



international conference

Ružička days

TODAY SCIENCE – TOMORROW INDUSTRY

September 18–20, 2024 | Vukovar, Croatia



BOOK OF PROCEEDINGS

ISSN 2671-0668 (Online)

www.ruzickadays.eu



međunarodni znanstveno-stručni skup

Ružičkini dani

DANAS ZNANOST – SUTRA INDUSTRIJA

18. – 20. rujna 2024. | Vukovar, Hrvatska



ZBORNİK RADOVA

ISSN 2671-0668 (Online)

www.ruzickadays.eu

9. SUSRET MLADIH KEMIČARA

18. rujna 2024., VUKOVAR, HRVATSKA



$$Re = \frac{vdp}{\eta}$$

ZNAŠ ŠTO
BI SE DOGODILO DA
SE SILVER SURFER
I IRON MAN
UJEDINE?

ZNAM....
POSTALI BI
LEGURA!





SKUP LABORATORIJSKIH TEHNIČARA

I. SKUP LABORATORIJSKIH TEHNIČARA

19. – 20. rujna 2024.
Vukovar, Hrvatska



Ružičkini dani
DANAS ZNANOST – SUTRA INDUSTRIJA
18. – 20. rujna 2024. | Vukovar, Hrvatska

www.ruzickadays.eu

ZBORNIK RADOVA |
BOOK OF PROCEEDINGS

20. Ružičkini dani
DANAS ZNANOST – SUTRA INDUSTRIJA
20th Ružička Days
TODAY SCIENCE – TOMORROW INDUSTRY

Izdavači |
Publishers

Hrvatsko društvo kemijskih
inženjera i tehnologa
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Croatian Society of Chemical Engineers
Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Food Technology Osijek

Glavni urednici |
Chief Editors

Ante Jukić, Vesna Očelić Bulatović,
Dajana Kučić Grgić

Izvršni urednici |
Executive Editors

Stela Jokić, Ivana Lauš

Tehnička urednica |
Technical Editor

Ivana Lauš

Tekst pripremili |
Text prepared by

AUTORI, koji su odgovorni za tekst
rada i slike
AUTHORS, who are fully responsible
for the paper and figures

Dizajn naslovnice i prijeloma |
Cover sheet and layout design

Zdenko Blažeković

Programsko-organizacijski
odbor |
Programme & Organizing
Committee

Ante Jukić (predsjednik/*chairman*),
Stela Jokić (dopredsjednica/*vice-chairman*),
Vesna Očelić Bulatović (dopredsjednica/
vice-chairman),
Dajana Kučić Grgić (tajnica/*secretary*),
Ivana Lauš (tajnica/*secretary*),
Jurislav Babić, Ana Filipović,
Ljubica Glavaš Obrovac, Ivan Hubalek,
Olgica Martinis, Ivanka Miličić,
Martina Miloloža, Drago Šubarić

ISSN 2671-0668 (Online)

Zagreb i/and Osijek, 2025.

- **SADRŽAJ**
CONTENTS



Sekcija: Kemijsko i biokemijsko inženjerstvo

Topic: Chemical and biochemical engineering

Nikica Baričević, Ena Miletić, Karla Stražičić, Lucija Vlahović, Roko Blažić,

Dajana Kučić Grgić, Vesna Ocelić Bulatović

PROCES CIJEPLJENJA PLA MALEINSKIM ANHIDRIDOM

PLA GRAFTING PROCESS WITH MALEIC ANHYDRIDE 1

Anita Bašić, Ana Brajnović, Mario Nikola Mužek, Sandra Svilović

SORPTION OF COPPER IONS ON IMMOBILISED ZEOLITE AND YEAST

SORPCIJA BAKROVIH IONA NA IMOBILIZIRANOM ZEOLITU I KVASCU 14

Vesna Ocelić Bulatović, Mario Kovač, Antun Jozinović,

Dajana Kučić Grgić, Drago Šubarić

POBOLJŠANJE KOMPATIBILNOSTI I TOPLINSKE STABILNOSTI MJEŠAVINA

TPS/PLA UZ DODATAK LIMUNSKJE KISELINE KAO OMEKŠAVALA

IMPROVEMENT OF COMPATIBILITY AND THERMAL STABILITY OF

TPS/PLA BLENDS WITH THE ADDITION OF CITRIC ACID AS A PLASTICIZER 29

Kristina Zagajski Kučan, Patrik Grahovac, Fabio Faraguna, Marko Rogošić

RAVNOTEŽA KAPLJEVINA-KAPLJEVINA U SUSTAVU S BUTILNIM ESTEROM

MASNIH KISELINA SINTETIZIRANIM IZ KOKOSOVOG ULJA

LIQUID-LIQUID EQUILIBRIUM IN THE SYSTEMS BASED ON FATTY

ACID BUTYL ESTER SYNTHESIZED FROM COCONUT OIL 49

Sekcija: Prehrambena tehnologija i biotehnologija

Topic: Food technology and biotechnology

Amanda Dorner, Zvonimir Ladešić, Juraj Tonković

KORELACIJA UDJELA ČVRSTIH TRIGLICERIDA I REOLOŠKIH SVOJSTAVA

SMJESA BILJNIH MASTI I ULJA PRI 25 °C I 30 °C

CORRELATION OF SOLID FAT CONTENT AND RHEOLOGICAL PROPERTIES

OF VEGETABLE FATS AND OILS MIXTURES AT 25 °C AND 30 °C..... 58

Aleksandra Vojvodić Cebin, Danijela Šeremet, Ana Mandura Jarić, Cléa Normand-Dubeau, Solenn Eude, Draženka Komes VALORIZATION POTENTIAL OF ITALIAN RYEGRASS AND REED CANARYGRASS BASED ON PROXIMATE, CARBOHYDRATE AND PHENOLICS COMPOSITION <i>POTENCIJAL VALORIZACIJE TALIJANSKOG LJULJA I BLJEŠTCA ODREĐIVANJEM OSNOVNOG SASTAVA, UGLJIKOHIDRATA I FENOLNIH SPOJEVA</i>	68
---	----

Antonia Zeman, Manuela Panić, Davor Valinger, Ana Jurinjak Tušek, Jasenska Gajdoš Kljusurić, Maja Benković, Tamara Jurina DETECTION OF ADULTERATION OF GROUND COFFEE USING NEAR-INFRARED SPECTROSCOPY AND CHEMOMETRICS <i>DETEKCIJA PATVORENJA MLJEVENE KAVE PRIMJENOM BLISKO INFRACRVENE SPEKTROSKOPIJE I KEMOMETRIJE</i>	86
--	----

Sekcija: Medicinska kemija i farmacija

Topic: Medical chemistry and pharmacy

Petra Kuzmić, Lucija Kuzmić, Nika Rimaj, Leonarda Vugrin, Ivan Halasz, Ernest Meštrović MEHANOKEMIJSKI POSTUPAK PRIPRAVE PRVE FAZE U SINTEZI DEFERASIROKSA <i>MECHANOCHEMICAL PROCEDURE FOR THE PREPARATION OF THE FIRST PHASE IN THE SYNTHESIS OF DEFERASIROX</i>	106
--	-----

Sekcija: Kemija u poljoprivredi i šumarstvu

Topic: Chemistry in agriculture and forestry

Nikola Španić, Stipo Žutić, Nikolina Barlović ANALIZA STRUKTURE I SVOJSTAVA DELIGNIFICIRANIH DRVNIH VLAKANA ČETINJAČA I LISTAČA <i>ANALYSIS OF THE STRUCTURE AND PROPERTIES OF DELIGNIFIED WOOD FIBERS OF SOME HARDWOODS AND SOFTWOODS</i>	123
--	-----

Sekcija: Zaštita okoliša

Topic: Environmental protection

Ida Bulić, Anita Štrkalj, Zoran Glavaš, Mateo Lončar,

Vesna Ocelić Bulatović

GROUNDWATER OF NON-HAZARDOUS WASTE DISPOSAL SITE "GORIČICA"

PODZEMNE VODE ODLAGALIŠTA NEOPASNOG OTPADA „GORIČICA“ 139

Gabriella Kanižai Šarić, Vesna Rastija, Ivana Majić

UTJECAJ AGROKEMIKA NA PRIRODU I OKOLIŠ

IMPACTS OF AGROCHEMICALS ON NATURE AND THE ENVIRONMENT..... 153

Dajana Kučić Grgić, Tin Mirt, Kristina Bule Možar, Martina Miloloža,

Vesna Ocelić Bulatović

ISPITIVANJE BIORAZGRADLJIVOSTI BIOPOLIMERA U TLU

DETERMINATION OF BIODEGRADABILITY OF BIOPOLYMERS IN SOIL..... 164

Marija Vuković Domanovac, Barbara Bertović, Monika Šabić Runjavec

IDENTIFIKACIJA I PROBIR BAKTERIJA SA SPOSOBNOSTI

RAZGRADNJE UGLJIKOVODIKA U TLU

IDENTIFICATION AND SCREENING OF HYDROCARBON-DEGRADING

BACTERIA IN SOIL 182

9. Susret mladih kemičara

9th Meeting of Young Chemists

Aurora Bićanić, Elena Požar, Jasminka Žiža, Tatjana Tot

ACINETOBACTER BAUMANNII, STVARNI UZROČNIK SMRTI KOD

COVID-19 POZITIVNIH PACIJENATA?

ACINETOBACTER BAUMANNII, THE REAL CAUSE OF DEATH IN

COVID-19 POSITIVE PATIENTS? 194

Anđela Čivljaku, Nika Pranjić, Ella Tomić, Mariela Zovko,

Luka Đulabić, Emir Horozić, Slavica Jukić

UTJECAJ OTAPALA NA SADRŽAJ BIOAKTIVNIH KOMPONENTI I

ANTIOKSIDATIVNU AKTIVNOST EKSTRAKATA

ACHILLEA MILLEFOLIUM L.

EFFECT OF SOLVENTS ON CONTENT OF BIOACTIVE COMPONENTS

AND ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF ACHILLEA

MILLEFOLIUM L. EXTRACTS 209

Marija Željana Kustura, Marijana Žgela Putniković

UTJECAJ TEMPERATURE I PH-VRIJEDNOSTI NA STABILNOST

ANTOCIJANINA ZA PRIMJENU U BOJOM SENZIBILIZIRANIM

SOLARNIM ĆELIJAMA

INFLUENCE OF TEMPERATURE AND PH-VALUE ON STABILITY

OF ANTHOCYANINS FOR USE IN DYE-SENSITIZED SOLAR CELLS 218

Kazalo autora

Author index 228

- **KEMIJSKO I BIOKEMIJSKO
INŽENJERSTVO**
***CHEMICAL AND BIOCHEMICAL
ENGINEERING***



Proces cijepjenja PLA maleinskim anhidridom

PLA grafting process with maleic anhydride

*Nikica Baričević, Ena Miletić, Karla Stražičić, Lucija Vlahović, Roko Blažić,
Dajana Kučić Grgić, Vesna Ocelić Bulatović**

Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije,

Trg Marka Marulića 19, 10000 Zagreb, Hrvatska

University of Zagreb Faculty of Chemical Engineering and Technology,

Trg Marka Marulića 19, 10000 Zagreb, Croatia

*Autor za dopisivanje: izv. prof. dr. sc. Vesna Ocelić Bulatović, vocelicbulatovic@fkit.unizg.hr

Sažetak

Potencijalnu alternativu primjenu sintetskih polimera kao ambalažnih materijala predstavljaju prirodni, biorazgradljivi polimeri poput poli(mliječne kiseline) (PLA). Međutim, mehanička svojstva PLA, poput krutosti i nedostatka fleksibilnosti, onemogućuju njegovu primjenu u ambalažnoj industriji.¹ Stoga se razvijaju biorazgradljive mješavine na temelju PLA čiji je nedostatak loša mješljivost polimera koja se može poboljšati primjenom kompatibilizatora.² Mogući kompatibilizator polimernih mješavina na temelju PLA jesu graft kopolimeri koji kao osnovni lanac sadrže PLA. Primjer takvog kopolimera jest PLA cijepljen maleinskim anhidridom (PLA-g-MA) koji osigurava dispergiranoost jedne polimerne faze u drugoj te poboljšava međufaznu adheziju polimera u mješavini.³ Steričke smetnje i moguće neželjene reakcije poput umreživanja PLA ili polimerizacije maleinskog anhidrida (MA) u prisutnosti inicijatora smanjuju učinkovitost procesa cijepjenja.³ Stoga je cilj ovoga rada priprema PLA-g-MA radikalskom polimerizacijom u taljevinu, koristeći dibenzoil peroksid (DBP) kao inicijator. Kako bi se postigao što veći stupanj graftiranja, DBP i MA dodavani su u različitim udjelima. Cijepljenje MA na PLA potvrđeno je nuklearnom magnetskom rezonancijom (NMR) te određivanjem toplinskih svojstva diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (DSC) i termogravimetrijskom analizom (TGA).

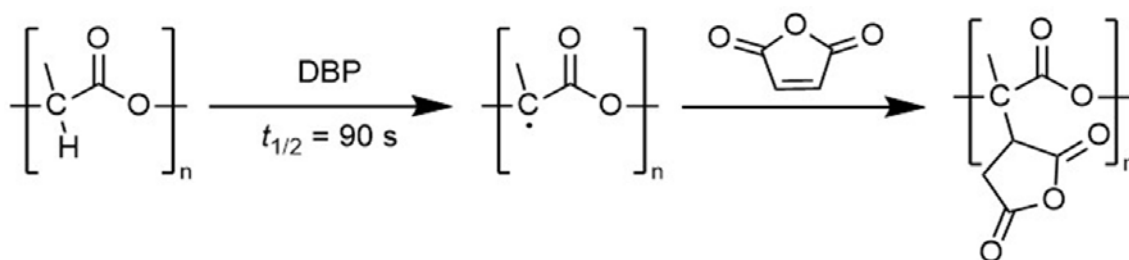
Ključne riječi: *Poli(mliječna kiselina), maleinski anhidrid, cijepjenje, PLA-g-MA, kompatibilizator*

Abstract

A potential alternative to the use of synthetic polymers as packaging materials is the application of natural, biodegradable polymers such as poly(lactic acid) (PLA). However, the mechanical properties of PLA, such as brittleness and lack of flexibility, prevent its use in the packaging industry.¹ Therefore, biodegradable blends based on PLA are being developed, whose drawback is poor polymer miscibility,

which can be improved by using compatibilizers.² A possible compatibilizer for PLA-based polymer blends is graft copolymers containing PLA as the base chain. An example of such a copolymer is PLA grafted with maleic anhydride (PLA-g-MA), which ensures the dispersion of one polymer phase in another and improves the interphase adhesion of polymers in the blend.³ Steric hindrance and potential unwanted reactions, such as PLA cross-linking or maleic anhydride (MA) polymerization in the presence of initiators, reduce the grafting process's efficiency.³ Therefore, the aim of this study is the preparation of PLA-g-MA by melt radical polymerization, using dibenzoyl peroxide (DBP) as the initiator. To achieve the highest possible degree of grafting, DBP and MA were added in different proportions. The grafting of MA onto PLA was confirmed by nuclear magnetic resonance (NMR), and determination by differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric analysis (TGA).

Key words: *Poly (lactic acid), maleic anhydride, grafting process, PLA-g-MA, compatibilizer*



1. Uvod

Prema podacima Eurostata za 2021. godinu, u Europskoj je Uniji prosječno proizvedeno 188,7 kg ambalažnog otpada po stanovniku. To predstavlja porast od 16,4 milijuna tona, odnosno 24,2 % u odnosu na 2010. godinu, a procjenjuje se kako je od toga u prosjeku reciklirano tek 14,7 kg ambalažnog otpada po osobi. 20 % svog ambalažnog otpada predstavljaju nerazgradljivi, sintetski polimerni materijali od kojeg se 10 % reciklira, 14 % spaljuje, a čak 76 % odlaže na odlagališta, ali i u prirodi – šumama, rijekama i morima – gdje nerazgrađeni mogu provesti stotine godina.^{4,5} Budući da zbog svoje nerazgradljivosti predstavljaju veliko opterećenje za okoliš, nerazgradljive je polimerne materijale potrebno zamijeniti novima. Potencijalna zamjena sintetskim materijalima kao ambalažnim materijalima su biorazgradljivi polimeri – materijali koji se procesom biorazgradnje, djelovanjem van- i unutarstaničnih enzima mikroorganizama, razgrađuju na biomasu, vodu te ugljikov dioksid ili metan u prihvatljivom vremenskom periodu.⁶ Jedan od biorazgradljivih polimera s potencijalom za primjenu u ambalažnoj industriji jest poli(mliječna kiselina), PLA. Zbog svoje netoksičnosti, biorazgradljivosti i kompostabilnosti predstavlja dobru alternativu sintetskim polimerima. Međutim, relativno visoka cijena, loša mehanička svojstva poput krutosti te higroskopnost čine ga nepogodnim za primjenu u ambalažnoj industriji te onemogućuju komercijalizaciju ambalažnih proizvoda dobivenih iz PLA.¹ Stoga se razvijaju biorazgradljive mješavine na osnovi PLA čiji je nedostatak loša mješljivost polimera koja za posljedicu ima nezadovoljavajuća mehanička svojstva. Loša mješljivost, a posljedično i mehanička svojstva poboljšati se mogu primjenom kompatibilizatora ili funkcionalizacijom PLA. Na taj se način osigurava dispergiranoost jedne polimerne faze u drugoj te poboljšava međufazna adhezija polimera u mješavini.² Mješljivost polimernih mješavina na osnovi PLA može se postići graft kopolimerima koji kao osnovni lanac sadrže PLA, a kao takav se može koristiti u manjem udjelu kao kompatibilizator ili u potpunosti kao funkcionalizirani PLA. Za cijepljenje polimernih lanaca PLA koristi se proces reaktivne polimerizacije prilikom kojega se veze između polimernog lanca i cijepljenih lanaca ostvaruju kemijskim vezivanjem preko funkcijskih skupina. Imajući u vidu primjenu cijepljenog PLA u proizvodnji mješavina za pakiranje prehrambenih proizvoda, proces cijepljenja mora se provesti koristeći netoksičan, a istovremeno kemijski reaktivan spoj poput maleinskog anhidrida.³ Primjerice *Wu i sur.*⁷ funkcionalizirali su PLA maleinskim anhidridom kako bi poboljšali mješljivost PLA i kokosovih vlakana. Mješavine PLA-g-MA/kokosova vlakna pokazala su znatno bolja mehanička svojstva i kompostabilnost od mješavina koje su sadržavale nefunkcionalizirani PLA. Autori poboljšanje svojstava pripisuju nastanku esterske veze između

PLA i kokosovih vlakana preko graftiranog MA. Iako je cijepjenje PLA maleinskim anhidridom obećavajući postupak kompatibilizacije, slabi afinitet MA prema PLA makroradikalima, uzrokovan strukturalnom simetrijom i niskom elektronskom gustoćom oko $-\text{CH}=\text{CH}-$ veze, dovodi do niskog stupnja cijepjenja (D_g) MA na PLA, često nižeg od 0,50 mas. %. Kako bi se spriječile sporedne reakcije poput umreživanja ili degradacije PLA te umreživanja MA, proces cijepjenja potrebno je provesti pravodobno.⁸ Stoga je osnovni cilj ovog rada istražiti sintezu PLA-g-MA primjenom radicalske polimerizacije u taljevini, uz korištenje dibenzoil peroksida kao inicijatora. Kako bismo postigli veći stupanj cijepjenja, korišteni su veći udjeli MA i DBP te više temperature u usporedbi s literaturnim vrijednostima. Također, MA i DBP dodavani su u različitim omjerima i redoslijedom kako bi se ispitali različiti utjecaji na učinkovitost cijepjenja.

2. Eksperimentalni dio

2.1. Materijali

Za pripremu PLA-g-MA korišteni su poli(mliječna kiselina) Luminy LX175 (TotalEnergies Corbion, Nizozemska), maleinski anhidrid (Thermo Scientific Chemicals, Belgija) te inicijator dibenzoil peroksid (Thermo Scientific Chemicals, Belgija).

2.2. Metoda pripreme

PLA-g-MA kompatibilizator pripremljen je reaktivnom polimerizacijom u Brabender gnjetilici pri različitim temperaturama (165 ili 175 °C) uz brzinu rotacije vijaka 60 o min⁻¹. Kako bi se postigao što veći stupanj cijepjenja, prekursori su dodavani različitim redoslijedom te koristeći različite masene udjele MA i DBP, te pri različitim temperaturama umješavanja, prikazanim u tablici 1. Prilikom pripreme uzoraka oznake N, PLA je miješan dvije minute nakon čega je dodan DBP, a nakon jedne minute dodan je MA te uzorak miješan tri minute. Za uzorke oznake Z, nakon miješanja PLA, DBP i MA dodani su istovremeno i miješani tri minute.

Tablica 1 - Reakcijski uvjeti korišteni prilikom graftiranja za pojedini uzorak

Table 1 - The reaction conditions used during grafting for each sample

Uzorak	w(MA) [%]	w(DBP) [%]	T [°C]
N ₁	10	2	175
N ₂	20	4	175
N ₁₁	10	2	165
N ₂₂	20	4	165
Z ₁	10	2	175
Z ₂	20	4	175

2.3. Metode karakterizacije

2.3.1. Nuklearna magnetska rezonancija

Uspješnost cijepjenja PLA maleinskim anhidridom istražena je pomoću ^1H NMR spektrima koji su snimljeni na instrumentu Bruker AV- 600 spektrometru pri frekvenciji od 600 MHz. Svi NMR spektri snimani su koristeći CDCl_3 kao otapalo te tetrametilsilan kao standard.

2.3.2. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)

Temperature staklastog prijelaza, hladne kristalizacije i, taljenja te stupanj kristalnosti uzoraka određeni su diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (Mettler Toledo DSC 3 Star System, Waltham, MA, USA). Mjerenja su provedena u inertoj dušikovoj atmosferi u temperaturnom intervalu -60 do $200\text{ }^\circ\text{C}$ (dva ciklusa zagrijavanja i jedan ciklus hlađenja) uz brzinu temperaturne promjene $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. Stupanj kristalizacije, χ_c , izračunat je prema izrazu 1 te ΔH_m^0 (PLA) iznosi $93,7\text{ J g}^{-1}$, a vrijednosti entalpije taljenja uzoraka su dobivene iz krivulje drugog ciklusa zagrijavanja.

$$\chi_c [\%] = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0 * w(\text{polimer})} * 100 \quad (1)$$

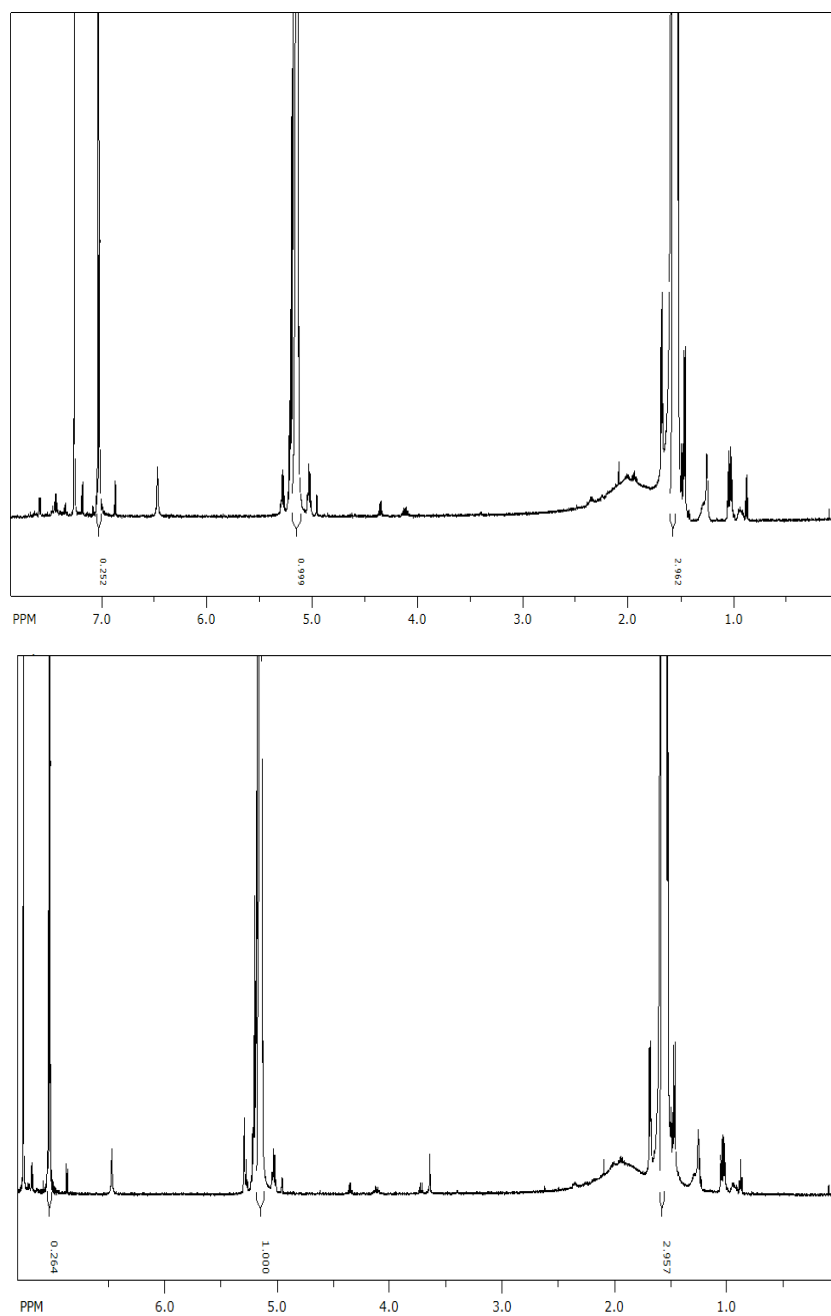
2.3.3. Termogravimetrijska analiza (TGA)

Gubitak mase uzoraka izazvan termičkom razgradnjom određen je termogravimetrijskom analizom (Mettler Toledo TGA/DSC 3+ Star System, Waltham, MA, USA). Mjerenja su provedena na približno 20 mg uzorka u inertoj atmosferi dušika u temperaturnom intervalu $25\text{ }^\circ\text{C}$ do $700\text{ }^\circ\text{C}$ uz brzinu zagrijavanja $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$.

3. Rezultati i rasprava

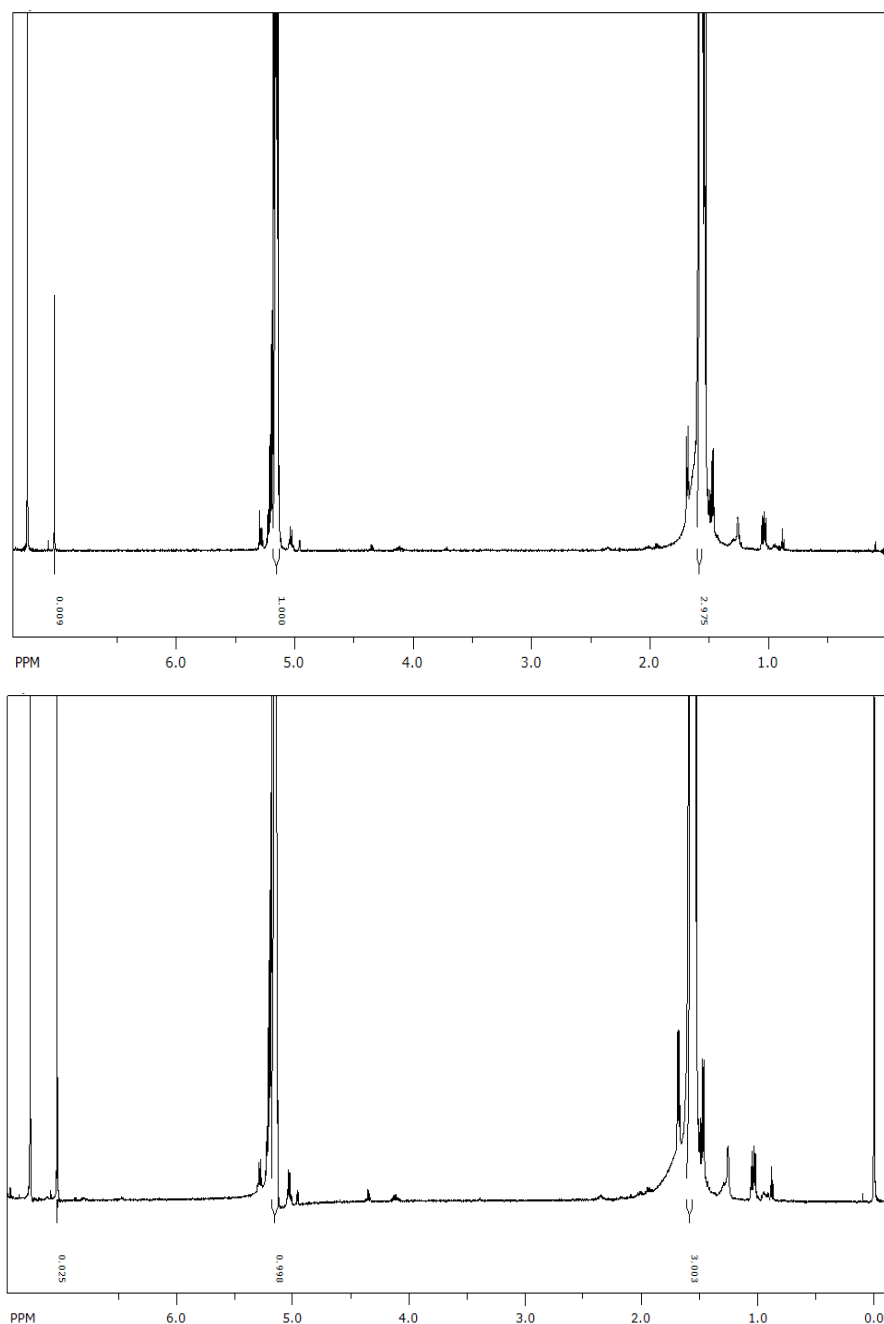
3.1. Nuklearna magnetska rezonancija

Na slikama 1-3 prikazani su ^1H NMR spektri ispitivanih uzoraka N_2 , N_{22} , N_1 , N_{11} , Z_1 i Z_2 . Signali protona karakteristični za PLA lanac nalaze se na $\sim 5,2\text{ ppm}$ (integracija: 1H) i $1,6\text{ ppm}$ (integracija: 3H). Također, vidljiv je signal vezan uz neizreagirani maleinski anhidrid koji se nalazi pri $7,0\text{ ppm}$. Nadalje, na slici 1 uočava se širok signal pri $2,0\text{ ppm}$, koji odgovara signalu maleinskog anhidrida cijepljen na PLA lanac. Ostali uzorci ne pokazuju takav signal, što ukazuje na to da kod njih nije došlo do reakcije cijepjenja PLA.⁹



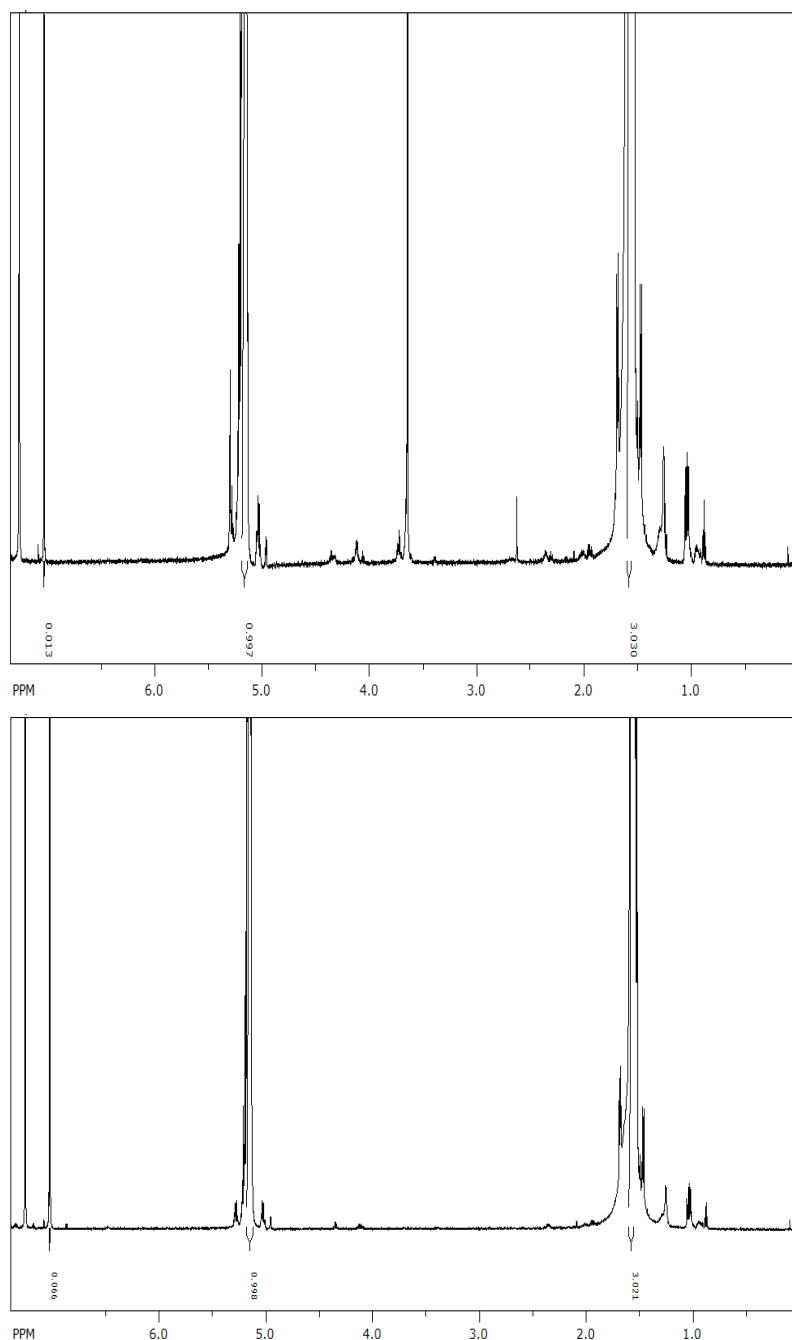
Slika 1 - ^1H NMR (CDCl_3 ; 600 MHz) spektar uzoraka: *lijevo* - N_{22} ; *desno* - N_2

Fig. 1 - ^1H NMR (CDCl_3 ; 600 MHz) spectra of samples: *left*- N_{22} ; *right* - N_2



Slika 2 - ^1H NMR (CDCl_3 ; 600 MHz) spektar uzoraka: lijevo - Z_1 ; desno - Z_2

Fig. 2 - ^1H NMR (CDCl_3 ; 600 MHz) spectre of samples: left- Z_1 ; right - Z_2



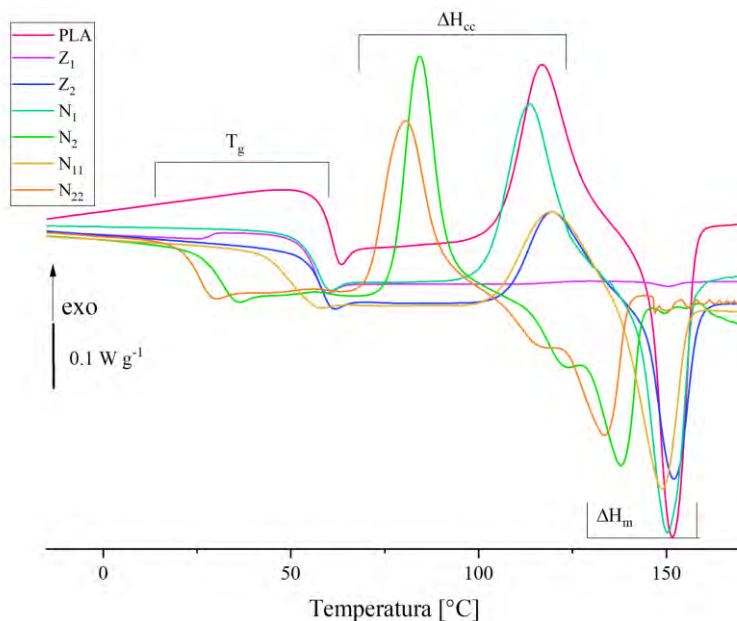
Slika 3 - ^1H NMR (CDCl_3 ; 600 MHz) spektar uzoraka: lijevo- N_1 ; desno- N_{11}

Fig. 3 - ^1H NMR (CDCl_3 ; 600 MHz) spectra of samples: left- N_1 ; right - N_1

3.2. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)

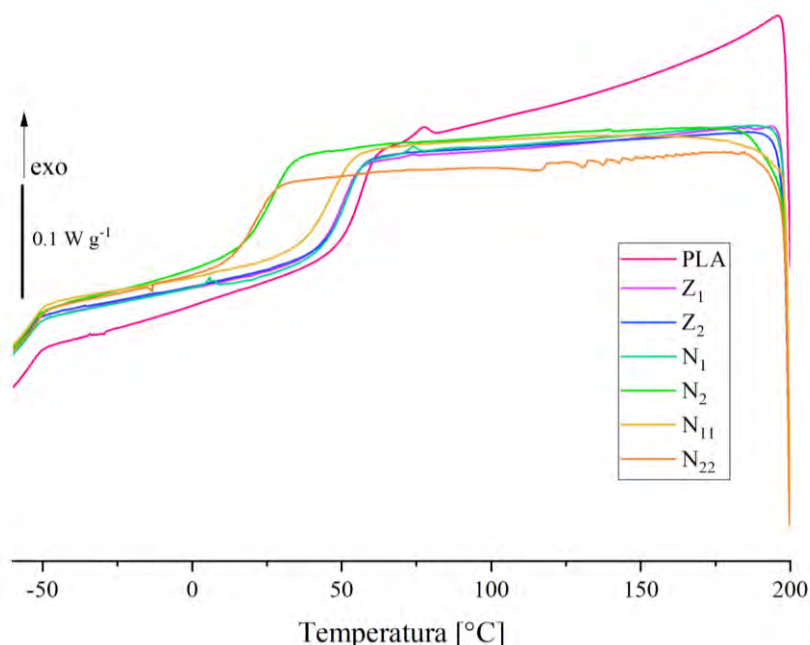
Metodom diferencijalne pretražne kalorimetrije dobiveni su DSC termogrami ispitivanih uzoraka (slike 4 i 5), dok su karakteristične vrijednosti očitane iz krivulja te su prikazane u tablici 2. Svrha

provođenja DSC analize je odrediti utjecaj graftiranog maleinskog anhidrida na toplinska svojstva PLA. Toplinska svojstva PLA određena su udjelom pojedinih faza i molekulskom masom polimera s obzirom da je kristalast polimer. Na termogramu drugog ciklusa zagrijavanja (slika 4) uočavaju se tri karakteristična toplinska prijelaza za čisti PLA. Prvi karakteristični prijelaz odgovara temperaturi staklastog prijelaza (T_g) te iznosi 60,5 °C. Zatim se javlja egzotermno područje koje odgovara entalpiji hladne kristalizacije (ΔH_{cc}) te maksimum krivulje koji odgovara temperaturi hladne kristalizacije (T_{cc}) koja se uočava pri 116,9 °C. Daljnjim zagrijavanjem javlja se endotermni prijelaz koji odgovara faznom prijelazu, taljenju, te temperatura taljenja (T_m) za čisti PLA iznosi 151,4 °C. DSC termogrami uzoraka koji su uspješno cijepljeni pokazuju pomak karakterističnih prijelaza prema nižem temperaturnom području. Prema tablici 2, za uzorke N₂ i N₂₂ temperatura staklastog prijelaza iznosi 31,1 °C i 25,1 °C, temperatura hladne kristalizacije (T_{cc}) se javlja pri temperaturi 84,3 °C odnosno 80,5 °C, a temperatura taljenja iznose 137,9 °C i 133,5 °C. Pomak vrijednosti T_g prema nižim temperaturama ukazuje na to da cijepljenje PLA maleinskim anhidridom pozitivno utječe na fleksibilnost makromolekula, povećavajući pokretljivost polimernih lanaca PLA. Rezultati DSC analize uzoraka koji nisu uspješno graftirani neznatno odstupaju od vrijednosti čistog PLA. DSC termogram prikazan na slici 5 odgovara krivulji ciklusa hlađenja na kojoj se uočava T_g uz izostanak kristalizacije prilikom hlađenja. Izračunat je i stupanj kristalnosti, χ_c , prema izrazu 1 te su rezultati prikazani u tablici 2. Zaključuje se da su udjeli kristalne faze približno jednaki za sve uzorke, što je u skladu s literaturnim podacima.¹⁰



Slika 4 - DSC termogrami uzoraka čistog PLA i PLA-g-MA- drugi ciklus zagrijavanja

Fig. 4 - DSC thermograms of PLA sample and PLA-g-MA samples – second heating cycle



Slika 5 - DSC termogrami uzoraka čistog PLA i PLA-g-MA- ciklus hlađenja

Fig. 5 - DSC thermograms of PLA sample and PLA-g-MA samples - cooling cycle

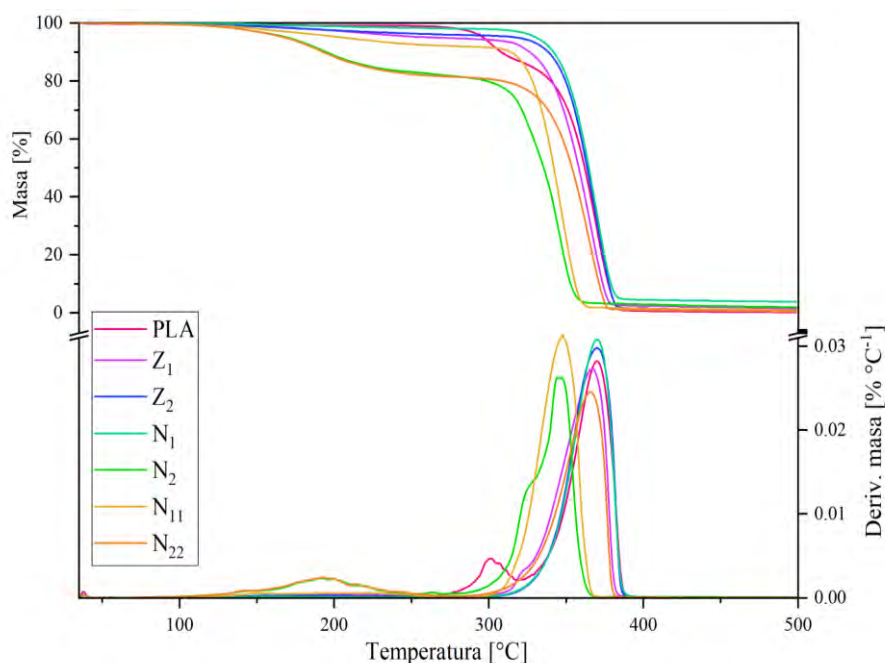
Tablica 2 - Rezultati DSC analize

Table 2 - DSC analysis results

Uzorak	T_g [°C]	T_{cc} [°C]	T_m [°C]	ΔH_m [J g ⁻¹]	ΔH_{cc} [J g ⁻¹]	χ_c [%]
PLA	60,5	116,9	151,4	-24,6	28,7	26,3
N ₁	55,5	113,7	150,3	-25,2	26,9	26,9
N ₂	31,1	84,3	137,9	-22,2	26,3	23,7
Z ₁	53,4	/	/	/	/	/
Z ₂	57,4	119,8	152,1	-13,4	18,9	14,3
N ₁₁	51,1	119,4	148,9	-17,8	18,9	20,2
N ₂₂	25,1	80,5	133,5	-21,1	24,5	26,1

3.3. Termogravimetrijska analiza (TGA)

Termogravimetrijska analiza uzoraka provedena je radi ispitivanja razlika u toplinskoj stabilnosti između PLA i uzoraka PLA-g-MA. Rezultati su prikazani na slici 6, a vrijednosti maksimalne temperature razgradnje navedene su u tablici 3. Za čisti PLA, toplinska razgradnja započinje na temperaturi od 294,3 °C i završava pri 423,5 °C (slika 6). Prvom derivacijom TG krivulje dobiva se DTG krivulja (slika 6) iz koje se može očitati temperatura maksimalne brzine raspada, T_{max} , te za čisti PLA iznosi 370,5 °C. Rezultati TGA analize uzoraka PLA-g-MA također su prikazani na slici 6, a uočeno je da su svi cijepljeni uzorci imali niže vrijednosti temperature maksimalne brzine razgradnje.



Slika 6 - TG/DTG krivulje

Fig. 6 - TG/DTG curves

Tablica 3 - Rezultati TG analize

Table 3 - TG analysis results

Uzorak	$T_{\max}$ [°C]
PLA	370,5
N ₁	369,6
N ₂	345,7
Z ₁	368,2
Z ₂	369,6
N ₁₁	347,6
N ₂₂	365,3

4. Zaključak

Sinteza cijepljenog kopolimera PLA-g-MA je bitan korak kako bi se osigurala bolja kompatibilizacija PLA s drugim polimerima koji mu mogu poboljšati mehanička svojstva. Rezultatima ¹H NMR analize utvrđeno je cijepljenje PLA s MA na uzorcima N₂ i N₂₂ pojavom širokog signala pri 2,0 ppm. Za sintezu PLA-g-MA nužno je osigurati odgovarajući redoslijed reakcijskih komponenti, koji uključuje prvo taljenje PLA, zatim dodatak inicijatora (4 mas. %), te na kraju dodatak maleinskog anhidrida (MA) pri visokim temperaturama (165 i 175 °C). Rezultati analize diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom pokazuje pomak temperature staklastog prijelaza prema nižim vrijednostima temperature za uzorke koji su uspješno

cijepljeni. Termogravimetrijskom analizom je potvrđeno da se svi PLA-g-MA uzorci termički razgrađuju pri nižim temperaturama od čistog PLA. Smanjenje toplinske stabilnosti cijepljenih uzoraka rezultira u većoj mobilnosti makromolekula PLA što možemo potvrditi i sniženjem temperature staklastog prijelaza.

ZAHVALA



Istraživanje je provedeno u sklopu projekta „Proizvodnja i razvoj kompostabilne ambalaže iz otpadne biomase za pakiranje industrijski prerađenih prehrambenih proizvoda” (NPOO.C3.2.R3-II .04.0059) financiranog iz Nacionalnog plana za oporavak i otpornost (financiran od strane Europske unije, NextGenerationEU).

Popis kratica i simbola

PLA - poli(mliječna kiselina) (*engl. poly(lactic acid)*)

PLA-g-MA - poli(mliječna kiselina) graftirana maleinskim anhidridom (*engl. grafted poly(lactic acid) with maleic anhydride*)

MA - maleinski anhidrid (*engl. maleic anhydride*)

DBP - dibenzoil peroksid (*engl. dibenzoyl peroxide*)

NMR - nuklearna magnetska rezonancija (*engl. nuclear magnetic resonance*)

DSC - diferencijalna pretražna kalorimetrija (*engl. differential scanning calorimetry*)

TGA - termogravimetrijska analiza (*engl. thermogravimetric analysis*)

D_g - stupanj graftiranja (*engl. grafting degree*) (%)

$CDCl_3$ - deuterirani kloroform (*engl. deuterated chloroform*)

T_g - temperatura staklastog prijelaza (*engl. glass transition temperature*) (°C)

ΔH_{cc} - entalpija hladne kristalizacije (*engl. cold crystallization enthalpy*) (J g⁻¹)

ΔH_m - entalpija taljenja (*engl. melting enthalpy*) (J g⁻¹)

ΔH_m^0 - entalpija taljenja 100 % kristalnog polimera (*engl. melting enthalpy of 100 % crystalline polymer*) (J g⁻¹)

T_m - temperatura taljenja (*engl. melting temperature*) (°C)

χ_c - stupanj kristalnosti (*engl. crystallinity index*) (%)

T_{max} - maksimalna temperatura razgradnje (*engl. maximal degradation temperature*) (°C)

Literatura

1. *S. Farah, D. G. Anderson, R. Langer*, Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications - A comprehensive review, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **107** (2016) 367–392, doi: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.012>.
2. *H. Jang, S. Kwon, S. J. Kim Park*, Maleic Anhydride-Grafted PLA Preparation and Characteristics of Compatibilized PLA/PBSeT Blend Films, *Int. J. Mol. Sci.* **23** (2022) 7166, doi: <https://doi.org/10.3390/ijms23137166>.
3. *S. W. Hwang, S. B. Lee, C.K. Lee, J. Y. Lee, J. K. Shim, et al.*, Grafting of maleic anhydride on poly(L-lactic acid). Effects on physical and mechanical properties, *Polym. Test.* **31** (2012) 333–344, doi: <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2011.12.005>.
4. URL: Packaging waste statistics (pristup: 1. 7. 2024.)
5. *R. Geyer*, Production, use, and fate of synthetic polymers, *Plastic Waste and Recycling* **2** (2020) 13–32, doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817880-5.00002-5>.
6. *M. A. Patwary, S. Sakib, M. Gafur*, Properties and Applications of Biodegradable Polymers, *J. Res. Updates Polym. Sci.* **9** (2020) 32–41, doi: <https://doi.org/10.6000/1929-5995.2020.09.03>.
7. *C. S. Wu*, Renewable resource-based composites of recycled natural fibers and maleated polylactide bioplastic: Characterization and biodegradability, *Polym. Degrad. Stab.* **94** (2009) 1076–1084, doi: <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2009.04.002>.
8. *H. Cartier, G. H. Hu*, Styrene-assisted melt free radical grafting of glycidyl methacrylate onto polypropylene, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **36** (1998) 1053–1063, doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0518\(199805\)36:7<1053::AID-POLA3>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0518(199805)36:7<1053::AID-POLA3>3.0.CO;2-3).
9. *T. R. Rigolin, L.C. Costa, T. Venâncio, B. Perlatti, S.H.P Bettini*, The effect of different peroxides on physical and chemical properties of poly(lactic acid) modified with maleic anhydride, *Polymer* **179** (2019) 121669, doi: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2019.121669>.
10. *R. Zhu*, Preparation of maleic anhydride grafted Poly(lactid acid) (PLA) and its compatibilization effects on PLA/SOY protein composites, *Diplomski rad*, Pullman, Wash., Washington State University, 2011.

Sorption of copper ions on immobilised zeolite and yeast

Sorpcija bakrovih iona na imobiliziranom zeolitu i kvascu

Anita Bašić,* Ana Brajnović, Mario Nikola Mužek, Sandra Svilović

University of Split, Faculty of Chemistry and Technology, Ruđera Boškovića 35,
21000 Split, Croatia

*Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, Ruđera Boškovića 35,
21000 Split, Hrvatska*

*Corresponding author: dr. sc. Anita Bašić, abasic@ktf-split.hr

Abstract

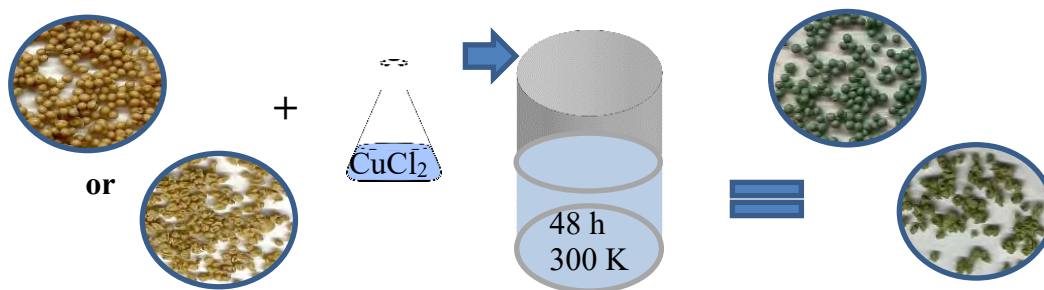
Copper is one of the essential metals for many industrial and agricultural processes. However, it is toxic, does not biodegrade, and can accumulate in living organisms. Because of this, wastewater contaminated with copper must be treated before it is released into the environment. This research explored utilising of NaX zeolite particles and *Saccharomyces cerevisiae* yeast immobilised in alginate for copper ions removal from solutions. Zeolites are widely used sorbents for the removal of pollutants. Yeast is commonly used to treat high concentration organic wastewater, wastewater containing heavy metals and household sewage. Immobilization of the yeast boosts its activity and facilitates separation. The immobilised NaX and yeast removal capabilities were examined concerning initial metal ion concentration at 300 K. Immobilised NaX and yeast were prepared with sodium alginate and calcium chloride. The results show that an increase in the initial copper solution concentration from 2.165 to 9.825 mmol L⁻¹ resulted in a decrease in the removal percentage from 70.244 to 30.291% when immobilised zeolite was used. Using immobilised yeast, the removal efficiency first increased from 7.654 to 10.338% for the initial concentrations of 2.165 to 5.249 mmol L⁻¹ and then decreased to 4.51% for the highest concentration used. The copper sorption data on immobilised NaX and yeast was tested with four types of isotherm models with Langmuir's isotherm model being the most appropriate equation to describe the experimental equilibrium data. The FTIR spectra of the sorbents used, recorded prior and after sorption, revealed no significant changes in the structure of the sorbents.

Key words: zeolite NaX, yeast *Saccharomyces cerevisiae*, sorption, copper ions

Sažetak

Bakar je jedan od bitnih metala za mnoge industrijske i poljoprivredne procese. Međutim, toksičan je, biološki nerazgradiv i može se akumulirati u živim organizmima. Zbog toga se otpadne vode onečišćene bakrom prije ispuštanja u okoliš moraju pročišćavati. Istraživanje se fokusiralo na korištenje čestica NaX zeolita i kvasca *Saccharomyces cerevisiae* imobiliziranih u alginatu za uklanjanje bakrovih iona iz otopina. Kvasac se obično koristi za obradu organskih otpadnih voda visoke koncentracije, otpadnih voda koje sadrže teške metale i otpadnih voda iz kućanstva. Imobilizacija kvasca pojačava njegovu aktivnost i olakšava odvajanje. Sposobnost uklanjanja imobiliziranog NaX i kvasca ispitana je s obzirom na početnu koncentraciju metalnih iona pri 300 K. Imobilizirani NaX i kvasac pripremljeni su s natrijevim alginatom i kalcijevim kloridom. Rezultati pokazuju da je povećanje početne koncentracije otopine bakra s 2,165 na 9,825 mmol L⁻¹ rezultiralo smanjenjem postotka uklanjanja sa 70,244 na 30,291 % kada je korišten imobilizirani zeolit. Korištenjem imobiliziranog kvasca, učinkovitost uklanjanja prvo se povećala sa 7,654 na 10,338 % za početne koncentracije od 2,165 do 5,249 mmol L⁻¹, a zatim se smanjila na 4,51 % za najveću korištenu koncentraciju. Podaci o sorpciji bakra na imobiliziranom NaX i kvascu ispitani su s četiri vrste modela izoterma, pri čemu je Langmuirov model izoterme najprikladniji za opisivanje podataka o postignutoj ravnoteži. FTIR spektri korištenih sorbensa, snimljeni prije i nakon sorpcije, nisu otkrili značajne promjene u strukturi sorbensa.

Ključne riječi: zeolit NaX, kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, sorpcija, bakrovi ioni



1. Introduction

Access to clean water is essential for the survival and progress of humanity, and the quality of water is crucial for the welfare of the population. It is also an important resource for socio-economic development and a factor or constraint to economic production.¹ Given the continuous contamination of the environment, despite environmental protection efforts, it is important to constantly remove heavy metal ions that originate from different sources including mining, urbanisation, chemical industries, wastewater treatment plants, pesticide factories, the biomedical sector, and agricultural practices.^{2,3} A variety of methods and techniques have been developed and are used to remove heavy metals from the environment. Coagulation, solvent extraction, flocculation, chemical precipitation, (bio)sorption, membrane filtration, electrochemical procedures, and phytoremediation are some of the methods used to reduce heavy metal concentrations to tolerable limits.⁴ Among the methods mentioned above, (bio)sorption is characterized by lower initial and ongoing costs and a simpler design.⁵

The *Saccharomyces cerevisiae* yeast is primarily used in the food industry. However, it is also used in biological wastewater treatment for the treatment of high concentration organic wastewater, heavy metal ions wastewater and domestic sewage. The main benefit is that it can be cultivated in large quantities using simple and cheap fermentation techniques and growth media, which enables economical biomass production. In addition to production, they can be easily obtained from various food and beverage industries as a waste product.^{6,7} There are a number of articles investigating the effects of various process parameters as time, temperature, pH, biomass concentration, initial metal concentration, immobilisation, on the biosorption of metals (chromium, copper, lead, mercury, strontium, arsenic, uranium, nickel etc.) by yeast.^{6,8-10} Zeolite, a common sorbent, removes metal ions and cationic dyes from aqueous solutions by adsorption and ion exchange processes, utilising its distinctive porous structure. Zeolites with a certain pore size on the surface can allow molecules of a smaller size or shape to diffuse into the inner pores. Organic cations are too big to penetrate the inner pores; thus they are adsorbed on the surface of zeolites. The surface properties of zeolites bearing negative surface charge can be varied by organic functionalisation of their internal and external surfaces, which can improve their affinity to absorb water and other cations. Researchers have conducted extensive research to find more cost-effective and efficient (bio)sorbents. A number of non-traditional low-cost (bio)sorbents, including natural materials, biosorbents, and recyclable materials from industry and agriculture, have been proposed for the wastewater treatment.

Since *Saccharomyces cerevisiae* is a widely used microorganism and its ability to absorb heavy metals, although intriguing, has not yet been thoroughly evaluated, one of the aims of this work was to improve the understanding of this field and to compare the results obtained with a sorbent renowned for its high capacity in the heavy metals removal. In the present study, immobilised *S. cerevisiae* and zeolites immobilised in alginate were used, as according to literature, immobilised biomass offers significant advantages in terms of handling, solid-liquid separation and ease of scale-up.¹¹ Evaluating the efficiency of metal (bio)sorption by immobilised microbial biomass or zeolites is important for the practical implementation of (bio)sorption. This inquiry provides insights into the equilibrium of the process that are valuable for the equipment design.

2. Experimental

2.1. Materials and Methods

Copper-containing solutions were obtained by dissolving copper chloride dihydrate in distilled water with an initial concentration of 2.165 mmol L⁻¹ to 9.825 mmol L⁻¹. The materials used as sorbents in this study were immobilised zeolite NaX (Alfa Aesar) with a particle diameter smaller than 40 µm and dry baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Belbake) with a particle diameter smaller than 160 µm. The immobilised sorbents were prepared by adding 6 g of zeolite or yeast to an aqueous solution of sodium alginate (Alfa Aesar) at a mass concentration of 40.00 g L⁻¹. The prepared mixture was homogenised for 30 minutes using a magnetic stirrer. The mixture of sodium alginate and zeolite or yeast was injected, drop by drop, into a homogenised calcium chloride solution previously poured into Petri dishes. Due to the ion exchange of sodium ions from sodium alginate and calcium ions from the calcium chloride solution, beads of insoluble calcium alginate are formed, in which are immobilized zeolite or yeast particles. After 20 minutes, the resulting beads are separated and washed 3 times with distilled water to remove excess calcium chloride solution. The washed beads are transferred to filter paper and dried (Fig. 1).

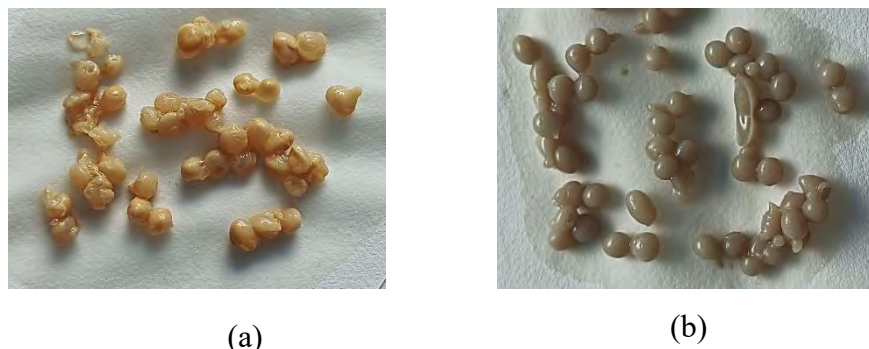


Fig. 1 – Immobilized Zeolite NaX (a) and yeast *Saccharomyces cerevisiae* (b) in calcium alginate

Slika 1 – Imobilizirani zeolit NaX (a) i kvasac *Saccharomyces cerevisiae* (b) u kalcijevom alginatu

2.2. Equilibrium experiments

The sorption of copper ions onto sorbents was carried out in batch reactors. The 0.15 L of CuCl_2 solution with 1.00 g of sorbent was agitated at 200 rpm in a JULABO SW22 water bath. Five different concentrations of the copper solution (2.165, 3.334, 5.249, 7.010, 9.825 mmol L^{-1}) were used for the sorption at 300 K. The solution samples taken out from the batch reactor were filtered and copper concentration in the samples was determined using UV/Vis spectrophotometer. The equilibrium amount of copper retained on the sorbent, q_e (mmol g^{-1}), and the sorption process efficiency, R_e (%), after 48 hours, were calculated as follows:

$$q_e = \frac{(c_0 - c_e) \cdot V}{m} \quad (1)$$

$$R_e = \frac{(c_0 - c_e)}{c_0} \cdot 100 \quad (2)$$

where c_0 is the initial concentration of metal in solution (mmol L^{-1}), c_e is concentration of metal in solution at time t (mmol L^{-1}), V is the volume of solution (L), and m is the mass of the sorbent (g).¹²

In all of the experiments, the initial and equilibrium pH values of solutions were also measured.

2.3. Sorption isotherm models

The data obtained from sorption equilibrium experiments may be utilised to establish a correlation between the amount of (bio)sorbed copper per unit mass of bio(sorbent) and the equilibrium concentration of copper in the solution using different isotherm models. They allow the analysis of various aspects of sorption, such as energy effects and surface interactions between sorbent and sorbate; and are used to determine the sorption capacity (sorbent capacity for metal ions), the sorbent's surface properties, and aid in the development and improvement of the sorption process itself.^{13,14} The sorption isotherms were tested using two two-parameter isotherms (Langmuir and Freundlich) and two three-parameter isotherms (Redlich-Peterson and Sips). Due to their simplicity and ability to be linearized, two-parameter isotherms are the most commonly used. The Langmuir isotherm was originally developed to represent adsorption in the gas-solid phase, but its application has been extended to (bio)sorption in the liquid-solid phase. The basic assumptions of the Langmuir isotherm are that the surface is homogenous, sorption is localised on the surface, and each site can only accept one molecule or atom.¹³ The Langmuir isotherm is defined as follows:

$$q_e = \frac{K_L \cdot c_e \cdot M}{1 + K_L \cdot c_e} \quad (3)$$

where q_e is the equilibrium amount of metal (bio)sorbed per gram of bio(sorbent) (mmol g^{-1}), c_e is the equilibrium concentration of the metal in the solution (mmol L^{-1}), K_L is the Langmuir constant related to the affinity of the binding sites (L mmol^{-1}), and M is also the Langmuir constant, the maximum sorption capacity, representing the single layer coverage of the sorbent by the sorbate (mmol g^{-1}).

The Freundlich isotherm is a model that assumes multi-layer sorption of sorbate molecules on the sorbent and their mutual interaction.¹⁵

$$q_e = K_F \cdot c_e^\beta \quad (4)$$

where K_F (mmol g^{-1}) and β are Freundlich isotherm constants.

The Redlich-Peterson isotherm combines the Freundlich and Langmuir isotherms. It presupposes multi-layer sorption of the sorbate molecules on the sorbent and their mutual interaction and is the three-parameter sorption isotherm.¹⁵

$$q_e = \frac{K_{RP} \cdot c_e \cdot M}{1 + (K_{RP})^r \cdot (c_e)^r} \quad (5)$$

where K_{RP} (L mmol⁻¹) and m are Redlich-Peterson isotherm constants. If the value of m is equal to 1, the above equation is reduced to the Langmuir isotherm.

The Sips isotherm (three-parameter isotherm) combines the Langmuir and Freundlich isotherms. At low sorbate concentrations, it is acting as the Freundlich isotherm, but at high sorbate concentrations, it predicts a monolayer sorption capacity similar to the Langmuir isotherm. The Sips isotherm can be represented by the following equation:¹³

$$q_e = \frac{(K_S \cdot c_e)^n \cdot M}{1 + (K_S \cdot c_e)^n} \quad (6)$$

where K_S (L mmol⁻¹) and n are Sips isotherm constants. If the value of n is equal to 1 then this equation will reduce to Langmuir equation. Conversely, as either c_e or K_S approaches 0, this isotherm reduces to the Freundlich isotherm.¹⁶

3. Results and discussion

The equilibrium of (bio)sorption of copper ions on baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* and zeolite NaX immobilised in alginate was reached after 24 hours. Table 1 shows the concentrations of copper ions in the solution at the beginning and at equilibrium, as well as the calculated values of the equilibrium amounts of copper ions bio(sorbed), and the efficiency of removal calculated using equations (1) and (2). The amount of sorbed copper ions at equilibrium on the NaX zeolite immobilised in alginate increases with increasing of concentration of the initial solution of copper ions, while the efficiency of removal decreased with the initial concentration increase. This can be explained by the saturation of the accessible sorption sites in the sorbent. At lower copper ion concentrations, the sorption sites of the sorbent are more available, resulting in higher removal efficiency. For a given quantity of sorbent, only a certain amount of sorption sites is available. As the initial copper ion concentration increases,

there is a competition for the sorption sites, resulting in a decrease in removal efficiency.¹⁷ The amount of biosorbed copper ions at equilibrium on the immobilised *S. cerevisiae* generally increased with increasing initial concentration of copper ions in the solution, while the efficiency of removal generally decreased with increasing initial concentration. The deviation from the above values was observed for the solution with an initial concentration of 5.249 mmol L⁻¹.

Table 1 – Concentrations, amounts of sorbed copper ions and efficiency of copper's ion sorption on *Saccharomyces cerevisiae* yeast and NaX zeolite immobilised in alginate

Tablica 1 – Koncentracija i količina sorbiranih bakrovih iona te učinkovitosti sorpcije bakrovih iona na kvascu *Saccharomyces cerevisiae* i zeolitu NaX imobiliziranom u alginatu

Immobilised NaX				Immobilised <i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
c_0 mmol L ⁻¹	c_e mmol L ⁻¹	q_e mmol g ⁻¹	R %	c_0 mmol L ⁻¹	c_e mmol L ⁻¹	q_e mmol g ⁻¹	R %
2.165	0.645	0.226	70.21	2.165	1.999	0.025	7.67
3.334	1.435	0.279	56.96	3.334	3.106	0.034	6.83
5.249	2.603	0.387	50.41	5.249	4.706	0.079	10.34
7.010	4.238	0.410	39.55	7.010	6.610	0.059	5.71
9.825	6.849	0.437	30.29	9.825	9.382	0.065	4.51

According to the literature, *S. cerevisiae* in alginate sorbs 0.0558 mmol L⁻¹ copper ions, from CuSO₄ · 5H₂O solution with a concentration of 0.432 mmol L⁻¹, and freely suspended 0.044 mmol L⁻¹ from CuSO₄ · 5H₂O solution with a concentration of 2.8 mmol L⁻¹. The result obtained in this work is slightly higher, which is probably a consequence of using higher concentrations of the copper ion solution.^{18,19} In processes where *S. cerevisiae* was used in freely suspended or immobilised form, an increase in the concentration of the initial solution of copper ions usually leads to an increase in the amount of metal removed, i.e. a decrease in efficiency.^{18,19} A deviation from the stated rule was observed by *Nascimento et al.* In the aforementioned study, *S. cerevisiae* showed a higher removal efficiency in a solution with a concentration of 100 mmol L⁻¹ than in a solution with a concentration of 75 mmol L⁻¹.²⁰

The sorption of copper ions led to a change in the colour of the (bio)sorbent used (Fig. 2).

During the experiments, initial (pH_i) and equilibrium (pH_e) pH values were also measured. Initial pH of solutions was in range from 5.17 to 4.79 and it decreased with the increase of initial concentrations. For both sorbents, a decrease of pH_e was observed with the increase of equilibrium concentrations. The pH_e ranged from 5.17 to 4.01 for immobilised NaX, while for the immobilised *Saccharomyces cerevisiae* the pH_e ranged from 4.90 to 3.79.



Fig. 2 – Zeolite NaX (a) and *Saccharomyces cerevisiae* yeast (b) immobilized in alginate after sorption of copper ions from solution with an initial concentration of $9.825 \text{ mmol L}^{-1}$

Slika 2 – Zeolit NaX (a) i kvasac *Saccharomyces cerevisiae* imobilizirani u alginatu nakon sorpcije bakrovih iona iz otopine početne koncentracije $9,825 \text{ mmol L}^{-1}$

3.1. Comparison of the isotherms

The level of the relationship between solute and (bio)sorbents can be characterised by equilibrium sorption isotherms, which serve as a direct representation of the conditions under which the maximum sorption capacities have been reached.²¹

In this work, four isotherms were used to fit experimental (bio)sorption data. The quality of fitting experimental data was evaluated by RMSE (root mean square error) and χ^2 (chi-square test).

The experimentally determined maximum capacity of copper sorption is $0.437 \text{ mmol g}^{-1}$ on immobilised NaX zeolite and $0.079 \text{ mmol g}^{-1}$ on the immobilised *S. cerevisiae* (Table 2). The best agreement between the experimentally determined and calculated maximum sorption capacity on immobilised NaX was obtained with the Redlich-Peterson isotherm ($0.433 \text{ mmol g}^{-1}$), followed by the Langmuir isotherm ($0.494 \text{ mmol g}^{-1}$), and the poorest agreement was obtained with the Sips isotherm ($0.538 \text{ mmol g}^{-1}$). When the immobilised *S. cerevisiae* is used as a biosorbent, the best agreement between the experimentally determined and the calculated maximum sorption capacity is obtained with the Sips isotherm ($0.067 \text{ mmol g}^{-1}$), followed by the Langmuir isotherm ($0.105 \text{ mmol g}^{-1}$) and the Redlich-Peterson isotherm ($0.018 \text{ mmol g}^{-1}$). The calculated values of the statistical parameters RMSE and the chi-square test show a good agreement between the selected isotherm models and the experimentally obtained equilibrium data. The experiments in which zeolite NaX was immobilised in alginate as a sorbent had the smallest RMSE value (0.016) for both the Langmuir and Sips isotherms. Looking at the value of the chi-square test, the Sips isotherm showed negligibly better agreement with the

experimentally obtained data (0.004 vs. 0.005). In the experiments in which the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is immobilised in alginate and used as a sorbent, the lowest RMSE value (0.013) and the chi-square test (0.016) were calculated for the Langmuir isotherm. If, in addition to the values of the statistical agreement parameters, the values of the experimental or calculated maximum capacity are taken into account, it can be concluded that the sorption of copper ions on both (bio)sorbents is best described by the Langmuir isotherm. This conclusion is consistent with the results of Zan *et al.*²²

Table 2 – Parameters of the isotherms used and calculated statistical parameters of the agreement of the isotherms and experimental data

Tablica 2 – Parametri izoterma i izračunati statistički parametri slaganja izoterma i eksperimentalnih podataka

Isotherm	Parameter	(Bio)sorbent in alginate	
		NaX	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Freundlich	q_e (mmol g ⁻¹)	0.437	0.079
	K_F (mmol g ⁻¹)	0.268	0.025
	β	0.277	0.482
	RMSE	0.022	0.014
	χ^2	0.007	0.019
Langmuir	K_L (L mmol ⁻¹)	1.153	0.228
	M (mmol g ⁻¹)	0.494	0.105
	RMSE	0.016	0.013
	χ^2	0.005	0.016
Redlich-Peterson	K_{RP} (L mmol ⁻¹)	1.528	4.743
	M (mmol g ⁻¹)	0.433	0.018
	r	0.948	0.603
	RMSE	0.019	0.014
	χ^2	0.007	0.019
Sips	K_S (L mmol ⁻¹)	0.961	107.879
	M (mmol g ⁻¹)	0.538	0.067
	N	0.817	0.213
	RMSE	0.016	0.019
	χ^2	0.004	0.035

3.2. FTIR spectra of immobilized zeolite and yeast

The FTIR spectra of (bio)sorbents, acquired before and after copper (bio)sorption (Fig. 3), revealed no significant changes in the structure of the (bio)sorbents. The spectra were obtained with a Perkin Elmer Spectrum Two FTIR spectrometer equipped with a diamond reflection crystal for collecting spectrum by the method of universal attenuated total reflectance at 4000 to 450 cm⁻¹ range with a resolution of 4 cm⁻¹.

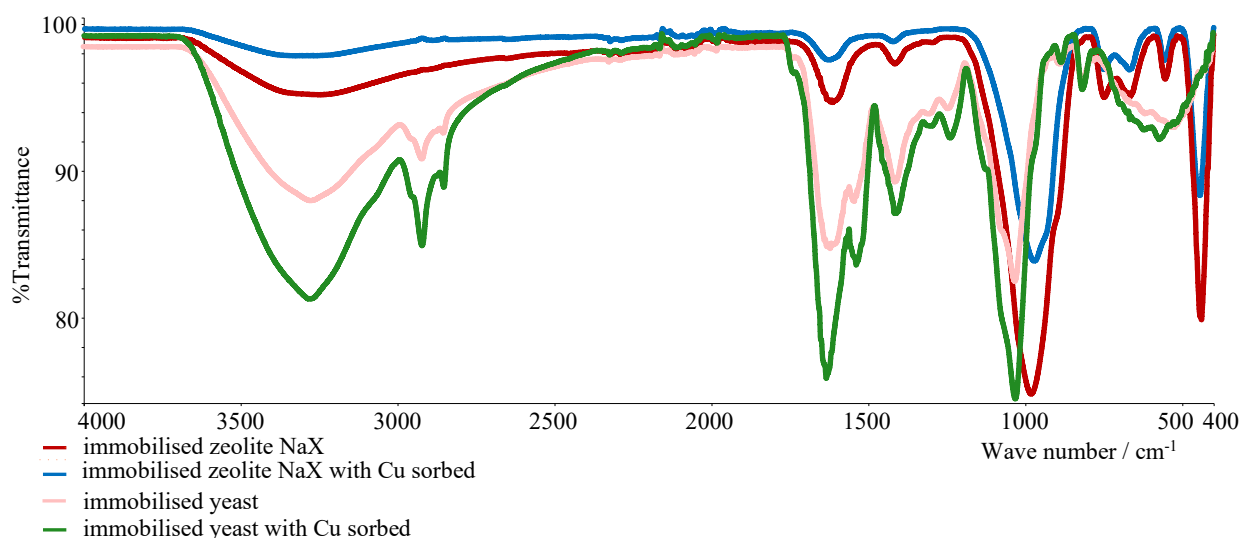


Fig. 3 – FTIR spectra of immobilized zeolite NaX and *Saccharomyces cerevisiae* prior and after the sorption of copper ions from solution with an initial concentration of 9.825 mmol L⁻¹

Slika 3 – FTIR spektar zeolita NaX (a) i kvasca *Saccharomyces cerevisiae* imobiliziranih u alginatu nakon sorpcije bakrovih iona iz otopine početne koncentracije 9,825 mmol L⁻¹

The main broad band on zeolite recorded at 983 cm⁻¹ corresponds to the asymmetric stretching vibrations of Si–O–Si and Al–O–Si and is connected with the internal Si–O(Si) and Si–O(Al) vibrations in tetrahedral or alumino- and silico-oxygen bridges.²³ The bands located at 749 cm⁻¹, 670 cm⁻¹, 555 cm⁻¹, and 439 cm⁻¹ are due to the pseudo-lattice vibrations of structural units. Bands appearing in the regions of 1614 cm⁻¹ and 3298 cm⁻¹ were attributed to the bending vibrations of H–O–H and the stretching vibrations of –OH, H–O–H.²³ The same was observed at the spectra of immobilized yeast, i.e. stretching vibrations of O–H bonds in the range of 3000–3600 cm⁻¹. At the range 2852–2922 cm⁻¹ stretching vibrations of aliphatic C–H were observed.²⁴ Bands recorded at 1633 and 1538 cm⁻¹ are assigned to the amide I and amide II of proteins due to –C=O and ±N–H stretching vibrations. The peaks at 1238 and 1031 cm⁻¹ can be attributed to the alcohol hydroxyl structure C–OH.²⁵

4. Conclusions

The amount of copper ions sorbed at equilibrium on the NaX zeolite immobilised in alginate increases with increasing of concentration of the initial copper ion solution and reaches its maximum value of 0.437 mmol g⁻¹ at the highest initial concentration of the copper ions

solution. Contrary to that, the highest value of copper ions sorbed on immobilised yeast is achieved at an initial concentration of $5.249 \text{ mmol L}^{-1}$. The removal efficiency of the copper ions generally decreases with the initial concentration increase and can be explained by the saturation of the accessible sorption sites in the sorbent. At lower copper ion concentrations, the sorption sites of the sorbent are more available, which leads to a higher removal efficiency. The copper sorption data on immobilised NaX and yeast was best described by the Langmuir isotherm model pointing out that the sorption is localised on the surface creating a monolayer. The FTIR spectra of the sorbents used, which were recorded prior and after the sorption, revealed no significant changes in the structure of the sorbents.

List of abbreviations and symbols

c_0 – initial concentration of metal in solution (mmol L^{-1})

c_e – concentration of metal in solution at time t (mmol L^{-1})

K_F – Freundlich isotherm constant (mmol g^{-1})

K_L – Langmuir isotherm constant (L mmol^{-1})

K_{RP} – Redlich-Peterson isotherm constant (L mmol^{-1})

K_S – Sips isotherm constant (L mmol^{-1})

m – mass of the sorbent (g)

pH_i – equilibrium pH value of solutions

r – Redlich-Peterson isotherm constant

M – the Langmuir constant, the maximum sorption capacity (mmol g^{-1})

n – Sips isotherm constant

q_e – amount of copper retained on the sorbent at equilibrium (mmol g^{-1})

R_e – sorption process efficiency (%)

V – the volume of solution (L)

β – Freundlich isotherm constant

References

1. Z. Liu, M. Sang, M. Zhu, R. Feng, X. Ding, Prediction and countermeasures of heavy metal copper pollution accident in the Three Gorges Reservoir Area, J. Hazard. Mater. **465** (2024) 133208, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.133208>.

2. R. A. Garanin, I. N. Lykov, Sorption of copper ions by immobilized yeast with poroforming additives, IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. **981** (2022) 042059, doi: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/981/4/042059>.
3. S. Das, K. W. Sultana, A. R. Ndhlala, M. Mondal, I. Chandra, Heavy Metal Pollution in the Environment and Its Impact on Health: Exploring Green Technology for Remediation, Environ. Health Insights. **17** (2023) 1–10, doi: <https://doi.org/10.1177/11786302231201259>.
4. S. R. Dhokpande, S. M. Deshmukh, A. Khandekar, A. Sankhe, A review outlook on methods for removal of heavy metal ions from wastewater, Sep. Purif. Technol. **350** (2024) 127868, doi: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2024.127868>.
5. A. Tripathi, M. R. Ranjan, Heavy Metal Removal from Wastewater Using Low Cost Adsorbents, J. Bioremed. Biodeg. **6** (6) (2015) 315, doi: <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000315>.
6. Y. Wang, L. Qiu, M. Hu, Application of yeast in the wastewater treatment, E3S Web Conf. **53** (2018) 04025, doi: <https://doi.org/10.1051/e3sconf/20185304025>.
7. E. A. El-Bestawy, M. M. El-Batouti, N. M. Zabermawi, H. M. Zaghlol, Removal of heavy metals, turbidity and coliform from contaminated raw drinking water using *Saccharomyces cerevisiae*, the Baker's yeast, Sustain. Chem. Pharm. **33** (2023) 101131, doi: <https://doi.org/10.1016/j.scp.2023.101131>.
8. V. Padmavathy, P. Vasudevan, S. C. Dhingra, Biosorption of nickel(II) ions on Baker's yeast, Process Biochem. **38** (10) (2003) 1389–1395, doi: [https://doi.org/10.1016/s0032-9592\(02\)00168-1](https://doi.org/10.1016/s0032-9592(02)00168-1).
9. R. Han, H. Li, Y. Li, J. Zhang, H. Xiao, J. Shi, Biosorption of copper and lead ions by waste beer yeast, J. Hazard. Mater. **137** (3) (2006) 1569–1576, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.04.045>.
10. B. Volesky, H. A. May-Phillips, Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*, Appl. Microbiol. Biotechnol. **42** (1995) 797–806, doi: <https://doi.org/10.1007/bf00171964>.
11. C. S. Van Wyk, Removal of heavy metals from metal-containing effluent by yeast biomass, Afr. J. Biotechnol. **10** (55) (2011) 11557–11561.

