the control and 1% AST-supplemented films. The microstructures of the AST-free GAR- and OSA-based films were homogeneous and smooth (Figure 1A), which indicates a good compatibility between the polysaccharides and GEL. In turn, the CMC- and WSSP-based films exhibited rough topography. The inhomogeneity of the CMC/GEL film can be attributed to the immiscibility of its biopolymeric components manifested as phase-separated GEL-rich microspheres [8,10].

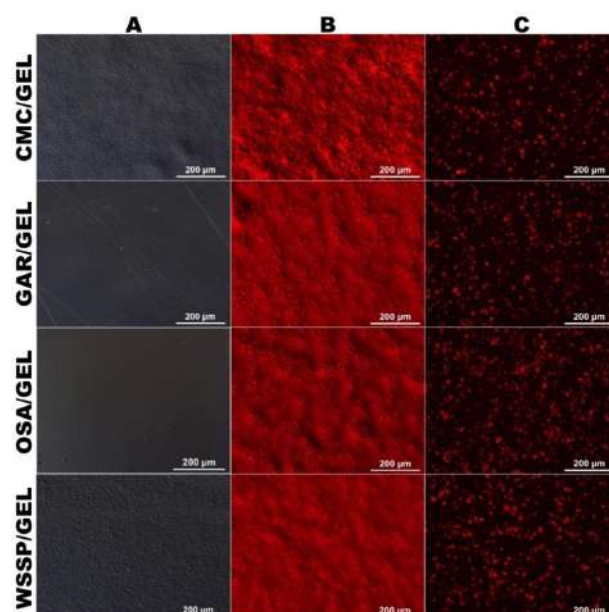


Figure 1. Microtopographies of AstaSana astaxanthin (AST)-free (A) and 1% AST-supplemented films (B,C) obtained from the 75/25 blends of polysaccharides (carboxymethyl cellulose (CMC), gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride starch (OSA), and water-soluble soy polysaccharides (WSSP)) and gelatin (GEL). (A,B)—unpolarized light; (C)—polarized light.

In turn, the grainy structure of the WSSP-based film reflects the presence of micro-sized polymer particles in the solution (Figure S1). In spite of nearly 100% solubility (Figure S2), the dissolved fraction of WSSP existed as microparticles (maximum diameter $\approx 4 \mu\text{m}$). Moreover, it was found that the presence of GEL slightly decreased the solubility of WSSP (Figure S1), which could be the result of the association of WSSP with GEL [13], manifested by the formation of microscopic agglomerates (Figure S2). To support this observation, our previous study also showed that the blend WSSP/GEL film was more rough than the neat WSSP film [14].

The AST-containing films were intensively red (Figure 1B). Moreover, the active films were uneven (Figure 1B) as a result of the presence of starch granules in the AST formulation (as evidenced by the occurrence of Maltese crosses, Figure 1C).

3.2. MC

As can be seen from Table 1, the CMC- and OSA-containing films had a higher MC (~14%) than the GAR- and WSSP-based carriers (~11%), which is partially consistent with the result of a previous study [14]. Regardless of the carrier type, the increasing concentration of AST tended to reduce the MC value. Considering the fact that all films were obtained from the same amount of total solids (to achieve the same film thickness), this result cannot be explained by the increasing dry mass content in the films. Based on the results of a previous study [15], it can be speculated that AST affected the moisture retention in the carriers through the development of hydrogen bonds between the polymers and the AST constituents, which inhibited the formation of polymer-water hydrogen bonds and, consequently, resulted in limited MC. Among the AST-supplemented samples, the CMC-based films had the highest MC. This result may be attributed to the presence of numerous hydrophilic groups (hydroxyl and carboxylic) in the CMC structure. The excellent water binding and moisture sorption properties of CMC-based films have been proved previously [10,16].

Table 1. The effect of Astasana (AST) concentration on the moisture content (MC), tensile strength (TS), elongation at break (E), and elastic modulus (EM) of 75/25 blend films obtained from polysaccharides: carboxymethyl cellulose (CMC), gum Arabic (GAR), octenyl-succinic-anhydride-modified starch (OSA), water-soluble soy polysaccharides (WSSP), and gelatin (GEL).

Films	AST (%)	MC (%)	TS (MPa)	E (%)	EM (MPa)
CMC/GEL	0	14.28 \pm 0.21 ⁱ	43.04 \pm 3.81 ^h	22.59 \pm 6.53 ^b	1242.68 \pm 179.48 ^{fg}
	0.25	13.62 \pm 0.31 ^h	38.36 \pm 1.61 ^g	20.51 \pm 7.06 ^{ab}	1302.23 \pm 112.87 ^g
	0.5	12.78 \pm 0.24 ^g	37.51 \pm 2.87 ^g	25.20 \pm 4.93 ^{bc}	1171.33 \pm 135.84 ^e
	1	12.03 \pm 0.24 ^f	36.88 \pm 2.78 ^g	12.57 \pm 2.94 ^{ab}	1216.89 \pm 146.18 ^{ef}
GAR/GEL	0	11.58 \pm 0.46 ^{ef}	10.31 \pm 2.06 ^{bcd}	15.31 \pm 4.46 ^{ab}	314.90 \pm 96.39 ^b
	0.25	11.18 \pm 0.43 ^{de}	9.09 \pm 2.05 ^b	10.21 \pm 4.07 ^a	231.01 \pm 98.31 ^b
	0.5	10.95 \pm 0.24 ^d	10.28 \pm 3.61 ^{bcd}	8.89 \pm 4.31 ^a	423.41 \pm 114.67 ^c
	1	10.14 \pm 0.21 ^{bc}	15.62 \pm 1.57 ^f	14.16 \pm 4.13 ^{ab}	673.45 \pm 80.14 ^d
OSA/GEL	0	14.62 \pm 0.21 ⁱ	3.26 \pm 0.53 ^a	139.21 \pm 25.21 ^g	16.48 \pm 5.77 ^a
	0.25	12.66 \pm 0.64 ^g	3.07 \pm 0.36 ^a	132.08 \pm 14.49 ^{fg}	16.16 \pm 4.31 ^a
	0.5	11.81 \pm 0.66 ^f	3.17 \pm 0.60 ^a	124.53 \pm 22.43 ^f	19.55 \pm 4.87 ^a
	1	10.69 \pm 0.48 ^{cd}	2.69 \pm 0.26 ^a	108.08 \pm 14.75 ^e	22.98 \pm 4.08 ^a
WSSP/GEL	0	11.01 \pm 0.48 ^{de}	13.05 \pm 1.47 ^e	39.36 \pm 8.07 ^d	497.80 \pm 125.45 ^c
	0.25	10.01 \pm 0.50 ^b	11.63 \pm 2.26 ^{cde}	34.56 \pm 11.45 ^{cd}	495.57 \pm 148.84 ^c
	0.5	9.30 \pm 0.31 ^a	13.03 \pm 2.03 ^e	39.33 \pm 9.45 ^d	421.01 \pm 86.66 ^c
	1	9.33 \pm 0.53 ^a	12.12 \pm 1.63 ^{de}	32.88 \pm 8.92 ^{cd}	412.73 \pm 43.07 ^c

^{a-i} Values with the different superscript letters within one column are significantly different ($p > 0.05$).

3.3. Mechanical Properties

Regardless of the AST concentration, CMC yielded films with the best mechanical strength and stiffness (Table 1), which partially supports the evidence from previous observations [8]. Specifically, compared to the WSSP-, GAR-, and OSA-based samples, the TS of the CMC/GEL films was approx. 3, 3.5, and 13 times higher, respectively. This

result can be easily explained by differences in the three-dimensional arrangements of the polysaccharides used for preparation of the films. It is well known that linear polymers, such as cellulose and its derivatives, form intra- and interchain H-bonds, which cause them to adhere strongly, resulting in a highly cohesive matrix [8,17]. In contrast, the branched polymers (in this study, GAR, waxy OSA, and WSSP) offer reduced packing efficiency [18]. Apart from that, the weak mechanical strength of GAR- and WSSP-based films can be attributed to the heterogeneous characteristics of these polysaccharides. GAR is a mixture of long and short chains of sugars (arabinogalactan, oligosaccharides, and polysaccharides) and glycoprotein [19], while WSSP is primarily a mixture of rhamnogalacturonans and arabinogalactans [20]. It has been suggested that, similar to polymer branching, the polymer heterogeneity can also give a material with reduced cohesiveness [14].

It is known that amorphous and crystalline polymers have irregularly and uniformly packed molecules, respectively. Therefore, compared to amorphous materials, crystalline materials are harder. As has been verified by wide X-ray diffraction analysis, GAR-, OSA-, and WSSP-containing films are amorphous [14], while CMC-containing films exhibit a semi-crystalline structure [21]. These structural differences provide an additional explanation for the tensile behaviour of the films (Table 1).

It should be mentioned that despite the phase-separated morphology of the CMC/GEL films [14], their mechanical resistance was better than other blend materials (Table 1). It can be ascribed to the fact that CMC as a predominant (continuous) matrix component ensured the strong polysaccharide–polysaccharide interactions, so the local presence of a dispersed phase (GEL) was of secondary importance.

The effect of AST on the mechanical properties was dependent on the type of carrier (Table 1). It was found that only in the case of the CMC/GEL film, AST reduced the TS value, suggesting that it interfered in the formation of a coherent matrix. In turn, AST did not affect the TS and EM of the OSA- and WSSP-based films (Table 1). These results indicate that a less organized network (created by the branched polymers) is not susceptible to mechanical changes caused by the presence of the active compound, while the more ordered network of CMC is weakened, possibly due to the interruption of hydrogen bonding between the polymer chains [8]. Regarding the GAR-based films, the low (0.25%) and moderate (0.5%) AST concentrations did not affect the TS values; however, the inclusion of AST at the highest level (1%) caused the mechanical strength of the carrier to increase (from 10.31 to 15.62 MPa). Moreover, an accompanying increase in EM was observed. It is difficult to explain this result, but it might be attributed to the binding/filling action of the bulky amounts of AST. Such an effect has been suggested previously to explain the decreased solubility of an AST-supplemented GAR-based film [11]. The possibility of enhancing mechanical strength may be related to the fact that GAR forms very frangible films that do not have sufficient mechanical resistance to be applied [14,22]. The mixing of GAR with GEL (at a ratio of 3:1) significantly improves the cohesiveness of films; however, the material durability is still relatively low [14]. In accordance with the present results, previous studies on ascorbyl-palmitate-supplemented films have also demonstrated that it is possible to improve the mechanical integrity of the GAR/GEL matrix [9].

Consistent with the previous studies [9,14], OSA yielded the most stretchable films with the lowest resistance to deformation ($E = 108.08\text{--}139.21\%$, $EM = 16.16\text{--}22.98\text{ MPa}$; Table 1). This result may be ascribed to the strong plasticizing action of octenyl succinic groups on amylopectin chains. Usually, films obtained from glycerol-plasticized unmodified waxy maize starch exhibit several times lower E [23] and tens of times greater stiffness [24].

3.4. T

Considering the transparency to visible light, the control samples were ranked in the following order: OSA/GEL > GAR/GEL > WSSP/GEL > CMC/GEL films (Figure 2). These differences reflect primarily the microstructural features of the films. As the OSA- and GAR-based films were fairly homogenous (Figure 1), they offered the highest transparency. In turn, the roughness of the CMC- and WSSP-based films was responsible for their

partial opaqueness. The CMC-based film had the lowest $T_{\lambda 400-700}$ (57.96–78.90%, Figure 2), probably due to the presence of phase-separated microspheres [8,10], which scattered, reflected, or absorbed light. As a result of the inhomogeneous microstructure, the CMC- and WSSP-based films exhibited the best UV-C barrier properties. Namely, at $\lambda = 280$, the T values of the WSSP-, CMC-, GAR-, and OSA-based films were approx. 8%, 11%, 32%, and 39%, respectively (Figure 2). The better UV blocking properties of the WSSP/GEL film compared to the CMC/GEL film may be ascribed to the fact that WSSP contains a small fraction (~5–14%) of protein [25,26]. Regardless of the polysaccharide type, all blend films completely blocked UV light below $\lambda \approx 240$ nm, which can mainly be related to the excellent UV protection property of GEL [27,28].

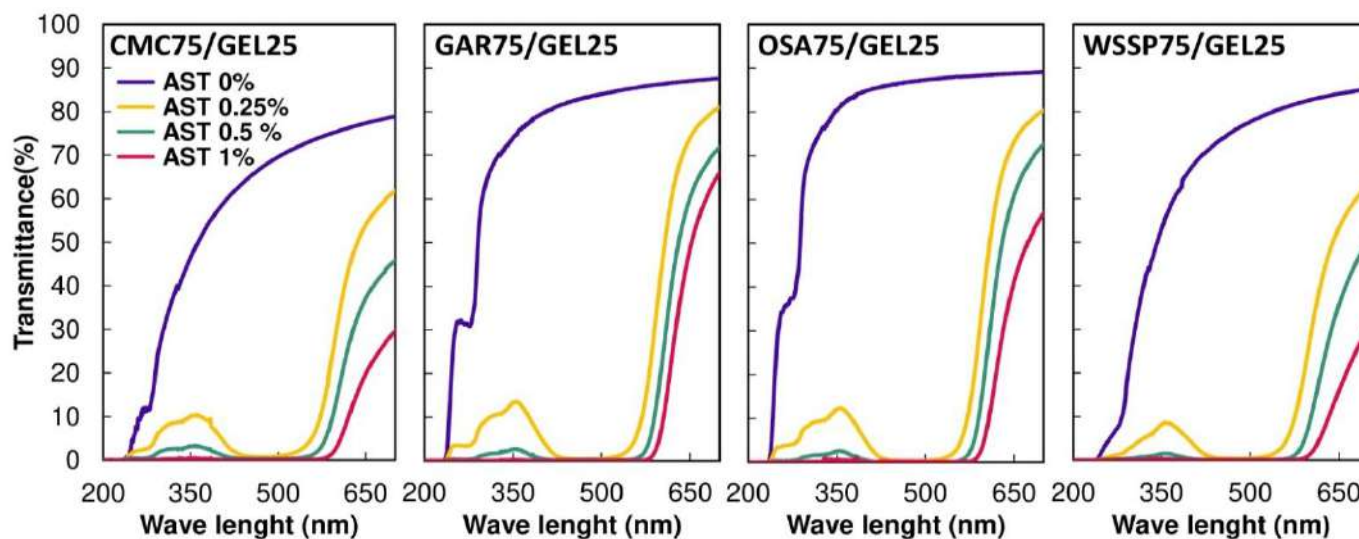


Figure 2. Effect of the increasing concentration of AstaSana astaxanthin (AST) on the light transmission of the films obtained from the 75/25 blends of polysaccharides (carboxymethyl cellulose (CMC), gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride starch (OSA), and water-soluble soy polysaccharides (WSSP)) and gelatin (GEL).

Generally, as the AST concentration increased, the T value successively decreased (Figure 2). This result may be partially explained by the presence of the increasing content of starch granules (from the AST formulation (Figure 1C)) that reflected/scattered a significant amount of light. In the spectra of the 0.25 and 0.5% AST-supplemented films, the observed transmittance band centred at $\lambda \approx 355$ nm (Figure 2) was a consequence of light absorption in the region $\lambda \approx 450$ – 500 nm (data not shown). This finding is not surprising, considering the fact that the absorption maxima of ASX are situated between 409 and 476 nm [29]. It was found that the 1% AST-supplemented films effectively blocked the light $< \lambda \approx 580$ nm. This outcome can be easily explained by the intense dark colour of these films (Figure S3).

3.5. Colour Stability at Room Temperature

To evaluate the colour stability of the obtained films, the storage experiment (25 °C for 60 days, without light) was conducted. Among the AST-free films, the WSSP-based carrier was the most prone to colour change ($\Delta E_{60\text{days}} = 3.70$). It is difficult to explain this finding; however, it should be mentioned that the WSSP/GEL film was initially the most yellow and dark (Figures S3–S5). Therefore, it is possible that the colour change was caused by the darkening of the pigments present in the polysaccharide fraction. Among the control samples, the best colour stability was observed for the CMC- and GAR-based films.

The AST-supplemented samples were darker, redder, and more yellowish than the controls (Figures S3–S5). The gradual increase in the AST concentration resulted in a gradual reduction in the lightness of the films (Figure S3). Surprisingly, the highest values of the a^* (redness) and b^* (yellowness) parameters were observed for the 0.25% AST-supplemented films (Figures S4 and S5), which agrees with our earlier observations [11].

As mentioned previously, these films were not overloaded with dye; thus, they exhibited the purest bright red colour. The CMC/GEL films incorporated with the higher level of AST (0.5–1%) exhibited the highest redness among all samples.

Regardless of the AST concentration, the AST-supplemented CMC- and GAR-based films exhibited the lowest colour change after 60 days of storage ($\Delta E < 2$, Table 2). Such a small colour difference could be noticed only by an experienced observer [30]. Regarding the OSA/GEL films, in some cases, ΔE exceeded 2, which also means that an inexperienced observer can notice the difference. A clear colour change was observed in the WSSP/GEL films (in some cases, ΔE exceeded 3.5, Table 2). The high ΔE values of the WSSP-based films were mainly caused by the decrease in the L^* and a^* parameters (Figures S3 and S4). This result suggests that ASX was the least stable in the WSSP/GEL carrier.

Table 2. The total colour differences during storage (ΔE) of 75/25 blend films obtained from polysaccharides: carboxymethyl cellulose (CMC), gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride-modified starch (OSA), water-soluble soy polysaccharides (WSSP), and gelatin (GEL) incorporated increasing Astasana (AST) concentration.

Films	AST (%)	25 °C		60 °C	
		30 Days	60 Days	30 Days	60 Days
CMC/GEL	0	0.88 ± 0.12 ^{abc}	0.98 ± 0.21 ^{abcde}	2.24 ± 0.24 ^a	2.73 ± 0.38 ^a
	0.25	0.91 ± 0.11 ^{abcd}	1.24 ± 0.20 ^{cdefg}	11.10 ± 0.34 ^{jkl}	13.40 ± 0.56 ^{op}
	0.5	1.45 ± 0.32 ^{fghi}	1.56 ± 0.23 ^{ghij}	5.26 ± 0.37 ^{bc}	5.38 ± 0.49 ^{bc}
	1	1.11 ± 0.30 ^{cdefg}	0.94 ± 0.16 ^{abcde}	6.23 ± 0.31 ^{cd}	6.79 ± 1.08 ^{de}
GAR/GEL	0	0.60 ± 0.14 ^a	1.09 ± 0.18 ^{bcdef}	7.72 ± 0.40 ^{ef}	10.59 ± 0.75 ^{ijk}
	0.25	0.64 ± 0.17 ^{ab}	1.66 ± 0.19 ^{hij}	11.89 ± 0.16 ^{lm}	13.67 ± 0.96 ^{opq}
	0.5	0.58 ± 0.16 ^a	1.37 ± 0.20 ^{bcd}	11.25 ± 0.23 ^{kl}	11.99 ± 0.48 ^{lm}
	1	1.16 ± 0.23 ^{cda}	1.13 ± 0.18 ^{ab}	7.95 ± 0.71 ^{efg}	8.24 ± 0.59 ^{fg}
OSA/GEL	0	1.35 ± 0.07 ^{defgh}	1.88 ± 0.12 ^{ijk}	4.78 ± 0.59 ^b	9.06 ± 0.40 ^{gh}
	0.25	1.46 ± 0.13 ^{fghij}	2.31 ± 0.23 ^{kl}	12.76 ± 0.27 ^{mno}	15.50 ± 0.71 ^r
	0.5	1.45 ± 0.47 ^{fghi}	2.54 ± 0.16 ^l	11.10 ± 0.31 ^{jkl}	14.31 ± 0.57 ^{pqr}
	1	1.25 ± 0.21 ^{cdefg}	1.91 ± 0.25 ^{jk}	12.10 ± 0.39 ^{lmn}	14.34 ± 1.11 ^{pqr}
WSSP/GEL	0	2.57 ± 0.17 ^l	3.70 ± 0.14 ^m	7.23 ± 0.63 ^{def}	9.73 ± 1.47 ^{hi}
	0.25	2.70 ± 0.34 ^l	1.20 ± 0.20 ^{cdefg}	17.20 ± 0.36 ^s	19.52 ± 1.02 ^t
	0.5	3.67 ± 0.31 ^m	2.54 ± 0.16 ^g	13.30 ± 0.37 ^{nop}	14.65 ± 0.91 ^{qr}
	1	4.41 ± 0.34 ⁿ	4.02 ± 0.20 ^{mn}	9.74 ± 0.37 ^{hi}	10.03 ± 1.63 ^{hij}

^{a–t} Values with the different superscript letters within one column are significantly different ($p > 0.05$).

3.6. Accelerated Colour Stability Test

As relatively small changes in the colour of the samples ($\Delta E < 5$, Table 2) were detected after storage at 25 °C, the accelerated colour stability test (at 60 °C) was employed in order to gain better insight in colour retention in the particular carriers. As expected, the obtained ΔE values were much higher (Table 2). Similar to the room storage test, the control CMC-based film was the most stable in terms of colour changes ($\Delta E < 3$). This was mainly related to the fact that this film was the least darkened and yellowed (Figures S6 and S8) during storage.

In the case of the other control samples, the colour changes were more noticeable ($\Delta E_{15\text{days}} = 4.78\text{--}7.72$) and deepened over time ($\Delta E_{30\text{days}} = 9.06\text{--}10.59$, Table 2). The weak colour changes observed in the control CMC/GEL film may be explained by the immiscibility of its constituents (Figure 1A). It can be assumed that, in the phase-separated polysaccharide/protein blend system, the intensity of the Maillard reaction was lower than in the other obtained carriers. The possibility of occurrence of the Maillard reaction between GAR and proteins, as well as WSSP and proteins, has been previously proved [31,32]. The available literature does not provide data on the possibility of participation of OSA in Maillard reactions; however, the results of this research indicate such an interaction.

As can be seen from the data in Table 2, with the increasing concentration of AST, the susceptibility to colour change tended to decrease. This indirectly indicates that the higher the ASX amount in the films, the better its stability. Moreover, it may be concluded that,

when AST was incorporated at the lowest level, the colour changes were easier to detect than in the films overloaded with the pigment. Among the 0.25% AST-supplemented films, the weakest colour stability ($\Delta E_{30\text{days}} = 19.52$, the highest L^* and b^* values) was observed for the WSSP-based film. In turn, at the highest AST addition level (1%), the CMC/GEL film tended to be the best carrier in terms of colour stability (Table 2). These results suggest that the type of the polysaccharide-based carrier affects the stability of ASX during storage.

3.7. Impact of Storage on the Antioxidant Activity of the Films

As can be seen in Figure 3, the control polysaccharide/GEL films (after complete dissolution in water at 40 °C) showed a relatively high ABTS⁺ scavenging activity (~42–46% at 60 min of incubation). Considering the fact that purified polysaccharide fractions have slight antioxidant potential [33], the observed result may be associated with the presence of the GEL fraction in the films. As reported in previous studies, the high glycine and proline contents in GEL are responsible for its good neutralisation of free radicals [34,35]. Regardless of the carrier type, the storage time (25 °C, 60 days) did not affect the antioxidant properties of the control samples. Generally, the increase in the AST concentration resulted in the increased antioxidant potential of the films. After the incorporation of 1% AST, the antiradical activity of the films increased by 1.5 times (~25 percentage points) compared to the controls. This result is not very impressive. However, it should be mentioned that the AST used in this study contains approx. 5% of ASX (DSM, 2014), so the real concentration of ASX in the FFSs at the highest AST addition level was only 0.05%.

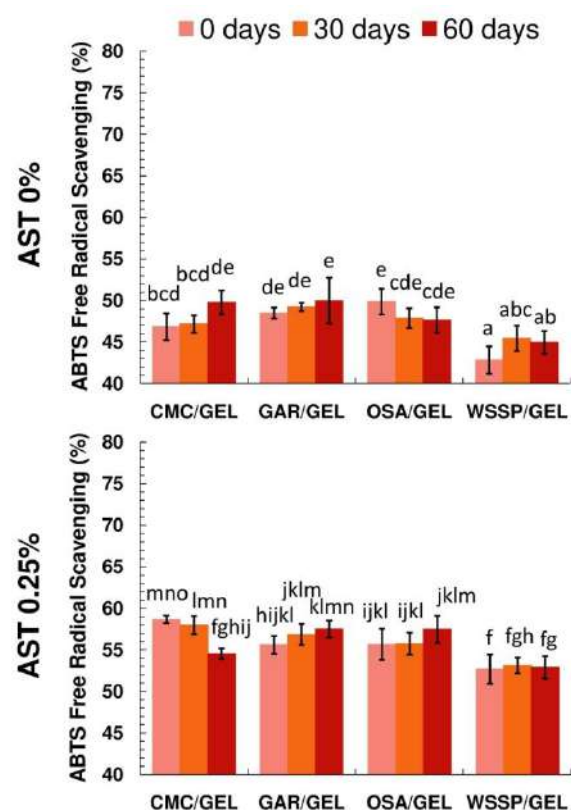


Figure 3. Cont.

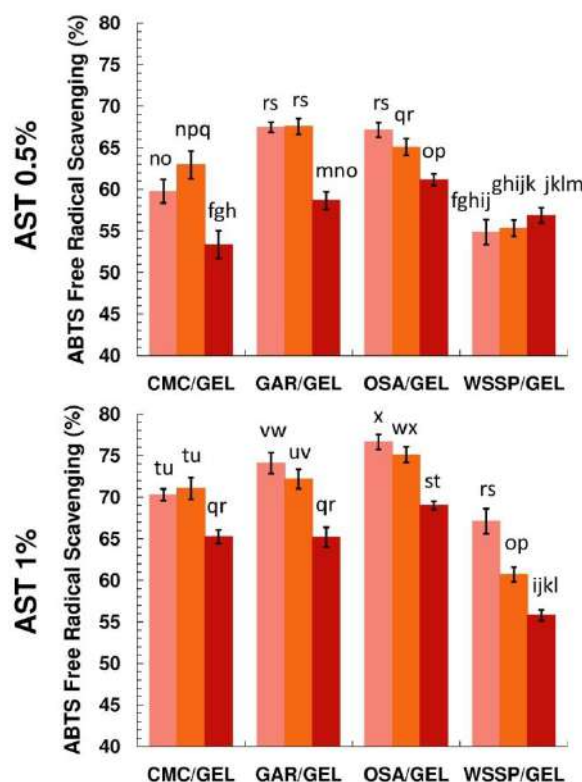


Figure 3. Effect of storage (25 °C, 50% relative humidity) on the antiradical activity of AstaSana astaxanthin (AST)-free (A) and AST-supplemented films obtained from the 75/25 blends of polysaccharides (carboxymethyl cellulose (CMC), gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride starch (OSA), water-soluble soy polysaccharides (WSSP)) and gelatin (GEL). a–x Values with the different superscript letters within one column are significantly different ($p > 0.05$).

