



**XL JUBILARNO SAVETOVANJE
Srpskog hemijskog društva**
Beograd, 14-15. Juni 2012.

Ovaj kompakt disk (CD) sadrži elektronsku Knjigu radova
(u pdf formatu) prezenovanih u okviru
50. savetovanja Srpskog hemijskog društva

U knjizi su **plavom bojom** obeleženi aktivni linkovi ka pojedinim njenim delovima, odnosno to su prečice iz Sadržaja i Indexa autora koje vode do naznačenih stranica.

U vrhu svake strane nalaze se prečice ka **Impresumu** i **Sadržaju** knjige, ka **Indexu** autora, kao i opcijama za štampanje (**Print**), zatvaranje dokumanta, odnosno izlaz iz knjige (**Exit**), i za povratak na ovu stranicu (**Intro**)

Pored toga na disku se nalazi i elektronska kopija (u pdf formatu) Programa i Kratkih izvoda radova prezentovanih na Savetovanju.
Možete joj pristupiti klikom **OVDE**

Da bi se pregledao CD-a potrebno je da na računaru bude postavljen program Adobe Reader.

Ovaj program može se postaviti na računar preko sledeće prečice:
[Adobe Reader 7.0.](#)

**Golden Jubilee Meeting of
the Serbian Chemical Society**
Belgrade, June 14-15, 2012

This CD contains Proceedings
(single pdf file) from
50th Meeting of the Serbian Chemical Society

One can navigate easily through the book contents by a single click on the appropriate links in Contents and Author Index
(**showed in blue color**)

All contents of the Proceeding can be accessed through following shortcuts existing at the top of each page:
Impresum (Impress of the Proceedings), **Contents**, **Index** (Author Index), **Print** (Print manager), **Exit** (which closes the CD) and **Intro** (which leads to this page).

CD contains also a copy of Programme and Book of Abstracts, which can be accessed by clicking **HERE**.

In order to access the book contents, the Adobe Reader has to be installed on PC.

One can install this application by clicking on the following link:
[Adobe Reader 7.0.](#)

Srpsko hemijsko društvo
Serbian Chemical Society



**50. JUBILARNO
SAVETOVANJE
SRPSKOG HEMIJSKOG
DRUŠTVA**

KNJIGA RADOVA

Golden Jubilee Meeting of
the Serbian Chemical Society

Proceedings

Beograd, 14-15. juni 2012.
Belgrade, April 14-15, 2012

CIP - Каталогizacija u publikaciji
Narodna biblioteka Srbije, Beograd

54(082) (0.034.2)

66(048) (0.034.2)

СРПСКО хемијско друштво (Београд). Саветовање (50 ; 2010 ; НОВИ САД)

Knjiga radova [Elektronski izvor] = Proceedings / XLVIII savetovanje Srpskog hemijskog društva, Novi Sad, 17-18 april 2010. = 48th Meeting of the Serbian Chemical Society, Novi Sad, April 17-18, 2010 ; [organizator] Srpsko hemijsko društvo = [organized by] Serbian Chemical Society ; [urednici, editors Rade Marković, Goran Bošković, Aleksandar Dekanski]. - Beograd : Srpsko hemijsko društvo, 2010 (Novi Sad : Srpsko hemijsko društvo) . - 1 elektronski optički disk (CD-ROM) : slika, tekst. ; 12 cm

Radovi na srp. i engl. jeziku. - Tiraž 180. - Nasl. sa naslovnog ekrana. - Bibliografija uz većinu radova. - Registar.

ISBN 978-86-7132-037-

1. Српско хемијско друштво (Београд)

а) Хемија – Зборници б) Технологија –Зборници

COBISS. SR-ID 137069324

XL SAVETOVANJE SRPSKOG HEMIJSKOG DRUŠTVA, BEOGRAD 14-15. JUNI 2012.

Knjiga radova

50th Meeting of the Serbian Chemical Society, Belgrade, Serbia, June 14-15, 2012

Proceedings

Izdaje / Published by

Srpsko hemijsko društvo / Serbian Chemical Society

Karnegijeva 4/III, Beograd, Srbija

tel./fax: 011 3370 467; www.shd.org.rs, E-mail: Office@shd.org.rs

Za izdavača / For Publisher

Ivanka POPOVIĆ, predsednik Društva

Urednici / Editors

Živoslav ***TEŠIĆ***

Aleksandar ***DEKANSKI***

Dizajn, slog i kompjuterska obrada teksta / Design, Page Making and Computer Layout

Aleksandar ***DEKANSKI***

Tiraž / Circulation

200 primeraka / 200 Copy

Umnožavanje / Copying

Srpsko hemijsko društvo / Serbian Chemical Society - Karnegijeva 4/III, Beograd, Srbija

ISBN 978-86-7132-049-8

Sadržaj / Contents

PLENARNA PREDAVANJA / PLENARY LECTURES.....	1
<i>Sпектроскопско истраживање реакција и структурна karakterizacija kompleksa zlata(III) sa пептидима.....</i>	<i>2</i>
<i>Милош И. Ђуран, Биљана Ђ. Глишић, Уршула Рихлевска.....</i>	<i>2</i>
<i>Spectroscopic investigation of reactions and structural characterization of gold(III) complexes with peptides</i>	<i>6</i>
SAOPŠTENJA / CONTRIBUTIONS.....	7
ANALITIČKA HEMIJA / ANALYTICAL CHEMISTRY.....	8
<i>Микроекстракција pesticida iz vodenih uzoraka sa jonskim течностима као екстрагентом.....</i>	<i>8</i>
<i>Татјана М. Тртић-Петровић.....</i>	<i>8</i>
<i>Ionic liquid based microextraction of the pesticides from selected water samples.....</i>	<i>11</i>
<i>Утицај матрикса јабуче, вишње и брескве на одређивање остатака pesticida</i>	<i>12</i>
<i>Gorica Lj. Vuković, Vojislava P. Bursić, Sanja D. Lazić, Bojana D. Špirović.....</i>	<i>12</i>
<i>Effect of apple, sour cherry and peach matrices on the determination of pesticide residues.....</i>	<i>15</i>
<i>Influence of different carbonization and activation parameters on pesticide adsorption on carbon monolith.....</i>	<i>16</i>
<i>Marija M. Vukčević, Ana Kalijadis, Biljana Babić, Zoran Laušević, Mila D. Laušević.....</i>	<i>16</i>
<i>Утицај параметара карбонизације и активације на адсорпцију pesticida на површини карбон монолита.....</i>	<i>19</i>
ELEKTROHEMIJA / ELECTROCHEMISTRY	20
<i>Cyclic voltammetric detection of epinephrine, ascorbic acid and uric acid using TX-100 modified carbon paste electrode.....</i>	<i>20</i>
<i>Bahadurgatta E. Kumara Swamy and Bananakere N. Chandrashekar.....</i>	<i>20</i>
HEMIJSKO INŽENJERSTVO / CHEMICAL ENGINEERING.....	25
<i>Preparation and characterization of hot-melt extruded solid dispersions of carbamazepine.....</i>	<i>25</i>
<i>Jelena Đuriš, Ioannis Nikolakakis, Svetlana Ibrić, Zorica Đurić, Kyriakos Kachrimanis.....</i>	<i>25</i>
<i>Karakterizacija čvrstih disperzija karbamazepina израђених методом екструзије топљењем</i>	<i>28</i>
<i>Controlled release of carbamazepine from tablets with self – emulsifying pellets</i>	<i>30</i>
<i>Mladen R. Milović, Svetlana R. Ibrić.....</i>	<i>30</i>
<i>Modifikovano oslobađanje karbamazepina iz tableta sa samolemljivajućim peletama.....</i>	<i>34</i>
<i>Experimental measurements of volumetric properties, refractive index and viscosity of the ternary system dimethyladipate + 2-butanone + 2-butanol.....</i>	<i>36</i>
<i>Андјела Б. Кнежевић Стевановић, Софија П. Мишков, Дивна М. Бајић, Душан К. Грозданић, Мирјана Лј. Кљевић.....</i>	<i>36</i>
<i>Експериментално одређивање волуметријских својстава, индекса рефракције и вискозности тернарног система диметиладипат + 2-бутанон + 2-бутанол.....</i>	<i>39</i>
<i>Determination of viscosity of aqueous alkanolamine solutions as potential carbon dioxide removal reagents.....</i>	<i>41</i>
<i>Вук Д. Спасојевић, Слободан С. Шербановић, Бојан Д. Ђорђевић, Мирјана Лј. Кљевић.....</i>	<i>41</i>
<i>Одређивање вискозности водених раствора алканолamina – потенцијалних агенса за уклањање угљен-диоксида.....</i>	<i>44</i>
<i>Анализа и моделовање разменјивача топлоте gas-gas.....</i>	<i>46</i>
<i>Татјана Калудеровић Радоичић, Зорана Арсенијевић, Мирјана Мунџан, Мирјана Кљевић, Жељко Грбавчић.....</i>	<i>46</i>
<i>Mathematical modeling and analysis of gas-gas heat exchanger</i>	<i>49</i>

Kretanje čestica u fluidizovanom sloju tečnost-čestice	51
Mihal Đuriš, Zorana Arsenijević, Tatjana Kaluderović Radoičić, Radmila Garić-Grulović,.....	51
Particle movement in liquid fluidized beds	54
Ispitivanje fluidizacionih karakteristika filtracionog peska	56
Mihal M. Đuriš, Zorana Lj. Arsenijević, Rada V. Garić-Grulović, Darko R. Jaćimovski, Željko B. Grbavčić.....	56
Analysis of filtration sand fluidization characteristics	59
Correlation of Liquid-liquid Equilibria by NRTL Model	61
Nikola D. Grozdanić, Gorica R. Ivaniš, Zoran P. Višak, Slobodan P. Šerbanović, Mirjana Lj. Kijevečanin.....	61
Korelisanje podataka za ravnotežu tečnost-tečnost pomoću NRTL modela	64
Forced Path Mechanical Calibration method establishment for high pressure density measurements	65
Lazar Drašković, Aleksandar Tasić, Jelena Vuksanović, Ivona Radović, Mirjana Kijevečanin	65
Uspostavljanje „Forced Path Mechanical Calibration” metodologije za merenja gustine na visokim pritiscima	68
Analogija prenosa količine kretanja, toplote i mase u vertikalnom toku pseudofluida	70
Radmila V. Garić-Grulović, Željko B. Grbavčić, Nevenka M. Bošković-Vragolović, Darko R. Jaćimovski, Zorana Lj. Arsenijević, Mihal M. Đuriš.....	70
The analogy among momentum, heat and mass transfer in vertical flow of a pseudofluid	74
METALURGIJA / METALLURGY	75
Tehnološke mogućnosti za smanjenje sadržaja arsena u nestandardnim koncentratima bakra	75
Aleksandra Mitovski, Nada Štrbac, Ivan Mihajlović, Velibor Andrić, Miroslav Sokić.....	75
Technological options for the reduction of arsenic content in the nonstandard copper concentrates	78
NAUKA O MATERIJALIMA / MATERIAL SCIENCE	80
Novel long-chain alkyl polyglucoside as a prospective stabilizer for dermal delivery systems	80
Milica Lukić, Ivana Pantelić, Rolf Daniels, Gordana Vuleta, Snežana Savić.....	80
Alkil poliglukozidni emulgator dugog lanca: nova generacija stabilizatora sistema za dermalnu isporuku	85
Radijaciono-hemijska sinteza termoosetljivih srebro/poli(N-izopropilakrilamid) hidrogel nanokompozita	86
Jelena P. Spasojević, Jelena I. Krstić, Aleksandra N. Radosavljević, Melina T. Kalagasidis-Krušić, Zorica M. Kačarević-Popović.....	86
Radiation-chemical synthesis of thermosensitive silver/poly(N-isopropylacrilamide) hydrogel nanocomposites	89
The crystallization of glass powders from the system $\text{Li}_2\text{O}-\text{Al}_2\text{O}_3-\text{GeO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$	91
Mihajlo B. Tošić, Srđan D. Matijašević, Snežana R. Grujić, Vladimir D. Živanović, Jovica N. Stojanović, Jelena D. Nikolić and Sonja V. Ždrale.....	91
Kristalizacija praha stakla iz sistema $\text{Li}_2\text{O}-\text{Al}_2\text{O}_3-\text{GeO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$	94
Annel hardening effect in thermomechanically treated a cast copper-gold alloy	95
Svetlana Nestorović, Ivana Marković, Dragoslav Gusković, Desimir Marković.....	95
Efekat ojačavanja žarenjem u termomehanički obrađenoj bakar-zlato livenoj leguri	98
Sintering of glasses in the ternary system $\text{La}_2\text{O}_3-\text{SrO}-\text{B}_2\text{O}_3$ studied by hot-stage microscopy	99
Sonja V. Ždrale, Snežana R. Grujić, Mihajlo B. Tošić, Vladimir D. Živanović, Anđelika Z. Bjelajac, Srđan D. Matijašević, Jelena D. Nikolić, Snežana N. Zildžović.....	99
Ispitivanje sinterovanja trokomponentnog sistema stakla $\text{La}_2\text{O}_3-\text{SrO}-\text{B}_2\text{O}_3$ primenom termomikroskopa	101
Polimerni kompleksi na bazi amidovanog pektina i montmorilonita za uklanjanje Basic Yellow 28 boje iz vodenih rastvora	102
Aleksandra R. Nešić, Sava J. Veličković, Dušan G. Antonović.....	102
Polymer complexes based on amidated pectin and montmorillonite for removal the Basic Yellow 28 dye from aqueous solutions	106

Sinteza i karakterizacija kompozitnih hidrogelova PMAA/zeolit A	107
Vesna V. Panić, Jelena G. Momić, Sava J. Veličković.....	107
The synthesis and characterization of PMMA/zeolite a composite hydrogels	110
HEMIJA ŽIVOTNE SREDINE / ENVIRONMENTAL CHEMISTRY	112
Determination of pesticide residues in working clothes	112
Nenad Andrić, Dragan Marković.....	112
Total VOCs emissions from screen printing	116
Jelena Kiurski, Savka Adamović, Ivana Oros, Dragan Adamović and Jelena Krstić.....	116
Emisija ukupnih VOC-ova u sito štampi	119
Проводљивост, рН и температура воде у акумулацију Врућици	120
Миленија Ј. Марковић, Драган Веселиновић.....	120
Conductivity, pH and temperature of water in the accumulation Vrutci	123
Sadržaj teških metala u reci Pek	124
Nada V. Babović, Tijana S. Čoporda-Mastilović, Mirjana B. Bartula, Dejan P. Marković.....	124
Heavy metals content in the Pek River	127
Ekstrakcija pesticida linurona i tebufenozida u membranskom kontaktoru na bazi poroznih kapilar	128
Jelena S. Đorđević, Tatjana M. Trtić-Petrović.....	128
Extraction of pesticides linuron and tebufenozid in a hollow fiber contactor	131
Determination of the natural zeolite capacity for the adsorptive removal of crystal violet dye from aqueous solution using response surface methods	132
Suzana I. Dimitrijević-Branković, Marija D. Pavlović, Aneta V. Buntić, Milica M. Randelović, Katarina R. Mihajlovski, Nevenka Z. Rajić, Dušan G. Antonović, Slavica S. Šiler-Marinković.....	132
Određivanje kapaciteta prirodnog zeolita u adsorptivnom uklanjanju boje kristal violet iz vodenog rastvora primenom metode površine odziva	136
Analiza tragova lekova i pesticida u komunalnoj otpadnoj vodi Beograda	137
Nikolina N. Antić, Marina M. Radišić, Svetlana D. Grujić, Tatjana M. Vasiljević, Mila D. Laušević.....	137
Determination of Pharmaceutical and Pesticide Residues in Belgrade Urban Wastewater	140
Biodegradacija kalemljenih kopolimera polistirena i skroba u rečnoj vodi	141
Vladimir B. Nikolić, Sava J. Veličković, Dušan G. Antonović, Aleksandar R. Popović.....	141
Biodegradation of polystyrene-graft-starch copolymers in river water	144
TEORIJSKA HEMIJA / THEORETICAL CHEMISTRY	146
CompChem (RS) aplikacija u okviru projekta HP-SEE. Dostupni računarski resursi, programi, prednosti i nedostaci	146
Branko J. Drakulić, Ivan O. Juranić.....	146
CompChem (RS) aplikacija u okviru projekta HP-SEE. Dostupni računarski resursi, programi, prednosti i nedostaci	149
BIOHEMIJA / BIOCHEMISTRY	150
Nanoscale Membrane Dynamics in Exocytosis: fine-tuning by PIP2 and Ca(II)	150
Dragomir D. Milovanovic, Alf Honigmann, Geert van den Bogaart.....	150
Nanonoskopski pregled dinamike membrane u egzocitozi: suptilna regulacija fosfatidil-inozitolom i Ca²⁺	156
Uticaj aktinidina - cistein proteaze iz kivija (Actinidia deliciosa) na ekspresiju proinflamatornih citokina u T84 epitelnim ćelijama humanog kolona	157
Milena Čavić, Milica Grozdanović, Radmila Janković, Marija Gavrović-Jankulović.....	157
The effect of actinidin – a kiwifruit (Actinidia deliciosa) cysteine protease on the expression of proinflammatory cytokines in T84 human colonic epithelial cells	160

Metal based photosensitizers of tetradentate Schiff base: Promising role in anti-tumor activity through singlet oxygen generation mechanism	161
Halehatty S. Bhojya Naik, Sirabadige M. Pradeepa, Atanu Barik, Indira K. Priyadarsini.....	161
Ispitivanje reakcije paracetamola sa Fentonovim reagensom i određivanje radical scavenging aktivnost DPPH metodom	165
Slavica M. Sunarić, Milica M. Radić.....	165
Investigation of the reaction of paracetamol with Fenton reagent and determination of DPPH radical scavenging activity	168
BIOTEHNOLOGIJA / BIOTECHNOLOGY	169
Yeast surface display expression and purification of chimera glucose oxidase construct with Aga2 protein	169
Marija Blazic, Gordana Kovacevic, Nevena Zelenovic, Raluca Ostafe, Marija Gavrovic-Jankulovic, Rainer Fischer, Radivoje Prodanovic.....	169
Prečišćavanje himere Aga2 proteina i glukoza oksidaze eksprimirane na površini ćelija kvasca	172
Cloning, heterologous expression and characterization of glucose oxidase mutants from Aspergillus niger in yeast Pichia pastoris	173
Gordana N. Kovačević, Marija Blažić, Bojana Draganić, Raluca Ostafe, Marija Gavrović-Jankulović, Rainer Fischer, Radivoje Prodanović.....	173
Kloniranje, heterologna ekspresija i karakterizacija mutanata glukoza oksidaze iz Aspergillus niger u kvascu Pichia pastoris	176
Zeolite/apatite system - nature mineral fertilizers	177
Marija L. Mihajlović, Mirjana Stojanović, Zorica Lopičić, Mirko Grubišić, Marija Petrović, Jelena Milojković, Dragan Radulović.....	177
Zeolit / apatit sistem – prirodna mineralna đubriva	179
Determination of exopolysaccharides production by lactic acid bacteria of water kefir grains	181
Miona G. Miljković, Sladjana Z. Davidović, Slavica S. Šiler-Marinković, Suzana I. Dimitrijević-Branković.....	181
Ispitivanje proizvodnje egzopolisaharida kod bakterija mlečne kiseline iz vodenog kefira	184
Enzymatic production of bioactive protein hydrolysates from egg white: effects of ultrasound on egg white proteins	186
Andrea B. Stefanović, Milena G. Žuža, Ana D. Gluvić, Verica B. Manojlović, Dejan I. Bezbradica, Branko M. Bugarski, Zorica D. Knežević-Jugović.....	186
Enzimaska proizvodnja bioaktivnih hidrolizata proteina belanceta: uticaj ultrazvuka na proteine belanceta	189
Poređenje imobilizacije peroksidaze iz soje na različite glicidil metakrilat polimere	191
Miloš Prokopijević, Olivera Prodanović, Dragica Spasojević, Željko Stojanović, Ksenija Radotić, Radivoje Prodanović.....	191
Comparison of soybean hull peroxidase immobilized on different glycidyl methacrylate polymers	194
Covalent immobilization of horseradish peroxidase on macroporous glycidyl methacrylate based copolymer	195
Olivera Prodanović, Miloš M. Prokopijević, Dragica R. Spasojević, Željko P. Stojanović, Ksenija D. Radotić, Zorica D. Knežević-Jugović, Radivoje Prodanović.....	195
Kovalentna imobilizacija peroksidaze rena na makroporozni glicidil metakrilatni kopolimer	198
Poređenje četiri metode za imobilizaciju HRP u alginatu radi potencijalne primene u prečišćavanju otpadnih voda	199
Dragica Spasojević, Miloš Prokopijević, Olivera Prodanović, Ksenija Radotić, Radivoje Prodanović.....	199
Comparison of four methods for the immobilization of HRP in alginate for potential application in wastewater treatment	202
Immobilization of Candida antarctica lipase B on supports with epoxy groups via covalent attachment	203
Sonja M. Jakovetić, Rafel Picazo-Espinosa, Maximino Manzanera, Željko P. Stojanović, Radivoje M. Prodanović, Ružica Đ. Miladinović, Zorica D. Knežević-Jugović.....	203
Kovalentna imobilizacija lipaze B iz Candida antarctica na nosače sa epoksidnim grupama	206

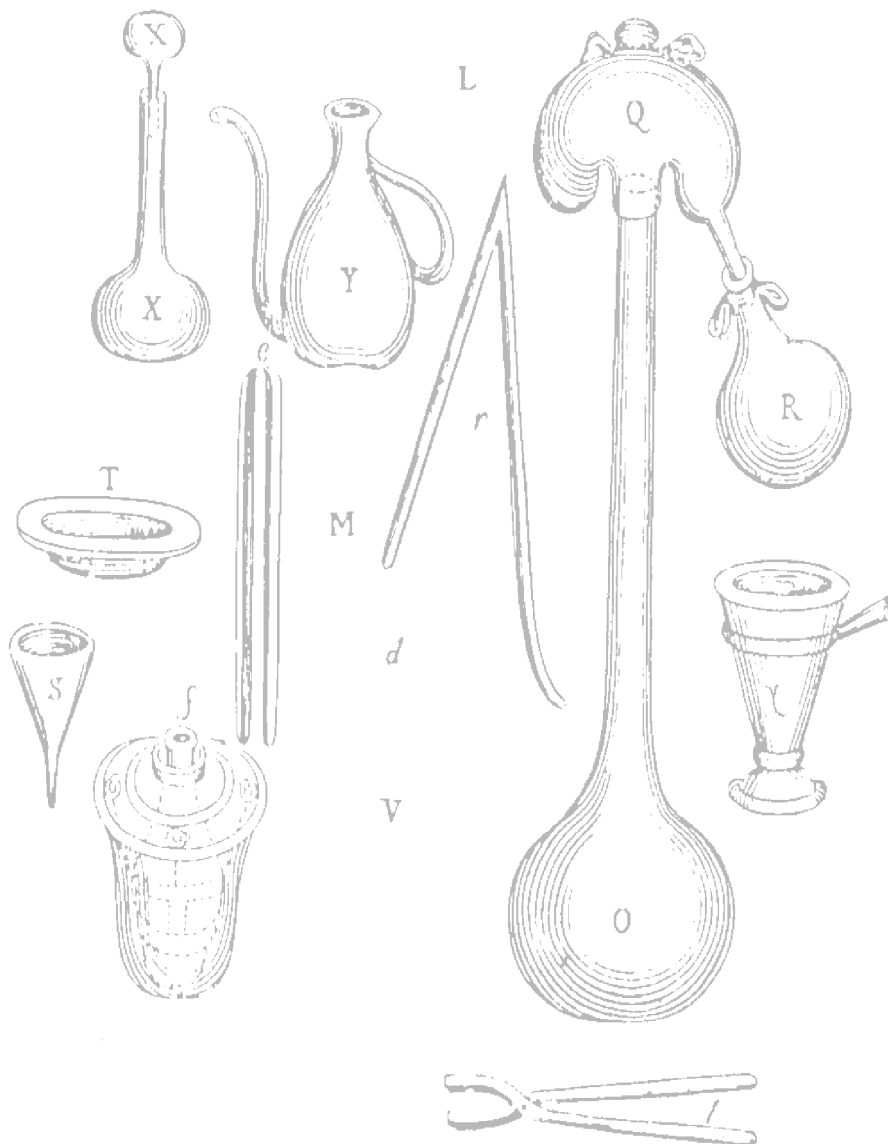
Uklanjanje vodonik-sulfida iz efluenta anaerobno prečišćene otpadne vode	208
Dragana V. Kukić, Marina B. Šćiban, Mile T. Klačnja, Jelena M. Prodanović, Vesna M. Vasić.....	208
Removal of hydrogen sulfide from effluent of anaerobic treated wastewater	211
HEMIJA I TEHNOLOGIJA MAKROMOLEKULA / CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF MACROMOLECULES	212
Mehanička i termička svojstva nanokompozita na bazi epoksidne smole i nanoglina	212
Miloš D. Tomić, Branko Dunjić, Violeta Likić, Jelena Rogan, Nevenka Rajić, Jasna Đonlagić.....	212
Mechanical and thermal properties of epoxy-nanoclay nanocomposites	217
Mehanička i termička svojstva umreženih poli(uretan-estar-siloksana)	218
Jasna V. Džunuzović, Marija V. Pergal, Rafaž Poręba, Sanja Ostojić, Enis S. Džunuzović, Milena Špírková, Slobodan Jovanović.....	218
Mechanical and Thermal Properties of Poly(urethane-ester-siloxane) Networks	221
Termoosetljivi mikrogelovi na bazi poli(N-izopropilakrilamida) i alginata namenjeni kontrolisanom otpuštanju lekova	222
Stojanka M. Petrušić, Petar Jovančić, Branko Bugarski, Svetlana Grujić, Smilja Marković, Jasna Đonlagić.....	222
Thermosensitive microgels based on poly(N-isopropylacrylamide) and alginate intended for controlled drug release	226
Biokompatibilni termoplastični poliuretani na bazi poli(dimetilsiloksana)	227
Marija V. Pergal, Vesna V. Antić, Gordana, Tovilović, Jelena Nestorov, Jasna Đonlagić.....	227
Biocompatible thermoplastic polyurethanes based on poly(dimethylsiloxane)	231
ORGANSKA HEMIJA / ORGANIC CHEMISTRY	232
Aryldiketoacids. Synthesis, high resolution mass spectra, and pharmacophoric similarity with floxacins	232
Ilija N. Cvijetić, Tatjana Ž. Verbić, Ivan O. Juranić, Branko J. Drakulić.....	232
Арилдикетокиселине. Синтеза, масени спектри високе резолуције и фармакофорна сличност са антибиотцима из класе флоксацина	235
Molecular modeling and SAR between phenyl-piperazine-acetamides, phenyl-piperazine-ureas and D2, 5HT1A receptors	236
Vladimir B. Sukalovic, Vukic Soskic, Deana Andric, Goran Roglic, Sladana Kostic-Rajacic.....	236
Molekulsko modelovanje i SAR analiza fenil-piperazin-acetamida, fenil-piperazin-urea i D2, 5HT1A receptora	241
NASTAVA HEMIJE / CHEMISTRY EDUCATION	243
Примена иконичне репрезентације у провери знања студијентима хемије	243
Игор М. Машијашевић и Јасминка Н. Королија.....	243
Application of iconic representation in student assessment of chemistry knowledge	246
Евалуација репрезентација у уџбеницима хемије	248
Игор М. Машијашевић, Милена Блајојевић и Јасминка Н. Королија.....	248
Evaluation of chemical representations in chemistry textbooks	251
Hemijska pismenost studenata hemije	252
Jasna Adamov, Stanislava Olić, Mirjana Segedinac.....	252
Chemical literacy of chemistry students	255
KERAMIKA / CERAMICS	256
Prikaz metoda za izračunavanje efektivnog koeficijenta difuzije pri sušenju glinenih proizvoda	256
Miloš Vasić.....	256
Presentation of methods for determination of effective diffusion coefficient during convective drying of clay masonry units	259

TEKSTILNO INŽENJERSTVO / TEXTILE ENGINEERING.....	261
Полисахаридни влакнасти биополимери као супстрат за добијање вештачкој депои инсулина.....	261
Agela X. Megović Baralić, Pešar D. Škungrić, Ljiljana M. Srećković, Mirjana M. Kostić.....	261
Polysaccharide fibrous biopolymers as a substrate for obtaining artificial insulin depot.....	265
Primena GPC/MALLS metode sa fluorescentnim FDAM markerima za određivanje sadržaja funkcionalnih grupa selektivno oksidisanih celulozних vlakana.....	266
Jovana Ž. Milanović, Antje Potthast, Sonja Schiehser, Predrag Milanović, Mirjana Kostić.....	266
Application of GPC/MALLS method with fluorescence FDAM labeling for determination of functional groups in selectively oxidized cellulose fibers.....	269
Uticaj parametara neselektivne oksidacije na sadržaj funkcionalnih grupa u celulozним vlaknima.....	270
Ana D. Kramar, Matea Korica, Jovana Ž. Milanović, Mirjana M. Kostić.....	270
Influence of the nonselective oxidation conditions onto functional groups content.....	274
in cellulose fibers.....	274
Netkani materijal na bazi vune sekundarnog porekla modifikovan nanočesticama TiO₂ za uklanjanje direktnih boja iz vode.....	275
Darka D. Marković, Bojan M. Jokić, Zoran V. Šaponjić, Petar M. Jovančić i Maja M. Radetić.....	275
Recycled wool-based nonwoven material modified with TiO₂ nanoparticles for removal of direct dyes from water.....	278
Ekološki i ekonomski prihvatljiv biosorbent na bazi kratkih vlakana konoplje: Uticaj strukture na parametre procesa sorpcije jona cinka.....	279
Biljana M. Pejić, Marija M. Vukčević, Ivana Pajić-Lijaković, Mila D. Laušević, Mirjana M. Kostić.....	279
Environmentally and economically acceptable biosorbent based on short hemp fibers: Influence of fibers structure parameters on the sorption process of zinc ions.....	282
INDEX AUTORA / AUTHOR INDEX.....	283



Plenarna predavanja

Plenary Lectures



Спектроскопско испитивање реакција и структурна карактеризација комплекса злата(III) са пептидима

Милош И. Ђуран, Биљана Ђ. Глишић, Уршула Рихлевска*

Институт за хемију, Природно-математички факултет, Универзитет у Крајеву,
Р. Домановића 12, 34000 Крајеву, Србија, djuran@kg.ac.rs

*Хемијски факултет, Универзитет Адам Мицкиевич, Грунвалдска 6, 60-780 Познањ, Пољска

Увод

Након Розенберговог открића да *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] комплекс показује антитуморску активност, започело је интензивно изучавање комплекса прелазних метала као потенцијалних антитуморских агенаса.¹ С обзиром да су Pt(II) и Au(III) изоелектронски јони (*d*⁸ електронска конфигурација) и да формирају квадратно-планарне комплексе, било је за очекивати да ће, слично комплексима платине(II), и комплекси злата(III) бити антитуморски активни. Међутим, комплекси злата(III), због високе позитивне вредности редокс потенцијала и изразитих оксидационих особина, нису довољно стабилни при физиолошким условима. Упркос овој чињеници, у току последње две деценије синтетизован је велики број комплекса злата(III) који су стабилни при физиолошким условима и који показују антитуморску активност према широком спектру ћелијских линија.² Да би се повећала стабилност Au(III) комплекса, у њиховим синтезама коришћени су различити полиидентатни лиганди, као што су полиамини, терпиридин, фенантролин, деривати фенилпиридина, биридиона и порфирина, пептиди и дитиокарбамати.² Међутим, да би се комплекси злата(III) примењивали у лечењу тумора, неопходно је утврдити механизам њиховог антитуморског и токсичног деловања. Најновија истраживања у овој области су показала да ДНК није примарни акцепторски молекул за комплексе злата(III), као у случају антитуморских комплекса платине(II), већ да су то молекули протеина.² Имајући наведене чињенице у виду, испитивање реакција комплекса злата(III) са пептидима може бити од великог значаја у тумачењу механизма њиховог антитуморског, као и токсичног деловања.

Експериментални део

Реакције [AuCl₄]⁻ комплекса са дипептидима (Gly-Gly, Gly-L-Ala, Gly-L-His, L-Ala-L-His, Gly-D,L-Met и Ac-Gly-D,L-Met) су праћене применом NMR (¹H и ¹³C) спектроскопије и UV-Vis спектрофотометрије. Поред тога, за карактеризацију производа реакција између дипептида који садрже метионин и [AuCl₄]⁻ употребљена је циклична волтаметрија. Реакције наведених дипептида са [AuCl₄]⁻ су испитиване у киселој средини (1,50 < pH < 5,00) при различитим молским односима реактаната (1:1, 2:1 и 3:1) и различитим температурама, 25 и 40 °C. Структурна карактеризација изолованих комплекса злата(III) са Gly-L-His, L-Ala-L-His и Gly-D,L-Met дипептидима је извршена помоћу рендгенске структурне анализе.

Резултати и дискусија

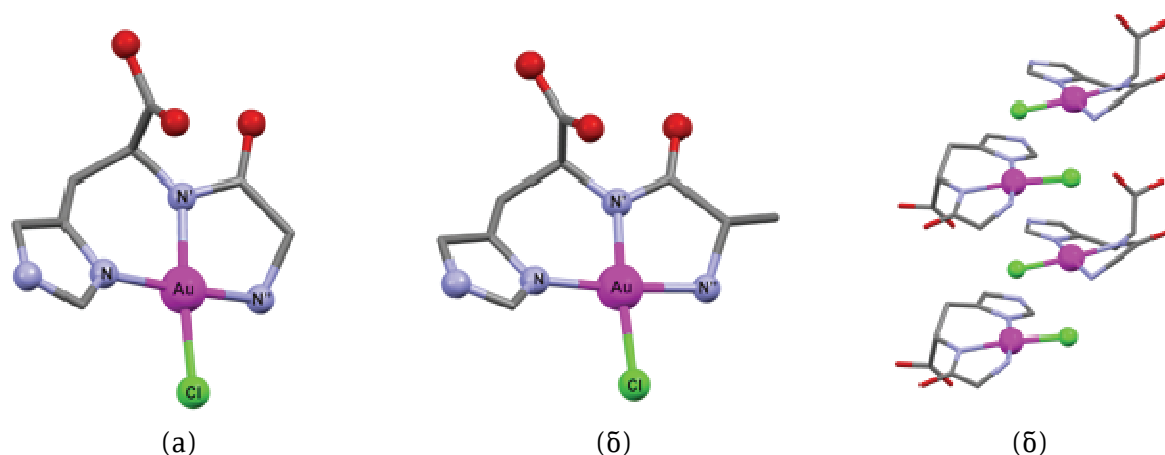
Реакције комплекса злата(III) са пептидима који не садрже хетероатом у бочном низу

Применом ¹H NMR спектроскопије испитиване су реакције дипептида глицил-глицина (Gly-Gly) и глицил-L-аланина (Gly-L-Ala) са хидроген-тетрахлоридоауратом(III) (H[AuCl₄]) у pH области 2,00 – 5,00 на 40 °C.³ Утврђено је да у овим реакцијама при pH = 2,00 и 3,00, долази до тридентатне координације Gly-Gly и Gly-L-Ala дипептида за Au(III) јон. Квадратно-планарни [Au(Gly-Gly-N,N',O)Cl] и [Au(Gly-L-Ala-N,N',O)Cl] комплекси, који настају као коначни производи испитиваних реакција су окарактерисани применом ¹H и ¹³C NMR спектроскопије. На основу спектроскопских података (Табела 1), закључено је да је су дипептиди координовани за Au(III) јон преко атома азота терминалне аминок групе (N), депротонованог атома азота пептидне везе (N') и кисеониковог атома карбоксилне групе (O), док је за четврто координационо место координован хлоридо лиганд. Када су испитиване реакције извођене на pH > 3,00 (pH = 4,00 и 5,00), долази до брзе редукције Au(III) јона и реакциона смеша потпуно потамни од издвојеног елементарног злата. Реакција тридентатне координације Gly-Gly дипептида за Au(III) јон ($k_2 = (1,63 \pm 0,07) \times 10^{-7} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) је приближно два пута

бржа у односу на реакцију координације Gly-L-Ala ($k_2 = (0,71 \pm 0,06) \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Разлика у брзини тридентатне координације ових дипептида је приписана стерном ефекту метил групе у L-аланинском остатку. Међутим, реакције $[\text{AuCl}_4]^-$ комплекса са Gly-Gly и Gly-L-Ala су приближно сто пута спорије од реакције између овог комплекса и глицил-L-хистидина (Gly-L-His) ($k_2 = (124,00 \pm 0,30) \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

Реакције комплекса злата(III) са пептидима који садрже аминокиселину L-хистидин

Упркос великом биолошком значају реакција пептида са јонима метала, резултати постигнути у области синтезе и структурне карактеризације комплекса злата(III) са пептидима су веома оскудни. До сада су синтетизована и структурно окарактерисана само три комплекса злата(III) са пептидима који у бочном низу садрже аминокиселину L-хистидин, од којих су два комплекса са дипептидом глицил-L-хистидином (Gly-L-His), мономерни $[\text{Au}(\text{Gly-L-His-N,N',N''})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ и тетрамерни $[\text{Au}(\text{Gly-L-His-N,N',N'',N'''})]_4\cdot 10\text{H}_2\text{O}$,⁴ а један комплекс са трипептидом глицил-глицил-L-хистидином (Gly-Gly-L-His) који је тетрадентатно координан за Au(III) јон, $[\text{Au}(\text{Gly-Gly-L-His-N,N',N'',N'''})\text{Cl}]\text{H}_2\text{O}$.⁵ Поред тога, мономерни комплекс злата(III) са Gly-L-His је показао антитуморску активност према A2780/S ћелијској линији, која је нешто мања од одговарајуће активности цисплатине.⁶ Недавно су, у нашој лабораторији, синтетизовани и применом ^1H NMR спектроскопије и рендгенске структурне анализе окарактерисани хидратисани и анхидровани облик Au(III) комплекса са Gly-L-His дипептидом, $[\text{Au}(\text{Gly-L-His-N,N',N''})\text{Cl}]\text{NO}_3\cdot 1,25\text{H}_2\text{O}$ и $[\text{Au}(\text{Gly-L-His-N,N',N''})\text{Cl}]\text{NO}_3$, као и комплекс са дипептидом L-аланил-L-хистидином (L-Ala-L-His), $[\text{Au}(\text{L-Ala-L-His-N,N',N''})\text{Cl}]\text{NO}_3\cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$.⁷ Ови комплекси су добијени у реакцијама еквимоларних количина $\text{H}[\text{AuCl}_4]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ и одговарајућег дипептида на $\text{pH} = 1,50$ и на собној температури. Упоредивањем ^1H NMR спектра добијених комплекса са одговарајућим спектрима некоординованих дипептида (Табела 1), закључено је да се Gly-L-His и L-Ala-L-His дипептиди координују за Au(III) јон преко N3 атома азота имидазоловог прстена L-хистидина (N), депротонаног атома азота пептидне везе (N') и атома азота терминалне амино групе глицина, односно L-аланина (N''). Као што се види из табеле 1, сигнали који потичу од C2H протона имидазоловог прстена у $[\text{Au}(\text{Gly-L-His-N,N',N''})\text{Cl}]\text{NO}_3\cdot 1,25\text{H}_2\text{O}$ и $[\text{Au}(\text{L-Ala-L-His-N,N',N''})\text{Cl}]\text{NO}_3\cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ комплексима су померени ка вишем пољу у односу на одговарајуће сигнале некоординованог дипептида, при чему је $\Delta\delta = 0,06$ односно $0,08$ ppm, док су сигнали за C5H протон Au(III) комплекса и некоординованих дипептида на сличном хемијском померању. Сигнали осталих протона у Au(III)-дипептид комплексима су незнатно померени ка нижем пољу у односу на одговарајуће сигнале слободних дипептида, при чему највеће померање имају GlyCH_2 протони ($\Delta\delta = 0,29$ ppm). Комплексни $[\text{Au}(\text{Gly-L-His-N,N',N''})\text{Cl}]^+$ и $[\text{Au}(\text{L-Ala-L-His-N,N',N''})\text{Cl}]^+$ катјони у $[\text{Au}(\text{Gly-L-His-N,N',N''})\text{Cl}]\text{NO}_3\cdot 1,25\text{H}_2\text{O}$ и $[\text{Au}(\text{L-Ala-L-His-N,N',N''})\text{Cl}]\text{NO}_3\cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ комплексима су приказани на слици 1а и б. Као што се из слике види, ови комплекси имају квадратно-планарну геометрију, са карбоксилном групом у аксијалном положају у односу на координациону раван.



Слика 1. Структуре $[\text{Au}(\text{Gly-L-His-N,N',N''})\text{Cl}]^+$ (а) и $[\text{Au}(\text{L-Ala-L-His-N,N',N''})\text{Cl}]^+$ (б) катјона у кристалима $[\text{Au}(\text{Gly-L-His-N,N',N''})\text{Cl}]\text{NO}_3\cdot 1,25\text{H}_2\text{O}$ и $[\text{Au}(\text{L-Ala-L-His-N,N',N''})\text{Cl}]\text{NO}_3\cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ комплекса и распоред Au-Cl димера у структури $[\text{Au}(\text{Gly-L-His-N,N',N''})\text{Cl}]\text{NO}_3$ комплекса (в).

Збој јасније приказивања на слици су изостављени атоми водоника^{7,8}

Имидазолов прстен у овим комплексима је планаран, док петочлани глицински и L-аланински прстенови, супротно глицинском прстену у $[\text{Au}(\text{Gly-L-His-N,N',N''})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ комплексу који садржи хлорид као контра-анјон,⁴ значајно одступају од планарности. Поред тога, супротно структури $[\text{Au}(\text{Gly-L-His-N,N',N''})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ комплекса,⁴ може се сматрати да $\text{Au}(\text{III})$ -дипептид комплекси, са нитратом као контра-анјоном, имају структуру издуженог октаедра, услед интеракције између $\text{Au}(\text{III})$ јона из квадратно-планарне равни ових комплекса и два хлоридна јона из суседних комплексних честица (Слика 1в).^{7,8}

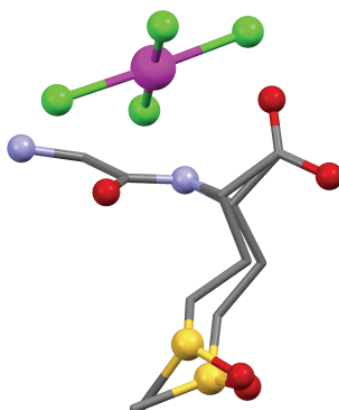
Табела 1. ^1H NMR хемијска померања (δ , ppm) за неке дипептиде и одговарајуће $\text{Au}(\text{III})$ -дипептид комплексе снимљени на $\text{pH} = 2,00$ у D_2O као растварачу у односу на TSP као референтни стандард

Пептид/Комплекс	Имидазолови	
	протони C2H C5H	Хемијска померања осталих протона
Gly-Gly ³		3,89 (Gly1CH ₂) 4,07 (Gly2CH ₂)
$[\text{Au}(\text{Gly-Gly-N,N',O})\text{Cl}]^3$		3,96 (Gly1CH ₂) 4,26 (Gly2CH ₂)
Gly-L-Ala ³		3,84 (GlyCH ₂) 4,08 (Ala α CH), 1,40 (Ala β CH ₃)
$[\text{Au}(\text{Gly-L-Ala-N,N',O})\text{Cl}]^3$		3,90 (GlyCH ₂) 4,15 (Ala α CH), 1,44 (Ala β CH ₃) 3,83 (GlyCH ₂)
Gly-L-His ⁷	8,62 7,31	4,63 (His α CH) 3,35 (His β CH), 3,21 (His β' CH), $J_{\text{AB}} = 15,60$ Hz 4,06 (GlyCH), 3,96 (GlyCH'), $J_{\text{AB}} = 20,00$ Hz
$[\text{Au}(\text{Gly-L-His-N,N',N''})\text{Cl}]\text{NO}_3\cdot 1,25\text{H}_2\text{O}^7$	8,56 7,31	4,69 (His α CH) 3,60 (His β CH), 3,11 (His β' CH), $J_{\text{AB}} = 15,90$ Hz 4,08 (Ala α CH), 1,53 (Ala β CH ₃)
L-Ala-L-His ⁷	8,64 7,34	4,64 (His α CH) 3,40 (His β CH), 3,24 (His β' CH), $J_{\text{AB}} = 15,70$ Hz 4,15 (Ala α CH), 1,56 (Ala β CH ₃)
$[\text{Au}(\text{L-Ala-L-His-N,N',N''})\text{Cl}]\text{NO}_3\cdot 2,5\text{H}_2\text{O}^7$	8,56 7,31	4,66 (His α CH) 3,58 (His β CH), 3,10 (His β' CH), $J_{\text{AB}} = 16,10$ Hz 3,89 (GlyCH ₂)
Gly-D,L-Met ¹⁰		2,11 (Met δ CH ₃) 2,18 (Met β CH ₂), 2,60 (Met γ CH ₂) 3,91 (GlyCH ₂)
$[\text{H}^+\text{Gly-Met-sulfoksid}][\text{AuCl}_4]^{10}$		2,71 (Met δ CH ₃) 2,40 (Met β CH ₂), 3,00 (Met γ CH ₂)

Реакције комплекса злата(III) са пептидима који садрже аминокиселину метионин

Применом ^1H NMR спектроскопије, UV-Vis спектрофотометрије и цикличне волтаметрије испитиване су реакције дипептида глицил-D,L-метионина (Gly-D,L-Met) и његовог *N*-ацетилованог деривата (Ac-Gly-D,L-Met) са $\text{H}[\text{AuCl}_4]$ комплексом на $\text{pH} = 2,00$ и на собној температури.⁹ Одговарајући дипептид и $\text{H}[\text{AuCl}_4]$ комплекс су мешани у 1:1, 2:1 и 3:1 молским односима. Утврђено је да се у првој фази реакције пептид монодентатно координује за Au(III) јон преко тиоетарског атома сумпора, при чему настаје $[\text{AuCl}_3(\text{R-Gly-Met-S})]$ комплекс ($\text{R} = \text{H}$ или Ac). Овај интермедијерни комплекс у следећој фази реакције реагује са метионинским остатком другог молекула пептида, при чему настаје R-Gly-Met-сулфонијум катјон, који подлеже хидролизи дајући одговарајући сулфоксид. Оксидација метионинског остатка у Gly-D,L-Met дипептиду до сулфоксида ($k_2 = 0,363 \pm 0,074 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) је пет пута бржа у односу на оксидацију његовог *N*-ацетилованог деривата ($k_2 = 0,074 \pm 0,007 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), што се може приписати утицају терминалне аминокиселине групе неацетилованог пептида. Комплекс $[\text{AuCl}_2]^-$, који настаје у реакцији еквимоларних количина реактаната, подлеже диспропорционисању, дајући $[\text{AuCl}_4]^-$ и елементарно злато, Au(0) , док у присуству вишка пептида, настају стабилнији полинуклеарни Gly-D,L-Met-S-Au(I) и Ac-Gly-D,L-Met-S-Au(I) комплекси.

Структура коначног производа оксидације Gly-D,L-Met дипептида у присуству еквимоларне количине $[\text{AuCl}_4]^-$ комплекса је додатно потврђена применом рендгенске структурне анализе.¹⁰ Кристалографски резултати су показали да се кристална структура $[\text{H}^+\text{Gly-Met-sulfoksid}][\text{AuCl}_4]$ комплекса састоји од квадратно-планарних $[\text{AuCl}_4]^-$ аниона и Gly-Met-сулфоксид катјона (Слика 2). Катјон је неуређен у бочном низу метионина, услед присуства два дијастереоизомера у истој јединичној ћелији, који се разликују у конфигурацији на атому сумпора. Процес кристализације $[\text{H}^+\text{Gly-Met-sulfoksid}][\text{AuCl}_4]$ комплекса је делимично дијастереоселективан, при чему један од два могућа дијастереоизомера настаје у вишку.



Слика 2. Структура $[\text{H}^+\text{Gly-Met-sulfoksid}][\text{AuCl}_4]$ комплекса^{8,10}

Закључак

На основу резултата постигнутих у оквиру испитивања реакција комплекса злата(III) са пептидима могу се извести следећи закључци. Пептиди који у бочном низу не садрже хетероатом и пептиди који у бочном низу садрже аминокиселину L-хистидин координују се за Au(III) јон, при чему настају стабилни квадратно-планарни комплекси. У супротности са тим, у реакцијама комплекса злата(III) са пептидима који садрже аминокиселину метионин, долази до оксидације тиоетарске функционалне групе и редукције Au(III) јона до Au(I) или Au(0) . Резултати испитивања реакција комплекса злата(III) са пептидима могу допринети развоју нових комплекса злата(III) као потенцијалних антитуморских агенаса, као и тумачењу механизма њиховог токсичног деловања.

Захвалница: Овај рад је финансијски подржан од стране Министарства просвете и науке Републике Србије (Пројекат 172036).

Spectroscopic investigation of reactions and structural characterization of gold(III) complexes with peptides

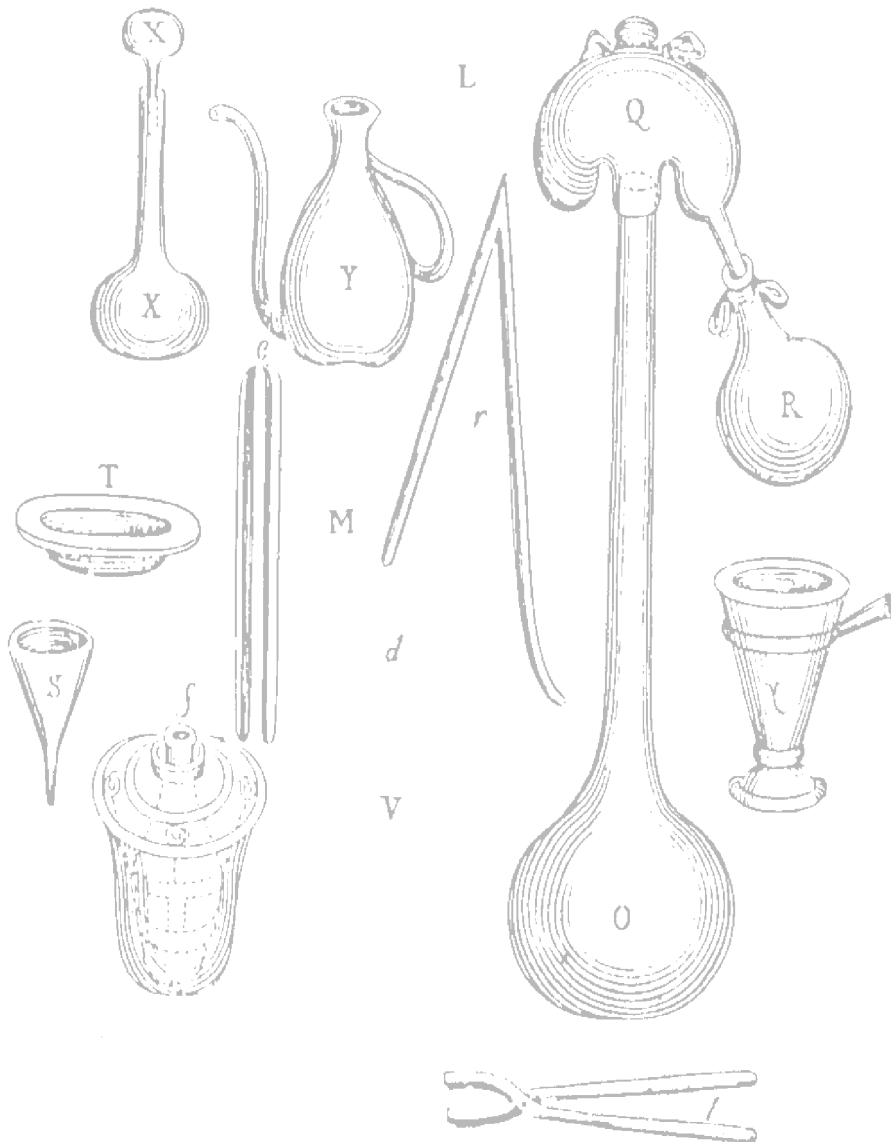
The possible involvement of gold(III) complexes in cancer treatment initiated an interest in the area of gold(III) interactions with different biologically important ligands such as amino acids, peptides and proteins. The present work provides an overview of the results achieved in the mechanistic studies of the reactions of gold(III) complexes with histidine- and methionine-containing peptides, and with peptides containing no heteroatom in the side chain. Also, this work deals with structural characterization of gold(III)-peptide complexes formed as the final products in these reactions.

Литература

1. B. Lippert, *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, John Wiley & Sons Inc., New York, 1999.
2. S. Nobili, E. Mini, I. Landini, C. Gabbiani, A. Casini, L. Messori, *Med. Res. Rev.* **30** (2010) 550.
3. B. Đ. Glišić, S. Rajković, M. D. Živković, M. I. Djuran, *Bioorg. Chem.* **38** (2010) 144.
4. M. Wienken, B. Lippert, E. Zangrando, L. Randaccio, *Inorg. Chem.* **31** (1992) 1983.
5. S. L. Best, T. K. Chattopadhyay, M. I. Djuran, R. A. Palmer, P. J. Sadler, I. Sóvágó, K. Várnagy, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1997) 2587.
6. S. Carotti, G. Marcon, M. Marussich, T. Mazzei, L. Messori, E. Mini, P. Orioli, *Chem. Biol. Interact.* **125** (2000) 29.
7. U. Rychlewska, B. Warzajtis, B. Đ. Glišić, M. D. Živković, S. Rajković, M. I. Djuran, *Dalton Trans.* **39** (2010) 8906.
8. B. Đ. Glišić, U. Rychlewska, M. I. Djuran, *Dalton Trans.* (2012) Doi:10.1039/c2dt30169e
9. B. Đ. Glišić, S. Rajković, Z. Stanić, M. I. Djuran, *Gold Bull.* **44** (2011) 91.
10. U. Rychlewska, B. Warzajtis, B. Đ. Glišić, S. Rajković, M. I. Djuran, *Acta Cryst. Sect. C* **66** (2010) 51.



Saopštenja Contributions



Analitička hemija / Analytical Chemistry**Mikroekstrakcija pesticida iz vodenih uzoraka sa jonskim tečnostima kao ekstragensom**

Tatjana M. Trtić-Petrović

Laboratorija za fiziku, Institut za nuklearne nauke „Vinča“, Univerzitet u Beogradu, P.O.Box 522,
11001 Beograd, Srbija, ttrtic@vinca.rs

Priprema uzorka je važan korak u analitičkoj proceduri i uključuje uklanjanje jedinjenja koja bi mogla da utiču na analizu i koncentrovanje ispitivanog jedinjenja. Tečno-tečna i tečno-čvrsta ekstrakcija su metode koje se najčešće primenjuju za pripremu uzoraka. Razvoj i poboljšanje metoda za pripremu uzoraka kreću se u pravcu izbora organske faze koja će biti što manje štetna za okolinu, smanjenja njene zapremine što se postiže u minijaturizovanim sistemima, kao i spajanjem faze prečišćavanja i koncentrovanja u jedan korak što značajno skraćuje vreme potrebno za ovu fazu. Primena jonskih tečnosti kao ekstragenasa u tečnofaznoj ekstrakciji predstavlja novi pravac u razvoju i primeni separacionih metoda¹. Jonske tečnosti su jonski medijumi koji su tečni na sobnoj temperaturi, a sastoje se iz neorganskog anjona i organskog katjona (obično heterocikli koji sadrže azot kao što su imidazol, piridin, itd.). Glavne karakteristike jonskih tečnosti su: zanemarljiva zapaljivost i nizak napon pare, mogućnost rada u širokom opsegu temperatura, visoka jonska konduktivnost, visoka solvaciona mogućnost, hemijska stabilnost i selektivnost, kao i niska štetnost za okolinu².

Cilj ovog rada bio je razvoj disperzivne tečno-tečne mikroekstrakcije sa jonskim tečnostima kao ekstragensom za određivanje pesticida u vodenim uzorcima. Izabrana su četiri pesticida (acetamiprid, imidakloprid, linuron i tebufenozid) koja pripadaju različitim hemijskim grupama i imaju različite osobine bitne za ekstrakciju.

Esperimentalni deo

U ovom radu su korišćeni sledeći pesticidi: acetamiprid (N-[(6-hloro-3-piridil)metil]-N'-ciano-N-metil-acetamid), imidakloprid (N-[1-[(6-hloro-3-piridil)metil]-4,5-dihidroimidazol-2-il]nitroamid), linuron (3-(3,4-dihlorofenil)-1-metoksi-1-metilurea) i tebufenozid (N-terc-butyl-N'-(4-ethybenzoil)-3,5-dimetilbenzohidrazid). Svi pesticidi su 95% čistoće i dobijeni su iz Fitofarmacije a.d. (Zemun, Srbija). Metanol (HPLC čistoće) i jonske tečnosti: 1-heksil-3-metilimidazolium heksafluorofosfat ([C₆MIM][PF₆]), 1-heksil-3-metilimidazolium bis(trifluorometilsulfonil)imid ([C₆MIM][(CF₃SO₂)₂N]), i 1-metil-3-oktilimidazolium heksafluorofosfat ([C₈MIM][PF₆]) su nabavljeni od Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Polazni rastvor pesticida (koncentracija pojedinačnog pesticida 200 mg dm⁻³) je pripreman u metanolu i stabilan je 3 meseca na temperaturi -18°C. Vodeni rastvori pesticida su pripremani neposredno pre eksperimenta razblaživanjem polaznog rastvora ili dejonizovanom vodom (Millipore, Bedford, MA, USA) ili uzorcima rečne vode. Uzorci rečne vode su uzeti iz reke Save kod Sremske Mitrovice i čuvani su na -18°C.

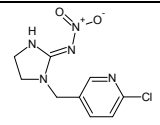
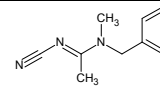
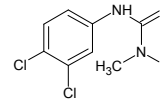
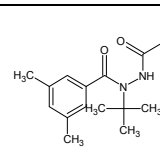
Pesticidi su ekstrahovani sledećim postupkom: određena zapremina vodenog rastvora (dejonizovana ili rečna voda) se sipa u epruvetu sa konusnim dnom, doda se jonska tečnost i snažno mućka, zatim se centrifugira 2 min na 2000 obr/min. Posle centrifugiranja, jonska tečnost ostaje na dnu epruvete, a vodena faza se odvoji dekantovanjem. Nakon ekstrakcije, koncentracija ekstrahovanih pesticida je određivana tečnom hromatografijom visokih performansi ili direktnim injektovanjem jonske tečnosti ili posle razblaživanja metanolom. Korišćen je tečni hromatograf Dionex-0650 (Dionex, USA) sa reversno-faznom kolonom dimenzija 4,6 mm × 150 mm Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies, USA) i UV-detektorom na talasnoj dužini 245nm. Mobilna faza (0,6 cm³ min⁻¹) za acetamiprid i imidakloprid je bila 41,5% metanol, 1,5% izopropanol i 57% voda pH 3,0 (podešena sa 2 mol dm⁻³ HCl), a za linuron i tebufenozid 68,5% metanol, 1,5% izopropanol i 38,5% voda.

Rezultati i diskusija

U ovom radu ispitivana je ekstrakcija acetamiprida (Acet), imidakloprida (Imid), linurona (Linr) i tebufenozida (Tebf) iz vodenog rastvora sa jonskom tečnošću kao ekstragensom. U Tabeli 1 prikazane

su glavne karakteristike ispitivanih pesticida. Izabrani pesticidi pripadaju različitim hemijskim grupama i imaju različite karakteristike bitne za ekstrakciju, npr. logD (koeficijent raspodele u sistemu oktanol/voda) im je u rasponu od 0,46 do 4,38. Iz Tabele 1 se takođe vidi da logD ispitivanih pesticida praktično ne zavisi od pH rastvora u opsegu od 2-10, kao i da u ovom opsegu pH nema aktivnih kiselinsko-baznih grupa. Ovi podaci ukazuju na to da u opsegu pH vrednosti prirodnih voda (pH 6 - 8), pH vodenog rastvora neće uticati na ekstrakciju ispitivanih pesticida.

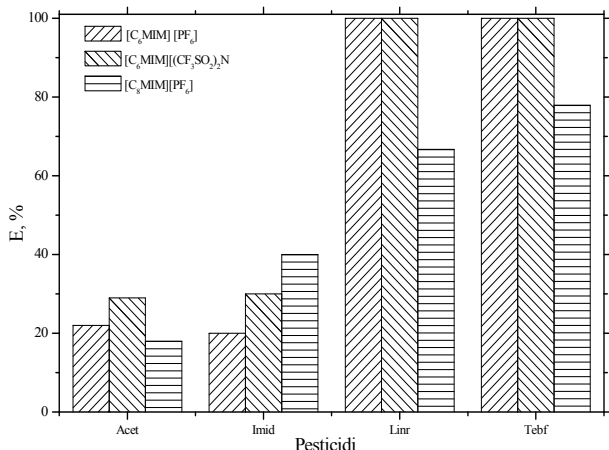
Tabela 1. Glavne karakteristike ispitivanih pesticida

Pesticid	Hemijska grupa (aktivnost)	Struktura	pK _a *	logD na pH*				
				2	4	5	8	10
Imid	Neonikotinoid (insekticid)		0.26 -4.08	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46
Acet	Neonikotinoid (insekticid)		-0.44 -2.47	1.55	1.55	1.55	1.55	1.55
Linr	Fenilurea (herbicid)		12.3 3 -1.04	3.12	3.12	3.12	3.12	3.12
Tebf	Diacilhidrazin (insekticid)		10.8 9 -2.2 -3.49	4.38	4.38	4.38	4.38	4.33

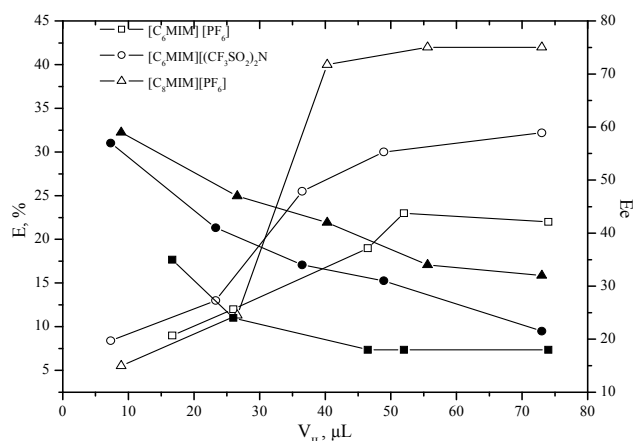
*izračunate primenom programa ACD/Labs PhysChem

Na Slici 1 prikazan je uticaj vrste jonske tečnosti na efikasnost ekstrakcije (E, %) koja je definisana kao deo ekstrahovanog pesticida u odnosu na polaznu količinu pesticida. Pesticidi su ekstrahovani iz vodenog rastvora smeše pesticida zapremine 5 cm³ (koncentracija svakog pojedinačnog pesticida je bila 0,5 mg dm⁻³) u koji je direktno dodavano ~ 40 μL jonske tečnosti. Nakon ekstrakcije vodena faza i jonska tečnost su odvajane centrifugiranjem; s obzirom da je gustina primenjenih jonskih tečnosti veća od vode one ostaju na dnu epruvete. Koncentracija pesticida nakon ekstrakcije određivana je i u vodenoj fazi i u ekstragensu – jonskoj tečnosti. Pesticidi koji imaju visok koeficijent raspodele (Linr i Tebf) ekstrahuju se sa jonskim tečnostima [C₆MIM][PF₆] i [C₆MIM][(CF₃SO₂)₂N] potpuno (E je 100%), dok je stepen ekstrakcije sa [C₈MIM][PF₆] 67 i 77% za Linr i Tebf, redom. Ekstrakcija Acet i Imid koji su manje hidrofobni od prethodna dva pesticida je značajno niža, i maksimalno iznosi 30 i 40% za Acet i Imid, redom.

Uticaj zapremine jonskih tečnosti na stepen ekstrakcije imidakloprida i faktor koncentrovanja, E_e (izražen kao količnik koncentracije pesticida u jonskoj tečnosti i u polaznom rastvoru) prikazan je na Slici 2. Pesticidi su ekstrahovani iz vodenog rastvora smeše pesticida zapremine 5 cm³, koncentracija svakog pojedinačnog pesticida je bila 0,5 mg dm⁻³, u koji je direktno dodavana određena zapremina jonske tečnosti. Dalja procedura ekstrakcije je bila ista kao što je opisano u prethodnom odeljku. Sa slike se jasno vidi da stepen ekstrakcije raste sa porastom zapremine jonske tečnosti do određene vrednosti u zavisnosti od primenjene jonske tečnosti npr. povećanje zapremine od 9 μL [C₈MIM][PF₆] do 39 μL, E imidakloprida se povećava od 5 do 40%, daljim povećanjem zapremine do 75 μL stepen ekstrakcije se povećava samo za 2%. Sa slike se takođe vidi da je faktor koncentrovanja najveći kada je odnos vodene faze i jonske tečnosti najveći tj. za najmanje zapremine jonske tečnosti. Sličan uticaj zapremine jonskih tečnosti dobijen je i za acetamiprid, dok je taj uticaj gotovo zanemarljiv za ekstrakciju Linr i Tebf sa jonskim tečnostima sa kojima se postiže 100% ekstrakcija. Iz opisanih rezultata može se zaključiti da su najbolji rezultati ekstrakcije smeše izabranih pesticida dobijeni primenom jonske tečnosti [C₆MIM][(CF₃SO₂)₂N] kao ekstragensa i sa zapreminom jonske tečnosti od 40 μL koja je izabrana kao kompromis dovoljno visokog stepena ekstrakcije i faktora koncentrovanja.



Slika 1. Uticaj vrste jonske tečnosti na ekstrakciju ispitivanih pesticida

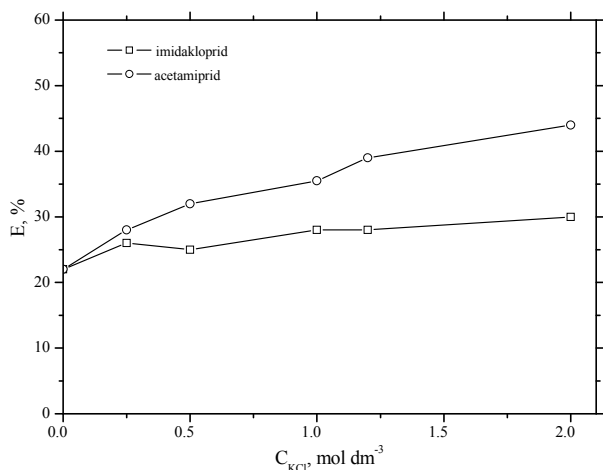


Slika 2. Uticaj zapremine jonske tečnosti na stepen ekstrakcije imidakloprida (leva osa i otvoreni znaci) i na faktor koncentrovanja (desna osa i puni znaci)

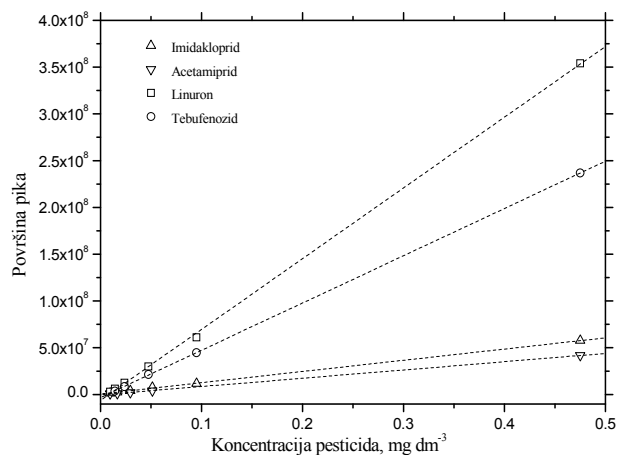
Vreme ekstrakcije predstavlja važan parametar u optimizaciji uslova ekstrakcije. U ovom radu je ispitan uticaj vremena ekstrakcije u opsegu od 2 do 240 min za sva četiri pesticida. Dobijeni rezultati su jasno pokazali da je ekstrakcija izuzetno brza i da je dovoljno 2 min da se pesticidi iz polaznog, vodenog rastvora ekstrahuju u ekstragens - jonsku tečnost.

Na Slici 3 prikazan je uticaj jonske jačine vodenog rastvora na stepen ekstrakcije Acet i Imid. Pesticidi su ekstrahovani iz vodenog rastvora smeše pesticida (5 cm³, koncentracija pesticida 0,5 mg dm⁻³) u koji je dodavano po 40 μL jonske tečnosti. Vreme ekstrakcije je bilo 2 min uz snažno mućkanje. Sa slike se vidi da dodatkom KCl u koncentraciji od 2 mol dm⁻³ u vodeni rastvor stepen ekstrakcije Imid se povećava dvostruko u poređenju sa ekstrakcijom bez KCl, dok je uticaj KCl na ekstrakciju Acet značajno manji. Dodatak KCl nema uticaja na ekstrakciju Linr i Tebf.

Na osnovu prikazanih rezultata zaključeno je da su optimalni uslovi za istovremenu ekstrakciju ispitivanih pesticida: koncentracija KCl u vodenom rastvoru 1 mol dm⁻³, 40 μL jonske tečnosti [C₆MIM][(CF₃SO₂)₂N], vreme ekstrakcije 2 min i centrifugiranje 2 min na 2000 obr/min.



Slika 3. Uticaj kalijum hlorida na ekstrakciju acetamiprida i imidakloprida



Slika 4. Kalibracione prave za ispitivane pesticide

Na Slici 4 su prikazane kalibracione prave za određivanje ispitivanih pesticida koje su dobijene ekstrakcijom pesticida iz vodenih rastvora (opseg koncentracija od 0,009 do 0,5 mg dm⁻³) pod optimalnim uslovima ekstrakcije. U Tabeli 2 su prikazane glavne karakteristike kalibracionih pravih. Za sva četiri ispitivana pesticide dobijena je linearna zavisnost u ispitivanom opsegu koncentracija sa visokim koeficijentom linearnosti (r^2 je bio 0,9999 za Ecet, Imid i Tebf; 0,9998 za Linr). Limit detekcije (LD) i

limit kvantifikacije (LG) su određeni grafičkim metodom kao najmanje koncentracije pesticida koje daju odnos hromatografskog signala prema slepoj probi 3 i 10, redom. Najniži LD ($2 \mu\text{g dm}^{-3}$) i LG ($9 \mu\text{g dm}^{-3}$) su dobijeni za Tebf koji ima najveći logD i najbolje se ekstrahuje od svih ispitivanih pesticida.

Tabela 2. Glavne karakteristike kalibracionih pravih ispitivanih pesticida

Pesticid	Opseg koncentracija, mg dm^{-3}	r^2	LD, mg dm^{-3}	LG, mg dm^{-3}
Acet	0,009-0,5	0,9999	0,008	0,027
Imid	0,009-0,5	0,9999	0,006	0,021
Linr	0,009-0,5	0,9998	0,004	0,013
Tebf	0,009-0,5	0,9999	0,002	0,009

Selektivnost mikroekstrakcije sa jonskim tečnostima ispitana je ekstrakcijom laboratorijske i česmenke vode pod optimalnim uslovima. U dobijenom hromatogramu jonske tečnosti nisu detektovani pikovi na retencionim vremenima karakterističnim za ispitivane pesticide. Primenom dobijenih kalibracionih pravih određene su koncentracije ispitivanih pesticida u uzorku rečne vode (reka Sava kod Sremske Mitrovice). Prvo je urađena ekstrakcija iz rečne vode sa jonskom tečnošću pod optimalnim uslovima. S obzirom da nije bilo signala na retencionim vremenima karakterističnim za ispitivane pesticide (što ukazuje da nema ekstrahovanih pesticida niti nekih drugih jedinjenja koja bi dala pik na karakterističnim retencionim vremenima) u uzorak vode dodati su ispitivani pesticidi tako da je njihova pojedinačna koncentracija $0,05 \text{ mg dm}^{-3}$ i urađena je ekstrakcija pod optimalnim uslovima. Određene koncentracije pesticida se veoma dobro slažu sa dodatim koncentracijama, relativna standardna devijacija je do 5%.

Zaključak

U ovom radu optimizovani su uslovi za određivanje pesticida u vodenim uzorcima primenom disperzivne mikroekstrakcije sa jonskim tečnostima kao ekstragensom. Opisana metoda je jednostavna i laka za izvođenje, veoma brza (ukupno vreme ekstrakcije i HPLC analize je 20 min), a jonske tečnosti u odnosu na druge organske ekstragense imaju prednost jer se koriste u mikrolitarskim količinama, i lako i brzo se odvajaju centrifugiranjem od vodene faze.

Zahvalnica: Ovaj rad je urađen u okviru projekta Fizika i hemija sa jonskim snopovima, Br. III 45006 koji je finansiran od strane Ministarstva za obrazovanje i nauku Republike Srbije. Zahvaljujem se D. Kolović i T. Stanić iz Fitofarmacije d.o.o., Zemun na donaciji pesticida.

Ionic liquid based microextraction of the pesticides from selected water samples

The dispersive liquid phase microextraction using room temperature ionic liquid has been investigated for determination of the selected pesticides (acetamiprid, imidacloprid, linuron and tebufenozide) in the selected water samples. The parameters affecting the extraction efficiency and the enrichment factor such as the type and the amount of RTIL (1-hexyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide, 1-hexyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate and 1-methyl-3-octylimidazolium hexafluorophosphate), extraction time, and salinity of sample have been investigated. The optimal extraction conditions was found: donor volume of 10 cm^3 and 0.1 mol dm^{-3} KCl, extractant $\sim 40 \mu\text{L}$ 1-hexyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide, extraction time of 2 min. The linearity was in the concentration range of 0,009 do $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$, and determined limits of detection were from 0.002 to 0.008 mg dm^{-3} .

References

1. P. Sun, D.W. Armstrong, *Anal. Chim. Acta* **661** (2010) 1.
2. M.A. Malik, M.A. Hashim, F. Nabi, *Chem. Eng. J.* **171** (2011) 242.

Uticaj matriksa jabuke, višnje i breskve na određivanje ostataka pesticida

Gorica Lj. Vuković, Vojislava P. Bursić*, Sanja D. Lazić*, Bojana D. Špirović**

Gradski zavod za javno zdravlje Beograd, Bulevar despota Stefana 54a, Beograd,
*Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, ** Poljoprivredni fakultet, Beograd

Uvod

Glavni problem određivanja ostataka pesticida u hrani je nizak nivo pesticida koji je prisutan u matriksu uzorka. Komponente matriksa injektovane u hromatografski sistem mogu dovesti do pojave lažno pozitivnih ili lažno negativnih rezultata, slabog odgovora detektora ili netačne kvantifikacije¹. Na žalost, do sada nije razvijena tehnika prečišćavanja koja bi mogla da ukloni sve komponente matriksa iz sirovog ekstrakta. Za veoma niske koncentracije ostataka pesticida u voću², povećanje signala može biti veliko, čak do 700% (izraženo kao relativna površina pika standarda u matriksu u odnosu na standard u čistom rastvaraču). U literaturi postoji nekoliko pristupa za smanjenje uticaja matriksa. Najpouzdaniji način je upotreba izotopski obeleženih internih standarda. Njihova upotreba je skupa, naročito u multirezidualnim analizama, gde je za svako jedinjenje potreban poseban standard³. Druga mogućnost i ujedno najviše korišćen pristup u analizi ostataka pesticida je metoda kalibracije u matriksu, gde se ekstrakt obogaćuje analiziranim jedinjenjem⁴⁻⁶. Tačan mehanizam povećanja/smanjenja signala pod uticajem matriksa nije poznat, pretpostavlja se da komponente matriksa utiču na efektivnost jonizacionog procesa, uzrokujući uzajamno pozitivne ili negativne efekte na količinu formiranih jona analita¹.

Rezultati i diskusija

Hemikalije

U radu su korišćeni standardi pesticida (Dr Ehrenstorfer, Germany), dok su svi organski rastvarači bili HPLC čistoće, firme Merck (Darmstadt, Germany). Voda HPLC čistoće je dobijena prečišćavanjem preko Purelab® ELGA (Vivendi Water Systems Ltd UK). Osnovni rastvori ispitivanih pesticida (1 mg/ml) su pripremljeni rastvaranjem 10 ±0,1 mg osnovnog standarda u 10 ml smeše acetona i metanola, a radni standardi (1µg/ml) su dobijeni razblaživanjem osnovnog standarda. Pripremljeni osnovni standardi su čuvani u zamrzivaču na -17 °C, dok su radni rastvori čuvani u frižideru na 4 °C⁷.

Priprema uzoraka za proveru uticaja matriksa

Za proveru linearnosti metode, ispitan je odgovor detektora kalibracionih standarda smeše pesticida u koncentracionom opsegu od 0,005 do 0,250 µg/ml što odgovara koncentraciji pesticida u uzorku od 0,005 do 0,250 mg/kg. Da bi se ispitan uticaj matriksa izvršena je kalibracija u rastvaraču, kao i u matriksu jabuke, višnje i breskve. Kalibracioni standardi u matriksu su pripremljeni tako što se u bočicu za autosampler odmeri po 0,5 ml ekstrakta blank uzorka jabuke, višnje ili breskve, pripremljenog po QuEChERS postupku⁸, upari do suva i rekonstituiše u 500 µl kalibracionim standardima koji su pripremljeni u mobilnoj fazi (voda/metanol, 50/50, modifikovana sa 0,1% mravljom kiselinom).

Uslovi hromatografskog određivanja pesticida na LS-MS/MS

Maseni spektrometar	
Instrument / Jonski izvor	Agilent 6410B QQQ/ Multimod, MMI
Tip jonizacije	+ESI
Drying gas flow/ Drying gas temp.	5 ml/min/325 °C
Vaporizer, temp.	220 °C
Nebulizer	50 psi
Napon kapilare/ Energija fragmentacija	2000V/ 70-150V
LC uslovi	
Injekciona zapremina	Vinj=10 µL
Protok/ Temperatura kolone	0,5 ml/min / 30 °C
Mobilna faza i gradijent:	A: 0,5% HCOOH u MeOH; B: 0,5% HCOOH u vodi; Gradijent: 0 min – 5% B; 5 min–50% B; 15min–20% B; 17min–5% B; 20min – 5% B; 21min–2% B
Vreme trajanja analize:	Stop Time: 21 min, Post Time: 3 min

Zbog značajnog uticaja matriksa na ispitivane pesticide koji se može javiti kod LC-MS/MS, neophodno je pre kvantitativnog određivanja ispitati u kojoj meri se javlja i da li se kalibracija u jednom matriksu, na primer, jabuci, može koristiti za kvantifikaciju u drugim matriksima. Da bi se ispitao uticaj matriksa, urađene su kalibracije ispitivanih pesticida u rastvaraču i matriksu jabuke, breskve i višnje („matrix-matched calibration“).