12. A. Bašić, M. N. Mužek, S. Svilović, Influence of impeller clearance, impeller size and baffles on copper sorption on zeolite NaX: Do the size and position really matter?, *Appl. Surf. Sci. Adv.* **18** (2023) 100507, doi: <https://doi.org/10.1016/j.apsadv.2023.100507>.
13. S. Svilović, D. Rušić, R. Stipišić, Thermodynamics and Adsorption Isotherms of Copper Ions Removal from Solutions Using Synthetic Zeolite X, *Chem. Biochem. Eng. Q.* **22** (3) (2008) 299–305.
14. S. Rangabhashiyam, N. Anu, M. S. Giri Nandagopal, N. Selvaraju, Relevance of isotherm models in biosorption of pollutants by agricultural byproducts, *J. Environ. Chem. Eng.* **2** (1) (2014) 398–414, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2014.01.014>.
15. K. Y. Foo, B. H. Hameed, Insights into the modelling of adsorption isotherm systems, *Chem. Eng. J.* **156** (1) (2010) 2–10, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.09.013>.
16. M. Belhachemi, F. Addoun, Comparative adsorption isotherms and modeling of methylene blue onto activated carbons, *Appl. Water Sci.* **1** (2011) 111–117, doi: <https://doi.org/10.1007/s13201-011-0014-1>.
17. A. Naga Babu, G. V. Krishna Mohan, K. Kalpana, K. Ravindhranath, Removal of lead from water using calcium alginate beads doped with hydrazine sulphate-activated red mud as adsorbent, *J. Anal. Methods Chem.* **2017** (2017) 4650594, doi: <https://doi.org/10.1155/2017/4650594>.
18. V. Gochev, Z. Velkova, M. Stoytcheva, Biosorption of Cooper (II) by Immobilized Dead Biomass of *Saccharomyces Cerevisiae*, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **24** (2010) 607–612, doi: <https://doi.org/10.1080/13102818.2010.10817907>
19. E. Savastru, D. Bulgariu, C.-I. Zamfir, L. Bulgariu, Application of *Saccharomyces cerevisiae* in the Biosorption of Co(II), Zn(II) and Cu(II) Ions from Aqueous Media, *Water* **14** (6) (2022) 976, doi: <https://doi.org/10.3390/w14060976>.
20. J. M. do Nascimento, J. D. de Oliveira, A. C. L. Rizzo, S. G. F. Leite, Biosorption Cu (II) by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Rep.* **21** (2019) e00315, doi: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00315>.
21. J. S. Markovski, D. D. Marković, V. R. Đokić, M. Mitrić, M. Đ. Ristić, A. E. Onjia, A. D. Marinković, Arsenate adsorption on waste eggshell modified by goethite, α -MnO₂ and goethite/ α -MnO₂, *Chem. Eng. J.* **237** (2014) 430–442, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.10.031>.

22. F. Zan, S. Huo, B. Xi, X. Zhao, Biosorption of Cd^{2+} and Cu^{2+} on immobilized *Saccharomyces cerevisiae*, Front. Environ. Sci. Engin. **6** (2012) 51–58, doi: <https://doi.org/10.1007/s11783-011-0206-9>.
23. M. N. Mužek, S. Svilović, J. Zelić, Kinetic studies of cobalt ion removal from aqueous solutions using fly ash-based geopolymer and zeolite NaX as sorbents, Sep. Sci. Technol. **51** (18) (2016) 2868–2875, doi: <https://dx.doi.org/10.1080/01496395.2016.1228675>.
24. H. Daemi, M. Barikani, Synthesis and characterization of calcium alginate nanoparticles, sodium homopolymannuronate salt and its calcium nanoparticles, Sci. Iran. **19** (6) (2012) 2023–2028, doi: <https://doi.org/10.1016/j.scient.2012.10.005>.
25. H. Chen, Z. Zhou, W. Chen, Z. Xiang, H. Nie, W. Yu, Construction of stable bio-Pd catalysts for environmental pollutant remediation, RSC Adv. **11** (57) (2021) 36174–36180, doi: <https://doi.org/10.1039/D1RA06465G>.

Poboljšanje kompatibilnosti i toplinske stabilnosti mješavina

TPS/PLA uz dodatak limunske kiseline kao omekšavala

Improvement of compatibility and thermal stability of TPS/PLA blends with the addition of citric acid as a plasticizer

Vesna Očelić Bulatović,^{a*} Mario Kovač,^b Antun Jozinović,^c Dajana Kučić Grgić^a, Drago Šubarić^c

^a Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije,

Trg Marka Marulića 19, 10000 Zagreb, Hrvatska

^a *University of Zagreb Faculty of Chemical Engineering and Technology,*

Trg Marka Marulića 19, 10000 Zagreb, Croatia

^b Sveučilište u Mostaru, Agronomski i prehrambeno-tehnološki fakultet,

Biskupa Čule bb, 88000 Mostar, BiH

^b *Faculty of Agriculture and Food Technology, University of Mostar,*

Biskupa Čule bb, 88000 Mostar, B&H

^c Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek,

Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

^c *Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Food Technology Osijek,*

Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Croatia

* Autor za dopisivanje: izv. prof. dr. sc. Vesna Očelić Bulatović, vocelicbulatovic@fkit.unizg.hr

Sažetak

Rad istražuje utjecaj amorfnog biorazgradivog termoplastičnog škroba (TPS) i dodatka limunske kiseline (LK) na toplinska svojstva i fazne prijelaze polilaktida (PLA) putem diferencijalne pretražne kalorimetrije (DSC) i termogravimetrijske analize (TGA). TPS/PLA mješavine sve se više proučavaju zbog njihove biorazgradljivosti i potencijala za zamjenu konvencionalnih polimernih materijala, no zahtijevaju aditive poput limunske kiseline za poboljšanje kompatibilnosti, toplinskih i mehaničkih svojstava. Rezultati DSC analize pokazuju smanjenje temperature staklastog prijelaza (T_g) pri dodavanju TPS-a i LK, čime se poboljšava mješljivost PLA i TPS mješavina. Također, dodavanje TPS-a i LK utječe na pomak temperature hladne kristalizacije (T_{cc}) te povećava stupanj kristalnosti (χ_c) PLA do optimalnog udjela LK (10 mas. %). S druge strane, veći udio LK u mješavinama PLA potiče plastifikaciju, smanjujući kristalnost PLA i utječući na njegov strukturni integritet. Termogravimetrijska

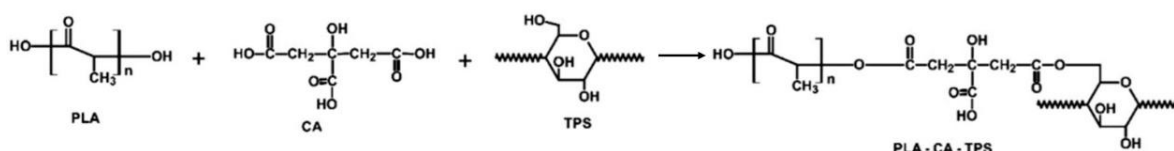
analiza (TGA) otkriva da ugradnja PLA u termoplastični škrob (TPS) povećava njegovu ukupnu toplinsku stabilnost. Međutim, dok LK smanjuje upijanje vlage, ne pridonosi poboljšanju toplinske stabilnosti. Umjesto toga, čini se da je njegova uloga značajnija u modificiranju fizičkih svojstava, kao što su fleksibilnost i hidrofobnost, kroz učinke plastificiranja, što može ugroziti toplinsko ponašanje materijala. Istraživanje naglašava važnost optimizacije sastava TPS/PLA mješavina radi postizanja željenih toplinskih svojstava biorazgradljivih materijala.

Ključne riječi: *polilaktid, termoplastični škrob, limunska kiselina, toplinska svojstva*

Abstract

This paper investigates the effect of amorphous biodegradable thermoplastic starch (TPS) and the addition of citric acid (CA) on the thermal properties and phase transitions of polylactide (PLA) using differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric analysis (TGA). TPS/PLA blends are increasingly being studied for their biodegradability and potential to replace conventional plastics, but they require additives such as CA to improve compatibility and thermal and mechanical properties. The results of the DSC analysis show a decrease in the glass transition temperature (T_g) upon the addition of TPS and CA, which improves the miscibility of PLA and TPS blends. Also, the addition of TPS and CA affects the shift of the cold crystallization temperature (T_{cc}). It increases the degree of PLA's crystallinity (χ_c) up to the optimal proportion of CA (10 wt. %). On the other hand, higher proportion of CA in PLA blends induces plasticization, reducing the crystallinity of PLA and impacting its structural integrity. Thermogravimetric analysis (TGA) reveals that incorporating PLA into thermoplastic starch (TPS) enhances its overall thermal stability. However, while CA reduces moisture absorption, it does not contribute to improving thermal stability. Instead, its role appears more significant in modifying physical properties, such as flexibility and hydrophobicity, through plasticization effects, which may compromise the thermal behavior of the material. The research emphasizes the importance of optimizing the composition of TPS/PLA blends in order to achieve the desired thermal properties of biodegradable materials.

Key words: *polylactide, thermoplastic starch, citric acid, thermal properties*



1. Uvod

Polimeri dobiveni iz obnovljivih izvora postaju sve značajniji u industriji materijala, s obzirom na rastuću svijest o ekološkim problemima, poput nakupljanja nerazgradivog plastičnog otpada i potrošnje fosilnih resursa. Među njima, polilaktid (PLA) i termoplastični škrob (TPS) ističu se kao materijali koji nude obećavajuće održive alternative konvencionalnim polimerima. PLA, polimer dobiven iz mliječne kiseline proizvedene fermentacijom biljnih šećera, široko je korišten zbog svoje biorazgradljivosti, biokompatibilnosti i relativno dobrih mehaničkih svojstava.¹⁻³ S druge strane, TPS se dobiva omekšavanjem prirodnog škroba uz dodatak najčešće glicerola, čime škrob dobiva termoplastična svojstva i omogućava lakšu obradu u različitim procesima. Iako oba materijala imaju značajne prednosti u smislu ekološke prihvatljivosti, njihove pojedinačne slabosti, kao što su krtost PLA i slaba mehanička svojstva TPS-a, ograničavaju njihovu širu primjenu. Mješavine PLA i TPS predstavljaju potencijalno rješenje za poboljšanje ukupnih svojstava ova dva biopolimera. Spajanjem PLA, koji ima relativno dobre mehaničke i toplinske karakteristike, s TPS-om, koji je jeftiniji i biorazgradiviji, nastoji se dobiti materijal s optimiziranim svojstvima, pogodnim za primjenu u raznim industrijskim sektorima, poput ambalaže i poljoprivrednih folija.¹ Međutim, glavna prepreka u proizvodnji ovih mješavina je njihova međusobna nekompatibilnost, koja proizlazi iz različitih kemijskih svojstava ovih polimera – hidrofobnosti PLA i hidrofilnosti TPS-a.^{1,4} Nekompatibilnost rezultira lošom interakcijom između faza, heterogenom mikrostrukturom i posljedično slabim mehaničkim svojstvima mješavine.^{1,5} Kako bi se poboljšala kompatibilnost između PLA i TPS, sve se više istražuju različiti pristupi modifikaciji mješavina, od kojih je jedan od najperspektivnijih upotreba kompatibilizatora i umrežavala.⁵ Limunska kiselina (LK), kao prirodni i biorazgradivi spoj, privukla je pozornost kao mogući kompatibilizator i umrežavalo u mješavinama PLA i TPS. Djelovanjem LK, dolazi do poboljšanja interakcije između hidrofobne i hidrofilne faze polimera, čime se poboljšavaju mehanička svojstva, a također dolazi i do umrežavanja škrobnih lanaca, što rezultira poboljšanom strukturom i toplinskom stabilnošću mješavine.⁶⁻⁸ Kao kompatibilizator, LK može poboljšati adheziju između PLA i TPS faza, što može rezultirati homogenijom mješavinom i poboljšanim mehaničkim svojstvima. Istovremeno, limunska kiselina može djelovati kao umrežavalo, tvoreći kemijske veze između polimernih lanaca TPS-a i PLA, što dodatno pridonosi mehaničkoj čvrstoći i stabilnosti mješavine.⁸ Prethodna istraživanja pokazuju da dodatak LK može poboljšati toplinska svojstva i otpornost na toplinsku razgradnju mješavina TPS-a i PLA,

no ti učinci ovise o koncentraciji LK, vrsti i udjelu plastifikatora te procesnim uvjetima proizvodnje mješavine.⁸⁻¹² Također, interakcija LK s drugim aditivima u sustavu može imati značajan utjecaj na finalna svojstva materijala, što zahtijeva daljnja istraživanja. Toplinske analize, poput diferencijalne pretražne kalorimetrije (DSC) i termogravimetrijske analize (TGA), od velike su važnosti jer omogućuju detaljno proučavanje utjecaja LK na toplinska svojstva kao i mehanizam razgradnje mješavina PLA/TPS, kao i procjenu učinkovitosti umrežavanja i plastifikacije, te pružaju ključne informacije za optimizaciju sastava i proizvodnog procesa materijala, što doprinosi razvoju održivijih bioplastičnih materijala.^{8,12-15} Cilj rada je istražiti utjecaj LK kao kompatibilizatora i umrežavala na toplinske prijelaze i toplinsku stabilnost mješavina TPS/PLA. Rezultati ovog istraživanja doprinijet će boljem razumijevanju uloge LK u poboljšanju svojstva PLA/TPS mješavina, otvarajući nove mogućnosti za primjenu ovih materijala u industriji, s posebnim naglaskom na održivost i ekološku prihvatljivost.

2. Eksperimentalni dio

2.1. Materijali

Za pripremu termoplastičnog škroba korišten je prirodni krumpirov škrob izoliran iz sorte krumpira Scala, koji je plastificiran redestiliranim glicerolom (99,8 % čistoće), proizvođača Gram Mol, Zagreb, Hrvatska. Postupak izolacije i karakterizacija krumpirovog škroba sorte Scala opisan je u našem prethodnom radu.¹⁶ Za pripravu omekšanog termoplastičnog škroba korištena je limunska kiselina (LK) (čistoće p.a.), proizvođača Gram Mol, Zagreb, Hrvatska. Za pripremu mješavina TPS_Scala/PLA korišten je polilaktid (PLA), pod komercijalnim nazivom Ingeo™ Biopolymer 4043D, NatureWorks LLC, Minnetonka, MN, SAD. Prema specifikacijama proizvođača sadržaj d-izomera u PLA je 4,3 %, brzina protoka taline (MFR) 6,0 g (10 min)⁻¹ (210 °C/2,16 kg), gustoća 1,24 g cm⁻³, molekulska masa $M_w = 168\,000$ g mol⁻¹. Temperatura taljenja PLA je u rasponu od 145–160 °C, dok je temperatura staklastog prijelaza između 55 i 60 °C.

2.2. Priprema termoplastičnog škroba bez i s kompatibilizatorom

Termoplastični škrob (TPS_Scala) pripremljen je miješanjem prirodnog krumpirovog škroba (sorta Scala) s dodatkom glicerola kao omekšavala u omjeru 60 (krumpirov škrob)/40 (glicerol) w/w. TPS_Scala je ekstrudiran u laboratorijskom jednopužnom ekstruderu (model 19/20DN;

Brabender GmbH, Duisburg, Njemačka) sa sapnicom promjera 4 mm. Temperaturni profil ekstrudera postavljen je na 100/100/130 °C za prvu (doziranje), drugu (kompresija) odnosno treću (ispusnu) zonu. Ekstrudirani uzorci su izrezani i granulirani u obliku peleta. Omekšani TPS_Scala pripremljeni su prema metodologiji *Kapelko-Zeberske i sur.*¹⁷ uz dodatak 5, 10 i 20 mas. % LK. TPS_Scala-LK (oznaka TPS_Scala_X % LK, gdje je X sadržaj LK) dobiveni su istim postupkom kao TPS_Scala.

2.3. Priprema mješavina

Nakon pripreme TPS_Scala i TPS_Scala-LK pripremljene su binarne mješavine s PLA. Termoplastični škrob je prije prerade sušen na 105 °C 24 h kako bi se uklonila zaostala vlaga. U prvom koraku glavne komponente mješavina su miješane ručno u polietilenskim vrećicama 5 min (različite količine TPS_Scala ili TPS_Scala-LK (40, 50 i 60 mas. %) s PLA peletima). U prethodno zagrijanoj Brabender gnjetilici (Brabender Technologie GmbH, Duisburg, Germany) na 170 °C komponente mješavina dodane su ručno, uz brzinu rotora od 60 okretaja tijekom 5 minuta. Pripremljene homogene polimerne mješavine oblikovane su u kalupu dimenzija 10 mm × 10 mm × 1 mm na laboratorijskoj hidrauličkoj preši (Fontune SRB 140, EC 320 × 320 NB, Nizozemska) na temperaturi od 180 °C, tlaku od 25 kPa tijekom 5 min, s vremenom predgrijavanja od 1 min i vremenom hlađenja od 20 min.

2.4. Karakterizacija materijala

2.4.1. Diferencijalna pretražna kalorimetrija, DSC

Procjena toplinskih svojstava provedena je diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom, DSC, model Mettler Toledo DSC 822^e (Greifensee, Švicarska). Uzorci se postavljaju u aluminijske posudice te zatvaraju probušenim aluminijskim poklopcem. Masa uzoraka je varirala između 9,0 mg i 11,0 mg. Provedena su dva ciklusa zagrijavanja: prvo su uzorci zagrijavani u temperaturnom rasponu od 25 do 200 °C u atmosferi dušika (50 mL min⁻¹) pri brzini zagrijavanja 10 °C min⁻¹ kako bi se uklonila toplina povijest pripreme uzorka, zatim izotermno držani na 200 °C 5 minuta, a zatim ohlađeni na -90 °C pri istoj brzini hlađenja od 10 °C min⁻¹, ponovno izotermno držani na -90 °C 5 min te ponovno zagrijani na 200 °C. Toplinska analiza provedena je u struji dušika (99,99 % čistoće) brzinom od 50 mL min⁻¹. Analizirane specifične temperature, kao i pripadajuće entalpije određene su iz drugog ciklusa zagrijavanja. Temperatura staklastog prijelaza, T_g , određena je kao mindpoint temperatura dok su

temperatura hladne kristalizacije, T_{cc} , i temperatura taljenja, T_m , određene kao temperature u minimumu taljenja, odnosno maksimumu hladne kristalizacije. Stupanj kristalnosti, χ_c , PLA u polimernim mješavinama izračunata je prema jednadžbi 1, gdje w maseni udio PLA, $\Delta H_m / \text{Jg}^{-1}$ vrijednost entalpije taljenja kristalne faze PLA, $\Delta H_m^0 / \text{Jg}^{-1}$ entalpija taljenja 100 % kristalnog PLA iznosi $93,1 \text{ J g}^{-1}$.¹⁸

$$\chi_c (\%) = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0 \cdot w(\text{PLA})} \quad (1)$$

2.4.2. Termogravimetrijska analiza, TGA

Toplinska stabilnost PLA, TPS_Scala, TPS_Scala_LK te njihovih mješavina provedena je termogravimetrijskom analizom na instrumentu Q500, tvrtke TA Instruments. Uzorci mase $\sim 10 \text{ mg}$ analizirani su u struji dušika (60 mL min^{-1}) uz brzinu zagrijavanja od $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ u temperaturnom području od 25 do $600 \text{ }^\circ\text{C}$.

3. Rezultati i rasprava

3.1. DSC analize

U cilju određivanja utjecaja dodatka i udjela amorfnog biorazgradljivog TPS-a sa i bez LK, na fazne prijelaze PLA provedena je DSC analiza. Iz DSC krivulja čistog PLA, te mješavina TPS_Scala/PLA, TPS_Scala_LK/PLA različitog sastava, određeni su karakteristični fazni prijelazi: temperatura staklastog prijelaza, ($T_g / ^\circ\text{C}$), temperatura hladne kristalizacije ($T_{cc} / ^\circ\text{C}$), temperatura taljenja ($T_m / ^\circ\text{C}$), entalpije hladne kristalizacije ($\Delta H_{cc} / \text{Jg}^{-1}$) i entalpija taljenja ($\Delta H_m / \text{J g}^{-1}$) te je izračunat stupanj kristalnosti ($\chi_c / \%$). Rezultati DSC analize prikazane su u Tablici 1. Prikazane su isključivo DSC krivulje drugog ciklusa zagrijavanja, budući da na krivuljama hlađenja nisu zabilježeni nikakvi fazni prijelazi. Na slici 1 prikazane su DSC krivulje drugog ciklusa zagrijavanja čistog PLA te mješavina TPS_Scala/PLA i TPS_Scala_LK/PLA različitog sastava. Na DSC termogramu u ciklusu zagrijavanja (slika 1 (a)) čistog PLA vidljiv je prvi temperaturni prijelaz pri $58,5 \text{ }^\circ\text{C}$ odnosno temperatura staklastog prijelaza (T_g) PLA. T_g pokazuje da su polimerni lanci PLA u staklastom stanju, na sobnoj temperaturi. Dodatkom termoplastičnog škroba smanjuje se T_g za otprilike $2\text{--}3 \text{ }^\circ\text{C}$ u usporedbi s T_g čistog PLA. Veća pokretljivost polimernih lanaca nastaje zbog snižavanja temperature staklastog prijelaza, što dovodi do poboljšane mogućnosti miješanja PLA i TPS_Scala

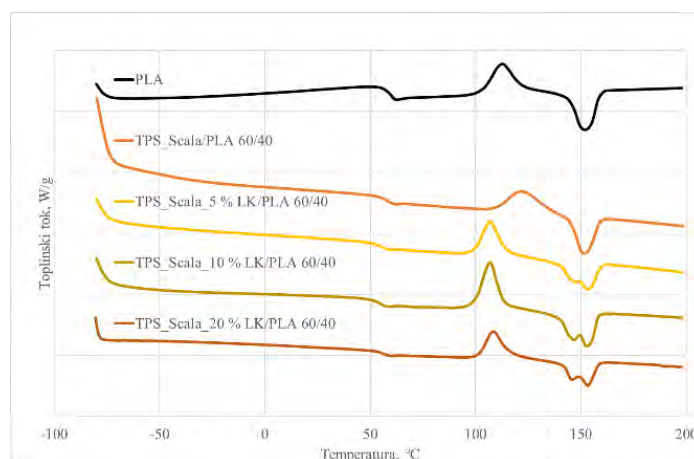
polimernih mješavina.¹⁹ T_g se ne mijenja značajno s povećanjem udjela TPS-a u TPS_Scala/PLA polimernim mješavina, dok dodatak limunske kiseline snižava T_g kod mješavina TPS_Scala/PLA što ukazuje na poboljšanje mješljivosti istraživanih mješavina polimera dodatkom limunske kiseline. Uz naknadno zagrijavanje polilaktida, aktivnost makromolekula unutar lanca se povećava, što dovodi do procesa restrukturiranja i oslobađanja energije.²⁰ Kao rezultat vidljiva je pojava hladne kristalizacije, egzotermna promjena na DSC krivulji, sa izraženim maksimumom na DSC krivulji na 112,4 °C (slika 1 (a)), što ukazuje na temperaturu hladne kristalizacije (T_{cc}). Nakon hladne kristalizacije dolazi do procesa taljenja, koji je vidljiv kao endotermni prijelaz na DSC krivulji s maksimumom pri temperaturi taljenja (T_m) od 152,1 °C. Krivulje zagrijavanja mješavina TPS_Scala-LK/PLA pokazuju dvostruki vrh taljenja, fenomen koji se pripisuje PLA jer je TPS potpuno amorfan polimer. Ovaj dvostruki vrh taljenja odnosi se na taljenje malih i nesavršenih kristala tijekom procesa rekristalizacije PLA.^{21,22} Objašnjenje višestrukih vrhova taljenja PLA ima dva pristupa. Prvi pristup pojašnjava da nakon zagrijavanja PLA dvostruki vrh taljenja rezultat je stvaranja različitih kristalnih struktura. Strukture uključuju temperature taljenja α -oblik i β -oblik niže temperature taljenja. β -oblik karakterizira nesavršenost kristalne strukture i rjeđi je od α -forme, koja dominira kao najrašireniji polimorf PLA polimera. Koncept taljenja-rekristalizacije je drugi pristup koji se koristi za objašnjenje dvostrukog vrha taljenja PLA, što implicira da s porastom temperature dolazi do taljenja malih i nesavršenih kristala rekristalizacijskim mehanizmom za postizanje stabilnosti.²³ Na krivuljama polimernih mješavina TPS_Scala/PLA u omjerima 60/40 i 50/50, može se primijetiti odsutnost dvostrukog vrha taljenja, kao kod čiste PLA matrice (slika 1). β -oblik nastaje u posebnom stanju lančanog gibanja i polja naprezanja koje je eliminirano prisutnošću amorfne termoplastičnog škroba. α -oblik je stabilniji u prisutnosti određenog udjela TPS_Scala. Smanjenje T_m u polimernim mješavinama pripisuje se morfološkom učinku, dok s termodinamičkog gledišta, smanjenje T_m povezano je sa smanjenjem kemijskog potencijal kristalnog polimera zbog prisutnosti amorfne polimer. Sniženje T_m u mješavinama TPS_Scala/PLA može se djelomično pripisati miješanju s amorfnim polimerom, tj. termoplastičnim škrobom.²⁰ Kada se usporede DSC krivulje TPS_Scala/PLA 40/60 sa i bez LK, vidljivo je da uzorci s LK imaju višu temperaturu taljenja u usporedbi s uzorcima bez LK. Dakle, uzorak TPS_Scala_20 % LK/PLA 60/40 ima najveću T_m (155,0 °C), dok polimerna mješavina bez dodatka LK (TPS_Scala/PLA 40/60) ima najnižu T_m (147,0 °C), što ukazuje da dodatak LK povećava stupanj urednosti u kristalnoj fazi, tj. unutar kristalne strukture PLA.

Miješanje TPS_Scala s PLA općenito uzrokuje smanjenje entalpije taljenja, uz istovremeni pomak T_{cc} prema nižim vrijednostima, što ukazuje da TPS ima nukleacijski učinak na PLA.¹⁹ Mješavine PLA s TPS_Scala_LK pokazuju smanjenje T_{cc} u usporedbi s polimernim mješavinama bez LK. Prilikom miješanja TPS_Scala_LK/PLA koji sadrže 10 mas. % LK pokazuju najznačajnije smanjenje T_{cc} . Polimerna mješavina TPS_Scala_10 % LK/PLA 50/50 ima T_{cc} (104,4 °C), što sugerira da dodavanje LK može ubrzati proces kristalizacije tijekom zagrijavanja. TPS_Scala utječe na sposobnost kristalizacije PLA i omogućuje pravilniji raspored polilaktidnih lanaca u kristalnu strukturu. Prema izračunu stupnja kristalnosti, dodatak amornog TPS-a pokazuje značajan utjecaj na povećanje stupnja kristalnosti PLA, djelujući kao nukleator. Dodavanje 5 mas. % LK povećava stupanj kristalnosti PLA za sve omjere u mješavini, dok daljnji porast koncentracije LK dovodi do smanjenja kristalnosti PLA, osim u slučaju polimerne mješavine TPS_Scala_10 % LK/PLA, koja pokazuje najveći stupanj kristalnosti (χ_c) od 58,0 %. Pri višim koncentracijama LK ona uzrokuje omekšavanje PLA matrice, što rezultira povećanom pokretljivošću polimernih lanaca. Ovo povećanje pokretljivosti ometa pravilno pakiranje i orijentaciju polimernih lanaca, što je ključno za proces kristalizacije i stoga smanjuje stupanj kristalnosti PLA. Uz to, veće količine LK mogu uzrokovati nekompatibilnost između faza TPS-a i PLA, čime dolazi do razdvajanja faza, što ometa pravilno poravnanje PLA lanaca i dovodi do nastanka amorfnije strukture u polimernim mješavinama, što se očituje u daljnjem smanjenju χ_c .

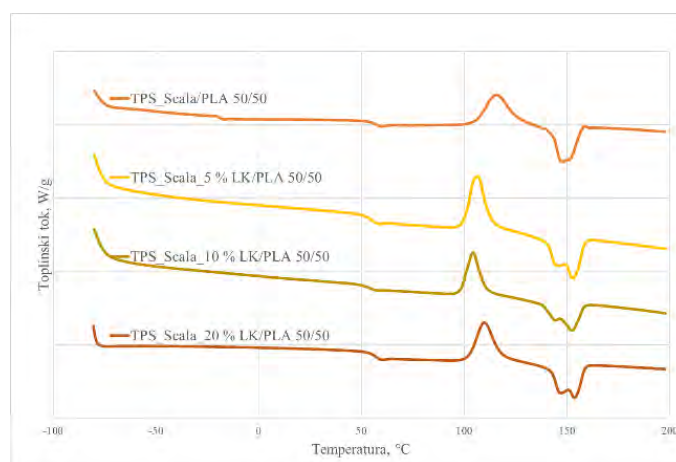
Tablica 1 – Rezultati DSC analize

Table 1 – Results of DSC analysis

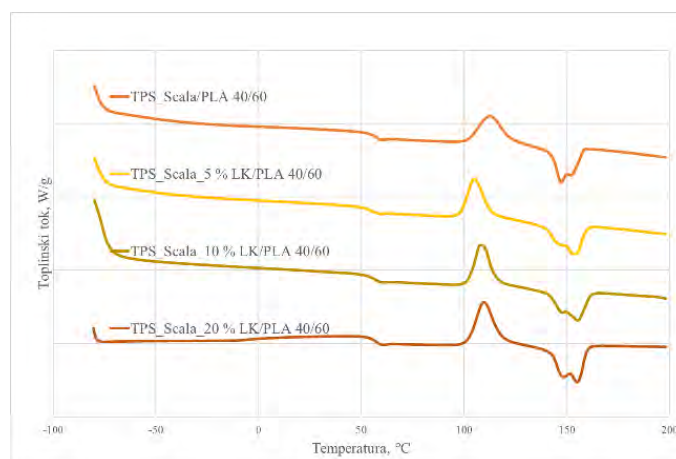
Uzorak Samples	T_g (°C)	T_{cc} (°C)	ΔH_{cc} (J g ⁻¹)	T_{m1} (°C)	T_{m2} (°C)	ΔH_m (J g ⁻¹)	χ_c (%)
PLA	58,5	112,4	20,9	/	152,1	20,2	21,7
TPS Scala/PLA 60/40	56,8	122,0	16,6	/	151,4	17,6	47,3
TPS Scala/PLA 50/50	56,3	115,6	18,7	/	148,0	15,4	33,1
TPS Scala/PLA 40/60	56,0	112,7	16,2	147,0	151,6	15,0	26,9
TPS Scala 5 % LK/PLA 60/40	54,7	106,9	17,1	149,3	153,6	17,9	48,1
TPS Scala 5 % LK/PLA 50/50	53,8	106,2	21,7	146,9	152,9	21,2	45,5
TPS Scala 5 % LK/PLA 40/60	53,6	105,0	15,9	148,7	153,7	16,8	30,1
TPS Scala 10 % LK/PLA 60/40	53,3	106,9	22,7	147,5	153,4	21,6	58,0
TPS Scala 10 % LK/PLA 50/50	53,1	104,4	15,8	146,8	152,7	14,1	30,3
TPS Scala 10 % LK/PLA 40/60	55,2	108,7	16,8	148,9	154,7	16,5	29,5
TPS Scala 20 % LK/PLA 60/40	55,4	108,4	14,60	148,2	153,2	13,4	36,0
TPS Scala 20 % LK/PLA 50/50	56,0	110,0	18,04	147,9	153,9	17,0	36,5
TPS Scala 20 % LK/PLA 40/60	56,0	109,7	20,15	149,2	155,0	19,4	34,7



(a)



(b)



(c)

Slika 1 – DSC termogrami mješavina TPS_Scala/PLA i TPS_Scala_LK/PLA:

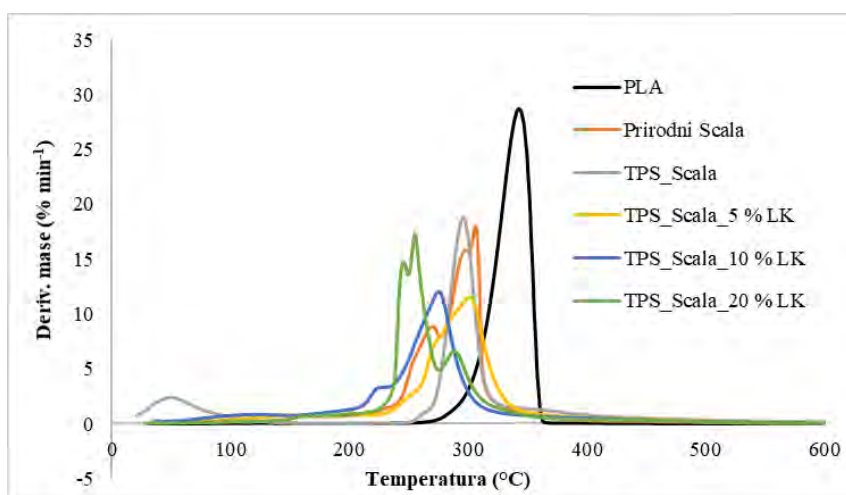
(a) 60/40; (b) 50/50; (c) 40/60

Fig. 1 – DSC thermograms of blends TPS_Scala/PLA and TPS_Scala_CA/PLA:

(a) 60/40; (b) 50/50; (c) 40/60

3.2. TG analize

U cilju određivanja toplinske stabilnosti čistih polimernih materijala TPS-a i PLA te njihovih mješavina TPS_Scala/PLA u različitom omjeru provedena je termogravimetrijska analiza u struji dušika. TG analiza provedena je i za mješavine TPS_Scala_LK/PLA dodatkom različitog udjela LK kako bi se dobio uvid u utjecaj LK na toplinsku stabilnost polimernih mješavina TPS_Scala/PLA. Toplinska stabilnost biorazgradljivih polimernih mješavina je bitno svojstvo jer do razgradnje materijala dolazi pri nižim temperaturama u usporedbi sa sintetskim polimernim materijalima što utječe na sniženje temperature prerade kao i njihove konačne primjene. Toplinska stabilnost uzoraka određena je kao ekstrapolirana temperatura početka razgradnje, T_{onset} (tablica 2). Maksimumi DTG krivulja predstavljaju temperature maksimalne brzine razgradnje ispitivanih uzoraka (T_{max1} i T_{max2}). Određena je i temperatura kraja razgradnje (T_{kraj}). Istražena je i toplinska stabilnost prirodnog krumpirovog škroba, termoplastičnog škroba te dodatak limunske kiseline (5, 10 i 20 mas. %) na navedene materijale. Radi velikog broja uzoraka i rezultata, prikazane su samo DTG krivulje (slika 2).



Slika 2 – DTG krivulja PLA, prirodnog škroba sorte Scala, TPS_Scala kao i TPS_Scala_LK

Fig. 2 – DTG curve of PLA, natural Scala starch, TPS_Scala as well as TPS_Scala_CA

Toplinska razgradnja škroba, kao ključni parametar u procesima prerade, izravno utječe na njegovu primjenjivost, osobito u kontekstu razvoja biomaterijala i ambalažnih materijala. U ovom istraživanju, prvo su analizirani procesi toplinske razgradnje prirodnog krumpirovog škroba sorte Scala, termoplastičnog škroba (TPS) te TPS-a modificiranog limunskom kiselinom (TPS_Scala_LK). Prvi značajan gubitak mase, zabilježen pri temperaturama ≤ 100 °C, povezan

je s oslobađanjem slobodne vode koja ima slabe interakcije sa škrobnom matricom. Gubitak mase rezultat je isparavanja molekula vode koja je fizički adsorbirana na površini škrobnih čestica i koja nije usko vezana za škrobnu strukturu. Slično ponašanje zabilježeno je kod svih uzoraka, uključujući i TPS_Scala_LK, koji pak pokazuje manje izraženu promjenu u odnosu na prirodni Scala škrob, što sugerira smanjenje upijanja vlage u okolini. Fenomen se može povezati s omekšavanjem i modifikacijama strukture škroba, što utječe na njegovu sposobnost apsorpcije vlage iz okoliša. Kada temperatura premaši 100 °C, razgradnja se nastavlja zbog oslobađanja vezane vode koja je snažnije povezana s škrobom preko vodikovih veza. Gubitak mase postaje izraženiji pri temperaturama do 180 °C, što ukazuje na jače interakcije između vode i molekula škroba, osobito u prisustvu glicerola kao omekšavala. U usporedbi s prirodnim krumpirovim škrobom sorte Scala, TPS pokazuje izraženiju prvu promjenu u temperaturnom području od sobne temperature do 120 °C, s maksimalnim gubitkom mase pri oko 50,6 °C. Gubitak mase povezan je s isparavanjem slobodne i vezane vode, a veća prisutnost glicerola u TPS-u smanjuje mogućnost stvaranja čvrstih vodikovih veza između molekula škroba, što dovodi do smanjenja stresa u škrobnoj matrici i povećanja fleksibilnosti materijala. U TPS_Scala_LK, prisutnost LK smanjuje upijanje vlage, što se očituje u manjem udjelu vezane vode. Dodatak LK u TPS, uz glicerol, omogućava dodatnu stabilizaciju strukture škroba, smanjujući njegovu sposobnost apsorpcije vlage, čime dolazi do smanjenja osjetljivosti na promjene u vlažnosti okoliša. To može doprinijeti poboljšanoj toplinskoj stabilnosti u odnosu na prirodni škrob. Daljnjim zagrijavanjem TPS_Scala (temperature između 270 i 330 °C), dolazi do glavne faze razgradnje, u kojoj dolazi do pucanja glikozidnih veza u dugim lancima škroba. Proces uključuje depolimerizaciju, pri čemu se dugi lanci razlažu na kraće fragmente. U temperaturnom intervalu, TPS_Scala pokazuje pomak prema višim temperaturama početka razgradnje u odnosu na prirodni škrob, što je indikacija povećane toplinske stabilnosti zbog omekšavanja. U prirodnom krumpirovom škrobu, višestruka faza razgradnje (višetstruki pikovi na DTG krivulji) ukazuje na pojavu različitih kemijskih reakcija, uključujući stvaranje malih organskih spojeva poput octene kiseline i furfurala. Octena kiselina nastaje uslijed cijepanja acetiliranih skupina u škrobu ili kao nusprodukt razgradnje ostataka šećera, dok furfural nastaje razgradnjom pentoza (vrsta šećera) koje su prisutne u strukturi škroba. S obzirom na to da se radi o hlapljivim i kiselim tvarima, njihovo oslobađanje može negativno utjecati na daljnje procesiranje i primjene materijala. Plastifikacija škroba, osobito dodatkom glicerola ili LK, smanjuje intermolekularne sile među molekulama škroba, povećavajući fleksibilnost materijala

i smanjujući njegovu kristaliničnost. Proces omogućava lakšu formaciju amorfnih struktura koje su manje podložne toplinskoj razgradnji i smanjuju mogućnost stvaranja hlapljivih spojeva poput octene kiseline i furfurala. Ujedno, omekšavanje slabi vodikove veze između škrobnih lanaca, što potiče depolimerizaciju i smanjuje brzinu razgradnje pod visokim temperaturama. Manji udio LK u TPS_Scala može djelovati kao blagi stabilizator, smanjujući stvaranje tih spojeva i odgađajući početak višestupanjske razgradnje. S druge strane, veći udio LK može izazvati povećanu kiselost, što dovodi do brže razgradnje škroba zbog intenzivnije esterifikacije i hidrolize. Ovi kemijski procesi razgrađuju duge škrobne lance na kraće fragmente, što omogućava daljnju razgradnju na organske kiseline poput octene kiseline i furfurala, čime se ponovo pojavljuje višestupanjska razgradnja na DTG krivulji (slika 2). Jednostupanjska toplinska razgradnja PLA (slika 2) odvija se u uskom temperaturnom području od 287 do 363 °C s maksimumom, $T_{\max2}$, pri 345,0 °C. Toplinska razgradnja PLA s gubitkom mase od 98,5 % i neznatnim ostatkom od oko 1 % sukladna je literaturi, a pripisuje se cijepanju krajnjih usporednih lanaca makromolekula PLA.²⁰ Toplinska razgradnja čistog PLA počinje na višoj temperaturi u usporedbi s temperaturom početka razgradnje ispitivanih polimernih mješavina što ukazuje na bolju toplinsku stabilnost PLA u odnosu na TPS_Scala/PLA mješavine različitih omjera (tablica 2).

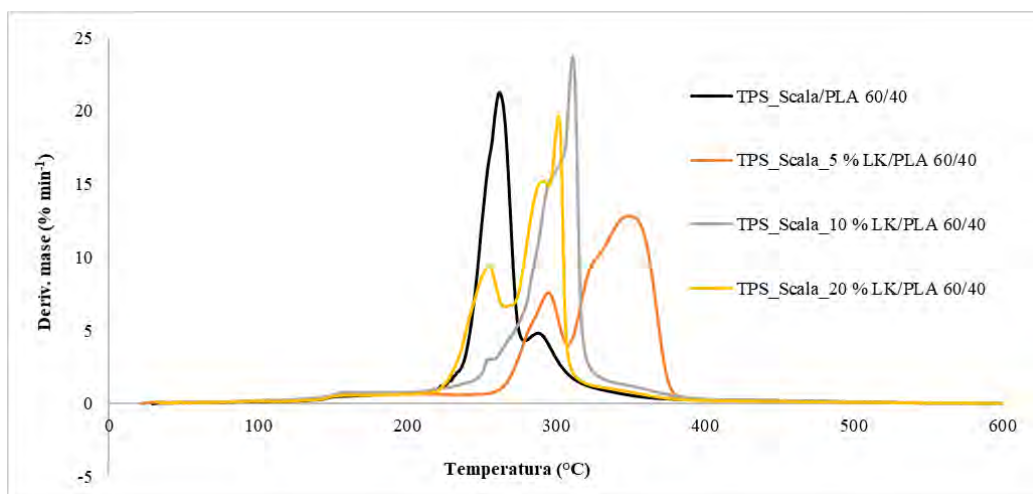
Tablica 2 – Rezultati TGA analize

Table 2 – Results of TGA analysis

Uzorak Samples	T_{onset} (°C)	T_{max1} (°C)	T_{max2} (°C)	T_{kraj} (°C)	$R_{600^{\circ}\text{C}}$ (%)
PLA	287,4	-	345,0	363,4	1,0
TPS Scala	253,4	287,3	-	334,5	7,8
TPS Scala/PLA 60/40	235,3	252,3	293,2	375,3	2,5
TPS Scala/PLA 50/50	259,3	293,7	333,8	394,6	4,3
TPS Scala/PLA 40/60	276,5	310,8	359,6	396,4	5,1
TPS Scala 5 % LK/PLA 60/40	258,7	295,3	354,5	393,6	3,4
TPS Scala 5 % LK/PLA 50/50	229,7	248,3	297,8	371,4	5,1
TPS Scala 5 % LK/PLA 40/60	232,9	308,7	319,2	391,4	5,2
TPS Scala 10 % LK/PLA 60/40	238,4	-	312,8	337,4	5,4
TPS Scala 10 % LK/PLA 50/50	225,7	257,3	288,6	363,4	4,8
TPS Scala 10 % LK/PLA 40/60	234,6	312,4	-	390,2	6,3
TPS Scala 20 % LK/PLA 60/40	222,4	285,4	294,8	324,5	7,3
TPS Scala 20 % LK/PLA 50/50	219,4	228,9	255,6	364,4	6,3
TPS Scala 20 % LK/PLA 40/60	218,4	258,4	276,4	342,5	10,4

Temperature početka razgradnje polimernih mješavina TPS_Scala/PLA nalaze se između temperatura početka razgradnje čistih komponenata i rastu s povećanjem udjela PLA u mješavinama, s iznimkom kod mješavine TPS_Scala/PLA 60/40 (slika 3, tablica 2). Ovakav trend pokazuju i temperature pri maksimalnoj brzini razgradnje pošto se $T_{\max}$ mješavina nalaze između $T_{\max}$ čistih komponenata i vidljiv je rast s porastom udjela PLA u mješavinama. Masa ostatka ($R_{600^{\circ}\text{C}}$) raste s povećanjem udjela TPS_Scala_LK što se pripisuje hidrofilnom karakteru TPS_Scala jer se anorganske nečistoće vežu za molekule vode čime raste i masa ostatka.²⁴

Toplinska razgradnja biorazgradivih polimernih mješavina svih udjela odvija se u širem intervalu u usporedbi s intervalima čistih komponenata. Proširenje intervala ukazuje na sporiju razgradnju polimernih mješavina u odnosu na čiste polimere, a navedeni učinak postaje sve izraženiji s povećanjem udjela TPS_Scala-a u polimernim mješavinama. Rezultati dobiveni termogravimetrijskom analizom čistih komponenti i njihovih mješavina s različitim udjelima pokazuju da porast udjela PLA u mješavinama poboljšava toplinsku stabilnost mješavine, dok porast udjela TPS-a u mješavinama dovodi do smanjenja toplinske stabilnosti (tablica 2). Slika 3 prikazuje DTG krivulje polimernih mješavina TPS_Scala_5 % LK/PLA 60/40, TPS_Scala_10 % LK/PLA 60/40 i TPS_Scala_20 % LK/PLA 60/40. Vidljiva je prisutnost vezane vode, te omekšavala u području od 120-200 °C, koje je manje izraženije pri većem udjelu LK. Toplinska razgradnja ispitivanih polimernih mješavina odvija se u dva jasno vidljiva stupnja, izuzetak je mješavina TPS_Scala_10 % LK/PLA 60/40, gdje se prvi stupanj uočava kao rame na krivulji pri 294 °C, što ukazuje na bolje interakcije i bolju mješljivost. Kod drugih mješavina uočavaju se jasno izraženi maksimumi razgradnje, $T_{\max1}$ i $T_{\max2}$, vezani za razgradnju manje toplinski stabilnog TPS_Scala i drugi stupanj vezan za PLA kao toplinski stabilnija komponenta. Dodatak LK utječe na povećanje oba $T_{\max}$. Veći udio dodatka LK (20 mas. %) ima najmanji utjecaj na $T_{\max}$. Znatn porast T_{kraj} vidljive je kod TPS_Scala_5 % LK/PLA 60/40. Ostatak pri 600 °C ($R_{600^{\circ}\text{C}}$) povećava se dodatkom LK, koji se mogu pripisati anorganskim komponentama kao što su pepeo, soli ili nečistoće prisutne u škrobu ili dodanom LK, mineralnim derivatima koji nastaju tijekom toplinske razgradnje TPS-a u kombinaciji s LK ili ugljičnim ostacima koji se ne razgrađuju u potpunosti u inertnoj atmosferi, odnosno pri nedostatku kisika.¹²

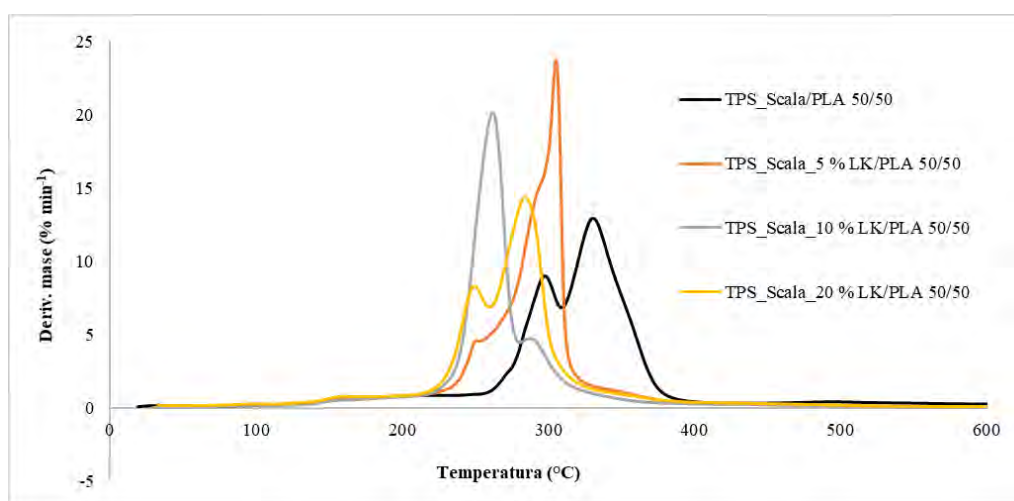


Slika 3 – DTG krivulja TPS_Scala/PLA 60/40 polimernih mješavina sa i bez dodatka LK

Fig. 3 – DTG curve of TPS_Scala/PLA 60/40 polymer blends with i without the addition of CA

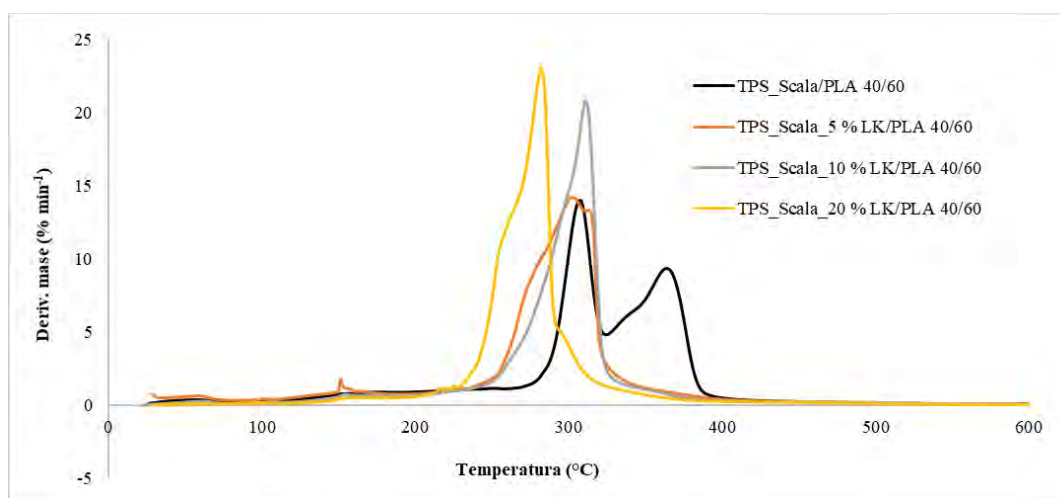
Na slikama 4 i 5 te u tablici 2 vidljivo je da se toplinska razgradnja mješavina TPS_Scala/PLA 50/50 i TPS_Scala/PLA 40/60 s dodatkom 5, 10 i 20 mas. % LK odvija u dva stupnja razgradnje. Ovakav dvofazni proces razgradnje uobičajen je kod polimernih mješavina gdje svaka komponenta doprinosi razgradnom mehanizmu. Istraživanja sugeriraju da dodatak poput LK mogu mijenjati interakcije između polimernih lanaca, što utječe na toplinsku stabilnost i kinetiku razgradnje. Rezultati pokazuju da dodatak LK smanjuje početnu temperaturu razgradnje (T_{onset}), pri čemu je smanjenje toplinske stabilnosti najizraženiji kod mješavina s 20 mas. % LK. To se može povezati s povećanjem mobilnosti polimernih lanaca i mogućom katalizom razgradnje uzrokovanom prisutnošću LK, što je u skladu s nalazima iz literature koji opisuju djelovanje organskih kiselina kao plastifikatora i katalizatora.²⁵ Na primjer, istraživanje *Srisuwan-a i suradnika*²⁵ pokazuje da dodaci poput LK mogu povećati brzinu razgradnje škroba i PLA zbog acidogene interakcije i promjene mikrostrukture polimernih lanaca. S druge strane, kod dodatka 10 mas. % LK uočava se povećanje T_{max1} u usporedbi s vrijednostima kod 5 mas. % LK. Ovo povećanje T_{max1} može biti rezultat uravnoteženijeg omjera između omekšavajućih i razgradnih učinaka LK, što omogućava bolju distribuciju topline unutar polimerne mješavine. Najviša početna temperatura razgradnje (T_{onset}) zabilježena je za mješavinu TPS_Scala/PLA 40/60 (276,5 °C), što je blisko vrijednosti čistog PLA ($T_{\text{onset}} = 287,5$ °C). Veći udio PLA u mješavini doprinosi očuvanju toplinske stabilnosti, budući da PLA ima višu toplinsku stabilnost u usporedbi s TPS_Scala. Prethodne studije također pokazuju da se stabilnost PLA povećava s

višim stupnjem kristaliničnosti i smanjenjem nečistoća ili dodataka koji mogu ubrzati razgradnju. Rezultati ukazuju na složenu međudjelovanje između TPS_Scala, PLA-a i LK, pri čemu koncentracija dodatka i sastav mješavine značajno utječu na toplinska svojstva. Daljnja istraživanja, primjerice analiza kinetike razgradnje ili ispitivanje utjecaja različitih vrsta omekšavala, mogla bi pružiti dodatne uvide u mehanizme razgradnje ovakvih biorazgradljivih polimernih sustava.



Slika 4 – DTG krivulja TPS_Scala/PLA 50/50 polimernih mješavina sa i bez dodatka LK

Fig. 4 – DTG curve of TPS_Scala/PLA 50/50 polymer blends with i without the addition of CA



Slika 5 – DTG krivulja TPS_Scala/PLA 40/60 polimernih mješavina sa i bez dodatka LK

Fig. 5 – DTG curve of TPS_Scala/PLA 40/60 polymer blends with i without the addition of CA

4. Zaključak

Na temelju provedenih analiza može se zaključiti da dodavanje amornog TPS_Scala i LK utječu na toplinska i kristalna svojstva PLA matrice. Rezultati su pokazali promjene u toplinskim svojstvima i kristaliničnoj strukturi mješavina u odnosu na čisti PLA. Dodatak TPS-a uzrokuje sniženje temperature staklastog prijelaza (T_g) te temperature taljenja (T_m), dok se smanjenje temperature hladne kristalizacije (T_{cc}) i povećanje stupnja kristalnosti (χ_c) može pripisati nukleacijskom učinku TPS-a. Snižavanje T_m i T_{cc} ukazuje na poboljšanu pokretljivost polimernih lanaca i bolju mješljivost TPS/PLA polimernih mješavina. Dodatkom LK u udjelima od 5, 10 i 20 mas. % zabilježene su dodatne promjene u toplinskim svojstvima mješavina. Primijećeno je da manji udio LK (do 10 mas. %) poboljšava kristalnost i toplinsku stabilnost polimernih mješavina, dok veći udjeli uzrokuju omekšavanje i smanjenje stupnja kristalnosti zbog povećane pokretljivosti polimernih lanaca i moguće inkompatibilnosti faza. Termogravimetrijska analiza pokazala je da miješanje PLA s TPS_Scala uzrokuje snižavanje temperature početka razgradnje u usporedbi s čistim PLA, ali dodavanje limunske kiseline može poboljšati stabilnost mješavina do određene koncentracije. Veći udio TPS_Scala u mješavini dovodi do proširenja temperaturnog intervala razgradnje, što ukazuje na usporenu razgradnju i bolju toplinsku stabilnost zbog omekšavanja i modifikacije škrobne matrice. Dodatkom amornog TPS_Scala i LK omogućava poboljšanje mješljivosti, fleksibilnosti i kristaliničnosti PLA polimera, uz istovremeno smanjenje temperature prerade, čime se povećava potencijal za upotrebu ovih biorazgradljivih materijala u industrijskim primjenama poput ambalaže. Daljnja istraživanja treba usmjeriti na optimizaciju sastava, uključujući dodatak aditiva radi poboljšanja nemješljivosti PLA i TPS, te na ispitivanje kinetike razgradnje, s ciljem postizanja optimalne kombinacije sastava i željenih svojstava kao ambalažni biorazgradljivi polimerni materijali.

ZAHVALA



Istraživanje je provedeno u sklopu projekta „Proizvodnja i razvoj kompostabilne ambalaže iz otpadne biomase za pakiranje industrijski prerađenih prehrambenih proizvoda” (NPOO.C3.2.R3-II .04.0059) financiranog iz Nacionalnog plana za oporavak i otpornost (financiran od strane Europske unije, NextGenerationEU).

Popis kratica i simbola

TPS - termoplastičnog škroba (*engl. thermoplastic starch*)

PLA - polilaktida (*engl. polylactide*)

LK - limunska kiselina (*engl. citric acid (CA)*)

DSC - diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (*engl. differential scanning calorimetry*)

TGA - termogravimetrijske analize (*engl. thermogravimetric analysis*)

T_g - temperaturu staklastog stanja (*engl. glass transition temperature*) (°C)

T_m - temperaturu taljenja (*engl. melting temperature*) (°C)

T_{cc} - temperatura hladne kristalizacije (*engl. glass transition temperature*) (°C)

χ_c - stupanj kristalnosti (*engl. crystallinity index*) (%)

MFR - brzina protoka taline (*engl. melt flow rate*) (g (10 min)⁻¹)

M_w - molekulska masa (*engl. molecular mass*) (g mol⁻¹)

ΔH_m - entalpija taljenja (*engl. melting enthalpy*) (J g⁻¹)

ΔH_m^0 - entalpija taljenja 100 % kristalnog PLA (*engl. melting enthalpy of 100 % crystalline*)
PLA (J g⁻¹)

ΔH_{cc} - entalpije hladne kristalizacije (*engl. cold crystallization enthalpy*) (J g⁻¹)

T_{onset} - temperatura početka razgradnje (*engl. decomposition onset temperature*) (°C)

T_{max1} , T_{max2} - temperature maksimalne brzine razgradnje (*engl. maximal degradation temperatures*) (°C)

T_{kraj} - temperatura kraja razgradnje (*engl. temperature of the end of decomposition*) (°C)

$R_{600^\circ C}$ - ostatak pri 600 °C (*engl. residue at 600 °C*) (%)

Literatura

1. M. Mihai, M. A. Huneault, B. D. Favis, H. Li, Extrusion foaming of semi-crystalline PLA and PLA/thermoplastic starch blends, *Macromol. Biosci.* **7** (2007) 907-920, doi: <https://doi.org/10.1002/mabi.200700080>.
2. M. Vert, G. Schwarch, J. Coudane, Present and Future of PLA Polymers, *J. Macromol. Sci.* **32** (1995) 787-796, doi: <https://doi.org/10.1080/10601329508010289>.
3. N. Ljungberg, B. Wesslén, Preparation and properties of plasticized poly(lactic acid) films, *Biomacromolecules* **6** (2005) 1789-1796, doi: <https://doi.org/10.1021/bm050098f>.

4. *L. C. Arruda, M. Magaton, S. R. E. Bretas, M. M. Ueki*, Influence of chain extender on mechanical, thermal and morphological properties of blown films of PLA/TPS blends, *Polym. Test.* **43** (2015) 21-35, doi: <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2015.02.005>.
5. *P. Lescher, K. Jayaraman, D. Bhattacharyya*, Water-free blending of thermoplastic starch and polyethylene for rotomoulding, *Starch/Stärke*, **61** (2009) 43-45, doi: <https://doi.org/10.1002/star.200800041>.
6. *W. Ning, Y. Jiugao, M. Xiaofei, H. Chunmei*, High performance modified thermoplastic starch/linear low-density polyethylene blends in one-step extrusion, *Polym. Comp.* **67** (2007) 89-97, <https://doi.org/10.1002/pc.20266>.
7. *H. Yuan, Z. Liu, J. Ren*, Preparation, characterization, and foaming behaviour of poly(lactic acid)/poly(butylene adipate-co-butylene terephthalate) blend, *Polym. Engin. Sci.* **49** (2009), doi: <https://doi.org/10.1002/pen.21287>.
8. *E. Chabrat, H. Abdillahi, A. Rouilly, L. Rigal*, Influence of citric acid and water on thermoplastic wheat flour/poly(lactic acid) blend: Thermal, mechanical and morphological properties, *In. Crop. Prod.* **37** (2012) 238-246, doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.11.034>.
9. *W. M. Kahar, H. Ismail, N. Othoman, A.* Morphology and tensile properties of highdensity polyethylene/natural rubber/thermoplastic tapioca starch blends: The effect of citric acid-modified tapioca starch, *J. Appl. Polym. Sci.* **125** (2012) 768-775, doi: <https://doi.org/10.1002/app.35057>.
10. *V. Ocelić Bulatović, I. Borković, D. Grgić Kučić, A. Jozinović*, Toplinska i mehanička svojstva biorazgradljivih mješavina PLA/TPS, *Chem. Ind.* **67** (2018) 33-42, doi: <https://doi.org/10.15255/KUI.2018.010>.
11. *M. Akrami, I. Ghasemi, H. Azizi, M. Karrabi, M. Seyedabadi*, A new approach in compatibilization of the poly(lactic acid)/thermoplastic starch (PLA/TPS) blends, *Carbohydr. Polym.* **144** (2016) 254-262, doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.02.035>.
12. *A. Salam, J. J. A. Pawlak, R. Venditti, K. El-Tahlawy*, Synthesis and Characterization of Starch Citrate–ChitosanFoam with Superior Water and Saline Absorbance Properties, *Biomacromolecules* **11** (2010) 1453-1459, doi: <https://doi.org/10.1021/bm1000235>.

13. *H. Wu, Y. Lei, J. Lu, R. Zhu, D. Xiao, C. Jiao, M. Li*, Effect of citric acid induced crosslinking on the structure and properties of potato starch/chitosan composite films. *Food Hydrocoll.* (2019) 105208, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105208>.
14. *R. Geyer*, Production, use, and fate of synthetic polymers. *Plast. Waste Recycl.* (2020) 13–32, doi: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817880-5.00002-5>.
15. *K. Martínez-Villadiego, M. J. Arias-Tapia, A. F. Jaramillo*, Improving thermal stability of starches native cross-linked with citric acid as a compatibilizer for thermoplastic starch/polylactic acid blends, *Polym. Bull.* **81** (2024) 13253–13274, doi: <https://doi.org/10.1007/s00289-024-05315-9>.
16. *M. Kovač, B. Ravnjak, D. Šubarić, T. Vinković, J. Babić, Đ. Ačkar, A. Lončarić, A. Šarić, V. Ocelić Bulatović, A. Jozinović*, Isolation and Characterization of Starch from Different Potato Cultivars Grown in Croatia, *Appl. Sci.* **14** (2024) 909, doi: <https://doi.org/10.3390/app14020909>.
17. *M. Kapelko-Z' eberska, K. Buksa, A. Szumny, T. Zięba, A. Gryszkin*, Analysis of molecular structure of starch citrate obtained by a well-established method, *LWT-Food Sci. Technol.* **69** (2016) 334–341, doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.066>.
18. *K. Li, J. Peng, L.-S. Turng, H.-X. Huang*, Dynamic rheological behaviour and morphology of polylactide/poly(butylene adipate-co-terephthalate) blends with various composition ratios, *Adv. Polym. Technol.* **30** (2011) 150–157, doi: <https://doi.org/10.1002/adv.20212>.
19. *V. Ocelić Bulatović, E. Govorčin Bajsić, D. Kučić Grgić, A. Jozinović*, Thermal properties of biodegradable PLA/TPS blends, *Kem. Ind.* **67** (2018) 33–42, doi: <https://doi.org/10.15255/KUI.2018.011>.
20. *D. A. Garlotta*, A Literature Review of Poly(Lactic Acid), *J. Polym. Environ.* **9** (2001) 63–84, doi: <https://doi.org/10.1023/A:1020200822435>.
21. *K. Fukushima, A. Fina, F. Geobaldo, A. Venturello, G. Camino*, Properties of poly(lactic acid) nanocomposites based on montmorillonite, sepiolite and zirconium phosphonate, *Express Polym. Lett.* **6** (2012) 914–926, doi: <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2012.97>.
22. *J. P. Kalish, K. Aou, X. Yang, S. L. Hsu*, Spectroscopic and thermal analyses of α' and α crystalline forms of poly(l-lactic acid), *Polymer* **52** (2011) 814–821, doi: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2010.12.042>.

23. *V. Ocelić Bulatović, D. Kučić Grgić, V. Mandić, M. Miloloža, J. Dybal, V. Gajdosova, M. Slouf*, Biodegradation of LDPE_TPS blends under controlled composting conditions, *Polym. Bull.* **80** (2023) 3331–3357, doi: <https://doi.org/10.1007/s00289-021-03982-6>.
24. *R. Baldev, U. Sankark, K. Siddaramaiah*, Low-Density Polyethylene Starch Blend Films for Food Packaging Applications, *Adv. Polym. Technol.* **23** (2004) 32-45, doi: <https://doi.org/10.1002/adv.10068>.
25. *Y. Srisuwan, P. Srihanam, T. Phromsopa, Y. Baimark*, Effect of citric acid on thermal, phase morphological, and mechanical properties of poly(l-lactide)- b -poly(ethylene glycol)- b -poly(l-lactide)/thermoplastic starch blends. *Polymer* **212** (2021) 123280, doi: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2020.123280>.

Ravnoteža kapljevina-kapljevina u sustavu s butilnim esterom masnih kiselina sintetiziranim iz kokosovog ulja

Liquid-liquid equilibrium in the systems based on fatty acid butyl ester synthesized from coconut oil

Kristina Zagajski Kučan,* Patrik Grahovac, Fabio Faraguna, Marko Rogošić

Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije,

Trg Marka Marulića 19, 10000 Zagreb, Hrvatska

University of Zagreb Faculty of Chemical Engineering and Technology,

Trg Marka Marulića 19, 10000 Zagreb, Croatia

*Autor za dopisivanje: dr. sc. Kristina Zagajski Kučan, kzkucan@fkit.unizg.hr

Sažetak

Suvremeni način života zahtijeva intenzivnu upotrebu motornih vozila, što rezultira velikom potrošnjom naftnih prerađevina. S ekološkog i ekonomskog aspekta teži se razvoju i primjeni lako dostupnog i jeftinog goriva. Kao potencijalna zamjena za fosilna goriva proučava se biodizel sintetiziran iz biljnih ulja (butilni ester masnih kiselina, *eng.* fatty acid butyl ester, FABE). Za njegovu komercijalnu proizvodnju potrebno je dobro projektirati, dimenzionirati i optimirati procesnu opremu za procese sinteze i pričišćavanja. Stoga je potrebno poznavanje ravnoteže između reaktanata i produkata reakcije sinteze biodizela. Ona se temelji na zakonitostima ravnoteže kapljevina-kapljevina. U ovom radu eksperimentalno je određeno i u trokutnom dijagramu prikazano fazno ponašanje u sustavima voda – butanol – FABE, glicerol – butanol – FABE te voda – glicerol – FABE. Uočena je potpuna nemješljivost butanola s biodizelom i glicerolom te djelomična s vodom. U trokomponentnim sustavima butanol se bolje raspodjeljuje u fazi biodizela nego vodenoj ili glicerolnoj fazi. Voda se pokazala učinkovitom za ekstrakcijsko uklanjanje glicerola iz produktne smjese sintetiziranog biodizela.

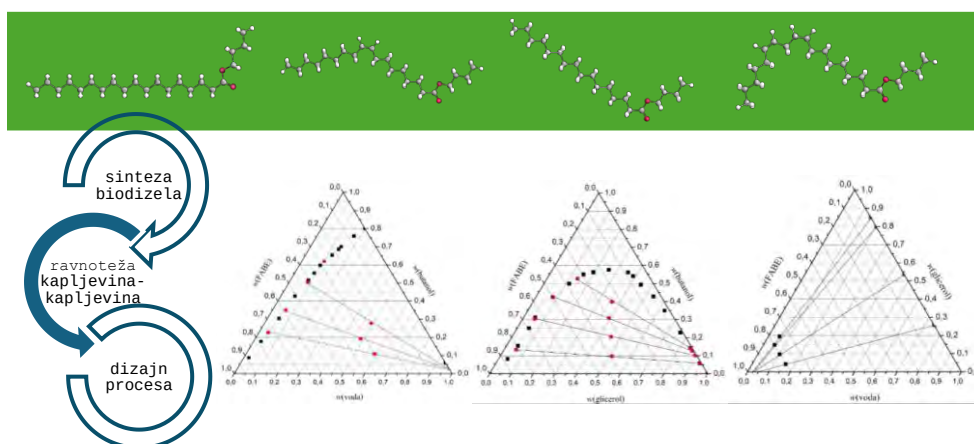
Ključne riječi: *biodizel, butilni ester masnih kiselina, ravnoteža kapljevina-kapljevina, kokosovo ulje*

Abstract

The modern way of life requires intensive use of motor vehicles, resulting in high consumption of petroleum products. From an ecological and economic point of view, the development and application of easily available and cheap fuel is being tested. Biodiesel synthesized from vegetable oils (fatty acid butyl ester, FABE) is being studied as a potential substitute for fossil fuels. For its commercial

production it is necessary properly to design, dimension and optimize process equipment for the synthesis and purification processes. Therefore, knowledge of the equilibrium between reactants and products of the biodiesel synthesis reaction is necessary. It is based on the laws of liquid-liquid equilibrium. In this paper the phase behavior in the systems water – butanol – FAME, glycerol – butanol – FAME and water – glycerol – FAME was experimentally determined and shown in a triangular diagram. Complete immiscibility of butanol with biodiesel and glycerol, and partial with water, was observed. In three-component systems, butanol is better distributed in the biodiesel phase than in the water or glycerol phase. Water proved to be effective for extractive removal of glycerol from the product mixture of synthesized biodiesel.

Key words: *biodiesel, fatty acid butyl ester, liquid-liquid equilibrium, coconut oil*



1. Uvod

Poskupljenje naftnih prerađevina i sve stroži zakoni o emisijama ispušnih plinova neki su od razloga za istraživanja alternativnog goriva čija bi prerada bila jeftina, a sirovine lako dostupne. Kao primjer takvog alternativnog goriva ispituje se i biodizel.^{1,2} Prema kemijskom sastavu biodizel je smjesa alkilnih estera masnih kiselina.³ Nastaje u reakciji transesterifikacije iz biljnih ulja ili životinjskih masti uz prisutnost odgovarajućeg alkohola u suvišku i katalizatora. Glavna prednost biodizela je upotreba jeftinih sirovina u procesu proizvodnje, primarno iz jestivih i nejestivih izvora, otpadnih ulja za kuhanje te otpadnih produkata kod rafiniranja biljnih ulja.^{4,5} Nakon sinteze reakcijska smjesa uz biodizel sadrži glicerol, neizreagirano ulje ili mast te alkohol. Najjednostavniji proces pročišćavanja biodizela je ispiranje vodom kojom se uklanja nastali glicerol.^{6,7} Za odabir procesne opreme i dimenzioniranje procesa sinteze i pročišćavanja biodizela važno je poznavanje fazne ravnoteže u sustavima koji sadrže biodizel i druge komponente reakcijske smjese, s obzirom na to da daju informacije o području sastava međusobne topljivosti komponenata. Dosad su istražene ravnoteže u komercijalno dostupnim biodizelima sintetiziranim iz metilnog i etilnog alkohola.^{8,9} U ovom je radu određena ravnoteža kapljevin-kapljevina u trokomponentnim sustavima dobivenih kombinacijama FABE s vodom, glicerolom i butanolom.

2. Eksperimentalni dio

U ovom radu eksperimentalno su određene mješljivosti dvokomponentnih (voda – butanol, voda – glicerol, butanol – glicerol) i pseudodvokomponentnih sustava (voda – FABE, glicerol – FABE, butanol – FABE) te binodalne krivulje, ravnotežni sastavi i vezne linije pseudotrokomponentnih sustava voda – butanol – FABE, glicerol – butanol – FABE i voda – glicerol – FABE.

2.1. Određivanje mješljivosti dvokomponentnih i pseudodvokomponentnih sustava

Mješljivost dvokomponentnih i pseudodvokomponentnih sustava određena je titracijskom metodom do pojave druge faze. U prethodno izvagano staklenu bočicu (analitička vaga Radwag AS 220.RS s preciznošću $\pm 0,0001$ g) od 10 mL dodana je određena količina prve komponente, bočica je ponovno izvagana te je dodavana druga komponenta kap po kap do pojave zamućenja nakon čega je bočica ponovno izvagana. Iz razlika masa izračunat je maseni udio koji predstavlja točku maksimalne topljivosti.

2.2. Određivanje binodalne krivulje

Binodalna krivulja određena je titracijom dvokomponente ili pseudodvokomponentne smjese trećom komponentom do pojave druge faze u sustavima voda – butanol – FABE i glicerol – butanol – FABE.

U prethodno izvaganu staklenu bočicu od 10 mL dodana je određena količina prve komponente, bočica je izvagana te je dodana određena količina druge komponente nakon čega je bočica ponovo izvagana. Dobivena smjesa titrirana je trećom komponentom do pojave zamućenja nakon čega je bočica izvagana te su iz razlika masa izračunati maseni udjeli sviju komponenata koji predstavljaju točku na binodalnoj krivulji. Skup točaka u cijelom području sastava predstavlja binodalnu krivulju.

2.3. Određivanje ravnotežnih sastava i veznih linija

Ravnotežni sastavi u pseudotrokomponentnim sustavima glicerol – butanol – FABE te voda – butanol – FABE određeni su metodom uparavanja hlapljivije komponente. U prethodno izvaganu staklenu bočicu od 10 mL pripremljena je pseudotrokomponentna nestabilna smjesa dodavanjem određenih količina svih triju komponenata te vaganjem nakon dodavanja svake komponente. Smjesa je miješana magnetskom miješalicom (LLG uniSTIRRER 3 s grijanjem) 30 minuta pri 25 °C i atmosferskom tlaku uz 1500 o min⁻¹, nakon čega je ostavljena da se razdvoje slojevi. 1 mL sloja uparavan je na temperaturi 80 °C do konstante mase što je pokazatelj isparene sve količine hlapljive komponente u uzorku. U sustavu voda – butanol – FABE uparavan je gornji sloj (sloj biodizela) iz kojeg je uklonjen butanol. Iz razlika masa izračunat je udio biodizela u sloju. U sustavu glicerol – butanol – FABE uparavana su oba sloja (sloj biodizela i sloj glicerola) kako bi se uklonio butanol te su iz razlika masa izračunati udjeli glicerola i biodizela u slojevima. Izračunati trokomponentni maseni udjeli predstavljaju ravnotežne sastave faza, a vezne linije dobivene su spajanjem ravnotežnih sastava.

U pseudotrokomponentnom sustavu voda – glicerol – FABE, ravnotežni sastavi određeni su mjerenjem indeksa loma donjeg vodenog sloja na Abbeovu refraktometru (Kern ORT 1RS, mjerni raspon 1,3000 – 1,7000 s točnošću $\pm 0,0002$). Udio glicerola izračunat je pomoću jednadžbe baždarne krivulje određene mjerenjem indeksa loma dvokomponentnih otopina glicerol – voda. Vezne linije dobivene su povlačenjem linije iz ravnotežnog sastava kroz početnu smjesu do odgovarajuće stranice dijagrama.

3. Rezultati i rasprava

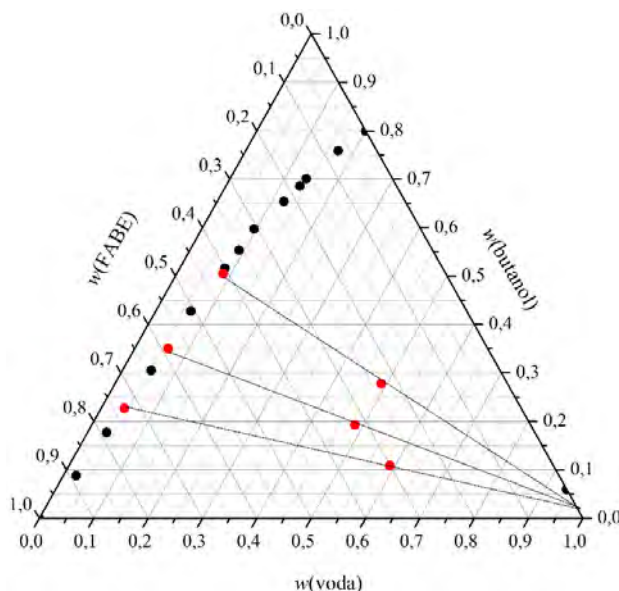
3.1. Mješljivost dvokomponentnih i pseudodvokomponentnih sustava

Određivanjem međusobne mješljivosti komponenata utvrđena je potpuna mješljivost vode i glicerola, glicerola i butanola te butanola i FABE. U pseudodvokomponentnim sustavima

utvrđena je potpuna nemješljivost glicerola i FABE te vode i FABE. U sustavu voda – butanol utvrđeno je područje nemješljivosti između 6,0 i 79,9 % masenog udjela butanola.

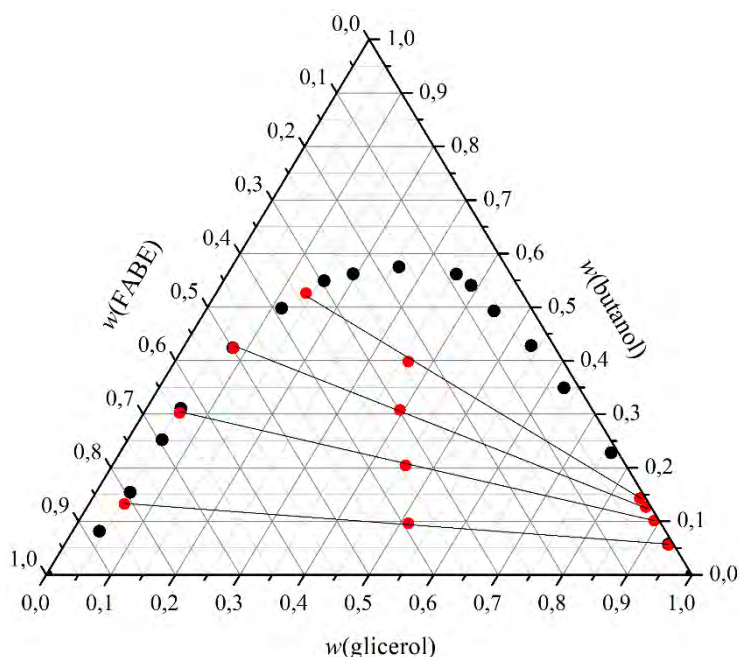
3.2. Binodalna krivulja

Eksperimentalno određena binodalna krivulja u sustavu voda – butanol – FABE prikazana je u trokutnom dijagramu na slici 1. Zbog potpune nemješljivosti biodizela s vodom jedan kraj binodalne krivulje nalazi se u vrhu trokuta čistog biodizela, a drugi kraj binodalne krivulje je točka maksimalne mješljivosti butanola i vode (79,9 % masenog udjela butanola). Područje ispod binodalne krivulje označava djelomičnu mješljivost triju komponenta. Na slici 2 prikazana je binodalna krivulja u sustavu glicerol – butanol – FABE. Zbog potpune nemješljivosti glicerola s butanolom i biodizelom krajevi binodalne krivulje završavaju u vrhovima trokuta čistog biodizela i glicerola. Područje nemješljivosti komponenata doseže do masenog udjela butanola od oko 57,0 % što je manje nego u sustavima s metilnim (do 79,0 % metanola) i etilnim (do 65,0 % etanola) esterima masnih kiselina.^{8,9} Manje područje nemješljivosti može biti razlog mogućim zahtjevnijim procesima pročišćavanja biodizela.