Regardless of the AST concentration, the WSSP-containing films had the weakest antiradical activity. It is difficult to explain this result, but it might be related to the faster nonenzymatic browning rate in this system, as evidenced by the intensive colour change (Table 2), especially darkening of the samples (decrease in L^* values) during storage (Figures S3 and S6). The possibility of occurrence of the Maillard reaction between WSSP and proteins (at 55–65 °C, for 36–96 h) has been previously proven [32]. It can be speculated that the blocking of the amino groups of GEL by the formation of polysaccharide/GEL conjugates resulted in weaker antioxidant activity of the obtained materials.

Generally, it was found that the films with the lowest and highest AST contents were the most and least stable in terms of antioxidant potential, respectively.

4. Conclusions

The CMC/GEL films exhibited at least twice as high TS as the GAR/GEL and WSSP/GEL films, and ten times higher TS than the OSA/GEL films. This outcome may be ascribed to the linear structure of CMC, which facilitated the formation of a more cohesive matrix, compared to the mixture of GEL with the branched polysaccharides. The more ordered network of the CMC-based film, however, was susceptible to mechanical weakening in the presence of AST (the TS value was reduced by ~14%). In turn, the bulky amounts of AST (1%) acted as a binder/filler that improved the TS of the GAR-based film. The increasing concentration of AST resulted in a decline in the transparency of the films, which may be associated with the presence of starch granules (carrying component) in the AST formulation.

Generally, the increase in the AST concentration resulted in darker films. As a result, the films with the lowest AST content (0.25%) were the most red. As expected, the films with the highest AST concentration (1%) exhibited the best antiradical capacity. The 0.25%

AST-supplemented films were the most stable in terms of the antioxidant potential, while the 1% AST-supplemented films were the most prone to deterioration of the antiradical activity during storage.

Despite their high transparency, the excessive plasticity (mechanical weakness) of the OSA-based films could make their application difficult. Considering their weakest colour stability and the weakest antiradical capacity, the WSSP-based film is the least desirable carrier for AST. In turn, the CMC/GEL film exhibited the most stable colour during storage (the lowest rate of darkening and yellowing) at both room and elevated temperatures. This result may be associated with the fact that GEL and CMC are immiscible polymers, as verified by microscopic observations, which probably limited the possibility of occurrence of the Maillard reaction. However, a serious drawback of the CMC/GEL AST-supplemented films was their low light transparency (due to the surface roughness). The GAR/GEL system was devoid of this disadvantage and was also quite stable during storage; therefore, it can be taken into account for some food packaging purposes that do not require high mechanical strength (e.g., coatings).

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/polym14194001/s1>, Figure S1: Solubility of water-soluble soy polysaccharides (WSSP) in water as a function of its concentration, without (dark blue line) and with the presence of gelatin (GEL) (orange line). The WSSP solutions and 75/25 WSSP/GEL blends (25 mL) were heated (90 °C, 1 h), cooled to 25 °C, and centrifuged (30 min, 6963 × g, 25 °C). After removing the supernatant, the pellet was dried (45 °C) until a constant mass. In order to calculate the solubility, the mass of the solubilized WSSP was divided by the initial mass of the solvent and then multiplied by 100. Figure S2: Microscopic images of the supernatants obtained by the centrifugation (30 min, 6963 × g, 25 °C) of the 3.75% water-soluble soy polysaccharides (WSSP) solution (A) and WSSP/gelatin 75/25 (3.75% WSSP and 1.25% gelatin) blend solution (B). Figure S3: Effect of storage (25 °C, 50% relative humidity) on the lightness (L^*) of AstaSana astaxanthin (AST)-free (A) and AST-supplemented films obtained from the 75/25 blends of polysaccharides (carboxymethyl cellulose (CMC), gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride starch (OSA), and water-soluble soy polysaccharides (WSSP)) and gelatin (GEL); Figure S4: Effect of storage (25 °C, 50% relative humidity) on the redness (a^*) of AstaSana astaxanthin (AST)-free (A) and AST-supplemented films obtained from the 75/25 blends of polysaccharides (carboxymethyl cellulose (CMC), gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride starch (OSA), and water-soluble soy polysaccharides (WSSP)) and gelatin (GEL); Figure S5: Effect of storage (25 °C, 50% relative humidity) on the yellowness (b^*) of AstaSana astaxanthin (AST)-free (A) and AST-supplemented films obtained from the 75/25 blends of polysaccharides (carboxymethyl cellulose (CMC), gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride starch (OSA), and water-soluble soy polysaccharides (WSSP)) and gelatin (GEL); Figure S6: Effect of storage (60 °C) on the lightness (L^*) of AstaSana astaxanthin (AST)-free (A) and AST-supplemented films obtained from the 75/25 blends of polysaccharides (carboxymethyl cellulose (CMC), gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride starch (OSA), and water-soluble soy polysaccharides (WSSP)) and gelatin (GEL); Figure S7: Effect of storage (60 °C) on the redness (a^*) of AstaSana astaxanthin (AST)-free (A) and AST-supplemented films obtained from the 75/25 blends of polysaccharides (carboxymethyl cellulose (CMC), gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride starch (OSA), and water-soluble soy polysaccharides (WSSP)) and gelatin (GEL); Figure S8: Effect of storage (60 °C) on the yellowness (b^*) of AstaSana astaxanthin (AST)-free (A) and AST-supplemented films obtained from the 75/25 blends of polysaccharides (carboxymethyl cellulose (CMC), gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride starch (OSA), and water-soluble soy polysaccharides (WSSP)) and gelatin (GEL).

Author Contributions: Conceptualization, K.Ł. and D.K.; methodology, K.Ł.; validation, D.K.; formal analysis, K.Ł.; investigation, K.Ł. and W.K.; data curation, D.K.; writing—original draft preparation, K.Ł.; writing—review and editing, D.K.; visualization, K.Ł. and W.K.; supervision, D.K.; project administration, K.Ł.; funding acquisition, K.Ł. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was financially supported by the National Science Centre (Poland) under grant number 2019/35/N/NZ9/01795.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data present in this study are available on request from the first author (Katarzyna Łupina).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Lim, G.B.; Lee, S.Y.; Lee, E.K.; Haam, S.J.; Kim, W.S. Separation of astaxanthin from red yeast *Phaffia rhodozyma* by supercritical carbon dioxide extraction. *Biochem. Eng. J.* **2002**, *11*, 181–187. [[CrossRef](#)]
2. McCall, B.; McPartland, C.K.; Moore, R.; Frank-Kamenetskii, A.; Booth, B.W. Effects of astaxanthin on the proliferation and migration of breast cancer cells in vitro. *Antioxidants* **2018**, *7*, 135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Kim, S.H.; Kim, H. Inhibitory effect of astaxanthin on oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction—A mini-review. *Nutrients* **2018**, *10*, 1137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Giannaccare, G.; Pellegrini, M.; Senni, C.; Bernabei, F.; Scoria, V.; Cicero, A.F.G. Clinical applications of astaxanthin in the treatment of ocular diseases: Emerging insights. *Mar. Drugs* **2020**, *18*, 239. [[CrossRef](#)]
5. Colín-Chávez, C.; Soto-Valdez, H.; Peralta, E.; Lizardi-Mendoza, J.; Balandrán-Quintana, R. Fabrication and Properties of Antioxidant Polyethylene-based Films Containing Marigold (*Tagetes erecta*) Extract and Application on Soybean Oil Stability. *Packag. Technol. Sci.* **2013**, *29*, 399–412. [[CrossRef](#)]
6. Xu, J.; Wei, R.; Jia, Z.; Song, R. Characteristics and bioactive functions of chitosan/gelatin-based film incorporated with ϵ -polylysine and astaxanthin extracts derived from by-products of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Food Hydrocoll.* **2020**, *100*, 105436. [[CrossRef](#)]
7. Inthamat, P.; Boonsiriwit, A.; Lee, Y.S.; Siripatrawan, U. Effects of genipin as natural crosslinker on barrier and mechanical properties of chitosan-astaxanthin film. *J. Food Process. Preserv.* **2021**, *46*, e15707. [[CrossRef](#)]
8. Łupina, K.; Kowalczyk, D.; Lis, M.; Raszewska-Kaczor, A.; Drożdowska, E. Controlled release of water-soluble astaxanthin from carboxymethyl cellulose/gelatin and octenyl succinic anhydride starch/gelatin blend films. *Food Hydrocoll.* **2021**, *123*, 107179. [[CrossRef](#)]
9. Łupina, K.; Kowalczyk, D.; Drożdowska, E. Polysaccharide/gelatin blend films as carriers of ascorbyl palmitate—A comparative study. *Food Chem.* **2020**, *333*, 127465. [[CrossRef](#)]
10. Kowalczyk, D.; Pytka, M.; Szymanowska, U.; Skrzypek, T.; Łupina, K.; Biendl, M. Release kinetics and antibacterial activity of potassium salts of iso- α -acids loaded into the films based on gelatin, carboxymethyl cellulose and their blends. *Food Hydrocoll.* **2020**, *109*, 106104. [[CrossRef](#)]
11. Łupina, K.; Kowalczyk, D.; Kazimierzczak, W. Gum Arabic/gelatin and water-soluble soy polysaccharides/gelatin blend films as carriers of astaxanthin—A comparative study of the kinetics of release and antioxidant properties. *Polymers* **2021**, *13*, 1062. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237. [[CrossRef](#)]
13. Liu, C.; Huang, J.; Zheng, X.; Liu, S.; Lu, K.; Tang, K.; Liu, J. Heat sealable soluble soybean polysaccharide/gelatin blend edible films for food packaging applications. *Food Packag. Shelf Life* **2020**, *24*, 100485. [[CrossRef](#)]
14. Łupina, K.; Kowalczyk, D.; Zięba, E.; Kazimierzczak, W.; Meżyńska, M.; Basiura-Cembala, M.; Wiącek, A.E. Edible films made from blends of gelatin and polysaccharide-based emulsifiers—A comparative study. *Food Hydrocoll.* **2019**, *96*, 555–567. [[CrossRef](#)]
15. Liu, Y.; Huang, L.; Li, D.; Wang, Y.; Chen, Z.; Zou, C.; Liu, W.; Ma, Y.; Cao, M.J.; Liu, G.M. Re-assembled oleic acid-protein complexes as nano-vehicles for astaxanthin: Multispectral analysis and molecular docking. *Food Hydrocoll.* **2020**, *103*, 105689. [[CrossRef](#)]
16. Gökkaya Erdem, B.; Dıblan, S.; Kaya, S. A Comprehensive Study on Sorption, Water Barrier, and Physicochemical Properties of Some Protein- and Carbohydrate-Based Edible Films. *Food Bioprocess Technol.* **2021**, *14*, 2161–2179. [[CrossRef](#)]
17. Poletto, M.; Pistor, V.; Zattera, A.J. Structural Characteristics and Thermal Properties of Native Cellulose. In *Cellulose—Fundamental Aspects*; van de Ven, T., Godbout, L., Eds.; IntechOpen: Rijeka, Croatia, 2013; pp. 45–68. ISBN 978-953-51-1183-2.
18. Shrivastava, A. Polymerization. In *Introduction to Plastics Engineering*; William Andrew: Norwich, NY, USA, 2018; pp. 17–48; ISBN 9780323396196.
19. Montenegro, M.; Boiero, L.; Valle, L.; Borsarelli, C. Gum Arabic: More Than an Edible Emulsifier. In *Products and Applications of Biopolymers*; Verbeek, C.J.R., Ed.; InTech: Rijeka, Croatia, 2012; pp. 3–26; ISBN 978-953-51-0226-7.
20. Chen, W.; Duizer, L.; Corredig, M.; Goff, H.D. Addition of soluble soybean polysaccharides to dairy products as a source of dietary fiber. *J. Food Sci.* **2010**, *75*, 478–484. [[CrossRef](#)]
21. Kowalczyk, D.; Szymanowska, U.; Skrzypek, T.; Basiura-Cembala, M.; Łupina, K.; Biendl, M. Edible films based on gelatin, carboxymethyl cellulose, and their blends as carriers of potassium salts of iso- α -acids: Structural, physicochemical and antioxidant properties. *Food Hydrocoll.* **2021**, *115*, 106574. [[CrossRef](#)]
22. Nieto, M.B. Structure and Function of Polysaccharide Gum-Based Edible Films and Coatings. In *Edible Films and Coatings for Food Applications*; Huber, K.C., Embuscado, M.E., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2009; pp. 57–112; ISBN 9780387928241.
23. Mathew, A.P.; Dufresne, A. Plasticized waxy maize starch: Effect of polyols and relative humidity on material properties. *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 1101–1108. [[CrossRef](#)]

24. de Almeida, V.S.; Barretti, B.R.V.; Ito, V.C.; Malucelli, L.; da Silva Carvalho Filho, M.A.; Demiate, I.M.; Pinheiro, L.A.; Lacerda, L.G. Thermal, morphological, and mechanical properties of regular and waxy maize starch films reinforced with cellulose nanofibers (CNF). *Mater. Res.* **2020**, *23*, e20190576. [[CrossRef](#)]
25. Matsumura, Y.; Egami, M.; Satake, C.; Maeda, Y.; Takahashi, T.; Nakamura, A.; Mori, T. Inhibitory effects of peptide-bound polysaccharides on lipid oxidation in emulsions. *Food Chem.* **2003**, *83*, 107–119. [[CrossRef](#)]
26. Nakamura, A.; Yoshida, R.; Maeda, H.; Furuta, H.; Corredig, M. Study of the role of the carbohydrate and protein moieties of soy soluble polysaccharides in their emulsifying properties. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5506–5512. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Campalani, C.; Causin, V.; Selva, M.; Perosa, A. Fish-Waste-Derived Gelatin and Carbon Dots for Biobased UV-Blocking Films. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2022**, *14*, 35148–35156. [[CrossRef](#)]
28. Mehta, M.J.; Kumar, A. Ionic Liquid Assisted Gelatin Films: Green, UV Shielding, Antioxidant, and Antibacterial Food Packaging Materials. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2019**, *7*, 8631–8636. [[CrossRef](#)]
29. Elde, A.C.; Pettersen, R.; Bruheim, P.; Järnegren, J.; Johnsen, G. Pigmentation and spectral absorbance signatures in deep-water corals from the Trondheimsfjord, Norway. *Mar. Drugs* **2012**, *10*, 1400–1411. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Mokrzycki, W.; Tatol, M. Color difference Delta E—A survey. *Mach. Graph. Vis.* **2011**, *20*, 383–411.
31. Zha, F.; Dong, S.; Rao, J.; Chen, B. Pea protein isolate-gum Arabic Maillard conjugates improves physical and oxidative stability of oil-in-water emulsions. *Food Chem.* **2019**, *285*, 130–138. [[CrossRef](#)]
32. Yang, Y.; Cui, S.W.; Gong, J.; Guo, Q.; Wang, Q.; Hua, Y. A soy protein-polysaccharides Maillard reaction product enhanced the physical stability of oil-in-water emulsions containing citral. *Food Hydrocoll.* **2015**, *48*, 155–164. [[CrossRef](#)]
33. Wang, J.; Hu, S.; Nie, S.; Yu, Q.; Xie, M. Reviews on Mechanisms of in Vitro Antioxidant Activity of Polysaccharides. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 5692852. [[CrossRef](#)]
34. Abuine, R.; Rathnayake, A.U.; Byun, H.G. Biological activity of peptides purified from fish skin hydrolysates. *Fish. Aquat. Sci.* **2019**, *22*, 10. [[CrossRef](#)]
35. Gomez-Guillen, M.C.; Gimenez, B.; Lopez-Caballero, M.E.; Montero, M.P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocoll.* **2011**, *25*, 1813–1827. [[CrossRef](#)]

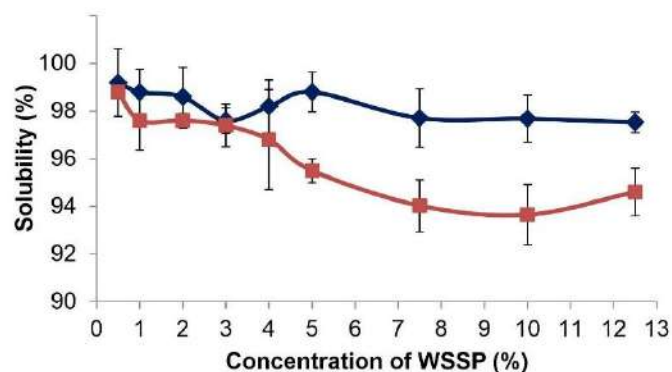


Figure S1: Solubility of water-soluble soy polysaccharides (WSSP) in water as a function of its concentration, without (dark blue line) and with the presence of gelatin (GEL) (orange line). The WSSP solutions and 75/25 WSSP/GEL blends (25 mL) were heated (90 °C, 1 h), cooled to 25 °C, and centrifuged (30 min, 6963 x g, 25 °C). After removing the supernatant, the pellet was dried (45 °C) until a constant mass. In order to calculate the solubility, the mass of the solubilized WSSP was divided by the initial mass of the solvent and then multiplied by 100.

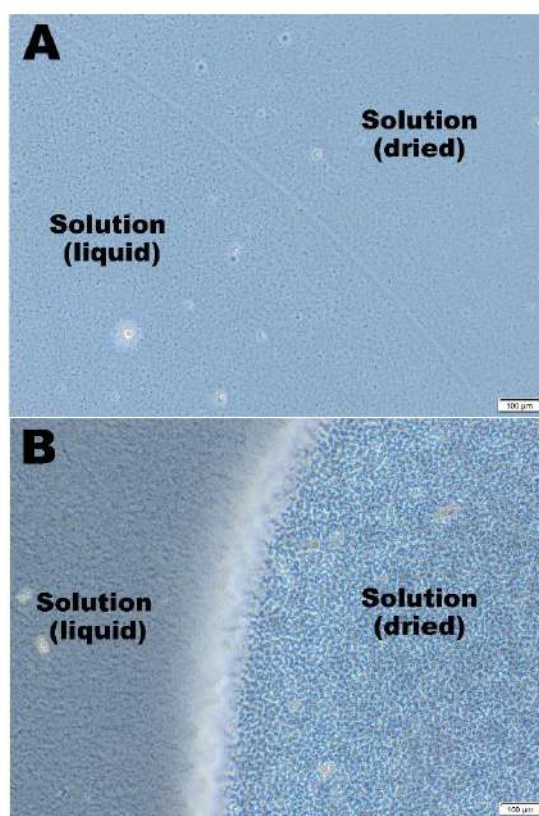


Figure S2: Microscopic images of the supernatants obtained by the centrifugation (30 min, 6963 x g, 25 °C) of the 3.75% water-soluble soy polysaccharides (WSSP) solution (A) and WSSP/gelatin 75/25 (3.75% WSSP and 1.25% gelatin) blend solution (B).

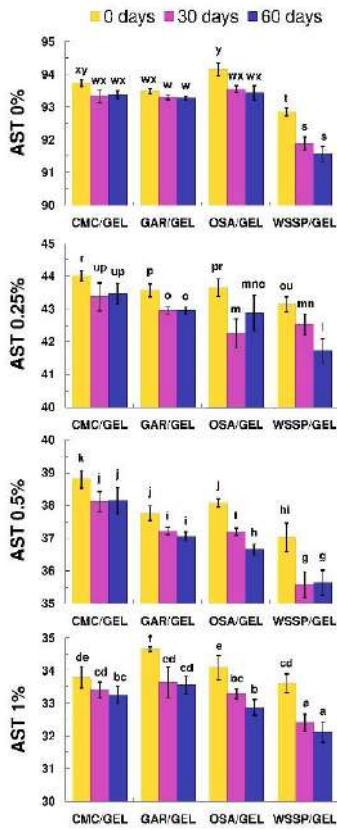


Figure S3: Effect of storage (25 °C, 50% relative humidity) on the lightness (L^*) of AstaSana astaxanthin (AST)-free (A) and AST-supplemented films obtained from the 75/25 blends of polysaccharides (carboxymethyl cellulose (CMC), gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride starch (OSA), and water-soluble soy polysaccharides (WSSP)) and gelatin (GEL).

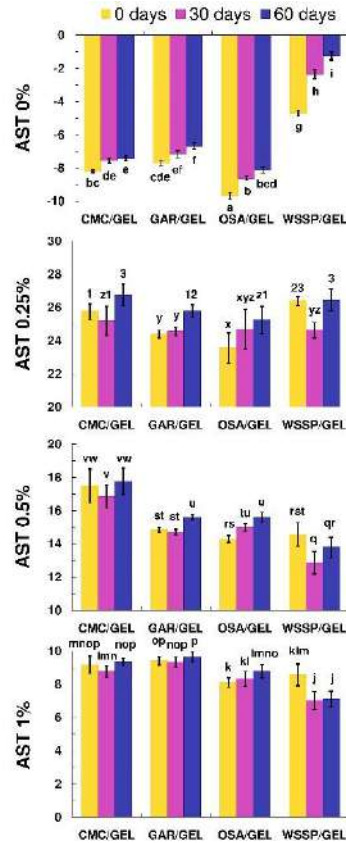


Figure S4: Effect of storage (25 °C, 50% relative humidity) on the redness (a^*) of AstaSana astaxanthin (AST)-free (A) and AST-supplemented films obtained from the 75/25 blends of polysaccharides (carboxymethyl cellulose (CMC), gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride starch (OSA), and water-soluble soy polysaccharides (WSSP)) and gelatin (GEL).

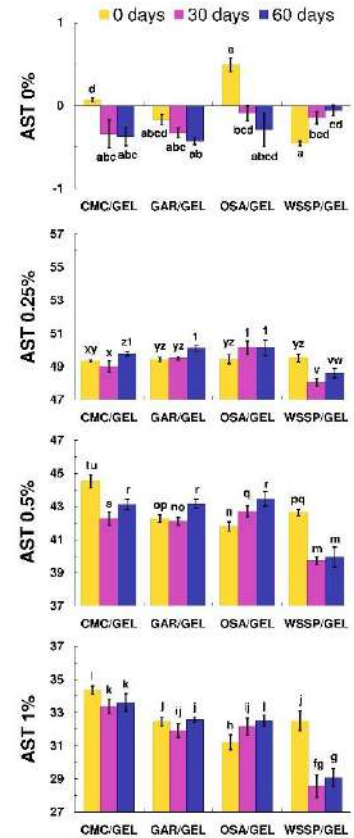


Figure S5: Effect of storage (25 °C, 50% relative humidity) on the yellowness (b^*) of AstaSana astaxanthin (AST)-free (A) and AST-supplemented films obtained from the 75/25 blends of polysaccharides (carboxymethyl cellulose (CMC), gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride starch (OSA), and water-soluble soy polysaccharides (WSSP)) and gelatin (GEL).

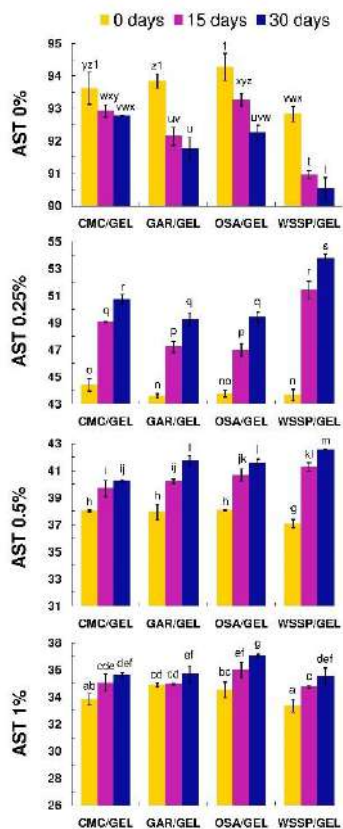


Figure S6: Effect of storage (60 °C) on the lightness (L^*) of AstaSana astaxanthin (AST)-free (A) and AST-supplemented films obtained from the 75/25 blends of polysaccharides (carboxymethyl cellulose (CMC), gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride starch (OSA), and water-soluble soy polysaccharides (WSSP)) and gelatin (GEL).

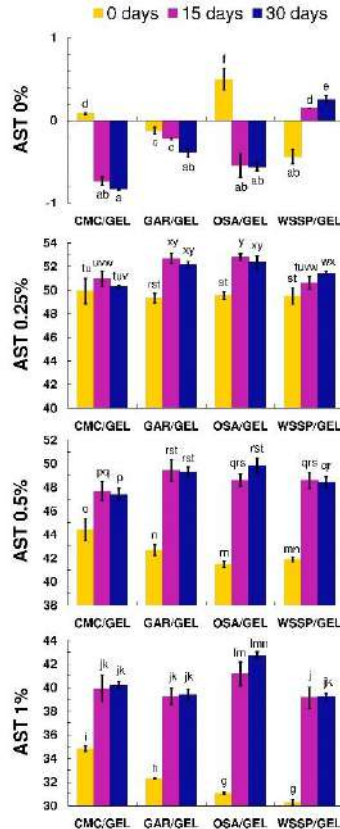


Figure S7: Effect of storage (60 °C) on the redness (a^*) of AstaSana astaxanthin (AST)-free (A) and AST-supplemented films obtained from the 75/25 blends of polysaccharides (carboxymethyl cellulose (CMC), gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride starch (OSA), and water-soluble soy polysaccharides (WSSP)) and gelatin (GEL).

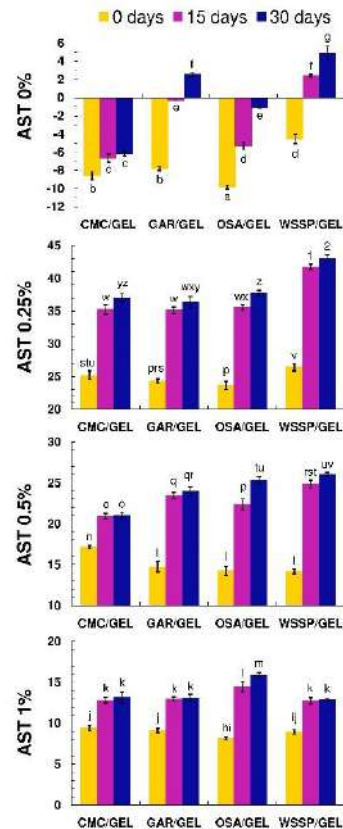
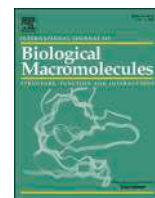


Figure S8: Effect of storage (60 °C) on the yellowness (b^*) of AstaSana astaxanthin (AST)-free (A) and AST-supplemented films obtained from the 75/25 blends of polysaccharides (carboxymethyl cellulose (CMC), gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride starch (OSA), and water-soluble soy polysaccharides (WSSP)) and gelatin (GEL).