Tabela 1. Jednačine kalibracionih krivih i koeficijent korelacije (R^2)

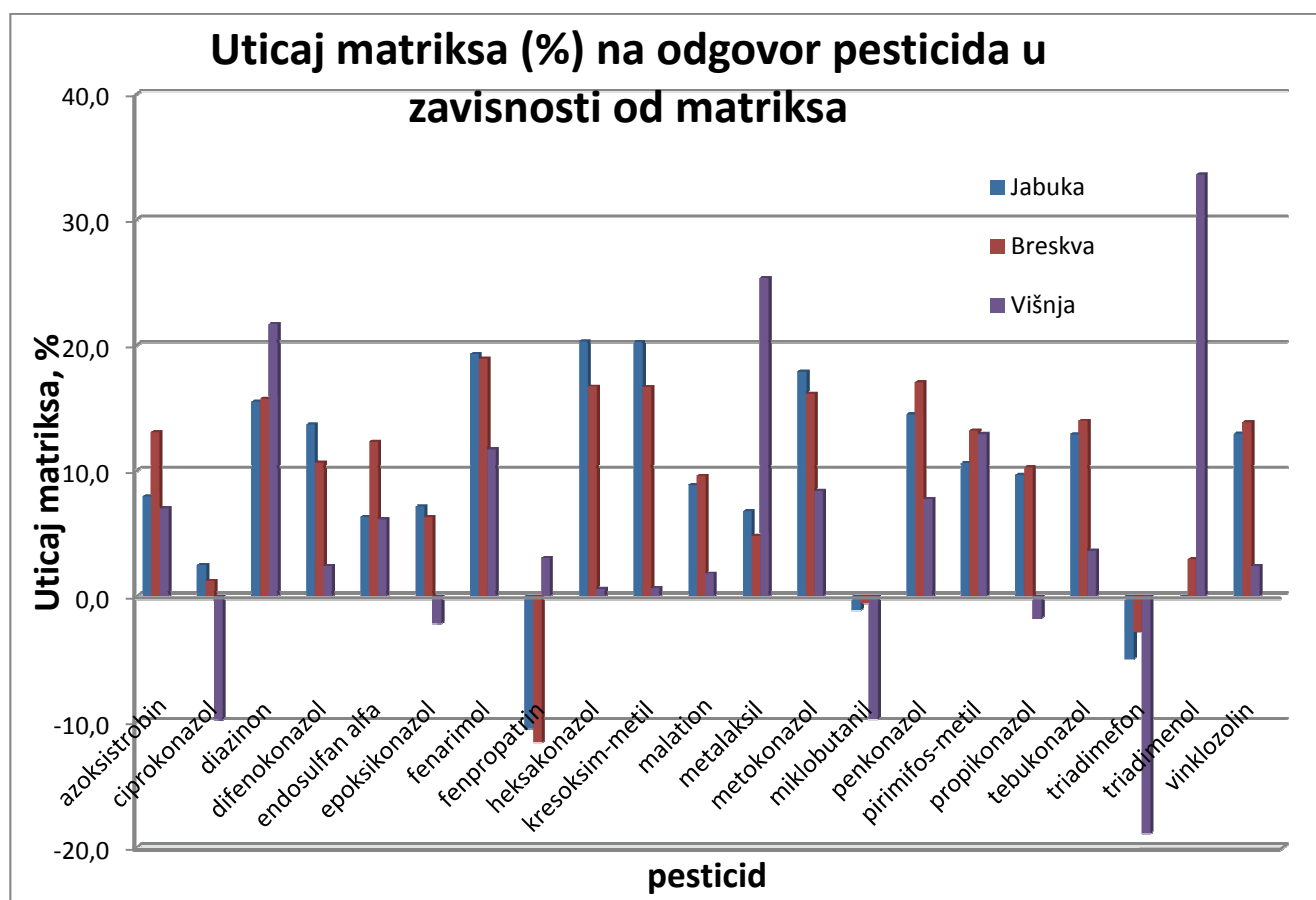
Pesticid	RASTVARAČ		JABUKA	
	$y=ax+b$	R^2	$y=ax+b$	R^2
Azoksistrobin	$y = 2634,9921x + 9299,7197$	0,9984	$y = 2425,0391x + 8136,708$	0,9983
Endosulfan α	$y = 1234,6687x + 4936,0469$	0,9983	$y = 1156,6741x + 4130,598$	0,9984
Metalaksil	$y = 1300,7134x + 564,4581$	0,9987	$y = 1212,7617x + 2839,314$	0,9948
Ciprokonazol	$y = 260,2648x + 786,3338$	0,9892	$y = 253,7926x + 998,0482$	0,9953
Epoksikonazol	$y = 1257,0000x - 2144,7759$	0,9993	$y = 1167,1319x + 500,0853$	0,9948
Fenarimol	$y = 1530,3141x - 853,1453$	0,9992	$y = 1235,0881x + 4216,308$	0,9929
Malation	$y = 779,9812x - 1028,2422$	0,9996	$y = 710,9586x + 19,7033$	0,9992
Miklobutanil	$y = 169,0742x - 225,2720$	0,9990	$y = 170,9267x - 62,2330$	0,9985
Triadimefon	$y = 173,5503x - 326,3526$	0,9994	$y = 182,2041x - 173,8876$	0,9989
Triadimenol	$y = 356,5095x - 771,1475$	0,9993	$y = 356,5236x - 353,5502$	0,9989
Diazinon	$y = 312,0288x - 1759,2462$	0,9963	$y = 263,6676x - 1226,8469$	0,9863
Difenokonazol	$y = 798,1922x - 1607,5732$	0,9992	$y = 689,0482x + 2045,4407$	0,9939
Fenpropatrin	$y = 6,6304x + 41,7223$	0,9963	$y = 13,4770x - 134,5718$	0,9783
Krezoksi metil	$y = 159,4809x - 450,5061$	0,9994	$y = 127,1755x + 892,528$	0,9912
Hexakonazol	$y = 35,2392x - 154,0562$	0,9992	$y = 26,9372x + 163,7881$	0,9904
Metokonazol	$y = 1257,7501x - 2725,8463$	0,9990	$y = 1032,7923x + 4396,226$	0,9945
Penkonazol	$y = 534,2088x - 858,5526$	0,9992	$y = 456,7549x + 1341,7405$	0,9968
Pirimifos-metil	$y = 309,5438x - 1073,3262$	0,9978	$y = 276,7367x - 123,2269$	0,9959
Propikonazol	$y = 345,3644x - 543,0848$	0,9992	$y = 311,9676x + 546,4876$	0,9972
Tebukonazol	$y = 1405,3809x - 3263,1511$	0,9991	$y = 1223,9135x + 2939,324$	0,9969
Vinklozolin	$y = 261,7206x - 302,4874$	0,9990	$y = 227,8242x + 619,5188$	0,9969
Pesticid	BRESKVA		VIŠNJA	
	$y=ax+b$	R^2	$y=ax+b$	R^2
Azoksistrobin	$y = 2290,4757x + 6860,4510$	0,9987	$y = 2450,5110x - 376,585$	0,9991
Endosulfan α	$y = 1082,6079x + 3429,3260$	0,9987	$y = 1158,8828x - 461,1869$	0,9992
Metalaksil	$y = 1237,8600x - 819,2534$	0,9995	$y = 971,0866x + 406,5581$	0,9942
Ciprokonazol	$y = 257,0639x - 355,6623$	0,9990	$y = 285,8891x - 201,9772$	0,9985
Epoksikonazol	$y = 1177,8580x - 1956,8779$	0,9992	$y = 1284,4576x - 3246,813$	0,9981
Fenarimol	$y = 1240,9157x - 1297,8270$	0,9994	$y = 1351,3994x - 4336,619$	0,9975
Malation	$y = 705,1676x - 1094,6612$	0,9994	$y = 122,4770x - 134,5718$	0,9901
Miklobutanil	$y = 170,0056x - 320,0747$	0,9996	$y = 185,6671x - 556,4481$	0,9980
Triadimefon	$y = 178,4855x - 220,7568$	0,9987	$y = 206,3556x - 570,7967$	0,9992
Triadimenol	$y = 346,0311x - 308,7120$	0,9994	$y = 236,6986x + 690,5898$	0,9880
Diazinon	$y = 262,9303x - 2144,5780$	0,9700	$y = 244,4221x - 1102,4275$	0,9938
Difenokonazol	$y = 713,1781x - 906,9924$	0,9994	$y = 778,9306x - 1913,1962$	0,9984
Fenpropatrin	$y = 13,6100x + 19,6321$	0,9995	$y = 11,8183x - 25,9328$	0,9801
Krezoksi metil	$y = 132,9136x - 155,7969$	0,9994	$y = 158,4583x - 131,3504$	0,9996
Hexakonazol	$y = 26,2551x - 14,4686$	0,9996	$y = 36,4702x - 135,0487$	0,9955
Metokonazol	$y = 1054,6568x - 1459,3723$	0,9993	$y = 1152,2162x - 1510,620$	0,9992
Penkonazol	$y = 443,1588x - 467,4050$	0,9995	$y = 492,7612x - 96,8944$	0,9990
Pirimifos-metil	$y = 268,6667x - 1227,7531$	0,9952	$y = 269,5281x - 1015,4641$	0,9958
Propikonazol	$y = 309,8722x + 59,8945$	0,9993	$y = 351,4018x - 741,0230$	0,9987
Tebukonazol	$y = 1209,1079x - 1320,2316$	0,9993	$y = 1354,6431x - 1715,723$	0,9993
Vinklozolin	$y = 225,5079x - 477,7500$	0,9993	$y = 255,3928x - 295,6765$	0,9993

Uticaji matriksa su izračunati na osnovu nagiba kalibracionih krivih (Tabela 1), a dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 2 i na Slici 1.

Tabela 2. Uticaj matriksa na kalibraciju (%)

Pesticid	Jabuka	Breskva	Višnja	Pesticid	Jabuka	Breskva	Višnja
Azoksistrobin	8,0	13,1	7,0	Difenokonazol	13,7	10,7	2,4
Endosulfan alfa	6,3	12,3	6,1	Fenpropatrin	-10,6	-11,6	3,1
Metalaksil	6,8	4,8	25,3	Krezoksi metil	23,6	25,5	12,8
Ciprokonazol	2,5	1,2	-9,8	Hexakonazol	20,3	16,7	0,6
Epoksikonazol	7,1	6,3	-2,2	Metokonazol	17,9	16,1	8,4
Fenarimol	19,3	18,9	11,7	Penkonazol	14,5	17,0	7,8
Malation	8,8	9,6	1,8	Pirimifos-metil	10,6	13,2	12,9
Miklobutanil	-1,1	-0,6	-9,8	Propikonazol	9,7	10,3	-1,7
Triadimefon	-5,0	-2,8	-18,9	Tebukonazol	12,9	14,0	3,6
Triadimenol	0,0	2,9	33,6	Vinklozolin	13,0	13,8	2,4
Diazinon	15,5	15,7	21,7				

Tabelarno prikazani rezultati navode na zaključak da matriksi kao što su jabuka i breskva pokazuju sličan, a matriks višnje različit uticaj na ispitivane pesticide. Značajan uticaj matriksa jabuke i breskve je zabeležen kod fenarimola, diazinona, krezoksi-metila, heksakonazola i metokonazola (>15%). Matriks višnje najviše utiče na metalaksil, triadimefon i diazinon. Diazinon je pesticid na koji matriks ima najveći uticaj usled čega je i koeficijenti korelacije diazinona manji od 0,99 u svim ispitivanim matriksima.



Slika 1. Uticaj matriksa na ispitivane pesticide u različitim matriksima

Zaključak

Prilikom određivanja ostataka pesticida u voću metodom LC-MS/MS komponente matriksa mogu dovesti do povećanja ili smanjenja odgovora detektora. Multirezidualnom LC-MS/MS analizom, ispitan je uticaj matriksa jabuke, višnje i breskve na kalibraciju 21 pesticida. Na osnovu nagiba kalibracionih krivih, zaključeno je da matriksi jabuke i breskve imaju sličan, a višnje različit uticaj na ispitivane pesticide. Da bi se prevazišao uticaj matriksa i omogućila tačna kvantifikacija ostataka pesticida, korišćena je metoda kalibracije obogaćenog uzorka (matrix-matched calibration).

Zahvalnica: Istraživanja u ovom radu deo su projekta "Stvaranje slabobujnih podloga za trešnju i višnju i razvijanje intenzivne tehnologije gajenja na principima održive poljoprivrede", TR 31038, koji finansira Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije.

Effect of apple, sour cherry and peach matrices on the determination of pesticide residues

In the determination of pesticide residues by the LC-MS/MS the matrix components may bring about the increase or decrease of the detector response, with an incorrect quantification as a consequence. In order to reduce the matrix influence, one of the ways is the use of matrix match calibration. By LC-MS/MS multi-residual analysis the effect of apple, sour cherry and peach matrices on the calibration has been investigated. Based on the slope of the calibration curves, the matrices of apples and peaches have a similar effect whereas the matrix of sour cherries shows different effect on the calibration of the some studied pesticides.

Literatura:

1. J. Hajšlova, J. Zrostlíková. *Journal of Chromatography A*, 1000, (2003) 181
2. Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje i o hrani za životinje za koju se utvrđuju maksimalno dozvoljene količine ostataka sredstava za zaštitu bilja (2010), Službeni glasnik RS broj 25/2010.
3. H.R Chao, S.L. Wang, T.C. Lin, X.H. Chung. *Chemosphere*, 62, (2006) 1774
4. F. Hernandez, M. Ibanez, J.V. Sancho, O.J. Pozo. *Analytical Chemistry*, 76, 15, (2006) 4349
5. J. Wang, W. Cheung, D. Grant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, (2005) 528
6. C.C. Leandro, P. Hancock, R.J. Fussell, B.J. Kelly. *Journal of Chromatography A*, 1103, (2006) 94
7. SANCO/10684/2009, Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed (2009)
8. D. Shtereva, R. Mladenova, G. Vuković, S. Lazić, V. Bursić, Evaluation of analytical methods for determining pesticides in baby food, 1st Euro-Mediterranean Symposium for Fruit and Vegetable Processing, 18-21.04.2011., The abstract book, 129, Avignon, France.

Influence of different carbonization and activation parameters on pesticide adsorption on carbon monolith

Marija M. Vukčević, Ana Kalijadis*, Biljana Babić**, Zoran Laušević*, Mila D. Laušević

Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, P.O.Box 494, 11001 Belgrade

**Laboratory of Physics, Vinca Institute of Nuclear Sciences, University of Belgrade, P.O.Box 522, 11001 Belgrade*

***Laboratory of Material Science, Vinca Institute of Nuclear Sciences, University of Belgrade, P.O.Box 522, 11001 Belgrade*

Introduction

Carbon monolith (CM) is relatively new carbon material. Depending on the application, CM can be produced with desirable shape and morphology, controlled composition, structure and porosity. CMs are potentially useful in a wide variety of applications such as: residential water filtration, volatile organic compound emission control,¹⁻⁴ indoor air purification, chemical separation,⁵ catalysis, biocatalysts⁶, adsorption, porous electrodes under continuous flow condition and chromatography columns. In our previous work⁷ we have impregnated CM with silver and used it successfully for water disinfection.

The last few years have been marked with a growing interest in carbon monolith as an alternative for conventional carbon materials. In this work the attempt was made to use activated CM, as an alternative for activated carbon, as adsorbent for the removal of pesticides from aqueous solutions. Pesticides are the group of hazardous compounds that may pollute water due to their extensive application in agriculture⁸. Several methods are available for pesticides removal such as photocatalytic degradation, combined photo-Fenton and biological oxidation, advanced oxidation processes, aerobic degradation, nanofiltration membranes, ozonation and adsorption⁹. Adsorption on activated carbon is the most widespread technology used to deal with the purification of water contaminated by pesticides¹⁰⁻¹³.

The main objective of this work was to find appropriate carbonization and activation parameters in order to obtain material with good adsorption properties toward pesticides. Different carbon monolith samples were obtained by changing carbonization temperature and the amount of potassium hydroxide used as activated agent. Adsorption properties of resulted CM samples were determined by adsorption of five pesticides: acetamiprid, dimethoate, nicosulfuron, carbofuran and atrazine. The influence of the carbonization temperature and the activation parameters on the specific surface area, surface functional groups and adsorption properties of activated CM samples were studied.

Materials and methods

Material. CMs precursor in the shape of cylinder (length 3.0 cm, diameter 1.8 cm) with 8600 parallel capillary channels (80 μm in diameter each) inside the cylinder were purchased from Fractal Carbon (London, UK). This is a composite material, consisting of the glassy carbon bed and activated carbon on the inner capillary walls.

Carbonization and activation of carbon monolith. In the 2-step activation process, the carbon precursor, were first carbonized at 700 and 1000 °C under constant nitrogen flow, with the heating rate of 5 °C/min. After carbonization, carbonized samples were chemically activated using KOH as an activating agent. Carbonized samples were mixed with KOH pellets in different KOH : carbonized material weight ratio (1:1, 2:1). Samples were placed in the furnace and heated at a rate of 5 °C/min to 900 °C. Activation process was carried out under a constant nitrogen flow. The resulting products after activation were thoroughly washed with tap water and finally distilled water to remove the residual KOH until the pH value of the washed solution ranged from 6 to 7. Four samples, obtained in this way were used for further examination. Samples were denoted as CM719, CM729, CM119 and CM129. The first number in the sample code represents a temperature of carbonization: 7 for 700 °C and 1 for 1000 °C; the second number in the sample code represents the amount of activating agent used: 1 for the KOH : carbon material ratio 1:1, and 2 for the ratio 2:1; the last number specify the temperature of activation: 9 for the 900 °C.

Porosity. Adsorption and desorption isotherms of N₂ were measured at -196°C, using the gravimetric McBain method. The specific surface area, S_{BET}, pore size distribution, mesopore including external surface area, S_{meso}, and micropore volume, V_{mic}, for the samples were calculated from the isotherms. Pore size distribution was estimated by applying BJH method¹⁵ to the desorption branch of isotherms. Mesopore surface and micropore volume were estimated using the high resolution α_s plot method¹⁶. Micropore surface, S_{mic}, was calculated by subtracting S_{meso} from S_{BET}.

Surface oxygen groups. Temperature-programmed desorption (TPD) in combination with mass spectrometry was used to investigate the nature and thermal stability of CM surface oxygen groups. The TPD profiles were obtained using a custom-built set-up, consisting of a quartz tube placed inside an electrical furnace. A CM samples were outgassed in the quartz tube and subjected to TPD at a constant heating rate of 10°C/min to 900 °C under high vacuum. The amounts of CO and CO₂ released from the carbon monolith sample (0.1 g) were monitored using an Extorr 300 quadrupole mass spectrometer (Extorr Inc, USA).

Pesticide adsorption. Adsorption of pesticides on the CM samples (0.5 g) was performed from the 50 ml of pesticide aqueous solution in batch system with constant shaking. Initial concentration of each pesticide was 500 ppb. The concentration of pesticides was determined at the end of 2 h adsorption period using HPLC-MS/MS method¹⁷.

HPLC-MS/MS analysis. Surveyor HPLC system (Thermo Fisher Scientific, USA) was used for the separation of the analytes on the reverse-phase Zorbax Eclipse XDB-C18 column, 75 mm long, 4.6 mm i.d. and 3.5 μ m particle size (Agilent Technologies, USA). The mobile phase consisted of methanol (A), water (B) and acetic acid (C). Gradient changed as follows: 0 min 59 % A, 40 % B, 1 C; 10 min 99 % A, 1 % C; 15 min 59 % A, 40 % B, 1 % C. The flow rate of the mobile phase was 0.5 ml/min. An aliquot of 10 μ l of the aqueous solution was injected into HPLC system. Quadrupole ion trap mass spectrometer, LCQ Advantage (Thermo Fisher Scientific, USA), was used for detection and quantification of pesticides. The electrospray ionization technique was used and all pesticides were analyzed in the positive ionization mode.

Results and discussion

Specific surface areas calculated by BET equation (S_{BET}), micropore and mesopore area, micropore volume and pore radius are listed in Table 1. S_{BET} values, for all samples, lie within 172-1144 m² g⁻¹. Values of S_{BET} from Table 1 show that carbonization at 700°C gives samples with higher specific surface than carbonization at 1000°C. Also, activation in higher amount of hydroxide significantly increases specific surface and porosity of the samples. Pore size distribution (PSD) of CM shows that all samples are microporous with most of the pores radius below 2 nm. Activation in higher amount of hydroxide slightly increases the amount of mesopores.

TPD profiles of CO and CO₂ evolution for all tested CM samples are shown in Figure 1. The TPD profiles of all tested CM samples show intensive peaks at relatively high temperature (from 650 °C to 780 °C). Also, the CO desorption profiles have a maximum at the temperature which coincides with the maximum in CO₂ desorption profile, which indicates the existence of anhydride groups¹⁹. In our previous work TPD analysis of non-activated CM sample did not show presence of considerable amount of carboxylic anhydrides¹⁴. Therefore, the presence of high amount of anhydride groups on the surface of activated CM samples is probably consequence of KOH activation process. The CO₂ desorption profile (Fig. 1b) for sample CM129 shows intensive TPD peak around 300 °C, which are related to the presence of carboxylic groups. For sample CM119 TPD peak at this temperature is less intensive but also present, while for CM samples carbonized at 700 °C so intensive peaks at this temperature were not observed.

The amounts of CO and CO₂ released from the surface of CM samples were obtained by integration of corresponding TPD curves (Table 1). For the CM samples carbonized at 1000 °C, increased amount of activating agent enhanced the amount of surface oxygen groups. On the other hand, for the CM samples carbonized at 700 °C, the increase of KOH amount decreases the amount of surface oxygen groups.

Concentration of pesticides in aqueous solution after adsorption was determined by HPLC-MS/MS method. Mass chromatogram of the pesticides is given in Figure 2a. From obtained MS² spectra of pesticides, most abundant fragment ions were selected. The selected reaction monitoring (SRM) mode was used for quantification of all pesticides. The level of adsorption at the end of 2 h adsorption period was presented as an amount of pesticides adsorbed on the CM samples (Figure 2b).

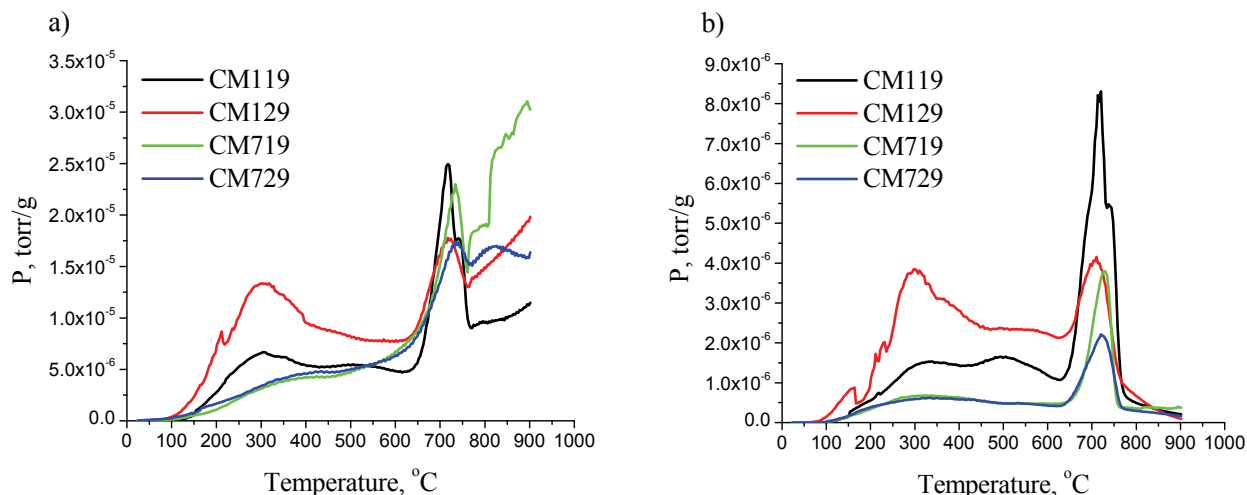


Figure 1. TPD spectra of CM samples: (a) CO and (b) CO₂ desorption profile.

Table 1. Surface properties of CM samples

Sample	S _{BET} m ² /g	S _{micro} m ² /g	S _{meso} m ² /g	V _{micro} cm ³ /g	r _p nm	CO evolving groups, mmol/g	CO ₂ evolving groups, mmol/g	CO + CO ₂ , mmol/g
CM119	172	168	4	0.084	1.54	2.068	0.772	2.840
CM129	843	823	20	0.396	1.78	3.103	1.031	4.134
CM719	341	398	2	0.160	2.03	2.637	0.335	2.972
CM729	1144	1133	11	0.540	2.03	2.173	0.283	2.456

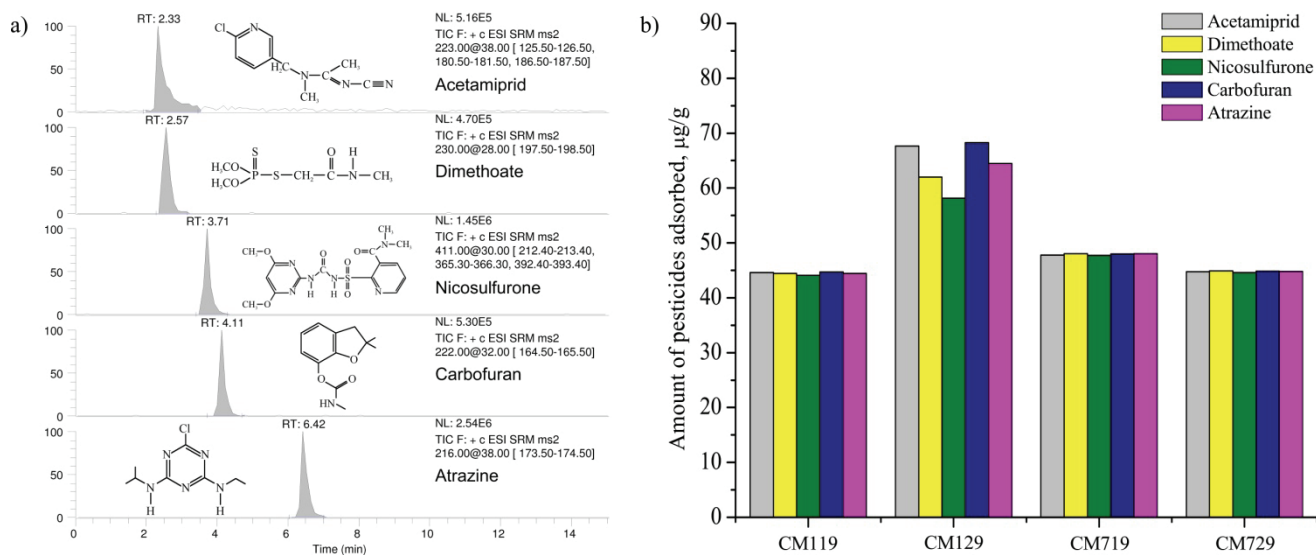


Figure 2. a) Mass chromatogram of the pesticides and
b) amount of pesticides adsorbed on the surface of activated CM samples.

Generally, all activated CM samples have good adsorption properties toward selected pesticides. Also, there is no strong competition between examined pesticides in adsorption on activated CM surface. The most pronounced adsorption capability is observed for the sample CM129 which is in agreement with the results of TPD analysis. The amounts of pesticides adsorbed on the samples CM119, CM719 and CM729 are rather similar. According to TPD results, these samples have the similar amounts of surface oxygen groups and despite the differences in specific surface area values they adsorb similar amounts of pesticides.

Conclusion

In this work we produced the microporous activated carbon monolith by changing the parameters of carbonization and activation. The higher specific surface area was obtained by using higher amount of activating agent for both carbonization temperatures. TPD analysis showed presence of anhydride groups on all CM samples and carboxylic groups on CM samples carbonized at 1000 °C. The possibility of using produced materials for pesticide removal was also tested. Although, all tested samples have good adsorption properties, the most pronounced adsorption capability is observed for the sample CM129 with higher amount of surface oxygen groups. From the results obtained it can be concluded that specific surface area is not crucial factor for pesticide adsorption on CM surface. On the other hand, the nature and the amount of surface oxygen groups show dominant effect on pesticide adsorption.

Acknowledgments. The authors wish to thank the Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia for financial support through the project of Basic Research, number 172007 and Physics and Chemistry with Ion Beams (III) number 45006.

Uticaj parametara karbonizacije i aktivacije na adsorpciju pesticida na površini karbon monolita

U ovom radu je predstavljeno dobijanje različitih uzoraka aktiviranog karbon monolita menjanjem parametara karbonizacije i aktivacije. Površinske karakteristike dobijenih uzoraka predstavljene su specifičnom površinom određenom BET metodom, raspodelom pora i sadržajem površinskih funkcionalnih grupa dobijenih temperaturno-programiranom desorpcijom. Adsorpcija pesticida (actamiprid, dimetoat, nikosulfuron, karbofuran i atrazin) na uzorcima aktiviranog karbon monolita iz vodenih rasvora ispitivana je u šaržnom sistemu uz neprekidno mešanje. Dobijeni rezultati pokazuju da se aktivacijom sa kalijum hidroksidom dobijaju mikroporozni materijali čija specifična površina zavisi od količine aktivirajućeg agensa. Primenom više temperature karbonizacije i veće količine aktivirajućeg agensa dobija se uzorak karbon monolita sa najvećim sadržajem površinskih funkcionalnih grupa. Dobijeni rezultati su pokazali da adsorpciona moć uzoraka karbon monolita nije uslovljena vrednošću specifične površine već količinom i vrstom površinskih funkcionalnih grupa.

References:

1. L. Luo, D. Ramirez, M. J. Rood, G. Grevillot, K. J. Hay and D. L. Thurston, *Carbon* **44** (2006) 2715-2723.
2. F. D. Yu, L. Luo, G. Grevillot, *Chem. Eng. Process* **46** (2007) 70-81.
3. J. M. Gatica, J. M. Rodríguez-Izquierdo, D. Sánchez, T. Chafik, et al., *C. R. Chimie* **9** (2006) 1215-1220.
4. A. F. Pérez-Cadenas, F. Kapteijn, J. A. Moulijn, F. J. Maldonado-Hódar, et al., *Carbon* **44** (2006) 2463-2468.
5. J. L. Williams, *Catal. Today* **69** (2001) 3-9.
6. K. M. de Lathouder, D. Lozano-Castelló, A. Linares-Solano, F. Kapteijn and J.A. Moulijn, *Carbon* **44** (2006) 3053-3063.
7. M. Vukčević, A. Kalijadis, S. Dimitrijević-Branković, Z. Laušević and M. Laušević, *Sci. Technol. Adv. Mater.* **9** (2008) 015006.
8. E. Ayranci, N. Hoda, *Chemosphere* **60** (2005) 1600-1607.
9. B.H. Hameed, J.M. Salman, A.L. Ahmad, *J. Hazard. Mater.* **163** (2009) 121-126.
10. N. Daneshvar, S. Aber, A. Khani, A. R. Khataee, *J. Hazard. Mater.* **144** (2007) 47-51.
11. C. Palaekani, V. L. Snoeyink, *Carbon* **38** (2000) 1423-1436.
12. E. Ayranci, N. Hoda, *J. Hazard. Mater. B* **112** (2004) 163-168.
13. E. Ayranci, N. Hoda, *Chemosphere* **57** (2004) 755-762.
14. M. Vukčević, A. Kalijadis, Z. Jovanović, Z. Laušević, M. Laušević, *Acta Phys. Pol. A* **120** (2011) 284-288.
15. E.P. Barret, L.G. Joyner, P.P. Halenda, *J. Am. Chem. Soc.* **73** (1951) 373-380.
16. Kaneko K, Ishii C, Kanoh H, Hanzawa Y, Setoyama N, Suzuki T. *Adv. Colloid Interfac.* **76-77** (1998) 295-320.
17. M. Radišić, S. Grujić, T. Vasiljević, M. Laušević, *Food Chem.* **113** (2009) 712-719
18. K. S. W Sing, D. H. Everett, R. A. W Haul, L. Moscou, et al., *Pure Appl. Chem.* **57** (1985) 603-619.
19. M. Domingo-Garcia, F.J. Lopez Garzon, M.J. Perez-Mendoza, *J. Colloid. Interface Sci.* **248** (2002) 116-122.

Elektrohemija / Electrochemistry

Cyclic voltammetric detection of epinephrine, ascorbic acid and uric acid using TX-100 modified carbon paste electrode

Bahadurgatta E. Kumara Swamy* and Bananakere N. Chandrashekar

*Dept. of P.G. Studies and Research in Industrial Chemistry, Kuvempu University,
Shankaraghatta -577 451, Shimoga, Karnataka, India.*

1. Introduction

Epinephrine (EN), ascorbic acid (AA) and uric acid (UA) are compounds of great biomedical interests, playing determining roles in human metabolism. The catecholamines are a group of compound bearing a dihydroxyphenyl moiety [1]. Epinephrine [1-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-methylaminoethanol], is a very important catecholamine neurotransmitter in the central nervous system. It exists as an organic cation in the nervous tissue and biological body fluid. Many diseases are ascribed to changes of its concentration [2]. EN has, therefore, been attracted tremendous consideration in biomedically-oriented research. Hence, it is very necessary to develop sensitive, selective, and reliable methods for the direct determination of trace EN due to its physiological function and the diagnosis of some diseases in clinical medicine. Therefore, it is very important to develop sensitive and selective analytical methods for the detection of EN in biological fluids [3]. Various methods, including spectrophotometry [4], fluorimetry [5], and electrochemiluminescence [6] have been employed to the determination of EN. Because EN is an electroactive compound, its electrochemical detection has been the focus of research for electroanalytical researchers and neurochemists. Similarly AA is a vital vitamin in the diet of humans and is present in mammalian brain along with several neurotransmitter amines. AA has been used for the prevention and treatment of common cold, mental illness, infertility, cancer and AIDS [7]. Uric acid is one of the great challenges to analytical chemists because abnormal levels of UA in urine and serum cause several diseases such as gout, hyperuricemia, and Lesch–Nyhan syndrome [8]. Several reports have shown that determination of UA by the electrochemical method is very simple, convenient, and more sensitive than other methods [9, 10]. One of the major problems with the determination of UA comes from the electrochemical interference such as AA because the oxidation of AA occurs at a potential close to that of UA [11]. Therefore, it is essential to develop simple and rapid methods for determination of these biological molecules in routine analysis. EN, AA and UA are electrochemically active compounds co-existing in body fluids and can be determined by electrochemical techniques. However, at the conventional electrode the electrochemical property of EN shows that the irreversible nature and requires overpotential. Furthermore, the oxidation potential of AA and UA overlaps with that of EN because AA largely coexists with EN in brain tissue, the content of which is 100–1000 times greater than that of EN. Simultaneous detection of catecholamines neurotransmitters (EN) in the presence of AA and UA is a problem of critical importance not only in the field of biomedical chemistry and neurochemistry but also for diagnostic and pathological research. Moreover the solid electrodes are very often suffer from the fouling effect due to the accumulation of oxidized product on the electrode surface, which results in rather poor selectivity and sensitivity. Electrochemical techniques with modified electrodes have received a great interest for simultaneous determination of neurotransmitters in the presence of AA and UA as they are more selective and less time consuming than those based on other colorimetric or spectrophotometric methods. There are few reports on reporting the determination of EN at modified electrodes [12-15].

In the present work, the method of fabrication of TX-100 modified carbon paste electrode was reported and applied for the study of simultaneous investigation of EN, AA and UA by cyclic voltammetric technique. It was shown that the anodic current peaks of AA, EN and UA could be well resolved, and therefore, a sensitive and selective electrochemical sensor for simultaneously determination of these three compounds has been established. The TX100/CPE could have a significant attraction in biological and chemical research. The objective of this experimental set up is to develop an ease of operation, fast and sensitive detection method without complicated preparations of modified electrodes.

2. Materials and methods

2.1 Reagents

Epinephrine hydrochloride, ascorbic acid and uric acid were purchased from Himedia chemicals. All other reagents used in this study were all of analytical grade. A stock solution of 1×10^{-5} M EN was prepared by dissolving in 0.1 N perchloric acid. Phosphate buffer solution (pH-7.0) was prepared by mixing equal volumes of 0.1 M sodium dihydrogen orthophosphate solution and 0.1 M disodium hydrogen orthophosphate solution and adjusting the pH with 0.1N sodium hydroxide solution or 0.1 N ortho-phosphoric acid solution. All the experiment carried at the room temperature.

2.2. Apparatus

Cyclic voltammetry (CV) was performed in an analytical system Model CHI-660c potentiostat. A conventional three-electrode cell assembly consisting of an $\text{Hg}_2/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ reference electrode and a Pt wire counter electrode were used for the electrochemical measurements. The working electrode was either an unmodified carbon paste electrode or TX-100/CPE. All the potentials were reported versus the $\text{Hg}_2/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ reference electrode. Digital pH meter MK VII from systronics was used for the adjustment of buffer solution pH.

2.3 Preparation of modified electrodes

A ratio of 60:40 of the graphite powder and the silicon oil was mixed thoroughly until the formation of homogenous mixture. Round cylindrical teflon tube pierced with copper wire was packed with carbon paste and then smoothened over the butter paper. The modifier TX-100 solution was immobilized over the surface of the bare carbon paste electrode and left for some time intervals to optimized the TX-100/CPE and later switched into the analyte solution.

3. Results and discussion

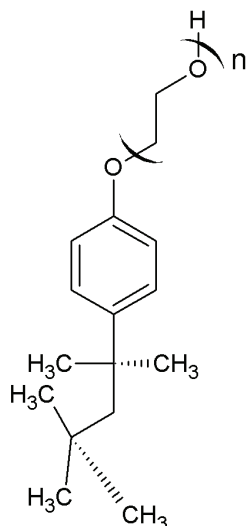
3.1 Calibration and electrochemical characterization of TX-100/CPE

TX-100 is a neutral surfactant having long chain hydrophobic and hydrophilic groups is shown in scheme. 1. Different concentration series of TX-100 solution was used for modifier and applied for the analysis of K_3FeCN_6 . As the concentration of the modifier increases, analyte could not shows any response due the surface hinderance by the long chain molecules. Hence the 10 mM TX-100 of different quantities have been immobilized over the unmodified carbon paste electrode and applied for the analysis of K_3FeCN_6 . It was clearly observed that, as the concentration of TX-100 increased, the anodic peak current of EN also increased with its capacitance current, hence it couldnot be easy to identify the peaks at higher concentration of modifier. Thus 30 μL TX-100 solution was used and applied for the analysis of neurotransmitters.

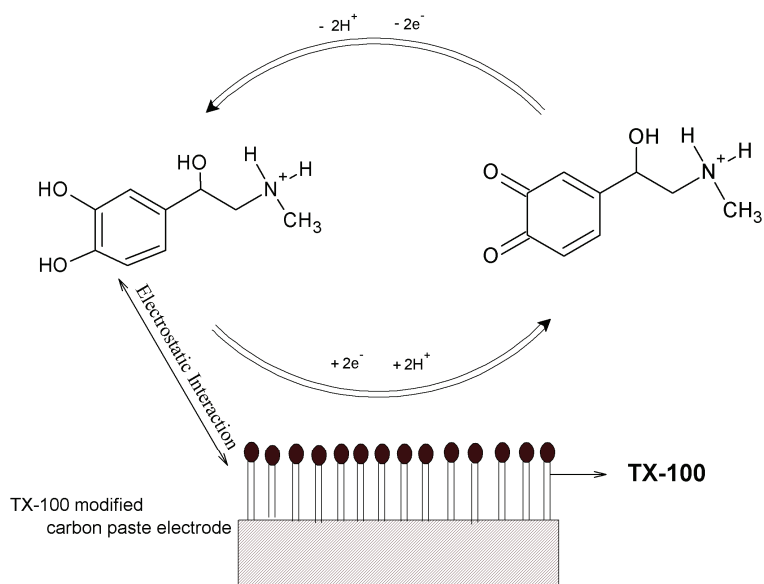
Fabricated TX-100/CPE was placed in the 0.1 M PBS (pH-7), showed no peaks at the potential between -0.4 to 0.6 V with the increase in its capacitance current which revealed that there was no peak interference of its modifier over the analyte solutions. The cyclic voltammograms of 1mM K_3FeCN_6 at TX-100/CPE reduces the oxidation overpotential with the enhancement in current as compare to that of bare carbon paste electrode and acts as good electrocatalytic biosensor. This indicates that the surface property of the modified electrode has been significantly changed and was evidenced by SEM which distinguished the surface morphology of the bare carbon paste electrode and TX/CPE. Based on the above observations the surfactant immobilized CPE had favorable and stable electrochemical behavior. Hence TX-100/CPE is used in an electrochemical biosensor for the investigation of catecholamine neurotransmitter.

3.2. Effect of TX-100 modified carbon paste electrode for the oxidation of EN

In order to elucidate the effect of TX-100/CPE for the determination of EN, the Fig. 1 shows the electrochemical responses of EN in the absence and presence of TX-100/CPE were examined by cyclic voltammetry, a very poor oxidation peak was observed for 1×10^{-5} M EN at bare carbon paste electrode (solid line). The oxidation peak potential is at 0.1497V and the peak current is very low (11.95 μA).



Scheme 1: Structure of TX-100



Scheme 2: Mechanism of oxidation of epinephrine at TX-100/CPE

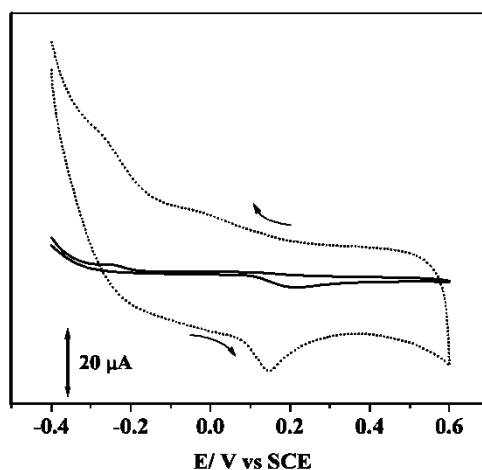


Fig. 1. Cyclic voltammograms of $0.5 \times 10^{-4} \text{ M}$ EN in pH 7.0 phosphate buffer solution at TX-100/CPE (dotted line) and bare CPE (solid line). Scan rate: 50 mVs^{-1} .

However, the oxidation peak current increases greatly ($52.18 \mu\text{A}$) after using TX-100/CPE, and the oxidation peak potential is shifted to negative side at 1.42 V (dotted line), suggesting that TX-100/CPE shows obvious electrocatalytic activity towards the oxidation of EN with the reduction of over oxidation potential around 0.0927 V . TX-100, a neutral surfactant, adsorbed on carbon paste electrode surface via hydrophobic interaction and then change the structure of electrode/solution interface, which facilitating the electron transfer of EN is depicted in Scheme 2. Otherwise, the surface amount of EN may be greatly increases in the presence of TX-100. Therefore, the oxidation peak current of EN significantly increases at TX-100/CPE. As increasing the concentration of EN from 10 to $50 \mu\text{M}$, it is found that the oxidation peak current increases. These phenomena reveal that the oxidation peak at 0.1497 V corresponds to EN, and its different concentration. It was also confirmed that the plot of the catalytic peak current versus the EN concentration was linear with the correlation coefficient $R^2=0.9974$. The peak currents of $10 \mu\text{M}$ EN remained the same after five continuous cyclic scanning. After the cyclic voltammograms of the TX-100/CPE for EN was rinsed with distilled water, no response of EN was observed in the phosphate buffer solution, which proved that the EN does not adsorb onto the TX-100 /CPE surface and suggesting that the electrode reaction is diffusion-limited. The peak potential for the catalytic oxidation of EN shifts to more positive potentials with increasing scan rate, suggesting a kinetic limitation in the reaction between the TX-100/CPE and EN. Effect of scan rate has a great influence on the peak current. The anodic peak current I_{pa} of the TX-100/CPE in EN solution is linear with the square root of the scan rate in the range from 25 to 200 mVs^{-1} with a correlation

coefficient of 0.9974. The linear regression equation is expressed as $I_p/\mu\text{A}=0.3782/\mu\text{A}+0.8920/(v/\text{mVs}^{-1})$. However, the inset demonstrated the oxidation current for EN increased linearly with the scan rate, suggesting that the reaction is mass transfer controlled process.

3.3 Simultaneous determination of AA, EN and UA at TX-100/CPE

The prime objective of the present study was to utilize the TX-100 modified electrode for the selective and sensitive analysis of EN in the presence of large amount of AA and UA. The CVs of different concentrations of AA, EN and UA were recorded at a bare carbon paste electrode (solid curve) and TX-100/CPE (dashed curve), is shown in Fig. 2. One of the main objectives of this study was the development of a modified electrode capable of the electrocatalytic oxidation of AA and separation of the electrochemical responses of AA, EN and UA. As shown, the unmodified CPE could not separate the voltammetric signals of EN, AA and UA mixture. On the other hand, in the case of the TX-100/CPE, three well-defined oxidation peak potentials of 0.0159, 0.1644 and 0.2964 V, corresponding to the oxidation of AA, EN and UA, respectively, is possible at the modified electrode. This suggests an efficient oxidation reaction of the three different species at the TX-100/CPE. It is very interesting to note that the sensitivities of the modified electrode towards AA in the absence and presence of EN and UA are virtually the same, which indicates the fact that the oxidation processes of AA, EN and UA at the TX-100/CPE are independent and therefore simultaneous measurements of the three analytes are possible without any interference. This separation was large enough to achieve the simultaneous determination of these three compounds in a homogeneous solution. The good separation in peak potential for AA, EN and UA could be attributed to the different adsorption affinity of these compounds on the modified electrode surface.

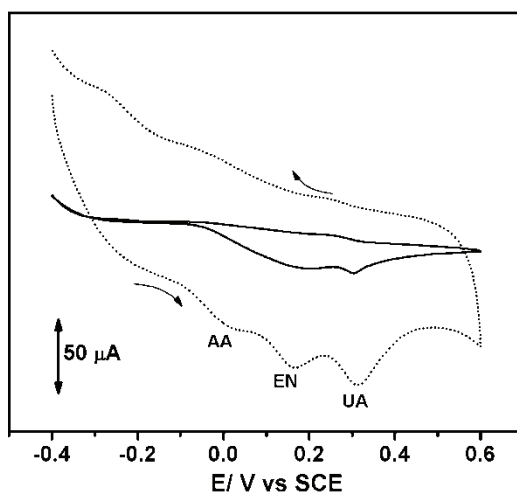


Fig. 2. Simultaneous cyclic voltammograms of 2 mM AA, 0.1 mM EN and 0.5 mM UA at bare (solid curve), TX-100/CPE (dashed curve) in pH 7.0 PBS. Scan rate: 50mVs^{-1} .

4. Conclusion

The work represents the anti-interference property and the electrocatalysis of the modified electrode. When the bare carbon paste electrode was modified with TX-100 surfactant by immobilization technique, the modified electrode has been shown to be selective and efficient for the electrocatalytic oxidation of AA and showed an interesting property that could selectively detect EN in the presence of excess AA. This provides many active sites and larger surface area, could efficiently enhances the selectivity and sensitivity. The proposed modified electrode is rapid, simple and low cost compared with other reported methods. At the same time, the oxidized product at the modified electrodes avoided fouling problems, provided good repeatability of the voltammograms and provided stability. Thus TX-100/CPE can be used as the biosensor and successfully applied for the determination of EN in the field of neurochemistry and biomedical chemistry.

References

1. H.K. Yildirim, A. Uren, U.Yucel, *Food Technol Biotechnol.*, **45** (2007) 62.
2. Y. Guo, J. Yang, X. Wu, H. Mao, *Talanta*, **73** (2007) 227.
3. P. Hernandez, I. Sanchez, F. Paton, L. Hernandez, *Talanta*, **46** (1998) 985.
4. M.H. Sorouraddin, J.L. Manzoori, E. Kargarzadeh, A.M.H. Shabani, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **18** (1998) 877.
5. A. Tzontcheva, N. Denikova, *Clin. Chim. Acta*, **297** (2000) 217.
6. F. Li, H. Cui, X. Q. Lin, *Anal. Chim. Acta*, **471** (2002) 187.
7. O. Arrigoni, M.C.D. Tullio, *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.*, **1569** (2002) 1.
8. H.A. Harper, *thirteen ed., Lange Medical, Los Altos, CA*, 1977.
9. X. Cai, K. Kalcher, C. Neuhold, *B. Ogorevc, Talanta*, **41** (1994) 407.
10. M. Pandurangachar, B.E. Kumara Swamy, B.N. Chandrashekar, O. Gilbert, B.S. Sherigara, *J. Mol. Liq.*, **158** (2011) 13.
11. T. Yao, Y. Taniguchi, T. Wasa, S. Musha, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **51** (1978) 2937.
12. J.G. Manjunatha, B.E. Kumara Swamy, G.P. Mamatha, Ongera Gilbert, B.N. Chandrashekar, B.S. Sherigara, *Int. J. Electrochem. Sci.*, **5** (2010) 1236.
13. R.C. Matos, L. Angnes, M.C.V. Araujo, T.C.B. Saldanha, *Analyst*, **125** (2000) 2011.
14. S. Shahrokhian, M. Ghalkhani, M.K. Amini, *Sens. Actuators B Chem.*, **137** (2009) 669.
15. B.N. Chandrashekar, B.E. Kumara Swamy, K. J. Gururaj, S. Chitravathi, M. Pandurangachar, *Chemical Sensors*, **2: 5** (2012) 1

Hemijsko inženjerstvo / Chemical Engineering

Preparation and characterization of hot-melt extruded solid dispersions of carbamazepine

Jelena Đuriš, Ioannis Nikolakakis*, Svetlana Ibrić, Zorica Đurić, Kyriakos Kachrimanis*

Department of Pharmaceutical Technology and Cosmetology, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia email: jelena.djuris@pharmacy.bg.ac.rs

**Department of Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, Aristotle University of Thessaloniki, Greece*

Introduction

Hot-melt extrusion (HME) is a simple technique widely used in the plastics, rubber and food industry. Recently it became more popular in the field of pharmaceuticals¹, since it provides the possibility to manufacture a variety of dosage forms: granules, pellets, tablets, suppositories, implants, stents, transdermal and transmucosal systems, ophthalmic inserts, etc². HME is performed at elevated temperatures converting a raw material into a product of uniform shape and density by forcing it through a die under controlled conditions³. There are many advantages of HME over conventional pharmaceutical manufacturing techniques; HME is solvent and dust-free, environmental friendly and continuous processing technique. Simple design of the processing tools allows easy scale-up to large scale extruders. HME requires usage of thermoplastic polymers that are molten in the heated extruder barrel and solidify once they leave the die attached at the end of the extruder. Furthermore, inclusion of additional excipients, such as plasticizers (e.g. poloxamer 407) to facilitate the HME processing, is often necessary. Thermoplastic polymer serves also as a matrix forming material for preparation of the solid dispersions of drugs. Excellent candidates for preparation of HME solid dispersions are poorly-soluble drugs⁴, such as carbamazepine (CBZ). CBZ is a BCS class II drug substance with low water solubility (0.12 mg/ml), additionally exhibiting polymorphism. A novel thermoplastic polymer, polyethylene-glycol- polyvinyl caprolactam- polyvinyl acetate grafted copolymer (Soluplus[®], BASF, Germany) has been selected for preparation of carbamazepine hot-melt extruded solid dispersions due to its low glass transition temperature, thermal stability at higher temperatures, high flowability and excellent solubilization properties⁵. The effect of additional plasticizer on extrudates properties was also investigated.

Materials and methods

Materials

Samples of carbamazepine (Ph. Eur. 7), glycol-polyvinyl caprolactam- polyvinyl acetate grafted copolymer (Soluplus[®], BASF, Germany) and poloxamer 407 (Lutrol[®] F127, BASF, Germany) were kindly donated by suppliers.

Preparation of solid dispersions by hot-melt extrusion technology

Composition of solid dispersions of carbamazepine prepared by the hot-melt extrusion technology is given in Table 1. Prior to hot-melt extrusion, powder mixtures were prepared manually using mortar and pestle.

Table 1. Composition of formulations used for solid dispersions preparation

% w/w of ingredient in the formulation	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
Carbamazepine	5	17.5	30	5	17.5	30	5	10	20	30
Soluplus [®]	95	82.5	70	85	72.5	60	75	80	60	50
Lutrol [®] F127	/	/	/	10	10	10	20	10	20	20

A single-screw hot-melt extruder was used (RCP-0250 Microtruder, Randcastle extrusion systems, USA). Powders mixtures were fed into the extruder by gravitational flow and powders were used as

received (no granulation or other particle agglomeration was needed). Approximately 10 g of physical mixtures were introduced to the extruder through a funnel, which was kept at a temperature of 8.2 °C. Four temperature zones of the extruder cylinder, from the feeding zone to the metering zone, were heated up to 100, 120, 125 and 130 °C, respectively. Rotational speed of the screw was adjusted to 30 rpm. The extrudates were collected after cooling at ambient temperature and cut manually in 2 – 4 mm length pieces.

Thermo-gravimetric analysis (TGA) and Differential scanning calorimetry (DSC)

Thermal analyses were carried out on a Shimadzu TGA-50 thermo-gravimetric analyzer and a DSC-50 differential scanning calorimeter (Shimadzu Corporation, Japan). Non-isothermal experiments were performed in the temperature range 20 – 220 °C at a heating rate of 10 °C/min and under a nitrogen purge gas flow of 50 ml/min. The average sample size was 5 mg. Instruments were calibrated for temperature and energy using indium standards.

Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR)

FT-IR spectra in the region of 600 – 4000 cm⁻¹ were obtained, after appropriate background subtraction, using a Shimadzu IR-Prestige-21 FT-IR spectrometer coupled with a horizontal Golden-Gate MKII single reflection ATR system (Specac, Kent, UK) equipped with a ZnSe lens.

Hot-stage microscopy (HSM)

HSM was undertaken with a Kofler hot stage (Reichert Thermovar, Austria) equipped with a temperature controller (Jumo iTron 04, Germany) under a polarized light microscope Olympus BX 41 (Olympus, Japan). The microscope was equipped with a Leica DFC295 camera controlled by the Leica Application Suite software (Leica Microsystems, Mannheim, Germany). Observation under crossed polarizers was used to detect crystallinity.

Dissolution testing

Dissolution testing was performed using the rotating basket apparatus (PT-DT7, Pharma Test, Germany), according to USP 35 monograph for immediate release CBZ tablets. Tests were performed in triplicate with spectrophotometric detection of CBZ (M330, Cam Spec, UK). According to the USP monograph, CBZ release rate should provide not less than 45 % of the drug released after 15 minutes and not less than 75 % released after one hour.

Results and discussion

Results of TGA analysis demonstrate that CBZ, Soluplus[®] and Lutrol[®] F127 can be used for the hot-melt extrusion process since no significant mass change was observed when the samples were heated up to 220 °C. The hot-melt extrudates of pure Soluplus[®] polymer and extrudates of binary mixtures of low fraction of CBZ in Soluplus[®] represent clear, transparent glassy solid solutions. Increase in the content of CBZ and addition of the plasticizer led to formation of more turbid, opaque dispersions (Figure 1a). By adding Lutrol[®] F127 in the extrudable powder blend, processing was facilitated by lowering the pressure monitored during the extrusion process. Further thermal analysis of the extrudates revealed that regardless of the CBZ content in the formulation, its melting peak (177.1 °C) is gone, indicating absence of crystallinity. By increasing the content of CBZ, melting endotherms become more pronounced and the onset of melting is shifted towards somewhat lower temperatures. These findings support the conclusion that Soluplus[®] is a suitable polymer for the hot-melt extrusion processing of CBZ, since the drug is dissolved in the molten polymer. According to the thermograms (Figure 3a) it could be anticipated that CBZ is molecularly/amorphously dispersed in all prepared extrudates. But, using the polarized light HSM technique, it was revealed that such solid solutions are only formed when the content of CBZ in the formulations is somewhat low (< 10 % w/w). Increase in CBZ content (up to 30 % w/w) leads to recrystallization of CBZ and, interestingly, these crystals melt at significantly lower temperature than pure CBZ. It was also noticed that the formulation containing plasticizer were less prone to recrystallization of CBZ in comparison to extruded binary mixtures of CBZ and Soluplus[®].

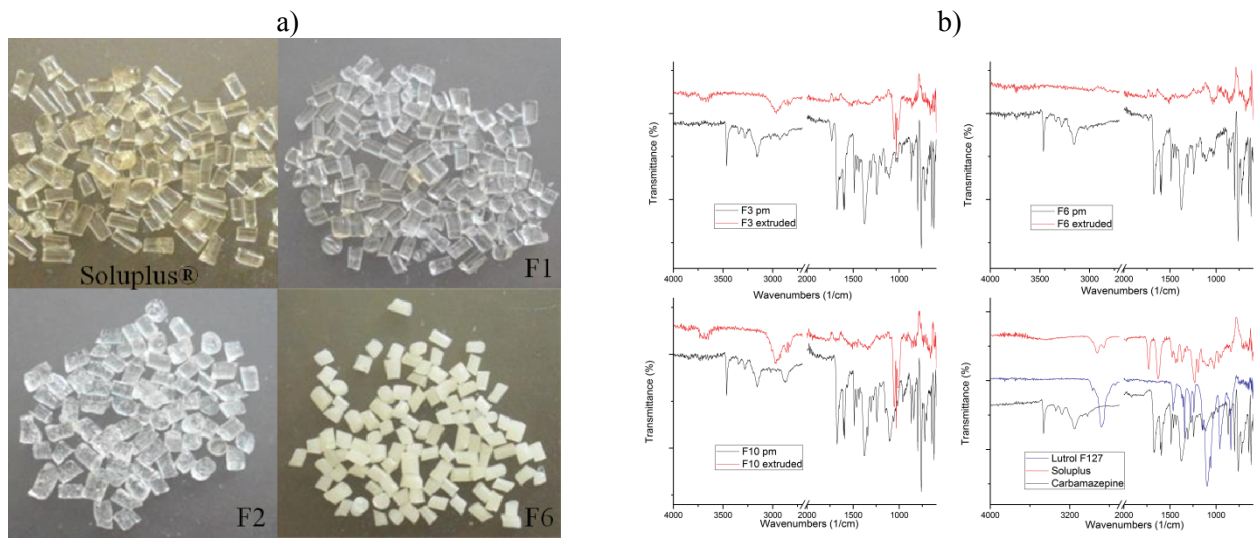


Figure 1. a) Hot-melt extrudates; b) FTIR spectra of raw materials and hot-melt extrudates

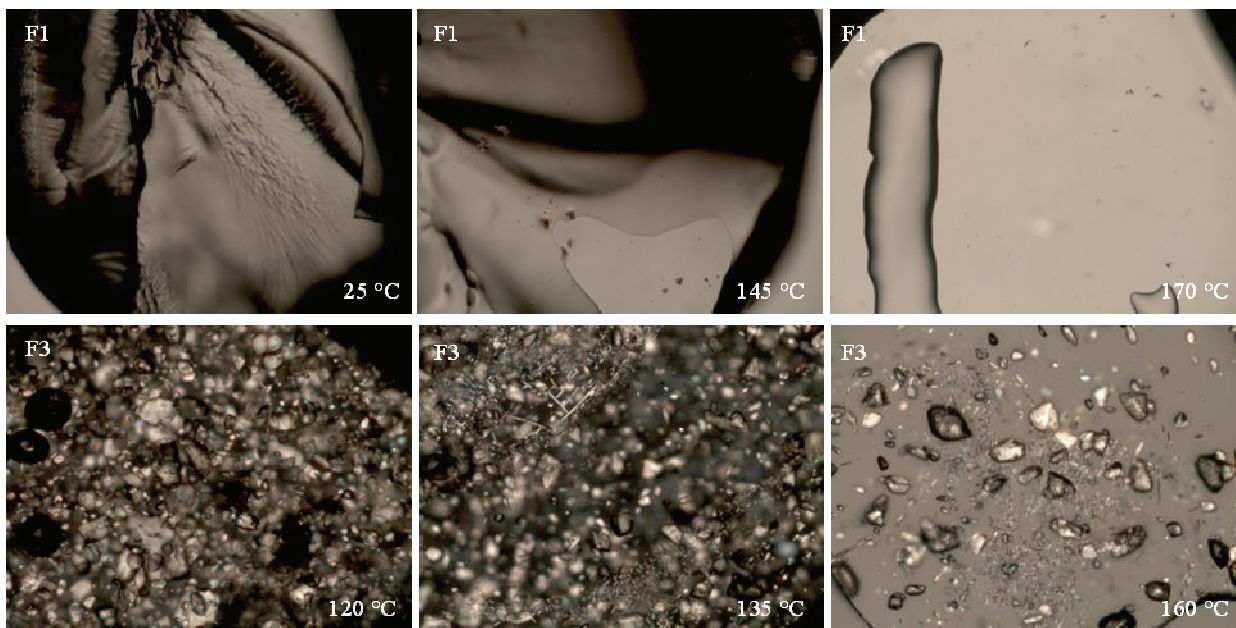


Figure 2. Photomicrographs of extrudates containing 5 % w/w (top) and 30 % w/w (bottom) of CBZ, taken on a polarized light Hot-Stage Microscope.

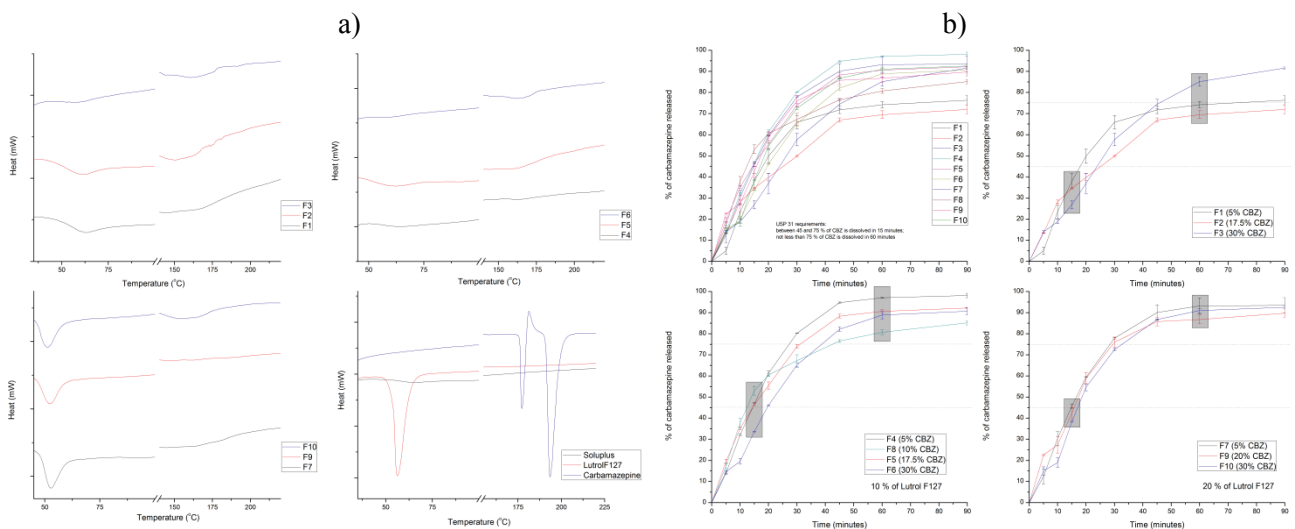


Figure 3. a) DSC thermograms of raw materials and hot-melt extrudates; b) CBZ release profiles of hot-melt extrudates

FTIR spectra of the physical mixtures were compared to those of the obtained extrudates (Figure 1b). FTIR spectra of the extrudates, in accordance to DSC results, lack characteristic peaks of the crystalline form III CBZ (at 3462, 3152, 1674, 1593, 1379 and 760 cm^{-1}). Peaks that were observed in the extrudates spectra are corresponding to either Soluplus[®] or Lutrol[®] F127 peaks (at 2924, 2880, 1730, 1632, 1466 and 1096 cm^{-1}).

Dissolution testing of the obtained extrudates demonstrated that for most of the formulations complete CBZ release in an hour can be expected. Being a poorly soluble drug, CBZ is burdensome for the development of formulations meeting the required pharmacopeial specifications. USP 35 requirement (not less than 45 % of CBZ released in 15 minutes and not less than 75 % of CBZ released in an hour) was met by the following formulations: F4, F5, F7 and F8. Formulation F8 demonstrated the fastest onset of CBZ release, with 53 % of the drug being released after 15 minutes. Interestingly, the level of CBZ dispersion (molecular or microcrystalline) in the extrudates did not influence its release rate as could be expected. Even though solid solutions of drugs are thought to dissolve more rapidly, it is the solubilization capacity (through micelle formation in water-based media) of Soluplus[®] that enabled release of CBZ dispersed as microcrystals. Noticeably, CBZ release from extrudates composed of binary mixtures of CBZ and Soluplus[®] was lower in comparison to CBZ release from extrudates containing a plasticizer. This positive effect of the plasticizer on CBZ release rate was confirmed for formulations where the ratio of CBZ to Lutrol[®] F127 was less than 1.75. This finding can be explained in two ways. Firstly, as noted before, the presence of the plasticizer in the formulation reduced the amount of recrystallized CBZ, therefore leading to its increased dissolution rate. Secondly, plasticizer itself can be used as a solubilizer, therefore CBZ solubility is enhanced by both Soluplus[®] and Lutrol[®] F127 polymers. Also, it is important to notice that extrudates of CBZ-Soluplus[®] binary mixtures (F1-F3) were significantly stiffer in comparison to other extrudates. Inclusion of the plasticizer in the formulation made the extrudates more brittle, which can be important in the process of CBZ release once the extrudate starts to dissolve.

Conclusion

Based on the presented results it can be concluded that Soluplus[®] polymer can be used to prepare solid dispersions of CBZ by hot-melt extrusion. CBZ is either molecularly dissolved in Soluplus[®] polymer to form the glassy solid solution, or dispersed as amorphous or low-crystallinity microparticles. Additional plasticizer, Lutrol[®] F127, serves both to facilitate the processing and to increase CBZ release rate from the extrudates. Plasticizer also reduced CBZ tendency to recrystallize in the prepared extrudates. Several formulations were found that meet the pharmacopeial (USP 35) requirements for immediate release of CBZ. Therefore, on the basis of presented results, it can be concluded that hot-melt extrusion technology can be successfully applied to prepare the immediate release solid dispersions of CBZ, a poorly soluble drug.

Acknowledgments: This work was done under the project no. TR34007 supported by the Ministry of Education and Science, Republic of Serbia.

Karakterizacija čvrstih disperzija karbamazepina izrađenih metodom ekstruzije topljenjem

U radu je predstavljena mogućnost izrade čvrstih disperzija karbamazepina metodom ekstruzije topljenjem. Ekstruzija topljenjem je u skorije vreme dobila na značaju u farmaciji, naročito s obzirom na mogućnost izrade čvrstih disperzija sa teško rastvornim lekovitim supstancama poput karbamazepina. Za ekstruziju topljenjem je primenjen novi ko-polimerni ekscipijens (PEG6000/vinilkaprolaktam/vinilacetat; Soluplus[®], BASF, Nemačka) a ispitan je i uticaj dodatnog plastifikatora na karakteristike ekstrudata karbamazepina. Za ekstruziju topljenjem je korišćen ekstruder sa jednim pužastim elementom uz zagrevanje u temperaturnom opsegu od 100 do 130 °C. Dobijeni ekstrudati, kao i polazni materijali, su okarakterisani termalnim (TGA i DSC), spektroskopskim (ATR-FTIR) i mikroskopskim (HSM) metodama, uz ispitivanje brzine rastvaranja karbamazepina iz ekstrudata. Dobijeni rezultati pokazuju da je primenom ekstruzije topljenjem sa Soluplus[®] kopolimerom moguće izraditi čvrste disperzije karbamazepina udela do 30 % m/m. U ekstrudatima sa nižim sadržajem karbamazepina lek i polimer obrazuju čvrsti rastvor, dok se sa povećanjem udela karbamazepina formira ili amorfna disperzija ili disperzija fino usitnjenih kristala karbamazepina. Pokazano je i da dodatak

plastifikatora olakšava izvođenje procesa ekstruzije topljenjem a dodati plastifikator utiče i na karakteristike ekstrudata, uključujući i brzinu rastvaranja karbamazepina. Profili brzine rastvaranja karbamazepina formulacija u čijem je sastavu odnos udela karbamazepin-plastifikator najviše 1.75 (F4, F5, F7, F8) odgovaraju zahtevu Američke farmakopeje (USP 35) za tablete sa trenutnim oslobađanjem karbamazepina.

References

1. J.W. McGinity, F. Zhang, M. Repka, J.J. Koleng, *Amer Pharm Rev* **4** (2001) 25.
2. J. Breitenbach, *Eur J Pharm Biopharm* **54** (2002) 107.
3. R. Chokshi, H. Zia, *Iran J Pharm Res* **3** (2004) 3.
4. B. Perissutti, J.M. Newton, F. Podczeck, F. Rubessa, *Eur J Pharm Biopharm* **53** (2002) 125.
5. H. Hardung, D. Djuric, A. Ali, *Drug Deliv Technol* **10** (2010) 20.

Controlled release of carbamazepine from tablets with self – emulsifying pellets

Mladen R. Milović, Svetlana R. Ibrić

*Department of Pharmaceutical Technology and Cosmetology, Faculty of Pharmacy,
Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia*

Introduction

More than 20 years have elapsed since the introduction of the first controlled release product of carbamazepine (CBZ) and at present there is a consensus that controlled release dosage forms are advantageous.¹ Controlled release products of CBZ do not potentiate the antiepileptic activity of CBZ. However, they may improve compliance and patient convenience and cause reduction in the concentration-related side effects. In essence, this leads to better antiepileptic therapy.² Carbamazepine, 5H-dibenz(b,f)azepine-5-carboxamide, is a widely used antiepileptic drug which has been efficient in treatment of psychomotor seizures and trigeminal neuralgia.³ According to the Biopharmaceuticals Classification System CBZ, as poorly soluble drug with high permeability, is classified as class II drug.⁴ After oral administration of CBZ in solid dosage form its gastrointestinal absorption is slow and irregular often leading to incomplete bioavailability.⁵ Oral lipid-based formulations have been proven to mitigate poor and variable gastrointestinal absorption of poorly soluble, lipophilic drug.⁶ Self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) represents oil/surfactant/cosurfactant and sometimes cosolvent mixture which after dilution with water produce opaque, white emulsions with 100 – 200 nm average droplet size.⁷ Drug-loaded SEDDS systems are usually prepared by solubilization of drugs in oil/surfactant/cosurfactant mixture. In order to increase dissolution rate and availability of poorly soluble drugs potential approach is formulation of self – emulsifying pellets. Self – emulsifying pellets can be designed as matrix or core system depending on which preparation technique is used. Most common preparation technique for matrix self-emulsifying pellets is combination of extrusion and spheronization.⁸ In order to produce core type systems fluid bed coating of indifferent core material is the most convenient technique. Sugar spheres were often used as a core material since their smooth surface provides the ideal base to build up successive layers of drug/excipient.⁹ Oral controlled release drug delivery systems can be classified into two broad groups: single unit dosage forms (e.g. tablets or capsules) and multiple unit dosage forms (e.g. pellets, granules or microparticles). Second group offers several advantages such as uniform spreading throughout the gastrointestinal tract, avoidance of high local drug concentrations and the risk of toxicity, reducing premature drug release from enterically coated dosage forms in the stomach, reducing degradation of the drug or irritation of the gastric mucosa, in comparison to single unit coated dosage forms due more rapid transit time and reducing inter- and intra-individual variations in bioavailability-caused for example by food effects.^{10, 11} With regard to the final dosage form, the multiparticulates can be filled into hard gelatin capsules or be compressed into tablets. The compression of multiparticulates into tablets is becoming more popular, especially in the USA, where hard gelatin capsules have been tampered (Tylenol[®]). The aim of this study on the compaction of self – emulsifying pellets pellets is to convert a multiple unit dosage form into a single unit dosage form containing the multiparticulates with controlled release of carbamazepine. In order to gain extended release for CBZ tablets a polymeric coating materials, ethylcellulose and hydroxypropyl cellulose, were used.^{12, 13,}

Experimental

All reagents and solvents used in this work are available commercially (Gattefosse, Lipoid, Sasol, Orpington, Hercules Incorporated, Evonik Industries, BASF, Suglets[®]) and used as received. Caprylocaproyl macrogol-8 glycerides/ lecithin/ propylene glycol/ caprylic/capric triglyceride self-emulsifying system with dispersed carbamazepine, 50 % (w/w) carbamazepine content, was prepared according to formulation guide from Gattefosse.¹⁴ Drug cores were prepared using a fluidized bed coater (Aeromatic Strea-1, Niro Inc., Aeromatic-Fielder AG, Bubendorf, Switzerland) under the following conditions: inlet temperature 60–65 °C; outlet temperature 40 °C; air flow rate 60–70 m³/h; atomizing air pressure 1.2 bar; spray nozzle diameter 1.2 mm. The drug was layered onto 400 g sugar spheres (710 – 825 µm and 425 – 510 µm) from water/ethanol, 9/1, solution of CBZ – loaded SEDDS system with hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) as the binder (13.8 % (w/w) based on drug). Composition of

medium for layering is presented in Table 1. The respective powders and pellets (pellets, polymer and excipients, for compositions see Table 2) were blended thoroughly with a spatula and mortar. Around 500 mg of the mixture were weighed and fed manually into the die of a single-punch tableting machine (EKO, Korsch, Berlin, Germany) to produce tablets using round-face punches (12 mm in diameter) at constant compression force. The hardness of the tablets was measured using hardness tester – PTB 311 Pharma Test (Hainburg, Germany).

Table 1: Composition of medium for drug layering

Components	Amount, g	Role
Carbamazepine	50	Active substance
Caprylocaproyl macrogol-8 glycerides	19.2	Surfactant
lecithin/ propylene glycol	12.8	Cosurfactant/Cosolvens
caprylic/capric triglyceride	8	Oil
hydroxypropyl methylcellulose	8	Binder
Silica-dioxide	8	Antisticky agent
Water/Ethanol 9:1	800	Dispersion medium

Self – emulsifying pellets were characterized by means of optical light microscopy. Pictures of pellets were taken with an optical light microscope (Axioscope, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Germany) with image analysis software (Easy-Measure, Inteq Informationstechnik GmbH, Berlin, Germany).

Table 2: Composition of uncoated tablets

Formulation	Eudragit S – 100: poly(methacrylic acid-co-methyl methacrylate) 1:2 (% w/w)	Eudragit L – 100: poly(methacrylic acid-co-methyl methacrylate) 1:1 (% w/w)	Microcrystalline cellulose (% w/w)	Mg-stearate (% w/w)	Pellets (% w/w)
A	25	0	23.75	1.25	50
B	6.25	18.75	23.75	1.25	50
C	18.75	6.25	23.75	1.25	50
D	12.5	12.5	23.75	1.25	50
E	0	25	23.75	1.25	50

Coating was done in modified apparatus for coating low weight amount of tablets (Figure 1). About 50 g of tablets is placed in modified rotating Florence glass flask with cut open bottom. The process conditions were as follows: inlet temperature: 40 – 42 °C; rotating speed: 45 - 50 rpm; nozzle diameter: 1.2 mm; atomizing air pressure: 1 bar; spray rate: 6 g/min. Tablets were coated with 5 % (w/w) solution of ethylcellulose (EC)/hydroxypropyl cellulose(HPC), 8/2, in isopropyl alcohol/water, 88/12, medium until 5 and 10 % (w/w) coating level (measured on weight of tablets).

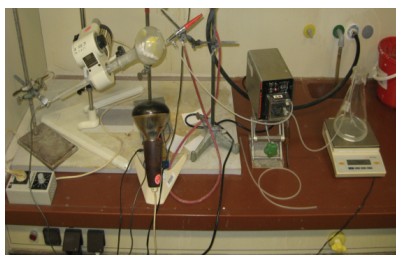


Figure 1. Modified apparatus used for coating the tablets

Dissolution profiles were obtained using rotating paddle dissolution apparatus (USP XXIV) (VanKel 700, Vankel Industries, Edison, NJ, USA), medium phosphate buffer solution (PBS) pH = 6.8, volume 900 ml, 37°C. Amount of released CBZ from uncoated pellets, uncoated tablets and coated tablets was determined spectrophotometrically (UV-2101 Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, USA) at 287 nm.

Results and discussion

Layering efficacy of liquid self – emulsifying drug delivery system on pellets was determined spectrophotometrically and it was 94 % for 710 – 825 μm sugar beads and 91.2 % for 425 – 510 μm . Final carbamazepine content was 9.88 % ($w_{\text{cbz}}/w_{\text{total}}$) for pellets with 710 – 825 μm sugar core and 9.70 % ($w_{\text{cbz}}/w_{\text{total}}$) for pellets with 425 – 510 μm sugar core. Presence of CBZ on the surface of sugar beads was confirmed with an optical light microscope (Fig. 2).

Dissolution profiles from uncoated pellets are presented in Figure 3

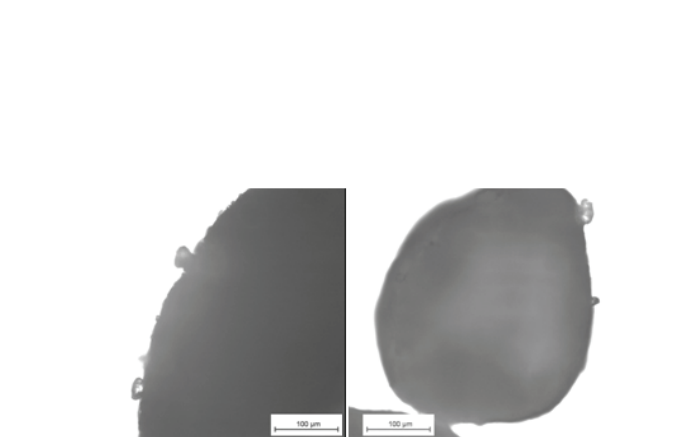


Figure 2 – Surface pictures of 710 – 825 μm pellet (left) and 425 – 510 μm (right)

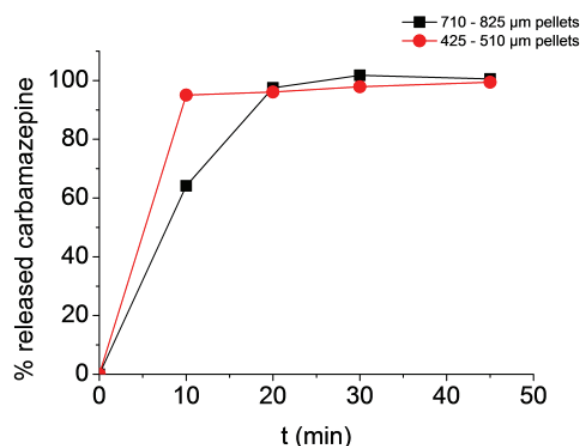


Figure 3 – Dissolution profiles from different uncoated pellets

It can be seen that release rate of CBZ from uncoated pellets is very fast and that in matter of minutes all CBZ is dissolved proving that sugar core self – emulsifying pellets can achieve fast and complete release of poorly soluble drugs. Faster release from 425 – 510 μm pellets (Figure 3) is due higher surface area of smaller size particles. All tablets were prepared at same conditions using same compression force. Hardness of the tablets was measured (Table 3). The difference in hardness between different formulations of tablets with 50 % (w/w) content of 710 – 825 μm pellets is less then with 50 % (w/w) content of 425 – 510 μm pellets (Table 3). The variation in weight and drug content uniformity is minimized when using higher pellet concentrations or larger particle size fractions (e.g. granules) of the inert excipients. At pellet content ≥ 50 % the variations are acceptable with nongranulated excipients.¹⁵

Table 3: Hardness of the tablets

Formulation	Hardness (N) \pm S.D.	
	710 – 825 μm	425 – 510 μm
A	77.00 \pm 7.00	100.67 \pm 6.03
B	69.67 \pm 1.53	61.33 \pm 0.58
C	74.33 \pm 1.53	72.00 \pm 2.00
D	73.67 \pm 12.86	65.33 \pm 4.62
E	64.33 \pm 5.03	52.67 \pm 4.04

Dissolution profiles from uncoated tablets are presented in Figure 4.

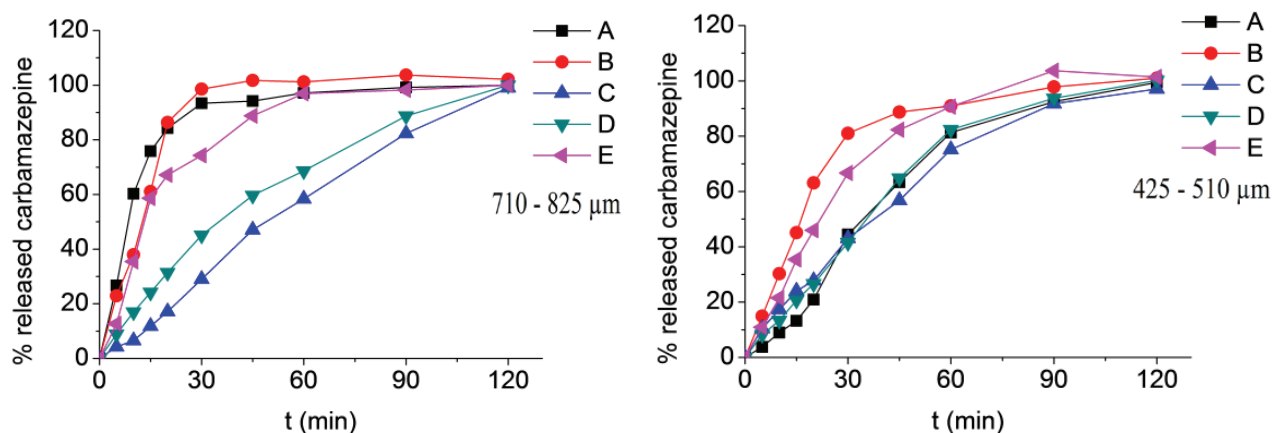


Figure 4 – Dissolution profiles from different uncoated tablets

From table 3 it can be concluded that uncoated tablet formulations with higher % of poly(methacrylic acid-co-methyl methacrylate) 1:2, which is insoluble at pH 6.8, generally have shown higher hardness indicating that this polymer is more compressible than poly(methacrylic acid-co-methyl methacrylate) 1:1, which is in comparison to latter one soluble at pH 6.8. Increasing the pellet size resulted in more damage to the pellets during compression, making more surfaces available for contact with medium.¹⁶ Because of that higher differences exist between uncoated tablet formulations with pellet size 710 – 825 µm in comparison to formulations with pellet size 425 – 510 µm (Figure 4). It is well known that soluble fillers can increase the solubility rate of poorly soluble drugs.¹⁷ Obtained dissolution test results for CBZ present balance between compression-induced damage and consequential increase of surface and filler solubility and in order to evaluate the relation between these two factors further research is needed to be done.

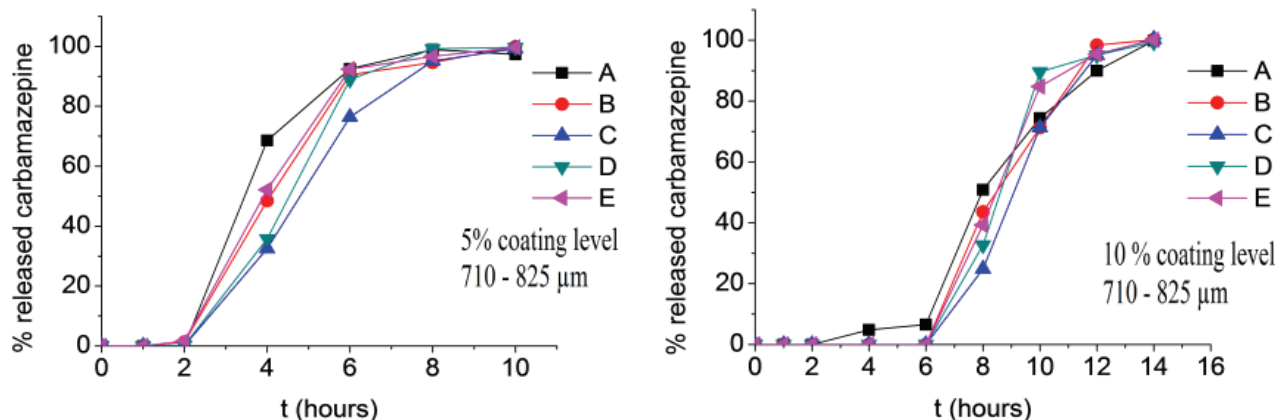


Figure 5 – Dissolution profiles from coated tablets, EC/HPC 8:2 film; sugar core 710 – 825 µm

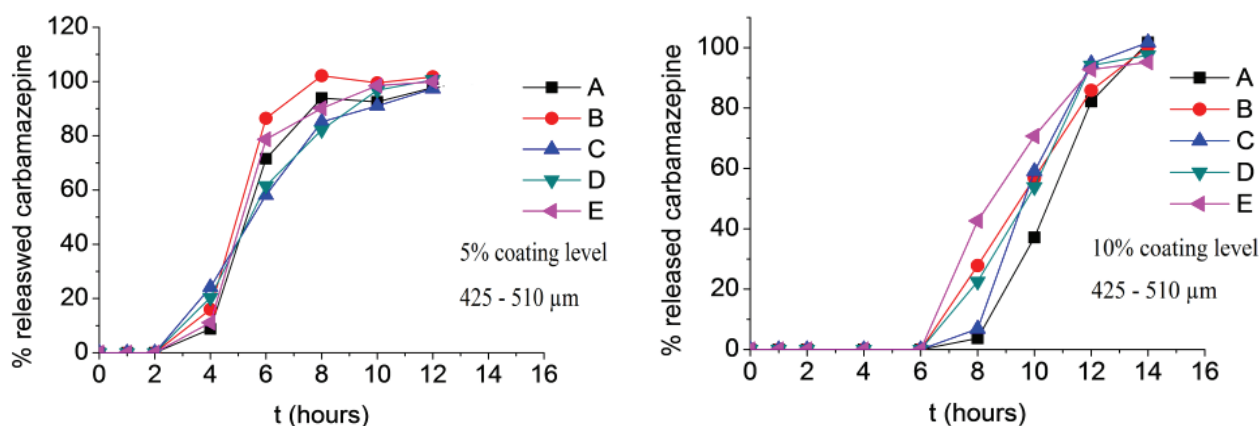


Figure 6 – Dissolution profiles from coated tablets, EC/HPC 8:2 film; sugar core 425 - 510 µm

With organic solutions, EC is molecularly dissolved and film formation occurs simply by a loss of organic solvent during the drying process and contact of individual polymer molecules.¹⁸ Ethylcellulose is insoluble in water and release mechanism of the CBZ from coated tablets is mainly via diffusion. HPC is soluble in water and during dissolution time it creates pores on the coating film which facilitate CBZ release.¹⁹ Tablet formulations with 5 % (w/w) coating level have shown sustained and extended release of carbamazepine (Figure 5, 6). Dissolution started after approximately 2 h and lasted 6 - 8 h, where release of carbamazepine from tablet formulations containing smaller pellets was more extended. Tablet formulations with 10 % (w/w) coating level have shown the most sustained release of carbamazepine (Figure 6). Dissolution of carbamazepine started after 6 h and lasted around 8 h with slight differences between formulations (Figure 5,6).

Conclusion

Self-emulsifying pellets can achieve fast release of poorly soluble carbamazepine. Compressing the pellets into tablets, at 50 % pellet content, and coating those tablets with EC/HPC film at 5 and 10 % coating level modified release of CBZ can be achieved, where release profile from 5 % coated tablets have shown lag time of approximately 2 h and from 10 % coated tablets lag time was around 6 h. Using different excipients in tablet formulation release rate of CBZ can be slightly modified.