Slika 1 – Trokutni dijagram sustava voda – butanol – FABE. Crne točke – točke binodalne krivulje; crvene točke – početni trokomponentni sastavi; crvene točke na binodalnoj krivulji – ravnotežni sastavi; crne linije – vezne linije.

Fig. 1 – Triangular diagram of the water – butanol – FABE system. Black dots – binodal curve points; red dots – initial three-component compositions; red dots on binodal curve – equilibrium compositions; black lines – tie lines.



Slika 2 – Trokutni dijagram sustava glicerol – butanol – FABE. Crne točke – točke binodalne krivulje; crvene točke – početni trokomponentni sastavi; crvene točke na binodalnoj krivulji – ravnotežni sastavi; crne linije – vezne linije

Fig. 2 – Triangular diagram of the glycerol – butanol – FABE system. Black dots – binodal curve points; red dots – initial three-component compositions; red dots on binodal curve – equilibrium compositions; black lines – tie lines

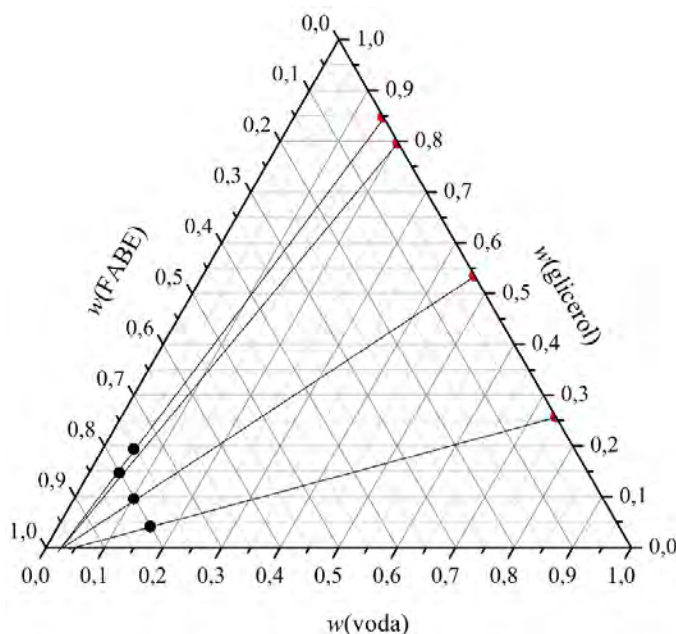
3.3. Ravnotežni sastavi i vezne linije

Uslijed potpune nemješljivosti biodizela s vodom, u sustavu voda – butanol – FABE (slika 1), butanol se raspodjeljuje u dvije faze. Jedna faza bogata je biodizelom, a druga vodom. Nakon uklanjanja butanola (lakše hlapljive komponente) iz faze biodizela, iz razlika masa izračunat je udio teže hlapljive komponente u fazi te je određen ravnotežni sastav faze. Uslijed djelomične mješljivosti butanola i vode (< 6 % butanola) vezne linije završavaju u točki na stranici trokutnog dijagrama butanol – voda. Negativan nagib veznih linija kao i točka maksimalne mješljivosti butanola i vode ukazuje na veću topljivost butanola u fazi biodizela nego u fazi vode pa proizlazi da voda nije pogodno otapalo za uklanjanje alkohola iz smjese s FABE, iako se pokazala pogodnim otapalom u sustavima s biodizelom sintetiziranim iz alkohola s manje ugljikovih atoma.⁸ Uslijed potpune nemješljivosti glicerola i biodizela, u sustavu glicerol – butanol – FABE (slika 2), butanol se raspodjeljuje između dvije faze, faze bogate glicerolom i

faze bogate biodizelom. Uparavanjem butanola određeni su maseni udjeli glicerola i biodizela te ravnotežni sastavi obje faze. Dobivene vezne linije nagnute su prema vrhu trokuta čistog glicerola iz čega se može zaključiti da je butanol topljiviji u biodizelu nego u glicerolu. Nagib veznih linija raste s povećanjem udjela butanola u početnoj pseudotrokomponentnoj smjesi. Pseudotrokomponentni sustav voda – glicerol – FBE (slika 3), uslijed potpune nemješljivosti biodizela s vodom i glicerolom, razdvaja se na dvije faze od kojih je gornja faza biodizel, a donja faza smjesa glicerola i vode. Prema tome je voda vrlo selektivno otapalo za uklanjanje glicerola iz smjese s FBE. Ravnotežni sastav određen je u sloju glicerola i vode; maseni udio glicerola izračunat je iz jednadžbe baždarnе krivulje:

$$w(\text{glicerol}) = 7,5062 \cdot n_{D,25} - 9,9716 \quad (1)$$

uz koeficijent determinacije 0,9995, na temelju refraktometrijski izmjerenih vrijednosti indeksa loma donjeg sloja. Zbog prisutnosti nečistoća u biodizelu koje su topljive u vodenom sloju, vezne linije većeg su nagiba od očekivanog i završavaju na stranici pseudodvokomponentnog sustava voda – FBE.



Slika 3 – Trokutni dijagram sustava voda – glicerol – FBE. Crne točke – početni trokomponentni sastavi; crvene točke na stranici trokuta – ravnotežni sastavi; crne linije – vezne linije.

Fig. 3 – Triangular diagram of the glycerol – butanol – FBE system. Black dots – binodal curve points; red dots – initial three-component compositions; red dots on triangle side – equilibrium compositions; black lines – tie lines.

4. Zaključak

U ovom radu eksperimentalno je određena ravnoteža kapljevina-kapljevina pri 25 °C u trokomponentnim sustavima s butilnim esterom masnih kiselina (FABE) sintetiziranim iz kokosovog ulja, i njegovim kombinacijama s butanolom, glicerolom i vodom. Glicerol je potpuno mješljiv s vodom i butanolom. Voda i butanol djelomično su mješljivi. FABE je nemješljiv s vodom i glicerolom, ali je potpuno mješljiv s butanolom. U trokomponentnom sustavu glicerol – butanol – FABE utvrđena je veća topljivost butanola u biodizelu nego u glicerolu. Područje nemješljivosti komponenata se smanjuje s porastom alkilnog lanca alkohola za sintezu biodizela ($C_4 < C_2 < C_1$), uspoređujući rezultate ovog istraživanja s literaturnim podacima za FAME i FAEE.^{8,9} Voda se pokazala prikladnim otapalom za potpuno uklanjanje glicerola iz smjese s FABE.

Popis kratica i simbola

FABE - butilni ester masnih kiselina (*engl. fatty acid butyl ester*)

p.a. - lat. *pro analysis*

w - maseni udio (*engl. mass fraction*)

$n_{D,25}$ - indeks loma pri 25 °C (*engl. refractive index at 25 °C*)

Literatura

1. J. E. Fargioni, R. J. Plevin, J. D. Hill, The ecological impact of biofuels, *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **41** (2010) 351–377, doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-102209-144720>.
2. S. Jaichandar, K. Annamalai, The status of biodiesel as an alternative fuel for Diesel engine – An overview, *J. Sustain. Energy Environ.* **2** (2011) 71–75, <https://www.thaiscience.info/journals/Article/JOSE/10889665.pdf>.
3. M. C. Sekhar, V. R. Mamilla, K. Vijayakumar Reddy, G. Lakshmi Narayana Rao, Synthesis of biodiesel, *Int. J. Eng. Sci. Technol.* **8** (2010) 3936–3941, https://www.researchgate.net/publication/50346095_Synthesis_of_biodiesel.
4. D. Singh, D. Sharma, S. L. Soni, S. Sharma, P. Kumar Sharma, A. Jhalani, A review on feedstocks, production processes, and yield for different generations of biodiesel, *Fuel* **262** (2009) 116553, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.116553>.

5. URL: <https://kumarmetal.com/biodiesel-raw-materials-manufacturing-processes/> (13. 11. 2024.)
6. URL: <https://repozitorij.fkit.unizg.hr/islandora/object/fkit%3A769/datastream/PDF/view> (24. 10. 2024.)
7. *I. M. Atadashi, M. K. Aroua, A. R. Abdul Aziz, N. M. N. Sulaiman*, Refining technologies for the purification of crude biodiesel, *Appl. Energy* **88** (2011) 4239–4251, doi: <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.05.029>.
8. *R. C. Basso, F. Miyake, A. J. de Almeida Meirelles*, Liquid-liquid equilibrium data and thermodynamic modeling at $T/K = 298.2$, in the washing step of ethyl biodiesel production from crambe, fodder radish and macauba pulp oils, *Fuel* **117** (2014) 590–597, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.09.020>.
9. *M. A. Mazutti, F. Voll, L. Cardozo-Filho*, Thermophysical properties of biodiesel and related systems: (Liquid+liquid) equilibrium data for soybean biodiesel, *J. Chem. Thermodyn.* **58** (2013) 83–94, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jct.2012.10.026>.

- **PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA
I BIOTEHNOLOGIJA**
***FOOD TECHNOLOGY AND
BIOTECHNOLOGY***



Korelacija udjela čvrstih triglicerida i reoloških svojstava smjesa biljnih masti i ulja pri 25 °C i 30 °C

Correlation of solid fat content and rheological properties of vegetable fats and oils mixtures at 25 °C and 30 °C

Amanda Dorner, Zvonimir Ladešić,* Juraj Tonković

Zvijezda plus d.o.o., Marijana Čavića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska (Croatia)

*Autor za dopisivanje: Zvonimir Ladešić, dipl ing chem teh, zvonimir.ladesic@zvijezda.hr

Sažetak

Funkcionalnost masti u hrani određena je ukupnom količinom kristaliziranih masti, mjereno kao udio čvrstih triglicerida (SFC). U industrijskim uvjetima je viskoznost masti i ulja pri određenim temperaturama jedan od ključnih čimbenika koje je potrebno uzeti u obzir prilikom projektiranja, planiranja i provedbe tehnoloških procesa.

Cilj ovog rada bio je utvrditi postoji li korelacija između navedenih fizikalnih svojstava masne smjese. Pripremljene su binarne i ternarne smjese ulja i masne sirovine različitog sastava (suncokretovo ulje, palmin stearin, palmino ulje) u poznatim omjerima. Postotak mase triglicerida u čvrstom stanju izmjeren je impulsnom nuklearnom magnetskom rezonancijom (p-NMR) pri 25 °C i 30 °C. Dinamička viskoznost je određena rotacionim viskozimetrom (Modular Compact Rheometer MCR 52, Anton-a Paar) s koncentričnim cilindrom nazubljene površine (CC27S) pri istim temperaturama. Kako se radi o newtonovskom fluidu, viskoznost pri datoj temperaturi je konstantna, te je prikazana međuovisnost varijabli. Uočen je trend linearnog rasta viskoznosti s porastom udjela čvrstih triglicerida pri 25 °C i 30 °C, uz R^2 vrijednosti 0,98 (25 °C) i 0,96 (30 °C).

Ključne riječi: reologija, viskoznost, rotacioni viskozimetar, p-NMR, SFC

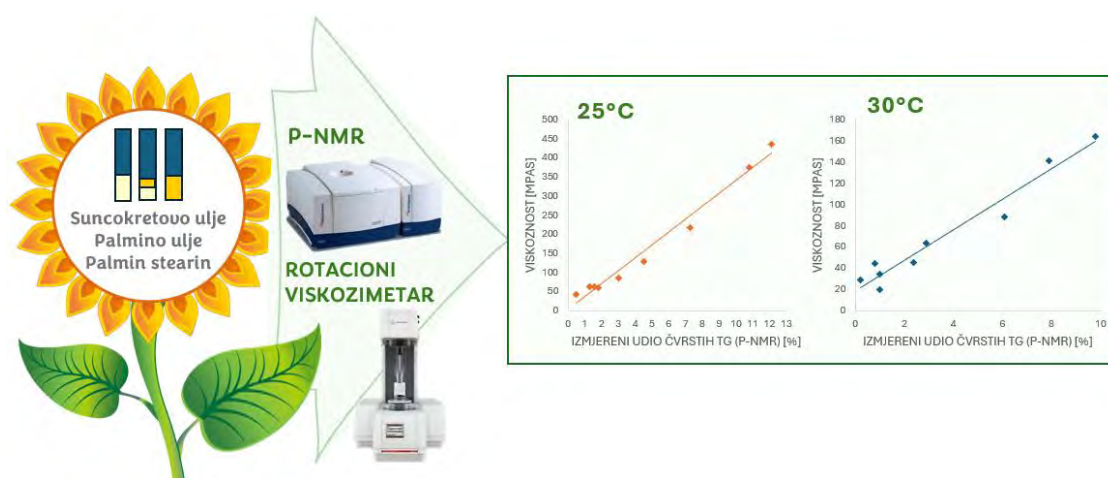
Abstract

The functionality of fat in food is determined by the total amount of crystallized fat, measured as the proportion of solid fat triglycerides (SFC). In industrial conditions, the viscosity of fats and oils at certain temperatures is one of the key factors that must be considered when designing, planning and implementing technological processes.

The aim of this work was to determine whether there is a correlation between the mentioned physical properties of the fat mixture. Binary and ternary mixtures of oils and fatty raw materials of different composition (sunflower oil, palm stearin, palm oil) were prepared in known proportions. The mass

percentage of triglycerides in the solid state was measured by pulsed nuclear magnetic resonance (p-NMR) at 25 °C and 30 °C. Dynamic viscosity was determined by a rotary viscometer (Modular Compact Rheometer MCR 52, Anton Paar) with a concentric cylinder with a serrated surface (CC27S) at the same temperatures. As it is a Newtonian fluid, the viscosity at a given temperature is constant, and the interdependence of variables is shown. A trend of linear increase in viscosity was observed with an increase in the proportion of solid triglycerides at 25 °C and 30 °C, with R^2 values of 0.98 (25 °C) and 0.96 (30 °C).

Key words: *rheology, viscosity, rotary viscometer, p-NMR, SFC*



1. Uvod

Ukupna količina kristaliziranih masti izražava se kao udio čvrstih triglicerida (SFC) i jedan je od važnijih pokazatelja funkcionalnosti masnoća.¹ Prilikom projektiranja, planiranja i provedbe tehnoloških procesa u industrijskim uvjetima, viskoznost masti i ulja pri određenim temperaturama jedan je od ključnih čimbenika koje je potrebno uzeti u obzir.² Na teksturu prehrambenih proizvoda na bazi masti u velikoj mjeri utječe struktura i mehanička svojstva umreženih kristala masti.³ Ova svojstva kvalitete uključuju npr. mazivost margarina, maslaca i namaza kao i lom čokolade, pa je očigledno da je iznimno važno pokušati predvidjeti ta svojstva.⁴ U radu na razvoju novih proizvoda koji uključuju ulja i masti, profil odnosno udio čvrstih triglicerida (SFC) vrlo je važan parametar koji se koristi za procjenu prihvatljivosti pojedine masti ili smjese (blende) masti i ulja za određenu primjenu.⁵ Na mehanička svojstva jestivih masti mogu utjecati razni faktori uključujući SFC profil, polimorfizam čvrstog stanja kao i mikrostruktura mreže kristalnih čestica.^{6,7} Viskoznost ulja je također važan faktor za migraciju ulja prema Fickovom drugom zakonu, ali utjecaj prirode kristalne umreženosti na viskoznost tekućeg ulja u ograničenom prostoru još nije dovoljno dobro razumljiva. Općenito viskoznost ulja može se procijeniti koristeći rotacione viskozimetre ili reometre. Proučavani su različiti fizikalni parametri koji utječu na mobilnost ulja kao npr. čvrste čestice, temperatura i kristalna struktura masti.^{8,9,10} Ipak struktura kristala masti može se deformirati pa čak i uništiti zbog smicanja i sabijanja.^{11,12} Tekstura odnosno čvrstoća masti ili smjese masti i ulja važno je svojstvo koje značajno utječe na dojam o teksturi prehrambenih proizvoda.¹³ Sadržaj čvrstih triglicerida (SFC) značajno utječe na mehaničko ponašanje masti, ali oslanjanje samo na SFC kako bi se predvidjela čvrstoća pokazalo se nepouzdanim.

U ovom radu proučavana je korelacija između fizikalnih svojstava viskoznosti i udjela čvrstih triglicerida (SFC) za neke binarne i ternarne smjese palminog ulja (PO), palminog stearina (PS) i suncokretovog ulja (SU).

2. Eksperimentalni dio

2.1. Materijali

Za ovo istraživanje korišteni su komercijalni uzorci rafiniranog, dekoloriranog i deodoriziranog palminog ulja (PO), palminog stearina (PS) i suncokretovog ulja (SU) iz tvornice ulja i masti Zvijezda plus d.o.o. Zagreb, Hrvatska.

2.2. Priprema uzoraka

Pripremljene su binarne smjese (w/w) i ternarne smjese (w/w/w) palminog ulja, palminog stearina i suncokretovog ulja u sastavima odnosno omjerima prikazanim u tablici 1.

Tablica 1 – Sastav analiziranih uzoraka odnosno masnih blendi (MB)

Table 1 – Composition of analysed samples or fat blend (MB)

Uzorak	Udio suncokretovog ulja	Udio palminog ulja	Udio palminog stearina
MB 1	95 %	-	5 %
MB 2	90 %	-	10 %
MB 3	80 %	-	20 %
MB 4	70 %	-	30 %
MB 5	75 %	-	25 %
MB 6	50 %	50 %	-
MB 7	45 %	50 %	5 %
MB 8	45 %	40 %	15 %
MB 9	90 %	10 %	-
MB 10	75 %	25 %	-

Binarne i ternarne smjese pripremljene su otapanjem svake vrste masti odnosno ulja na 80 °C i njihovim međusobnim miješanjem u staklenim posudama prema unaprijed zadanim omjerima. Vrijeme miješanja bilo je 15 minuta na 60 °C, a ukupna količina svake smjese iznosila je 0,5 kilograma. Sve blende su statički kristalizirane u zamrzivaču na -25 °C kroz 20 minuta, a zatim su temperirane na 15 ± 0,5 °C u vremenu od 48 sati. Ovim načinom pripreme uzoraka pokušalo se simulirati hlađenje na industrijskom izmjenjivaču topline sa brišucom površinom. Svi uzorci pripremljeni su u istom danu od iste serije masnih sirovina, kako bi se eliminirala pogreška varijacije udjela čvrstih triglicerida sirovine. Utvrđena je neispravnost količine dodanih sirovina prilikom pripreme uzorka MB 7, te je isti izuzet iz svih analiza. Naknadna priprema istog uzorka uključila bi potencijalnu pogrešku uslijed nemogućnosti osiguravanja istih uvjeta. Iz tog razloga, analize su provedene na 9 preostalih uzoraka.

2.3 Udio čvrstih triglicerida (SFC profil)

Za određivanje sadržaja odnosno udjela čvrstih triglicerida korišten je pulsni NMR spektrometar (Minispec-pc120; Bruker, Karlsruhe, Germany). Profil sadržaja čvrstih triglicerida mjereno je prema modificiranoj ISO8292 metodi (ISO 8292-1:2008). Uzorci su 20 minuta grijani na 80 °C, kako bi se izbrisala kristalna povijest, i temperirani na 60 °C minimalno 5 minuta, zatim držani na 0 °C kroz 60 minuta i konačno kroz minimalno 30 minuta temperirani na 25 °C i 30 °C prije analiza. Navedena modificirana metoda validirana je te se svakodnevno

primjenjuje za određivanje udjela čvrstih triglicerida u laboratoriju Zvijezde Plus d.o.o. Podaci su dobiveni i analizirani koristeći programski paket instaliran od strane proizvođača instrumenta. Automatska kalibracija vršila se na dnevnoj bazi koristeći 3 standarda (isporučeni od strane Bruker-a) koji su sadržavali 0,0, 31,2 i 73,3 % čvrstih triglicerida.

2.4. Mjerenje dinamičke viskoznosti

Dinamička viskoznost određena je rotacionim viskozimetrom (Modular Compact Rheometer MCR 52 Anton Paar sa koncentričnim cilindrom nazubljene površine CC27S pri istim temperaturama. Svi uzorci temperirani su na sobnoj temperaturi (23 °C) 72 sata, te termostatirani 1 sat na 25 °C tj. 30 °C. Za analizu je korištena metoda preporučena za određivanje reoloških svojstava newtonovskih fluida. Uvjeti određivanja nisu korigirani, te su navedeni u tablici 2. Temperatura mjerenja postavljena je na uređaju prije početka mjerenja na 25 °C tj. 30 °C. Provedena su 3 paralelna mjerenja za svaki uzorak pri datim temperaturama.

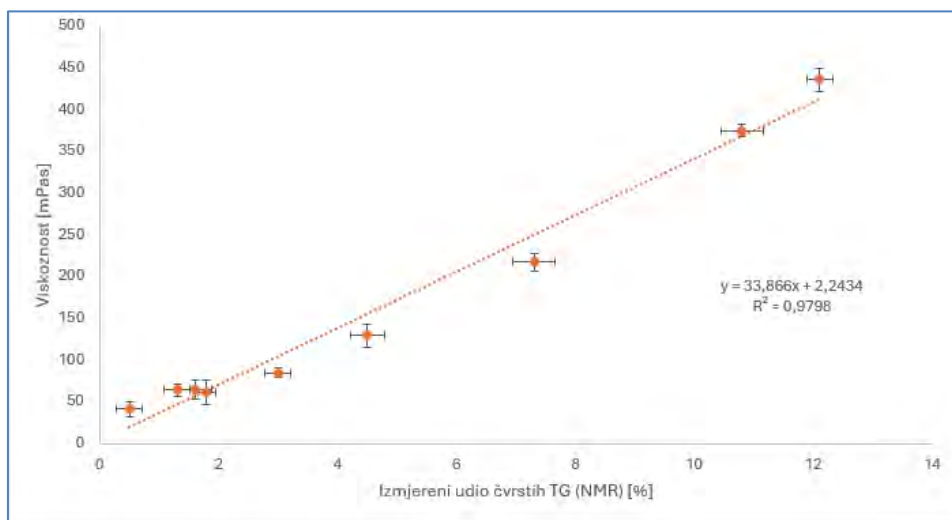
Tablica 2. Uvjeti određivanja viskoznosti

Table 2. Viscosity Determination Conditions

Mjerni interval		Smična brzina	
Broj točaka	100	Profil	Linearno uvećanje
Vrijeme mjerenja	Linearno uvećanje	Početna brzina	1 s ⁻¹
Početni interval između točaka	10 s	Završna brzina	100 s ⁻¹
Završni interval između točaka	1 s		

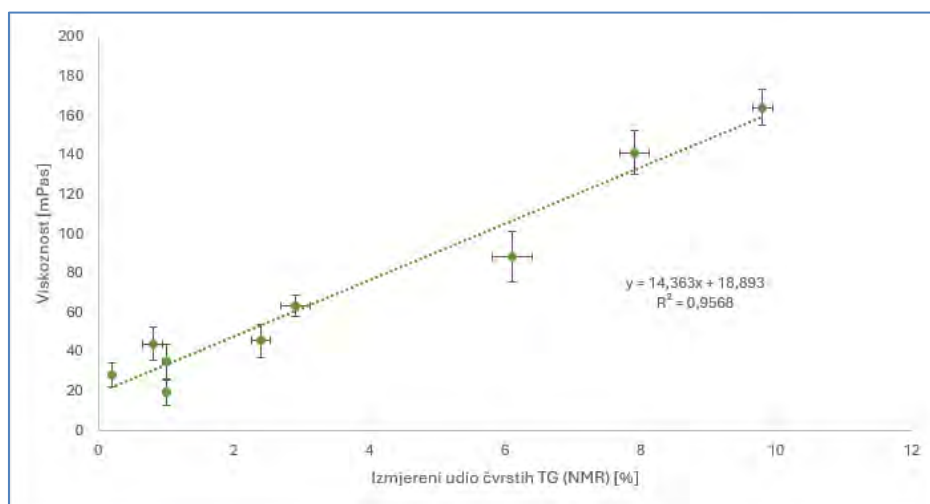
3. Rezultati i rasprava

Svi prikazani rezultati prosječne su vrijednosti na osnovu tri mjerenja. Proizvoljno je definirano da će se testiranje provesti na 2 temperaturna režima, te su izabrane središnje točke intervala. Nadalje, određivanje viskoznosti na 20 °C i niže, zahtijevalo bi promjenu metode kod masnih blendi s većim udjelom čvrstih triglicerida, kako se viskoznost krutina na datom uređaju određuje na paralelnim pločama, a ne pomoću koncentričnih cilindara. Razlike SFC vrlo su očekivane u ovom temperaturnom intervalu 25 – 30 °C, kako se temperatura blende približava točki tališta masnih sirovina, što se kako je ustanovljeno ovim pokusom također manifestira i na viskoznost.



Slika 1 - Ovisnost udjela čvrstih triglicerida (TG) na 25 °C o dinamičkoj viskoznosti na 25 °C za binarne i ternarne smjese PO, PS i SU (PO-palmino ulje; PS-palmin stearin; SU-suncokretovo ulje)
Fig. 1 - Relation between SFC profile at 25 °C and dynamic viscosity at 25 °C for binary and ternary blends of PO, PS and SU (PO-palm oil; PS-palm stearine; SO-sunflower oil)

Slika 1 prikazuje ovisnost dinamičke viskoznosti o izmjerenom udjelu čvrstih triglicerida na 25 °C za svih 9 binarnih i ternarnih kombinacija palminog ulja, palminog stearina i suncokretovog ulja. Kao što je vidljivo iz slike 1 porastom vrijednosti čvrstih triglicerida gotovo linearno raste ($R^2=0,9798$) i vrijednost dinamičke viskoznosti u svim blendama odnosno mješavinama.



Slika 2 - Ovisnost udjela čvrstih triglicerida (TG) na 30 °C o dinamičkoj viskoznosti na 30 °C za binarne i ternarne smjese PO, PS i SU (PO-palmino ulje; PS-palmin stearin; SU-suncokretovo ulje)
Fig. 2 - Relation between SFC profile at 30 °C and dynamic viscosity at 30 °C for binary and ternary blends of PO, PS and SU (PO-palm oil; PS-palm stearine; SO-sunflower oil)

Slika 2 prikazuje ovisnost dinamičke viskoznosti o izmjerenom udjelu čvrstih triglicerida na 30 °C za svih 9 binarnih i ternarnih kombinacija palminog ulja, palminog stearina i suncokretovog ulja. Kao i kod slike 1 i na slici 2 porastom vrijednosti čvrstih triglicerida gotovo linerano ($R^2=0,9568$) raste i vrijednost dinamičke viskoznosti u svim blendama odnosno mješavinama. Pri razvoju proizvoda na bazi ulja i masti, tekstura, viskoznost i udio čvrstih triglicerida (SFC profil) su vrlo važni parametri za definiranje pogodnosti pojedine masne sirovine ili njihove smjese u konačnom proizvodu. Udio čvrstih triglicerida, pri konstantnoj temperaturi, konstantna je vrijednost. Kako se radi o newtonovskim fluidima i viskoznost pri datoj temperaturi je konstantna.^{2,14} Pravac pri 25 °C idealnije opisuje linearnu korelaciju uz R^2 vrijednost 0,9798, u usporedbi sa R^2 (30 °C) od 0,9568. Također trebalo bi obratiti pozornost na koeficijente smjera pravca, iz čega slijedi da dolazi do značajnije promjene viskoznost masnih blendi u ovisnosti o SFC pri 25 °C, nego pri 30 °C. Iz toga slijedi da dobivana korelacija vrijedi isključivo uz konstantan parametar temperature. U literaturnom pregledu ustanovljeno je da nije dostupno mnogo sličnih studija. Kristalne rešetke razlikuju se ovisno o vrsti i udjelu komponenata te uvjetima kristalizacije. Slična istraživanja provedena na drugačijim smjesama masti tako dakle mogu rezultirati potpuno drugačijom slikom. *Liang i sur.*¹⁵ postavili su empirijske modele koji su adekvatno korelirali reološka svojstva lipidnih mješavina sa SFC i gustoćom mikrostrukture. Također je eksperimentalno utvrđeno kako je SFC imao veliki utjecaj na reološka svojstva mjerena testovima kompresijske penetracije analizatorom teksture.¹⁵ Ranija istraživanja provedena u sklopu istraživačko-razvojnog projekta Zvijezde plus d.o.o. također ukazuju da se povećanjem udjela čvrste komponente (PO i PS) u smjesama PO/SO i PS/SO povećavala čvrstoća kao i SFC vrijednost uz izuzetak smjesa sa udjelom PS većim od 50 %.¹⁶ Kada govorimo o korelaciji viskoznosti smjesa biljnih i masti i ulja sa SFC-om, mjerenja provedena od strane *Tecuanhuey i sur.*¹⁷ na biljnim mastima i uljima, kao i na smjesama masti i ulja koje uključuju suncokretovo, repičino ulje, te kakaov i shea maslac i shea stearin, ukazuju da viskoznost visoke brzine smicanja na 30 °C nije visoko povezana sa SFC-om na 30 °C.¹⁷ Naša saznanja ukazuju kako istraživanja korelabilnosti SFC i viskoznosti na smjesama masti i ulja koje uključuju palmin stearin, palmino ulje i suncokretovo ulje pri konstantnoj temperaturi nisu do sada provedena. Nedostatak ovog istraživanja svakako uključuje mali uzorak iz čega se teško može pretpostaviti reološko ponašanje smjesa biljnih masti i ulja izvan opsega izmjerene udjela čvrstih triglicerida. Nadalje, potrebno je mjerenja ponoviti kako bi se testirala ponovljivost rezultata. Također, ova metoda mjerenja dinamičke

viskoznosti može dovesti do uništavanja i deformacije kristala masti, što može utjecati na pouzdanost mjerenja.

4. Zaključak

Proučavanje međusobnih odnosa vrijednosti dinamičke viskoznosti i sadržaja čvrstih triglicerida (SFC profil) za binarne i ternarne smjese palminog ulja, palminog stearina i suncokretovog ulja, kroz ispitivanja u ovom radu, utvrđen je trend linearnog rasta dinamičke viskoznosti sa porastom udjela čvrstih triglicerida mjerenih pri 25 °C i 30 °C. Navedene korelacije potencijalno se mogu koristiti kao model za predviđanje jednog fizikalnog svojstva (dinamičke viskoznosti) smjese palminog ulja, palminog stearina i suncokretovog ulja na temelju analitičkih rezultata za drugo svojstvo (udio čvrstih triglicerida) i obrnuto. Potencijalnu primjenjivost ovih korelacija pri vođenju i korekciji tehnoloških procesa, te kontroli kvalitete gotovih i polugotovih proizvoda bit će potrebno potvrditi kroz daljnje eksperimente.

ZAHVALA

Ovim putem zahvaljujemo se svim kolegama koji su sudjelovali na bilo koji način u ovom radu kao i Zvijezdi plus d.o.o. na osiguranim materijalima i resursima.

Popis kratica i simbola

SFC udio čvrstih triglicerida (*engl. Solid Fat Content*)

p-NMR pulsna nuklearna magnetska rezonanca (*engl. pulsed Nuclear Magnetic Resonance*)

PO palmino ulje (*engl. palm oil*)

PS palmin stearin (*engl. palm stearine*)

SU suncokretovo ulje (*engl. sunflower oil*)

MB masna blenda (*engl. fat blend*)

Literatura

1. M. Teles dos Santos, V. Gerbaud, G. A. C. Le Roux, Solid Fat Content of vegetable oils and simulation of interesterification reaction: Predictions from thermodynamic approach, J. Food Eng. **126** (2014) 198–205, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.11.012>.

2. *B. E. Rapp*, Microfluidics: Modeling, Mechanics and Mathematics. Elsevier, 2017, str. 243-263.
3. *A. G. Marangoni*, Special issue of FRI—crystallization, structure and functionality of fats, *Food Res. Int.* **35** (2002), 907–908, doi: [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(02\)00152-7](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(02)00152-7).
4. *S. S. Narine, A. G. Marangoni*, Fractal nature of fat crystal networks, *Phys. Rev. E* **59** (1999a) 1908–1920, doi: <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.59.1908>.
5. *I. Noraini, M. S. Embong, A. Aminah, A. R. Md.Aliand, C. H. Che Maimon*, Physical characteristics of some shortenings based on modified palm oil, milk fat and low melting milk fat fraction, *Fat Sci. Technol.* **7** (1995) 253-260, doi: <https://doi.org/10.1002/lipi.19950970704>.
6. *S. S. Narine, A. G. Marangoni*, Microscopic and rheological studies of fat crystal networks, *J. Cryst. Growth* **198/199** (1999b) 1315–1319.
7. *S. S. Narine, A. G. Marangoni*, Relating structure of fat crystal networks to mechanical properties: a review, *Food Res. Int.* **32** (1999c) 227–248.
8. *J. M. Aguilera, M. Michel, G. Mayor*, Fat Migration in Chocolate: Diffusion or Capillary Flow in a Particulate Solid? A Hypothesis Paper, *J. Food Sci.* **69** (2006) 167-174, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb13615.x>.
9. *V. Ghosh, G. R. Ziegler, R. C. Anantheswaran*, Fat, moisture, and ethanol migration through chocolates and confectionary coatings, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **42** (2002) 583-626, doi: <https://doi.org/10.1080/20024091054265>.
10. *P. Altimiras, L. Pyle, P. Bouchon*, Structure–fat migration relationships during storage of cocoa butter model bars: Bloom development and possible mechanisms, *J. Food Eng.* **80** (2007) 600–610, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.06.022>.
11. *S. Rønholt, A. S. Madsen, J. J. K. Kirkensgaard, K. Mortensen, J. C. Knudsen*. Effect of churning temperature on water content, rheology, microstructure and stability of butter during four weeks of storage, *Food Struct.* **2** (2014) 14-26, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2014.07.001>.
12. *W. Kloek, T. van Vliet, P. Walstra*, Large deformation behavior of fat crystal network, *J Texture Stud.* **36** (2005) 516-543, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2005.00030.x>.

13. *N. Brunello, S. E. Mc Gauley, A. G. Marangoni*, Mechanical properties of cocoa butter in relation to its crystallization behavior and microstructure, *LWT*. **36** (2003) 525-532, doi: [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(03\)00053-7](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(03)00053-7).
14. *J. van Duynhoven, I. Dubourg, G. J. Goudappe, E. Roijers*, Determination of MG and TG phase composition by time-domain NMR, *JAOCs*. **79** (2002) 383–388, doi: <https://doi.org/10.1007/s11746-002-0493-7>.
15. *A. Liang, Y. Shi, R. W. Hartel*, Correlation of Rheological and Microstructural Properties in a Model Lipid System, *JAOCs*. **85** (2008) 397-404, doi: <https://doi.org/10.1007/s11746-008-1213-2>.
16. *Z. Ladešić, S. Maričić Tarandek, J. Cvetko*, Određivanje teksture (čvrstoće) i SFC profila binarnih i ternarnih smjesa palminog ulja, palminog stearina i sojinog ulja, International Scientific and Professional Conference 15th Ružička days (2014) 253-258.
17. *M. Tecuanhuey, A. Girardi, L. Corrà, J. B. Descarrega, L. Sagalowicz, M. Devezeaux de Lavergne*, Understanding mechanisms behind the oily mouthcoating perception of pure vegetable oils using tribology, *J. Texture Stud.* **55** (2024), e12829, doi: <https://doi.org/10.1111/jtxs.12829>.

Valorization potential of Italian Ryegrass and Reed Canarygrass based on proximate, carbohydrate and phenolics composition

Potencijal valorizacije talijanskog ljulja i blještca određivanjem osnovnog sastava, ugljikohidrata i fenolnih spojeva

Aleksandra Vojvodić Cebin,^{a*} Danijela Šeremet,^a Ana Mandura Jarić,^a

Cléa Normand-Dubeau,^b Solenn Eude,^c Draženka Komes^a

^a University of Zagreb Faculty of Food Technology and Biotechnology,

Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

^b Institute Agro Dijon, 26 Boulevard du Docteur Petitjean, 21000 Dijon, France

^c Polytech Clermont Campus Universitaires des Cézeaux, 2 Av. Blaise Pascal, 63000 Aubière, France

*Corresponding author: Aleksandra Vojvodić Cebin, PhD, aleksandra.vojvodic@pbf.unizg.hr

Abstract

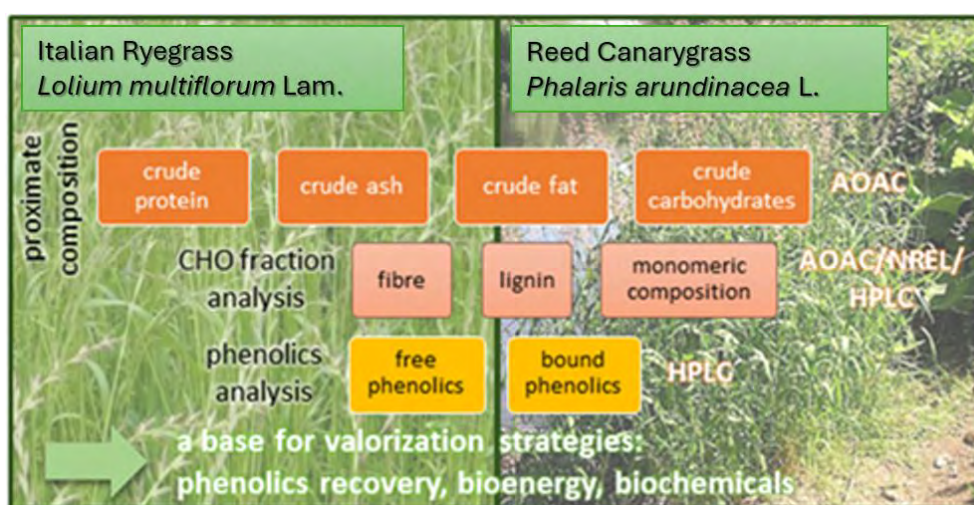
Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam., IRG) and reed Canarygrass (*Phalaris arundinacea* L., RCG) are plant species within the Poaceae family, mainly cultivated for animal feed, especially IRG. Biomass of both species can be characterized as lignocellulose. Recently, these materials are increasingly being investigated for their valorization potential as novel industrial feedstocks, primarily for the production of bioenergy and biochemicals. The recovery of initially present bioactive compounds (phenolics) is still understudied. The aim of this work to set a base for determining the valorization strategies of Italian Ryegrass and Reed Canarygrass in terms of proximate composition, with special emphasis on the carbohydrate fraction, and the content of phenolics. The proximate composition included dry matter-based crude protein, fat, ash, and carbohydrate contents, while the carbohydrate fraction was further analyzed for fibre, lignin and monomeric composition. Free and bound phenolic compounds were determined with Folin-Ciocalteu reaction and individually by HPLC-DAD. This study presents a valuable reference work, especially for the characterization of phenolics.

Key words: *carbohydrates, Italian Ryegrass, phenolics, proximate composition, Reed Canarygrass, valorization*

Sažetak

Talijanski ljulj (*Lolium multiflorum* Lam., IRG) i trstasti blještac (*Phalaris arundinacea* L., RCG) su biljne vrste iz porodice Poaceae koje se često uzgajaju za hranidbu životinja, posebice talijanski ljulj. Biomasa obje vrste može se okarakterizirati kao lignoceluloza. U novije vrijeme, lignocelulozni materijali intenzivno se istražuju zbog svog valorizacijskog potencijala, kao nove, zanimljive industrijske sirovine za proizvodnju bioenergije i biokemikalija. Izdvajanje i uporaba fenolnih spojeva iz ovih materijala još uvijek je relativno neistražena. Cilj ovog rada bio je postaviti bazu za definiranje valorizacijskih strategija talijanskog ljulja i blještca, temeljem osnovnog sastava, s posebnim osvrtom na ugljikohidratnu frakciju i udio fenolnih spojeva. Analiza osnovnog sastava uključivala je određivanje sirovih proteina, masti, mineralnog ostatka i ugljikohidrata u suhoj tvari, dok je ugljikohidratna frakcija dalje analizirana s obzirom na udio vlakana, lignina i monomerni sastav. Slobodni i vezani fenolni spojevi određeni su s Folin-Ciocalteu reagensom te pojedinačno HPLC-DAD metodom. Ovo istraživanje predstavlja vrijedan izvor podataka o sastavu navedenih biljnih vrsta, posebice u smislu karakterizacije prisutnih fenolnih spojeva.

Ključne riječi: ugljikohidrati, talijanski ljulj, fenoli, osnovni sastav, blještac, valorizacija



1. Introduction

In recent years, bioenergy has emerged as a promising alternative to non-renewable sources, such as fossil fuels. It comprises the use of the chemical energy stored within the different types of biomass and is considered as the most promising form of renewable energy.¹ Feed materials in concern are energy trees and grasses (herbs), wood processing residues, agro-industrial residues, and domestic and food processing wastes. At the same time, the energy-rich products derived from them are bioethanol, biodiesel, biogas, bio-oil and solid biomass.^{1,2} Many different plant species are being investigated as suitable bioenergy crops, based on various criteria, such as high biomass yield, low demand for agriculture interventions, low or positive impact on the environment, optimal chemical composition for the conversion into the desired bioenergy form, non-competitiveness to food or cultivable land and so on. Among them, grasses have gained significant interest due to their adaptability, high productivity and environmental friendliness.³ Reed Canarygrass (RCG) (*Phalaris arundinacea* L.) is a C₃ perennial grass, belonging to the Poaceae family, usually 0.6-2 m, exceptionally to 3 m, tall. It is spread throughout the Eurasian area and in North America. It can typically be found in mild climates and water-rich areas, such as wet meadows, wetlands, lake shores, etc.^{1,2} Nonetheless, it is considered a persistent species since it can adapt to a wide range of environmental conditions.¹ In this context, it can grow on land that is not usable for agricultural production, giving it a certain advantage over other bioenergy crops. As a bioenergy crop, RCG cultivation is of the largest scale in Europe, with northern parts being particularly recommended.¹ RCG biomass yield depends on different factors, generally, it reaches 5-10 t DM/ha/year of the above-ground biomass.¹ Italian ryegrass (IRG) (*Lolium multiflorum* Lam.) is conventionally an annual grass from the Poaceae family, but some types may behave as biennials and short-lived perennials.⁴ It is native to southern Europe but it is widely distributed all over the world. Due to its high palatability and digestibility, it is commonly used as high-quality animal feed, alone or combined with clover and vetch.^{4,5} Nonetheless, it is highly productive and grows fast.⁴ The reported green biomass yield ranges between 1.5 to 3.2 t ha⁻¹.⁵ IRG is characterized by a good adaptability to diverse soil and climate conditions, but it is best adapted to cool and wet climates. Morphologically, the IRG stem is hollow and usually 30-100 cm long, consisting of nodes and internodes, with nodes bearing leaves with a glossy appearance. The stem ends with an inflorescence in the form of a spike (10-30 cm) that carries 5-38 alternately arranged spikelets.⁴ The general composition of IRG and RCG, which determines their digestibility and

use as animal feed is more or less well-covered in the literature. In the context of alternative uses of IRG and RCG, as innovative feedstocks for producing various chemicals, the carbohydrate and lignin fractions are particularly interesting. However, the content of minor constituents, such as polyphenols is less reported. Their extraction might be interesting in enhancing the added value of these materials due to the known antioxidant and related health-beneficial action of polyphenols. RCG was previously reported to contain gallic and *p*-coumaric acid as well as anthocyanins in flowers.⁶ The alkali extracted fraction contained *p*-coumaric and *t*-ferulic acids.⁷ Low palatability, low intake and possible toxic effects of some strains of RCG are attributed to the content of alkaloids.⁸ In case of IRG, *p*-coumaric acid was reported as dominant among phenolic acids, while myricetin, rutin, luteolin, vitexin and kaempferol among flavonoids.⁹ Considering the variable nature of chemical constituents in plant materials concerning the growing conditions and stage of growth, this work aimed to broaden the base of the proximate composition and structural carbohydrate composition of IRG and RCG and characterize their free- and bound-phenolics fractions. The obtained results are important for deciding innovative valorization strategies for these plants, where it is favorable to obtain as much as possible of the added-value products.

2. Experimental part

2.1. Samples

Italian Ryegrass (IRG) and Reed Canarygrass (RCG) samples were collected in September 2023 directly from the field (in the vicinity of Ludbreg, Varaždin county, Croatia) where they were grown for animal feed. Samples were air-dried while kept in the shade (for several days, until reaching a sufficiently dry feel under the fingers). Dry samples were ground to 4 mm particle size and additionally in a coffee grinder, which reduced particle size by approximately double, and stored in polypropylene zip-lock bags in a dry and cool place, until use.

2.2. Chemicals

Folin-Ciocalteu reagent was supplied from Lach-Ner, s. r. o. (Neratovice, Czechia), DPPH radical from Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, USA), as well as gallic acid, Trolox and ABTS radical. Ethanol (96 % vol.) was purchased from Gram-mol d. o. o. (Zagreb, Croatia), L-ascorbic acid from Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, USA), EDTA (diammonium salt, dihydrate) from T. T. T: d. o. o. (Sveta Nedelja, Croatia). Acetonitrile and formic acid for HPLC

analysis of phenolics were supplied from Fisher Scientific (Hampton, New Hampshire, USA). Sodium phosphate monobasic and dibasic (dihydrate) salts for buffered mobile phase preparation were purchased from Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, USA). PMP reagent (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazoline-5-one) was supplied from Acros Organics (Geel, Belgium). Analytical standards of *t*-ferulic acid, *p*-coumaric acid and quercetin were supplied from Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, USA), quercetin-3-glucoside from Fluka/Honeywell (Charlotte, USA) and rutin from Acros Organics (Geel, Belgium). Kjeldahl tablets (without Hg and Se) were purchased from Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Germany). Sugar standards of D-(+)-mannose, D-(+)-galactose, D-(-)-xylose, D-(+)-arabinose and L-(+)-rhamnose monohydrate were supplied from LGC Standards (Teddington, United Kingdom), D-(+)-glucose monohydrate from Fluka (Buch, Switzerland), L-(-)-fucose from Acros Organics (Geel, Belgium), D-(+)-galacturonic acid, D-glucuronic acid and D-(-)-ribose from Sigma-Aldrich/Merck (SAD). All chemicals were of p.a. or HPLC purity.

2.3. Free-phenolics extract and alcohol-insoluble residue preparation

Extracts were prepared using 80% (v/v) ethanol, prepared from 96% ethanol. Samples were mixed with the solvent in 1:20 (w/v) ratio (1 g samples + 20 mL solvent) and extracted under a cooler for 30 min at 80 °C, while constantly stirred on a magnetic stirrer. Once the mixture was cooled, the extract was recovered by vacuum filtration and filled to 25 mL. All prepared extracts were kept refrigerated until use. The alcohol-insoluble residue (AIR) was prepared by 3 successive extractions as described, using 80% ethanol. The obtained residue was rinsed with 20 mL of 96% ethanol and 10 mL acetone and left under ventilation to dry. The AIR sample was pulverized in a ball homogenizer (Cryomill; Retsch, Germany) using a single metal ball ($\phi = 1$ cm), at a frequency of 30 Hz for 1 minute.

2.3. Bound-phenolics extract preparation

Bound phenolics were extracted from AIR samples according to a modified protocol by Arruda *et al.*¹⁰. 50 mg of AIR were extracted with 2,5 mL of 2 M NaOH containing 1% (w/v) ascorbic acid, 10 mM EDTA, 12% ethanol, and 100 µg/mL internal standard caffeic acid. The extraction was carried out for 2 h at ambient temperature while constantly stirred on a magnetic stirrer. Afterward, the mixture was added with 1,5 mL of 4 M HCl and 1 mL of demineralized water and centrifuged (9000 rpm, 5 min, ambient temperature), (SL 8R with fixed angle rotor,

ThermoFisher Scientific, USA). An aliquot of 1 mL of the supernatant was passed through a preconditioned SPE C18 column (3 mL, 200 mg, ChromaBond, Macherey Nagel, Germany). Phenolics were eluted with 1 mL of methanol into HPLC vials.

2.4. Determination of proximate composition

Proximate composition was determined using the well-established AOAC protocols for dry matter (AOAC 930.15), fat (AOAC 920.39), protein (976.05) and ash (AOAC 942.05).¹¹ Additionally, dietary fiber content was analyzed using a specialized kit (Megazyme, Ireland) and following an AOAC 2011.25 protocol.¹² Lignin content was determined following an NREL protocol.¹³ Proximate composition was expressed on dry matter basis (dmb).

2.5. Determination of carbohydrate monomeric composition

Monomeric composition was evaluated upon complete acid hydrolysis and PMP derivatization of liberated sugars.¹⁴ Briefly, AIR samples (25 mg) were pre-hydrolyzed by homogenizing with 0.25 mL 72% (v/v) H₂SO₄ for 30 min at ambient temperature. Afterward, 2.25 mL of demineralized water and 0.5 mL 2.4 mg mL⁻¹ ribose solution were added, the tubes were tightly capped and put to hydrolysis at 100 °C for 2 h. Another set of samples was prepared, subjected only to high-temperature, dilute acid hydrolysis. For this purpose, the sulphuric acid was added last to the reaction mixture (as described above), samples were vortexed, tightly capped and put to hydrolysis at 100 °C for 2 h. Once cooled, the hydrolysates were recovered by centrifugation (3500 rpm, 5 min, ambient temperature) and neutralized with solid CaCO₃ until pH 6-6.5. Aliquots of 50 µL were pipetted into 2 mL tubes and added with 50 µL of 0,6 M NaOH and 100 µL of 0,5 M methanolic solution of PMP. The tubes were capped and incubated at 70 °C for 1 h. Once cooled, 120 µL of 0.3 M HCl solution and 680 µL of demineralized water were added and thoroughly mixed. The solution was checked for pH (4-6) and then extracted 2 times with 0,5 mL of chloroform. Phase separation was enhanced with a mini centrifuge (D1008, Dlab, China). The upper aqueous layer was carefully collected and filtered through a 0.2 µm pore size microfilter (regenerated cellulose, Macherey Nagel, Germany) into an HPLC vial. The HPLC analysis was carried out on Agilent 1200 Series instrument coupled with Zorbax Extend C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm) (Agilent Technologies, USA) according to the method of Vojvodić Cebin *et al.*¹⁴. Data were collected using OpenLab software (Agilent Technologies,

USA). Quantification of monosaccharidic-PMP sugar derivatives was based on internal standard calibration using ribose.

2.6. Total free-phenolic content and antioxidant capacity determination

Total phenolic content was determined in a reaction with Folin-Ciocalteu reagent.¹⁵ The results were expressed as gallic acid equivalents (mg dmb). Antioxidant capacity was determined using TEAC methods: ABTS and DPPH radical-scavenging assays.^{16,17} The results were expressed as Trolox equivalents (μmol dmb).

2.7. HPLC-DAD analysis of individual phenolic compounds

Individual free and bound phenolic compounds were analyzed using reversed-phase chromatography. Agilent 1200 system was used (Agilent Technologies, USA), coupled with Kinetex 2.6 μm Biphenyl 100 Å (4,6 x 150 mm) column (Phenomenex, USA). Analysis conditions comprised a two-component mobile phase (A - 0.1% formic acid solution in water, B - 0.1% formic acid solution in acetonitrile) and the following gradient: 0 min - 10% B, 2nd min - 10% B, 17th min - 45% B, 20th min - 70% B, 23rd min - 70% B, 25th min - 10% B, + 5 min equilibration, at 0.5 mL min⁻¹ flow rate, column temperature of 35 °C, injection volume of 5 μL. Chromatograms were recorded at 320 and 350 nm along with the absorption spectra in the 190-450 nm range. Data were collected using OpenLab software (Agilent Technologies, USA).

3. Results and discussion

This study aimed to determine the proximate composition of Italian Ryegrass and Reed Canarygrass and to further characterize their carbohydrate and phenolic fractions as a valuable base for planning valorization strategies to recover fermentable sugars and/or bioactives. The proximate composition, as crude protein, crude fat, crude ash, and crude carbohydrates, all expressed on a dry matter basis, is shown in Table 1.

Table 1 - Proximate composition of Italian Ryegrass and Reed Canarygrass

Tablica 1 - Osnovni sastav talijanskog ljulja i blještca

Sample /component	Dry matter (% sample)	Crude protein	Crude fat	Crude ash	Crude carbohydrates
% dmb					
IRG	84.78 ± 0.06	22.18 ± 0.14	2.28 ± 0.06	17.83 ± 0.22	57.71
RCG	90.67 ± 0.01	3.68 ± 0.01	0.80 ± 0.01	5.67 ± 0.02	89.85

The dry matter content of materials ranged from approximately 85% (IRG) to 91% (RCG) which ensured the sufficient stability of the material in experiments. Crude fat content, determined as petroleum ether extractives, was generally low, below 1% dmb in RCG and 2.3% in IRG, which was somewhat expected for these plant materials. Crude protein content was significant in IR (22.2% dmb), as well as the crude ash (17.8% dmb), while in RCG their contents were 6-fold and 2.5-fold lower, respectively. Crude carbohydrate content, as a major macrocomponent, was calculated as a difference to 100% dmb. From the results, it was seen that RCG was particularly abundant in the carbohydrate fraction, reaching almost 90% of its dry matter. Proximate content determination is an important parameter of the quality of the material used in animal feed. For that matter, IRG is highly valued for its high protein content and used as a high-quality grass for animal feed in the wintertime. Previously reported data on IRG composition show a crude protein content of 15-20 % dmb, crude ash 10-13 % dmb, crude fat 3.5-5 % dmb.^{18,19} in agreement to the herein presented data (Table 1).

The first step in the characterization of the carbohydrate composition was the determination of the monomeric composition of structural carbohydrates. This was enabled after complete acid hydrolysis of the materials and the pre-column PMP derivatization of the liberated monomeric sugars, subsequently analyzed by HPLC-DAD. The hydrolysis was performed in 2 ways, one time employing the presoaking of the materials in a strong mineral acid, followed by the hydrolysis in a diluted acid solution at high temperature, and the other time by omitting the presoaking step. By doing so, it was possible to evaluate the content of cellulose, which crystallinity and interactions with lignin should be degraded before hydrolysis. The monomeric composition of the IRG and RCG is presented in Fig. 1. As can be seen from the results (Fig. 1), the most abundant monomers in both samples were glucose (Glc, 14.27% dmb in IRG and 33.56% dmb in RCG) and xylose (Xyl, 9.72% dmb in IRG and 20.56% dmb in RCG), indicating the predominance of cellulose and hemicellulosic polymers. Generally, it was observed that IRG exhibited a lower content of structural carbohydrates, evaluated as the sum of all determined monomers, approximately 31% dmb, in comparison to RCG (approximately 58% dmb). When comparing the results with and without the prehydrolysis in 72% sulphuric acid, it can be seen that glucose content was the most affected, indicating the portion of cellulose. Namely, the prehydrolysis step was mandatory to solvate cellulose which was subsequently hydrolyzed. In RCG a part of total xylose was affected as well, probably referring to the hemicellulose closely connected to lignin or cellulose.

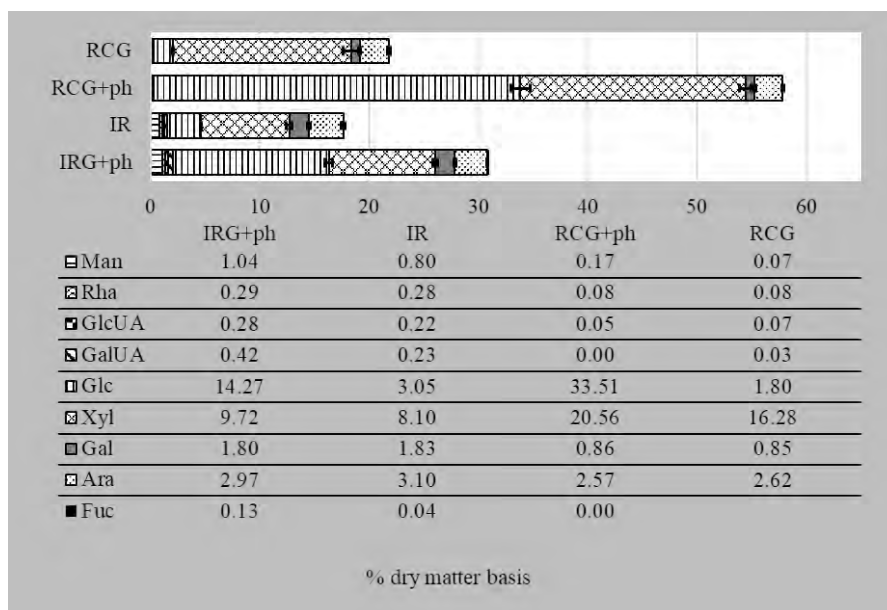


Fig. 1 - Monomeric composition of structural carbohydrates from Italian Ryegrass and Reed Canarygrass (+ph – with prehydrolysis step)

Slika 1 - Monomerni sastav strukturnih ugljikohidrata talijanskog ljujla i blještca (+ph – s prethodnom predhidrolizom)

In addition to glucose and xylose, arabinose (Ara) and galactose (Gal) exhibited somewhat notable contents. From the monomeric composition, it was concluded that the hemicellulose of both materials was predominantly arabinoxylan type, also containing some xyloglucan and arabinogalactan. Comparable studies on the composition of cell wall polysaccharides show similar distribution of Glc, Xyl and Ara in RCG, namely, 36-48.5 % dmb, 17.6-19.1 % dmb and 3.2-2.3 % dmb, depending on the time of harvest (spring or autumn, respectively).²⁰ Other authors, such as *Dien et al.*²¹, reported lower Glc and Xyl contents, of 26.5% dmb and 16.3% dmb, respectively. For IRG, the previously reported data for the monomeric composition show 35.1% and 15% of glucan and xylan which is higher than the herein obtained values and can be attributed to the native differences of the analyzed materials, since the content of dry matter and cell wall components can vary notably with the age of the plant.²² Similarly, the reported relative ratio of Glc and Xyl in IRG (approximately 65:26%) differs from the results obtained in this study (46:31%).²³

By combining the results of the monomeric composition and fiber content, the relative contents of cellulose, hemicellulose and lignin were determined, as presented in Fig. 2.

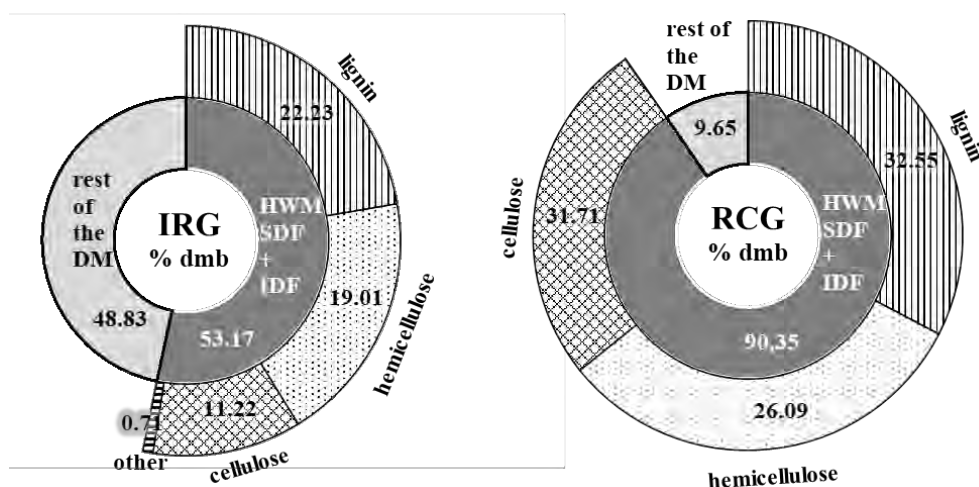


Fig. 2 - Composition of the carbohydrate fraction (% dmb) of Italian Ryegrass (IRG) and Reed Canarygrass (RCG) (HWM – high molecular weight, IDF – insoluble dietary fibre, SDF – soluble dietary fibre, DM – dry matter)

Slika 2 - Sastav ugljikohidratne frakcije talijanskog ljlja (IRG) i blještca (RCG) (HWM – visoke molekulske mase, IDF – netopljiva vlakna, SDF – topljiva vlakna, DM – suha tvar)

Determination of insoluble and soluble fibre in IRG and RCG enabled a better insight into the nature and content of the fibers. Generally, insoluble fibers were predominant, as expected, while soluble fiber contents were 3.39% dmb in IRG and 2.20% dmb in RCG. The content of total fiber for both materials corresponded well to the content of crude carbohydrates (Table 1). Cellulose content was determined from the difference in glucose yield with and without the pre-hydrolysis step (monomeric composition). The cellulose content in IRG exhibited 11.2% dmb, while in RCG 31.7% dmb. Hemicellulose content was estimated by subtracting the cellulose content from the content of total structural carbohydrates. In IR, due to the presence of galacturonic acid (GalUA), the content of pectic substances (series „other“ in Fig. 2) was also determined as a sum of GalUA and rhamnose (Rha), although galactose (Gal) and arabinose (Ara) are as well constituents in most pectins, their content herein was expected to be rather low so they were preferably ascribed to the hemicellulosic polysaccharides. So, in IRG, the hemicellulose content was calculated as total structural carbohydrates corrected for cellulose and other polysaccharides' contents (namely, low content of pectins). In RCG, pectin content was not determined due to the absence of GalUA. Hemicellulose content in IR was

approximately 19% dmb, while in RCG approximately 26% dmb. Lignin was determined by two methods, indirectly, as a difference of total dietary fiber content and the content of total structural polysaccharides (Fig. 2), and directly by gravimetric and absorbance measurements upon complete acid hydrolysis (Table 3). Cellulose and hemicellulose content in RCG was reported to be approximately 37-38.7% and 31.7%, respectively, in accordance to the herein obtained data.^{24,25} *Dien et al.*²¹ determined somewhat lower contents of cellulose and hemicellulose in RGC and, depending on the analytical approach, their contents ranged from 26.5-35.6 % dmb and 21.8-30.5 % dmb. RCG in vegetative phase (younger plants) contained lower contents of the mentioned cell wall components. For IRG, the reported values for cellulose and hemicellulose, of 16.9-19.8 % dmb and 19.8-20.4 % dmb, respectively,²⁶ following the results obtained in this study, although the Glc yield is rather low. The results presented in Table 2 were obtained from the direct measurement of lignin following the NREL protocol. Two portions of lignin were determined, the acid-insoluble lignin (AIL) and acid-soluble lignin (ASL). The former was obtained as the residue upon acid hydrolysis of the sample and its content was determined gravimetrically, while the latter was calculated upon spectrophotometric measurements of the obtained liquor.

Table 2 - Lignin content in Italian Ryegrass and Reed Canarygrass

Tablica 2 - Udio lignina u talijanskom ljuju i blještu

Sample	AIL (% dmb)	ASL (% dmb)		
		$\lambda = 240 \text{ nm},$ $\varepsilon = 12 \text{ L g}^{-1}\text{cm}^{-1}$	$\lambda = 240 \text{ nm},$ $\varepsilon = 25 \text{ L g}^{-1}\text{cm}^{-1}$	$\lambda = 320 \text{ nm},$ $\varepsilon = 30 \text{ L g}^{-1}\text{cm}^{-1}$
IRG	10.02 ± 0.29	21.56 ± 0.43	10.35 ± 0.21	2.93 ± 0.08
RCG	18.92 ± 0.11	12.58 ± 0.21	6.04 ± 0.10	1.43 ± 0.04
total lignin IRG		31.58 ± 0.72	20.37 ± 0.50	12.95 ± 0.37
total lignin RCG		31.50 ± 0.10	24.96 ± 0.01	20.36 ± 0.07

Based on the wavelength and absorptivity used, the content of ASL was different (Table 2). The proposed parameters (λ , ε) were optimized for Monterey pine, bagasse, corn stover, and Eastern cottonwood), hence materials different from the IRG and RCG. Comparing the results for lignin presented in Fig. 2 and Table 2, it can be seen that the best matching was obtained when using $\lambda = 240 \text{ nm}$ and $\varepsilon = 25 \text{ L g}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for IRG (total lignin content of 20.4% dmb) and using $\lambda = 240 \text{ nm}$ and $\varepsilon = 12 \text{ L g}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for RCG (total lignin content of 31.5% dmb). AIL to ASL ratio in IR was approximately 50:50, while in RCG, it was approximately 60:40. In the

context of energy crops, such as IRG and RCG, as well as other lignocellulosic materials intended for saccharification, lignin content is an important factor in determining their processability. Lignin limits the accessibility of cell wall polysaccharides during saccharification, especially when employing enzymatic or microbial processes, but it can also inhibit their activity. Therefore, pretreatment strategies are commonly used to reduce lignin content or enhance its solubility. The literature data for RCG show variability in lignin content which arises from the natural differences of the materials analyzed as well as the employed methodology. The previously reported lignin content in RCG varies between 15.42%, to 23.3% dry basis and up to approximately 27 %.^{24,25,27} It was shown that the lignin content in RCG can be affected by environmental and agronomic factors, such as time of sowing, fertilization rate, and harvesting time.²⁷ The discrepancy between the literature data can also be attributed to the methodology used: the overestimation of the soluble lignin portion due to the interferences.^{28,29} In addition to the proximate and carbohydrate fraction analysis, the materials were extracted with 80% ethanol and the extracts were analyzed for total phenolic content (TPC) and antioxidant capacity (Fig. 3). The TPC value for IRG was approximately 6 mg GAE/g sample, while for RCG somewhat lower, approximately 4.5 mg GAE/g sample. The antioxidant capacity, evaluated by ABTS and DPPH assays, followed the TPC values so, on average, the antioxidant capacity of IRG extract was higher than that of RCG. The exception was in DPPH-determined antioxidant capacity which was unexpectedly higher in RCG than in IRG, concerning the TPC values. The profile of the individual phenolic compounds was established by HPLC-DAD analysis (Table 3). Not only free phenolic compounds were evaluated, present in 80% ethanolic extract, but also phenolics closely bound to the cell wall structures like hemicelluloses and lignin, the bound phenolics. Among the free phenolics, rutin, chlorogenic acid and *p*-coumaric acid could be identified as the most dominant peaks on the chromatograms. Rutin was found in IRG, while the hydroxycinnamic acids in RCG. Generally, both materials were not particularly abundant in phenolics. The content of phenolics is closely related to the growing conditions and the stage of growth of the plant, as well as the subsequent processes after harvesting, and drying in this case, which might explain the obtained results. In contrast to the free phenolics, the bound phenolics content was more abundant, especially for RCG. In both samples, *t*-ferulic and *p*-coumaric acids were identified. Both were more abundant in RCG, reaching approximately 1.6% of the dry matter and with *p*-coumaric acid being approximately 3-fold more represented. In IRG, the total content of bound phenolics was approximately 0.34%

dmb and the *t*-ferulic acid was more represented, almost double. Feruloylation is common among the Poaceae family and has a role in cell wall formation.³⁰ Many agro-industrial residues are nowadays being explored as sources for the recovery of ferulic acid, recognized as a precursor in vanillin formation.³¹ Nonetheless, *p*-coumaric and *t*-ferulic acids are also known for their bioactive properties and can bring an additional added value to their non-conventional sources, such as agro-industrial wastes and bioenergy crops.³²

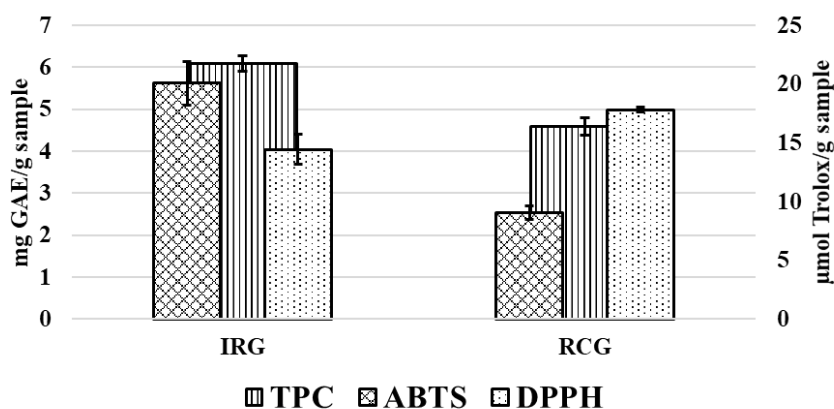


Fig. 3 - Total polyphenols content and antioxidant capacity of 80% ethanol extracts of Italian Ryegrass and Reed Canarygrass

Slika 3 - Udio ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet 80 %-etanolnih ekstrakata talijanskog ljlja i blještca

Table 3 - The content of individual free and bound phenolics in Italian Ryegrass and Reed Canarygrass

Tablica 3 - Udio pojedinačnih slobodnih i vezanih fenolnih spojeva u talijanskom ljlju i blještcu

Phenolic compound		IRG	RCG
		mg g ⁻¹ dry matter	
Free	Rutin	0.44±0.04	-
	<i>p</i> -coumaric acid	-	0.20±0.01
	chlorogenic acid	-	0.16±0.01
Bound	<i>p</i> -coumaric acid	1.08±0.09	11.99±0.02
	<i>t</i> -ferulic acid	2.30±0.09	4.18±0.01

4. Conclusion

This study has shown that Italian Ryegrass and Reed Canarygrass are abundant in structural carbohydrates and lignin. The former are composed of cellulose and arabinoxylan, both of which could be used to generate fermentable sugars, whereas arabinoxylans could additionally

be explored as an alternative source to produce prebiotic fiber – xylooligosaccharides. Among the phenolic fraction, a notable content of bound phenolics – *p*-coumaric and *t*-ferulic acids, was determined, the recovery of which could be integrated into the biorefinery process of these materials. This study presents a valuable reference for proximate, carbohydrate and phenolics composition of Italian Ryegrass and Reed Canarygrass. Considering the variable nature of the chemical composition of plant materials in general, further investigations are needed to determine the relation between chemical composition and stage of growth resulting in optimal plant usability.

ACKNOWLEDGMENT

This work has been supported by the Croatian Science Foundation through the project „Biorefinery system for biofuels and biochemicals production from non-food lignocelulosic raw materials” (IP-2022-10-3075)

List of abbreviations and symbols

PMP - 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazoline-5-one

dmb -dry matter basis

AOAC - Association of Analytical Chemists

AIR – alcohol-insoluble residue

NREL - National Renewable Energy Laboratory

TEAC - Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

HPLC-DAD - High Performance Liquid Chromatography - Diode-Array Detection

HMW – high molecular weight

IDF – insoluble dietary fibre

SDF – soluble dietary fibre

DM – dry matter

TPC – total phenolic content

GAE – gallic acid equivalents

References

1. S. Ustak, J. Šinko, J. Muñoz, Reed canary grass (*Phalaris arundinacea* L.) as a promising energy crop. J. Cent. Eur. Agric. **20** (4) 2019 1143-1168, doi: <https://doi.org/10.5513/JCEA01/20.4.2267>.
2. P. Yadav, P. Priyanka, D. Kumar, A. Yadav, K. Yadav, Bioenergy crops: recent advances and future outlook, u A. A. Rastegari, A. N. Yadav i A. Gupta (ur.), Prospects of Renewable Bioprocessing in Future Energy Systems, Biofuel and Biorefinery Technologies 10, Springer Nature Switzerland AG, Cham, 2019, str. 315-335, doi: https://doi.org/10.1007/978-3-030-14463-0_12.
3. C. S. Varnero, M. V. Urrutia, S. V. Ibaceta. Bioenergy from Perennial Grasses, u M. Nageswara-Rao i J. Soneji (ur.) Advances in Biofuels and Bioenergy. InTech 2018., <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.74014>.
4. D. Hannaway, S. Fransen, J. Cropper, M. Teel, M. Chaney, T. Griggs, R. Halse, J. Hart, P. Cheeke, D. Hansen, R. Klinger, W. Lane. Annual ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.), PNW 501, 1999, https://ir.library.oregonstate.edu/concern/administrative_report_or_publications/cf95jb75s.
5. W. Carrasco-Chilon, M. Cervantes-Paralte, L. Mendoza, Y. Munoz-Vilchez, C. Quicate, D. C. Nunez-Melgar, H. Vasquez, W. Y. Alvarez-Garcia, Morphological differentiation, yield, and cutting time of *Lolium multiflorum* L. under acid soil conditions in highlands, Plants **13** (2024) 2331, doi: <https://doi.org/10.3390/plants13162331>.
6. E. T. Abd-Elmaseh, M. N. Samy, M. S. E. Abdelkader, M. A. Fouad, A review of phytoconstituents and biological activities of genus *Phalaris*, J. Adv. Biomed. Pharm. Sci. **7** (2024) 80-87, doi: <https://doi.org/10.21608/jabps.2024.263056.1212>.
7. A. S. Bittner, Alkali-soluble phenolic acids from a xylan fraction isolated from reed canarygrass, J. Dairy Sci. **66** (1983) 920-923.
8. M. Grzelak, E. Gawel, M. Janyszek-Soltysiak, J. Barszczewski, K. Janyszek, D. Wronska-Pilarek, Variation in quantitative and qualitative alkaloid composition in *Phalaris arundinacea* (Poaceae), J. Res. Appl. Agric. Eng. **63** (2) (2018) 77-80.
9. P. Kuppusamy, K. D. Lee, C. E. Song, S. Ilavenil, S. Srigopalram, M. V. Arasu, K. C. Choi, Quantification of major phenolic and flavonoid markers in forage crop *Lolium multiflorum* using HPLC-DAD, Rev. Bras. Farmacogn. **28** (3) (2018) 282-288, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.03.006>.

10. H. S. Arruda, G. A. Pereira, G. M. Pastore, Optimization of extraction parameters of total phenolics from *Annona crassiflora* Mart. (Araticum) fruits using response surface methodology, Food Anal. Method. **10** (2016) 100–110, doi: <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0554-y>.
11. J. M. Padmore, Animal Feed, u K. Helrich (ur.) Official Methods of Analysis, Vol. 1, 15th edition, AOAC International, Arlington, 1990, str. 69-79.
12. B. V. McCleary, J. W. DeVries, J. I. Rader, G. Cohen, L. Prosky, D. C. Mugford, K. Okuma, Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber (CODEX definition) by enzymatic-gravimetric method and liquid chromatography: Collaborative study. J. AOAC Int. **95** (2012) 824-844, doi: https://doi.org/10.5740/jaoacint.cs2011_25.
13. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, D. Crocker, Determination of structural carbohydrates and lignin- Laboratory analytical procedure. Technical report NREL/TP-510-42618 (2008) <http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/42618.pdf>.
14. Vojvodić Cebin, D. Komes, M.-C. Renard, Development and validation of HPLC-DAD method with pre-column PMP derivatization for monomeric profile analysis of polysaccharides from agro-industrial wastes, Polymers (Basel) **14** (3) (2022) 544, doi: <https://doi.org/10.3390/polym14030544>.
15. V. L. Singleton, R. Orthofer, M. Lamuela-Raventós, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, u L. Packer, (ur.), Methods in Enzymology Vol. 299, Oxidants and Antioxidants Part A, Academic Press, Cambridge, MA, 1999, str. 152-178, doi: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1).
16. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, Free Radic. Biol. Med. **26** (1999) 1231-1237, doi: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
17. W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset, Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, LWT **28** (1995) 25-30, doi: [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
18. G. Moseley, E. L. Jones, V. Ramanathan, The nutritional evaluation of Italian ryegrass cultivars fed as silage to sheep and cattle, Grass Forage Sci. **43** (1988) 291-295, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1988.tb02154.x>.

19. G. J. Choi, Y. C. Lim, H. C. Ji, S.-H. Lee, K.-W. Lee, D. K. Kim, S. Seo, K.-Y. Kim, Change in dry matter yields and feed values of italian ryegrass, hwasan 101, at different growth stages, J. Kor. Grassl. Forage Sci. **31** (2) 2011 107-112, doi: <https://doi.org/10.5333/KGFS.2011.31.2.107>.
20. Kallioinen, J. Uusitalo, K. Pakkala, M. Kontturi, L. Viikari, N. von Weymarn, M. Siika-aho, Reed canary grass as a feedstock for 2nd generation bioethanol production, Biores. Technol. **123** (2012) 669-672, doi: <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.023>.
21. S. Dien, H.-J. G. Jung, K. P. Vogel, M. D. Casler, J. F. S. Lamb, L. Iten, R. B. Mitchell, G. Sarath, Chemical composition and response to dilute-acid pretreatment and enzymatic saccharification of alfalfa, reed canarygrass, and switchgrass, Biomass Bioenerg. **30** (2006) 880-891, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2006.02.004>.
22. M. Yasuda, Y. Takenouchi, Y. Nitta, Y. Ishii, K. Oht, Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam) as a high-potential bio-ethanol resource. Bioenerg. Res. **8** (2015) 1303–1309, doi: <https://doi.org/10.1007/s12155-015-9582-5>.
23. G. Smith, P. J. Harris, The polysaccharide composition of Poales cell walls: Poaceae cell walls are not unique, Biochem. Syst. Ecol. **27** (1999) 33-53, doi: [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(98\)00068-4](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(98)00068-4).
24. B. Waliszewska, M. Grzelak, E. Gawel, A. Spek-Dzwigala, A. Sieradzka i W. Czekala, Chemical characteristics of selected grass species from Polish meadows and their potential utilization for energy generation purposes, Energies **14** (2021) 1669, doi: <https://doi.org/10.3390/en14061669>.
25. T. Aysu, Supercritical fluid extraction of reed canary grass (*Phalaris arundinacea*), Biomass Bioenerg. **41** (2012) 139-144, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.02.024>.
26. H. H. Meissner, A comparison of Italian ryegrass (*Lolium multillorum*) cultivars Bxalta and Midmar with respect to their nutritive value for sheep, S. Afr. J. Anim. Sci. **26** (2) (1996) 37-41, doi: <https://doi.org/10.4314/sajas.v26i2.44335>.
27. L. Poiša, A. Adamovičs, R. Platače, E. Teirumnieka, Evaluation of the factors that affect the lignin content in the reed canarygrass (*Phalaris arundinacea* L.) in Latvia, u B. Moshfegh (ur.) Proceedings of the World Renewable Energy Congress, 2011, Švedska, str. 224-231.

28. *F. Lu, C. Wang, M. Chen, F. Yue, J. Ralph*, A facile spectroscopic method for measuring lignin content in lignocellulosic biomass, *Green Chem.* **23** (2021) 5106, doi: <https://doi.org/10.1039/D1GC01507A>.
29. *R. Hatfield, R. S. Fukushima*, Can lignin be accurately measured?, *Crop Sci.* **45** (2005) 832–839, doi: <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.0238>.
30. *M. M. O. Buonafina*, *Feruloylation in grasses: current and future perspectives*, *Mol. Plant* **2** (2009) 861-872, doi: <https://doi.org/10.1093/mp/ssp067>.
31. *Sharma, A. Sharma, J. Singh, P. Sharma, G. S. Tomar, S. Singh, L. Nain*, A biorefinery approach for the production of ferulic acid from agroresidues through ferulic acid esterase of lactic acid bacteria, *3 Biotech* **10** (8) (2020) 367, doi: <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02360-9>.
32. *S. Koikias, C. Proestos, V. Oreopoulou*, Phenolic acids of plant origin—a review on their antioxidant activity in vitro (o/w emulsion systems) along with their *in vivo* health biochemical properties, *Foods* **9** (2020) 534, doi: <https://doi.org/10.3390/foods9040534>.