Antioxidant polysaccharide/gelatin blend films loaded with curcumin — A comparative study

Katarzyna Łupina^{a,*}, Dariusz Kowalczyk^a, Magdalena Lis^b, Monika Basiura-Cembala^c

^a Department of Biochemistry and Food Chemistry, Faculty of Food Sciences and Biotechnology, University of Life Sciences in Lublin, Skromna 8, 20-704 Lublin, Poland

^b Department of Biomedicine and Environmental Research, Faculty of Natural Sciences and Health, The John Paul II Catholic University of Lublin, Konstantynów 1J, 20-708 Lublin, Poland

^c Faculty of Materials, Civil and Environmental Engineering, University of Bielsko-Biala, Willowa 2, 43-309 Bielsko-Biala, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Carboxymethyl cellulose
Gum Arabic
Octenyl succinic anhydride modified starch
Soy polysaccharides
Gelatin
Curcumin

ABSTRACT

Curcumin (CUR; 0, 0.005, 0.01, 0.02 %) was loaded into binary 75/25 blend films based on polysaccharides (carboxymethyl cellulose (CMC), gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride modified starch (OSA), water-soluble soy polysaccharides (WSSP)) and gelatin (GEL). The GAR-based system was the least rough and, consequently, the most transparent of the films. An opposite result was found for the WSSP-based film. Despite the phase separation, the CMC75/GEL25 film exhibited excellent mechanical strength and stiffness. CUR improved the UV/VIS light-barrier characteristics of the films, but did not affect most of other physicochemical properties. X-ray diffractograms revealed that CUR provoked the rearrangement of the triple helical structure of GEL. As highly erodible, the CMC75/GEL25 carrier ensured the fastest and the most complete release of CUR. The OSA75/GEL25 system exhibited an opposite behavior. The kinetic profiles of the antiradical activity of the films did not reflect CUR release. A comparison of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH^{*}) scavenging on the plateau revealed that the CUR-supplemented films had quite comparable antiradical potential. The CMC75/GEL25 system exhibited the highest colorimetric stability, likely as a result of complete encapsulation of CUR in the GEL-rich microspheres. Weak symptoms of physical aging (enthalpy relaxation) were found in the films.

1. Introduction

Elimination of plastic packaging from production and distribution, even if only partially, is regarded as a great success and a contribution to reduction of the negative impact of plastic on the environment. Biopolymers are considered an inevitable alternative to synthetic polymers obtained from the declining oil deposits. Future packaging must be biodegradable and serve additional functions, e.g. antimicrobial and/or antioxidant activity. Oxidation is one of the main causes of food deterioration. Controlled release of antioxidants from the packaging material limits their amount in the finished product and directs their action towards the surface layers of the product, which are most exposed to contact with oxygen. In contrast to synthetic food additives, the use of natural ingredients does not give rise to consumer concerns. Consequently, active antioxidant packaging materials are most often obtained through incorporation of plant extracts, natural polyphenolic compounds, vitamins C and E, and carotenoids [1,2].

Curcumin (CUR) is a yellow polyphenol pigment extracted from

turmeric (*Curcuma longa*) roots. The compound represents the group of β -diketones and can exist in two tautomeric forms: keto (dominant in neutral and acidic environments) and enol (present only in alkaline environments). As a hydrophobic compound, CUR is practically insoluble in water (max. solubility= 3.12 mg/L at 25 °C) [3]. Aqueous CUR solutions, however, can be obtained by addition of some biopolymers, surfactants, lipids, or cyclodextrins. Alcohols, acetonitrile, and acetone are the primary solvents and cosolvents for CUR [4]. Ethanol has been found to be the most preferred solvent for CUR (max. solubility= 10 mg/mL at 25 °C) [5]. CUR is resistant to high temperatures (<120 °C) but is quickly degraded under the influence of such factors as changes in pH and the presence of oxygen, light, and SO₂. It exhibits the greatest stability in acidic solutions (pH = 2.5 to 6.5), where it is intense yellow, and turns red-brown in neutral and alkaline environments where the dye undergoes degradation [6,7].

CUR is commonly used as a food additive (E100). It has a status of Generally Recognized as Safe (GRAS). The acceptable daily intake of CUR is 3 mg/kg bw/day [8,9]. CUR is a powerful antioxidant. Its free

* Corresponding author.

E-mail addresses: katarzyna.lupina@gmail.com (K. Łupina), dariusz.kowalczyk@up.lublin.pl (D. Kowalczyk).

radical scavenging activity may arise from the presence of either the phenolic OH group or the CH₂ group of the β-diketone moiety. A free radical can undergo electron transfer or abstract H-atom from either of these two groups [10]. CUR exhibits a pleiotropic spectrum of health-enhancing properties, e.g. anti-cancer, anti-inflammatory, antimicrobial, and anti-viral activity. It is recommended to be used in the treatment and prophylaxis of cancers and for prevention of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease [8,11]. The major drawback of CUR is its very poor bioavailability due to its poor absorption, rapid metabolism, chemical instability, and rapid systemic elimination [12]. Currently, extensive scientific research is focused on improvement of the bioavailability and stability of CUR through encapsulation of the compound in a biopolymer matrix or making polymer-based solid dispersions [13].

The unique properties of CUR are increasingly being used for production of active and intelligent (pH sensitive) packaging materials [14]. Various biopolymers, including polysaccharides, proteins, polylactide, and polysaccharide/polyvinyl alcohol blends, have been used as carriers of CUR. The materials obtained, however, have rarely been compared in a single study (using the same experimental methods) to reveal their advantageous or disadvantageous load-carrying properties. The selection of the carrier should be a starting point in the design of active materials with optimal physicochemical parameters and desired diffusion mobility. Furthermore, simultaneous comparative analysis of the structural, optical, barrier, mechanical, antioxidant, and release properties of CUR-supplemented films can help to expand, verify, and systematize the knowledge on processes and factors affecting the quality of active packaging systems.

Since CUR is a non-polar antioxidant, it can be assumed that the use of polysaccharides with emulsion-stabilizing properties as film-forming biopolymers will yield homogeneous materials without the necessity to use additional emulsifiers. The most popular polysaccharide emulsifiers are gum Arabic (GAR), octenyl succinate anhydride starch (OSA), and water-soluble soy polysaccharides (WSSP) [15]. Also, carboxymethyl cellulose (CMC) is a hydrocolloid with surface activity that can act as an emulsifier in oil-in-water emulsions; however, its principal role is to act as a structuring, thickening, or gelling agent in the aqueous phase [16]. As reported in previous studies [17], films obtained from some of the aforementioned polysaccharides have limited functional properties (e.g. the GAR film is excessively brittle and the OSA-based film is excessively adhesive). To improve their functional properties, these polymers have been proposed to be doped with gelatin (GEL) [17], which has excellent film-forming and emulsion-stabilizing properties [18,19]. Generally, 25 % replacement of part of the polysaccharide with GEL helps to strengthen the film matrix as a whole [17].

Active packaging can be classified into two main groups: active release packaging allowing controlled migration of the active agent and non-migratory active packaging acting without intentional migration [20]. The immobilization of additives is desirable if the migration of the active compound from packaging (e.g. wrapping, sachets, casings, coatings) could negatively alter the sensory profile of the product. Modeling of controlled release is highly desirable, as rapid release causes fast consumption of the antioxidant on the food surface; on the other hand, oxidative reactions may start if the release of the antioxidant from the packaging film is too slow [21]. To date, there are several approaches to achieve different release rates of the active agent from the packaging material, e.g. incorporation of compounds at different concentrations [22–26], encapsulation of active compounds into the polymer matrix [27,28], or development of polymer blends with different morphologies [23,29].

The aim of the present study was to compare the microstructural, thermal, optical, mechanical, release, and antioxidant properties of edible 75/25 blend films based on polysaccharides (CMC, GAR, OSA, WSSP) and GEL incorporated with increasing CUR contents (0.005, 0.01, and 0.02 %).

2. Materials and methods

2.1. Materials

Pork GEL (with bloom strength of 240; McCormick-Kamis S.A., Poland), sodium CMC WALOCEL CRT 30 GA (with a substitution degree of 0.82–0.95; Dow Wolff Cellulosics, Germany), GAR Agri-Spray Acacia R (Agrigum International, United Kingdom), waxy maize starch sodium octenyl succinate Purity Gum 2000 (Ingredient, Germany), and WSSP (Gushen Biological Technology Group Co., LTD, China) were used in this study. CUR (from *Curcuma longa*), glycerol, and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) were purchased from Sigma Chemical (USA).

2.2. Film preparation

Films were obtained from ethanol aqueous solutions (4 %) containing polysaccharides (3.75 % w/w), GEL (1.25 % w/w), glycerol (1 % w/w), and increasing amounts of CUR (0, 0.005, 0.01, and 0.02 % w/w). The biopolymer concentration levels were based on our previous work [17]. Briefly, blends of polysaccharides with GEL at the ratio of 75/25 were mixed with water and glycerol and then heated in a water bath at 90 °C for 1 h with constant stirring (100 rpm) in order to ensure complete dissolution. The film-forming solutions (FFSs) were allowed to cool (to ~40 °C) and the CUR ethanolic solution (or pure ethanol in the case of the control) was subsequently added. The mixtures were stirred (800 rpm, 10 min), degassed, and placed on polycarbonate trays with an area of 144 or 4 cm². A constant amount of total solids (0.0125 g/cm²) was placed on the trays in order to maintain film thickness. The FFSs were dried at 25 ± 2 °C and 50 ± 5 % relative humidity (RH) for 48 h. The films were peeled from the trays, cut into sample pieces, and conditioned.

2.3. Film thickness and conditioning

The film thickness was determined using a Mitotuyo 547–401 digital thickness gauge (Mitotuyo, Tokyo, Japan). Before testing, the films samples were maintained in an MLR-350 climatic test chamber (Sanyo Electric Biomedical Co. Ltd., Japan) for 48 h at 25 °C and 50 % RH.

2.4. Analyses of FFSs

The morphology of the FFSs was examined using an inverted microscope (CKX53, Olympus, Japan) and a Leica 5500B microscope (Leica Microsystems GmbH, Germany) equipped with a differential interference contrast (DIC) optical system. Additionally, cryo-scanning electron microscopy (cryo-SEM) observations were conducted using a Carl Zeiss Ultra Plus scanning electron microscope (Oberkochen, Germany). A glass electrode (Elmetron ERH–11S, Poland) connected to a pH meter (Elmetron CPC 401, Poland) was used for measurement of pH of the FFSs at 40 °C (in order to avoid gelatinization). The tests were performed in triplicate.

2.5. Microscopy of films

The surface of the films was examined using a Leica 5500B microscope equipped with a DIC optical system. The obtained 2D photos were converted into 3D topographies (ImageJ software) in order to calculate the film surface roughness (root-mean-square roughness, Rq) [30]. Furthermore, the topography of the films was visualized by the SEM technique.

2.6. Attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy

The analysis of the structural links of the control and 0.02 % CUR-supplemented films was performed using a Thermo Nicolet 8700 FTIR

spectrometer with a Smart Orbit™ diamond ATR accessory and a deuterated triglycine sulphate (DTGS) detector (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). No special sample preparation was required for the analysis. The tests were carried out at room temperature in the wavenumber range of 4000–400 cm⁻¹ with the spectral resolution of 4 cm⁻¹. A total of 64 scans were made for each spectrum. The collected spectra were subjected to ATR correction, automated baseline correction, and normalization using the Omnic Spectra™ software. Each sample was scanned twice and good reproducibility was observed.

2.7. Wide-angle X-ray diffraction (WAXD)

WAXD patterns of the control and 0.02 % CUR-supplemented films were obtained on a URD 6 Seifert X-ray diffractometer (FPM-Seifert, Freiberg, Germany) with a Cu K α radiation source. The operating parameters were as follows: 30 mA, 40 kV, 2 θ scanning from 2° to 50° with a step size of 0.1°, scanning speed of 0.1° per 15 s, ~ 25 °C.

2.8. Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC thermograms were obtained using an MDSC 2920 differential scanning calorimeter (TA Instruments, New Castle, DE, USA) equipped with an intracooler. The instrument was calibrated with melting temperature and enthalpy of the indium standard (156.6 °C and 28.45 J/g, respectively). The samples were weighed, transferred to hermetically sealed aluminum pans, and heated at a rate of 10 °C/min over a range of 20–300 °C, allowing for 5 min of isotherm at the beginning and end of the heating run. An inert atmosphere was maintained by purging nitrogen at a rate of 40 mL/min.

2.9. Moisture content (MC), solubility (So), and swelling (Sw)

Film specimens (4 cm²) were dried in an oven at 105 °C for 24 h [31]. The weight loss of each sample was determined and MC was calculated as follows:

$$MC (\%) = \frac{w_i - w_d}{w_i} \times 100\% \quad (1)$$

where: w_i is the initial weight of the sample and w_d is the weight of the dry sample.

So was expressed as the percentage of film solubilized after immersion in an aqueous-ethanolic solution (50 %) (Eq. (2)).

$$So = \frac{w_i - w_u}{w_i} \times 100\% \quad (2)$$

where: w_i is the initial weight of the sample and w_u is the weight of the undissolved sample residue.

Briefly, the film specimens (4 cm²) were weighed and mixed using a magnetic stirrer (170 rpm) in 20 mL of the aqueous-ethanolic solution at 25 ± 2 °C. Then, undissolved residues taken at 5 different time points were removed from the solutions and conditioned (at 25 ± 2 °C and 50 ± 5 % RH for 72 h) to determine the solubilized dry matter.

To determine Sw, the film samples (4 cm²) were weighed and immersed in 20 mL of the 50 % aqueous-ethanolic solution at 25 ± 2 °C. The weight of swollen films was measured after gentle blotting the surface with filter paper after 5, 10, 30, 60, and 120 min of the test. Sw was calculated as the percentage of water absorbed by the sample (Eq. (3)).

$$Sw = (w_i - w_s) \times 100\% \quad (3)$$

where: w_i is the initial weight of the sample and w_s is the weight of the sample after swelling.

The tests were performed in triplicate.

2.10. Water vapor permeability (WVP)

The WVP (g mmm⁻² d⁻¹ kPa⁻¹) was calculated as follows:

$$WVP = (WVTR \times L) / \Delta p \quad (4)$$

where: WVTR is the water vapor transmission rate of the film (g m⁻² d⁻¹) measured gravimetrically based on the ISO 2528 [32] method, L is the mean film thickness (mm), and Δp is the difference in the water vapor pressure (kPa) between two sides of the film.

The permeation cell (poly(methyl methacrylate)) cups had an internal diameter of 7.98 cm (exposed film area = 50 cm²) and an internal depth of 2 cm. Distilled water (30 mL) was added into each test cup and the film samples were placed over the circular opening and secured by a screw top. The cups were placed in the test chamber at 25 °C and 50 % RH. The weight loss from the samples with 3 replicates was monitored for 10 h with weights recorded at 2 h intervals. The slopes of the steady state (linear) portion of the weight lost versus the time curves were used to calculate WVTR.

2.11. Optical parameters

The light transmission of the film samples (1 × 4 cm) was measured using a spectrophotometer (Lambda 40, Perkin-Elmer, Shelton, CT, USA) at selected wavelengths between 200 and 700 nm. The opacity (Op) of the film samples was calculated with the following formula [33]:

$$Op = A_{600} / x \quad (5)$$

where: A_{600} is the absorbance at 600 nm and x is the film thickness (mm).

The color values (CIE L*a*b*) of the film samples (1 × 4 cm) were measured with a colorimeter (NH310, 3nh, China) on a white background (L* = 93.74, a* = 0.23, b* = -10.08). The color of the film specimens was analyzed immediately after conditioning and after 30 and 60 days of storage in the test chamber (without light, at 25 ± 1 °C and RH ≈ 50 %). The total color difference (ΔE) between the initial color of the sample (time zero) and the color of the stored sample was calculated with the use of Eq. (6).

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2} \quad (6)$$

where: ΔL^* , Δa^* , and Δb^* are the differences between the L*, a*, and b* values of two analyzed samples, respectively.

All optical analyses were performed fivefold.

2.12. Mechanical properties

The mechanical properties of the films were determined using a TA-XT2i texture analyzer equipped with a 50 kg load cell (Stable Micro Systems, UK). To perform the tensile test, the initial grip separation was set to 30 mm, and the film samples (2 × 5 cm) were stretched at a speed of 1 mm s⁻¹. Tensile strength (TS, MPa), elongation at break (E, %), and elastic modulus (EM, MPa) were calculated using Eqs. (7), (8), and (9), respectively:

$$TS = F_{max} / A \quad (7)$$

where: F_{max} is the maximum load for breaking the film (N) and A is the initial cross-sectional area (thickness × width, mm²) of the specimen.

$$E = (\Delta L / L) \times 100 \quad (8)$$

where: L is the initial gage length (mm) and ΔL is the difference in the length at the moment of fracture.

$$EM = (\sigma_2 - \sigma_1) / (\epsilon_2 - \epsilon_1) \quad (9)$$

where: ϵ_1 is a strain of 0.2 (0.67 %), ϵ_2 is a strain of 0.4 (1.33 %), σ_1

(MPa) is the stress at ϵ_1 , and σ_2 (MPa) is the stress at ϵ_2 .

To perform the puncture strength (PS, MPa) test, a steel ball-ended (2 mm diameter) probe was moved perpendicularly at the film surface at a constant speed (1 mm s^{-1}) until it passed through the film. PS was calculated with Eq. (10):

$$PS = F/A \quad (10)$$

where: F is the maximum force (N) and A is the cross-sectional area of the probe (films thickness x diameter of the opening of the film holder, mm^2).

The mechanical analyses were performed at least ten times.

2.13. Release test

The film discs (4 cm^2) were immersed in 20 mL of the 50 % aqueous-ethanolic solution (food simulant able to extract fat-soluble substances, assigned for foods that have a lipophilic character, including dairy and non-dairy fatty products) at 25°C and mixed using a magnetic stirrer (170 rpm). The absorbance of the acceptor solution was monitored (at 425 nm) as a function of time using a set of flow-through cuvette with a peristaltic sipper ("PESI" B2190036, Perkin-Elmer, USA) connected to the spectrophotometer at a flow rate of 120 min^{-1} . The tests were performed in triplicate. The CUR release kinetics was modeled using DDSolver: add-in software for Microsoft Excel. Eight mathematical models were chosen to fit the data (Table S1). The values of the adjusted coefficient of determination (R_{adjusted}^2) were used for the selection of the optimal model. On the basis of the best-fitted model, the half-release time values ($t_{50\%}$) were calculated [34]. However, if the optimal model was unable to determine the $t_{50\%}$, the next in order best-fitting model was used for the calculation.

2.14. Antioxidant properties

The film discs (4 cm^2) were immersed in 20 mL of a DPPH-50 % ethanol solution at 25°C and mixed using a magnetic stirrer (170 rpm). The absorbance of the acceptor solution was monitored as a function of time using a set of flow-through cuvette with a peristaltic sipper ("PESI" B2190036, Perkin-Elmer, USA) connected to the spectrophotometer at a flow rate of 120 min^{-1} . The absorbance at 517 nm was measured until the reaction reached a plateau. The ability of the films to quench DPPH free radicals was calculated using Eq. (11).

$$\text{DPPH scavenging (\%)} = [1 - (\text{Abs}/\text{Abs}_{\text{DPPH}})] \times 100 \quad (11)$$

where: Abs is the absorbance of the sample and Abs_{DPPH} is the absorbance of the solution of DPPH (0.77 ± 0.05). The tests were performed in triplicate.

The Weibull_1 model (Wb_1, Table S1) was used to determine the time values needed to reduce the DPPH* concentration by 50 % ($t_{50\% \text{ DPPH}}$) as described in Section 2.13.

2.15. Statistical analysis

Differences among the mean values of the data were tested for statistical significance at the $p < 0.05$ level using analysis of variance (Statistica 13.1, StatSoft Inc., Tulsa, USA) and Fisher's test. Additionally, the relationship between the $t_{50\%}$ and $t_{50\% \text{ DPPH}}$ was evaluated using Pearson's correlation.

3. Results and discussion

3.1. Microstructure

A proper microscopic analysis of FFSs provides a better insight into the surface morphology of the resultant films [30]. Therefore, in this study, three different microscopy techniques were applied and

compared. It was found that the conventional light and DIC microscopies (Fig. 1 A-B) provided more useful information than the cryo-SEM method (Fig. 1C). Primarily, the observations of cryogenically fixed samples, regardless of the magnification (data not shown), did not reveal a heterogeneous microstructure of the WSSP- and OSA-containing FFSs (Fig. 1C). On the basis of the previous studies [17,22,24], the graininess of the WSSP75/GEL25 blend was the result of the limited solubility of the soybean hemicellulose. In turn, the slight structural heterogeneity of the OSA75/GEL25 mixture (Figs. 1-2) could be attributed to the formation of electrostatic coacervates [35]. Consistent with the literature [36], the blending of CMC with GEL generated a completely non-miscible system in which the GEL-rich hydrogel microspheres were anchored in the CMC-rich matrix (Figs. 1-2). The microspheres, likely due to their relatively large sizes ($\sim 11\text{--}47 \mu\text{m}$), were finely visualized by all microscopy techniques (Fig. 1). Interestingly, compared to the previous study [23], the microspheres of the CMC75/GEL25 system seemed to be more numerous. This suggests that the presence of ethanol (cosolvent for CUR) in the FFSs intensified the immiscibility of the polymers. Among the obtained blends, the GAR75/GEL25 system was the most homogenous (Fig. 1), indicating good compatibility of the components.

The film topographies (Fig. 2) reflected the observations of the FFSs to a certain extent. One unanticipated finding was that the CMC75/GEL25 film, even in spite of the phase separation, was less rough ($R_q = 16.23$) than the WSSP75/GEL25 film ($R_q = 21.18$, Fig. 2B). The control GAR75/GEL25 film was the smoothest ($R_q = 4.59$, Fig. 2B) of the obtained materials, which is consistent with the previous study [24].

Surprisingly, in the CMC75/GEL25 system, CUR was strictly distributed into the GEL-rich microspheres (Fig. 1A-B). This finding may be explained in terms of the hydrophobic bounding of CUR with the hydrophobic regions of GEL. The result partially supports the evidence from previous observations reported by Roy and Rhim [37], who demonstrated some microstructural incompatibility between CUR and CMC. Interestingly, in the CUR-supplemented CMC75/GEL25 FFS, the microspheres tended to be bigger (max. diameter $\approx 80 \mu\text{m}$) than those found in the control (max. diameter $\approx 50 \mu\text{m}$, Fig. 1A). A possible explanation for this finding might be that the CUR-attached GEL became more hydrophobic and, consequently, less miscible with the CMC. Regarding the other FFSs, the CUR was relatively uniformly distributed in the blends (Fig. 1A-B), which can be attributed to the amphiphilic character of the GAR, OSA, and WSSP. Possibly, due to its low level (0.005–0.02 %), the presence of CUR, did not significantly affect the topography of most films (Fig. 2). An exception was the clearly reduced roughness of the CMC75/GEL25 film (Fig. 2B).

3.2. FTIR

The FTIR spectra of the control and the 0.02 % CUR-supplemented films are presented in Fig. 3. The spectra of all samples showed peaks at $\sim 3290\text{--}3296 \text{ cm}^{-1}$, which are attributed to amide A ($-\text{OH}$ and/or $-\text{NH}_2$) stretching. Moreover, there were bands at $\sim 2878\text{--}2933 \text{ cm}^{-1}$ attributed to Amide B stretching vibrations of asymmetric and symmetric methyl groups (CH_2). The spectra of the GAR-, OSA-, and WSSP-based films exhibited an absorption peak at 1648 cm^{-1} , corresponding to the Amide I band (stretching vibrations of the $\text{C}=\text{O}$ and $\text{C}-\text{N}$ groups). Interestingly, the separated protein-rich regions of the CMC75/GEL25 film were manifested by a small peak at 1629 cm^{-1} (Amide I band) [25]. The set of vibrations associated with the carboxylate group was positioned at 1591 cm^{-1} (the CMC75/GEL25 film), $1556\text{--}1558 \text{ cm}^{-1}$ (the GAR-, OSA-, and WSSP-based films), and $1409\text{--}1413 \text{ cm}^{-1}$ (all films). The bands found between 1016 and 1149 cm^{-1} represent $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ pyranose ring stretching vibrations.

For all types of carriers, the locations of peaks in the spectra of the 0.02 % CUR-containing films were identical to those of the control (Fig. 3). Considering the low addition level, the peaks of CUR might be suppressed by the predominant amount of polymers. Yang et al. [38]

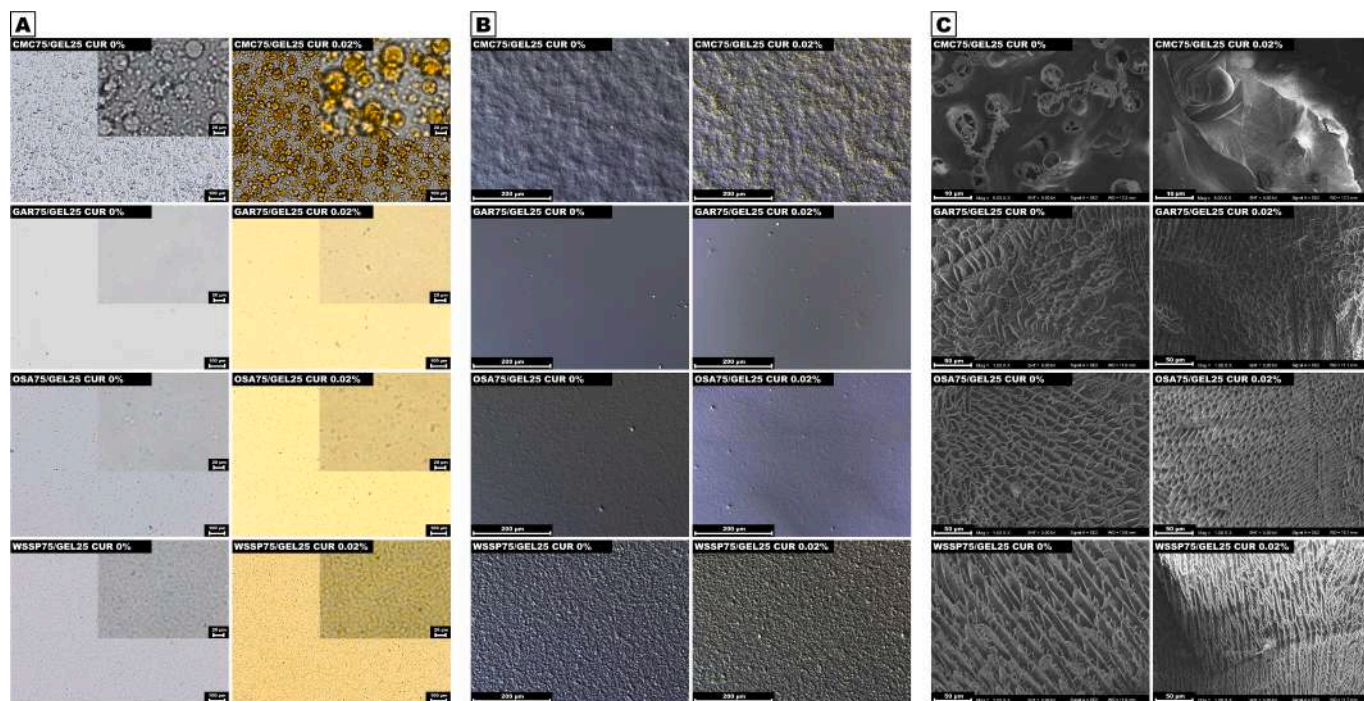


Fig. 1. Optical microscopy (A), DIC microscopy (B), and cryo-SEM (B) images of the curcumin-free and 0.02 % curcumin-added film-forming solutions based on 75/25 blends of polysaccharides (carboxymethyl cellulose (CMC), gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride starch (OSA), water-soluble soy polysaccharides (WSSP)) and gelatin (GEL).