Acknowledgement: This work was supported by Project TR34007, funded by Ministry of Education and Science, Republic of Serbia

Modifikovano oslobađanje karbamazepina iz tableta sa samoemulgirajućim peletama

U radu je prikazana izrada obloženih tableta koje sadrže samoemulgirajuće pelete u cilju postizanja modifikovanog oslobađanja karbamazepina. Šećerne pelete različite veličine su oblagane u fluid-bedu sa samoemulgirajućim sistemom koji sadrži 50 % (m/m) dispergovanog karbamazepina. Različite tabletno formulacije su pripremljene komprimovanjem smeše u kojoj je varirana veličina samoemulgirajućih peleta kao i sadržaj dva akrilna polimera, poli(metakrilna kiselina-ko-metilmetakrilat) 1:2, 0 – 25 % (m/m), i poli(metakrilna kiselina-ko-metilmetakrilat) 1:1, 0 – 25 % (m/m), prilikom čega sadržaj peleta je uvek bio 50 % (m/m). Rastvor etilceluloze/ hidroksipropilceluloze, odnos 8/2, u smeši izopropanola i vode 88/12, korišćen je kao medijum za oblaganje tableta, pri čemu je brzina rastvaranja ispitivana za 5 i 10 %-ni (m/m) stepen oblaganja i poređena sa brzinom rastvaranja neobloženih tableta. Oslobađanje karbamazepina iz formulacija sa sadržajem obloge od 5 % (m/m) počinje nakon 2 h i traje 6 – 8 h, u zavisnosti od sastava formulacije. U poređenju sa predhodnim formulacijama, oslobađanje karbamazepina iz formulacija sa sadržajem obloge 10 % (m/m) počinje nakon 6 h i traje 8 – 9 h.

References

1. P.J. Neuvonen, *Int. J. Clin. Pharmacol. Toxicol.* **23** (1985) 226–232
2. M. Bialer, L. Arcavi, S. Sussan, A. Volosov, A. Yacobi, D. Moros, B. Levitt, A. Laor, *Epilepsy Res.* **32** (1998) 371–378
3. L.S. Goodman, A.G. Gilman, J.G. Hardman, L.E. Limbird, *Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, 10th ed. Goodman & McGraw-Hill Book Co., New York, p. 534
4. M. Lindenberg, S. Kopp, J.B. Dressman, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **58** (2004) 265
5. E. Gavini, A.B. Hegge, G. Rassa, V. Sanna, C. Testa, G. Pirisino, J. Karlsen, P. Giunchedi. *Int. J. Pharm.* **307** (2006) 12
6. C.W. Pouton, C.J.H. Porter. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **60** (2008) 630.
7. L. Wang, J. Dong, J. Eastoe, X. Li. *J. Colloid. Interface Sci.* **330** (2009) 444
8. A. Abdalla, K.Mäder, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **66** (2007) 220
9. D.M. Jones, Fluidized bed processing and drying pharmaceutical engineering. In: 3rd International Congress (1991).
10. L. Maganti, M. Celik, *Int. J. Pharm.* **103** (1994) 55-67
11. L. Maganti, M. Celik. 6th Inter. Conf. Pharm. Tech. (1992) 117-125
12. R. Bodmeier, X. Guo, O. Paeratakul, *Process and formulation factors affecting the drug release from pellets coated with the ethylcellulose-pseudolatex Aquacoat*. In: J.W. McGinity, (Ed.), *Aqueous Polymeric Coatings for Pharmaceutical Dosage Forms*. Dekker, New York, 1997 pp. 55–80

13. R. Bodmeier, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **43** (1997) 1-8
14. Gattefoss'e, S.A., *Microemulsions: Formulation Guide*, publication, Saint-Priest Cedex, France No. PF9225 A (1994)
15. T.Beckert, *Verpressen von magensaftresistent iiberzogenen Pellets zu zerfallenden Tabletten*. Ph.D. dissertation, Eberhard- Karls-Universitat Tübingen, Germany (1995).
16. G. Ragnarsson, A. Sandberg, U.E, Jonsson, J. Sjiigren, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **13** (1987)1495-1509
17. J.M. Tyrer; M.J. Eadie, J.M. Sutherland, W.D. Hopper, *Br. Med. J.* 1970, 271-273
18. M. Wesseling, R. Bodmeier, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **47** (1999) 33-38.
19. M. Larsson, J. Hjärtstam, J. Berndtsson, M. Stading, A. Larsson, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **76** (2010) 428-432

Experimental measurements of volumetric properties, refractive index and viscosity of the ternary system dimethyladipate + 2-butanone + 2-butanol

Andjela B. Knežević Stevanović, Sofija P. Miškov*, Divna M. Bajić*,
Dušan K. Grozdanić*, Mirjana Lj. Kijevčanin*

Metro Vancouver, 4330 Kingsway, Burnaby BC V5H 4G8 Canada

*Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Karnegijeva 4, 11120 Belgrade, Serbia

Abstract Density, refractive index and viscosity data of the ternary system dimethyladipate + 2-butanone + 2-butanol have been measured in temperature range 288.15-323.15 K with temperature step 5K, and at atmospheric pressure. The measurements were performed on Anton Paar DMA 5000 digital vibrating tube densimeter, Anton Paar RXA 156 refractometer and Anton Paar SVM 3000 digital viscometer. Based on the corresponding binary data, as well as ternary data presented in this work, excess molar volumes (V^E), refractive index deviations (Δn_D) and viscosity deviations ($\Delta \eta$) were determined and fitted by the Nagata-Tamura polynomial equation.

Introduction

Mixing effects for thousands of compounds and their mixtures used in the process industry are not known, hence the knowledge of physical properties of pure substances and their mixtures is very important. Systematic studies of density, refractive index and viscosity, as well as excess molar volumes (V^E), refractive index (Δn_D) and viscosity ($\Delta \eta$) deviations, of multicomponent liquid mixtures on different temperatures are significant since it allows better insight into the liquid state theory and intermolecular interactions.

Dimethyladipate is non-volatile, low toxicity, readily biodegradable organic solvent, therefore significant industrial compound¹. Also, liquid mixtures containing alcohols and/or ketones have different, very important application, especially as a solvent widely used in synthesis of other organic compounds.²⁻⁴

Experimental Section

Chemicals. All chemicals were supplied by Merck with high mass purity of $\geq 99\%$ for dimethyladipate, $\geq 99.5\%$ for 2-butanone and $\geq 99\%$ for 2-butanol. They were stored in dark bottles and used without further purification.

Measurements. The densities of the pure substances and ternary mixture were measured with an Anton Paar DMA 5000 digital vibrating U-tube densimeter with a stated accuracy $\pm 5 \times 10^{-3} \text{ kg m}^{-3}$. The temperature in the cell was measured by means of two integrated Pt 100 platinum thermometers with the stability better than $\pm 0.002 \text{ K}$. The temperature was regulated to $\pm 0.001 \text{ K}$ with a built-in solid-state thermostat. The refractive index was measured by Anton Paar RXA 156 refractometer with a stated accuracy of $\pm 5 \times 10^{-5}$. The temperature was controlled with an internal Peltier thermostat to $\pm 0.03 \text{ K}$. Viscosities of the pure substances and ternary mixture were measured with a digital Stabinger viscometer (model SVM 3000/G2) with a stated accuracy of $\pm 0.1\%$ of the measurement value. The temperature in the cell was regulated with a solid-state thermostat that is placed in the instrument with the uncertainty of $\pm 0.01 \text{ K}$.

The experimental uncertainty in the density, refractive index and viscosity measurements were about $\pm 1 \times 10^{-2} \text{ kg m}^{-3}$, $\pm 1 \times 10^{-4}$ and $< 1.5\%$, respectively, and the average uncertainty in excess molar volume, refractive index and viscosity deviation have been estimated at $\pm 3 \times 10^{-9} \text{ m}^3 \text{ mol}^{-1}$, $\pm 2 \times 10^{-4}$ and better than $\pm 3 \times 10^{-3} \text{ mPas}$, respectively.

The mixtures were prepared by measuring the masses of pure substances on a Mettler AG 204 balance with a precision 1×10^{-4} . The uncertainty of the mole fraction calculation was less than $\pm 1 \times 10^{-4}$.

Results and Discussion

Density (ρ), refractive index (n_D) and viscosity (η) for the system dimethyladipate + 2-butanone + 2-butanol were measured at eight temperatures ($T=288.15, 293.15, 298.15, 303.15, 308.15, 313.15, 318.15$ and 323.15) K and at atmospheric pressure. Using measured data, the excess molar volumes (V^E), refractive index deviations (Δn_D) and viscosity deviations ($\Delta\eta$) for this ternary system were calculated and correlated by the Nagata-Tamura⁵ polynomial equation.

Excess molar volumes V^E were calculated from the density data by the equation:

$$V^E = \sum_{i=1}^N x_i M_i \left[\left(\frac{1}{\rho} \right) - \left(\frac{1}{\rho_i} \right) \right] \quad (1)$$

where N is the number of components; x_i is the mole fraction of component i in the mixture; M_i is its molecular mass ρ and ρ_i are the measured densities of the mixture and the pure component i , respectively. The refractive index deviations, Δn_D , were calculated from the equation:

$$\Delta n_D = n_D - \sum_{i=1}^N x_i n_{Di} \quad (2)$$

where n_D and n_{Di} are the measured refractive indices of the mixture and the pure component i , respectively. The viscosity deviations $\Delta\eta$ were calculated from the equation:

$$\Delta\eta = \eta - \sum_{i=1}^N x_i \eta_i \quad (3)$$

where η and η_i are the measured viscosities of the mixture and the pure component i , respectively.

The experimental values of excess molar volumes (V_{123}^E), refractive index deviations (Δn_{D123}) and viscosity deviations ($\Delta\eta_{123}$) of the ternary system were correlated with Nagata-Tamura (NT) equations⁵:

$$V_{123}^E = V_{12}^E + V_{13}^E + V_{23}^E + x_1 x_2 x_3 RT (B_0 - B_1 x_1 - B_2 x_2 - B_3 x_1^2 - B_4 x_2^2 - B_5 x_1 x_2 - B_6 x_1^3 - B_7 x_2^3 - B_8 x_1^2 x_2) \quad (4)$$

$$\Delta n_{D123} = \Delta n_{D12} + \Delta n_{D13} + \Delta n_{D23} + x_1 x_2 x_3 RT (B_0 - B_1 x_1 - B_2 x_2 - B_3 x_1^2 - B_4 x_2^2 - B_5 x_1 x_2 - B_6 x_1^3 - B_7 x_2^3 - B_8 x_1^2 x_2) \quad (5)$$

$$\Delta\eta_{123} = \Delta\eta_{12} + \Delta\eta_{13} + \Delta\eta_{23} + x_1 x_2 x_3 RT (B_0 - B_1 x_1 - B_2 x_2 - B_3 x_1^2 - B_4 x_2^2 - B_5 x_1 x_2 - B_6 x_1^3 - B_7 x_2^3 - B_8 x_1^2 x_2) \quad (6)$$

where V_{ij}^E , Δn_{Dij} and $\Delta\eta_{ij}$ are calculated values of corresponding binary mixtures⁶, and B_0, B_1, \dots, B_8 are adjustable parameters. The final part of the eqs (4) – (6) is ternary contribution to the total value of the related property.

The results of V^E , Δn_D and $\Delta\eta$ for the corresponding binary mixtures were correlated with the Redlich-Kister (RK) equation⁷:

$$Y^E \text{ (or } \Delta Y) = x_i x_j \sum_{p=0}^k A_p (x_i - x_j)^p \quad (7)$$

where Y^E (or ΔY) represents V_{ij}^E , Δn_{Dij} , or $\Delta\eta_{ij}$; A_p are fitting parameters⁶ of the related property and $(k + 1)$ is the number of parameters determined using the F-test, and mole fractions of the i and j components are taken based on the composition of the ternary system.

The root-mean-square deviation (rmsd) of the correlation for the ternary V^E , Δn_D and $\Delta\eta$ is defined by the equation:

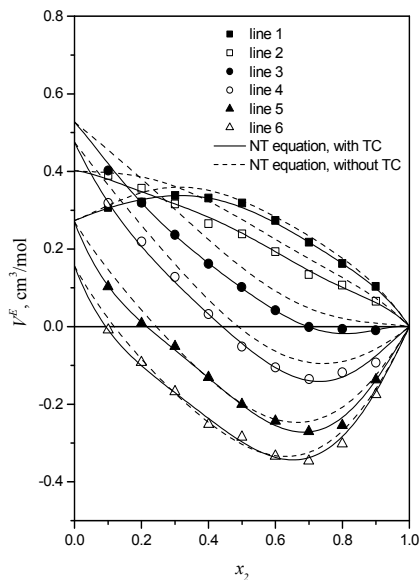
$$\sigma = \left(\sum_{i=1}^m (Y_{\text{exp},i}^E - Y_{\text{cal},i}^E)^2 / m \right)^{1/2} \quad (8)$$

where m is the number of experimental data points.

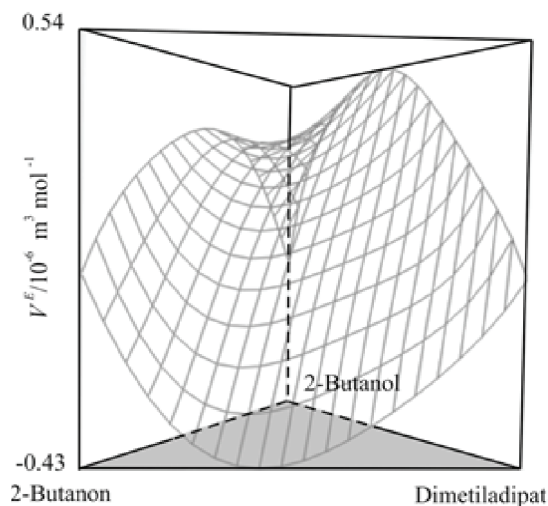
Data of excess molar volumes, refractive index deviations and viscosity deviations for the investigated ternary system dimethyladipate + 2-butanone + 2-butanol at 303.15 K along with the RK and NT

correlation results are presented in Figure 1(a), Figure 2(a) and Figure 3(a), respectively. Lines 1-6 present the lines of constant ratio of molar fractions of first and third component in the mixture: $x_1/x_3 = 0.111$ (line 1), $x_1/x_3 = 0.250$ (line 2), $x_1/x_3 = 0.667$ (line 3), $x_1/x_3 = 1.500$ (line 4), $x_1/x_3 = 4.000$ (line 5), $x_1/x_3 = 9.000$ (line 6).

Figure 1(b), Figure 2(b) and Figure 3(b) present ternary surface of V^E , Δn_D and $\Delta\eta$, respectively, for system dimethyladipate + 2-butanone + 2-butanol at 303.15 K calculated by Nagata-Tamura polynomial.

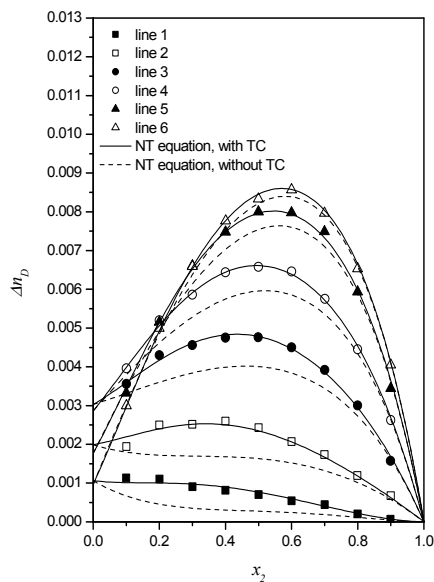


(a)

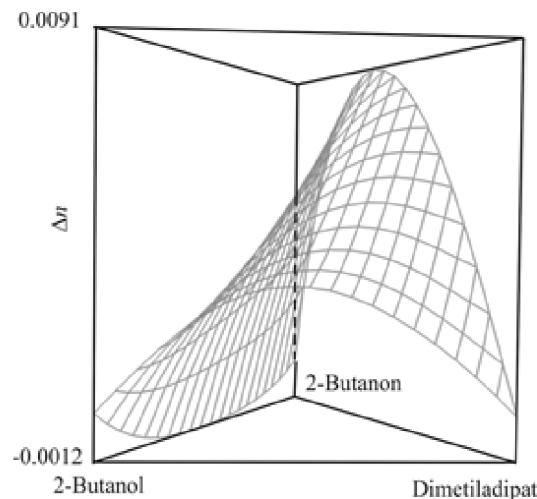


(b)

Figure 1. V^E data for the ternary system dimethyladipate (1) + 2-butanone (2) + 2-butanol (3) at 303.15 K: (a) experimental data along the constant x_1/x_3 ratio. Symbols refer to experimental data points. Solid lines present the results calculated by eq (4), with ternary contribution, and dash lines are the results calculated by eq (4), without ternary contribution. (b) V^E surface calculated by eq (4).



(a)



(b)

Figure 2. Δn_D data for the ternary system dimethyladipate (1) + 2-butanone (2) + 2-butanol (3) at 303.15 K: (a) experimental data along the constant x_1/x_3 ratio. Symbols refer to experimental data points. Solid lines present the results calculated by eq (5), with ternary contribution, and dash lines are the results calculated by eq (5), without ternary contribution. (b) Δn_D surface calculated by eq (5).

As shown in Figure 1(a), for lines 1 and 2, values of excess molar volumes are positive over the whole range of mixture compositions. The quantity of dimethyladipate in mixtures that represent lines 1 and 2 is small comparing to 2-butanol, and high influence of the binary 2-butanone + 2-butanol system is present. Lines 5 and 6 are negative almost for entire concentration range, while lines 3 and 4 are negative for higher values of mole fraction of 2-butanone.

The refractive index deviations are positive for all six lines and they increase as the quantity of dimethyladipate in mixtures is rising (Figure 2(a)).

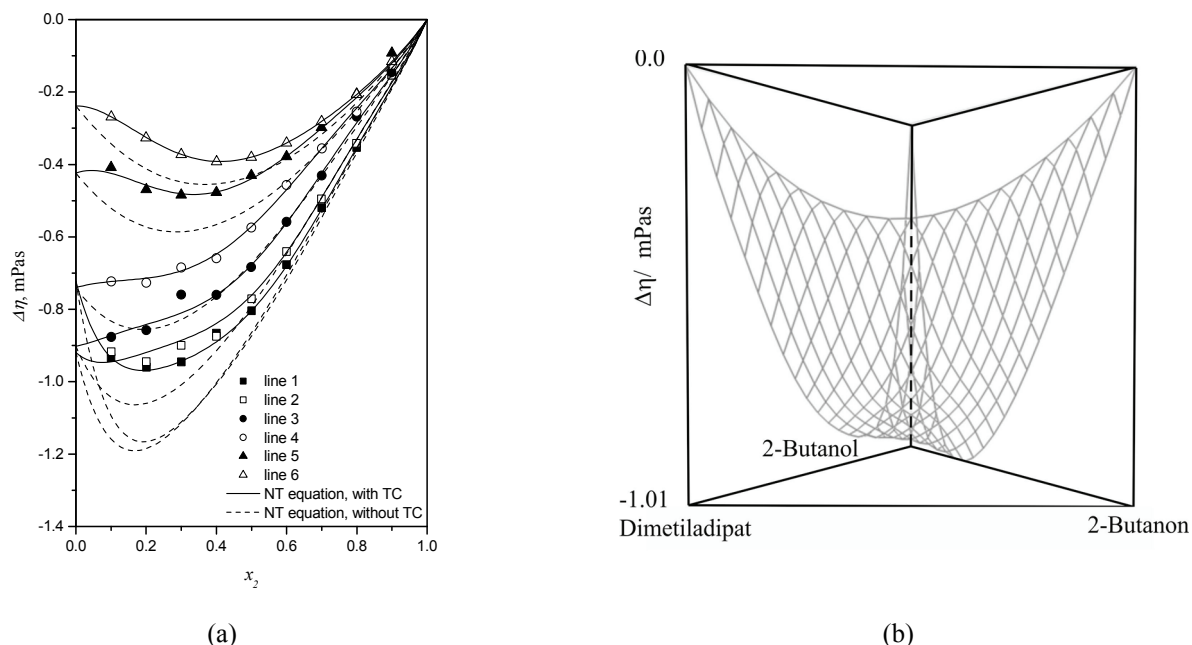


Figure 3. $\Delta\eta$ data for the ternary system dimethyladipate (1) + 2-butanone (2) + 2-butanol (3) at 303.15 K: (a) experimental data along the constant x_1/x_3 ratio. Symbols refer to experimental data points. Solid lines present the results calculated by eq (6), with ternary contribution, and dash lines are the results calculated by eq (4), without ternary contribution. (b) $\Delta\eta$ surface calculated by eq (6).

As shown in Figure 3(a), viscosity deviations for ternary system dimethyladipate (1) + 2-butanone (2) + 2-butanol (3) are negative over the whole range of mole fraction of 2-butanone. Values of the viscosity deviations become less negative as the mole fraction of dimethyladipate in mixture increases.

The results of excess molar volumes, deviations of refractive indices and viscosity deviations for the investigated ternary system suggest the presence of dipole-dipole type of interactions for smaller values of mole fraction of dimethyladipate. As the mole fraction of this component in the mixture increases, specific interaction causes complex formation between unlike molecules.

The authors gratefully acknowledge the financial support received from the Research Fund of Ministry of Education and Science (project No 172063), Serbia and the Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade.

Eksperimentalno određivanje volumetrijskih svojstava, indeksa refrakcije i viskoznosti ternernog sistema dimetiladipat + 2-butanon + 2-butanol

Eksperimentalno su određene gustine, indeksi refrakcije i viskoznosti ternernog sistema dimetiladipat + 2-butanon + 2-butanol u temperaturnom intervalu 288.15 – 323.15 K sa korakom 5 K, i na atmosferskom pritisku. Eksperimentalna merenja su izvršena na digitalnom gustomeru Anton Paar 5000, refraktometru Anton Paar RXA 156 i digitalnom viskozimetru Anton Paar SVM 3000. Na osnovu eksperimentalnih podataka za odgovarajuće binarne sisteme, kao i na osnovu ternernih podataka prikazanih u ovom radu, izračunate su dopunske molarne zapremine (V^E), promene indeksa refrakcije (Δn_D) i promene viskoznosti ($\Delta\eta$) ternerne smeše, kao i njihovo korelisanje Nagata-Tamura polinomom.

Literature

1. A.B. Knezevic Stevanovic, S.P. Serbanovic, B.D. Djordjevic, D.K. Grozdanic, J.D. Smiljanic, M.Lj. Kijevcanin, *Thermochimica Acta*, 533 (2012) 28
2. I.R. Radovic, S.P. Serbanovic, B.D. Djordjevic, M.Lj. Kijevcanin, *J. Chem. Eng. Data*, 56 (2011) 344.
3. M.Lj. Kijevcanin, I.R. Radovic, S.P. Serbanovic, E.M. Zivkovic, B.D. Djordjevic, *J. Chem. Eng. Data*, 55 (2010) 1739.
4. B.D. Djordjevic, S.P. Serbanovic, I.R. Radovic, A.Z. Tasic, M.Lj. Kijevcanin, *J. Serb. Chem. Soc.*, 72 (2007) 1437.
5. I. Nagata, K. Tamura, *J. Chem. Thermodyn.*, 22 (1990) 279.
6. A.B. Knezevic Stevanovic, PhD. thesis, Faculty of Technology and Metallurgu, 2012 (submitted)
7. O. Redlich, A.T. Kister, *Ind. Eng. Chem.*, 40 (1948) 345.

Determination of viscosity of aqueous alkanolamine solutions as potential carbon dioxide removal reagents

Vuk D. Spasojević, Slobodan S. Šerbanović*, Bojan D. Djordjević*, Mirjana Lj. Kijevčanin*

Institute for Nuclear sciences Vinča, University of Belgrade, 11 000 Belgrade, Serbia

**Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Karnegijeva 4, 11 000 Belgrade, Serbia*

Abstract Viscosities of four aqueous alkanolamine solutions (water +monoisopropanolamine (MIPA), or +diisopropanolamine (DIPA), or +triisopropanol amine (TIPA), or +diethanolamine (DEA)) were measured at temperature ranges (288.15 - 323.15) K and at the atmospheric pressure. In order of analysis of real process of carbon dioxide removal, due to corrosive effect of increased concentration of alkanolamines solutions, lower concentrations of alkanolamines were selected: (5, 10, 15, 20 and 25) mass %. The aim of this work is to contribute to the extension of thermodynamic and transport properties data of various aqueous solutions of alkanolamines. Obtained results provide necessary data for industrial equipment design and process optimization regarding carbon dioxide removal, but are also foundation for advancements that can be achieved by potential replacement of usually used monoethanolamine with other mixtures of alkanolamine solutions presented within this work.

Introduction

Capturing of carbon dioxide from flue gases presents nowadays crucial task in control of global warming problems. It is clear that increase of so called greenhouse gases is caused by human activities in past 200 years¹. With new energy technologies still under development and in use of nuclear energy after incident in Japan, scientific attention is set toward reduction of emission of greenhouse gasses. Chemical absorption, physical absorption, cryogenic methods and membrane separation have been used to separate carbon dioxide from flue gases of conventional fossil fuel fired power plants and industrial process plants. These techniques are suitable for treating low carbon dioxide concentration within high volume flue gases streams. These conditions are typical for coal based power plants. Commonly used solvents for purpose of carbon dioxide removal are aqueous solutions of alkanolamines. One of the most widely adopted liquid absorption agent is monoethanol amine (MEA), due to high carbon dioxide loading capacity. Nowadays MEA is being gradually replaced by other more efficient alkanolamine solutions due to negative characteristics of MEA such as significant amount of energy required for solvent regeneration, operational problems with process equipment caused by increased corrosion², degradation of solvent etc.³ It has been discovered that solvent formation, achieved by blending of variety of single alkanolamines can partially or completely compensate these negative effects⁴. This approach combines the favorable characteristics of different solvents while suppressing their unfavorable characteristics. Small addition of secondary alkanolamines to primary alkanolamines can shift 2 to 3 times mass transfer coefficient of carbon dioxide with no change of operation properties of blended constituents⁵. The aim of this work is to provide precise and reliable data regarding thermodynamic and transport properties of aqueous solutions of alkanolamines as a starting point for further investigation of potential use of blended alkanolamines in future work.

Theoretical approach: Basic idea behind all carbon dioxide removal techniques, use principal of amine based solvents, reaction between acid gases which are in ionized form and alkanolamines (as bases) with its alkalinity that originate from amine group. The presence of hydroxyl groups in alkanolamines serves to reduce the vapor pressure causing the potential losses of solvents due to evaporation, but also to increase the solubility of alkanolamines in water by hydrogen bonding. Although there are many proposed different reaction pathways between carbon dioxide and aqueous solutions of alkanolamine, overall reactions that occur when alkanolamines are used to absorb carbon dioxide may be represented by next formulas:

- Ionization of H₂O:
 $H_2O = H^+ + OH^-$
- Ionization of dissolved H₂S (if present in flue gases, which occurs in most cases):
 $H_2S = H^+ + HS^-$
- Hydrolysis and ionization of dissolved CO₂:

- $$\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} = \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$$
- Protonation of alkanolamine:
 $\text{RNH}_2 + \text{H}^+ = \text{RNH}_3^+$
 - Carbamate formation:
 $\text{RNH}_2 + \text{CO}_2 = \text{RNHCOO}^- + \text{H}^+$

For the primary and secondary alkanolamines (alkanolamines with one and two hydrogen atoms attached to nitrogen atom of amino group) previously mentioned equations can describe the chemical processes and interactions between amine solvent and carbon dioxide. In case of tertiary alkanolamines, reaction with carbon dioxide molecule can not be achieved through carbamate formation. Since majority of coal based power plants are operating at atmospheric pressure, and since new power plants designs with increased operating pressure are still under development, all measurements were carried out at atmosphere pressure. The reaction equilibrium between alkanolamines and carbon dioxide is also sensitive to temperature, since rise of temperature causes rise of partial vapor pressure of acid gases. This property offers possibility that acid gases can be easily striped from amine solution by the application of heat with simultaneous regeneration of alkanolamine solvent. Basic concept of acid gases removal includes absorber and stripping column with operating temperature around 50°C and 120°C, respectively in order to cover potential low temperature operating conditions, but also higher temperatures that may occur (due to increase of heat of reaction). Measurements within this work were carried out in temperature range from 15°C to 60°C with temperature step of 5°C which corresponds to temperature operating conditions within absorption column. Typical concentrations of alkanolamines range from 10 wt% to 35 wt%⁶. Higher alkanolamines concentrations can be achieved by implementation of corrosion inhibitors since higher concentrations of alkanolamines have negative effect (corrosion, solvent degradation) on process equipment. Such a high concentrations are mainly used in treatment of natural gas within petrochemical industries. For the purpose of this work, concentrations of alkanolamines were set in range of 5, 10, 15, 20 and 25 wt%. Although there are many other parameters which effect absorption of acid gases, main goal of this work is to determine thermodynamic properties of viscosity of aqueous solutions of alkanolamines.

Experimental section

Chemicals. For the purpose of investigation of properties of alkanolamines solutions, following chemicals have been used: 1-amino-2-propanol (99%), diethanolamine (99,5%), diisopropanol amine and triisopropanol amine (99%) were supplied by Acros Organics and Merck. All chemicals were kept in dark bottles in an inert atmosphere, and degassed just before a sample preparation. Aqueous solutions of alkanolamines were prepared with 4D ultra pure deionized water (> 99%). In order to prevent eventual solubility of ambient air, water was degassed by ultrasonic bath at elevated temperature of 50 °C for 30 minutes.

Measurements. Mixtures were prepared gravimetrically using a Mettler AG 204 balance with a precision of 1×10^{-4} g. The error in the calculation of the mole fraction was less then $\pm 1 \times 10^{-4}$. Viscosities η of aqueous solutions of alkanolamines were measured with a digital Stabinger viscometer (model SVM 3000/G2). The instrument contains two measuring cells. A U-tube which is filled with the liquid sample and excited to oscillate via magnetic coils. The other cell which is used for dynamic viscosity measurements contains a straight tube filled with liquid sample. Within this tube, floating measuring rotor made of low density material with built-in magnet is placed, centered by centrifugal force. A rotating magnet in SVM 3000 induces an eddy current field with a speed dependant brake torque. After the start of experiment, rotor is reaching a constant speed determined by the equilibrium between the viscosity - dependant driving torque, which is proportional to the speed difference between tube and the rotor, and the brake torque caused by eddy currents. The instrument was calibrated before measurements using MilliQ water and dry air as standards. The dynamic viscosity is calculated from equation:

$$\eta = \frac{k u_2}{(u_1 - u_2)} \quad (1)$$

where u_1 is the speed of tube, u_2 is the rotor speed and k is the mean adjustment coefficient for the instrument. The instrument measuring ranges were adjusted by the manufacturer. The uncertainty of

the dynamic viscosity measurements is below 1.5% in the temperature and viscosity range used in this work. Detailed description of the above mentioned apparatus have been given in our previous papers⁶⁻⁹.

Results and discussion

Viscosity of aqueous solutions of alkanolamines increases with rise of mass percentage of alkanolamines. Increase of temperature is causing decrease of viscosity values. Obtained results of viscosities are fitted with polynomial equation of second order, as presented by eq. (2). Dependence of viscosity from mass percent of alkanolamines is shifting towards linear dependence at higher temperatures. Data regarding temperature and concentration dependence of viscosity of aqueous solutions of alkanolamine are presented in Figure 1. Calculated values are presented with lines obtained by linear or polynomial fittings of experimental values using following polynomial equation:

$$\rho \text{ (g} \cdot \text{cm}^{-3}\text{) or } n_D \text{ or } \eta \text{ (mPa} \cdot \text{s)} = A_2 \cdot x^2 + A_1 \cdot x + A_0 \quad (2)$$

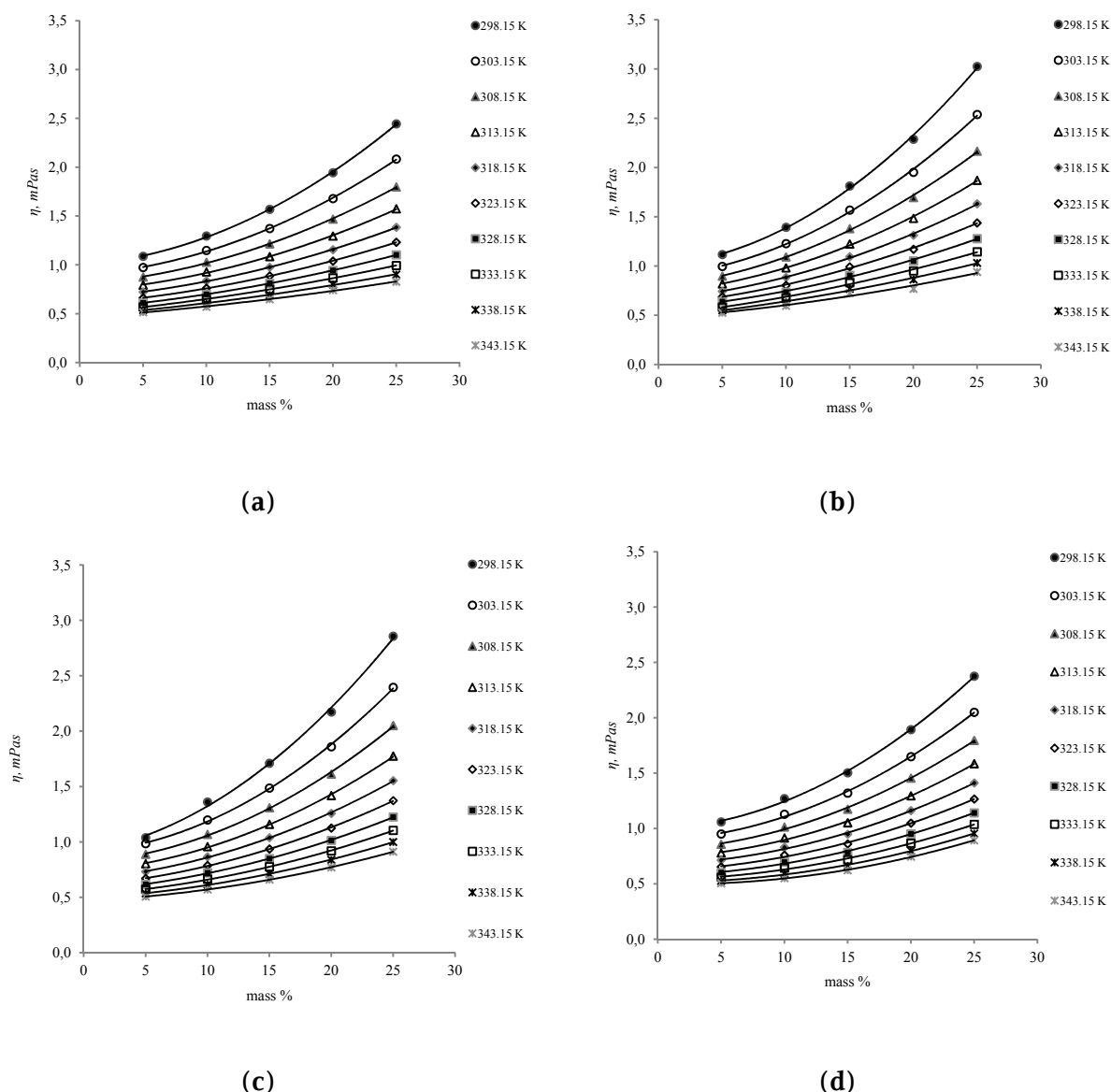


Figure 1. Experimental values of viscosity for the systems: (a) monoisopropanolamine + water, (b) diisopropanolamine + water, (c) triisopropanolamine + water, (d) diethanolamine + water. Lines present polynomial fitting using Eq.(2).

In view of alkanolamine theoretical loading capacity of carbon dioxide, primary alkanolamines tend to favor reaction of carbamate ion formation, which is stable and have the low rate of hydrolysis to bicarbonate. Carbamate ion can tie up to alkanolamine ion which prevents one mol of alkanolamine to react with carbon dioxide. Thus, theoretical level that can be achieved is 0.5 mol of carbon dioxide per

mol of alkanolamine. Tertiary alkanolamine shows tendency to form bicarbonate with potential theoretical level of one mol of carbon dioxide per one mol of alkanolamine. Although such a high loading capacity can be achieved, bicarbonate is unstable with limiting factor of very slow rate of reaction of hydrolysis and ionization of dissolved carbon dioxide. This problem can be easily overcome by addition of an activator, typically another amine, which increases the rate of hydration of dissolved carbon dioxide.

It could be concluded that by increasing of alkanolamine concentration, acid gases removal will be more efficient with reduction of the required solution circulation rate and overall plant cost. However, in real process it does not happened, since solutions with higher alkanolamine concentration cause increase of acid gases vapor pressures. Due to exothermic nature of reaction between alkanolamines and carbon dioxide, increase in concentration of alkanolamine in solution will cause increase in temperature with final increase in vapor pressure of acid gases, thus nullifying positive effects of increase in absorption of carbon dioxide⁴.

In order to compare calculated and measured data, each set of determined parameters was valuated through average absolute deviation (AAD). Values of AAD for each system and all parameters are given in Table 1. Average absolute deviation is calculated using following equation:

$$AAD = \frac{100}{N} \sum_{i=1}^N \left[\frac{\eta_{exp,i} - \eta_{cal,i}}{\eta_{exp,i}} \right] \quad (3)$$

where η_{exp} are experimental values, η_{cal} represent calculated values, and N number of data points.

Table 1. Average absolute deviations for aqueous alkanolamine solutions

	AAD, %
MIPA	0.386
DIPA	1.019
TIPA	0.545
DEA	0.856

The authors gratefully acknowledge the financial support received from the Research Fund of Ministry of Education and Science (project No 172063), Serbia and the Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade.

Određivanje viskoznosti vodenih rastvora alkanolamina – potencijalnih agensa za uklanjanje ugljen-dioksida

Viskoznosti četiri vodena rastvora alkanol amina (voda + monoizopropanol amin (MIPA), voda + diizopropanol amin (DIPA), voda + triizopropanol amin (TIPA), voda + dietanol amin (DEA)) su određeni u temperaturnom opsegu (288.15 - 323.15) K i na atmosferskom pritisku. U cilju analize realnog problema koji se može javiti u procesu uklanjanja ugljen-dioksida, usled korozivnog efekta povećanih koncentracija vodenih rastvora alkanol amina, u radu su korišćeni vodeni rastvori alkanol amina sledećih, manjih, koncentracija (5, 10, 15, 20 and 25) mas %. Cilj ovog rada je da doprinese proširenju baze termodinamičkih i transportnih svojstava različitih vodenih rastvora alkanol amina. Dobijeni rezultati pružaju neophodne podatke potrebne za projektovanje procesne opreme kao i optimizaciju procesa koji obuhvataju postupke uklanjanja ugljen-dioksida, ali su i polazna osnova za unapredjenja koja se mogu ostvariti potencijalnom supstitucijom najčešće korišćenog monoetanolamina drugim smešama vodenih rastvora alkanol amina koji su ispitivani u ovom radu.

Literature:

1. D.J. Hofmann, J.H. Butler, P.P. Tans, *Atmos. Environ.*, **43** (2009) 2084.
2. L. White, D. E. Street, Proceedings of corrosion in the oil refining industry conference, Phoenix, AZ, sep 17-18, 1998.
3. S. Chi, G.T. Rochelle, Presented at the First National conference on carbon Sequestration, Washington, DC, May 14, 2001.
4. A.L. Kohl, R.B. Nielsen, Gas Purification, Gulf Publishing Company, Houston, 1997.
5. A. Adisorn, V. Amornvadee, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **43** (2004) 2228.
6. M.Lj. Kijevcanin, M.M. Djuris, I.R. Radovic, B.D. Djordjevic, S.P. Serbanovic, *Chem. Eng. Data.*, **52** (2007) 1136.
7. S.P. Serbanovic, M.Lj. Kijevcanin, I.R. Radovic, B.D. Djordjevic, *Fluid Phase Equilib.*, **239** (2006) 69.
8. M.Lj. Kijevcanin, I.R. Radovic, E.M. Djordjevic, B.D. Djordjevic, S.P. Serbanovic, *Fluid Phase Equilib.*, **263** (2008) 205.
9. E.M. Zivkovic, M.Lj. Kijevcanin, I.R. Radovic, S.P. Serbanovic, B.D. Djordjevic, *Fluid Phase Equilib.*, **299** (2010) 191.

Analiza i modelovanje razmenjivača toplote gas-gas

Tatjana Kaluđerović Radoičić, Zorana Arsenijević*, Mirjana Munćan**,
Mirjana Kijevčanin, Željko Grbavčić

*Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd,
*IHTM, Univerzitet u Beogradu, Beograd, **Galenika, Beograd*

Abstrakt U ovom radu izvršeno je eksperimentalno ispitivanje i matematičko modelovanje razmenjivača toplote gas-gas, koji se nalazi u okviru poluindustrijskog postrojenja za katalitičko prečišćavanje otpadnih gasova. Postrojenje se sastoji od reaktora sa pakovanim slojem katalizatora, električnog predgrejača vazduha, ventilatora i razmenjivača toplote sa cevnom snopom i omotačem u kome se ulazni zagađeni vazduh koji struji kroz omotač predgreva korišćenjem toplote prečišćenog gasa koji izlazi iz reaktora. Dimenzije razmenjivača toplote su 1300 mm x 450 mm, sa 199 cevi u trougaonom rasporedu. Tokom eksperimentalnih ispitivanja poluindustrijskog postrojenja izmerene su vrednosti temperatura gasovitih struja na ulazu i izlazu iz razmenjivača pri različitim zapreminskim protocima ulaznog vazduha. Na osnovu eksperimentalnih podataka izvršeno je modelovanje prenosa toplote korišćenjem Kern-ove i Bell-Delaware-ove metode i testiranje njihove pouzdanosti i tačnosti. Vrednosti srednjeg procentnog odstupanja izračunatih od eksperimentalnih vrednosti izlaznih temperatura vazduha dobijene korišćenjem Kern-ove metode iznose 9,7% za vazduh u cevima, odnosno 13,7% za vazduh u omotaču. Odgovarajuće vrednosti srednjih procentnih odstupanja dobijenih korišćenjem Bell-ove metode su 19,7% za fluid u cevima i 10,7% za fluid u omotaču. Vrednosti koeficijenta prelaza toplote sa strane omotača dobijene korišćenjem Bellove metode su niže, dok su vrednosti padova pritiska u omotaču više u odnosu na vrednosti dobijene Kernovom metodom.

Uvod

Racionalno korišćenje energije u industrijskim postrojenjima postalo je jedno od najznačajnijih pitanja. Mnoga naučna istraživanja usmerena su kako na poboljšanje efikasnosti samih industrijskih procesa, tako i na razvijanje metoda za korišćenje toplote procesnih fluida koja se ispušta u okolinu. Jedan od načina povećanja energetske efikasnosti postrojenja i smanjenja utroška energije je korišćenje otpadne toplote procesnih fluida i u tu svrhu se projektuju različiti sistemi za rekuperaciju toplote

Postoji više tipova razmenjivača toplote koji mogu da se koriste kao rekuperatori toplote. U industrijskoj praksi se najčešće upotrebljavaju razmenjivači toplote sa cevnom snopom i omotačem obzirom da se mogu lako prilagoditi operativnim uslovima.

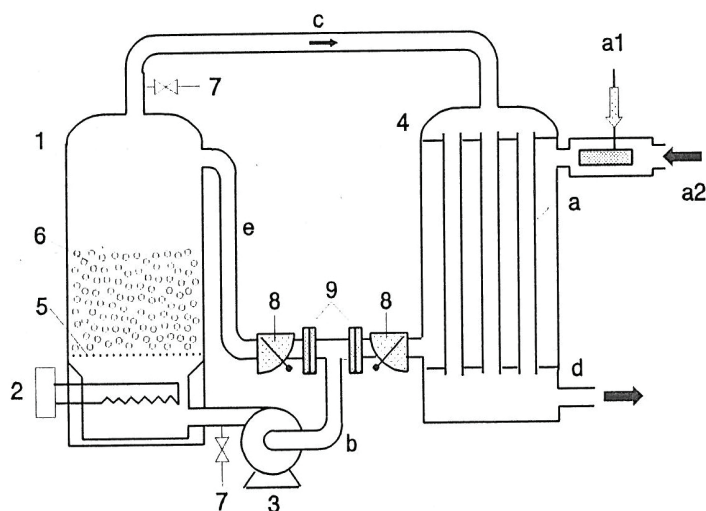
Kern-ova metoda se često koristi za dobijanje brzih i zadovoljavajućih rezultata pri projektovanju razmenjivača sa cevnom snopom i omotačem. Njena glavna prednost je što ne zahteva mnogo podataka o geometrijskim parametrima razmenjivača, odnosno potrebni su prečnik cevi i korak, fizičke osobine fluida sa strane omotača i pretpostavlja se korišćenje segmentnih pregrada sa visinom odsečka od 25% (u odnosu na unutrašnji prečnik omotača) koje su, kako su istraživanja pokazala, veoma blizu optimalnih vrednosti.

Za pouzdanije rezultate Bell-Delaware-ova metoda predstavlja bolji izbor, kao jedna od najpouzdanijih analitičkih, neiterativnih procedura za određivanje koeficijenta prelaza toplote i pada pritiska u razmenjivačima toplote sa složenom konfiguracijom strujanja fluida u omotaču. Koeficijenti prelaza toplote i pad pritiska se izračunavaju za idealan snop cevi, a zatim se dobijene vrednosti popravljaju nizom korekcionih faktora u vezi sa konfiguracijom pregrada, strujanjem fluida kroz zazore između cevi i pregrada i između pregrada i zida omotača, opstrujavanje fluida između snopa i zida omotača..

U radu je prikazana analiza razmenjivača toplote sa cevnom snopom i omotačem koji se koristi za rekuperaciju toplote izlaznih gasova iz katalitičkog reaktora čije su temperature, a time i njihove specifične entalpije velike. Izvršena su merenja temperature gasovitih struja na ulazu i izlazu iz razmenjivača, za različite zapreminske protoke ulaznog gasa. Pored eksperimentalnog ispitivanja, izvršeno je i matematičko modelovanje prenosa toplote u razmenjivaču korišćenjem Kern-ove i Bell-Delaware-ove metode¹⁻³ i poređenje dobijenih rezultata sa eksperimentalnim podacima.

Ekperimentalni sistem

Razmenjivač toplote korišćen u ovom radu je istostrujni razmenjivač toplote gas-gas, sa cevnim snopom i omotačem, dimenzija 1300 mm x 450 mm, sa 199 cevi u trougaonom rasporedu^{4,5}. U omotaču razmenjivača toplote se zagreva zagađeni atmosferski vazduh sobne temperature, korišćenjem toplote prečišćenog vazduha visoke temperature koji izlazi iz katalitičkog reaktora i struji kroz cevi razmenjivača toplote. Tehnološka šema poluindustrijskog postrojenja prikazana je na slici 1.

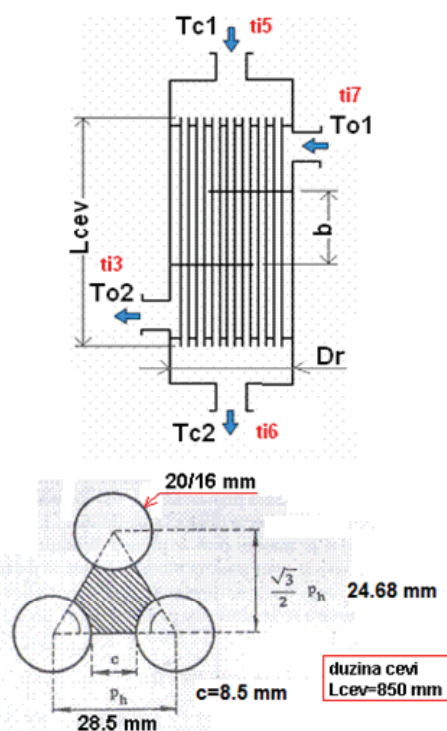


Slika 1. Tehnološka šema poluindustrijskog postrojenja za katalitičko prečišćavanje otpadnih gasova

vanje gasova (7). Gas koji se prečišćava se cevovodom (a) uvodi u razmenjivač toplote. Cevovod (a₁) je usisni cevovod za gasoviti polutant (toluol ili etilen oksid), a cevovod (a₂) služi za dovoz vazduha za razblaživanje, odnosno pravljenje gasne smeše određene koncentracije. Geometrijske karakteristike rekuperatora toplote prikazane su u tabeli 1 i na slici 2.

Tabela 1. Geometrijske karakteristike razmenjivača toplote

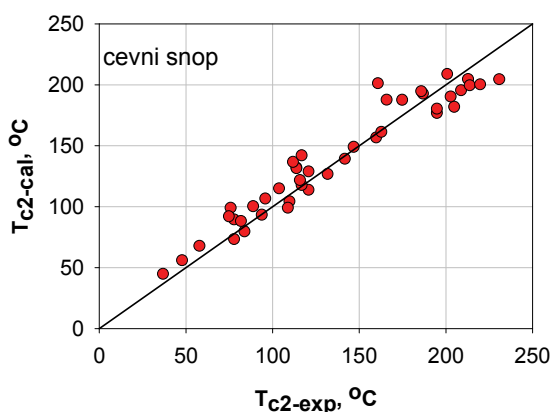
Parametar	Oznaka	Vrednost
Geometrija razmenjivača		
Prečnik razmenjivača	D_r	0.45 m
Spoljni prečnik cevi	d_{cs}	0.020 m
Unutrašnji prečnik cevi	d_{cu}	0.016 m
Dužina cevi	L_{cev}	0.85 m
Broj cevi	N_{cev}	199
Korak		0.0085 m
Međuosno rastojanje	p_H	0.0285 m
Broj pregrada u omotaču	N_{preg}	2
Razmak između pregrada u omotaču	b	0.283 m
Ostali ulazni podaci		
Spoljni radijus cevi	r_{cs}	0.010 m
Unutrašnji radijus cevi	r_{cu}	0.008 m
Površina za razmenu toplote	A_{top}	10.628 m ²
Površina za strujanje kroz cevi	A_{str}	0.0400 m ²
Omotač		
Ekvivalentni prečnik	D_{ekv}	0.02478 m
Površina za strujanje kroz omotač	S_o	0.03803 m ²



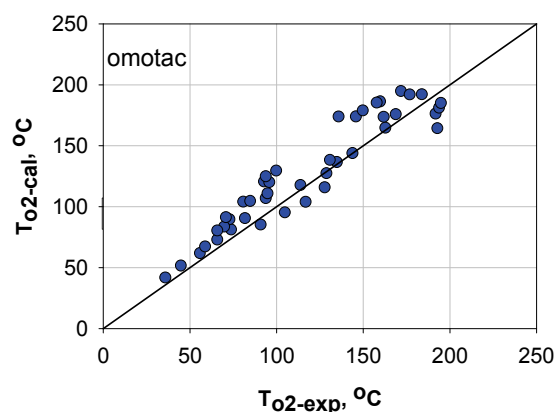
Rezultati

Na slikama 3 i 4 prikazani su rezultati dobijeni modelovanjem razmenjivača toplote korišćenjem Kern-ove i Bell-ove metode. Na slikama 3a) i 4a) prikazana su apsolutna odstupanja izračunatih od eksperimentalnih vrednosti izlaznih temperatura iz cevi, dok su na slikama 3b) i 4b) prikazana apsolutna odstupanja izračunatih od eksperimentalnih vrednosti izlaznih temperatura iz omotača. Analizom rezultata prikazanih na slikama 3 i 4 vidi se da je raspored odstupanja u pozitivnom i negativnom smeru ravnomeran kada se koristi Kern-ova metoda, dok se kod Bell-ove metode zapaža da su odstupanja izračunate vrednosti izlazne temperature vazduha iz cevi veće od eksperimentalnih u svim tačkama, dok su za vazduh u omotaču odstupanja ravnomernija.

a)

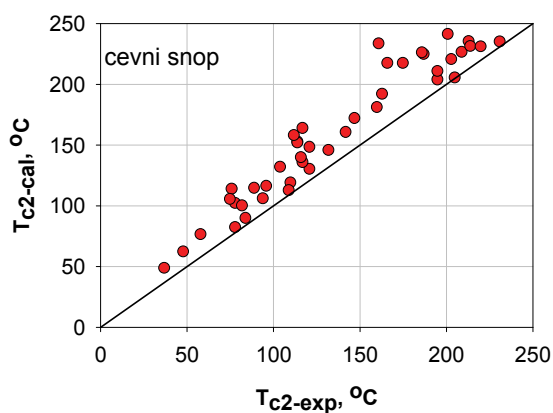


b)

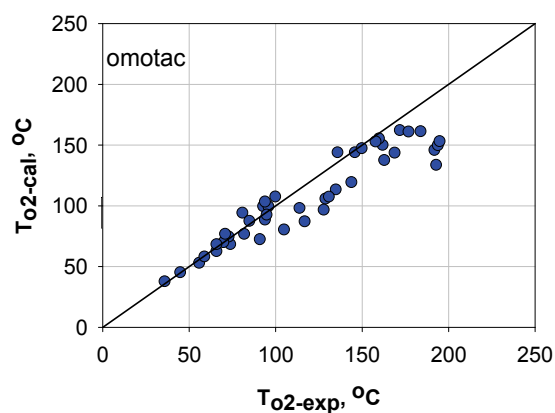


Slika 3. Apsolutna odstupanja izračunatih od eksperimentalnih vrednosti izlaznih temperatura vazduha dobijena korišćenjem Kern-ove metode a) za vazduh u cevima, b) za vazduh u omotaču

a)



b)



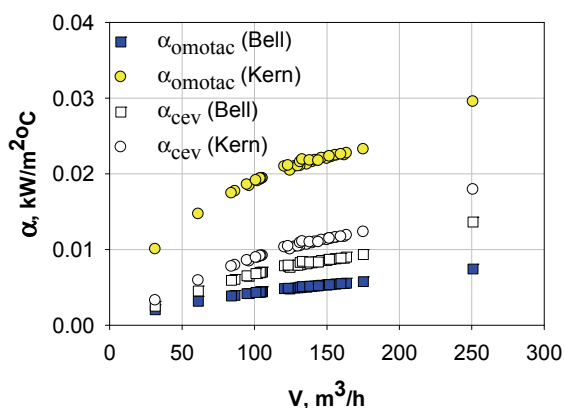
Slika 4. Apsolutna odstupanja izračunatih od eksperimentalnih vrednosti izlaznih temperatura vazduha dobijena korišćenjem Bell-ove metode a) za vazduh u cevima, b) za vazduh u omotaču

U tabeli 2 prikazane su vrednosti srednjeg procentnog odstupanja izračunatih od eksperimentalnih vrednosti za obe metode. Korišćenjem Bell-ove metode dobija se manje odstupanje izlaznih temperatura vazduha iz omotača od eksperimentalnih vrednosti. Ovaj rezultat je u skladu sa većom složenosti Bell-Delaware-ove metode, koja preciznije opisuje složeno strujanje fluida oko snopa cevi. Međutim, vrednost srednjeg procentnog odstupanja izlaznih temperatura iz cevi se povećalo korišćenjem Bell-Delaware-ove metode (tabela 2).

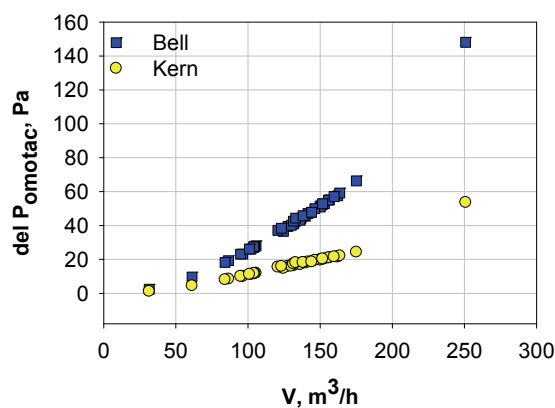
Tabela 2. Srednje procentno odstupanje izračunatih od eksperimentalnih vrednosti izlaznih temperatura iz cevi i omotača

	Srednje % odstupanje za vazduh u cevima	Srednje % odstupanje za vazduh u omotaču
Kern-ova metoda	9,7	13,7
Bell-ova metoda	19,7	10,7

Na slici 5 prikazana je zavisnost koeficijenta prelaza toplote sa strane omotača izračunatih po Kernovoj, odnosno Bellovoj metodi, od ulaznog zapreminskog protoka vazduha. Zapaža se da su vrednosti dobijene korišćenjem Bellove metode niže, odnosno da je ova metoda konzervativnija u predviđanju toplotnog protoka. Sa druge strane, kao što se vidi sa slike 6, vrednosti padova pritisaka sa strane omotača koje predviđa Bellova metoda su više od analognih vrednosti dobijenih Kernovom metodom, a razlika se povećava sa povećanjem protoka vazduha.



Slika 5. Zavisnost koeficijenta prelaza toplote u omotaču i cevnom snopu od ulaznog zapreminskog protoka vazduha prema Kern-ovoj i Bell-ovoj metodi



Slika 6. Zavisnost pada pritiska u omotaču od ulaznog zapreminskog protoka vazduha prema Kern-ovoj i Bell-ovoj metodi

Zaključak

Osnovni cilj ovog rada se sastojao u ispitivanju mogućnosti korišćenja postojećeg razmenjivača toplote gas-gas za rekuperaciju otpadne toplote gasova koji napuštaju katalitički reaktor sa pakovanim slojem katalizatora, kao i modelovanje prenosa toplote korišćenjem Kern-ove i Bell-Delaware-ove metode i testiranje njihove pouzdanosti i tačnosti. Dobijeni rezultati srednjeg procentnog odstupanja izračunatih od eksperimentalnih vrednosti izlaznih temperatura gasova ukazuju da Bell-Delaware-ova metoda daje manje vrednosti odstupanja za fluid u omotaču, ali pri tome veća odstupanja za fluid u cevima. Vrednosti koeficijentata prelaza toplote sa strane omotača dobijene korišćenjem Bellove metode su niže, dok su vrednosti padova pritisaka u omotaču više u odnosu na vrednosti dobijene Kernovom metodom.

Zahvalnica: Ovaj rad je podržalo Ministarstvo nauke Srbije kroz projekat 172022.

Mathematical modeling and analysis of gas-gas heat exchanger

In this work, experimental investigation and mathematical modeling of gas – gas heat exchanger was performed. The heat exchanger is a part of semi-industrial pilot plant for catalytic purification of waste gases. The pilot plant consists of fixed-bed catalytic reactor, electrical air preheater, fan and heat recuperator. Heat recuperator is shell and tube heat exchanger used for preheating the inlet contaminated air using the heat of purified outlet air from the catalytic reactor. The dimensions of the heat exchanger are 1300 mm x 450 mm, with 199 tubes in triangle layout. During the experimental investigations of the pilot plant, the values of inlet and outlet temperatures of the gas streams were measured for different inlet gas flow rates. Based on the experimental data, mathematical modeling of heat transfer coefficients was performed using Kern and Bell-Delaware methods. The values of mean percentile difference between experimental and calculated values of gas outlet temperatures obtained using Kern's method are 9.7% for the tube-side fluid and 13.7% for the shell-side fluid. The respective values obtained using Bell's method are: 19.7% for tube-side fluid and 10.7% for shell-side fluid. The values of shell side heat transfer coefficients obtained using Bell's method are higher than those obtained using Kern method, while it is opposite for the values of shell-side pressure drop.

Literatura

1. J.M. Coulson, J.F Richardson, R.K Sinnott, *Chemical Engineering Design, Volume 6*, Elsevier Butterworth-Heinemann, Oxford, England, 2005, Chapter 12
2. M.Serna, A. Jimenez, *Chem Eng Res Des* **83** (2005) 539
3. F.T. Mizutani, F.L.P. Pessoa, E.M. Queiroz, *Ind Eng Chem Res* **42** (2003) 4009
4. Z. Arsenijević, *Ispitivanje karakteristika i modelovanje reaktora sa pakovanim slojem katalizatora za uklanjanje sagorivih organskih polutanata*, Diplomski rad, TMF Beograd, 1994
5. Z.Lj. Arsenijević, B.V. Grbić, N.D. Radić, Ž.B. Grbavčić, *Chem Eng J* **116** (2006) 173

Kretanje čestica u fluidizovanom sloju tečnost-čestice

Mihal Đuriš, Zorana Arsenijević, Tatjana Kaluđerović Radoičić*, Radmila Garić-Grulović,
Željko B. Grbavčić*

*Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju - Centar za katalizu i hemijsko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu, Njegoševa 12, Beograd,*

**Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Karnegijeva 4, Beograd*

Uvod

Fluidizacija tečno-čvrsto se u praksi kroksi koristi u različitim procesima kao što su, separacioni procesi, klasifikacija materijala, adsorpcija, jonska izmena, katalitički kreking, hidrometalurgija, biološki procesi, za tretman otpadnih voda itd. Ispiranje zrnastih filtera je jedna od najčešćih primena partikulative fluidizacije, naročito pešćanih filtera¹. Tokom fluidizacije sa vodom prethodno filtrirane mehaničke nečistoće bivaju uklonjene iz solja filtracionog materijala ispiranjem. Efikasnost procesa ispiranja zavisi od trenja između fluida i čestica kao i od intenziteta sudara između čestica koje fluidizuju, tako da je od značaja ispitati hidrodinamičke uslove pri kojima je frekvencija sudara između fluidizovanih čestica najviša. U ovom radu ispitivano je kretanje čestica u fluidizovanom sloju u cilju razvoja modela za predviđanje ukupne frekvencije sudara između čestica. U literaturi ima relativno malo podataka^{2,3,4} o brzinama čestica u partikulativno fluidizovanim slojevima. Rezultati ispitivanja u ovom radu su pokazali da je brzina čestice proporcionalna površinskoj brzini fluida, a da je frekvencija sudara između čestica najveća pri poroznosti sloja $\varepsilon \approx 0.7$ za čestice prečnika $d_p = 2.98$ mm koje su fluidizovane vodom.

Rezultati i diskusija

Brzine čestica u partikulativno fluidizovanom sloju merene su u «dvodimenzionoj» koloni dimenzija 138x10x700 mm. Korišćene su staklene sfere prečnika $d_p = 2.98$ mm, gustine $\rho_p = 2509$ kg/m³. Kao tečnost za fluidizaciju korišćena je voda temperature 20°C. Prethodno je u istoj koloni određena zavisnost između površinske brzine fluida i poroznosti sloja. Eksperimentalni podaci su pokazali da se ova zavisnost pokorava relaciji Richardson-Zakija⁵:

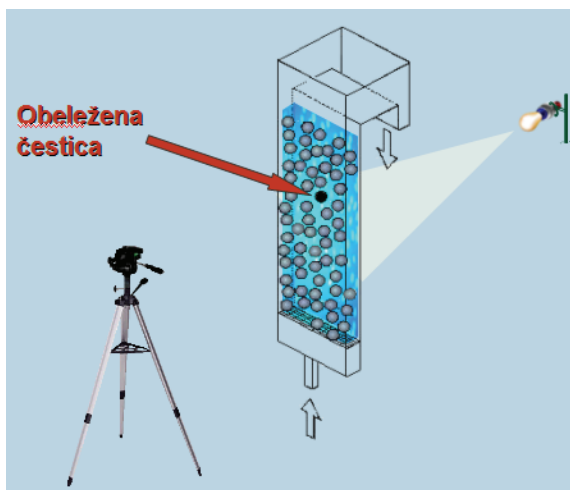
$$U = U_E \cdot \varepsilon^n \quad (1)$$

gde je U_E ekstrapolisana vrednost brzine vode za $\varepsilon = 1$ a n -indeks ekspanzije koji zavisi od Reynolds-ovog broja za česticu pri brzini U_t ($U_E = 26$ cm/s, $n = 2.92$). Brzina slobodnog taloženja ispitivanih čestica je $U_t = 35.4$ cm/s, minimalna brzina fluidizacije je $U_{mf} = 4$ cm/s, dok je odgovarajuća poroznost sloja $\varepsilon_{mf} = 0.545$. Šematski prikaz sistema za merenje brzina obeležene čestice prikazan je na slici 1. Nakon što je fiksirana brzina vode video kamerom je snimano kretanje jedne obeležene čestice. Nakon toga snimak je analiziran frejm po frejm i beležene su pozicije obeležene čestice. Potom je ovako dobijena slika odnosno hodogram obeležene čestice analiziran pomoću softvera SigmaScan⁶ u cilju određivanja koordinata čestice. Tipičan primer hodograma obeležene čestice dat je na slici 2. Napomenimo da rastojanje između dva simbola odgovara vremenskom intervalu $\Delta\tau = 0.035$ s. Brzina obeležene čestice je $v_i = \Delta s_i / \Delta\tau$, gde je Δs_i - pređeni put, a $\Delta\tau$ - vremenski interval između dva frejma. Srednja brzina obeležene čestice pri datoj brzini fluida je:

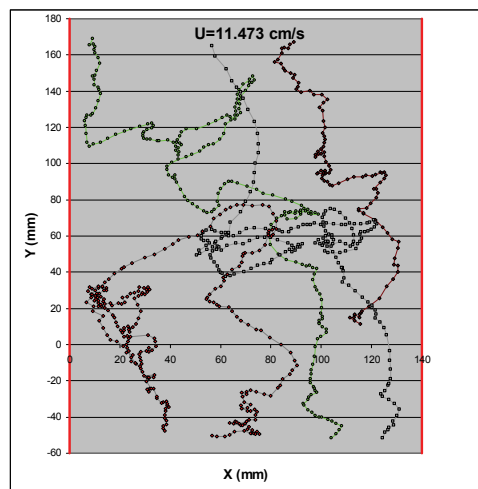
$$v_{sr} = \frac{S}{\tau} \quad (2)$$

gde je S ukupni put koji je prešla obeležena čestica u vremenskom intervalu τ . Kako se čestice u fluidizovanom sloju kreću haotično u različitim pravcima i različitom brzinom tačnost određivanja srednje brzine zavisi od broja pojedinačnih merenja. Na slici 3 prikazano je kako broj pojedinačnih merenja utiče na srednju vrednost brzine obeležene čestice. Može se uočiti da sa porastom N srednja vrednost asimptotski teži konstantnoj vrednosti i da se sa dovoljnom tačnošću može smatrati da je oko 4000 pojedinačnih merenja dovoljno za određivanje srednje vrednosti. Na slici 3 prikazan je uticaj brzine fluida na srednju vrednost brzine obeležene čestice. Srednja brzina čestice raste proporcionalno površinskoj brzini fluida, pri čemu je karakteristično da dolazi do promene nagiba pri brzini fluida od $U \approx 11.5$ m/s. Ova brzina fluida odgovara poroznosti sloja od $\varepsilon \approx 0.76$. Interesantno je napomenuti da je

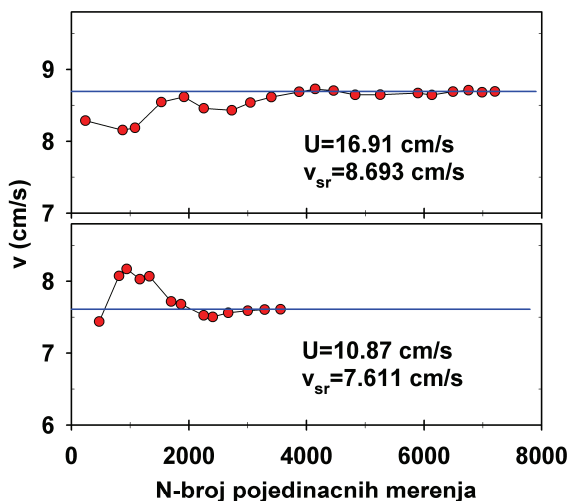
više autora⁷ uočilo da na dijagramu ekspanzije partikulativno fluidizovanog sloja (zavisnost između površinske brzine fluida i poroznosti sloja u log-log dijagramu) takođe dolazi do promene nagiba pri približno istoj poroznosti sloja.



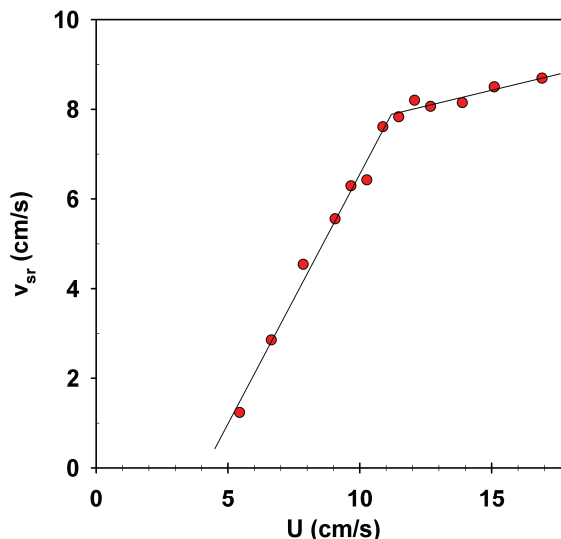
Sl.1. Šematski prikaz eksperimentalnog sistema



Sl.2. Hodogram obeležene čestice

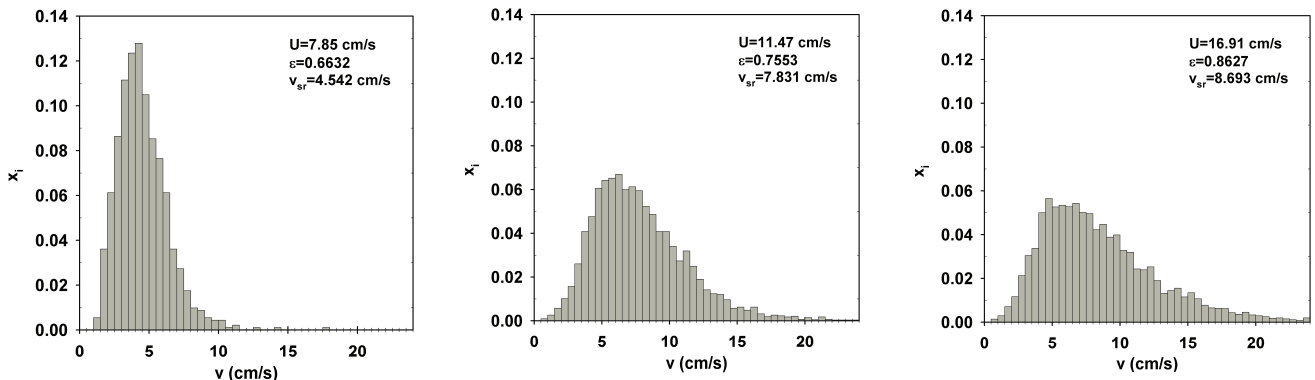


Sl.3. Srednja brzina obeležene čestice u zavisnosti od broja pojedinačnih merenja



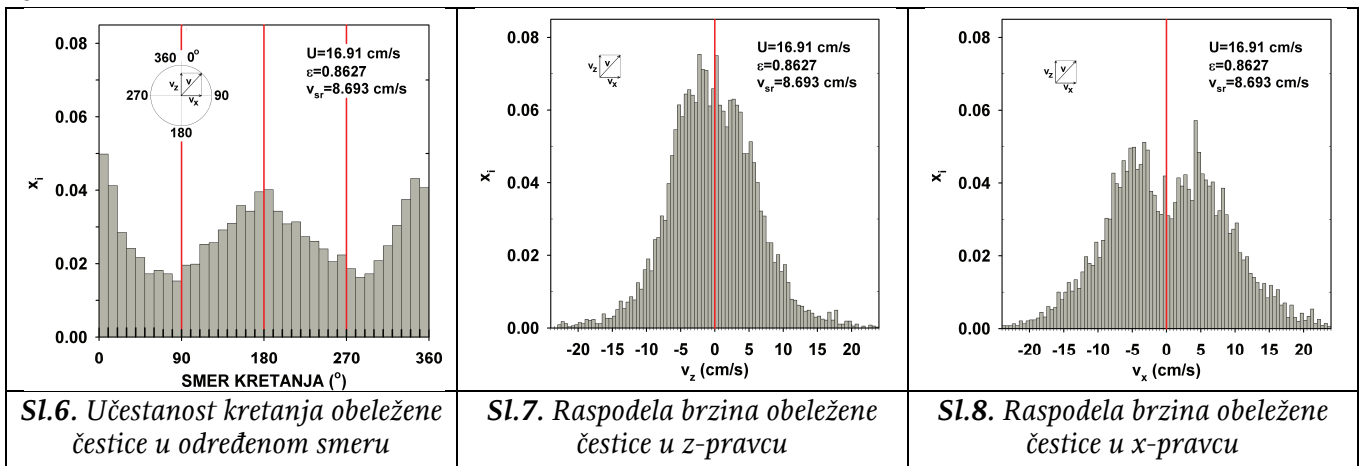
Sl.4. Srednja brzina obeležene čestice u zavisnosti od površinske brzine fluida

Na slici 5 prikazana je raspodela brzina obeležene čestice po intenzitetu za tri različite brzine fluida. Može se uočiti izvesna analogija sa kinetičkom teorijom gasnog stanja, budući da raspodela podseća na Maxwell-ovz raspodelu brzina molekula gasa. Slična raspodela brzina je uočena i u trodimenzionom sloju^{XX}. Uticaj brzine fluida na oblik krivih raspodele je sličan uticaju temperature na raspodelu brzina molekula. Međutim, kada je u pitanju kretanje molekula gasa svi pravci su ravnopravni dok je u fluidizovanom sloju z pravac favorizovan budući da se poklapa sa smerom kretanja fluida. To se može uočiti na slici 6 koja prikazuje raspodelu brzina kretanja obeležene čestice po smeru kretanja nezavisno od intenziteta. Može se uočiti da je udeo čestica koje se kreću vertikalno u $\pm z$ pravcu (smerovi 0 i 180°) nešto veći od udela čestica koje se kreću horizontalno u $\pm x$ pravcu (smerovi 90 i 270°). Na slici 7 i 8 prikazane su raspodele aksijalne (v_z) i radijalne (v_x) komponente brzine. Može se uočiti visok stepen simetrije, tj. približno ista raspodela važi za $+z$ i $-z$ pravac, kao i za $+x$ i $-x$ pravac, što govori o visokom stepenu izotropnosti sloja.



SL.5. Raspodela brzina obeležene čestice

b

Optimalna poroznost sloja

Frekvencija sudara jedne čestice je

$$f_1 = \frac{v_{sr}}{\lambda} \quad (3)$$

gde je λ -srednji put čestica između dva sudara. Po analogiji sa kinetičkom teorijom gasnog stanja je²:

$$\lambda = \frac{d_p}{6\sqrt{2}(1-\varepsilon)} \quad (4)$$

gde je d_p -prečnik sferične čestice a ε -poroznost sloja. Srednja frekvencija binarnih sudara je⁸:

$$f_{11} = \frac{1}{2} \cdot N \cdot f_1 \quad (5)$$

gde je N-broj čestica po jedinici zapremine sloja dat izrazom

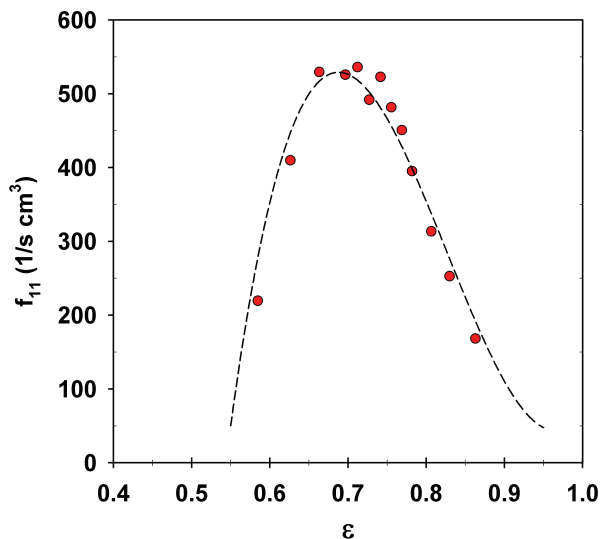
$$N = \frac{1-\varepsilon}{\frac{\pi}{6} d_p^3} \quad (6)$$

Kombinovanjem izraza (2-5) ukupna frekvencija binarnih sudara je

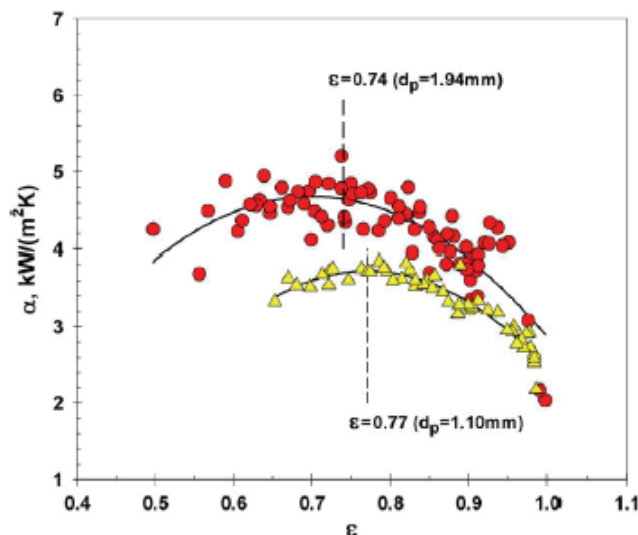
$$f_{11} = \frac{18\sqrt{2}}{\pi} \cdot \frac{(1-\varepsilon)^2}{d_p^4} \cdot v_{sr} \quad (7)$$

Na slici 9 prikazane su izračunate vrednosti ukupne frekvencije binarnih sudara po jednačini (6) korišćenjem eksperimentalnih podataka za poroznost sloja (ε) i srednju brzinu čestica (v_{sr}). Karakteristično je da postoji izraziti maksimum pri poroznosti soja $\varepsilon \approx 0.7$, što znači da se pri ovoj poroznosti može očekivati maksimalna efikasnost sloja u određenim procesima. Dva najkarakterističnija procesa su povratno ispiranje pešćanih filtera i prenos toplote/mase u fluidizovanom sloju. Na slici 10 prikazana su rezultati merenja koeficijenta prelaza toplote zid-sloj u partikulativno fluidizovanom sloju

tečnost staklene sfere prečnika 1.94 i 1.1 mm⁹, koji pokazuju da se najviše vrednosti koeficijenta prelaza toplote zid-sloj ostvaruju pri poroznosti od $\epsilon \approx 0.74$ za čestice $d_p = 1.94$ mm odnosno $\epsilon \approx 0.77$ za čestice $d_p = 1.10$ mm. Da je poroznost $\epsilon \approx 0.7$ karakteristična za partikulativno fluidizovane slojeve potvrđuju i ispitivanja drugih autora. Na primer, da je pri ovoj poroznosti najintenzivnije mešanje čestica u sloju i aksijalno mešanje tečnosti¹⁰, da su koeficijenti prelaza toplote i frekvencija sudara najviši¹¹, da su kolizionni pritisak čestica na zid kolone i fluktuacija brzine čestica najviši^{2,13}, kao i da su maksimalne fluktuacije aksijalne brzine tečnosti¹⁴.



Sl.9. Ukupna frekvencija binarnih sudara u zavisnosti od poroznosti sloja



Sl.10. Koeficijent prelaza toplote zid-sloj u zavisnosti od poroznosti sloja^{XX}

Zaključak

Ispitivano je kretanje čestica prečnika $d_p = 2.98$ mm u dvodimenzionom fluidizovanom sloju. Pokazano je da se srednja brzina obeležene čestice menja linerno sa brzinom fluida, pri čemu se nagib linije menja pri poroznosti sloja od $\epsilon \approx 0.76$. Raspodela pojedinačnih brzina obeleženih čestice ima sličnosti sa Maxwell-ovom raspodelom brzina molekula gasa u kinetičkoj teoriji gasnog stanja, pri čemu je nešto naglašeniji udeo čestica koje se kreću u $\pm z$ pravcu. Razvijen je model za predviđanje frekvencije sudara između čestica, koji pokazuje da se sa ispitivanim česticama maksimalna frekvencija sudara javlja pri poroznosti od $\epsilon \approx 0.7$. Ovaj rezultat je u dobroj saglasnosti sa merenjima koeficijenta prelaza toplote zid-sloj^{9,11}, kao i sa merenjima intenziteta mešanja čestica i aksijalnog mešanja tečnosti¹⁰, kolizionog pritiska čestica na zid kolone¹², fluktuacije brzine čestica¹³ i fluktuacije aksijalne brzine tečnosti¹⁴.

Zahvalnica: Ovaj rad je podržalo Ministarstvo nauke Srbije kroz projekat 172022.

Particle movement in liquid fluidized beds

Liquid-solid fluidized bed are used in several processes such as solids separation and classification, adsorption, ion exchange, catalytic cracking, hydrometallurgical operations, waste water treatment and biotechnological processes. Probably the most widely used application is backwashing of downflow granular filters, especially sand filters. During fluidization by water primarily filtered solids are removed from the bed by elutriation. The efficiency of this process depends on the friction between fluid and particles as well as on collisions between fluidized particles. The aim of this work is to investigate the optimal filter bed porosity at which the filter backwashing is most efficient, i.e. at what bed porosity frequency of the collision between particles reaches maximum value. The particle velocities in fluidized bed were carried out in "two-dimensional" 2D column, the dimension of column is 138x10x700 mm. The fluidized bed was consisted from spherical particles $d_p = 1.94$ mm in diameter. Using a camera the motion of single marked particle in fluidized bed was performed, by images analysis in SigmaSacr software package we conclude that particle speed distribution in fluidized bed follows a Maxwell-Boltzmann velocity distribution of the gas molecules. The maximum bed efficiency in the terms of frequency of the collision between particles occurs at bed porosity of $\epsilon \approx 0.7$.

Literatura

1. N.Epstein, *Powder Technol.* **151** (2005) 2.
2. C.R.Carlos, J.F.Richardson, *Chem.Eng.Sci.* **23** (1968) 825.
3. B.A.J.Latif, J.F.Richardson, *Chem.Eng.Sci.* **27** (1972)1933.
4. Ž.Grbavčić, D.Vuković, F.Zdanski, *Powder Technol.* **62** (1990)199.
5. J.F. Richardson, W.N.Zaki, *Trans. Inst. Chem. Eng.* **32** (1954) 35.
6. SigmaScan-Image Measurement Software, *Jandel Scientific*, USA, 1999.
7. R. Di Felice, *Chem. Eng. Sci.* **50** (1995) 1213.
8. T.B.Nelson, J.M.Skaates, *Ind. and Eng.Chem.Res.* **27** (1988) 1502.
9. R.Garić-Grulović, N.Bošković-Vragolović, Ž.Grbavčić, Z.Arsenijević, *Int. J. of Heat and Mass Transfer* **51** (2008) 5942.
10. J.P.Couderc, *Fluidization, 2nd Edition* (Edited by J.F. Davidson, R. Clift and D. Harrison), pp. 1-46, 1985, Academic Press, London.
11. M.Aghajani, H.Müller-Steinhagen, M.Jamialahmadi, *Int.J. of Heat and Mass Transfer*, **48** (2005) 317.
12. R.Zenit, M.L.Hunt, C.E.Brennen, *J. of Fluid Mech.* **353** (1997) 261.
13. F.Gevrin, O.Masbernat, O.Simonin, *Chem.Eng.Sci.* **63** (2008) 2450.
14. N.Kechroud, M.Brahimi, A.Djati, *Powder Technol.* **200** (2010) 149.