Detection of adulteration of ground coffee using near-infrared spectroscopy and chemometrics

Detekcija patvorenja mljevene kave primjenom blisko infracrvene spektroskopije i kemometrije

Antonia Zeman,^a Manuela Panić,^b Davor Valinger,^a Ana Jurinjak Tušek,^a Jasenka Gajdoš Kljusurić,^a Maja Benković,^a Tamara Jurina^{a*}

^a University of Zagreb Faculty of Food Technology and Biotechnology, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Croatia

^a Sveučilište u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

^b Nades design d.o.o., Borongajska cesta 83H, 10000 Zagreb, Croatia (Hrvatska)

*Corresponding author: izv. prof. dr. sc. Tamara Jurina, tamara.jurina@pbf.unizg.hr

Abstract

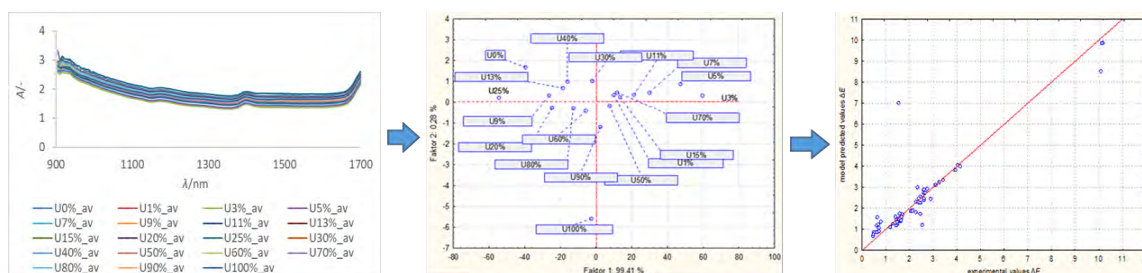
Coffee authenticity has become a challenging issue in the food industry, due to the fact that coffee is among the most consumed beverages globally. When considering coffee's market value, the main problem represents an illegal practice of adulterating coffee with less expensive and inferior ingredients, due to greater financial profit. Therefore, the purpose of this work was to investigate if Near Infrared Spectroscopy (NIRs), in combination with chemometrics, could be used in detection of the adulteration of ground coffee with malt coffee. Pure coffee samples were adulterated with corresponding amounts of malt coffee and prepared mixtures (1%, 3%, 5%, 7%, 9%, 11%, 13%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%) were recorded using two NIRs devices. Principal Component Analysis (PCA) successfully distinguished prepared mixtures with the eigenvalues of 99.41% and 0.28% for the first and second factor, respectively. Based on the recorded NIR spectra, artificial neural network models (ANNs) were developed in order to predict physical (dry matter content, color change, average Feret's particle diameter) and chemical (concentration of caffeine measured by two methods: spectrophotometric and HPLC) characteristics of the adulterated samples. The developed ANN models, with values of $R^2_{\text{validation}} = 0.8088 - 0.9659$ for caffeine concentration of the prepared mixtures and values of $R^2_{\text{validation}} = 0.7471 - 0.9791$ for color change (ΔE), showed the potential for industrial application of NIRs in detection of adulteration of ground coffee.

Key words: *Near Infrared Spectroscopy, chemometrics, Artificial Neural Networks, ground coffee, adulteration*

Sažetak

Autentičnost kave postala je izazovno pitanje u prehrambenoj industriji, zbog činjenice da je kava među najkonzumiranim pićima u svijetu. Kada je riječ o tržišnoj vrijednosti kave, glavni problem predstavlja ilegalna praksa patvorenja kave jeftinijim i manje kvalitetnim sastojcima, zbog veće financijske dobiti. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati potencijal primjene blisko infracrvene spektroskopije (*engl.* Near Infrared Spectroscopy, NIRs), u kombinaciji s kemometrijom, u detekciji patvorenja mljevene kave sladnom kavovinom. Uzorci čiste kave su patvoreni odgovarajućim količinama sladne kavovine i pripremljene mješavine (1 %, 3 %, 5 %, 7 %, 9 %, 11 %, 13 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %) snimljene su pomoću dva NIR uređaja. Analiza glavnih komponentata (PCA) uspješno je razlikovala pripremljene mješavine sa vrijednostima od 99,41 % i 0,28 % za prvu i drugu glavnu komponentu. Na temelju snimljenih NIR spektara razvijeni su modeli umjetnih neuronskih mreža (ANNs) za predviđanje fizikalnih (udio suhe tvari, promjena boje, prosječni Feretov promjer čestica) i kemijskih (koncentracija kofeina određena dvjema metodama: spektrofotometrijskom i HPLC metodom) karakteristika patvorenih uzoraka. Razvijeni ANN modeli, s vrijednostima koeficijenta determinacije za validaciju ($R^2_{\text{validacija}} = 0,8088 - 0,9659$) za koncentraciju kofeina u pripremljenim mješavinama i s vrijednostima koeficijenta determinacije ($R^2_{\text{validacija}} = 0,7471 - 0,9791$) za promjenu boje (ΔE), pokazali su potencijal za industrijsku primjenu NIR spektroskopije u detekciji patvorenja mljevene kave.

Ključne riječi: blisko infracrvena spektroskopija, kemometrija, umjetne neuronske mreže, mljevena kava, patvorenje



1. Introduction

The coffee plant belongs to the *Coffea* genus of the Rubiaceae family. Despite the fact that this family contains more than 100 species, most of the coffee for human consumption is produced from *Coffea arabica* (*Arabica*) and *Coffea robusta* (*Robusta*).^{1,2} Millions of people consume coffee every day. Coffee is one of the most popular beverages, characterized by a distinctive taste and aroma, made from ground-roasted coffee beans. Since coffee contains antioxidant substances, studies have attributed many potential health benefits to coffee intake such as prevention of severe chronic and degenerative diseases, antibacterial, antifungal, antiviral, antioxidant and chemo-protective properties.² Due to the positive effect of coffee on human health, consumers are paying attention to coffee quality and safety. In the coffee industry, numerous fraudulent practices are employed to reduce costs and maximize profits at the expense of product authenticity and consumer trust. These frauds include mixing beans from different species, adulteration with other substances or foods, mislabeling, etc. To combat these fraudulent practices, different techniques could be used to detect coffee adulteration with other foods or coffee byproducts.² Among them, Near Infrared Spectroscopy (NIRs) became one of the most used spectroscopic method providing simultaneous, rapid and non-destructive qualitative and/or quantitative analysis of the major components in many food products and plant materials.³⁻⁶ However, due to complexity of food matrices, spectroscopic measurements provide misleading results and chemometric tools are often used for interpretation of recorded NIR spectra. Chemometric approaches employ mathematical and statistical tools to analyze the obtained data and extract as much information as possible.^{7,8} Therefore, the aim of this research was to investigate the applicability of Near Infrared Spectroscopy (NIRs), in combination with Principal Component Analysis (PCA), for detection of the adulteration of ground coffee with different amounts of malt coffee. Furthermore, Artificial Neural Network (ANN) models were built for estimating physical (the average Feret's diameter, dry matter and color change) and chemical (caffeine concentration) characteristics of ground coffee, malt coffee and adulterated coffee samples.

2. Experimental part

2.1. Samples preparation

The roasted ground coffee named Jubilarna Original (Franck d.d., Zagreb) was purchased from the local supermarket. The coffee samples were adulterated with corresponding amounts (1%,

3%, 5%, 7%, 9%, 11%, 13%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%) of malt coffee (Drogerie Markt GmbH + Co. KG, Germany). Each prepared mixture had a total weight of 10 grams, ensuring that the proportions of ground coffee and malt coffee were accurately represented. The samples were then manually mixed. After mixing, 2 grams of the prepared mixtures were mixed with 50 mL of boiling water, homogenized for 30 seconds using a magnetic stirrer (500 rpm). After stirring, the samples were cooled to room temperature for 20 minutes, prior to further analyses.

2.2. Extraction of caffeine from the coffee mixtures

In order to extract caffeine from the aqueous phase, liquid-liquid extraction was performed.⁹ Initially, 10 mL of the cooled samples were transferred to a separatory funnel and extracted three times with 5 mL of dichloromethane (Kemika, Zagreb, Croatia). After each extraction, the phases were allowed to completely separate, and the lower organic layer was carefully drained into a collection tube. The collected aqueous phase containing the extracted caffeine was stored at 4 °C, prior to further analyses.

2.3. Spectrophotometric determination of caffeine concentration

The caffeine concentration in the aqueous phase was determined using a spectrophotometric method.¹⁰ The absorbance of aqueous samples was measured at $\lambda = 260$ nm using a UV-VIS spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA). Caffeine concentration was calculated based on the calibration curve (0 – 500 mg L⁻¹) and expressed as milligram of caffeine per gram of dry matter of the prepared mixture (powder). Two parallel measurements were performed for each sample and the results were presented as mean value $\pm$ SD.

2.4. Determination of caffeine concentration using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method

The caffeine concentration in the aqueous phase was also determined using a HPLC method.¹¹ Caffeine concentration was identified and quantified using HPLC system (1260 Infinity II, Agilent, Santa Clara, CA, USA) with diode array detector (UV/DAD, 1260 Infinity II, Agilent, USA) and an automatic sampler (1260 Infinity II, Agilent, USA). Separation was achieved on a Poroshell 120 SB C18 column (150 mm, 4.6 mm, 5 μ m; Agilent, USA) using H₂O with 0.25% AcOH (A) and ACN (B) as the mobile phases. Gradient elution was modified as follows: 0–7.5

min 10% B, 7.5–15 min from 10% to 15% B and 15–25 min from 15% to 10% B. The flow rate was 1 mL min⁻¹. The sample injection volume was 15 µL and the samples were filtered through 0.22 µm polytetrafluoroethylene (PTFE) filters prior to injection. The column temperature was kept at 40 °C. UV-DAD acquisitions were carried out in the 200–600 nm range, while chromatograms were acquired at 280 nm. The retention time and spectral data of caffeine were compared with external standard. Caffeine was identified at 280 nm and quantified considering calibration curve of external standard (10–1000 mg L⁻¹), at the wavelength of maximum absorbance. Caffeine concentration was expressed as milligram of caffeine per gram of dry matter of the prepared mixture (powder). Two parallel measurements were performed for each sample and the results were presented as mean value ± SD.

2.5. Color determination of the coffee mixtures

A PCE-CSM 3 colorimeter (PCE Instruments, Berlin, Germany) was utilized to assess the color of prepared samples. Hunter's parameters (L^* , a^* , b^*) were measured for the calculation and comparison of color change (ΔE) between pure coffee and adulterated coffee samples, with ground (pure) coffee as reference sample.¹² Two parallel measurements were performed for each sample and the results were presented as mean value ± SD.

2.6. Determination of dry matter content of the coffee mixtures

The dry matter content of the pure coffee, malt coffee and adulterated samples was assessed according to the AOAC method by drying the samples until constant mass at 105 °C.¹³ Two parallel measurements were performed for each sample and the results were presented as mean value ± SD.

2.7. Determination of the average Feret's diameter of the prepared coffee mixtures

The average Feret's diameter of particles from ground coffee, malt coffee and the prepared coffee mixtures was assessed through image analysis. ImageJ software tool (v 1.8.0. NIH, Maryland, USA) was used to process images captured by a camera (AM2111, Dino-Lite, USA). The images were taken immediately after the samples were mixed. For each image, 20 particles were analyzed and the average Feret's diameter was calculated. Results were presented as mean value ± SD.

2.8. *Near infrared spectroscopy (NIRs)*

Continuous NIR spectra of ground coffee, malt coffee and prepared coffee mixtures (a total of 19 prepared samples) were recorded using two different spectrometers: (1) NIR spectrometer Control Development (Inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm with the installed SPEC 32 software and a halogen light source, which operates within a wavelength range of 904 nm to 1699 nm) and (2) portable NIR spectrometer NIR-S-G1 (Innospectra Taiwan, with the installed ISC-NIRScan software, which has a wavelength range of 900 nm to 1700 nm). Each sample was recorded in duplicate and the average value of spectra were further used for chemometric analysis.

2.9. *Near infrared data processing*

Principal Component Analysis (PCA) was employed to analyze the unprocessed spectra obtained from NIR spectroscopy. The absorbance value measured within the wavelength ranges of 904 – 1699 nm and 900 – 1700 nm were transformed into a set of new orthogonal variables known as principal components or factors.¹⁴ Statistica 14.0 (TIBCO® Statistica, Palo Alto, CA, USA) was used to perform PCA. Based on the recorded NIR spectra, Artificial Neural Network (ANN) modeling was applied for predicting physical (dry matter content, color change, the average Feret's particle diameter) and chemical (concentration of caffeine measured by the spectrophotometric and the HPLC method) characteristics of the adulterated samples. For ANN development, back error propagation algorithm available in Statistica 14.0 (TIBCO® Statistica, Palo Alto, CA, USA) was applied. Developed ANNs consisted of ten neurons in the input layer that represent the coordinates of the first ten factors obtained from PCA. The ten factors' principal components contributed to more than 99.99% of the data variability. The number of the hidden layer neurons ranged from 4 to 13. Data were randomly divided into training, test and validation (70:15:15). The number of neurons in the output layer was 1 (each physical or chemical characteristic). In order to estimate the performance of developed ANN models, determination coefficient (R^2) and Root Mean Square Error (RMSE) values for training, testing, and validation were used.¹⁵

2.10. *Statistical analysis*

The means of the results of physical and chemical characteristics of ground coffee, malt coffee and prepared coffee mixtures were evaluated using t-test for dependent samples, to compare

significant differences ($p < 0.05$) between the samples. t-test was performed in Statistica 14.0 (TIBCO® Statistica, Palo Alto, CA, USA).

3. Results and discussion

3.1. Determination of the average Feret's diameter of ground coffee, malt coffee and prepared coffee mixtures

In this study, the average Feret's diameter of the powder samples (ground coffee, malt coffee and prepared coffee mixtures) was determined using the ImageJ software. The Feret's diameter is particularly useful for assessing the size distribution of particles, as it measures the distance between two parallel tangents of a particle, also providing insight into its dimension and shape.⁴ The results from Table 1 indicated that the sample with the highest average Feret's diameter ($108.20 \pm 30.94 \mu\text{m}$) corresponds to the sample U90% (sample containing 90% of malt coffee added). Conversely, the sample U5% (sample containing 5% of malt coffee added) exhibited the lowest average Feret's diameter ($57.25 \pm 12.02 \mu\text{m}$). It could be concluded that adding a higher amount of malt coffee increases the average Feret's diameter of mixtures (Fig. 1).



Slika 1 – Mikroskopski prikaz čestica pripremljenih mješavina kave s dodatkom
 sladne kavovine u određenim postocima: (a) čista (mljevena) kava (U0 %),
 (b) mješavina kave s 50 %-tnim udjelom sladne kavovine (U50 %)
 i (c) sladna kavovina (U100 %)

Fig. 1 – The microscopic presentation of the particles from the prepared coffee mixtures
 with the addition of malt coffee in certain percentages: (a) pure (ground coffee) (U0%),
 (b) coffee mixture with 50% of malt coffee (U50%)
 and (c) malt coffee (U100%)

Tablica 1 – Ovisnost prosječnog Feretovog promjera čestica mljevene kave (U0 %), sladne kavovine (U100 %) te pripremljenih mješavina kave o udjelu sladne kavovine (U1 %, U3 %, U5 %, U7 %, U9 %, U11 %, U13 %, U15 %, U20 %, U25 %, U30 %, U40 %, U50 %, U60 %, U70 %, U80 %, U90 %). Različita slova predstavljaju značajne razlike kod $p < 0,05$.

Table 1 – The dependence of the average Feret's diameter of ground coffee (U0%), malt coffee (U100%) and prepared coffee mixtures on the amount of added malt coffee (U1%, U3%, U5%, U7%, U9%, U11%, U13%, U15%, U20%, U25%, U30%, U40%, U50%, U60%, U70%, U80%, U90%). Different letters represent significant differences at $p < 0.05$.

Uzorak Sample	Prosječni Feretov Promjer/ μm The Average Feret Diameter/ μm
U0%	59.40 $\pm$ 13.19 ^a
U1%	91.00 $\pm$ 32.70 ^a
U3%	104.35 $\pm$ 33.10 ^{a,c}
U5%	57.25 $\pm$ 12.02 ^a
U7%	66.15 $\pm$ 19.33 ^a
U9%	94.55 $\pm$ 37.17 ^a
U11%	107.65 $\pm$ 25.76 ^a
U13%	81.60 $\pm$ 26.02 ^{a,h}
U15%	89.70 $\pm$ 23.89 ^a
U20%	90.05 $\pm$ 26.20 ^{a,j}
U25%	84.00 $\pm$ 20.72 ^{a,k}
U30%	94.75 $\pm$ 23.75 ^{a,l}
U40%	94.10 $\pm$ 42.43 ^a
U50%	88.75 $\pm$ 33.90 ^{a,m}
U60%	70.15 $\pm$ 24.05 ^{a,n}
U70%	97.25 $\pm$ 21.78 ^a
U80%	68.55 $\pm$ 20.82 ^{a,p}
U90%	108.20 $\pm$ 30.94 ^a
U100%	77.70 $\pm$ 19.10 ^{a,s}

3.2. Determination of dry matter content and caffeine concentration in prepared coffee mixtures with the addition of malt coffee

Dry matter content for the samples of ground coffee, malt coffee and adulterated samples are presented in Table 2. The dry matter content in the ground coffee and the adulterated samples remained relatively consistent. Malt coffee (U100%) had significantly lower dry matter content (0.9662 $\pm$ 0.0004 %), suggesting that malt coffee is distinct in its composition.

The concentration of caffeine in the ground coffee and the prepared coffee mixtures was determined using two methods. The caffeine concentrations determined by the spectrophotometric method (Table 3) were significantly higher compared to the caffeine concentrations obtained by the HPLC method (Table 4).

Tablica 2 – Suha tvar uzoraka mljevene kave (U0 %), sladne kavovine (U100 %) i uzoraka s dodatkom sladne kavovine (U1 %, U3 %, U5 %, U7 %, U9 %, U11 %, U13 %, U15 %, U20 %, U25 %, U30 %, U40 %, U50 %, U60 %, U70 %, U80 %, U90 %). Različita slova predstavljaju značajne razlike kod $p < 0,05$.

Table 2 – Dry matter content for the samples of ground coffee (U0%), malt coffee (U100%) and samples with the addition of malt coffee (U1%, U3%, U5%, U7%, U9%, U11%, U13%, U15%, U20%, U25%, U30%, U40%, U50%, U60%, U70%, U80%, U90%). Different letters represent significant differences at $p < 0.05$.

Uzorak Sample	Suha tvar/% Dry matter/%
U0%	0.9929±0.0046 ^a
U1%	0.9936±0.0003 ^a
U3%	0.9951±0.0000 ^a
U5%	0.9923±0.0028 ^a
U7%	0.9945±0.0011 ^a
U9%	0.9931±0.0034 ^a
U11%	0.9919±0.0021 ^a
U13%	0.9944±0.0013 ^a
U15%	0.9952±0.0005 ^a
U20%	0.9953±0.0008 ^a
U25%	0.9952±0.0048 ^{a,k}
U30%	0.9960±0.0001 ^{a,l}
U40%	0.9887±0.0007 ^{a,lj}
U50%	0.9926±0.0033 ^a
U60%	0.9932±0.0035 ^a
U70%	0.9963±0.0015 ^a
U80%	0.9966±0.0008 ^{a,p}
U90%	0.9968±0.0009 ^{a,r}
U100%	0.9662±0.0004 ^{a,s}

Although it is to be expected that a decrease in caffeine concentration would be result of increased amount of malt coffee, this was not observed in this work. This discrepancy can be attributed to the presence of caffeine in the precipitate formed during 20 minutes cooling period as well as the aggregation of particles that occurred during the mixing of samples. These factors may have influenced the overall caffeine concentration in the final mixtures. In the study conducted by *F. Gandra et al.*¹⁶ the caffeine concentration in pure coffee determined by the HPLC method was 18 mg g_{dm}⁻¹. As the amount of the adulterant (malt) increased, the caffeine concentration decreased, ranging from 15.6 mg g_{dm}⁻¹ to 11.4 mg g_{dm}⁻¹. The obtained literature results are in agreement with this work, for the mixtures containing up to 20% of malt coffee.

Tablica 3 – Koncentracija kofeina, određena spektrofotometrijskom metodom, u mljevenoj kavi (U0 %) i pripremljenim mješavinama kave s različim udjelima sladne kavovine (U1 %, U3 %, U5 %, U7 %, U9 %, U11 %, U13 %, U15 %, U20 %, U25 %, U30 %, U40 %, U50 %, U60 %, U70 %, U80 %, U90 %). Različita slova predstavljaju značajne razlike kod $p < 0,05$.

Table 3 – The caffeine concentration determined by the spectrophotometric method, in the ground coffee (U0%) and prepared coffee mixtures with different amount of malt coffee (U1%, U3%, U5%, U7%, U9%, U11%, U13%, U15%, U20%, U25%, U30%, U40%, U50%, U60%, U70%, U80%, U90%). Different letters represent significant differences at $p < 0.05$.

Uzorak Sample	Koncentracija kofeina/mg g _{dm} ⁻¹ Caffeine concentration/mg g _{dm} ⁻¹
U0%	598.0906±2.5805 ^a
U1%	475.0494±0.7419 ^b
U3%	558.4575±0.8408 ^c
U5%	548.0968±0.2187 ^d
U7%	510.4069±4.1242 ^c
U9%	514.9409±8.8778 ^{b,c,d,f}
U11%	534.4721±4.7260 ^{c,d,g}
U13%	537.5087±14.0471 ^{a,b,c,d,h}
U15%	525.7428±21.9411 ^{a,b,c,d,i}
U20%	494.3315±15.5171 ^{a,b,c,d,j}
U25%	521.3444±8.1455 ^{b,c,d,k}
U30%	481.4048±4.5094 ^{b,l}
U40%	503.3325±1.4177 ^{f,g,h,i,j,k,l,lj}
U50%	481.7843±6.3861 ^{b,lj,m}
U60%	531.2474±14.3097 ^{a,b,c,d,lj}
U70%	496.3052±24.9664 ^{a,b,c,d,lj}
U80%	538.1981±0.4523 ^{f,g,h,i,j,k,l,lj,p}
U90%	510.5279±5.7928 ^{b,d,i,r}

Tablica 4 – Koncentracija kofeina, određena HPLC metodom, u mljevenoj kavi (U0 %) i pripremljenim mješavinama kave s različim udjelima sladne kavovine (U1 %, U3 %, U5 %, U7 %, U9 %, U11 %, U13 %, U15 %, U20 %, U25 %, U30 %, U40 %, U50 %, U60 %, U70 %, U80 %, U90 %). Različita slova predstavljaju značajne razlike kod $p < 0,05$.

Table 4 – The caffeine concentration determined by the HPLC method, in the ground coffee (U0%) and prepared coffee mixtures with different amount of malt coffee (U1%, U3%, U5%, U7%, U9%, U11%, U13%, U15%, U20%, U25%, U30%, U40%, U50%, U60%, U70%, U80%, U90%). Different letters represent significant differences at $p < 0.05$.

Uzorak Sample	Koncentracija kofeina/ mg g _{dm} ⁻¹ Caffeine concentration/ mg g _{dm} ⁻¹
U0%	29.1855±0.1270 ^a
U1%	25.9860±0.3180 ^a
U3%	33.2636±0.0080 ^c
U5%	30.5665±0.1000 ^{a,d}
U7%	24.4291±0.0140 ^{a,e}
U9%	23.7455±0.0740 ^{c,f}
U11%	16.5759±0.0350 ^g
U13%	16.8170±0.0500 ^h
U15%	16.6580±0.0010 ^{g,h,i}
U20%	17.7744±0.0740 ^j
U25%	33.4730±0.8820 ^{a,c}
U30%	25.9169±0.0180 ^{a,l}
U40%	26.8704±0.0310 ^{a,lj}
U50%	21.9390±0.0480 ^m
U60%	28.7056±0.1140 ^{a,n}
U70%	28.9096±0.0445 ^a
U80%	27.7360±0.0150 ^{a,p}
U90%	26.4390±0.0200 ^{a,r}

3.3. Color determination of prepared coffee mixtures with the addition of malt coffee

Colorimetric measurements were conducted to assess the color characteristics of ground coffee, malt coffee and the prepared mixtures. Specifically, Hunter's parameters L^* , a^* and b^* were measured and used for calculation of color change (ΔE^*) of the prepared samples (Table 5).

Tablica 5 – Hunterovi parametri (L^* , a^* i b^*) i promjena boje (ΔE^*) boje uzoraka mljevene kave (U0 %), sladne kavovine (U100 %) i uzoraka s dodatkom sladne kavovine (U1 %, U3 %, U5 %, U7 %, U9 %, U11 %, U13 %, U15 %, U20 %, U25 %, U30 %, U40 %, U50 %, U60 %, U70 %, U80 %, U90 %). Različita slova predstavljaju značajne razlike kod $p < 0,05$.

Table 5 – The Hunter's color parameters (L^* , a^* and b^*) and color change (ΔE^*) for the samples of ground coffee (U0%), malt coffee (U100%) and samples with the addition of malt coffee (U1%, U3%, U5%, U7%, U9%, U11%, U13%, U15%, U20%, U25%, U30%, U40%, U50%, U60%, U70%, U80%, U90%). Different letters represent significant differences at $p < 0.05$.

UZORAK* SAMPLE*	Hunterovi parametri Hunter's parameters			Promjena boje Color change
	L^*	a^*	b^*	ΔE^*
U0%	32.07 ± 3.15 ^a	7.99 ± 0.15 ^a	4.98 ± 0.42 ^a	/
U1%	31.86 ± 0.01 ^{a,b}	8.05 ± 0.01 ^a	4.98 ± 0.00 ^a	2.26 ± 0.29 ^b
U3%	32.82 ± 0.02 ^a	8.29 ± 0.04 ^a	5.25 ± 0.08 ^a	1.48 ± 0.01 ^b
U5%	34.92 ± 0.00 ^a	8.16 ± 0.00 ^a	5.28 ± 0.03 ^a	0.63 ± 0.01 ^{b,d}
U7%	34.03 ± 0.01 ^{a,c}	7.86 ± 0.00 ^{a,e}	4.69 ± 0.02 ^{a,e}	0.70 ± 0.01 ^{b,e}
U9%	32.87 ± 0.00 ^{a,f}	7.78 ± 0.01 ^{a,f}	4.54 ± 0.02 ^{a,f}	1.64 ± 0.01 ^b
U11%	32.23 ± 3.51 ^a	7.87 ± 0.25 ^a	4.67 ± 0.55 ^a	0.47 ± 0.03 ^{b,g}
U13%	33.16 ± 0.01 ^{a,h}	7.74 ± 0.01 ^{a,h}	4.49 ± 0.01 ^{a,h}	1.43 ± 0.01 ^{b,h}
U15%	32.07 ± 0.33 ^a	7.88 ± 0.07 ^a	4.72 ± 0.10 ^{a,i}	2.13 ± 0.06 ^{b,i}
U20%	34.98 ± 2.20 ^{a,j}	8.36 ± 0.35 ^a	5.52 ± 0.63 ^a	2.37 ± 0.04 ^{b,j}
U25%	33.48 ± 3.23 ^a	8.00 ± 0.25 ^{a,k}	4.95 ± 0.50 ^{a,k}	1.42 ± 0.18 ^b
U30%	35.33 ± 0.74 ^{a,l}	7.89 ± 0.19 ^{a,l}	4.99 ± 0.33 ^a	1.19 ± 0.55 ^b
U40%	31.90 ± 0.05 ^a	8.89 ± 0.18 ^{a,m}	6.13 ± 0.30 ^{a,m}	2.75 ± 0.21 ^b
U50%	31.30 ± 0.36 ^{a,n}	9.75 ± 0.07 ^{a,n}	7.43 ± 0.14 ^{a,n}	4.04 ± 0.14 ^{b,n}
U60%	33.58 ± 0.33 ^{a,o}	9.04 ± 0.11 ^{a,o}	6.41 ± 0.25 ^{a,o}	1.66 ± 0.07 ^b
U70%	31.32 ± 1.24 ^a	9.22 ± 0.18 ^{a,p}	6.62 ± 0.17 ^{a,p}	2.60 ± 0.00 ^{b,p}
U80%	31.53 ± 0.35 ^a	9.17 ± 0.04 ^{a,x}	6.62 ± 0.11 ^{a,x}	3.26 ± 0.22 ^{b,x}
U90%	32.00 ± 1.87 ^{a,y}	9.24 ± 0.33 ^{a,y}	6.92 ± 0.63 ^{a,y}	2.47 ± 0.27 ^{b,y}
U100%	41.79 ± 0.07 ^{a,z}	10.67 ± 0.01 ^{a,z}	11.59 ± 0.01 ^{a,z}	10.13 ± 0.06 ^{b,z}

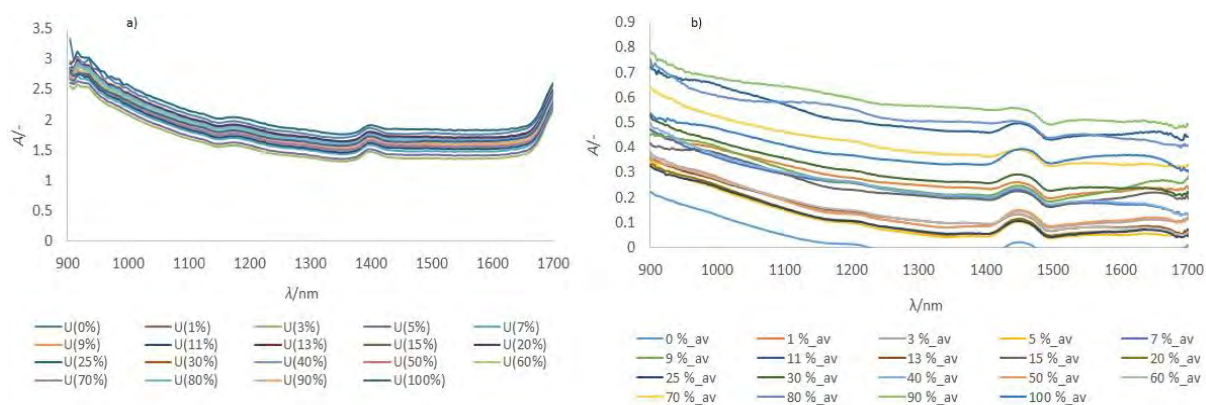
The measured values of the parameter L^* exhibited a predominantly increasing trend indicating that the samples become lighter with higher amounts of malt coffee. The parameter a^* in all observed samples remained positive with an increasing trend, indicating that the samples are moving towards a red color as more malt coffee was added. The parameter b^* in all observed samples also showed positive and increasing trend, indicating that the samples are moving towards a yellow color as more malt coffee was added. The sample of malt coffee (U100%) exhibited the greatest color change

($\Delta E^* = 10.13 \pm 0.06$), compared to the ground coffee. The sample with the lowest deviation from the ground coffee is U11% ($\Delta E^* = 0.47 \pm 0.03$). This minimal change in ΔE^* value suggests that the addition of the malt coffee at this proportion (11%) has a negligible impact on the color of coffee mixture, maintaining a closer similarity to the pure (ground) coffee.

3.4. Near infrared spectra of the prepared coffee mixtures with the addition of malt coffee

The analysis of the Near infrared (NIR) spectra for the samples of ground coffee, malt coffee and their mixtures revealed both similarities and differences in absorbance, at specific wavelengths. This spectral analysis can be used as a qualitative method for identifying the adulterants within the powder samples. The continuous NIR spectra were collected in the range from 904 – 1699 nm (Fig. 2a) and in the wavelength range from 900 nm to 1700 nm (Fig. 2b). From the results shown in Fig. 2a, the unprocessed spectra of all samples correspond to a single absorbance pattern. Additionally, significant peaks were observed from 1100 nm and 1200 nm, 1430 nm and within the wavelength range 1600 – 1699 nm. The C–H second overtone, the O–H first overtone and the C–H first overtone correspond to selected spectral areas.^{3,15,17,18} Structure of the caffeine molecule includes purine rings and several functional groups such as C = O, C – H, N – H. These structural features contribute to distinct absorption peaks in the NIR region. Furthermore, significant peaks were observed from 1100 nm and 1200 nm which are primarily linked to the stretching vibrations of the CH₃ and C = O groups. Peaks between 1350 nm and 1470 nm correspond to combination of C–H group, while peaks between 1600 and 1720 nm correspond to C–H stretching first overtone.¹⁷

The NIR spectra recorded with portable NIR spectrometer (Fig. 2b) differed from those recorded by the NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm. Significant noise has been observed in the wavelength ranges of 900 to 1000 nm and 1640 to 1700 nm. For all recorded samples, significant peak was observed within the wavelength range of 1400 to 1500 nm which corresponds to the stretching of methyl group and presence of C–H bonds. This data highlights the varying concentrations of methyl groups and C–H bonds in the different samples.



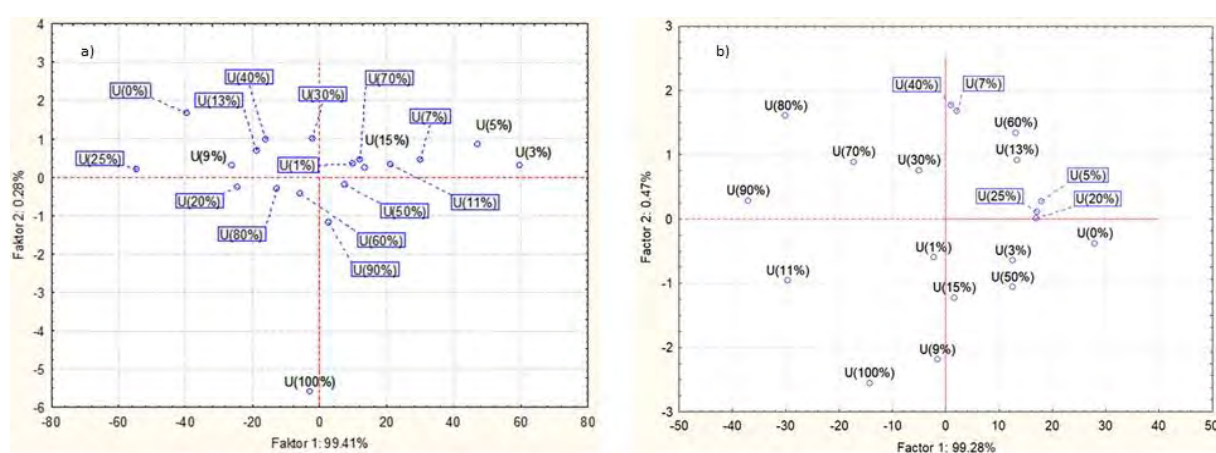
Slika 2 – Izvorni NIR spektri, snimljeni NIR uređajima: a) Control Development, Inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm i b) NIR-S-G1, Innospectra Tajvan, uzoraka mljevene kave (U0 %_{av}), sladne kavovine (U100 %_{av}) te mješavine mljevene kave patvorene dodatkom sladne kavovine u različitim udjelima (U1 %_{av}, U3 %_{av}, U5 %_{av}, U7 %_{av}, U9 %_{av}, U11 %_{av}, U13 %_{av}, U15 %_{av}, U20 %_{av}, U25 %_{av}, U30 %_{av}, U40 %_{av}, U50 %_{av}, U60 %_{av}, U70 %_{av}, U80 %_{av}, U90 %_{av}; av – srednja vrijednost dviju paralela snimljenih NIR spektara)

Fig. 2 – Unprocessed NIR spectra, recorded with NIR spectrometers: a) Control Development, Inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm and b) NIR-S-G1, Innospectra Taiwan, of ground coffee (U0%_{av}), malt coffee (U100%_{av}) and mixtures of ground coffee adulterated with the addition of different amounts of malt coffee (U1%_{av}, U3%_{av}, U5%_{av}, U7%_{av}, U9%_{av}, U11%_{av}, U13%_{av}, U15%_{av}, U20%_{av}, U25%_{av}, U30%_{av}, U40%_{av}, U50%_{av}, U60%_{av}, U70%_{av}, U80%_{av}, U90%_{av} – average value of NIR spectra recorded in duplicate)

3.5. Principal Component Analysis of the unprocessed NIR spectra of the prepared coffee mixtures with the addition of malt coffee

Because NIR spectral data comprises of a large amount of information that could be partially visible, Principal Component Analysis (PCA) was applied. PCA could account for the most variability, beginning with the first factor containing the greatest variance explained and ending with the final factor with the least variance explained.¹⁴ In this work, PCA analysis was performed in order to show similarities and differences between investigated samples (Fig. 3). PCA analysis, based on the unprocessed NIR spectra, recorded with both NIR spectrometers, successfully separated ground (pure) coffee (U0%) from malt coffee (U100%). Better grouping, based on the amount of added adulterant, was achieved for the samples recorded with the device Control Development, Inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm (Fig. 3a), compared to the portable

spectrometer (NIR-S-G1, Innospectra Taiwan) (Fig. 3b). For NIR spectra recorded with both spectrometers, the first and second principle components accounted for more than 99% of the overall variation for all samples (Fig. 3). Comparable findings were given by *W. L. Cheah and M. Fang*, who successfully distinguished pure coffee from adulterated samples, with detection limit around 5%, confirming the applicability of chemometric tools in combination with the analytical methods in detection of coffee adulteration.¹⁹ *L. Munyendo et al.*²⁰ proved suitability of PCA analysis to distinguish adulterated arabica coffee according to the type and the adulterant concentration.



Slika 3 – Analiza glavnih komponenta (PCA) izvornih NIR spektara, snimljenih NIR uređajima: a)

Control Development, Inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm) i b) NIR-S-G1, Innospectra Tajvan, mljevene kave (U0 %), sladne kavovine (U100 %) te mješavine mljevene kave patvorene dodatkom sladne kavovine u različitim udjelima (U1 %, U3 %, U5 %, U7 %, U9 %, U11 %, U13 %, U15 %, U20 %, U25 %, U30 %, U40 %, U50 %, U60 %, U70 %, U80 %, U90 %)

Fig. 3 – Principal Component Analysis (PCA) of unprocessed NIR spectra, recorded with NIR spectrometers: a) Control Development, Inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm and b) NIR-S-G1, Innospectra Taiwan, of ground coffee (U0%), malt coffee (U100%) and mixtures of ground coffee adulterated with the addition of different amounts of malt coffee (U1%, U3%, U5%, U7%, U9%, U11%, U13%, U15%, U20%, U25%, U30%, U40%, U50%, U60%, U70%, U80%, U90%)

3.6. Artificial neural networks for prediction of physical and chemical characteristics of ground coffee, malt coffee and prepared coffee mixtures with the addition of malt coffee

Due to their nonlinearity, ANNs have been reported as an efficient tool for spectral data analysis and as an alternative to linear calibration methods often used in NIR spectroscopy.⁵ ANN models were developed separately for each characteristic. Table 6 shows the most effective ANN design, for each

output parameter, based on the determination coefficients and RMSE values for training, testing and validation. Based on the NIR spectra recorded with NIR spectrometer Control Development, Inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm , the MLP 10-7-1, was considered as the most favorable for the representation of caffeine concentration measured by the spectrophotometric method. Determination coefficients were as follows: $R^2_{\text{training}} = 0.9694$, $R^2_{\text{test}} = 0.9666$, and $R^2_{\text{validation}} = 0.9644$ while corresponding RMSE values were in the range from 0.0015 to 0.0071. For the caffeine concentration measured by the HPLC method, determination coefficients for training, test and validation were in the range from 0.9179 to 0.9589, while their corresponding RMSE values were in the range from 0.0019 to 0.0085. Selected ANNs described the chemical characteristic of the analysed samples with high precision (R^2 values were higher than 0.9).

Regarding the physical characteristics, selected ANNs, described well the color change (ΔE) ($R^2_{\text{training}} = 0.9939$, $R^2_{\text{test}} = 0.7630$, and $R^2_{\text{validation}} = 0.7471$; $\text{RMSE}_{\text{training}} = 0.0003$, $\text{RMSE}_{\text{test}} = 0.0011$; $\text{RMSE}_{\text{validation}} = 0.0232$), while for the prediction of average Feret's diameter and dry matter developed ANNs were unreliable; R^2 values for training, test and validation were in the range from 0.2520 to 0.5761 ($\text{RMSE}_{\text{training}} = 0.0407$, $\text{RMSE}_{\text{test}} = 0.0292$; $\text{RMSE}_{\text{validation}} = 0.0440$) and from $R^2 = 0.1951$ to $R^2 = 0.9766$ ($\text{RMSE}_{\text{training}} = 0.0015$, $\text{RMSE}_{\text{test}} = 0.0021$; $\text{RMSE}_{\text{validation}} = 0.0033$), respectively.

Based on the NIR spectra recorded with NIR spectrometer NIR-S-G1, Innospectra Taiwan, the multilayer perceptron MLP 10-11-1, described caffeine concentration measured by the spectrophotometric method with high precision. Determination coefficients were as follows: $R^2_{\text{training}} = 0.9928$, $R^2_{\text{test}} = 0.9758$, and $R^2_{\text{validation}} = 0.9659$ while corresponding RMSE values were in the range from 0.0004 to 0.0025. For the caffeine concentration measured by the HPLC method, determination coefficients for training, test and validation were in the range from 0.8088 to 0.9684, while their corresponding RMSE values were in the range from 0.0014 to 0.0076. Selected ANN, MLP 10-11-1 described the color change (ΔE) ($R^2_{\text{training}} = 0.9993$, $R^2_{\text{test}} = 0.9539$, and $R^2_{\text{validation}} = 0.9791$; $\text{RMSE}_{\text{training}} = 0.0001$, $\text{RMSE}_{\text{test}} = 0.0004$; $\text{RMSE}_{\text{validation}} = 0.002$) with high accuracy, while MLP 10-5-1 described dry matter ($R^2_{\text{training}} = 0.9962$, $R^2_{\text{test}} = 0.9950$, and $R^2_{\text{validation}} = 0.7363$; $\text{RMSE}_{\text{training}} = 0.0001$, $\text{RMSE}_{\text{test}} = 0.0004$; $\text{RMSE}_{\text{validation}} = 0.0013$) with high accuracy. For the prediction of the average Feret's diameter, developed ANN were unreliable; R^2 values for training, test and validation were in the range from 0.2481 to 0.5672 ($\text{RMSE}_{\text{training}} = 0.0394$, $\text{RMSE}_{\text{test}} = 0.0285$; $\text{RMSE}_{\text{validation}} = 0.0433$).

Tablica 6 – Karakteristike odabranih umjetnih neuronskih mreža razvijenih za predviđanje: koncentracije kofeina eksperimentalno određenih spektrofotometrijskom i HPLC metodom, promjene boje (ΔE), prosječnog Feretovog promjera čestica i suhe tvari na temelju izvornih NIR spektara snimljenih NIR uređajima Control Development, Inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm i NIR-S-G1, Innospectra Tajvan, u istraživanim uzorcima

Table 6 – The structure of artificial neural networks chosen to describe: caffeine concentration (determined by the spectrophotometric and the HPLC method), color change (ΔE), the average Feret's diameter of particle and dry matter based on the unprocessed NIR spectra recorded using NIR spectrometers Control Development, Inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm and NIR-S-G1, Innospectra Taiwan, in investigated samples

Parametri	Karakteristika mreže	Preciznost učenja $R^2_{\text{učenje}}$	Pogreška učenja RMSE _{učenje}	Preciznost testiranja $R^2_{\text{testiranje}}$	Pogreška testiranja RMSE _{testiranje}	Preciznost validacije $R^2_{\text{validacija}}$	Pogreška validacije RMSE _{validacija}	Skrivena aktivacijska funkcija	Izlazna aktivacijska funkcija
Parameters	MLP (Multilayer Perceptron)	Training performance R^2_{training}	Training error RMSE _{training}	Test performance R^2_{test}	Test error RMSE _{test}	Validation performance $R^2_{\text{validation}}$	Validation error RMSE _{validation}	Hidden activation function	Output activation function
NIR spectrometer (Control Development, Inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm)									
koncentracija kofeina (spektrofotometrijska metoda)	10-7-1	0.9694	0.0015	0.9666	0.0028	0.9644	0.0071	Tanh	Logistic
caffeine concentration (spectrophotometric method)									
koncentracija kofeina (HPLC metoda)	10-9-1	0.9589	0.0019	0.9183	0.0085	0.9179	0.0056	Tanh	Exponential
caffeine concentration (HPLC method)									
promjena boje (ΔE)	10-8-1	0.9939	0.0003	0.7630	0.0011	0.7471	0.0232	Tanh	Logistic
color change (ΔE)									
prosječni Feretov promjer čestica	10-4-1	0.3135	0.0407	0.5761	0.0292	0.2520	0.0440	Tanh	Tanh
the average Feret's diameter of particles									
suha tvar	10-9-1	0.9620	0.0015	0.9766	0.0021	0.1951	0.0033	Logistic	Identity
dry matter									
NIR spectrometer (NIR-S-G1, Innospectra Taiwan)									
koncentracija kofeina (spektrofotometrijska metoda)	10-11-1	0.9928	0.0004	0.9758	0.0025	0.9659	0.0025	Tanh	Tanh
caffeine concentration (spectrophotometric method)									
koncentracija kofeina (HPLC metoda)	10-8-1	0.9684	0.0014	0.9626	0.0032	0.8088	0.0076	Exponential	Exponential
caffeine concentration (HPLC method)									
promjena boje (ΔE)	10-11-1	0.9993	0.0001	0.9539	0.0004	0.9791	0.002	Tanh	Tanh
color change (ΔE)									
prosječni Feretov promjer čestica	10-12-1	0.5672	0.0394	0.3379	0.0285	0.2481	0.0433	Identity	Identity
the average Feret's diameter of particles									
suha tvar	10-5-1	0.9962	0.0001	0.9950	0.0004	0.7363	0.0013	Exponential	Exponential
dry matter									

Other authors investigated the potential of NIR spectroscopy, in combination with PCA analysis and artificial neural network modelling, in monitoring the adulteration of coffee and different food products and for simulations of different geographical and varietal classification of coffee.²¹⁻²⁴ Results indicated capability of NIR technology to detect adulteration as well as generate sufficient information for authentication of roasted and ground coffee from different geographical origins.

4. Conclusions

Near Infrared Spectroscopy, in combination with Principal Component Analysis and Artificial Neural Network modeling may be efficiently utilized for detection of adulteration in ground coffee samples, in qualitative as well as quantitative manners. Incorporating ANN models into quality control processes provides a powerful tool to enhance food safety, detect food fraud and protect consumers.

List of abbreviations and symbols

ANNs – Artificial Neural Networks

DM – Dry matter

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

NIRs – Near Infrared Spectroscopy

PCA – Principal Component Analysis

RMSE – Root Mean Square Error

a^* , b^* , L^* - Coordinates of Hunters parameters

ΔE – Color change calculated based on measured Hunters parameters

R^2 – Determination coefficient

λ – wavelength, nm

av – average of two parallel measurements

U0%, U1%, U3%, U5%,, U100% – Samples of ground coffee containing corresponding amount of malt coffee

References

1. N. Núñez, X. Collado, C. Martínez, J. Saurina, O. Núñez, Authentication of the origin, variety and roasting degree of coffee samples by non-targeted HPLC-UV fingerprinting and chemometrics. Application to the detection and quantitation of adulterated coffee samples, *Foods* **9** (3) (2020) 378, doi: <https://doi.org/10.3390/foods9030378>.
2. M. Perez, I. Domínguez-López, A. López-Yerena, A. Vallverdú Queralt, Current strategies to guarantee the authenticity of coffee, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **63** (2023) 539–554, doi: <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1951651>.
3. D. Cozzolino, W. U. Cynkar, N. Shah, P. Smith, Multivariate data analysis applied to spectroscopy: Potential application to juice and fruit quality, *Food Res. Int.* **44** (2011) 1888–1896, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.041>.
4. S. Sirovec, A. Jurinjak Tušek, M. Benković, D. Valinger, T. Sokač Cvetnić, J. Gajdoš Kljusurić, T. Jurina, Emulsification of rosemary and oregano aqueous extracts and their in vitro bioavailability, *Plants* **11** (2022) 3372, 1–22, doi: <https://doi.org/10.3390/plants11233372>.
5. D. Valinger, T. Jurina, A. Šain, N. Matešić, M. Panić, M. Benković, J. Gajdoš Kljusurić, A. Jurinjak Tušek, Development of ANN models based on combined UV-vis-NIR for rapid quantification of physical and chemical properties of industrial hemp extracts, *Phytochem. Anal.* (2020) 1–13, doi: <https://doi.org/10.1002/pca.2979>.
6. M. Zareef, Q. Chen, M. M. Hassan, M. Arslan, M. M. Hashim, W. Ahmad, F. Y. H. Kutsanedzie, A. A. Agyekum, An overview on the applications of typical non-linear algorithms coupled with NIR spectroscopy in food analysis, *Food Eng. Rev.* **12** (2020) 173–190, doi: <https://doi.org/10.1007/s12393-020-09210-7>.
7. F. Grgić, T. Jurina, D. Valinger, J. Gajdoš Kljusurić, A. Jurinjak Tušek, M. Benković, Near-infrared spectroscopy coupled with chemometrics and artificial neural network modeling for prediction of emulsion droplet diameters, *Micromachines* **13** (2022) 1876, doi: <https://doi.org/10.3390/mi13111876>.
8. L. R. Costa, G. H. D. Tonoli, F. R. Milagres, P. R. G. Hein, Artificial neural network and partial least square regressions for rapid estimation of cellulose pulp dryness based on near infrared spectroscopic data, *Carbohydr. Polym.* **224** (2019) 115186, doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115186>.

9. *A. Belay, K. Ture, M. Redi, A. Asfaw*, Measurement of caffeine in coffee beans with UV/vis spectrometer, *Food Chem.* **108** (2008) 310–315, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.024>.
10. *N. Vuletić, L. Bardić, R. Odžak*, Spectrophotometric determining of caffeine content in the selection of teas, soft and energy drinks available on the Croatian market, *Food Res.* **5** (2021) 325–330, doi: [https://doi.org/10.26656/fr.2017.5\(2\).482](https://doi.org/10.26656/fr.2017.5(2).482).
11. *M. Panić, V. Gunjević, K. Radošević, M. Cvjetko Bubalo, K. Kovačević Ganić, I. Radojčić Redovniković*, COSMOtherm as an effective tool for selection of deep eutectic solvents based ready-to-use extracts from Graševina grape pomace, *Molecules* **26** (2021) 4722, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26164722>.
12. *W. S. Mokrzycki, M. Tatol*, Colour difference ΔE -A survey, *Mach. Graph. Vis.* **20** (2011) 383–411.
13. AOAC (1995) Official methods of analysis, Association of Official Analytical Chemists, 16. izd., Arlington VA, USA.
14. *S. A. Mireei, S. S. Mohtasebi, R. Massudi, S. Rafiee, A. Arabanian*, Feasibility of near infrared spectroscopy for analysis of date fruits, *Int. Agrophys.* **24** (2010) 351–356.
15. *S. Sirovec, M. Benković, D. Valinger, T. Sokač Cvetnić, J. Gajdoš Kljusurić, A. Jurinjak Tušek, T. Jurina*, Development of ANN models for prediction of physical and chemical characteristics of oil-in-aqueous plant extract emulsions using near-infrared spectroscopy, *Chemosensors* **11** (2023) 278, 1–20, doi: <https://doi.org/10.3390/chemosensors11050278>.
16. *F. Gandra, A. Lima, E. Ferreira, M. Pereira, R. Pereira*, Adding adulterants to coffee reduces bioactive compound levels and antioxidant activity, *J. Food Nutr. Res.* **5** (2017) 313–319, doi: <https://doi.org/10.12691/jfnr-5-5-5>.
17. *A. I. Badr Eldin*, Near Infrared Spectroscopy, u I. Akyar (ur.), *Wide Spectra of Quality Control*, IntechOpen, 2011, 1–14.
18. *K. B. Beć, J. Grabska, C. W. Huck*, Principles and applications of miniaturized near-infrared (NIR) spectrometers, *Chem. Eur. J.* **27** (2021) 1514–1532, doi: <https://doi.org/10.1002/chem.202002838>.
19. *W. L. Cheah, M. Fang*, HPLC-based chemometric analysis for coffee adulteration, *Foods* **9** (2020) 880, 1–11, doi: <https://doi.org/10.3390/foods9070880>.

20. *L. Munyendo, D. Njoroge, Y. Zhang, B. Hitzmann*, Novel method for the detection of adulterants in coffee and the determination of a coffee's geographical origin using near infrared spectroscopy complemented by an autoencoder, *Int. J. Food Sci. Technol.* **58** (2023) 1284–1298, doi: <https://doi.org/10.1111/ijfs.16283>.
21. *S. S. N. Chakravartula, R. Moscetti, G. Bedini, M. Nardella, R. Massantini*, Use of convolutional neural network (CNN) combined with FT-NIR spectroscopy to predict food adulteration: A case study on coffee, *Food Control* **135** (2022) 108816, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108816>.
22. *S. Benedetti, S. Mannino, A. G. Sabatini, G. Marcazzan*, Electronic nose and neural network use for the classification of honey, *Apidologie* **35** (2004) 397–402, doi: <https://doi.org/10.1051/apido:2004025>.
23. *M. Soltani Firouz, M. Omid, M. Babaei, M. Rashvand*, Dielectric spectroscopy coupled with artificial neural network for classification and quantification of sesame oil adulteration, *Inf. Process. in Agric.* **9** (2022) 233–242, doi: <https://doi.org/10.1016/j.inpa.2021.05.001>.
24. *A. Guerrero-Peña, L. Vázquez-Hernández, A. Bucio-Galindo, V. Morales-Ramos*, Chemical analysis and NIR spectroscopy in the determination of the origin, variety and roast time of Mexican coffee, *Heliyon* **9** (2023) e18675, doi: [10.1016/j.heliyon.2023.e18675](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18675).

- **MEDICINSKA KEMIJA I FARMACIJA**
MEDICAL CHEMISTRY AND PHARMACY



Mehanokemijski postupak priprave prve faze u sintezi deferasiroksa *Mechanochemical procedure for the preparation of the first phase in the synthesis of deferasirox*

Petra Kuzmić,^{a*} Lucija Kuzmić,^a Nika Rimaj,^a Leonarda Vugrin,^b
Ivan Halasz,^b Ernest Meštrović^a

^a Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije,
Marulićev trg 19, 10000 Zagreb, Hrvatska

^a University of Zagreb Faculty of Chemical Engineering and Technology,
Marulićev trg 19, 10000 Zagreb, Croatia

^b Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb, Hrvatska

^b Ruđer Bošković Institute, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb, Croatia

* Autor za dopisivanje: Petra Kuzmić, univ. bacc. ing. cheming., pkuzmic@fkit.hr

Sažetak

Mehanokemija je grana kemije koja uključuje kemijske i fizikalno-kemijske transformacije tvari svih agregatnih stanja potaknute mehaničkom energijom. Slijedi načela zelene kemije i nalazi široku primjenu, posebice u anorganskoj kemiji i kemiji materijala, a u novije vrijeme i organskoj te farmaceutskoj kemiji. IUPAC je mehanokemiju uvrstio u jednu od deset tehnologija budućnosti koja će revolucionirati svijet.

Cilj istraživanja bio je sintetizirati djelatnu tvar – deferasiroks. To je prvi oralni kelator željeza koji se najčešće koristi za uklanjanje viška željeza iz tijela. Zbog povoljne ekonomije atoma, izvrstan je kandidat za pokušaj mehanokemijske sinteze. U radu je opisan mehanokemijski postupak sinteze intermedijera (benzoksazona) koji nastaje u prvom stupnju sinteze deferasiroksa. Kao glavnu razliku u odnosu na konvencionalni pristup važno je istaknuti izbjegavanje korištenja opasnih i korozivnih sredstava. Dokazano je da je benzoksazon moguće sintetizirati bez korištenja otapala i to u većem prinosu od uobičajene sinteze. Provedeni eksperimenti rezultirali su i otkrićem novog kokristala salicilne kiseline i salicilamida. Poboljšanjem procesa, odnosno dodatnim optimiranjem najvjerojatnije bi se moglo postići još veće iskorištenje. Premda drugi stupanj sinteze nije proveden, postoji velika mogućnost za uspješnost i ovog stupnja jer su njegovi reakcijski uvjeti blaži od onih u prvom stupnju.

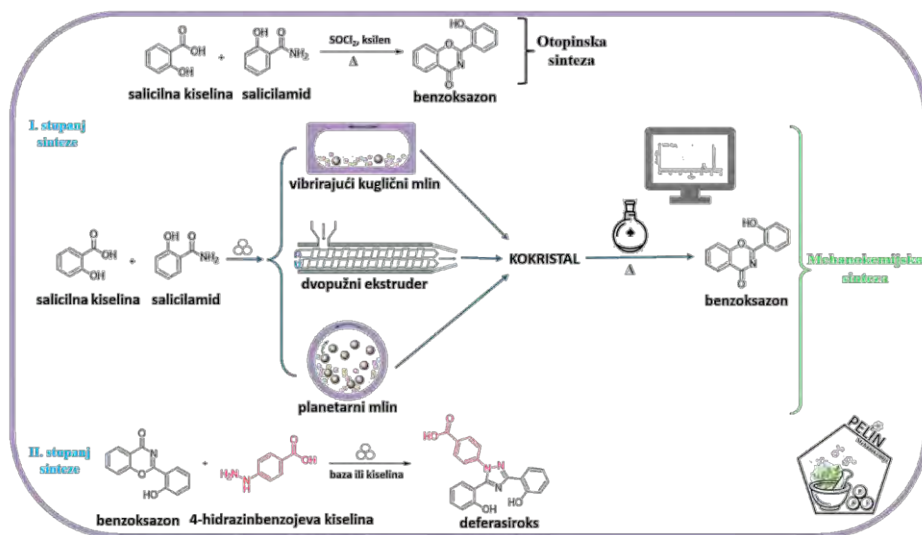
Ključne riječi: mehanokemija, zelena kemija, ekonomija atoma, kokristali, benzoksazon, deferasiroks

Abstract

Mechanochemistry is a branch of chemistry that includes chemical and physicochemical transformations of substances of all aggregate states driven by mechanical energy. It follows the principles of green chemistry and finds wide application, especially in inorganic chemistry and material chemistry and, more recently, in organic and pharmaceutical chemistry. IUPAC included mechanochemistry as one of the ten future technologies that will revolutionize the world.

The research aimed to synthesize the active substance deferasirox. It is the first oral iron chelator most commonly used to remove excess iron from the body. Due to its favorable atom economy, it is an excellent candidate for an attempt at mechanochemical synthesis. The paper describes the mechanochemical process for synthesizing an intermediate (benzoxazine) formed in the first stage of deferasirox synthesis. As the main difference compared to the conventional approach, it is important to highlight avoiding using dangerous and corrosive agents. It has been proven that benzoxazine can be synthesized without using solvents and in a higher yield than usual. The experiments resulted in the discovering of a new co-crystal of salicylic acid and salicylamide. By improving the process, i.e. additional optimization, an even greater yield could most likely be achieved. Although the second stage of synthesis has not been carried out, there is a great possibility for the success of this stage as well, because its reaction conditions are milder than those of the first stage.

Key words: mechanochemistry, green chemistry, atom economy, co-crystals, benzoxazine, deferasirox



1. Uvod

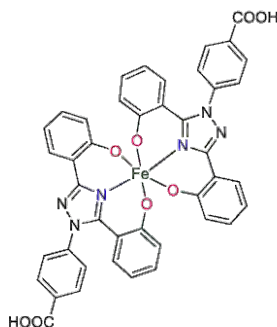
1.1. Kokristali salicilne kiseline i salicilamida

Kokristali su višekomponentni kristalni materijali u kojima su građevni elementi povezani nekovalentnim interakcijama kao što su vodikova i halogena veza te pi --- pi interakcije.^{1,2}

Do sada je priređeno nekoliko tisuća kokristala, dijelom u nakani fundamentalnog istraživanja, no u isto vrijeme neki od kokristala imaju važnu primjenu, kao primjerice ljekoviti pripravci ili intermedijeri u sintezi ciljanih molekula. Salicilna kiselina često je predmet istraživanja u području kemije čvrstog stanja te je korištena u pripremi različitih kokristala. Tragom toga, 2014. g. *A. N. Manin i sur.*³ objavili su rad o sintezi kokristala salicilne kiseline i salicilamida, no nije upisan u CSD bazu. 2019. g. *H. Phetmung, K. Musikapong i T. Srichana*⁴ opisali su kokristal salicilne kiseline i salicilamida sintetiziran u omjeru 1:2 koji je uvršten u CSD bazu (refcode: AQEJEO).

1.2. Deferasiroks

Deferasiroks (DFX), ICL670, 4-[3,5-bis (2-hidroksifenil)-1,2,4-triazol-1-il] benzojeva kiselina bijeli je kristalni prah i prvi oralni kelator željeza. Američka agencija za hranu i lijekove (USFDA) odobrila ga je 2005. g. Primjenjuje se jednom dnevno, a prodaje u obliku konvencionalnih oralnih tableta i granula te kao tablete za oralnu suspenziju. Također, DFX je prvi kelator željeza koji je podvrgnut randomiziranom kliničkom ispitivanju i koji se pokazao učinkovitim u smanjenju opterećenja željezom kod talasemije koja nije ovisna o transfuziji. Koristi se i u terapiji bolesnika s progresivnom rinocerebralnom mukormikozom. Komercijalni DFX slabo je topljiv što predstavlja glavno ograničenje u postizanju odgovarajuće oralne bioraspoloživosti. Stoga, razvoj različitih čvrstih oblika DFX-a ima veliki značaj za formulaciju lijeka.^{6,7,8} Deferasiroks sadrži dva fenolna kisika i triazolski dušik koji djeluju kao tridentatni ligand. Tridentatni kelatori djeluju na način da se dvije molekule liganda vežu na jedan atom željeza (slika 1).^{8,9} 1,2,4-triazolni prsten supstituiran s tri arilne skupine ključni je strukturni motiv deferasiroksa. Opisan je niz učinkovitih sinteza triazola, no izravan pristup prikladno funkcionaliziranim 1,2,4-triazolnim prstenovima težak je izazov jer priroda supstituenata ograničava dostupnost početnih materijala i obično zahtijeva višestupanjske sinteze.⁸



Slika 1 – Vezivanje deferasiroksa na atom željeza⁹

Fig. 1 – Binding of deferasirox to the iron atom⁹

Najčešće korišteni sintetski put za proizvodnju deferasiroksa ima dva koraka. Prvi korak uključuje kondenzaciju cjenovno pristupačnih reaktanata, salicilne kiseline sa salicilamidom, korištenjem tionil klorida u prisutnosti piridina pri refluksu u ksilenu kako bi se dobio 2-(2-hidroksifenil)benz[e][1,3]oksazin-4-on* kao krutina u prinosu (50 – 55 %). U drugom koraku, benzoksazon reagira s 4-hidrazinbenzojevom kiselinom u kipućem etanolu dajući deferasiroks u visokom prinosu (80 %). Glavni problem za uvećanje procesa (engl. scale up) leži u činjenici da se za pripremu benzoksazona koristi vrlo korozivni tionil klorid na visokim temperaturama, što ovaj proces čini iznimno opasnim i teškim za upotrebu u industrijskim razmjerima.⁸ Deferasiroks je zbog više razloga odabran kao predmet istraživanja. Cilj je bio pokušati izbjeći korištenje ksilena i tionil klorida. Osim toga, u literaturi nije zabilježeno da je deferasiroks do sada mehanokemijski sintetiziran. Također, riječ je o skupom lijeku, a dobiva se iz cjenovno dostupnih reaktanata.⁵ Nalazi se i na popisu esencijalnih lijekova Svjetske zdravstvene organizacije (WHO), a zbog zadovoljavanja atomske ekonomičnosti idealan je kandidat za mehanokemijsku sintezu.

2. Eksperimentalni dio

2.1. Polazni spojevi

Salicilna kiselina (C₇H₆O₃, oznaka: SA); salicilamid (C₇H₇NO₂, oznaka: SAM); 4-hidrazinbenzojeva kiselina (C₇H₆O₃, oznaka: 4-HBK)

*2-(2-hidroksifenil)benz[e][1,3]oksazin-4-on u ovom radu kolokvijalno nazivamo benzoksazon

2.2. Računalni programi za prikupljanje i obradu podataka

PXRD – ConQuest, Mercury, PowDLL, Topas; Ramanova spektroskopija – InSitu Raman ver. 2.0.0, Matlab; IR – PerkinEmner Spectrum IR; NMR – MestReNova; DSC – STARe Excellence Software

2.3. Provedba pokusa

Za provedbu pokusa korištena je uobičajena mehanokemijska oprema – vibrirajući kuglični mlin, ekstruder i planetarni mlin. Tarionik s tučkom korišten je po potrebi, kod pripreme uzoraka za PXRD, IR i DSC analizu. Pokusi u tikvicama, ampuli i autoklavu, tj. u talini, vršeni su bez dodatka otapala što je u skladu s načelima zelene kemije.

2.3.1. Karakterizacija polaznih reaktanata

Na početku eksperimenta snimljeni su spektri polaznih reaktanata Ramanovom spektroskopijom, nuklearnom magnetskom rezonancijom (NMR) i infracrvenom spektroskopijom (IR) te difraktogrami rendgenskom difrakcijom na prahu (PXRD), kako bi se spektri čistih reaktanata mogli uspoređivati sa spektrima produkata dobivenih pokusima.

Ramanova spektroskopija

Na kugličnom je mlinu (IST 500) snimljen Ramanov spektar prazne PMMA (poli(metil-metakrilat) posudice od 14 mL, kako bi se njen doprinos uklonio iz cijelog spektra. Također, snimljen je Ramanov spektar polaznih reaktanata (SA, SAM, 4-HBK). Izvagan je po 1 mmol svakog reaktanta i odvage pažljivo stavljanje u posudice od PMMA tako da prekriju ravan, najtanji dio stijenke. Time je osigurano snimanje spektra reaktanata pomoću Ramanove sonde.

PXRD

Salicilna kiselina, salicilamid i 4-hidrazinbenzojeva kiselina bili su naneseni na prethodno pripremljene silicijeve nosače. Podaci su prikupljeni snimanjem u kutnom području od 3 do 45° s korakom 0,021° tijekom 6 minuta. Difraktogrami polaznih reaktanata odgovarali su pripadnim difraktogramima navedenim u CSD bazi (tzv. cifovi). Time je potvrđeno da se radi o čistim reaktantima u čvrstom stanju odgovarajućih kristalnih faza. Za rendgensku difrakciju korišten je uređaj PANalytical Aeris gdje je bakrena anoda izvor rendgenskog zračenja, a rendgenska cijev radi pri naponu od 40 kV, dok je katoda grijana strujom jakosti 7,5 mA.

NMR

Za ^1H NMR analizu, salicilna kiselina, salicilamid i 4-hidrazinbenzojeva kiselina otopljeni su u deuteriranom kloriformu (CDCl_3). Kemijski pomaci odgovarali su literaturnima čime je potvrđeno da su u istraživanju uporabljeni spojevi pretpostavljenjih molekulskih struktura.

IR

Salicilna kiselina, salicilamid i 4-hidrazinbenzojeva kiselina (vrh špatule svakog) snimljeni su refleksijskom tehnikom (ATR) nanošenjem na predviđeno mjesto (transparentni kristal). Na pripadnim IR spektrima bile su vidljive karakteristične skupine koje posjeduju salicilna kiselina, salicilamid i 4-hidrazinbenzojeva kiselina. IR spektri snimani su spektrometrom Perkin Elmer Spectrum Two.

2.3.2. Pokusi mljevenja

Vibrirajući kuglični mlin

Pokusi mljevenja, u manjim količinama (od 300 do 400 mg), provedeni su korištenjem vibrirajućeg kugličnog mlina (IST500 i IST636). Najčešće se, iskustveno, za mljevenje koriste dvije čelične ili jedna cirkonijeva kuglica. Reaktanti su vagani na analitičkoj vagi i stavljani u posudice od PMMA. Zatim su krajevi posudica pažljivo zatvoreni, tako da se polazni reaktanti – salicilna kiselina i salicilamid ne pomiješaju prije mljevenja na mlinu, čime je osigurano snimanje prvog kontakta reaktanata Ramanovom sondom. Mljevenje je provedeno uz sljedeće uvjete: trajanje mljevenja: 2 h; frekvencija: 30 Hz; korištene PMMA posudice od 14 mL; upotrebljavane po 2 čelične kuglice (mase 1,4 g).

Ekstruder

Provedeno je mljevenje na ekstruderu (ExTTTruder ZE 12) u deset ciklusa (tablica 1). Ekstruder je za razliku od mlinova, kod kojih se mljevenje provodi u zatvorenim posudama, otvoren sustav pa je moguć izlazak vode koja nastaje u prvom stupnju sinteze. Također, ekstruder nudi mogućnost zagrijavanja, a u konačnici, dobiva se veća količina produkta nego u vibrirajućem kugličnom mlinu. Reaktanti (SA i SAM) su vagani u omjeru 1:1 na analitičkoj vagi tako da je masa smjese iznosila 10 g. Reakcijska je smjesa homogenizirana u čaši i zatim polako dozirana kroz lijevak ekstrudera. U prvom ciklusu grijači nisu bili upaljeni da bi se smjesa dodatno homogenizirala. Potom su upaljeni i grijači da bi se pokušao pripremiti benzoksazon. Prva dva

grijača radila su na istoj, višoj temperaturi u odnosu na druga dva grijača koji su hladili talinu prije izlaska iz ekstrudera. Konfiguracija vijaka utječe na ishod reakcije. U pokusu je korištena uobičajena konfiguracija: fiksni dio + jedan pomični segment (za transport) + segmenti za gnječenje (jedan od 90°, dva od 60° i jedan od 30°) + nanizani pomični segmenti (za transport).

Tablica 1 – Opis parametara i opažanja za pokuse koji su provedeni na ekstruderu

Table 1 – Description of parameters and observations for experiments carried out on the extruder

Ciklus Cycle	Trajanje Duration min	Frekvencija Frequency Hz	Temperatura Temperature °C	Opažanja/Rezultat Observations/Results
1.	24	20 — 90	/	-bijeli prah -fizička smjesa reaktanata -white powder -physical mixture of reactants
2.	27	40	120 120 80 24	-bijeli prah -započinje nastajanje kokristala -white powder -formation of co-crystals begins
3.	28	40	120 120 80 24	-blago ružičasti prah -nastajanje kokristala -slightly pink powder -formation of co-crystals
4.	28	40	120 120 80 24	-blago ružičasti prah -kokristal -slightly pink powder -co-crystal
5.	18	40	150 150 100 24	-ružičasti prah -pink powder
6.	20	40	150 150 100 24	-ružičasti prah -pink powder
7.	21	40	180 180 100 24	-ružičasti/smeđi prah -pink/brown powder
8.	18	40	180 180 100 24	-smeđi prah -brown powder
9. + 50 µL CH ₃ COOH	16	40	180 180 100 24	-smeđi prah -brown powder
10. + 50 µL CH ₃ COOH	6	40	180 180 100 24	-tamnosmeđi prah -darkbrown powder

* T_v (CH₃COOH) = 117,9 °C (postoji mogućnost da je dio octene kiseline ispario pri doziranju na visokoj temperaturi)

Temperature na grijačima zadane su pomoću literature u kojoj je opisana konvencionalna sinteza benzoksazona. Dok je octena kiselina dodana kao kiseli katalizator.

Planetarni mlin

Ispitana je mogućnost pripreve kokristala na planetarnom mlinu (FRITSCH Pulverisette 6) kako bi se dobila veća količina kokristala potrebna za planirane daljnje pokuse taljenja. Na

analitičkoj su vagi izvagani polazni reaktanti tako da je masa smjese iznosila 10 g. Korišteno je 10 kuglica (SS 1,4 g); trajanje mljevenja: 10 h pri 400 okretaja/min.

2.3.3. Pokusi taljenja

Diferencijalni pretražni kalorimetar (DSC)

Da bi se istražila mogućnost primjene postupka taljenja s ciljem dobivanja željenog produkta, načinjeno je preliminarno istraživanje korištenjem diferencijalne pretražne kalorimetrije (DCS). Na temelju provedenih mjerenja određeno je talište polaznih reaktanata (SA i SAM) da bi se i ovom metodom provjerilo radi li se o čistim reaktantima, a uz to na temelju dobivenih vrijednosti odabrani su parametri pokusa. Također, određeno je talište kokristala i talište smjesa salicilne kiseline i salicilamida u omjerima: 0,5:1, 1:1, 1,5:1, 1:2. Za mjerenja je korišten DSC uređaj (METTLER TOLEDO DSC 3) prema programu → izotermno zadržavanje na sobnoj temperaturi 2 minute, zatim zagrijavanje brzinom 10 °C/min do 160 °C, potom zadržavanje 2 minute na 160 °C te hlađenje do 25 °C brzinom 30 °C/min. Mjerenje je provedeno u atmosferi dušika. Ispitivanja su provedena kako bi se, nakon poznavanja točne temperature taljenja, pokušala odrediti temperatura potrebna za odvijanje reakcija u talini, odnosno temperatura pri kojoj bi se mogao sintetizirati benzoksazon.

Taljenje u tikvici, autoklavu i ampuli

Budući da željeni produkt – benzoksazon nije sintetiziran pokusima mljevenja, provedeni su pokusi pripreme u talini na način da se pripremi smjesa reaktanata, nakon čega se smjesa rastali. Ispitala se mogućnost njegove sinteze taljenjem smjese polaznih reaktanata (bez i uz korištenje aditiva) i taljenjem kokristala. Vremena odvijanja pokusa određivana su sukladno ponašanju sustava (cilj je bio dobiti žuti prah jer je literaturno poznato da je benzoksazon žuto obojen). Ponekad, ako analize dobivenog praha nisu potvrdile nastanak željenog produkta, vrijeme odvijanja reakcije u talini bilo bi produljeno preko noći. Za svaki pokus taljenja (u tikvici, autoklavu ili ampuli) izvagani su reaktanti na analitičkoj vagi. Pokusi u tikvicama najčešće su bili izvođeni u inertnoj atmosferi (u struji argona) kako bi se spriječila oksidacija. Ampula i autoklav korišteni su jer postoje i u industrijskoj izvedbi. U slučaju moguće sinteze benzoksazona u njima, potencijalno bi bilo izvedivo uvećanje procesa.

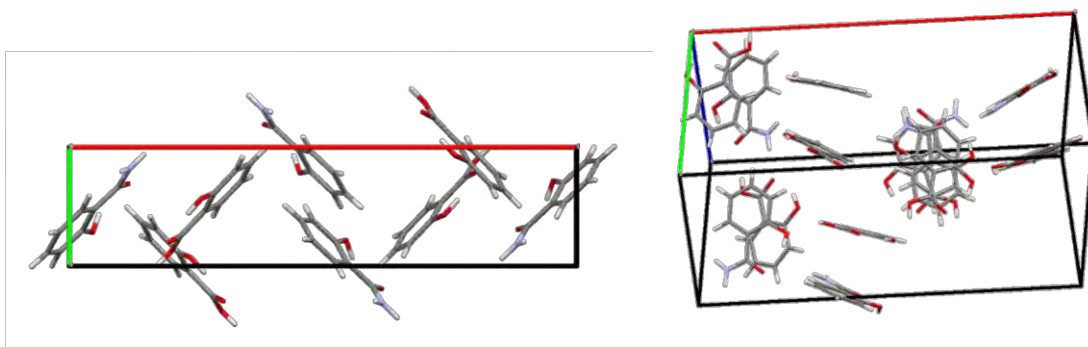
Opis pokusa tijekom kojeg je dobiveni najveći prinos benzoksazona

U tikvici od 35 mL taljeno je 1001,34 mg kokristala zagrijavanjem u uljnoj kupelji. Povremeno je žlicom ulje prelijevano po stijenci tikvice (po dijelu koji nije bio uronjen u ulje) kako bi se kristali sublimirane salicilne kiseline vraćali u reakcijsku smjesu. Tikvica je bila zatvorena balonom ispunjenim argonom. Temperatura ulja praćena je termometrom, a u tikvici termoparom (UNI-T UT320D). Razlika između temperature ulja i temperature u tikvici bila je oko 20 °C. Temperaturni je interval prvih sat vremena pokusa bio između 130 i 140 °C, a zatim između 140 do 145 °C. Nakon 2 h i 50 min zagrijavanje je zaustavljeno, a nakon hlađenja sustava (talina brzo prelazi u krutinu), snimljeni su difraktogrami produkta s vrha i dna tikvice. Zbog toga što nije zapažen nastanak benzoksazona, prah snimljen na PXRD-u vraćen je u tikvicu. Aparatura je ponovno postavljena (kao na početku). Pokus taljenja nastavljen je preko noći na temperaturi od oko 130 °C. Analizom dobivenog praha na PXRD-u i NMR-u dokazan je nastanak benzoksazona, a za kristale na vrhu tikvice potvrđeno je da odgovaraju salicilnoj kiselini.

3. Rezultati i rasprava

3.1. Rezultati pokusa mljevenja

Mljevenjem SA:SAM u omjeru 1:1 na vibrirajućem kugličnom mlinu, ekstruderu te planetarnom mlinu sintetiziran je novi kokristal, polimorf kokristala AQEJEO. Struktura novog kokristala utočnjena je Rietveldovom metodom (slika 2 i tablica 2).¹⁰



Slika 2 - Slaganje molekula unutar jedinične ćelije: AQEJEO, lijevo i novi kokristal, desno¹⁰

Fig. 2 - Arrangement of molecules within a single cell: AQEJEO, left and the new cocrystal, right¹⁰

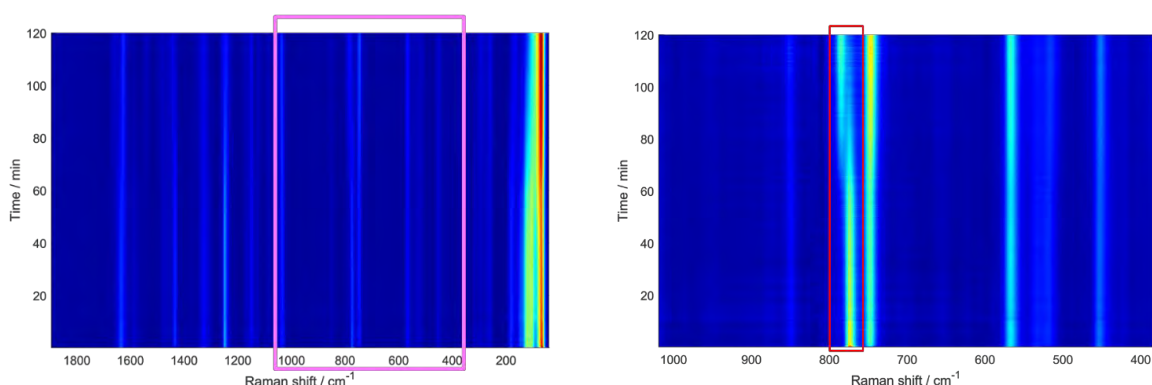
Tablica 2 – Kristalografski podaci kokristala AQEJEO i novog kokristala

Table 2 – Crystallographic data of the AQEJEO co-crystal and the new co-crystal

Kokristal Co-Crystal	Kristalni sustav Crystal System	Točkasta grupa Point Group	Prostorna grupa Space Group	Dimenzije ćelije Cell Dimensions	Volumen ćelije Cell Volume
AQEJEO	rompski ortilorhombic	$mm2$	$Pna2_1$	$a = 21,505 \text{ \AA}$, $b = 5,026 \text{ \AA}$, $c = 12,143 \text{ \AA}$	$1312,57 \text{ \AA}^3$
novi kokristal new co-crystal	rompski ortilorhombic	222	$P2_12_12_1$	$a = 21,893 \text{ \AA}$, $b = 12,500 \text{ \AA}$, $c = 9,698 \text{ \AA}$	$2654,09 \text{ \AA}^3$

Potvrda nastanka kokristala

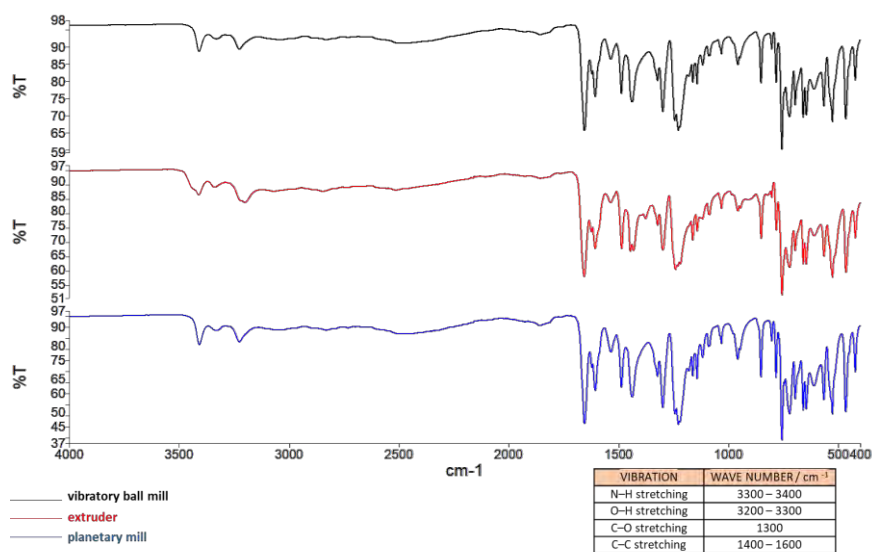
Rezultati Ramanove spektroskopije (pokus mljevenja SA:SAM = 1:1 s upaljenim Ramanovim laserom) (slika 3).