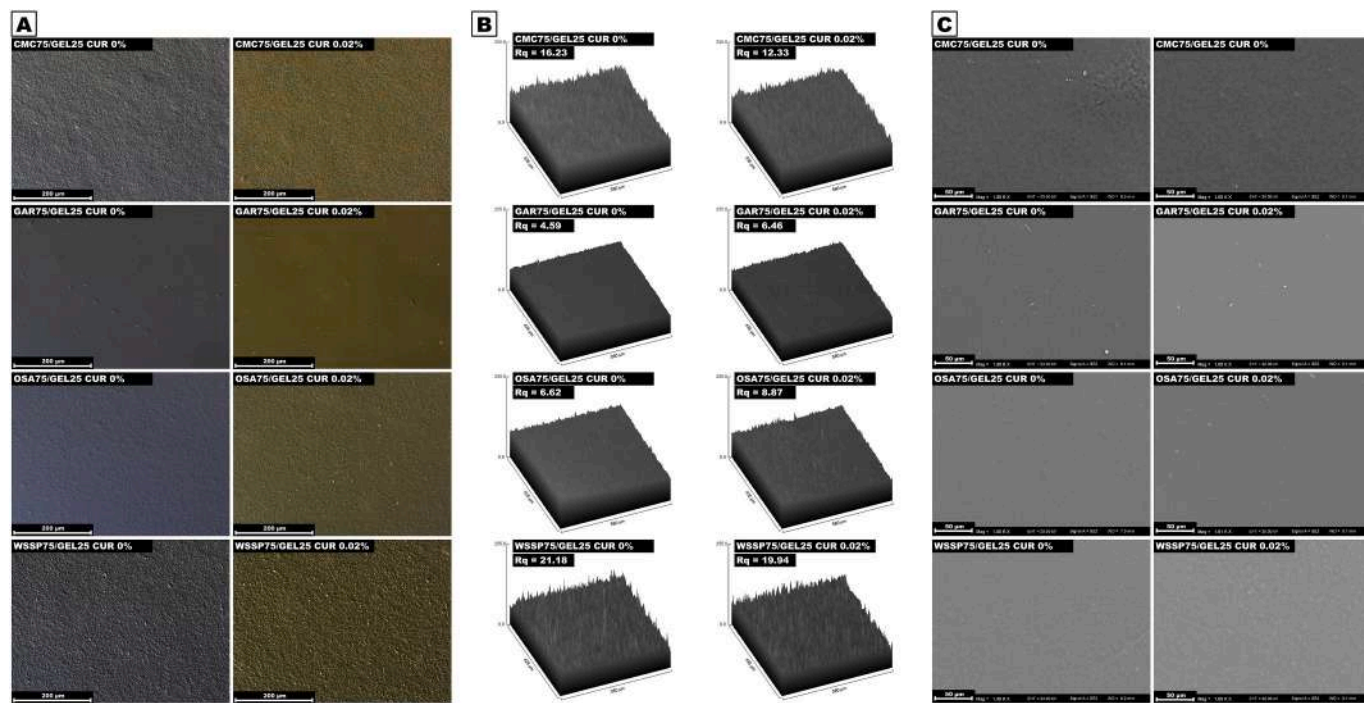


Fig. 2. DIC microscopy (A), 3D images (B) with calculated root-mean-square roughness (Rq), and SEM images (C) of the curcumin-free and 0.02 % curcumin-added films based on 75/25 blends of polysaccharides (carboxymethyl cellulose (CMC), gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride starch (OSA), water-soluble soy polysaccharides (WSSP)) and gelatin (GEL).

concluded that small bioactive molecules such as CUR are bounded to GEL mainly through non-covalent interactions, which cannot be reflected in FTIR. Also, Taghnia et al. [39] reported no change in the FTIR spectrum of *Lallemantia iberica* seed gum film after CUR incorporation, suggesting the formation of physical interactions between the

polysaccharide and CUR. In agreement with the present results, other previous studies have demonstrated that the incorporation of low amounts of active molecules did not induce significant changes in FTIR spectra of biopolymeric films [23,24,26,40]. Relatively high amounts of CUR (1–20 %) are necessary to provoke changes in the FTIR spectrum of

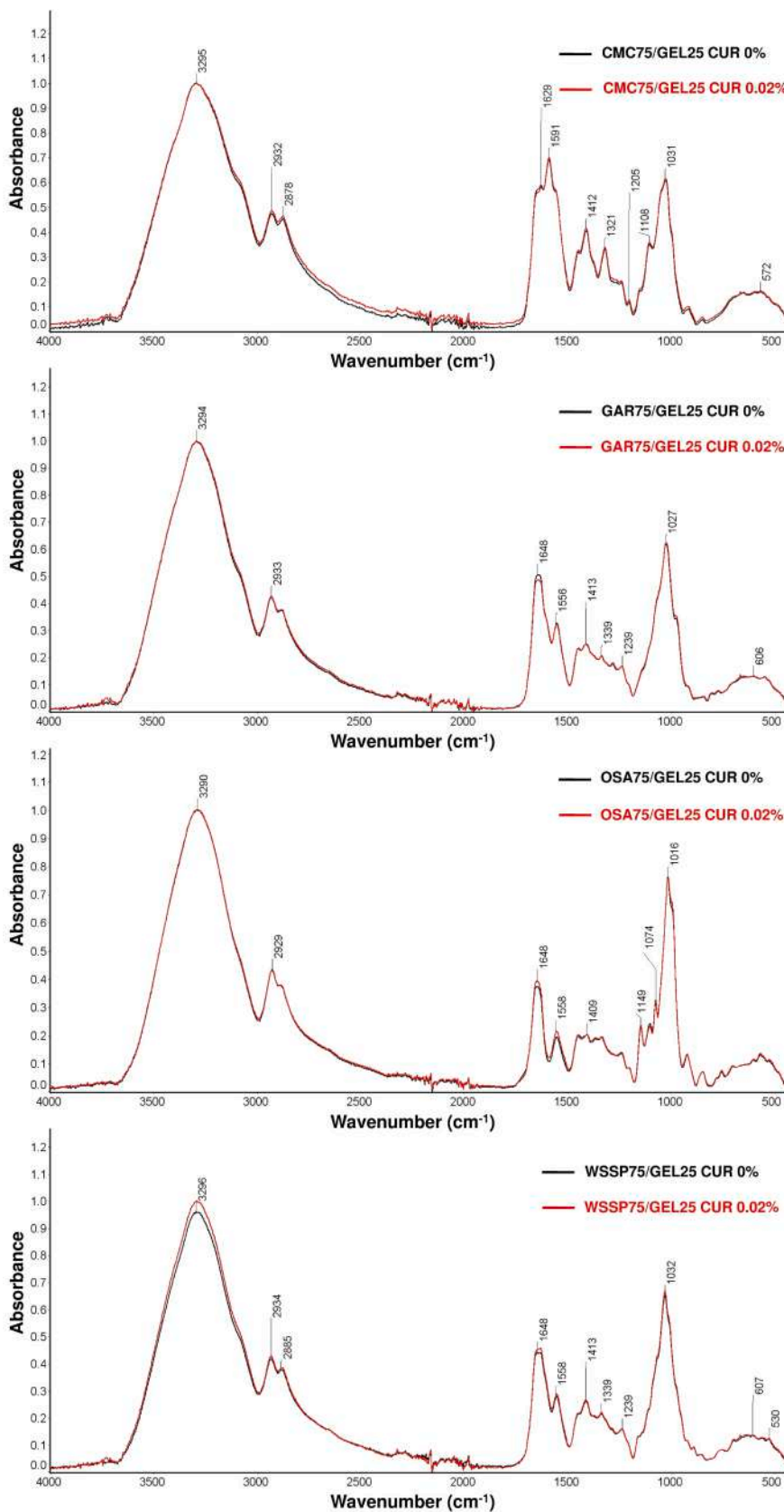


Fig. 3. Attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectra of the curcumin-free and 0.02 % curcumin-added 75/25 blend films obtained from polysaccharides (carboxymethyl cellulose (CMC), gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride modified starch (OSA), water-soluble soy polysaccharides (WSSP)) and gelatin (GEL).

the carrier [41].

3.3. WAXD

Two characteristic peaks in the diffractograms (Fig. 4) revealed a semi-crystalline structure of the films, which agrees with previous findings [17,36]. In contrast to earlier observations [36], however, the CMC75/GEL25 system exhibited negligible crystallization peaks at a low angle. Considering that for all films, the peak at $2\theta \approx 8^\circ$ is a GEL-origin (it represents a partial reversion of GEL to triple helical segments of collagen [17,36,42]). This inconsistency might indicate that the presence of ethanol (cosolvent) limiting the extent of GEL renaturation. This hypothesis is based on previous findings [43,44], which showed that alcohol had a negative effect on the formation of H-bonds (intermolecular and/or water-mediated) stabilizing the triple helix. The speculation is, however, limited since the GEL-origin peak was clearly visible in the WAXD patterns of other films. Therefore, another possible explanation for the non-consistent results could be a non-uniform distribution of GEL-rich microspheres in the CMC-rich matrix (Fig. 2), which did not ensure reproducibility of the WAXD data.

CUR is a highly crystalline compound, i.e. its X-ray diffraction pattern consists of a series of sharp peaks [45]. The lack of these peaks (Fig. 4) suggests therefore the existence of CUR in an amorphous state. Interestingly, in the case of all films, the intensity of the peak at $2\theta \approx 20^\circ$ increased after the addition of CUR. It is difficult to explain this result, but it might be related to the recrystallisation of some portion of CUR. By that logic, the GAR75/GEL25 system was the best anti-crystallizing carrier matrix for CUR. Consistent with the literature, the addition of CUR provoked changes in the intensity of the first crystalline peak, which could be attributed to the rearrangement of a triple helical structure [46].

3.4. Thermal properties

First of all, it should be mentioned that, in the case of the moisture-containing-samples, the DSC pan type (open vs. sealed system) strongly affects the experimental results and their further interpretation. For example, while the endothermic peak at around 100°C in open pans is attributed to moisture evaporation, a similar thermal event appearing in hermetically sealed pans is assigned to the polymer melting transition [47]. Since the film samples were hermetically sealed in this study, the DSC results were discussed only with data obtained in the same way.

All the thermograms showed a weakly pronounced endothermic peak located in the range of $73\text{--}98^\circ\text{C}$, depending on the film type (Fig. 5). Its presence is probably an indicator of physical aging of the films [48–50]. This process occurs in glassy or partial glassy polymers stored below their glass transition temperature (T_g). Over time, the polymer molecules slowly adapt their conformation to a new temperature. The gradual rearrangement causes an increase in packing density and a reduction in free volume and enthalpy within the polymer, which may reduce molecular mobility, resulting in more brittle material. The

aged polymer recovers the lost free volume at a temperature above T_g , presenting an endothermic peak. This phenomenon is called enthalpy relaxation/recovery [51]. Unfortunately, the aging peak commonly overlaps the polymer T_g , which causes a problem in determining its precise location. In this case, a modulated temperature DSC (MTDSC) is necessary to separate the enthalpy relaxation and glass transition events [52]. Nevertheless, considering the location of the aging peaks (Fig. 5), it can be speculated that the OSA- and GAR-based systems exhibited the smallest and the highest T_g values, respectively.

The melting transition of the control films was found at 192°C (GAR/GEL), 214°C (WSSP/GEL), and 224°C (CMC/GEL and OSA/GEL) (Fig. 5). These melting temperatures (T_m) are higher than previously observed for pure GEL ($\sim 170^\circ\text{C}$) [53] and CMC films ($\sim 102^\circ\text{C}$). A note of caution is due here since the T_m of biopolymeric films depends on many factors, including the plasticizer content [54]. The incorporation of the CUR raised the T_m of the films. Since the melting range of CUR crystals lies between 179 and 182°C [55], this finding was unexpected and suggested occurrence of heat-induced chemical interactions between the biopolymers and the CUR, which resulted in formation of more densely linked systems.

Clearly visible exothermic peaks were found for the CMC- and WSSP-based films at temperatures around $250\text{--}265^\circ\text{C}$ (Fig. 5). These thermal events might be primarily ascribed to the depolymerization and decomposition of the polysaccharide fraction [56]. The further sudden release of heat at $\sim 300^\circ\text{C}$ is a subsequent indicator of pyrolysis/carbonization of the film-formers [56–59] and presumably glycerol [60]. It was observed that CUR caused a marginal decrease in the thermal stability of the CMC75/GEL25 film. Consistent with the literature [61,62], no CUR-origin exothermic peaks were observed in the DSC patterns of the CUR-supplemented films (Fig. 5). This could be ascribed to the fact that the total decomposition of CUR occurs at $>400^\circ\text{C}$ [63]. The noisy peaks observed at the end of heating of some films can be ascribed to the mechanical movements of the pans as a result of self-pressurization of the hermetically sealed specimens.

3.5. MC, So, Sw, and WVP

Consistent with the previous study [17], the OSA75/GEL25 films exhibited the highest MC among the obtained materials (Table 1). Interestingly, the incorporation of CUR significantly reduced the MC only in the case of the OSA75/GEL25 system. It is difficult to explain this result, but it might be speculated that the hydrogen bonding and hydrophobic interactions between CUR and OSA [64,65] restricted the formation of polymer-water H-bonds, which reduced the equilibrium water content in the films.

Since the So and Sw values of the carrier are one of the most important parameters controlling the release rate of active substances, 50 % ethanol (food simulant for the release test) was used in the dissolution tests to provide a more comprehensive understanding of the CUR release mechanism. After the 2-h test, the So of the films ranged from ~ 18 to 100 %, depending on the film type (Fig. 6A). Only the

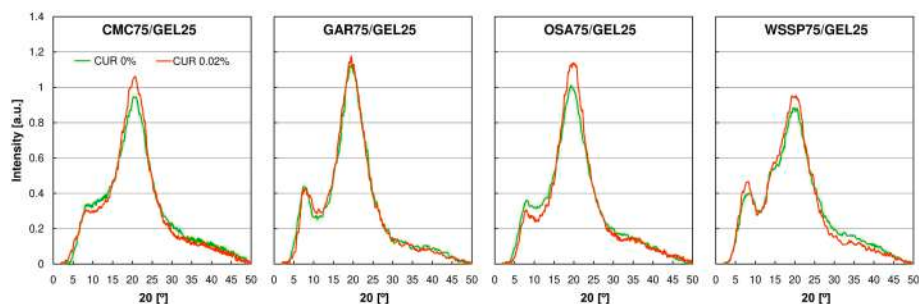


Fig. 4. Wide-angle X-ray diffraction (WAXD) patterns of the curcumin-free and 0.02 % curcumin-added 75/25 blend films obtained from polysaccharides (carboxymethyl cellulose (CMC), gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride modified starch (OSA), water-soluble soy polysaccharides (WSSP)) and gelatin (GEL).

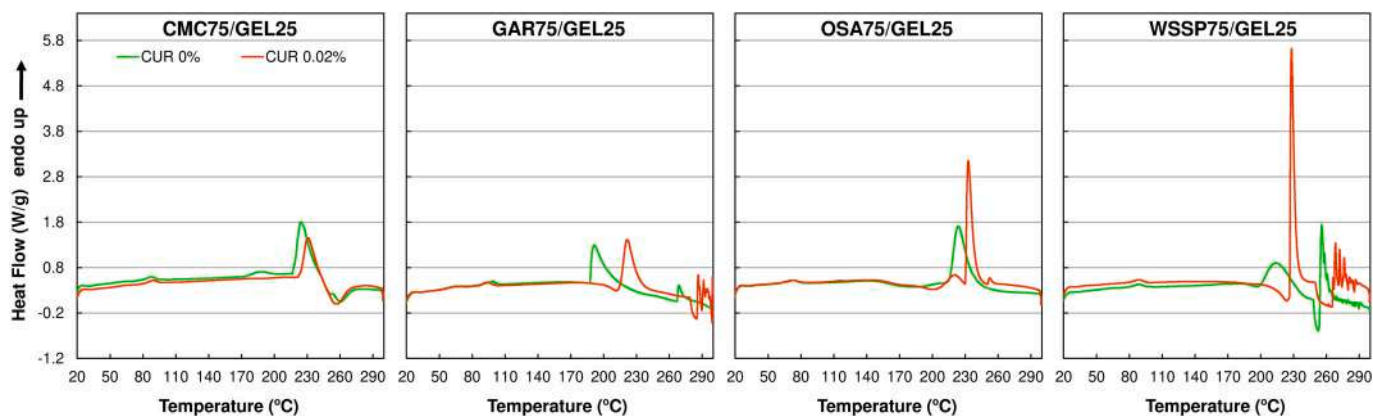


Fig. 5. Differential scanning calorimetry (DSC) thermograms of the curcumin-free and 0.02 % curcumin-added 75/25 blend films obtained from polysaccharides (carboxymethyl cellulose (CMC), gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride modified starch (OSA), water-soluble soy polysaccharides (WSSP)) and gelatin (GEL).

Table 1

The effect of curcumin (CUR) concentration on the pH, moisture content (MC), water vapor permeability (WVP), and opacity (Op) of 75/25 blend films obtained from polysaccharides (carboxymethyl cellulose (CMC), gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride modified starch (OSA), water-soluble soy polysaccharides (WSSP)) and gelatin (GEL).

Film	CUR (%)	pH	MC (%)	WVP (*)	Op (A_{600}/mm)
CMC75/ GEL25	0	6.31 ± 0.02 ^d	13.33 ± 0.45 ^{abcd}	57.01 ± 0.70 ^a	0.95 ± 0.06 ^{de}
	0.005	6.30 ± 0.03 ^d	13.61 ± 0.10 ^{cde}	56.22 ± 1.43 ^{ab}	1.04 ± 0.02 ^e
	0.01	6.32 ± 0.01 ^d	13.52 ± 0.09 ^{cde}	54.12 ± 1.44 ^b	1.03 ± 0.04 ^e
	0.02	6.29 ± 0.05 ^d	13.93 ± 0.15 ^{def}	48.80 ± 3.31 ^{cd}	1.54 ± 0.09 ^f
	0.02	6.29 ± 0.05 ^d	13.93 ± 0.15 ^{def}	48.80 ± 3.31 ^{cd}	1.54 ± 0.09 ^f
GAR75/ GEL25	0	5.29 ± 0.05 ^c	13.01 ± 0.52 ^{abcd}	48.48 ± 3.85 ^{cd}	0.51 ± 0.01 ^a
	0.005	5.27 ± 0.01 ^c	12.39 ± 0.45 ^{ab}	48.80 ± 1.51 ^{cd}	0.76 ± 0.12 ^{bcd}
	0.01	5.28 ± 0.04 ^c	12.33 ± 0.99 ^a	49.83 ± 1.34 ^c	0.65 ± 0.04 ^{ab}
	0.02	5.25 ± 0.04 ^c	12.79 ± 0.17 ^{abc}	49.75 ± 3.99 ^c	0.88 ± 0.05 ^{cde}
	0.02	5.25 ± 0.04 ^c	12.79 ± 0.17 ^{abc}	49.75 ± 3.99 ^c	0.88 ± 0.05 ^{cde}
OSA75/ GEL25	0	4.93 ± 0.02 ^a	17.78 ± 0.43 ⁱ	50.06 ± 1.69 ^c	0.75 ± 0.05 ^{bcd}
	0.005	4.91 ± 0.02 ^a	16.46 ± 0.32 ^h	49.98 ± 1.21 ^c	0.76 ± 0.12 ^{bcd}
	0.01	4.91 ± 0.06 ^a	15.89 ± 0.79 ^{gh}	49.71 ± 2.11 ^c	0.71 ± 0.06 ^{abc}
	0.02	4.92 ± 0.01 ^a	14.97 ± 0.32 ^{fg}	48.24 ± 3.45 ^c	1.04 ± 0.14 ^e
	0.02	4.92 ± 0.01 ^a	14.97 ± 0.32 ^{fg}	48.24 ± 3.45 ^c	1.04 ± 0.14 ^e
WSSP75/ GEL25	0	5.10 ± 0.03 ^b	14.34 ± 0.33 ^{ef}	47.02 ± 2.31 ^{cd}	2.70 ± 0.19 ^h
	0.005	5.05 ± 0.04 ^b	13.82 ± 0.21 ^{cde}	46.78 ± 2.62 ^{de}	2.08 ± 0.40 ^g
	0.01	5.08 ± 0.03 ^b	14.24 ± 0.09 ^{ef}	46.44 ± 1.01 ^{de}	3.06 ± 0.30 ⁱ
	0.02	5.09 ± 0.02 ^b	13.48 ± 0.48 ^{bcdde}	46.15 ± 0.73 ^{de}	5.66 ± 0.39 ^j
	0.02	5.09 ± 0.02 ^b	13.48 ± 0.48 ^{bcdde}	46.15 ± 0.73 ^{de}	5.66 ± 0.39 ^j

^{a-h}Values with the different superscript letters within one column are significantly different ($P > 0.05$).

*g mm m⁻² d⁻¹ kPa⁻¹.

CMC75/GEL25 system was completely dissolved in the acceptor solution. This result may be explained by the fact that the CMC can be solubilized in water-miscible solvents, such as ethanol (up to 50 %) [66]. In accordance with the present results, previous studies have also demonstrated a highly dissolvable character of CMC films [19,25]. The limited S_o values observed for the GAR, OSA, and WSSP-based films (Fig. 6A) supports the evidence from a previous study conducted using

pure water [17]. However, since the aforementioned polysaccharides are insoluble in ethanol [67,68], the S_o values obtained in this study were lower. Furthermore, the S_o of the GAR, OSA, and WSSP-based films was relatively time-independent (after exceeding 5 min of dissolution) (Fig. 6A). The weaker S_o of the GAR- and WSSP-containing films, compared to the OSA-based material, might be an indicator of their more extensive aggregation in contact with 50 % ethanol, i.e. the alcohol could generate stronger adhesive forces in the hemicelluloses than in the modified starch.

The S_w abilities of the films (Fig. 6B) reflect the value rank order observed in previous studies conducted using an aqueous medium [23,24]. Certainly, due to the presence of ethanol, the S_w values of the films were significantly lower. In the initial soaking period, the S_w capacity of the CMC75/GEL25 films was ~4–6 times higher compared to the other carriers (Fig. 6B); nevertheless, since the CMC-based films were prone to disintegration (Fig. 6A), their S_w capacity could only be determined for up to 5 min. The high S_w of the CMC/GEL system can be attributed to the immobilization of water in the crevices of the film network structure, which was loosened by leaching of the highly dissolvable polysaccharide fraction. In most cases, the incorporation of CUR, regardless of the concentration, did not change the S_o and S_w capacity of the films (Fig. 6A-B). An exception was the reduced S_w of the CMC75/GEL25 film loaded with the highest CUR level.

Among the control films, the CMC-based system was the most permeable to water vapor (Table 1). This finding, however, is contrary to a previous study [23], which showed that the CMC75/GEL25 film ensured lower WVP than the OSA75/GEL25 film. The inconsistency may be explained by the fact that, in this work, the FFs contained the cosolvent for CUR (i.e. ethanol in the concentration of 4 %). It is, therefore, possible that alcohol molecules affected the cohesiveness of the film matrix, e.g. by partial aggregation of the polysaccharide fraction and/or denaturation of GEL. For example, Musso et al. [69] demonstrated that, in comparison to the aqueous solution, GEL dissolved in the ethanolic solution (~50 %) produced films with a lower degree of compactness, suggesting different protein chain molecular unfolding or crosslinking within the film network. This phenomenon can be explained by the disruption of the side-chain intramolecular hydrogen bonding and the formation of new H-bonds between ethanol molecules and GEL side-chains. As discussed in Section 3.3, this assumption is based on the comparison of the WAXD pattern of the CMC75/GEL25 film obtained in this study (Fig. 4) with the analogous film cast from an aqueous solution [36].