Ispitivanje fluidizacionih karakteristika filtracionog peska

Mihal M. Đuriš, Zorana Lj. Arsenijević, Rada V. Garić-Grulović,
Darko R. Jaćimovski, Željko B. Grbavčić*

*Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju – CKHI, Univerzitet u Beogradu, Njegoševa 12, Beograd,
Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Karnegijeva 4, Beograd, Srbija

Uvod

Filtracija vode predstavlja jednu od faza pri prečišćavanju otpadnih voda i pripreme vode za piće. Cilj filtracije je da se uklone nerastvorne materije koje su dispergovane u vodi. Ovaj separacioni proces sastoji se u prolasku zaprljane vode kroz porozni medijum koji zadržava čvrstu materiju a dozvoljava tečnosti da slobodno protiče. Uglavnom se koriste različita kućišta filtera sa odgovarajućim filter ulošcima raznih poroziteta, a postoji čitava paleta poluautomatskih i automatskih filtera, koji se mogu ispirati tokom rada, te nema diskontinuiteta u radu zbog zamene ili čišćenja filter uložaka. Kod jače zaprljanih voda mogu se koristiti klasični peščani filtri sa višeslojnom silikatnom ispunom različite granulacije¹.

U praksi filtriranje vode u kontrolisanim uslovima izvodi se u sporim filterima, brzim gravitacionim filterima i filterima pod pritiskom. Filtraciona jedinica, u svim ovim slučajevima sastoji se od objekta izrađenog od betona i čelika sa perforiranom podlogom i nosećim pakovanim slojem preko kog se sakuplja filtrirana voda. Isti sistem se koristi i za pranje filtera sa kretanjem vode odozdo na gore. Ispiranje filtra vrši se propuštanjem vode odozdo naviše tako da sloj peska počne da fluidizuje. Protok vode za ispiranje treba da bude podešen tako da ekspanzija filtracionog sloja bude između 30-50%¹, jer se pri toj ekspanziji potrošnja vode potrebne za pranje filtera najoptimalnija. Zato pravilno odabran materijal pakovanog sloja i poznavanje njegovih fluidizacionih karakteristika predstavlja jedan od važnih faktora za filtraciju i ispiranje filtera.

Rezultati i diskusija

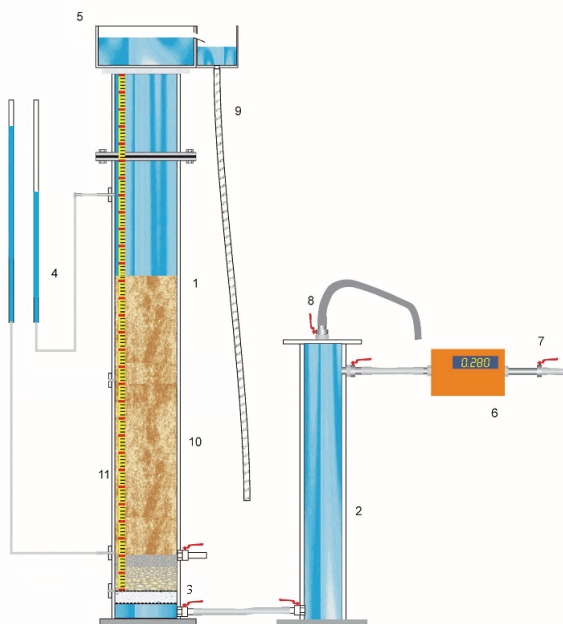
Fluidizacioni eksperimenti izvršeni su za 8 frakcija filtracionog (kvarcnog) peska različitih granulacija dobijene sejanjem kroz sistem standardnih sita tabela 1. Eksperimentalna ispitivanja rađena su u standardnim fluidizacionim kolonama unutrašnjeg prečnika 64 i 40 mm i visine 2 m, početna visina sloja u svim eksperimentima bila je 400 mm. Šematski prikaz eksperimentalnog sistema dat je na slici 1, na kojoj je 1-glavna kolona za fluidizaciju, 2-pomoćna kolona za dearaciju, 3-nosač filtera, 4-Piezo-metri za merenje pada pritiska u sloju, 5-prelivnik, 6- merač protoka, 7-ventil dotoka vode, 8-ispusni ventil za vazduh, 9-odlivno crevo, 10- peščani filter, 11-metar za merenje visine sloja.

Tabela 1. Eksperimentalni podaci

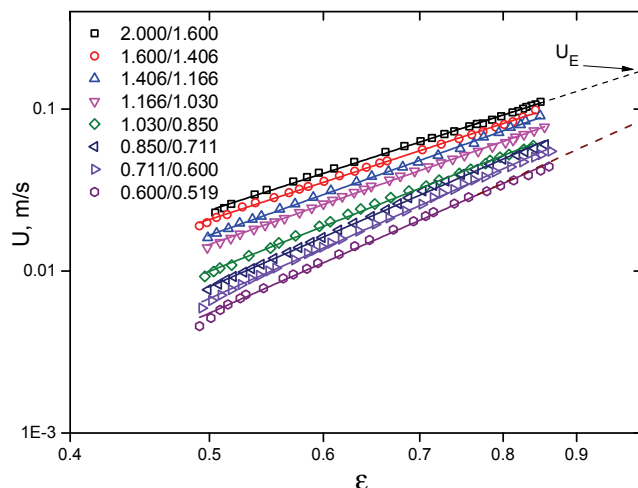
Frakcija	Srednji prečnik, mm d_M	Min. brzina fluidizacije, m/s U_{mF}	Poroznost min. fluid. ϵ_{mF}	Brzina taloženja, m/s U_t	Indeks ekspanzije n	Brzina odnošenja, m/s U_E	d_E
2.000/1.600	1.800	0.0250	0.5159	0.1722	2.9509	0.1792	1.236
2.000/1.406	1.700	0.0230	0.5114	0.1496	2.8771	0.1664	1.141
2.000/1.166	1.583	0.0230	0.5150	0.1613	2.8473	0.1598	1.1092
1.600/1.406	1.500	0.0200	0.5000	0.1472	2.8511	0.1531	1.046
1.406/1.166	1.283	0.0156	0.5000	0.1336	3.1435	0.1476	1.007
1.166/1.030	1.098	0.0131	0.4900	0.1204	3.1467	0.1283	0.871
1.030/0.850	0.940	0.0093	0.5000	0.1014	3.4576	0.1119	0.759
0.850/0.711	0.781	0.0084	0.5000	0.0911	3.4134	0.0931	0.636
0.711/0.600	0.656	0.0064	0.5000	0.0866	3.7040	0.0975	0.664
0.600/0.519	0.560	0.0057	0.5080	0.0764	3.7735	0.0798	0.551

Tokom eksperimentalnih merenja praćeni su padovi pritiska u sloju sa promenom protoka tečnosti a istovremeno su praćene i promene visine sloja. Minimalna brzina fluidizacije (U_{mF}) i odgovarajuća poroznost sloja (ϵ_{mF}) određeni su na osnovu položaja maksimuma na krivoj $-dP/dz=f(U)$ i prikazane su u tabeli 1. Da bi eksperimentalno izmerili brzine slobodnog taloženja U_t iz svake od frakcija nasumično

smo birali oko 30 čestica, i za njih sme uz pomoć štoperice izmerili vreme koje je potrebno da „paket čestica“ pređe referentno rastojanje od 1 m slobodnim taloženjem, svako merenje je ponavljano 20-30 puta, u tabeli 1. prikazane su srednje vrednosti izmerenih brzina taloženja. Eksperimentalni podaci su pokazali da se zavisnost između poroznosti sloja i površinske brzine vode pokorava relaciji Richardson-Zakija² (jed. 1.) :



Sl.1. Šematski prikaz eksperimentalnog sistema fluidizacije



Sl.2. Ekspanzija sloja - zavisnost $U=f(\epsilon)$

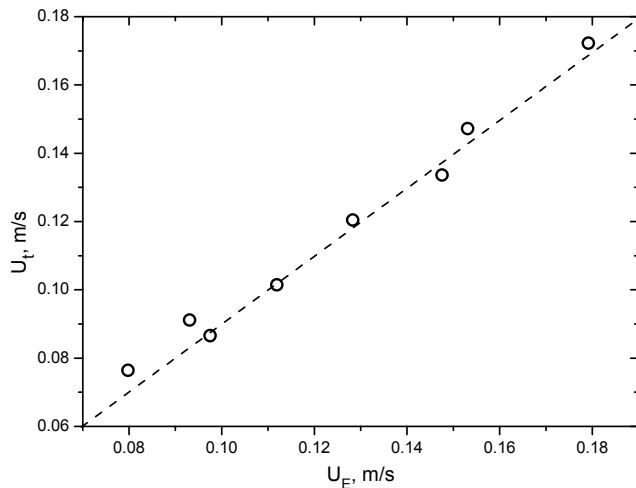
$$U = U_E \cdot \epsilon^n$$

$$\log U = \log U_E + n \cdot \epsilon$$

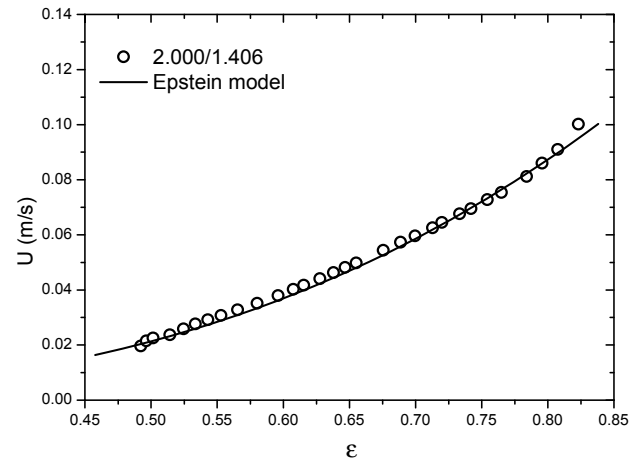
(1)

Na slici 2 prikazana je zavisnost promene površinske brzine tečnosti U sa poroznošću ϵ za svaku ispitivanu frakciju peska. Sa grafika se može uočiti da su zavisnosti $U(\epsilon)$ u logaritamskom dijagramu za frakcije peska sa krupnijom granulacijom prave linije što je u saglasnosti sa relacijom Richardson/Zakija², dok frakcije peska sa sitnijom granulacijom blago odstupaju od ove zakonitosti. Nagib krive na slici 2 odgovara indeksu ekspanzije n koji zavisi od Rejnolds-ovog broja za česticu pri brzini U_t (gde je U_t -brzina slobodnog taloženja usamljene čestice) i faktora stešnjenja (odnos prečnika čestice prema prečniku kolone). Brzina odnošenja čestica U_E može da se odredi ekstrapolacijom eksperimentalnih podataka za vrednost poroznosti $\epsilon=1$, ova vrednost po originalnoj korelaciji Richardson-Zakija² bi trebalo biti jednaka brzini taloženja $U_E=U_t$ međutim kasnija ispitivanja su pokazala da se ove dve brzine razlikuju $U_E \neq U_t$ i do 30% zavisno od sistema³. Vrednosti n -indeksa ekspanzije i brzine odnošenja čestica U_E prikazane su u tabeli 1.

Poređenje eksperimentalno izmerene brzine taloženja oblaka od 30 čestica sa ekstrapolisanim brzinom taloženja U_E slika 3, da se primetiti da se ove vrednosti u našem slučaju razlikuju i do 10 %, razlika u ove dve brzine proizilazi u uticaju slobodne turbulencije na koeficijent otpora strujanja jedne čestice. Da bi procenili karakterističnu veličinu čestica svake frakcije, predložili smo da se ona izračuna kao efektivni «hidraulički prečnik čestica d_E », koji se definiše kao prečnik sfere iste gustine čija je brzina slobodnog taloženja jednaka U_E , izračunate vrednosti d_E (tabela 1.). Kao karakteristična veličina za nesferične čestice u praksi se koristi i površinsko zapreminski prečnik d_{sv} koji bi mogao da se izračuna iz dobro poznate Ergunove⁴ i Karman-Kozeny-jeve jednačine. Karakteristične veličine čestica d_E i d_{sv} mogu da nam koriste za dalje izračunavanje koeficijenta otpora usled oblika (C_D faktora) i sferičnosti čestica npr. pomoću jednačina Haider i Levenspiel⁵ i Turton i Levenspiel⁶, isti autori su predložili i korelacione formule za izračunavanje brzina slobodnog taloženja čestica.



Sl.3. Poređenje brzina odnošenja i taloženja



Sl.4. Upoređenje eksperimentalnih podataka sa modelom Epstein.

Kada je u pitanju fluidizacija peska koja predstavlja polidisperznu smešu nesferičnih čestica, u literaturi ne postoji jedinstvena korelacija koja bi omogućila pouzdano predviđnje ekspanzije sloja. Osnovni problemi su karakterizacija polidisperzne smeše i određivanje reprezentativnog faktora oblika čestica, kao i uticaj oblika čestica na U_E i n . Prema nekim autorima⁷, koncept „srednje“ čestice nije primenljiv ako je odnos prečnika najkrupnijih prema najsitnijim česticama u populaciji $d_R > 1.3$. Jedan od najranijih i najjednostavnijih pristupa je „serijski“ model Epstein-a⁸. Prema ovom modelu ukupna ekspanzija polidisperzne smeše pri određenoj brzini vode je zbir ekspanzija pojedinih (približno monodisperznih) frakcij pri istoj brzini vode, odnosno.

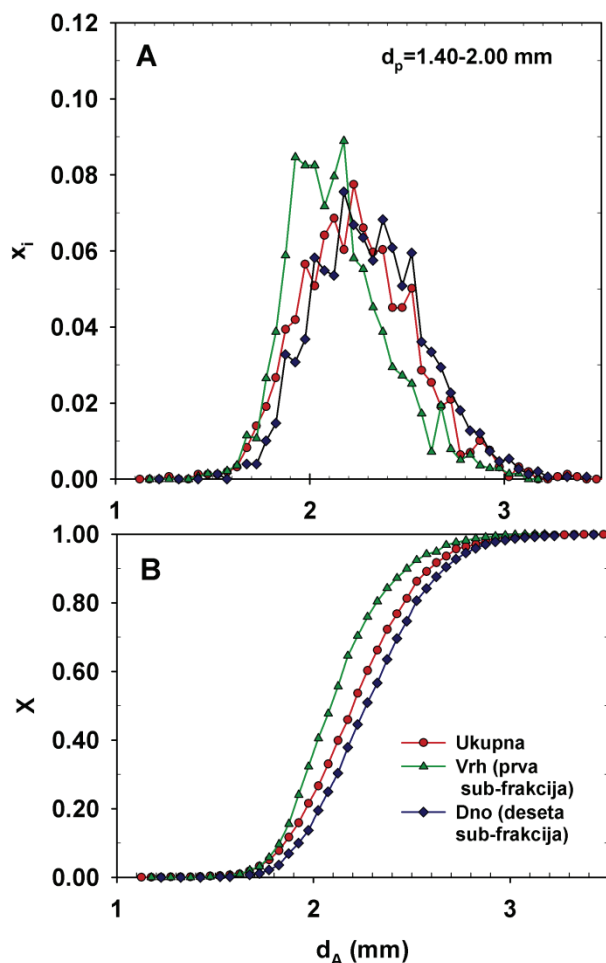
$$\frac{1}{1 - \varepsilon_s} = \sum_{i=1}^N \frac{x_i}{1 - \varepsilon_i} \quad (2)$$

gde je ε_s -srednja poroznost smeše čestica pri određenoj površinskoj brzini vode (U), ε_i -poroznost i -te frakcije pri istoj brzini vode a x_i -težinski udeo i -te frakcije. Da bi ispitati ispravnost predloženog modela primenili smo ga za frakciju 2.000/1.406 mm pretpostavljajući da je čine jednake mase frakcije peska (2.00/1.600 mm i 1.600/1.406 mm), gde smo poroznost svake od frakcije računali je po korelaciji Richardson-Zaki-a. Dobijeni rezultati prikazani su na slici 4., može se uočiti da podaci pokazuju dobro slaganje sa eksperimentalnim podacima. Epsteinov model treba još primeniti za smešu koja je sačinjena od frakcija peska čije se veličine znatno razlikuju da bi se ispitala njegova pouzdanost.

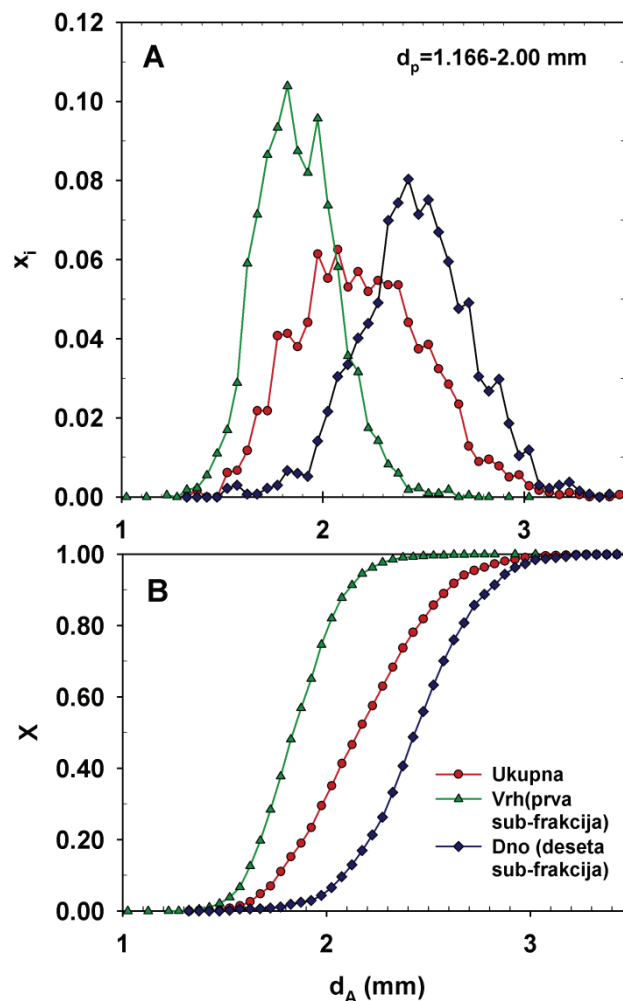
Prilikom ispiranja pešćanih filtera, fluidizovani slojevi tečnost čestice imaju osobinu da se fluidizovani materijal jasno razdvojiti po veličini zrna⁹. Najkrupnije čestice će fluidizirati na dnu sloja, a najsitnije na vrhu. Pri tome, poroznost sloja neće biti konstantna, pri dnu je najmanja a pri vrhu najveća. Ova nova raspodela po veličini filtracionog materijala može da dovede narušavanja raspodele filtracionog materijala po zapremini što može da prouzrokuje brzo zagušenje filtera. Da bi ispitati segregaciju veličine čestica simulirali smo ispiranje pešćanih filtera granulacije (2.000/1.600, 2.000/1.406, 2.000/1.166 mm) protokom vode koji odgovara ekspanzija sloja od $E = 100(H - H_0)/H = 35\%$. Nakon toga je za svaku frakciju izvršena hidraulička klasifikacija čestica na 10 jednakih delova, potom je deo sa vrha, sredine i dna analiziran i cilju određivanje raspodele veličina čestica. Raspodela veličine čestica rađena je analizom skenirane slike nasumično odabranih (1000-2000) čestica pomoću softverskog paketa SigmaScan, koji nam kao karakterističnu veličinu čestica daje projektovani prečnik koji se računa po sledećoj jednačini,

$$d_A = \frac{1}{N} \sqrt{\frac{4}{\pi} \sum A_i} \quad (3)$$

Na slikama 5 i 6 prikazane su raspodele veličina čestica sa vrha, dna i raspodela veličine čestica smeše. Može se videti da tokom simulacije ispiranja pešćanog filtera granulacije 2.000/1.600 i 2.000/1.406 nije došlo do značajne segregacije čestica, dok je tokom ispiranja pešćanog filtera granulacije 2.000/1.166 došlo do pojave segregacije po veličini slojeva sa vrha i dna što se može videti i na slici 6.



SI.5. Raspodela veličine čestica za frakciju peska 2.000/1.406



SI.6. Raspodela veličine čestica za frakciju peska 2.000/1.166

Zaključak

Ekspanzija fluidizovane polidisperzne smeše peska vodom se pokorava opštoj zakonitosti Richardson-Zaki-ja $U=U_E \epsilon^n$. Ekstrapolisan vrednost brzine slobodnog taloženja (U_E) je u dobroj saglasnosti sa eksperimentalno određenom brzinom slobodnog taloženja «oblaka» čestica. Dobijene vrednosti minimalne brzine fluidizacije pokazuju da pravilno rastu sa porastom veličine čestica, što je sasvim očekivano. Epsteinom model pokazuju dobro slaganje sa eksperimentalnim podacima, ali ga treba još ispitati za smešu sačinjenu od frakcija koje se znatno razlikuju u veličini čestica. Može se smatrati da tokom fluidizacije polidisperzne smeše peska neće doći do segregacije ako je odnos prečnika $d_R < 1.5$.

Zahvalnica: Ovaj rad je podržalo Ministarstvo nauke Srbije kroz projekat 172022.

Analysis of filtration sand fluidization characteristics

In the filter backwashing process one of the most important operational parameters to be determined is the amount of water required for each backwash. This amount depends on the design of the filter and the quality of the water being filtered. The objective of this work was to determine expansion coefficients for 10 different sand fractions, expansion coefficients are important for determination optimum value porosity and backwashing. The expansion characteristics of the sand particles followed a Richardson-Zaki relationship. The intercept velocity, i.e., the extrapolated value of the fluid superficial velocity to $\epsilon=1$ on the plot $\log(U)$ vs. $\log(\epsilon)$, agreed quite well with the experimentally determined

mean free settling velocity of the cloud of about 30 randomly selected particles. Experimentally obtained values of expansion of grain size of the sand $d_p=1.406-2.000$ mm was correlated according to Epstein model. By analyzing the particle size distribution at the bottom and at the top of the bed, it was concluded that the bed was well mixed if the sieving ratio of the largest to smallest sieve opening was less than about 1.5.

Literatura

1. F. R. Spellman, *Handbook of Water and Wastewater treatment Plant Operations*, Lewis, New York, USA, 2003, p.42.
2. J.F. Richardson, W.N.Zaki, Sedimentation and fluidization: part I, *Trans. Inst. Chem. Eng.* 32 (1954) 35-53.
3. O.Akgiray, E. Soyer, E. Yuksel, Prediction of filter expansion during backwashing, *Water science & technology : Water supply* 4(5-6) (2004) 131-138
4. S. Ergun, Fluid flow through packed columns, *Chem. Eng. Prog.* 48 (1952), 89-94
5. A. Haider, O. Levenspiel, Drag coefficient and terminal velocity of spherical and nonspherical particles, *Powder Technol.* 58 1989 63-70
6. R. Turton, O. Levenspiel, A short note on the drag correlation for spheres, *Powder Technol.* 47 (1986) 83-86.
7. D. Geldart, Estimation of basic particle properties for use in fluid-particle process calculations, *Powder Technology* 60 (1990) 1-13
8. N.Epstein, B.P.Leclair, B.B. Pruden, Liquid fluidization of binary particle mixtures-I, *Chem.Eng. Sci.* 36 (1981) 1803-1809
9. N. Epstein, Liquid solids fluidization, in: W.C. Yang, *Handbook of fluidization and fluid-particle systems*, Marcel Dekker, New Yourk, 2003, pp. 705-764

Correlation of Liquid-liquid Equilibria by NRTL Model

Nikola D. Grozdanić, Gorica R. Ivaniš, Zoran P. Višak*, Slobodan P. Šerbanović, Mirjana Lj. Kijevčanin

Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Karnegijeva 4, 11120, Belgrade, Serbia

**Centro Química Estrutural, Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, Avenida Rovisco Pais, 1049-001, Lisbon, Portugal*

Abstract In this paper NRTL model with different temperature dependence parameters for correlation of Liquid-Liquid equilibria data is presented. The model was tested on four different binary systems of methanol with n-alkanes: methanol+nonane, methanol+decane, methanol+undecane and methanol+dodecane. Experimental data were taken from literature, where Liquid-Liquid equilibria were determined at four temperatures. In all cases satisfactory results were achieved, with absolute average deviation PD(x) less or equal 3%.

Introduction

Various industrial processes are based on liquid-liquid equilibria (LLE), established in highly non-ideal mixtures with strong positive deviations from Raoult's law. Therefore, in order to have accurate process and equipment modeling, development and design, it is very important to have reliable thermodynamic model for good system description.

Miscibility is the property of liquids to mix in all proportions forming homogeneous solutions. Many liquids are only partially miscible, or in some cases the mutual solubility is so small that the liquids could be considered immiscible. The liquid mixtures selected for investigation in this paper show partial miscibility, and that type of behavior is often called phase splitting.

Activity coefficient models that have been successfully used for correlation and prediction of Vapour-Liquid Equilibria (VLE), Liquid-Liquid Equilibria (LLE) and other thermodynamic properties of very complex systems, are for example UNIQUAC^{1,2}, UNIFAC³, NRTL^{4,5}, ect.

In this paper the applicability of the NRTL model on the selected mixtures of methanol with n-alkanes was examined. NRTL (Non-Random Two-Liquid model) is an activity coefficient model that correlates the activity coefficients γ_i of a component i with its mole fractions x_i in the liquid phase. It is applicable to soluble and partially soluble liquids, multicomponent Vapour-Liquid, Liquid-Liquid, and Liquid-Liquid-Vapour Equilibria.

Modeling of Liquid-Liquid Equilibria

The NRTL⁴ is the model for activity coefficient determination and it could be applied on miscible, partially miscible and immiscible binary and multicomponent mixtures. The main equations of NRTL model, for binary systems are

$$\frac{G^E}{RT} = x_1 x_2 \left(\frac{\tau_{12} G_{12}}{x_2 + G_{12} x_1} + \frac{\tau_{21} G_{21}}{x_1 + G_{21} x_2} \right) \quad (1)$$

$$\ln \gamma_1 = x_2^2 \left[\frac{\tau_{12} G_{12}}{(x_2 + G_{12} x_1)^2} + \tau_{21} \left(\frac{G_{21}}{x_1 + G_{21} x_2} \right)^2 \right] \quad (2)$$

$$\ln \gamma_2 = x_1^2 \left[\frac{\tau_{21} G_{21}}{(x_1 + G_{21} x_2)^2} + \tau_{12} \left(\frac{G_{12}}{x_2 + G_{12} x_1} \right)^2 \right] \quad (3)$$

where binary interaction parameters are

$$G_{12} = \exp(-\alpha_{12} \tau_{12}); \quad \tau_{12} = \frac{\Delta g_{12}}{RT} \quad (4)$$

$$G_{21} = \exp(-\alpha_{21} \tau_{21}); \quad \tau_{21} = \frac{\Delta g_{21}}{RT} \quad (5)$$

$$G_{12} \neq G_{21}, \alpha_{12} = \alpha_{21}$$

where x is a mole fraction, γ an activity coefficient, α is NRTL excess free energy non-randomness parameter, T is a temperature, and R an universal gas constant. Parameters Δg_{12} and Δg_{21} are NRTL excess free energy model binary interaction temperature dependent parameters.

Since, as it was shown previously, on VLE data calculation⁶, temperature has high influence on excess properties or equilibria calculation, several different forms of temperature dependence for parameters Δg_{12} and Δg_{21} are introduced

Form I

$$\begin{aligned}\Delta g_{12} &= A_{12} + B_{12}T \\ \Delta g_{21} &= A_{21} + B_{21}T\end{aligned}\quad (6)$$

Form II

$$\begin{aligned}\Delta g_{12} &= A_{12} + B_{12}T + C_{12}T^2 \\ \Delta g_{21} &= A_{21} + B_{21}T + C_{21}T^2\end{aligned}\quad (7)$$

Form III

$$\begin{aligned}\Delta g_{12} &= A_{12} + B_{12}T + C_{12}T^{-2} \\ \Delta g_{21} &= A_{21} + B_{21}T + C_{21}T^{-2}\end{aligned}\quad (8)$$

In this work the nonrandom parameters α_{12} and α_{21} were treated as temperature independent and were fixed at constant values, 0.3 (recommended in literature for this type of systems and confirmed in our preliminary investigations).

The general expression for the liquid-liquid equilibria calculation is ⁷

$$\gamma_i^I x_i^I = \gamma_i^{II} x_i^{II} \quad , \quad i=1,2,\dots,m$$

where γ^I is an activity coefficient of component i in phase I, γ^{II} is an activity coefficient of component i in phase II, x^I is a mole fraction of component i in phase I, x^{II} is a mole fraction of component i in phase II, and m is a number of components in a mixture. NRTL parameters are adjusted by minimizing the following objective function

$$F = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (\gamma_{j,i}^I x_{j,i}^I - \gamma_{j,i}^{II} x_{j,i}^{II})^2 \rightarrow \min \quad (9)$$

where n is a number of experimental data.

Results and discussion

The systems formed by methanol and n-alkane (nonane, decane, undecane and dodecane) were selected for LLE calculation. The LLE data of methanol + n-alkane mixtures at equilibrium are taken from literature.⁸

A deviation of calculated from the experimental values is expressed as absolute average deviation $PD(x)$ for each data set point

$$PD(x),\% = \left(\frac{100}{2n}\right) \sum_{i=1}^n \left\{ \left| \frac{(x_{1,i,exp}^I - x_{1,i,cal}^I)}{x_{1,i,exp}^I} \right| + \left| \frac{(x_{1,i,exp}^{II} - x_{1,i,cal}^{II})}{x_{1,i,exp}^{II}} \right| \right\} \quad (10)$$

Results of Liquid-Liquid Equilibrium correlation for methanol + n-alkanes (C9 to C12) systems by the NRTL model are given in Table 1. According to the obtained results (Table 1 and Figure 1) very good representation of LLE could be obtained using NRTL model. Since the quality of the results is very similar it is recommended application of the simplest linear form, with two coefficients in temperature dependent parameters of NRTL model.

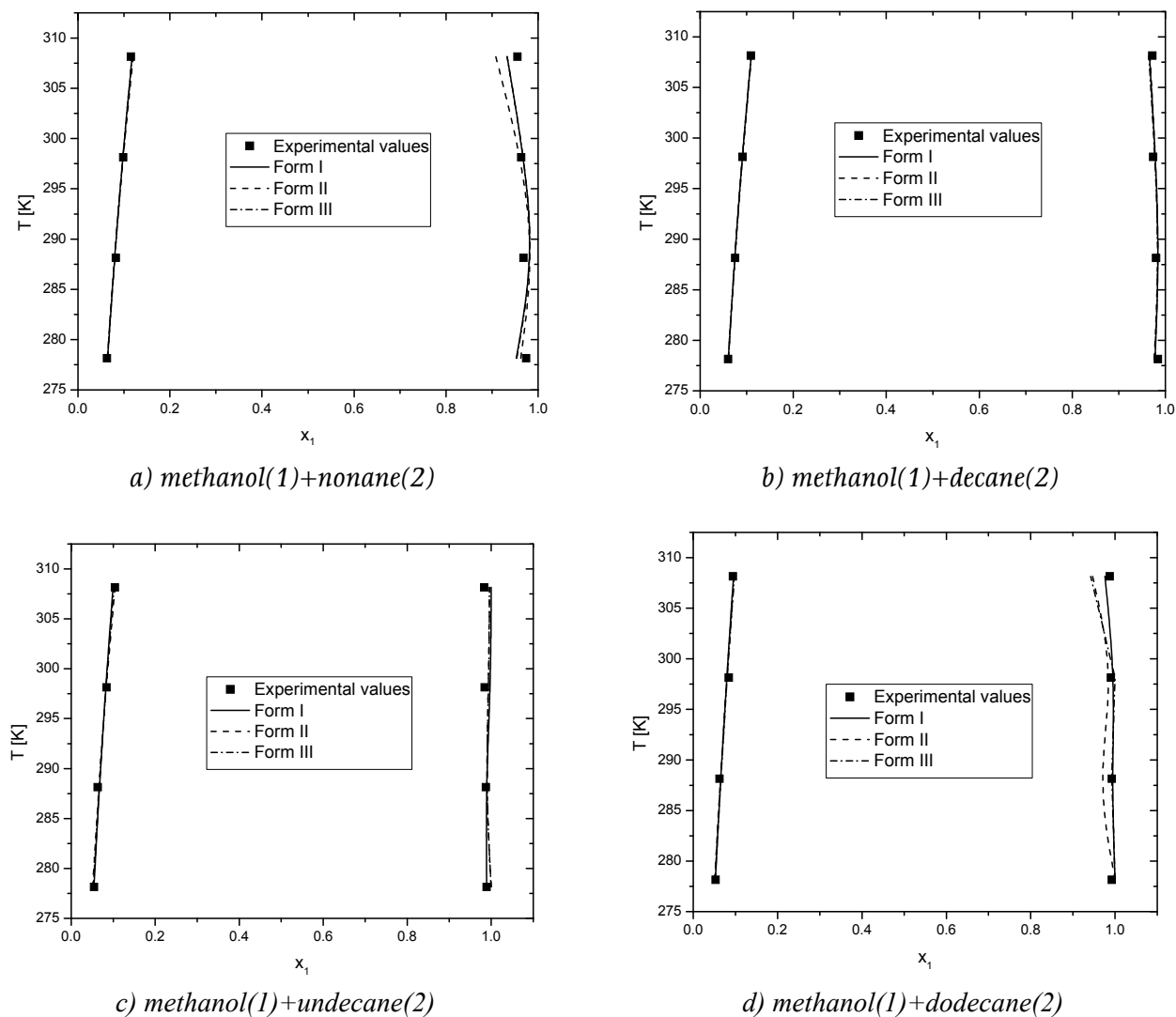


Figure 1. Phase diagrams – Experimental⁷ and calculated values of LLE of selected binary systems: a) methanol (1) + nonane (2), b) methanol + decane(2), c) methanol (1) + undecane, d) methanol (1) + dodecane (2)

Table 1. Results of LLE correlations of selected binary systems

System	Equation	A_{12}	B_{12}	C_{12}	A_{21}	B_{21}	C_{21}	PD(x) [%]
methanol(1)+nonane(2)	Form I	9069.34	-5.58	-	11124.08	-23.11	-	0.79
	Form II	9173.88	-6.50	0.0019	11077.01	-22.94	-0.000056	0.79
	Form III	9032.47	-5.46	0.0046	11163.76	-23.74	-0.00029	0.79
methanol(1)+decane(2)	Form I	7404.33	-2.87	-	10655.97	-21.71	-	2.06
	Form II	7090.39	-1.40	-0.0014	9950.14	-15.17	-0.014	2.20
	Form III	7386.24	-2.79	-0.31	10675.13	-21.78	0.84	2.05
methanol(1)+undecane(2)	Form I	6510.94	6.19	-	12148.45	-25.99	-	1.94
	Form II	65593.43	5.44	0.0021	11297.94	-13.81	-0.032	1.57
	Form III	6486.10	6.27	1.70	12985.73	-28.86	5.28	1.86
methanol(1)+dodecane(2)	Form I	9078.06	0.092	-	12316.48	-26.25	-	1.98
	Form II	6931.27	8.76	-0.0046	11564.43	-17.81	-0.020	3.10
	Form III	7588.77	5.22	-0.76	12889.97	-28.25	1.93	2.68

The authors gratefully acknowledge the financial support received from the Research Fund of Ministry of Education and Science (project No 172063), Serbia and the Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade.

Korelisanje podataka za ravnotežu tečnost-tečnost pomoću NRTL modela

Mnogi industrijski procesi se zasnivaju na ravnoteži faza tečnost-tečnost kod neidealnih smeša sa jakim pozitivnim odstupanjem od Raulovog zakona. Zato je, u cilju pravilnog odvijanja i modelovanja procesa, projektovanja opreme, kao i razvoja procesa, veoma važno imati pouzdan termodinamički model koji dobro opisuje proces.

Potpuna mešljivost je osobina tečnosti da se mešaju u svim odnosima stvarajući homogen rastvor. Mnoge tečnosti su samo delimično mešljive ili je u nekim slučajevima međusobna rastvorljivost toliko mala da se mogu smatrati nemešljivim. Kod tečnih smeša, odabranih za istraživanje u ovom radu, primećuje se delimična mešljivost i ovakvo ponašanje se često naziva razdvajanje faza.

Modeli koeficijenta aktivnosti koji su uspešno korišćeni za korelisanje i predviđanje ravnoteže para-tečnost (VLE) i tečnost-tečnost (LLE), kao i drugih termodinamičkih osobina složenih sistema su UNIQUAC, UNIFAC, NRTL, itd.

U ovom radu primenjen je NRTL model za korelisanje podataka ravnoteže tečnost-tečnost sa različitim temperaturno zavisnim parametrima na četiri različita binarna sistema metanola sa n-alkanima: metanol+nonan, metanol+dekan, metanol+undekad i metanol+dodekan. U svim slučajevima su postignuti zadovoljavajući rezultati, sa apsolutnim prosečnim odstupanjem manjim ili jednakim 3%.

Literature:

1. X. Li, K. Tamura, *J. Chem. Thermodyn*, **42** (2010) 1478
2. C. Chokradjaroen, X. Li, K. Tamura, *J. Chem. Thermodyn*, **46** (2012) 72
3. A. Fredenslund, R. L. Jones, J. M. Prausnitz, *AIChE J.*, **21** (1975) 1086
4. H. Renon, J. M. Prausnitz, *AIChE J.*, **14** (1968) 135
5. H. Matsuda, M. Fujita, K. Ochi, *J. Chem. Eng. Data*, **48** (2003) 1076
6. B.D. Djordjevic, M.Lj. Kijevcanin, S.P.Serbanovic, *Fluid Phase Equilib.*, **155** (1999) 205
7. B. E. Poling, J. M. Prausnitz, J. P. O'Connell, *The Properties of Gases and Liquids*, McGraw Hill, New York, 2001, p. 421
8. L. M. Casas, A. Tourino, B. Orge, G. Marino, M. Iglesias, J. Tojo, *J. Chem. Eng. Data*, **47** (2002) 887

Forced Path Mechanical Calibration method establishment for high pressure density measurements

Lazar Drašković, Aleksandar Tasić, Jelena Vuksanović, Ivona Radović, Mirjana Kijevčanin

*Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Karnegijeva 4, 11000 Belgrade, Serbia

Abstract This work presents a new calibration procedure of the vibrating tube densimeter Anton Paar DMA, for accurate density calculations in wide ranges of temperatures and at pressures up to 70 MPa. This issue has become an important topic, so in this work an analysis of the selected calibration procedures of high pressure vibrating tube densimeters is presented. Matlab code for estimating density of fluids based on experimental measurements of vibration periods of a cell is developed. The applied methodology incorporates a new FPMC (Forced Path Mechanical Calibration) method as calibration procedure, while Monte Carlo methodology is used for uncertainty estimation. Finally, densities of toluene, calculated by the proposed method are given and compared with literature values.

Introduction

Density, ρ is one of fundamental physical properties of liquids and liquid mixtures. Knowledge of densities at different temperatures, T and pressures, p is important in various industrial processes. Also, other relevant physical properties can be obtained from density measurements, e.g. the isobaric thermal expansivity, α_p and the isothermal compressibility, k_T ¹. By combining $p\rho T$ data with puT or pC_pT measurements (u is speed of sound and C_p is isobaric heat capacity), the isentropic compressibility and the isochoric molar heat capacity can also be calculated and therefore a wide thermodynamic characterization is reached^{2,3}.

There are a large number of experimental techniques for density measurements^{4,5}. However, the vibrating tube densimetry⁶, based on the measurement of the resonance frequency, f of U-vibrating tube filled with fluid allows fast and precise density measurements as a function of T and p ⁷. From the difference between the resonance frequency of filled and undamped vibrating tube unknown density of fluid is obtained. Dependence between ρ and natural vibration period τ is as follows:

$$\rho = \frac{K}{4\pi^2 V} \tau^2 - \frac{m_o}{V} = A\tau^2 + B \quad (1)$$

where m_o is the mass of empty U-tube, V is the tube inner volume, K is the tube stiffness constant and A and B are the calibration constants. If A and B are known, measuring the vibrating period τ the density ρ of the sample can be obtained.

Parameters A and B have to be determined in wide range of pressures and temperatures. Therefore, a calibration of the instrument (A and B determination) is necessary in order to enhance accuracy of density measurements. The most popular procedure, the so-called "classical method"⁸, uses two calibration fluids of well-known density, while the sample density must be limited by the density values of the two standards. Calibration fluids need certified density data at various temperatures and pressures, and only few of them fulfil this requirement. In most cases, water is chosen as one of the calibration fluids since its density is known with high precision⁹. As the second fluid it can be used nitrogen¹⁰, octane⁷, dichlorodifluoromethane¹¹, or tetrachloromethane¹². However, uncertainty for density data of these fluids is greater than those of water.

In order to reduce the uncertainty introduced by the limited density precision of the calibration fluids, alternative methods have been developed using one calibration fluid and vacuum as standards^{13,14}. However, a new source of uncertainty arises in these methods from the necessity to make a specific approximation about the behaviour of the calibration constants as a function of pressure.

The so-called "continuous method" essentially differs from the "classical method" in one, assigned physical meaning to the parameters m_o , V and K which opens the possibility for the design of simpler calibration procedures^{15,16,17,18}.

Method which suggested Lampreia and Castro¹⁹ refers to Laggourette's work²⁰ which represents alternative calibration procedure using one calibration standard and vacuum. However, use of vacuum increases uncertainty of density measurements.

FPMC (Forced Path Mechanical Calibration) is an enhanced procedure involving the modelization of the behaviour of the A and B as a function of pressure, taking into account stress and thermal behaviour of the vibrating tube clamped at one end. It is suggested to use water as a standard, or for sample density measurements higher than water density dichlorofluoromethane is suggested^{13,14} as a standard fluid. Avoiding of vacuum significantly reduces uncertainty and increases accuracy of a measurement. Model is based on FPMC procedure and can be applied in wide measurement ranges: $\rho = (700 - 1600)$ kgm^{-3} , $T = (-10 - 200)$ $^{\circ}\text{C}$ and $p = (0 - 20)$ MPa ⁸. In the proposed model¹³ three parameters need to be determined, m_o , L_o and γ_T .

Model description

Calibration method. As it was previously stated, the relation between ρ and τ can be expressed by the equation (1), while the stiffness constant K and the inner volume V are expressed with the following equations²¹:

$$K = \frac{3E}{L^3}I \text{ and } I = \frac{\pi}{4}(r_e^4 - r_i^4) \quad (2)$$

$$V = \pi r_i^2 L \quad (3)$$

where E is the Young modulus of elasticity of the tube, L is the total tube length, I is the quadratic moment of inertia of the transversal surface of the tube, and r_e and r_i are the external and internal tube radius, respectively. Now density equation is:

$$\rho = \frac{3E(r_e^4 - r_i^4)}{16\pi^2 r_i^2 L^4} \tau^2 - \frac{m_o}{\pi r_i^2 L} = A\tau^2 + B \quad (4)$$

The dependence of L , r_e and r_i as a function of pressure and temperature follows the characterization proposed in the FPMC model. The tube length dependence of temperature and pressure $L(T,p)$ is expressed using the isobaric thermal expansivity α_p of the tube and the linear coefficient of one-dimensional expansion γ_T of the tube:

$$L(T, p) = L(T_o, p_o) \exp\left(\int_{T_o}^T \alpha_p dT + \int_{p_o}^p \gamma_T dp\right) \quad (5)$$

where $T_o = 273.15$ K and $p_o = 0.1$ MPa.

Dependencies of the external and internal radius (r_k ; $k=e$ or i) as a function of T and p are expressed as follows:

$$r_k(T, p_o) = r_k(T_o, p_o) \exp\left(\int_{T_o}^T \alpha_p dT\right) \quad (6)$$

$$Mr_k^2(T, p) + Nr_k(T, p) + O = 0 \quad (7)$$

where M , N and O are expressed as follows:

$$M = 1 - \left(\frac{1-\nu}{E(T)}\right) \left(\frac{pr_i^2(T, p_o) - p_e r_e^2(T, p_o)}{r_e^2(T, p_o) - r_i^2(T, p_o)}\right) \quad (8)$$

$$N = -r_k(T, p_o) \quad (9)$$

$$O = -\left(\frac{1+\nu}{E(T)}\right) \left(\frac{(p-p_e)r_e^2(T, p_o)r_i^2(T, p_o)}{r_e^2(T, p_o) - r_i^2(T, p_o)}\right) \quad (10)$$

where ν is the Poisson coefficient of the tube and p_e is the external pressure of the tube.

Sanmamed et al.⁸ consider that E is only temperature dependent:

$$E(T) = E(T_1) + s\left(\frac{1}{e^{t/T_1} - 1} - \frac{1}{e^{t/T} - 1}\right) \quad (11)$$

where $T_1 = 298.15$ K. De la Rosa Vidal²² suggested the following values for the physical constants of the vibrating tube: $E(T_1) = 2.07 \cdot 10^5$ MPa, parameters S and t are $1.17308 \cdot 10^5$ MPa and 1298.51 K,

respectively. The Poisson coefficient, radius $r_i(T_o, p_o)$ and $r_e(T_o, p_o)$ are 0.307, 0.001073 m and 0.001588 m, respectively. α_p is approximated to be constant, temperature and pressure independent, and amounts to $1.14446 \cdot 10^5 \text{ K}^{-1}$.

Estimation of m_o , L_{oo} and γ_T . To achieve A and B determination it is necessary to estimate the values of m_o , L_{oo} and γ_T . For the parameter determination it is necessary to introduce a third calibration fluid into procedure. Determining m_o and L_{oo} for each temperature, calibration constants A and B can be calculated for atmospheric pressure. At different pressures A and B can be calculated by the estimation of γ_T for each temperature. All these parameters are determined using calibration fluids; m_o and L_{oo} are obtained by determining natural vibrating period τ of the tube filled with heptane and dichloromethane, using known reference densities (for heptane²³ and for dichloromethane²⁴) and equation (1). Parameter γ_T was determined at each T from certified water densities²⁵ in the whole range of working pressures.

Uncertainty estimation. Uncertainty of the calibration and sample density determination is resolved using Monte Carlo method²⁶. The natural vibration period τ_i at the corresponding T_i and p_i can be calculated from the directly measured period $\tau_i(T_i^*, p_i^*)$ using the equation:

$$\tau_i(T_i, p_i) = \tau_i(T_i^*, p_i^*) - (\partial \tau_i / \partial T)_p \Delta T_i - (\partial \tau_i / \partial p)_T \Delta p_i \quad (12)$$

where T_i^* and p_i^* are experimental values of measurement conditions (slightly deviated from T_i and p_i), $\Delta T_i = T_i - T_i^*$ and $\Delta p_i = p_i - p_i^*$.

The final output of the applied methodology is the sample density and the uncertainty of the experimental densities calculation.

Results and discussion

In this work toluene is examined as a substance of unknown density at temperature 318 K and pressures 0.1, 20 and 60 MPa. Thus, the functionality of FPMC model is checked, as well as the validity of calculations based on experimental data. Experimental measurements were performed at DMA 512P cell at Instituto de Tecnologia Quimica e Biologica, Universidade Nova de Lisboa, Portugal.

As calibration fluids heptane, dichloromethane and water were used. The values of certified densities were taken from the literature²³⁻²⁵. Parameters of calibration fluids required for calculations are determined and presented in Table 1.

Table 1. – Values of thermophysical properties required for calibration procedure

Component	p^* MPa	T^* K	$\tau_i(T_i^*, p_i^*)$ ms	ΔT_i K	Δp_i MPa	$(\partial \tau_i / \partial T)_p$ msK ⁻¹	$(\partial \tau_i / \partial p)_T$ msMPa ⁻¹	ρ_{lit}^{-3} kgm ⁻³
heptane	0.10	318.145	4.029716	0.005	0	0.0003731	0.0002247	662.09 ^a
dichloromethane	2.30	318.149	4.155007	0.001	-2.20	0.0002292	0.0002717	1279.97 ^b
water	6.70	318.149	4.097207	0.001	-0.70	0.0005003	0.0001024	992.78 ^c
water	9.81	318.147	4.097526	0.003	0.19	0.0004772	0.0001024	994.50 ^c
water	13.07	318.149	4.097875	0.001	1.93	0.0004662	0.0001024	996.40 ^c
water	18.11	318.160	4.098395	-0.010	1.89	0.0004712	0.0001024	998.73 ^c
water	33.64	318.154	4.100007	-0.004	-3.64	0.0004881	0.0001024	1002.87 ^c
water	39.08	318.152	4.100555	-0.002	0.92	0.0004824	0.0001024	1006.93 ^c
water	51.18	318.148	4.101777	0.002	-1.18	0.0004965	0.0001024	1010.91 ^c
water	59.83	318.149	4.102636	0.001	0.17	0.0004929	0.0001024	1014.82 ^c

^a Watson et al.²³

^b Gonçalves et al.²⁴

^c Wagner et al.²⁵

Then, thermophysical properties (inputs for sample density calculations) are calculated and given in Table 2. Parameters m_o and L_{oo} are determined in FPMC procedure using natural vibration periods of heptane and dichloromethane at atmospheric pressure and literature values^{23,24}. The parameters m_o and L_{oo} amount to 0.002404 kg and 0.073114 m, respectively. Additionally, γ_T parameter was obtained by fitting the water density²⁵ to equation (1) against the natural vibration period τ of the vibrating tube filled with water, determined in the whole range of working pressures. Calculated densities of toluene at different pressures are compared to literature values²⁷ and also presented in Table 2.

Table 2. – Results for toluene measurements after calibration procedure

Component	p^*/MPa	$(\partial\tau_i/\partial T)_p$ /msK ⁻¹	$(\partial\tau_i/\partial p)_T$ /msMPa ⁻¹	$\gamma_T \cdot 10^{-6}$ /Mpa ⁻¹	ρ_{cal} / kgm ⁻³	ρ_{lit}^a / kgm ⁻³	Percentage deviation, %
toluene	0.1	0.0003480	0.0001620	8.457144	841.71	843.53	0.216
toluene	20	0.0003974	0.0001620	8.456147	860.05	860.33	0.032
toluene	60	0.0004511	0.0001620	8.456620	886.04	885.27	0.087

^a Watson et al.²⁷

Values of parameters m_o , L_{oo} and γ_t are in good coherence with values of parameters given by Sanmamed et al.⁸. It was found that the expanded uncertainty is not pressure dependant and at all investigated pressures amounts to 0.05 kgm⁻³. Very good agreement between calculated and literature density values for toluene and low uncertainty confirm the validity of the applied methodology based on FPMC calibration procedure and Monte Carlo method.

The authors gratefully acknowledge the financial support received from the Research Fund of Ministry of Education and Science (project No 172063), Serbia and the Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade.

Uspostavljanje „Forced Path Mechanical Calibration” metodologije za merenja gustine na visokim pritiscima

U ovom radu razmatrana je nova procedura kalibrisanja gustomera sa vibracionom cevi Anton Paar DMA, namenjenog preciznom merenju gustina fluida u širokom intervalu temperatura i pri pritiscima i do 70 MPa. Budući da je ova problematika postala veoma značajna, izvršena je analiza različitih postupaka kalibracije gustomera sa vibracionom cevi. Razvijen je i MATLAB kod koji vrši proračun gustine nepoznatog uzorka na osnovu eksperimentalnih merenja perioda vibracije cevi. Nova FPMC (Forced Path Mechanical Calibration) metoda je primenjena u postupku kalibracije, dok je procena nesigurnosti izvršena pomoću Monte Carlo metodologije. Konačno, prikazane su gustine toluena izračunate pomoću predloženog modela i upoređene su sa literaturnim vrednostima.

Literature

1. J.S. Rowlinson, F.L. Swinton, *Liquid and Liquid Mixtures*, third ed., Butterworth & Co., London, 1982.
2. R. Gomes de Azevedo, J. Szydlowski, P.F. Pires, J.M.S.S. Esperanca, H.J.R. Guedes, L.P.N. Rebelo, *J. Chem. Thermodynamics*, **36** (2004) 211–222
3. D. Bessieres, H. Saint-Guirons, J.-L. Daridon, *J. Therm. Anal. Calorim.*, **62** (2000) 621–632
4. R. Battino, *Chem. Rev.*, **71** (1971) 5–45 (Washington, DC, United States).
5. W. Wagner, R. Kleinrahm, *Metrologia*, **41** (2004) S24–S39
6. O. Kratky, H. Leopold, H. Stabinger, *Angew. Phys.*, **27** (1969) 273–277
7. J. Troncoso, D. Bessieres, C.A. Cerdeirina, E. Carballo, L. Romani, *Fluid Phase Equilib.*, **208** (2003) 141–154
8. Y. A. Sanmamed, A. Dopazo-Paz, D. Gonzales-Salgado, J. Troncoso, L. Romani, *J. Chem. Thermodynamics*, **41** (2009) 1060–1068
9. W. Wagner, A. Prub, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **31** (2002) 387–535
10. L.A. Galicia-Luna, D. Richon, H. Renon, *J. Chem. Eng. Data*, **39** (1994) 424–431
11. C. Bouchot, D. Richon, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **37** (1998) 3295–3304
12. M.M. Piñeiro, D. Bessieres, J.L. Legido, H. Saint-Guirons, *Int. J. Thermophys.*, **24** (2003) 1265–1275
13. C. Bouchot, D. Richon, *Fluid Phase Equilib.*, **191** (2011) 189–208
14. A. T. Sousa, P. Fialho, C. A. Nieto de Castro, R. Tufeu, B. Le Niendre, *Fluid Phase Equilib.*, **80** (1992) 213–225
15. G. Morrison, D. K. Ward, *Fluid Phase Equilib.*, **62** (1991) 65–86
16. V. G. Niesen, *J. Chem. Thermodynamics*, **21** (1989) 915–923
17. E. Hassel, J. Safarov, *Measurement of pressure, density and temperature of liquids by vibration tube densimeter*, authorized lecture, Institute of Technical Thermodynamics, University of Rostock, Germany, downloaded at november 2011. from http://web.me.com/egon.hassel/research/densimeter/files/vibration_tube102.pdf
18. C. D. Holcomb, S. L. Outcalt, *Fluid Phase Equilib.*, **150-151** (1998) 815–827
19. I. M. S. Lampreia, C. A. Nieto de Castro, *J. Chem. Thermodynamics*, **43** (2011) 537–545
20. B. Lagourette, C. Boned, H. Saint-Guirons, P. Xans, H. Zhou, *Meas. Sci. Technol.*, **3** (1992) 699–703

21. E.A. Avallone, T. Baumeister III, *Mark's Standard Handbook for Mechanical Engineers*, 10th ed., McGraw-Hill, New York, 1997.
22. E. de la Rosa Vidal, MSc Thesis. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México, 2002.
23. G. Watson, C. K. Zèberg-Mikkelsen, A. Baylaucq, C. Boned, *J. Chem. Eng. Data*, **51** (2006) 112-118
24. F. A. M. M. Gonçalves, C. S. M. F. Costa, J. C. S. Bernardo, I. Johanson, I. M. A. Fonseca, A. G. M. Ferreira, *J. Chem. Thermodynamics*, **43** (2011) 105-116
25. W. Wagner, A. Pruiß, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **31** (2002) 387-535
26. M. Solaguren-Beascoa Fernández, J. M. Alegre Calderón, P. M. Bravo Díez, *Accred. Qual. Assur.*, **14** (2009) 95-106
27. G. Watson, T. Lafitte, C. K. Z'eberg-Mikkelsen, A. Baylaucq, D. Bessieres, C. Boned, *Fluid Phase Equilib.*, **247** (2006) 121-134

Analogija prenosa količine kretanja, toplote i mase u vertikalnom toku pseudofluida

Radmila V. Garić-Grulović, Željko B. Grbavčić*, Nevenka M. Bošković-Vragolović*,
Darko R. Jaćimovski, Zorana Lj. Arsenijević, Mihal M. Đuriš

Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerzitet u Beogradu, Njegoševa 12, Beograd, Srbija

*Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Karnegijeva 4, Beograd, Srbija

Izvod Ispitivan je prenos količine kretanja, toplote i mase, u sistemima sa vertikalnim dvofaznim tokom fluid-čestice. Poznavanje osnovnih fluidnodinamičkih parametara prenosa količine kretanja, kao i koeficijenata prelaza toplote i mase omogućava da se uspostavi analogija između navedenih fenomena prenosa. Eksperimentalna ispitivanja prenosa količine kretanja, toplote i mase, u sistemima sa vertikalnim tokom fluida u prisustvu inertnih staklenih sferičnih čestica prečnika 1.20, 1.94 i 2.98 mm, vršena su u transportnoj staklenoj cevi prečnika 24 i bakarnoj cevi 25.4 mm sa omotačem za zagrevanje parom, kao i segmentom cevi prepariranim rastopom benzojeve kiseline. Vertikalni dvofazni tok tretiran je kao pseudofluid i uveden je modifikovani koeficijent trenja smeše fluid-čestice sa zidom cevi (f_w) i modifikovani Reynolds-ov broj za smešu fluid-čestice (Re_m). Dobljene su zavisnosti promene bezdimenzionih faktora prenosa toplote (j_H), mase (j_D) i modifikovanog koeficijenta trenja (f_w) od Reynolds-ovog broja za smešu fluid-čestice (Re_m). Rezultati ispitivanja prenosa količine kretanja, toplote i mase u vertikalnom toku pseudofluida, ukazuju na postojanje analogije između navedenih fenomena prenosa.

Uvod

Za projektovanje sistema u kojima je zastupljen vertikalni dvofazni tok fluid-čestice¹⁻³, neophodno je poznavati zavisnosti koje povezuju koeficijente trenja sa koeficijentima prelaza toplote i mase. Kako je koeficijente prelaza toplote i mase mnogo teže odrediti nego koeficijente trenja fluid-zid, koji je moguće jednostavno odrediti merenjem gradijenta pritiska u sistemu, razumljivo je zašto se davno javila ideja da se uspostavi analogija fenomena prenosa i u heterogenim fluid-čestice sistemima.

Raspoloživa literatura o prenosu količine kretanja, toplote i mase u vertikalnim sistemima tečnost-čestice bavi se uglavnom pojedinačnim prenosima ova tri fenomena prenosa. U literaturi postoje pokušaji da se odrede analogije za prenos količine kretanja i toplote u vertikalnom toku fluida i čestica, mada su brojnija istraživanja koja su zasnovana na korišćenju postojećih analogija za jednofazno strujanje/opstrujavanje sfere, u cilju određivanja koeficijenata prelaza toplote i mase, gde se usvaja da se na razblažene suspenzije mogu primeniti zakonitosti koje vače za usamljenu česticu.

Za jednofazni tok fluida u literaturi postoje brojna istraživanja prenosa količine kretanja, toplote i mase, a najvažniji rezultat je poznata Chilton-Colburnova analogija⁴:

$$j_H = j_D = \frac{f_f}{2} \quad (1)$$

gde su: j_H - faktor prenosa toplote, j_D - faktor prenosa mase i f_f - koeficijent trenja zid-fluid.

Eksperimentalna ispitivanja

Za ispitivanje prenosa količine kretanja, u vertikalnom dvofaznom toku fluida, korišćena su dva eksperimentalna sistema, jedan sa staklenom transportnom cevi prečnika 24 mm i drugi sa bakarnom cevi prečnika 25.4 mm (slika 1). Staklena transportna cev (c, sistem A), bila je snabdevena sa dva specijalna zatvarača za merenje koncentracije čestica (detalj "A"). Na vrhu cevi nalazi se preliv za vodu i čestice (e), a mreža u prelivu (b), razdvaja čestice i vodu. Voda nadalje protiče kroz preliv za vodu (f), dok čestice krećući se na dole kroz modifikovani fontanski sloj ulaze u transportnu cev. Kutija u prelivu koristi se za merenje ukupnog protoka vode i čestica. Transportna cev snabdevena je i sa piezometrima za merenje pritiska i termoparovima za merenje temperature smeše fluida i čestica. Voda se uvo-di u kolonu kroz mlaznicu prečnika 20 mm.

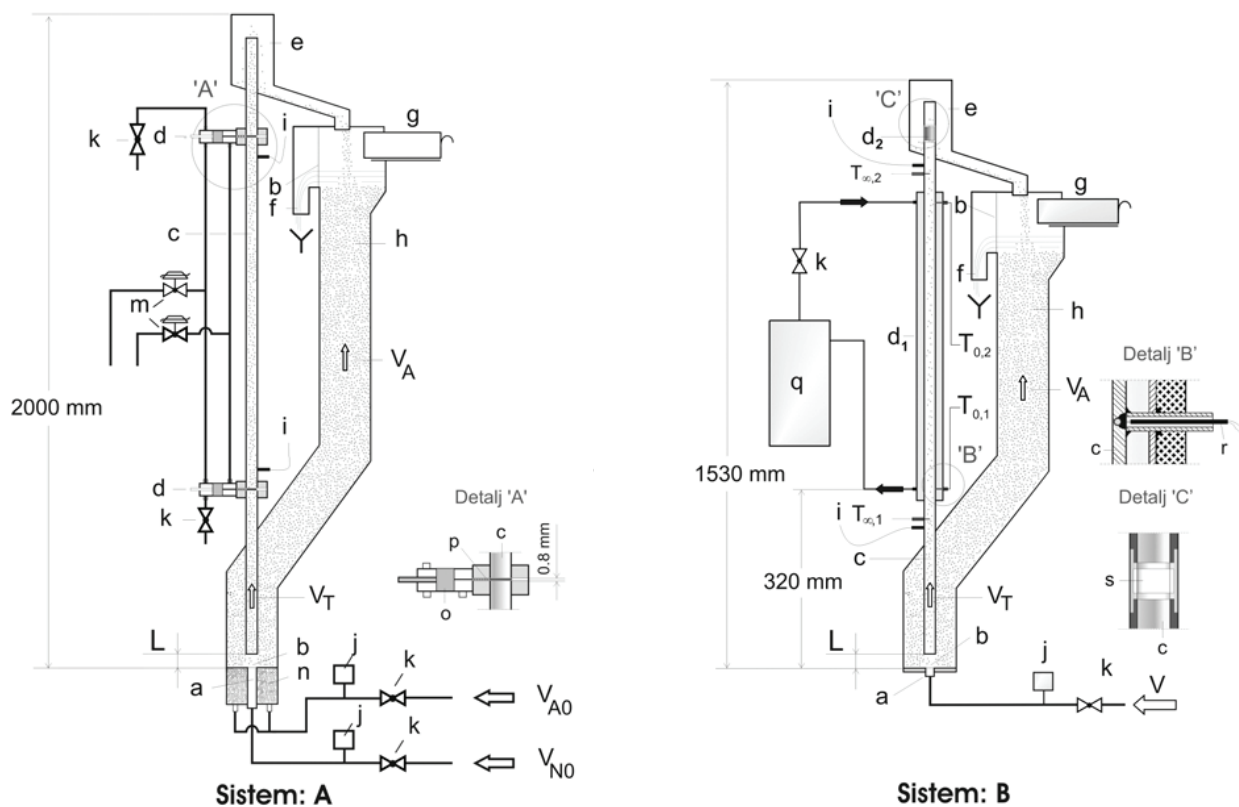
Tabela 1. Karakteristike čestica i operativni uslovi

d_p (mm)	1.20	1.94	2.98
ρ_p (kg/m ³)	2641	2507	2509
U_t (m/s) /8/	0.188	0.2878	0.3698
U/U_t	0.43-4.90	0.31-4.72	0.27-3.89
ε	0.780-0.923	0.729-0.897	0.712-0.865

Karakteristike, staklenih sferičnih čestica, korišćenih u navedenim ispitivanjima date su u tabeli 1. Kao transportni medijum korišćena je voda.

Eksperimentalni sistem sa bakarnom transportnom cevi (sistem B, slika 1), prilagođen je za ispitivanja prenosa toplote, tako što je opremljen sa omotačem za zagrevanje transportne cevi parom. Sistem je opremljen i sa termoparovima za merenje temperature šmeše fluida i čestica i zida transportne cevi (detalj "B").

Aparatura vertikalnog dvofaznog toka sa bakarnom cevi (sistem B, slika 1), prilagođena je i za ispitivanja prenosa mase, tako što je na transportnu cev postavljan segment prepariran sa benzojevom kiselinom.



Slika 1. Eksperimentalni sistemi za ispitivanje prenosa količine kretanja (sistem A), toplote i mase (sistem B):

- a – mlaznica,
- b – mreža,
- c – transportna cev,
- d – pneumatski zatvarači,
- d₁ – omotač za paru
- d₂ – prsten ispunjen benzojevom kiselinom
- e – preliv čestica i vode,
- f – preliv vode,
- g – kutija za merenje protoka čestica,
- h – dozer čvrstih čestica,
- i – piezometri
- j – merači protoka
- k – ventili,
- L – rastojanje transportne cevi od mlaznice,
- m – elektromagnetni ventili,
- n – raspodeljivač anularnog toka
- o – klip,
- p – perforirana ploča za prekidanje toka čestica
- q – generator pare, 30kW,
- r – termopar
- s – rastop benzojeve kiseline,
- T – merna mestatempérature
- V_{No} – protok vode kroz mlaznicu,
- V_{A0} – protok vode kroz anularni raspodeljivač,
- V_T – protok vode kroz transportnu cev,
- V_A – protok vode kroz dozer čvrstih čestica.

Rezultati i diskusija

Koeficijent trenja smeše fluid-čestice - zid

Bilans količine kretanja dvofaznog toka izvan zone ubrzavanja u transportnoj cevi je:

$$-\frac{dP}{dz} = (\rho_p - \rho_f)g(1 - \varepsilon) + F_w \quad (2)$$

Bilansne jednačine za fluid i čestice⁶, respektivno su:

$$\varepsilon \left[-\frac{dP}{dz} \right] = \beta(u - v)^2 + F_f \quad (3)$$

$$(1 - \varepsilon) \left[-\frac{dP}{dz} \right] = \beta(u - v)^2 + (\rho_p - \rho_f)g(1 - \varepsilon) + F_p \quad (4)$$

gde je $\beta(u-v)^2$ hidrodinamička sila trenja po jedinici zapremine suspenzije. F_f i F_p su gradijenti pritiska usled trenja fluid-zid i čestice-zid:

$$F_f = 2 f_f \rho_f U^2 / D_t \quad (5)$$

$$F_p = 2 f_p \rho_p (1 - \varepsilon) v^2 / D_t \quad (6)$$

Koeficijent trenja fluid-zid, u jednačini (5), određuje se iz izraza za glatke cevi⁵:

$$f_f = 0.0791 / \text{Re}^{0.25} \quad (7)$$

gde je Reynolds-ov broj baziran na površinskoj brzini fluida ($\text{Re} = D_t \rho_f U / \mu$). Eksperimentalne vrednosti f_f za jednofazni tok fluida pokazuju veoma dobro slaganje sa izračunatim vrednostima po jednačini (7).

Vrednosti za koeficijent trenja čestice-zid f_p , u jednačini (6), dobijene u eksperimentima izvan zone ubrzanja čestica u transportnoj cevi⁶, korelisane sledećim izrazom:

$$f_p = 0.035 \cdot \text{Fr}^{-2} \quad (8)$$

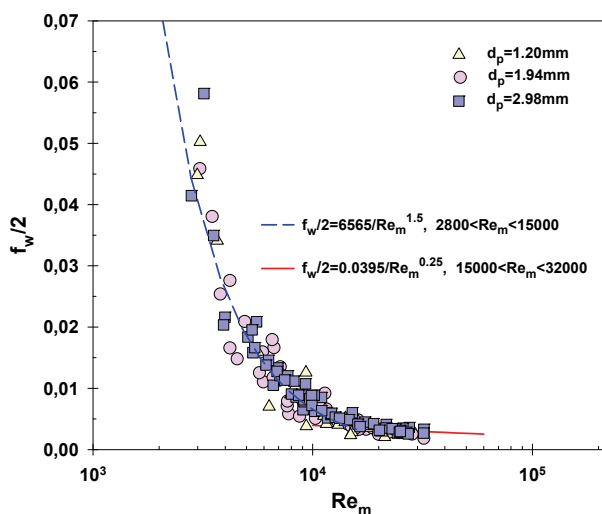
S' obzirom da bilansne jednačine za fluid i čestice (3, 4) imaju aditivni karakter⁷, sledi da je:

$$F_w = F_f + F_p \quad (9)$$

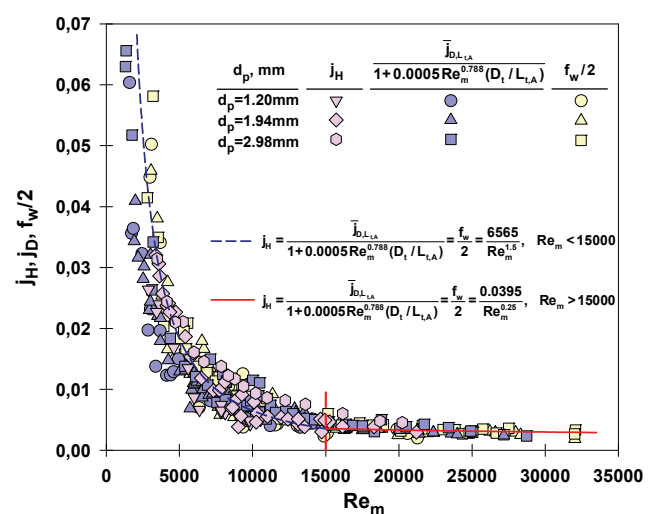
Koristeći eksperimentalne podatke za $-dP/dz$, U i ε , iz prethodnih ispitivanja⁶, eksperimentalne vrednosti za F_w su određivane na osnovu jednačine (2).

$$F_w = -\frac{dP}{dz} - (\rho_p - \rho_f)g(1 - \varepsilon) \quad (10)$$

Koncept pseudofluida primenjen na vertikalni tok fluid-čestice



Slika 2. Korelisanje podataka za koeficijent trenja pseudofluid-zid ($D_t=24$ mm)



Slika 3. Zavisnost faktora prenosa toplote, mase i koeficijenta trenja pseudofluida od Reynoldsovog broja za pseudofluid, za sve ispitivane čestice.

Posmatrajući smešu fluida i čestica kao pseudofluid srednje gustine:

$$F_w = -\frac{dP}{dz} - (\rho_p - \rho_f) g (1 - \varepsilon) \quad (11)$$

i viskozitetom⁸,

$$\mu_m = \mu \cdot \exp\left(\frac{5(1-\varepsilon)}{3\varepsilon}\right) \quad (12)$$

analogno jednačini (5), modifikovani koefici-jent trenja smeša-zid je:

$$f_w = \frac{F_w D_t}{2\rho_m U_m^2} \quad (13)$$

gde je f_w - koeficijent trenja pseudofluid-zid transportne cevi (slika 2). U jednačini (13), U_m je srednja površinska brzina pseudofluida⁸:

$$U_m = U + c_s = \frac{G_f}{\rho_f A_t} + \frac{G_p}{\rho_p A_t} \quad (14)$$

Modifikovani Reynolds-ov broj za smešu fluid-čestice tj. pseudofluid je:

$$Re_m = \frac{D_t \rho_m U_m}{\mu_m} \quad (15)$$

Ispitivanja u vertikalnom toku fluida i čestica ukazuju, kao i kod naših prethodnih ispitivanja pri jednofaznom strujanju fluida⁹, da je zona prenosa mase bila relativno kratka u odnosu na prečnik cevi ($L_{t,A} \leq 10$), tako da su merenja vršena u zoni neformiranog graničnog sloja i da je neophodno izvršiti korekciju podataka na navedeni uticaj. Koristeći literaturnu korelaciju za strujanje fluida u kratkim cevima⁹, prenos toplote, korigovani faktor prenosa mase i koeficijent trenja pseudofluida o zid cevi u zavisnosti od Reynolds-ovog broja za pseudofluid korelisani su jednačinama (slika 4), za turbulentni,

$$\dot{J}_H = \frac{\bar{J}_{D,L_{t,A}}}{1 + 0.0005 Re_m^{0.788} (D_t / L_{t,A})} = \frac{f_w}{2} = \frac{6565}{Re_m^{1.5}}, \quad \text{za: } 2800 < Re_m < 15000 \quad (16)$$

i paralelni tok pseudofluida,

$$\dot{J}_H = \frac{\bar{J}_{D,L_{t,A}}}{1 + 0.0005 Re_m^{0.788} (D_t / L_{t,A})} = \frac{f_w}{2} = \frac{0.0395}{Re_m^{0.25}}, \quad \text{za: } 15000 < Re_m < 32000 \quad (17)$$

Srednje apsolutno odstupanje izmedju eksperimentalnih podataka za faktor prenosa toplote i koeficijent trenja pseudofluida o zid cevi i jednačine (16) je $\delta_{sr} = 25.2\%$, a jednačine (17) je $\delta_{sr} = 14.9\%$. Srednje apsolutno odstupanje izmedju eksperimentalnih podataka za korigovani faktor prenosa mase i koeficijent trenja pseudofluida o zid cevi i jednačine (16) je $\delta_{sr} = 25.5\%$, a jednačine (17) je $\delta_{sr} = 14.3\%$. U jednačini 17 (za $Re_m > 15000$) koeficijent trenja pseudofluida o zid cevi f_w identičan je Blasiusovoj jednačini za jednofazno strujanje fluida u turbulentnom režimu strujanja (jedn. 7). Takođe, navedene korelacije ukazuju na postojanje analogije prenosa količine kretanja toplote i mase u ovim sistemima.

Zaključci

Vertikalni dvofazni tok sfernih čestica tretiran je kao pseudofluid i uvedene su veličine: modifikovani koeficijent trenja pseudofluid-zid (f_w) i modifikovani Reynolds-ov broj za pseudofluid (Re_m). Pri niskim Re_m brojevima, tj. u oblasti turbulentnog toka pseudofluida, trenje pseudofluid-zid i do 20 puta je veće u odnosu na paralelni tok pseudofluida ($Re_m > 15000$).

Eksperimentalni podaci za paralelni i turbulentni režim strujanja pseudofluida korelisani su jednačinama Chilton-Colburn-ovog tipa (jedn. 16 i 17). Može se zaključiti da je koncept pseudofluida rezultirao jedinstvenom analogijom između prenosa količine kretanja, toplote i mase u vertikalnom dvofaznom toku tečnost-čestice, tj. toku pseudofluida.

Zahvalnica: Ovaj rad je podržalo Ministarstvo nauke Srbije kroz projekat 172022.

The analogy among momentum, heat and mass transfer in vertical flow of a pseudofluid

Wall-to-bed momentum, heat and mass transfer in vertical twophase flow of fluid-particles was studied. The aim of the present investigation was to relate an analogy between those phenomena.

The experiments in vertical two-phase flow were performed by spherical glass particles of 1.20, 1.94 and 2.98 mm in diameter with water in a 24 mm I.D. glass tube, and in a 25.4 mm I.D. cooper tube equipped with a steam jacket, and equipped with a segment of the transport tube prepared from benzoic acid.

The vertical two-phase flow is treating as the pseudofluid, and is introduced modified mixture-wall friction coefficient (f_w) and modified mixture Reynolds number (Re_m). Also, there is represent the dependence of changes for the mass transfer factor and modified mixture-wall friction coefficient (f_w) of modified mixture Reynolds number (Re_m).

The data for wall-to-bed momentum, heat and mass transfer in vertical flow of pseudofluid, show that an analogy among these three phenomena exists.

Literatura

1. Agarawal, P.K., *Chem. Engng Sci.*, **43(9)** (1988) 2501-2510.
2. Zhang, L. & Fryer, P.J., *AIChE*, **40(5)** (1994) 888-898.
3. Fryer, P. J., *New Methods of Food Preservation*, ed. G. Gould. Chapman and Hall, Edinburgh (1994).
4. Chilton H.T., Colburn P.A., *Ind.Eng.Chem.*, **26** (1934) 1183-1187.
5. R.B.Bird, W.E.Stewart and E.N.Lightfoot, *Transport Phenomena*, J.Wiley, New York, 1960.
6. Z.B.Grbavčić, R.V.Garić, D.V.Vuković, Dz.E.Hadžismajlović, H.Littman, M.H.Morgan III and S.Dj. Jovanović, *Pow. Techn.*, **72** (1992), 183-191.
7. Nakamura, K., Capes, C. E., *Can. J. Chem. Engng*, **51**(1973) 39-46.
8. Garić-Grulović, R.V., Grbavčić, Ž.B., Arsenijević, Z.Lj., *J.Serb.Chem.Soc.*, **70(5)** (2005), 775-784.
9. Boškovic-Vragolović, N., Garić-Grulović, R., Grbavčić, Ž., *J.Serb.Chem.Soc.*, **72(11)** (2007), 1103-1113.

Metalurgija / Metallurgy**Tehnološke mogućnosti za smanjenje sadržaja arsena u nestandardnim koncentratima bakra**

Aleksandra Mitovski, Nada Štrbac, Ivan Mihajlović, Velibor Andrić*, Miroslav Sokić**

*Univerzitet u Beogradu - Tehnički fakultet u Boru, Bor***Institut za nuklearne nauke „Vinča“, Beograd****Institut za Tehnologiju Nuklearnih i drugih Mineralnih Sirovina, Beograd***Uvod**

Arsen je jedan od elementa koji je najčešći pratilac bakra u sulfidnim koncentratima (Tabela 1).

Tabela 1. Sadržaj arsena u koncentratima bakra¹

Arsen (%)	Nivo	Učestalost pojavljivanja (%)
<0.010	Vrlo nizak	25
0.01-0.1	Nizak	38
0.1-0.3	Srednji	22
0.3-1.0	Visok	10
1.0-2.0	Vrlo visok	3
>2.0	Neophodan predtretman	2

Tokom pirometalurške prerade koncentrata bakra, arsen predstavlja smetnju kako pri topljenju, tako i pri rafinaciji, tako da je u proizvodnom procesu neophodna implementacija kontrole sadržaja arsena. Za kontrolu sadržaja arsena u metalurgiji bakra potreban je integrisani pristup koji uključuje svaku proizvodnu fazu do finalnog proizvoda.

Progresivno osiromašivanje bogatijih ruda bakra sa niskim sadržajem arsena, koje, sa tehnološke, ali i ekološke strane, nisu „problematične“ za preradu, postaje rastuća briga u okvirima metalurgije bakra².

Oštra zakonska regulativa, visoki penali za sadržaje arsena u koncentratima veće od 0,5%, kao i stroži globalni ekološki zahtevi nameću obaveze kako istraživačima, tako i subjektima koji učestvuju u samom proizvodnom procesu, za iznalaženje mogućih i primenljivih tehnoloških rešenja za uklanjanje arsena iz nestandardnih koncentrata bakra³.

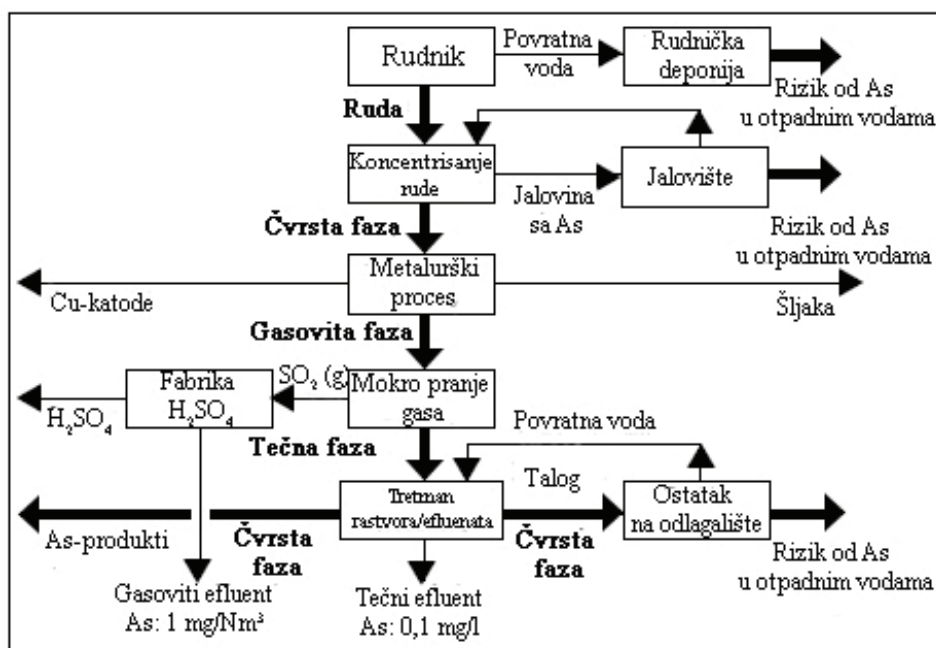
Tokom procesa topljenja, arsen, prisutan u koncentratu, obrazuje opasne oksidne prašine i isparenja čija stabilizacija radi neškodljivog uklanjanja nije jednostavna⁴, stoga ova problematika predstavlja sve veći izazov za sve subjekte koji su, posredno ili neposredno, uključeni u pirometaluršku proizvodnju bakra iz sulfidnih i ostalih nestandardnih koncentrata bakra (Slika 1).

Uz adekvatnu tehnologiju, u savremenim topionicama moguće je postići niske sadržaje arsena u koncentratima, čak i sa visokim sadržajem arsena na ulazu u proces.

Luženje enargita u kiselim rastvorima

Enargit (Cu_3AsS_4) se obično javlja kao najčešći pratilac halkopirita (CuFeS_2). Kada je sadržaj enargita u koncentratima halkopiritnog tipa relativno nizak (<0.5% As), koncentri se tretiraju konvencionalnim pirometalurškim postupcima za proizvodnju bakra. Međutim, kada je udeo enargita u koncentratu veći, direktno topljenje koncentrata vezano je za probleme izdvajanja isparljivih jedinjenja arsena, njihovo prevođenje u stabilnu formu i bezbedno uklanjanje⁶.

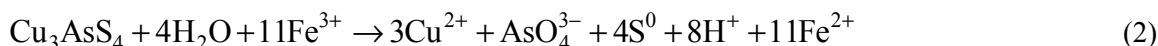
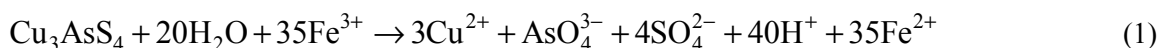
Procesi luženja sulfida bakra oduvek su smatrani održivim alternativama za proizvodnju bakra kada direktno topljenje nije tehnički izvodljivo. Selektivno luženje ili bakra ili arsena iz halkopiritnih koncentrata koji sadrže enargit, predstavlja potencijalno prihvatljivu opciju proizvodnje bakra iz ovakvih koncentrata, uz smanjenje zagađenja životne sredine arsenovim jedinjenjima.

Slika 1. Glavni tokovi arsena u metalurgiji bakra⁵

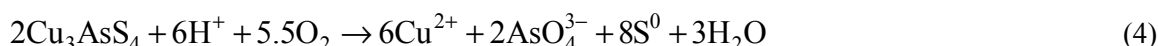
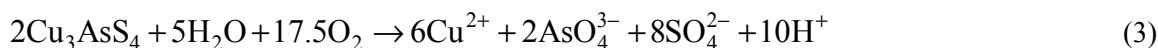
Obzirom da enargit predstavlja uobičajen kontaminant koncentrata bakra, poznavanje njegovog ponašanja pri razlaganju, omogućava određivanje specifičnih uslova za selektivno luženje bakra ili arsena iz koncentrata bakra koji sadrže enargit.