Slika 3 - Prikaz Ramanovog spektra cijele reakcije, lijevo i uvećanog dijela od interesa, desno

Fig. 3 - Raman spectrum of the entire reaction, left and the magnified part of interest, right

Na slikama je dan 2D prikaz Ramanovog spektra reakcijske smjese *in situ* praćenja reakcije. Boje ukazuju na nastajanje i nestajanje vrpce te njihov intenzitet. Plava označava slab, a crvena jak intenzitet. Promjene u vibracijama kristalne rešetke vidljive su u fononskom dijelu spektra (od 40 do 200 cm^{-1}). Kako bi se bolje vidjele vrpce u plavom dijelu, uvećano je područje od interesa (od 400 do 1000 cm^{-1}). Uočava se nestanak vrpce na 770 cm^{-1} unutar 60 minuta mljevenja te potom nastanak nove vrpce na 780 cm^{-1} koja odgovara kokristalu. Usporedba kokristala (pripravljenog na kugličnim mlinovima te ekstruderu) snimljenih na infracrvenom spektrofotometru (slika 4).

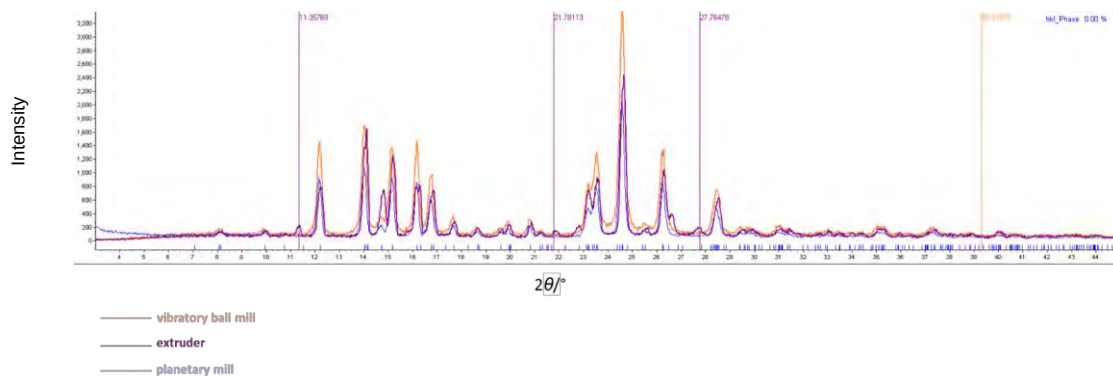


Slika 4 – Usporedbeni prikaz IR spektra kokristala

Fig. 4 - Comparative view of the IR spectrum of cocrystals

Prikaz IR spektra kokristala pripremljenog korištenjem kugličnih mlinova i ekstrudera. U području funkcionalnih skupina, od 3300 do 3400 cm⁻¹ vidljivo je istezanje N–H veze te široka vrpca istezanja O–H veze karboksilne skupine od 3200 do 3300 cm⁻¹, što je i očekivano. Na 1300 cm⁻¹ vidljiva je vrpca jakog intenziteta koja odgovara istezanju C–O veze karboksilne skupine, a od 1400 do 1600 cm⁻¹ vidljive su vrpce istezanja C–C veze kod aromata.

Usporedba kokristala (pripravljenog na kugličnim mlinovima te ekstruderu) – rendgenska difrakcija na prahu (slika 5).



Slika 5 – Usporedbeni prikaz PXRD spektra kokristala

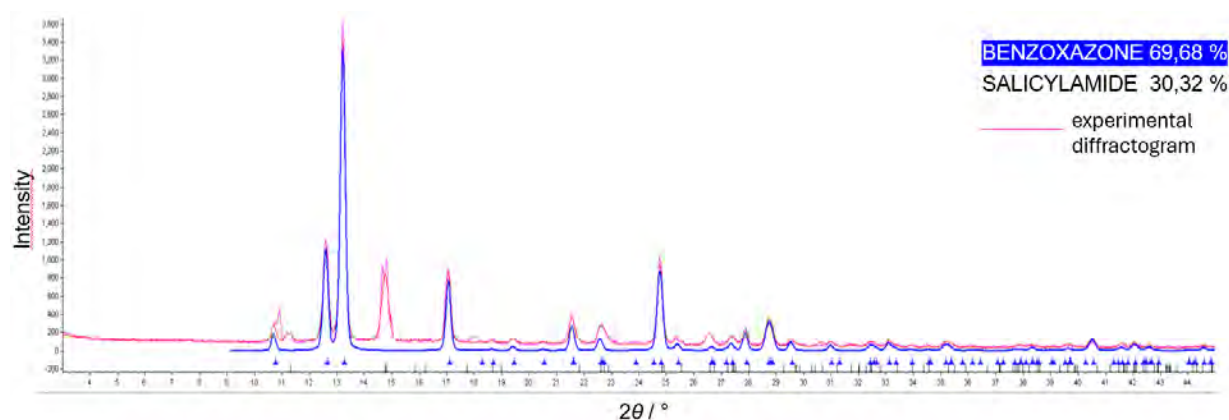
Fig. 5 – Comparative presentation of the PXRD spectrum of cocrystal

Prahovi s kugličnih mlinova i ekstrudera snimljeni su i rendgenskom difrakcijom na prahu. Na difraktogramu uočavamo dobro preklapanje pikova čime je potvrđen nastanak iste nove faze, odnosno kokristala. Postoje manje razlike u intenzitetima, no to je rezultat pripreme uzorka i preferirane orijentacije.

3.2. Rezultati pokusa taljenja

Potvrda nastanka benzoksazona

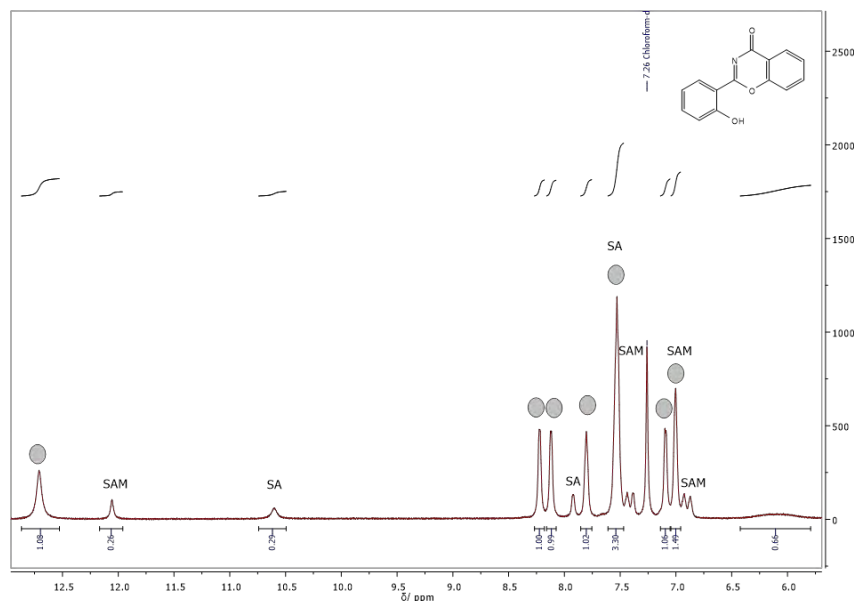
Na slici 6 vidljiv je difraktogram uzorka koji je dobiven za pokus koji je rezultirao sintezom s najvećim udjelom željenog produkta. Izračun u programu Topas procjenjuje maseni udio sastojaka smjese pa je tako određen udio od 69,68 % benzoksazona te 30,32 % polimorfa salicilamida. U smjesi je zastupljena i salicilna kiselina, ali u malom udjelu. Dio SA je sublimirao, dio izreagirao, a ostatak prešao u amorfni oblik pa nije vidljiva na difraktogramu, ali je vidljiva na NMR spektru.



Slika 6 – Difraktogram smjese benzoksazona i polimorfa salicilamida

Fig. 6 – Diffractogram of a mixture of benzoxazone and salicylamide polymorph

Na slici 7 vidljiv je NMR spektar praha najuspješnijeg pokusa taljenja. Kemijski pomaci odgovaraju polaznim reaktantima (SA i SAM), ali i željenom produktu – benzoksazonu.



Slika 7 – NMR spektar – detekcija benzoksazona

Fig. 7 – NMR spectrum - detection of benzoxazone

3.3. Uvjeti potrebni za dobivanje benzoksazona

Na temelju provedenih pokusa moguće je izdvojiti uvjete koji vode prema dobivanju benzoksazona.

Aparatura

Taljenje je pogodnije provoditi u tikvici, nego u ampuli i autoklavu. Naime, autoklav je izrađen od teflona i čelika. Čvrsto je zatvoren sustav zbog čega je teško pratiti odvijanja unutar sustava (zahtjevno je mjeriti temperaturu unutar autoklava) i osigurati miješanje reakcijske smjese. Ampula je staklena, kao i tikvica, što je prednost prilikom praćenja reakcije, no onemogućeno je miješanje reakcijske smjese čime je otežan nastanak benzoksazona, a potrebno ju je i zataliti na vrhu da bi sustav bio zatvoren. Tikvica je staklena pa je praćenje reakcije vizualno moguće. Osim toga, nudi mogućnost zagrijavanja na razne načine od kojih se kao najbolji izbor pokazala uljna kupelj (sustav je tromiji nego kod zagrijavanja grijaćom kapom, a lakše je i mjeriti temperaturu ulja). Pješčanoj je kupelji potrebno mnogo vremena da se zagrije na željenu temperaturu te otežava vizualno praćenje reakcije. Iako se tikvica pokazala kao dobar izbor, potencijalno bi bolji odabir bio kuglični mlin koji bi se mogao zagrijavati ili tikvica koja bi se mogla okretati/potresati i istovremeno zagrijavati na željenu temperaturu. Time bi se spriječio gubitak salicilne kiseline iz smjese prilikom sublimacije.

Miješanje

Pokazalo se da miješanje pogoduje formiranju benzoksazona (pogodna je brzina oko 250 rpm na magnetskoj miješalici kada je masa smjese oko 1 g).

Temperatura

Optimalna temperatura nije još pronađena, no kao pogodan temperaturni interval pokazao se iznos od 135 do 145 °C, dakle potrebno je sustav održavati iznad temperature taljenja.

Inertnost

Većina pokusa taljenja vršena je u tikvici ispunjenoj argonom kako bi se spriječila oksidacija (jer je cilj sintetizirati API).

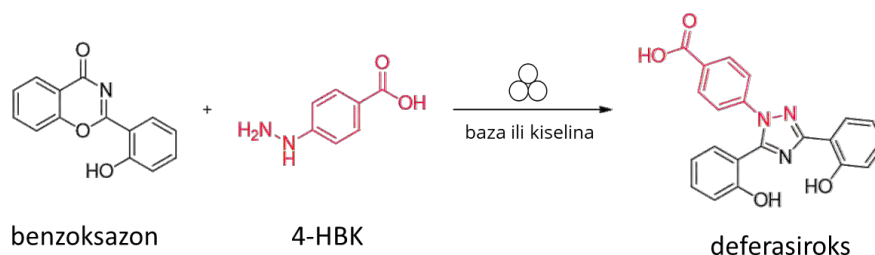
Reakcijska smjesa

Iako je benzoksazon sintetiziran taljenjem čistih polaznih reaktanata (SA:SAM=1:1), jednostavniji i uspješniji postupak taljenje je kokristala SA i SAM-a.

Vrijeme odvijanja reakcije

Za sintezu veće količine benzoksazona potrebno je dulje vrijeme odvijanja reakcije u talini (oko 12 h kada je masa smjese oko 1 g).

Ramanovom je sondom teško pratiti odvijanje reakcije u talini, preko stakla tikvice ili ampule, odnosno preko čeličnog autoklava, stoga je bilo nemoguće potvrditi nastanak intermedijera – disalicilamida, za koji je pretpostavljeno da će nastati u prvom stupnju sinteze. Tijekom pokušaja sinteze deferasiroksa, otkriven je novi kokristal SA i SAM-a. Nastanak kokristala općenito nije rijedak slučaj u mehanokemiji. Budući da je uspješno proveden prvi stupanj sinteze deferasiroksa, na sljedećem je prikazu (drugi stupanj sinteze) vizualiziran dio molekule koji je do sada sintetiziran (označeni crveni dio molekule deferasiroksa odgovara 4-HBK) (slika 8).



Slika 8 – Prikaz do sada sintetiziranog dijela molekule deferasiroksa

Fig. 8 – Part of the deferasirox molecule synthesized so far

4. Zaključak

Provedeni pokusi mljevenja rezultirali su otkrićem novog kokristala salicilne kiseline i salicilamida. Najprije je sintetiziran u manjoj količini na vibrirajućem kugličnom mlinu, uz *in situ* praćenje Ramanovom spektroskopijom, a potom i na ekstruderu te planetarnom mlinu u većoj količini. Spomenuti kokristal polimorf je literaturno poznatog kokristala (refcode: AQEJEO). Budući da je riječ o novoj tvari, odnosno dosad neopisanom kokristalu, bilo mu je potrebno utočniti strukturu, što je učinjeno Rietveldovom metodom. Ovime je, između ostalog, utvrđeno da pripada rompskom kristalnom sustavu. Korištenjem uobičajenih mehanokemijskih uređaja (kuglični mlinovi i ekstruder) nije dobiven benzoksazon. Zbog toga je ispitana mogućnost njegove sinteze taljenjem kokristala. Riječ je o miješanju kokristala u tikvici, bez dodatka otapala, uz zagrijavanje u struji argona (što je u skladu s načelima zelene kemije). Reakcije u talini pokazale su se uspješnim za pripravu benzoksazona. Iako je napravljen značajan iskorak u poboljšanju provedbe prvog stupnja sinteze, u odnosu na otopinski postupak, izazov koji se javlja pri taljenju sublimacija je salicilne kiseline. Ona se izdvaja u obliku igličastih kristala na vrhu tikvice što utječe na smanjenje iskorištenja reakcije. Dodatno optimiranje prvog stupnja (temperatura, brzina miješanja, vrijeme odvijanja reakcije) ili potencijalno korištenje drugačije aparature (npr. mlin koji bi imao mogućnost grijanja i praćenja *in situ*) vjerojatno bi rezultiralo povećanim iskorištenjem. Dakle, provedenim je istraživanjem dokazano da se prvi stupanj sinteze deferasiroksa može uspješno provesti mehanokemijski. Taljenjem kokristala dobiva se benzoksazon u većem prinosu (60 – 70 %) u odnosu na komercijalni pristup (50 – 55 %). Budući da je izbjegnuto korištenje otapala, odnosno opasnih i korozivnih sredstava – tionil klorida i ksilena, ovi rezultati mogli bi u budućnosti biti korisni za farmaceutsku industriju. Postoji velika vjerojatnost da je i drugi stupanj sinteze moguće uspješno provesti mehanokemijski zbog blažih reakcijskih uvjeta potrebnih za sintezu deferasiroksa u odnosu na reakcijske uvjete potrebne za sintezu benzoksazona.

ZAHVALA

Zahvaljujemo Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije (FKIT) te Institutu Ruđer Bošković (IRB) na kvalitetnoj suradnji.

Popis kratica i simbola

API - farmaceutski aktivne tvari (*engl. Active Pharmaceutical Ingredient*)

CCDC - Cambridge Crystallographic Data Centre

CSD - Cambridge Structural Database

DFX - deferasiroks (*engl. Deferasirox*)

DSC - diferencijalna pretražna kalorimetrija (*engl. Differential Scanning Calorimetry*)

ES - etil salicilat (*engl. Ethyl Salicylate*)

4-HBK - 4-hidrazinbenzojeva kiselina (*engl. 4-hydrazinobenzoic acid*)

IR - infracrvena spektroskopija (*engl. Infrared Spectroscopy*)

NMR - nuklearna magnetska rezonancija (*engl. Nuclear Magnetic Resonance*)

PMMA - Poli(metil-metakrilat) (*engl. Poly(methyl methacrylate)*)

PXRD - rendgenska difrakcija na prahu (*engl. Powder X-ray Diffraction*)

SA - salicilna kiselina (*engl. Salicylic Acid*)

SAM - salicilamid (*engl. Salicylamide*)

SS - nehrđajući čelik (*engl. Stainless Steel*)

TLC - tankoslojna kromatografija (*engl. Thin-Layer Chromatography*)

η - odnos između volumena dodanog otapala i ukupne mase reaktanata (*engl. ratio of liquid additive to reactant weight*)

Literatura

1. F. Fischer, Mechanochemie: Charakterisierung und Synthese von Cokristallen, Dissertation, Berlin: Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin, (2016).
2. J. G. P. Wicker, L. M. Crowley, O. Robshaw, E. J. Little, S. P. Stokes, R. I. Cooper, S. E. Lawrence, Will they co-crystallize?, Cryst. Eng. Comm. **19** (2017) 5336-5340, doi: <https://doi.org/10.1039/C7CE00587C>.
3. M. Przybyłek, D. Ziolkowska, K. Mroczyńska, P. Cysewski, Propensity of salicylamide and ethenzamide cocrystallization with aromatic carboxylic acids, Eur. J. Pharm. Sci. **85** (2016) 132-140, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.02.010>.
4. H. Phetmung, K. Musikapong, T. Srichana, Thermal analysis, structure, spectroscopy and DFT calculations of a pharmaceutical cocrystal of salicylic acid and salicylamide, J. Therm. Anal. Calorim. **138** (2019) 1207–1220, doi: <https://doi.org/10.1007/s10973-019-08794-5>.

5. URL: <https://narodne-novine.nn.hr/eli/sluzbeni/2023/57/pdf> (07. 10. 2024.)
6. *Q. Du, X. Xiong, Z. Suo, P. Tang, J. He, X. Zeng, Q. Hou, H. Li*, Investigation of the solid forms of deferasirox: solvate, co-crystal, and amorphous form, *RSC. Adv.* **7** (2017) 43151-43160, doi: <https://doi.org/10.1039/C7RA08077H>.
7. *Y. Akdag, T. Gulsun, N. Izat, M. Cetin, L. Oner, S. Sahin*, Characterization and comparison of deferasirox fast disintegrating tablets prepared by direct compression and lyophilization methods, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **57** (2020) 101760, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101760>.
8. *S. Jarussophon, P. Pongwan, O. Srikun*, Benzoxazinone Intermediate for the Synthesis of Deferasirox, Preparation of Deferasirox, *Org. Prep. Proced. Int.* **47** (6) (2015) 483-489, doi: <https://doi.org/10.1080/00304948.2015.1088759>.
9. *R. S. Ashani, H. Azizian, N. S. Alavijeh, V. F. Vavsari, S. Mahernia, N. Sheysi, M. Biglar, M. Amanlou, S. Balalaie*, Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Docking of Deferasirox and Substituted 1,2,4-Triazole Derivatives as Novel Potent Urease Inhibitors: Proposing Repositioning Candidate, *Chem. Biodiversity* (2020) doi: <https://doi.org/10.1002/cbdv.201900710>.
10. Slika – program Topas

- **KEMIJA U POLJOPRIVREDI I
ŠUMARSTVU**
***CHEMISTRY IN AGRICULTURE
AND FORESTRY***



Analiza strukture i svojstava delignificiranih drvnih vlakana četinjača i listača

Analysis of the structure and properties of delignified wood fibers of some hardwoods and softwoods

Nikola Španić, Stipo Žutić, Nikolina Barlović*

Sveučilište u Zagrebu Fakultet šumarstva i drvne tehnologije, Svetošimunska cesta 23,
10000 Zagreb, Hrvatska

*University of Zagreb Faculty of Forestry and Wood Technology, Svetošimunska 23,
10000 Zagreb, Croatia*

*Autor za dopisivanje: Nikolina Barlović, mag. ing. techn. lign., nbarlovi@sumfak.unizg.hr

Sažetak

Današnja proizvodnja papira visoke čvrstoće, visoke bjeline i dobrih uporabnih svojstava neminovno podrazumijeva kombiniranje celuloznih vlakana različitih dimenzija i oblika. U pravilu se kombiniraju kraća i duža vlakna, dok su sva ostala svojstva papira određena dodacima i procesom proizvodnje. Osim dimenzija samih vlakana, važni pokazatelji kvalitete i prikladnosti vlakana pojedine vrste drva za proizvodnju papira su stupanj polimerizacije (DP) celuloze i njezina molekulska masa (M_w). U ovom radu su delignificirani uzorci 10 vrsta drva te su određena prethodno navedena svojstva, uz određivanje bakrovog (Cu) broja. Rezultati ispitivanja su pokazali da su vrijednosti DP i M_w celuloze, pripremljene od ispitivanih vrsta, prilično visoke, te da vlakna hrasta (*Quercus robur* L.) prema gotovo svim ispitivanim kriterijima ne zaostaju mnogo za vlaknima ostalih, za proizvodnju drvnih vlakana češće korištenih vrsta drva.

Ključne riječi: *celulozna vlakna, drvo, delignifikacija, molekulska masa,, stupanj polimerizacije, bakrov broj*

Abstract

Today's production of paper with high strength, high whiteness and good usability inevitably involves combining cellulose fibres of various morphological characteristics. Typically, shorter and longer fibres are combined, while all other properties of the paper are determined by additives and the production process. Besides the dimensions of the fibres themselves, important indicators of the quality and suitability of fibres from a particular wood species for paper production include the degree of

polymerization (DP) of cellulose and its molecular weight (M_w). In this study, samples from 10 wood species were delignified, and the previously mentioned properties were determined, along with the copper (Cu) number. The test results showed that the DP and M_w values of cellulose prepared from the examined wood species are relatively high, and that oak (*Quercus robur* L.) fibres by nearly all determined criteria, are comparable to the fibres of other commercially more frequently used wood species.

Key words: *cellulose fibres, wood, delignification, molecular weight, degree of polymerization, copper number*



1. Uvod

U industriji papira, kompozita i biomaterijala, delignificirana drvena vlakna dobivena iz listača i četinjača predstavljaju ključan sirovinski resurs zbog svojih jedinstvenih strukturnih i kemijskih svojstava. Razlike u morfologiji, kemijskom sastavu i fizikalnim svojstvima između vlakana listača i četinjača značajno utječu na njihovu primjenu u industriji. Proces delignifikacije je kemijski postupak uklanjanja lignina, čime se vlakna čine pogodnijima za daljnje kemijske i mehaničke obrade, poboljšava se njihova čvrstoća te kompatibilnost s različitim polimernim matricama.¹ Svaka vrsta ponaša se drugačije te je istraživanje celuloze i njenih vlakana izrazito bitno. Posebice ako se proces sagleda sa današnjeg aspekta podjele produkata kemijske prerade drva ovisno o primijenjenom postupku za dobivanje vlakana, a to su: kemijski, polu-kemijski, kemijsko-mehanički i mehanički postupci.¹ Izuzev potonjeg, u svim navedenim postupcima proizvodnje drvnih vlakana, lignin se izdvaja iz stanične stijenke drva, uz uvjet zadržavanja prirodne hijerarhijske strukture celuloze.² Isključivo mehaničkim putem dobivena vlakna, po svom su kemijskom sastavu identična cjelovitom drvu iz kojeg su dobivena. Kako je celulozno-papirna industrija jedna od najstarijih ljudskih djelatnosti uopće, istraživanja delignifikacije drva vrlo su opširna, no u današnjem je svijetu daleko najčešća primjena tzv. kraft postupka delignifikacije drva, ponajprije četinjača, u kojem je prinos drvnih vlakana otprilike 50 %, a sama je metoda razvijena krajem 19. stoljeća.³ U spomenutom postupku gotovo 85 % lignina otapa se djelovanjem kemikalija, a sam proces ovisi o cijelom nizu faktora jer djelovanje kemikalija uz delignifikaciju uzrokuje i niz popratnih reakcija na ugljikohidratnom dijelu drva, poput hidrolize i deacetilacije celuloze.⁴ Upravo te reakcije, uz specifičnosti, tijekom rasta debla, prirodno formiranih celulozno-ligninskih kompleksa uvjetuju veću ili manju uspješnost procesa delignifikacije. Naime, produkti degradacije obje gradbene jedinice drva mijenjaju kemijsku okolinu procesa poput ionske snage ili prisustva određenih komponenti, čime direktno i na samu reakciju, ali i na transportne mehanizme, odnosno mogućnost impregnacije drva kemikalijama.⁵ Osim svojevrsne heterogenosti konačnog produkta i samog procesa, kraft postupak delignifikacije ima i dodatnu manu, a to je nužnost primjene smjese jakih kemikalija (natrijev-hidroksid, natrijev-sulfid i natrijev-karbonat) za omekšavanje drva. Navedene kemikalije teško se regeneriraju i stoga je ekološki i ekonomski aspekt kraft procesa podložan raznim tumačenjima. S druge strane, u organosolv postupcima delignifikacije drva, za razliku od kraft postupka, za prevođenje lignina i hemiceluloza u topljivo stanje koriste se organska otapala (npr. octena kiselina). Ova je metoda

također razvijena krajem 19. stoljeća, no u širu upotrebu ušla je tek u novije vrijeme, upravo iz ekoloških razloga. Ovaj se postupak u pravilu vrši u dva koraka, od kojih prvi podrazumijeva hidrolizu drva (primjenom katalizatora), a drugi odvajanje lignina primjenom organskog otapala (najčešće smjesom alkohola i vode).⁶ Konačni rezultat organosolv postupka delignifikacije su drvena vlakna nižeg sadržaja lignina, koja se jednostavno izbjeljuju. Pritom se u odnosu na kraft postupak koristi mnogo manje vode, manje kemikalija, a proizvedeni gotovi proizvod nema neugodan miris i mnogo je manje nečistoća uz veće iskorištenje drve sirovine. Iako u suštini nepovoljan za delignifikaciju drva četinjača, danas su razvijene metode za organosolv predtretman i proizvodnju celuloze kao sirovine za proizvodnju biogoriva (bioetanola).⁷

U ovom radu provedena je organosolv delignifikacija odabranih 10 vrsta listača i četinjača, uz djelomičnu karakterizaciju dobivenih vlakana. Konkretno, utvrđeni su prinos vlakana, bakrov (Cu) broj, molekulska masa te stupanj polimerizacije delignificiranih vlakana. Time je pružen uvid u efekt spomenutog postupka delignifikacije na ispitivane vrste drva, u smislu utvrđivanja razine razgradnje i stabilnosti celuloznih vlakana nakon delignifikacije. Dodatno, primjenom optičke mikroskopije i prikladnog softvera, utvrđena je duljina vlakana, kao značajnog čimbenika mehaničkih svojstava vlakana. Istraživanje je provedeno s ciljem utvrđivanja razlike i usporedbe delignificiranih vlakana u kontekstu njihove primjene u industrijskim procesima, poput proizvodnje papira, biokompozita i drugih naprednih materijala.

2. Eksperimentalni dio

2.1. Materijali

Istraživanje je provedeno na deset različitih vrsta drva četinjača i listača, kako je to navedeno u tablici 1. Drvne vrste odabrane su tako da eksperimentom budu obuhvaćene, za globalnu proizvodnju drvnih vlakana, komercijalno korištene vrste četinjača (smreka i jela) i mekih vrsta listača (crna joha i bijela topola). Uz to ispitane su i tvrde vrste listača od velikog komercijalnog značaja na području Republike Hrvatske, koje se kao sirovina ne koriste za proizvodnju drvnih vlakana (javor, hrast lužnjak, orah, trešnja i divlja kruška). Potonje navedene vrste drva odabrane su za analizu iz razloga što za iste ne postoje literaturni podaci o istraživanju njihova potencijala u proizvodnji drvnih vlakana. Vrste drva iz kojih se komercijalno proizvode drvena vlakana odabrane su iz razloga što su redovno dostupne na području Republike Hrvatske i zato što je njihova sirovinska baza (a time i potencijal) vrlo velika.

Tablica 1 - Ispitivane vrste drva

Table 1 - Examined wood species

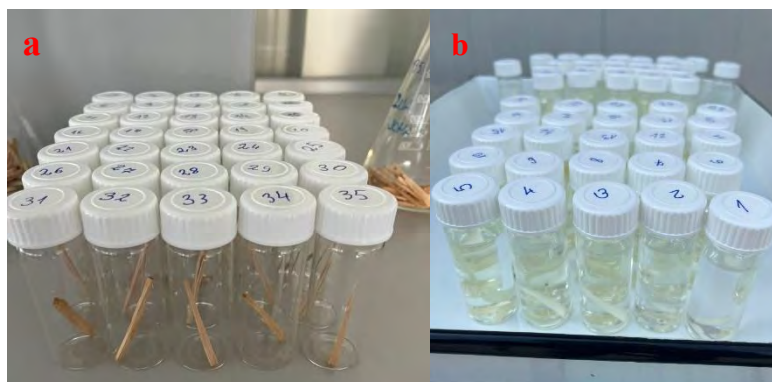
Vrsta drva	Latinski naziv
Javor	<i>Acer platanoides</i> L.
Hrast lužnjak	<i>Quercus robur</i> L.
Smreka	<i>Picea abies</i>
Orah	<i>Juglans regia</i>
Trešnja	<i>Prunus avium</i>
Poljski jasen	<i>Fraxinus angustifolia</i>
Crna joha	<i>Alnus glutinosa</i>
Jela	<i>Abies alba</i>
Bijela topola	<i>Populus alba</i> L.
Divlja kruška	<i>Pyrus pyraeaster</i> L.

Svi uzorci pripremljeni su iz koluta visine 5-6 cm, uzetih na prvom trupcu od panja, na visini od 1,3 m od tla. Inicijalno uzorkovanje napravljeno je piljenjem navedenih koluta motornom pilom lančanicom, u skladu s normom TAPPI T 257 cm-12, nakon čega su uzorci sušeni na zraku kroz tri mjeseca.⁸ Po završetku sušenja iz koluta, primjenom ručnog dlijeta pripremljena je veća količina uzoraka (u formi štapića za šibice) za razvlaknjivanje i analizu strukture i svojstava dobivenih drvnih vlakana. Sve korištene kemikalije bile su stupnja čistoće za analizu (*pro analysi*) te su korištene bez dodatnog pročišćavanja. Vodikov peroksid, 30 %; octena kiselina, min. 99,5 %; natrijev karbonat, 99,5 %; aceton, 99,5 %; bakrov(II) sulfat pentahidrat, 99,0 %; natrijev hidroksid, 98,0 %; kalijev natrijev tartarat heksahidrat, 98,0 %; sulfatna kiselina, 96,0 %; kalijev permanganat, 99,0 % te glicerol, 99,5 %, nabavljene su od proizvođača Kemika. Željezov(III) sulfat hidrat, 97,0 %; otopina bakar-etilediamina, 1.0 M u H₂O te toluidin plavo bojilo, nabavljeni su od proizvođača Sigma Aldrich (Merck). Destilirana voda korištena u eksperimentu bila je tip 2, prema ASTM DS1193-06.⁹

2.2. Metode

2.2.1. Razvlaknjivanje

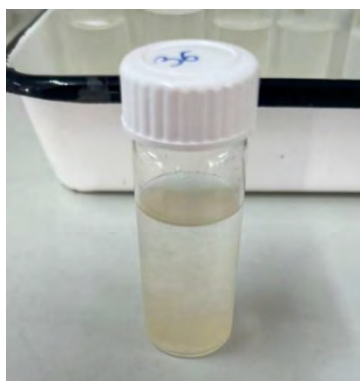
Postupak razvlaknjivanja proveden je organosolv procesom, gdje su u početnoj fazi uzorci ispitivanih tretirani (macerirani) smjesom 30 % otopine vodikovog peroksida i koncentrirane octene kiseline, u volumnom omjeru 1:1. Svaki od uzoraka stavljen je u staklenu vialu od 30 ml s PE čepom uz dodatak 25 ml spomenute reakcijske smjese kemikalija. Za svaku ispitivanu vrstu drva maceracija je provedena uz 5 ponavljanja. Pripremljene staklene viala s uzorcima i reakcijskom smjesom, stavljene su u laboratorijski sušionik Memmert, model UF110 plus na temperaturu od 60 °C kroz 48 sati.



Slika 1 - Uzorci drva prije tretmana (a) i nakon organosolv postupka (b)

Fig. 1 - Wood samples before treatment (a) and after the organosolv procedure (b)

Kao što je i vidljivo na slici 1b, po završetku procesa uzorci su u potpunosti izgubili svoje prirodno obojenje te poprimili bijelu boju. Nakon vađenja iz sušionika reakcijska smjesa je dekantirana, izbijeljeni uzorci su isprani destiliranom vodom (dH_2O) te neutralizirani natrijevim karbonatom (Na_2CO_3). Po završetku neutralizacije, višak smjese kemikalija i vode je dekantiran i uzorak je ponovno ispran destiliranom vodom (dH_2O). Kada je smjesa u potpunosti neutralizirana i isprana, u svaku vialu dodano je 20 ml destilirane vode (dH_2O) te su viala ponovno zatvorene PE čepom. Pripremljeni uzorci u vialama, razvlaknjeni su mehaničkim putem tj. ručnom trešnjom viala. U slučaju uzoraka drva oraha (*Juglans regia*) i divlje kruške (*Pyrus pyraeaster* L.) ovaj postupak nije dao željene rezultate (nepotpuno razvlaknjen uzorak), te se stoga u viala dodalo po nekoliko odmašćenih i acetonom očišćenih staklenih kuglica, da pomognu pri mehaničkom procesu razvlaknjivanja. Rezultat procesa razvlaknjivanja bez i uz primjenu staklenih kuglica bile su suspenzije vlakana u vodi, spremne za filtraciju i sušenje (slika 2).



Slika 2 - Smjesa vode i razvlaknjenog uzorka

Fig. 2 - Mixture of water and fiberized sample

Pripremljene suspenzije vlakana u vodi vakuumski su filtrirane, primjenom Büchnerova lijevka i filter papira gramature 99,5 g m⁻² (grade 389, bijela vrpca, proizvođača Ahlstrom-Munksjö). Sadržaj uzorka zajedno s filter papirom sušen je do konstantne mase u laboratorijskom sušioniku na 103±2 °C. Osušeni papiri i vlakna su naposljetku izvagani na analitičkoj vagi Sartorius CPA225D-0CE s točnošću od 0,1 mg. Nakon razvlaknjivanja izračunat je prinos vlakana prema formuli 1, za što je prvo potrebno izračunati masu apsolutno suhog uzorka prema formuli 2 te sadržaj vode uzorka. Prinos vlakana izračunat je prema formulama:

$$V = \frac{b - a}{c} \times 100 \quad (1)$$

$$c = m_1 - m_1 \times \left(\frac{w}{100} \right) \quad (2)$$

gdje je:

V – prinos vlakana, %; b – masa osušenog filter papira i uzorka, g; a – masa osušenog filter papira, g; c – masa apsolutno suhog uzorka, g; m₁ – masa zrakosuhog uzorka, g; w – sadržaj vode uzorka, %

Vlakna za pripremu mikroskopskih uzoraka te uzorci za određivanje molekulske mase pripremljena su na isti način. Manji broj uzoraka pripremljen je za određivanje molekulske mase, a za određivanje Cu broja na isti je način pripremljena veća količina vlakana.

2.2.2. Određivanje bakrovog (Cu) broja

Bakrov broj opisuje vrijednost degradacije celuloze te ovisi o broju reducirajućih skupina u molekulama celuloze. Vrijednost bakrova broja raste smanjenjem stupnja polimerizacije i povećanjem oksidativne razgradnje celuloze. Za metodu određivanja bakrovog broja korišteni su prethodno pripremljeni uzorci, koji su dodatno razvlaknjeni primjenom laboratorijskog mlina IKA, model A10 opremljenog zvjezdastim nožem s metalnom oštricom. Dobiveni materijal bio je u formi vate. Za određivanje bakrovog broja korištena je smjesa Fehlingove otopine I i Fehlingove otopine II, pomiješanih u volumnom omjeru 1:1. Reakcija smjesa pripremljenih otopina zagrijana je do vrenja, te je u istu na kuhanje od tri minute dodan prethodno pripremljeni materijal. Po isteku tri minute, sadržaj je filtriran vakuum filtracijom primjenom Büchnerova lijevka s filter papirom gramature

84 g m⁻² (grade 388, crna vrpca, proizvođač Ahlstrom-Munksjö). Smjesa na filter papiru isprana je s 500 ml destilirane vode (dH₂O) zagrijane na 95 °C, a zatim s 250 ml hladne destilirane vode (dH₂O). Sadržaj s filter papira se odvojio i dodatno tretirao s 25 ml kisele otopine željezo(III)-sulfata, nakon čega je slijedio ponovljeni postupak filtracije, ali u ovom slučaju preko dva filter papira (inicijalni + filter papir za naknadnu filtraciju), nakon čega je sve isprano s dodatnih 25 ml kisele otopine željezo(III)-sulfata, a potom s 500 ml destilirane vode (dH₂O). Posljednji korak je titracija pripremljenog filtrata s otopinom kalijeva permanganata, koncentracije 0,1 mol/l do prve pojave rozog obojenja.

Bakrov broj izračunat je primjenom formule 3:

$$\text{Bakrov broj} = \frac{a \times 0,00636 \times 104}{g \times b} \quad (3)$$

gdje je:

a – volumen otopine kalijeva permanganata utrošenog za titraciju, ml; g – masa uzorka celuloze, g; b – sadržaj suhe tvari, %; 0,00636 – faktor odnosa titrirane otopine kalijeva permanganata i bakra (1 ml otopine KMnO₄ odgovara 0,00636 g Cu)

2.2.3. Određivanje stupnja polimerizacije i molekulske mase celuloze

Dinamički viskozitet i granični viskozitetni broj (η) u otopini bakar-etilediamina (CED) određeni su kapilarnom viskozimetrijom, iz kojih su proračunati molekulska masa i stupanj polimerizacije (DP). Samo ispitivanje provedeno je u skladu s normom HRN ISO 5351:2011.¹⁰ Ova se metoda zasniva na mjerenju vremena potrebnog za prolaz otopine celuloze u CED kroz kapilaru Ubbelohdeova viskozimetra, točno definiranog promjera i duljine. Izračun stupnja polimerizacije i molekulske mase celuloze izveden je iz formula i Mark-Houwinkovih koeficijenata preuzetih iz ranije objavljenih radova^{1,11,12}. Dobivene vrijednosti molekulske mase predstavljaju prosječnu viskozitetnu molekulsku masu (M_v), u nastavku rada imenovanu kao molekulska masa (M_w). Mjerenje viskoziteta izvršeno je primjenom Ubbelohdeova viskozimetra, tip 501 01 SI Analytics i SI Analytics Visco Clock plus dodatka, a temperiranje uzoraka izvršeno je u akrilnoj vodene kupelji uz primjenu cirkulirajućeg termostata, SI Analytics model CT 72/P (slika 3). Prije viskozimetrije, uzorci su dodatno profiltrirani primjenom filtra CHROMAFIL Xtra PA-45/25 (poroziteta 0,45 μm).



Slika 3 - Ubbelohdeov viskozimetar i Visco Clock plus dodatak

Fig. 3 - Ubbelohde viscometer and Visco Clock plus accessory

2.2.4. Određivanje duljine vlakanaca

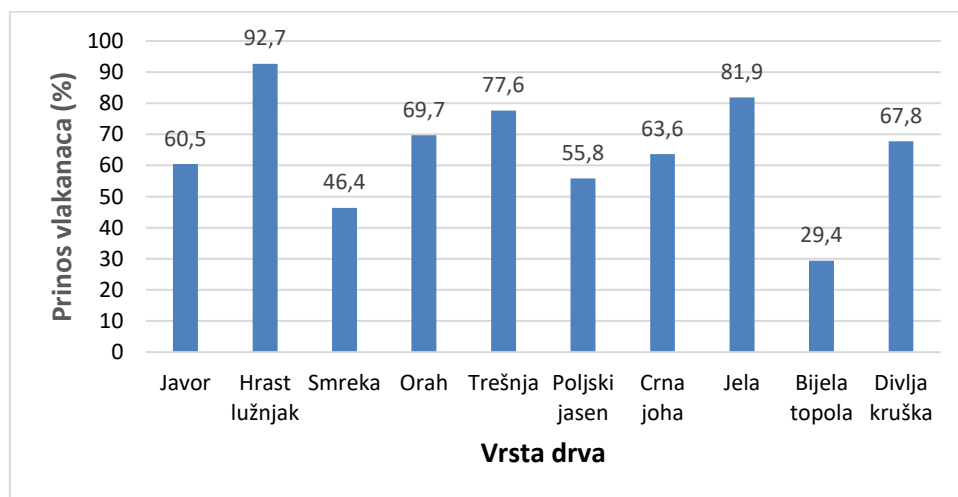
Za određivanje duljine vlakanaca pojedine vrste drva korišten je istraživački mikroskop ZEISS Axio Zoom.V16. opremljen digitalnom kamerom i odgovarajućim softverom za analizu slike. Prije mikroskopiranja pripremljeni su mikroskopski preparati. Iz prvobitno pripremljene smjese vlakanaca i vode, kapaljkom se na predmetno stakalce stavila određena količina ispitnog uzorka, koji se s ciljem boljeg kontrasta obojio 0,01 % otopinom Toluidin plavo bojila u etanolu. Nakon sušenja preparata, na ista su uz pomoću glicerola zalijepljena pokrivna stakalca. Tako pripremljeni preparati su zatim analizirani pod mikroskopom i za svaku je vrstu izmjerena duljina 30 nasumično odabranih vlakanaca.

3. Rezultati i rasprava

3.1. Prinos vlakana

Rezultati prinosa vlakana izraženi kao prosjek rezultata pet mjerenja za svaku od deset prethodno navedenih vrsta, prikazani su na slici 4. Iz rezultata je vidljivo da organosolv proces ima različito djelovanje na svaku od korištenih vrsta drva. Razlog tomu jest činjenica da je u svim slučajevima korištena ista smjesa kemikalija, a dostupnost lignina, i udio hemiceluloza u ispitanim vrstama drva nisu isti. Naime, kako lignin s celulozom i hemicelulozama tvori tzv. lignin-ugljikohidratne komplekse (LCC), pri čemu putevi njihova stvaranja nisu sasvim poznati, dostupnost lignina uvjetovana je upravo specifičnostima pojedinačnih LCC.¹³ Dodatna činjenica da struktura i koncentracija lignina značajno variraju ovisno o ispitivanoj vrsti drva, dijelu stabla iz kojeg su uzeti uzorci, te vrsti i dijelu stanične stijenke obuhvaćene ispitivanjem dodatno naglašavaju razloge zašto se u komercijalnim procesima delignifikacije osnovni proces (u smislu kemikalija koje čine

reakcijsku smjesu i njihova omjera), u pravilu prilagođavaju za svaku pojedinačnu vrstu drva. Svakako pritom treba voditi i računa da se sposobnost pojedinačnih otapala za otapanje ili bubrenje lignina povećava kako se gustoća kohezijske energije ili kapacitet vodikovih veza otapala povećava, a pridruženi parametar topljivosti (Hildebrandov parametar, vrijednost δ_1), približava procijenjenoj vrijednosti od oko $22,5 \text{ (J cm}^{-3}\text{)}^{-1/2}$ što je približni parametar topljivosti ekstrahiranog lignina drva.¹⁴ S obzirom na to da stupanj vodikovih veza opada s povećanjem temperature relativno visoka temperatura od 60 °C u procesu delignifikacije, uzrokovala je pad topljivosti lignina i direktno utjecala na prinos vlakanca. Na osnovi navedenog može se zaključiti da je razlog tomu da hrast i jela imaju prividno najviši, a smreka i topola najniži prinos vlakancu (slika 4) upravo rezultat specifične strukture i kemizma individualne vrste drva (različite dostupnosti lignina i udio hemiceluloza), odnosno činjenice da je u svim slučajevima proces delignifikacije vođen po identičnim uvjetima, pri istoj temperaturi i uz istu smjesu kemikalija. Naravno, nikako se ne smije zanemariti i činjenica da je povišenje temperature procesa delignifikacije utjecalo i na disocirajuću konstantu octene kiseline, koja je zbog produženog djelovanja svakako degradirala dio hemiceluloza, čineći ih u potpunosti vodotopivima.

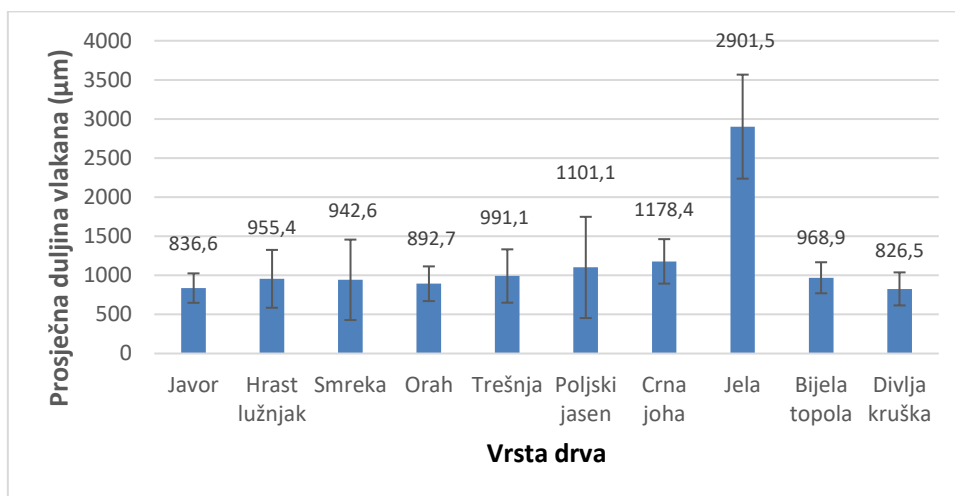


Slika 4 - Prosječni prinos vlakanca

Fig. 4 - Average fibre yield

3.2. Mikroskopska analiza duljine vlakana

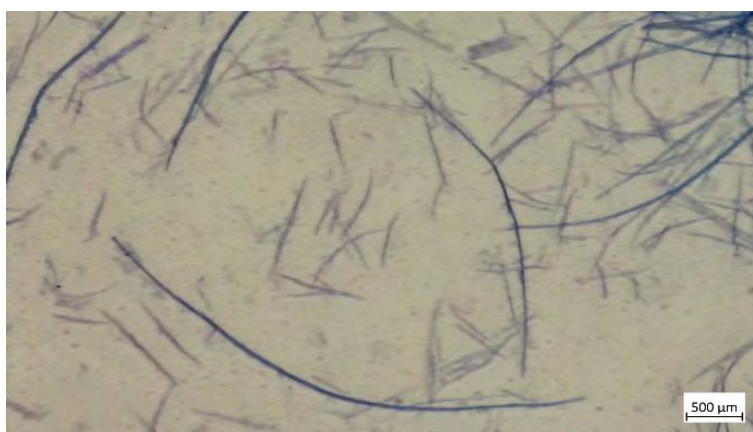
Analiza duljine vlakana, neminovno sugerira da četinjače imaju značajno duža vlakna, što je posebice izraženo kod drva jele (slike 5 i 6) koja uvelike odskake od ostalih analiziranih vrsta.



Slika 5 - Prosječna duljina vlakana

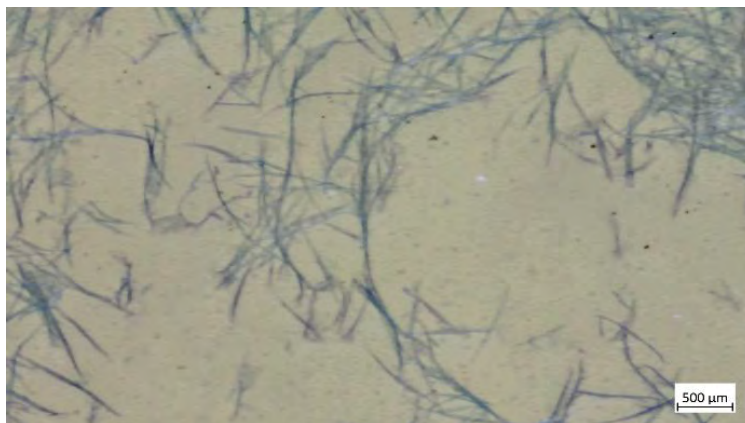
Fig. 5 - Average fibre length

Od drva listača nešto duža vlakna imaju crna joha, jasen, trešnja i bijela topola (slika 7), ali u suštini gledano između vrsta listača nema značajne razlike. Generalno gledano, ovakvi rezultati su i očekivani budući da je anatomska građa drva listača i četinjača bitno drugačija (odnosi duljina traheja i traheida). Rezultati ujedno sugeriraju da je korištenje staklenih kuglica u procesu razvlaknjivanja uzoraka oraha i divlje kruške potencijalno uzrokovalo skraćanje vlakana, a koja su u procesu mikroskopiranja obuhvaćana analizom.



Slika 6 - Mikroskopska snimka vlakana jele

Fig. 6 - Microscopic image of fir fibres

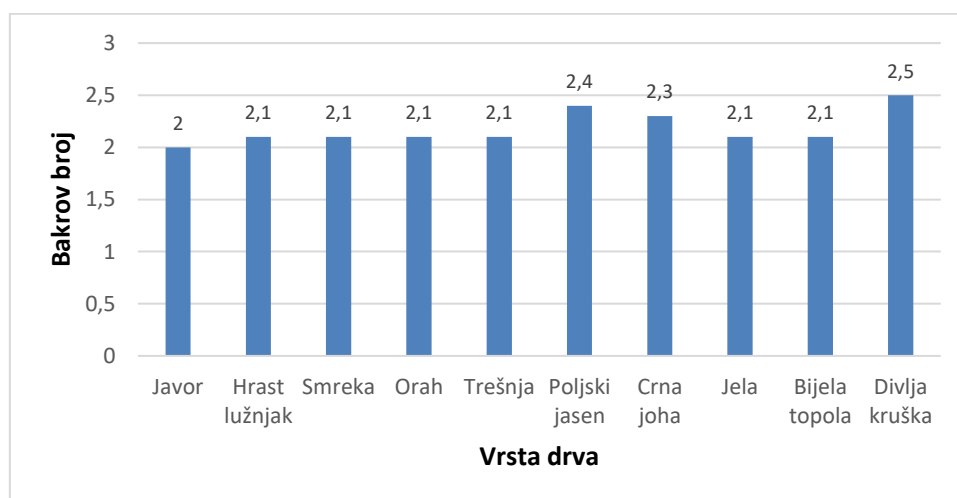


Slika 7 - Mikroskopska snimka vlakana bijele topole

Fig. 7 - Microscopic image of white poplar fibres

3.3. Bakrov (Cu) broj

Rezultati degradacije celuloze, odnosno bakrovog broja prikazani su na slici 8, iz čega je vidljivo da su vrijednosti bakrovog (Cu) broja približno jednake za sve ispitane vrste, izuzev drva kruške, jasena i crne johe, koji pokazuju nešto veće vrijednosti. Za ove se vrste stoga može konstatirati da je proces delignifikacije nešto agresivnije djelovao na reducirajuće skupine unutar molekula celuloze, točnije hemiacetalne hidroksilne i aldehidne skupine. Bakrov broj je za ostale ispitivane vrste nešto niži, te je stoga i degradacija celuloze (vjerojatno) nešto niža. Pritom najniži stupanj degradacije imaju javor i jela. Ovakve podjednake vrijednosti su vrlo dobar pokazatelj pravilne provedbe procesa delignifikacije te pravilnog vođenja procesa određivanja bakrovog (Cu) broja.

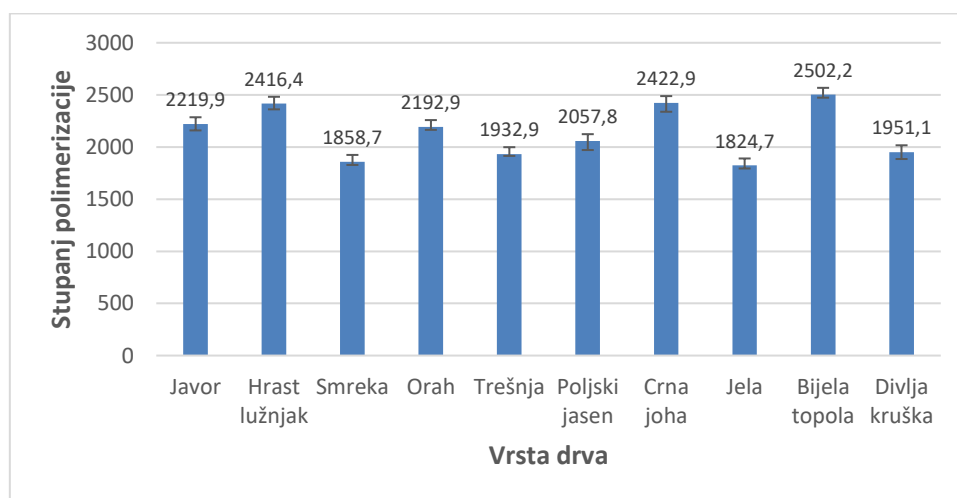


Slika 8 - Rezultati određivanja bakrovog (Cu) broja

Fig. 8 - Results of copper (Cu) number determination

3.4. Stupanj polimerizacije i molekulska masa

Srednje vrijednosti stupnja polimerizacije za 10 ispitanih vrsta drva, prikazane su na slici 9. Usporedbom vrijednosti stupnja polimerizacije (DP) za sve vrste možemo vidjeti da su ove vrijednosti relativno gusto distribuirane. Poznato je da su uz DP celuloze izravno povezana i njena mehanička svojstva, gdje viši stupanj polimerizacije rezultira boljim svojstvima. S aspekta proizvodnje papira (npr. izolacijskog papira za transformatore) povoljno je da vlakna u startu imaju nešto viši DP, jer se kod samog procesa izrade papira DP neminovno smanjuje. U ovom specifičnom slučaju (ali i u slučaju svih ostalih tipova papira) vrijednost stupnja polimerizacije opada i za vrijeme korištenja papira. Optimalna vrijednost bi stoga, u prethodno navedenom slučaju papira za transformatore bila oko 1100, a minimalna oko 200. Ispod te se granice vrijednosti DP, papiri više ne bi smjeli koristiti jer je procijenjeno da se pri tim vrijednostima vlačna čvrstoća papira smanjuje za nevjerovatnih 60 %, čime papir gubi svoju primarnu funkciju.¹⁵ Vodeći se ovim kriterijem, može se zaključiti da sve ispitivane vrste imaju vrlo dobra vlakna s aspekta njihovog DP i mehaničkih svojstava.

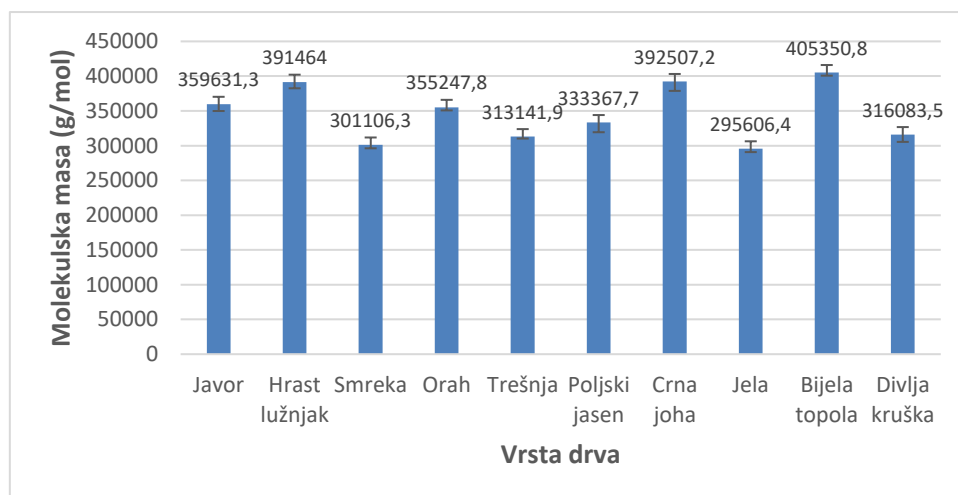


Slika 9 - Vrijednosti stupnja polimerizacije (DP)

Fig. 9 - Values of degree of polymerization (DP)

Svakako vrlo zanimljiva je i činjenica, da su u usporedbi s drugim vrstama iznimno duga vlakanca jele, na makromolekulskom nivou zapravo „najlošija“, a vrlo blizu po vrijednostima DP je i druga ispitivana četinjača (smreka). Jednim dijelom se ovo može pripisati i nešto primitivnijoj anatomske građi četinjača u odnosu na listače, koja čini celulozu dostupniju kemikalijama u procesu delignifikacije, što svakako utječe na smanjenje vrijednosti DP.

Razmotre li se podaci za drvo listača, evidentno je da meke vrste, kao što su bijela topola i crna joha, imaju viši DP. Paralelno s izračunom stupnja polimerizacije, proračunata je i molekulska masa pripremljene celuloze te su njene srednje vrijednosti za svaku vrstu prikazane na slici 10.



Slika 10 - Vrijednosti molekulske mase (M_w)

Fig. 10 - Molecular weight values (M_w)

Budući da vrijednosti molekulske mase strogo koreliraju s vrijednostima stupnja polimerizacije ($r = 0,99999$), distribucija podataka i raspored vrsta je identičan. Što znači da ponovno bijela topola, kao meka vrsta listača ima najveću molekulsku masu, dok jela ima najmanju. Meke vrste listača općenito imaju visoku molekulsku masu i visoke vrijednosti DP i stoga se upravo ove drvene vrste najčešće i koriste u industrijskoj proizvodnji vlakana i papira. Raspon vrijednosti je vrlo velik i kreće se u rasponu od 295 000 g mol⁻¹ do preko 400 000 g mol⁻¹. Prema *Fengelu i Wegeneru*¹⁶ prosječna molekulska masa celuloze ovisi o izvoru i metodi pripreme, u rasponu od 50 000 do 2 500 000 g mol⁻¹. Shodno tome, možemo reći da su dobiveni podaci ispitanih vrsta, u nekom srednjem rasponu prema literaturnim podacima.

4. Zaključak

Ovaj rad bazirao se na ispitivanju svojstva delignificiranih drvnih vlakana deset različitih vrsta četinjača i listača, pripremljenih na isti način. Proces delignifikacije značajno je ubrzala povišena temperatura procesa, uz posljedicu skraćivanja vlakana za neke vrste, što je vidljivo i iz mikroskopskog određivanja duljine vlakana. Iz vrijednosti bakrovog (Cu) broja možemo zaključiti da je proces bio podjednak za sve vrste. Vrijednosti stupnja polimerizacije (DP) i

molekulske mase (M_w) su vrlo dobre i pokazuju nam da bi ispitane vrste bile pogodne kao sirovina u papirnoj industriji i polimernoj tehnologiji. Isto tako, visoke vrijednosti stupnja polimerizacije daju naslutiti da navedene vrste imaju dobra mehanička svojstva.

Literatura

1. E. Sjöstrom, Wood Chemistry: Fundamentals and Applications, 2nd edition. Academic Press, USA, 1993.
2. S. Fink, Transparent Wood – A new approach in the functional study of wood structure, *Holzforschung* **46** (1992) 403-408, doi: <https://doi.org/10.1515/hfsg.1992.46.5.403>.
3. FAO. Pulp and paper capacities, Survey 2021-2026.
4. E. Brännvall, A. Reimann, The balance between alkali diffusion and alkali consuming reactions during impregnation of softwood. Impregnation for kraft pulping revisited, *Holzforschung* **72** (2018) 169-178, doi: <https://doi.org/10.1515/hf-2017-0078>.
5. J. Bogren, H. Brelid, H. Theliander, Reaction kinetics of softwood kraft delignification - General considerations and experimental data, *NPPRJ.* **22** (2007) 177-183, doi: <https://doi.org/10.3183/npprj-2007-22-02-p177-183>.
6. A. Rodríguez, E. Espinosa, J. Domínguez - Robles, R. Sánchez, I. Bascón, A. Rosal, Different solvents for organosolv pulping. In: *Pulp and Paper Processing*, Kazi, S. N. (ur.) Intechopen, 2018, pp. 32-54.
7. A. A. Vaidya, K. D. Murton, D. A. Smith, G. Dedual, A review on organosolv pretreatment of softwood with focus on enzymatic hydrolysis of cellulose, *Biomass Convers. Biorefin.* **12** (2022) 5427-5442, doi: <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02373-9>.
8. TAPPI T 257cm-12 (2012) Sampling and Preparing Wood for Analysis.
9. ASTM D1193-06 (2011) Standard Specification for Reagent Water.
10. HRN ISO 5351:2011 (Pulpa – Određivanje graničnoga viskozitetnog broja u otopini bakar-etilendiamina (CED)).
11. T. Łojewski, K. Zięba, J. Łojewska, Size exclusion chromatography and viscometry in paper degradation studies. New Mark-Houwink coefficients for cellulose in cupri-ethylenediamine, *J. Chromatog. A* **1217** (2010) 6462-6468, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.07.071>.

12. *D. Bu, X. Hu, Z. Yang, X. Yang, W. Wei, M. Jiang, Z. Zhou, A. Zaman*, Elucidation of the relationship between intrinsic viscosity and molecular weight of cellulose dissolved in tetra-N-butyl ammonium hydroxide/dimethyl sulfoxide, *Polymers* **11** (10) (2019) 1605, doi: <https://doi.org/10.3390/polym11101605>.
13. *A. Tribota, G. Amer, M. A. Alio, H. de Baynast, C. Delattre, A. Pons, J.-D. Mathias, J. M. Callois, C. Vial, P. Michaud, C.-G. Dussap*, Wood-lignin: supply, extraction processes and use as bio-based material, *Eur. Polym. J.* **112** (2019) 228-240, doi: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.01.007>.
14. *A. Schuerch*, The solvent properties of liquids and their relation to the solubility, swelling, isolation and fractionation of lignin, *J. Am. Chem. Soc.* **74** (1952) 5061-5067, doi: <https://doi.org/10.1021/ja01140a020>.
15. *M. Duval*, Transformers with low degree of polymerisation of paper, *Transformers Magazine*, 1,3 (2014), 30-35.
16. *D. Fengel, G. Wegener*, Wood – Chemistry, Ultrastructure, Reactions. Verlag Kessel, Remagen, Germany, 1989.

- **ZAŠTITA OKOLIŠA**
ENVIRONMENTAL PROTECTION



Groundwater of non-hazardous waste disposal site "Goričica"

Podzemne vode odlagališta neopasnog otpada „Goričica“

Ida Bulić,^{a,b} Anita Štrkalj,^{a*} Zoran Glavaš,^a Mateo Lončar,^b Vesna Očelić Bulatović^c

^a University of Zagreb Faculty of Metallurgy, Aleja narodnih heroja 3, 44000 Sisak, Croatia

^a Sveučilište u Zagrebu Metalurški fakultet, Aleja narodnih heroja 3, 44000 Sisak, Hrvatska

^b Gospodarenje otpadom Sisak d.o.o., Trg Josipa Mađerića 1, 44000 Sisak, Croatia

^b Gospodarenje otpadom Sisak d.o.o., Trg Josipa Mađerića 1, 44000 Sisak, Hrvatska

^c University of Zagreb Faculty of Chemical Engineering and Technology,

Trg Marka Marulića 19, 10000 Zagreb, Croatia

^c Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije,

Trg Marka Marulića 19, 10000 Zagreb, Hrvatska

*Corresponding author: prof. dr. sc. Anita Štrkalj, strkalj@simet.unizg.hr

Abstract

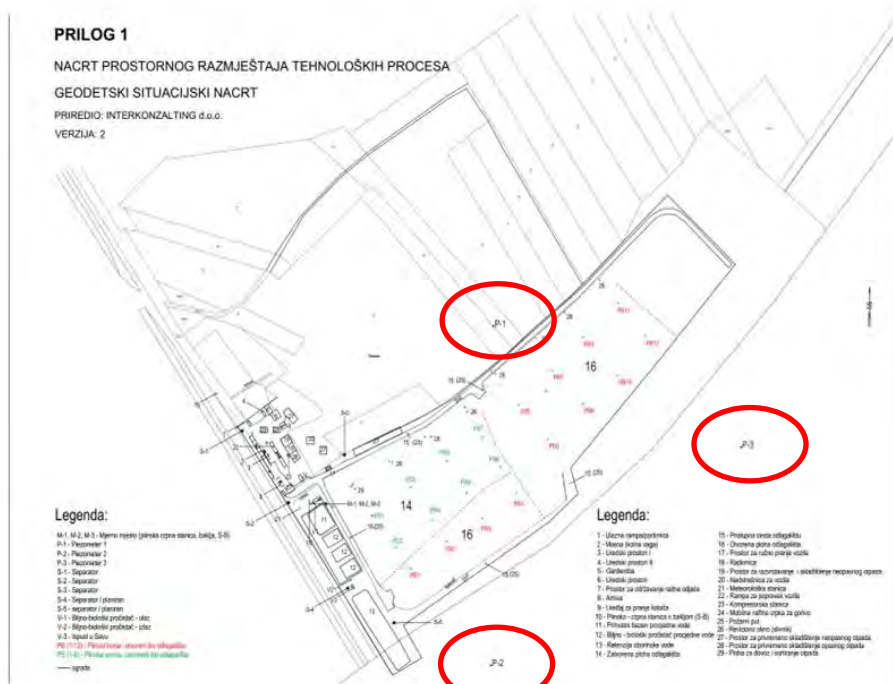
In this paper, physicochemical parameters (groundwater level, temperature, electrical conductivity, concentration of ammonia, phosphate, sulphate, nitrate, chloride, cadmium, lead, mercury, and arsenic) were determined in the groundwater of the non-hazardous waste disposal site "Goričica" (near the town of Sisak, Croatia) in the period from 2019 to 2023. Sampling was carried out at three locations (piezometer 1, 2 and 3 - labelled in the paper as P-1, P-2 and P-3). The obtained results showed a slightly smaller but "jumpy" increase in ammonia and phosphate concentrations in the groundwater samples taken at piezometers 1 and 3 and a more frequent and significant increase of the mentioned ions in the groundwater samples taken at piezometer 2. It is assumed that the deviation from the maximum allowed concentration of NH_4^+ and PO_4^{3-} in the groundwater near the location of piezometers 1 and 3 occurs due to the application of fertilizers on the arable land surrounding the landfill. Due to the disposal of a large amount of biowaste on a small area of the landfill and due to the contact of rainwater with waste, as well as the outflow of rainwater from the rainwater channels, groundwater near piezometer 2 showed increased concentrations of the mentioned ions.

Key words: waste, landfill, groundwater, ammonia, phosphates

Sažetak

U ovom radu određivani su fizikalno-kemijski parametri (razina podzemne vode, temperatura, električna vodljivost, koncentracija amonijaka, fosfata, sulfata, nitrata, klorida, kadmija, olova, žive i arsena) u podzemnim vodama odlagališta neopasnog otpada „Goričica“ (u blizini grada Siska, Hrvatska) u periodu od 2019. do 2023. Uzorkovanje je provedeno na tri lokacije (piezometar 1, 2 i 3 - označeni u radu kao P-1, P-2 P-3). Dobiveni rezultati pokazali su nešto manje, ali „skokovito“ povećanje koncentracija amonijaka i fosfata u uzorcima podzemnih voda uzetih na piezometrima 1 i 3 i češće i značajnije povećanje navedenih iona u uzorcima podzemnih voda uzetih na piezometru 2. Pretpostavlja se da do odstupanja od maksimalno dopuštene koncentracije NH_4^+ i PO_4^{3-} u podzemnim vodama u blizini lokacije piezometara 1 i 3 dolazi zbog primjene gnojiva na obradivim površinama kojima je okruženo odlagalište. Zbog odlaganja veće količine biootpada na malu plohu odlagališta te zbog kontakta oborinskih voda s otpadom, kao i izljevanja oborinskih voda iz oborinskih kanala, podzmenne vode u blizini piezometra 2 pokazale su povećane koncentracije navedenih iona.

Ključne riječi: *otpad, odlagalište, podzemne vode, amonijak, fosfati*



1. Introduction

Waste is considered any substance or object that is thrown away, intended to be thrown away or must be thrown away. In addition, any substance or object that requires collection, transport and processing for the protection of the public interest is considered waste.¹ Waste is created as a result of human activities and besides representing a loss of material and energy creates an additional cost because its collection, transportation and disposal must be ensured.² Depending on where it originates (place of origin), it can be classified into two categories: municipal waste (waste from households and from production and/or service activities) and production waste (waste generated during the production process). Furthermore, waste can be divided according to its properties into hazardous, non-hazardous and inert³. Regardless of whether it is municipal or production, hazardous, non-hazardous or inert waste, it is necessary to properly dispose of the waste. Landfilling has always been the most common way of disposing of waste. Landfilling is the process of permanent, controlled and organized disposal of waste on the surface of the earth or in the soil.⁴⁻⁶ Waste disposal sites are places where waste undergoes a process of complete neutralization, decomposition and mineralization over time. In doing so, various chemical, physical and microbiological decomposition processes take place, which can be more or less invasive. During these processes, water vapor, gases and heat are released. The intensity of these processes primarily depends on the composition of the waste, but also on the moisture content, the proportion and type of organic substances, the method of waste disposal, the construction of the landfill, as well as on meteorological conditions.^{2,7} In view of the above, as well as the fact that disposed waste is a danger to the environment, every landfill must have an effective sealing system (sealing layers), drainage systems for precipitation and leachate, and a degassing system. The sealing system (covering and foundation) is usually made in several permeable and impermeable layers with the use of artificial and natural materials. Its purpose is to prevent water from seeping into and out of the landfill. The cover sealing system prevents rainwater from coming into contact with the disposed waste, and the base sealing system enables the resulting leachate not to be retained in the landfill body, but to be collected in basins or lagoons and, depending on the design of the landfill, purified and discharged into aquifer systems or returned on the landfill body.⁸ Improper management of wastewater from landfills can have a significant harmful impact on the environment. Namely, landfill wastewater contains various chemical compounds, including heavy metals, organic substances, salts and other harmful substances. If the sealing layer is poorly executed, water can seep

through the soil, which leads to soil pollution, and thus to a negative impact on plant and microbial life. In addition, the penetration of water through the sealing layer causes contamination of groundwater, which often serves as a source of drinking water.⁹ The "Goričica" landfill is a non-hazardous landfill that disposes of waste from the area of the town of Sisak and three other municipalities (Martinska Ves, Sunja and Lekenik). It is located opposite the oil port on the left side of the Sava River, about 6.5 km south of the city center of Sisak (Fig. 1). The location of the non-hazardous waste disposal site "Goričica" is surrounded by agricultural land (on the north-west and south-east sides), the Sava mound and the left bank of the Sava River (on the south-west side) and the water body of the Sava branch (on the north-east side). Since the course of the Sava River and the groundwater near the coast are practically parallel, the direction of the groundwater near the landfill is from north to south. According to geological tests, the first three meters of the soil profile contain clay, which often has admixtures of sand.

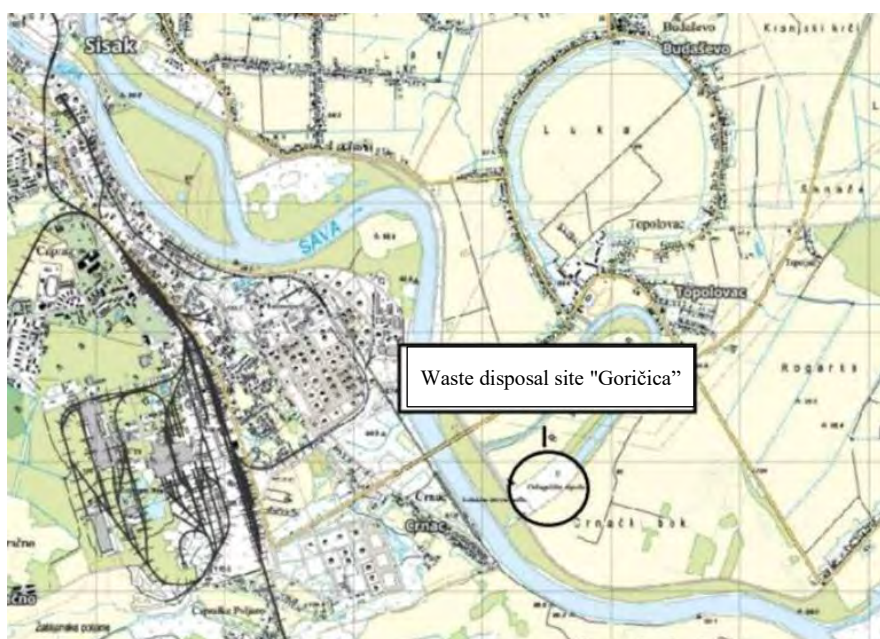


Fig. 1 - Location of non-hazardous waste disposal site "Goričica"¹⁰

Slika 1 - Lokacija odlagališta neopasnog otpada „Goričica“¹⁰

The landfill areas are divided into the eastern and western areas (Fig. 2). The western area is further divided into southern and northern areas. The southern part of the western area is an open part where waste is continuously deposited, while the northern part of the area is renovated and closed. The eastern area was built in II. rehabilitation phase and also serves for immediate waste disposal.¹¹



Fig. 2 - Closed and open area of non-hazardous waste disposal site "Goričica"

Slika 2 - Zatvorena i otvorena ploha odlagališta neopasnog otpada „Goričica“

Until 1990, waste was disposed of in cassettes dug in the ground, and then on the surface with occasional covering with inert material. In parallel with the disposal of waste, various stages of rehabilitation of the landfill were carried out. Thus, in 1997, a project of extensive rehabilitation of the landfill was launched, which was carried out in two phases. Renovation was completed in 2007.¹² Today, at the "Goričica" non-hazardous waste disposal site, waste is deposited on a surface where a basic multi-layered sealing system with a perimeter embankment, horizontal and vertical degassing system is installed. In addition, there is a drainage system for collecting and draining the leachate of new waste. The rehabilitation of the landfill is still being worked on, and a new project of rehabilitation and elevation of the existing landfill body is planned. Given that the need for waste disposal is relatively large (Table 1), the planned rehabilitation will enable the continuation of disposal.

Table 1 - Total amounts of waste disposed of at the "Goričica" landfill in the period from 2018 to 2023¹³

Tablica 1 - Ukupne količine otpada odloženog na odlagalište „Goričica“ u periodu od 2018. do 2023. godine¹³

Year	2018	2019	2020	2021	2022	2023
Weight (t)	16 677	16 358	15 691	18 775	17 359	16 151

In general, it can be said that proper design and construction of the landfill is necessary, because in this way the minimum impact on the environment is achieved. In addition, it is necessary to monitor various parameters that indicate the way waste is handled and the operation of the landfill. Therefore, in this paper, the chemical and physical properties of the groundwater of the “Goričica” landfill were monitored.

2. Experimental part

Water sampling was carried out at three locations within the landfill where piezometers were installed. One piezometer is located upstream (P-1), and the other two downstream (P-2, P-3) in relation to the Sava River. The area where the piezometers are located is built up by flood sediments and alluvial deposits of the Sava River. Shallow aquifers of low to medium yield are formed in the mentioned alluvial deposits, and they are hydraulically connected to the nearby watercourse. The direction of the groundwater is parallel to the course of the Sava River.¹⁴ Fig. 3 shows the arrangement of piezometers at the "Goričica" landfill.

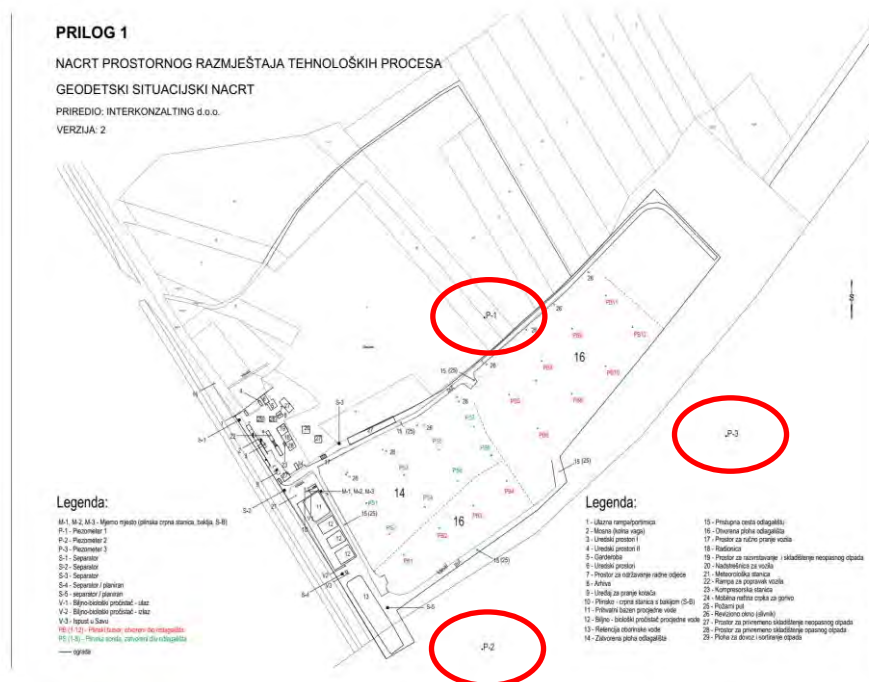


Fig. 3 - Arrangement of piezometers at the non-hazardous waste disposal site "Goričica"¹¹

Slika 3 - Razmještaj piezometara na odlagalištu neopasnog otpada „Goričica“¹¹

Groundwater sampling was carried out 4 times a year (in March, June, September and December) in the period from 2019 to 2023 according to the HRN ISO 5667-11:2011 standard. Groundwater level, temperature, electrical conductivity, ammonia, phosphates, sulphates, nitrates, chlorides, cadmium, lead, mercury and arsenic were determined. The analyses were carried out in accordance with Croatian standards (Table 2). Fig. 4 shows a sample of groundwater for analysis taken at piezometer P-3.

Table 2 – Standards according to which the analyses were carried out and the parameters that were determined

Tablica 2 - Norme prema kojima su provedene analize i parametri koji su se određivali

STANDARD	The parameter being determined
HRN EN 27888:2008	electrical conductivity
HRN EN ISO 10304-1:2009	phosphates, sulphates, nitrates, chlorides
HRN EN ISO 11885:2010	cadmium, lead, mercury, arsenic



Fig. 4 - Sample of groundwater for analysis from piezometer P-3

Slika 4 - Uzorak podzemne vode za analizu s piezometra P-3

3. Results and discussion

By reviewing all conducted and collected analyses in the period from 2019 to 2023, it was noticed that all tested parameters, except for the concentration of NH_4^+ and PO_4^{3-} , were in accordance with the Decision on unified environmental protection conditions and the Regulation on water quality standards.^{15,16} Therefore, in Figs. 5-7, only the months in which

there were deviations of the specified parameters from the maximum permissible concentration (MPC) are shown, which according to the Regulation on water quality standards is 0.5 mg l⁻¹ for NH₄⁺, and 0.2 mg l⁻¹ for PO₄³⁻.