In most cases, the WVP of the films was not affected by CUR. An exception was the reduced WVP of the CMC75/GEL25 film loaded with the highest CUR level. It is difficult to explain this result, but it is possible that the water vapor molecules slowly passed through this film matrix

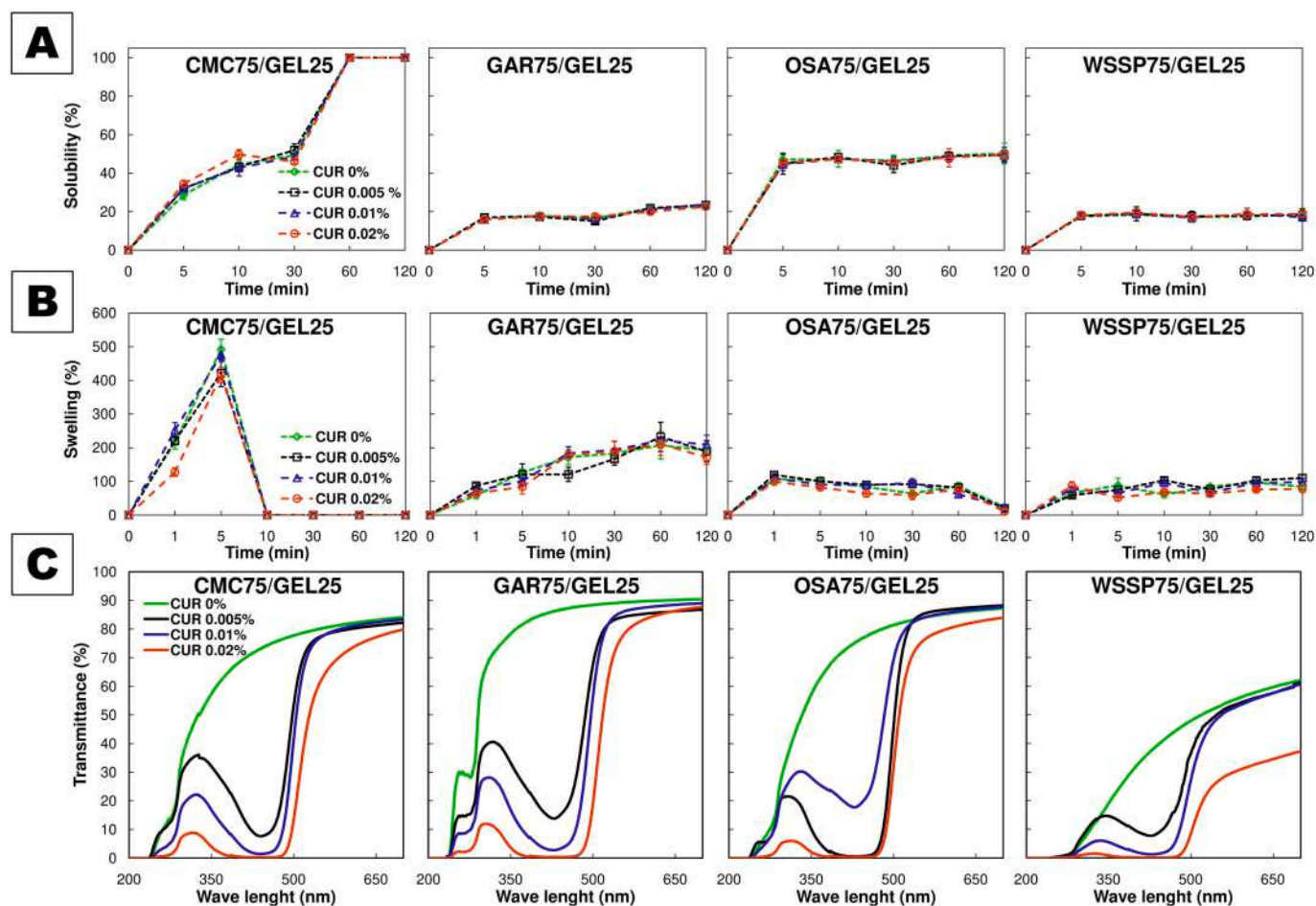


Fig. 6. Solubility (A), swelling (B), and transmittance (C) of 75/25 blend films obtained from polysaccharides (carboxymethyl cellulose (CMC), gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride modified starch (OSA), water-soluble soy polysaccharides (WSSP)) and gelatin (GEL), incorporated with increasing amounts of curcumin (CUR).

due to the tortuosity effect generated by the presence of larger GEL-rich microspheres formed as a result of CUR incorporation (Fig. 1A). Many recent studies [70–72] have shown that, as a hydrophobic compound, CUR has the ability to reduce the WVP of films both based on proteins and polysaccharides. Nevertheless, some studies [69,73] reported no effect of CUR on the film WVP, which was attributed to its low concentration (i.e. 0.2 %).

3.6. Optical properties

The Op of the control films increased in the following ranked order: GAR/GEL < OSA/GEL < CMC/GEL < WSSP/GEL (Table 1). This result primarily reflects the differences in the microstructural features of the films, i.e. since the WSSP- and CMC-containing films exhibited high morphological heterogeneity (Fig. 2), they offered higher Op than the more homogenous GAR- and OSA-based films. As a result of the excellent UV-absorbing properties of GEL (due to the presence of aromatic amino acids, S–S bonds, and carbonyl groups of peptide bonds [17]), all the films were excellent barriers against UV-C radiation (<280 nm, Fig. 6C). In the whole UV region, the WSSP75/GEL25 film exhibited the best barrier properties, which may be explained by the presence of tightly packed non-solubilized polysaccharide particles (Fig. 1-2), which scattered, reflected, or absorbed light. Since CUR displays an excellent UV-light absorption capacity [74], its addition improved the light-barrier characteristics in the films, especially in the UV-A region (315–400 nm). All spectra of the CUR-supplemented films exhibited a transmittance band centered at $\lambda \approx 346$ nm (Fig. 6C), which was a

consequence of the CUR absorbance peak at $\lambda_{\max} \approx 430$ nm (data not shown) [74].

3.7. Color stability

Among the control samples, the WSSP/GEL film was the darkest and the most yellow (Fig. 7), which reflects the color of the WSSP-based FFS (Fig. S1). The high transparency of the GAR- and OSA-based films (Table 1) resulted in their high lightness. The L^* parameter of the films tended to decrease with the increasing CUR content. The CUR-added films were intensively yellow; however, there were no differences in the b^* parameter of the 0.01 and 0.02 % CUR-supplemented films ($p > 0.05$). Interestingly, the incorporation of CUR at the low level (0.05 %) decreased the redness of the films (especially the transparent ones), while the further increase in the CUR concentration contributed to a higher redness value of the films (Fig. 7). It was found that, at the highest CUR concentration, the CMC-based film had the highest a^* parameter. This result can be explained by the fact that this carrier had higher pH than the other systems (6.31 vs. 4.93–5.29, Table 1), which probably favored the occurrence of a larger amount of the bright red enol form of CUR [75]. This result supports the evidence from previous observations [76], which reported significant differences in the color of the CUR solution at the pH values of 5 and 6.

The storage experiment (25 °C for 60 days, 50 % RH, without light) was conducted to determine the color stability of the films. Both the control and the CUR-added films were prone to color change. The longer the storage time was, the more extensive the changes in color

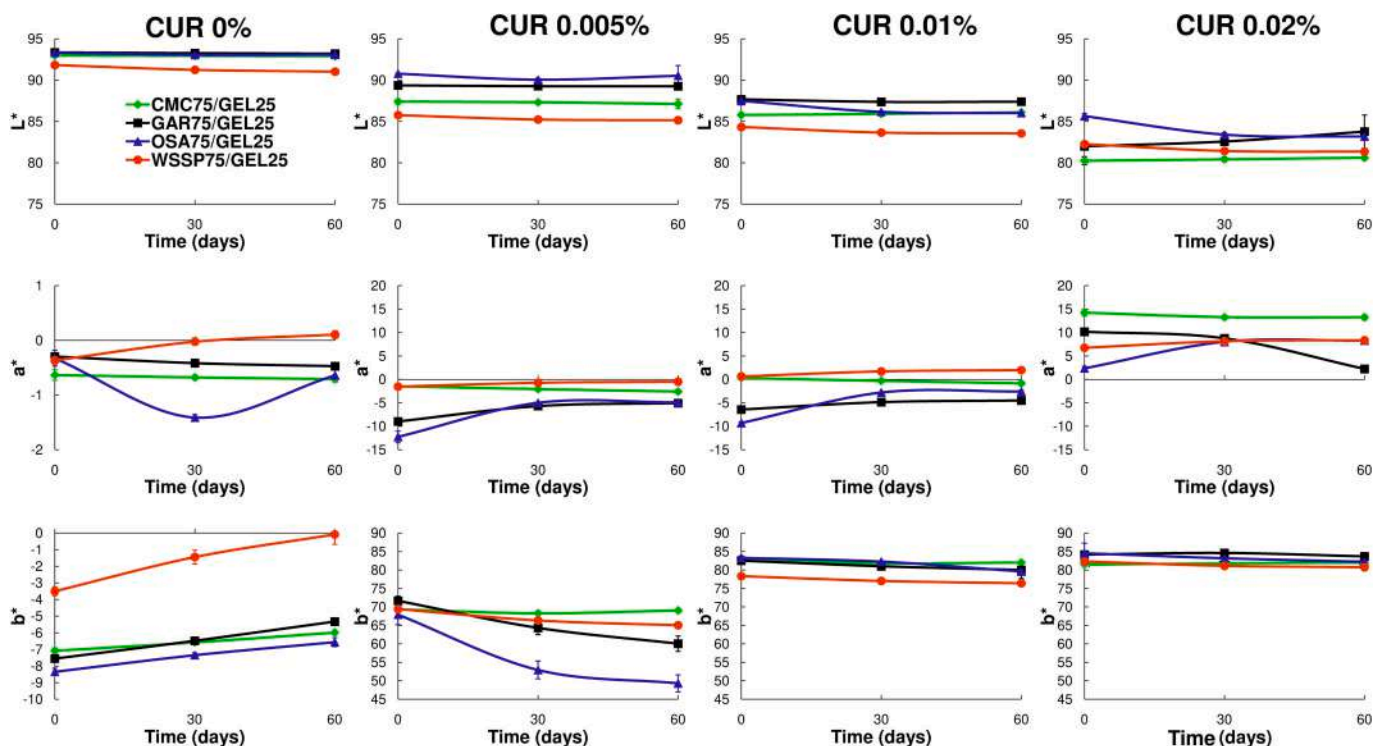


Fig. 7. Color stability of 75/25 blend films obtained from polysaccharides (carboxymethyl cellulose (CMC), gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride modified starch (OSA), water-soluble soy polysaccharides (WSSP)) and gelatin (GEL), incorporated with increasing amounts of curcumin (CUR).

parameters were found (Figs. 7 and 8). Among the CUR-free films, the WSSP-based carrier was the most prone to the time-induced color changes ($\Delta E_{60\text{days}} = 3.55$; Fig. 8), which can be ascribed to the darkening (Fig. 7) of the WSSP pigments. The ΔE values of the CMC- and OSA-based controls were < 2 , which means that the color difference was perceptible only through close observation [77]. Regardless of the CUR concentration, the CMC-based film ensured the highest colorimetric stability ($\Delta E < 1.60$). This result may be explained by the fact that, in this carrier system, the CUR molecules were completely entrapped in the GEL-rich microparticles, which presumably limited their oxygen-triggered degradation. It is also possible that the antioxidant potential of GEL plays a significant role in protecting CUR molecules against chemical degradation [78]. Numerous studies have shown that encapsulation of CUR with biopolymeric (including protein-based) nanoparticles remarkably improves its storage stability [79–82], most likely by arresting spontaneous autoxidation.

It should be mentioned that relatively good color stability was also

found for all the CUR-added WSSP-based films ($\Delta E_{60\text{days}} = 2.42\text{--}4.53$) and the 0.01–0.02 % CUR-added GAR-based films ($\Delta E_{60\text{days}} = 2.63\text{--}3.19$) (Fig. 8). In turn, the highest values of ΔE (caused by the increased redness and/or decreased yellowness; Fig. 7) were noticed for the OSA-based system, suggesting its weakest protective action towards CUR. This finding was unexpected since OSA has been successfully used for stabilization of CUR [64]. A note of caution is due here, since the OSA loaded nanocurcumin in the previous work was stored in the dry form in an airtight container. Here, it is also essential to mention that CUR has low stability in the aqueous phase [83], as it becomes fragmented by the OH^- ion of water into vanillin, acetone, feruloylmethane, and ferulic acid [84]. In the light of this information, it is possible that the noticeable changes in the color of the CUR-added OSA75/GEL25 films (Fig. 8) were in part stimulated by their higher ($p < 0.05$) MC (14.97–16.46 vs. 12.33–14.34, Table 1).

It was found that the films with the lowest CUR content were more susceptible to the color change than the 0.01–0.02 % CUR-added

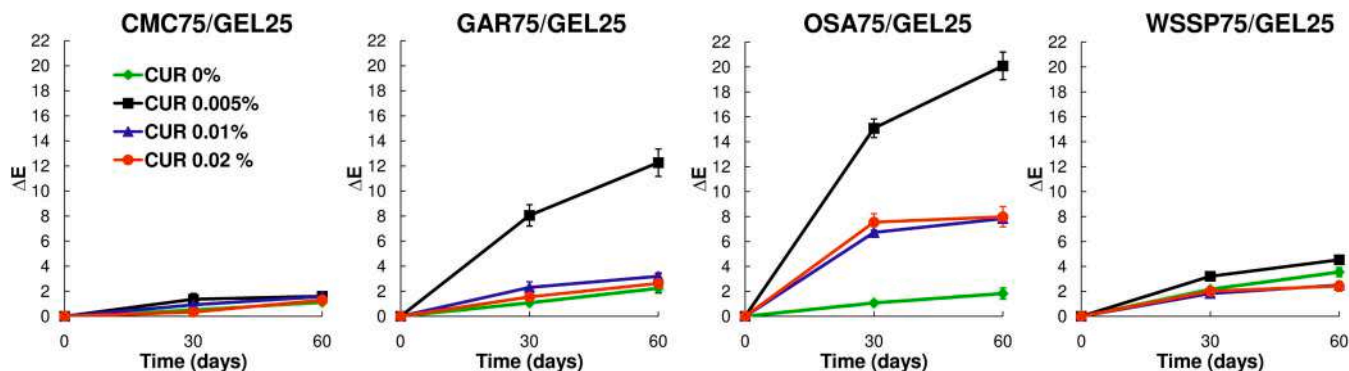


Fig. 8. Effect of storage (25 °C, 50 % RH, no light) on the total color difference (ΔE) of 75/25 blend films obtained from polysaccharides (carboxymethyl cellulose (CMC), gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride modified starch (OSA), water-soluble soy polysaccharides (WSSP)) and gelatin (GEL), incorporated with increasing amounts of curcumin (CUR).

systems (Fig. 8). It is possible that, at the lower concentration, the CUR degradation was more visible than in the intensely pigmented samples.

3.8. Mechanical properties

The CMC75/GEL25 films, despite the phase separation, exhibited the best mechanical strength and stiffness (Table 2). This result can be attributed to the regular arrangement of the hydroxyl and carboxymethyl groups along the linear CMC chain (Fig. S2A; [85]) which facilitated the formation of H-bridges and therefore a highly packaged polymer-polymer structure of the film matrix. It can be assumed that the local presence of the GEL microspheres did not affect the mechanical adhesion of CMC molecules [36]. Evidently, due to the branched structure (Fig. S2B, S3, S4; [68,86,87]) the intermolecular bonds between the other polysaccharides were weaker, thus these materials were less cohesive and exhibited weaker mechanical strength. Specifically, the TS of the CMC-based films was 2 times higher than that of the GAR- and WSSP-based samples and ~ 8 times higher than that of the OSA-based films (Table 2). OSA yielded both the weakest and the most stretchable films (114.73–133.55 %, Table 2). This result can be ascribed to the limited adherence of amylopectin backbone structures of the modified waxy starch due to the presence of octenyl succinic groups [88] (Fig. S2B). In support of this hypothesis, previous findings [89,90] showed that glycerol-plasticized amylopectin (unmodified) yielded restrainedly stretchable films (25–29 %). Furthermore, the observed high stretchability of the OSA-containing films might be attributed to their more hydrated state (Table 1). It is known that water acts as a very potent plasticizer for polysaccharides and proteins [91]. Interestingly,

Table 2

The effect of curcumin (CUR) concentration on the tensile strength (TS), elongation at break (E), elastic modulus (EM) and puncture strength (PS) of 75/25 blend films obtained from polysaccharides (carboxymethyl cellulose (CMC), gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride modified starch (OSA), water-soluble soy polysaccharides (WSSP)) and gelatin (GEL).

Film	CUR (%)	TS (MPa)	E (%)	EM (MPa)	PS (MPa)
CMC75/ GEL25	0	42.34 ± 4.52 ^f	30.90 ± 8.66 ^b	1357.73 ± 95.26 ^d	12.78 ± 1.71 ^e
	0.005	42.07 ± 5.23 ^f	29.29 ± 9.03 ^b	1358.65 ± 145.71 ^d	12.95 ± 2.05 ^e
	0.01	41.79 ± 3.54 ^f	28.42 ± 10.49 ^b	1261.09 ± 145.75 ^d	12.50 ± 2.01 ^e
	0.02	40.31 ± 4.06 ^f	29.25 ± 8.96 ^b	1296.89 ± 137.79 ^d	13.56 ± 1.14 ^e
	0.02	40.31 ± 4.06 ^f	29.25 ± 8.96 ^b	1296.89 ± 137.79 ^d	13.56 ± 1.14 ^e
GAR75/ GEL25	0	24.53 ± 1.86 ^{de}	9.97 ± 5.00 ^a	891.48 ± 47.92 ^c	5.58 ± 0.33 ^{bcd}
	0.005	24.37 ± 2.97 ^{cde}	6.27 ± 3.43 ^a	878.99 ± 105.52 ^c	5.03 ± 0.44 ^b
	0.01	26.08 ± 3.97 ^e	6.03 ± 3.01 ^a	917.79 ± 126.97 ^c	5.07 ± 0.70 ^{bc}
	0.02	23.45 ± 3.84 ^{bcd}	4.94 ± 2.12 ^a	963.26 ± 104.96 ^c	5.20 ± 0.61 ^{bc}
OSA75/ GEL25	0	4.99 ± 0.59 ^a	125.14 ± 18.41 ^c	52.83 ± 9.69 ^a	3.32 ± 0.14 ^a
	0.005	5.21 ± 0.71 ^a	129.00 ± 18.00 ^c	51.26 ± 6.00 ^a	3.21 ± 0.12 ^a
	0.01	5.48 ± 0.95 ^a	133.55 ± 23.78 ^c	53.96 ± 9.32 ^a	3.55 ± 0.30 ^a
	0.02	5.65 ± 0.83 ^a	124.73 ± 17.84 ^c	58.53 ± 12.82 ^a	3.38 ± 0.42 ^a
WSSP75/ GEL25	0	21.80 ± 1.49 ^{bc}	30.96 ± 5.18 ^b	694.28 ± 84.48 ^b	5.96 ± 0.52 ^{bcd}
	0.005	21.20 ± 1.55 ^b	32.32 ± 6.29 ^b	677.54 ± 47.87 ^b	6.73 ± 0.23 ^d
	0.01	21.24 ± 1.96 ^b	32.66 ± 7.05 ^b	683.08 ± 79.55 ^b	6.73 ± 0.31 ^d
	0.02	22.52 ± 1.89 ^{bcd}	33.82 ± 5.21 ^b	745.75 ± 66.28 ^b	6.32 ± 0.42 ^{cd}

^{a-f} Values with the different superscript letters within one column are significantly different ($P > 0.05$).

the level of E of the OSA75/GEL25 films observed in our investigation is far above that observed for pure octenyl succinylated potato starch-based films [92].

In accordance with previous results [17,22,24], the system based on GAR was the least extensible (≤ 10 %, Table 2), which reveals a fragile character of this polysaccharide caused by its highly branched structure and heterogeneous composition (Fig. S3).

The CUR incorporated at the concentrations studied did not affect the mechanical properties of the films. These results partially corroborate the findings of some previous works. For example, Musso et al. [69] found that CUR (0.04 % w/v) did not change TS and E of GEL films. Nevertheless, the GEL film incorporated with CUR exhibited a significantly decreased EM (at least by 50 %). In turn, Rubini et al. [93] reported that CUR (0.02–0.1 % w/v) did not affect the TS but contributed to stiffening of the GEL film when used at higher concentrations. In another study, Roy and Rhim [37] demonstrated that the ~0.013 % (w/v) CUR level did not change the mechanical properties of CMC-based films; however, its doubled concentration caused a reduction in the TS and EM, but an increment in the E value. It could be speculated that, by loosening the polymer network, the large number of CUR molecules exerted a weakening/plasticizing effect on the CMC film. In another work on κ -carrageenan film, it was found that as CUR concentration exceeded 3 %, the TS and EM decreased probably due to the poor dispersion of the agglomerated CUR [94].

3.9. Release properties

Fig. 9 presents experimental and model-predicted data of the percentage cumulative release of CUR from the films. As can be seen, the release process can be divided into two stages: (i) an initial heightened rate and (ii) a slow-release afterward. Depending on the CUR concentration and film type, ~42–98 % of CUR was released during the 30 min dissolution test (Fig. 9). In this period, the release of CUR reached a plateau for most carriers. Regardless of the carrier type, the release of CUR increased gradually with an increase in its concentration (Table 3). This result may be explained by the fact that the increase in the CUR content increased the concentration gradient and, consequently, stimulated diffusion into the surrounding medium. It seems also possible that the capture of CUR within the polymeric network decreased as its content increased.

It was found that the CMC75/GEL25 film ensured the fastest ($t_{50\%} = 4.13$ – 5.61 min) and the most complete (83.36–98.18 %) release of CUR (Fig. 9). This result can be related to the highly swellable character of this system (Fig. 6B). It is known that as the penetrant solvent starts to diffuse into the polymer matrix, the drug at the same time begins to diffuse through the swollen part of the polymer. Due to the glass-to-gel transition (relaxation), swelling loosens the matrix and the active agent is able to diffuse out, with the release rate determined by the rate of diffusion of the penetrant solvent [95,96]. It is possible, therefore, that the rapid and abundant transport of the 50 % ethanol into the CMC75/GEL25 matrix favored the release of CUR. It should also be noticed that the CMC75/GEL25 system was the most prone to dissolution (Fig. 6A); therefore, the release could be additionally driven by the progressive erosion of the carrier. Interestingly, the encapsulation of CUR in the GEL-rich microspheres was not a slow-down factor of the release. This was probably related to the fact that CMC, which is highly hydrophilic, was prone to swelling and dissolution in contact with water (despite the presence of alcohol), which facilitated the leaching of the active compound from the matrix [97].

Among the obtained carriers, the OSA75/GEL25 system ensured the slowest ($t_{50\%} = 4.58$ – 97.95 min, Table 3) and the least complete (42.11–61.61 %) release of CUR (Fig. 9). It was especially visible at the 0.005–0.01 % CUR addition levels; for example, at the lowest concentration, the CUR release from the OSA75/GEL25 carrier was ~18, ~8, and ~6 times slower than that in the CMC-, WSSP-, and GAR-based systems, respectively (Table 3). This result might indicate the

CMC75/GEL25 GAR75/GEL25 OSA75/GEL25 WSSP75/GEL25

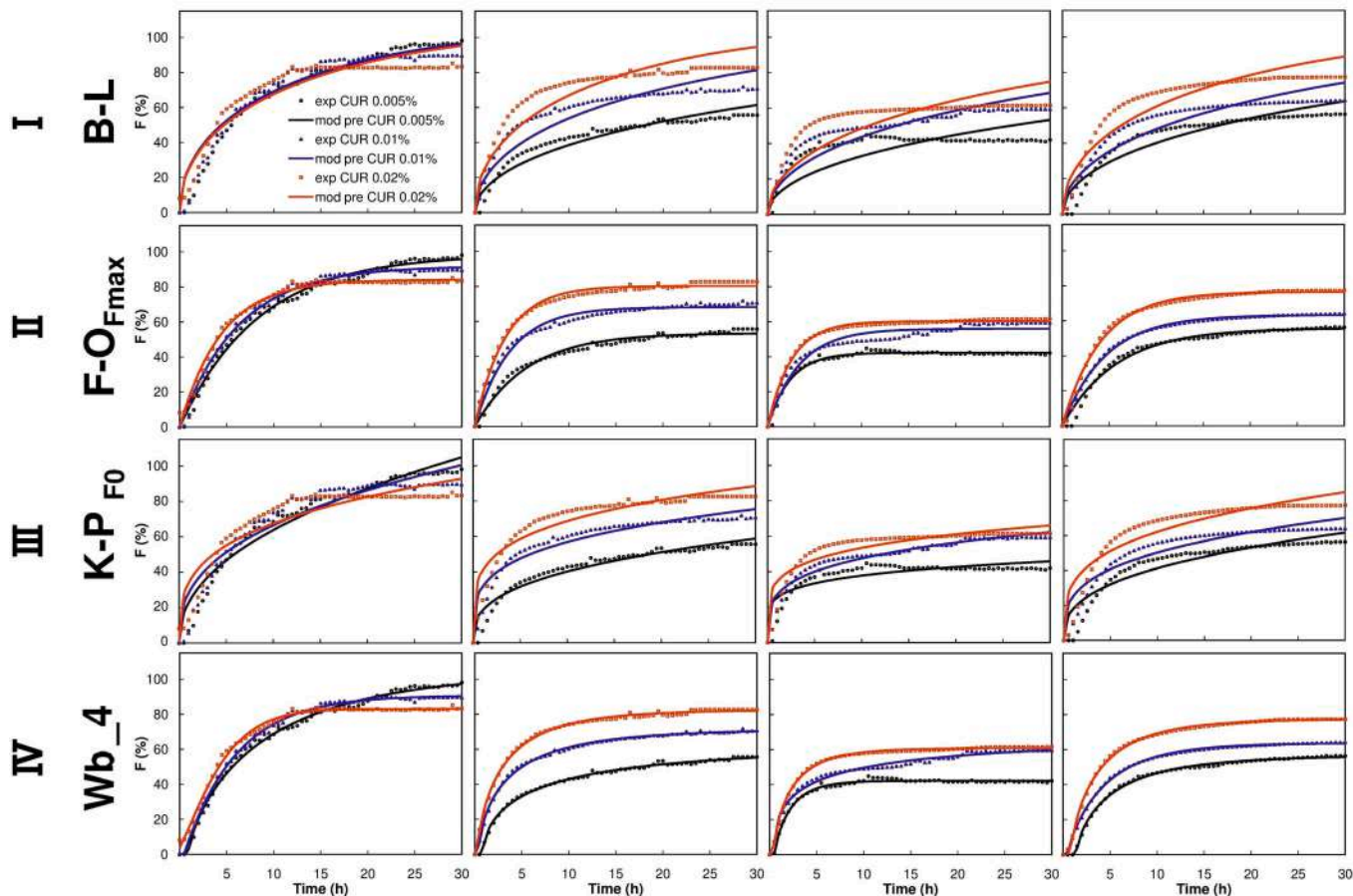


Fig. 9. Fraction (F) of curcumin (CUR) released from 75/25 blend films obtained from polysaccharides (carboxymethyl cellulose (CMC), gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride modified starch (OSA), water-soluble soy polysaccharides (WSSP)) and gelatin (GEL), according to the Baker-Lonsdale (B-L), First order with F_{max} ($F-O F_{max}$), Korsmeyer–Peppas with F_0 (K-P F_0), and Weibull_4 (Wb_4) models; experimental (points) and theoretical data (lines).

Table 3

Time values needed to 50 % curcumin (CUR) release ($t_{50\%}$) and reduce the DPPH* concentration by 50 % ($t_{50\%DPPH}$) obtained from the best fitting mathematical models. Diffusional exponent (n) of the Korsmeyer–Peppas model.