Hemizam procesa razlaganja enargita u kiselim rastvorima

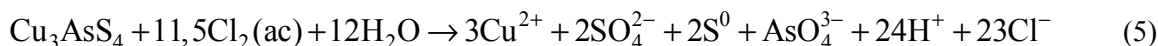
Enargit se može razložiti u oksidnim kiselim rastvorima uz potpunu oksidaciju sulfidnog sumpora u sulfatni ili delimičnu oksidaciju do elementarnog sumpora. Ukoliko se kao oksidans koriste feri- joni, ukupne reakcije u oba slučaja se mogu zapisati kao:



U prisustvu kiseonika, zbirne reakcije stvaranja sulfatnog ili elementarnog sumpora bile bi:



Istraživanja su pokazala da pri luženju enargita u kiselom ferisulfatnom rastvoru, oko 70% sumpora iz enargita oksiduje do elementarnog sumpora i oko 30% oksiduje do sulfata. Kada se vrši oksidacija sa hlorom, oko 50% sumpora iz enargita oksiduje do elementarnog sumpora, a druga polovina do sulfatnog, prema sledećoj zbirnoj reakciji:



Uopšte je zapaženo da pri luženju enargita u sulfatnim kiselim medijima, sulfidni sumpor oksiduje i u elementarni sumpor i u sulfatni. Udeli elementarnog, odnosno stvorenog sulfatnog sumpora zavise od količine oksidansa i reakcionih uslova⁷.

Istraživači su se bavili ponašanjem enargita u sulfidno-hloridnim rastvorima u oksidacionoj atmosferi i pri različitim reakcionim uslovima⁸⁻¹⁴.

Luženje enargita ispitivano je primenom hlora dobijenog *in situ*, kao proizvod reakcije HCl i NaClO. Zapaženo je da se razlaganje enargita odvija u dva stupnja, pri čemu je prvi stupanj izuzetno brz, prema linearnoj kinetici, dok se drugi stupanj javlja pri jako malim brzinama prema paraboličnoj kinetici, usled obrazovanja sloja sumpora na površini koji otežava i na kraju stopira reakciju. Dobijene su energije aktivacije od 14,6 i 20,9 kJ/mol za prvi i drugi stupanj, respektivno⁹.

Proučavanje kinetike razlaganja sintetičkog i prirodnog minerala enargita u ferisulfatnim rastvorima i temperaturnom opsegu 60-95 °C dovelo je do zaključka da se razlaganje enargita odvija sporo sa linearnom kinetikom¹⁰, dok je energija aktivacije procesa iznosila 55,6kJ/mol.

Ispitivanjem luženja enargita u rastvoru H₂SO₄-NaCl u prisustvu kiseonika kao oksidansa, došlo se do zaključka da je brzina rastvaranja arsena mala, odnosno oko 6% arsena se rastvorilo za 7 časova pri luženju na 100 °C u rastvoru koji je sadržao 0,25 M H₂SO₄ i 1,5 M NaCl pri protoku kiseonika od 0.3 l/min¹⁴.

Luženje arsena u alkalnim rastvorima

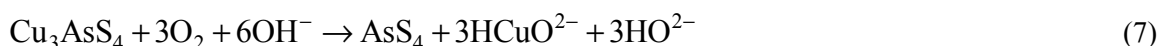
Od sredine 1990-ih većina istraživanja razlaganja enargita vršena je u alkalnim sredinama, koja su uključivala primenu tehnika koje daju informacije o površinskim procesima, bilo indirektno (npr. elektrohemija), ili direktno (npr. X- ray fotoelektronska spektroskopija)¹⁵⁻¹⁷.

Proučavanje površinskih pojava pri tretmanu enargita sa rastvorima hipohlorita pri pH=12.5 dovelo je do zaključka da je enargit reagovao veoma brzo i za kratko vreme bio prekriven debelim filmom bakarnog oksida, koji, međutim ne inhibira reakciju obzirom da je porozan. Procenjena je i energija aktivacije procesa od 58 kJ/mol u temperaturnom opsegu (25-60)°C¹⁸⁻¹⁹.

Predložena reakcija razlaganja enargita u rastvorima sa pH≤ 9.2:



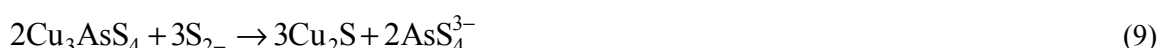
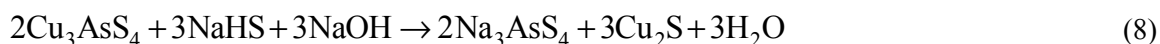
dok bi moguća reakcija pri pH>11 bila:



Na osnovu elektroforetskih merenja ponašanja enargita pri razlaganju, pri pH>11 i u kiseonikom zasićenoj sredini, zapaženo je da enargit ima manju sklonost ka oksidaciji od halkozita i tenantita, ali sa druge strane, brže oksiduje u odnosu na halkopirit i bornit. Takođe je utvrđeno da prirodni enargit brže oksiduje u odnosu na sintetički, ali na ovakvo ponašanje je uticalo prisustvo dodatnih faza.

Jedan od ispitivanih i predloženih procesa za uklanjanje rastvorenog arsena iz Cu₃AsS₄-NaHS-NaOH sistema u obliku stabilnog Na₃AsS₄, može se izvesti i bez neophodnog podešavanja pH. Prvo, filtrat iz operacije luženja se kontinuirano reciklira sve do sadržaj arsena ne pređe 35 g/l. Rastvor se zatim tretira u precipitacionom/ taložnom procesu gde se dodaju elementarni sumpor i antimon u cilju delimične precipitacije (50-60%) rastvorenog arsena u obliku Na₃AsS₄, dok se filtrat vraća u fazu luženja i tako se kontinuirano koristi¹⁹.

Predložene reakcije procesa su:



Kinetika luženja opisana je difuziono kontrolisanim modelom $kt = 1 - 3(1 - \alpha)^{2/3} + 2(1 - \alpha)$, dok je proračunata energija aktivacije 70.26±4.74 kJ/mol²⁰⁻²¹.

Ispitivanja su vršena pri različitim koncentracijama NaHS, NaOH, i količinama dodatih sumpora i antimona, u prisustvu As₂S₃ i Cu₃AsS₄ kao izvora arsena, a sumirani rezultati ukazuju na sledeće: minimalne koncentracije NaHS i NaOH za potpuno rastvaranje As₂S₃ i S na 90 °C za 1h, moraju biti u opsegu 180-250 g/l (NaHS), odnosno 60-100 g/l (NaOH); da bi se obrazovala dovoljna količina taloga, neophodno je postići koncentraciju arsena od preko 35g/l, kao i da minimalna količina dodatog sumpora mora treba biti jednaka polovini mase arsena; hlađenje rastvora sa 90 °C na 30 °C u trajanju 3-5 h, dovelo je do uklanjanja 50-80% As.

Zaključak

Obzirom na sve intenzivnije osiromašenje rudnih ležišta bogatih korisnim mineralnim formama od interesa, industrija na globalnom nivou nalazi se pred novim problemima vezanim za eksploataciju i preradu manje kvalitetnih rudnih ležišta, odnosno pronalaženje adekvatnih tehnoloških rešenja za buduću preradu ruda, koje će sadržati više toksičnih pratećih elemenata.

U radu je dat pregled nekih od metoda koje su našle praktičnu primenu ili su još u fazi istraživanja, a koje daju dobre polazne osnove za unapređenje i implementaciju istih u postojeće proizvodne procese metalurgije bakra, konkretno potencijalnih tehnoloških mogućnosti za smanjenje sadržaja arsena u koncentratima bakra na bazi enargita, odnosno predpripremu koncentrata bakra sa povećanim sadržajem toksičnih elemenata, a u skladu sa ekološkim zahtevima i postojećom zakonskom regulativom.

Zahvalnica: Rad je realizovan u okviru projekta TR 34023 „Razvoj tehnoloških procesa prerade nestandardnih koncentrata bakra u cilju optimizacije zagađujućih materija“, čiju realizaciju finansira Ministarstvo za prosvetu i nauku Republike Srbije.

Technological options for the reduction of arsenic content in the nonstandard copper concentrates

The paper reviews some current research activities in the field of nonstandard copper concentrates treatment, primarily enargite based, in order to reduce the arsenic content from these concentrates so they can be further treated by standard pyrometallurgical processes. The usual procedure of separating the valuable mineral from tailings is flotation, but in some cases this separation method gives poor results, so different hydrometallurgical methods are entering in the focus of the research problem technologically, economically and environmentally feasible and acceptable solutions for the removal of harmful and toxic elements from the copper concentrates.

Literatura

1. Copper Concentrate Quality, Copper Studies, 20 (1)(London:CRU, 1992).
2. Chen, C., Zhang, L., Jahanshahi, S. Thermodynamic Modeling of Arsenic in Copper Smelting Processes. Metallurgical and Materials Transactions B, Vol. 41B, (2010)pp.2010-1175.
3. Brook Hunt, Global Copper Concentrate & Blister/Anode Markets to 2022. Wood McKenzie Company, January 2011, 2010 edition.
4. Dreisinger, D., The Hydrometallurgical Treatment of Arsenical Copper Concentrates: New Process Options to Unlock Metal Values and Fix Arsenic in Waste. Department of Materials Engineering, University of British Columbia, (2005).
5. N.L. Piret and K. Spitz, "Metallurgical Aspects of Solid Waste Generation and Minimization in Copper Smelting," Extraction and Processing for the Treatment and Minimization of Wastes, ed. J.P. Hager et al. (Warrendale, PA: TMS, 1994), pp. 843–872.
6. Hoffmann, J.E., 1993. Remediating copper smelter dust: the arsenic problem. JOM 45 (8), 30–31.
7. Koch, S., Grasselly, G., 1952. Data on the oxidation of sulfide ore deposits. Acta Miner. Petrogv. Szeged. 6, 23–29.
8. Herreros, O., et al., 2003. Leaching of copper concentrates with high arsenic content in chlorine-chloride media. Rev. Metal. Madrid 39, 90–98.
9. Dutrizac, J.E., MacDonald, R.J.C., 1972. The kinetics of dissolution of enargite in acidified ferric sulphate solutions. Can. Metall. Q. 11 (3), 469–476.
10. Lawson, F., Cheng, C., Lee, L.S.Y., 1992. Leaching of copper sulphides and copper mattes in oxygenated chloride/sulphate leachants. Miner. Process. Extr. Metall. Rev. 8, 183–203.
11. Lu, Z.Y., Jeffrey, M.I., Lawson, F., 2000. The effect of chloride ions on the dissolution of chalcopyrite in acidic solutions. Hydrometallurgy 56, 189–202.
12. Deng, T., Lu, Y., Wen, Z., Liu, D., 2001. Oxygenated chloride-assisted leaching of copper residue. Hydrometallurgy 62, 23–50.
13. Padilla, D., Zambrano, P., Ruiz, M.C., 2003. Leaching of sulfidized chalcopyrite with H₂SO₄–NaCl–O₂. Metall. Mater. Trans., B, Proc. Metall. Mater. Proc. Sci. 34B, 153–159.
14. R. Padilla, D. Girón, M.C. Ruiz, Leaching of enargite in H₂SO₄–NaCl–O₂ media, Hydrometallurgy 80 (2005) 272–279.
15. Pauporté, T., Schuhmann, D., 1996. An electrochemical study of natural enargite under conditions relating to those used in flotation of sulphide minerals. Colloids Surf. 111 (1–2), 1–19.
16. Rossi, A., Atzei, D., Da Pelo, S., Frau, F., Lattanzi, P., England, K.E.R., Vaughan, D.J., 2001. Quantitative X-ray photoelectron spectroscopy study of enargite (Cu₃AsS₄) surface. Surf. Interface Anal. 31, 465–470.

17. Velasquez, P., Leinen, D., Pascual, J., Ramos-Barrado, J.R., Córdova, R., Gomez, H., Schrebler, R., 2000b. SEM, EDX and EIS study of an electrochemically modified electrode surface of natural enargite (Cu_3AsS_4). *J. Electroanal. Chem.* 494, 87–95.
18. Viñals, J., Roca, A., Hernández, M.C., Benavente, O., 2003. Topochemical transformation of enargite into copper oxide by hypochlorite leaching. *Hydrometallurgy* 68, 183–193.
19. Mihajlovic, I., Strbac, N., Zivkovic, Z., Kovacevic, R., Stehernik, M., 2007. A potential method for arsenic removal from copper concentrates. *Miner. Eng.* 20, 26–33.
20. W. Tongamp, Y. Takasaki, A. Shibayama, Precipitation of arsenic as Na_3AsS_4 from Cu_3AsS_4 – NaHS – NaOH leach solutions, *Hydrometallurgy* 105 (2010) 42–46.
21. W. Tongamp, Y. Takasaki, A. Shibayama, Selective leaching of arsenic from enargite in NaHS – NaOH media, *Hydrometallurgy* 101 (2010) 64–68.

Nauka o materijalima / Material Science

Novel long-chain alkyl polyglucoside as a prospective stabilizer for dermal delivery systems

Milica Lukić, Ivana Pantelić, Rolf Daniels*, Gordana Vuleta, Snežana Savić

University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Serbia,

**Eberhard Karls Universität, Tübingen, Germany*

Introduction

On-going interest in alkyl polyglucosides (APGs), the so called sugar surfactants obtained from renewable raw materials, over traditionally used polyoxyethylene derivatives, is mainly due to their advantages with regard to skin and environment compatibility¹. They are usually in the form of mixed emulsifiers, consisting of an alkyl glucoside and at least one fatty alcohol. Due to the presence of numerous free hydroxyl groups, they enable complex water binding which could provide additional skin moisturization, thus having an impact on skin permeability of various actives².

The skin compatibility of sugar-based emulsion vehicles is mostly the consequence of their special skin-similarity structure. Although stratum corneum (SC) is commonly described by a brick-and-mortar model, the corneocytes within the SC are in fact embedded in lipid lamellar structures³. It appears that APG-based vehicles mimic SC organization well as the result of lyotropic liquid crystals formation. Liquid crystals are known to have a highly ordered microstructure and are further capable of forming multilamellar structures, which can act as a specific modulator for water retention in the SC. In this context, the mesomorphic behaviour of APGs can be responsible for different modes of water incorporation⁴.

Several thermoanalytical methods are successfully used in research of various dispersed systems. Mass transfer phenomena during solidification and melting within an emulsion submitted to steady cooling and/or heating can be used for obtaining diverse information⁵. Differential scanning calorimetry (DSC) is ideally suited for the assessment of phase transition phenomena and therefore is applicable for different lipids and their mixtures with water and surfactants⁶. Hence, it is expected that DSC could provide valuable information concerning emulsion systems stabilized with APG emulsifiers, particularly those combined with long-chain fatty alcohols. On the other hand, thermogravimetric (TG) analysis can be used for water binding mechanism investigation and further structural analysis⁷. The mode of water distribution is of special interest since the bulk (free) water evaporates shortly after their application, while interlamellar (fixed) water needs certain time to be liberated from the system⁸.

In this work, a long-chain APG emulsifier comprising arachidyl alcohol (C20), behenyl alcohol (C22) and arachidyl (C20) glucoside was investigated regarding its potential to create lamellar mesophases. It was of interest to evaluate this material as a stabilizer of emulsion systems with prospective capability to hold "depot" water for a prolonged skin hydration. Therefore, in order to characterize the inherent structure and mode of water distribution within its selected binary and ternary systems differing in the oil phase, two thermoanalytical methods were conducted. Additionally, the results obtained were correlated to other techniques commonly employed for these systems, namely polarization microscopy and X-ray diffraction.

Materials and methods

Investigated emulsifier, Arachidyl alcohol, behenyl alcohol and arachidyl glucoside (Montanov[®]202, Seppic, France) was used for binary and ternary systems preparation. Binary systems were prepared with emulsifier/water ratios (emulsifier wt%): 1:12.33 (7.5%), 1:7.7 (11.5%), 1:5.67 (15%), 1:4 (20%), 1:2.33 (30%), 1:1.5 (40%) and labelled B1, B2, B3, B4, B5 and B6, respectively. Ternary systems with fixed emulsifier/water ratio (1:7.7) and increasing percentage of oil phase (5-30 wt% of medium-chain triglycerides) were prepared and labelled T5mc, T10mc, T20mc, and T30mc, alongside with two samples with the same emulsifier/water ratio and 20 wt% of different oil phases: avocado oil and liquid paraffin oil (T20ao and T20lp, respectively). Water phase for all samples was preserved distilled water (0.5% Euxyl[®]K300, Schülke&Mayr, Germany).

Binary systems were prepared by heating the preserved water and emulsifier in glass vials to 80°C, stirred at constant temperature for 1 min (1000 rpm) and then for 3 min at 500 rpm. The samples were removed from the heating plate but the mixing was continued at 400 rpm to the room temperature. For the preparation of ternary systems the oil phase heated to the same temperature was added to water/emulsifier mixture and the same mixing procedure was conducted.

Polarization microscopy: Colloidal structure of the samples was observed by a Carl Zeiss ApoTome Imager Z1 microscope (Zeiss, Germany) integrated with digital AxioCam ICc1 camera and AxioVision 4.6 software. 200x and 400x magnifications were captured with cross polarizer in bright field using wavelength (λ) plate, to detect birefringence.

Small-angle X-ray diffraction (SAXD): To provide an insight to the possible presence of the liquid crystalline phases within the systems, SAXD measurements were performed using a position-sensitive detector (Braun, Germany) for all investigated samples. The semisolids were pressed between Capton foils (Krempel, Germany) to a thickness of 1 mm, avoiding air bubbles. X-rays were produced by a PW-1730 generator (Philips, Germany) with a copper anode (current 25 mA, k 0.154 nm, accelerating voltage 40 kV). The exposure time was 300 s at ambient temperature. From diffraction angle theta (θ) the interlayer spacings were calculated according to the Bragg's law.

Wide-angle X-ray diffraction (WAXD): To obtain full structural information on the samples, short-range ordering was examined using WAXD measurements. Diffraction patterns were collected using an X-ray goniometer PW-1050/25 (Philips, Germany), coupled with a Xe-filled linear counter (Fuji, Japan). X-rays were produced by an X-ray generator PW-1730 (Philips, Germany) using a copper anode (anode current 25 mA; k 0.154 nm, accelerating voltage 40 kV). From diffraction angle theta (θ), the intermolecular distances were calculated according to the Bragg's law.

Differential scanning calorimetry (DSC): DSC measurements were performed in order to assess phase transition phenomena in all prepared samples and to obtain information about mesomorphic behaviour and stabilization mechanisms provided by the investigated APG emulsifier. Small amount of samples was accurately balanced in aluminium pans, hermetically sealed and analysed with Mettler DSC820 (Mettler Toledo, Germany). As a reference an empty pan was used. Samples were heated from ambient temperature (25°C) to 120°C, with the heating rate of 2K/min.

Thermogravimetric analysis (TG): TG was performed in order to assess the mode of water distribution in investigated samples, implying the complexity of their colloidal structure. Small amount of samples were placed in open aluminium pans and heated in Netzsch STA 409PG (Netzsch, Germany), from 30 to 110°C with isothermal segments at the beginning and ending of each measurement. The heating rate was set at 5 K/min.

Results and discussion

Apart from the preliminary screening of the obtained mesophases, it was of interest to evaluate the influence of emulsifier concentration within the binary systems as well as the oil concentration increase in ternary systems on the specific phase behaviour of the APG emulsifier. The rational was to distinguish the most promising concentration range of both for optimal formulation development. Furthermore, the influence of different oil phases (different polarity, chemical composition) on specific structures' formation was evaluated. Recorded anisotropic structures, defined as distorted Maltese crosses, as well as birefringence at the oil droplets border, indicate the presence of lamellar structures probably of both types, i.e. lamellar liquid crystalline and α -crystalline gel phases⁴. In binary systems, the increase of emulsifier concentration (Fig. 1a-c) has led to the increase in both number and size of anisotropic structures. As expected, recorded binary systems' micrographs revealed the presence of emulsifier crystals due to the excess of the emulsifier and the absence of the oil phase. Polarization micrographs of ternary systems (Fig. 1d-g) showed anisotropic droplets ("onion rings") being more numerous and larger with the increase in oil content from 5 to 20%. Further increase of the oil phase (sample T30mc) showed no significant alterations.

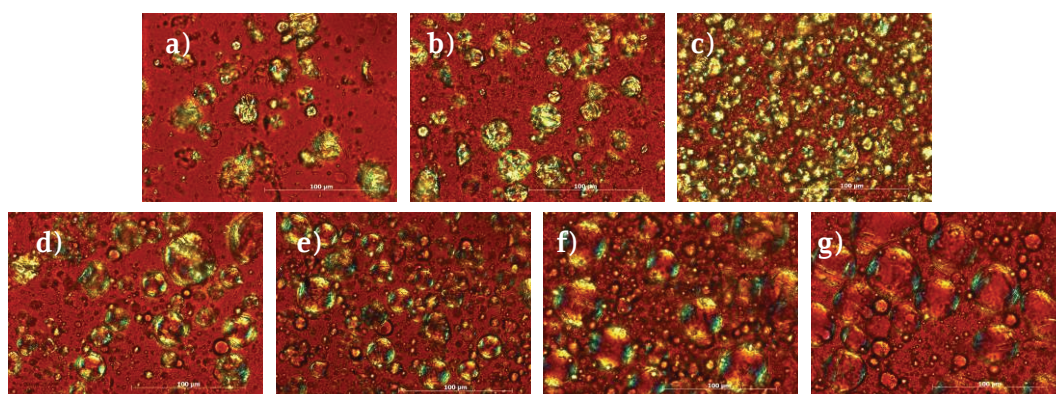


Figure 1. Polarization micrographs of C20/22 APG mixed emulsifier binary systems: a) B1, b) B2, c) B4, and ternary systems with medium-chain triglycerides: d) T5mc, e) T10mc, f) T20mc, and g) T30mc

With the selected oils the investigated mixed APG emulsifier formed soft creams stabilized with lamellar phase as well (Fig. 2). Oils of medium polarity (avocado oil and medium-chain triglycerides) have induced distinct lamellar phase formation characterized by numerous distorted Maltese crosses when observed between crossed polars. However, non-polar liquid paraffin oil has distinctly reduced the specific birefringence.

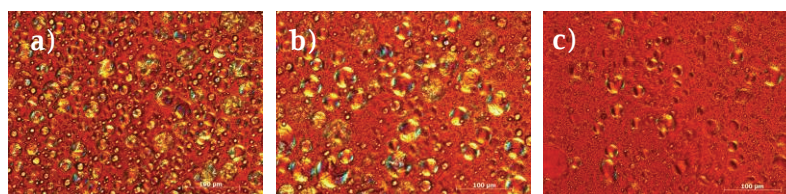


Figure 2. Polarization micrographs of ternary systems with: a) avocado oil (T20ao), b) medium-chain triglycerides (T20mc), and c) liquid paraffin (T20lp)

In search for a more reliable identification of the particular phases within the system, the assessment of WAXD and SAXD profiles was subsequently performed. It is a well-known fact that diffraction characteristics of hydrocarbon chains in α -crystalline gel phase ($L\beta$), namely the presence of a sharp peak that appears at 0.41-0.42 nm with the additional patterns within the small-angle region, imply presence of the lamellar liquid crystalline phase⁹. Therefore, the obtained WAXD patterns with a single sharp reflection at 0.415 nm (Fig. 3) confirm the presence of α -crystalline gel phase both in binary and ternary systems. As expected, the intensity of interference increases with the increase of emulsifier content in binary systems. However, in ternary systems a decrease in intensity has occurred with the increase in oil content.

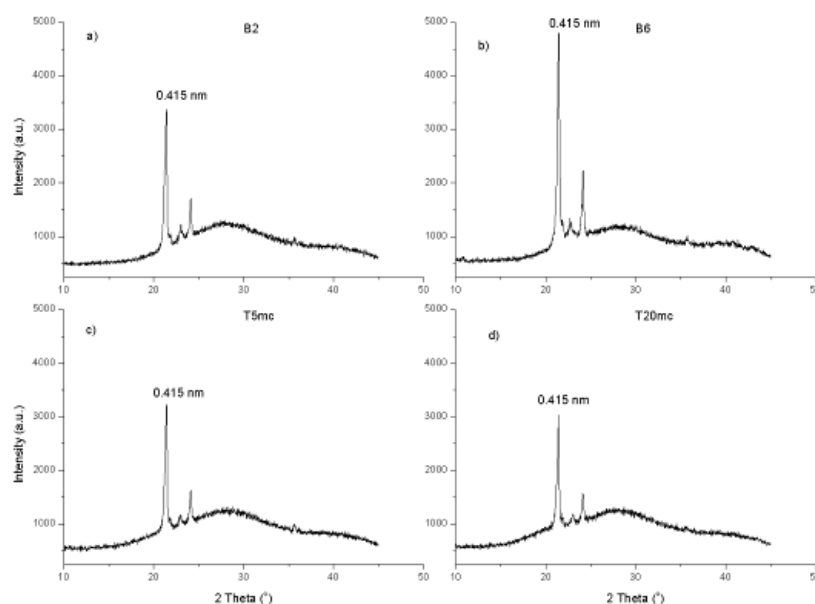


Figure 3. WAXD profiles of selected samples: a) B2, b) B6, c) T5mc and d) T20mc.

Signs of diffuse halo were apparent in all samples, specifically in the part of the diffraction pattern next to the single peak, at 0.45 nm. Therefore, alongside the dominant lamellar α -crystalline phase ($L\beta$) WAXD results indicate also the presence of the lamellar liquid crystalline phase ($L\alpha$). WAXD findings were supported with SAXD, thus confirming the existence of a strongly ordered structure containing lamellae with well-defined repeated distance, manifesting as sharp reflections in the ratio $d:d/2:d/3$, the omen of lamellar liquid crystalline phase.

DSC measurements are known to enable monitoring of mass transfer phenomena during melting within an emulsion submitted to steady heating⁵. The emulsifier itself was characterized by 3 distinct peaks with total enthalpies of 787.2, 1608.1 and 205.4 mJ/mg. Melting points for arachidyl and behenyl alcohol are shown to be in the range 64–66°C, i.e. 68–72°C. Broad second endothermic peak at 64–71°C could therefore correspond to the melting of the free alcohols, whereas the third could represent the melting of the alkyl polyglucoside blend. However, the first peak could represent the free arachidyl and behenyl alcohols β - α transition at 42.5°C⁶. Contrary to that, binary systems are represented by only one broad endothermic peak, showing a distinct shift towards both higher ΔH and melting temperatures. Structures that are formed as the result of water incorporation between the lipid lamellae (bilayers) could modify the phase transition in such a manner⁴. The considerable activation energy required for melting of binary systems considered in conjunction with the results of microscopy, WAXD and SAXD may be interpreted by the formation of complex lamellar phase consisted of both the liquid crystalline and gel crystalline type mesophases. Additionally, thermograms of binary systems (B1–B5) where the absence of β - α transition is noticeable indicate that the alkyl chains of fatty alcohols in these binary mixtures are in α -crystalline form at room temperature⁶. DSC results implied that peak temperatures and ΔH increased with higher water content (decrease in emulsifier concentration). Consideration of the lamellar structures within these systems suggests that alkyl glucoside units are probably interpositioned among the fatty alcohol molecules. Therefore, the possible explanation for the observed DSC behaviour could be that with higher water content there is an increase in swelling of the α -crystals of alcohols due to the hydration of glucoside head groups which are oriented and infiltrated into the interlamellar water layers. At the same time the alkyl glucoside unit gradually dissolves at increasing water content.

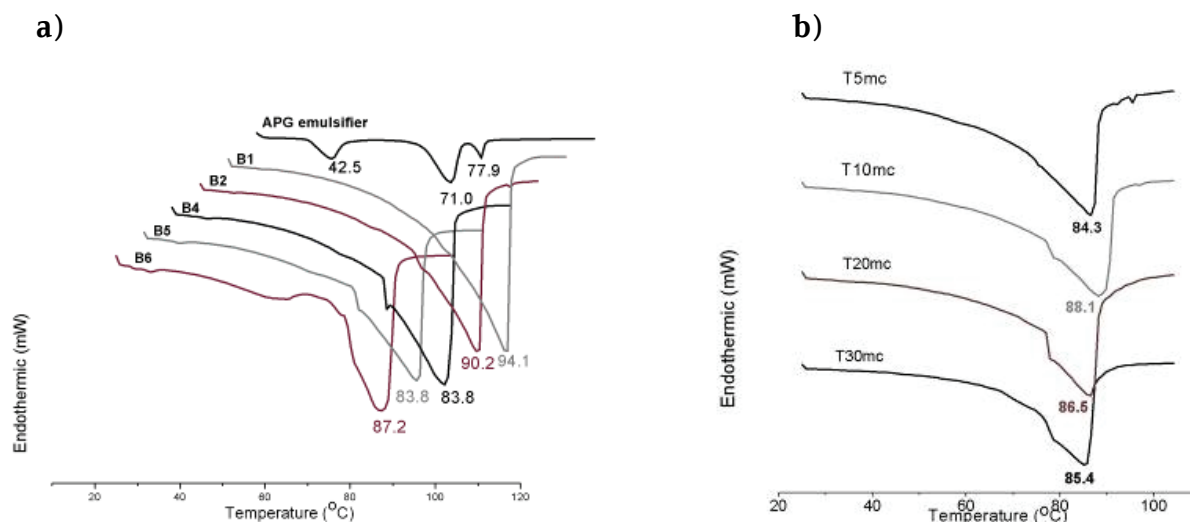


Figure 4. DSC thermograms of a) the investigated emulsifier along with its binary and b) ternary systems with increased oil concentration.

DSC curve of the sample with 5% of oil phase (T5mc) quite resembles the binary system (B2) DSC curve (Fig.4). Addition of medium-chain triglycerides lowered the total enthalpy of the system transition, which gradually decreases with the increase in oil concentration within the emulsion. Namely, when compared to the corresponding binary system, the endothermic peak recorded in all ternary systems is narrower with a distinct shift towards lower melting temperatures. Observed alterations are even more pronounced with the increase in oil content. A possible explanation lies in the insertion of medium alkyl chains from the oil into the lipid bilayers which can disrupt close packing of the mixed APG emulsifier, thus affecting their swelling behaviour.

Thermal behaviour of ternary systems with oils of different polarity was subsequently assessed, and manifested in similar DSC curves to those obtained for ternary systems with medium-chain triglycerides, with similar ΔH and peak temperatures (82.5-85.9°C). Expectedly, DSC curve of the sample T20lp with non-polar liquid paraffin differed from other curves, and was characterized by a very broad endothermic peak. Lamellar structures formation depends on the ability of molecules to pack together closely and to interact with water. As liquid paraffin is composed of non-polar, medium-chain alkanes, it could be presumed that the insertion of these hydrocarbons strongly disrupts lamellar structure.

Direct assessment of TG profiles enabled insight into samples' partial weight losses over different temperature ranges; whereas the comparison of first derivative TG curves indirectly revealed their water evaporation rates. TG findings imply that the water in all binary and ternary systems is predominantly incorporated as interlamellarly fixed (so-called "depot") water, and hence mainly evaporated at the third temperature range (70-110°C). This probably occurs upon the disruption of lamellar phases of different types: i) more fluid liquid crystalline lamellae built mostly from APG surfactant units; ii) more rigid hydrophilic lamellar gel randomly oriented through the continual phase of the ternary systems, consisting of the part of APG units and part of both long chain fatty alcohols and iii) rigid lipophilic gel with the small part of dispersed oil within, which mostly contains semi-hydrates of arachidyl and behenyl alcohols. That means that beside highly hydrated APG units of the mixed emulsifier, behenyl and arachidyl alcohols being in excess may be also responsible for binding a part of the water, appearing in that way as some form of fixed water (so-called "secondary" water)⁸.

In binary systems, the percentage of water evaporation during the third stage gradually increased from 60.97% in system B1 to 68.15% in B6. As expected, with the increase of emulsifier content the water is interlamellarly fixed to a greater extent. However, in the ternary systems, the increase of oil concentration has led to a decrease in water evaporation in the third temperature stage. These results support WAXD and DSC measurements, and the previous assumption that with increased oil concentration lamellar phase formation is reduced. When considering the samples with different oil phases, percentages of water evaporation during the final heating stage were from 48.13% (T20lp) to the 63.48% (T20ao) suggesting that more than one half of water within the system is somehow entrapped. Sample with liquid paraffin showed the highest water evaporation rates during the first (30-50°C) and the second (50-70°C) temperature range, and as previously mentioned the lowest during the third one, pointing to the low compatibility of the long-chain APG mixed emulsifier with non-polar oil phase, potentially indicating not satisfying long-term physical stability of the system.

Conclusion

Investigated long-chain APG emulsifier proved to have high potential in lamellar phase formation when used in reasonable concentration range. Obtained results showed that in systems stabilized with this mixed emulsifier synergism between the two main types of lamellar phases: the liquid crystalline ($L\alpha$) and the gel crystalline ($L\beta$) one, exists. Formation of lamellar structures enabled for more than one half of water within the system to be entrapped (e.g., as interlamellarly fixed -depot or secondary water). Therefore, it could be expected that emulsions based on this APG emulsifier could influence the delivery of diverse active ingredients. Studies related to the effect of the oil phase concentration and composition showed that the increase in oil phase content reduces lamellar phase formation. Although the investigated emulsifier showed a considerable potential for lamellar phase formation, results indicate the importance of the oil phase selection. In that context, it was demonstrated that in the presence of liquid paraffin, as non-polar oil, the stability of the obtained mesophases appears to be compromised, implying a potential compatibility concern between the investigated long-chain APG mixed emulsifier with a non-polar oil phase.

Acknowledgement: The work was supported by the Ministry of Education and Science, Republic of Serbia, through the project TR34031.

Alkil poliglukozični emulgator dugog lanca: nova generacija stabilizatora sistema za dermalnu isporuku

Emulzioni sistemi stabilizovani alkil poliglukozičnim (APG) emulgatorima odgovaraju strukturnoj organizaciji stratum corneum-a kao rezultat formiranja kompleksnih struktura tipa tečnih kristala. U radu je ispitan APG emulgator dugog lanca koji se sastoji iz arahidil alkohola (C20), behenil alkohola (C22) i arahidil (C20) glukozida, i njegov potencijal da obrazuje lamelarne mezofaze. Binarni sistemi izrađeni su u različitim odnosima emulgator : voda (od 1:12,33 do 1:2,33), a ternarni sa uljima različite polarnosti: trigliceridi srednje dužine lanca, avokadovo ulje i tečni parafin. Kako bi se ispitaio potencijal mešanog APG emulgatora da stabilizuje nosače za različite aktivne supstance karakterizacija pripremljenih uzoraka sprovedena je primenom polarizacije mikroskopije, difrakcijom X-zraka pod malim (SAXD) i velikim (WAXD) uglom, diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom (DSC) i termogravimetrijskom analizom. Uočene anizotropne strukture, deformisani Malteški krstovi i anizotropija oko kapi uljane faze, ukazuju na prisustvo lamelarnih struktura oba tipa, tj. lamelarne tečno-kristalne i α -kristalne gel faze. Dobijeni WAXD spektri sa oštrim centrom refleksije na 0.415 nm potvrdili su prisustvo α -kristalne gel faze u binarnim i ternarnim sistemima. Intenzitet signala povećavao se sa primenjenom koncentracijom emulgatora. Iako je termalna analiza ukazala da čist emulgator karakteriše prisustvo tri odvojena pika, DSC termogrami binarnih sistema okarakterisani su jednim širokim endotermnim pikom. Prisustvo triglicerida srednje dužine lanca u ternarnim sistemima uticalo je na smanjenje ukupne entalpije faznog prelaza, koja se dalje smanjuje sa povećanjem koncentracije uljane faze. Obrazovanje lamelarnih struktura od strane ispitivanog emulgatora omogućava kompleksno zadržavanje vode u sistemu u vidu interlamelarno vezane vode. Dobijeni rezultati ukazuju da su emulzioni sistemi na bazi ispitivanog APG emulgatora stabilizovani kompleksnim lamelarnim strukturama koje zadržavajući vodu mogu uticati na hidratisanost stratum corneum-a i dermalnu isporuku različitih aktivnih supstanci.

References

1. C. Stubenrauch, *Cur. Opin. Colloid Interf. Sci.*, 6 (2001) 160-70.
2. M. Lodén, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.*, 19 (2005) 672-88.
3. X. Wang, M. Ujihara, T. Imae, A. Ishikubo, Y. Sugiyama, T. Okamoto, *Colloid Surface B*, 78 (2010)92-100.
4. S. Savic, M. Savic, S. Tamburic, G. Vuleta, S. Vesic, C. Müller-Goyman, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 30 (2007) 441-50.
5. D. Clause, *J. Thermal. Anal. Calorim.*, 101 (2010) 1071-7.
6. R. Goetz, M. El-Aasser, *Langmuir*, 6 (1990) 132-6.
7. E. Csizmazia, M. Budai-Szücs, I. Erős, Z. Makai, P. Szabó-Révész, G. Varju, E. Csányi, *J. Thermal. Anal. Calorim.*, 101 (2010) 313-6.
8. V. Peramal, S. Tamburic, D. Craig, *Int. J. Pharm.*, 155 (1997) 91-98.
9. D. Demus, J. Goodby, G. Gray, H. Spiess, V. Vill, *Handbook of liquid crystals*, Wiley VCH, Weinheim, Germany 1998. p. 341-392.

Radijaciono-hemijska sinteza termoosetljivih srebro/poli(N-izopropilakrilamid) hidrogel nanokompozita

Jelena P. Spasojević, Jelena I. Krstić, Aleksandra N. Radosavljević,
Melina T. Kalagasidis-Krušić*, Zorica M. Kačarević-Popović

Institut za Nuklearne nauke Vinča, Univerzitet u Beogradu, Poštanski fah 522, 11001 Beograd, Srbija

**Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Karnegijeva 4, 11000 Beograd, Srbija*

Uvod

Tehnološke potrebe za novim materijalima su dovele do kreativnih pristupa sintezi i generisanju struktura, svojstava i funkcija u oblasti nanokompozitnih gelova, uglavnom za biotehnološke primene.¹ Posebnu grupu nanokompozitnih gelova čine osetljivi tj. „pametni“ sistemi koji imaju sposobnost da odreaguju na veoma male promene spoljašnjih faktora, kao što su promena temperature, pH vrednosti, električnog polja, svetlosti, itd. Poli(N-izopropilakrilamid) (PNiPAAm) spada u termoosetljive polimere, čija je donja kritična temperatura rastvora (LCST) oko 32 °C. Na ovoj temperaturi dolazi do diskontinualne promene zapremine tj. faznog prelaza, na koji je moguće uticati promenom odnosa hidrofilnih i hidrofobnih grupa u sistemu, procesom kopolimerizacije, dodatkom surfaktanta, soli, itd.^{2,3} S druge strane, nanočestice srebra (Ag) su optički aktivne, jer usled apsorpcije elektromagnetnog zračenja dolazi do koherentnog oscilovanja provodnih elektrona, i pojave apsorpcionih traka površinskog plazmona. Pored toga, Ag-nanočestice su efikasni antimikrobni agens za mnoge viruse, eukariotičke bakterije i mikroorganizme.⁴

Hidrogelne polimerne mreže usled svoje porozne strukture, i zahvaljujući tečnošću ispunjenim šupljinama u nabubrelom stanju koje se pri sintezi ponašaju kao nanoreaktori, predstavljaju dobru platformu za nukleaciju i rast nanočestica (tzv. templejt sinteza).⁵ Među mnogim metodama sinteze, novija istraživanja bazirana su na ispitivanju potencijala radijaciono-hemijske *in situ* metode inkorporacije metalnih nanočestica u trodimenzionalne polimerne mreže (hidrogelove), koja pruža mogućnost kontrolisanja veličine i morfologije nanočestica. Radijaciono-hemijski metod se izdvaja kao veoma pogodan kako za modifikaciju polimernih matrica odnosno formiranje polimernih mreža, tako i za sintezu nanočestica metala u cilju dobijanja nanokompozitnih sistema. Jedna od najvažnijih prednosti ove metode dobijanja nanokompozita jeste sinteza i sterilizacija sistema u jednom tehnološkom koraku, što je izuzetno važno kada se govori o biomedicinskoj primeni.⁴

Cilj ovog rada je ispitivanje mogućnosti radijaciono-hemijske *in situ* inkorporacije nanočestica srebra u termoosetljive hidrogelove na bazi N-izopropilakrilamida, u cilju dobijanja Ag/PNiPAAm hidrogel nanokompozita. Umrežavanje polimerne matrice (formiranje hidrogela) takođe je izvršeno radijaciono-hemijskom metodom tj. upotrebom gama zračenja. Ispitana su različita fizičko-hemijska svojstva umreženih sistema (PNiPAAm hidrogelova i Ag/PNiPAAm hidrogel nanokompozita), u kojima koncentracija polimera u mreži raste, dok je koncentracija Ag-nanočestica konstantna.

Ekperimentalni deo

Reaktanti. N-izopropilakrilamid (NiPAAm) i srebro nitrat (AgNO₃) su proizvodi Sigma-Aldrich-a i Merck-a, respektivno, dok je 2-propanol (C₃H₈O) nabavljen od proizvođača Zorka Pharma. Sve supstance su korišćene bez prethodnog prečišćavanja. Za pripremu rastvora korišćena je voda dobijena prečišćavanjem destilovane vode pomoću Milli-Q sistema (Millipore Corporations). Gas argon (Ag) visokog stepena čistoće (99,5 %; Messer Tehnogas) korišćen je za produvanje rastvora, neposredno pre izlaganja dejstvu gama zračenja.

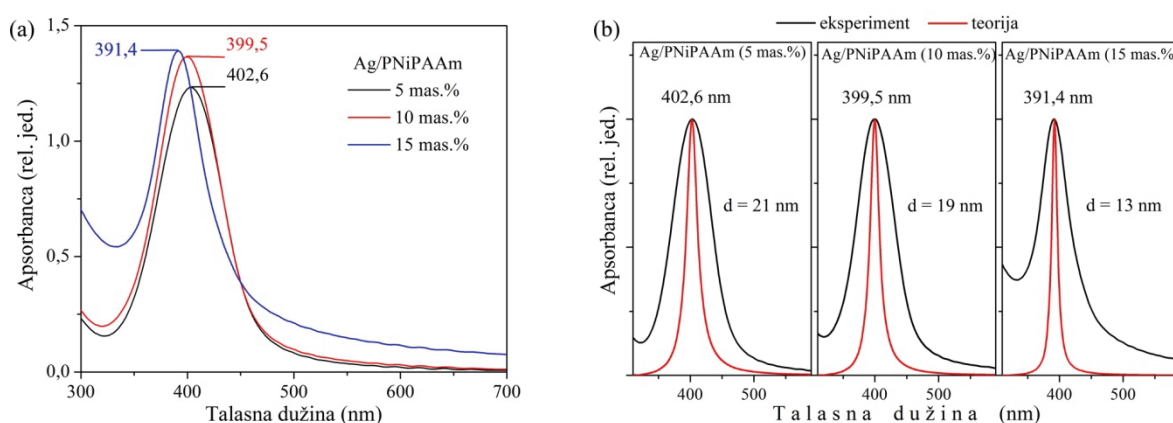
Sinteza Ag/PNiPAAm hidrogel nanokompozita. Vodeni NiPAAm rastvori koncentracija 5, 10 i 15 mas.% su u cilju uklanjanja kiseonika zasićeni Ar u trajanju od 20 min, a zatim na sobnoj temperaturi izloženi dejstvu gama zračenja (izvor ⁶⁰Co; brzina doze 0,5 kGy/h) do ukupne apsorbovane doze od 25 kGy. Nakon umrežavanja, polimerne mreže su potopljene u destilovanu vodu radi uklanjanja neproreagovanog dela, pri čemu je voda menjana svakodnevno tokom 7 dana. Dobijeni hidrogelovi su u trajanju od 2 dana bubrili u Ar zasićenoj smeši vodenih rastvora AgNO₃ (5·10⁻³ M) i C₃H₈O (0,2 M), a zatim su izloženi dejstvu gama zračenja do ukupne apsorbovane doze od 9 kGy, pri brzini zračenja od 10 kGy/h.

Metode. Apsorpcioni spektri Ag/PNiPAAm hidrogel nanokompozita su snimljeni Thermo Scientific Evolution 600 spektrofotometrom. Veličina Ag-nanočestica određena je TEM mikroskopijom (JEOL 100CX, radni napon 100 kV) i teorijskim proračunom pomoću kompjuterskog programa „MiePlot v.3.4“.⁶ Bubrenje umreženih sistema je ispitano u destilovanoj vodi, na sobnoj temperaturi, dok je temperatura faznog prelaza (LCST) određena bubrenjem u opsegu temperatura od 12-48 °C. Morfologija polimernih mreža ispitana je SEM mikroskopijom (JEOL JSM-6610LV, radni napon 20 kV).

Rezultati i diskusija

Pod dejstvom gama zračenja, u vodenim rastvorima se odigrava niz fizičkih i hemijskih procesa koji sumarno čine proces radiolize vode. Glavni primarni produkti radiolize vode su hidratirani elektroni (e^-_{aq}) i H^\bullet radikali, kao redukujuće vrste, i OH^\bullet radikali kao oksidujuća vrsta. S obzirom da su OH^\bullet radikali sposobni da oksiduju jone ili atome metala, i na taj način narušavaju ravnotežu reakcija redukcije metalnih jona, u reakcionu smešu se dodaju tzv. hvatači OH^\bullet radikala. Najčešće je to 2-propanol koji u reakciji sa OH^\bullet radikalima kao proizvod daje redukujuće 2-propanol radikale ($(CH_3)_2C^\bullet OH$). OH^\bullet radikali učestvuju i u procesu apstrakcije H-atoma iz polimernih lanaca, te u sistemu nastaju i redukujući PNiPAAm $^\bullet$ radikali. Pri datim eksperimentalnim uslovima, za redukciju Ag^+ jona odgovorni su e^-_{aq} , $(CH_3)_2C^\bullet OH$ i PNiPAAm $^\bullet$ radikali. Nastali atomi srebra kroz uzastopne procese sudaranja prerastaju u veće klustere, od kojih zatim nastaju Ag-nanočestice.^{7,8}

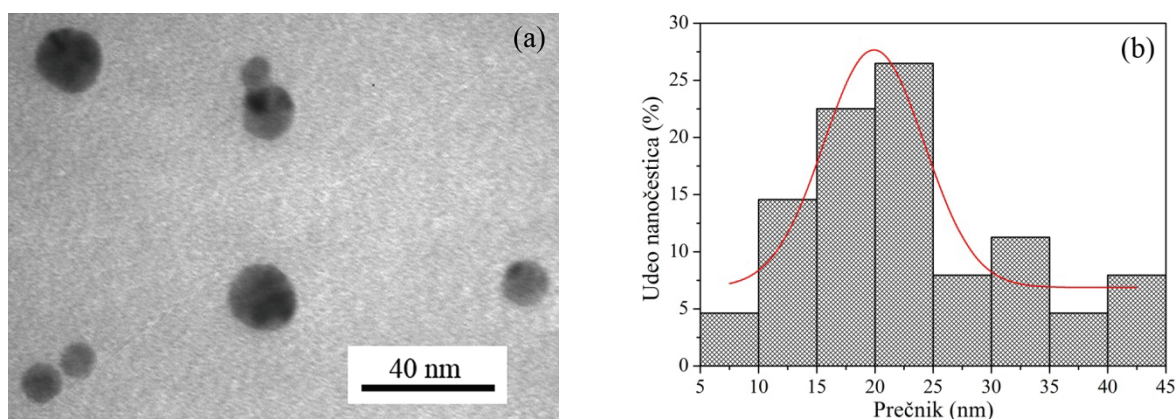
Po završetku procesa ozračivanja, kao rezultat transfera naelektrisanja i formiranja Ag-nanočestica, dobijeni su intenzivno obojeni žuti Ag/PNiPAAm hidrogel nanokompoziti. Prisustvo inkorporiranih Ag-nanočestica u polimernim mrežama potvrđeno je pojavom karakterističnih maksimuma plazmonske apsorpcije u vidljivoj oblasti spektra, u opsegu talasnih dužina između 391-403 nm (slika 1a).



Slika 1. Apsorpcioni spektri Ag/PNiPAAm hidrogel nanokompozita (a) i najbolje slaganje eksperimentalno dobijenih i teorijski izračunatih položaja maksimuma apsorpcije nanokompozita (b).

Poznato je da na položaj maksimuma apsorpcije utiču veličina tj. prečnik, geometrija i stepen agregacije nanočestica, kao i dielektrična svojstva sredine u kojoj su čestice dispergovane. Za teorijsku procenu veličina sintetisanih Ag-nanočestica korišćen je računski program "MiePlot v.3.4", a koji je u skladu sa Mie-vom teorijom. U okviru proračuna varirana je veličina Ag-nanočestica, a na osnovu najboljeg slaganja eksperimentalno dobijenih i teorijski izračunatih položaja maksimuma apsorpcije (slika 1b) nađeno je da je prečnik Ag-nanočestica u opsegu od 13-21 nm. U cilju ispitivanja morfologije i veličine inkorporiranih Ag-nanočestica korišćena je i transmisiona elektronska mikroskopija (TEM). Dobijeni mikrograf i odgovarajuća raspodela veličina Ag-nanočestica prikazani su na slici 2a i 2b, respektivno. Uočljivo je da su sintetisane nanočestice sfernog oblika, sa srednjom vrednošću prečnika oko 20 nm. Rezultati mikroskopije su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim na osnovu UV-Vis spektroskopije i teorijskog proračuna baziranog na Mie-voj teoriji.

Kapacitet bubrenja je jedno od najvažnijih svojstava hidrogelova, koje određuje njihova osnovna fizičko-hemijska svojstva. Karakterizacija umreženih sistema izvedena je praćenjem procesa bubrenja u vodi, na sobnoj temperaturi. Vrednosti ravnotežnog stepena bubrenja (SD_{eq}) i kinetičkih parametara - kinetička konstanta (k), difuzioni eksponent (n), koeficijent difuzije (D), kao i inicijalna brzina bubrenja (v_0) dati su u Tabeli 1.



Slika 2. TEM mikrograf Ag-PNiPAAm (10 mas.%) hidrogel nanokompozita (a) i odgovarajući histogram raspodele veličina Ag-nanočestica (b).

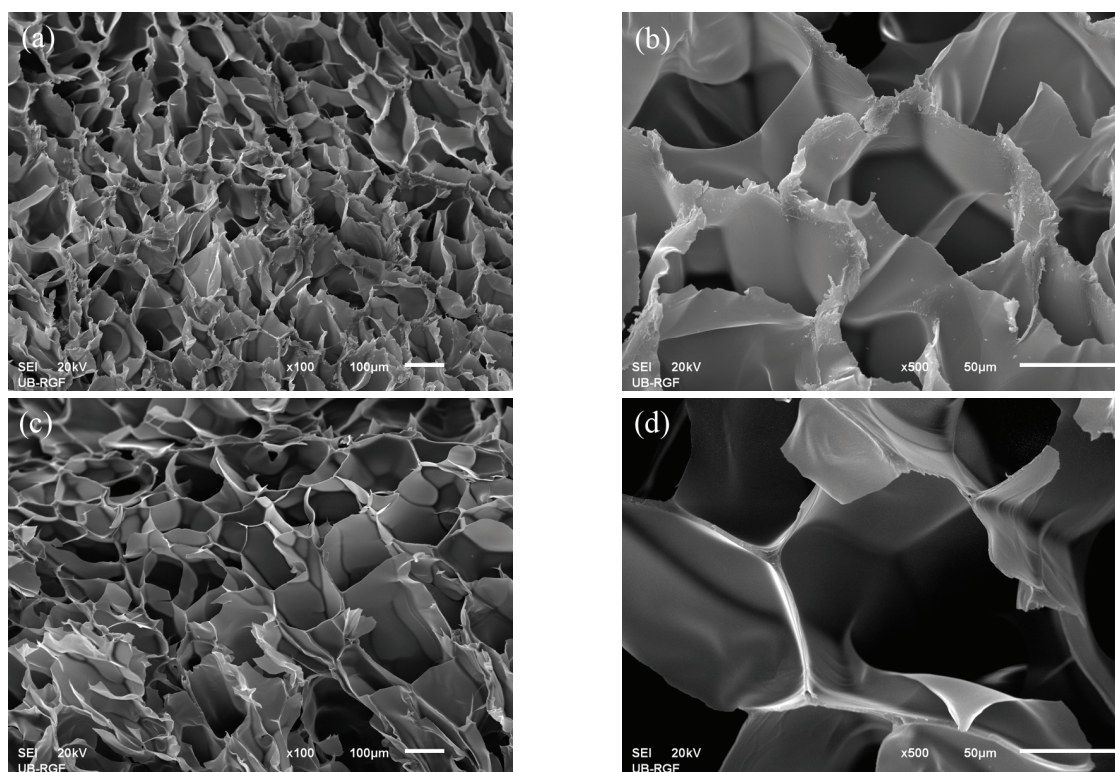
Tabela 1. Vrednosti karakterističnih parametara bubrenja u vodi na 25 °C.

Uzorak	SD_{eq}	n	k (min^{-1})	$D \times 10^6$ ($\text{cm}^2 \text{min}^{-1}$)	ν_0 ($\% \text{min}^{-1}$)	LCST (°C)
PNiPAAm (5 mas.%)	17,59	0,532	0,028	3,377	0,085	30,7
PNiPAAm (10 mas.%)	17,85	0,504	0,031	4,250	0,080	30,8
PNiPAAm (15 mas.%)	12,34	0,479	0,035	5,381	0,053	32,1
Ag/PNiPAAm (5 mas.%)	17,91	0,501	0,032	4,598	0,084	30,5
Ag/PNiPAAm (10 mas.%)	18,72	0,488	0,033	4,885	0,079	30,8
Ag/PNiPAAm (15 mas.%)	11,81	0,456	0,040	6,971	0,051	31,9

Iz tabele 1 može se primetiti blago povećanje vrednosti SD_{eq} u slučaju polimerne mreže sa 10 mas.% polimera u odnosu na 5 mas.%, dok je kod 15 mas.% zabeležen značajan pad vrednosti SD_{eq} . Takođe, značajno je naglasiti da su vrednosti SD_{eq} veće kada su u pitanju hidrogel nanokompoziti, jer inkorporirane Ag-nanočestice u polimernoj matrici izazivaju ekspanziju i širenje polimernih lanaca povećavajući slobodan prostor između njih. Veći slobodan prostor između lanaca znači i veću sposobnost apsorpcije okružujućeg medijuma, a samim tim i bolju difuziju molekula kroz pore, što vrednosti dobijene za koeficijent difuzije (D) i potvrđuju. Kinetička konstanta (k) ima približno iste vrednosti za sve sisteme, što posredno ukazuje da se dodatna količina energije zračenja troši isključivo na redukciju metalnih jona, odnosno da ne dolazi do degradacije polimerne mreže. Difuzioni eksponent (n) je parametar koji opisuje model difuzije u datom sistemu. Ukoliko je $n < 0,5$ govorimo o Fick-ovom modelu difuzije, što znači da je proces bubrenja polimerne mreže kontrolisan isključivo brzinom difuzije molekula vode. Za vrednosti parametra $0,5 < n < 1$ reč je o ne-Fick-ovoj difuziji, kada je proces bubrenja kontrolisan kako brzinom difuzije molekula vode tako i brzinom relaksacije polimernih lanaca. Dobijeni rezultati pokazuju da sa povećanjem koncentracije polimera u mreži dolazi do smanjenja vrednosti parametra n , odnosno do promene model difuzije iz ne-Fick-ove u Fick-ovu. Takođe, kada se uporede uzorci istih koncentracija polimernih matrica, vrednosti parametra n se smanjuju u slučaju nanokompozita.

Temperatura faznog prelaza (LCST), kao jedno od osnovnih svojstava termoosetljivih polimera, određena je praćenjem procesa bubrenja u vodi, u opsegu temperatura od 12-48°C. Dobijene vrednosti za LCST se kreću u opsegu 30,7-32,1 °C za PNiPAAm hidrogelove i 30,5-31,9 °C za Ag/PNiPAAm hidrogel nanokompozite (tabela 1). Očigledno je da prisustvo Ag-nanočestica u polimernoj matrici nema značajnog uticaja na LCST.

Morfologija umreženih sistema ispitana je primenom skenirajuće elektronske mikroskopije. SEM mikrografi jasno pokazuju da PNiPAAm hidrogelovi imaju poroznu strukturu (slika 3a i 3b), te da inkorporacija Ag-nanočestica u polimernu mrežu ne utiče na njenu poroznost (slika 3c i 3d). Upravo zahvaljujući poroznosti, i stabilnosti morfologije, hidrogelovi su se pokazali kao dobre matrice za inkorporaciju i rast nanočestica metala.



Slika 3. SEM mikrografi kserogelova: PNiPAAm (10 mas.%) (a, b) i Ag-PNiPAAm (10 mas.%) (c, d).

Zaključak

Termoosetljivi PNiPAAm hidrogelovi i Ag/PNiPAAm hidrogel nanokompoziti su uspešno sintetisani radijaciono-hemijskom metodom, tj. upotrebom gama zračenja. Prisustvo Ag-nanočestica unutar polimernih mreža potvrđeno je pojavom karakteristične plazmonske apsorpcije u vidljivom delu spektra (391-403 nm). Transmisiona elektronska mikroskopija je pokazala da su sintetisane Ag-nanočestice sfernog oblika, prosečne veličine oko 20 nm. Teorijskim proračunom zasnovanim na Mie-voj teoriji, nađeno je da se veličina prečnika Ag-nanočestica smanjuje sa povećanjem koncentracije polimera u polimernoj mreži, i iznosi 21, 19 i 13 nm za sisteme sa 5, 10 i 15 mas.% polimera u mreži. Praćenjem procesa bubrenja utvrđeno je da nanočestice uzrokuju širenje polimernih lanaca i utiču na povećanje sposobnosti bubrenja ispitivanih umreženih sistema. Međutim, prisustvo nanočestica nema veći uticaj na temperaturu faznog prelaza čije vrednosti se kreću u opsegu od 30,5 do 32,1°C. Pored toga, SEM ispitivanja su pokazala da inkorporacija Ag-nanočestice u polimernu mrežu nema uticaj na njenu morfologiju.

Zahvalnica: Ovaj rad je finansiran od strane Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije u okviru projekta III 45005 i Međunarodne agencije za atomsku energiju (MAAE) u okviru projekta CRP F23028, ugovor 15384.

Radiation-chemical synthesis of thermosensitive silver/poly(N-isopropylacrilamide) hydrogel nanocomposites

This work describes radiation-chemical induced in situ incorporation of silver nanoparticles within thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels, previously crosslinked also by gamma irradiation, in order to obtain Ag/PNiPAAm hydrogel nanocomposites. The presence of silver nanoparticles within the hydrogels was confirmed by appearance of characteristic surface plasmon absorption band, with peak maxima in the range 391-403 nm. Morphology, size and size distribution of silver nanoparticles were investigated by transmission electron microscopy (TEM) and Mie theory (computer program "MiePlot 3.4" for theoretical calculation). Average particles size, determined by comparing experimental and theoretical results, was in the range 13-21 nm. The physico-chemical properties of crosslinked systems (pure polymer networks and nanocomposites) were investigated by swelling measurement, while morphology was determined by scanning electron microscopy (SEM). Obtained results indicate that gamma irradiation induced synthesis is very

suitable method for in situ synthesis of hydrogel nanocomposites with many advantages. Synthesized nanocomposites have wide range of application in biomedicine, pharmacy, optics, photonics, catalysis etc.

Acknowledgements: This work is financed by the Ministry of Education and Science of Republic of Serbia, project III 45005 and International Atomic Energy Agency (IAEA), project CRP F23028 contract No. 15384.

Literatura:

1. P. Schexnailder, G. Schmidt, *Colloid. Polym. Sci.* **287** (2009) 1–11.
2. I.Y. Galaev, B. Mattiasson, *Trends. Biotechnol.* **17** (2000) 335–340.
3. N. Milašinović, M.K. Krušić, Z.K. Jugović, J. Filipović, *Int. J. Pharmaceut.* **383** (2010) 53–61.
4. Ž. Jovanović, A. Krklješ, J. Stojkovska, S. Tomić, B. Obradovic, V. Mišković-Stanković, Z. Kačarević-Popović, *Rad. Phys. Chem.* **80** (2010) 1208-1215.
5. A. Krklješ, J. Nedeljkovic, Z. Kačarević-Popović, *Polym. Bull.* **58** (2007) 271-279.
6. "MiePlot 3.4", A computer program for scattering of light from a sphere using Mie theory & the Debye series, www.philiplaven.com/mieplot.htm.
7. J. Belloni, M. Mostafavi, H. Remita, J.L. Marignier, M.O. Delcourt, *New J. Chem.* **22** (1998) 1239-1255.
8. P. Strauss, W. Knolle, S. Naumov, *Macromol. Chem. Phys.* **199** (1998) 2229-2235.

The crystallization of glass powders from the system $\text{Li}_2\text{O}-\text{Al}_2\text{O}_3-\text{GeO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$

Mihajlo B. Tošić, Srđan D. Matijašević, Snežana R. Grujić*, Vladimir D. Živanović,
Jovica N. Stojanović, Jelena D. Nikolić and Sonja V. Ždrale*

*Institute for the Technology of Nuclear and other Mineral Raw Materials,
86 Franchet d'Esperey St, 11000 Belgrade, Serbia.*

**Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Karnegijeva 4, 11000 Belgrade, Serbia.*

Abstract The crystallization of powder glass from the system $\text{Li}_2\text{O}-\text{Al}_2\text{O}_3-\text{GeO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$ was studied. The investigations were performed under non-isothermal and isothermal conditions using the DTA, XRD and SEM methods. The results showed that the glass crystallize by primary crystallization. As a primary phase the $\text{LiGe}_2(\text{PO}_4)_3$ is formed and the traces of GeO_2 as a secondary one is present. The influence of particle size of the glass powder samples in the range 0-1 mm on the temperature of the DTA crystallization peak, T_p , the peak height $(\delta T)_p$ and the parameter $T_p^2/(\Delta T)_p$ was studied. It was demonstrated that for the particle size in the range 0-0.4 mm both surface and volume crystallization are significant, while for the particle size >0.4 mm the volume crystallization is dominant. The crystallization process occurred at a high homogeneous nucleation rate and the spherulitic crystal growth morphology. Nanostructured samples were obtained.

Introduction

By crystallization of some glasses from the system $\text{Li}_2\text{O}-\text{Al}_2\text{O}_3-\text{GeO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$, the $\text{LiGe}_2(\text{PO}_4)_3$ phase which belongs to the solid solutions with general formula of $\text{Li}_{1+x}\text{M}_x\text{Ge}_{2-x}(\text{PO}_4)_3$ ($\text{M}=\text{Al}$ or Cr) is formed. They generally crystallize in rhombohedral $R\bar{3}c(167)$ space group related to open structures and the monovalent Li^+ cation can easily migrate in lattice with low activation energy¹⁻⁴. The crystal structure of $\text{LiGe}_2(\text{PO}_4)_3$ consists of a three-dimensional framework of corner-shared GeO_6 octahedra and PO_4 tetrahedra. The basic unit of the framework consists of two GeO_6 octahedra and PO_4 tetrahedra corresponding to $[\text{Ge}_2(\text{PO}_4)]$. Each GeO_6 octahedron is connected to three PO_4 tetrahedra, each of which is linked to four GeO_6 octahedra. These units in turn are connected to form 'ribbons' along the c -axis and the ribbons are joined together along the a - and b -axis by PO_4 tetrahedra⁵.

This family of the crystalline phosphates are often referred to as 'NASICONs' (acronym for 'Na-Super Ionic Conductors') although they do not contain Na^+ ion⁶. NASICON-type materials are potential candidates as the solid electrolytes for utilization in high energy density batteries, supercapacitors, sensors, displays, nuclear waste disposals, low expansion ceramics, thermal-shock-resistant materials and electrochemical devices⁷.

$\text{LiGe}_2(\text{PO}_4)_3$ can be synthesized by conventional ceramic method, glass-ceramics method, solution-sol-gel method or hydrothermal method. In comparison with the sintered materials, glass-ceramics have much advantage because they can be easily manufactured into desired size or shape and have dense microstructure. Therefore, it is significant to understand the process crystallization of these glasses.

In the present paper the mechanism crystallization of germanophosphate glass powders under nonisothermal conditions was studied.

Experimental

The glass was prepared by melting a homogeneous mixture of reagent-grade Li_2CO_3 , Al_2O_3 , GeO_2 and $(\text{NH})_2\text{HPO}_4$ in a covered platinum crucible. The melting was performed in an electric furnace BLF 17/3 at $T=1400$ °C during $t=0.5$ h. The melt was cast and cooled between two steel plates. Powder X-ray diffraction (XRD) analysis confirmed the quenched melts to be vitreous. The samples were transparent, without visible residual gas bubbles

The experiments under non-isothermal conditions were performed using a Netzsch STA 409 EP device and Al_2O_3 powder as the reference material. Powder samples of the following granulations were prepared: <0.048 ; $0.048-0.063$; $0.063-0.1$; $0.1-0.2$; $0.2-0.3$; $0.3-0.4$; $0.4-0.5$; $0.5-0.65$; $0.65-0.83$ and $0.83-1.0$ mm. The glass powders were prepared by crushing of bulk glass in an agate mortar and sieving it to appropriate grain size. In the experiments, a constant weight (100 mg) of the samples was heated at heating rate

$\beta = 10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ to $T = 800 \text{ }^\circ\text{C}$. The second group of experiments was performed with granulations <0.048 , which were heated at different rates of 5, 10, 12, 15 and $20 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ from $20 \text{ }^\circ\text{C}$ to $T = 800 \text{ }^\circ\text{C}$.

The experiments with bulk glass samples were performed in a one-stage regime. The samples were heated at heating rate $\beta = 10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ up to the chosen temperature in the range of $T = 500\text{-}800 \text{ }^\circ\text{C}$ at which they were maintained over different periods of time in an electric furnace Carbolite CWF 13/13, with automatic regulation and temperature accuracy of $\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Finally, the samples were removed from the furnace and then crushed into an agate mortar. Powdered samples were used for X-ray and fractured ones for SEM analyses.

The XRD method was used to determine the phase composition and the XRD patterns were obtained by using a Philips PW-1710 automated diffractometer with a Cu tube operated at 40 kV and 30 mA. The instrument was equipped with a diffracted beam curved graphite monochromator and a Xe-filled proportional counter. The diffraction data were collected in the 2θ Bragg angle range from 5 to 70° , counting for 0.50 s. The XRD measurements were performed at room temperature in a stationary sample holder.

A MIRA 3 XMU microscope was used for the SEM investigations, and the fractured bulk samples previously sputtered with gold were used.

Results and discussion

The results of the chemical analysis show that a glass composition of $6.4\text{Li}_2\text{O}\cdot 8.6\text{Al}_2\text{O}_3\cdot 42\text{GeO}_2\cdot 43\text{P}_2\text{O}_5$ (wt%) was obtained. In Fig. 1 the DTA curve of glass sample particle sizes of <0.048 mm and $0.83\text{-}1$ mm, recorded at heating rate of $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ in the temperature range $20\text{-}800 \text{ }^\circ\text{C}$ is shown.

As can be seen in Fig. 1 two exothermal temperature peaks for both curves were registered. The higher peaks appeared at lower temperatures. Also, only the peaks height is changed while their positions do not change markedly by increasing of the glass particle size. Similar peaks behavior was registered for all glass samples studied.

In order to identify the formed crystalline phases at the temperatures corresponding to peak 1 and 2, the experiments under isothermal conditions were performed with bulk samples. In a one-step regime, the samples were heated at $T=500\text{-}800 \text{ }^\circ\text{C}$ for different times. XRD analyses revealed that at DTA peak 1 the $\text{LiGe}_2(\text{PO}_4)_3$ phase is formed with quantity of 97.5 %, and at DTA peak 2 the secondary phase GeO_2 with quantity of 2.5% appeared. The XRD pattern of the glass sample annealed at $800 \text{ }^\circ\text{C}$ is shown in Fig. 2.

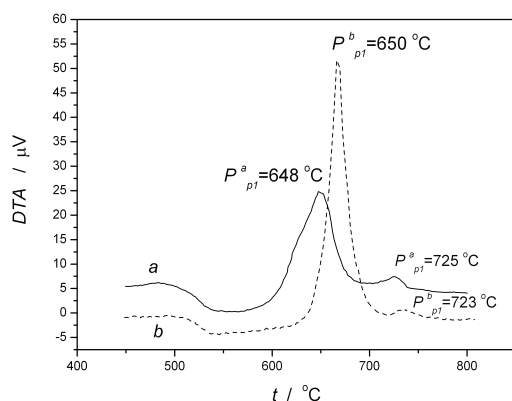


Fig. 1. DTA curves recorded at a heating rate of $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ for powder sample particle sizes: a) <0.048 mm and b) $0.83\text{-}1$ mm.

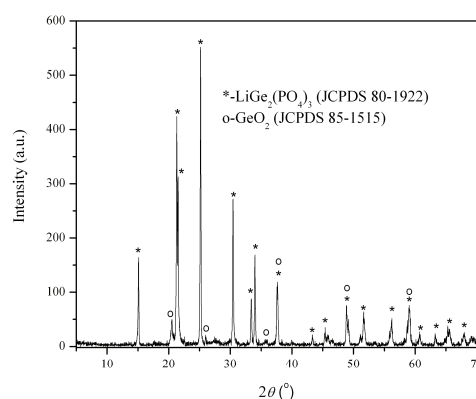


Fig. 2 XRD pattern of the glass sample annealed at $T=800 \text{ }^\circ\text{C}$ for $t=100$ h.

In Fig. 3, the effects of particle size on the exothermal DTA peak temperatures, T_p , for all samples are presented.

The glasses generally crystallize by either surface or volume mechanism. The one of the procedure convenient for evaluating the dominant crystallization mechanism of glass powder is differential thermal analysis (DTA)⁸. Experimental and theoretical studies have shown that the particle size of glass

powder influences the mechanism of its crystallization⁹⁻¹¹. The parameters of $T_p^2/(\Delta T)_p$ and $(\delta T)_p$ show the dependency on particle size and can be used as qualitative measure for the polymorphic as well as the primary surface and volume crystallization. The ratio $T_p^2/(\Delta T)_p$, where T_p is the DTA peak temperature and $(\Delta T)_p$ is the half-width of the DTA peak is related to the dimension of crystal growth. The height of the exothermal DTA peak $(\delta T)_p$ is proportional to total number of nuclei (volume and surface) contained in the glass particle. If surface and volume crystallization proceed simultaneously, three distinct regions can be distinguished as a function of particle size. They reflect the behavior arising from decreasing of surface-to-volume ratio with the increase of particle size.

The results of the influence of particle size on the ratio $T_p^2/(\Delta T)_p$ and DTA peak height $(\delta T)_p$ for peak 1 are shown in Fig. 3.

As can be observed from Fig. 4 (peak 1), the curves with two distinguishable regions were obtained. The ratio $T_p^2/(\Delta T)_p$ and $(\delta T)_p$ have a lowest values for average particle size <0.050 mm.

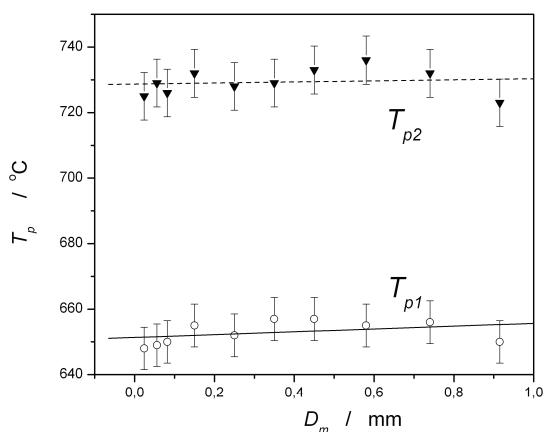


Fig. 3 The Effect of particle size on DTA exothermal peak temperatures T_p

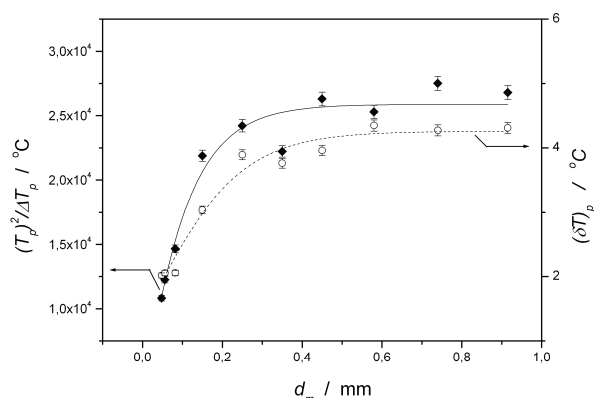


Fig. 4 The effect of particle size on $T_p^2/(\Delta T)_p$ and $(\delta T)_p$ for peak 1

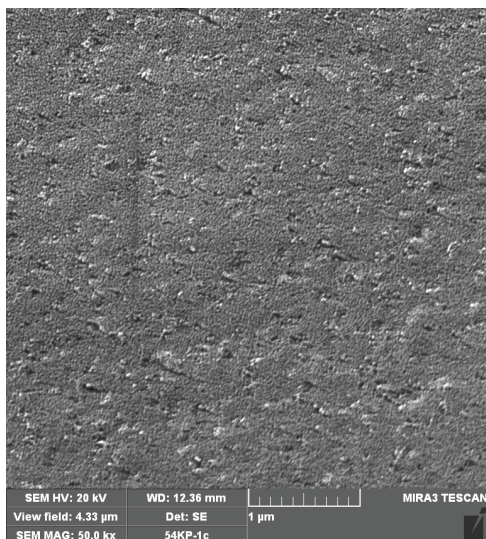


Fig. 5 SEM micrographs for glass sample annealed at $T=510$ °C for $t=20$ h.

Practically, only for this glass grain size the number of surface nuclei was comparable with volume ones and the total number of the present nuclei is smallest. In the particle size range of 0.05-0.4 mm, the both parameters increased to asymptotic values. In this case, with increasing particle size, the ratio of volume to surface nuclei increased as the number of volume nuclei increases with respect to the number of surface nuclei. Both mechanisms of crystallization are present also in this range. In the grain size range >0.4 mm, both parameters remain approximately constant. In this case, the number of volume nuclei dominates in the total number of nuclei and hence, the volume crystallization mechanism prevails. When the number of volume nuclei becomes dominant, a further increase in particle size does not significantly influence the change in the volume nuclei or the total number of nuclei.

To check this behavior the bulk samples under isothermal conditions were analyzed. The SEM micrographs of the

interior surface of sample thermally treated in one-stage regime at $T=510$ °C are shown in Fig. 5. Spherically shaped crystals dimension of about 20 to 40 nm in diameter are visible. This results were confirmed that a glass crystallized by volume mechanism at high rate of homogenous nucleation.

Conclusions

The crystallization of the $6.4\text{Li}_2\text{O}\cdot 8.6\text{Al}_2\text{O}_3\cdot 42\text{GeO}_2\cdot 43\text{P}_2\text{O}_5$ (wt%) glass powders was studied. The results showed the primary crystallization of this glass. $\text{LiGe}_2(\text{PO}_4)_3$ was formed as the stable primary phase, and as a secondary one the GeO_2 in traces appeared. The effect of particle size of glass on the crystallization mechanism was analyzed. For particle size in the range 0-0.4 mm both surface and volume crystallization are significant, while for particle size >0.4 mm volume crystallization is dominant.

SEM analyzes showed that the crystallization process occurred with a high homogeneous nucleation rate and spherulite crystal growth morphology.

Acknowledgment: The authors are grateful to the Ministry of Education and Science, Republic of the Serbia for financial support (Projects 34001 and 172004).

Kristalizacija praha stakla iz sistema $\text{Li}_2\text{O}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3\cdot\text{GeO}_2\cdot\text{P}_2\text{O}_5$

Ispitana je kristalizacija praha stakla iz sistema $\text{Li}_2\text{O}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3\cdot\text{GeO}_2\cdot\text{P}_2\text{O}_5$. Ispitivanja su izvršena pri neizotermnim i izotermnim uslovima korišćenjem DTA, XRD i SEM metoda. Rezultati su pokazali da ovo staklo kristališe primarnom kristalizacijom pri čemu se kao primarna faza formira $\text{LiGe}_2(\text{PO}_4)_3$ a kao sekundaran faza u tragovima nastaje GeO_2 . Analiziran je uticaj dimenzija čestica praškastih uzoraka u oblasti 0-1 mm na temperaturu pika kristalizacije, T_p , visinu pika kristalizacije (δT)_p i parametar $T_p^2/(\Delta T)_p$. Pokazano je da u oblasti dimenzija čestica 0-0,4 mm deluju istovremeno površinska i zapreminska kristalizacija dok je u oblasti dimenzija čestica >0,4 mm dominantna zapreminska kristalizacija. Proces kristalizacije se odvija pri visokoj brzini homogene nukleacije i sa sferulitskom morfologijom rasta kristala. Kristalisani uzorci imaju nanostrukturu.

References

1. J.Fu, *J.Mater.Sci.* **33** (1998) 1549
2. M.Cretin, P.Fabry, *J.Eur.Ceram.Soc.* **19**(1999) 2931
3. P.M.Manso, E.R.Losilla, M.M.Lara, M.A.G.Aranda, S.Bruque, F.E.Mouahid, M.Zahir, *Chem.Mater.* **15** (2003) 1879
4. P.P.Kumar, S.Yashonati, *J.Chem.Sci.* **118** (2006) 135
5. A. S. Wills, VALIST (2009) Program available from www.CCP14.ac.uk.
6. N.Anantharamulu, K.K.Rao, G.Rambabu, B.V.Kumar, V.Radha, M.Vithal, *J.Mater.Sci.* **46** (2011) 2821
7. K.Arbi, M.Ayadi-Trabelsi, J.Sanz, *J.Mater.Chem.*, **12** (2002) 2985
8. C.S.Ray, Q.Yang, W.Haung and D.E.Day, *J.Am.Ceram.Soc.* **79** (1996) 3155
9. C.S.Ray, D.E.Day, W.Haung, K.Lakshmi Narayan, T.C.Cull, K.F.Kelton, *J.Non-Cryst.Solids*, **204** (1996)1
10. K.F.Kelton, K.Lakshmi Narayan, L.E.Levine, T.C.Cull, C.S.Ray, *J.Non-Cryst.Solids*, **204** (1996)13
11. M. B. Tošić, V. D. Živanović, S. R. Grujić, J. N. Stojanović, J. D. Nikolić, *J. Non-Cryst. Solids*, **354** (2008)3694

Anneal hardening effect in thermomechanically treated a cast copper-gold alloy

Svetlana Nestorović, Ivana Marković, Dragoslav Gusković, Desimir Marković

University of Belgrade, Technical Faculty in Bor, VJ 12, Bor, Serbia

Introduction

Many investigations have been made on the so called anneal hardening phenomenon in the solid solution of copper alloys, but researchers are not yet ready for putting a decisive interpretation upon its mechanism. Especially, the fact that the anneal hardening is hardly observable in single crystals gives rise to some difficulties in interpreting the mechanism¹. Various investigations have been made on the anneal-hardening, attributing its cause to (1) reordering of SRO, (2) formation of G.P. zone, (3) segregation of solute atoms due to the Suzuki effect and (4) formation of a local ordered structure². Among this four, two propositions are thought to be rational.

First proposition is a formation and collapse of the short range order. The term "short range order" involves two different meanings: One is that, in a solid solution which may form a long range order superlattice under an ideal condition, the perfect ordered region can not grow into a large domain for some reason, but remains in fine state and is dispersed randomly in the solid solution. This conception may be said "Partial long range order". The other is based on the probability of an atomic arrangement of the solid solution. For example, in a solid solution which is composed from A and B atoms and does not form any superlattice, if the number of B atoms surrounding an A atom is greater than the average value of B atoms, then the solid solution tends to form the short range order.

Second proposition is the segregation of solute atoms to stacking faults. The segregation of solute atoms to stacking faults has been confirmed by transmission electron microscopy³. Lattice parameter changes of cold worked Cu-Zn during annealing have also led to the conclusion that solute clustering at dislocations should be one of the major causes of anneal hardening⁴.

Anneal hardening effect was investigated in several binary copper based alloys: Cu-Al, Cu-Zn, Cu-Al, Cu-Ga, Cu-Ni, Cu-Rh, Cu-Zn, Cu-Sb, Cu-Sn¹⁻¹⁰. But only Vitek and Warlimont⁵ conformed hardening of cold deformed single phase Cu-4at.%Au alloy after low temperature annealing by measuring of spring bending limit. In this paper are presented the results of investigations on anneal hardening effect in Cu-Au alloy after thermomechanically treatment.

Experimental

Pure copper and binary copper alloy containing nominally 4 at.% (i.e. 11, 44 mass %) of gold and weighing approximately 0,1 kg were melt in laboratory electro resistance furnace in a borax protective cover. Ingots were homogenized at 800 °C for 24 h in graphite protective cover. Samples with dimensions 30x10x5 mm were cut from the homogenized copper and Cu-4Au alloy ingots and then were subjected to the thermomechanical treatment (TMT), which included prefinal cold rolling to the thickness of 2.5 mm, solution annealing (at 500 °C for 45 min followed by an ice-water quenching), cold rolling with 20 % reduction on the final thickness of 2 mm. At last copper and Cu-4Au samples deformed with 20 % reduction were annealed in the temperature range between 60 and 300 °C in the electro resistance furnace. The holding time at annealing temperature was 30 min. Vickers hardness, Vickers microhardness and electrical conductivity were measured after each step of TMT. Vickers hardness was measured applying 5 kp load, the holding time under the load was 15 s, until Vickers microhardness was measured applying 100 g load and the holding time under the load was 15 s. The electrical conductivity was measured at 60 kHz on rolled samples using "Sigmatest" conductometer. Eight measurements of hardness, microhardness and electrical conductivity were performed on each sample.

Results and discussion

The hardness, microhardness and electrical conductivity values of the tested pure copper and Cu-4Au alloy after different step of TMT are given in Table 1. It can be seen from Table 1 that the hardness and microhardness of Cu-4Au alloy is higher than for pure copper, but electrical conductivity of Cu-4Au alloy is lower than for pure copper. Cold plastic deformation increases hardness, microhardness and electrical conductivity for all tested samples.

Table 1 – Values of hardness, microhardness and electrical conductivity of the tested samples after different steps of TMT

TMT	Metal/Alloy	Hardness, HV	Microhardness, HV _{μ100}	Electrical conductivity, MSm ⁻¹
Homogenization annealing	Cu	44,6	10,62	53,15
	Cu-4Au	62,8	13,13	22,64
Preliminary rolled with 50 % reduction	Cu	105	13,55	56,29
	Cu-4Au	142	17,9	23,89
Solution annealed	Cu	38,7	8,74	53,32
	Cu-4Au	56,5	12,7	21,9
Finally rolled with 20 % reduction	Cu	95,5	12,6	55,96
	Cu-4Au	124	15,92	23,92

After final cold rolling with 20 % of reduction samples are annealed in the temperature range from 60 °C to 300 °C. Influence of annealing temperature on the hardness values for quenched and cold rolled ($\epsilon=20\%$) pure copper and Cu-4Au alloy samples is shown in Fig. 1.