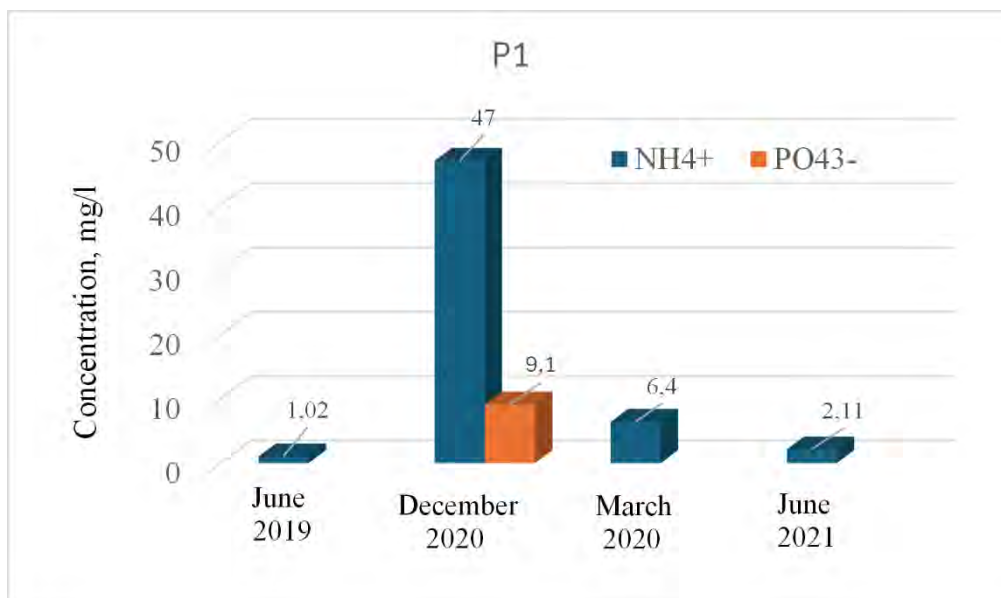


Fig. 5 - Concentrations of NH₄⁺ and PO₄³⁻ in groundwater samples taken at piezometer P-1
 Slika 5 - Koncentracije NH₄⁺ i PO₄³⁻ u uzorcima podzemne vode uzetim na piezometru P-1

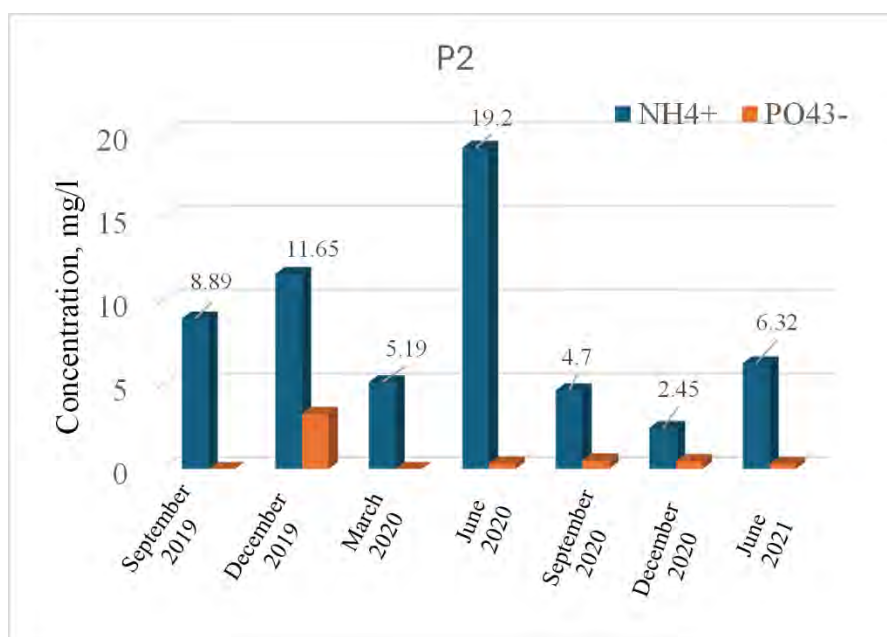


Fig. 6 - Concentrations of NH₄⁺ and PO₄³⁻ in groundwater samples taken at piezometer P-2
 Slika 6 - Koncentracije NH₄⁺ i PO₄³⁻ u uzorcima podzemne vode uzetim na piezometru P-2

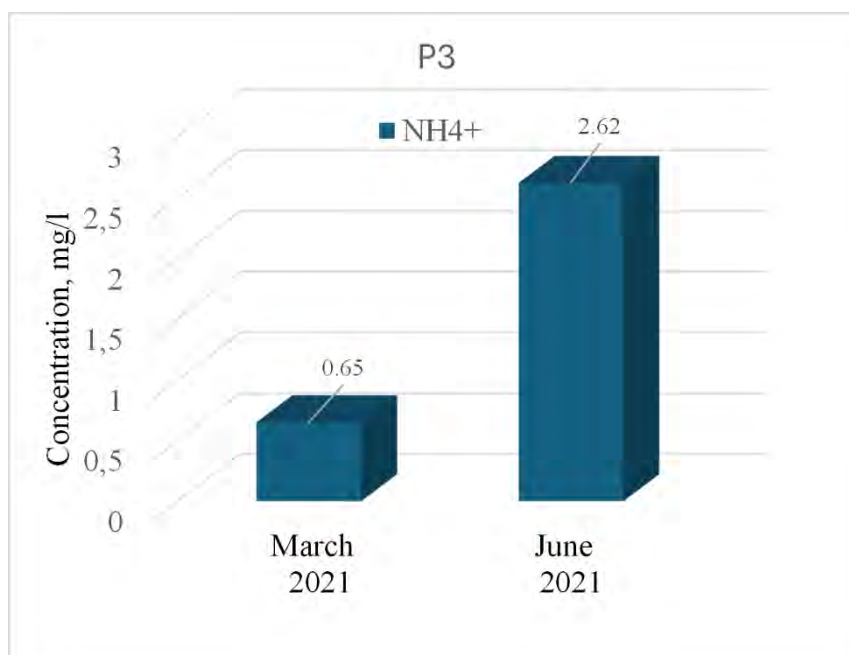


Fig. 7 - Concentrations of NH₄⁺ and PO₄³⁻ in groundwater samples taken at piezometer P-3

Slika 7 - Koncentracije NH₄⁺ i PO₄³⁻ u uzorcima podzemne vode uzetim na piezometru P-3

Figs. 5-7 show that the biggest deviations from MPC refer to the concentration of NH₄⁺ ions. In studies NH₄⁺ was described as the most common contaminant of groundwater.^{17,18} Many factors influence the temporal and spatial variations of the concentration of this ion in groundwater.^{19,20,21} Fig. 5 shows that the concentration of NH₄⁺ ions on piezometer P-1 is above the maximum permissible concentration, MPC (0.5 mg/l) according to the Decision on unified environmental protection conditions and the Regulation on water quality standards in March and June 2021, June 2019, and especially in December 2020.^{15,16} Furthermore, at piezometer P-3 (Fig. 7), the concentration of NH₄⁺ ions increased in June and March 2021. Since the landfill is surrounded by agricultural land (Fig. 8) the increased concentration of NH₄⁺ ions occur as a result of crop feeding or preparing the soil for sowing by applying different fertilizers. For the same reason, the concentration of PO₄³⁻ also increased. Most artificial fertilizers are based on ammonia and phosphate. Ammonia is soluble in water, which is why it settles very quickly in the soil and vegetation. When ammonia reacts with acid gases, it can be transported a long distance from the emission source and precipitate much more slowly as it is in this case.^{22,23} Furthermore, variations in the concentrations of the mentioned ions in groundwater also depend on the amount of precipitation. In the months preceding March and June 2021, June 2019 and December 2020, higher amounts of precipitation were recorded,

especially in May 2019 and 2021, which resulted in an increase in the concentration of NH_4^+ ions.²⁴ In addition, "jumps" in concentrations that are visible only in certain periods indicate that the sealing system of the "Goričica" waste disposal site is functioning, that is, that leachate does not penetrate underground. In case the sealing layer is damaged, the concentration of the mentioned ions would constantly increase.



Fig. 8 - Orthophoto of the location of the landfill "Goričica"

Slika 8 - Ortofoto snimka lokacije odlagališta „Goričica“

More significant and frequent deviations in the concentrations of NH_4^+ and PO_4^{3-} in groundwater were observed in the samples taken from piezometer 2 (P-2) (Fig. 6). For a long period of time, large quantities of biowaste generated during the landscaping of green areas in the city of Sisak were deposited on the area of the landfill, which is in the immediate vicinity of piezometer 2. A total of 2651.1 kg of bio-waste was disposed of on this area, of which 1164.52 kg of bio-waste was disposed of in the period from 2019 to 2021. The mentioned area is open and bounded on one side by a storm drain. Rainwater drainage is carried out through the system of precipitation channels. It is possible that due to the longer time of disposal, ammonia developed in the mentioned waste as a result of rotting.²⁵ It is known that ammonium ion appears in old landfills due to the hydrolysis and fermentation of the nitrogen fraction of

biodegradable substrates. Ammonia nitrogen is a waste decomposition product and has the potential to act as one of the dominant environmental pollutants and therefore often presents a problem for the management of all landfills.^{5,26,27} In accordance with the above, it is assumed that the increase in the concentration of NH_4^+ ions in the groundwater occurred not only from arable land but also due to the washing of the land with waste. Due to the large amount of rainfall, wastewater overflowed from the untreated rain channel and soaked the surface immediately next to piezometer 2. The results of the analyses obtained during 2023 indicate that the concentrations of the tested substances at piezometer 2 are below the MPC, which confirms the above statements, since from November 2021 due to changes in technology, the company that arranges green areas in the city of Sisak no longer disposes of waste from the arrangement of green areas. In addition to the specified specifics in the operation of the landfill, no sampling was possible on piezometer 2 (during the whole of 2022) and on piezometer 3 (during June 2019 and December 2022), and it was assumed that the piezometers were damaged. Therefore, in 2023, works were carried out with the aim of replacing all three piezometers. The aforementioned works enabled better sampling. In addition, the landfill elevation plan envisages the collection of rainwater from all sides of the landfill by constructing the remaining sections of the stormwater channel. In this way, the overflow of water over the precipitation channels will be prevented.

4. Conclusions

The analysis of the groundwater of the non-hazardous waste disposal site "Goričica" in the period from 2019 to 2023 showed that in the samples taken at the locations where piezometers 1 and 3 were installed, the concentrations of all tested parameters were below the MPC, except for the concentrations of NH_4^+ and PO_4^{3-} . Since the landfill is surrounded by agricultural land, it is assumed that the increased concentration of NH_4^+ and PO_4^{3-} ions in the groundwater is the result of feeding crops or preparing the soil for sowing by applying different fertilizers. This is confirmed by the fact that the concentrations of the mentioned ions are increased only in certain periods of the year. Significant and more frequent deviations in the concentrations of NH_4^+ and PO_4^{3-} were recorded in the groundwater samples taken at piezometer 2. It is assumed that the increase in NH_4^+ ions in the groundwater is a consequence of the overflow of rainwater (loaded with ammonia that was released as a result of the decomposition of waste created during landscaping) from the rainwater channels. In order to reduce the harmful impact of waste water

from the landfill, it is important to apply appropriate technologies for collecting and treating water, monitor water quality, and pay special attention to the rehabilitation of the landfill, which will be carried out in 2024.

ACKNOWLEDGMENT

The research in this paper was carried out as part of a professional project *"Monitoring waste water and waste from the Goričica non-hazardous waste disposal site"*.

References

1. Zakon o gospodarenju otpadom, Narodne novine 84/21 i 142/23.
2. D. Barčić, V. Ivančić, Utjecaj odlagališta otpada Prudinec/Jakuševac na onečišćenje okoliša, Šumarski list **7-8** (2010) 347-359.
3. D. Kiš, S. Kalambura, Gospodarenje otpadom I, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Sveučilište J. J. Strossmayera Osijek, Osijek, 2018.
4. T. Christensen, Sanitary Landfilling: Process, Technology and Environmental Impact, Elsevier, Amsterdam, 2012.
5. N. Yang, A. Damgaard, F. Lü, L. Shao, L. Brogaard, P. He, Environmental impact assessment on the construction and operation of municipal solid waste sanitary landfills in developing countries: China case study. Waste Manage. **34** (2014) 929–937, doi: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.02.017>.
6. C. Khalil, C. Al Hageh, S. Korfali, R. Khnayzer, Municipal leachates health risks: Chemical and cytotoxicity assessment from regulated and unregulated municipal dumpsites in Lebanon, Chemosphere **208** (2018) 1–13, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.151>.
7. H. A. Aziz, M. Zahari, M. Bashir, Y. Hung, Handbook of Environment and Waste Management, Volume 2: Land and Groundwater Pollution Control, World Scientific Publishing, New Jersey, 2014.
8. M. Hrnčić, V. Hrnčić, Prilog izgradnji brtvenih sustava na odlagalištu otpada. Tehnički glasnik **5** (2011) 135-140.
9. D. Reinhart, P. McCreanor, T. Townsend, The bioreactor landfill: Its status and future, Waste Manage. Res. **20** (2002) 172–186, doi: <https://doi.org/10.1177/0734242X0202000209>.

10. Elaborat o izvedbi piezometara P-1, P-2 i P-3 na lokaciji odlagališta otpada „Goričica“, grad Sisak, Vodovod-hidrogeološki radovi d.o.o., 2023.
11. Interkonzalting d.o.o., Obrazac stručne podloge zahtjeva za izmjenama okolišne dozvole – Odlagalište otpada „Goričica“, Gospodarenje otpadom Sisak d.o.o., Zagreb, 2023.
12. URL: <https://gos.hr/odlagaliste-neopasnog-otpada-goricica/> (15. 9. 2024.)
13. Podaci tvrtke Gospodarenje otpadom Sisak d.o.o.
14. Geotehnički studio d.o.o., Izvedba trajnog piezometra za objekt odlagalište otpada „Goričica“, Zagreb, 2020.
15. Rješenje o objedinjenim uvjetima zaštite okoliša, KLASA: UP/I-351-03/13-02/63, URBROJ: 517-06-2-2-1-16-56, Zagreb, 29. veljače 2016. godine, Republika Hrvatska, Ministarstvo zaštite okoliša i prirode.
16. Uredba o standardu kakvoće voda, Narodne novine 96/19.
17. *T. Christensen, P. Kjeldsen, P. Bjerg, D. Jensen, J. Christensen, A. Baun*, Biogeochemistry of landfill leachate plumes, *Appl. Geochem.* **16** (2001) 659–718, doi: [https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(00\)00082-2](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(00)00082-2).
18. *L. Diaz, G. Savage, L. Eggerth, C. Golueke*, Composting and Recycling: Municipal Solid Waste, CRC Press, Boca Raton, 2020.
19. *T. Sabbas, A. Poletini, R. Pomi, T. Astrup, O. Hjelm, P. Mostbauer, G. Cappai, G. Magel, S. Salhofer, C. Speiser*, Management of municipal solid waste incineration residues. *Waste Manage.* **23** (2003) 61–88, doi: [https://doi.org/10.1016/S0956-053X\(02\)00161-7](https://doi.org/10.1016/S0956-053X(02)00161-7).
20. *O. Hjelm*, Disposal strategies for municipal solid waste incineration residues, *Journal of Hazard. Mater.* **47** (1996) 345–368, doi: [https://doi.org/10.1016/0304-3894\(95\)00111-5](https://doi.org/10.1016/0304-3894(95)00111-5).
21. *A. Omran, A. Mahmood, H. Aziz*, Current practice of solid waste management in Malaysia and its disposal, *Environ. Eng. Manage. J.* **6** (2007) 296–300, doi: <https://doi.org/10.30638/eemj.2007.035>.
22. *M. Ramos, M. López-Acevedo*, Zinc levels in vineyard soils from the Alt Penedès-Anoia region (NE Spain) after compost application, *Adv. Environmen. Res.* **8** (2004) 687–696, doi: [https://doi.org/10.1016/S1093-0191\(03\)00041-8](https://doi.org/10.1016/S1093-0191(03)00041-8).

23. *E. Papadimitriou, J. Barton, E. Stentiford*, Sources and levels of potentially toxic elements in the biodegradable fraction of autoclaved non-segregated household waste and its compost/digestate. *Waste Manage. Res.* **26** (2008) 419–430, doi: <https://doi.org/10.1177/0734242X08088697>.
24. URL: https://meteo.hr/klima.php?section=klima_podaci¶m=k2_1_(1. 10. 2024.)
25. *S. Royani, A. Fitriana*, Ammoniacal Nitrogen Contaminant in Water of Kaliori Landfill Area in Banyumas, *INSOLOGI: Jurnal Sains dan Teknologi* **2** (2023) 462–467.
26. *S. Al-Salem, P. Lettieri, J. Baeyens*, Recycling and recovery routes of plastic solid waste, *Waste Manage.* **29** (2009) 2625–2643, doi: <https://doi.org/10.55123/insologi.v2i3.1885>.
27. *K. Ragaert, L. Delva, K. Van Geem*, Mechanical and chemical recycling of solid plastic waste, *Waste Manage.* **69** (2017) 24–58, doi: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.07.044>.

Utjecaj agrokemikalija na prirodu i okoliš

Impacts of agrochemicals on nature and the environment

Gabriella Kanižai Šarić,* Vesna Rastija, Ivana Majić

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek,
Vladimira Preloga 1, 31000 Osijek, Hrvatska

*Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek,
Vladimira Preloga 1, 31000 Osijek, Croatia*

*Autor za dopisivanje: prof. dr. sc. Gabriella Kanižai Šarić, gkanizai@fazos.hr

Sažetak

Agrokemikalije su neizostavan dio intenzivnih sustava poljoprivredne proizvodnje. Njihova primjena donosi brojne koristi, ali isto tako izaziva zabrinutost zbog štetnog učinka na zdravlje ljudi, prirodu i okoliš. Neodgovorna primjena agrokemikalija može rezultirati kontaminacijom tla, vode i zraka te imati štetne učinke na ekosustav. Agrokemikalije mogu imati dugoročne posljedice na ekološku ravnotežu te uzrokovati neželjeno uništavanje korisnih, ne ciljanih organizama. Osim toga, dugotrajna izloženost agrokemikalijama različitih skupina toksičnosti može uzrokovati ozbiljne kronične zdravstvene probleme kod ljudi poput karcinogenosti, hormonalnih i neuroloških promjena i drugih oboljenja. Agrokemikalije mogu suprimirati rast i razvoj pojedinih grupa mikroorganizama, što može utjecati na biogeokemijski ciklus hranjivih elemenata i kvalitetu tla. Neprikladna uporaba agrokemikalija može dovesti do smanjenja biološke raznolikosti tla što može dugoročno narušiti plodnost i produktivnost tla te negativno utjecati na lanac prehrane. Uz sve veću svijest o ekološkoj održivosti, postoji pomak prema metodama uzgoja koje smanjuju potrebu za agrokemikalijama poput integriranog pristupa upravljanja poljoprivrednom proizvodnjom. Stalno usavršavanje poljoprivrednih metoda i tehnologija, ključno je za postizanje održivog poljoprivrednog sustava kako bismo očuvali ravnotežu mikrobiote tla, zaštitili prirodu i okoliš te osigurali sigurnost hrane. Razvoj i primjena alternativa agrokemikalijama mogu značajno doprinijeti zaštiti prirodne sredine i zdravlja ljudi u budućnosti.

Ključne riječi: *pesticidi, toksičnost, akumulacija, mikrobiom tla, održiva poljoprivreda*

Abstract

Agrochemicals are an important part of intensive agricultural production systems. Their application brings numerous benefits but also causes concern due to the harmful effects on human health, nature, and the environment. Irresponsible application of agrochemicals can result in soil, water, and air contamination which cause negative impacts on the ecosystem. Agrochemicals can long-term affect the ecological balance and cause unwanted destruction of beneficial, non-target organisms. In addition, long-term exposure to agrochemicals can cause serious chronic health problems in people of different toxicity groups such as carcinogenicity, hormonal and neurological changes, and other diseases. Agrochemicals can suppress the growth and development of certain microorganisms, affecting the biogeochemical cycle of nutrients and soil quality. Improper use of agrochemicals can decrease soil biodiversity, damage soil fertility and productivity in the long term, and negatively affect the food chain. With increasing awareness of environmental sustainability, there is a shift towards farming methods that reduce the need for agrochemicals such as integrated crop management. Constant improvement of agricultural practices and technologies is essential for achieving a sustainable agricultural system to preserve the balance of soil microbiota, protect nature and the environment, and ensure food safety. Agrochemical alternative development and application can significantly contribute to the future protection of nature, the environment, and human health.

Key words: *pesticides, toxicity, accumulation, soil microbiome, sustainable agriculture*



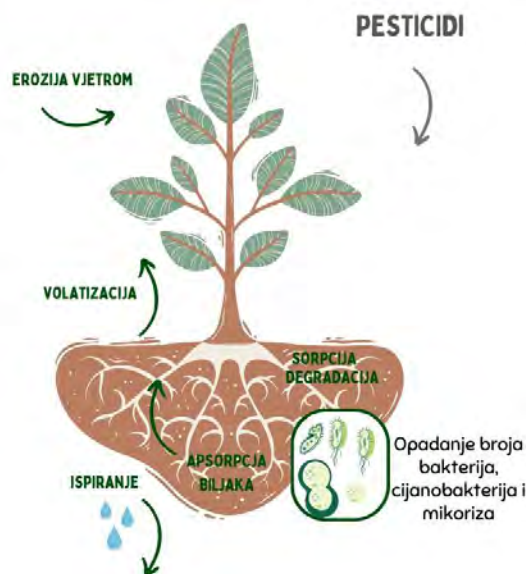
1. Uvod

Principi konvencionalne poljoprivredne proizvodnje temelje se na intenzivnoj primjeni agrokemikalija u uzgoju visokorodnih kultivara poljoprivrednih kultura uz primjenu intenzivne obrade s poljoprivrednom mehanizacijom, a u cilju postizanja visokih prinosa po jedinici površine. U ovakvom načinu gospodarenja tlom upotrebljavaju se mnogobrojna mineralna gnojiva, herbicidi, fungicidi, insekticidi, rotendicidi, akaricidi, nematocidi i druga sredstva. Različite statističke analize procjenjuju kako je globalno tržište sredstava za zaštitu bilja poraslo za 9,9 % u 2022. i doseglo 78,7 milijardi dolara, pri čemu herbicidi dominiraju s oko 47 %, a slijede ih insekticidi s 29,5 %, te fungicidi s 17,5 %. Biološki proizvodi za zaštitu usjeva čine manje od 5 % ukupnog iznosa. Projekcije ukazuju kako će tržišna vrijednost sredstava za zaštitu, potencijalno, do 2029. godine, doseći 97 milijardi dolara, globalno. Svake godine se širom svijeta upotrebljava oko tri milijuna tona kemijskih sredstava za zaštitu bilja s tendencijom rasta.¹ Postojanost sredstava za zaštitu bilja ovisi o njihovoj adsorpciji, razgradnji te prijenosa putem ispiranja, volatilizacije ili otjecanja i infiltracije, dok produkti razgradnje mogu biti jednako toksični kao izvorna molekula. Primijenjena sredstva za zaštitu smanjuju bioraznolikost, ispiru se u podzemne i nadzemne vode, kontaminiraju zrak i tlo, upitne su razgradivosti, te često zaostaju u okolišu. Ovakav intenzivan način gospodarenja tlom dugoročno ostavlja štetne posljedice u vidu opadanja sadržaja humusa u tlu, degradacije tla, onečišćenja podzemnih i nadzemnih voda te toksičnog djelovanja na živa bića.

2. Sudbina pesticida u okolišu

Sudbina pesticida u okolišu (slika 1) ovisi o različitim faktorima, uključujući svojstva samog pesticida, uvjete i metode raspršivanja odnosno primjene, klimatskih parametara i tipa tla. Pesticidi mogu proći kroz procese degradacije, gdje se njihove kemijske strukture mijenjaju pod utjecajem mikroorganizama koji koriste pesticide kao izvor ugljika i energije, ili ih razgrađuju enzimima i kiselinama.² Razgradnja može nastati i djelovanjem sunčeve svjetlosti ili drugih kemijskih procesa. Brzina razgradnje ovisi o vrsti pesticida. Pojedini pesticidi su relativno stabilni i mogu perzistirati u okolišu dulje vrijeme. Nadalje, bioakumulacija pesticida može dovesti do visoke akumulacije u vrhovima lanca ishrane, a što može imati ozbiljne posljedice na predatorne organizme. Pesticidi se mogu ispirati s poljoprivrednih površina kišom ili navodnjavanjem te tako dospijevati u vodene ekosustave. Pesticidi se mogu prenositi vjetrom s mjesta primjene na druga područja, što može uzrokovati onečišćenje zraka i dodatnu

izloženost ljudi. Nadalje, mogu se vezati u tlu, čime se smanjuje njihova pokretljivost i potencijalno sprječava ispiranje u vode. Pesticidi mogu imati štetne učinke na ne ciljane organizme, uključujući mikroorganizme, ptice, sisavce, pčele i druge korisne insekte. Navedeno može dovesti do poremećaja različitih ekosustava.



Slika 1 – Sudbina pesticida u okolišu

Fig. 1 – Fate of pesticides in the environment

Prema istraživanju *F. Maggi i sur.*³ u kojem je analizirano korištenje najčešće upotrjebljenih pesticida ustanovljeno je da se otprilike 70 000 tona potencijalno štetnih kemikalija ispire u slatkovodne resurse. Također u istom istraživanju je ustanovljeno da se oko 80 % primijenjenih pesticida razgrađuje u bioprodukte, 10 % zaostaje u tlu, a 7 % ispire ispod zone korijena. Novi globalni problem je zagađenje mješavinama pesticida koje djeluju sinergistički nakon akutne i kronične izloženosti kod ne ciljanih organizama. Utvrđena je kontaminacija od 94 %, 73 %, i 69 % poljoprivrednog zemljišta u Europi, Sjevernoj Americi i Južnoj Americi pesticidima s više od jednog aktivnog sastojka⁴.

3. Toksičnost pesticida

Klasifikacija pesticida Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) prema opasnosti prikazana je u tablici 1.⁵

Tablica 1 – Klasifikacija pesticida prema opasnosti

Table 1 – Classification of Pesticides by Hazard

Klasa		LD50 (mg kg ⁻¹)	
		Oralno	Dermalno
Ia	Izuzetno opasni	< 5	< 50
Ib	Visoko opasni	5–50	50–200
II	Umjereno opasni	50–2000	200–2000
III	Slabo opasni	> 2000	> 2000
U	Mala vjerojatnost za akutne posljedice	> 5000	

Izvor: WHO (2019): Recommended Classification of Pesticides by Hazard and guidelines to classification⁵

Prvu i drugu skupinu predstavljaju izuzetno i visoko opasni (klasa Ia i Ib) aktivni sastojci u pesticidima a to su: organofosfati, organoklorni spojevi, karbamati, derivati kumarina, spojevi žive, arsena i bakra, pirazoli, pirertroidi i triazini poput aldikarba, klormefosa, mevinfos, parationa, forata, fosfamidona, kumafosa, karbofurana, nikotina, varfarina, cink fosfida i drugih. U II skupinu pripadaju: ametrin, bifentrin, klordan, klorpirifos, DDT, imazalil, dikvat, dodin, lindan i drugi. U III skupini su: atrazin, malation, glifosat i drugi, dok su u zadnjoj skupini: antrakinon, kaptan, fenfuram, giberelinska kiselina i drugi. Više od 150 000 ljudi godišnje umire trovanjem pesticidima. Najviše letalnih ishoda nastaje zbog samotrovanja gutanjem, profesionalna ili slučajna izloženosti su lokalna ili inhalacijska. Glavni uzročnici su organofosforni i karbamatni insekticidi, herbicid parakvat i fumigant aluminijev fosfid.⁶ Međutim, različita istraživanja potvrđuju kronične posljedice izloženosti pesticidima. *Mostafalou i Abdollahi*⁷ navode šest skupina toksičnosti: karcinogenost, neurotoksičnost, reproduktivnu, metaboličku, pulmonarnu i razvojnu toksičnost pesticida, povezanih s 43 ljudske bolesti. U ovom pregledu ustanovljeno je kako su pesticidi uzročnici tumora živčanog sustava, probavnog sustava, limfnog tkiva, urinarnog sustava, reproduktivnih organa, Alzheimerove bolesti, Parkinsonove bolesti, astme, ADHD-a, autizma, neplodnosti, urođenih mana, kroničnog bronhitisa, dijabetesa, gojaznosti i mnogih drugih bolesti. Najzastupljenija je kancerogenost u odnosu na vrste pesticida, uključujući insekticide, herbicide, fungicide i fumigante. Pesticidi ulaze u organizme putem izravnog unosa iz vode ili kroz hranidbeni lanac duž različitih trofičkih razina. Često bioakumulacija ne pokazuje izravne učinke, a koji se mogu uočiti tek u kasnijim fazama života, kao što je smanjena plodnost.² Najpoznatiji primjer toksičnog djelovanja pesticida su organoklorni spojevi kao što je DDT (diklor-difenil-trikloretnan). DDT je insekticid, sporo se razgrađuje, perzistentan je i pokazuje značajnu sposobnost nakupljanja u tkivima te na ovaj način izaziva dugoročne posljedice.⁸ Primjena

DDT-a zabranjena je u većini zemalja 70-ih godina 20. stoljeća, ali zbog perzistentnosti pokazuje dugoročne toksične učinke i bioakumulaciju u tkivima organizama. Dugoročna izloženost DDT-u može dovesti do ozbiljnih zdravstvenih problema u humanoj populaciji, uključujući neurološke, kancerogene, reproduktivne i endokrine poremećaje.⁹ Također je zapaženo da DDT ima sposobnost induciranja epigenetskog transgeneracijskog nasljeđivanja pretilosti, te bolesti bubrega, testisa i jajnika.¹⁰ Prema Stockholmskoj konvenciji (UNEP) o postojanim organskim onečišćujućim tvarima, prema kojoj se njihova proizvodnja zabranjuje ili ograničava, a s ciljem zaštite ljudskog zdravlja i okoliša, utvrđeno je da se DDT-u ograničava proizvodnja i/ili uporaba za kontrolu prijenosnika bolesti u skladu s preporukama i smjernicama Svjetske zdravstvene organizacije.¹¹ Stoga se DDT i danas proizvodi i koristi u kontroli vektora malarije i lišmanioze, dominantno na području Afrike i Indije.^{12,13} Još jedan primjer toksičnog djelovanja pesticida je glifosat. Glifosat je sistemski organofosforni herbicid širokog spektra i trenutno je najkorišteniji herbicid u svijetu.¹⁴ Prema WHO klasifikaciji nalazi se u skupini III te je opisan kao neznatno toksičan. U ožujku 2015. IARC (International Agency for Research on Cancer) je klasificirao glifosat kao vjerojatni kancerogen za ljude (Skupina 2A). Ovakav zaključak, kako navode, se temelji na ograničenim dokazima o raku kod ljudi i dokazima o raku kod pokusnih životinja. EFSA (European Food Safety Authority) i ECHA (European Chemicals Agency) procjenjuju da glifosat ne ispunjava znanstvene kriterije za razvrstavanje kao kancerogena, mutagena ili reproduktivno toksičnu tvar.^{15,16,17} Navedeno ističe postojanje značajnog neslaganja između regulatornih agencija, kao i potrebu ažuriranja sigurnosnih standarda za glifosat u cilju zaštite javnog zdravlja i okoliša.¹⁸ Znanstvena zajednica se razilazi u mišljenjima oko toksičnosti glifosata, a zbog nekonzistentnih rezultata te metodike epidemioloških studija s glifosatom. Unatoč svemu, istraživanja ukazuju kako izlaganje glifosatu i glavnom metabolitu aminometil fosfonskoj kiselini, kao i komercijalnim formulacijama dovodi do izazivanja neurotoksičnih učinaka kod svih ispitivanih vrsta. Glavni načini djelovanja uključuju promjene u razvoju živčanog sustava, oksidativni stres, neuroinflamaciju, procese koji dovode do smrti neurona i pojavu promjene ponašanja, dok promjene u strukturi i funkciji neurona uzrokuju razvoj neuropatologija, encefalopatologija, senzorne i motoričke disfunkcije.¹⁸ Europska komisija je obnovila upotrebu glifosata na razdoblje od 10 godina, pod određenim novim uvjetima i ograničenjima.¹⁹

4. Utjecaj na mikrobiom tla

Mikroflora i mikrofauna tla je neizostavna u procesima mineralizacije organske tvari. Njihova brojnost i raznolikost je izuzetno visoka, a pod utjecajem različitih abiotičkih i biotičkih okolišnih faktora. Nakon primjene pesticida u tlo, mikroorganizmi tla imaju sposobnost aktivne razgradnje pesticida, koristeći ih kao izvor energije ili se javlja inhibicija njihovog rasta zbog toksičnog djelovanja pesticida. Potencijal toksičnosti pesticida uključuje: kemijsku strukturu spoja, način djelovanja pesticida i ciljni organizam, primijenjene doze i način primjene.²⁰ Smanjenje broja mikroorganizama dovodi do poremećaja u hranidbenoj mreži, što u konačnosti utječe na plodnost tla i prinos usjeva. Istraživanja su utvrdila kako primjena pesticida kod mikroorganizama smanjuje aktivnost enzima dehidrogenaze, u sljedećem redoslijedu: insekticid > fungicid > herbicid, ali i oksidoreduktaze, nitrogenaze, hidrolaze.^{21,22} Pesticidi utječu na supresiju procesa amonifikacije, nitrifikacije i fiksacije dušika, te je utvrđeno kako su organoklorni pesticidi toksičniji od organofosfornih na predstavnike roda *Nitrosomonas*, *Nitrobacter* i *Thiobacillus* koji sudjeluju u ovom procesima.²³ Također je utvrđena inhibicija infekcije, nodulacije, te broj rizobium bakterija - simbiota leguminoza u procesu fiksacije dušika.²⁴ Gljive u tlu imaju veću sposobnost otpornosti na primjenu pesticida, ali primjena fungicida drastično smanjuje njihovu populaciju, a time i bioraznolikost i procese razgradnje u kojima sudjeluju.²⁵ Najosjetljivije su arbuskularno mikorizne gljive, pri čemu herbicidi i fungicidi inhibiraju klijanje spora i duljinu hifa arbuskularne mreže.²⁵ Arbuskularne mikorizne gljive su simbionti koji koloniziraju korijenje biljaka i time omogućuju učinkovitije usvajanje hranjivih tvari, posebno fosfora i vode iz tla, čime biljka razvija veću nadzemnu i podzemnu masu. Primjenom pesticida smanjuje se i bioraznolikost algi i cijanobakterija tla, a primijenjeni pesticidi djeluju antagonistički na fotosintezu. Određeni fungicidi i herbicidi utječu i na smanjenje brojnost mikrofaune tla.²²

4.1. Održivo gospodarenje tlom

Iz navedenog je jasno kako se proizvodnja i upotreba pesticida povećava unatoč dokazanoj toksičnosti i nizu štetnih dugoročnih posljedica. Nadalje, toksičnost se očituje i u svim životnim zajednicama biljaka, životinja, tla, vode i zraka. Neosporna je činjenica kako je u smislu javnog zdravlja, upotreba kemijskih sredstava značajno smanjila i eliminirala zarazne bolesti. Nadalje, poljoprivredni proizvođači koriste agrokemikalije za suzbijanje korova i insekata u poljoprivrednom uzgoju, što rezultira stabilnim prinosom te ujednačenom tržišnom cijenom

poljoprivrednih proizvoda.²⁶ Međutim visoko profitabilna industrija, političke odluke, te česta, nepravilna i neodgovorna uporaba i upravljanje pesticidima, kao i njihova rezistentnost u okolišu, dovode do štetnih posljedica za sve članove životnih zajednica te onečišćenje tla, vode, zraka, a što utječe na proizvodnju hrane kontaminirane ksenobioticima. Postoji potreba za ekološki prihvatljivijim alternativama koje rezultiraju povećanom proizvodnjom usjeva, uz razumno korištenje agrokemikalija, kako predlažu protokoli održive zaštite i fertilizacije usjeva.²⁵ Trenutačni trendovi su organski uzgoj, primjena biognojiva i bioloških sredstava za suzbijanje, konzervacijska obrada tla, precizna primjena pesticida ili uporaba nanopesticida.²⁵

5. Zaključak

Smanjenje upotrebe agrokemikalija pridonosi poboljšanju zdravlja i očuvanju kvalitete tla, smanjenju onečišćenja voda i zraka, očuvanju bioraznolikosti, smanjenju rizika od ozbiljnih zdravstvenih oboljenja ljudi, boljoj kvaliteti poljoprivrednih proizvoda, te promicanju održive poljoprivredne proizvodnje. Navedeni ciljevi bi trebali biti neupitni ne samo u primarnoj poljoprivrednoj proizvodnji nego i u managementu visokoprofitabilnih korporacija, a u cilju zaštite i razvoja zdravijeg i odgovornijeg čovječanstva.

Literatura

1. A. Sharma, V. Kumar, B. Shahzad, M. Tanveer, G. Preet Singh Sidhu, N. Handa, S. Kaur Kohli, P. Yadav, A. Shreeya Bali, R. Daman Parihar, O. Iqbal Dar, K. Singh, S. Jasrotia, P. Bakshi, M. Ramakrishnan, S. Kumar, R. Bhardwaj, A. Kumar Thukral, Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem, SN Appl. Sci. **1** (2019) 1446, doi: <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1485-1>.
2. S. Gupta, K. Gupta, Bioaccumulation of Pesticides and Its Impact on Biological Systems, u P.K. Srivastava, V.P. Singh, A. Singh, D. K. Tripathi, S. Singh, S. M. Prasad, D. K. Chauhan, (ur.), Pesticides in Crop Production: Physiological and Biochemical Action, Wiley, 2020, str. 55-68.
3. F. Maggi, F. H. M Tang, F. N Tubiello, Agricultural pesticide land budget and river discharge to ocean, Nat. **620** (2023) 1013-1017, doi: <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06296-x>.

4. *F. H. M., Tang, M. Lenzen, A. McBratney, F. Maggi*, Risk of pesticide pollution at the global scale, *Nat. Geosci.* **14** (2021) 206-210, doi: <https://doi.org/10.1038/s41561-021-00712-5>.
5. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240005662> (3. 10. 2024.)
6. *M. Eddleston*, Poisoning by pesticides, *Med.* **48** (2020) 214-217, doi: <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2019.12.019>.
7. *S. Mostafalou, M. Abdollahi*, Pesticides: an update of human exposure and toxicity, *Arch. Toxicol.* **91** (2017) 549–599, doi: <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1849-x>.
8. *R. Thapa, A. Nainabasti, A. Lamsal, S. Malla, B. Thapa, B., Y. Subedi, S. Ghimire*, Pesticide Persistence in Agriculture and its hazardous effects on Environmental Components, *Int. J. Appl. Sci. Biotechnol.* **10** (2) (2022) 75-83, doi: <https://doi.org/10.3126/ijasbt.v10i2.45095>.
9. *M. P. Longnecker, W. J. Rogan, G. Lucier*, The human health effects of DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane) and PCBs (polychlorinated biphenyls) and an overview of organochlorines in public health, *Annu. Rev. Public Health* **18** (1997) 211–44, doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.publhealth.18.1.211>.
10. *M. K. Skinner, M. Manikkam, R. Tracey, E. Nilsson, M. M. Haque, C. Guerrero-Bosagna*, Ancestral DDT Exposures Promote Epigenetic Transgenerational Inheritance of Obesity, *BMC. Med.* **11** (2013) 228, doi: <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-228>.
11. URL:
<https://www.pops.int/Implementation/PesticidePOPs/DDT/DDToverview/Overview/tabid/378/Default.aspx> (3. 10. 2024.)
12. *H. van den Berg*, Global status of DDT and its alternatives for use in vector control to prevent disease, *Environ. Health Perspect.* **117** (2009) 1656–1663, doi: <https://doi.org/10.1289/ehp.0900785>.
13. *H. van den Berg, G. Manuweera, F. Konradsen*, Global trends in the production and use of DDT for control of malaria and other vector-borne diseases, *Malar. J.* **16** (2017) 401, doi: <https://doi.org/10.1186/s12936-017-2050-2>.
14. *D. Soares, L. Silva, S. Duarte, A. Pena, A. Pereira*, Glyphosate Use, Toxicity and Occurrence in Food, *Foods* **10** (2021) 2785, doi: <https://doi.org/10.3390/foods10112785>.

15. *ECHA*, Committee for Risk Assessment, Opinion proposing harmonised classification and labelling at EU level of glyphosate (ISO); N-(phosphonomethyl)glycine, EC Number: 213-997-4 (2022).
16. *EFSA*, *F. Alvarez*, *M. Arena*, *D. Auteri*, *M. Binaglia*, *A. Federica Castoldi*, *A. Chiusolo*, *F. Crivellente*, *M. Egsmose*, *G. Fait*, *F. Ferilli*, *V. Gouliarmou*, *L. Herrero Nogareda*, *A. Ippolito*, *F. Istace*, *S. Farrah*, *D. Kardassi*, *A. Kienzler*, *A. Lanzoni*, *R. Lava*, *A. Linguadoca*, *C. Lythgo*, *I. Mangas*, *L. Padovani*, *M. Panzarea*, *J. Manuel Parra Morte*, *S. Rizzuto*, *A. Romac*, *A. Rortais*, *R. Serafimova*, *R. Sharp*, *C. Szentes*, *A. Terron*, *A. Theobald*, *M. Tiramani*, *G. Vianello*, *L. Villamar-Bouza*, Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate, *EFSA Journal* **21** (7) (2023) 8164.
17. *A. Székács*, *B.R. Darvas*, Re-registration Challenges of Glyphosate in the European Union, *Front. Environ. Sci.* **6** (2018) 78, doi: <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00078>.
18. *C. Costas-Ferreira*, *R. Durán*, *L. R. F. Faro*, Toxic Effects of Glyphosate on the Nervous System: A Systematic Review, *Int. J. Mol. Sci.* **23** (2022) 4605, doi: <https://doi.org/10.3390/ijms23094605>.
19. URL: https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/statement_23_5792
European Commission Statement 23/5792 (2023): No qualified majority reached by Member States to renew or reject the approval of glyphosate. (3. 10. 2024.)
20. *D. G. Karpouzas*, *Z. Vryzas*, *F. Martin-Laurent*, Pesticide soil microbial toxicity: setting the scene for a new pesticide risk assessment for soil microorganisms (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.* **94** (10) (2022) 1161–1194, doi: <https://doi.org/10.1515/pac-2022-0201>.
21. *A. Subhani*, *L. Min*, *H. Chango-Yong*, *X. Zheng-Miao*, Alteration of certain soil microbiological and biochemical indices of a paddy soil under anthropogenic stress, *J. Zhejiang Univ. Sci.* **3** (4) (2022) 467-474.
22. *S. Arora*, *D. Sahni*, Pesticides effect on soil microbial ecology and enzyme activity- An overview, *J. App. Nat. Sci.* **8** (2) (2016) 1126-1132, doi: <https://doi.org/10.31018/jans.v8i2.929>.
23. *L. O. Odokuma*, *C. Osuagwu*, Tolerance of chemolithotrophic bacteria to organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides, *J. Agr. Environ. Eng. Technol.* **1** (1) (2004) 7–15.

24. *M. Singh, J. S. Kalar, R. P. Gupta*, The effect of preemergence applied herbicides on the symbiotic parameters and seed yield of soybean (*Glycine max* Merrill), *Int. J. Trop. Agr.* **13** (1–4) (1995) 143–150.
25. *A. Kalia, S. K. Gosal*, Effect of pesticide application on soil microorganisms, *Arch. Agron. Soil Sci.* **57** (6) (2011) 569-596, doi: <https://doi.org/10.1080/03650341003787582>.
26. *M. Tudi, D. H. Ruan, L. Wang, J. Lyu, R. Sadler, D. Connell, C. Chu, D. T. Phung*, Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **18** (2021) 1112, doi: <https://doi.org/10.3390/ijerph18031112>.
27. *P. Kittilsen, H. F. Svendsen*, Three-level mass-transfer model for the heterogeneous polymerization of olefins, *J. Appl. Polym. Sci.* **91** (2004) 2158–2167, doi: <https://doi.org/10.1002/app.13338>.

Ispitivanje biorazgradljivosti biopolimera u tlu

Determination of biodegradability of biopolymers in soil

Dajana Kučić Grgić,* Tin Mirt, Kristina Bule Možar, Martina Miloloža, Vesna Ocelić Bulatović

Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije,

Trg Marka Marulića 19, 10000 Zagreb, Hrvatska

University of Zagreb Faculty of Chemical Engineering and Technology,

Trg Marka Marulića 19, 10000 Zagreb, Croatia

*Autor za dopisivanje: izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić, dkucic@fkit.unizg.hr

Sažetak

Brzi industrijski razvoj dovodi do stvaranja velikih količina otpada koji se često neadekvatno zbrinjava, što rezultira njegovim nakupljanjem u prirodi i stvaranjem ozbiljnih ekoloških problema. Jedno od održivih rješenja je upotreba biorazgradljivih materijala, koji se uz pomoć mikroorganizama razgrađuju u okolišu, čime se smanjuje količina otpada koja ostaje u prirodi. Polimerni biorazgradljivi materijali, poput termoplastičnog škroba (TPS), polilaktida (PLA), polihidroksialkanoata (PHA) i polikaprolaktone (PCL), ističu se svojom širokom primjenom, posebno u ambalažnoj industriji i poljoprivredi, zahvaljujući svojoj sposobnosti prirodne razgradnje.

U ovom istraživanju analizirana je biorazgradljivost navedenih polimera i njihovih mješavina praćenjem promjene mase uzoraka tijekom 56 dana. Površinske promjene materijala detaljno su karakterizirane polarizacijskim mikroskopom. Rezultati su potvrdili da su svi analizirani materijali i njihove mješavine pokazali različite stupnjeve razgradnje tijekom ispitivanog perioda. TPS i njegove mješavine zabilježile su najbržu razgradnju, što se pripisuje njihovoj amorfnoj strukturi, dok su PLA i njegove mješavine pokazale značajno sporiju razgradnju, što je povezano s visokom kristalnošću i strukturnom čvrstoćom. Dobiveni rezultati naglašavaju utjecaj kemijskih i fizičkih svojstava polimera na njihov proces razgradnje te potvrđuju važnost biorazgradljivih materijala u rješavanju problema plastičnog otpada.

Ključne riječi: *biopolimeri, biorazgradljivost, tlo, polarizacijski mikroskop*

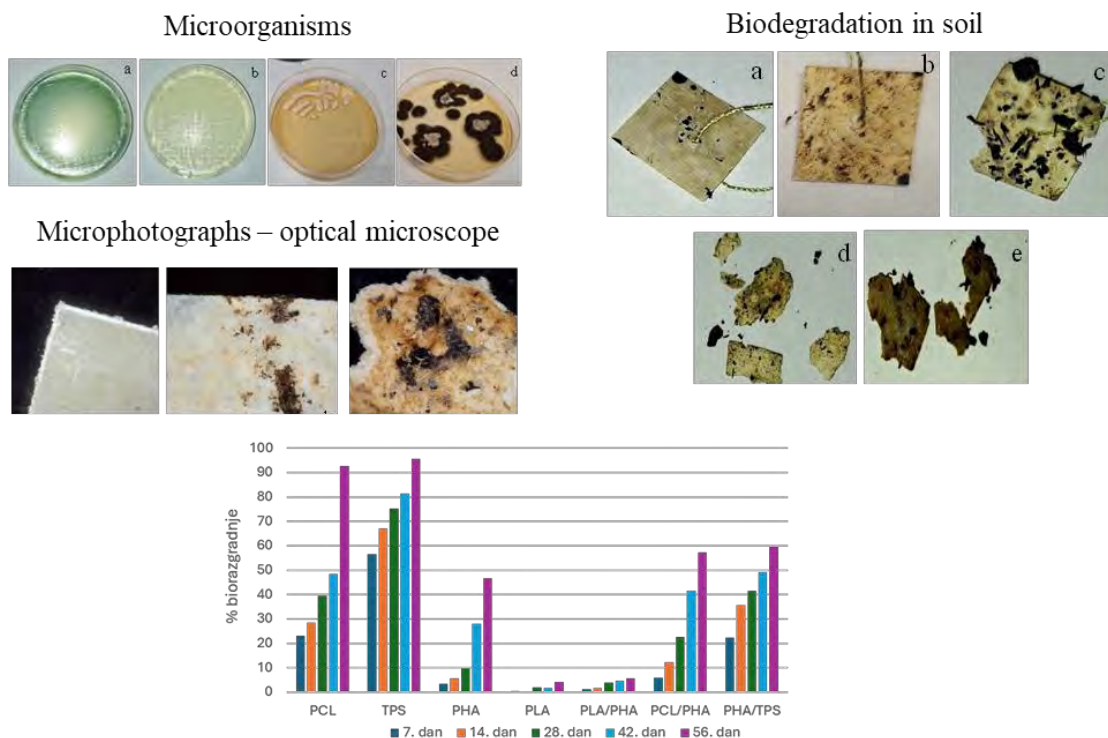
Abstract

The rapid industrial development leads to the generation of large amounts of waste that is often improperly managed, resulting in its accumulation in the environment and causing serious ecological problems. One sustainable solution to this issue is the use of biodegradable materials, which break down

in the environment with the help of microorganisms, thereby reducing the amount of waste that remains in nature. Polymer-based biodegradable materials, such as thermoplastic starch (TPS), polylactic acid (PLA), polyhydroxyalkanoates (PHA), and polycaprolactone (PCL), are notable for their wide application, particularly in the packaging industry and agriculture, due to their natural degradation ability.

This study analysed the biodegradability of these polymers and their blends by monitoring the change in sample mass over 56 days. Surface changes in the materials were thoroughly characterized using a polarization microscope. The results confirmed that all analysed materials and their blends showed varying degrees of degradation over the test period. TPS and its blends exhibited the fastest degradation, which is attributed to their amorphous structure, while PLA and its blends showed significantly slower degradation, which is linked to their high crystallinity and structural strength. The obtained results highlight the impact of the chemical and physical properties of polymers on their degradation process and confirm the importance of biodegradable materials in addressing the plastic waste problem.

Key words: *biopolymers, biodegradability, soil, polarization microscope*



1. Uvod

Danas se polimeri i polimerni materijali široko koriste zbog svoje primjenjivosti u raznim sektorima. Razvoj polimernih materijala značajno je unaprijedio različite gospodarske i tehnološke grane. Polimeri su kemijski spojevi izgrađeni od makromolekula, sastavljenih od manjih jedinica nazvanih monomeri.¹ Polimeri se dijele na prirodne, odnosno biopolimere, koji se sintetiziraju prirodnim biološkim procesima, i sintetske polimere, koji nastaju preradom prirodnih sirovina ili kemijskom sintezom.² Najzastupljeniji biopolimeri su prirodna guma, prirodna koža, škrob i celuloza. Sintetski polimeri se dobivaju procesom polimerizacije – kemijskom reakcijom u kojoj se monomeri povezuju kovalentnim vezama u duge polimerne lance. Ovi se materijali najviše primjenjuju u ambalažnoj industriji, ali i u mnogim drugim granama. Međutim, onečišćenje koje uzrokuju sintetski polimeri predstavlja ozbiljan rizik za ljude i okoliš zbog njihove slabe biorazgradljivosti. U svrhu smanjenja negativnog utjecaja na okoliš, sve se češće primjenjuju biorazgradljivi polimerni materijali, koji su održivija alternativa konvencionalnim polimerima. Biorazgradnja je proces razgradnje materijala pod utjecajem mikroorganizama, poput bakterija, gljiva i algi, te ovisi o brojnim čimbenicima, uključujući temperaturu, vlagu, vrstu materijala i prisutnost određenih mikroorganizama.³ Biorazgradljivi polimerni materijali dobivaju se iz prirodnih izvora, što im omogućava razgradnju u okolišu. Njihova biorazgradljivost prvenstveno je uvjetovana strukturom i sastavom polimera. Primjeri takvih materijala uključuju celulozu, termoplastični škrob (TPS), polilaktid (PLA) i polihidroksialkanoate (PHA).⁴ Škrob je prirodni polimer koji biljke koriste za pohranu energije, a jedan je od ključnih sastojaka ljudske prehrane, prisutan u namirnicama poput riže, krumpira i kruha. Kemijski, škrob je polisaharid sastavljen od dviju komponenata: amiloze i amilopektina. Amiloza ima spiralnu strukturu, s po šest glukoznih jedinica po zavoju, dok je amilopektin razgranat, s bočnim lancima povezanima na glavnu strukturu α -(1,6)-glikozidnim vezama, dok su glukozne jedinice unutar glavnog lanca povezane α -(1,4)-glikozidnim vezama.⁵ Da bi se škrob mogao koristiti kao polimerni materijal, mora se modificirati. Kombinacijom s vodom i plastifikatorima, poput glicerola ili sorbitola, škrob se zagrijavanjem pretvara u biorazgradljivi polimer poznat kao termoplastični škrob (TPS), koji je prilagodljiv i obradiv pri povišenim temperaturama, čime dobiva svojstva slična plastici. PHA su prirodni polimeri koje proizvode mnogi mikroorganizmi, posebice bakterije. Ovisno o broju atoma ugljika u monomernim jedinicama, PHA se dijele na kratkolančane (3-5 atoma ugljika), srednjelančane (6-14 atoma ugljika) i dugolančane (15 ili više atoma ugljika).⁶

Kratkolančani PHA, poput polihidroksibutirata (PHB) i njegovih kopolimera (PHBV), karakteriziraju krutost i krhkost. Srednjelančani PHA, kao što je poli(3-hidroksiheksanoat), imaju nižu vlačnu čvrstoću, točku taljenja i polukristalnu strukturu. Dugolančani PHA, poput poli(3-hidroksioktadekaoata), rijetko se koriste u industriji zbog duljih bočnih lanaca koji otežavaju njihovu primjenu. U proizvodnji dugolančanog PHA najviše sudjeluje *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, u srednjelančanima *Pseudomonas oleovorans*, a u kratkolančanima *Azotobacter vinelandii*, *Alcaligenes latus*, *Escherichia coli*.⁷ Proizvodnja PHA uglavnom se odvija fermentacijom ugljičnih supstrata (poput glukoze i saharoze) unutar stanica mikroorganizama. Ovisno o vrsti mikroorganizma i uvjetima uzgoja, mogu se dobiti homo- ili kopolijestri različitih hidroksilalkanskih kiselina. Značajan istraživački fokus posljednjih godina usmjeren je na proizvodnju PHA iz otpadne biomase, uključujući agroindustrijski otpad, što smanjuje troškove proizvodnje i pomaže u rješavanju problema zbrinjavanja takvog otpada. PHA polimeri imaju brojne prednosti, uključujući izvanrednu biokompatibilnost, biorazgradljivost, te dobra toplinska i mehanička svojstva. Sastoje se od esterske veze između karbonilne skupine jedne molekule i hidroksilne skupine druge molekule.⁷ PHA se mogu koristiti u plastičnim i gumenim proizvodima, biomedicinskim uređajima, lijekovima, kozmetici, tekstilu i odjeći. Međutim, visoka cijena PHA u usporedbi s konvencionalnim plastikama, poput polietilena i polipropilena, predstavlja značajan izazov. Naime, cijena PHA može biti 6–8 USD po kilogramu, dok cijena konvencionalnih plastika varira od 1–2 USD po kilogramu. Svojstva PHA mogu se dodatno poboljšati miješanjem s drugim polimerima, kao što su PLA, celuloza ili škrob.⁸ PLA (polilaktid) je biopolimer koji se sintetizira polimerizacijom mliječne kiseline, koja se dobiva fermentacijom biljnih izvora poput kukuruznog škroba ili šećerne trske. Ovaj polimer ima niz značajnih prednosti, među kojima se izdvaja visoka čvrstoća, biokompatibilnost i ekološka prihvatljivost. Međutim, njegova primjena ograničena je visokom cijenom u usporedbi s konvencionalnim plastikama. PLA se sastoji od dva stereoizomera mliječne kiseline: L-laktida i D-laktida, koji nastaju kao produkti aktivnosti mikroorganizama. Količina D-laktida u PLA utječe na njegovu strukturu i fizikalna svojstva. Ako je koncentracija D-laktida veća od 6 %, PLA postaje amorfan, dok pri manjoj koncentraciji od 6 % postaje polukristalni.⁹ Stupanj kristalizacije direktno utječe na temperaturu taljenja i mehaničku čvrstoću PLA. S povećanjem udjela D-izomera, temperatura taljenja PLA opada, što ima značajan utjecaj na njegova termička svojstva. Zbog svojih sličnosti u obradi i svojstvima s konvencionalnim plastikama, PLA se široko koristi u

industrijama poput pakiranja, 3D tiska i tekstilne industrije. PCL (polikaprolakton) je biorazgradljiv polimer koji se proizvodi iz fosilnih goriva. Zbog svoje hidrofobnosti, PCL se razgrađuje vrlo sporo, što može potrajati i do godinu dana.¹⁰ Ima nisko talište od oko 60 °C i nisku temperaturu staklenog prijelaza od oko -60 °C, a karakterizira ga visoka topljivost i stabilnost. PCL može imati i kristalnu i amorfnu strukturu, a omjer tih područja može se prilagoditi uvjetima polimerizacije. PCL s većim udjelom kristalnih regija ima veću vlačnu čvrstoću, dok PCL s većim udjelom amorfne regije pokazuje veću fleksibilnost i elastičnost. Također, PCL ima nižu gustoću u odnosu na druge polimere poput polipropilena i polietilena, što ga čini lakšim i jednostavnijim za rukovanje. Mikroorganizmi razgrađuju PCL u masne kiseline i karboksilne kiseline, ali stopa razgradnje PCL-a je sporija u odnosu na PLA. U normalnim uvjetima, može proći nekoliko godina da bi se PCL potpuno razgradio. Također, PCL pokazuje dobru kompatibilnost s različitim materijalima. Može se kombinirati sa škrobom kako bi se smanjili troškovi i poboljšala biorazgradljivost ili se koristi kao plastifikator za poli(vinil-klorid).¹¹

U ovom istraživanju ispitivana je biorazgradljivost polimernih materijala u tlu tijekom 56 dana. Uzorci su podvrgnuti FTIR-ATR analizama radi karakterizacije strukturalnih promjena, promatrani su polarizacijskim mikroskopom, a također je mjereno smanjenje mase materijala tijekom razgradnje.

2. Eksperimentalni dio

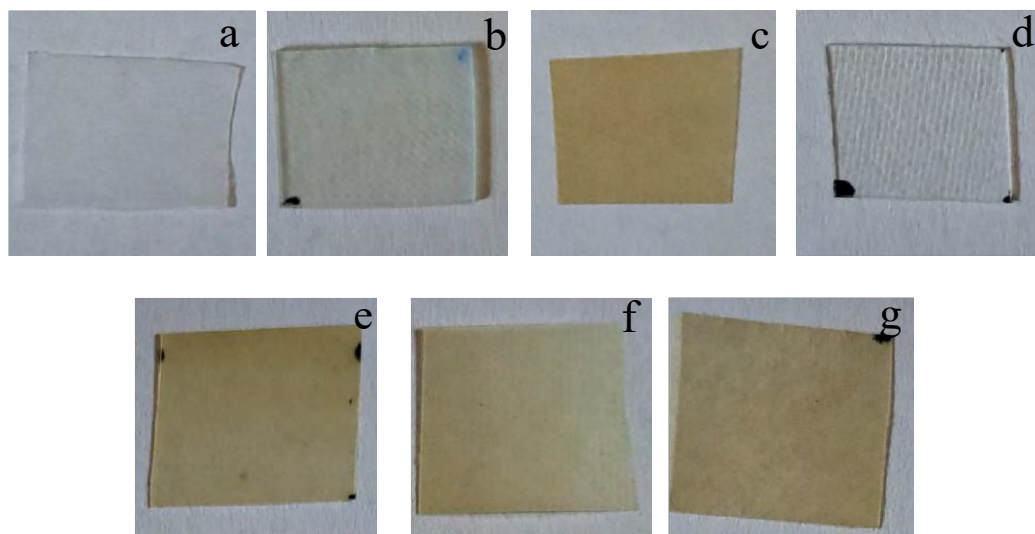
2.1. Materijali

Za izvođenje eksperimenta korišteni su različiti polimerni materijali, uključujući PCL, TPS, PHA, PLA, te njihove mješavine: PLA/PHA, PCL/PHA i PHA/TPS, pripremljene u omjeru 50:50. Suspenzija inokulirana u tlo sastojala se od bakterija *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, kvasca *Candida* sp. i plijesni *Aspergillus niger*. Svi navedeni mikroorganizmi pohranjeni su u Zavodu za industrijsku ekologiju, na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

2.2. Metode rada

2.2.1. Priprema biopolimernih mješavina

Biopolimeri i biopolimerne mješavine korišteni u eksperimentu pripremljeni su na Zavodu za inženjerstvo polimera i polimernih materijala, Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Za potrebe eksperimenta, polimerni filmovi su izrezani na dimenzije 1×1 cm, kako je prikazano u slici 1. Sastav polimera u masenom postotku naveden je u tablici 1.



Slika 1 - Filmovi pripremljenih uzoraka biopolimernih materijala za provedbu procesa biorazgradnje:

a) PCL, b) TPS, c) PHA, d) PLA, e) PLA/PHA (50:50), f) PCL/PHA (50:50), g) PHA/TPS (50:50)

Fig. 1 - Films of prepared biopolymer material for biodegradation process: a) PCL, b) TPS, c) PHA, d) PLA, e) PLA/PHA (50:50), f) PCL/PHA (50:50), g) PHA/TPS (50:50)

Tablica 1 - Sastav biopolimernih mješavina

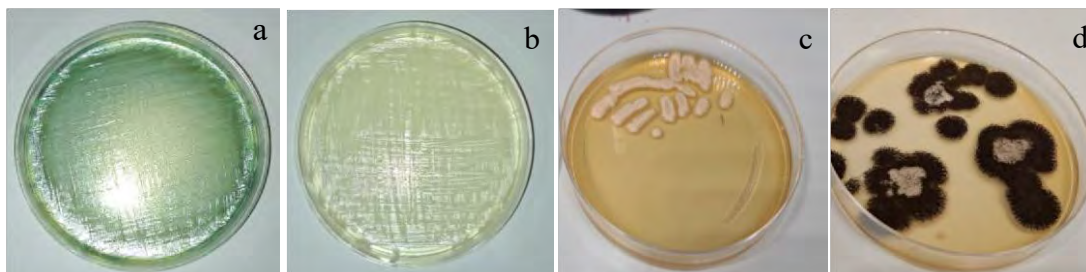
Table 1 - Composition of biopolymer blends

Uzorak	PCL, mas. %	TPS, mas. %	PHA, mas. %	PLA, mas. %
PCL	100	/	/	/
TPS	/	100	/	/
PHA	/	/	100	/
PLA	/	/	/	100
PLA/PHA	/	/	50	50
PCL/PHA	50	/	50	/
PHA/TPS	/	50	50	/

2.2.2. Biorazgradnja biopolimernih mješavina

Eksperimenti biorazgradnje biopolimernih materijala provedeni su u skladu s normama ISO 14855¹² i ASTM D5338¹³. Biorazgradnja biopolimera pratila se tijekom 56 dana na temperaturi od 58 ± 2 °C, pri čemu su uzorci biopolimera uzimani 7., 14., 28., 42. i 56. dana. Tlo korišteno za biorazgradnju obogaćeno je s 50 mL suspenzije mikroorganizama, koja je uključivala *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida* sp. i *Aspergillus niger*. Ovi su mikroorganizmi, prije postavljanja pokusa, uzgojeni na hranjivim podlogama, kako je prikazano na slici 2. Bakterije (*Pseudomonas aeruginosa* i *Bacillus subtilis*) uzgajane su na

hranjivom agaru na 37 °C tijekom 24 sata, dok su gljive (*Candida* sp. i *Aspergillus niger*) uzgajane na malt agaru tijekom tri dana na temperaturi od 28 °C.



Slika 2 - Mikroorganizmi uzgojeni na hranjivim podlogama: a) *Pseudomonas aeruginosa*, b) *Bacillus subtilis*, c) *Candida* sp. i d) *Aspergillus niger*

Fig. 2 - Microorganisms cultivated on nutrient media: a) *Pseudomonas aeruginosa*, b) *Bacillus subtilis*, c) *Candida* sp., and d) *Aspergillus niger*

U svaki reaktor dodano je 300 g tla, nakon čega su postavljeni uzorci biopolimera dimenzija 1×1 cm. Uzorci su pričvršćeni koncem i označeni papirnatim etiketama radi jednostavnijeg identificiranja i uklanjanja, a zatim su prekriveni s dodatnih 300 g tla. Prije smještanja reaktora u termostet na 58 °C, svi su reaktori prekriveni folijom kako bi se očuvala optimalna vlažnost. Tlo je svakodnevno ovlaživano deioniziranom vodom. Jednom tjedno, uzorci biopolimernih materijala pažljivo su uklonjeni iz reaktora kako bi se spriječilo njihovo oštećenje, te su fotografirani i analizirani svjetlosnim mikroskopom (Olympus BX50, Olympus Optical Co. Ltd., Japan). Nakon analize, uzorci su isprani 70 % etanolom i deioniziranom vodom radi uklanjanja organskih tvari i čestica tla, a potom su sušeni na zraku četiri dana prije vaganja. Nakon sušenja, određena je masa uzorka. Promjena mase izračunata je prema sljedećem izrazu:

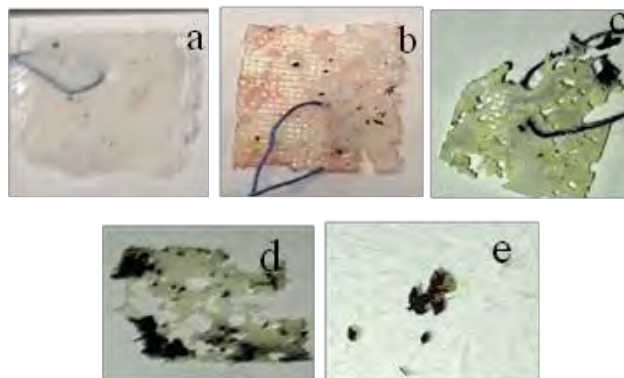
$$\Delta m, \% = (m_0 - m_k) / m_0 * 100 [\%] \quad (1)$$

gdje je Δm promjena mase, m_0 /g, masa prije biorazgradnje i m_k /g, masa poslije biorazgradnje. Na kraju eksperimenta, biopolimerni filmovi promatrani su pod polarizacijskim mikroskopom pri uvećanju od 50x (Olympus BX53M opremljen polarizacijskim modulom i kamerom Olympus SC50). Osim polarizacijskog mikroskopa, uzorci su analizirani FTIR-ATR spektroskopijom (IrTracer-100, Shimadzu), čime su omogućena precizna mjerenja strukturnih promjena biopolimernih materijala tijekom procesa biorazgradnje.

3. Rezultati i rasprava

3.1. Biorazgradnja biopolimera

Na slikama 3–9 prikazane su fotografije biopolimera tijekom 56-dnevnog procesa biorazgradnje u tlu. Na slici 3 prikazani su filmovi od PCL-a.

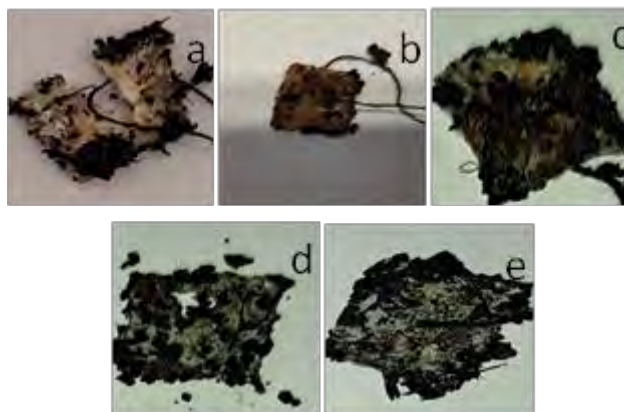


Slika 3 - Filmovi PCL-a u: a) 7., b) 14., c) 28., d) 42. i e) 56. danu biorazgradnje

Fig. 3 - PCL films at: a) day 7, b) day 14, c) day 28, d) day 42, and e) day 56 of biodegradation

Na temelju ovih fotografija može se uočiti da su već nakon 7 dana rubovi PCL-a postali nepravilniji. U 14. i 28. danu uočava se difuzija boje unutar strukture PCL-a te njegova postupna degradacija. Do značajne razgradnje PCL-a dolazi u 42. i 56. danu biorazgradnje.

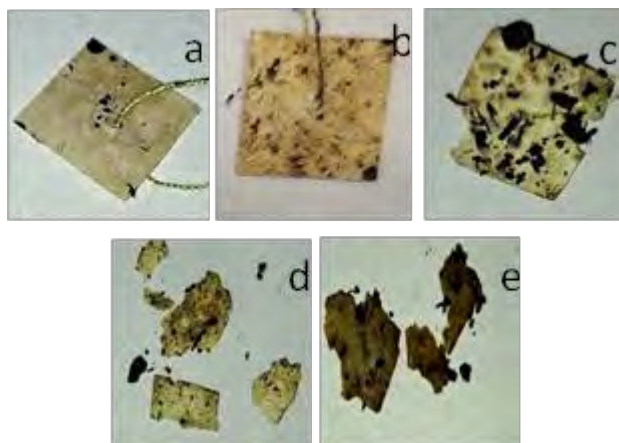
Na slici 4 prikazani su TPS filmovi tijekom 56-dnevnog procesa biorazgradnje u tlu. Već nakon 7 dana vidljivi su znakovi biorazgradnje u obliku narušavanja strukture i promjene boje polimera. U narednim danima, degradacija postaje sve intenzivnija, s očitijim promjenama iste vrste. Crne nakupine na biopolimeru predstavljaju zaostalo tlo koje nije bilo moguće ukloniti zbog vlage u uzorku. Morfologija biopolimera igra ključnu ulogu u brzini razgradnje, pri čemu amorfnost strukture TPS-a dodatno potiče njegovu biorazgradnju.¹⁴



Slika 4 - Filmovi TPS-a u: a) 7., b) 14., c) 28., d) 42. i e) 56. danu biorazgradnje

Fig. 4 - TPS films at: a) day 7, b) day 14, c) day 28, d) day 42, and e) day 56 of biodegradation

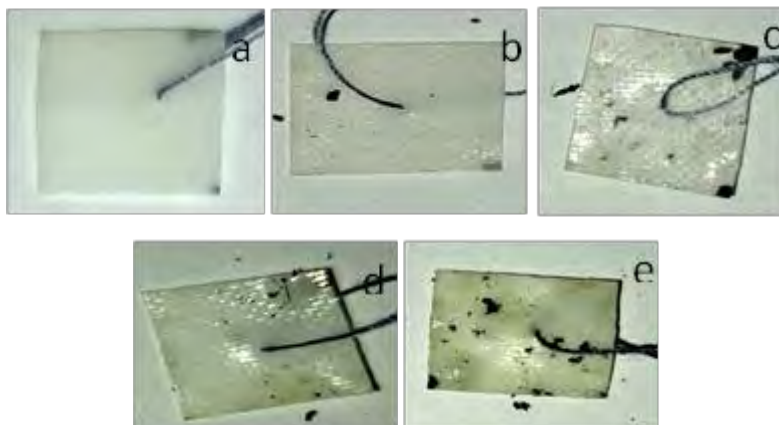
Na slici 5 prikazani su PHA filmovi nakon 56-dnevnog procesa biorazgradnje u tlu. Tijekom prvih 7 i 14 dana nisu zabilježene vidljive promjene u obliku pukotina ili promjene boje. Prva značajnija promjena opažena je nakon 28 dana, kada se uočava blago narušavanje površine polimera. Nakon 42. dana procesa vidljive su izraženije promjene PHA filmova, uz vidljivo oštećenje površinske strukture. Na temelju ovih rezultata može se zaključiti da se PHA relativno sporo razgrađuje u tlu, što se pripisuje krutosti biopolimernog materijala.¹⁵



Slika 5 - Filmovi PHA-a u: a) 7., b) 14., c) 28., d) 42. i e) 56. danu biorazgradnje

Fig. 5 - PHA films at: a) day 7, b) day 14, c) day 28, d) day 42, and e) day 56 of biodegradation

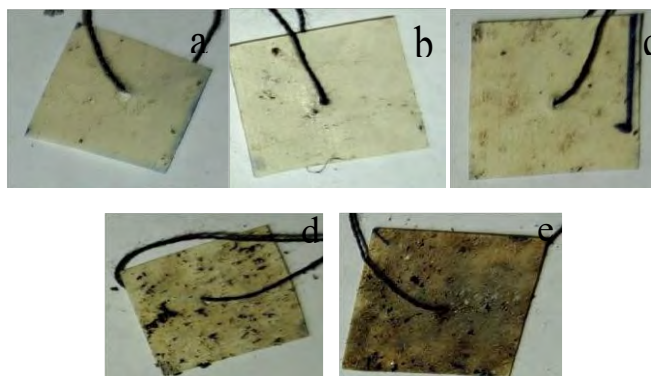
Na slici 6 prikazani su PLA filmovi tijekom 56-dnevnog procesa biorazgradnje u tlu. Tijekom prvih 7, 14 i 28 dana nisu uočene značajne promjene u strukturi biopolimera. Blage promjene u izgledu PLA filma postale su vidljive tek nakon 42 dana. Na temelju ovih rezultata može se zaključiti da je PLA izrazito sporo biorazgradljiv u tlu. Sporu razgradnju ovog materijala prvenstveno uzrokuje njegova kristalna struktura, koja materijalu daje visoku krutost i čvrstoću, značajno otežavajući prirodne procese razgradnje u okolišu.¹⁵



Slika 6 - Filmovi PLA-a u: a) 7., b) 14., c) 28., d) 42. i e) 56. danu biorazgradnje

Fig. 6 - PLA films at: a) day 7, b) day 14, c) day 28, d) day 42, and e) day 56 of biodegradation

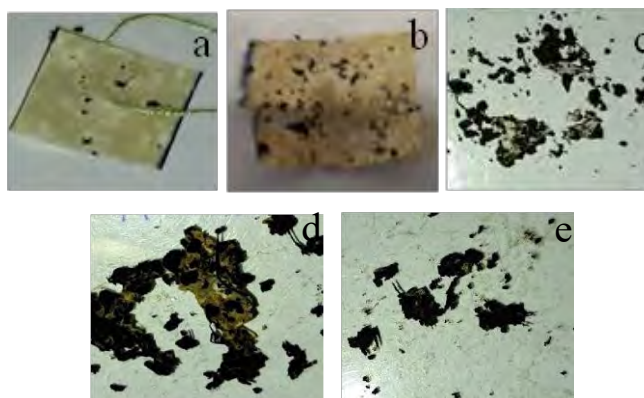
Na slici 7 prikazani su PLA/PHA filmovi tijekom 56-dnevnog procesa biorazgradnje u tlu. Tijekom prvih 7, 14, 28 i 42 dana nisu zabilježene značajne promjene, a biopolimer zadržava izgled gotovo identičan početnom stanju prije biorazgradnje. Tek nakon 56 dana uočava se blaga promjena boje, što ukazuje na početak razgradnje. Ovi rezultati sugeriraju da je PLA/PHA relativno otporan na biorazgradnju u usporedbi s prethodno analiziranim biopolimerima te da mu je potrebno dulje vrijeme za značajniju razgradnju.¹⁴



Slika 7 - Filmovi PLA/PHA-a u: a) 7., b) 14., c) 28., d) 42. i e) 56. danu biorazgradnje

Fig. 7 – PLA/PHA films at: a) day 7, b) day 14, c) day 28, d) day 42, and e) day 56 of biodegradation

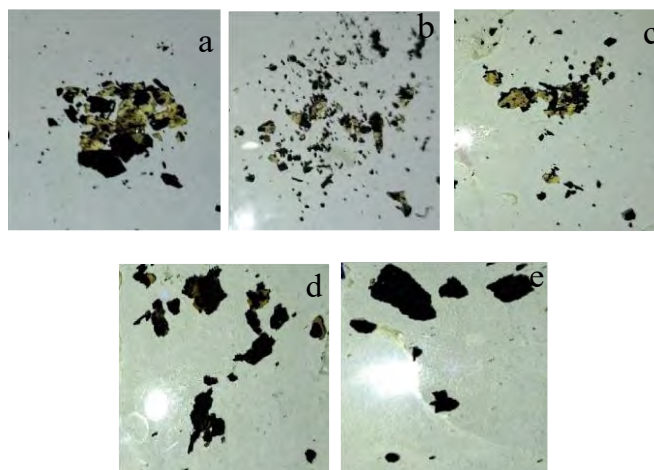
Na slici 8 prikazani su PCL/PHA filmovi tijekom 56-dnevnog procesa biorazgradnje u tlu. Već nakon 7 dana uočena je blaga promjena boje, dok su se nakon 14 dana počeli pojavljivati znakovi narušavanja strukture mješavine biopolimera, osobito izraženi na rubovima materijala. U razdoblju od 28., 42. i 56. dana zabilježena je značajna razgradnja, što se očituje u progresivnom raspadanju biopolimera.



Slika 8 - Filmovi PCL/PHA-a u: a) 7., b) 14., c) 28., d) 42. i e) 56. danu biorazgradnje

Fig. 8 – PCL/PHA films at: a) day 7, b) day 14, c) day 28, d) day 42, and e) day 56 of biodegradation

Na slici 9 prikazani su PHA/TPS filmovi tijekom 56-dnevnog procesa biorazgradnje u tlu. Već nakon prvih 7 dana uočeno je gotovo potpuno raspadanje mješavine biopolimera, a daljnji prikazi potvrđuju nastavak razgradnje tijekom cijelog razdoblja biorazgradnje. Ovi rezultati jasno ukazuju na vrlo brzu razgradnju PHA/TPS mješavine u tlu. Brzina razgradnje pripisuje se prisutnosti TPS-a, čija amorfnost značajno ubrzava proces biorazgradnje.¹⁵

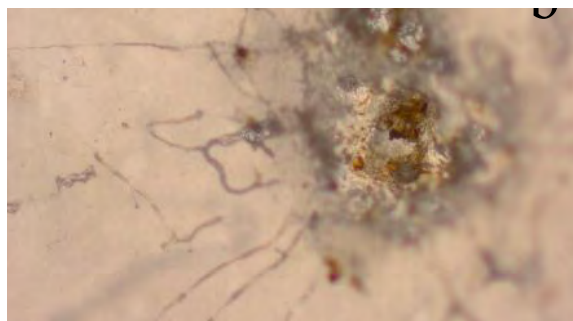


Slika 9 - Filmovi PHA/TPS-a u: a) 7., b) 14., c) 28., d) 42. i e) 56. danu biorazgradnje

Fig. 9 – PHA/TPS films at: a) day 7, b) day 14, c) day 28, d) day 42, and e) day 56 of biodegradation

3.2. Analiza površine biopolimera svjetlosnim i polarizacijskim mikroskopom

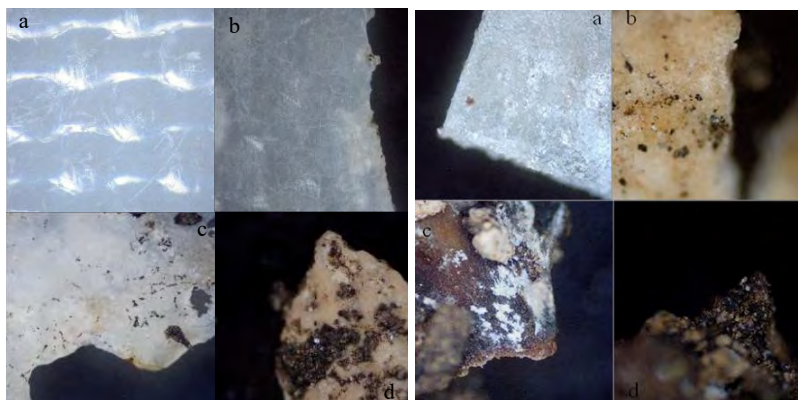
Mikroskopska analiza pomoću svjetlosnog mikroskopa provedena je prije uklanjanja organskih tvari s površine biopolimernih uzoraka. Cilj analize bio je uočiti formiranje biofilma na površini materijala. Formiranje biofilma predstavlja prvi i ključni korak u procesu biorazgradnje bioplastike u tlu, a njegova prisutnost smatra se izuzetno poželjnom za učinkovitu razgradnju biopolimera.¹⁶ Na slici 10 prikazan je biofilm stvoren na površini biopolimera PCL-a nakon 7 dana razgradnje.