Film	CUR (%)	$t_{50\%}$ (min)	n	$t_{50\%DPPH}$ (min)
CMC75/GEL25	0	–	0.452	10,379,957.04 ^b
	0.005	5.61 ^a	0.375	655.87 ^b
	0.01	4.94 ^a	0.270	56.96 ^b
	0.02	4.13 ^a	0.346	21.50 ^b
GAR75/GEL25	0	–	0.258	905.94 ^b
	0.005	17.51 ^a	0.230	153.77 ^b
	0.01	5.02 ^a	0.176	116.94 ^b
	0.02	2.96 ^a	0.248	11.40 ^b
OSA75/GEL25	0	–	0.193	9365.49 ^b
	0.005	97.95 ^b	0.365	281.54 ^b
	0.01	10.33 ^a	0.303	77.49 ^b
	0.02	4.58 ^a	0.282	12.72 ^b
WSSP75/GEL25	0	–	0.452	9848.68 ^b
	0.005	13.02 ^a	0.375	157.03 ^b
	0.01	7.08 ^a	0.270	135.71 ^b
	0.02	4.19 ^a	0.346	15.13 ^b

^a Weibull_4 model.

^b Weibull_1 model.

existence of strong binding between CUR and OSA. As suggested previously, various amphiphilic octenyl succinate-modified polysaccharides form a hydrophobic core that can immobilize hydrophobic drugs, including CUR [64,98,99]. Another possible explanation for the

high entrapping efficiency of the OSA-containing carrier may be the encapsulation of CUR in the OSA/GEL coacervates. To support this hypothesis, previous studies [100,101] have shown such a possibility for different polysaccharide/protein complex coacervates. It should also be mentioned that the OSA-containing carrier in contact with water behaves like sticky glue, which can ensure the adhesive entrapment of CUR.

Among the eight mathematical models (Table S1) used for the analysis of the kinetics of CUR release, the four-parameter model, i.e. Weibull_4 (Wb_4) provided the best fit for all formulations (average $R^2_{adjusted} = 0.9952$, Table S2). This confirms the rule that the multi-parameter models, especially Wb_4, are better in release prediction than the one- or two-parameter models [25,26,29]. The disadvantage of the Wb_4 model, however, was that it did not calculate the $t_{50\%}$ value of the limited release system (<50 %), namely, the 0.005 % CUR-added OSA75/GEL25 film. Therefore, for this formulation, the Wb_1 model (i.e. the three-parameter equation, not taking into account the F_{max}) was a better choice in terms of the numerical estimation of the release rate.

The ‘ n ’ release exponent in the Korsmeyer–Peppas (K–P) model is used for general description of the main transport phenomena involved in the release either by drug diffusion and/or polymer chain relaxation during polymer swelling [102]. In our study, the K-P F_0 moderately predicted the CUR release kinetics (average $R^2_{adjusted} = 0.8825$, Table S2). Nevertheless, according to the ‘ n ’ value (<0.5; Table 3), a quasi-Fickian diffusion-controlled mechanism was mainly responsible for the release of CUR from the carriers.

3.10. Antioxidant properties

Various methods for evaluation of the antioxidant capacity of CUR have been employed in literature. Several reports have highlighted the DPPH^{*} scavenging activity of CUR and CUR-functionalized materials [93,103]. In our study, the film samples were directly added to the antioxidant assay medium (i.e. DPPH-50 % ethanol solution). The presence of alcohol was required to ensure the CUR release. CUR and DPPH are equally soluble in ethanol (approximately 10 mg/mL) [5,104]; therefore, it can be assumed that the DPPH method is more favorable than the application of the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation (ABTS^{•+}) assay. For comparison, the solubility of ABTS in ethanol is limited to 1 mM (approximately 0.5 mg/mL) [105]. The ferric reducing antioxidant power (FRAP) method was not considered in this study because the FRAP reagent typically does not contain any organic solvent.

Based on the $t_{50\%DPPH}$ values, the antiradical activity of the CUR-free films increased in the following ranked order: CMC/GEL < WSSP/GEL < OSA/GEL < GAR/GEL (Table 3). The best antioxidant capacity noticed for the control GAR-based film can be attributed to the fact that this polysaccharide contains alcohol-extractable polyphenols [106,107]. The CMC75/GEL25 carrier showed negligible antioxidant activity (the scavenging value for the DPPH radical was ~1.7 %, Fig. 10), which supports evidence from previous observations [108,109]. Other studies [23,36], however, showed that the CMC75/GEL25 system had a considerable ability to scavenge the ABTS^{•+}, mainly due to the portion of GEL, i.e. a protein with a documented antioxidant ability [36]. The differences between DPPH and ABTS radical scavenging activities can be ascribed to different reaction media, i.e. the DPPH assay uses alcohol or an alcoholic solution as a solvent, whilst the ABTS assay is typically carried out in the aqueous phase. It is possible that the ethanol-precipitated GEL molecules had almost no DPPH^{*} radical scavenging activity [110,111].

The antiradical potential of the films increased with the increasing concentration of CUR (Fig. 10, Table 3). At the end of the test (120 min), the antiradical activity of the 0.02 % CUR-added films was ~4–40 times greater than that of the control samples. The highest increment was observed for the carrier with the lowest initial antioxidant activity (i.e. the CMC75/GEL25 film). The antioxidant activity did not reflect the CUR release abilities of the carriers, as a weak positive correlation ($R^2 = 0.26$) was found between the $t_{50\%}$ and $t_{50\%DPPH}$ values (Fig. S5). This was likely because the free radicals were scavenged by CUR released, non-released, as well the carrier itself. Interestingly, despite the fact that carrier type affected the $t_{50\%DPPH}$ values (Table 3), in the plateau stage, the DPPH^{*} scavenging abilities of the films were quite comparable (Fig. 10). Since the DPPH^{*} scavenging profiles of the particular carrier systems were strongly dependent on the CUR concentration, it was impossible to indicate one carrier system ensuring the distinguished antioxidant potential.

4. Conclusion

CUR (0.005–0.02 %) significantly improved the antiradical capacity and UV barrier properties (especially in the UV-A region) of the polysaccharide/GEL films. At the same time, no bigger changes in the morphology, mechanical properties, and most physicochemical parameters of the films were observed. The CUR-supplemented films were intensively yellow.

It was found that the CUR release and antioxidant profiles of the obtained systems could not be accurately explained in terms of their soaking behavior (i.e. dissolution and solvent uptake). The tests performed in 50 % ethanol (a fatty food simulant) revealed that the CMC75/GEL25 carrier ensured in general the fastest ($t_{50\%} = 4.13$ – 5.61 min) and the most complete release of CUR (83.36–98.18 %). In turn, the OSA75/GEL25 film was the weakest releasing system ($t_{50\%} = 4.58$ – 97.95 min, CUR release = 42.11–61.61 %). This outcome proves

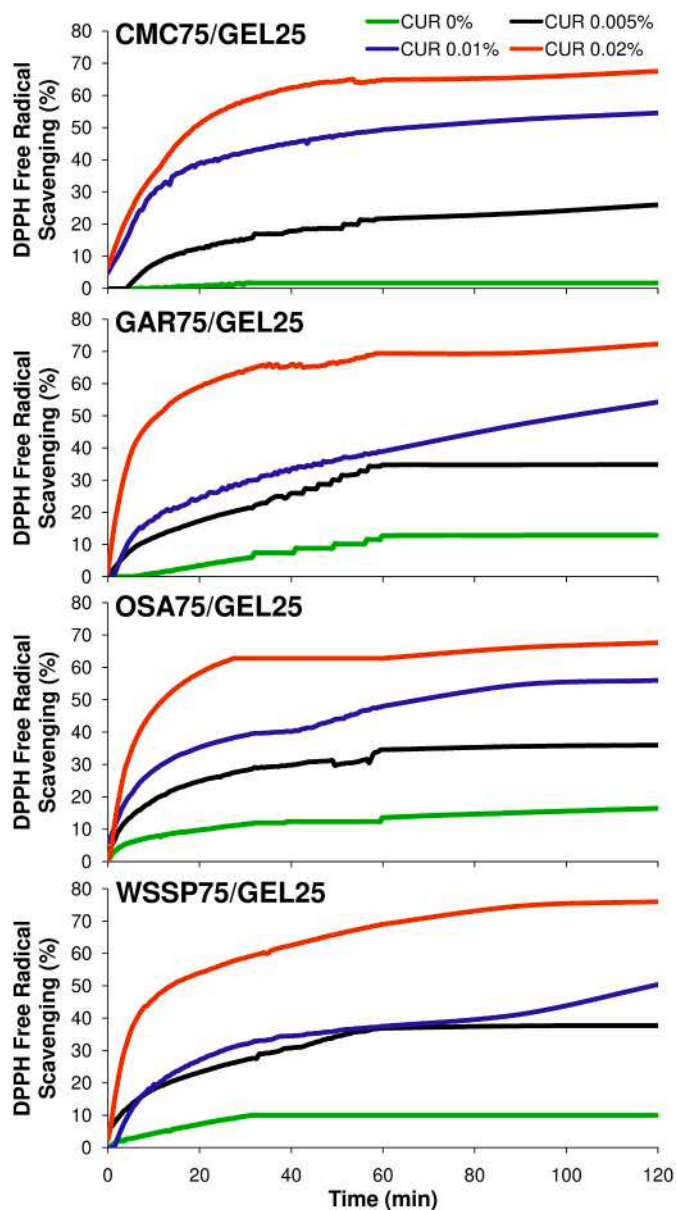


Fig. 10. Kinetics of the antiradical activity (against DPPH^{*}) of 75/25 blend films obtained from polysaccharides (carboxymethyl cellulose (CMC), gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride modified starch (OSA), water-soluble soy polysaccharides (WSSP)) and gelatin (GEL), incorporated with increasing amounts of curcumin (CUR).

that the selection of the biopolymeric carrier is a simple and efficient way for manipulating the rate of release of the active compound. Nevertheless, it should be noted that all the proposed carriers released CUR via the same quasi-Fickian diffusion-controlled mechanism. Consequently, the initial release proceeded at an increased rate followed by a plateau at a reduced rate. Such a migration profile can be beneficial, as the release process can start immediately after contact of the packaging with the food. However, it should be mentioned that the release of the active compound to real foods is much slower than to liquid acceptor. Therefore, the presented kinetic models are not reliable in the prediction of the migration of CUR into real-food products, as these are much more complex [112]. Nevertheless, where it is recommended to retain CUR in packaging over a longer period, e.g. because of the unfavorable interaction of CUR with food, the OSA-containing film may be the most useful material. The disadvantage of this system, however, was its susceptibility to color changes, suggesting weak stability of CUR.

Moreover, its weak mechanical resistance and stretchable character should also be taken into account in the practical application.

Contrary to expectations, the GEL-rich microspheres of the phase-separated CMC75/GEL25 carrier did not contribute to delayed release of CUR (no lag period). This was related to the bulk-erodible character of this carrier driven by the highly soluble character of CMC. The encapsulation, however, had a presumably protective effect on CUR, as indirectly proved by the high color stability of this system.

Abbreviations

ΔE	total color difference
ABTS	2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
ATR-FTIR	attenuated total reflection Fourier transform infrared
B-L	Baker-Lonsdale model
CMC	carboxymethyl cellulose
cryo-SEM	cryogenic scanning electron microscopy
CUR	curcumin
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DSC	differential scanning calorimetry
E	elongation at break
FFS	film-forming solution
EM	elastic modulus
F-O _{Fmax}	First order with F _{max} model
GEL	gelatin
GAR	gum Arabic
GRAS	Generally Recognized as Safe
ISO	International Organization for Standardization
K-P	Korsmeyer–Peppas model
K-P _{F0}	Korsmeyer–Peppas with F ₀ model
MC	moisture content
RH	relative humidity
Op	opacity
OSA	octenyl succinic anhydride starch
PS	puncture strength
R _a ² _{adjusted}	adjusted coefficient of determination
SEM	scanning electron microscopy
So	solubility
Sw	swelling
Tg	glass transition temperature
Tm	melting temperature
TS	tensile strength
WAXD	wide-angle X-ray diffraction
Wb ₁	Weibull ₁ model
Wb ₄	Weibull with F _{max} model
WSSP	water-soluble soy polysaccharides
WVP	water vapor permeability
WVTR	water vapor transmission rate

CRedit authorship contribution statement

Katarzyna Łupina: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing - Original draft preparation, Visualization, Project administration, Funding acquisition.

Dariusz Kowalczyk: Conceptualization, Methodology, Writing - review & editing, Supervision,

Magdalena Lis: Investigation.

Monika Basiura-Cembala: Investigation.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work was financially supported by the National Science Centre (Poland) under grant number 2019/35/N/NZ9/01795.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123945>.

References

- [1] L. Kuai, F. Liu, B. Sen Chiou, R.J. Avena-Bustillos, T.H. McHugh, F. Zhong, Controlled release of antioxidants from active food packaging: a review, *Food Hydrocoll.* 120 (2021), 106992, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106992>.
- [2] A. Sanches-Silva, D. Costa, T.G. Albuquerque, G.G. Buonocore, F. Ramos, M. C. Castilho, A.V. Machado, H.S. Costa, Trends in the use of natural antioxidants in active food packaging: a review, *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 31 (2014) 374–395, <https://doi.org/10.1080/19440049.2013.879215>.
- [3] S. Surma, A. Sahebkar, J. Urbański, P.E. Penson, M. Banach, Curcumin - the nutraceutical with pleiotropic effects? Which cardiometabolic subjects might benefit the most? *Front. Nutr.* 9 (2022), 865497 <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.865497>.
- [4] E. Horosanskaia, L. Yuan, A. Seidel-morgenstern, H. Lorenz, Purification of curcumin from ternary extract-similar mixtures of curcuminoids in a single crystallization step, *Crystals* 10 (2020) 206, <https://doi.org/10.3390/cryst10030206>.
- [5] Sigma Aldrich, Product Specification Curcumin - from *Curcuma longa* (Turmeric), PRD.2.ZQ5.10000011852.
- [6] J. Kuźmińska, A. Sobczak, M. Wierzychowski, T. Gośliński, History and chemistry of curcumin, *Farm. Współczesna.* 14 (2021) 140–145, <https://doi.org/10.53139/FW.20211417>.
- [7] S. Przybylska, Curcumin – health-promoting pigment of turmeric, *Probl. Hig. i Epidemiol.* 96 (2015) 414–420.
- [8] M.U. Akbar, K. Rehman, K.M. Zia, M.I. Qadir, M.S.H. Akash, M. Ibrahim, Critical review on curcumin as a therapeutic agent: from traditional herbal medicine to an ideal therapeutic agent, *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 28 (2018) 17–24, <https://doi.org/10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2018020088>.
- [9] Efsa, Scientific opinion on the re-evaluation of curcumin (E 100) as a food additive, *Efsa J.* 8 (2010) 1679, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1649>.
- [10] M. Sökmen, M. Akram Khan, The antioxidant activity of some curcuminoids and chalcones, *Inflammopharmacology* 24 (2016) 81–86, <https://doi.org/10.1007/s10787-016-0264-5>.
- [11] Y.S. Fu, T.H. Chen, L. Weng, L. Huang, D. Lai, C.F. Weng, Pharmacological properties and underlying mechanisms of curcumin and prospects in medicinal potential, *Biomed. Pharmacother.* 141 (2021), 111888, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111888>.
- [12] A.L. Lopresti, The problem of curcumin and its bioavailability: could its gastrointestinal influence contribute to its overall health-enhancing effects? *Adv. Nutr.* 9 (2018) 41–50, <https://doi.org/10.1093/advances/nmx011>.
- [13] M.E. Abd El-Hack, M.T. El-Saadony, A.A. Swelum, M. Arif, M.M. Abo Ghanima, M. Shukry, A. Noreldin, A.E. Taha, K.A. El-Tarabily, Curcumin, the active substance of turmeric: its effects on health and ways to improve its bioavailability, *J. Sci. Food Agric.* 101 (2021) 5747–5762, <https://doi.org/10.1002/jsfa.11372>.
- [14] J.G. de Oliveira Filho, M.R.V. Bertolo, M.Á.V. Rodrigues, C.A. Marangon, G.da C. Silva, F.C.A. Odoni, M.B. Egea, Curcumin: a multifunctional molecule for the development of smart and active biodegradable polymer-based films, *Trends Food Sci. Technol.* 118 (2021) 840–849, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.11.005>.
- [15] P. Chivero, S. Gohtani, H. Yoshii, A. Nakamura, Assessment of soy soluble polysaccharide, gum arabic and OSA-starch as emulsifiers for mayonnaise-like emulsions, *LWT - Food Sci. Technol.* 69 (2016) 59–66, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.064>.
- [16] C. Arancibia, R. Navarro-Lisboa, R.N. Zúñiga, S. Matiacevich, Application of CMC as thickener on nanoemulsions based on olive oil: physical properties and stability, *Int. J. Polym. Sci.* 2016 (2016), 8730573, <https://doi.org/10.1155/2016/6280581>.
- [17] K. Łupina, D. Kowalczyk, E. Zięba, W. Kazmierczak, M. Mężyńska, M. Basiura-Cembala, A.E. Wiącek, Edible films made from blends of gelatin and polysaccharide-based emulsifiers - a comparative study, *Food Hydrocoll.* 96 (2019) 555–567, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.05.053>.
- [18] E. Dickinson, Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers, *Food Hydrocoll.* 23 (2009) 1473–1482, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.08.005>.
- [19] D. Kowalczyk, B. Baraniak, Effect of candelilla wax on functional properties of biopolymer emulsion films - a comparative study, *Food Hydrocoll.* 41 (2014) 195–209, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.04.004>.
- [20] S. Agriopoulou, Active packaging for food applications, *EC Nutr.* 6 (2) (2016) 86–87.

- [21] M. Uz, S.A. Altinkaya, Development of mono and multilayer antimicrobial food packaging materials for controlled release of potassium sorbate, *LWT - Food Sci. Technol.* 44 (2011) 2302–2309, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.05.003>.
- [22] K. Lupina, D. Kowalczyk, E. Drozowska, Polysaccharide/gelatin blend films as carriers of ascorbyl palmitate – a comparative study, *Food Chem.* 333 (2020), 127465, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127465>.
- [23] K. Lupina, D. Kowalczyk, M. Lis, A. Raszowska-Kaczor, E. Drozowska, Controlled release of water-soluble astaxanthin from carboxymethyl cellulose/gelatin and octenyl succinic anhydride starch/gelatin blend films, *Food Hydrocoll.* 123 (2021), 107179, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107179>.
- [24] K. Lupina, D. Kowalczyk, W. Kazmierczak, Gum Arabic/gelatin and water-soluble soy polysaccharides/gelatin blend films as carriers of astaxanthin—a comparative study of the kinetics of release and antioxidant properties, *Polymers* 13 (2021) 1062, <https://doi.org/10.3390/polym13071062>.
- [25] D. Kowalczyk, M. Pytko, U. Szymanowska, T. Skrzypek, K. Lupina, M. Biendl, Release kinetics and antibacterial activity of potassium salts of iso- α -acids loaded into the films based on gelatin, carboxymethyl cellulose and their blends, *Food Hydrocoll.* 109 (2020), 106104, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106104>.
- [26] D. Kowalczyk, U. Szymanowska, T. Skrzypek, A. Bartkowiak, M. Materska, K. Lupina, Release of fireweed extract (*Epilobium angustifolium* L.) from corn starch- and methylcellulose-based films - a comparative study, *Food Hydrocoll.* 120 (2021), 106887, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106887>.
- [27] F. Xue, Y. Gu, Y. Wang, C. Li, B. Adhikari, Encapsulation of essential oil in emulsion based edible films prepared by soy protein isolate-gum acacia conjugates, *Food Hydrocoll.* 96 (2019) 178–189, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.05.014>.
- [28] A.I. Bourbon, M.J. Costa, L.C. Maciel, L. Pastrana, A.A. Vicente, M.A. Cerqueira, Active carboxymethylcellulose-based edible films: influence of free and encapsulated curcumin on films' properties, *Food* 10 (2021) 1512, <https://doi.org/10.3390/foods10071512>.
- [29] D. Kowalczyk, M. Kordowska-Wiater, M. Karaś, E. Zięba, M. Meżyńska, A. E. Wiącek, Release kinetics and antimicrobial properties of the potassium sorbate-loaded edible films made from pullulan, gelatin and their blends, *Food Hydrocoll.* 101 (2020), 105539, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105539>.
- [30] D. Kowalczyk, M. Karaś, M. Kordowska-Wiater, T. Skrzypek, W. Kazmierczak, Inherently acidic films based on chitosan lactate-doped starches and pullulan as carries of nisin: a comparative study of controlled-release and antimicrobial properties, *Food Chem.* 404 (2023), 134760, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134760>.
- [31] ISO 287:2017, Paper and Board - Determination of Moisture Content of a Lot - Oven-drying Method, 2017.
- [32] ISO 2528:2017, Sheet Materials - Determination of Water Vapour Transmission Rate - Gravimetric (Dish) Method, 2017.
- [33] J.H. Han, J.D. Floros, Casting antimicrobial packaging films and measuring their physical properties and antimicrobial activity, *J. Plast. Film Sheeting* 13 (1997) 287–298, <https://doi.org/10.1177/875608799701300405>.
- [34] Y. Zhang, M. Huo, J. Zhou, A. Zou, W. Li, C. Yao, S. Xie, DDSolver: an add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles, *AAPS J.* 12 (2010) 263–271, <https://doi.org/10.1208/s12248-010-9185-1>.
- [35] Y. Zhao, N. Khalid, G. Shu, M.A. Neves, I. Kobayashi, M. Nakajima, Complex coacervates from gelatin and octenyl succinic anhydride modified kudzu starch: insights of formulation and characterization, *Food Hydrocoll.* 86 (2019) 70–77, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.01.040>.
- [36] D. Kowalczyk, U. Szymanowska, T. Skrzypek, M. Basiura-Cembala, K. Lupina, M. Biendl, Edible films based on gelatin, carboxymethyl cellulose, and their blends as carriers of potassium salts of iso- α -acids: structural, physicochemical and antioxidant properties, *Food Hydrocoll.* 115 (2021), 106574, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106574>.
- [37] S. Roy, J.W. Rhim, Carboxymethyl cellulose-based antioxidant and antimicrobial active packaging film incorporated with curcumin and zinc oxide, *Int. J. Biol. Macromol.* 148 (2020) 666–676, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.204>.
- [38] T. Yang, H. Yang, Y. Fan, B. Li, H. Hou, Interactions of quercetin, curcumin, epigallocatechin gallate and folic acid with gelatin, *Int. J. Biol. Macromol.* 118 (2018) 124–131, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.058>.
- [39] P. Taghnia, A. Abdolshahi, S. Sedaghati, B. Shokrollahi, Smart edible films based on mucilage of *Lallemantia iberica* seed incorporated with curcumin for freshness monitoring, *Food Sci. Nutr.* 9 (2021) 1222–1231, <https://doi.org/10.1002/fsn3.2114>.
- [40] K. Mangmee, W. Homthawornchoo, Antioxidant activity and physicochemical properties of rice starch-chitosan-based films containing green tea extract, *Food Appl. Biosci. J.* 4 (2016) 126–137.
- [41] T. Ranjith Kumar Reddy, H.J. Kim, Mechanical, optical, thermal, and barrier properties of poly (lactic acid)/curcumin composite films prepared using twin-screw extruder, *Food Biophys.* 14 (2019) 22–29, <https://doi.org/10.1007/s11483-018-9553-4>.
- [42] D. Kowalczyk, T. Skrzypek, M. Basiura-Cembala, K. Lupina, M. Meżyńska, The effect of potassium sorbate on the physicochemical properties of edible films based on pullulan, gelatin and their blends, *Food Hydrocoll.* 105 (2020), 105837, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105837>.
- [43] A. Gopinath, S.M.M. Reddy, B. Madhan, G. Shanmugam, J.R. Rao, Effect of aqueous ethanol on the triple helical structure of collagen, *Eur. Biophys. J.* 43 (2014) 643–652, <https://doi.org/10.1007/s00249-014-0994-5>.
- [44] J.L. Gornall, E.M. Terentjev, Helix-coil transition of gelatin: helical morphology and stability, *Soft Matter* 4 (2008) 544–549, <https://doi.org/10.1039/b713075a>.
- [45] Z. Li, Q. Lin, D.J. McClements, Y. Fu, H. Xie, T. Li, G. Chen, Curcumin-loaded core-shell biopolymer nanoparticles produced by the pH-driven method: physicochemical and release properties, *Food Chem.* 355 (2021), 129686, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129686>.
- [46] A. Etxabide, J.I. Maté, P.A. Kilmartin, Effect of curcumin, betanin and anthocyanin containing colourants addition on gelatin films properties for intelligent films development, *Food Hydrocoll.* 115 (2021), 106593, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106593>.
- [47] C. Qiao, X. Ma, X. Wang, J. Yao, Effect of water on the thermal transition in chitosan films, *Polym. Cryst.* 2 (2019) 1–7, <https://doi.org/10.1002/per2.10092>.
- [48] Y.-J. Kim, T. Hagiwara, K. Kawai, T. Suzuki, R. Takai, Kinetic process of enthalpy relaxation of glassy starch and effect of physical aging upon its water vapor permeability property, *Carbohydr. Polym.* 53 (2003) 289–296, [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00075-4](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00075-4).
- [49] F. Badii, C. Martinet, J.R. Mitchell, I.A. Farhat, Enthalpy and mechanical relaxation of glassy gelatin films, *Food Hydrocoll.* 20 (2006) 879–884, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.08.010>.
- [50] K. Chuaynukul, T. Prodpran, S. Benjakul, Preparation, thermal properties and characteristics of gelatin molding compound resin, *J. Chem. Environ. Sci.* 2 (2014) 1–9, <http://www.aelsindia.com/rjcesaugust2014/1.pdf>.
- [51] X.S. Sun, *Thermal and mechanical properties of soy proteins*, in: *Bio-based Polym. Composites*, Academic Press, Inc., 2005, pp. 292–326.
- [52] E.-Z.M. Ebeid, M.B. Zakaria, Temperature-modulated DSC (TMDSC) from introductory fundamentals to advanced applications, in: *Therm. Anal. Elsevier, 2021*, pp. 41–128.
- [53] H. Staroszczyk, J. Pielichowska, K. Sztuka, J. Stangret, I. Kołodziejka, Molecular and structural characteristics of cod gelatin films modified with EDC and TGase, *Food Chem.* 130 (2012) 335–343, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.047>.
- [54] O. Shulga, A. Chorna, S. Kobylinskiy, Differential scanning calorimetry research of biodegradable films for confectionery and bakery products, *Chem. Chem. Technol.* 11 (2017) 492–496, <https://doi.org/10.23939/chcht11.04.492>.
- [55] European Commission, Commission Regulation (EU) No 231/2012 of 9 March 2012 laying down specifications for food additives listed in Annexes II and III to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council, *Off. J. Eur. Union* 83 (2012) 1–286.
- [56] P.R.D. Weerasooriya, R. Nadhilah, F.A.T. Owolabi, R. Hashim, H.P.S. Abdul Khalil, Z.A. Syahariza, M.H. Hussin, S. Hiziroglu, M.K.M. Haafiz, Exploring the properties of hemicellulose based carboxymethyl cellulose film as a potential green packaging, *Curr. Res. Green Sustain. Chem.* 1–2 (2020) 20–28, <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2020.05.001>.
- [57] A. Djori, N. Moulai-Mostefa, Structural, physicochemical and thermal properties of OSA-modified waxy maize starch, *Kem. u Ind.* 71 (2022) 39–47, <https://doi.org/10.15255/kui.2021.005>.
- [58] J. Jamaludin, F. Adam, R.A. Rasid, Z. Hassan, Thermal studies on Arabic gum - carrageenan polysaccharides film, *Chem. Eng. Res. Bull.* 19 (2017) 80–86, <https://doi.org/10.3329/ceb.v19i0.33800>.
- [59] M.M. Goma, E. El Fadly, M.A. Salama, M. Abdin, Production of bio-composite films from gum Arabic and galangal extract to prolong the shelf life of *Agaricus bisporus*, *J. Polym. Environ.* 30 (2022) 4787–4799, <https://doi.org/10.1007/s10924-022-02551-w>.
- [60] M. Almazrouei, I. Adeyemi, I. Janajreh, Thermogravimetric assessment of the thermal degradation during combustion of crude and pure glycerol, *Biomass Convers. Biorefin.* 12 (2022) 4403–4417, <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02526-w>.
- [61] H. Xie, L. Ma, Y. Li, J. Fu, Z. Li, X. Yu, Q. Gao, Preparation and characterizations of curcumin protection and delivery system using linear dextrin, *Compounds* 2 (2022) 353–366, <https://doi.org/10.3390/compounds2040029>.
- [62] U. Hani, H.G. Shivakumar, A. Srivastava, N. Mohammed, S. Thirumaleswar, N.S. Kumar Varma, R. Vaghela, C.G. Shinde, M.P. Gowrav, Design and optimization of curcumin-HP β CD bioadhesive vaginal tablets by 23 factorial design: in vitro and in vivo evaluation, *J. Pharm. Innov.* 10 (2015) 21–35, <https://doi.org/10.1007/s12247-014-9203-4>.
- [63] B. Zebib, Z. Mouloungui, V. Noirot, Stabilization of curcumin by complexation with divalent cations in glycerol/water system, *Bioinorg. Chem. Appl.* 2010 (2010), 292760, <https://doi.org/10.1155/2010/292760>.
- [64] G.K. Athira, A.N. Jyothi, V.R. Vishnu, Water soluble octenyl succinylated cassava starch-curcumin nanoformulation with enhanced bioavailability and anticancer potential, *Starch - Stärke* 70 (2018) 1700178, <https://doi.org/10.1002/star.201700178>.
- [65] S. Liang, J. Du, Y. Hong, L. Cheng, Z. Gu, Z. Li, C. Li, Octenyl succinate anhydride debranched starch-based nanocarriers for curcumin with improved stability and antioxidant activity, *Food Hydrocoll.* 135 (2023), 108118, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108118>.
- [66] M. Michelin, A.M. Marques, L.M. Pastrana, J.A. Teixeira, M.A. Cerqueira, Carboxymethyl cellulose-based films: effect of organosolv lignin incorporation on physicochemical and antioxidant properties, *J. Food Eng.* 285 (2020), 110107, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110107>.
- [67] L. Viscione, *Fibre-enriched beverages*, in: J.A. Delcour, K. Poutanen (Eds.), *Fibre-Rich Wholegrain Foods Improv. Qual.*, Woodhead Publishing Limited, 2013, pp. 369–388, <https://doi.org/10.1533/9780857095787.4.369>.
- [68] H. Maeda, A. Nakamura, Soluble soybean polysaccharide, in: P.A. Williams, G. O. Phillips (Eds.), *Handb. Hydrocoll.*, Second Ed., Woodhead Publishing, 2009, pp. 693–709, <https://doi.org/10.1533/9781845695873.693>.