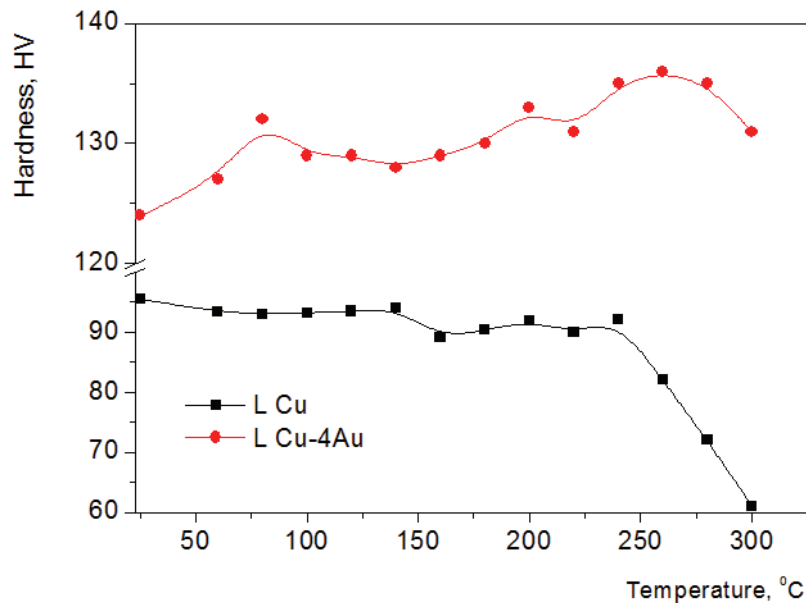


Figure 1 – Influence of annealing temperature on the hardness

It can be noted that there is some increase in hardness for Cu-4Au, namely, anneal-hardening occurs. It has already been reported that the process of anneal hardening in α brass consists of two stage, and it is considered that the second hardening is caused by the interaction of lattice imperfection and solute atoms¹¹. The first hardening in Cu-4Au alloy was seen at an early stage of annealing of about 60-140 °C, followed by small softening and then the second hardening takes place. The maximum hardness increase for Cu-4Au alloy is about 12 HV after annealing at 260 °C. The hardness values of Cu-4Au alloy increase from 124 HV to 132 HV after annealing at 80 °C and then decrease slowly to 128 HV after which increase to 136 after annealing at 260 °C.

After annealing above 240 °C cold deformed Cu sample, hardness drops significantly as a result of the formation and growth of a new undeformed grain, i.e. the recovery and recrystallization occurrence. After annealing at 300 °C the value of hardness for Cu-4Au alloy is higher compared to the cold rolled condition for the Cu-4Au alloy, implying that the recrystallization does not occur i.e. the anneal hardening still continues.

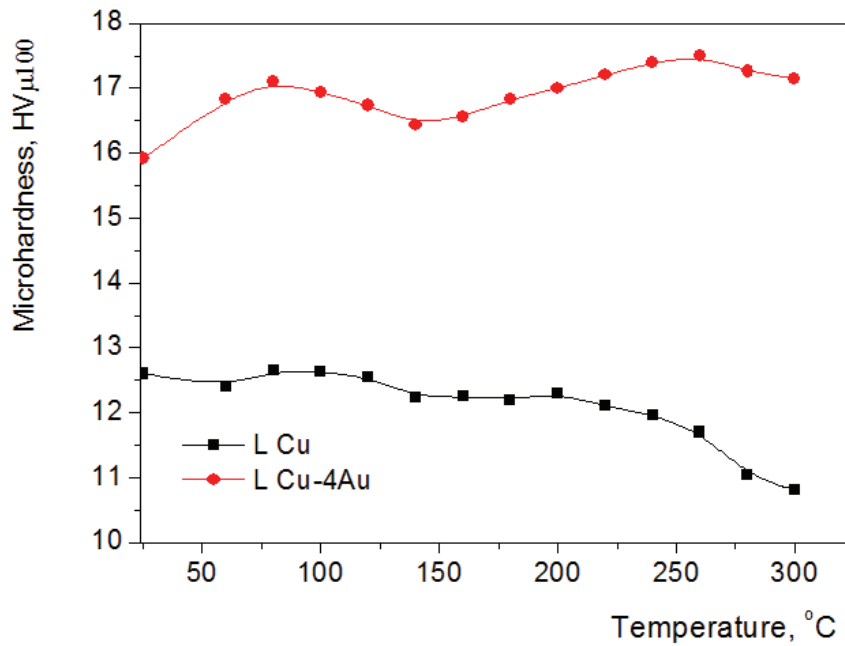


Figure 2 – Influence of annealing temperature on the microhardness

Influence of annealing temperature on the microhardness values for quenched and cold rolled ($\epsilon=20\%$) pure copper and Cu-4Au alloy samples is shown in Fig. 2. It can be seen from Fig. 2 that the first and the second hardening stages can also clearly be seen for Cu-4Au alloy measuring microhardness values. The microhardness values of Cu-4Au alloy increase from 15,92 HV_{μ100} to 17,1 HV_{μ100} after annealing at 80 °C and then decrease slowly to 16,44 HV_{μ100} after which increase to 17,5 after annealing at 260 °C.

Microhardness values for pure copper significantly drop after annealing above 240 °C as a result of recrystallization.

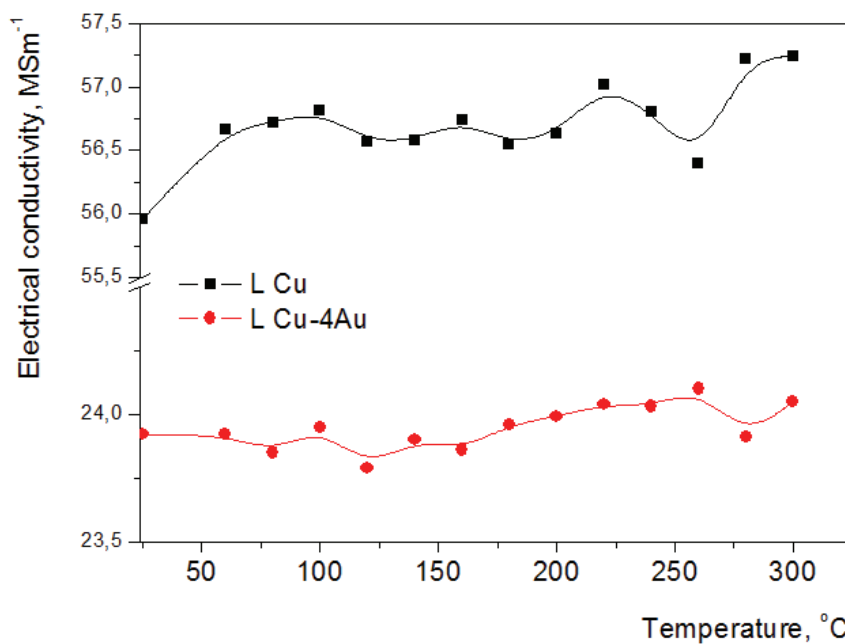


Figure 3 - Influence of annealing temperature on the electrical conductivity

Influence of annealing temperature on the electrical conductivity values for quenched and cold rolled ($\epsilon=20\%$) pure copper and Cu-4Au alloy samples is shown in Fig. 3. The electrical conductivity of Cu-4Au alloys slowly increases with annealing in the temperature range, where the first and the second

hardening stages appears, due to the segregation of the atoms of gold to dislocations which is contributed to the depleting of solid solution on alloying element¹².

Electrical conductivity values for pure copper increase with increasing annealing temperature as a result of recovery and recrystallization.

Conclusions

The obtained results can be summarized as follows:

- The anneal hardening effect was attained in Cu-4Au alloy after annealing in the temperature range between 60 and 300 °C cold deformed samples, and was followed by an increase in hardness, microhardness and electrical conductivity.
- Strengthening which follow anneal hardening in Cu-4Au alloy consists of two stages, first stage from room temperature to approximately 150 °C and second hardening from 150 °C to approximately 300 °C which main increase mechanical properties.
- Recrystallization does not occur in Cu-4Au alloy after annealing at 300 °C because recrystallization temperature is shifted by presence of solute atoms of gold.
- Experiments will be continued annealing up to 600 °C following next property changes in Cu-4Au alloy due to recovery and recrystallization.

Acknowledgements: The authors are grateful to the Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia for the financial support under Project TR 34003.

Efekat ojačavanja žarenjem u termomehanički obrađenoj bakar-zlato livenoj leguri

Istraživanja su izvršena na livenim uzorcima legure Cu-4at.%Au (11,44 % masenih) kao i na uzorcima čistog bakra radi upoređenja svojstava. Liveni uzorci bakra i legure su podvrgnuti istoj termomehaničkoj obradi. Termomehanička obrada je obuhvatila homogenizaciono žarenje na temperaturi od 850 °C u trajanju od 24 h, predzavršno hladno valjanje, rastvorno žarenje na 500 °C u trajanju od 45 minuta, završno hladno valjanje sa redukcijom od 20 %. Nakon toga je izvedeno izohrono žarenjesve do temperature rekristalizacije legure. Praćen je uticaj temperature žarenja na intenzitet efekta ojačavanja žarenjem kod legure Cu-4at.%Au merenjem vrednosti tvrdoće, mikrotvrdoće i električne provodnosti. Istraživanja su pokazala da se u leguri Cu-4at.%Au javio efekat ojačavanja žarenjem u temperaturnom intervalu od 60-300 °C koji je praćen povećanjem vrednosti tvrdoće, mikrotvrdoće i električne provodnosti.

References:

1. O. Izumi, *Journal of the Japan Institute of Metals*, **21** (1957) 632-644.
2. N. Kuwano, Y. Tomokiyo, C. Kinoshita, T. Eguchi, *Transactions of the Japan Institute of Metals*, **15** (1974) 338-344.
3. M. Bader, G.T. Eldis, H. Warlimont, *Metallurgical Transactions A*, **7** (1976) 249-255.
4. H. Otte, *Journal of Applied Physic*, **33** (1962)1436-1441.
5. J.M. Vitek, H. Warlimont, *Metallurgical Transactions A*, **10** (1979) 1889-1892.
6. S. Nestorović, D. Marković, I. Marković, *Journal of Alloys and Compounds*, **489** (2010) 582-585.
7. A. Varschavsky, E. Donoso, *Journal of Thermal Analysis*, **50** (1997) 533-545.
8. A. Varschavsky, E. Donoso, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **57** (1999) 607-622.
9. W. Arafa, M. Abd El Wahab, *Journal of Materials Engineering and Performance*, **14** (2005) 473-479.
10. A. Varschavsky, E. Donoso, *Materials Science and Engineering A*, **251** (1998) 208-215.
11. O. Izumi, *Science reports of the Research Institutes, Tohoku University. Ser. A, Physics, chemistry and metallurgy*, **17-18** (1965) 9 -16.
12. Q. Liu, X. Zhang, Y. Ge, J. Wang, J.Z. Cui, *Metallurgical and Materials Transactions A*, **37** (2006) 3233-3238.

Sintering of glasses in the ternary system $\text{La}_2\text{O}_3\text{-SrO-B}_2\text{O}_3$ studied by hot-stage microscopy

Sonja V. Ždrale, Snežana R. Grujić, Mihajlo B. Tošić*, Vladimir D. Živanović*,
 Anđelika Z. Bjelajac, Srđan D. Matijašević*, Jelena D. Nikolić*, Snežana N. Zildžović*

Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Karnegijeva 4, 11000 Belgrade, Serbia,

**Institute for the Technology of Nuclear and other Raw Materials,*

Franchet d`Esperey St 86, 11000 Belgrade, Serbia

Introduction

Recently, more attention is dedicated to exploring new non-linear optical (NLO) materials given the importance of their application. Borate crystals and salts, that generate ultraviolet as well as blue and green light are interesting materials that can be applied as NLO and laser¹. Borate crystals are known as excellent laser as well as NLO with very good second harmonic generation (SGH) efficiency². It has been shown that single grown crystals from ternary systems $\text{R}_2\text{O}_3\text{-CaO-B}_2\text{O}_3$ (R=rare earth) are materials with very good NLO properties. There was also attempt to substitute strontium for calcium and obtain single crystal with possible NLO properties¹. Crystallized glasses in these ternary systems with NLO crystalline phase have been investigated. Glasses and crystallization in ternary system $\text{La}_2\text{O}_3\text{-CaO-B}_2\text{O}_3$ have been investigated due to explore possibility of their application as NLO and laser².

In this work glasses in the ternary system $\text{La}_2\text{O}_3\text{-SrO-B}_2\text{O}_3$ with constant content (71.4 % mol) of B_2O_3 have been studied. Objective of this study was to examine the behavior of the glass when heated, to investigate the properties that are important for the processes of crystallization, and thus determine the application thereof. Viscosity is crucial property for glassmakers that determines melting behavior, working range, annealing parameters and it also affects the crystallization tendency of the glass. Hot stage microscopy (HSM) technique is considered appropriate for a viscosity-temperature data, sintering and crystallization phenomena in glasses^{3,4}.

Experimental

The glasses were prepared by melting reagent grade mixture of H_3BO_3 , SrCO_3 , $\text{La}_2(\text{CO}_3)_3$ in electrical furnace. Mixture was placed in platinum crucible in electric furnace and melted at 1200 °C for 30 min. The melt was cast and cooled at stainless steel plate in air at room temperature. The obtained samples were transparent, without visible bubbles, clear glasses. Compositions of obtained glasses with constant content (71.4 % mol) of B_2O_3 are given in table 1.

Table 1 Composition of studied glasses

Glass, number	x_i / mol %		
	La_2O_3	SrO	B_2O_3
1	5.7	22.9	71.4
2	9.5	19.1	71.4
3	14.3	14.3	71.4
4	19.1	9.5	71.4

A hot stage microscope, E. LEITZ WETZLAR, was used. The microscope projects the image through a quartz window. Glass powders were hand pressed into cylinders. The specimens were placed on platinum plate, then on alumina support which is contacted with thermocouple. The temperature was measured with (Pt/Rh/Pt) thermocouple. Heating rate was 10 °C min⁻¹.

Process of sintering of glass powders is given by changes of relative height and relative area of the samples as a function of temperature.

The temperatures that are corresponding to typical viscosity points such as first shrinkage ($\log\eta=9.1\pm 0.1$), maximum shrinkage ($\log\eta=7.8\pm 0.1$), deformation ($\log\eta=6.3\pm 0.1$), sphere ($\log\eta=5.4\pm 0.1$), half ball ($\log\eta=4.1\pm 0.1$) and flow ($\log\eta=3.4\pm 0.1$) are obtained from photomicrographs⁴.

Results and discussion

Temperature of first shrinkage (t_{FS}), maximum shrinkage (t_{MS}), deformation (t_D), sphere (t_S), half ball (t_{HB}) and flow (t_F) points are designated from the results obtained by HSM, table 2.

Table 2. Results obtained by HSM

Glass	$t_{FS} / ^\circ\text{C}$	$t_{MS} / ^\circ\text{C}$	$t_D / ^\circ\text{C}$	$t_S / ^\circ\text{C}$	$t_{HB} / ^\circ\text{C}$	$t_F / ^\circ\text{C}$
1	580	600	680	700	840	890
2	600	700	720	760	900	950
3	700	720	740	800	1000	1020
4	720	740	760	780	1050	1060

In Figure 1 are shown photomicrographs characteristics of the shape of glass sample number 1 taken during HSM experiments, which are representative for the other samples. Temperature of first shrinkage or sintering is temperature at which sample shrinks to about 3 to 5% of its initial height^{4,5}. The temperature of maximum shrinkage is a temperature at which a sample shrinks to the maximum possible level, before softening, and a sample still has sharp edges^{4,5}. The t_D is a point at which the first signs of softening can be observed, the edges of the samples are rounded^{4,5}. More on, the t_S is a temperature at which a sample has a shape of a sphere, whereas the half-ball temperature is a temperature at which the section of the sample observed forms a semicircle, and the flow temperature is the one at which the maximum height of the drop of molten glass corresponds to a unit on the microscopic scale^{4,5}.

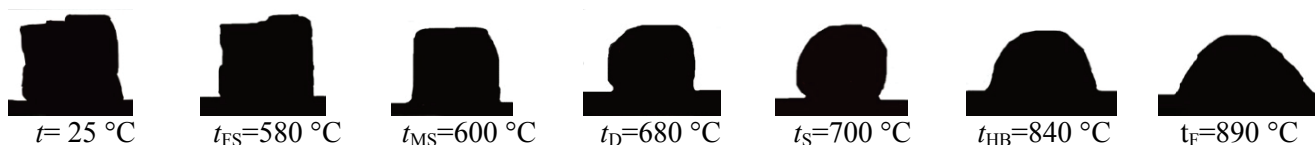


Fig. 1. Photomicrographs of the shape sample during the HSM measurements

Results of variation in area and height of glass samples are shown in Figures 2, 3, 4 and 5.

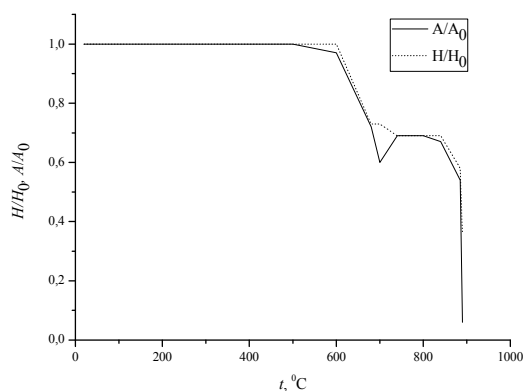


Fig. 2. Variation in area and height of glass powder number 1

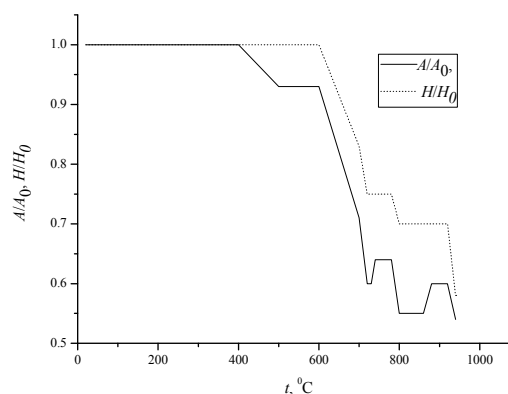


Fig. 3. Variation in area and height of glass powder number 2

With increasing content of La_2O_3 in studied glasses it can be observed that difference in flow temperature was increasing. The melting temperature of glasses increased with increasing content of lanthanum. The differences in sintering temperatures were not significant with small changes to lanthanum content.

The shape of the curve obtained for the sample 4, Figure 5, with wide plateau followed by melting and flow similar to materials exhibiting devitrification upon heating, indicates, significant crystallization before flow⁴.

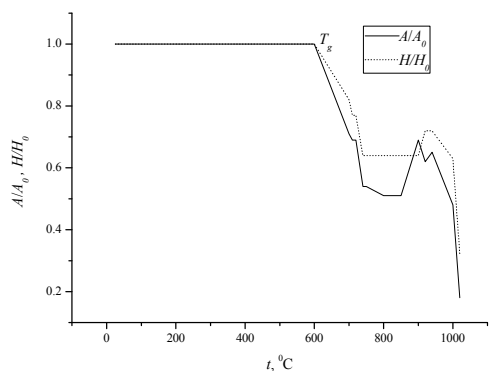


Fig. 4. Variation in area and height of glass powder number 3

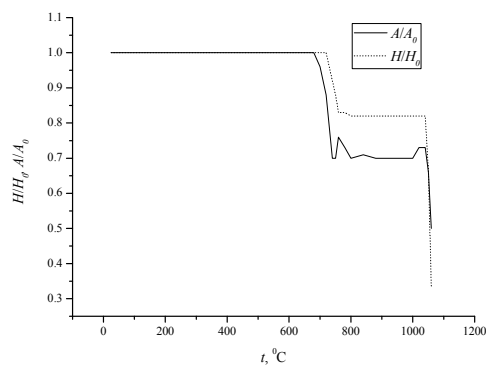


Fig. 5. Variation in area and height of glass powder number 4

Conclusion

New glasses in the system $\text{La}_2\text{O}_3\text{-SrO-B}_2\text{O}_3$ were investigated for NLO and laser application, present research provides further opportunities in the determination of the sintering process and crystallization.

The present investigation of the ternary system $\text{La}_2\text{O}_3\text{-SrO-B}_2\text{O}_3$ via hot stage microscope provided initial conclusions about variation of the characteristic temperatures with the change of the La_2O_3 content. The obtained thermo micrographs demonstrated that with the increase in La_2O_3 content there is an increase in the flow temperature.

Acknowledgment. The authors are grateful to the Ministry of Education and Science, Republic of the Serbia for financial support (Projects 172004 and 34001).

Ispitivanje sinterovanja trokomponentnog sistema stakla $\text{La}_2\text{O}_3\text{-SrO-B}_2\text{O}_3$ primenom termomikroskopa

U ovom radu korišćen je termomikroskop u cilju određivanja 6 temperatura koje odgovaraju tipičnim vrednostima viskoznosti (temperatura prvog skupljanja, temperatura maksimalnog skupljanja, temperatura deformacije, temperatura sfere, temperatura polulopte i temperatura tečenja) za 4 različita uzorka stakla iz sistema $\text{La}_2\text{O}_3\text{-SrO-B}_2\text{O}_3$ sa konstantnim sadržajem B_2O_3 . Pokazano je da se razlike u temperaturi tečenja i topljenja povećavaju sa povećanjem sadržaja La_2O_3 . Razlike u temperaturi sinterovanja nisu bile značajne sa promenama sadržaja La_2O_3 . Ovaj sistem stakla je ispitivan zbog dalje primene za lasere i nelinearnu optiku.

References

1. J. Cao, J. Wang, P. Fu, F. Guo, Z. Yang, Y. Wu, *Prog. Cryst. Growth Ch.* **40** (2000) 97
2. I. Dyamant, E. Korin, J. Hormadaly, *J. Non-Cryst Solids* **354** (2008) 3135
3. C. Lara, M.J. Pascual, M.O. Pradob, A. Duran, *Solid State Ionics* **170** (2004) 201
4. M.J. Pascual, A. Duran, *Phys. Chem. Glasses* **46** (2004) 512
5. H. Scholze, *Ver. Dtsch. Kerm. Ges.* **391** (1962) 63

Polimerni kompleksi na bazi amidovanog pektina i montmorilonita za uklanjanje Basic Yellow 28 boje iz vodenih rastvora

Aleksandra R. Nešić, Sava J. Veličković*, Dušan G. Antonović*

Institut za Nuklearne nauke Vinča, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

**Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija*

1. Uvod

Ukupni tehnološki razvoj poslednjih decenija usmeren je na rešavanje dva krupna, globalna problema: zaštitu životne sredine i očuvanje prirodnih resursa. Zagadjenje životne sredine predstavlja jedan od osnovnih problema za dalji razvoj čovečanstva. Životna sredina postaje sve više zagadjena usled ispuštanja otpadnih voda različitog hemijskog sastava u vodene tokove. Sintetske boje predstavljaju veliku grupu organskih jedinjenja koje se primenjuju u svim područjima ljudskog delovanja, pa samim tim spadaju u vodeće zagadjujuće materije životne sredine. Procenjuje se da je proizvodnja sintetskih boja u 2008.oj godini iznosila preko 7×10^5 t¹. Veliki broj ovih jedinjenja se koristi u mnogim oblastima industrije kao što su tekstilna industrija^{2,3}, kožarska industrija^{4,5}, proizvodnja papira⁶, prehrambena tehnologija^{7,8}, farmaceutska industrija⁹, poljoprivreda^{10,11}. Prisustvo ovih zagadjujućih materija u vodi i u vrlo malim koncentracijama može uticati nepovoljno na eko-sistem i zdravlje ljudi. Boje štetno utiču na biljke jer smanjuju prenos sunčeve svetlosti kroz vodu i time ometaju proces fotosinteze. Ispuštanje boja u većem obimu u rečne vodotokove može uništiti floru i faunu. Boje štetno utiču na zdravlje ljudi izazivajući iritacije kože i očiju, disfunkciju bubrega, probleme s reproduktivnim sistemom, oštećenje jetre, mozga i centralnog nervnog sistema^{12,13,14}. Najčešće ispitivani adsorbent za uklanjanje boja je aktivni ugalj, koji poseduje veliku aktivnu površinu i kapacitet adsorpcije^{15,16,17}. Međutim, aktivni ugalj je veoma skup i posle procesa adsorpcije mora da se regeneriše, što smanjuje njegovu komercijalnu upotrebu. Sve veća pažnja se poklanja ispitivanju adsorbenata koji potiču iz obnovljivih izvora energije i koji su biodegradabilni, zbog ekoloških i ekonomskih uslova.

Pektin je privukao posebnu pažnju za istraživanje zbog niske cene, netoksičnosti i biorazgradivosti. Pektin predstavlja smešu polisaharida i sastoji se pretežno od D-galakturonske kiseline. Najveći prirodni izvor pektina je voće. Zbog sposobnosti formiranja gela u kiseloj sredini, pektin se odavno upotrebljava kao dodatak hrani i potpuno je biodegradabilan jer se razlaže pod dejstvom pektinaza mikrobiološkog porekla u crevima^{18,19}. Takodje, pektin ima sposobnost geliranja u prisustvu dvovalentnih i trovalentnih jona metala, pa se u literaturi mogu naći brojni radovi za uklanjanje metala iz otpadnih voda pomoću pektina^{20,21,22}. Galakturonska kiselina u pektinu poseduje karboksilne grupe, od kojih su neke metilovane a ostale se mogu tretirati amonijakom čime nastaju amidne grupe i takav pektin se naziva amidovani pektin. Prednosti amidovanog pektina naspram komercijalnog pektina su: niža pH osetljivost, manja hidrofilitnost i brže formiranje gela u prisustvu jona metala. Amidovani pektin poseduje odlične sorpcione karakteristike za uklanjanje jona metala i boja iz otpadnih voda zbog prisustva više funkcionalnih grupa u svojoj strukturi (amidne-, primarne i sekundarne hidroksilne grupe) i velike hemijske reaktivnosti ovih grupa. Glavni nedostatak amidovanog pektina kao adsorbenta je hidrofilitnost, slaba poroznost i mala površina²³. S obzirom na nedostatke, javila se potreba za modifikacijom ovog polimera u cilju poboljšanja sorpcionih karakteristika.

U ovom radu je ispitivan kompleks na bazi amidovanog pektina i montmorilonita (MMT) pri različitim odnosima komponenti. Montmorilonit je mineral koji spada u grupu smektita i poseduje izomorfnu 2:1 slojnu strukturu, što znači da ima dva tetraedarna sloja između kojih se nalazi centralni oktaedarni sloj. Zbog svoje strukture, montmorilonit poseduje veliku sposobnost za uklanjanje toksina, jona metala iz vodenih rastvora, pa je zbog toga veoma značajan u kontroli životne sredine i u redukciji herbicida^{24,25,26}. Karboksilne i hidroksilne grupe iz amidovanog pektina mogu graditi vodonične veze sa Si-O-Si grupama iz montmorilonita, formirajući polimerni kompleks koji se odlikuje boljim fizičko-hemijskim svojstvima naspram čistog amidovanog pektina. Amidne grupe iz amidovanog pektina takodje mogu graditi veze sa silikatnim grupama iz montmorilonita. Cilj ovog rada je dobijanje novog materijala na bazi amidovanog pektina za efikasno uklanjanje katjonske boje Basic Yellow 28 boje iz vodenih rastvora. U tabeli 1.1. su prikazane osnovne karakteristike Basic Yellow 28 boje.

Tabela 1.1. Karakteristike Basic Yellow 28 boje

Komercijalno ime	Basic Yellow 28, Sandocryl Gold Yellow, Basacryl Golden Yellow X-GFL
Molekulska formula	C ₂₁ H ₂₇ N ₃ O ₅ S
Molekulska masa	433,52
CAS broj	54060-92-3
λ_{max} / nm	438
Toksičnost	Iritantna za oči, kožu i disajne organe, zabranjena supstanca u kozmetici

2. Eksperimentalni deo

2.1. Reaktanti

Za dobijanje kompleksa korišćen je amidovani pektin (LA110, Danisco, Danska) sa stepenom amidovanja 15.9% i stepenom metilovanja 35.9%. Udeo galakturonske kiseline iznosi 48%. Montmorilonit korišćen u proceduri dobijanja kompleksa je Cloisite Na⁺ (Southern Clay Products Inc., USA). Boja Basic Yellow 28 je dobijena na poklon od firme Bezema AG.

2.2. Priprema adsorbenta

Kompleksi AP/MMT su pripremani mešanjem rastvora amidovanog pektina i montmorilonita u različitim odnosima. Ispitivan je udeo montmorilonita od 10-50 % u kompleksu. Amidovani pektin (1 mas %) je rastvaran u destilovanoj vodi uz konstantno mešanje pri temperaturi 80 °C. Montmorilonit je dispergovan u 0.2M sirćetnoj kiselini na temperaturi 80 °C do homogenog dispergovanja montmorilonita u kiselini. Disperzija montmorilonita je potom mešan sa rastvorom amidovanog pektina pri temperaturi 80 °C do uspostavljanja homogenosti disperzije. Rastvor je izlivan u kalupe i sušen u sušnici na 50 °C do potpune osušenosti kompleksa. Kao referentni uzorak za poredjenje sorpcionih karakteristika korišćen je film amidovanog pektina. Film amidovanog pektina je dobijen rastvaranjem 0.2g AP u 20 ml vode, a potom izlivanjem rastvora u kalupe i sušenjem u sušnici na 50 °C.

2.3. Karakterizacija adsorbenta

Radi potvrde sastava adsorbenta i kompleksacije između amidovanog pektina i montmorilonita korišćena je Fourier transformisana infracrvena spektroskopija (FTIR). FTIR spektri kompleksa su u obliku KBr pastila snimani na Bomem MB 100 FTIR spektrofotometru. Ovi adsorbenti su karakterisani i Skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) radi utvrđivanja morfologije ovih adsorbentata. Snimanja su izvedena na uređaju JEOL JSM-5800.

2.4. Adsorpcija

U ovom istraživanju ispitana je mogućnost primene dobijenih kompleksa kao adsorbentata za uklanjanje katjonske boje Basic Yellow 28 iz vodenih rastvora. Ispitivan je uticaj sledećih parametara na adsorpciju boja na hitozan/PIA komplekse:

- uticaj početne koncentracije boje (30, 50 i 80 mg/l),
- uticaj temperature (8 °C, 20 °C, 37 °C i 55 °C),

Adsorpcija boje iz vodenog rastvora praćena je na UV/VIS Shimadzu 1700 spektrofotometru. U programu su praćeni spektri adsorpcije (dijagrama zavisnosti vrednosti apsorbance od talasne dužine propuštene svetlosti) i očitavana je vrednost apsorbance, na talasnoj dužini od 439 nm za boju Basic Yellow 28. Kapacitet adsorpcije se izračunava na osnovu sledeće jednačine:

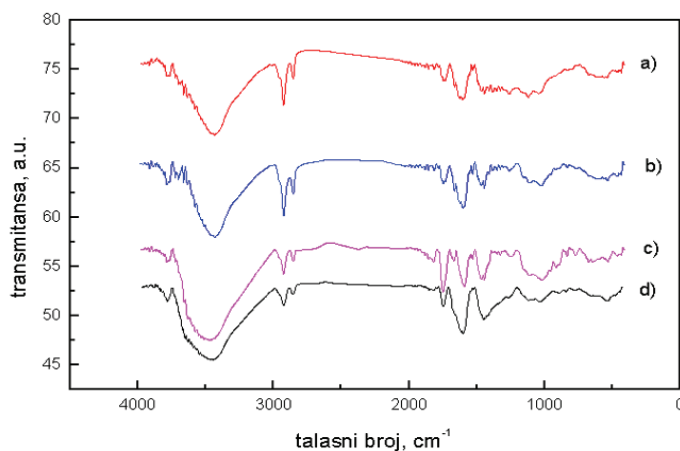
$$q_e = (c_0 - c_e) \times \frac{V}{m} \quad (2.1)$$

gde je c_0 -početna koncentracija rastvora (mg/l), c_e -koncentracija rastvora u ravnoteži (mg/l), V zapremina rastvora (l), m-masa adsorbenta (g).

3. Rezultati i diskusija

3.1. Karakterizacija adsorbenta

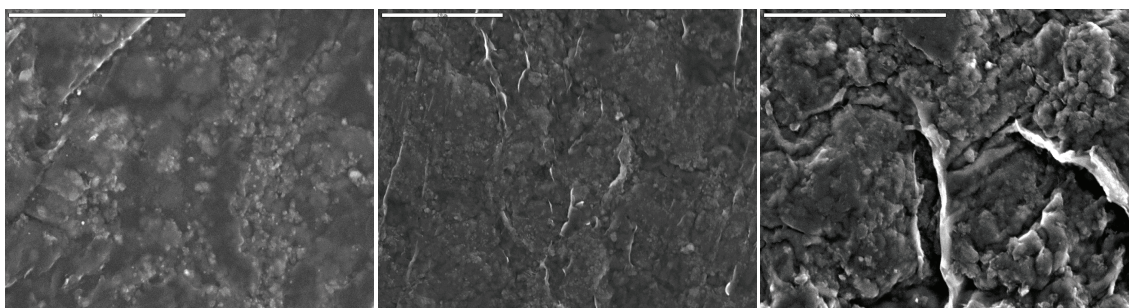
Na slici 3.1. su prikazani FTIR spektri amidovanog pektina, montmorilonita, i kompleksa AP/MMT.



Slika 3.1. FTIR spektri: a) AP/MMT 10%, b) AP/MMT 30%, c) AP/MMT 50%, d) AP/MMT 50% nakon adsorpcije boje

Na svim FTIR spektrima kompleksa AP/MMT mogu se uočiti vibracije istezanja estarskih grupa koje se nalaze oko 1750 cm^{-1} . Pikovi estarskih grupa se sa porastom udela montmorilonita u kompleksu pravilno pomeraju ka višim frekvencama. Amidna grupa iz AP se nalazi oko 1670 cm^{-1} , dok se hidroksilna grupa koja potiče iz AP i MMT nalazi oko 3450 cm^{-1} . Vibracije istezanja Si-O-Si grupa se nalaze oko 1022 cm^{-1} . Pikovi silikatnih grupa se pravilno pomeraju ka nižim frekvencama sa porastom udela MMT u kompleksu, a intenzitet ovih pikova takodje raste sa porastom udela MMT u kompleksu. Poredeći FTIR spektre amidovanog pektina i montmorilonita sa spektrima kompleksa AP/MMT, može se uočiti da je došlo do značajnog pomeranja pikova hidroksilne grupe ka višim vrednostima frekvenci, dok se pikovi estarske, amidne i silikatne grupe pomeraju ka nižim vrednostima frekvenci. Takodje, na svim FTIR spektrima kompleksa javlja se intenzivan novi pik oko 1590 cm^{-1} , koji predstavlja slobodne NH_3^+ grupe koje intereaguju sa negativno naelektrisanim grupama iz montmorilonita. Ovi rezultati nesumnjivo potvrđuju kompleksaciju između AP i MMT. Poredjenjem spektara kompleksa AP/MMT 50% pre i posle adsorpcije boje Basic Yellow, ne uočavaju se novi pikovi. Dolazi do pomeranja hidroksilnih, amidnih, estarskih i silikatnih grupa, što ukazuje da su ove grupe aktivno uključene u proces adsorpcije.

Na slici 3.2. je prikazana morfologija kompleksa AP/MMT 10%, AP/MMT 50% i kompleksa AP/MMT 50% nakon adsorpcije boje.



Slika 3.2. SEM mikrografi: AP/MMT 10% (veličina bara $20\text{ }\mu\text{m}$), AP/MMT 50% (veličina bara $20\text{ }\mu\text{m}$), uvećanje 1000 i AP/MMT 50% nakon adsorpcije (veličina bara $20\text{ }\mu\text{m}$), uvećanje 4000

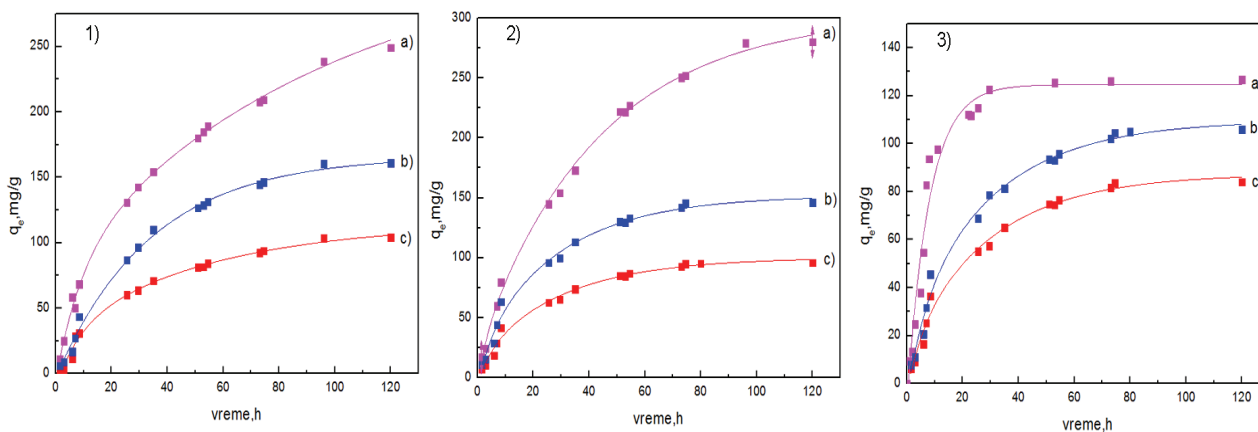
Na osnovu priloženih mikrografa, može se uočiti da je MMT ravnomerno raspoređen u kompleksu. Na površina kompleksa AP/MMT 10 % nalazi se mali broj ispupčenja i aglomerata. Pri povećanju udela MMT u kompleksu javlja se veći broj aglomerata i neravnina na površini. Nakon adsorpcije boje javlja se svetli sloj po površini, za koji se pretpostavlja da predstavlja adsorbovanu boju. Takodje, primećuje se povećan broj aglomerata nakon adsorpcije. SEM mikrografi ukazuju na to da

inkorporiranje MMT u matricu amidovanog pektina dovodi do povećane poroznosti naspram čistog amidovanog pektina, što predstavlja jedan od glavnih uticaja na kapacitet adsorpcije.

3.2. Uticaj početne koncentracije boje

Kinetika adsorpcije Basic Yellow 28 na komplekse AP/MMT je ispitivana pri početnim koncentracijama od 30, 50 i 80 mg/l. Kao referent za poredjenje ispitivan je i uticaj početne koncentracije na čist film amidovanog pektina.

Preliminarni rezultati su pokazali da se kapacitet adsorpcije smanjuje sa porastom mase adsorbenta pri konstantnom pH i koncentraciji boje. Takođe, ustanovljeno je da su ovi kompleksi stabilni pri pH vrednostima nižim od pKa ($\text{pH} < 3.5$), pa je uticaj koncentracije ispitivan pri pH2. Čist film amidovanog pektina se rastvara u vodenim rastvorima boje. Na slici 3.3 je prikazan efekat početne koncentracije na kapacitet adsorpcije za ove komplekse.



Slika 3.3. Uticaj početne koncentracije boje Basic Yellow na komplekse AP/MMT 10% (Slika 3.3.1.), 30% (Slika 3.3.2.) i 50% (Slika 3.3.3.) : a) 80 mg/l, b) 50 mg/l, c) 30 mg/l.

Početni uslovi: masa adsorbenta 15 ± 2 mg, pH2, $t = 20$ °C.

Sa porastom početne koncentracije rastvora boje raste kapacitet adsorpcije na kompleksima pri istom udelu MMT. Udeo montmorilonita u kompleksu ima veliki uticaj na kapacitet adsorpcije. Sa slike 3.3 se može uočiti da kapacitet adsorpcije raste sa porastom MMT u kompleksu do 30%, dok pri daljem porastu MMT u kompleksu, kapacitet adsorpcije opada. Pretpostavlja se da kapacitet adsorpcije opada pri udelu MMT 50% zbog lošije stabilnosti ovog kompleksa.

3.3. Uticaj temperature

Ispitivan je uticaj temperature na kinetiku adsorpcije Basic Yellow 28 boje na komplekse AP/MMT na sledećim temperaturama: 8 °C, 20 °C, 37 °C i 55 °C pri početnoj koncentraciji 30 mg/l. Pri porastu temperature rastvora boje koncentracije 30 mg/l ne dolazi ni do kakve promene u kapacitetu adsorpcije Basic Yellow 28 boje na komplekse AP/MMT, što znači da su ovi kompleksi efikasni i primenljivi za uklanjanje boje Basic Yellow 28 u širokom opsegu temperature.

4. Zaključak

U ovom radu je prikazana procedura dobijanja novog polimernog kompleksa na bazi amidovanog pektina i montmorilonita za uklanjanje katjonske boje Basic Yellow 28 iz vodenih rastvora. Ispitivan je uticaj početne koncentracije i temperature rastvora boje na kapacitet adsorpcije: Rezultati su pokazali da kapacitet adsorpcije raste sa porastom MMT u kompleksu do 30%, dok pri daljem porastu MMT u kompleksu, kapacitet adsorpcije opada. Glavna prednost ovog kompleksa kao adsorbenta naspram čistog amidovanog pektina je što je porozniji i efikasan u različitom opsegu temperature. Maksimalni procenat uklonjene boje iznosi 95%. Prednost ovih kompleksa kao adsorbentata naspram do sada ispitivanih za uklanjanje Basic Yellow 28 boje je što su biodegradabilni, netoksični, ekonomski prihvatljivi, i lako primenljivi u industriji.

Zahvalnica: Autori se zahvaljuju na finansijskoj pomoći Ministarstvu prosvete i nauke Republike Srbije (Projekti 43009 i 172062).

Polymer complexes based on amidated pectin and montmorillonite for removal of the Basic Yellow 28 dye from aqueous solutions

In this work the complexes based on amidated pectin and montmorillonite for removal of the Basic Yellow 28 dye were investigated. Complexes were characterized by FTIR spectroscopy and Scanning electron microscopy. The influence of initial concentration and temperature on adsorption capacity was studied. Also the influence of content of montmorillonite on adsorption capacity was investigated. The results showed that FTIR spectroscopy confirmed the complexation between amidated pectin and montmorillonite. Analysis of micrographs showed that the surface of the complexes was uniform. The adsorption capacity increased with increasing the content of montmorillonite up to 30%, but with further increase of the content of montmorillonite, the adsorption capacity decreased. The temperature of the dye solution had no influence on the adsorption capacity of Basic Yellow 28 dye onto complexes of amidated pectin/montmorillonite. The maximum adsorption capacity was obtained for amidated pectin/montmorillonite 30% sample and was 95%.

Literatura

1. K.Z. Elwakeel, J. Hazard. Mater. 2009,167, 383–392.
2. G.M. Walker, L.R. Weatherley, Sep. Sci. Technol. 2000, 35, 1329–1341.
3. S. Raghu, C. Ahmed Basha, J. Hazard. Mater. 2007,149,324–330.
4. O. Tunay, I. Kabdasli, D. Ohron, G. Cansever, Water Sci. Technol. 1999, 40, 237–244.
5. R.A. Masoud, A.A. Haroun, N.H. El-Sayed, J. Appl. Polym. Sci. 2006101, 174–179.
6. J. Liu, Paper Technol. 2005, 46, 31–36.
7. A. Slampova, D. Smela, A. Vondrackova, I. Jancarova, V. Kuban, Chem. Listy 2001, 95, 163–168.
8. S. Chaudhuri, K. Ray, U.R. Chaudhuri, R. Chakraborty, J. Food Sci. Technol. 2004, 41, 1–8.
9. R.J. Turesky, J.P. Freeman, R.D. Holland, D.M. Nestorick, D.W. Miller, D.L. Ratnasinghe, F.F. Kadlubar, Chem. Res. Toxicol. 2003, 16, 1162–1173.
10. V.K. Gupta, R. Jain, S. Varshney, J. Hazard. Mater. 2007,142 443–448.
11. R. Malik, D.S. Ramteke, S.R. Wate, Waste Manage. 2007, 27, 1129–1138.
12. K. Kadirvelu, M. Kavipriya, C. Karthika, M. Radhika, N. Vennilamani, S. Pattabhi, J. Biores. Technol. 2003, 87, 129–132.
13. A.R. Dinçer, Y. Günes, N. Karakaya, E. Günes, J. Biores. Technol. 2007, 98, 834–839.
14. D. Shen, J. Fan, W. Zhou, B. Gao, Q. Yue, Q. Kang, J.Hazard. Mater. 2009, 172, 99–107.
15. X.Y. Yang, B.Al-Duri, Chem Eng J 2001, 83, 15-23.
16. G McKay. Chem. Eng. J. 1983, 27, 187-196.
17. F.Rozada, L.F. Calvo, A.I. Garcia, J. Martin-Villacorta, M. Otero, Bioresour. Technol. 2003, 87, 221–230.
18. B. R Thakur, R. K. Singh, A. K. Handa, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 1997, 37, 47–73.
19. J. Cummings, D. Southgate, W. Branch, H. Wiggins, H. Houston, D. Jenkins, T. Jirraj, M. Hill, British Nutr J, 1979, 41, 477
20. M. Kartel, L. Kupchik, B. Veisov, Chemosphere, 1999, 38, 2591-2596.
21. Y. Mata, M.Blázquez, A.Ballester, F.González, J.Munoz, Chem. Eng. J., 1999, 150, 289–301.
22. S. Schiewer, A. Balaria, Chem. Eng. J. 2009, 146, 211–219.
23. E. Guibal, Sep Purif Technol 2004, 38, 43–74.
24. X.L. Wu, D. Zhao, S.T. Yang, Desalination 2011, 269, 84–91.
25. R.M. Torres Sánchez, M.J. Genet, E.M. Gaigneaux, M. Santos Afonso, S. Yunes, Appl Clay Sci 2011, 53, 366–373.
26. J. Zhu, V. Cozzolino, M. Pigna, Q. Huang, A.G. Caporale, A. Violante, Chemosphere 2011, 84, 484–489.

Sinteza i karakterizacija kompozitnih hidrogelova PMAA/zeolit A

Vesna V. Panić, Jelena G. Momić, Sava J. Veličković

Univerzitet u Beogradu, Tehnološko metalurški fakultet, Beograd, Srbija

Uvod

Hidrogelovi su polimerni materijali, trodimenzionalne, slabo umrežene strukture. Sposobni su da apsorbuju i zadrže velike količine vode ili drugih fluida, a da se pri tome ne rastvaraju.¹ Poslednjih godina sve više pažnje se fokusira na hidrogelove osjetljive na spoljne stimulanse ili takozvane „inteligentne“ hidrogelove čija svojstva mogu da se kontrolišu ne samo promenom molekulske strukture, već i podešavanjem spoljašnjih uslova. Karakteristično svojstvo koje ih u stvari čini „inteligentnim“ je njihova sposobnost da promenom jednog ili više svojstava odgovore na veoma male promene u spoljašnjoj sredini. Jedinstvenost ovih materijala leži i u činjenici da su ove promene reverzibilne. Zbog pogodnih svojstava našli su primenu u oblasti kontrolisanog i ciljanog otpuštanja supstanci, kozmetici, inženjerstvu tkiva i regenerativnoj medicini kao matrice za reparaciju i regeneraciju tkiva i organa, imobilizaciji i separaciji biomolekula i ćelija, uklanjanju polutanata iz otpadnih voda, itd. I pored velikih mogućnosti, postoje i ograničavajući faktori u primeni hidrogelova i to su pre svega slaba mehanička svojstva i nedovoljno brz odziv na spoljašnji stimulan, pa je prevazilaženje ovih nedostataka smernica za buduća istraživanja ovih materijala.

Sa ciljem da se dobiju novi materijali, boljih svojstava, u ovom radu su sintetisani kompozitni hidrogelovi na bazi poli(metakrilne kiseline) (PMAA) i neorganskog punila, zeolita A, u koncentracijama 0-30 mas%.

Rezultati i diskusija

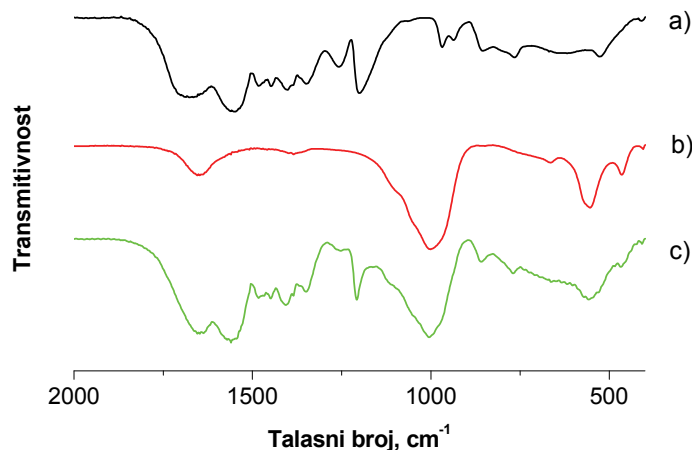
Sinteza kompozitnih hidrogelova PMAA/zeolit A kao i čistog PMAA hidrogela izvedena je slobodno radikalskom polimerizacijom i umrežavanjem u vodenom rastvoru na 80 °C i u prisustvu umreživača N,N'-metilenbisakrilamida (Aldrich Chemical Co., SAD) i inicijatora 2,2'-azobis[2-(2-imidazolin-2-il)propan] dihidrohlorida (Wako Pure Chemicals Industries, Ltd., Japan). Korišćena je modifikacija ranije opisane metode za dobijanje hidrogelova na bazi metakrilne kiseline², pri čemu je posle neutralizacije metakrilne kiseline (Merck KGaA, Nemačka), do stepena neutralizacije od 80%, natrijum hidroksidom (Zorka Pharma, Srbija) u reakcionu smešu dodat zeolit. Po završetku reakcije, dobijeni proizvodi su izvađeni iz kalupa, isečeni u obliku diskova (prečnika 10 mm i oko 2 mm debljine) i potopljeni u destilovanu vodu. Voda je menjana svakih 2-3 h, osim noću, tokom 7 dana, kako bi se uklonila rastvorna (sol) frakcija polimera, nevezan zeolit i neizreagovali monomer. Isprani hidrogelovi su sušeni u sušnici na 40 °C, do konstantne mase i kao takvi korišćeni u svim eksperimentima. Navedene hemikalije su upotrebljene u obliku dobijenom od proizvođača, bez daljeg prečišćavanja. U svim eksperimentima je korišćena destilovana voda. Ispitivanje pH-osetljivosti izvršeno je u puferima pH vrednosti 4.0, 5.0, 6.4 i 7.4, svi nabavljeni od firme Mol a.d., Srbija.

Karakterisanje dobijenih kompozita izvedeno je primenom infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom (FTIR)(Bomem MB 100), termogravimetrijske (TGA)(SDT Q600) i dinamičko-mehaničke (DMA)(Reometrics RMS 605) analize, skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM)(JEOL JSM-6610LV) i praćenjem ponašanja pri bubrenju pod uticajem različitih eksperimentalnih uslova: prirode i pH medijuma, temperature i dejstva mikrotalasnog polja (mikrotalasni reaktor CEM Discovery).

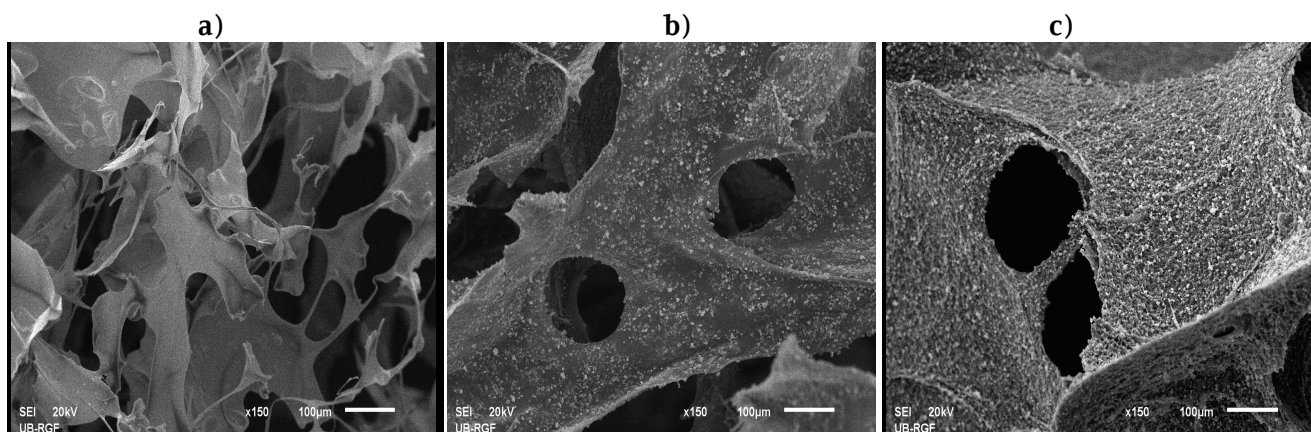
Na Slici 1. su prikazani FTIR spektri referentnog PMAA hidrogela, zeolita A i kompozitnog hidrogela PMAA/zeolit A sa 15 mas% punila. Spektar kompozita pokazuje pikove karakteristične i za PMAA i za zeolit A, pri čemu su njihova pomeranja veoma mala, kao i da nema novih pikova. Ovo ukazuje da su kompozitni hidrogelovi PMAA/zeolit A uspešno sintetisani i da su interakcije uspostavljene između polimerne matrice i zeolita fizičke, najverovatnije vodonične veze.

SEM mikrografi poprečnih preseka ispitivanih kompozitnih hidrogelova PMAA/zeolit A, kao i referentnog PMAA hidrogela, prethodno nabubrelih do ravnoteže u destilovanoj vodi i liofilizovanih (Slika 2.) pokazuju da je zeolit ravnomerno raspoređen u PMAA matrici i to u slučaju obe koncentracije zeolita. Za razliku od glatke površine zidova kod referentnog PMAA hidrogela, kompoziti imaju prilično grube i hrapave površine, pri čemu ovaj efekat raste sa porastom koncentracije zeolita. Inkorporiranje

15 mas% neorganskog punila nije promenilo strukturu kompozita u odnosu na čist PMAA hidrogel; iskidana struktura sa velikim šupljinama je u ovom slučaju zadržana. Veća koncentracija zeolita, ipak, čini strukturu odgovarajućeg kompozita mnogo krućom, sa jasnije izraženim porama.

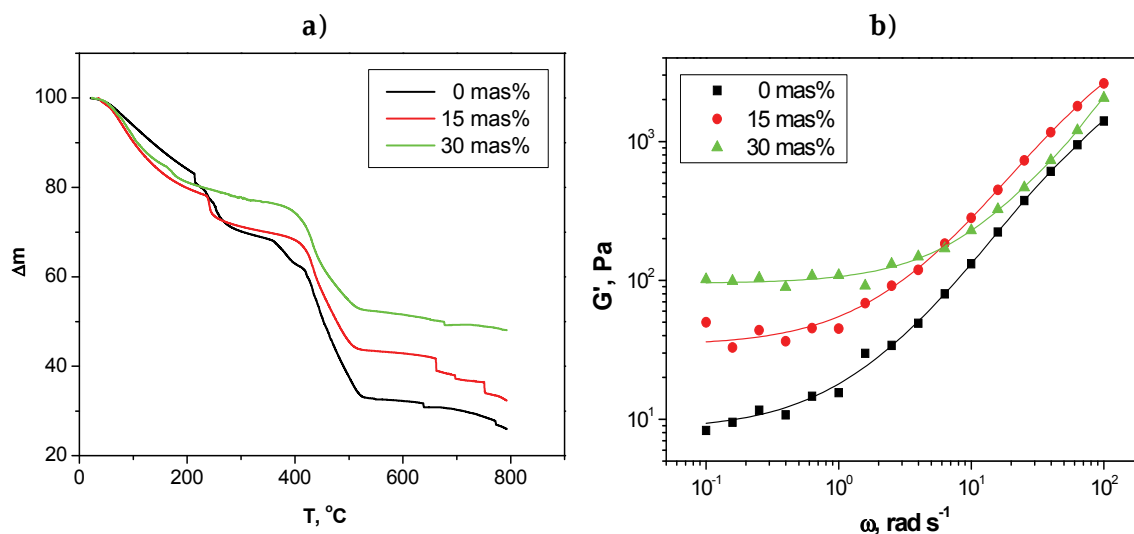


Slika 1. FTIR spektri a) PMAA hidrogela, b) zeolita A i c) kompozita PMAA/zeolit A sa 15 mas% punila.



Slika 2. SEM mikrografi a) PMAA hidrogela i kompozitnih hidrogelova PMAA/zeolit A sa različitim koncentracijama zeolita b) 15 mas% i c) 30 mas% (uvećanje 150 x, 'bar' 100 μm)

TGA i DMA krive za kompozitne hidrogelove PMAA/zeolit A i referentni PMAA hidrogel su prikazane na Slici 3.



Slika 3. a) TGA i b) DMA krive za kompozitne hidrogelove PMAA/zeolit A sa različitim koncentracijama zeolita

Na prikazanim termogramima se vidi da se degradacija svih ispitivanih sistema odvija u tri faze: prvo se uklanjanje voda, a zatim započinje degradacija gde prvo dolazi do raskidanja veza u bočnim -COOH grupama uz oslobađanje molekula vode i formiranja polianhidrida, a potom i do dekarboksilacije i intenzivnog kidanja osnovnog lanca, aromatizacije i na kraju nastanka ugljeničnog ostatka. Kako sa povećanjem koncentracije zeolita temperature na kojim počinju navedene faze degradacije rastu, termička stabilnost sintetisanih kompozita je povećana u odnosu na čist PMAA hidrogel. Dobijeni rezultati jasno pokazuju da se zeolit A ponaša kao aktivno punilo u ispitivanim kompozitima, odnosno da su uspostavljene najverovatnije vodonične interakcije između -COOH grupa u polimernoj matrici i T-O-T (T=Si ili Al) grupa zeolita.

Na Slici 3. b) se uočava da sa porastom koncentracije zeolita u kompozitima PMAA/zeolit A plato modula sačuvane energije (G') raste, odnosno sintetisani kompoziti imaju bolja mehanička svojstva. G' nije konstantan u celom opsegu frekvencija (ω); sa porastom koncentracije zeolita proširuje se oblast platoa i G' se manje menja sa porastom ω . Ovakav uticaj povećanja koncentracije zeolita na G' ukazuje na povećanje elastičnog odgovora materijala, što se može pripisati smanjenju rastojanja između čestica čvrstog zeolita, formiranju mreže zeolita i dominaciji interakcija zeolit-zeolit nad interakcijama polimer-polimer usled veće koncentracije zeolita.

Kinetika bubrenja u vodi na 25 °C analizirana je primenom semi-empirijske jednačine $m_t/m_\infty = kt^n$ (1), gde su m_t i m_∞ masa vode apsorbirana u trenutku t , odnosno pri dostizanju ravnoteže, n karakterističan eksponent koji opisuje mehanizam transporta penetranta i zavisi od oblika uzorka, koeficijent k karakteristična konstanta hidrogela koja predstavlja konstantu brzine ovog modela i t vreme bubrenja.³ Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 1.

Tabela 1. Vrednosti ravnotežnog stepena bubrenja kompozita PMAA/zeolit A u vodi na 25 °C, parametri n , k

Kompozit	SD_{eq}	$k \times 10^3 / \text{min}^{-n}$	n
PMAA/0	420	1.0	1.3
PMAA/10A	104	0.15	1.9
PMAA/15A	90	0.24	1.7
PMAA/20A	80	0.13	1.9
PMAA/30A	41	0.45	1.6

Inkorporiranje zeolita značajno smanjuje vrednosti ravnotežnog stepena bubrenja ($SD_{eq} = (m_\infty - m_0)/m_0$) i parametra k kompozita PMAA/zeolit A u odnosu na PMAA hidrogel, dok su vrednosti eksponenta n veće.

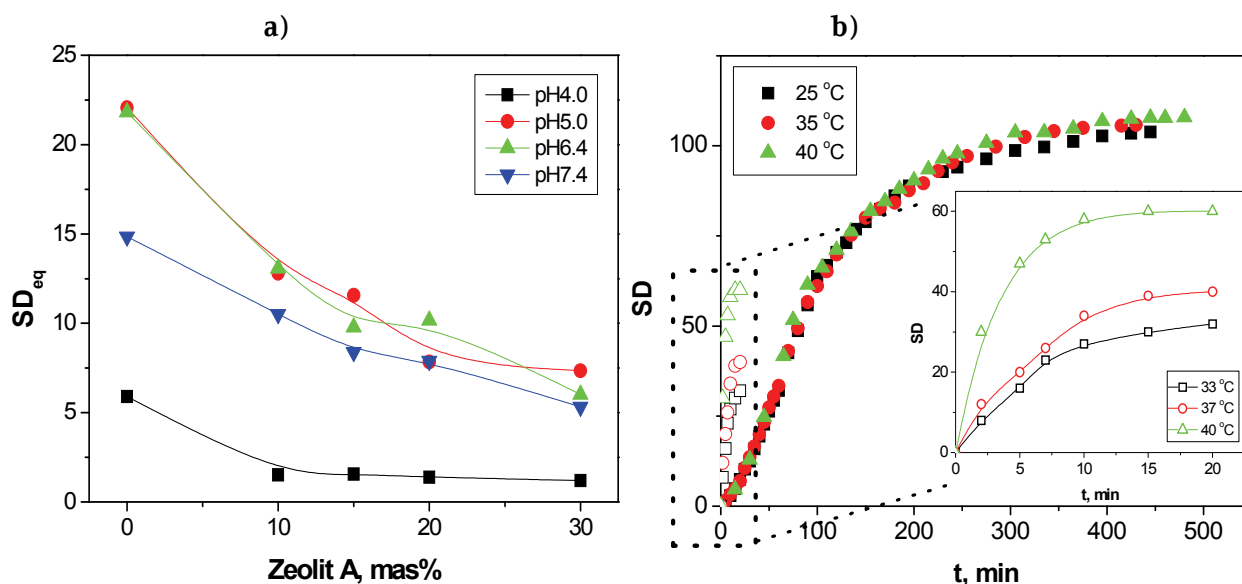
pH-osetljivost kompozita PMAA/zeolit A i čistog PMAA hidrogela pokazana je na Slici 4. a). Evidentno je da svi hidrogelovi mnogo manje bubre u puferima nego u destilovanoj vodi: na $\text{pH} < \text{pKa}$ (oko 5.5) usled sprečene jonizacije -COOH grupa, a na $\text{pH} > \text{pKa}$ usled prisustva jona koji sprečavaju odbijanje -COO⁻ grupa. Povećanje koncentracije zeolita vodi smanjenju SD_{eq} u svim korišćenim medijima što može da se objasni stvaranjem dodatnog fizičkog umreženja, prostim zauzimanjem slobodne zapremine u polimernoj matrici ili nastankom interakcija polimer-neorgansko punilo.

Na Slici 4. b) su prikazane krive bubrenja kompozita PMAA/zeolit A u sušnici i pod dejstvom mikrotalasnog polja promenljive snage (0-30 W) na različitim temperaturama.

Dobijeni eksperimentalni podaci su analizirani primenom jednačine (1), a dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 2.

Tabela 2. Vrednosti karakterističnih parametara bubrenja kompozita PMAA/zeolit A sa 10 mas% zeolita u vodi, konvencionalno (u sušnici) i u mikrotalasnom polju, u funkciji temperature

Parametri	Konvencionalno (u sušnici)			Mikrotalasno polje		
Temperatura, °C	25	35	40	33	37	40
SD_{eq}	104	106	110	32	40	60.2
k / min^{-n}	1.5×10^{-4}			0.146	0.188	0.382
n	1.9			0.78	0.64	0.42



Slika 4. a) Uticaj pH medijuma na ravnotežni stepen bubrenja kompozita PMAA/zeolit A u funkciji koncentracije zeolita; b) Krive bubrenja kompozitnog hidrogela PMAA/zeolit A sa 10 mas% zeolita konvencionalno u sušnici (puni znaci) i u mikrotalasnom polju promenljive jačine (max 30 W) (šuplji znaci), na navedenim temperaturama

Prvo se uočava da su pod dejstvom mikrotalasnog polja vrednosti SD_{eq} značajno smanjene u odnosu na klasično bubrenje u sušnici, a istovremeno je izražen i uticaj temperature; sa porastom temperature od 33 °C do 40 °C, ravnotežni stepen bubrenja poraste blizu 100%. Najznačajniji efekat mikrotalasnog polja, koji je i zaslužan za izuzetnu popularnost i sve veću primenu u velikom broju oblasti, jeste ubrzanje procesa. Vrednost konstante k koje su za tri reda veličine veće u odnosu na odgovarajuće vrednosti dobijene pri klasičnom bubrenju jasno pokazuju da je ovaj efekat mikrotalasnog polja ispoljen pri bubrenju ispitivanog kompozita. Usled uticaja mikrotalasnog polja, eksponent n opada sa porastom temperature, u datom opsegu, od 0,78 do 0,42, ukazujući na promenu mehanizma transporta penetranta od ne-Fick-ove ka Fick-ovoj difuziji, odnosno na promenu procesa koji kontroliše brzinu bubrenja u mikrotalasnom polju od konkurentno difuziono-relaksacionog do potpuno difuziono kontrolisanog procesa. Može da se zaključi da je kompozit PMAA/10A osetljiv na dejstvo mikrotalasnog polja.

Zaključak

Modifikacija hidrogela na bazi delimično neutralisane metakrilne kiseline zeolitom A uspešno je izvedena i dala je nove materijale, u kojima je zeolit ravnomerno raspoređen u PMAA matrici. Utvrđeno je da su ostvarene fizičke interakcije, najverovatnije vodonične veze kao i da sintetisani kompoziti imaju bolja mehanička svojstva i veću termičku stabilnost u odnosu na referentni hidrogel, da su zadržali pH-osetljivost, dok su u ispitivanom temperaturnom opsegu potpuno neosetljivi na promenu temperature ukoliko nisu izloženi dejstvu mikrotalasnog polja. Vrednosti ravnotežnog stepena bubrenja u mikrotalasnom polju su značajno smanjene, ali je njegovom primenom brzina odziva pri bubrenju kompozitnih hidrogelova povećana za tri reda veličine u odnosu na klasično bubrenje u sušnici.

Zahvalnica: Autori se zahvaljuju na finansijskoj pomoći Ministarstvu prosvete i nauke Republike Srbije (Projekat 172062).

The synthesis and characterization of PMMA/zeolite a composite hydrogels

Composite hydrogels based on partially neutralized poly(methacrylic acid)(PMAA) matrix and inorganic filler of zeolite A type at concentrations of 0-30 wt%, were synthesized by free-radical polymerization and crosslinking. The characterization of the obtained composites was performed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Scanning Electron Microscopy, Dynamic-mechanical and Thermogravimetric analysis and by monitoring the swelling behavior at different solution pH, temperature and under the influence of microwave field. It is found that the zeolite particles are distributed uniformly in the PMAA matrix and that the

established interactions are physical, probably hydrogen bonds. It is shown that composites with better mechanical properties and higher thermal stability with respect to pure PMAA hydrogel were synthesized. PMAA/zeolite A hydrogel composites are also found to be sensitive to microwave field and change of solution pH, while completely insensitive to temperature changes in the investigated temperature range unless they are exposed to microwave field.

Literatura

1. N.A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, H. Ichikawa. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **50** (2000) 27
2. V.V. Panić, B.K. Adnađević, S.J. Veličković, J.D. Jovanović. *Chem. Eng. J.* **156** (2010) 206
3. P.L. Ritger, N.A. Peppas. *J. Contr. Rel.* **5** (1987) 37

Hemija životne sredine / Environmental Chemistry**Determination of pesticide residues in working clothes**

Nenad Andrić, Dragan Marković*

*Galenika Fitofarmacija AD, Batajnički drum bb, Zemun***Fakultet za primenjenu ekologiju FUTURA, Lazarevački drum 13, Beograd***Introduction**

Pesticides are chemical substances which are used in farming, fruit growing, forestry as well as in communal hygiene. These chemicals are used for plant protection. They are used to control insect pests and plant diseases, for the destruction of weeds and to preserve the quality of agricultural products and increase yields, control of parasites and diseases dangerous to humans and animals.¹

Due to the relatively low price, pesticides for plant protection are in massive use. Agricultural production can not be imagined without use of these products. Effective destruction of harmful organisms increases their use. Uncontrolled use of pesticides has led to their accumulation in streams and through the food chain in man. The effectiveness of their action depends on the dose of pesticide, the form of pesticides, application methods, and selectivity. The degradation rates of pesticides. The efficiency of late effects depends both on the properties of pesticides and the conditions in which they are applied. Based on these properties, we can determine the persistence of pesticides in the field. Because of their stability and durability (particularly organophosphorus compounds), they can be distributed and finally accumulate in plants, animals and in the environment. Mechanisms for vertical transport behavior they can act far away from the source, which is characterized by their residue effects. They can move in the form of aerosols, by migration of wind, animals and people, by transport of material and food. Because of this, pesticides can often cause considerable secondary effects.^{2,3}

After use, pesticides undergo different physical and biochemical processes. While in some cases ends up as non-hazardous materials, in other cases they can be transformed into toxic substances in agricultural products, soil and water. The original or modified chemical structure of pesticides is essential. The presence of residues in the environment can be achieved if pesticides are disintegrated to products that are still abundant in the environment. In other words, pesticide molecules needs to be converted into fragments of biogenic substances such as sugar, lipids, carboxylic acids and inorganic compounds. The case of organophosphorus compounds where in the final stage of decomposition occurs phosphoric acid.⁴

Experimental

This kind of experiment is rare in Serbia because attention is given to the contaminated working clothes. The constantly wear pesticides can be endangered, because even the small dose contamination can be dangerous, depending bioaccumulation effect. Long term exposition to the pesticides can cause serious problems. Purpose of this experiment is to draw attention on this type of pollution and to prevent it.

The aim of the experiment was to determine the possible pesticide residues of active substances in the working clothes. Working clothes is the material used in the laboratory for testing of pesticides and it involves working coats, shirts, pants. For better comparison, the experiment was performed on a sample of clean and dirty laundry (working clothes from the laboratory). Clean laundry was washed in a washing machine with water and 100 ml of detergent. The same was done with work clothes. Washing machine is programmed to wash for 30 minutes at 40 °C. After washing, twice per one liter of water from the clean laundry was taken and once per one liter of water from the dirty laundry. Samples were stored in PEV bottles. Liter of water from the clean laundry was extracted with dichloromethane in a separating funnel. 400 ml of sample was transferred from PEV bottle to the separation funnel and then added 100 ml of dichloromethane. The sample was stirred and extracted in a glass. The same procedure was repeated with the next 400 ml. A further 200 ml of water from clean laundry was transferred into the funnel and added 50 ml of dichloromethane. The extract was also transferred into the cup. After these three extractions, in the glass is now 250 ml of dichloromethane and the analytes from the sample. The entire

**POVUČEN
WITHDRAWN**

extraction procedure was repeated, only this time three times of 300 ml of sample was extracted with 250 ml of dichloromethane (containing analytes) from the cup. Again, we get 250 ml of dichloromethane containing unknown analytes. This sample was evaporated in the water bath to a volume of 10 ml. In this way the sample was concentrated. Extraction was performed in the same manner with the next liter of water from the clean laundry. The same procedure was applied on water samples of work clothes, i.e., contaminated laundry. Analysis of these four samples was performed on the gas-mass chromatograph.^{4,5}

The conditions of gas-mass chromatograph GC/MS Agilent were as follows:

Oven - 100 °C Inlet - 250 °C Column 1 flow - 1.2 Aux 2 - 200 °C Run time is 60 minutes.

Results and discussion

GC/MS analysis of the identified compounds is shown in the tables. Only compounds with high accuracy rate of 90% were taken under consideration.

Table 1. Water from clean laundry sample 1

Compound	Clean laundry sample 1 Percentage of accuracy	Possible origin
2 h-1-benzopyran-2-one	91%	Nicotine, alcohol
Cyclopentane acetyl acid	90%	-
Tetradecanoic acid	91%	Fat, butter, palm oil
Pentadecanoic acid	91%	Cow milk, butter
1-heneicosanol	94%	Glycerin from human tissue, plant oil
Cis-9 hexadecenoic acid	91%	-
n-hexadecanoic acid	91%	-
Behenyl alcohol	96%	Cosmetics
Squalene	97%	Human organic compound which is important for synthesis of cholesterol, steroids and vitamins; prevents cancer
Oleic acid	99%	Fat acid from plant and animal fats
Cyclotetradecane	94%	-
Dotriacontyl pentafluoropropionate	90%	-
Heptaethylene glycol monodecyl ether	91%	Detergent
Methyl 3,5 heptadiene 2-one	91%	-

Table 2. Water from contaminated laundry sample 2

Compound	Clean laundry sample 2 Percentage of accuracy	Possible origin
2 h-1-benzopyran-2-one	90%	Nicotine, alcohol
Cyclopentane acetyl acid	90%	-
Tetradecanoic acid	99%	Fat, butter, palm oil
Pentadecanoic acid	96%	Cow milk, butter
Cis-9 hexadecenoic acid	96%	Glycerin from human tissue, plant oil
n-hexadecanoic acid	97%	-
Behenyl alcohol	95%	Cosmetics
Squalene	95%	Human organic compound which is important for synthesis of cholesterol, steroids and vitamins; prevents cancer
Oleic acid	99%	Fat acid from plant and animal fats
Cyclotetradecane	94%	-
Dotriacontyl pentafluoropropionate	90%	-
Heptaethylene glycol monodecyl ether	91%	Detergent
Methyl 3,5 heptadiene 2-one	91%	-
Tetra pentacontane 1,54 dibromo	90%	-
n tetraconasol 1	95%	-
n nonadecanol 1	95%	-

**POVUČEN
WITHDRAWN**

Table 3. Water from work clothes – sample 1

Compound	Work clothes-sample 1 Percentage of accuracy	Possible origin
Dimethyl ester	91%	Polyester, polyamide fiber
Indole	96%	Faeces, perfume
Nicotine	95%	Nicotine smoke
N decanoic acid	96%	Perfume, colour
Cyclopentane acetic acid	94%	
Tetradecanoic acid	93%	Palm butter, palm oil
Terbutylazine	95%	Herbicide
Cis 9 hexadecenoic acid	98%	Glycerin from human tissue, plant oil
Ascorbic acid	90%	Vitamine C
n-nonadecanol-1	93%	Alcohol
Cyclopentadecane	93%	
1-octadecene	96%	
Pentadecyl pentafluoropropionate	94%	
Oleic acid	99%	Fat acid from plant and animal fats
Phenol	91%	Nylon, detergent, herbicide
Phenylethyl alcohol	90%	Perfume, soap, cigarettes
Cholesterol	99%	Cholesterol
Ethanol	97%	Ethanol
Nonanoic acid	96%	
2 h-1-benzopyran-2-one	98%	Nicotine, alcohol
Diethyl phthalate	94%	Cosmetics, detergent, deodorant
Oleic acid	99%	
Bis(2 ethylhexyl) phthalate	98%	Plastic, PVC from clothes

Table 4. Water from work clothes – sample 2

Compound	Work clothes-sample 2 Percentage of accuracy	Possible origin
Dimethyl ester	91%	Polyester, polyamide fiber
Indole	96%	Faeces, perfume
Nicotine	95%	Nicotine smoke
N decanoic acid	97%	Perfume, colour
Cyclopentane acetic acid	92%	
Tetradecanoic acid	97%	Palm butter, palm oil
Terbutylazine	94%	Herbicide
Cis 9 hexadecenoic acid	99%	Glycerin from human tissue, plant oil
Ascorbic acid	91%	Vitamine C
n-nonadecanol-1	93%	Alcohol
Cyclopentadecane	93%	
Pentadecyl pentafluoropropionate	94%	
Oleic acid	99%	Fat acid from plant and animal fats
Phenol	91%	Nylon, detergent, herbicide
Phenylethyl alcohol	90%	Perfume, soap, cigarettes
Cholesterol	99%	Cholesterol
Ethanol	97%	Ethanol
2 h-1-benzopyran-2-one	98%	Nicotine, alcohol
Diethyl phthalate	94%	Cosmetics, detergent, deodorant
Bis(2 ethylhexyl) phthalate	98%	Plastic, PVC from clothes
Behenyl alcohol	94%	Cosmetics
Squalene	90%	Human organic compound which is important for synthesis of cholesterol, steroids and vitamins; prevents cancer

POVUČEN
WITHDRAWN

The results obtained for pure water are expected and there is no trace of contamination in them. Basically, the same compounds were found in both samples of pure linen, with similar percentages of accuracy. Similarly with the water samples of work clothes, the compounds are generally the same in both samples and with a similar percentage of accuracy. However, in water samples from the work clothes was found one pesticide - terbutylazine, which was the purpose of this experiment. Terbutylazin is a herbicide which is used to spray sunflower and maize. It belongs to the triazine group and to the third category of toxins. It is not known whether is carcinogenic, but it has low acute toxicity. Terbutylazine is irritating to skin, eyes and respiratory tract. If it is found in water, it can

affect the growth, physiology and plant populations. This herbicide accumulates in fish, phytoplanktons and zooplanktons. For a fish is moderately toxic and highly toxic to zooplankton. Terbutylazine is persistent in aquatic systems, because it is poorly hydrolysed and it is resistant to photolysis. If the pH of water is between 5 and 9 this pesticide is stable from 86 to over 200 days. There is no evidence that in small doses terbutylazine is harmful to humans and animals.^{6, 7, 8}

Conclusion

Although only one pesticide was found, we can consider that the experiment succeeded. High resistance to hydrolysis explains presence of terbutylazine in water samples of work clothes. Work clothes were in contact with other active substances, but their presence was not detected probably due to their instability in aqueous systems. This experiment went only to the qualitative determination of pesticide residues in working clothes, which is a good start for their quantitative determination in the future. The next step is to attempt quantitative determination of pesticide in work clothes.

References

1. D. Minić, *Hemija pesticida, dobijanje i primena*, Nauka, Beograd, 1995.
2. D. Veselinović, I. Grzečić, Š. Đarmatić, *Terbutilazina i procesi u životnoj sredini*, Beograd, 1995.
3. N. Mitić, *Pesticidi u poljoprivredi i marnarstvu u Srbiji i ovoj Gori*, Društvo za hemiju Srbije, 2004.
4. B. Dalmacija - *Kontrola kvaliteta voda u Srbiji za hemiju*, Novi Sad, 2004.
5. V. Jovanović, M. Kopećni, S. Milošević, A. Jovanović, A. Spirić, *Terbutilazina, teorijski i praktični aspekti*, Institut za nauku i nauku Vinca, 1988.
6. <http://www.pesticideip.org/pesticideip.html>
7. http://www.who.int/water_sanitation_health/dwg/chemicals/terbutylazine.pdf
8. <http://www.alanwood.net/pesticides/terbutylazine.html>

**POZUČEN
WITHDRAWN**

Total VOCs emissions from screen printing

Jelena Kiurski, Savka Adamović, Ivana Oros, Dragan Adamović and Jelena Krstić

University of Novi Sad, Faculty of Technical Sciences, Trg Dositeja Obradovića 6, 21000 Novi Sad,
Republic of Serbia, e-mail: kiurski@uns.ac.rs

Abstract. The objective of this study was to characterize the indoor air quality (IAQ) in four screen printing facilities of Novi Sad, Republic of Serbia. For that purpose, total VOCs concentrations were monitored by a mobile gas chromatograph during the screen printing production. The highest total VOC concentration was detected in printing facility SPF 2, due to the usage of high-VOC chemicals in the production. The level of total VOC in SPF 2 (172 ppm) was almost 2 to 105 times higher than the highest concentrations in other three facilities. The obtained results could be useful for the risk assessment of indoor exposure to total VOCs, and also for the creation of IAQ guidelines of the Republic of Serbia.

Introduction

Screen printing is a short-run process that prints on almost any substrate, and involves forcing ink through a stencil in which the image areas are porous. The screens are generally made of silk, nylon, or metal mesh. Screen printing is used for signs, displays, electronics, wallpaper, greeting cards, ceramics, decals, banners, and textiles. Ink systems used in screen printing include ultra-violet cure, water-borne, solvent-borne, and plastisol (polyvinyl chloride), which is mainly used in textile printing. Solvent-based ink systems contain aliphatic, aromatic, and oxygenated organic solvents¹. Both sheet-fed and web presses are used in screen printing. The substrate can be dried after each printing station or, in the case of absorbent substrates, after all colors are printed. Solvent and water-borne inks are dried in hot-air or infra-red drying ovens. Dryer gases are partially recycled and partially vented²⁻⁶.

During printing, screen printers use cleanup solvents to clean the excess ink from the screens. All screen printers remove the ink from the screens after printing when the screens are saved for the next run or recycled for reuse. The cleaners that are used today may contain toxic materials that pose a risk to workers and community members and virtually all of them are classified as VOCs that contribute to smog.

The most appropriate method for determining VOC emissions from printing activities is a gas chromatography. In determining the VOC emission from a printing operation, it is important to take into account the amount of used chemicals as well as the dimensions and geometry of the facility, ambient parameters (temperature, relative humidity and light intensity) and the presence of ventilation system^{7,8}.

The objective of this study was to determine the main emission sources and workers exposure of total VOCs during production process in screen printing, as like as to correlate total VOCs concentrations with the sampling time.

Materials and methods

Description of the screen printing facilities

The measurements of total VOCs were performed in four screen printing facilities (SPF 1 - 4) of Novi Sad, Republic of Serbia. All investigated screen printing facilities are small and similar in area (50 - 70 m²), number of employees (3 - 4) and production volume (50 - 70 printed products per hour), but different in the type of printed products (SPF 1 - advertising cardboards, SPF 2 - folders, SPF 3 - T-shirts, and SPF 4 - advertising labels). The printing facilities were not air-conditioned and ventilated by the appropriate ventilation system.

Sampling points

The sampling points were defined based on the following criteria: (i) flow of screen printing process, (ii) workers' stations during printing process, (iii) availability of the emission sources of total VOCs, and (iv) used chemicals and substrates. The desk with a screen holder was selected as the uniquely sampling point in all screen printing facilities.

Sampling methods

Air samples were collected and analyzed in situ for 6 times, once per 40 minutes, during 4 hours by mobile gas chromatograph Voyager, Photovac, Inc. During the sampling, mobile gas chromatograph was located approximately 0.5 m from the sampling point.

Results and discussion

Total VOCs measurements

The quality of indoor air inside workplaces is important not only for workers' comfort but also for their health. Poor indoor air quality (IAQ) has been tied to symptoms like headaches, fatigue, trouble concentrating, and irritation of the eyes, nose, throat and lungs. Also, some specific diseases have been linked to specific air contaminants or indoor environments, like asthma with damp indoor environments.

Many factors affect IAQ. These factors include poor ventilation (lack of outside air), problems controlling temperature, high or low humidity, recent remodeling, and other activities in or near a printing facility that can affect the fresh air coming into the printing facility. Sometimes, specific contaminants like dust from construction or renovation, mold, cleaning supplies, pesticides, or other airborne chemicals (including small amounts of chemicals released as a gas over time) may cause poor IAQ⁹.

Reducing exposure to chemicals in the workplace is a preventative action that can lead to improved outcomes for both worker health and to the screen printing environment.

Concentrations data of total VOCs were obtained promptly, registering current situation of the working environment in four SPFs of Novi Sad. Total VOCs concentration levels were automatically monitored. The obtained emissions data for total VOCs are presented in Table 1.