Slika 10 - Prikaz formiranja biofilma na površini PCL-a nakon 7 dana biorazgradnje, snimljen optičkim mikroskopom pri povećanju od 100×

Fig. 10 - Depiction of biofilm formation on the surface of PCL after 7 days of biodegradation, captured using an optical microscope at 100× magnification

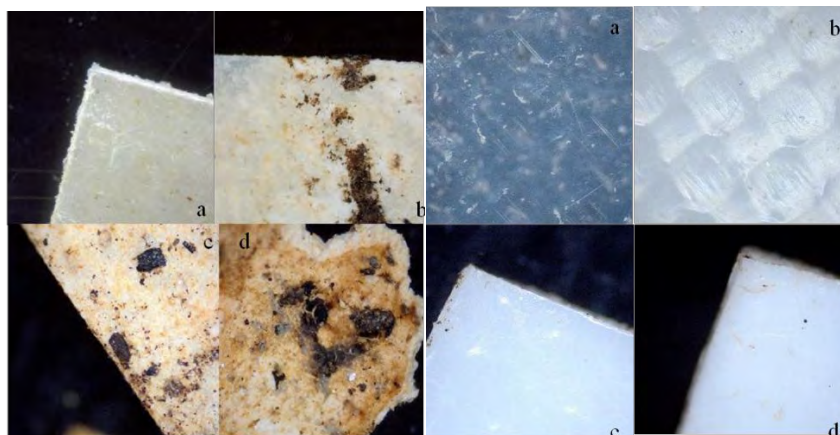
Nakon analize biopolimera svjetlosnim mikroskopom, organske nečistoće uklonjene su s površine uzoraka primjenom odgovarajućih postupaka, a površina biopolimera zatim je promatrana pod polarizacijskim mikroskopom. Polarizacijski mikroskop omogućio je precizniji uvid u strukturalne karakteristike površine biopolimera, uključujući eventualne kristalne ili amorfne regije. Na slikama 11 do 14 prikazane su mikroskopske slike ispitivanih biopolimera i njihovih mješavina nakon 7., 28. i 56. dana procesa biorazgradnje. Dobiveni rezultati potvrđuju zapažanja s makroskopskih slika opisanih u poglavlju 3.1. Konkretno, kod PCL-a i TPS-a (slika 11) uočena je pojava pukotina i nepravilnih rubova, što ukazuje na strukturna narušavanja biopolimera.



Slika 11 - Filmovi PCL-a (lijevo) i TPS-a (desno) u: a) 0., b) 7., c) 28. i d) 56. danu biorazgradnje slikano polarizacijskim mikroskopom, $P = 50\times$

Fig. 11 – PCL (left) and TPS (right) films at: a) 0, b) 7, c) 28, and d) 56 days of biodegradation, captured using a polarizing microscope, $P = 50\times$

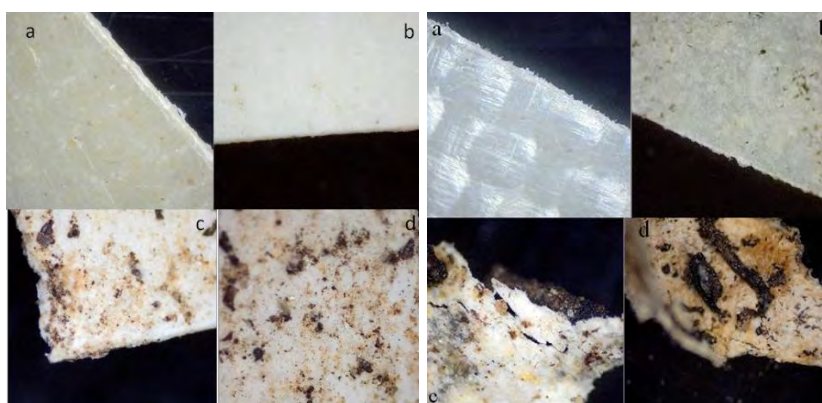
Ovi procesi povezani su sa smanjenjem molekulske mase biopolimera uslijed biorazgradnje.¹⁷ Na površini TPS-a vidljive su bijele naslage koje predstavljaju kolonije mikroorganizama. Ovi mikroorganizmi proizvode enzime sposobne razgraditi strukturu TPS-a, čime dodatno pridonose procesu biorazgradnje.¹⁸ Mikroskopske slike prikazane na slici 12 (lijevo) ukazuju na promjene na površini PHA biopolimera nakon 28 dana biorazgradnje, dok su značajnije promjene zabilježene nakon 56 dana, kada je došlo do narušavanja strukture materijala.



Slika 12 - Filmovi PHA-a (lijevo) i PLA-a (desno) u: a) 0., b) 7., c) 28. i d) 56. danu biorazgradnje slikano polarizacijskim mikroskopom, $P = 50\times$

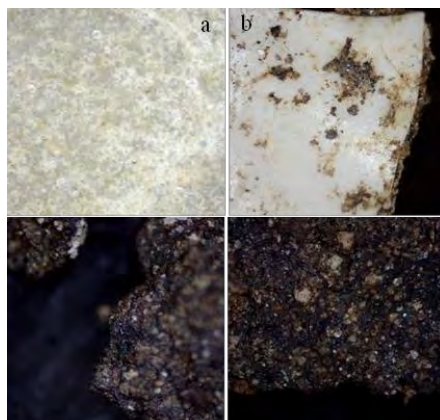
Fig. 12 – PHA (left) and PLA (right) films at: a) 0, b) 7, c) 28, and d) 56 days of biodegradation, captured using a polarizing microscope, $P = 50\times$

S druge strane, kod biopolimera PLA (slika 12 desno) i mješavine PLA/PHA (slika 13 lijevo) nisu uočene značajne promjene na površini uzoraka. To se pripisuje njihovoj kristalnoj strukturi, koja pruža visoku čvrstoću i otpornost na razgradnju u tlu.¹⁴ Za razliku od PLA/PHA mješavine, mješavine PCL/PHA (slika 13 desno) i PHA/TPS (slika 14) pokazale su brzo razgradnju u tlu. U oba slučaja, jasno je uočeno narušavanje strukture biopolimera.



Slika 13 - Filmovi PLA/PHA (lijevo) i PCL/PHA (desno) u: a) 0., b) 7., c) 28. i d) 56. danu biorazgradnje slikano polarizacijskim mikroskopom, $P = 50\times$

Fig. 13 – PLA/PHA (left) and PCL/PHA (right) films at: a) 0, b) 7, c) 28, and d) 56 days of biodegradation, captured using a polarizing microscope, $P = 50\times$



Slika 14 - Filmovi PHA/TPS u: a) 0., b) 7., c) 28. i d) 56. danu biorazgradnje
 slikano polarizacijskim mikroskopom, $P = 50\times$

Fig. 14 – PHA/TPS films at: a) 0, b) 7, c) 28, and d) 56 days of biodegradation,
 captured using a polarizing microscope, $P = 50\times$

3.3. Promjena mase biopolimera tijekom biorazgradnje

Nakon provedene analize svjetlosnim i polarizacijskim mikroskopom, uzorci biopolimera vagani su na analitičkoj vagi, a promjena mase izračunata je prema formuli 1. U tablici 2 prikazana je promjena mase ($\Delta m / \%$) svih ispitivanih uzoraka nakon 7., 14., 21., 28., 42. i 56. dana biorazgradnje. Na temelju promjene mase, rezultati ukazuju da uzorci koji sadrže PLA (PLA i PLA/PHA) pokazuju minimalne promjene mase tijekom procesa. To sugerira da se PLA vrlo sporo razgrađuje, što se može pripisati njegovoj kristalnoj strukturi koja otežava enzimima pristup hidrolizabilnim vezama. Nasuprot tome, kod ostalih biopolimera zabilježene su značajnije promjene mase, što ukazuje na narušavanje njihove strukture i smanjenje molekulske mase. Niža molekulska masa polimera olakšava proces biorazgradnje jer manji polimerni lanci pružaju veću površinu za interakciju s enzimima koji sudjeluju u razgradnji. To omogućuje brži pristup enzima hidrolizabilnim vezama, ubrzavajući proces. Suprotno tome, polimeri s visokom molekulskom masom mogu ograničiti dostupnost enzimskih aktivnih mjesta i otežati transport molekula u unutrašnjost polimera, čime se usporava proces biorazgradnje.¹⁹ Kod TPS-a je zabilježena značajnija promjena mase, što se pripisuje amorfnoj strukturi TPS-a, koja značajno ubrzava biorazgradnju.¹⁵ Analiza mase PHA-a pokazala je da je značajnija promjena mase nastupila nakon 42. dana, što je u skladu s prethodnim rezultatima koji ukazuju na relativno sporu razgradnju ovog biopolimera u početnim fazama biorazgradnje.

Tablica 2 - Promjena mase ispitivanih filmova biopolimera tijekom 56 dana biorazgradnje

Table 2 - The mass change of tested biopolymer films during 56 days of biodegradation

UZORAK	$\Delta m / \%$				
	7. dan	14. dan	28. dan	42. dan	56. dan
PCL	23,05	28,58	39,66	48,32	92,74
TPS	56,44	67,20	75,26	81,48	95,75
PHA	3,29	5,71	9,67	28,07	46,78
PLA	0,53	0,24	1,80	1,61	4,06
PLA/PHA	1,25	1,73	3,91	4,62	5,51
PCL/PHA	5,74	12,16	22,68	41,43	57,33
PHA/TPS	22,40	35,64	41,51	49,06	59,77

4. Zaključak

Na temelju provedenih analiza i dobivenih rezultata, zaključeno je da su svi ispitivani biopolimeri i njihove mješavine podložni razgradnji, pri čemu dinamika razgradnje varira ovisno o njihovim strukturnim svojstvima. Optička mikroskopija jasno pokazuje sporiju razgradnju kod biopolimera koji sadrže PLA i PHA, kao i njihovih mješavina (PLA/PHA), što se pripisuje visokoj kristalnosti i krutosti PLA te krutosti PHA, svojstvima koja značajno usporavaju proces biorazgradnje. Suprotno tome, polimeri s PCL-om i TPS-om pokazuju bržu razgradnju, što se može objasniti njihovim povoljnijim svojstvima, poput amorfne strukture TPS-a i elastičnosti PCL-a. Ovi rezultati potvrđeni su analizom smanjenja mase tijekom biorazgradnje, gdje su PCL i TPS zabilježili najveće gubitke mase, dok su PLA i PHA pokazali minimalne promjene, što dodatno ukazuje na njihovu otpornost na razgradnju. Istraživanje naglašava značaj biorazgradivih polimernih materijala, koji zbog svoje ekološke prihvatljivosti i biorazgradivosti predstavljaju održivo rješenje za smanjenje negativnog utjecaja plastike na okoliš. Ovi materijali mogu igrati ključnu ulogu u globalnim naporima za smanjenje plastičnog otpada i zaštitu okoliša.

ZAHVALA



Ovaj rad izrađen je u sklopu projekta *"Proizvodnja i razvoj kompostabilne ambalaže iz otpadne biomase za pakiranje industrijski prerađenih prehrambenih proizvoda"* (NPOO.C3.2.R3-II.04.0059), financiranog iz sredstva Nacionalnog plana oporavka i otpornosti (NextGenerationEU).

Popis kratica i simbola

PCL - polikaprolakton (*engl. policaprolactone*)

TPS - termoplastični škrob (*engl. thermoplastic starch*)

PHA – polihidroksialkanoat (*engl. polyhydroxyalkanoates*)

PLA - polilaktid (*engl. polylactide*)

Δm - gubitak mase (*engl. mass loss*)

Literatura

1. C. Kelly, A. Kirillova, E. Bachtar, K. Gall, 3 - Material science for 3D printing in medicine, u P. D. Highlander (ur.), Clinical applications of 3D printing in foot and ankle surgery. Vol. 1, Elsevier, Amsterdam, 2023, str. 25–50.
2. G. Bhat, V. Kandagor, 1 - Synthetic polymer fibers and their processing requirements, u D. Zhang (ur.), Advances in filament yarn spinning of textiles and polymers. Vol. 1, Woodhead Publ., Cambridge, 2014, str. 3–30.
3. URL: <https://www.britannica.com/technology/biodegradability> (15. 11. 2024.)
4. V. Ocelić Bulatović, E. Govorčin Bajsić, D. Kučić Grgić, A. Jozinović, Toplinska svojstva biorazgradljivih mješavina PLA/TPS, KUI **67** (2018) 33–42, doi: <https://doi.org/10.15255/KUI.2018.011>.
5. A. M. Nafchi, M. Moradpour, M. Saeidi, A. K. Alias, Thermoplastic starches: Properties, challenges, and prospects, Starch/Stärke **65** (2013) 61–72, doi: <https://doi.org/10.1002/star.201200201>.
6. A. V. Samrot, S. K. Samanvitha, N. Shobana, E. R. Renitta, P. Senthilkumar, S. S. Kumar, S. Abirami, S. Dhiva, M. Bavanilatha, P. Prakash, S. Saigeetha, K. S. Shree, R. Thirumurugan, The synthesis, characterization and applications of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and PHA-based nanoparticles, Polymers **13** (2021) 1–29, doi: <https://doi.org/10.3390/polym13193302>.
7. F. C. de Paula-Elias, C. B. C. de Paula, N. M. L. de Oliveira, A. F. de Almeida, J. Contieiro, Chapter 1 - Polyhydroxyalkanoates: naturally occurring microbial polymers suitable for nanotechnology applications, u B. Kharisov and O. Kharissova (ur.), Handbook of greener synthesis of nanomaterials and compounds. Vol. 2, Elsevier, Amsterdam, 2021, str. 3–20.

8. *A. Ashfaq, Z. Anjum, K. Younis*, Chapter 5 - Natural pigments-based biodegradable food packaging films, u S. U. Islam (ur.), *Renewable dyes and pigments*. Vol. 1, Elsevier, Amsterdam, 2023, str. 77–92.
9. *S. Teixeira, K. M. Eblagon, F. Miranda, M. F. R. Pereira, J. L. Figueiredo*, Towards controlled degradation of poly(lactid) acid in technical applications, *C* **7** (2021) 1–43, doi: <https://doi.org/10.3390/c7020042>.
10. *M. A. Mateos-Timoneda*, 8 - Polymers for bone repair, u J. A. Planell, S. M. Best, D. Lacroix, and A. Merolli (ur.), *Bone repair biomaterials*. Vol. 2, Woodhead Publ., Cambridge, 2009, 231–251.
11. *L. Averous, L. Moro, P. Dole, C. Fringant*, Properties of thermoplastic blends: starch–polycaprolactone, *Polym. J.* **41** (2000) 4157–4167, doi: [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(99\)00636-9](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(99)00636-9).
12. *ISO 14855-1*, Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials under controlled composting conditions — Method by analysis of evolved carbon dioxide — Part 1, International Organization for Standardization, Switzerland, Second Edition, 2012. <https://cdn.standards.iteh.ai/samples/57902/9a906f80fa7245a1b7f13c8576d308de/ISO-14855-1-2012.pdf>
13. *ASTM D5338 – 15*, Standard test method for determining aerobic biodegradation of plastic materials under controlled composting conditions, incorporating thermophilic temperatures, ASTM International, SAD, 2021. <https://cdn.standards.iteh.ai/samples/108135/78c217c0ea5b4c7a890b9d6cb0044310/ASTM-D5338-15-2021-.pdf>
14. *B. Palai, S. Mohanty, S. K. Nayak*, A comparison on biodegradation behaviour of polylactic acid (PLA) based blown films by incorporating thermoplasticized starch (TPS) and poly(butylene succinate-co-adipate) (PBSA) biopolymer in soil, *J. Environ. Polym. Degrad.* **29** (2021) 2772–2788, doi: <https://doi.org/10.1007/s10924-021-02055-z>.
15. *B. Ghanbarzadeh, H. Almasi*, Chapter 6 – Biodegradable polymers, u R. Chamy and F. Rosenkranz (ur.), *Biodegradation – Life of science*. Vol. 1, InTech, London, 2013, str. 141–185.
16. *V. M. Pathak, Navneet*, Review on the current status of polymer degradation: a microbial approach, *Bioresour. Bioprocess.* **4** (2017) 1–25, doi: <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0145-9>.

17. R. Gautam, A. S. Bassi, E. K. Yanful, E. Cullen, Biodegradation of automotive waste polyester polyurethane foam using *Pseudomonas chlororaphis* ATCC55729, Int. Biodeterior. Biodegradation. **60** (2007) 245–249, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.03.009>.
18. A. H. M. Zain, M. K. Ab Wahab, H. Ismail, Biodegradation Behaviour of Thermoplastic Starch: The Roles of Carboxylic Acids on Cassava Starch, J. Environ. Polym. Degrad. **26** (2017) 691–700, doi: <https://doi.org/10.1007/s10924-017-0978-5>.
19. R. R. A. Silva, C. S. Marques, T. R. Arruda, S. C. Teixeira, T. V. de Oliveira, Biodegradation of polymers: stages, measurement, standards and prospects, Macromol. **3** (2023) 371–399, doi: <https://doi.org/10.3390/macromol3020023>.

Identifikacija i probir bakterija sa sposobnošću razgradnje ugljikovodika u tlu

Identification and screening of hydrocarbon-degrading bacteria in soil

Marija Vuković Domanovac,^{a*} Barbara Bertović,^b Monika Šabić Runjavec^a

^a Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije,
Trg Marka Marulića 19, 10000 Zagreb, Hrvatska

^a University of Zagreb Faculty of Chemical Engineering and Technology,
Trg Marka Marulića 19, 10000 Zagreb, Croatia

^b Hrvatska banka za obnovu i razvitak, Trg Josipa Jurja Strossmayera 9,
10000 Zagreb, Hrvatska

^b Croatian Bank for Reconstruction and Development, Trg Josipa Jurja Strossmayera 9,
10000 Zagreb, Croatia

* Autor za dopisivanje: prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac, mvukovic@fkit.unizg.hr

Sažetak

Tlo je neobnovljiva sastavnica okoliša, ključna za sve oblike života na ovom planetu. Nafta je najčešće korišteno fosilno gorivo koje se sastoji od različitih ugljikovodika. Brzi rast industrijskih, poljoprivrednih i komunalnih aktivnosti, zajedno s globalnim rastom stanovništva, doveo je do velike potražnje za naftnim derivatima. Onečišćenje tla naftom iz različitih izvora narušava ekosustave, onečišćuje vodu, šteti ljudskom zdravlju i smanjuje poljoprivrednu proizvodnju. Tehnologija bioremedijacije prepoznata je kao učinkovita, sigurna i ekonomski prihvatljiva tehnika sanacije tla. Mikroorganizmi izloženi naftnom onečišćenju razvili su mehanizme prilagodbe kako bi preživjeli u stresnom okruženju te učinkovito razgradili onečišćenje. Izolacijom specifičnih mikrobnih kultura koje imaju sposobnost razgradnje naftnih ugljikovodika može se povećati učinkovitost biorazgradnje. Među mikroorganizmima koji iskorištavaju naftne ugljikovodike, bakterije se smatraju najaktivnijima i najvažnijima. U ovom radu u uzorcima tla (T1 i T2) onečišćenih naftom praćena je brojnost bakterijskih kultura preko ukupnog broja živih stanica (eng. CFU-Colony Forming Units) i određivana je pH-vrijednost u periodu od 28 dana. Identifikacija i probir bakterijskih kultura proveden je na selektiranim izolatima. Karakterizacija bakterijskih izolata je provedena mikrobiološkim i MALDI-TOF analizama. Rezultati pokazuju da je u tlima onečišćenima naftom prisutna mikrobna zajednica iz rodova

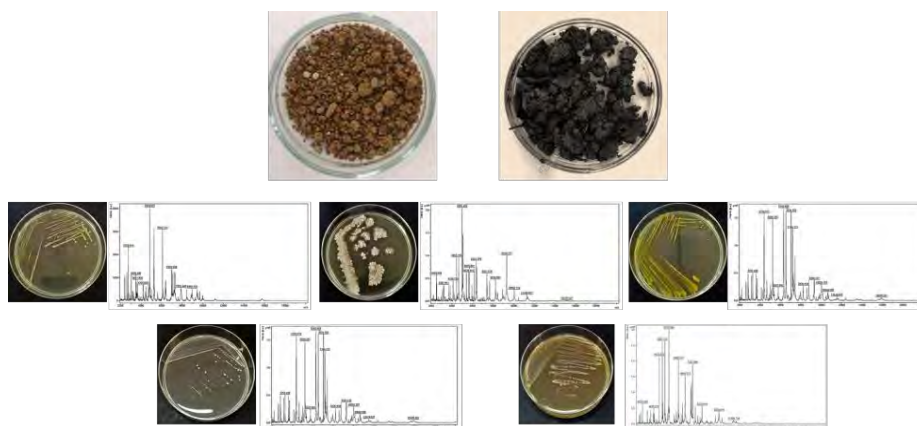
Lysobacter, *Bacillus*, *Cupriavidus*, *Pseudomonas* i *Novosphingobium*. Identifikacija i probir bakterija sa sposobnošću razgradnje ugljikovodika predstavljaju obećavajuće rješenje za poboljšanje učinkovitosti i održivosti bioremedijacije.

Ključne riječi: naftno onečišćenje, tlo, identifikacija, probir, bakterijski izolati

Abstract

Soil is a non-renewable component of the environment and is essential for all life forms on this planet. Oil is the most commonly used fossil fuel, consisting of various hydrocarbons. The rapid increase in industrial, agricultural and municipal activities, together with global population growth, has led to a high demand for petroleum products. Soil contamination by oil from various sources disrupts ecosystems, contaminates water, harms human health and reduces agricultural productivity. Bioremediation technology is recognized as an effective, safe and economical soil remediation technique. Microorganisms exposed to oil contamination have developed adaptive mechanisms to survive in a stressful environment and achieve high biodegradation rates. By isolating specific microbial cultures that can degrade petroleum hydrocarbons, the efficiency of biodegradation can be increased. Among the microorganisms that utilise petroleum hydrocarbons, bacteria are considered to be the most active and important. In this study, the number of bacterial cultures was monitored by colony forming units (CFU) in oil-contaminated soil samples (T1 and T2) and the pH-value was determined over a period of 28 days. The identification and screening of bacterial cultures was carried out on selected isolates. The bacterial isolates were characterized by microbiological and MALDI-TOF analyses. The results showed that a microbial community from the genera *Lysobacter*, *Bacillus*, *Cupriavidus*, *Pseudomonas* and *Novosphingobium* was present in oil-contaminated soils. The identification and screening of hydrocarbon-degrading bacteria is a promising solution to improve the effectiveness and sustainability of bioremediation.

Key words: oil contamination, soil, identification, screening, bacterial isolates



1. Uvod

Intenzivan industrijski razvoj te eksponencijalni rast stanovništva doveli su do globalnog povećanja potrebe za energijom. Usprkos naporima da se konvencionalna fosilna goriva zamjene održivim izvorima energije, danas su nafta i naftni proizvodi još uvijek jedni od dominantnih izvora.¹ Uz neosporan negativan utjecaj na klimatske promjene, eksploatacija, prerada i korištenje nafte negativno utječu i na ostale sastavnice okoliša, ponajviše na tlo i podzemne vode.² Brojne gospodarske, ekološke i sociološke funkcije tla neophodne su za život kakav poznajemo, stoga je važno očuvanje ovog izrazito važnog neobnovljivog resursa.³ Do onečišćenja tala naftom i naftnim proizvodima može doći u različitim djelatnostima i industrijama, a posebice u naftnoj industriji.⁴ Tlo onečišćeno naftnim ugljikovodicima doprinosi nestajanju staništa i ekosustava, onečišćenju podzemnih voda, smanjenju površina za poljoprivrednu proizvodnju, degradaciji tla te ima negativan utjecaj na zdravlje čovjeka.^{2,3,5} Danas postoje brojne remedijacijske tehnologije čiji je cilj vraćanje onečišćenih lokacija u stanje prije onečišćenja.⁶ Postupak bioremedijacije istaknuo se kao siguran za okoliš, učinkovit i ekonomski prihvatljiv u sanaciji onečišćenog tla.² Bioremedijacija tla temelji se na metaboličkim sposobnostima mikroorganizama koji mogu transformirati i biološki razgraditi onečišćenje u okolišu.⁷ Nafta je složena smjesa raznovrsnih spojeva koji različito podliježu biorazgradnji.^{8,9} Mikroorganizmi učinkovitije i brže razgrađuju ugljikovodike s jednostavnom strukturom i manjom molekulskom masom, dok su ugljikovodici s kompleksnijom strukturom, kao što su policiklički aromatski ugljikovodici s četiri ili pet prstena, teže biorazgradivi pa je za učinkovitu bioremedijaciju potreban raznolik i brojna mikrobni konzorciji s različitim bakterijskim sojevima i enzimima.^{7,10} Bioremedijacija se provodi bioaugmentacijom tla ciljanim sojevima sa sposobnošću razgradnje onečišćenja, u obliku komercijalno dostupnih bakterijskih preparata ili autohtonim bakterijskim sojevima izoliranim iz naftom onečišćenog tla.¹¹⁻¹⁴ Iako onečišćenje tla naftom uništava staništa i ekosustave te predstavlja stresne uvjete za biljke, životinje te mikrobnu zajednicu prirodno razvijenu u tlu, određeni mikroorganizmi razvili su mehanizme prilagodbe na novonastale uvjete te učinkovito preživljavaju u okolišu onečišćenom naftnim ugljikovodicima.^{7,10} Mikrobna zajednica ima potencijal za učinkovitu razgradnju onečišćenja putem svojih metaboličkih procesa u svrhu iskorištenja kao izvora energije za rast i razvoj.⁴ Stoga nakon početnih stresnih uvjeta i smanjenja mikrobne zajednice uslijed onečišćenja, u tlu započinje oporavak i povećanje brojnosti specifičnih mikroorganizama. Zbog mogućnosti preživljavanja u stresnom okolišu te zbog visoke

učinkovitosti u biorazgradnji onečišćenja, upravo bakterijski sojevi prirodno prisutni u tla onečišćenom naftnim ugljikovodicima predstavljaju potencijal za učinkovitu bioremedijaciju. Bioremedijacija tla kompleksan je proces u kojem dolazi do interakcije mikroorganizama, tla i onečišćenja, stoga je za učinkovito pročišćavanje, uz neophodnu mikrobnu zajednicu, potrebno osigurati i niz drugih okolišnih faktora kao što su aerobni uvjeti, dostupnost onečišćenja mikroorganizmima, hranjive tvari, optimalna vlažnost, temperatura te pH-vrijednost.^{1,7}

U ovom radu provedena je identifikacija i probir bakterijskih kultura izoliranih iz naftom onečišćenog tla, a u svrhu potencijalne buduće primjene u bioremedijaciji.

2. Eksperimentalni dio

2.1. Tlo

U radu su korištena dva realna uzorka tla onečišćena naftnim ugljikovodicima, označena T1 i T2, dobivena od hrvatske tvrtke specijalizirane za gospodarenje otpadom i zaštitu okoliša. Uzorkovano je po 2 kg reprezentativnog uzorka tla koji su pohranjeni u plastične boce i čuvani pri temperaturi od 4 °C do početka eksperimenta.¹⁵ Uzorak tla T1 je slabo vezani glinoviti silt, tamnosmeđe boje i izražajnog mirisa naftnih ugljikovodika. Uzorak tla T2 je siltni pijesak, srednje plastičnosti i srednje konzistencije, smeđe-crvene boje i bez izražajnog ugljikovodičnog mirisa.

2.2. Mikrobiološka i MALDI-TOF analiza

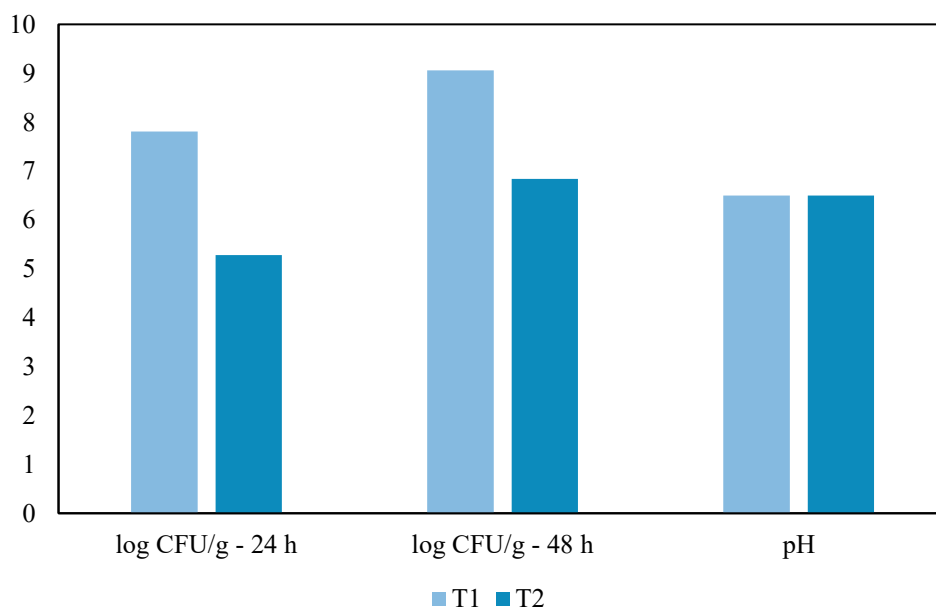
Mikrobiološka analiza tla onečišćenog sirovom naftom provedena je pripravom suspenzije u Erlenmeyerovoj tikvici od 300 mL sa šlifom koja je sadržavala 15 g onečišćenog dobro homogeniziranog tla i 135 mL mineralnog medija.¹⁶ Eksperiment je proveden na rotacijskoj tresilici (Heidolph unimax 1010, Heidolph inkubator 1000, Njemačka) pri 150 o min⁻¹ i temperaturi od 25 °C u periodu od 28 dana. Kako bi se osigurali aerobni uvjeti jednom dnevno se Erlenmeyerova tikvica miješala 2 sata pri 180 o min⁻¹ bez šlifa. U uzorku suspenzije provedeno je neizravno određivanje ukupnog broja živih stanica (CFU)¹⁷ i pH-vrijednosti (pH elektroda Sentix® 940, WTW, Multi 3430, Njemačka). Nacijepljene Petrijeve zdjelice s hranjivim agarom (Biolife) stavljene su na inkubaciju pri 37 °C tijekom 24–48 h. Za pročišćene i izolirane kulture provedeno je bojanje po Gramu i Schaeffer-Fulton te su provedena morfološka karakterizacija (Olympus BX50, ZEN Blue 2.5; Tokyo, Japan) i biokemijski testovi pomoću API 20E i API 50CH (BioMérieux, North Ryde, NSW, Australia).¹⁷

Identifikacija bakterijskih izolata provedena je MALDI-TOF masenom spektrometrijom. Na MALDI metu je nanesen uzorak (pojedinačna kolonija bakterijske monokulture) i na njega je stavljena matrica (otopina α -cijano-4-hidroksicimetne kiseline u 50 % acetonitrila i 2,5 % trifluorooctene kiseline). Bakterije su identificirane primjenom MALDI-TOF spektrometrije masa koristeći Microflex LT spektrometar masa i MALDI Biotyper Compass HT 5.1 računalni program.

3. Rezultati i rasprava

3.1. Mikrobiološka i MALDI-TOF analiza

Tijekom eksperimenta u uzorcima tla (T1 i T2) onečišćenih naftnim ugljikovodicima praćena je brojnost bakterijskih kultura preko ukupnog broja živih stanica (CFU) i određivana je pH-vrijednost (slika 1).



Slika 1 – Rezultati analize ukupnog broja živih stanica (CFU) nakon 24 h i 48 h inkubacije i pH-vrijednost ispitivanog sustava

Fig. 1 – Results of the analysis of the total number of viable cells after 24 h and 48 h of incubation and the pH value of the tested system

Rezultati pokazuju da je u 24. i 48. satu log CFU g⁻¹ iznosio 7,81 i 9,06 te 5,81 i 6,84 za T1 i T2. Navedene vrijednosti ukazuju da se broj bakterijskih kultura povećao u oba uzorka u

prosijeku za 14,5 %. Brojnost bakterijske populacije u onečišćenom tlu dokaz je prilagodbe bakterijskih kultura i ukazuje na njihovu sposobnost metaboliziranja prisutnog onečišćenja.^{18,19} Za rast i razmnožavanje većine heterotrofnih bakterija optimalna vrijednost pH kreće se između 6,0 i 8,0.²⁰ U oba eksperimenta vrijednost pH iznosila je 6,5 što odgovara optimalnim okolišnim uvjetima za učinkovitu bioremedijaciju.¹ Izolati koji su učinkovito preživljavali na naftnom supstratu tijekom 28 dana eksperimenta odabrani su za daljnje morfološke i biokemijske testove i identifikaciju. U tablici 1 prikazani su rezultati 9 bakterijskih izolata prema morfološkim karakteristikama kolonija i karakteristikama stanica. Određivanje morfologije kolonija jedan je od početnih koraka u identifikaciji i karakterizaciji mikroorganizama. Nadalje, rezultati pokretljivosti te postupka bojanja po Gramu i Schaeffer-Fulton u važni su za dobivanje dodatnih informacija o karakteristikama stanica s ciljem pblize identifikacije istraživanih mikroorganizama.

Tablica 1 – Rezultati morfoloških analiza bakterijskih izolata

Table 1 – Results of morphological analysis of the isolates

Uzorak tla	Izolat	KARAKTERISTIKE KOLONIJA		KARAKTERISTIKE STANICA		
		Boja	Morfološki izgled kolonija	Pokretljivost	Bojanje po gramu	Bojanje po Schaeffer-Fulton
T1	A1	mliječno bijela	okrugle, pravilnog ruba, srednje veličine	+	G+	sporogene
	B1	mliječno bijela	okrugle, nepravilnog ruba	+	G-	nesporogene
T2	A2	mliječno žuta	blago ispupčene, okrugle, pravilnog ruba	-	G-	nesporogene
	B2	mliječno bijela	ispupčene, okrugle, pravilnog ruba	+	G-	nesporogene
	C2	žuta boja	okrugle, pravilnog ruba	+	G-	nesporogene

S ciljem daljnje identifikacije proveden je niz biokemijskih testova čiji su rezultati prikazani u tablici 2. Svi izolati pozitivni su na katalaza test što ukazuje da sadrže enzim katalazu. Osim što je ključan za zaštitu stanice, enzim katalaza proizvodi vodu i kisik koji su neophodni za metabolizam aerobnih mikroorganizama i biorazgradnju onečišćenja.²¹ Većina izolata (B1–C2) pozitivna je na enzim oksidazu koji je važan za implementaciju atmosferskog kisika kao elektron akceptora u metabolizmu mikroorganizama. Upravo je aktivacija i uvođenje kisika prvi korak u razgradnji naftnog onečišćenja u okolišu.¹⁸ Enzim nitratna reduktaza ima ulogu u procesu denitrifikacije, a pozitivan je za izolate A2 i B2.²² Ispitivanje enzima β -galaktozidaze hidrolizom supstrata o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozida ključan je i za hidrolizu laktoze u reakcijama sinteze galakto-

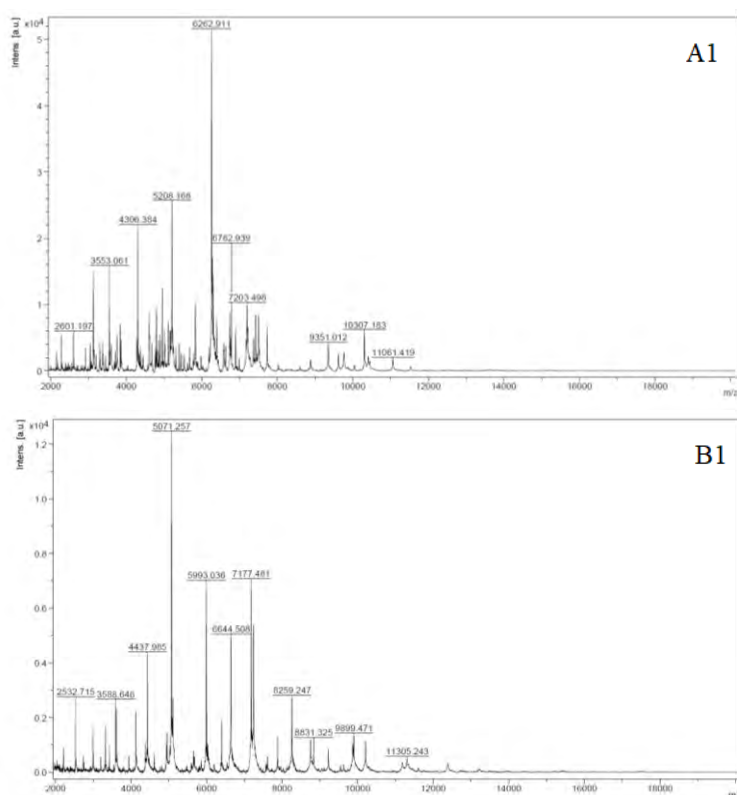
oligosaharida, a dobiven je pozitivan rezultat za izolate A1 i C2.²³ Izolat A1 pozitivan je na testove celobioza i maltoza, a koji ukazuju na fermentaciju celobioze i hidrolizu maltoze pomoću enzima maltaze kod bakterija roda *Bacillus*.^{24,25} Test nastajanja acetoina, koji je bitan za mikrobnu fermentaciju i metaboličke procese pozitivan je kod svih 5 izolata.²⁶ Izolati A1 i A2 sadrže želatinazu, koja omogućuje mikroorganizmima razgradnju želatine na manje polipeptide, peptide i aminokiseline koje mogu proći kroz staničnu membranu.²⁷

Tablica 2 – Rezultati biokemijskih analiza izolata

Table 2 – Results of biochemical analysis of the isolates

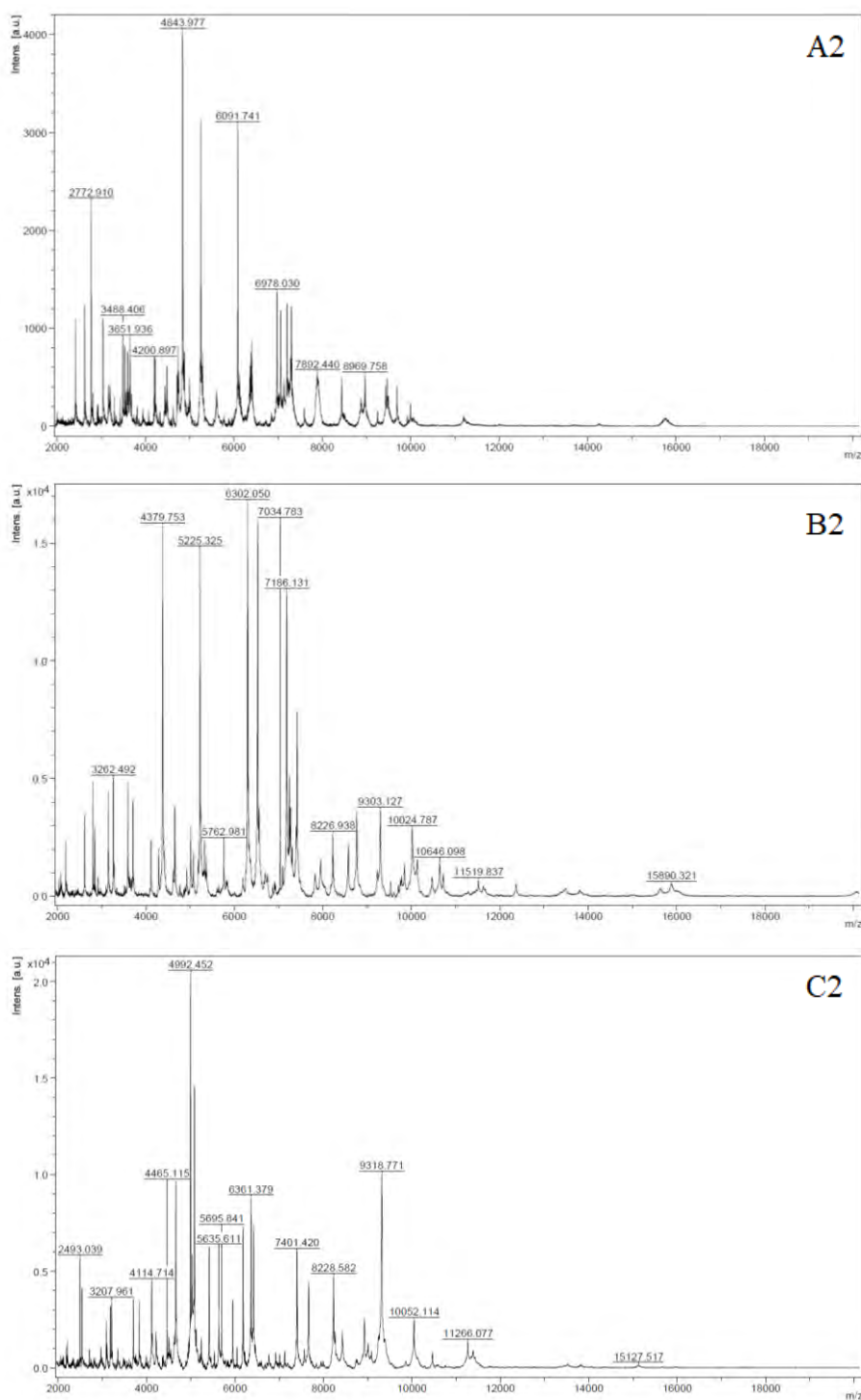
Uzorak tla	Izolat	Katalaza	Oksidaza	Nitratna reduktaza	β-galaktozidaza	Celobioza	Maltoza	Nastajanje acetoina	Želatinaza
T1	A1	+	-	-	+	+	+	+	+
	B1	+	+	-	-	/	/	+	-
	A2	+	+	+	-	/	/	+	+
T2	B2	+	+	+	-	/	/	+	-
	C2	+	+	-	+	/	/	+	-

pozitivan test (+); negativan test (-); test nije proveden (/)



Slika 2a – Maseni spektri analiziranih bakterijskih izolata dobivenih MALDI-TOF analizom za T1

Fig. 2a – Mass spectra of analysed bacterial isolates by MALDI- TOF analysis for T1



Slika 2b – Maseni spektri analiziranih bakterijskih izolata dobivenih MALDI-TOF analizom za T2

Fig. 2b – Mass spectra of analysed bacterial isolates by MALDI- TOF analysis for T2

MALDI-TOF analizom dobivena je konačna identifikacija mikroorganizama. Kao rezultat analize dobiveni su spektri koji su karakteristični za određene mikroorganizme (slike 2a i 2b). Izlazna vrijednost MALDI Biotypera, izračunata usporedbom referentnog spektra u bazi i spektra dobivenog za ispitivani nepoznati uzorak je vrijednost logaritamskog zapisa ($\log(\text{score})$) koja se kreće u rasponu 0,00–3,00 i predstavlja vjerojatnost ispravne identifikacije uzorka. Kako je prikazano slikom 2a., izolat A1 identificiran je kao bakterija iz roda *Bacillus* s rezultatom vrijednosti logaritamskog zapisa 2,03 koja predstavlja visoku pouzdanost identifikacije. Izolat B1 je bakterija iz roda *Pseudomonas* s vrijednosti logaritamskog zapisa 1,98 uz nisku pouzdanost identifikacije. Prema masenim spektrima na slici 2b, izolat A2 je identificiran kao bakterija iz roda *Lysobacter*, pri čemu $\log(\text{score})$ iznosi 1,99, a sama vrijednost predstavlja nisku pouzdanost identifikacije. Izolat B2 je bakterija iz roda *Cupriavidus* pri čemu $\log(\text{score})$ iznosi 2,09 što predstavlja visoku pouzdanost identifikacije, dok je izolat C2 identificiran kao bakterija iz roda *Novosphingobium*, uz logaritamsku vrijednost 2,03 (visoka pouzdanost identifikacije).

4. Zaključak

Iz tla onečišćenog naftnim ugljikovodicima izolirane su prirodno prisutne bakterijske kulture. Probir specifičnih izolata s potencijalom za buduću primjenu u bioremedijaciji napravljen je temeljem provedenih mikrobioloških, morfoloških i biokemijskih testova. Biokemijski testovi imaju ključnu ulogu u određivanju prisutnosti specifičnih enzima koje proizvode mikroorganizmi, a koji imaju značajnu ulogu u biorazgradnji ugljikovodika. Identificirani izolati su iz rodova *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Lysobacter*, *Cupriavidus* i *Novosphingobium* sa sposobnošću preživljavanja u tlu onečišćenom naftnim ugljikovodicima. Sadržaj širokog spektra enzima ove izolate čini resursom za povećanje učinkovitosti procesa bioremedijacije.

Literatura

1. Z. S. Aziz, S. H. Jazza, H. N. Dageem, S. R. Banoon, B. A. Balboul, M. A. Abdelzaher, Bacterial biodegradation of oil-contaminated soil for pollutant abatement contributing to achieve sustainable development goals: A comprehensive review, Results Eng. **22** (2024) 102083, doi: <https://doi.org/10.1016/j.rineng.2024.102083>.

2. *I. C. Ossai, A. Ahmed, A. Hassan, F. S. Hamid*, Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review, *Environ. Technol. Innov.* **17** (2020) 100526, doi: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100526>.
3. *J. Lehmann, D. A. Bossio, I. Kögel-Knabner, M. C. Rillig*, The concept and future prospects of soil health, *Nat. Rev. Earth. Environ.* **1** (2020) 544–553, doi: <https://doi.org/10.1038/s43017>.
4. *E. Pandolfo, A. Barra Caracciolo, L. Rolando*, Recent Advances in Bacterial Degradation of Hydrocarbons, *Water* **15** (2023) 375, doi: <https://doi.org/10.3390/w15020375>.
5. *J. Clunes, S. Valle, J. Dörner, O. Martínez, D. Pinochet, F. Zúñiga, W. E. H. Blum*, Soil fragility: A concept to ensure a sustainable use of soils, *Ecol. Indic.* **139** (2022) 108969, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.108969>.
6. *M. W. Lim, E. Von Lau, P. E. Poh*, A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil – Present works and future directions, *Mar. Pollut. Bull.* **109** (2016) 14–45, doi: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.04.023>.
7. *M. Vidali*, Bioremediation. An Overview, *Pure Appl. Chem.* **73** (2001) 1163–1172.
8. *F. A. Al-Dhabaan*, Morphological, biochemical and molecular identification of petroleum hydrocarbons biodegradation bacteria isolated from oil polluted soil in Dhahran, Saud Arabia. *Saudi J. Biol. Sci.* **26** (2019) 1247–1252, doi: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.05.029>.
9. *X. Sui, X. Wang, Y. Li, H. Ji*, Remediation of petroleum-contaminated soils with microbial and microbial combined methods: Advances, mechanisms and challenges, *Sustainability* **13** (2021), 9267, doi: <https://doi.org/10.3390/su13169267>.
10. *S. J. Varjani*, Microbial degradation of petroleum hydrocarbons, *Bioresour. Technol.* **223** (2017) 277–286, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>.
11. *C. Li, C. Cui, J. Zhang, J. Shen, B. He, Y. Long, J. Ye*, Biodegradation of petroleum hydrocarbons based pollutants in contaminated soil by exogenous effective microorganisms and indigenous microbiome, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **253** (2023) 114373, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114673>.

12. *M. T. Bidja Abena, T. Li, M. N. Shah, W. Zhong*, Biodegradation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in highly contaminated soils by natural attenuation and bioaugmentation, *Chemosphere* **234** (2019) 864–874, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.111>.
13. *S. J. Varjani, V. N. Upasani, A. Pandey*, Bioremediation of oily sludge polluted soil employing a novel strain of *Pseudomonas aeruginosa* and phytotoxicity of petroleum hydrocarbons for seed germination, *Sci. Total Environ.* **737** (2020) 139766, doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139766>.
14. *J. Xu, L. Xu, X. Qiao, Y. Zheng, Y. Xie, Z. Yang*, Stimulated biodegradation of all alkanes in soil, *Chemosphere* **278** (2021) 130444, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130444>.
15. EN ISO 18400-101:2017, Soil Quality – Sampling – Part 101: Framework for the Preparation and Application of a Sampling Plan.
16. APHA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, APHA. Washington, DC, USA, 2012.
17. *M. J. Leboffe, B. E. Pierce*, Microbiology: Laboratory Theory and Application. Morton Publishing Company, Englewood, 2012, str. 125–203, str. 237–363.
18. *E. Koshlaf, A. S. Ball*, Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments, *AIMS Microbiol.* **3** (2017) 25–49, doi: <https://doi.org/10.3934/MICROBIOL.2017.1.25>.
19. *M. Łebkowska, E. Zborowska, E. Karwowska, E. Miaskiewicz-Peska, A. Muszynski, A. Tabernacka, J. Naumczyk, M. Jeczalik*, Bioremediation of soil polluted with fuels by sequential multiple injection of native microorganisms: Field-scale processes in Poland, *Ecol Eng.* **37** (2011) 1895–1900, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2011.06.047>.
20. *M. Ullah*, Biodegradation of petroleum hydrocarbons and the factors effecting rate of biodegradation, *Am. J. Biomed. Sci. Res.* **16** (2022) 6–15, doi: <https://doi.org/10.34297/ajbsr.2022.16.002182>.
21. *J. Kaushal, S. Mehandia, G. Singh, A. Raina, S. K. Arya*, Catalase enzyme: Application in bioremediation and food industry. *Biocatal Agric Biotechnol.* **16** (2018) 192–199, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.07.035>.

22. D. Grgas, T. Štefanac, M. Galant, A. Brozinčević, A. Štrkalj, T. L. Dragičević, Biološka denitrifikacija, Croat. J. Food Technol. **16** (2021) 28–34, doi: <https://doi.org/10.31895/hcptbn.16.1-2.4>.
23. N. Sharma, N. Sharma, S. Sharma, P. Shrama, B. Devi, Identification, morphological, biochemical, and genetic characterization of microorganisms, u: A. K. Bhatt, R. K. Bhatia, T. C. Bhalla, Basic Biotechniques for Bioprocess and Bioentrepreneurship, Academic Press **3** (2023) 47–84.
24. Z. Zheng, T. Jiang, L. Zou, S. Ouyang, J. Zhou, X. Lin, Q. He, L. Wang, B. Yu, H. Xu, J. Ouyang, Simultaneous consumption of cellobiose and xylose by *Bacillus coagulans* to circumvent glucose repression and identification of its cellobiose-assimilating operons, Biotechnol. Biofuels **11** (2018) 320, doi: <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1323-5>.
25. S. Schönert, S. Seitz, H. Krafft, E.-A. Feuerbaum, I. Andernach, G. Witz, M.K. Dahl, Maltose and maltodextrin utilization by *Bacillus subtilis*, J. Bacteriol. **188** (2006) 3911–3922, doi: <https://doi.org/10.1128/JB.00213-06>.
26. Q. Wang, X. Zhang, K. Ren, R. Han, R. Lu, T. Bao, X. Pan, T. Yang, M. Xu, Z. Rao, Acetoin production from lignocellulosic biomass hydrolysates with a modular metabolic engineering system in *Bacillus subtilis*, Biotechnol. Biofuels Bioprod. **15** (2022) 87, doi: <https://doi.org/10.1186/s13068-022-02185-z>.
27. H. Nursyam, A. Prihanto, I. Warasari, M. Saadah, R. Masrifa, N. Nabila, N. Istiqfarin, I. Siddiq, The isolation and identification of endophytic bacteria from mangrove (*Sonneratia alba*) that produces gelatinase, IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. **137** (2018) 012056, doi: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/137/1/012056>.

- **9. SUSRET MLADIH KEMIČARA**
9th MEETING OF YOUNG CHEMISTS



Acinetobacter baumannii, stvarni uzročnik smrti kod COVID-19 pozitivnih pacijenata?

Acinetobacter baumannii, the real cause of death in COVID-19 positive patients?

Aurora Bičanić,^a Elena Požar,^a Jasminka Žiža,^{a*} Tatjana Tot^b

^a Gimnazija Karlovac, Rakovac 4, 47000 Karlovac, Hrvatska (Croatia)

^b Opća bolnica Karlovac, Ul. Andrije Štampara 3, 47000, Karlovac, Hrvatska

^b General Hospital Karlovac, Ul. Andrije Štampara 3, 47000, Karlovac, Croatia

* Autor za dopisivanje: Jasminka Žiža, zizajasminka@gmail.com

Sažetak

Virus SARS-CoV-2 uzrokuje bolest COVID-19 čije su epidemije česte na dječjim odjelima i domovima za starije. On je čest uzročnik bolničkih infekcija, posebice kod osoba oslabljenog imunološkog sustava. Mnogi COVID-19 pacijenti koji su obolijevali od pneumonije, liječeni su pomoću mehaničke ventilacije. Posljedica mehaničke ventilacije može biti koinfekcija bakterijom *Acinetobacter baumannii*. Cilj rada je dokazati rasprostranjenost bakterije *Acinetobacter baumannii* na bolničkim odjelima i njezin utjecaj na smrtnost pacijenata starijih od 55 godina. U prvom su dijelu eksperimenta analizirani podaci hospitaliziranih pacijenata dok se u drugom ispituje otpornost bakterije na pojedine antibiotike. Većina SARS-CoV-2 pacijenata s *A. baumannii* koinfekcijom umrli su tijekom hospitalizacije te su bolovali od pneumonije. Zaključili smo da su intubirani pacijenti s pozitivnim SARS-CoV-2 PCR testom češće obolijevali od *A. baumannii* koinfekcije zbog oslabljenog imuniteta te da je smrtnost pacijenata s *A. baumannii* koinfekcijom veća nego kod pacijenata bez navedene bakterijske koinfekcije.

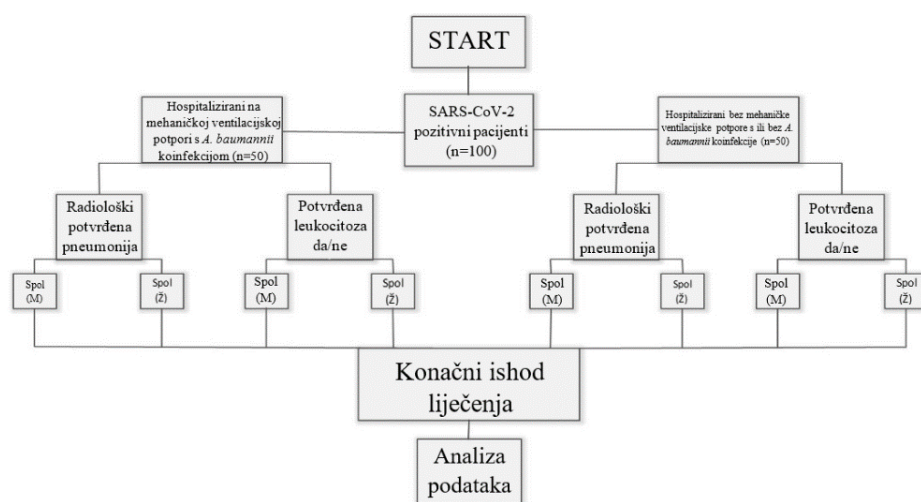
Ključne riječi: COVID-19, pneumonija, kontaminacija, *Acinetobacter baumannii*, smrtnost

Abstract

The SARS-CoV-2 virus causes the disease COVID-19, whose epidemics are common in children's wards and homes for the elderly. It is a frequent cause of hospital infections, especially in people with a weakened immune system. Many COVID-19 patients who developed pneumonia were treated with mechanical ventilation. The consequence of mechanical ventilation can be co-infection with the *Acinetobacter baumannii* bacterium. The aim of the work is to prove the prevalence of the bacterium

Acinetobacter baumannii in hospital wards and its influence on the mortality of patients over 55 years of age. In the first part of the experiment, the data of hospitalized patients were analyzed, while in the second, the resistance of bacteria to certain antibiotics was tested. The majority of SARS-CoV-2 patients with *A. baumannii* co-infection died during hospitalization and suffered from pneumonia. We concluded that intubated patients with a positive SARS-CoV-2 PCR test were more likely to suffer from *A. baumannii* co-infection due to weakened immunity and that the mortality of patients with *A. baumannii* co-infection was higher than in patients without said bacterial co-infection.

Key words: COVID-19, pneumonia, contamination, *Acinetobacter baumannii*, mortality



1. Uvod

Krajem 2019. godine teško zaustavljivi virus počeo se širiti svijetom. Osim što je uzrokovao velike promjene u društvu (držanje distance, nošenje medicinskih maski, redovna upotreba dezinfekcijskih sredstava i sl.), mnogi ga smatraju glavnim razlogom povećanja smrtnosti u posljednjih 5 godina.^{1,2} No, je li to zapravo istina? Riječ je o virusu iz porodice *Coronaviridae* koji je, zbog sličnosti sa SARS virusom koji je uzrokovao respiratorne infekcije u Aziji tijekom 2002. godine, nazvan SARS-CoV-2.³ Uzrokuje bolest nazvanu COVID-19 (engl. coronavirus disease 2019) koja se širi kao i rinovirus: izravnim kontaktom, kapljično i aerosolom.^{3,4} Epidemije su uočene na dječjim odjelima i domovima za starije te se na ovaj način povećava njegova rasprostranjenost kao uzročnika bolničkih infekcija, što je posebno teško za osobe oslabljenog imunološkog sustava.^{5,6} Inkubacija prilikom infekcije ovoga virusa traje 2-14 dana nakon izlaganja.⁷ Često zarazu obilježava respiratorna infekcija koja počinje vrućicom, zatim kašljem i kratkoćom daha, a imunost postepeno slabi te su moguće reinfekcije.⁶ Pneumonija je infekcija koja zahvaća jedno ili oba plućna krila. Kao najteža upalna bolest dišnoga sustava, može biti uzrokovana brojnim i različitim mikroorganizmima.⁸ Pnevmoniju bolesnika s oslabljenom imunosti danas izdvajaju u posebnu skupinu, a pored uobičajenih, česti su im uzročnici i oportunistički mikroorganizmi.⁹ Danas se za pneumonije u izvanbolničkoj populaciji uglavnom primjenjuje PORT Score pravilo kojim se procjenjuje težina bolesti i potreba za hospitalizacijom.^{10,11} Uočeno je da su pneumonije kod COVID-19 pacijenata, koji su zbog težine bolesti zahtijevali bolničko liječenje i mehaničku ventilaciju, dodatno pogoršane koinfekcijom bakterije *A. baumannii* koja rezultira velikom smrtnošću.^{10,11,12} U mnogim bolnicama kod COVID-19 pacijenata primijećeno je da je određena dobna skupina (stariji od 55 godina), koja zahtijeva mehaničku ventilacijsku potporu, zbog smanjene opskrbe kisikom, učestalo inficirana okolišnim bakterijama.¹³ Radi se o vrsti gram-negativnih štapićastih bakterija koje su iznimno sposobne preživjeti u bolničkom okružju, osobito u jedinicama intenzivnog liječenja.^{14,15} *A. baumannii* bakterije razvile su otpornost na brojne antibiotike i, premda prirodno niske patogenosti, postale su jedan od značajnijih bakterijskih uzročnika bolničkih infekcija.^{14,15,16,17,18} Na svijetu je predmet malobrojnih istraživanja o infekciji ove multirezistentne bakterije u bolničkom okruženju i kao mogućem uzročniku smrtnosti. Epidemije infekcija ovom bakterijom pripisuju se kontaminaciji i prijenosu u bolničkom okruženju.^{14,15,19} U istraživačkom radu uspoređivana je učestalost infekcija *A. baumannii* kod COVID-19 infekcije tijekom 2022. godine. Motiv je ovog istraživanja dokazati

rasprostranjenost ove bakterije kao glavnog uzroka infekcije i moguće smrtnosti pacijenata tijekom buktajuće pandemije COVID-19 bolesti.



Slika 1 - Bakterije *A. baumannii*

Fig. 1 - *A. baumannii* bacteria

Provođenjem istraživanja očekuju se rezultati koji potvrđuju da su osobe oboljele od SARS-CoV-2 infekcije s dokazanom *A. baumannii* koinfekcijom imale veću smrtnost od pacijenata bez bakterijske koinfekcije, da je skupina pacijenata koji su u sklopu liječenja zahtijevali mehaničku ventilacijsku potporu (intubirani pacijenti) češće obolijevali od *A. baumannii* infekcije od skupine pacijenata bez mehaničke ventilacijske potpore te da su COVID-19 pacijenti s mehaničkom ventilacijskom potporom imali veću smrtnost uzrokovanu *A. baumannii* koinfekcijom u usporedbi s COVID-19 pacijentima bez mehaničke ventilacijske potpore.

2. Eksperimentalni dio

2.1. Istraživanje rezistencije bakterije (izrada antibiograma)

Uzorci su obrađeni u laboratoriju za mikrobiologiju Opće bolnice Karlovac u studenom i prosincu 2023. godine te je kod nekoliko izoliranih *A. baumannii* sojeva napravljen antibiogram prema EUCAST smjernicama. Svaki izolat *A. baumannii* testiran je na sljedeće antibiotike: ampicilin-sulbaktam, meropenem, imipenem, gentamicin, amikacin, ciprofloksacin, levofloksacin, sulfametoksazol-trimetoprim i kolistin. Testirana kolonija gram-negativnih štapićastih bakterija razmućena je u sterilnoj fiziološkoj otopini i na podlozi za

testiranje na antibiotike (univerzalno zvana Mueller-Hinton).²⁰ Razmazana je u tankom sloju te su na tako obrađenu podlogu postavljene diskovi antibiotika. Takve su ploče stavljene u inkubator grijan na 37 °C i drugi dan su očitane zone osjetljivosti na antibiotike prema EUCAST smjernicama. Antibiotici su podijeljeni prema zonama inhibicije rasta oko diska mjerene u milimetrima na osjetljive, rezistentne i umjereno osjetljive.²¹



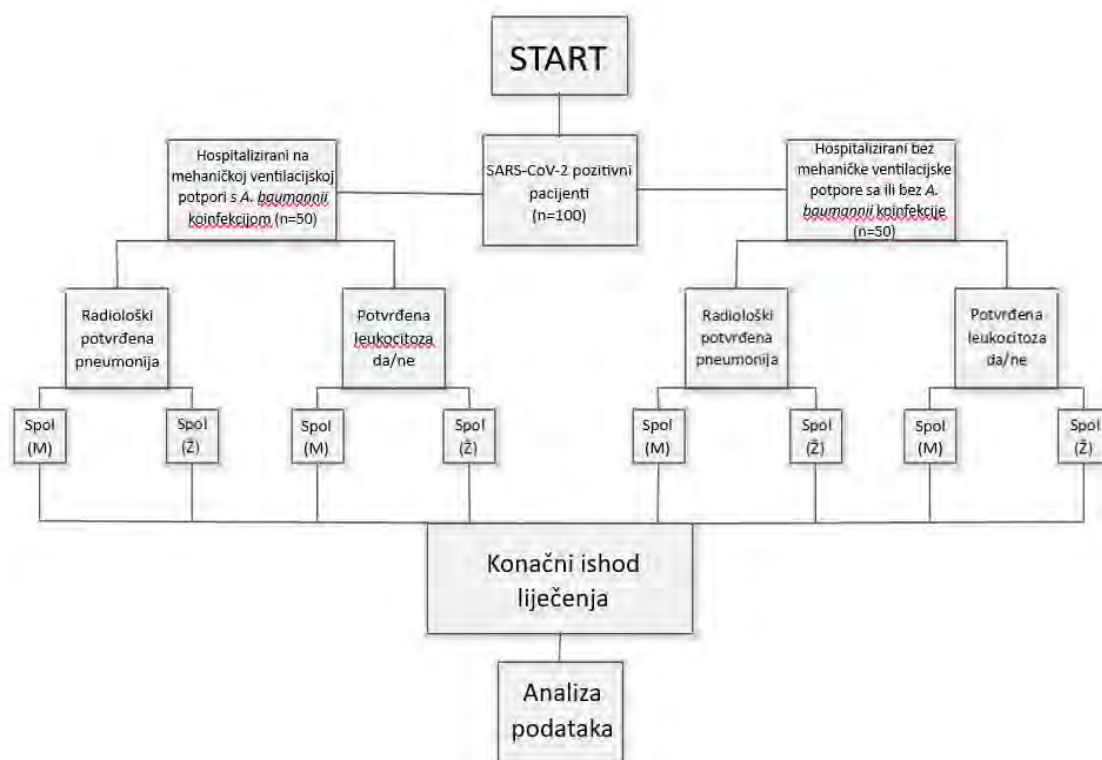
Slika 2 - Obrada uzoraka pacijenata antibiogramom

Fig. 2 - Processing of patient samples by antibiogram

2.2. Opis metode rada za testiranje pacijenata

Obradeno je 100 bolnički liječenih pacijenata oboljelih od SARS-CoV-2 infekcije. Ciljana skupina sadrži 50 pacijenata. Pacijenti imaju radiološki potvrđenu pneumoniju i izoliran *A. baumannii*. Bakterija je izolirana iz uzoraka donjeg dišnog sustava. Uzorci su prikupljeni iskašljem, aspiratom traheje (usisaj dušnika) ili bronhoalveolarnim lavažom (BAL) u velikom broju ($\geq 10^4$ i/ili $\geq 10^5$).²² Ona je uspoređena s 50 oboljelih od SARS-CoV-2 infekcije koji nisu zahtijevali mehaničku ventilacijsku potporu i nisu nužno imali potvrđenu bakterijsku koinfekciju *A. baumannii*. Svi obrađeni pacijenti stariji su od 55 godina. Uvjet su za obradu infekcija SARS-CoV-2 virusom potvrđena metodom molekularne dijagnostike na GeneXpert aparatu ili na Bioneer aparatu iz brisa gornjeg dijela ždrijela (nazofarinksa).²² Obradeni podaci uneseni su MS Excel. Izračunat je postotak tih vrijednosti koji su grafički prikazani kao i njihova brojnost. Parametri koji su praćeni u obje skupine su: dob (obrađeni su samo pacijenti stariji od 55 godina liječeni u Općoj bolnici Karlovac), leukocitoza— broj leukocita veći od $9,7 \times 10^9/L$ kao pokazatelj infekcije, radiološki potvrđena pneumonija, konačni ishod liječenja i bakteriološka obrada uzoraka iz donjeg dišnog sustava koji su uključivali iskašljaj (sputum), endotrahealni aspirat (aspirat traheje) i/ili BAL iz kojih se tražila izolacija *A. baumannii*

u broju $\geq 10^4$. Izolati *A. baumannii* podijeljeni su u dvije grupe od kojih je jedna uključivala multirezistentne izolate (bakterije koje su rezistentne na minimalno tri skupine antibiotika) i na dobro osjetljive izolate bakterije. Iz skupine pacijenata kod kojih je izoliran *A. baumannii* najčešći uzorak je uzorak dobiven invazivnom metodom, brohoalveolarnom lavažom u kojoj se segment pluća ispire sterilnom fiziološkom otopinom i zatim se aspirira (usiše) minimalno 1 ml uzorka.



Slika 3 - Grafički prikaz obrade pacijenata

Fig. 3 - Graphical representation of patient treatment

Obrada podataka analizirana je iz BIS-a uz nadzor nadležnog liječnika poštujući Zakon o zaštiti tajnosti podataka. Obradene su punoljetne osobe što nije zahtijevalo etičko povjerenstvo i informirani pristanak, a imena i prezimena pacijenata zatamnjena su uz vidljivi datum i godinu rođenja te se iz epikrize (završnog mišljenja) moglo iščitati spol bolesnika. Podaci su analizirani tijekom zime 2023. godine.

3. Rezultati i rasprava

Rezultati su podijeljeni u dva dijela: izrada antibiograma i analiza bolničkih podataka.

1. Izradom antibiograma dobiveni su sljedeći rezultati.

Na MacConkey agaru testirana je rezistentnost bakterije i kao rezultat uočljivi su promjeri oko navedenih antibiotika. Bakterija *A. baumannii* ima veliku rezistentnost na antibiotike koji su pokazali malen promjer, a to su: ampicilin-sulbaktam, meropenem, imipenem, gentamicin, amikacin, ciprofloksacin, levofloksacin i sulfametoksazol-trimetoprim. Ovi antibiotici ne mogu utjecati na bakterijsku koinfekciju. Antibiotik kolistin jedini pokazuje znatno veći promjer. Tim rezultatom uočavamo da bakterija *A. baumannii* ima manju rezistenciju na antibiotik kolistin.



Slika 4 - Antibiogram na MacConkey agaru

Fig. 4 - Antibiogram on MacConkey agar

2. Analizom bolničkih podataka dobiveni su sljedeći rezultati.

Tablica 1 - Rezultati obrade ciljane skupine pacijenata

Table 1 - Treatment results of the target group of patients

redni br.	PCR pozitivni	hospitalizacija	A. b. pozitivni	pneumonija	leukocitoza	spol	smrtni ishod
p1	+	da	da	da	+	M	+
p2	+	da	da	da	+	Ž	+
p3	+	da	da	da	+	Ž	+
p4	+	da	da	da	+	M	+

Tablica 1 - (nastavak)

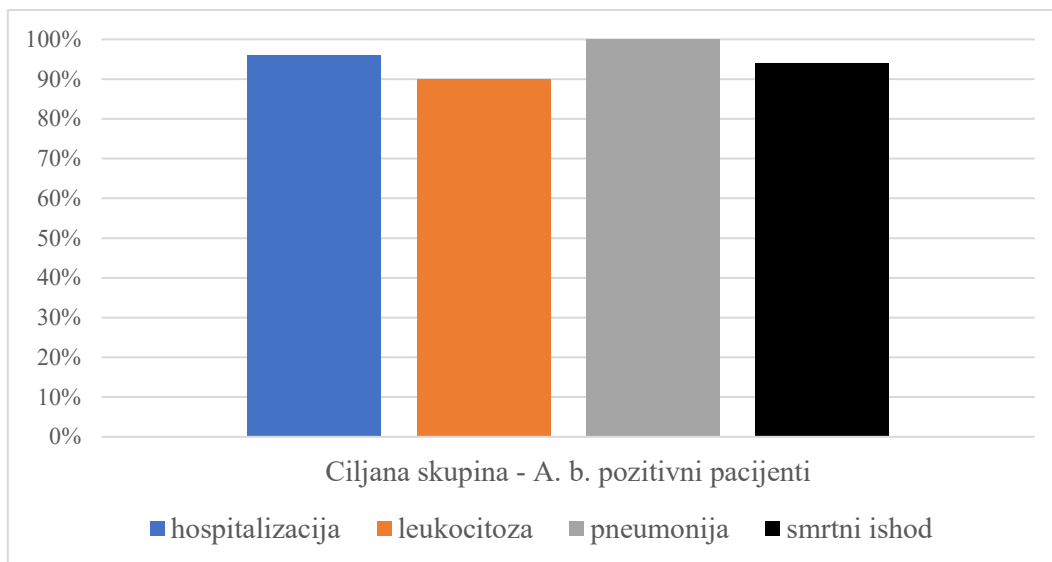
Table 1 - (continued)

redni br.	PCR pozitivni	hospitalizacija	A. b. pozitivni	pneumonija	leukocitoza	spol	smrtni ishod
p5	+	da	da	da	+	Ž	+
p6	+	da	da	da	+	M	+
p7	+	da	da	da	+	M	+
p8	+	da	da	da	+	Ž	+
p9	+	da	da	da	+	M	+
p10	+	da	da	da	+	M	+
p11	+	da	da	da	+	Ž	+
p12	+	da	da	da	+	M	+
p13	+	da	da	da	+	M	+
p14	+	da	da	da	-	Ž	+
p15	+	da	da	da	+	M	+
p16	+	da	da	da	+	M	+
p17	+	da	da	da	+	M	+
p18	+	da	da	da	+	M	+
p19	+	da	da	da	+	M	+
p20	+	da	da	da	-	M	+
p21	+	ne	da	da	+	Ž	-
p22	+	da	da	da	+	M	+
p23	+	da	da	da	+	Ž	+
p24	+	da	da	da	+	M	+
p25	+	da	da	da	+	M	+
p26	+	da	da	da	-	M	-
p27	+	da	da	da	-	M	+
p28	+	da	da	da	+	M	+
p29	+	da	da	da	+	M	+
p30	+	da	da	da	+	M	+
p31	+	da	da	da	+	Ž	+
p32	+	da	da	da	+	M	+
p33	+	da	da	da	+	M	+
p34	+	da	da	da	+	Ž	+
p35	+	da	da	da	+	M	+
p36	+	da	da	da	+	M	+
p37	+	da	da	da	+	M	-
p38	+	da	da	da	+	M	+
p39	+	da	da	da	+	M	+
p40	+	da	da	da	-	M	+
p41	+	da	da	da	+	Ž	+
p42	+	da	da	da	+	Ž	+
p43	+	da	da	da	+	Ž	+
p44	+	da	da	da	+	M	+
p45	+	da	da	da	+	Ž	+
p46	+	da	da	da	+	M	+
p47	+	da	da	da	+	M	+
p48	+	da	da	da	+	M	+
p49	+	da	da	da	+	M	+
p50	+	da	da	da	+	Ž	+

Ciljana skupina:

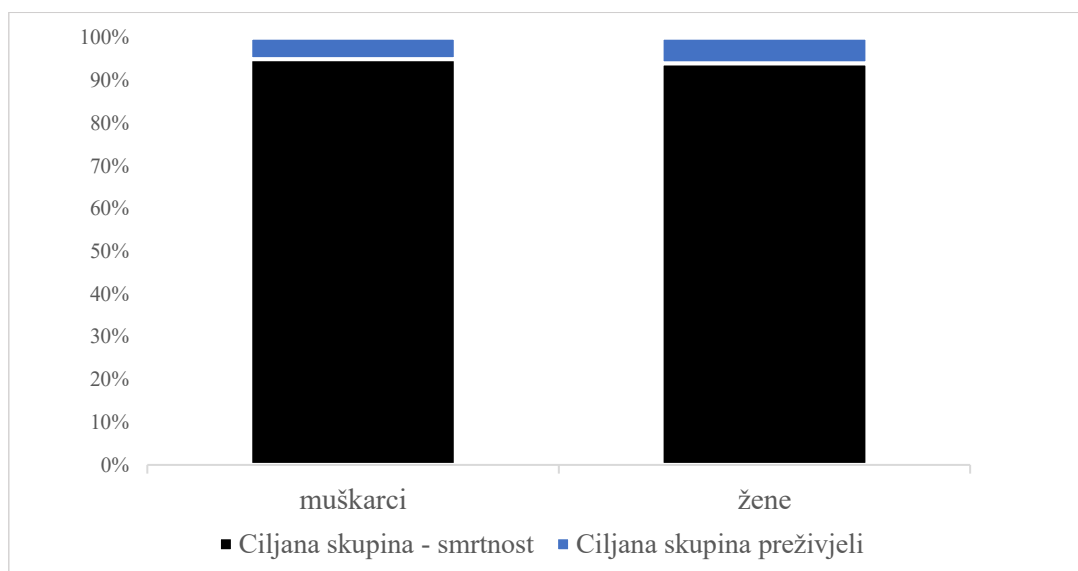
Prema podacima iz tablice 1, u ciljanoj skupini SARS-CoV-2 pacijenata s radiološki potvrđenom pneumonijom i *A. baumannii* koinfekcijom, iščitavamo veliki broj hospitaliziranih pacijenata. Na slici 5 uočljivo je da većina navedenih pacijenata ima radiološki potvrđenu leukocitozu i njihov je

ukupni postotak smrtnosti 96 %. Ciljana skupina sadržavala je 30 % ženskih pacijenata i 70 % muških. Svim pacijentima koji su imali smrtni ishod bila je potrebna hospitalizacija. Broj smrtnih ishoda gotovo je jednak kod pacijenata muškoga i ženskoga spola, kako prikazuje slika 6.



Slika 5 - Analiza ciljane skupine

Fig. 5 - Target group analysis



Slika 6 - Brojčani udio smrtnog ishoda ciljane skupine

Fig. 6 - Numerical share of death outcome in the target group

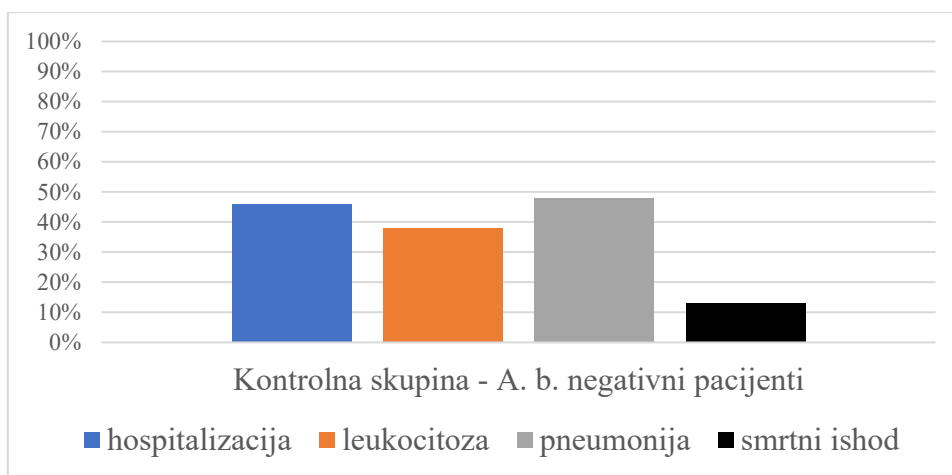
Tablica 2 - Rezultati obrade kontrolne skupine pacijenata

Table 2 - Treatment results of the control group of patients

redni br.	PCR pozitivni	hospitalizacija	A. b. pozitivni	pneumonija	leukocitoza	spol	smrtni ishod
p51	+	-	-	-	-	Ž	-
p52	+	-	-	-	-	Ž	-
p53	+	+	-	+	+	M	-
p54	+	+	-	+	+	M	+
p55	+	-	-	-	-	Ž	-
p56	+	-	-	-	-	Ž	-
p57	+	+	-	+	-	Ž	-
p58	+	+	-	+	+	Ž	+
p59	+	-	-	-	-	Ž	-
p60	+	-	-	-	-	M	-
p61	+	-	-	-	-	Ž	-
p62	+	+	-	+	+	M	+
p63	+	-	-	-	-	Ž	-
p64	+	-	-	-	-	M	+
p65	+	-	-	-	-	M	-
p66	+	-	-	-	-	M	-
p67	+	-	-	-	-	Ž	-
p68	+	-	-	-	-	M	-
p69	+	+	-	+	+	M	-
p70	+	+	-	+	+	M	-
p71	+	-	-	-	-	Ž	-
p72	+	+	-	+	-	M	+
p73	+	+	-	+	+	Ž	+
p74	+	-	-	-	-	Ž	-
p75	+	-	-	-	-	Ž	-
p76	+	-	-	-	-	M	-
p77	+	+	-	+	+	M	+
p78	+	+	-	+	-	M	-
p79	+	-	-	-	-	Ž	-
p80	+	-	-	-	-	M	-
p81	+	+	-	+	+	Ž	+
p82	+	-	-	-	-	M	-
p83	+	-	-	-	-	Ž	-
p84	+	+	-	+	+	Ž	-
p85	+	+	-	+	+	M	-
p86	+	+	-	+	+	M	+
p87	+	+	-	+	+	M	+
p88	+	+	-	+	+	Ž	+
p89	+	+	-	+	+	Ž	-
p90	+	+	-	+	+	Ž	-
p91	+	-	-	-	-	Ž	-
p92	+	+	-	+	-	Ž	+
p93	+	-	-	-	-	Ž	-
p94	+	+	-	+	+	Ž	-
p95	+	+	-	+	+	M	+
p96	+	-	-	-	-	Ž	-
p97	+	-	-	-	-	Ž	-
p98	+	+	-	+	+	M	-
p99	+	-	-	-	-	Ž	-
p100	+	-	-	-	-	Ž	-

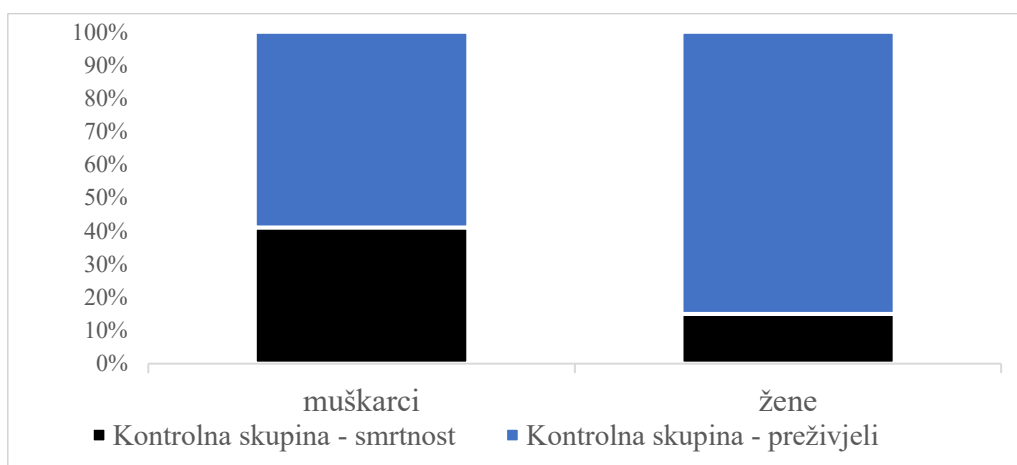
Kontrolna skupina:

Prema podacima iz tablice 2, u kontrolnoj skupini SARS-CoV-2 pacijenata bez *A. baumannii* koinfekcije, nešto manje od polovine pacijenata bilo je hospitalizirano te su svi hospitalizirani imali radiološki potvrđenu pneumoniju. Da se uočiti da je 42 % pacijenata bilo muškog spola, a 58 % pacijenata ženskoga. Zbog nižeg postotka hospitalizacije, pacijenti imaju niži i postotak pneumonije i leukocitoze. Kao što je prikazano na slici 7, postoci hospitalizacije, leukocitoze i pneumonije vidljivo su manji, nego u ciljanoj skupini pacijenata s koinfekcijom. Iz slike 8 može se iščitati manja smrtnost od ciljane skupine kod oba spola.