- [69] Y.S. Musso, P.R. Salgado, A.N. Mauri, Smart edible films based on gelatin and curcumin, *Food Hydrocoll.* 66 (2017) 8–15, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.11.007>.
- [70] S.K. Baek, K. Bin Song, Characterization of active biodegradable films based on proso millet starch and curcumin, *Starch - Stärke* 71 (2019) 1–26, <https://doi.org/10.1002/star.201800174>.
- [71] Y. Liu, Y. Cai, X. Jiang, J. Wu, X. Le, Molecular interactions, characterization and antimicrobial activity of curcumin-chitosan blend films, *Food Hydrocoll.* 52 (2016) 564–572, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.08.005>.
- [72] D. Salarbashi, M. Tafaghodi, M. Heydari-Majid, Fabrication of curcumin-loaded soluble soy bean polysaccharide/TiO₂ nanoparticles bio-nanocomposite for improved antimicrobial activity, *Nanomedicine J.* 7 (2020) 85–92, <https://doi.org/10.22038/nmj.2020.07.00002>.
- [73] L. Wang, J. Xue, Y. Zhang, Preparation and characterization of curcumin loaded caseinate/zein nanocomposite film using pH-driven method, *Ind. Crop. Prod.* 130 (2019) 71–80, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.072>.
- [74] T. Atloo, R. Mohammadhani, A. Mohammadi, K.A. Zaboli, S. Kaboli, H. Rahimi, H. Nosrati, H. Danafar, The bovine serum albumin coated copper oxide nanoparticle for curcumin delivery in biological environment: in-vitro drug release, *J. Polym. Environ.* 30 (2022) 3203–3208, <https://doi.org/10.1007/s10924-022-02401-9>.
- [75] R. Kaur, P. Khullar, A. Mahal, A. Gupta, N. Singh, G.K. Ahluwalia, M.S. Bakshi, Keto-enol tautomerism of temperature and pH sensitive hydrated curcumin nanoparticles: their role as nanoreactors and compatibility with blood cells, *J. Agric. Food Chem.* 66 (2018) 11974–11980, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03893>.
- [76] N. Petchana, N. Phoopiam, L. Thiraphattaraphun, Natural pH indicator from tapioca starch/curcumin film, in: *AIP Conf. Proc.*, 2020, pp. 1–6, <https://doi.org/10.1063/5.0023184>.
- [77] W. Mokrzycki, M. Tatol, Color difference Delta E - a survey, *Mach. Graph. Vis.* 20 (2011) 383–411.
- [78] K.Z. Sanidad, E. Sukantoh, H. Xiao, D.J. McClements, G. Zhang, Curcumin: recent advances in the development of strategies to improve oral bioavailability, *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 10 (2019) 597–617, <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121738>.
- [79] F.P. Chen, B.S. Li, C.H. Tang, Nanocomplexation of soy protein isolate with curcumin: influence of ultrasonic treatment, *Food Res. Int.* 75 (2015) 157–165, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.009>.
- [80] S. Peng, L. Zhou, Q. Cai, L. Zou, C. Liu, W. Liu, D.J. McClements, Utilization of biopolymers to stabilize curcumin nanoparticles prepared by the pH-shift method: caseinate, whey protein, soy protein and gum arabic, *Food Hydrocoll.* 107 (2020), 105963, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105963>.
- [81] Y. Li, J. Liu, S. Ma, M. Yang, H. Zhang, T. Zhang, Y. Yu, Z. Du, Co-assembly of egg white-derived peptides and protein-polysaccharide complexes for curcumin encapsulation: the enhancement of stability, redispersibility, and bioactivity, *Food Chem.* 394 (2022), 133496, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133496>.
- [82] K. Pan, Q. Zhong, S.J. Baek, Enhanced dispersibility and bioactivity of curcumin by encapsulation in casein nanocapsules, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 6036–6043, <https://doi.org/10.1021/jf400752a>.
- [83] H. Le-Tan, T. Fauster, K. Haas, H. Jaeger, Aqueous extraction of curcuminoids from Curcuma longa: effect of cell disintegration pre-treatment and extraction condition, *Food Bioprocess Technol.* 15 (2022) 1359–1373, <https://doi.org/10.1007/s11947-022-02820-5>.
- [84] S. Mondal, S. Ghosh, S.P. Moulik, Stability of curcumin in different solvent and solution media: UV-visible and steady-state fluorescence spectral study, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 158 (2016) 212–218, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.03.004>.
- [85] T. Heinze, O.A. El Seoud, A. Koschella, *Cellulose Derivatives Synthesis, Structure, and Properties*, 1st ed., Springer Cham, 2018 https://doi.org/10.1007/978-3-319-73168-1_3.
- [86] C.E. McNamee, Y. Sato, B. Wiege, I. Furikado, A. Marefati, T. Nylander, M. Kappl, M. Rayner, Rice starch particle interactions at air/aqueous interfaces-effect of particle hydrophobicity and solution ionic strength, *Front. Chem.* 6 (2018) 1–15, <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00139>.
- [87] S.P. Nie, C. Wang, S.W. Cui, Q. Wang, M.Y. Xie, G.O. Phillips, A further amendment to the classical core structure of gum arabic (*Acacia senegal*), *Food Hydrocoll.* 31 (2013) 42–48, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.09.014>.
- [88] C.A. Bello-Flores, M.C. Nuñez-Santiago, M.F.S. Martín-Gonzalez, J.N. BeMiller, L.A. Bello-Pérez, Preparation and characterization of octenylsuccinylated plantain starch, *Int. J. Biol. Macromol.* 70 (2014) 334–339, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.06.061>.
- [89] Å. Rindlav-Westling, M. Stading, A.M. Hermansson, P. Gatenholm, Structure, mechanical and barrier properties of amylose and amylopectin films, *Carbohydr. Polym.* 36 (1998) 217–224, [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(98\)00025-3](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(98)00025-3).
- [90] D. Lourdin, G. Della Valle, P. Colonna, Influence of amylose content on starch films and foams, *Carbohydr. Polym.* 27 (1995) 261–270, [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(95\)00071-2](https://doi.org/10.1016/0144-8617(95)00071-2).
- [91] Y.I. Matveev, V.Y. Grinberg, V.B. Tolstoguzov, The plasticizing effect of water on proteins, polysaccharides and their mixtures. Glassy state of biopolymers, food and seeds, *Food Hydrocoll.* 14 (2000) 425–437, [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(00\)0020-5](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(00)0020-5).
- [92] M. Leon-Bejarano, Y. Durmus, M. Ovando-Martínez, S. Simsek, Physical, barrier, mechanical, and biodegradability properties of modified starch films with nut by-products extracts, *Foods* 9 (2020) 1–17, <https://doi.org/10.3390/foods9020226>.
- [93] K. Rubini, E. Boanini, S. Parmeggiani, A. Bigi, Curcumin-functionalized gelatin films: antioxidant materials with modulated physico-chemical properties, *Polymers (Basel)* 13 (2021) 1824, <https://doi.org/10.3390/polym13111824>.
- [94] J. Liu, H. Wang, P. Wang, M. Guo, S. Jiang, X. Li, S. Jiang, Films based on κ-carrageenan incorporated with curcumin for freshness monitoring, *Food Hydrocoll.* 83 (2018) 134–142, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.05.012>.
- [95] L. Fan, S.K. Singh, Swelling-controlled release, in: L. Fan, S.K. Singh (Eds.), *Control. Release a Quant. Treat*, 1st ed., SpringerBerlin Heidelberg, New York, 1989, pp. 110–156.
- [96] J. Sen Lin, C.C. Hwang, J.Y. Hsieh, S.C. Lee, Swelling controlled release of drug from polymeric delivery devices: a local similarity solution, *J. Phys. Soc. Jpn.* 69 (2000) 1991–1998, <https://doi.org/10.1143/JPSJ.69.1991>.
- [97] F. Liu, R.J. Avena-Bustillos, B. Sen Chiou, Y. Li, Y. Ma, T.G. Williams, D.F. Wood, T.H. McHugh, F. Zhong, Controlled-release of tea polyphenol from gelatin films incorporated with different ratios of free/naoencapsulated tea polyphenols into fatty food simulants, *Food Hydrocoll.* 62 (2017) 212–221, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.004>.
- [98] Z. Hu, T. Feng, X. Zeng, S. Janaswamy, H. Wang, O. Campanella, Structural characterization and digestibility of curcumin loaded octenyl succinic nanoparticles, *Nanomaterials.* 9 (2019) 1073, <https://doi.org/10.3390/nano9081073>.
- [99] L. Zhao, Q. Tong, Y. Liu, Z. Geng, L. Yin, W. Xu, A. Rehman, Fabrication and characterization of octenyl succinic anhydride modified pullulan micelles for encapsulating curcumin, *J. Sci. Food Agric.* 102 (2022) 2874–2884, <https://doi.org/10.1002/jsfa.11628>.
- [100] C.R. Su, Y.Y. Huang, Q.H. Chen, M.F. Li, H. Wang, G.Y. Li, Y. Yuan, A novel complex coacervate formed by gliadin and sodium alginate: relationship to encapsulation and controlled release properties, *Lwt* 139 (2021), 110591, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110591>.
- [101] M. Mohammadian, M. Salami, F. Alavi, S. Momen, Z. Emam-Djomeh, A. A. Moosavi-Movahedi, Fabrication and characterization of curcumin-loaded complex coacervates made of gum arabic and whey protein nanofibrils, *Food Biophys.* 14 (2019) 425–436, <https://doi.org/10.1007/s11483-019-09591-1>.
- [102] N.A. Peppas, *Analysis of fickian and non-fickian drug release from polymers, Pharm. Acta Helv.* 60 (1985) 110–111.
- [103] K.S. Bhullar, A. Jha, D. Youssef, H.P.V. Rupasinghe, Curcumin and its carbocyclic analogs: structure-activity in relation to antioxidant and selected biological properties, *Molecules* 18 (2013) 5389–5404, <https://doi.org/10.3390/molecules18055389>.
- [104] Cayman Chemical, *Product Information DPPH*, 2022.
- [105] A. Cano, M. Acosta, M.B. Arnao, A method to measure antioxidant activity in organic media: application to lipophilic vitamins, *Redox Rep.* 5 (2000) 365–370, <https://doi.org/10.1179/135100000101535933>.
- [106] A.A.M. Elnour, M.E.S. Mirghani, N.A. Kabbashi, K. Hamid Musa, F. Shahabipour, N. Ashammakhi, N. Hamid Abdurahman, Comparative study of the characterisation and extraction techniques of polyphenolic compounds from *Acacia seyal* gum, *Food Qual. Saf.* 6 (2022) 1–10, <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyab034>.
- [107] M.E.S. Mirghani, A.A.M. Elnour, N.A. Kabbashi, M.Z. Alam, K.H. Musa, A. Abdullah, Determination of antioxidant activity of gum arabic: an exudation from two different locations, *ScienceAsia* 44 (2018) 179–186, <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2018.44.179>.
- [108] Y.Y. Lin, S.H. Lu, R. Gao, C.H. Kuo, W.H. Chung, W.C. Lien, C.C. Wu, Y. Diao, H. M.D. Wang, A novel biocompatible herbal extract-loaded hydrogel for acne treatment and repair, *Oxidative Med. Cell. Longev.* 5598291 (2021), <https://doi.org/10.1155/2021/5598291>.
- [109] D.L. Belan, F.P. Flores, L.E. Mopera, Optimization of antioxidant capacity and tensile strength of gelatin-carboxymethylcellulose film incorporated with bignay (*Antidesma bunius* (L.) Spreng.) crude phenolic extract, in: *AIP Conf. Proc.*, 2018, p. 020184, <https://doi.org/10.1063/1.5066825>.
- [110] J.-H. Li, J. Miao, J.-L. Wu, S.-F. Chen, Q.-Q. Zhang, Preparation and characterization of active gelatin-based films incorporated with natural antioxidants, *Food Hydrocoll.* 37 (2014) 166–173, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.015>.
- [111] J. Villasante, A. Martín-Lujano, M.P. Almajano, Characterization and application of gelatin films with pecan walnut and shell extract (*Carya illinoensis*), *Polymers (Basel)* 12 (2020) 1424, <https://doi.org/10.3390/polym12061424>.
- [112] C. Vasilie, M. Baican, Progresses in food packaging, food quality, and safety-controlled-release antioxidant and/or antimicrobial packaging, *Molecules* 26 (2021) 1263, <https://doi.org/10.3390/molecules26051263>.

Table S1. Mathematical models used to describe the dissolution curves [34].

Model	Equation	Parameters
First-order (F-O)	$F = 100 \cdot (1 - e^{-k_1 \cdot t})$	k_1
Baker-Lonsdale (B-L)	$\frac{3}{2} \left[1 - \left(1 - \frac{F}{100} \right)^{2/3} \right] - \frac{F}{100} = k_{BL} \cdot t$	k_{BL}
First order with F_{max} (F-OF _{max})	$F = F_{max} \cdot (1 - e^{-k_1 \cdot t})$	k_1, F_{max}
Gompertz_1(Go)	$F = 100 \cdot e^{-a} \cdot e^{-\beta \cdot \log(t)}$	α, β
Weibull_1 (Wb_1)	$F = 100 \cdot \left[1 - e^{-\frac{(t-Ti)^\beta}{\alpha}} \right]$	α, β, Ti
Korsmeyer–Peppas with F_0 (K-P _{F0})	$F = F_0 + k_{KP} \cdot t^n$	k_{KP}, n, F_0
Makoid-Banakar(M-B)	$F = k_{MB} \cdot t^n \cdot e^{-k \cdot t}$	$k_{MB}, n, k,$
Weibull_4 (Wb_4)	$F = F_{max} \cdot \left[1 - e^{-\frac{(t-Ti)^\beta}{\alpha}} \right]$	$\alpha, \beta, Ti, F_{max}$

F is the fraction (%) of drug released in time t

k_1 is the first-order release constant

k_{BL} is the combined constant in Baker–Lonsdale model, $k_{BL} = [3 \times D \times C_s / (r_0^2 \times C_0)]$, where D is the diffusion coefficient, C_s is the saturation solubility, r_0 is the initial radius for a sphere or cylinder or the half-thickness for a slab, and C_0 is the initial drug loading in the matrix

F_{max} is the maximum fraction of the drug released at infinite time

α is the scale factor in Gompertz 1 and 2 models; β is the shape factor in Gompertz 1 and 2 models

α is the scale parameter which defines the time scale of the process; β is the shape parameter which characterizes the curve as either exponential ($\beta=1$; case 1), sigmoid, S-shaped, with upward curvature followed by a turning point ($\beta>1$; case 2), or parabolic, with a higher initial slope and after that consistent with the exponential ($\beta<1$; case 3)

Ti is the location parameter which represents the lag time before the onset of the dissolution or release process and in most cases will be near zero

k_{KP} is the release constant incorporating structural and geometric characteristics of the drug-dosage form; n is the diffusional exponent indicating the drug-release mechanism

F_0 is the initial fraction of the drug in the solution resulting from a burst release

$k_{MB}, n,$ and k are empirical parameters in Makoid–Banakar model ($k_{MB}, n, k>0$)

Table S2. Comparison of R^2_{adjusted} values obtained from fitting experimental data to the different release models.

Films	CUR (%)	I		II		III		IV	
		F-O	B-L	F-O _{Fmax}	Go	Wb_1	K-P _{F0}	M-B	Wb_4
CMC75/GEL25	0.005	0.991	0.948	0.991	0.981	0.994	0.951	0.987	0.995
	0.01	0.968	0.940	0.993	0.991	0.989	0.900	0.992	0.997
	0.02	0.803	0.866	0.989	0.973	0.955	0.841	0.980	0.995
GAR75/GEL25	0.005	0.488	0.914	0.980	0.986	0.992	0.937	0.977	0.996
	0.01	0.294	0.803	0.982	0.987	0.976	0.917	0.981	0.997
	0.02	0.529	0.799	0.987	0.991	0.975	0.903	0.978	0.996
OSA75/GEL25	0.005	-1.449	0.132	0.978	0.796	0.919	0.732	0.930	0.990
	0.01	-0.112	0.730	0.934	0.977	0.982	0.937	0.963	0.986
	0.02	-0.627	0.429	0.993	0.920	0.961	0.839	0.951	0.997
WSSP75/GEL25	0.005	0.561	0.878	0.980	0.958	0.986	0.878	0.965	0.998
	0.01	0.434	0.846	0.996	0.971	0.974	0.887	0.981	0.999
	0.02	0.621	0.847	0.992	0.980	0.973	0.867	0.970	0.998
Average R^2_{adjusted}		0.262	0.750	0.983	0.959	0.973	0.8825	0.971	0.995*

CMC75/GEL25 **GAR75/GEL25** **OSA75/GEL25** **WSSP75/GEL25**
CUR 0% **CUR 0%** **CUR 0%** **CUR 0%**

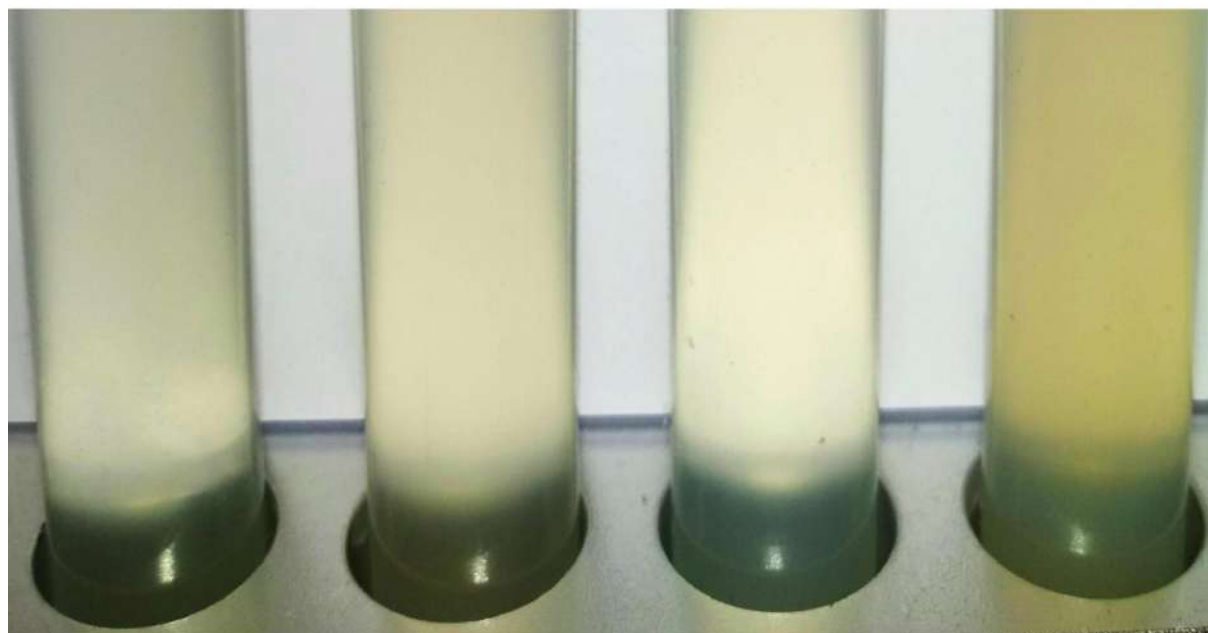


Fig. S1. The appearance of the curcumin-free film-forming solutions based on 75/25 blends of polysaccharides (carboxymethyl cellulose (CMC), gum Arabic (GAR), octenyl succinic anhydride starch (OSA), water-soluble soy polysaccharides (WSSP)) and gelatin (GEL).

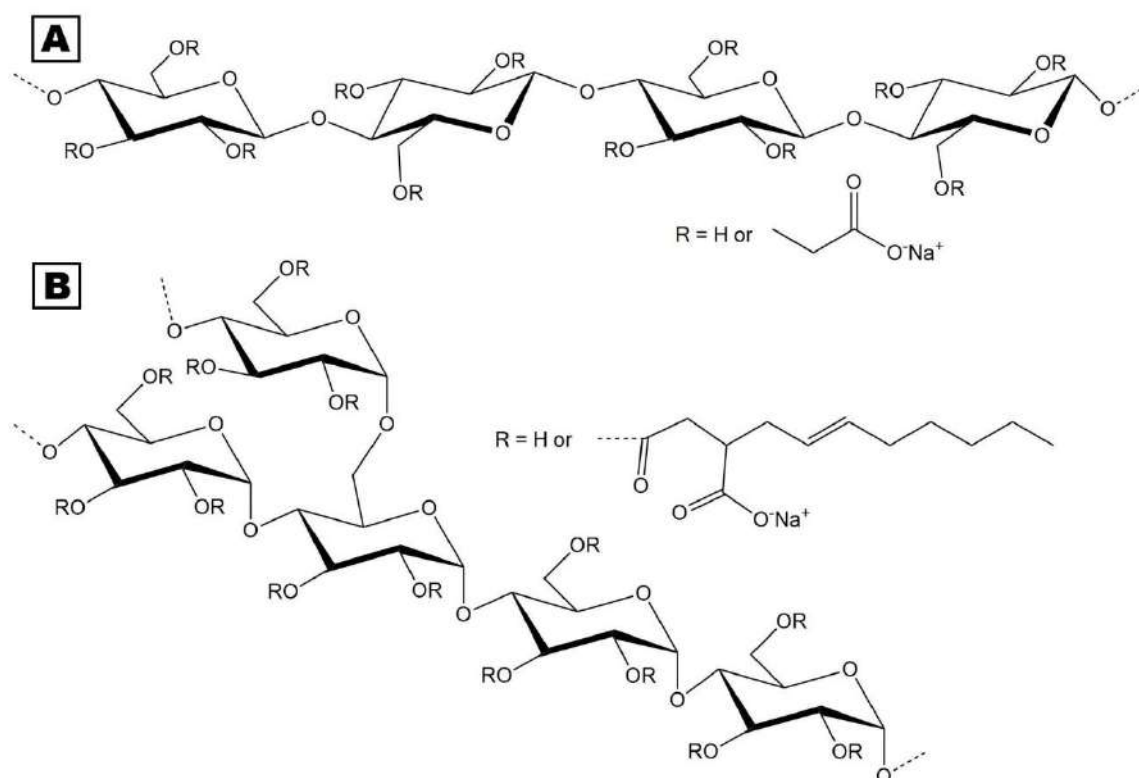


Fig. S2. Structure of sodium carboxymethyl cellulose (A) [85] and waxy starch sodium octenyl succinate (consisting almost exclusively of amylopectin) (B) [86].