Table 1 Concentrations of total VOCs in screen printing facilities

Screen printing facility	Concentration, ppm					
	Sampling time, min					
	40	80	120	160	200	240
SPF 1	0.411	0.655	0.423	1.633	0.597	0.448
SPF 2	0.422	0.693	2.237	23.830	172.000	13.700
SPF 3	1.085	0.490	25.158	1.242	0.311	1.279
SPF 4	3.905	5.007	80.352	24.158	7.519	2.212

The experimental data confirmed the increased total VOCs concentrations from 0.311 to 172 ppm, Table 1. Emissions in printing facilities are resulted from production process and evaporation of organic compounds from raw printing materials (emulsion, solvent, ink, cleaning solution and adhesive). The results suggest that screen printing process is a source of indoor air contamination.

Long-term exposure to total VOCs in indoor environments may cause a number of adverse health effects on workers. Thus, the first phase in the exposure control is to eliminate individual and total VOCs from the workplace air. This can be achieved through substitution work in a closed circuit, modification of the work methods and introduction of ventilation systems. It is also important to use water-soluble instead of solvent-based printing inks in order to minimize use of conventional solvents and reduce the VOC emissions.

Correlation between total VOCs and sampling time

During the investigation, different production processes (pre press, press and post press) took place in the different time intervals which could explain the appearance of maximum total VOCs concentrations in SPFs 1 - 4, Figure 1. Taking into consideration that the investigated screen printing facilities are different in the type of printed products, as well as the type and amount of used substrates and inks, it is evident that the total VOCs concentration detected should be different. The use of large amounts of

inks leads to an increase in the total VOCs concentrations. Also, the screen cleaning process with the high-VOC liquid solvent contributes to increasing of the total VOCs concentrations.

The examination of the correlation between total VOCs concentrations and sampling time (Figure 1) showed some significant linear dependence of total VOCs on sampling time. As the printing process was continuous, there was a linear dependence between total VOCs and sampling time. Specifically, the maxima of total VOCs concentrations were observed between 120 and 200 minutes, due to the production volume. At the end of the printing run, the total VOCs/sampling time dependence was discontinued and total VOC concentrations decreased.

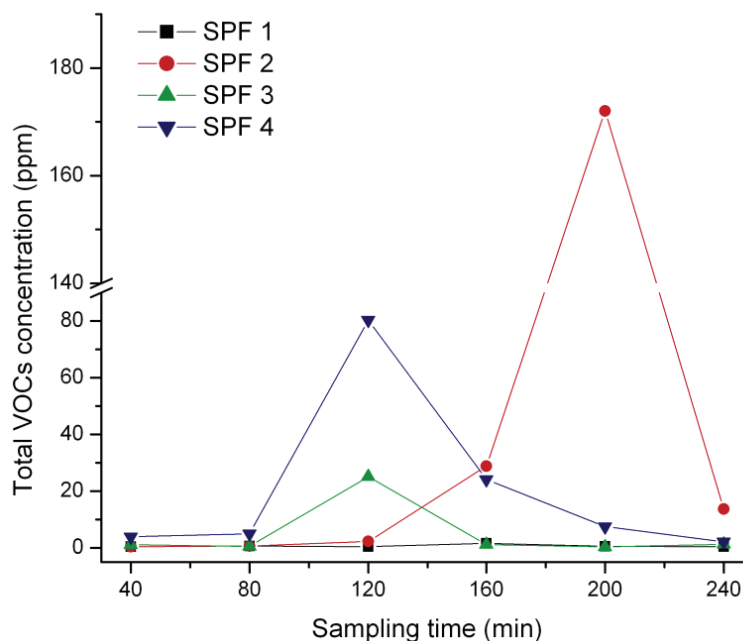


Figure 1 Correlation between total VOCs and sampling time

Conclusion

The study confirmed that screen printing manufacturing operations cause indoor air pollution. The first phase in the air pollution control during screen printing manufacturing was to determine the actual emissions of total VOCs. Considerably amounts of total VOCs are emitted to the indoor screen printing air, especially in SPF 2 (172 ppm). The usage of large amounts of inks and cleaning solvents contributed to increasing of the total VOCs concentrations. The detected higher total VOCs concentrations are associated with the type of printed products, production volume, frequency of the screen cleaning process and preparations for the next screen printing run.

The obtained results in screen printing environment could be useful for the creation of the general IAQ guidelines of the Republic of Serbia and the risk assessment of indoor exposure to total VOCs. However, in most of the world the actual enforcement of IAQ standards still lags far behind in public awareness and governmental legislation. As with many public health regulations, IAQ laws will grow teeth slowly but surely.

Until that time, concerned homeowners, tenants, and workers should investigate the local laws concerning VOCs, as there is no worldwide standard for allowable indoor air pollution levels.

Acknowledgment: The authors acknowledge the financial support of the Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia, within the Project No. 34014.

Emisija ukupnih VOC-ova u sito štampi

Cilj rada bio je da se okarakteriše kvalitet vazduha u zatvorenom prostoru (IAQ) četiri sito štamparije u Novom Sadu, Republika Srbija. U tu svrhu, mobilnim gasnim hromatografom, su praćeni koncentracioni nivoi ukupnih VOC-ova u procesu štampe. Najveća koncentracija je detektovana u sito štampariji 2 zbog korišćenja visoko-isparljivih hemikalija. Nivo ukupnih VOC-ova u štampariji 2 (172 ppm) bio je do 373 puta veći od najveće koncentracije izmerene u drugim štamparijama. Dobijeni rezultati mogu biti korisni za procenu rizika izloženosti ukupnim VOC-ima u radnom prostoru, kao i za stvaranje IAQ smernica Republike Srbije.

References:

1. National Pollution Inventory, Emissions Estimation Technique Manual for Printing, Publishing, and Packaging, Environment Australia, 1998
2. M. Leung, C. H. Liu, A. Chan, *J. Occup. Health* 47 (2005) 540
3. J. G. Watson, J. C. Chow, E. M. Fujita, *Atmos. Environ.* 35 (2001) 1567
4. S. Davis, Waste Reduction in the Screen Printing Industry, P2 for printers, 2001, p. 1
5. Missouri Department of Natural Resources Environmental Assistance Office, Preventing Pollution in Screen Printing, A Guide to Environmental Compliance and Pollution Prevention for Screen Printers in Missouri, 2004
6. The Local Hazardous Waste Management, Screen printers, Waste management guide, 1994, p. 1
7. N. Fiedler, R. Laumbach, K. Kelly-McNeil, P. Liroy, Z. H. Fan, J. Zhang, J. Ottenweller, P. Ohman-Strickland, H. Kipen, *Environ. Health Perspect.* 113 (2007) 1542
8. A. Müezzinoğlu, *J Clean Prod* 6 (1998) 339
9. Workplace Safety and Health Topics, National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) Education and Information Division, 2012

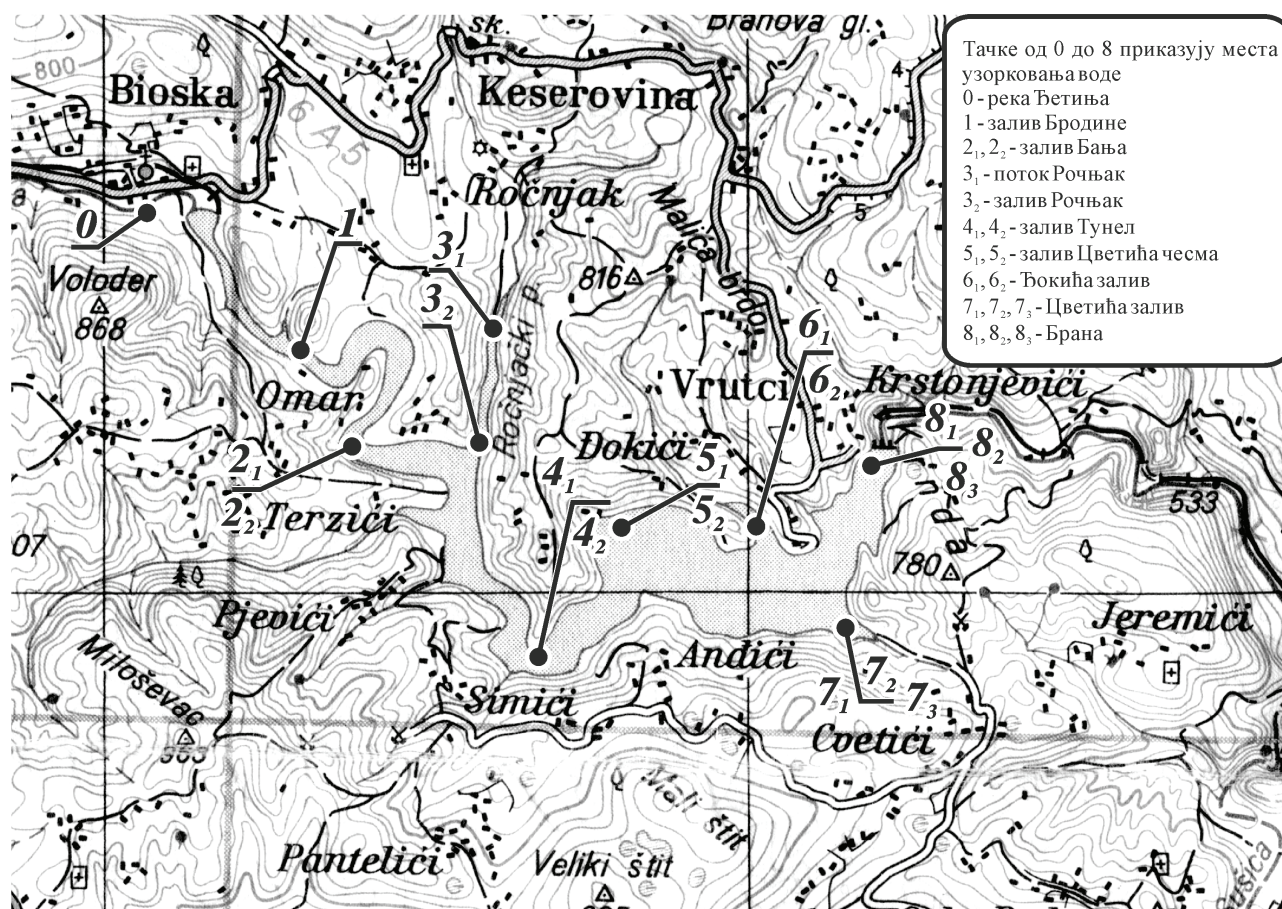
Проводљивост, рН и температура воде у акумулацији Врутци

Миленија Ј. Марковић, Драган Веселиновић*

Градска управа, Ужице, * Факултет за физичку хемију, Београд

Увод

Акумулација припада сливном подручју западне Мораве, налази се на надморској висини од 564 m, дужине је 8 km и просечне ширине 400 m. Захвата површину од око 250 ha, долином реке Бетиње[1]. Просечна количина воде у језеру је око $56 \cdot 10^6 \text{ m}^3$. Од ушћа Бетиње у језеро до бране уочавају се већи заливи: Бродине, Бања, Рочњачки, Тунел, Цветића чесма, Ђокића и Цветића залив (слика 1).



Слика 1. Акумулација Врутци

Саграђена је ради снабдевања водом Ужица и околних насеља 1984. године. Окружена је брдско – планинским селима, слабо настањеним. У непосредном окружењу нема индустрије. У акумулацији има 23 врсте рибе, од којих су гргеч и бабушка најприсутнији.

Циљ рада је упознавање са параметрима квалитета воде, рН и проводљивости као и температуре, у акумулацији Врутци након више од 20 година од њеног успостављања, јер се може сматрати да се за ово време систем за водоснабдевање стабилизовао.

Експериментални део

Апарати и раствори

У раду су коришћени кондуктометар EC- meter BASIC 30 + CRISON, рН - метар MV 870 рН – m 82, standard radiometar Copenhagen, термометар INTOS - Загреб и перистатичка пумпа. Калибрација

кондуктометра вршена је раствором NaCl – 400 $\mu\text{S}/\text{cm}$, а рН - метар стандардним пуферским раствором S - 7 и S – 10.

Посуде

За узимање и чување узорака воде коришћене су посуде од полиетилена са поклопцем. За мерење проводљивости и температуре коришћене су посуде од полиетилена, а за мерење рН посуде од стакла.

Поступак мерења

До места узорковања (мерења) приступано је коришћењем чамца који се ка њему кретао узводно. Узорци су узимани и на лицу места је измерена температура. Након преношења узорка у лабораторију вршено је мерење рН и проводљивости [2], претходно подешавајући у термостату температуру воде измереној на лицу места.

Места узорковања

Узорци воде узети су на местима која су претходно одређена као репрезентативна. Од 18 узорака воде по један је узет из реке Ђетиње и потока Рочњак, а 16 из акумулације Врутци. Узорци воде узети су на следећим местима:

Узорак 0 из реке Ђетиње, на 300 m узводно од места улива реке у акумулацију;

Узорак 1 из акумулације Врутци, на 150 m од улива реке Ђетиње, са површине;

Узорци 2₁ и 2₂ из залива Бања, са површине узорак 2₁ и са дубине од 10 m, узорак 2₂;

Узорак 3₁ из потока Рочњак, а узорак 3₂ из залива Рочњак, на 150 m од улива потока у акумулацију, са површине;

Узорци 4₁ и 4₂ код Тунела, са површине узорак 4₁ и са дубине од 10 m, узорак 4₂;

Узорци 5₁ и 5₂ из залива Цветића чесма, са површине узорак 5₁ и са дубине од 15 m, узорак 5₂;

Узорци 6₁ и 6₂ из Ђокића залива, са површине узорак 6₁ и са дубине од 20 m узорак 6₂;

Узорак 7₁, 7₂ и 7₃ из Цветића залива, са површине узорак 7₁, са дубине од 18 m узорак 7₂ и са дубине од 35m узорак 7₃;

Узорци 8₁, 8₂ и 8₃ код бране, са површине узорак 8₁, са дубине од 18 m узорак 8₂ и са дубине од 35 m узорак 8₃.

На слици 1 назначена су места узорковања.

Време и број узорковања

Узорци воде узети су 31.маја у периоду од 11 h до 16 h у првој серији, а у другој серији 11. октобра од 12,30 h до 15 h.

Резултати и дискусија

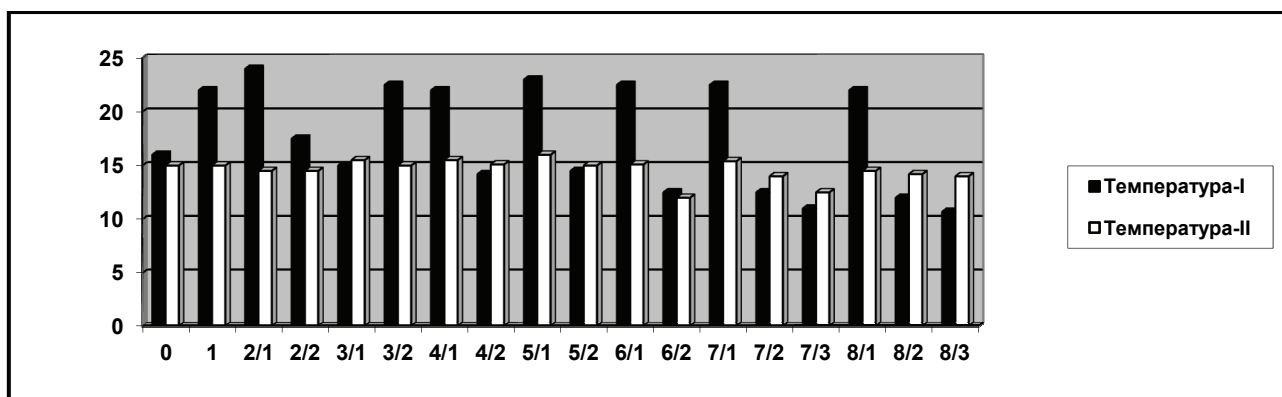
Вредности проводљивости (μS), температуре ($^{\circ}\text{C}$) и рН воде дати су у Табели 1, представљају средњу вредност три мерене пробе из одређеног узорка. Добијене вредности дате су у Табели 1, за прво (I) и друго (II) узорковање и на сликама 2, 3 и 4.

Упоређивањем средњих вредности температуре, рН и проводљивости добијених у првом и другом узорковању јасно указује да са снижењем температуре долази до смањења вредности рН и проводљивости воде, такође, и код највећег броја појединачних узорака долази до смањења мерених вредности (Слика 2, 3 и 4).

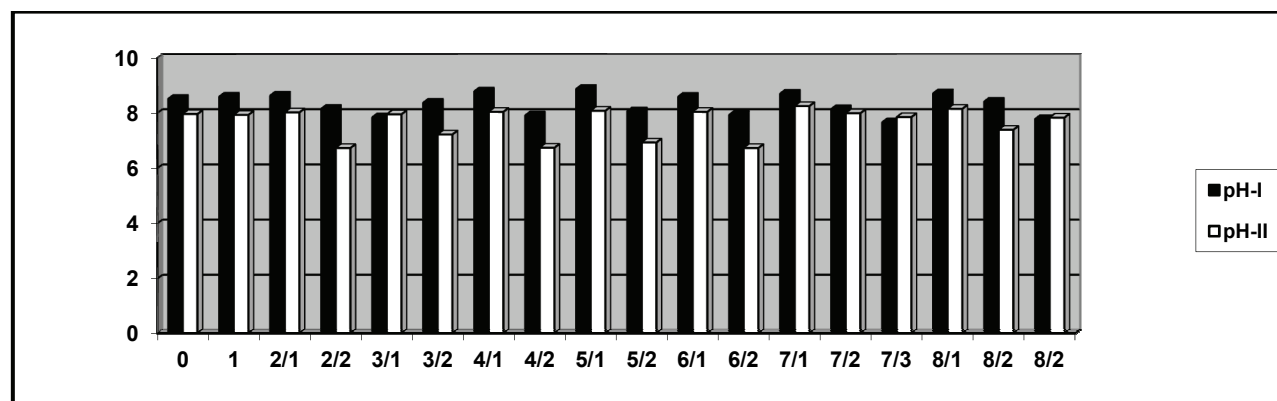
Види се да се средња температура воде смањила од 17,6 ($^{\circ}\text{C}$) на 14,6 ($^{\circ}\text{C}$), рН од 8,31 до 7,66, а проводљивост од 381,77 (μS) на 294,94 (μS), те ови показатељи квалитета воде одређују припадност водотока класи [3], односно категорији [4], у оквиру чијих граничних вредности се налази измерена вредност показатеља.

Табела 1. Температурна, рН и проводљивост воде акумулације Врућици измерене: I – 31.05. и II – 11.10.

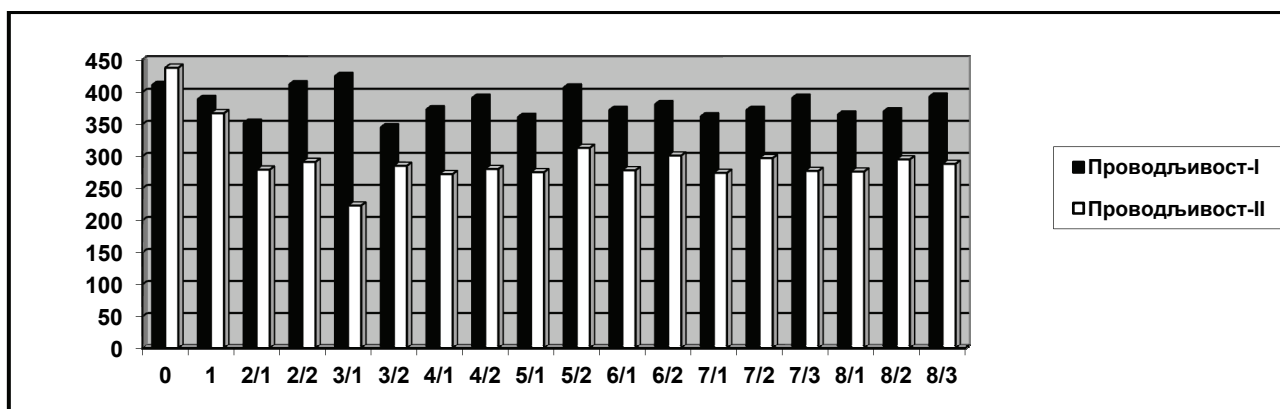
Узорци	Температура, °C		рН		Проводљивост, μS	
	I	II	I	II	I	II
0	16	15	8,51	7,96	411	438
1	22	15	8,59	7,93	389	367
2 ₁	24	14,5	8,63	8,02	352	279
2 ₂	17,5	14,5	8,15	6,73	412	291
3 ₁	15	15,5	7,84	7,95	425	223
3 ₂	22,5	15	8,37	7,22	345	285
4 ₁	22	15,5	8,78	8,04	373	272
4 ₂	14,2	15,1	7,91	6,74	391	280
5 ₁	23	16	8,87	8,08	361	275
5 ₂	14,5	15	8,06	6,93	407	313
6 ₁	22,5	15,1	8,59	8,04	372	278
6 ₂	12,5	12	7,93	6,73	381	301
7 ₁	22,5	15,4	8,70	8,25	362	274
7 ₂	12,5	14	8,14	7,99	372	297
7 ₃	11	12,5	7,66	7,85	391	277
8 ₁	22	14,5	8,71	8,15	365	276
8 ₂	12	14,2	8,41	7,39	370	295
8 ₃	10,7	14	7,78	7,83	393	288
Средње вредности	17,6	14,6	8,31	7,66	382	295



Слика 2. Упоредне вредности температуре узорака на коришћеним мерним местима добијене првим (I) и другим (II) узорковањем



Слика 3. Упоредне вредности рН узорака на коришћеним мерним местима добијене првим (I) и другим (II) узорковањем



Слика 4. Ујоредне вредности проводљивости узорка на коришћеним мерним местима добијене првим (I) и другим (II) узорковањем

Закључак

Смањење проводљивости са температуром одражава температурске промене проводљивости за разлику од смањења рН, тј. повећања киселости, односно концентрација H^+ јона није искључиво последица промене температуре, него низа других равнотежних процеса у којима посредно и непосредно учествују водонични јони.

Узимајући измерене величине у обзир може се закључити да вода припада класи еколошког статуса I-II и категорији I/II.

Conductivity, pH and temperature of water in the accumulation Vrutci

The accumulation Vrutci is used for providing Uzice and the neighbouring settlements with potable water. It lies between the mountains Zlatibor and Tara. The accumulation gets the supply of water from the Djetinja river and Rocnjak stream permanently, and occasionally from other sources.

Measuring the conductivity, pH, and temperature of water was performed on two occasions, in May and October. The samples were taken on 10 sites, eighteen samples were taken on each occasion. The mean values of the samples taken on the first (I) and on the second occasion (II) are the following: temperature ($^{\circ}C$), 17.6 (I) and 14.6 (II), pH 8.31 (I) and 7.66 (II), conductivity (μS), 382 (I) and 295 (II).

The mean values of all three measured quantities are lower on the second occasion compared to the first one. On the basis of these values this water belongs to the class of ecological status I-II and category I/II.

Литература

1. Опште одлике акумулације Врутци, основни план, Завод за рибарство, Београд, 1984.
2. Стандардне методе за испитивање хигијенске исправности воде за пиће, Завод за здравствену заштиту, 1990.
3. Правилник о параметрима еколошког и хемијског статуса површинских вода и параметрима хемијског и квантитативног статуса подземних вода (Сл. гласник РС бр. 74/2011).
4. Уредба о категоризацији водотока (Сл. гласник СРС бр. 5/68).

Sadržaj teških metala u reci Pek

Nada V. Babović, Tijana S. Čoporda-Mastilović, Mirjana B. Bartula, Dejan P. Marković

Univerzitet Singidunum, Fakultet za primenjenu ekologiju, Lazarevački drum 13, Beograd, Srbija

Uvod

Na svom putu ka evropskim integracijama Republika Srbija je uradila dosta na usaglašavanju domaćeg zakonodavstva koje se tiče životne sredine sa pravom Evropske unije. Skupština Srbije je maja 2009. godine usvojila set od 16 zakona iz oblasti zaštite životne sredine, a godinu dana kasnije Zakon o vodama (Službeni glasnik br. 30/10) harmonizovanog sa EU Okvirnom direktivom o vodama, čime se stvorila zakonska obaveza za primenu inovativnog pristupa u upravljanju vodnim resursima. Ovo podrazumeva utvrđivanje hidroloških, hemijskih i bioloških standarda, korišćenja vode za posebne namene, određivanje posebnih ciljeva, kao i sistematski monitoring voda, integralno upravljanje rečnim slivom, čak i preko administrativnih i međunarodnih granica, uključuje planove upravljanja slivom i koordinirane programe monitoringa koji se baziraju na kvantitativnim, ekološkim i hemijskim karakteristikama i ciljevima zaštite, kombinovani pristup u vezi sa standardima za granične vrednosti dozvoljenih emisija i imisija (prijema), podrazumeva granične vrednosti dozvoljene emisije od strane izvora zagađivanja u akvatičnu životnu sredinu, kako bi se zadovoljili minimalni standardi kvaliteta vode recipijenta. To se ostvaruje kontrolom ispuštanja otpadnih voda, pri čemu se definišu maksimalno dopuštene količine zagađenja koje izvor zagađivanja može da ispusti u vodu. Kontrolom kvaliteta vode definiše se minimalni nivo kvaliteta recipijenta, koji nije štetan za zdravlje i životnu sredinu, čime se određuju i kontrolišu granice kumulativnog unosa zagađenja vode^{1,2}.

Imajući u vidu činjenicu da se stvarna implementacija međunarodnih ugovora i zaštita prirodnih resursa dešavaju zapravo na lokalnom nivou, opština Veliko Gradište je u saradnji sa opštinama Majdanpek i Kučevo, sa kojima deli slivno područje reke Pek, uz podršku slovenačke opštine Pojčane i NVO Unija ekologa inicirala projekat „Zajednički naponi za zaštitu i integralno upravljanje rekom Pek“ čiji krajnji rezultat treba da bude Integralni plan upravljanja rekom Pek, zasnovanog na prethodnoj analizi svih postojećih antropogenih pritisaka. U sve tri opštine prilično su razvijene poljoprivredne aktivnosti (u Kučevu je zastupljena kao primarna delatnost), proizvodno trgovinski sektor (Veliko Gradište, Kučevo) gde su zastupljene prerađivačka delatnost, proizvodnja električne energije, gasa i vode, prehrambena industrija, proizvodnja mineralne vode u Neresnici i klanica u Rabrovu i teška industrija u Kučevu a naročito u Boru³.

Područje oko Kučeva bogato je određenim mineralnim sirovinama pa je zastupljena istražna eksploatacija zlata sa jamskim iskopom, kao i početak eksploatacije uglja sa površinskim kopom. Jedan od osnovnih nosilaca privrednog razvoja je Kombinat kreča, kamena i kvarca “Veljko Dugošević”, koji od kraja 2003. posluje pod imenom “U.S. Steel Serbia Smederevo”, ogranak Kučevo³.

Privrednom strukturom Bora dominira industrija koja se bazira na jednom od raspoloživih prirodnih resursa (ruda bakra). Od privrednih industrijskih subjekata značajni su: Rudnik bakra Majdanpek DOO u restrukturiranju (proizvodnja rude i koncentrata bakra, magnetita, olova i cinka), Industrija za preradu metala – IPM DOO u restrukturiranju i Fabrika bakarnih cevi Majdanpek AD (prerada bakra i legura od bakra, odnosno, proizvodnjom bakarnih i mesinganih cevi raznih profila)³.

Zagađivanje vode odnosi se na svaku nepropisnu radnju u sklopu navedenih privrednih aktivnosti. U slivu reke Pek na teritoriji ove tri opštine, u sklopu izrade projekta³, identifikovan je veliki broj divljih deponija, kanalizacionih i industrijskih ispusta - većine neprečišćenih otpadnih voda. Konkretno, u pet katastarskih jedinica u opštini Majdanpek kroz koje protiču Veliki i Mali Pek, čiji tokovi čine reku Pek od naselja Debeli Lug, detektovano je 10 divljih deponija, od kojih su neke sanirane i 4 ispusta gradske fekalne kanalizacije u Mali Pek. Što se tiče seoskih naselja u sve tri opštine, treba naglasiti da nijedno nema izgrađenu kanalizacionu mrežu (kolektor otpadnih voda), već da sva domaćinstva poseduju individualne septičke jame, što predstavlja direktan rizik od zagađenja podzemnih voda. Površinski kop - rudnik bakra Majdanpek predstavlja najveću opasnost po vode Peka i živi svet u njoj. Prilikom dosadašnje izrade baze podataka projekta, veliki broj podataka o eksploataciji rude, proizvodnom tehnološkom procesu, količini i sastavu otpadnih voda koje se ispuštaju u reku samog rudnika bakra nisu bili dostupni. Tim i dalje radi na prikupljanju podataka vezanih za rudnik, što u velikoj meri zavisi

od "raspoloženja" lokalne samouprave i uprave preduzeća. Slični problemi javljaju se i za druga industrijska preduzeća kao što su fabrika zlatnog nakita i fabrika bakarnih cevi.

U ovom radu će se posvetiti veća pažnja analizi rezultata sadržaja metala - koncentracijama gvožđa, mangana i bakra. Pored metala mereni su i sledeći parametri: temperatura vazduha, temperatura vode, pH, sadržaj rastvorenog kiseonika, koncentracije hlorida i sulfata. pH i temperatura vode su mereni pomoću LaMotte pH 5 Series Meter, sadržaj rastvorenog kiseonika pomoću Hach HQ40d Digital Multi-Parameter Meter. Merenja ostalih parametara izvršena su u laboratoriji u Velikom Gradištu koja je postavljena u okviru projekta "Zajednički naponi za zaštitu i upravljanje rekom Pek". Za određivanje koncentracije gvožđa, mangana, bakra, hlorida i sulfata korišćen je spektrofotometar DR 2800 marke Hach Lange.

Rezultati i diskusija

Za procenu kvaliteta vode korišćen je Pravilnik o parametrima ekološkog i hemijskog statusa površinskih voda i parametrima hemijskog i kvantitativnog statusa podzemnih voda (Sl. glasnik RS, br. 74/2011), Pravilnik o opasnim materijama u vodama (Sl. glasnik SRS, br.31/82), Uredba o kategorizaciji i klasifikaciji međurepubličkih i međudržavnih vodotoka, (Sl. list SFRJ br. 6/78), Uredba o klasifikaciji voda (Sl. glasnik SRS" br. 5/68), kao i preporuke ICPDR-a.⁴⁻⁷

U tabeli 1 dati su podaci o lokaciji uzorkovanja četiri uzorka vode sa različitih lokaliteta uzetih duž toka reke Pek. Temperatura vazduha tokom merenja se kretala od – 1 do 15 °C. Temperatura uzoraka vode kretala se u opsegu od 3,6 do 8,8°C.

Tabela 1. Tačke uzimanja uzoraka

Broj uzorka	Opis lokacije
1	Ušće Peka u Dunav 100 metra uzvodno
2	Ispod Rabrova kod mosta u Klenju
3	Granica opštine Majdanpek i Kučevo, uzvodno od naselja Blagojev Kamen
4	Pek 30 metara nizvodno od ušća Malog u Veliki Pek

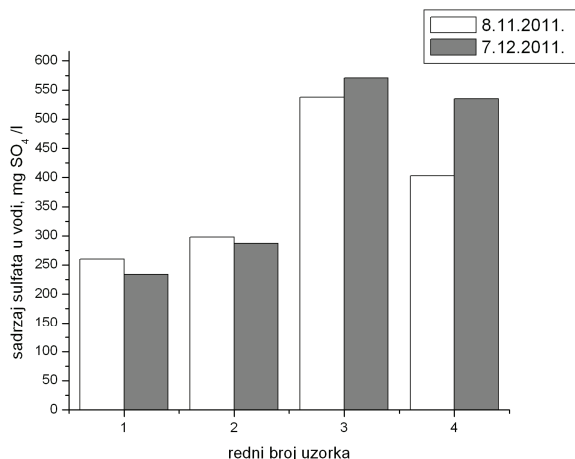
pH vrednost ispitivanih uzoraka vode kretala se u opsegu 7,89-8,40 u novembru, i 7,36-8,21 u decembru, na osnovu čega se prema Uredbi o klasifikaciji voda (Sl. glasnik SRS" br. 5/68) i Pravilniku o parametrima ekološkog i hemijskog statusa površinskih voda i parametrima hemijskog i kvantitativnog statusa podzemnih voda (Sl. glasnik RS, br. 74/2011) voda svrstava u I klasu. Prema sadržaju rastvorenog kiseonika voda reke Pek se može svrstati u I klasu na svim ispitivanim lokalitetima.

Po sadržaju hlorida voda Peka pripadala je u potpunosti I klasi prema Pravilniku o parametrima ekološkog i hemijskog statusa površinskih voda i parametrima hemijskog i kvantitativnog statusa podzemnih voda (Sl. glasnik RS, br. 74/2011).

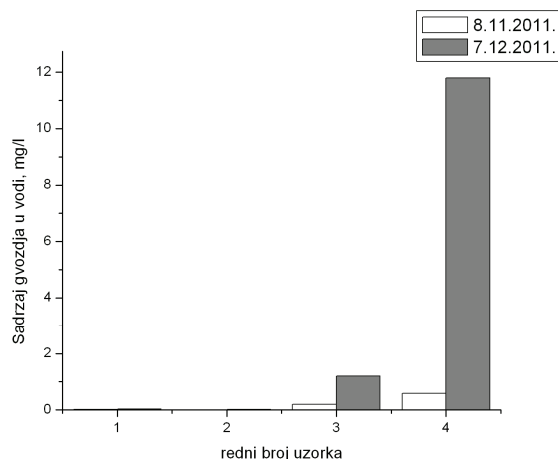
U svim uzorcima je izmeren visok sadržaj sulfata, koji se kretao u opsegu od 260-538 mg/l u novembru i u opsegu od 234-571 mg/l u decembru (slika 1). Najveći sadržaj sulfata izmeren je na lokalitetima 3 i 4. Po preporuci EU (Directive 98/83/EC) i po našem Pravilniku o higijenskoj ispravnosti vode za piće sulfati su u vodi za piće ograničeni na 250 mg/l. U slučaju sadržaja sulfata u površinskim vodama ne postoji dozvoljen nivo u nacionalnom zakonodavstvu. Što se tiče maksimalne koncentracije sulfata u efluentima koji se ulivaju u površinske vode, dozvoljene koncentracije u raznim zemljama sveta variraju u opsegu 150 -2000 mg/l. U principu, sulfati su široko rasprostranjeni u prirodi i mogu biti prisutni u prirodnim vodama u koncentraciji od nekoliko hiljada miligrama po litru. Odvodnjavanje iz rudnika doprinosi povećanju prisutva sadržaja sulfata u vodama zbog oksidacije rude pirita. Oksidacijom pirita može doći do acidifikacije prirodnih voda (rudničke vode), međutim u slučaju reke Pek do acidifikacije nije došlo, jer su merenja pokazala da se prema pH vrednosti voda Peka svrstava u I klasu. U literaturi nalaze se podaci da zavisno od tvrdoće vode, sadržaja hlorida i slično, dozvoljen sadržaj sulfata u vodi iznosi do 2000 mg/l, pa je prema tome sadržaj sulfata u uzorcima 3 i 4 slabo povećan.

Prema pravilniku o opasnim materijama u vodama ("Službeni glasnik SRS" br. 31/82) vode klase I i II maksimalno mogu sadržati 0,3 mg/l gvožđa i 0,1 mg/l bakra, dok vode klase III i IV maksimalno mogu sadržati 1,0 mg/l gvožđa i 0,1 mg/l bakra. Rezultati sadržaja metala (gvožđa, mangana i bakra) u vodi predstavljeni su na slikama 2-4. Sadržaj rastvorenog gvožđa u vodi na lokalitetima 1 i 2 prisutan je u

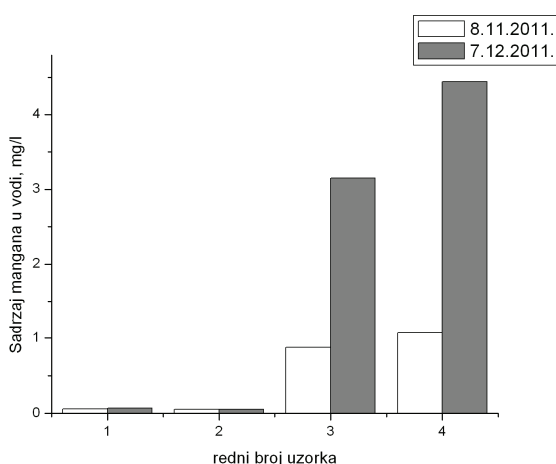
količini koja odgovara I i II klasi voda, a na lokalitetima 3 i 4 u količini koja prekoračuje sadržaj ovih metala propisan za III i IV klasu voda. Dozvoljena gornja granica za mangan u vodi za piće po Pravilniku o higijenskoj ispravnosti vode za piće je 0,05 mg/l. Sadržaj mangana u uzorcima se kretao u opsegu 0,06-1,07 mg/l u novembru i u opsegu 0,07-4,44 mg/l u uzorcima uzorkovanim u decembru. Najveća količina mangana je detektovana na lokalitetima 3 i 4. Na svim ispitivanim lokalitetima duž reke Pek, sadržaj bakra prekoračuje maksimalno dozvoljenu koncentraciju definisanu za III/IV klasu prema Pravilniku o opasnim materijama u vodama ("Službeni glasnik SRS" br. 31/82), a u uzorcima 3 i 4 ovo prekoračenje iznosi čak više od 30 puta od dozvoljene koncentracije bakra u vodi.



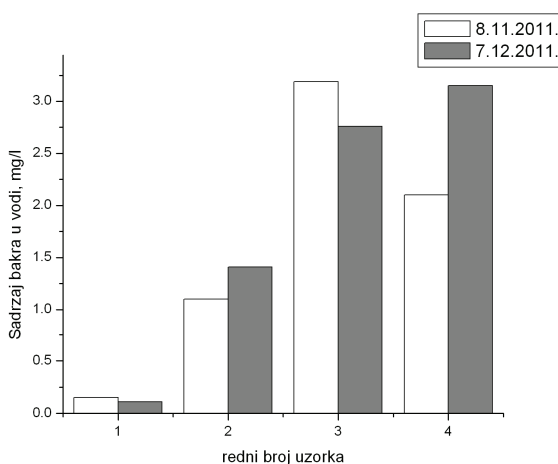
Slika 1. Sadržaj sulfata u vodi



Slika 2. Sadržaj gvožđa u vodi



Slika 3. Sadržaj mangana u vodi



Slika 4. Sadržaj bakra u vodi



Slika 5. Prikaz stanja vode reke Pek usled ispuštanja otpadnih voda iz industrijskih postrojenja fabrike bakarnih cevi i rudnika bakra Majdanpek (levo), Prikaz uginulih riba usled kontaminacije teškim metalima iz otpadnih voda industrije (desno)¹

Zaključak

Alarmantna je činjenica da količina sadržaja rastvorenog gvožđa u vodi na lokalitetima 3 (granica opštine Majdanpek i Kučevo) i 4 (ušće Malog u Veliki Pek) prekoračuje sadržaj ovih metala propisan za III i IV klasu voda, a naročito za bakar, čija količina na svim ispitivanim lokalitetima duž reke Pek prekoračuje maksimalno dozvoljenu koncentraciju od i 0,1 mg/l definisanu za III/IV klasu (prema Pravilniku o opasnim materijama u vodama). Može se zaključiti na osnovu dosadašnje istraženosti, da najveći antropogeni uticaj na kvalitet vode reke Pek imaju otpadne vode rudnika bakra i fabrike olovnih cevi u Majdanpeku. Sadržaj bakra u uzorcima se kretao u opsegu 0,15-3,19 mg/l u novembru i u opsegu 0,11-3,15 mg/l u uzorcima uzorkovanim u decembru. Prisutne su i povećane koncentracije mangana i sulfata, a prekoračene gornje granice za sulfate i mangan analizirane su u odnosu na preporuke EU (Directive 98/83/EC) i po našem Pravilniku o higijenskoj ispravnosti vode za piće.

I pored značajnih koncentracija bakra, mangana i gvožđa, u odnosu na ostale analizirane fizičko hemijske parametre, reka ima dobar kvalitet. Merenja su pokazala da se prema pH vrednosti, prema sadržaju rastvorenog kiseonika i po sadržaju hlorida voda Peka svrstava u I klasu.

Vodosnabdevanje ove tri opštine se uglavnom bazira na eksploataciji podzemnih voda iz izdani aluvijona reke Pek. Izdanske vode aluvijalnih naslaga nalaze se u dolinama reka gde se u priobalnom delu uspostavlja hidraulička veza reka i izdani. Iz tog razloga, kao i moguće migracije zagađujuće materije tim putem, potpuniji uvid i slika o statusu vodnog resursa, dobiće se poređenjem rezultata fizičko-hemijskih analiza podzemnih voda aluvijalne izdani sa rezultatima iz reke Pek.

Dobijeni podaci o koncentracijama teških metala biće, pored ostalih podataka, osnova za definisanje vizije, ciljeva upravljanja slivnim područjem kao i adekvatnih mera za unapređenje postojeće stanja.

Zahvalnica: Ovaj rad je urađen u okviru projekta "Zajednički naponi za zaštitu i upravljanje rekom Pek", IPA 2007, 07SER01/02/41, 2011

Heavy metals content in the Pek River

This paper is derived from the results of activities of the project Joint efforts for the protection and management of the Pek River. The overall objective of this project deals with the improvement of integrated protection and management of natural resources in three municipalities that share the Pek river basin. One of the activities undertaken so far was the laboratory analysis of surface water quality. Analyses of ground water at selected springs are still in progress as well as analysis of surface water intended for the second planned period. Air temperature, water temperature, pH, dissolved oxygen content, concentrations of iron, manganese, copper, chloride and sulfate were measured at four locations along the flow. Monitoring was done at the source of river, on the border between Majdanpek and Kucevo municipalities, on the border between Kucevo and Veliko Gradiste municipalities and at the confluence of Pek into Danube River. In the following text, the results of physicochemical analysis of surface water for the past two periods mentioned on the mentioned pollution spots will be shown, with special emphasis on the analysis of heavy metals and sulfate, considering the occurrence of significantly exceeded values.

Literatura:

1. M. Kosović, *Evropsko zakonodavstvo*, VIII (2009), br. 27-28, 142
2. Zakon o vodama (Sl. glasnik SRS br. 30/10)
3. Projekat Zajednički naponi za zaštitu i upravljanje rekom Pek, IPA 2007, 07SER01/02/41, 2011
4. Pravilnik o parametrima ekološkog i hemijskog statusa površinskih voda i parametrima hemijskog i kvantitativnog statusa podzemnih voda Sl. glasnik RS, br. 74/2011
5. Pravilnik o opasnim materijama u vodama, Sl. glasnik SRS br. 31/82
6. Uredba o klasifikaciji voda, Sl. glasnik SRS br. 5/68
7. Uredba o kategorizaciji i klasifikaciji međurepubličkih i međudržavnih vodotoka, Sl. list SFRJ br. 6/78

Ekstrakcija pesticida linurona i tebufenozida u membranskom kontaktoru na bazi poroznih kapilara

Jelena S. Đorđević, Tatjana M. Trtić-Petrović

Laboratorija za fiziku, Institut za nuklearne nauke Vinča, Univerzitet u Beogradu, P. P. 522, 11001 Beograd, Srbija, e-mail: jdjordjevic@vinca.rs

Uvod

Savremena poljoprivredna proizvodnja se skoro ne može zamisliti bez upotrebe brojnih pesticida za zaštitu biljaka od korova, bolesti i štetnih insekata. Pesticidi su posebna grupa hemijski stabilnih, heterogenih organskih jedinjenja, čija je biorazgradivost relativno spora ili su nerazgradivi bez inicijalnog dejstva UV zračenja. Preko padavina, ispiranjem zemljišta, dospevaju u površinske i podzemne vodotokove i tako predstavljaju ozbiljan problem zbog zagađenja pitkih i drugih voda¹. Pesticidi i proizvodi njihovog razlaganja su često toksični, kancerogeni i mutageni, a dugo vreme ostaju u prirodi.

Membranska ekstrakcija je nedisperzivna tečno-tečna ekstrakcija u kojoj dolazi do razmene mase između dve nemešljive tečnosti razdvojene mikroporoznom membranom². Postoje dva načina primene membranske ekstrakcije: dvofazna membranska ekstrakcija (MMLLE eng. microporous membrane liquid-liquid extraction) i trofazna membranska ekstrakcija (SLME eng. supported liquid membrane extraction). Za ekstrakciju iz vodene faze koristi se hidrofobna membrana. Organska faza koja se koristi u membranskoj ekstrakciji treba da ima sledeće karakteristike: visok koeficijent raspodele i selektivnost u odnosu na jedinjenje koje se ekstrahuje, nisku rastvorljivost u vodi, kao i nisku viskoznost koja odgovara velikim koeficijentima difuzije kroz tečnu membranu.

Membranski ekstraktori imaju nekoliko prednosti u poređenju sa drugim ekstraktorima, a to su: velika kontaktna površina po zapremini, moguć je rad sa veoma malim zapreminama i vodene i organske faze, nema curenja iz jedne faze u drugu što se reguliše protokom faza. Takođe, nema pojave emulzije, razlika u gustinama faza ne mora da bude značajno velika kao kod klasične ekstrakcije, ne postoje problemi sa odvajanjem faza, ceo postupak je lako automatizovati, što je značajno u slučaju separacije toksičnih materijala, cena membrana je niska, a s obzirom na mogućnost korišćenja malih zapremina ekstragenasa (samo za punjenje pora) i cena ekstrakcije je manja u odnosu na klasičnu.

Membranska ekstrakcija u kontaktorima na bazi mikroporoznih kapilara ispitivana je za uklanjanje organskih jedinjenja iz vode³, za uklanjanje fenola iz otpadnih voda⁴, za uklanjanje acetona i etanola iz vode⁵. Kontaktori nalaze primenu u prehrambenoj industriji⁶, za ekstrakciju lekova⁷ itd.

Cilj ovog rada bio je određivanje karakteristika membranske ekstrakcije pesticida linurona i tebufenozida u kontaktorima na bazi mikroporoznih, polimernih kapilara koje bi omogućile procenu primene membranske ekstrakcije za njihovo uklanjanje iz industrijskih voda.

Ekperimentalni deo

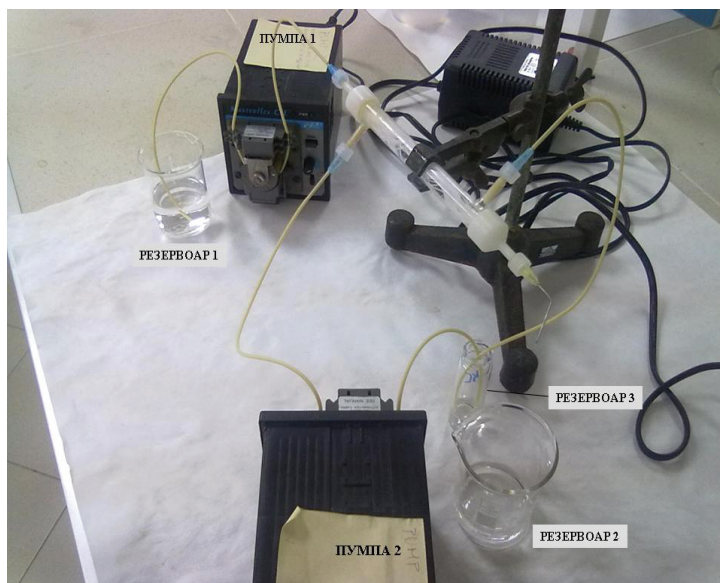
Membranski kontaktor je napravljen od staklene cevi dužine 20 cm, u čijoj unutrašnjosti se nalazi 50 paralelno postavljenih hidrofobnih mikroporoznih kapilara od polipropilena (Celgrad X-20, Hoechst Celanese), efektivne dužine 12,5 cm, koji su na krajevima zalepljeni dvokomponentnom epoksidnom smolom (Bison Epoxy, Holandija). Polipropilenske mikroporozne kapilare imaju unutrašnji prečnik 280 μm , debljina zida im je 190 μm , a poroznost 28%. Cev ima dva bočna izvoda za ulaz i izlaz tečnosti koja ide oko kapilare. Sav materijal koji je korišćen za kontaktore otporan je na HCl, 5% TOPO i DHE.

Na slici 1 prikazan je sistem za ekstrakciju pesticida u kontaktoru na bazi mikroporoznih kapilara pri režimu rada bez recirkulacije. Ovaj ekstrakcioni sistem se sastoji iz membranskog kontaktora, ulaznog rezervoara za rastvor donora (rezervoar 1), izlaznog rezervoara za rastvor donora posle ekstrakcije tj. rafinata (rezervoar 2), rezervoara za akceptor (rezervoar 3), dve peristaltičke pumpe (za rastvor donora i akceptora), magnetne mešalice i creva različitih unutrašnjih prečnika (Pharmed).

Priprema kontaktora za ekstrakciju: prvo se stakleno kućište napuni akceptorom (2 mol dm^{-3} HCl, zapremine 20 cm^3) da bi se sprečilo curenje organske faze. Zatim se organska faza (5% TOPO u di-n-heksiletar) pumpa kroz lumen kapilara pri čemu se pune mikropore membrane. Nakon punjenja organ-

skom fazom lumen kapilara se ispira vodom. Kao donor korišćeni su vodeni rastvori linurona i tebufenozida. Koncentracija pojedinačnih pesticida u donoru bila je 20 mg dm^{-3} . Rastvor donora se priprema neposredno pre analize iz početnog rastvora pojedinačnih pesticida koncentracije 200 mg dm^{-3} koji su pripremani u metanolu i čuvani u mraku na temperaturi -20°C . U toku eksperimenta donor je kontinualno proticao kroz kontaktor, dok je akceptorska faza bila stacionarna. Uzorci u kojima je određivana koncentracija pesticida prikupljeni su u vremenskom intervalu od 5 do 10 minuta na izlazu iz kontaktora.

Za određivanje koncentracije pesticida korišćen je HPLC-UV Dionex-0650 (Dionex, SAD) sa reverzno-faznom kolonom Eclipse XDB-C18 (4,6 mm x 250 mm, 3,5 mm) sa predkolonom Zorbax XDB-C18 (4 x 4 mm, 5 μm) (Agilent, SAD). Mobilna faza je bila 75% metanol i 25% voda, talasna dužina 244 nm. Retenciono vreme linurona je 8, a tebufenozida 11 minuta.

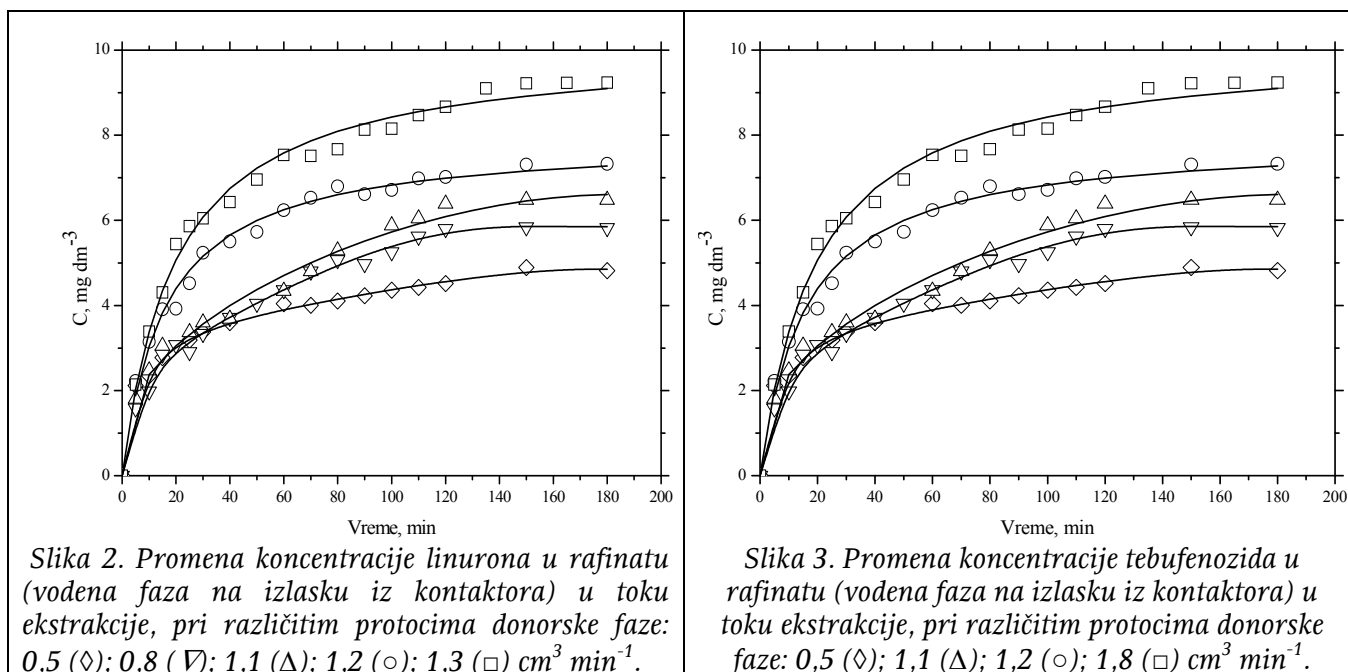


Slika 1. Sistem za ekstrakciju pesticida sa kontaktorom na bazi mikroporoznih kapilara pri protoku vodene faze bez recirkulacije.

Rezultati i diskusija

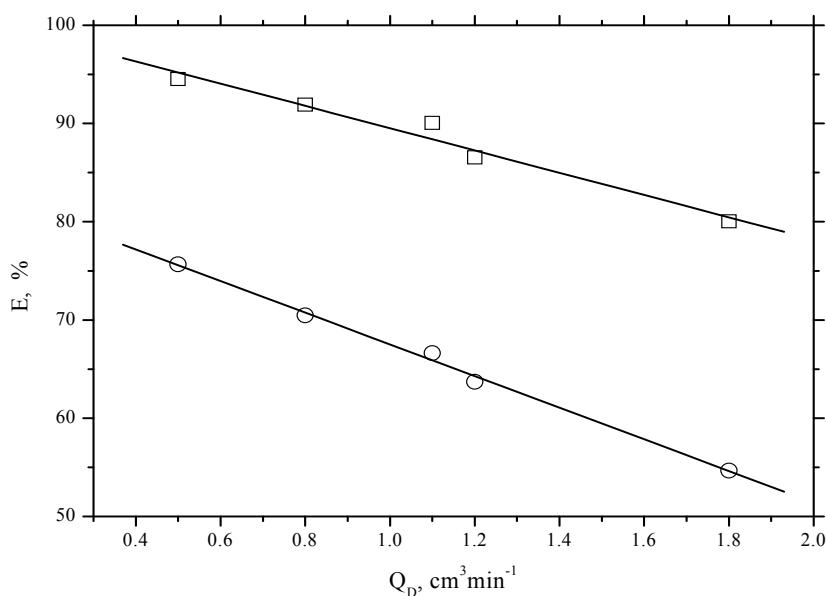
U ekstrakcionim sistemima u kome je koeficijent raspodele ispitivanog jedinjenja ili jona veći od 1 uticaj protoka polaznog, vodenog rastvora na efikasnost ekstrakcije je značajan. Ispitivan je uticaj protoka donora u opsegu od $0,5$ do $1,8 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, dok je akceptorska faza bila stacionarna. Smeša ispitivanih pesticida bila je linuron i tebufenozid sa koeficijentima raspodele $\log D$ 3,12 i 4,38 redom. Na slikama 2 i 3 prikazane su vremenske zavisnosti koncentracije linurona i tebufenozida u rafinatu (vodena faza na izlasku iz kontaktora) u toku ekstrakcije pri različitim protocima donorske faze. Sa ovih slika se vidi da na početku ekstrakcije ($t = 0 \text{ min}$) koncentracija pesticida u rafinatu na izlazu iz kontaktora je jednaka nuli. Koncentracija pesticida u rafinatu raste sa vremenom ekstrakcije dok se ne uspostavi stacionarno stanje. Vreme potrebno za uspostavljanje stacionarnog stanja za tebufenozid je oko 20 min, dok je za linuron značajno duže i iznosi oko 100 min. Vreme potrebno za uspostavljanje stacionarnog stanja ni u jednom slučaju ne zavisi od protoka vodene faze. Povećanjem protoka vodene faze, povećava se i koncentracija pesticida koja zaostaje u rafinatu posle prolaska kroz kontaktor. Ovakva zavisnost je posledica dužine trajanja kontakta između vodene i organske faze. Pri nižim protocima ove faze su duže u kontaktu, pa se više pesticida ekstrahuje.

Uticaj protoka donora na efikasnost uklanjanja pesticida iz polaznog vodenog rastvora ili stepen ekstrakcije (E) računat je posle uspostavljanja stacionarnog stanja. Rezultati su dati kao zavisnost stepena ekstrakcije, E , koji se definiše kao količina ekstrahovanog pesticida iz polaznog rastvora u odnosu na polaznu količinu pesticida u donoru.



Na slici 4 prikazana je zavisnost stepena ekstrakcije od protoka polaznog rastvora (donora). Sa slike se vidi da stepen ekstrakcije linearno opada sa porastom protoka donora. Najviši stepen ekstrakcije (94,5% za tebufenozid i 75,6% za linuron) je dobijen za najniži primenjeni protok donora (0,5 cm³ min⁻¹). Stepen ekstrakcije se smanjuje od 94% do 79,1% za tebufenozid, i od 75,6% do 54,7% za linuron, pri povećanju protoka od 0,5 do 1,8 cm³ min⁻¹. Nagib prave E vs. Q_D je manji za tebufenozid nego za linuron što potiče od većeg koeficijenta raspodele tebufenozida tj. tebufenozid je hidrofobniji i bolje se ekstrahuje u odnosu na linuron.

Efikasnost pertrakcije, P , se definiše kao količina pesticida, u odnosu na početnu količinu u donoru, koja je reekstahovana u akceptor. U slučaju linurona i tebufenozida dobijena je vrlo niska pertrakcija 4 i 2%, redom. Ukoliko je cilj rada uklanjanje pesticida iz rastvora onda je efikasnost ekstrakcije važniji parametar nego efikasnost pertrakcije. Važno je napomenuti da u ovom slučaju najveći deo ekstrahovanih pesticida ostaje u organskoj fazi, i da se praktično može posmatrati kao dvofazna membranska ekstrakcija, a da se korišćenjem trofazne membranske značajno smanjuje potrošnja organske faze.



Slika 4. Zavisnost stepena ekstrakcije linurona (○) i tebufenozida (□) od protoka polaznog rastvora (Q_D).

Zaključak

U ovom radu pokazano je da se ispitivani pesticidi, linuron i tebufenozid, veoma dobro uklanjaju iz donorskog vodenog rastvora primenom ekstrakcije u kontaktoru na bazi mikroporoznih kapilara pri kontinualnom protoku donora bez recirkulacije. Stepenu ekstrakcije ispitivanih pesticida se smanjuje sa povećanjem protoka donora. *E* se smanjuje od 94% do 79,1% za tebufenozid i od 75,6% do 54,7% za linuron, pri povećanju protoka od 0,5 do 1,8 cm³ min⁻¹. Ekstrakcija linurona i tebufenozida iz vode u membranskom kontaktoru na bazi hidrofobnih poroznih kapilara sa 5% TOPO-om na osnovu eksperimentalnih rezultata pokazala se kao efikasna i može se primeniti za njihovo uklanjanje iz industrijskih voda.

Zahvalnica: Ovaj rad je finansiran podrškom Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije kroz projekat Fizika i hemija sa jonskim snopovima, broj III 45006.

Extraction of pesticides linuron and tebufenozid in a hollow fiber contactor

In this paper the membrane extraction of pesticides (linuron and tebufenozid) with 5% TOPO in di-hexylether was investigated using a laboratory made contactor consisting of hydrophobic polypropylene hollow fibers. The purpose of this study was determination of the donor flow rate influence on the extraction efficiency of the studied pesticides. The obtained results show the influence of the donor flow rate in the operation mode without recirculation on the extraction of pesticides. Extraction efficiency is reduced from 94% to 79,1% for tebufenozid and from 75,6% to 54,7% for linuron with the increasing flow rate from 0,5 to 1,8 cm³min⁻¹.

Literatura

1. F. Hernández, O. J. Pozo, J. V. Sancho, L. Biljsma, M. Berredá, E. Pitarch, *J. Chromatogr. A.* **1109** (2006) 242.
2. Jonsson JÅ, Mathiasson L, *J. Sep. Sci.* **24** (2001) 495.
3. M. Pankhania, T. Stephenson, M.J. Semmends, *Water Res.* **28** (1994) 2233.
4. W. Kujawski, A. Warszawski, W. Rotajaczak, T. Porębski, W. Capala, I. Ostrowska, *Desalination* **163** (2004) 287.
5. G.D. Bothun, B.L. Knutson, H.J. Strobel, S.E. Nokes, *J. Membr. Sci.* **227** (2003) 183.
6. M. Younas, S. Droun Bocquet, J. Sanchez, *J. Membr. Sci.* **323** (2008) 386.
7. C. Yang, E.L. Cussler, *Biotechnol. Bioeng.* **69** (2000) 66.

Determination of the natural zeolite capacity for the adsorptive removal of crystal violet dye from aqueous solution using response surface methods

Suzana I. Dimitrijević-Branković, Marija D. Pavlović, Aneta V. Buntić, Milica M. Randelović, Katarina R. Mihajlovski, Nevenka Z. Rajić, Dušan G. Antonović, Slavica S. Šiler-Marinković

Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Introduction

Various industries such as food, textile, papers and plastics generate waste water with dissolved dyes. The most of them are synthetic as well as inert that cannot be easily degraded. In addition, they can be harmful agents that can damage living systems. For example, crystal violet (CV) is a cationic dye that is more toxic than anionic dyes because it can easily interact with negatively charged cells membrane surface¹. It is widely used as a biological stain and it showed toxic effect to mammalian cells as well as mutagenic and carcinogenic effects. For this reasons, the removal of dyes from waste water is still gain considerably attention among researchers. Adsorptive removal of dyes from water is the most commonly studied². Various natural as well as activated or synthetic adsorbents are used. Natural and synthetic zeolites are commonly used in adsorption study because of their unique adsorption, ion-exchange, molecular sieve and catalytic properties. The main benefit of zeolites is that they are low cost and are wide spread in terrestrial environment³. However, there are small numbers of investigations that used the natural zeolite for adsorption of crystal violet dye. In this work we used response surface methodology (RSM) for determination of optimal parameters related natural zeolite capacity for adsorptive removal of crystal violet. RSM was recently started to employ for adsorption processes. The most common methods employ various kinetics models for adsorptive capacity determination⁴. However, RSM is very useful method for studying the effect of several variables influencing the responses by varying them simultaneously with limited number of experiment⁵. Thus, we performed RSM and central composite design for determination of natural zeolite adsorption capacity and compared the results with some of kinetic models.

Materials and methods

Materials

A natural zeolite was obtained from the sedimentary Zlatokop deposit (Vranjska banja, Serbia) with grain size in the range 0.063-0.1 mm. A previous detailed X-ray powder diffraction (XRPD) analysis showed that the zeolitic tuff contains 72.6 % clinoptilolite phase, 14.6 % feldspar plagioclase and 12.8 % quartz⁶. The chemical composition of the clinoptilolite phase expressed by oxide mass % is as follows: SiO₂ – 65.63, Al₂O₃ – 12.97, Fe₂O₃ – 1.48, Na₂O – 0.95, K₂O – 1.33, CaO and MgO – 1.41, loss of ignition - 12.96⁷.

Process variables and experimental design

Software Design Expert 8 (Trial version, Stat-Ease, Inc.) was employed for process optimisation and statistical analysis. Three process variables of central composite design were selected for investigations: adsorbent dosage (A), initial concentration of CV (B) and time of contact (C) in dynamic ambient conditions. A and B were applied as five level numeric factors while the C was applied as three level discrete numeric factor. This condition generate quadratic model with 30 runs which consisted of 12 factorial, 12 axial and 6 central design points. The limits of process variables are presented in Table 1.

Adsorption procedure

Crystal violet (Acros organics) working solution with concentration of 1g/l was prepared in distilled water. The appropriate solutions (100 ml) of dye were prepared in 250 ml Erlenmeyer flasks in which the appropriate amounts of adsorbent were added. The flasks were placed in water bath shaker at 100 rpm at room temperature (25°C). After required time, the samples were taken, filtered using filter paper and the absorbance were determined by UV/VIS Spectrophotometer (Amersham, Bioscience) at

540 nm (maximum absorbance for CV dye). The amounts of CV adsorbed onto adsorbent were calculated using Eq. 1.

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e) \cdot V}{W} \quad (1)$$

where q_e is the adsorption capacity (mg/g), C_0 and C_e are the initial and equilibrium concentration (mg/l) respectively, W is the adsorbent dosage (g) and V is the solution volume (l).

Table 1. Process control variable and their limits

Variable	Units	Notation	Limits				
			α	1	0	+1	$+\alpha$
Adsorbent dose ⁿ	g/100 ml	A	0.19	0.50	1.25	2.00	2.31
Initial concentration of dye ⁿ	mg/l	B	8.58	50	150	250	291.42
Time of agitation ^c	s	C		120	600	1200	

ⁿ numeric factor, ^c discrete numeric factor

Table 2. Design of RSM and its actual and predicted values

Run	A g/100 ml	B mg/l	C s	Adsorptive capacity mg/g	
				Experimental	Predicted
1	0.50	250	1200	3.11	4.32
2	0.50	50	120	2.06	1.57
3	1.25	150	600	9.74	10.19
4	1.25	150	1200	9.44	10.18
5	2.00	250	600	11.33	11.44
6	0.50	50	1200	3.04	2.27
7	2.00	50	1200	2.25	2.18
8	2.00	250	1200	11.29	11.04
9	0.19	150	1200	1.58	1.69
10	0.19	150	600	1.29	1.70
11	2.31	150	1200	6.20	6.38
12	1.25	8.58	600	0.43	1.46
13	1.25	150	1200	10.92	10.18
14	1.25	291	120	9.86	10.74
15	1.25	8.58	1200	1.50	2.01
16	2.00	50	120	2.25	1.49
17	1.25	8.58	120	0.61	1.02
18	1.25	150	120	10.16	10.20
19	1.25	291.4 2	600	11.30	10.29
20	2.00	50	600	2.49	1.80
21	1.25	150	120	10.09	10.20
22	0.50	250	600	6.45	4.72
23	1.25	150	600	10.80	10.19
24	0.50	250	120	5.07	5.04
25	2.31	150	120	5.74	6.40
26	0.19	150	120	0.95	1.71
27	0.50	50	600	2.47	1.88
28	2.00	250	120	11.84	11.76
29	1.25	291.4 2	1200	9.46	9.71
30	2.31	150	600	6.42	6.39

Adsorption kinetics

For determination of adsorption kinetics, adsorbent mass (2.0 g natural zeolite) and 100 ml of water dye solution with initial concentration of 250 mg/l in 250 ml Erlenmeyer flask was shaken in water bath at 100 rpm at room temperature (25°C). Samples were taken at defined time intervals (1-60 min) and prepared for measurement as described previously. The percentage removal of dye was calculated using C_0 and C_e (Eq. 2):

$$\text{Removal \%} = \frac{C_0 - C_e}{C_0} \cdot 100 \quad (2)$$

In order to analyze the adsorption kinetics of dye the pseudo-second order was applied to data according to equation 3:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{(k_2 q_e^2)} + \frac{1}{q_e} t \quad (3)$$

where k_2 is second order reaction rate equilibrium constant (g/mg h).

Results and discussion

Regression model equation for CV removal

The experimental design matrix derived from central composite design as well as the observed and predicted responses (adsorption capacity) are presented in Table 2. The average adsorption capacity ranged from 0.43 to 11.84 mg/g. A reduced quadratic model was built to estimate the response as a function of adsorbent dose, initial concentration of CV and time of agitation. The analysis of variance (ANOVA) is presented in table 3. The significant factors (p-value > F) that influence the adsorption capacity were adsorbent dose (A), initial concentration of CV (B), their quadratic coefficients as well as interaction AB and BC. Time of agitation (C) showed low level of

significance. For further regression analysis, the model was modified (reduced by rejection of

nonsignificant AC) and the best fitted model equation which describes the CV adsorption process by natural zeolite was obtained as:

$$\text{Adsorbent capacity} = 10.19 + 1.66 \times A + 3.08 \times B - 7.747 \times 10^{-3} \times C + 1.70 \times AB - 0.36 \times BC - 3.07 \times A^2 - 2.16 \times B^2 \quad (3)$$

The goodness of fit of the model was checked by the correlation coefficient (R^2) between the experimental and model predicted values of the response variable (Figure 2a). A high value of R^2 (0.9508) indicated that most of the data variation was explained by the regression model. A plot of the normal probability of the residuals is shown in Fig. 2b. The normal probability plot of the residuals is an important diagnostic tool to detect and explain the systematic departures from the assumption that errors are normally distributed and is independent of each other, and that the error variance is homogeneous.

Table 3. Analysis of variance for quadratic model of central composite design

Source	Sum of Squares	Degree of freedom	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Model	473.77	7	67.68	114.36	< 0.0001 ^s
A-Adsorbent dose	66.01	1	66.01	111.53	< 0.0001 ^s
B-Initial concentration of CV	227.24	1	227.24	227.24	< 0.0001 ^s
C-Time of agitation	1.205 10^{-3}	1	1.205 10^{-3}	2.037 10^{-3}	0.9644 ^{ns}
AB	34.69	1	34.69	58.61	< 0.0001 ^s
BC	2.03	1	2.03	3.43	0.0776 ^{ns}
A ²	129.50	1	129.50	218.82	< 0.0001 ^s
B ²	63.89	1	63.89	107.95	< 0.0001 ^s
Residual	13.02	22	0.59		
Lack of Fit	11.37	19	0.60	1.09	0.5497 ^{ns}
Pure Error	1.65	3	0.55		
Cor Total	486.79	29			

^s significant ^{ns} nonsignificant

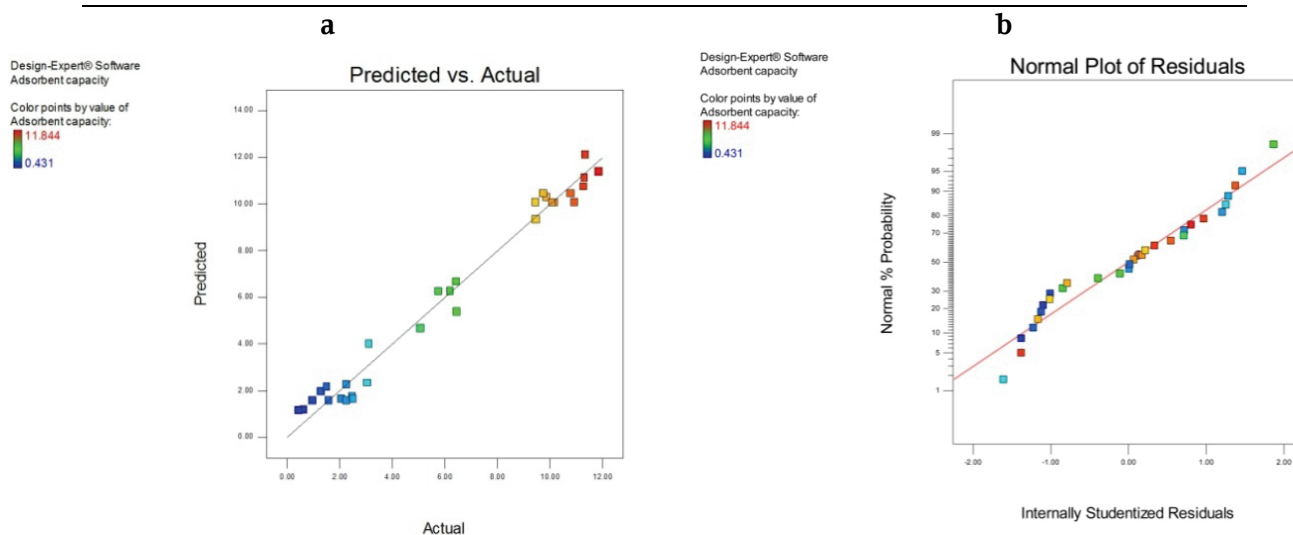


Figure 2 a) Plot of the measured and model predicted values of the response variable and (b) the normal probability plot of the residuals.

Estimation of quantitative effects of the factors

The tree dimensional response surface and contour plot obtained from numerical optimization of model (adsorbent dose of 2 g, initial CV concentration of 250 mg/l and agitation time of 600 s) were presented in figure 3a and 3b. These optimal conditions gained predicted maximal value for adsorbent capacity of 11.439 mg/g with desirability of 0.991.

a

b

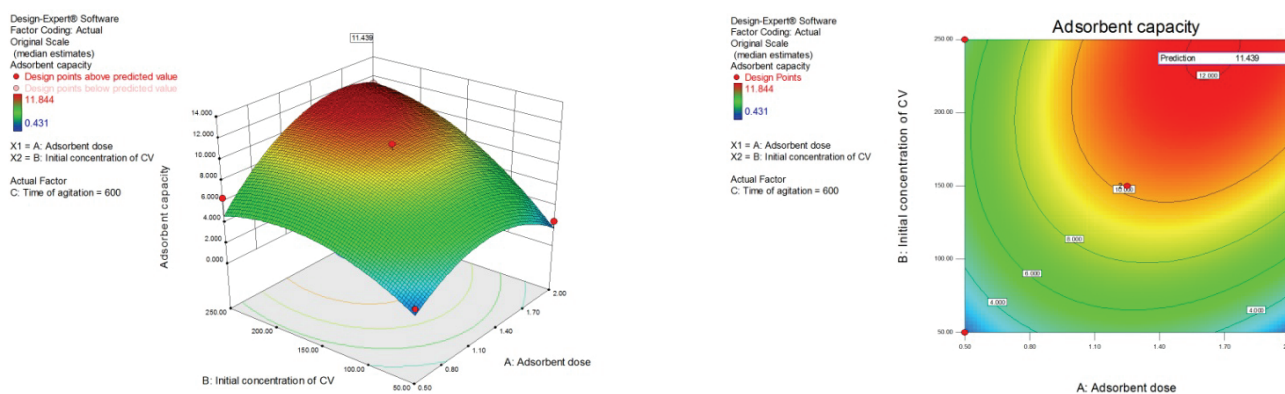


Figure 3. 3D plot (a) and contour (b) of adsorbent dose and initial concentration effects on zeolite adsorptive capacity for CV

Pseudo-second order kinetic parameters

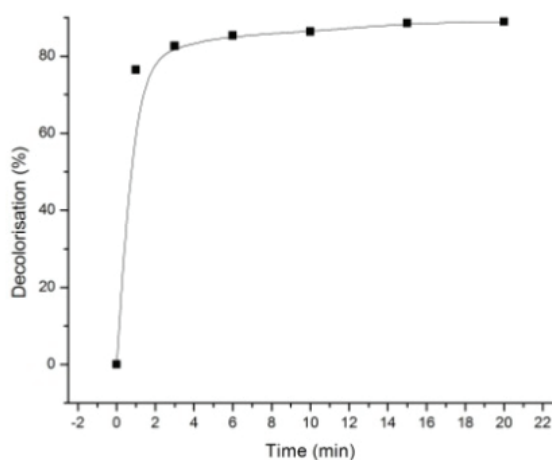


Figure 4. Effect of agitation time on decolorisation

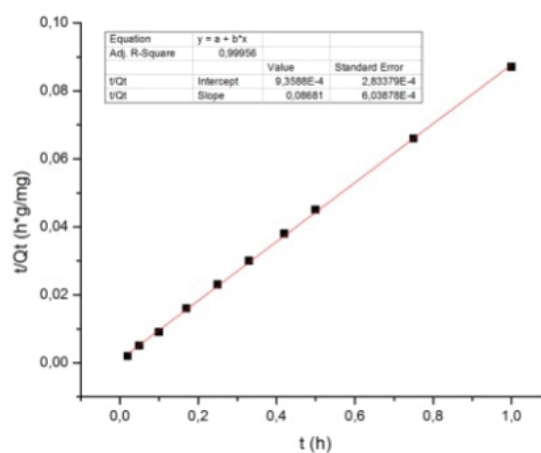


Figure 5. The second-order kinetics of CV adsorption on natural zeolite

Investigation of adsorption rate over a period of 1 to 60 minutes gain the result expressed as percent of adsorption which are shown in figure 4.

A plot of t/q_t against t (figure 5) gave a linear relationship that is applicable for the pseudo-second order kinetic. The pseudo-second order considers the rate of occupation of adsorption sites to be proportional to the number of unoccupied sites. The estimated kinetics parameters were $R^2 = 0.99956$, $k_2 = 0.0039$ g/mg h and $q_e = 11.519$ mg/g, which is closely related to the q_e obtained by RSM (Figure 3a and b).

Conclusion

The results of this work suggested that response surface methodology can be useful tool for investigation of adsorption capacity of adsorbent such as natural zeolite. Both, RSM and standard kinetics equation of pseudo-second order predicted similar values of the natural zeolite adsorption capacity for crystal violet dye (11.439 mg/g and 11.519 mg/g, respectively) in applied experimental condition. The advantage of RSM is that it relates the influence of several factors simultaneously with limited number of runs and gives the possibility to compare the combined effect of these factors.

Acknowledgments: This work is the part of the research within the Project TR31035, which is financed by the Ministry of Education and Science, Republic of Serbia.

Određivanje kapaciteta prirodnog zeolita u adsorptivnom uklanjanju boje kristal violet iz vodenog rastvora primenom metode površine odziva

U radu je ispitan kapacitet prirodnog zeolita (ležište Zlatokop, Vranjska Banja, Srbija) u adsorptivnom uklanjanju boje kristal violet (CV) iz vodenog rastvora. Izvršena je optimizacija procesa adsorpcije primenom metode površine odziva i centralnog kompozitnog dizajna (Design Expert 8, trial version). U dobijeni kvadratni model su uključena dva numerička faktora (količina prirodnog zeolita i početna koncentracija boje) sa 5 vrednosti i jedan numerički faktor (vreme kontakta) sa 3 vrednosti, pri dinamičkim ambijetalnim uslovima ($t=25^{\circ}\text{C}$, brzina mešanja 100 rpm i pH 6). Rezultati su pokazali da je maksimalna eksperimentalna vrednost za adsorptivni kapacitet prirodnog zeolita, dobijena primenom 2 g zeolita u 100 ml vodenog rastvora CV početne koncentracije od 250 mg/l, u toku 600 s, iznosila 11.844 mg/g. Korelacija eksperimentalnih i vrednosti koje su predviđene modelom, pokazuju visoku vrednost R^2 (0.9733) što ukazuje na to da je većina varijacija podataka objašnjena datim regresionim modelom. Optimizacijom ispitivanih parametara u dobijenom kvadratnom modelu centralnog kompozitnog dizajna, dobijeno je predviđanje maksimalne vrednosti adsorptivnog kapaciteta od 11.439 mg/g, a ispitivanjem kinetičkih modela ustanovljeno je da su rezultati uporedivi sa kinetičkim parametrima reakcije drugog reda ($q_e=11.519$ mg/g).

References

1. S. Mona, A. Kaushik, C.P. Kaushik, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65 (2011) 513-521
2. S. J. Allen, B. Koumanova, *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 40 (2005) 175-192
3. E. Ariyanto, *Reaktor*, 12 (2009) 161-165
4. R. Ahmad, *Journal of Hazardous Materials*, 171 (2009) 767-773
5. P. Sudamalla, P. Saravanan and M. Matheswaran, *Sustain. Environ. Res.*, 22 (2012) 1-7
6. Š. Cerjan Stefanović, N. Zabukovec Logar, K. Margeta, N. Novak Tušar, I. Arčon, K. Maver, J. Kovač, V. Kaučič, *Micropor. Mesopor. Mater.*, 105 (2007) 251.
7. N. Rajic, D. Stojakovic, N. Daneu, A. Recnik, *J. Phys. Chem. Solids*, 72 (2011) 298.

Analiza tragova lekova i pesticida u komunalnoj otpadnoj vodi Beograda

Nikolina N. Antić, Marina M. Radišić, Svetlana D. Grujić, Tatjana M. Vasiljević, Mila D. Laušević

Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Karnegijeva 4, Beograd, Srbija

Uvod

Pesticidi i lekovi pripadaju grupi zagađujućih materija čije prisustvo u životnoj sredini predstavlja izuzetno zanimljivo područje analitičkih ispitivanja poslednjih godina. Lekovi dospevaju u životnu sredinu njihovim konstantnim korišćenjem u humanoj medicini i veterini. Izvori zagađenja površinskih i podzemnih voda aktivnim supstancama lekova su domaćinstva, bolnice i farmaceutska industrija. Najvećim delom lekovi dospevaju u životnu sredinu putem komunalnih otpadnih voda¹⁻³.

Pesticidi su hemijske supstance koje su široku primenu našle u poljoprivredi, voćarstvu, šumarstvu, kao i u komunalnoj higijeni. Ova jedinjenja dospevaju u životnu sredinu spiranjem sa površine tretiranog zemljišta, direktnim putem prilikom aerotretmana, pri nepravilnoj tehnologiji prskanja i zaprašivanja, kao i iz urbane sredine. U urbanoj sredini pesticidi se koriste u domaćinstvu za suzbijanje štetočina, prilikom distribucije hrane, u baštama, parkovima, na golf terenima, i dospevaju u septičke jame, komunalne vode, a zatim i u prirodne vodotokove⁴⁻⁶.

S obzirom na to da značajne količine lekova i pesticida koje dospevaju u prirodne vodotokove potiču iz komunalne otpadne vode, kontrola sastava komunalne vode je veoma značajna i potrebna. Predmet ovog rada je ispitivanje sadržaja odabranih lekova i pesticida u komunalnoj otpadnoj vodi Beograda. Odabrani su najčešće korišćeni pesticidi i lekovi u Srbiji, koji po svojoj strukturi pripadaju različitim grupama. Analizirani su sledeći pesticidi: simazin, atrazin, propazin, linuron, monuron (herbicidi); monokrotofos, dimetoat, malation, tebufenozid, imidakloprid, acetamiprid, karbofuran, karbaril (insekticidi); i karbendazim (fungicid). Ispitivani su sledeći lekovi: trimetoprim, sulfametoksazol (antibiotici); bromazepam, lorazepam, diazepam, karbamazepin (sedativi); i diklofenak (analgoantipiretik). Uzorci su uzeti na sedam različitih lokacija ispusta komunalne otpadne vode u Beogradu u junu i julu 2011. godine. Metode posebno razvijene za analizu tragova pesticida⁷, a zatim i lekova⁸ u površinskoj i podzemnoj vodi su objedinjene u jednu multirezidualnu metodu koja je nakon validacije primenjena na uzorke otpadne vode.

Kao metoda pripreme uzoraka korišćena je ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE, engl. Solid Phase Extraction) kojom se istovremeno postiže izolovanje, prečišćavanje i koncentrovanje analita iz tečnog uzorka na čvrstom adsorbensu. To je široko primenjivana tehnika zbog svoje jednostavnosti, brzine i efikasnosti. Koristi se pri analizi tragova supstanci u uzorcima iz životne sredine, farmaceutskim i biohemijskim analizama, kao i u analizi namirnica^{6,9}.