Slika 7 - Analiza kontrolne skupine

Fig. 7 - Control group analysis



Slika 8 - Brojčani udio smrtne ishoda kontrolne skupine

Fig. 8 - Numerical share of death outcome in the control group

U istraživanju je analizirana bakterije *A. baumannii*. Slično kao i kod slučajeva u radu *Rangel i sur.*⁸, većina pacijenata s *A. baumannii* koinfekcijom umrli su tijekom hospitalizacije. Za razliku od njihovih rezultata, pokazalo se kako ove koinfekcije ima više, nego što su oni pronašli te postoji mogućnost da razvijenost zemalja može utjecati na ovu koinfekciju. Prema radu *Protić*¹¹, dugo intubirani pacijenti imaju oslabljen imunitet i bolje uvjete za razvoj multirezistentnih bakterija i drugih patogenih organizama. Prema radu *Ćurčić i sur.*²³ bakterija *A. baumannii* među najčešćim je uzročnicima bolničkih infekcija te je najčešće pronađena putem BAL-a. Podaci o smrtnosti pacijenata s ovom koinfekcijom slični su, kao i podaci smrtnosti prema spolu. Koristeći saznanja o rasprostranjenosti *A. baumannii* bakterije (česta je u bolničkim prostorima), možemo razmišljati da je nedovoljna briga za pacijenta te neodržavanje potrebne čistoće bolničkih prostora mogući razlog učestalosti ove infekcije kod intubiranih pacijenata u bolnici. Pokazalo se kako koinfekcije s *A. baumannii* ima mnogo u SARS-CoV-2 pacijenata koja se može prevenirati uvođenjem aparata za dezinfekciju prostora (npr. Glosair) čime je moguće znatno smanjiti infekciju u bolničkih pacijenata, a posljedično i njihovu smrtnost. Kao što su istražili *Rangel i sur.*²⁴, za koinfekcije, posebice *A. baumannii* bakterijom, među SARS-CoV-2 pacijentima ima malo podataka i istraživanja što otežava provedbu budućih istraživanja o ovoj temi.

4. Zaključci

Usporedbom analiziranih skupina zaključili smo da je *A. baumannii* bakterija izolirana u bolnici, rezistentna na mnoge antibiotike: ampicilin-sulbaktam, meropenem, imipenem, gentamicin, amikacin, ciprofloksacin, levofloksacin i sulfametoksazol-trimetoprim. Kod COVID-19 pacijenata starijih od 55 godina, zbog niske oksigenacije, potrebna je mehanička ventilacija. Dokazana je veća smrtnost pacijenata s *A. baumannii* koinfekcijom nego pacijenata bez bakterijske koinfekcije. Zaključili smo da su intubirani pacijenti s pozitivnim SARS-CoV-2 PCR testom češće obolijevali od *A. baumannii* koinfekcije zbog oslabljenog imuniteta. Brojnost smrtnosti pacijenata neovisan je o njihovom spolu.

Popis kratica i simbola

SARS CoV-2 - Teški akutni respiratorni sindrom koronavirus 2 (*engl. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*)

ECDC - Europski centar za sprečavanje i kontrolu bolesti (*engl. European Centre for Disease Prevention and Control*)

WHO - Svjetska zdravstvena organizacija (*engl. World Health Organisation*)

HZJZ - Hrvatski zavod za javno zdravstvo (*engl. Croatian Institute of Public Health*)

EUCAST - Europsko povjerenstvo za testiranje osjetljivosti na antimikrobne lijekove (*engl. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)

BAL - bronhoalveolarna lavaža (*engl. Bronchoalveolar lavage*)

BIS - Bolnički informacijski sustav (*engl. Hospital Information System*)

Literatura

1. URL: <https://www.who.int/health-topics/coronavirus> (19. 11. 2023.)
2. URL: <https://www.who.int/data/stories/global-excess-deaths-associated-with-covid-19-january-2020-december-2021> (10. 12. 2024.)
3. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/infectious-disease-topics/z-disease-list/covid-19/facts/transmission-covid-19> (19. 11. 2023.)
4. URL: <https://www.zzjzdnz.hr/zdravlje/covid-19/novi-koronavirus-i-bolest-koju-uzrokuje-covid-19> (19. 11. 2023.)
5. J. Begovac i sur., Koronavirusi, u Ivić I., Lišnjić D., Perić Lj. (ur.), Klinička infektologija, Zagreb: Medicinska naklada, 2019, str. 596-606.
6. H. Wilde, C. Tomlinson, B. A. Mateen, D. Selby, H. K. Kanthimathinathan, P., Ramnarayan, P. du Pré, M. Johnson, N. Pathan, A. Gonzalez-Izquierdo, A. G. Lai, D. Gurdasani, C. Pagel, S. C. Denaxas, S. J. Vollmer, K. L. Brown, Hospital admissions linked to SARS-CoV-2 infection in children and adolescents: cohort study of 3.2 million first ascertained infections in England, *BMJ* **382** (2023) e073639.
7. URL: <https://www.kbsd.hr/zavod-za-klinicku-mikrobiologiju-i-hospitalne-infekcije/> (20. 12. 2023.)
8. G. Pavliša, L. Ljubičić, L. Turk, M. Halar, M. Samaržija, COVID-19 i pneumonija, *Medicus* **29** (2 COVID-19) (2020) 179-184.
9. M. S. Aleem, R. Sexton, J. Akella, Pneumonia in an immunocompromised patient, in: StatPearls [Internet], StatPearls Publishing, 2023, URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557843/> (10. 12. 2024.)
10. URL: https://www.who.int/health-topics/pneumonia/#tab=tab_1 (10. 12. 2024.)

11. *I. Kuzman*, Pneumonije: uzročnici i dijagnostika, *Medicus* **14** (1_ARI) (2005) 71-82.
12. *J. Begovac i sur.*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter* species, u I. Ivić, D. Lišnjić, Lj. Perić (ur.), *Klinička infektologija*, Zagreb: Medicinska naklada, 2019, str. 744-750.
13. *S. Jirapanakorn, W. Witthayapipopsakul, K. Kusreesakul, D. Lakhota, V. Tangcharoensathien, R. Suphanchaimat*, All-cause excess mortality among end-stage renal disease (ESRD) patients during the COVID-19 pandemic in Thailand: a cross-sectional study from a national-level claims database, *BMJ* **14** (1) (2024) e081383, doi: <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2023-081383>.
14. *C. V. Guillaumet, M. H. Kollef*, *Acinetobacter* Pneumonia: Improving Outcomes With Early Identification and Appropriate Therapy, *Clinical Infectious Diseases* **67** (9) (2018) 1455–1462, doi: <https://doi.org/10.1093/cid/ciy375>.
15. *A. Protić*, COVID-19 u jedinicama intenzivnog liječenja, *Medicus* **29** (2 COVID-19) (2022) 167-170.
16. *R. Takada, T. Takazawa, Y. Takahashi, K. Fujizuka, K. Akieda, S. Saito*, Risk factors for mechanical ventilation and ECMO in COVID-19 patients admitted to the ICU: A multicenter retrospective observational study, *PLOS ONE* **17** (11) (2022) e0277641, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0277641>.
17. *C. A. Moubareck, D. H. Halat*, Insights into *Acinetobacter baumannii*: A Review of Microbiological, Virulence, and Resistance Traits in a Threatening Nosocomial Pathogen, *Antibiotics* **9** (3) (2020) 119, doi: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9030119>.
18. *S. Kalenić i sur.*, *Acinetobacter*, u Kalenić S. (ur.), *Medicinska mikrobiologija*, Zagreb: Medicinska naklada, 2013, str. 403-405.
19. *A. Howard, M. O'Donoghue, A. Feeney, R. D. Sleator*, *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen, *Virulence* **3** (3) (2012) 243–250, doi: <https://doi.org/10.4161/viru.19700>.
20. URL: <https://www.enciklopedija.hr/clanak/antibiogram> (21. 12. 2023.)
21. *N. Damani*, *Priručnik o prevenciji i kontroli infekcija*. Zagreb: Medicinska naklada, 2015, str. 165-167.
22. URL: <https://zjzka.hr/mikrobioloska-ambulanta/> (2. 12. 2023.)

23. *M. Ćurčić, M. Tarle, H. Almahariq, S. Hleb, J. Havaš, M. Pražetina, ... A. Šribar*, Distribution of Pathogens and Predictive Values of Biomarkers of Inflammatory Response at ICU Admission on Outcomes of Critically Ill COVID-19 Patients with Bacterial Superinfections—Observations from National COVID-19 Hospital in Croatia, *Diagnostics* **12** (9) (2022), doi: <https://doi.org/10.3390/diagnostics12092069>.
24. *K. Rangel, T. P. G. Chagas, S. G. De-Simone*, *Acinetobacter baumannii* Infections in Times of COVID-19 Pandemic, *Pathogens* **10** (8) (2021) 1006, doi: <https://doi.org/10.3390/pathogens10081006>.

Utjecaj otapala na sadržaj bioaktivnih komponenti i antioksidativnu aktivnost ekstrakata *Achillea millefolium* L.

Effect of solvents on content of bioactive components and antioxidative activity of Achillea millefolium L. extracts

Andela Čivljaku,^a Nika Pranjić,^b Ella Tomić,^a Mariela Zovko,^b Luka Đulabić,^a
Emir Horozić,^a Slavica Jukić^{b*}

^a Katolički školski centar „Sveti Franjo“ Tuzla, Klosterska 10,
75 000 Tuzla, BiH (B&H)

^b Katolički školski centar „Don Bosco“ Žepče, Stjepana Radića bb,
72 230 Žepče, BiH (B&H)

* Autor za dopisivanje: Slavica Jukić, slavica.perkovic71@gmail.com

Sažetak

Stolisnik ili hajdučka trava (*Achillea millefolium* L.) je biljka koja se u tradicionalnoj medicini najčešće koristi za liječenje astme, bronhitisa, gastritisa te drugih bolesti dišnog i probavnog sustava. Povijesno gledano, ova biljna vrsta je prošla brojne analize biološkog djelovanja u *in vitro* i *in vivo* uvjetima. U ovom radu ispitan je sadržaj polifenola i flavonoida, te antioksidativno djelovanje ekstrakata stolisnika koji su pripremljeni maceracijom u vodi, etanolu i metanolu, te smjesi voda:metanol i voda:etanol u omjeru 1:1. Za ispitivanje antioksidativnog kapaciteta korištena je DPPH i FRAP metoda. Biljni materijal je sakupljen na dvije lokacije, u Tuzli i Žepču. Ispitivanja su pokazala da ekstrakti pripremljeni u smjesi voda:metanol imaju najveću koncentraciju bioaktivnih komponenti i ujedno najveći antioksidativni kapacitet. Najslabiji ekstrakcijski učinak imao je etanol, za čiji je ekstrakt evidentiran najniži sadržaj polifenola i flavonoida. S obzirom na geografsko porijeklo, biljni materijal sakupljen u okolini Žepča pokazao se učinkovitijim u inhibiciji slobodnih radikala i s većim sadržajem bioaktivnih komponenti.

Ključne riječi: maceracija, polifenoli, flavonoidi, DPPH, FRAP, *Achillea millefolium*

Abstract

Yarrow (*Achillea millefolium* L.) is a plant that is most commonly used in traditional medicine for the treatment of asthma, bronchitis, gastritis, and other diseases of the respiratory and digestive systems. Historically, this plant species has undergone numerous biological activity analyses in both in vitro and in vivo conditions. This study investigated the content of polyphenols and flavonoids, as well as the antioxidant activity of yarrow extracts prepared by maceration in water, ethanol, and methanol, as well as mixtures of water:methanol and water:ethanol. The DPPH and FRAP methods were used to assess the antioxidant capacity. The plant material was collected from two locations, Tuzla and Žepče. The results showed that extracts prepared in the water:methanol mixture had the highest concentration of bioactive compounds and the greatest antioxidant capacity. The weakest extraction effect was observed with ethanol, whose extract exhibited the lowest content of polyphenols and flavonoids. Based on geographical origin, the plant material collected near Žepče proved to be more effective in inhibiting free radicals and had a higher content of bioactive compounds.

Key words: *maceration, polyphenols, flavonoids, DPPH, FRAP*

1. Uvod

Stolisnik ili hajdučka trava (*Achillea millefolium* L.), jedna je od najrasprostranjenijih biljaka, od davnina poznata po svojim ljekovitim svojstvima. Ova biljna vrsta pripada porodici Asteraceae i rodu *Achillea*. Autohtona je vrsta Europe, Azije, Sjeverne i Središnje Amerike.¹ Trajnica je koja iz svijetlosmeđeg, puzavog podanka razvija prizemne kovrčave listove u proljeće, dok se uspravna stabljika pojavljuje nešto kasnije. Na vrhovima stabljika formiraju se cvatovi s brojnim malim cvjetovima, koji cvatu od lipnja do kasne jeseni. Stolisnik je karakterističnog mirisa i specifičnog gorkog okusa.² Kao biljna droga koristi se svježi ili sušen nadzemni dio (herba) od kojeg se pripremaju ekstrakti, poput uvaraka i tinktura.³ Ima brojna djelovanja, poput antimikrobnog, adstringentnog i protuupalnog,^{4,5} a najčešće se upotrebljava za liječenje probavnih i menstrualnih tegoba te za zaustavljanje vanjskih i unutarnjih krvarenja. Stolisnik je biljka poznata po visokom sadržaju različitih bioaktivnih spojeva. Fitokemijska ispitivanja pokazala su prisutnost različitih kemijskih spojeva, uključujući laktone, flavonoide, alkamide, terpenoide, gorki glikozid ahilein, kumarine, saponine i sterole. Njegov kemijski sastav varira ovisno o vrsti i uvjetima rasta. Antioksidativna svojstva stolisnika potvrđena su u različitim ekstraktima: vodenom-alkoholnim, metanolnim i vodenim, kao i u esencijalnim uljima.⁶ Provedene su brojne vrste analiza koje pružaju važne informacije o potencijalnoj primjeni stolisnika u medicini. Dok *in vitro* studije omogućuju bržu i precizniju analizu, *in vivo* istraživanja su ključna za razumijevanje učinaka na cjelokupni organizam. Korištenje obaju pristupa može pridonijeti razvoju novih terapija ili dodataka prehrani temeljenih na stolisniku. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj otapala na ekstrakciju bioaktivnih komponenti iz stolisnika te usporediti antioksidativne aktivnosti uzoraka stolisnika ubranih na dvije različite lokacije, u Žepču i Tuzli.

2. Eksperimentalni dio

Uzorci nadzemnog biljnog materijala stolisnika prikupljeni su u svibnju 2024. godine na dva lokaliteta, naselje Vitlaci (Žepče) i naselje Solina (Tuzla). Biljni materijal osušen je na sobnoj temperaturi i tamnom mjestu četrnaest dana, nakon čega je usitnjen u električnom mlinu u fini prah i kao takav korišten za pripremu ekstrakata. Za pripremu radnih otopina korištena je demineralizirana voda. Za pripremu ekstrakata korištena je serija otapala, i to: voda, metanol, etanol, te smjese navedenih alkohola i vode u jednakim volumnim omjerima. Spektrofotometrijska mjerenja vršena su na spektrofotometru Perkin Elmer λ25 (USA).

2.1. Priprema ekstrakata

Ekstrakti su pripremljeni miješanjem 0,5 grama usitnjenog biljnog materijala s 50 ml otapala. Smjese su miješane na magnetnoj miješalici 20 minuta pri 150 obrtaja/minuti, a nakon toga filtrirane. Prikupljeni filtrati (ekstrakti) su odmah nakon filtriranja analizirani.

2.2. Određivanje sadržaja polifenola

Ukupni polifenoli kvantificirani su spektrofotometrijski korištenjem Folin-Ciocalteu testa prema publiciranom protokolu,⁷ uz određene modifikacije. 200 µl matičnog ekstrakta pomiješano je s 2,54 ml 10% Folin-Ciocalteu reagensa. Nakon 5 minuta dodano je 420 µl 10% natrijeva karbonata. Intenzitet razvijenog plavog obojenja izmjeren je nakon 1 sat inkubacije na sobnoj temperaturi na 765 nm. Kvantitativna mjerenja provedena su na temelju standardne kalibracijske krivulje galne kiseline ($y = 0,0042x + 0,0076$, $R^2 = 0,9998$). Ukupni sadržaj fenola izražen je kao ekvivalent galne kiseline (GAE) u miligramima po gramu suhog biljnog materijala.

2.3. Određivanje sadržaja flavonoida

Ukupni sadržaj flavonoida u ekstraktima određen je prethodno opisanom metodom,⁸ uz određene modifikacije. 1 ml otopine ekstrakta pomiješano je s 0,3 ml 5% natrijeva nitrita. Nakon 5 minuta dodano je 0,3 ml 10% aluminijevog klorida. Nakon 6 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi, 1 ml 1 M natrijeva hidroksida je dodano u reakcijsku smjesu. Konačni volumen je dopunjen do 10 ml s destiliranom vodom. Apsorbanca uzorka je mjerena u odnosu na slijepu probu na 510 nm. Rezultati su izvedeni iz kalibracijske krivulje ($y = 3,024x - 0,0034$; $R^2 = 0,9984$) kvercetina i izraženi u ekvivalentima kvercetina (QE) po gramu suhog biljnog materijala.

2.4. Određivanje redukcijskog kapaciteta ekstrakata (FRAP metoda)

Redukcijski kapacitet ekstrakata (eng. Ferric Reducing Antioxidant Power, FRAP) koji odražava njihovu antioksidacijsku aktivnost određen su prema protokolu.⁹ 3 ml pripremljenog FRAP reagensa pomiješano je s 100 µl razrijeđenih ekstrakata. Apsorbanca na 593 nm bilježi se nakon 30 minuta inkubacije na 37 °C. FRAP vrijednost izračunata je iz kalibracijske krivulje željezovog(II) sulfata heptahidrata ($y = 0,001x + 0,0698$; $R^2 = 0,9997$) i izražena u mol po gramu suhog biljnog materijala.

2.5. Ispitivanje inhibicije DPPH radikala

DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) metoda provedena je prema ranije opisanoj metodi Horozić i sur.¹⁰ Ekstrakt je miješan u različitim volumnim odnosima s metanolom nakon čega je dodano 500 µl 0,5 mM otopine DPPH radikala. Apsorbanca je izmjerena na 517 nm. Kontrolni uzorak pripremljen je miješanjem 0,5 ml 0,5 mM otopine DPPH radikala s 4 ml metanola. Efikasnost inhibicije DPPH radikala biljnim ekstraktima izračunat je prema jednadžbi:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100 \quad (1)$$

pri čemu je A_s apsorbanca otopine koja sadrži uzorak na 517 nm, a A_c je apsorbanca DPPH otopine. Rezultati su izraženi kao IC_{50} vrijednosti, odnosno koncentracije ekstrakata koje inhibiraju 50 % DPPH radikala.

3. Rezultati i rasprava

U cilju jasnijeg praćenja rezultata, ekstrakti pripremljeni s biljnim materijalom s područja Žepča označeni su oznakom A, dok su ekstrakti biljnog materijala s područja Tuzle označeni oznakom B. Voda, metanol, etanol, te smjese metanol:voda i etanol:voda označene su brojevima od 1 do 5, respektivno. Rezultati ispitivanja sadržaja polifenola, flavonoida i antioksidativne aktivnosti u *in vitro* uvjetima prikazani su u tablici 1.

Tablica 1 - Rezultati sadržaja bioaktivnih komponenti i antioksidativne aktivnosti ekstrakata stolisnika

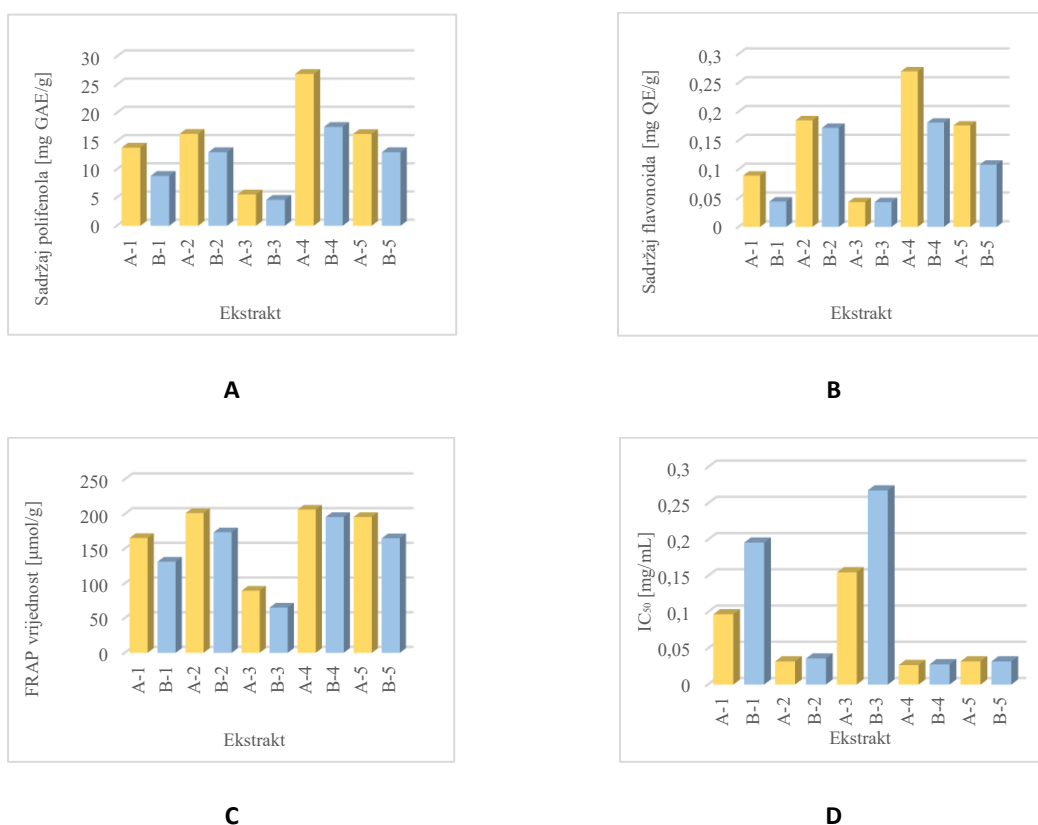
Table 1 - Results of the content of bioactive components and antioxidant activity of yarrow extracts

Uzorak	Polifenoli [mg GAE/g]	Flavonoidi [mg QE/g]	FRAP vrijednost [µmol/g]	IC_{50} [mg/mL]
A-1	13,86	0,089	165,55	0,097
B-1	8,84	0,044	131,44	0,196
A-2	16,29	0,185	201,35	0,032
B-2	13,05	0,172	173,82	0,036
A-3	5,55	0,043	89,54	0,155
B-3	4,60	0,043	65,24	0,268
A-4	26,93	0,270	206,52	0,027
B-4	17,53	0,181	195,80	0,028
A-5	16,27	0,176	195,90	0,032
B-5	13,05	0,108	165,20	0,032

Rezultati ukazuju na razlike u sadržaju bioaktivnih komponenti u biljnom materijalu s različitim lokaliteta. Za ekstrakte pripremljene s biljnim materijalom s područja Žepča potvrđen je veći sadržaj polifenola i flavonoida, a time i veći antioksidativni kapacitet u odnosu na ekstrakte pripremljene s istom biljnom vrstom koja je prikupljena na području Tuzle. Brojni su čimbenici

kojima se mogu objasniti dobiveni rezultati. Različito geografsko porijeklo uzoraka, uvjeti pri kojima biljka raste, kao i prisustvo industrijskih postrojenja značajno utječu na rast i razvoj biljke, a time direktno i na sadržaj polifenola i biološke aktivnosti biljnih vrsta. Razvijena kemijska industrija i urbanizacija na području tuzlanske regije povećava sadržaj polutanata u zraku, vodi i tlu, što se odražava na fiziološke funkcije i procese sinteze fitokemikalija.¹¹

U pogledu efikasnosti korištenih otapala, smjese vode i nižih alkohola pokazale su najveću učinkovitost u ekstrakciji bioaktivnih komponenti iz biljnog materijala. Smjesa metanola i vode pripremljena miješanjem otapala u jednakom volumnom odnosu pokazala je najveću ekstrakcijsku moć. Voda povećava proces difuzije, čime se olakšava ekstrakcija fenolnih spojeva iz biljnog tkiva.¹² Etanol se pokazao kao najmanje učinkovit za ekstrakciju polifenola iz stolisnika. Rezultati sadržaja polifenola i flavonoida su u potpunoj korelaciji s antioksidativnim kapacitetom ekstrakata. Na slici 1 prikazani su histogrami za analizu sadržaja bioaktivnih komponenti (polifenola i flavonoida) te antioksidativnu aktivnost u *in vitro* uvjetima.



Slika 1 - Histogramski prikazi: (A) sadržaja polifenola, (B) sadržaja flavonoida, (C) reduksijske sposobnosti ekstrakata i (D) IC₅₀ vrijednosti inhibicije DPPH radikala

Fig. 1 - Histograms: (A) polyphenol content, (B) flavonoid content, (C) reducing ability of extracts and (D) IC₅₀ value of DPPH radical inhibition

Ispitivanje biljnih vrsta s ciljem utvrđivanja sadržaja bioaktivnih komponenti, bioloških aktivnosti biljnih pripravaka, komparacije rezultata različitih znanstvenika i dr. vrlo je aktualno. S tim u vezi, pronađeno je nekoliko znanstvenih radova koji obrađuju ovu temu.

*Eghdami i sur.*¹³ su analizirali sadržaj bioaktivnih komponenti i inhibiciju DPPH radikala vodenih i metanolnih ekstrakata cvjetova stolisnika prikupljenih iz autohtonih populacija na različitim lokacijama regije Saveh u Iranu. Vodeni ekstrakti su pripremljeni zagrijavanjem 30 minuta na 100 °C, a metanolni ekstrakti miješanjem smjese biljnog materijala i 80 % metanola na 40 °C 24h. Rezultati su pokazali veći sadržaj polifenola i flavonoida u odnosu na ovu studiju. *Geogrieva i sur.*¹⁴ ispitivani su fitokemijski profil i antioksidativnu aktivnost ekstrakata stolisnika kupljenog u lokalnoj ljekarni na području Plovdiva (Bugarska). U sklopu istraživanja koristili su vodu kao ekstrakcijsko sredstvo i više vrsta ekstrakcijskih tehnika, i to: infuzija, dekocija, ultrazvučna i mikrotalasna ekstrakcija. Prijavljen je značajno niži sadržaj polifenola u usporedbi s ovim istraživanjem. Mogući čimbenici koji su utjecali na manju koncentraciju polifenola, pored prije navedenih, mogu biti i visoke temperature pri kojima su *Geogrieva i sur.*¹⁴ pripremali ekstrakte jer je poznato da su određene polifenolne komponente termolabilne, što ovisi o biljnoj vrsti. *Koraqi i sur.*¹⁵ publicirali su rezultate ispitivanja sadržaja bioaktivnih komponenti i antioksidativne aktivnosti ekstrakata stolisnika prikupljenog na Kosovu. Za pripremu ekstrakata koristili su vodu i nekoliko organskih otapala (metanol, etanol, etil acetat i aceton). Uspoređivanjem rezultata koje su publicirali *Koraqi i sur.*¹⁵ s ovom studijom, može se uočiti sličan prinos u ekstrakciji polifenolnih spojeva iz uzoraka stolisnika. U navedenom istraživanju potvrđena je bolja efikasnost metanola u odnosu na čistu vodu, što je evidentirano i kroz provedeno istraživanje u ovom radu.

4. Zaključci

Ekstrakti pripremljeni s biljnim materijalom s područja Žepča sadrže veću koncentraciju bioaktivnih komponenti i veću antioksidativnu aktivnost. Smjese vode i nižih alkohola pokazale su se najučinkovitijim za ekstrakciju polifenolnih spojeva. Efikasnost vodeno-alkoholnih smjesa objašnjava se utjecajem vode u procesu difuzije, čime se olakšava ekstrakcija fenolnih spojeva iz biljnog tkiva. Razlike u sadržaju bioaktivnih komponenti mogu se objasniti različitim geografskim porijeklom uzoraka, ali i uvjetima okoline pri kojima biljka raste i razvija se.

Literatura

1. J. Vélez-Gavilán, *Achillea millefolium* (yarrow), in: CABI Compendium, 2016, URL: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompendium.2636>.
2. S. Mollasalehi, B. Kashefi, H. Hashemi-moghaddam, Comparison of Microwave-Assisted and Hydrodistillation Methods for Extraction of Essential Oil from *Achillea millefolium*, J. Chem. Health Risks **3** (2013) 39-46.
3. P. H. Gorni, A. C. Pacheco, A. Lima Moro, J. F. Albuquerque Silva, R. R. Moreli, G. R. de Miranda, J. M. Pelegrini, C. Baptista Zaniboni, K. Daleck Spera, R. M. Gonçalves da Silva, Elicitation Improves the Leaf Area, Enzymatic Activities, Antioxidant Activity and Content of Secondary Metabolites in *Achillea millefolium* L. grown in the Field, J. Plant Growth Regul **40** (2021) 1652-1666, doi: <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10217-x>.
4. N. Yassa, S. Saeidnia, R. Pirouzi, M. Akbaripour, A. Shafiee, Three phenolic glycosides and immunological properties of *Achillea millefolium* from Iran, population of Golestan, DARU, J. Pharm. Sci. **15** (2007) 49-52.
5. M. Villalva, L. Jaime, D. Villanueva-Bermejo, B. Lara, T. Fornari, G. Reglero, S. Santoyo, Supercritical anti-solvent fractionation for improving antioxidant and anti-inflammatory activities of an *Achillea millefolium* L. extract, Food Res. Int. **115** (2019) 128-134, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.027>.
6. E. Horozić, M. Šljivić Husejnović, L. Kolarević, D. Bjelošević, M. Ibišević, E. Karić, A. Džambić, Antioksidansi, 2021, In Scan, Tuzla.
7. V. L. Singleton, R. Orthofer, R. M. Lamuela-Raventós, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, Methods Enzymol. **299** (1999) 152-178, doi: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1).
8. A. A. Olajire, L. Azeez, Total antioxidant activity, phenolic, flavonoid and ascorbic acid contents of Nigerian vegetables, Af. J. Food Sci. Tech. **2** (2011) 22-29.
9. I. F. F. Benzie, J. J. Strain, Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration, Methods Enzymol. **299** (1999) 15-27, doi: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99005-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99005-5).

10. E. Horozić, A. Zukić, L. Kolarević, D. Bjelošević, Z. Ademović, B. Šarić-Kundalić, D. Husejnagić, A. Kudumović, S. Hamzić, Evaluation of antibacterial and antioxidant activity of methanol needle extracts of *Larix Decidua* Mill., *Picea Abies* (L.) H. Karst. and *Pinus Nigra*, J. F. Arnold. TTEM **14** (2019) 14-19.
11. E. Horozić, S. Begić, A. Zukić, H. Alibašić, M. Briga, Effect of extraction technique on the content of bioactive components and antioxidant activity of aqueous extracts of fresh and dried nettle *Urtica dioica* L.), Tech. Acta **15** (2022) 1-7, doi: <https://doi.org/10.51558/2232-7568.2022.15.2.1>.
12. E. Altıok, D. Bayçin, O. Bayraktar, S. Ülkü, Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin, Sep. Purif. Technol. **62** (2008) 342-348, doi: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.01.022>.
13. A. Eghdami, V. Fateh, D. Eradatmand Asli, A. Houshmandfar, Antioxidant Activity, Total Phenolic and Flavonoids Contents in Methanolic and Aqueous Extract of *Achillea millefolium* L., Adv. Environ. Biol. **5** (2011) 929-932.
14. L. Georgieva, A. Gadjalova, D. Mihaylova, A. Pavlov, *Achillea millefolium* L. - phytochemical profile and *in vitro* antioxidant activity, Int. Food Res. J. **22** (2015) 1347-1352.
15. H. Koraqi, F.C. Ajazi, K. Lluga-Rizani, S. Kazlauskaitė, Effect of extraction solvent on bioactive compounds and antioxidant activity of *Achillea millefolium* L. grown in Kosovo region, Croat. J. Food Sci. Technol. **14** (2022) 108-115, doi: <https://doi.org/10.17508/CJFST.2022.14.1.12>.

Utjecaj temperature i pH-vrijednosti na stabilnost antocijanina za primjenu u bojom senzibiliziranim solarnim ćelijama

Influence of temperature and pH-value on stability of anthocyanins for use in dye-sensitized solar cells

Marija Željana Kustura,* Marijana Žgela Putniković

V. gimnazija, Klaićeva 1, 10000 Zagreb, Hrvatska (Croatia)

*Autor za dopisivanje: Marija Željana Kustura, marijakustura5@gmail.com

Sažetak

Antocijanini su pigmenti koji se nalaze u brojnim biljnim vrstama, a zahvaljujući svojoj sposobnosti apsorpcije svjetlosti koriste se i u bojom senzibiliziranim solarnim ćelijama (eng. *Dye-Sensitized Solar Cells* – DSSC). U takvim se solarnim ćelijama mogu koristiti prirodne boje, među kojima su i antocijanini, koje imaju sposobnost fotoelektričnog efekta. Njihova primjena u DSSC-u privukla je pažnju istraživača zbog ekološke prihvatljivosti i potencijalne ekonomske isplativosti. Ipak, istraživanja su pokazala da na njihovu stabilnost, to jest sposobnost zadržavanja kemijske strukture, utječu različiti vanjski čimbenici, poput promjena temperature i pH-vrijednosti. Takve promjene mogu ograničiti rad DSSC-a, čime se smanjuje njihova dugoročna pouzdanost i primjena. Ovo istraživanje usmjereno je određivanju uvjeta temperature i pH-vrijednosti u kojima su kemijske strukture antocijanina najstabilnije. U istraživanju je spektrofotometrijski ispitan utjecaj temperature, u rasponu od 8 °C do 80 °C, te pH-vrijednosti, u intervalu od 2,15 do 8,20, na stabilnost antocijanina izdvojenih iz plodova kupina. Mjerenja su provedena pomoću spektrofotometra, snimanjem Vis-spektara uzoraka, nakon određenih vremenskih intervala pri različitim temperaturama i pH-vrijednostima uzoraka. Posebno je promatrana apsorbanacija pri 526 nm. Rezultati istraživanja u navedenim intervalima mjerenja pokazali su veću stabilnost antocijanina pri nižim temperaturama te kiselijim uvjetima. Dakle, učinkovitost i trajnost solarnih ćelija može se značajno poboljšati hlađenjem i zakiseljavanjem boje.

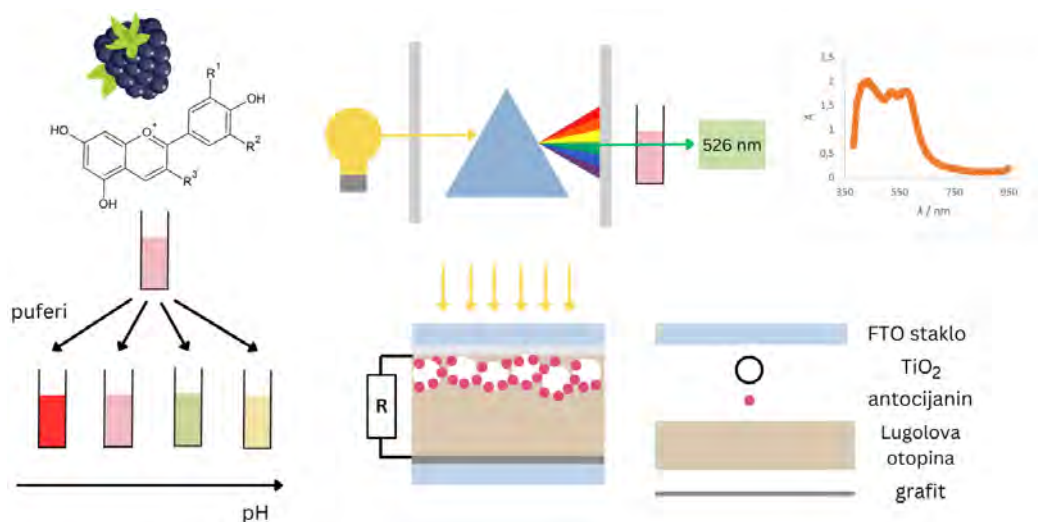
Ključne riječi: *antocijanini, temperatura, pH-vrijednost, spektrofotometrija, DSSC*

Abstract

Anthocyanins are pigments found in numerous plant species and are also, thanks to their ability to absorb light, utilized in dye-sensitized solar cells (Dye-Sensitized Solar Cells - DSSC). Such solar cells can use natural colors, including anthocyanins, which are known for their photoelectric properties. Their

application in DSSC has attracted the attention of researchers due to their environmental acceptability and potential cost-effectiveness. However, research has shown that their stability, i.e., the ability to retain their chemical structure, is affected by various external factors, such as changes in temperature and pH. These changes can limit the operation of DSSCs, thereby reducing their long-term reliability and applicability. Consequently, this research focuses on determining the optimal temperature and pH conditions under which the chemical structures of anthocyanins remain most stable. The study involved a spectrophotometric examination of the effects of temperature, ranging from 8 °C to 80 °C, and pH levels, spanning from 2.15 to 8.20, on the stability of anthocyanins extracted from blackberries. Measurements were conducted by recording Vis-spectra of samples after specific time intervals under altered conditions using a spectrophotometer, with particular attention given to absorbance at 526 nm. The research results within the specified measurement intervals showed greater stability of anthocyanins at lower temperatures and more acidic conditions. Thus, the efficiency and durability of solar cells can be significantly improved by cooling and acidifying the dye.

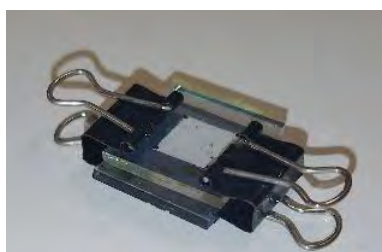
Key words: *anthocyanins, temperature, pH, spectrophotometry, DSSC*



1. Uvod

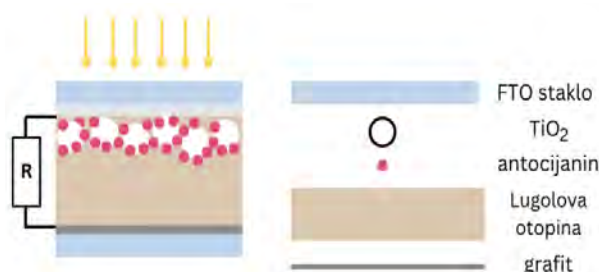
Povećanje potražnje energije u 21. stoljeću rezultat je porasta svjetskog stanovništva te sve većeg oslanjanja na tehnologiju. Većina se električne energije u svijetu još uvijek proizvodi korištenjem fosilnih goriva (60,65 %), čija upotreba štetno utječe na okoliš. Zbog toga su u proteklom desetljećima istraživani obnovljivi izvori energije, poput solarnih ćelija, čija je upotreba u proizvodnji električne energije u porastu (4,59 %).¹

Solarne ćelije nude ekološki prihvatljivo i održivo rješenje.



Slika 1 – Bojom senzibilizirana solarna ćelija

Fig. 1 – Dye-sensitized solar cell



Slika 2 – Građa DSSC-a

Fig. 2 – Structure of DSSC

Trenutno se najčešće koriste solarne ćelije koje sadrže silicij kao fotoelektrični materijal. No, zbog visokih troškova proizvodnje silicija, razvijaju se i druge vrste solarnih ćelija, među kojima se posebno ističu bojom senzibilizirane solarne ćelije (eng. *Dye-Sensitized Solar Cells* – DSSC) (slika 1), zbog mogućnosti korištenja lako dostupnih i jeftinih boja, poput antocijanina.² Antocijanini (antocijani) čine skupinu biljnih pigmenata topljivih u vodi te smještenih u vakuolama biljnih stanica gdje pridonose crvenom, ljubičastom i plavom obojenju tkiva mnogih biljaka poput kupina, borovnica, malina, jagoda i dr.³ Unutar DSSC-a, antocijanini apsorbiraju energiju elektromagnetskog vala, nakon čega dolazi do oslobađanja

elektrona, što omogućuje kruženje elektrona, to jest protok struje (slika 2). Unatoč prednostima upotrebe antocijanina u DSSC-u, njihov je glavni nedostatak kemijska nestabilnost. Naime, antocijanini su skloni promjeni kemijske strukture kada su izloženi različitim uvjetima okoline, poput promjena temperature i pH-vrijednosti, što negativno utječe na rad DSSC-a.⁴ Budući da porast temperature povećava brzinu kemijske reakcije, u ovom je istraživanju pretpostavljeno da će se antocijanini brže razgrađivati pri višim temperaturama. Strukture antocijanina unutar nekog medija (najčešće vode) međusobno su u ravnoteži, pri čemu prevladavajuća struktura ovisi o pH-vrijednosti okoline. U vrlo kiselom okruženju ($\text{pH} < 2$) prevladava crveni flavilium kation, dok u umjereno kiselom ($\text{pH} 4\text{--}6$) prevladava kinonoidna baza ljubičaste boje. Povišenjem pH-vrijednosti nastaju strukture podložne degradaciji, poput bezbojnog hemiketala/karbinol pseudobaze i stereoizomeri kalkona žutog obojenja.⁵ Stoga su postavljene sljedeće hipoteze:

1. Antocijanini će se brže razgrađivati pri višim temperaturama.
2. Na brzinu razgradnje antocijanina utječe pH-vrijednost otopine.

U ovom istraživanju, spektrofotometrijski je praćena brzina promjene strukture antocijanina pri različitim temperaturama i pH-vrijednostima, s ciljem utvrđivanja optimalnih uvjeta stabilnosti antocijanina, čime bi se povećala njihova učinkovitost i dugotrajnost u primjeni u bojom senzibiliziranim solarnim ćelijama (DSSC).

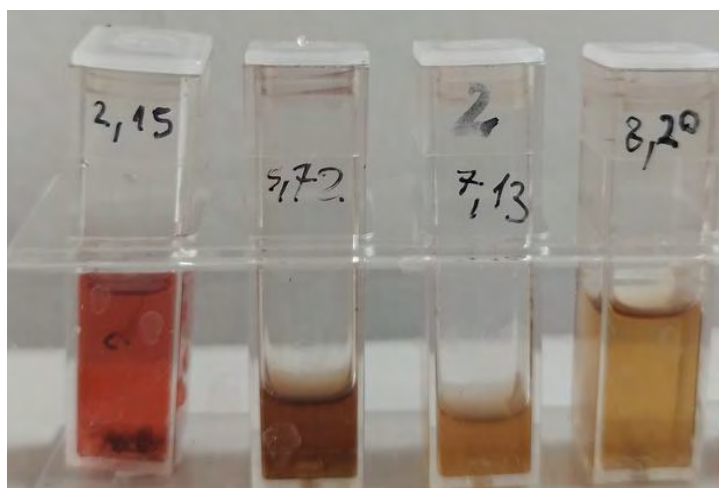
2. Eksperimentalni dio

Uzorci antocijanina korišteni u ovom istraživanju izdvojeni su iz kupina (*Rubus fruticosus* L.). Tijekom ekstrakcije antocijanina, plodovi kupine usitnjeni su u tarioniku uz dodatak vode u omjeru 1 mL vode na 1 g ploda. Izdvojeni tekući dio smjese zatim je prebačen u kivete te je centrifugiran 10 minuta pri brzini od 6000 rpm, čime je dobiven bistri supernatant. Nakon centrifugiranja, vodeni ekstrakt antocijanina pohranjen je u kivetama zatvorenim čepovima kako bi se izbjeglo isparavanje. Tijekom skladištenja, uzorci su čuvani na 8 °C.

Prije početka eksperimentalnih mjerenja, izmjerena je pH-vrijednost vodenog ekstrakta antocijanina, a zatim je, spektrofotometrom snimljen njegov apsorpcijski spektar u intervalu od 400 do 750 nm. Na temelju snimljenog spektra za daljnja mjerenja apsorbancije uzoraka pri različitim temperaturama ili pH-vrijednostima u određenom vremenskom intervalu, odabrana je valna duljina od 526 nm, pri kojoj uzorak pokazuje visoku apsorbanciju. Sva mjerenja apsorbancije provedena su pri 27 °C.

Tijekom ispitivanja utjecaja temperature na stabilnost antocijanina korištena je prva polovina vodenog ekstrakta antocijanina, koja je podijeljena na četiri uzorka. Zatim su uzorci antocijanina izloženi jednoj od različitih temperatura (27, 40, 60 i 80 °C) u vodenoj kupelji, koja je omogućila ravnomjerno zagrijavanje uzoraka. Apsorbancija svakog uzorka mjerena je svakih pola sata pri 526 nm tijekom četiri sata zagrijavanja.

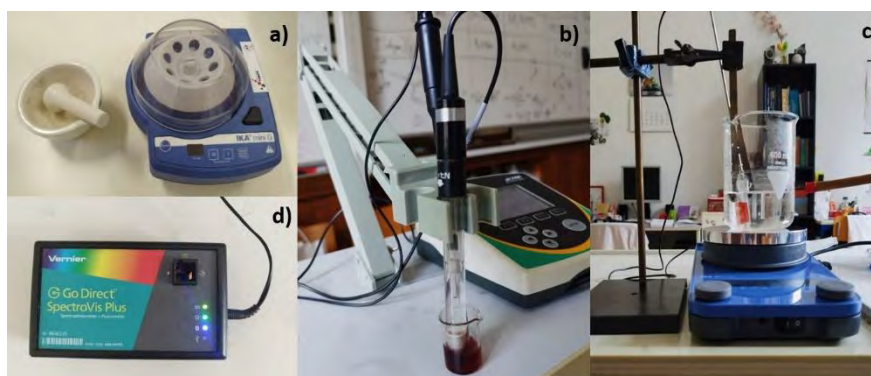
Druga polovina ekstrakta korištena je pri ispitivanju utjecaja različitih pH-vrijednosti na stabilnost antocijanina. Za pripremu otopina antocijanina različitih pH-vrijednosti korišteni su citratni puferi pH-vrijednosti 2 i 6, te boratni puferi pH-vrijednosti 8 i 9. Dodatkom 2 mL odgovarajućeg pufera u 1 mL ekstrakta, pripremljene su otopine antocijanina (slika 3) čije su pH-vrijednosti (2,15, 5,72, 7,13 i 8,20) izmjerene pH-metrom.



Slika 3 – Eksperimentalni tijek rada: a) korišteni materijali pri ekstrakciji antocijanina; b) mjerenje pH-vrijednosti; c) zagrijavanje u vodenoj kupelji; d) spektrofotometar

Fig. 3 – Experimental workflow: a) materials used for anthocyanin extraction; b) measurement of pH value; c) heating treatment of sample in water bath; d) spectrophotometer

Nakon pripreme, svakoj je otopini snimljen apsorpcijski spektar u intervalu od 400 do 750 nm. Potom je ponovljen postupak zagrijavanja u vodenoj kupelji na 80 °C u trajanju od tri sata. Apsorbancije uzoraka su mjerene svakih sat vremena pri valnoj duljini 526 nm kako bi se utvrdio utjecaj različitih pH-vrijednosti na razgradnju antocijanina pri visokim temperaturama.

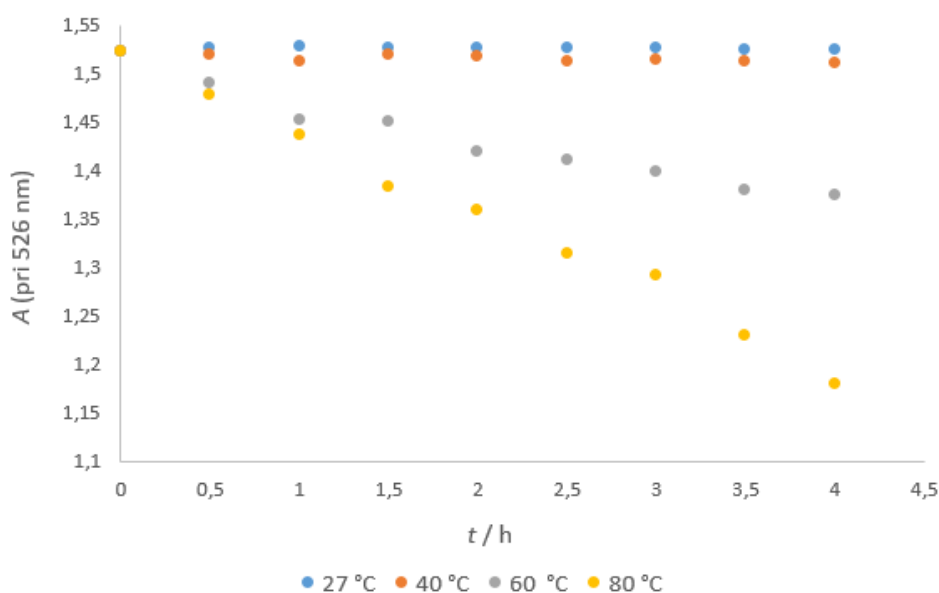


Slika 4 – Otopine antocijanina različitih pH-vrijednosti

Fig. 4 – Solutions of anthocyanins at different pH values

3. Rezultati i rasprava

Na temelju rezultata mjerenja (slika 5) vidljivo je da nakon izlaganja antocijanina temperaturama od 27 i 40 °C, apsorbancija pri 526 nm ostaje gotovo nepromijenjena, što ukazuje na veću stabilnost kemijske strukture antocijanina pri navedenim temperaturama. Međutim, pri višim temperaturama od 60 i 80 °C opažen je pad apsorbancije, pri čemu se apsorbancija pri 60 °C smanjila za 9,78 %, a pri 80 °C za 22,51 % u odnosu na početnu.



Slika 5 – Ovisnost apsorbancije vodenog ekstrakta antocijanina o vremenu izloženosti određenoj temperaturi

Fig. 5 – Dependence of the absorbance of water extract of anthocyanin
 on exposure time to a certain temperature

Razlika u padu apsorbancije pri temperaturama od 60 i 80 °C ukazuje na brže raspadanje antocijanina pri 80 °C. Zbog toga je određena prosječna brzina trošenja antocijanina nakon četiri sata zagrijavanja na 60 i 80 °C. Prosječna brzina trošenja iskazana je jednačbom 2, što je u skladu s Lambert-Beerovim zakonom (jednačba 1), koji definira proporcionalnost između apsorbancije i koncentracije.⁶

$$A = \varepsilon bc \Rightarrow A \sim c \quad (1)$$

gdje je:

A – apsorbancija, ε – molarna apsorptivnost ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), b – duljina puta svjetlosti kroz uzorak (cm), c – množinska koncentracija (mol L^{-1})

$$\bar{v}(R) = -\frac{\Delta A(R)}{t} \sim -\frac{\Delta c(R)}{t} \quad (2)$$

gdje je:

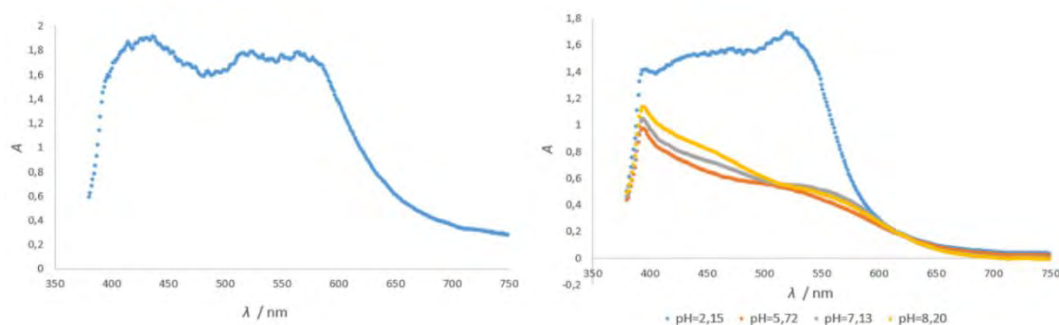
$\bar{v}$ – prosječna brzina trošenja (h^{-1}), ΔA – promjena apsorbancije, t – vrijeme (h), Δc – promjena množinske koncentracije (mol L^{-1})

Uvrštavanjem prikupljenih podataka tijekom istraživanja, dobivamo sljedeće vrijednosti prosječne brzine trošenja pri 60 i 80 °C:

$$\bar{v}_{60^{\circ}\text{C}}(\text{antocijanin}) = -\frac{1,375 - 1,524}{4 \text{ h}} = 0,03725 \text{ h}^{-1} \quad (3)$$

$$\bar{v}_{80^{\circ}\text{C}}(\text{antocijanin}) = -\frac{1,181 - 1,524}{4 \text{ h}} = 0,08575 \text{ h}^{-1} \quad (4)$$

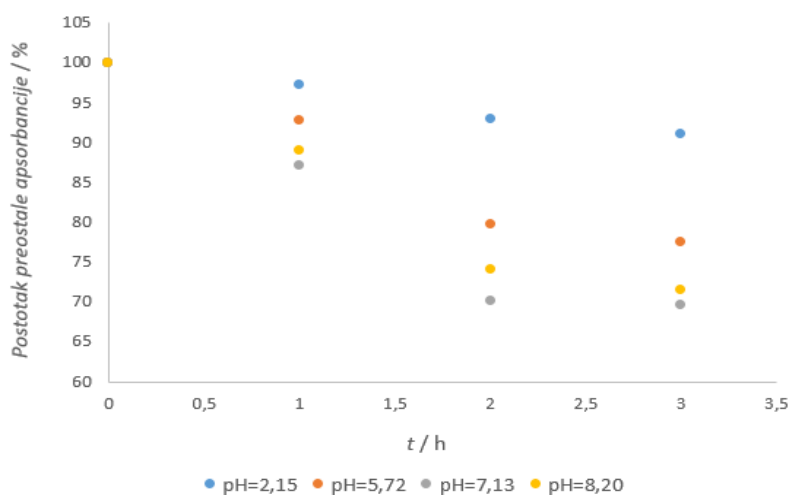
Konačno, pri 80 °C prosječna brzina trošenja antocijanina bila je 2,3 puta veća, nego pri 60 °C. Iz slika 6 i 7 vidljivo je da dodatak pufera značajno utječe na spektar antocijanina, mijenjajući njegov oblik u odnosu na početni spektar pri pH-vrijednosti od 3,46, što upućuje na nastanak novih kemijskih struktura antocijanina.



*Slike 6 i 7 – Početni vis-spektri vodenog ekstrakta antocijanina (slika 6)
 i otopina antocijanina različitih pH-vrijednosti (slika 7)*

*Figs. 6 and 7 – Initial Vis-spectra of the aqueous anthocyanin extract (Fig. 6)
 and anthocyanin solutions at different pH values (Fig. 7)*

S obzirom na moguću prisutnost različitih struktura, pretpostavljeno je da svaka otopina antocijanina prije zagrijavanja postiže maksimalnu apsorbanciju za specifičnu strukturu antocijanina, koja se zatim smanjuje s vremenom zagrijavanja. Stoga su rezultati utjecaja pH-vrijednosti na stabilnost antocijanina tijekom zagrijavanja (slika 8) iskazani u obliku postotka preostale apsorbancije (jednadžba 5).



*Slika 8 – Ovisnost postotka preostale apsorbancije otopina antocijanina
 različitih pH-vrijednosti o vremenu izloženosti temperaturi od 80 °C*

*Fig. 8 – Dependence of the percentage of remaining absorbance of anthocyanin solutions
 at different pH values to a temperature of 80 °C*

$$\text{postotak preostale apsorbancije} = \frac{A_{\text{trenutno}}}{A_{\text{početno}}} \times 100\% \quad (5)$$

Iz rezultata prikazanih na slici 8, vidljivo je da najviši postotak preostale apsorbancije, nakon 3 sata zagrijavanja, postignut pri pH-vrijednosti 2,15. Nadalje, povišenje pH-vrijednosti na 5,72, 7,13 i 8,20 dovelo je do smanjenja preostale apsorbancije na 77,65 %, 69,71 % i 71,51 %, pri čemu je najniži postotak postignut pri pH-vrijednosti 7,13.

4. Zaključci

Istraživanje je pokazalo da dugotrajna izloženost različitim temperaturama ima značajan utjecaj na stabilnost antocijanina u vodenom ekstraktu. Pri pH-vrijednosti 3,46, apsorbancija antocijanina pri 526 nm ostaje konstantna do 40 °C. Međutim, izlaganje temperaturama od 60 °C i 80 °C tijekom 4 sata, uzrokuje značajno smanjenje apsorbancije. Dakle, dobiveni rezultati potvrđuju prvu hipotezu, prema kojoj povišena temperatura ubrzava razgradnju antocijanina. U skladu s drugom hipotezom, koja je predviđala da pH-vrijednost utječe na stabilnost antocijanina, utvrđeno je da snižavanje pH-vrijednosti otopine na 2,15 znatno povećava otpornost antocijanina na temperaturu od 80 °C. Štoviše, pri pH-vrijednosti 2,15 antocijanini zadržavaju čak 22,21 % više početne apsorbancije pri 526 nm, u usporedbi s antocijaninima pri pH-vrijednosti 7,13. To ukazuje da kiselo okruženje može poboljšati otpornost antocijanina na visoke temperature.

Zaključno, za izradu DSSC-a koje koriste antocijanine kao fotoelektrična sredstva, preporučuje se održavanje temperature ispod 40 °C te zakiseljavanje otopine antocijanina. Navedeni uvjeti osiguravaju veću stabilnost antocijanina, čineći DSSC-ove efikasnijima u pretvorbi svjetlosne energije.

Literatura

1. URL: <https://ourworldindata.org/electricity-mix> (15. 11. 2024.)
2. N. Y. Amogne, D. W. Ayele, Y. A. Tsigie, Recent advances in anthocyanin dyes extracted from plants for dye sensitized solar cell, Mater. Renew. Sustain. Energy **9** (23) (2020) 1-16, doi: <https://doi.org/10.1007/s40243-020-00183-5>.
3. URL: <https://www.enciklopedija.hr/clanak/antocijani> (15. 11. 2024.)

4. *S. Oancea*, A Review of the current knowledge of thermal stability of anthocyanins and approaches to their stabilization to heat, *Antioxidants* **10** (9) (2021) 13–37, doi: <https://doi.org/10.3390/antiox10091337>.
5. *A. Houghton, I. Appelhagen, C. Martin*, Natural blues: structure meets function in anthocyanins, *Plants* **10** (4) (2021) 726, doi: <https://doi.org/10.3390/plants10040726>.
6. *D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler*, Uvod u spektrofotometrijske analitičke metode, Osnove analitičke kemije. Vol 1, Školska knjiga, Zagreb, 1999, str. 500.

- **KAZALO AUTORA**
AUTHOR INDEX



B		Jukić, Slavica	209
Baričević, Nikica	1	Jurina, Tamara	86
Barlović, Nikolina	123	Jurinjak Tušek, Ana	86
Bašić, Anita	14		
Benković, Maja	86	K	
Bertović, Barbara	182	Kanižai Šarić, Gabriella	153
Bićanić, Aurora	194	Komes, Draženka	68
Blažić, Roko	1	Kovač, Mario	29
Brajnović, Ana	14	Kučić Grgić, Dajana	1, 29, 164
Bule Možar, Kristina	164	Kustura, Marija Željana	218
Bulić, Ida	139	Kuzmić, Lucija	106
		Kuzmić, Petra	106
Č			
Čivljaku, Anđela	209	L	
		Ladešić, Zvonimir	58
D		Lončar, Mateo	139
Dorner, Amanda	58		
		M	
Đ		Majić, Ivana	153
Đulabić, Luka	209	Mandura Jarić, Ana	68
		Meštrović, Ernest	106
E		Miletić, Ena	1
Eude, Solenn	68	Miloloža, Martina	164
		Mirt, Tin	164
F			
Faraguna, Fabio	49	N	
		Nikola Mužek, Mario	14
G		Normand-Dubeau, Cléa	68
Gajdoš Kljusurić, Jasenka	86		
Glavaš, Zoran	139	O	
Grahovac, Patrik	49	Očelić Bulatović, Vesna	1, 29, 139, 164
H		P	
Halasz, Ivan	106	Panić, Manuela	86
Horozić, Emir	209	Požar, Elena	194
		Pranjić, Nika	209
J			
Jozinović, Antun	29		

R

Rastija, Vesna	153
Rimaj, Nika	106
Rogošić, Marko	49

S

Stražičić, Karla	1
Svilović, Sandra	14

Š

Šabić Runjavec, Monika	182
Šeremet, Danijela	68
Španić, Nikola	123
Štrkalj, Anita	139
Šubarić, Drago	29

T

Tomić, Ella	209
Tonković, Juraj	58
Tot, Tatjana	194

V

Valinger, Davor	86
Vlahović, Lucija	1
Vojvodić Cebin, Aleksandra	68
Vugrin, Leonarda	106
Vuković Domanovac, Marija	182

Z

Zagajski Kučan, Kristina	49
Zeman, Antonia	86
Zovko, Mariela	209

Ž

Žgela Putniković, Marijana	218
Žiža, Jasminka	194
Žutić, Stipo	123

- **SPONZORI, DONATORI, PARTNERI
I IZLAGAČI**

***SPONSORS, DONORS, PARTNERS
AND EXHIBITORS***





PARTNER | PARTNER





Zlatni sponzori | *Gold sponsors*



<https://www.jgl.hr>



Čitavo stoljeće posvećeni
brizi za zdravlje.

pliva.hr





Srebrni sponzori | *Silver sponsors*



Anton Paar



since
1922

Great **people**
Great **instruments**

Anton Paar Croatia d.o.o.
Ulica Velimira Škorpika 24/1
10090 Zagreb
Croatia

T: +385 - 1 - 7776 - 745

www.anton-paar.com

Čuvajmo zdravlje zajedno!



www.belupo.hr
www.zdravobudi.hr

Doprinos društvu kroz znanost i tehnologiju

Shimadzu je vodeći svjetski proizvođač analitičkih i mjernih instrumenata. Nudimo sofisticirana i optimalna rješenja neophodna za istraživanje, razvoj i kontrolu kvalitete.

Naša rješenja!

Sustavi za plinsku kromatografiju (GC) osiguravaju pouzdanu i osjetljivu analizu hlapljivih spojeva sadržanih u uzorku.



Sustavi za plinsku kromatografiju - masenu spektrometriju (GC/MS) omogućuju brzu identifikaciju nepoznatih komponenti i preciznu kvantitativnu analizu, čak i za komponente u tragovima.



Masena spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) je tehnika u kojoj se induktivno spregnuta plazma koristi kao ionizacijski izvor, a detekcija se vrši masenom spektrometrijom.



Sustavi za visoko učinkovitu tekućinsku kromatografiju (HPLC) podržavaju širok raspon aplikacija, uključujući analizu hrane, lijekova te uzoraka iz okoliša.



Spektrofotometri mjere intenzitet svjetlosti koju apsorbiraju ili emitiraju kemijske tvari.



Sustavi za tekućinsku kromatografiju (LC) uspješno razdvaja tvari na osnovi razmjешtanja između čvrste stacionarne faze i tekuće mobilne faze.



Analizatori ukupnog organskog ugljika (TOC) mjere ukupnu količinu organskog ugljika u vodi, plinovima i čvrstim tvarima. Zadovoljavaju raznolik raspon potreba u područjima kao što su istraživanje okoliša, kontrola kvalitete i upravljanje procesima.



KONTAKTIRAJTE NAS!

Shimadzu d.o.o.
Zavrtnica 17, Zagreb, Hrvatska
tel. +385 1 6185 777
shimadzu@shimadzu.hr



Brončani sponzori | *Bronze sponsors*

Chemistry Solutions from Avantor®

Avantor® is proud to offer one of the largest selection of chemicals from one source to our customers. As well as extensive investment in our own chemical production, our mission is to make getting the products you need effortless.

LEARN
MORE AT
[SI.VWR.COM](https://si.vwr.com)

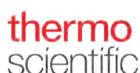
Avantor® carries a broad range of products to meet the specialized needs of all chemistry laboratories.

We offer high-quality products from the world's most trusted brands to help you and your colleagues answer the most challenging questions in biomedical research, environmental and forensic work, clinical diagnostics, and other materials science applications.

- Mass spectrometry
- High Performance Liquid Chromatography
- Low Pressure Chromatography
- Gas Chromatography
- Atomic Spectroscopy
- Molecular Spectroscopy
- Titration
- Karl Fischer water determination
- pH & Conductivity Measurement
- Physical Measurement
- X-ray fluorescence spectroscopy (XRF)



SUPPLIERS:



[VWR.COM](https://vwr.com)

VWR International GmbH

Graumannsgasse 7 | A-1150 Vienna | export.at@vwr.com | si.vwr.com



Svaki put uz vas

INA

VEĆ 60 GODINA



Tvrtka **Jasika d.o.o.** osnovana je 1997. godine sa sjedištem u Zagrebu i podružnicom u Splitu te sestrinskim firmama na području Bosne i Hercegovine, Slovenije i Srbije. Više od 20 godina usko je specijalizirana za zastupanje, uvoz i distribuciju te održavanje razne laboratorijske opreme i usluga svjetskih renomiranih proizvođača. Danas zapošljava oko 40 visoko obrazovanih djelatnika, uz organizacijsku strukturu podijeljenu na 4 odjela. Odjel za medicinske proizvode, Odjel medicinske dijagnostike, Farmaceutski odjel povezan s lijekovima te Odjel Analitike na koji se uspješno proširila prije otprilike pet godina.

Odjel Analitike tvrtke Jasika d.o.o. specijaliziran je za distribuciju laboratorijske opreme brojnih renomiranih svjetskih proizvođača od kojih izdvajamo PerkinElmer u područjima molekularne spektroskopije (UV-Vis, FT-IR, fluorimetrija), termalne analize (DSC, TGA, STA i DMA), kromatografije (GC, LC, GC-MS, LC-MS/MS), hipernacijskih sustava (IR-TGA, TGA-GC/MS, IR-TGA-GC/MS) te anorganskih tehnika analize (AAS, ICP-OES i ICP-MS), Berghof (uređaji za mikrovalnu digestiju, reaktori te pročišćivači kiselina), ColeParmer (SpexSamplePrep - homogenizatori, kriogeni mlinovi te SpexCertiPrep standardi i custom made standardi), Labtech (generatori plinova, centrifuge, uparivači) te Evoqua (uređaji za vodu). Evoqua (uređaji za vodu). Odjel Analitike također obuhvaća i program Life Science namijenjen za istraživačke i dijagnostičke institucije u poljima biokemije, molekularne i stanične biologije, protočne citometrije te mikrobiologije. Program se specijalizirao za distribuciju opreme brojnih renomiranih svjetskih proizvođača poput Revvity (čitači mikrotitarskih pločica, homogenizatori, NGS reagensi), eBioscience (ELISA, protutijela), Luminex te PCR Biosystems.

Naš dinamičan tim stručnjaka uvest će Vas u svijet vodećih svjetskih tehnologija i inovacija i upravo za Vaše potrebe predložiti najbolje rješenje, a prodajni savjetnici s dugogodišnjim iskustvom stoje Vam na raspolaganju za sve informacije vezane za program prodaje instrumenata, potrošnog materijala i rezervnih dijelova te ideja za provedbu projekata.



<https://selvita.com/>

Partner | *Partner*



**SAMLJELI SMO
KOMADIĆE.
NITKO NEĆE
VIDJETI
TVOJ TAJNI
SASTOJAK.**

Sve ima bolji
okus s Vegetom.





Sponzori, donatori, izlagači | Sponsors, donors, exhibitors



AGROPROTEINKA

PRERADA NUSPROIZVODA I ZDRAVLJE LJUDI I OKOLIŠA

Vjerojatno ste već puno puta čuli da biorazgradivi ostaci i nusproizvodi životinjskog podrijetla nisu otpad i da njihova prerada ima višestruku korist. Skupljanjem otpada i nusproizvoda sprječava se njihovo gomilanje u okolišu te se na taj način čuva okoliš, a i širenje potencijalnih zaraznih bolesti. To je prva, ujedno i najvažnija korist razdvajanja i skupljanja otpada. Druga korist od skupljenih nusproizvoda i otpada je njihova prerada. Preradom se dobivaju novi vrijedni proizvodi te se potiče načelo kružnog gospodarstva. Novi proizvodi mogu se koristiti u različitim industrijama poput kemijske, prehrambene, energetske i u pet food industriji. Ono što je pritom ključno naglasiti je da se pravilnim zbrinjavanjem čuva zdravlje ljudi i životinja te vodi briga o našem okolišu. Stoga je javnozdravstvena uloga ove djelatnosti, njezin glavni i središnji naglasak. Skupljanje nusproizvoda životinjskog podrijetla je neposredna aktivnost na suzbijanju zaraznih bolesti. Bez nje, bez pravovremenog i ispravnog prikupljanja odvoza i zbrinjavanja nusproizvoda, zarazne bi se bolesti mogle nekontrolirano širiti. Zamislimo samo koliko se na dnevnoj razini proizvede otpada po jednoj osobi, dodajmo tome otpad u ugostiteljstvu, prehrambenoj industriji, farmama i slično, i da se sav taj otpad odloži u prirodi, improvizacijski zakopa po poljima, ili spontano baci u rijeke ili jezera itd. Bilo bi to pogubno za zdravlje ljudi i životinja i stanje okoliša. Jednostavno, zaštita zdravlja ljudi i životinja i očuvanje zdravog okoliša preduvjet je svake sigurnosti i budućnosti života uopće.

Kako bi se ideje o ispravnom razdvajanju i o našoj vlastitoj odgovornosti spram otpada koji stvaramo proširile društvom i došle do što većeg broja ljudi, potrebna je trajna edukacija, pozitivni primjeri, prenošenje znanja sa stručne javnosti na sve razine i skupine javnosti i društva. Otvorenošću znanstvene i poslovne zajednice prema okruženju putem edukacija, potporama, organiziranjem i poticanjem različitih ekoloških akcija, stvara se i njeguje kultura i spoznaja o vrijednosti očuvanja prirode kao temeljnog preduvjeta opstanka života. To je najbolji i najuvjerljiviji način vraćanja prirodi i okolišu ono što od njih i dobivamo. I konačno, potvrđuje da priroda svoju cjelovitost i svoje zdravlje može vratiti i sačuvati samo ako s njom surađujemo. Jer ako okoliš ne bude zdrav, neće niti čovjek biti zdrav. Čovjek i okoliš jedino i mogu živjeti i opstati zajedno.

<https://www.agroproteinka.hr/>

Bio-mi d.o.o. je mala i srednja tvrtka za istraživanje i razvoj sa sjedištem u Matuljima, posvećena proizvodnji termoplastičnih materijala i proizvoda iz biološkog izvora koji se koriste za proizvodnju primarne i sekundarne ambalaže te poljoprivrednih proizvoda.

Glavne aktivnosti tvrtke uključuju napredni inženjering novih materijala na osnovi biomase i održivih plastičnih materijala. Prvi smo proizvođač certificiranih granulata i proizvoda u Istočnoj i Jugoistočnoj Europi, a ponosno ističemo da smo jedni od malobrojnih proizvođača na svijetu koji će nakon dvije godine analize, u vrlo kratkom roku, ishodovati i TUV certifikat za biorazgradnju u tlu kojim će se svakom poljoprivredniku, tj. korisniku folije za malčiranje, jamčiti potpuna biorazgradnja, bez rizika onečišćenja tla ili kontaminacije usjeva. Upravo iz osjetljivosti proizvoda koji direktno utječe na proizvodnju hrane, sama analiza i proces ishodovanja certifikata je dugotrajan i iznimno temeljit.

Sve znanstveno-istraživačke aktivnosti unutar tvrtke možemo podijeliti na nekoliko područja:

- Inovativni Horizon 2020 i Horizon Europe projekti koji se provode za Europsku komisiju. Unutar tih projekata razvijaju se najsuvremenija (*state-of-the-art*) rješenja koja još ne postoje na tržištu, a koja bi trebala u bliskoj budućnosti zamijeniti proizvode dobivene iz fosilnih izvora.
- Interne aktivnosti u kojima razvijamo vlastite formulacije za proizvodnju materijala i proizvoda za tržište. Skoro svaki proizvod ima biološku alternativu samo treba odabrati kompoziciju materijala koja najbolje odgovara finalnom proizvodu koji želimo proizvesti, a da pritom očuvamo, tj. ne narušimo svojstva
- Privatni znanstveno-istraživački projekti u kojima, u suradnji s klijentima iz raznih područja, razvijamo formulacije za specifičan proizvod koji se treba zamijeniti održivijim

Naše aktivnosti imaju za cilj proizvodnju materijala na biološkoj osnovi koji bi zamijenili materijale iz tradicionalnih, fosilnih izvora, istražujući na taj način biorazgradivost i mogućnost recikliranja bioloških materijala, procjenjujući njihov potencijal, posebno biopolimera i bioplastike.

Osim razvijanja novih sastavnih elemenata (*building blocks*) i materijala na biološkoj osnovi, Bio-Mi pruža usluge savjetovanja i edukacije u području transformacije i reciklaže plastike i ostalih naprednih materijala u gotove proizvode koji su u skladu s ciljevima bioekonomije. Ukratko, želimo pridonijeti održivoj budućnosti i odgovoriti na društvene izazove koji su povećanjem fosilne plastike u sustavu sve veći.

Bio-Mi je jedna od rijetkih tvrtki u Hrvatskoj i ovom dijelu Europe koja je postala punopravna članica Konzorcija bio-industrije (BIC) i nastoji aktivno pridonijeti razvoju bioekonomije u Europi sudjelujući sa ostalim članovima konzorcija na kolaborativnim projektima koji su direktno usmjereni na bioindustriju. Konzorcij bio-industrije omogućava da se dizanjem svijesti potrošača i umreživanjem svih sudionika lanca vrijednosti u inovativne projekte s ambicioznim ciljevima, poveća konkurentnost bio proizvoda, kreiraju radna mjesta u bioindustriji, i u konačnici stvori klimatski-neutralna i resursno učinkovita Europa koja je konkurentna na globalnoj sceni.



U EMUS-u ponosno nudimo širok spektar prilagođenih rješenja za kontrolu kvalitete zahvaljujući našem dugogodišnjem iskustvu i stručnosti. Bez obzira tražite li standardni proizvod ili prilagođeno rješenje, naš tim stručnjaka ovdje je da vam pomogne pronaći pravo rješenje za vašu specifičnu primjenu.

Naša sveobuhvatna ponuda pruža korisnicima rješenje koje će ih podržavati tijekom čitavog procesa. Od instalacije do održavanja, naš koncept je osmišljen kako bi zadovoljili vaše specifične potrebe i napravili razliku u vašem poslovanju. Pouzdajte se u EMUS za sve vaše potrebe u rješenjima za kontrolu kvalitete i opremanje postrojenja, tvornica, inspeksijskih kuća, laboratorija, instituta.

EMUS održava partnerske odnose s vodećim proizvođačima u industriji, što nam omogućuje da našim klijentima ponudimo najbolje sustave za kontrolu kvalitete, mjerenje i usluge. U EMUS-u shvaćamo važnost održavanja visokih standarda kontrole kvalitete u vašem poslovanju. Zato se naš tim posvećuje pružanju inovativnih rješenja. S EMUS-om možete biti sigurni da su vaše potrebe za kontrolom kvalitete u stručnim rukama. Nadogradite svoje procese kontrole kvalitete s nama već danas, i doživite razliku brzo i osobno.

EMUS pruža sustave za kontrolu kvalitete, ispitivanje zahvaljujući bliskim partnerskim odnosima s vodećim proizvođačima u industriji. Naš se tim posvećuje osiguravanju preciznosti i pouzdanosti u svakom sustavu koji isporučujemo, uključujući instalaciju, održavanje i kalibraciju. Nadogradite svoje poslovanje s našim stručnim rješenjima i doživite razliku s EMUS-om.

EMUS je na čelu uvođenja novih tehnologija pružajući pouzdana rješenja za mjerenje svojstva materijala i komponenti. Pouzdajte se u EMUS za rješenja za mjerenje, kontrolu kvalitete i ispitivanja materijala.

S potporom naših partnera, EMUS može biti vaš pouzdani dobavljač novih tehnologija za vas!

Naši partneri:

- Affri
- Bruker Alicona
- Comet Xray
- Eddyfi
- CGM NDT
- GNR Italy
- IBG
- Vericon
- Vigor
- BowmanXRF
- Uniterm
- Acer Industries

Industrije:

- Automobilska
- Elektronika
- Avio-industrija
- Strojna obrada
- Metalurgija
- Baterije
- Kemijska industrija
- Laboratoriji

Stručnost:

- Kemijska analiza
- Metrologija
- NDT Ispitivanja bez razaranja
- X-Ray tehnologije
- Računalni vid
- Ispitivanje materijala

Usluge:

- Instalacija
- Podrška
- Obuke
- Servis
- Mjerenja



IZDAVAČI | PUBLISHERS

Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa
Croatian Society of Chemical Engineers

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Josip Juraj Strossmayer University of Osijek Faculty of Food Tehnology Osijek

Zagreb i Osijek, 2025.