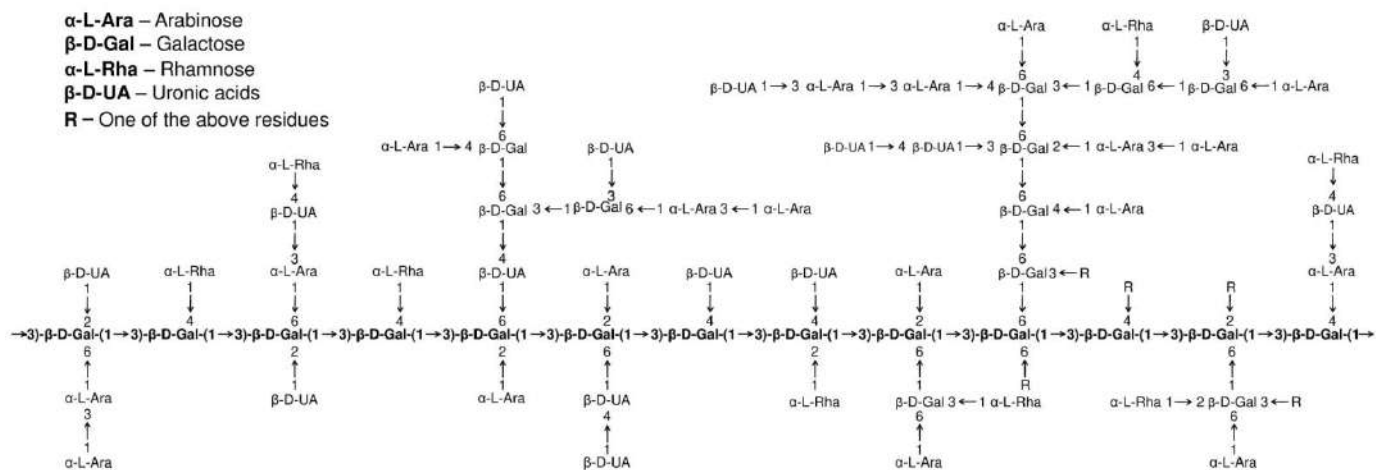


Fig. S3. Structure of gum Arabic [87].

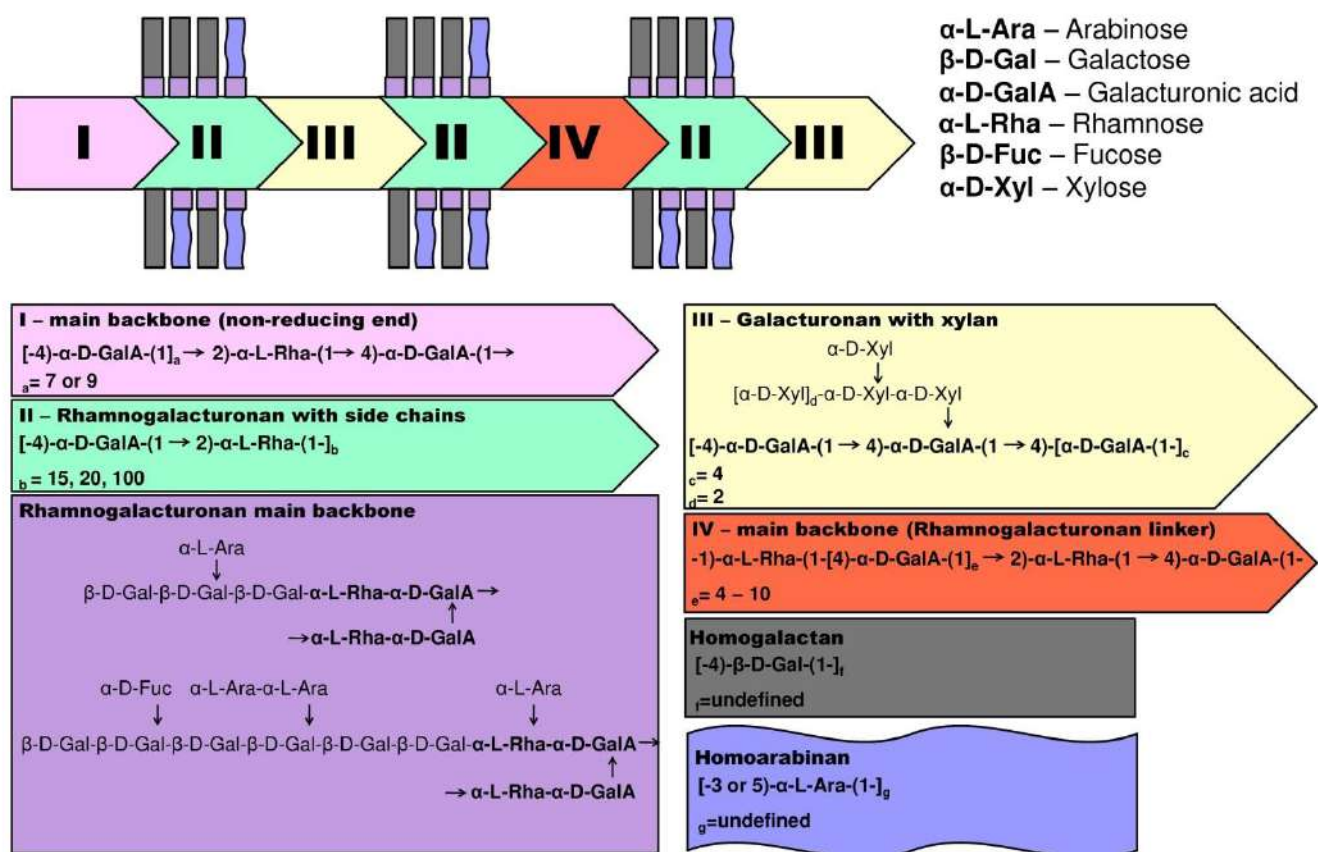


Fig. S4. Schematic representation of the structure of water soluble soy polysaccharides [68].

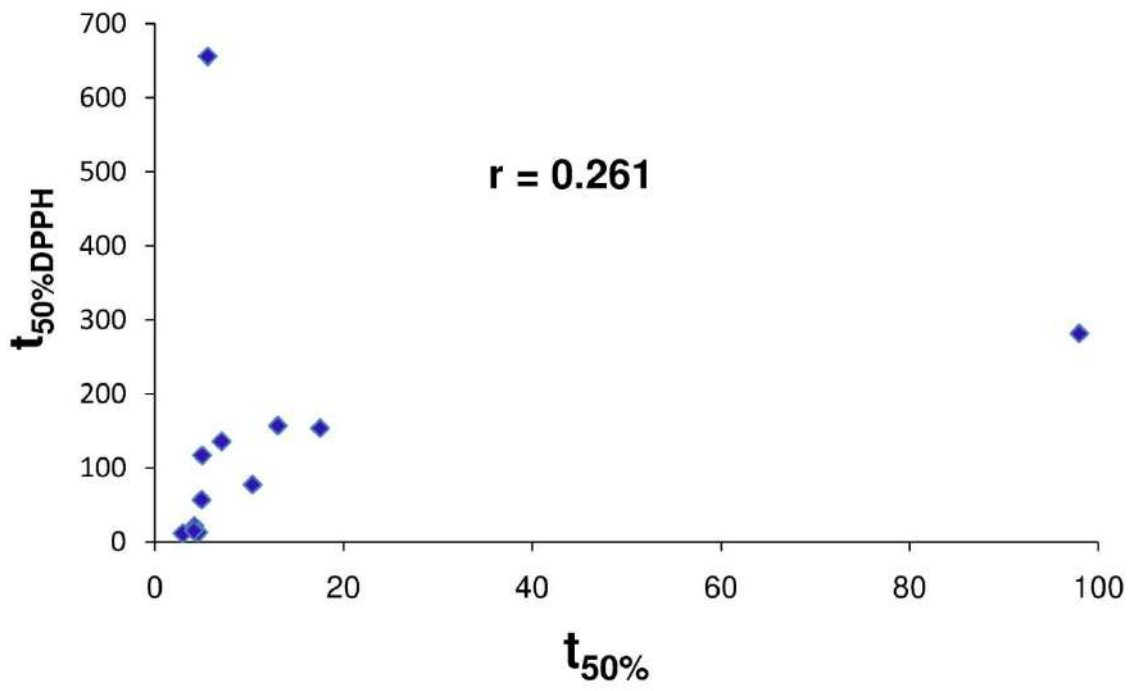


Fig. S5. Correlation (R^2) between the curcumin half-release times ($t_{50\%}$) and the time values needed to reduce the DPPH* concentration by 50% ($t_{50\%}\text{DPPH}$).

11. Oświadczenia

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

mgr Katarzyna Łupina

Lublin, 05.06.2023 r.

Katedra Biochemii i Chemii Żywności

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój udział w pracy: **Łupina K., Kowalczyk D., Zięba E., Kazimierczak W., Mężyńska M., Basiura-Cembala M., Wićcek A. E. (2019). Edible films made from blends of gelatin and polysaccharide-based emulsifiers - A comparative study. Food Hydrocolloids, 96, 555–567**, wynosił **50%** i polegał na współpracowaniu koncepcji i metodologii badań; wykonaniu analiz laboratoryjnych (otrzymanie materiału badawczego, tj. roztworów foliotwórczych i folii, badanie właściwości optycznych, mechanicznych oraz powinowactwa do wody); opracowaniu, wizualizacji i współinterpretacji wyników; wykonaniu analiz statystycznych; współprzygotowaniu manuskryptu; współprzygotowaniu odpowiedzi na recenzję.

Oświadczam, że mój udział w pracy: **Łupina K., Kowalczyk D., Drozłowska E. (2020). Polysaccharide/gelatin blend films as carriers of ascorbyl palmitate – A comparative study. Food Chemistry, 333, 127465**, wynosił **70%** i polegał na współpracowaniu koncepcji i metodologii badań; wykonaniu analiz laboratoryjnych (otrzymanie materiału badawczego, tj. roztworów foliotwórczych i folii, wykonanie obserwacji mikroskopowych w świetle przechodzącym, badanie właściwości optycznych, mechanicznych, przeciwutleniających oraz powinowactwa do wody, oznaczenie kinetyki uwalniania substancji aktywnej, modelowanie matematyczne kinetyki uwalniania); opracowaniu, wizualizacji i współinterpretacji wyników; wykonaniu analiz statystycznych, współprzygotowaniu manuskryptu; współprzygotowaniu odpowiedzi na recenzję.

Oświadczam, że mój udział w pracy: **Łupina K., Kowalczyk D., Kazimierczak W. (2021). Gum Arabic/gelatin and water-soluble soy polysaccharides/gelatin blend films as carriers of astaxanthin—A comparative study of the kinetics of release and antioxidant properties. Polymers, 13(7), 1062**, wynosił **70%** i polegał na współpracowaniu koncepcji i metodologii badań; wykonaniu analiz laboratoryjnych (otrzymanie materiału

badawczego, tj. roztworów foliotwórczych i folii, wykonanie obserwacji mikroskopowych w świetle przechodzącym, badanie właściwości przeciwutleniających oraz powinowactwa do wody, oznaczenie kinetyki uwalniania substancji aktywnej); opracowaniu, wizualizacji i współinterpretacji wyników; wykonaniu analiz statystycznych; współprzygotowaniu manuskryptu; współprzygotowaniu odpowiedzi na recenzję.

Oświadczam, że mój udział w pracy: **Lupina K., Kowalczyk D., Lis M., Raszkowska-Kaczor A., Drozłowska E. (2022). Controlled release of water-soluble astaxanthin from carboxymethyl cellulose/gelatin and octenyl succinic anhydride starch/gelatin blend films. Food Hydrocolloids, 123, 107179**, wynosił **60%** i polegał na na współpracowaniu koncepcji i metodologii badań; wykonaniu analiz laboratoryjnych (otrzymanie materiału badawczego, tj. roztworów foliotwórczych i folii, wykonanie obserwacji mikroskopowych w świetle przechodzącym, badanie właściwości optycznych, mechanicznych, przeciwutleniających oraz powinowactwa do wody, oznaczenie kinetyki uwalniania substancji aktywnej, modelowanie matematyczne kinetyki uwalniania); opracowaniu, wizualizacji i współinterpretacji wyników; wykonaniu obliczeń statystycznych, współprzygotowaniu manuskryptu, współprzygotowaniu odpowiedzi na recenzję.

Oświadczam, że mój udział w pracy: **Lupina K., Kowalczyk D., Kazimierzak W. (2022). Functional properties and storage stability of astaxanthin-loaded polysaccharide/gelatin blend films—A comparative study. Polymers, 14(19), 4001**, wynosił **70%** i polegał na współpracowaniu koncepcji i metodologii badań; wykonaniu analiz laboratoryjnych (otrzymanie materiału badawczego, tj. roztworów foliotwórczych i folii, wykonanie obserwacji mikroskopowych w świetle przechodzącym, badanie właściwości optycznych, mechanicznych, przeciwutleniających, przeprowadzenie testów przechowalniczych); opracowaniu, wizualizacji i współinterpretacji wyników; wykonaniu obliczeń statystycznych, współprzygotowaniu manuskryptu, przygotowaniu odpowiedzi na recenzję.

Oświadczam, że mój udział w pracy: **Lupina K., Kowalczyk D., Lis M., Basiura-Cembala M. (2023). Antioxidant polysaccharide/gelatin blend films loaded with curcumin — A comparative study. International Journal of Biological Macromolecules, 236, 123945**, wynosił **65%** i polegał na udziale w: na współpracowaniu koncepcji i metodologii badań; wykonaniu analiz laboratoryjnych (otrzymanie materiału badawczego, tj. roztworów foliotwórczych i folii, wykonanie obserwacji mikroskopowych w świetle przechodzącym, badanie właściwości optycznych, mechanicznych, przeciwutleniających oraz

powinowactwa do płynu akceptorowego, przeprowadzenie testów przechowalniczych, oznaczenie kinetyki uwalniania substancji aktywnej, modelowanie matematyczne kinetyki uwalniania); opracowaniu, wizualizacji i współinterpretacji wyników; wykonaniu analiz statystycznych; współprzygotowaniu manuskryptu; **pełnieniu roli autora korespondencyjnego**; współprzygotowaniu odpowiedzi na recenzję.

Katarzyna Łupina

mgr Katarzyna Łupina

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

dr hab. inż. Dariusz Kowalczyk, prof. uczelni

Lublin, 05.06.2023 r.

Katedra Biochemii i Chemii Żywności

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój udział w pracy: **Lupina K., Kowalczyk D., Zięba E., Kazimierczak W., Mężyńska M., Basiura-Cembala M., Wiącek A. E. (2019). Edible films made from blends of gelatin and polysaccharide-based emulsifiers - A comparative study. Food Hydrocolloids, 96, 555–567**, wynosił **25%** i polegał na współpracowaniu koncepcji i metodologii badań; wykonaniu analiz laboratoryjnych (oznaczenie pH i zawartości wody), współinterpretacji wyników, współprzygotowaniu manuskryptu, współprzygotowaniu odpowiedzi na recenzję oraz pełnieniu roli autora korespondencyjnego.

Oświadczam, że mój udział w pracy: **Lupina K., Kowalczyk D., Drozłowska E. (2020). Polysaccharide/gelatin blend films as carriers of ascorbyl palmitate – A comparative study. Food Chemistry, 333, 127465**, wynosił **25%** i polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji badań i metodologii; współinterpretacji wyników, współprzygotowaniu manuskryptu, współprzygotowaniu odpowiedzi na recenzję oraz pełnieniu roli autora korespondencyjnego.

Oświadczam, że mój udział w pracy: **Lupina K., Kowalczyk D., Kazimierczak W. (2021). Gum Arabic/gelatin and water-soluble soy polysaccharides/gelatin blend films as carriers of astaxanthin—A comparative study of the kinetics of release and antioxidant properties. Polymers, 13(7), 1062.**, wynosił **25%** i polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji badań i metodologii; wykonaniu analiz (modelowanie matematyczne kinetyki uwalniania), współinterpretacji wyników, współprzygotowaniu manuskryptu, przygotowaniu odpowiedzi na recenzję oraz pełnieniu roli autora korespondencyjnego.

Oświadczam, że mój udział w pracy: **Lupina K., Kowalczyk D., Lis M., Raszkowska-Kaczor A., Drozłowska E. (2022). Controlled release of water-soluble astaxanthin from carboxymethyl cellulose/gelatin and octenyl succinic anhydride starch/gelatin blend films.**



Food Hydrocolloids, 123, 107179, wynosił **25%** i polegał na współdziale w opracowaniu koncepcji badań i metodologii; współinterpretacji wyników, współprzygotowaniu manuskryptu, współprzygotowaniu odpowiedzi na recenzję oraz pełnieniu roli autora korespondencyjnego.

Oświadczam, że mój udział w pracy: **Łupina K., Kowalczyk D., Kazimierzczak W.** (2022). *Functional properties and storage stability of astaxanthin-loaded polysaccharide/gelatin blend films—A comparative study*. *Polymers*, 14(19), 4001., wynosił **25%** i polegał na współdziale w opracowaniu koncepcji badań i metodologii, współinterpretacji wyników, współprzygotowaniu manuskryptu, pełnieniu roli autora korespondencyjnego.

Oświadczam, że mój udział w pracy: **Łupina K., Kowalczyk D., Lis M., Basiura-Cembala M.** (2023). *Antioxidant polysaccharide/gelatin blend films loaded with curcumin — A comparative study*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 236, 123945., wynosił **25%** i polegał na współdziale w opracowaniu koncepcji badań i metodologii, współinterpretacji wyników badań, współprzygotowaniu manuskryptu, współprzygotowaniu odpowiedzi na recenzję.



dr hab. inż. Dariusz Kowalczyk, prof. uczelni

mgr Emil Zięba

Lublin, 07.06.2023 r.

Katedra Biomedycyny i Badań Środowiskowych

Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

Oświadczam, że mój udział w pracy: *Lupina K., Kowalczyk D., Zięba E., Kazimierczak W., Mężyńska M., Basiura-Cembala M., Wiącek A. E. (2019). Edible films made from blends of gelatin and polysaccharide-based emulsifiers - A comparative study. Food Hydrocolloids, 96, 555–567*, wynosił **5%** i polegał na wykonaniu fotografii roztworów filmotwórczych (za pomocą kriogenicznego mikroskopu elektronowego) i folii (za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego) oraz współudziale w wizualizacji wyników badań mikroskopowych.

mgr Emil Zięba

(podpis czytelny)

dr Waldemar Kazimierzczak

Lublin, 07.06.2023 r.

Katedra Biomedycyny i Badań Środowiskowych

Instytut Nauk Biologicznych

Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

Oświadczam, że mój udział w pracy: *Lupina K., Kowalczyk D., Zięba E., Kazimierzczak W., Mężyńska M., Basiura-Cembala M., Wiącek A. E. (2019). Edible films made from blends of gelatin and polysaccharide-based emulsifiers - A comparative study. Food Hydrocolloids, 96, 555–567*, wynosił **5%** i polegał na wykonaniu fotografii folii za pomocą mikroskopu optycznego z wykorzystaniem kontrastu interferencyjno-różniczkowego oraz współudziale w wizualizacji wyników badań mikroskopowych.

Oświadczam, że mój udział w pracy: *Lupina K., Kowalczyk D., Kazimierzczak W. (2021). Gum Arabic/gelatin and water-soluble soy polysaccharides/gelatin blend films as carriers of astaxanthin - A comparative study of the kinetics of release and antioxidant properties. Polymers, 13(7), 1062*, wynosił **5%** i polegał na wykonaniu fotografii roztworów filmotwórczych (za pomocą kriogenicznego mikroskopu elektronowego i mikroskopu polaryzacyjnego) oraz współudziale w wizualizacji wyników badań mikroskopowych.

Oświadczam, że mój udział w pracy: *Lupina K., Kowalczyk D., Kazimierzczak W. (2022). Functional properties and storage stability of astaxanthin-loaded polysaccharide/gelatin blend films - A comparative study. Polymers, 14(19), 4001*, wynosił **5%** i polegał na wykonaniu mikrofotografii folii oraz współudziale w wizualizacji wyników badań mikroskopowych.


dr Waldemar Kazimierzczak

(podpis czytelny)

dr inż. Monika Mężyńska

Szczecin, 07.06.2023 r.

Centrum Bioimmobilizacji i Innowacyjnych Materiałów Opakowaniowych

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie (do 2020 r.)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że mój udział w pracy: *Lupina K., Kowalczyk D., Zięba E., Kazimierczak W., Mężyńska M., Basiura-Cembala M., Wiącek A. E. (2019). Edible films made from blends of gelatin and polysaccharide-based emulsifiers - A comparative study. Food Hydrocolloids, 96, 555–567*, wynosił 5% i polegał na wykonaniu badań folii za pomocą spektroskopii fourierowskiej w podczerwieni i wizualizacji uzyskanych wyników badań.

dr inż. Monika Mężyńska
Monika Mężyńska
(podpis czytelny)

dr Monika Basiura-Cembala

Bielsko-Biała, 07.06.2023 r.

Wydział Inżynierii Materiałowej, Budownictwa i Środowiska

Akademia Techniczno-Humanistyczna w Bielsku-Białej

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

Oświadczam, że mój udział w pracy: *Lupina K., Kowalczyk D., Zięba E., Kazimierzak W., Mężyńska M., Basiura-Cembala M., Wiącek A. E. (2019). Edible films made from blends of gelatin and polysaccharide-based emulsifiers - A comparative study. Food Hydrocolloids, 96, 555–567*, wynosił **5%** i polegał na analizie folii za pomocą szerokokątowej dyfraktometrii rentgenowskiej i wizualizacji uzyskanych wyników badań.

Oświadczam, że mój udział w pracy: *Lupina K., Kowalczyk D., Lis M., Basiura-Cembala M. (2023). Antioxidant polysaccharide/gelatin blend films loaded with curcumin — A comparative study. International Journal of Biological Macromolecules, 236, 123945*, wynosił **5%** i polegał na analizie folii za pomocą szerokokątowej dyfraktometrii rentgenowskiej oraz różnicowej kalorymetrii skaningowej i wizualizacji uzyskanych wyników badań.

dr Monika Basiura-Cembala

(podpis czytelny)

Monika Basiura-Cembala



UMCS

UNIwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Wydział Chemii

dr hab. Agnieszka Ewa Wiącek, prof. UMCS

Katedra Zjawisk Międzyfazowych

Instytut Nauk Chemicznych

Lublin, 07.06.2023

Oświadczenie współautora

W związku z rozpoczętym postępowaniem w przewodzie doktorskim mgr Katarzyny Łupiny oświadczam, że mój udział w pracy:

Łupina K., Kowalczyk D., Zięba E., Kazimierczak W., Mężyńska M., Basiura-Cembala M., Wiącek A. E. (2019). Edible films made from blends of gelatin and polysaccharide-based emulsifiers - A comparative study. Food Hydrocolloids, 96, 555–567, wynosił 5% i polegał na analizie układów filmotwórczych z wykorzystaniem techniki dynamicznego rozpraszania światła oraz mikroelektroforezy, a także wizualizacji uzyskanych wyników badań (m.in. wielkości cząstek, rozkładu wielkości cząstek, polidispersyjności oraz wartości potencjału zeta).

Agnieszka Ewa Wiącek



dr inż. Emilia Drozłowska

Szczecin, 07.06.2023 r.

Centrum Bioimmobilizacji i Innowacyjnych Materiałów Opakowaniowych

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

Oświadczam, że mój udział w pracy: *Lupina K., Kowalczyk D., Drozłowska E. (2020). Polysaccharide/gelatin blend films as carriers of ascorbyl palmitate – A comparative study. Food Chemistry, 333, 12746*, wynosił **5%** i polegał na wykonaniu pomiarów kąta zwilżania folii (w tym wizualizacji wyników pomiarów) oraz współredagowaniu rozdziału 3.2.

Oświadczam, że mój udział w pracy: *Lupina K., Kowalczyk D., Lis M., Raszkowska-Kaczor A., Drozłowska E. (2022). Controlled release of water-soluble astaxanthin from carboxymethyl cellulose/gelatin and octenyl succinic anhydride starch/gelatin blend films. Food Hydrocolloids, 123, 107179*, wynosił **5%** i polegał na wykonaniu pomiarów kąta zwilżania folii.

dr inż. Emilia Drozłowska

(podpis czytelny)



dr Magdalena Lis

Lublin, 07.06.2023 r.

Katedra Biomedycyny i Badań Środowiskowych

Instytut Nauk Biologicznych

Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Lublin

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

Oświadczam, że mój udział w pracy: *Lupina K., Kowalczyk D., Lis M., Raszkowska-Kaczor A., Drozłowska E. (2022). Controlled release of water-soluble astaxanthin from carboxymethyl cellulose/gelatin and octenyl succinic anhydride starch/gelatin blend films. Food Hydrocolloids, 123, 107179*, wynosił **5%** i polegał na wykonaniu fotografii roztworów filmotwórczych przy użyciu kriogenicznego mikroskopu elektronowego oraz mikroskopu polaryzacyjnego.

Oświadczam, że mój udział w pracy: *Lupina K., Kowalczyk D., Lis M., Basiura-Cembala M. (2023). Antioxidant polysaccharide/gelatin blend films loaded with curcumin — A comparative study. International Journal of Biological Macromolecules, 236, 123945*, wynosił **5%** i polegał na wykonaniu fotografii roztworów filmotwórczych i folii (za pomocą kriogenicznego mikroskopu elektronowego, skaningowego mikroskopu elektronowego, mikroskopu optycznego z wykorzystaniem kontrastu interferencyjno-różniczkowego) oraz określeniu chropowatości powierzchni folii.



dr Magdalena Lis

(podpis czytelny)

dr Aneta Raszkowska-Kaczor

Toruń, 07.06.2023 r.

Instytut Inżynierii Materiałów Polimerowych i Barwników

Sieć Badawcza Łukasiewicz, Toruń

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

Oświadczam, że mój udział w pracy: *Lupina K., Kowalczyk D., Lis M., Raszkowska-Kaczor A., Drozłowska E. (2022). Controlled release of water-soluble astaxanthin from carboxymethyl cellulose/gelatin and octenyl succinic anhydride starch/gelatin blend films. Food Hydrocolloids, 123, 107179.* wynosił **5%** i polegał na wykonaniu pomiarów szybkości przenikania tlenu przez folie.

dr Aneta Raszkowska-Kaczor

(podpis czytelny)