Za identifikaciju i kvantitativno određivanje lekova i pesticida korišćena je tačna hromatografija visoke performanse u sprezi sa tandem masenom spektrometrijom (HPLC-MS/MS, engl. High Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry). Ova tehnika je tehnika izbora za identifikaciju i kvantitativno određivanje polarnih, neisparljivih i termonestabilnih jedinjenja iz složenih matrica, kao što je otpadna voda. Najveću primenu ima u farmaciji, medicini, forenzici i zaštiti životne sredine^{7,8}.

Eksperimentalni deo

Ekstrakcija na čvrstoj fazi

Priprema OASIS HLB kolone za ekstrakciju vršena je laganim nanošenjem 5 ml smeše rastvarača metanol-dihlormetan (1:1) i 10 ml dejonizovane vode. Nakon pripreme kertridža, nanošeno je 100 ml uzorka otpadne vode, sa pH-vrednošću podešenom na 6. Kolona je zatim sušena 5–10 min. na vakuumu i eluirana sa 15 ml smeše metanol-dihlormetan (1:1). Dobijeni ekstrakt je uparen do suva u struji azota, u vodenom kupatilu na 30 °C, a zatim rekonstituisan u 1 ml metanola. Ovako dobijen ekstrakt filtriran je kroz filter veličine pora 0,45 µm i zatim analiziran.

HPLC-MS analiza

U ovom radu korišćen je Surveyor HPLC sistem (Thermo Fisher Scientific, SAD). Razdvajanje je vršeno na Zorbax Eclipse® XDB-C18 koloni (Agilent Technologies, SAD), dimenzija 4,6 mm x 75 mm x 3,5 µm. Mobilna faza sastojala se od metanola, dejonizovane vode i 10 mas.% sirćetne kiseline. U HPLC sistem

je unošeno 10 µl uzorka. Maseni spektri dobijeni su korišćenjem LCQ Advantage (Thermo Fisher Scientific) jonskog trapa, kao masenog spektrometra. Pri radu je korišćena elektrosprej jonizaciona tehnika (ESI, engl. Electrospray Ionization), a svi analiti su analizirani kao pozitivni joni. Za svaki analit sniman je hromatogram odabrane reakcije (SRM, engl. Selected Reaction Monitoring), na osnovu koga je vršena kvalitativna i kvantitativna analiza. Obrada podataka izvršena je pomoću softverskog paketa Xcalibur v. 1,3 (Thermo Fisher Scientific).

Kalibracija

Kalibracija je izvršena upotrebom tzv. „matrix-matched” standarda, tj. standarda koji odgovaraju matrici uzorka. Ovi standardi su pripremljeni dodatkom standardnog rastvora smeše lekova i pesticida u finalni ekstrakt dobijen nakon SPE procedure.

Rezultati i diskusija

Validacija analitičke metode

U cilju provere valjanosti analitičke metode ispitivani su sledeći parametri: prinos metode, linearnost, granica detekcije i kvantifikacije, kao i ponovljivost metode (tabela 1). Analizirani su uzorci otpadne vode u koje je dodata poznata količina svih analita (100 ng l⁻¹).

Dobijene vrednosti prinosa analitičke metode su u intervalu 80–118% i može se zaključiti da su u prihvatljivom opsegu, sa vrednostima relativne standardne devijacije generalno manjim od 20%.

Sledeći parametri validacije su granica detekcije (LOD, engl. Limit of Detection) i granica kvantifikacije (LOQ, engl. Limit of Quantification). Granica detekcije predstavlja najnižu koncentraciju analita koja se može detektovati u uzorku, a računa se kao koncentracija pri kojoj je vrednost odnosa signala i šuma 3:1 (S/N = 3, engl. Signal to Noise). Granica kvantitativnog određivanja izračunata je kao koncentracija pri kojoj je vrednost S/N = 10. Postignute su niske granice detekcije (0,21–4,76 ng l⁻¹) i kvantifikacije (0,70–15,87 ng l⁻¹) za sve posmatrane analite.

Linearnost je još jedan parametar valjanosti analitičke metode i definiše se kao mogućnost da se u datom opsegu koncentracija detektuje signal koji je direktno proporcionalan koncentraciji ili količini analita. Za sve posmatrane analite koeficijenti linearnosti kreću se od 0,9923 do 0,9993, što ukazuje na to da je metoda linearna, u posmatranom opsegu koncentracija (10–500 ng l⁻¹).

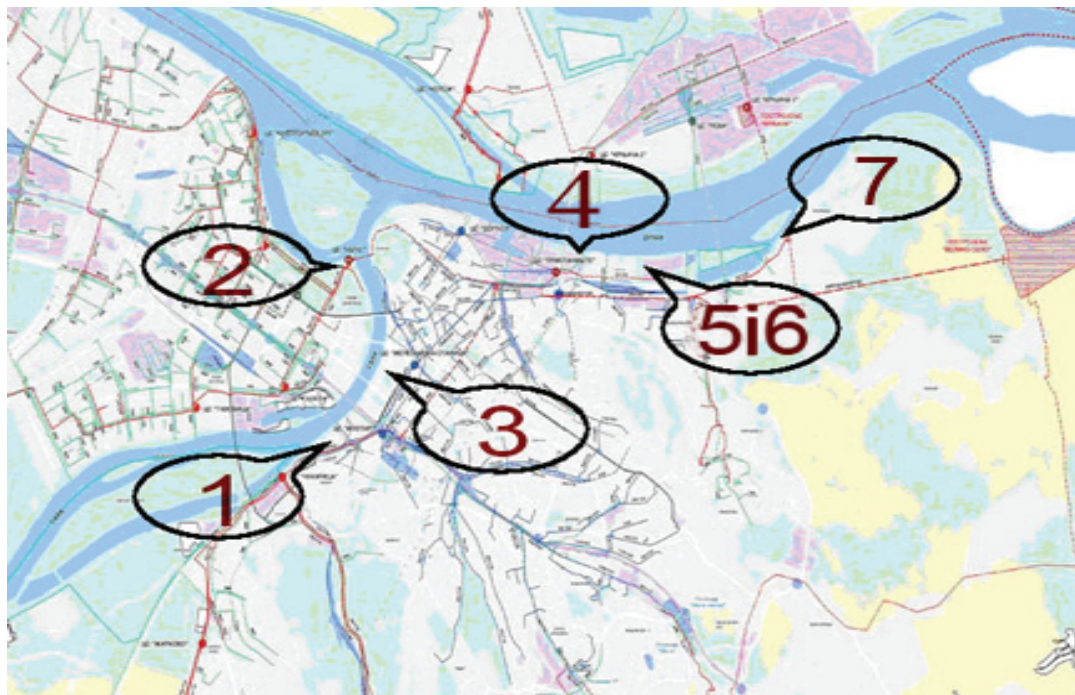
Na osnovu ovih parametara je utvrđeno da je metoda odgovarajuća, dovoljno osetljiva, da daje zadovoljavajuće prinose i da se uspešno može primeniti za određivanje odabranih lekova i pesticida u otpadnoj vodi.

Tabela 1. Parametri validacije analitičke metode

Analit	Prinos, % (RSD, %) 100 ng l ⁻¹	Granica detekcije i kvantifikacije		Koeficijent linearnosti
		LOD / ng l ⁻¹	LOQ / ng l ⁻¹	
Monokrotofos	88 (4)	1,04	3,47	0,9983
Karbendazim	84 (6)	1,18	3,93	0,9982
Acetamiprid	89 (14)	2,64	8,80	0,9946
Dimetoat	84 (3)	0,42	1,40	0,9989
Simazin	88 (8)	1,23	4,10	0,9951
Karbofuran	86 (5)	0,23	0,77	0,9964
Atrazin	89 (9)	0,67	2,23	0,9953
Malation	89 (4)	0,36	1,20	0,9986
Tebufenozid	80 (6)	2,60	8,67	0,9993
Imidakloprid	82 (5)	1,61	5,37	0,9982
Monuron	85 (7)	1,39	4,63	0,9967
Karbaril	80 (7)	1,43	4,77	0,9944
Propazin	88 (6)	0,46	1,53	0,9983
Linuron	118 (20)	2,63	8,77	0,9981
Trimetoprim	88 (17)	0,21	0,70	0,9962
Sulfametaksazol	105 (11)	4,76	15,87	0,9993
Bromazepam	90 (1)	0,97	3,23	0,9991
Lorazepam	107 (2)	0,24	0,80	0,9977
Diazepam	88 (15)	0,40	1,33	0,9923
Diklofenak	92 (20)	1,76	5,87	0,9937
Karbamazepin	96 (4)	0,21	0,70	0,9972

Analiza realnih uzoraka

Uzorkovanje otpadne vode vršeno je automatskim uzorkivačem na svakih sat vremena tokom 24 h. Mešanjem određene zapremine svakog od uzetih uzoraka dobijen je kompozitni (zbirni) uzorak koji je analiziran. Mesta uzorkovanja obuhvataju 80% svih ispusta komunalne otpadne vode u Beogradu. Uzorkovanje je izvršeno na sledećim tačkama: Sajam (1), Ušće (2), Lasta (3), Istovar (4), Ada Huja 1 (5), Ada Huja 2 (6) i Višnjica (7). U junu je izvršena analiza uzoraka vode koji su uzeti sa svih 7 mernih lokacija, a u julu sa 4 merne lokacije (Sajam, Ušće, Ada Huja 1, Ada Huja 2). Mapa sa obeleženim mestima uzorkovanja prikazana je na slici 1.



Slika 1. Mesta uzorkovanja

U tabeli 2 prikazane su koncentracije detektovanih lekova i pesticida u uzorcima otpadne vode. Najčešće detektovani analiti su pesticid karbendazim i lekovi lorazepam i diklofenak. Prisustvo karbendazima detektovano je u većini uzetih uzoraka, izuzev u onim sa mernih mesta Ušće i Lasta. Diklofenak je detektovan u svakoj tački uzorkovanja, dok lorazepam nije samo na mernom mestu Višnjica. Najviše analita detektovano je na mernom mestu Sajam. Ovo se može objasniti činjenicom da se upravo ovde sakuplja najveća količina otpadne vode Beograda. Lekovi su detektovani na svim mestima uzorkovanja, dok pesticidi nisu detektovani u uzorcima uzetim na mestima Ušće i Lasta. Od 14 ispitivanih pesticida 8 nije detektovano, dok od lekova nisu detektovani bromazepam i karbamazepin. Pronađene koncentracije pesticida kreću se u opsegu od $12,2 \text{ ng l}^{-1}$ (propazin) do $144,5 \text{ ng l}^{-1}$ (malation). Najniža koncentracija za lekove izmerena je za diklofenak ($58,4 \text{ ng l}^{-1}$), a najviša za sulfametoksazol ($1184,2 \text{ ng l}^{-1}$).

Tabela 2. Lekovi i pesticidi detektovani u uzorcima otpadne vode (ng l^{-1})

Analit	Sajam		Ada Huja 1		Ada Huja 2		Ušće		Lasta	Istovar	Višnjica
	jun	jul	jun	jul	jun	jul	jun	jul	jun	jul	jun
Karbendazim	96,9	31,9	21,8		24,4				jun	51,8	31,7
Dimetoat		25,3									127,3
Karbofuran		80,7									
Malation	144,5										
Imidaklopid	72,8										
Propazin	12,2										
Trimetoprim	122,2		482,0								
Sulfametoksazol			1184,2								
Lorazepam	171,4		77,0		104,7		582,5	104,7	83,6	166,6	
Diazepam	162,8										
Diklofenak	442,1		782,0		479,0		58,4		578,7	471,1	310,0

Zaključak

U ovom radu ispitivan je sadržaj odabranih lekova i pesticida u beogradskoj komunalnoj otpadnoj vodi. Odabrani su najčešće korišćeni pesticidi i lekovi u Srbiji, koji po svojoj strukturi pripadaju različitim grupama. Uzorci su uzeti na sedam različitih lokacija ispusta komunalne otpadne vode u Beogradu u junu i julu 2011. godine. Metode posebno razvijene za analizu tragova pesticida, a zatim i lekova u površinskoj i podzemnoj vodi su objedinjene u jednu multirezidualnu metodu koja je nakon validacije primenjena na uzorke otpadne vode. Najčešće detektovani analiti su pesticid karbendazim, i lekovi lorazepam i diklofenak. Najviše analita je detektovano na mernom mestu Sajam.

Zahvalnica: Ovaj rad je finansiran od strane Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije (broj projekta 172007).

Determination of Pharmaceutical and Pesticide Residues in Belgrade Urban Wastewater

Since significant amounts of pharmaceuticals and pesticides present in the aquatic environment originate from the urban wastewater, there is need for the control of urban wastewater composition. Methods separately developed for analysis of pharmaceutical and pesticide residues in surface and ground water were combined in a single multiresidual method that was applied to the wastewater samples after validation. The sample preparation consisted of solid-phase extraction of 100 ml of the wastewater sample (pH 6), using Oasis HLB cartridge, and elution with methanol-dichloromethane (1:1) mixture. Extracts were analyzed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, using electrospray ionization technique. Recoveries of the validated method were in the range 80–118%. Repeatability of the method was in general lower than 20%. Low limits of detection (0.21–4.76 ng L⁻¹) and quantification (0.70–15.87 ng L⁻¹) were achieved for all investigated analytes. Validated method was successfully applied in analysis of samples from Belgrade urban wastewater system. The most frequently detected analytes were pesticide carbendazim, and pharmaceuticals lorazepam and diclofenac.

Literatura:

1. S.E. Jørgensen, B. Halling-Sørensen, *Chemosphere*, **40** (2000) 691
2. C.A. Daughton, T.A. Ternes, *Environmental Health Perspectives*, **107** (1999) 1
3. S. Zuehlke, U. Duennbier, T. Heberer, *Analytical Chemistry*, **76** (2004) 6548
4. H. Blanchoud, E. Moreau-Guigon, F. Farrugia, M. Chevreuil, J.M. Mouchel, *Science of the Total Environment*, **375** (2007) 168
5. I.K. Wittmer, H.-P. Bader, R. Scheidegger, et al., *Water Research*, **44** (2010) 2850
6. F. Liu, G. Bischoff, W. Pestemer, W. Xu, A. Kofoet, *Chromatographia*, **63** (2006) 233
7. N. Dujaković, S. Grujić, M. Radišić, T. Vasiljević, M. Laušević, *Analytica Chimica Acta*, **678** (2010) 63.
8. S. Grujić, T. Vasiljević, M. Laušević, *Journal of Chromatography A*, **1216** (2009) 4989
9. J.M.F. Nogueira, T. Sandra, P. Sandra, *Analytica Chimica Acta*, **505** (2004) 209

Biodegradacija kalemljenih kopolimera polistirena i skroba u rečnoj vodi

Vladimir B. Nikolić, Sava J. Veličković*, Dušan G. Antonović*, Aleksandar R. Popović**

Inovacioni centar, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Studentski trg 12-16, Beograd, Srbija,

Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Karnegijeva 4, Beograd, Srbija,

***Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Studentski trg 12-16, Beograd, Srbija*

1. Uvod

Porast svesti o rastućem problemu očuvanja životne sredine vodi porastu proizvodnje bioplastike i biodegradabilnih polimera poslednjih godina¹. Zbog ovih problema sinteza kopolimera u kojima je jedna komponenta prirodna i biodegradabilna je sve učestalija.

Skrob je prirodni polisaharid, koji se nalazi u biljkama i služi za deponovanje energije. Skrob je pogodan i kao ekološki alternativni materijal za pravljenje biodegradabilne plastike. Reakcije vinilnih monomera sa skrobom predstavljaju jedan od najčešćih načina za modifikovanje svojstava kopolimera skroba bez narušavanja njegove biodegradabilne prirode²⁻⁶. Kalemljeni kopolimeri stirena i skroba mogu se dobiti na različite načine: suspenzionom polimerizacijom⁷, emulzionom polimerizacijom⁸, zračenjem ⁶⁰Co^{9,10}. U ovim reakcijama se mogu koristiti različiti inicijatorski sistemi¹¹⁻¹³. Korišćenje amina kao aktivatora na ovim sistemima nije se do sad sretalo u literaturi. Amini, kao aktivatori su korišćeni na sistemima sa itakonskom kiselinom¹⁴.

Najvažnije i najčešće korišćene metode biodegradacije su: metoda degradacije UV zračenjem, biodegradacija u zemljištu, degradacije in vitro različitim vrstama mikroorganizama, kao i biodegradacija u prirodnim i veštačkim (otpadnim) vodama.

Degradacija u rečnoj vodi se najčešće koristi u ispitivanjima biodegradacije surfaktanata¹⁵, najčešće linearnih alkilbenzilsulfonata¹⁶, bisfenola A^{17,18} i raznih glikola¹⁹. Velika pažnja se poklanja degradaciji hlorovanih alifatičnih ugljovodonika, kao što je 1,2-dihloreotan²⁰. Takođe, veoma važna su i ispitivanja biodegradacije sintetskih kopolimera, kao što je polietilen²¹ i njegove blende i kopolimeri sa prirodnim polimerima²².

Glavni cilj ovog rada bio je praćenje biodegradacije kalemljenih kopolimera u rečnoj, savskoj, vodi. Ne postoje literaturni navodi o degradaciji ovih vrsta kalemljenih polimera u rečnoj vodi. Takodje, prvi put je primenjen protočni kontinualni sistem sa recirkulacijom koji je omogućio simuliranje prirodnih uslova u laboratoriji.

2. Eksperimentalni deo

2.1. Materijali

Skrob (Centrohem, Srbija) je sušen 3 dana, pod vakuumom na 50 °C. Stiren (Aldrich Chemicals) je prečišćen destilacijom pod sniženim pritiskom. Kalijum-persulfat (KPS) (Aldrich Chemicals), metanol (Fluka), hloroform (J. T. Baker), toluen (Fluka) i amini: *N,N*-dimetiletanolamin, *N,N*-dietiletanolamin, trietilamin, propilamin, izo-butilamin, pentilamin, heksilamin, 4-(2-hidroksietil)morfolin i 1-(2-hidroksietil)piperazin (svi Fluka) su korišćeni kako su i pristigli. Savska rečna voda je uzeta u Beogradu sa lokacije u blizini ušća Save u Dunav.

2.2. Sinteza i prečišćavanje kalemljenih kopolimera

PS-g-skrob kopolimeri sintetisani su u vodenoj sredini uz KPS kao inicijator i različite amine kao aktivatore polimerizacije.

Cilj ovih sinteza je bio dobijanje kopolimera sa najvećim mogućim stepenom kalemljenja. Skrob i stiren su dodati odmah na početku reakcije. Količina skroba i stirena iznosila je po 10.00 g od svakog reaktanta. Smeša skroba i stirena se meša 30 min da bi se homogenizovala i da bi se dostigla reakciona temperatura. Temperature na kojima su izvodjene ove sinteze varirale su od 55 do 75 °C. Po postizanju reakcione temperature dodavani su KPS i različiti aminoaktivatori. Takodje, ispitivan je uticaj i reakcionog vremena na stepen kalemljenja. Reakciono vreme iznosilo je od 15 min do 2.5 h u reakcijama sinteze kopolimera skroba i stirena. Po isteku reakcionog vremena čvrsta faza se odvaja filtriranjem.

PS-g-skrob kopolimer se mora prečistiti od zaostalog neizreagovanog monomera stirena kao i homopolimera polistirena. Monomer stirena se uklanja rastvaranjem u toluenu, dok se homopolimer uklanja ekstrakcijama u hloroformu. Ekstrakcije se odigravaju na mućkalici u trajanju od 4 h. Nakon ovoga zaostaje kalemljeni kopolimer.

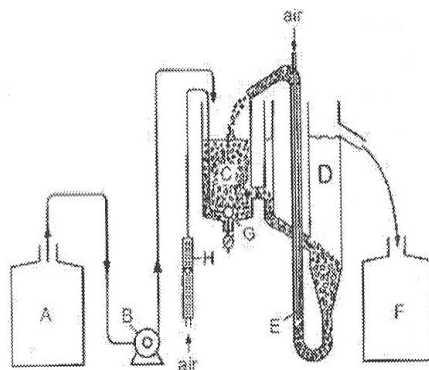
Dobijeni kopolimeri se suše u sušnici na 50 °C do konstantne mase.

2.3. Postupak biodegradacije i mikrobiološke metode

Savska voda sakupljena je u Beogradu neposredno pre ušća Save u Dunav. Količina uzete vode iznosila je 2 litra. Biorazgradnja PS-g-skrob kopolimera ispitivana je pomoću prirodnih mikroorganizama savske vode, uz izdvajanje frakcionim eluiranjem, u periodu od 28 dana, na sobnoj temperaturi. Za ovu metodu određivanja biorazgradivosti korišćena je aparatura prikazana na Slici 1.

Aparatura se sastoji od rezervoara za rečnu vodu A, dozirne pumpe B, aeracione posude C, posude za smeštanje uzorka D, pumpe za recirkulaciju E, posude za prikupljanje efluenta F, pumpe za aeraciju G i merača protoka H.

Da bi se napravila veštačka otpadna voda (VOV) u 3 litre destilovane vode rastvoreni su sledeći sastojci: 800 mg peptona, 550 mg mesnog ekstrakta, 150 mg uree, 35 mg NaCl, 20 mg CaCl₂·2H₂O, 10 mg MgSO₄·7H₂O i 140 mg K₂HPO₄. U ove 3 litre vode dodaju se 2 litre savske vode i tako čine 5 litara veštačke otpadne vode.



Slika 1. Šema aparature za određivanje biorazgradivosti

Aeracija se vrši 48 h kako bi se mikroorganizmi privikli na nove uslove sredine. Rad infuzora se podese tako da protok bude što manji (oko 2 l/dan), kako bi se uslovi mogli smatrati stacionarnim. Nakon 48 h cirkulisanja vode u sistemu, u sistem se smeštaju uzorci kopolimera, u kolonu (D). Svaki od 12 uzoraka je najpre ubačen u mrežastu, vodopropustljivu vrećicu, a zatim su svi uzorci zajedno ubačeni u veliku mrežastu, vodopropustljivu vrećicu i potopljeni na sredinu kolone (D).

Uzorci su vadjeni na svakih 9 dana. Nakon vađenja, uzorci se ispiraju destilovanom vodom, a zatim suše u sušnici na 50 °C do konstantne mase (oko 24 h). Merenjema gubitka mase računa se i procenat biodegradacije na osnovu sledeće formule:

$$\text{biodegradacija, \%} = [(m_0 - m_x) / m_0] \times 100, \quad (1)$$

Gde je m_0 početna masa uzorka, neposredno pre stavljanja u vodu, a m_x masa osušenog uzorka nakon vađenja iz vode posle određenog vremenskog intervala.

Uporedo sa praćenjem biodegradacije, praćen je i broj mikroorganizama prisutnih u vodi, Kohovom metodom. Nakon inkubiranja na agarnoj podlozi (u Petrijevoj kutiji) broje se izrasle kolonije. Pregled zasejanog materijala vrši se posle 48 h inkubacije u termostatu na 30 °C. Zatim se izrasle kolonije broje golim okom ili lupom (n) i množe sa razblaženjem (m) kako bi se dobio ukupan broj živih ćelija u 1 ml ispitivane supstance (N).

$$N = n \times m \quad (2)$$

Broj mikroorganizama se najčešće izražava u obliku log CFU/ml, što u stvari predstavlja logaritmovanu vrednost N ($\log \text{CFU/ml} = \log N$). Skraćenica CFU označava colony forming unit.

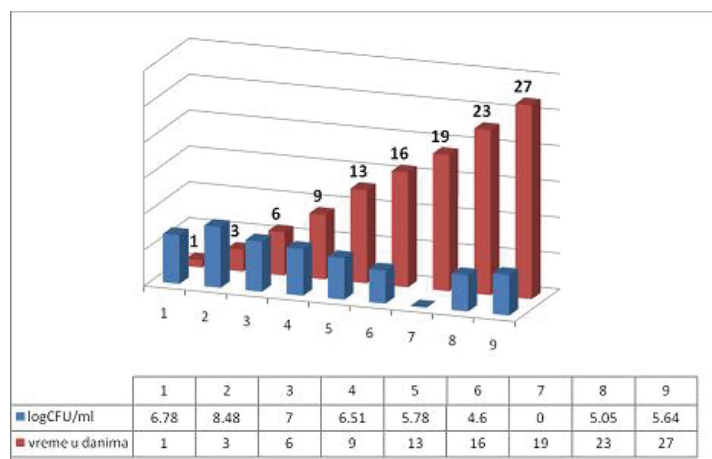
3. Rezultati i diskusija

U ovom istraživanju korišćeno je ukupno 11 uzoraka PS-g-skrob kopolimera i 1 kontrolni uzorak polistirena. Uzorci kopolimera se razlikuju po stepenu kalemljenja, koji su dati u Tabeli 1.

Tabela 1. Stepenu kalemljenja uzoraka PS-g-skrob kopolimera

Redni broj uzorka	6	9	10	11	12	13	15	16	18	19	20
Stepenu kalemljenja (%)	12.93	16.24	25.90	32.55	25.67	6.91	25.27	28.45	18.37	20.91	27.30

Tokom 28 dana, koliko je trajalo izvođenje eksperimenta praćenja biodegradacije kalemljenih kopolimera polistirena i skroba, u uzorcima VOV-a određivan je ukupan broj mikroorganizama. Rezultati ovih ispitivanja prikazani su na Slici 2. Tokom ovog ispitivanja korišćeno je razblaženje od 10^5 .



Slika 2. Promena broja mikroorganizama (u logCFU/ml) tokom izvođenja eksperimenta za uzorke PS-g-skrob kopolimera

Na osnovu podataka sa Slike 2 može se videti da broj mikroorganizama tokom prva tri dana raste, a zatim opada, uz blage varijacije, do potpunog nestanka u 19 danu, pri korišćenom razblaženju od 10^5 . Da bi se broj mikroorganizama povećao u 19 danu dodati su izvori azota i minerala. Nakon toga broj mikroorganizama raste i ima vrednosti logCFU/ml oko 5.5.

Praćenje biodegradacije vršeno je merenjem gubitaka mase uzoraka. Uzorci su vađeni na svakih 9 dana. Rezultati ovih merenja dati su u Tabeli 2. Svi uzorci su pre merenja sušeni u sušnici na 50°C , do konstantne mase.

Tabela 2. Smanjenje mase uzoraka kalemljenih PS-g-skrob kopolimera tokom trajanja eksperimenta

Redni broj uzorka	Masa uzorka (g)	Masa mrežice (g)	Ukupna masa (uzorak + mrežica) (g)	Masa uzorka nakon 9 dana (g)	Smanjenje mase (%)	Masa uzorka nakon 18 dana (g)	Smanjenje mase (%)	Masa uzorka nakon 27 dana (g)	Smanjenje mase (%)
6	0.2440	0.0725	0.3165	0.1912	51.35	0.1321	75.57	0.1040	87.07
9	0.2745	0.0993	0.3738	0.2771	35.23	0.2111	59.27	0.1720	73.52
10	0.2827	0.0836	0.3663	0.2666	35.27	0.2185	52.28	0.1914	61.87
11	0.2728	0.0933	0.3661	0.3101	20.53	0.2705	35.04	0.2412	45.78
12	0.2876	0.1187	0.4063	0.3092	33.76	0.2569	51.95	0.2310	60.95
13	0.2815	0.0882	0.3697	0.1929	62.81	0.1325	84.26	0.1076	93.09
15	0.2919	0.0969	0.3888	0.3218	22.95	0.2743	39.22	0.2436	49.74
16	0.2856	0.0710	0.3566	0.2969	20.90	0.2539	35.96	0.2163	49.12
18	0.2861	0.1137	0.3998	0.2991	35.20	0.2498	52.43	0.2134	65.15
19	0.2893	0.0855	0.3748	0.2712	35.81	0.2194	53.72	0.1838	66.02
20	0.2873	0.0608	0.3481	0.2832	22.59	0.2331	40.03	0.1988	51.97
PS	0.2669	0.0847	0.3516	0.3516	0	0.3516	0	0.3516	0

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 2 može se zaključiti da se sa povećanjem stepena kalemljenja (količine polistirena u kopolimeru) smanjuje biodegradacija uzorka. To je bilo i za očekivati, jer se u tabeli vidi da je biodegradacija polistirena 0, što znači da se u ovom eksperimentu samo skrob degraduje, a što je njegova količina manja, manji je i procenat biodegradacije. Najveći procenat biodegradacije od 93.09 % pokazuje uzorak 13, u kome je količina polistirena najmanja. U ovom uzorku dolazi do potpune razgradnje sveg prisutnog skroba. Do potpune razgradnje skroba dolazi još samo u uzorku 6, koji je sledeći u nizu po količini skroba (drugi po minimalnoj količini polistirena). Sa daljim povećanjem udela polistirena biodegradacija skroba je nepotpuna. Ovaj fenomen se može objasniti na osnovu načina kalemljenja polistirena na skrob. Sa povećanjem udela polistirena u kopolimeru sve veći deo granula skroba ostaje zarobljen lancima polistirena. Pošto mikroorganizmi ne degradiraju polistiren, date granule skroba ostaju van njihovog domašaja, a samim tim se i ne degradiraju, tako da je i ukupan % biodegradacije manji od očekivanog. To se može videti i u Tabeli 2, da kako udeo polistirena raste sve je veća razlika dobijenih rezultata biodegradacije od onih koji su očekivani.

4. Zaključak

U ovom radu izvršena je uspešna sinteza kalemljenih PS-g-skrob kopolimera uz korišćenje novog inicijatorsko aktivatorskog para (kalijum persulfat-aminski aktivatori). Uzorci kopolimera su podvrgnuti biodegradaciji u vodi pod uticajem mikroorganizama savske vode. Biodegradacijom PS-g-skrob kopolimera utvrđeno je da dolazi samo do biodegradacije skroba u ovim uzorcima. Što je procenat polistirena u ovim uzorcima manji to je veća verovatnoća da će sav skrob razgraditi. Sa povećanjem količine polistirena u uzorcima, smanjuje se biodegradacija. Skrob se, u ovim uzorcima, ne razgrađuje u potpunosti, jer delimično ostaje zarobljen česticama polistirena.

Zahvalnica: Autori se zahvaljuju Ministarstvu prosvete i nauke Republike Srbije koje je finansiralo ovaj rad preko projekata OI 172001 i OI 172062.

Biodegradation of polystyrene-graft-starch copolymers in river water

In this manuscript graft copolymers of starch and polystyrene were successfully synthesized, using amines as activators. The main aim of this work was monitoring of biodegradation of these copolymers, with different percentage of grafting, by natural microorganism of River Sava. The experiment was done in laboratory conditions in continuous flow system with recirculation at room temperature and in period of 28 days. The biodegradation was monitored by mass loss of samples. During the experiment, the number of microorganism was monitored, as well. The percentage mass loss varied between 45.78 and 93.09 % for polystyrene-graft-starch copolymers. These results are very significant, because this experiment in soil would last 1 year to achieve the same mass loss, and here these mass losses are achieved in less than a month.

Literatura

1. P. Galgali, U.S. Puntambekar, D.V. Gokhale, A.J. Varma, *Carbohydr. Polym.*, **Vol.** 55 (2004) 393-399.
2. A. Nagaty, F. Abd-Et-Mouti, O.Y. Mansour, *Euro. Polym. Jnl.*, **Vol.** 16 (1980) 343-346.
3. Z. Yang, M. Bhattacharya, R.U. Vaidya, *Polymer*, **Vol.** 37 (1996) 2137-2150.
4. P. Matzinos, V. Tserki, C. Gianikouris, E. Pavlidou, C. Panayiotou, *Euro. Polym. Jnl.*, **Vol.** 38 (2002) 1713-1720.
5. J. Zhou, Y. Ma, L. Ren, J. Tong, Z. Liu, L. Xie, *Carbohydr. Polym.*, **Vol.** 76 (2009) 632-638.
6. B.Y. Shin, S.H. Jang, B.S. Kim, *Polym. Eng. Sci.*, **Vol.** 51 (2011) 826-834.
7. K. Kaewtatip, V. Tanrattanakul, *Carbohydr. Polym.*, **Vol.** 73 (2008) 647-655.
8. C.G. Cho, K. Lee, *Carbohydr. Polym.*, **Vol.** 48 (2002) 125-130.
9. S. Kiatkamjornwong, M. Sonsuk, S. Wittayapichet, P. Prasassarakich, P. Vejjanukroh, *Polym. Degrad. Stabil.*, **Vol.** 66 (1999) 323-335.
10. G.F. Fanta, R.C. Burr, W.M. Doane, C.R. Russell, *J. Appl. Polym. Sci.*, **Vol.** 21 (1977) 425-433.
11. P. Janarthanan, W.M.Z.W. Yunus, M.B. Ahmad, *J. Appl. Polym. Sci.*, **Vol.** 90 (2003) 2053-2058.
12. R.A.D. Graaf, L.P.B.M. Janssen, *Polym. Eng. Sci.*, **Vol.** 40 (2000) 2086-2094.
13. B. Singh, N. Sharma, *Polym. Degrad. Stab.*, **Vol.** 92 (2007) 876-885.
14. S.J. Velickovic, E.S. Dzunuzovic, P.C. Griffiths, I. Lacik, J. Filipovic, I.G. Popovic, *J. Appl. Polym. Sci.*, **Vol.** 110 (2008) 3275-3282.

15. A. Szymanski, J. Jaroszynski, P. Jeszka, Z. Lukaszewski, *Water Res.*, **Vol.** 30 (1996) 2465-2471.
16. J.A. Perales, M.A. Manzano, D. Sales, J.A. Quiroga, *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **Vol.** 43 (1999) 155-160.
17. J.H. Kang, F. Kondo, *Chemosphere*, **Vol.** 49 (2002) 493-498.
18. J.H. Kang, F. Kondo, *Chemosphere*, **Vol.** 60 (2005) 1288-1292.
19. A. Zgola-Grzeskowiak, T. Grzeskowiak, J. Zembruska, Z. Lukaszewski, *Chemosphere*, **Vol.** 64 (2006) 803-809.
20. B. van der Zaan, J. de Weert, H. Rijnaarts, W.M. de Vos, H. Smidt, J. Gerritse, *Water Res.*, **Vol.** 43 (2009) 3207-3216.
21. E. Chiellini, A. Corti, S. D'Antone, *Polym. Degrad. Stabil.*, **Vol.** 92 (2007) 1378-1383.
22. D. Bikiaris, C. Panayiotou, *J. Appl. Polym. Sci.*, **Vol.** 70 (1998) 1503-1521.

Teorijska hemija / Theoretical Chemistry

CompChem (RS) aplikacija u okviru projekta HP-SEE. Dostupni računarski resursi, programi, prednosti i nedostaci

Branko J. Drakulić, Ivan O. Juranić

Centar za hemiju – IHTM, Univerzitet u Beogradu. Njegoševa 12, 11000 Beograd, Srbija
(bdrakuli@chem.bg.ac.rs)

Introduction

High-Performance Computing (HPC) Infrastructure for South East Europe's Research Communities (HP-SEE), supported by the European Commission through seventh framework project (FP7), link existing and upcoming HPC facilities in South East Europe in a common infrastructure, and offer operational solution for it. The initiative open the South East European HPC infrastructure to a wide range of new user communities, including those of less-resourced countries, fostering collaboration and providing advanced capabilities to researchers.¹ The three strategic groups, named as the virtual communities (VC), in computational physics, computational chemistry, and computational life sciences are included in the project.

Project offers computational resources and ported software applications on existing HPC infrastructure from Hungary to Azerbaijan. Along with this regular training and dissemination events were performed, aimed to introduce users in the basic of programming, usage of HPC recourses and software ported. The strong management of the project aim to obtain unified prerequisites on all HPC centers to facilitate porting of the software and their usage. In the same frame younger researcher should be trained to use ported software, perform basic programming and, consequently, be able to use similar HPC facilities in their further work.

Our group is the active participant of the project within Computational Chemistry virtual community. The aim of our application, named 'Quantum Mechanical, Molecular Mechanics, and Molecular Dynamics computation in chemistry' (CompChem(RS)),² is to use HPC resources, available in our country (mainly on the Institute of Physics, Belgrade), and resources of other partners, to improve and facilitate ongoing projects that use molecular-dynamics simulations, DFT and *ab initio* calculations. The other aim is the education in this field of postgraduate students.

In this communication we want to address a few points. The first is brief presentation of the software ported, including some examples of usage by our group, as well as the aim for recruitment of other researchers in Republic of Serbia that can become the users. The next is the presentation of HPC resources available by the other partners (Hungary, Romania, and Bulgaria offer BluGene/P super-computers, as an example). The last is the problem, lasting from the very beginning of the project, in the consent and recognition of the usefulness of available resources among different research groups that we met (means, among our colleagues that have a need for the similar resources, but did not use it, even if available). Such problem is, unfortunately, inherent to the area of the South-Eastern Europe, as well as to our scientific community in general.

Software ported

On the so far unique HPC facility in Serbia, PARADOX cluster on the Institute of Physics, Belgrade,³ we ported source codes (programs) that are instantly ready-to-use, as is shown in Table 1. Scripts for the execution of the programs are available to users that have account on the cluster. The requisites to get access to HP-SEE infrastructure are given on the project Wiki page.⁴ Any other software recognized as the useful for the users within VC Computational Chemistry, or the new ones, after registration, can be ported to the cluster. The prerequisite (generally within the project) is that software that should be ported is distributed for free for the academic community. For commercial software, user must provide the proof of license of the software version made for execution on more than one node (parallel execution).

So far we have a ported tools for massive classical molecular dynamics studies (NAMD), *ab initio* molecular dynamics (CPMD), classical DFT and *ab initio* calculations (Gaussian, Firefly). The last

programs listed can be used for calculations on the semiempirical level of theory, too. For the molecular docking, AutoDock Vina is installed. For the modelling of the large set of compounds, including ligand-based and structure-based virtual screening, we ported OpenEye applications. OMEGA is fast conformer generation tool, able to process tens of thousands of compounds per day. ROCS is shape comparison tool that can be used for virtual screening. EON compare electrostatic potentials of pre-aligned molecules, and often is used for the refinement of the ROCS results. FRED is docking program that performs fast exhaustive docking, and also can be used for virtual screening. To make comparison with other HPC centers in the project, we offer the list of programs related to chemistry, available on Bulgarian Supercomputer Center (BGSC), hosting IBM BlueGene/P.

Table 1. Software ported to PARADOX cluster.

Software/version ^{a)}	Mode of execution ^{b)}	Home Page
NAMD 2.8	P	www.ks.uiuc.edu/Research/namd/
Firefly 7.1G	P	classic.chem.msu.su/gran/firefly/index.html
CPMD 3.1	P	cpmd.org
Gaussian03	P	www.gaussian.com/
AutoDock Vina 1.0	P/S	vina.scripps.edu/
OpenEye Software OMEGA, EON, ROCS, FRED	P/S	www.eyesopen.com/products

a) The last stable version ported on the day of the submission of this communication; b) P – parallel, S – sequential.

BGSC offer NAMD, GROMACS, LAMMPS, and DL POLY for the molecular dynamics; CPMD, NW Chem, Quantum Espresso, and CP2K for the *ab initio* molecular dynamics simulation; GAMESS for the DFT and *ab initio* calculations.

Resources

Our home cluster PARADOX offer 89 worker nodes (2 x quad core Intel Xeon E5345 @ 2.33 GHz with 8GB of RAM) and 15 service nodes (Xeon-based nodes). About 80 nodes are always available for computation. Jobs are submitted using PBS queuing system. Number of nodes and number of processors per node can be chosen in the input script, as well as needed time of computation. Rare advantage is that there is no limitation on time of the computation. Such limitation is frequent on the big clusters. Paradox also offers large space for the permanent storage of the input/output data. Other resources within HP-SEE project is listed in Table 2.

Table 2. Illustration of the computing power offered within the HP-SEE project.

Name	Configuration	Processors*/ Threads**
Bulgarian Supercomputing Centre (BGSC) / BG	IBM Blue Gene/P	8192
HPCG at ICT-BAS / BG	Express 7000	576
HPCG at ICT-BAS / BG	NVIDIA GTX 295 (GPU)	1920
IFIN-HH / RO	Intel Xeon / AMD opteron	704
NCIT – UV / RO	IBM Blue Gene/P	4096
NCIT – UV / RO	Intel Xeon	400
NIIFI - SC / HU	AMD Opteron	798
Pecs - SC / HU	Intel Xeon	1152
Szeged - SC / HU	AMD Opteron	2304
Debrecen - SC / HU	Silicon Graphics (SGI)	1536

* Processors 850 MHz – 3.2 GHz; ** Threads reported for the Graphics processing units (GPU).

Usage examples

The one of the main aims of the project is to allow to participants to perform modelling of interest to their research in a full scale. So far we have been limited by the computational power, and able to perform very short simulations, or just to try the software of interest to us. Now we are able to use programs in their full power. As an example, molecular dynamics simulation, using biasing forces to map free-energy landscapes of compounds examined, were performed on the set of ~ 20 congeners in different explicit or implicit isotropic, or explicit anisotropic solvents, during 20-30 ns each. Small part of the results is published so far.^{5,6} For such calculations about 10000 cpu hours were used on PARADOX, and the lot of the storage space. A bit (1/20), of the each run of such simulations, on the author lab computer (~ 5 GHz in two processors), takes about three days. For the different project we have need to perform docking of about 120 small organic molecules to acetylcholinesterase active site to obtain conformations suitable to be used in three-dimensional QSAR.⁷ By using AutoDock Vina, which is very fast, on PARADOX this took half of the day. On the user lab computer few days will be spent for such calculation, using full processors power, and the lot of memory. Consequently, no other tasks could be done on that computer. As the last example, we examined dynamic behaviour of the protein isolated in the department of biochemistry of the Faculty of Chemistry.⁸ Even protein is not big (140 amino-acid residues) large solvent cluster have been added, along with counter ions, to simulate ionic strength comparable with experimental conditions. Due to memory issues such calculation cannot be even started at the lab computer.

Number of users

So far, our part of the project counts eleven users, including two technical staff that did not use CPUs (also did not perform planned tasks at all). For the technical side of view we have high quality support from the researchers of Scientific Computing Laboratory – Institute of Physics, Belgrade. In Serbia, research community count much more users that devote their research time to computational chemistry (in the broadest sense). Many attempts to involve number of our colleagues, from the very beginning of the project, did not trigger their interest. Arguments for non-interest span range from asking 'Is it possible to use my terminal, and graphical user interface to submit and monitor my job, as that I perform computations in my own computer', to the inability to port software of interest in a way to be executed in parallel mode. There are many other subjective points of view, which are not suitable to be described in communication for the scientific conference. Number of training events so far, that instruct the users in using of HPC, from console commands, to non-trivial programming; as well as many information on usage of resources, in a cook-book way, on the project Wiki web site, freely available to all interested should be mentioned. There are a lot of researchers that did not give any comment, just cover their knowledge and skills (Figure 1).



Figure 1. The corresponding author view on the possible subjective attitude, that triggers non-interest to project in our scientific community.

Acknowledgment: The work reported makes use of results produced by the High-Performance Computing Infrastructure for South East Europe's Research Communities (HP-SEE), a project co-funded by the European Commission (under Contract Number 261499) through the Seventh Framework Programme HP-SEE (<http://www.hp-see.eu/>). The Ministry of Education and Science of Serbia support this work under Grant 172035.

CompChem (RS) aplikacija u okviru projekta HP-SEE. Dostupni računarski resursi, programi, prednosti i nedostaci

Projekt 'High-Performance Computing for the south eastern European Communities' (HP-SEE), podržan od strane Evropske komisije, povezuje postojeće resurse u oblasti računara visokih performanci od Mađarske do Azerbejdžana u zajedničku infrastrukturu. U okviru projekta postoje tri strateške grupe (virtuelne zajednice), Računarska fizika, Računarska hemija i Računarske prirodne nauke. Kao deo projekta, u okviru virtuelne zajednice Računarska Hemija, u Republici Srbiji postoji aplikacija 'Kvantno mehanička, molekulska mehanička izračunavanja i simulacije molekulske dinamike u hemiji' (skraćenica CompChem). U sopštenju su kratko prikazani dostupni računarski resursi u okviru celog projekta, programi povezani sa hemijom instalirani na našem nacionalnom centru za izračunavanja visokih performansi, kao i nekim drugim centrima u okviru projekta. Na pristupačan način su opisane prednosti korišćenja dostupnih resursa i dat je kitički osvrt na mali interes naše naučne zajednice za korišćenje dostupnih računarskih kapaciteta/instaliranih programa.

Zahvalnica: Ova komunikacija prikazuje rezultate dobijene radom na projektu 'High-Performance Computing Infrastructure for South East Europe's Research Communities' (HP-SEE), finansiranog od strane Evropske Komisije (ugovor broj 261499), u okviru sedmog okvirnog projekta HP-SEE. Ministarstvo Prosvete i Nauke Republike Srbije, delom, finansira istraživanja u okviru projekta 172035.

References:

1. <http://www.hp-see.eu/> - the project overview.
2. <http://wiki.hp-see.eu/index.php/CompChem>
3. <http://www.scl.rs/>
4. http://wiki.hp-see.eu/index.php/Access_Procedure
5. B.J. Drakulić, A.D. Marinković, I.O. Juranić *Tetrahedron Lett.* **53** (2012) 553
6. B.J. Drakulić, A. Pedretti, M. Zloh, V. Slavnić, I.O. Juranić, M.M. Dabović "Range And Sensitivities of 2-[(Carboxymethyl)sulfanyl]-4-oxo-4-arylbutanoic Acids Property Spaces. Part 2. Multidimensional Free Energy Landscapes" 18th European Symposium on Quantitative Structure - Activity Relationships, "Discovery Informatics & Drug Design" (2010) Rhodes, Greece.
7. M.D. Vitorović-Todorović, I. Cvijetić, I.O. Juranić, B.J. Drakulić. "The 3D-QSAR study of 110 diverse, dual binding acetylcholinesterase Inhibitors, based on alignment independent descriptors (GRIND-2). The effects of conformation on predictive power and Interpretability of the models." (2012), submitted.
8. Article in preparation.

Biohemija / Biochemistry**Nanoscale Membrane Dynamics in Exocytosis: fine-tuning by PIP2 and Ca(II)**

Dragomir D. Milovanovic****, Alf Honigmann** Geert van den Bogaart*

*Department of Neurobiology, Max Planck Institute for Biophysical Chemistry,
Am Fassberg 11, 37077 Göttingen, Germany

**Department of NanoBiophotonics, Max Planck Institute for Biophysical Chemistry,
Am Fassberg 11, 37077 Göttingen, Germany.

***International Max Planck Research School for Molecular Biology,
Georg-August-Universität Göttingen, Justus-von-Liebig-Weg 11, 37077 Göttingen, Germany.

Introduction

The specific organization of lipids and proteins in functional domains in biological membranes allows localization and segregation of specific physiological activities. Nowadays, the initial fluid-mosaic model of cell membranes¹ where transmembrane proteins are diffusing freely throughout the membrane is convoluted into more sophisticated models where proteins and lipids are clustered in membrane domains such as cholesterol enriched lipid rafts². Over the years, other membrane clustering mechanisms have been shown, such as interactions with the cytoskeleton³, hydrophobic mismatch⁴ and electrostatic protein-lipid interactions⁵. In the current view, the organization of proteins and lipids in membrane compartments of 2 – 200 nm are meliorating certain reactions and allows spatial and temporal modulation of the diverse functions of the membranes^{3,6}.

The fusion of synaptic vesicles with the pre-synaptic plasma membrane releasing neurotransmitters involves a tight temporal and spatial organization of membrane proteins and lipids in the plasma membrane⁵⁻⁸. Furthermore, neuronal release is triggered by an increase of the cytoplasmic Ca²⁺ concentration⁹, which results in reorganization of the plasma membrane. The central process in synaptic vesicle release is the interaction between SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor) proteins present in the pre-synaptic membrane and synaptic vesicles^{6,8,10,11}. The SNAREs syntaxin-1A and SNAP-25 (25-kDa synaptosome-associated protein) are not uniformly distributed in the plasma membrane, but cluster in ~70 nm-sized membrane domains^{6, 7}. Specifically, new findings indicate that PIP2 (phosphatidylinositol (4,5) biphosphate) is essential for exocytosis^{5,12}. Furthermore, PIP2 interacts with Ca²⁺ and may connect the calcium response to vesicular fusion¹³. The polyanionic PIP2 can directly cluster syntaxin-1A by electrostatic interactions with a polybasic region of syntaxin-1A¹⁴.

Murray and Tamm¹⁵ recently proposed another model how syntaxin-1A can be clustered – called the “icebreaker model”. Here, cholesterol competes with syntaxin-1A for solvation by bulk lipids and this result in protein clustering. These clusters are disrupted by PIP2, because PIP2 molecules electrostatically interact with syntaxin-1A and the resulting PIP2/syntaxin-1A complexes are more soluble in the bulk lipid environment^{15,16}. Thus, PIP2 can both disrupt cholesterol-stimulated clustering¹⁵ and promote electrostatic clustering of syntaxin-1A⁵. These two types of clusters have fundamentally different properties. PIP2 domains are large, round and syntaxin-1A is mobile within the clusters, whereas cholesterol rich domains are more rigid and syntaxin-1A is immobile within these clusters.

At present, it is still unclear what precisely drives the solvation/segregation in the “icebreaker” model^{15,16}. One interesting possibility is that this is driven by hydrophobic mismatch. Keiser *et al.*⁴ demonstrated hydrophobic mismatch of artificial peptides as the mechanism for peptide sorting in membranes with different thickness. Similar to “icebreaker” domains, these were promoted by cholesterol which makes the membrane more rigid. Since cholesterol is inducing a thickening of the membrane by stretching and stiffening lipid acyl chains, we speculated that hydrophobic mismatch induced by cholesterol could be the driving force for syntaxin cluster formation.

In the present study we reconstituted the syntaxin-1A transmembrane peptide (sxTM) including the poly-basic linker region (²⁶⁰KARRKK²⁶⁵) in membranes using phospholipids with different acyl-chain lengths. FRET measurements were done in order to depict the association of sxTM in the presence of cholesterol and PIP2. FCS measurements of sxTM lateral diffusion were done in membranes of different thicknesses. The effect of Ca²⁺ on sxTM and PIP2 organization was observed both by FRET and imaging. The membrane model systems used were: large unilamellar vesicles –LUV (for FRET analysis), sup-

ported lipid multi-layers (for FCS) and polymer-supported bilayers – PSM (for imaging). The data suggest that syntaxin-1A forms domains in the membrane due to hydrophobic mismatch and the electrostatic interactions with PIP2. Further modulation of these domains is accomplished by altering the Ca^{2+} concentration.

Results and discussion

Cholesterol lowers the diffusion rate of syntaxin-1A and induces clustering. In order to quantify the clustering of sxTM, we did a FRET experiment similar to the assay of Murray and Tamm¹⁵. In this assay two spectrally separated fluorescently labeled sxTMH, acting as donor and acceptor, were incorporated into 100 nm sized large unilamellar vesicles (LUV). The LUVs were composed of PC with different phospholipid-acyl-chain lengths (from C14:1 to C20:1) and different amounts *r* of cholesterol and PIP2. The labeled peptides (Atto647N and Rhodamine Red) were added to a 1/4,000 molar protein-to-lipid ratio. If the peptide ensembles were clustered, we expected to detect energy transfer from sxTM labeled with Rhodamine Red (excitation/emission maximums at 560/580 nm) to sxTM labeled with Atto647N (excitation/emission maximums at 644/669 nm) as is illustrated in Figure 1A. The fluorescence emission spectra were normalized to the maximum emission level (usually around the donor emission maximum at 580 nm) and typical examples of normalized curves are presented in Figure 1B. In order to correct for the cross-talk, we subtracted the fluorescence intensity from reconstitution of only sxTM Rhodamine Red. The FRET efficiency, defined as the acceptor over donor fluorescence is plotted in Figure 1C.

We first tested the possibility that the “icebreaker” domains were caused by hydrophobic mismatch by reconstitution of these domains in artificial membranes of different thickness. An increase of 50 % in FRET was detected in C16:1, C18:1, C20:1 PC membranes upon the inclusion of 30 % cholesterol. In contrast, C14:1 PC did not show a significant difference in FRET efficiency upon inclusion of cholesterol. Finally, we observed an increase of 50 % in a sample of phosphocholines isolated from brain (porcine brain isolated PC). Since brain phosphocholines primarily (>60%) consist of 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine (C16:0, C18:1; Avanti) these results are matching our observation with pure C16:1 and C18:1 PC.

In our results, we don't observe any change in the peptide clustering in the C14:1 PC membrane. This may indicate that the hydrophobic mismatch between already drives clustering by the shortness of phospholipid-acyl-chain.

Subsequently, the dispersion of the “icebreaker” domains and formation onto electrostatic domains with PIP2 was tested. In C14:1, C16:1, C18:1 and brain PC, the addition of 1 mol% PIP2 caused an increase of the FRET efficiency of 50 % (Figure 1C). Hence, PIP2 seems to electrostatically attract the positive charge of N-terminal syntaxin-1A TMH peptide and mediates clustering into electrostatic domains as described. Our results imply that both cholesterol and PIP2 are inducing the syntaxin domain formation. For C20:1 PC PIP2 alone did not induce syntaxin-1A domain formation unless cholesterol was present. This implies that for membranes with long phosphatidyl acyl-chain cholesterol must be present for clustering to take place.

We then studied the dynamics of syntaxin-1A in the various membrane compositions with FCS. FCS was done in supported lipid bilayers composed of C14:1, C16:1, C18:1 and C20:1 PC membranes without or with 30 mol% cholesterol. Syntaxin-1A was labeled with Atto647N and added in a protein-to-lipid ratio 1/10,000. A Bodipy lipid analogue was used as 1/20,000 of total lipids to measure lipid diffusion as a reference. Syntaxin-1A TMH diffusion coefficients from two independent membrane reconstitutions (four to seven measurements each) are shown in Figure 2A. The bars indicate the range of values. We clearly see that syntaxin-1A diffusion coefficients are dropping in samples containing cholesterol. Lowering syntaxin-1A-diffusion coefficient may be the combined consequence of syntaxin-1A domain formation and general cholesterol effect in thickening the phospholipid bilayer thus making the membrane overall less fluid². The main difference in diffusion coefficients was observed for C20:1 PC membranes indicating that hydrophobic mismatch between phospholipids and sxTM is important for clustering.

The clustering of syntaxin-1A was also obvious from confocal images of the supported lipid bilayers. Images of PSM reconstituted C18:1 PC without and with cholesterol indicate clear clustering of sxTM (Figure 2B). Here, the green fluorescent lipid analogue DiO dye was incorporated to verify the integrity of our supported lipid bilayers and sxTM was labeled with Atto647N. Clear segregation in membranes

containing 30 mol% cholesterol can be seen as excluded sxTM clusters. Molar ratios of DiO and SxTM to phospholipids were 1/5,000 and 1/10,000 respectively.

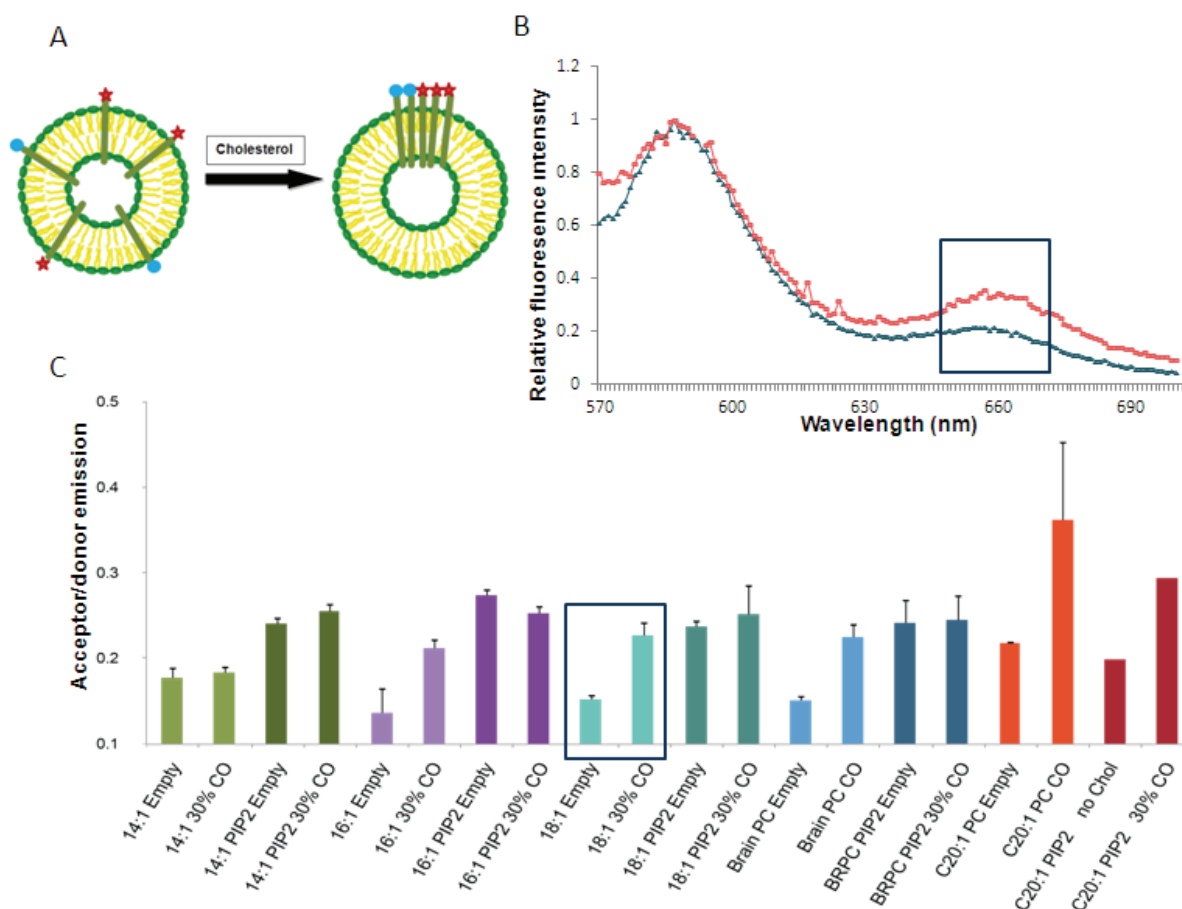


Figure 1: Cholesterol and PIP2 induce clustering of Syntaxin-1A TMH. (A) Schematic representation of FRET assay used to measure protein-protein interaction. (B) Normalized fluorescence spectra of C18:1 samples without or with 33 mol% cholesterol. Donor was Rhodamine Red-SxTM (absorbance at 560 nm, emission at 580 nm) and acceptor was Atto647N-SxTM (absorption at 644 nm, emission at 669 nm). (C) FRET efficiency showed a 50% increase in the syntaxin-1A TMH clustering in C16:1, C18:1 PC, brain PC and C20:1 PC membranes that contained 33 mol% cholesterol compared to the vesicles without cholesterol. High FRET signal in the vesicles reconstituted with PIP2 demonstrate that PIP2 interacts with SxTM and promotes its domain organization. All sample measurements are two independent reconstitutions and the bars indicate the ranges.

Hydrophobic mismatch modulates the lateral diffusion of syntaxin-1A. Our FCS data for syntaxin-1A diffusion coefficients (Figures 3A and 4A) show that the syntaxin-1A is slowest in moieties where the length mismatching takes place C20:1 PC membranes ($5.8 \pm 0.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$) comparing to the C16:1 ($10.4 \pm 0.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$). An optimum diffusion for membrane proteins in certain lipid thickness has previously been observed for the bacterial glutamate transporter and the bacterial lactose transporter proteins (26, 27). Accordingly, the FRET efficiency data for samples with phospholipids are lowest for C16:1 implying that syntaxin-1A was least likely to cluster in domains (Figure 3B).

Hydrophobic mismatch between the peptide and surrounding lipid bilayer determines syntaxin-1A mobility and drives cluster formation as suggested by: (i) the lack of FRET signal for C20:1 PC liposomes containing PIP2 without cholesterol (Figure 1C), (ii) the greatest difference in syntaxin-1A diffusion rates between C20:1 PC sample with and without cholesterol (Figure 2A), (iii) the clear maximum mobility in C16:1 compared to the other bilayer thicknesses (Figure 3A).

Syntaxin-1A and PIP2 microdomain formation is enhanced by Ca^{2+} . Ca^{2+} directly interacts with PIP2^{13, 17} and modulates the clustering of SNARE proteins in the plasma membrane of neuroendocrine cells¹⁸. Indeed, addition of calcium above 0.5 mM caused a clear and immediate increase of sxTM:PIP2 cluster size (100% overlap) and density in supported bilayers (Figure 4A). The effect of Ca^{2+} is reversed with an excess of 1 mM of the chelating agent EGTA. The effect of Ca^{2+} was specific, because Mg^{2+} did not affect the sxTM:PIP2 overlap even when 1 mM was added (Figure 4B).

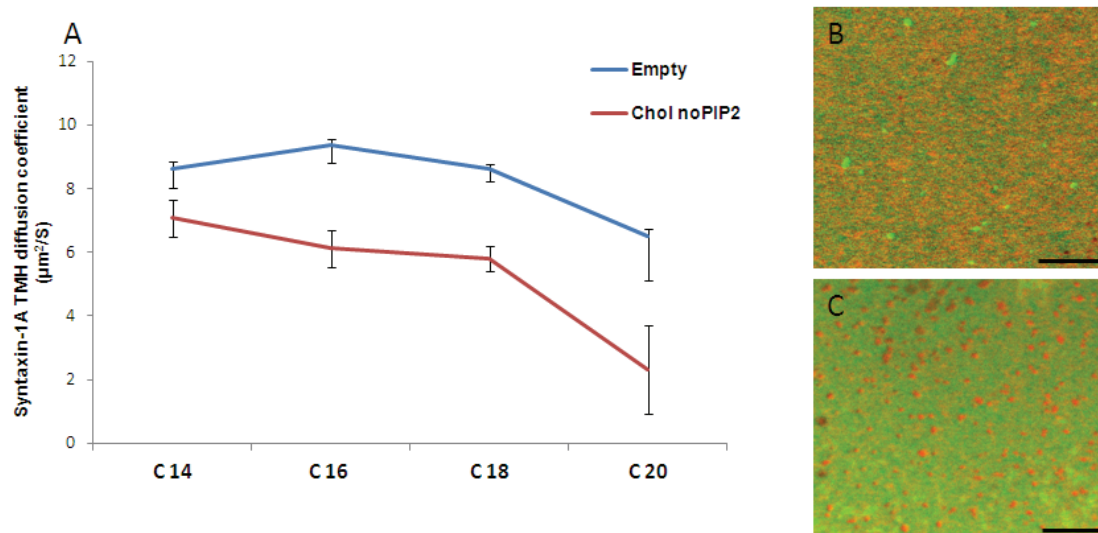


Figure 2: Syntaxin-1A TMH diffusion coefficient drops due to hydrophobic mismatch (A) The lateral diffusion of SxTM measured in the samples prepared by spincoating the total lipid concentration of 30 mM, without or with 30 mol% of cholesterol and protein-to-lipid ratio 1/10,000. BODIPY lipid dye was used as 1/20,000 of total lipids. Values are obtained from two independent membrane reconstitutions with three to five measurements taken from each. The bars are indicating the range of values. The SxTM diffusion coefficient is lower for samples containing cholesterol. The syntaxin-1A TMH has the slowest rate in C20:1 PC membranes in both samples with and without cholesterol. (B) Images of SxTM (labeled with Atto647N; red), C18:1 phosphocholine (DiO dye incorporated; no cholesterol; green). Molar ratios of DiO and SxTM to phospholipids were 1/5,000 and 1/10,000 respectively. (C) Same as Panel B, but now for C18:1 phospholipids with 33 mol% cholesterol. The tendency for peptide clustering could clearly be observed from the accumulation of red fluorescence signal. Scale bar is representing 2 µm.

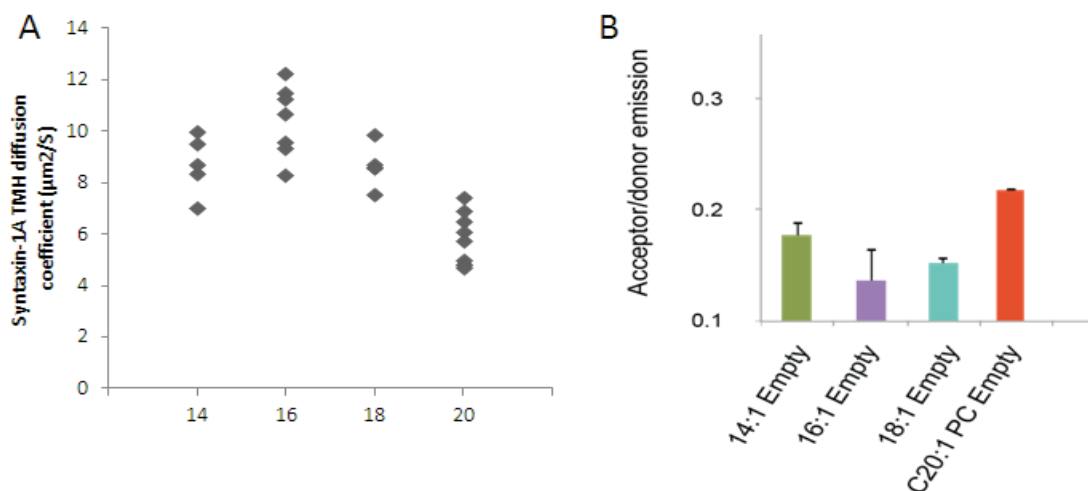


Figure 3: Diffusion coefficient of the Syntaxin-1A TMH depends on its hydrophobic (mis)match with the membrane bilayer. (A) Diffusion coefficients for sxTM-Atto647N in C14:1 PC, C16:1 PC, C18:1 PC and C20:1 PC membranes indicate that at C16:1 PC where the SxTM matches the phospholipids thickness the diffusion is faster than in membranes with other acyl-chain lengths. The data are representing values measured from two different reconstitutions. (B) FRET efficiency is the lowest at C16:1 PC – indicates the least clustering of SxTM. The data represent C16:1 PC, C18:1 PC, brain PC and C20:1 PC membranes without cholesterol or PIP2. All sample measurements are two independent reconstitutions and the bars indicate the ranges.

Syntaxin-1A and PIP2 microdomain formation is enhanced by Ca^{2+} . Ca^{2+} directly interacts with PIP2^{13, 17} and modulates the clustering of SNARE proteins in the plasma membrane of neuroendocrine cells¹⁸. Indeed, addition of calcium above 0.5 mM caused a clear and immediate increase of sxTM:PIP2 cluster size (100% overlap) and density in supported bilayers (Figure 4A). The effect of Ca^{2+} is reversed with an excess of 1 mM of the chelating agent EGTA. The effect of Ca^{2+} was specific, because Mg^{2+} did not affect the sxTM:PIP2 overlap even when 1 mM was added (Figure 4B).

The increase of membrane clustering by Ca^{2+} was also clear from the increase in FRET upon addition of 0.5 mM Ca^{2+} to liposomes composed of brain extract PC without or with 30 mol% cholesterol. In these

experiments, the donor fluorophore was Rhodamine Red-SxTM (absorbance at 560 nm, emission at 580 nm) and the acceptor was Atto647N-PIP2 (absorption at 644 nm, emission at 669 nm). A schematic representation of the FRET experiment is shown in Figure 5A and the spectra show a drop in donor emission upon addition of Ca^{2+} regardless of the presence of cholesterol (Figure 5B).

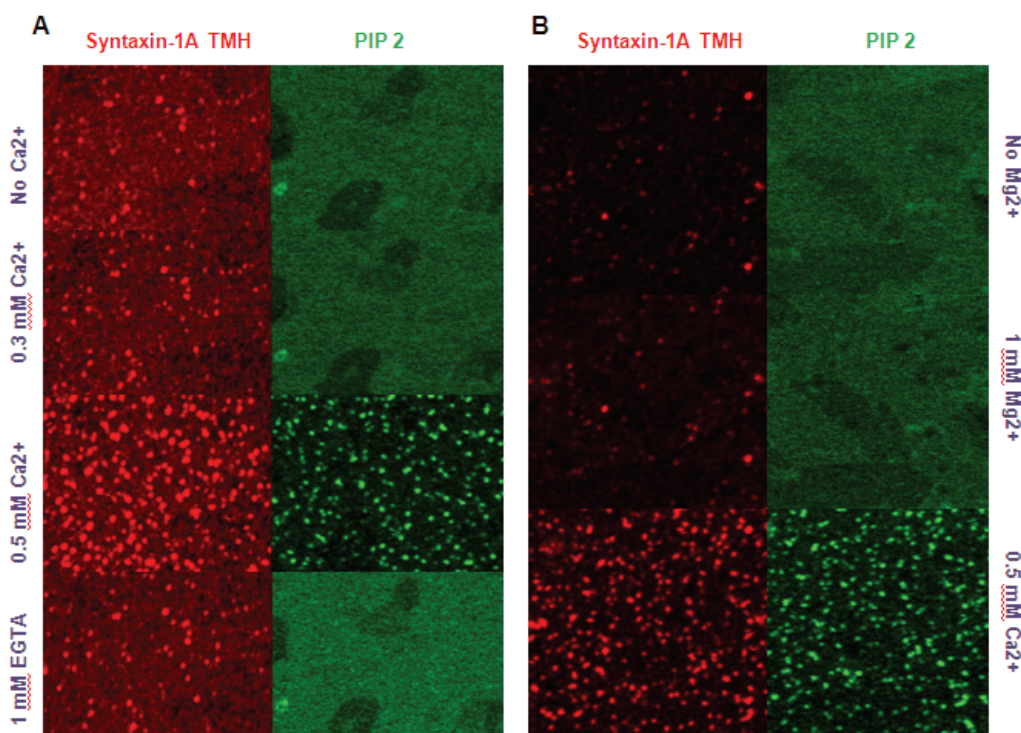


Figure 4: Calcium ions (0.5 mM) specifically enhance the Syntaxin-1A TMH/PIP2 interaction. (A) Confocal images of syntaxin-1A TMH labeled with Atto647N (red channel) and Top-Fluor PIP2 (green channel) without Ca^{2+} , and after addition of 0.2 mM Ca^{2+} , 0.5 mM Ca^{2+} and 1 mM EGTA. Membranes composed of C18:1 PC, 30 mol% Cholesterol, 1 mol% PIP2 and 0.1 mol% Bodipy-PIP2. SxTM-Atto647N was added in 1/12,000 molar ratio. (B) Confocal images of syntaxin-1A TMH labeled with Atto647N (red channel) and Top-Fluor PIP2 (green channel) without Mg^{2+} , and after addition of 1 mM Mg^{2+} and 0.5 mM Ca^{2+} . Scale bars represent 1 μm .

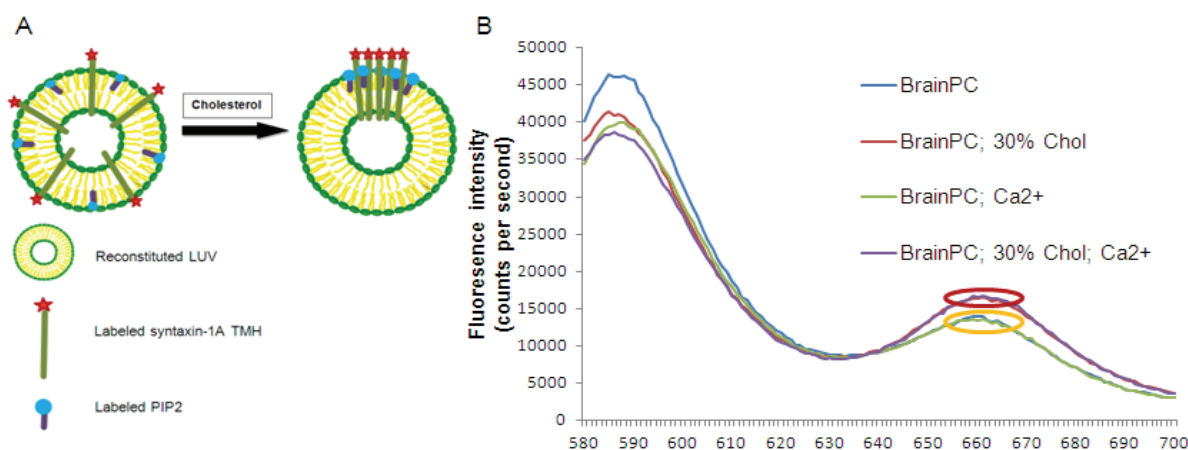


Figure 5: Cholesterol-induced Syntaxin-1A TMH:PIP2 domains are further elevated by Ca^{2+} . (A) Schematic representation of FRET assay used to measure syntaxin-1A TMH:PIP2 interaction. (B) Fluorescence spectra of rat brain extract PC samples without or with 33 mol% cholesterol. The donor fluorophore was Rhodamine Red-SxTM (absorbance at 560 nm, emission at 580 nm) and the acceptor was Atto647N-PIP2 (absorption at 644 nm, emission at 669 nm). The spectra show that for the same acceptor intensities donor signal is decreasing upon addition of Ca^{2+} in both membranes with (red-to-purple spectra) and without (blue-to-green spectra) cholesterol.

Conclusion

In the present study we investigated the mechanisms of syntaxin-1A domain formation in reconstituted membranes as a function of (a) cholesterol, (b) hydrophobic mismatch, (c) PIP2 and (d) Ca^{2+} . We studied sxTM:PIP2 clustering by measuring FRET efficiency in reconstituted LUVs, direct imaging of syntaxin-1 cluster in supported lipid bilayers, and FCS.

FRET and confocal imaging consistently showed that cholesterol increased syntaxin-1 clustering (Figure 2C). This clustering was especially apparent in membranes composed of PC with longer (C18:1, C20:1) acyl-chain lengths. These results are in agreement with previous FRET measurements by Murray and Tamm¹⁵. They speculated that syntaxin-1A clustering was caused by a competition of cholesterol and syntaxin-1A for solvation by the bulk lipids (the “icebreaker” model). Our combined confocal imaging, FRET and FCS data now demonstrate that the solvation effect is driven by hydrophobic mismatch between syntaxin-1A and surrounding lipid environment.

This mechanism has already been shown by Kaiser *et al.*⁴ for artificial membrane peptides and we now show that this mechanism can explain clustering of syntaxin-1A. Cholesterol enhances the clustering of syntaxin-1A presumably by making membranes more rigid^{2, 4}.

The physiological importance of SNARE clustering by hydrophobic mismatch is confirmed by a recent computational analysis of all different SNARE transmembrane domains from fungi and *Saccharomyces cerevisiae*. The screen of Sharpe *et al.*¹⁹ indicates a clear correlation between the length of the transmembrane helix and the thickness of the organellar membrane where it appears. These biological observations are in agreement with the notion that the membrane thicknesses contributes to the sorting of SNARE proteins.

Anionic lipids also modulate SNARE sorting by electrostatic interactions with polybasic peptides, hence providing plasticity of the intracellular membrane systems necessary for proper exocytosis^{5, 20}. PIP2 is essential for neuronal exocytosis²⁰ and Aoyagi *et al.* showed that PIP2 colocalizes with syntaxin clusters in PC12¹⁴. Recently, van den Bogaart *et al.* showed that syntaxin-1A clustering can be driven by electrostatic interactions between PIP2 and the polybasic linker of syntaxin-1A that connects the SNARE domain and the transmembrane helix⁵. Indeed, our FRET efficiency data (Figure 2C) show that overall the presence of PIP2 in reconstituted membranes caused the increase of syntaxin-1A clustering and this clustering is enhanced in the presence of cholesterol. The only exception is the C20:1 PC system without cholesterol. However, this could be due to the prevalence of hydrophobic mismatch between syntaxin transmembrane peptide and lipid bilayer. The enhancement of PIP2 interactions with syntaxin-1 by cholesterol has been shown previously¹⁵.

We also investigated the effect of Ca^{2+} on the domain organization of syntaxin-1A. A recent study by Zilly *et al.* showed that Ca^{2+} enhances the membrane clustering of various SNARE proteins in PC12 and chromaffin cells¹⁸. The authors speculated that this increased clustering was caused by electrostatic interactions between solvent exposed negative residues on SNARE and Ca^{2+} . Our work now suggests a different mechanism, where clustering of the SNAREs by Ca^{2+} is enhanced via PIP2. Levental *et al.* showed that Ca^{2+} alters the lateral organization of membranes containing both cholesterol and PIP2 and suggest that Ca^{2+} can sequester PIP2 molecules in membrane domains¹³. The same group recently showed that Ca^{2+} promotes linearized PIP2 domains by binding two neighboring PIP2 molecules¹⁷. Thus, our study suggests that Ca^{2+} can act as a change bridge connecting various PIP2:syntaxin clusters in larger domains. We only observed this effect upon addition of more than 0.5 mM Ca^{2+} . This low Ca^{2+} -sensitivity might be partly explained by our experimental setup: PIP2 was present in both leaflets of our supported lipid bilayers, whereas it is only in the inner leaflet of the plasma membrane in cells. On the other hand, such low Ca^{2+} -sensitivity might be physiological since Ca^{2+} -influx by Ca^{2+} -channels results in locally very high ion concentrations with increases up to several 100 μM near the mouth of the Ca^{2+} -channel^{21, 22}. Syntaxin-1A directly interacts with Ca^{2+} -channels^{23, 24} and colocalisation of syntaxin clusters with Ca^{2+} channels is physiologically crucial for fast and strong/frequent synaptic vesicle response^{9, 22, 25}.

In conclusion, we present a synergistic model by which cholesterol, membrane thickness and electrostatic interactions all modulate the protein-lipid organization in biological membranes. Our data indicate that membrane syntaxin-1A domain organization is dependent on the combined effects of cholesterol competition for lipid solvation, hydrophobic mismatch between the peptide and lipid bilayer, and electrostatic interactions between proteins and lipids. Apart from that, Ca^{2+} induces PIP2 clustering and syntaxin-1A is recruited to these clusters.

Acknowledgments: We thank Dr. Frederick Roder for introducing the PSM technology and helping us transferring the methodology to our laboratory conditions. Dr. Karsten Meyenberg and Prof. Ulf Diederichsen for providing the labeled peptide. D. M. is financed by the Stipend of the Excellence Foundation for the Promotion of the Max Planck Society.

Nanonoskopski pregled dinamike membrane u egzocitozi: suptilna regulacija fosfatidil-inozitolom i Ca²⁺

Oslobađanje neurotransmitera iziskuje specifičnu organizaciju lipida i proteina u presinaptičkoj membrani. Syntaxin-1A iz familije SNARE proteina formira akceptorski kompleks koji vezuje vezikule za membranu neurona. Syntaxin-1A nije ravnomerno raspoređen u membrani, već se javlja u formi klastera. Prema predhodno predloženim modelima, holesterol se takmiči sa syntaxin-1A peptidom za solvataciju fosfolipidima. Međutim, hidrofobne interakcije između holesterola, fosfolipida i transmembranskih peptida mogu da budu odgovorne za uspostavljanje domenske organizacije. Ovim istraživanjem pokazujemo kako hidrofobne interakcije utiču na lateralnu organizaciju syntaxin-1A polipeptida u in vitro membranskim sistemima. Takođe, pokazujemo i modulaciju ovih domena fosfatidil-inozitolom i Ca²⁺. Naši rezultati pokazuju da hidrofobne interakcije mogu da budu opšti princip lateralne organizacije membranskih proteina.

References

1. S. J. Singer, G. L. Nicolson, *Science*, 175. (1972)720;
2. K. Simons, E. Ikonen, *Nature*, 387. (1997) 569;
3. K. Ritchie, A. Kusumi, *Subcell Biochem* 37. (2004) 233;
4. H. J. Keiser, A. Orłowski, T. Rog, T. K. M. Nyholm, W. Chai, T. Feizi, D. Lingwood, I. Vattulainen, K. Simons, *Proc Natl Acad Sci USA* 40. (2011) 16628;
5. G. van den Bogaart, K. Meyenberg, H. J. Risselada, H. Amin, K. I. Willig, B. E. Hubrich, M. Dier, S. W. Hell, H. Grubmueller, U. Diederichse, R. Jahn, *Nature* 479. (2011) 552;
6. J. J. Sieber, K. I. Willig, C. Kutzner, C. Geding-Reimers, B. Harke, G. Donnert, B. Rammer, C. Eggeling, S. W. Hell, H. Grubmuler, T. Lang, *Science* 317. (2007) 1072;
7. J. J. Sieber, K. I. Willig, R. Heintzmann, S. W. Hell, T. Lang, *Biophysical Journal* 90. (2006) 2843;
8. C. Rickman, D. A. Archer, F. A. Meunier, M. Craxton, M. Fukuda, R. D. Burgoyne, B. Davletov, *J. Biol. Chem.* 279. (2004) 12574;
9. R. Jahn, T. Lang, T. C. Südhof, *Cell* 112. (2003) 519;
10. R. Jahn, R. H. Scheller, *Nature Rev Mol Cell Bio* 7. (2006) 631;
11. T. Lang, D. Bruns, D. Wenzel, D. Riedel, P. Holroyd, C. Thiele, R. Jahn *EMBO J* 20. (2001) 2202;
12. P. J. Wen, S. L. Osborne, F. A. Meunier *Prog. Lipid Res.* 50. (2011) 52;
13. I. Levental, D. A. Christian, Y. H. Wang, J. J. Madara, D. E. Discher, P. A. Janmey, *Biochemistry*, 48. (2009) 8241;
14. K. Aoyagi, T. Sugaya, M. Umeda, S. Yamamoto, S. Terakawa, M. Takahashi, *J. Biol. Chem.* 17. (2005) 17246;
15. D. H. Murray, L. K. Tamm *Biochemistry* 48. (2009) 4617;
16. D. H. Murray, L. K. Tamm *Biochemistry* 50. (2011) 9014;
17. W. Ellenbroek, Y. H. Wang, D. A. Christian, D. E. Discher, P. A. Janmey, A. J. Liu, *Biophys J* 101. (2011) 2178;
18. E. F. Zilly, N. D. Halemani, D. Walrafen, L. Spitta, A. Schreiber, R. Jahn, T. Lang, *EMBO J* 1. (2012) 1;
19. Sharpe HJ, Stevens TJ, Munro S (2010) A Comprehensive Comparison of transmembrane domains reveals organelle-specific properties. *Cell* 142: 158-169;
20. S. McLaughlin, D. Murray, *Nature* 438. (2005) 605;
21. R. Rizzuto, T. Pozzan, *Physiol. Rev.* 86. (2006) 369;
22. J. H. Bollmann, B. Sakmann, *Nature Neuroscience* 8. (2005) 426;
23. P. P. Lam, Y. M. Leung, L. Sheu, J. Ellis, R. G. Tsushima, L. R. Osborne, H. Y. Gaisano, *Diabetes* 54. (2005) 2744;
24. S. N. Yang, O. Larsson, R. Bränström, A. M. Bertorello, B. Leibiger, I. B. Leibiger, T. Moede, M. Köhler, B. Meister, P. O. Berggren, *PNAS* 96. (1999) 10164;
25. C. J. Torregrosa-Hetland, J. Villanueva, I. López-Font, V. Garcia-Martinez, A. Gil, V. Gonzalez-Vélez, J. Segura, S. Vinięra, L. M. Gutiérrez, *Cell and Mol Neurobio.*30. (2010)1315.

Uticaj aktinidina - cistein proteaze iz kivija (*Actinidia deliciosa*) na ekspresiju proinflamatornih citokina u T84 epitelnim ćelijama humanog kolona

Milena Čavić, Milica Grozdanović*, Radmila Janković, Marija Gavrović-Jankulović*

Odeljenje za eksperimentalnu onkologiju, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije, Pasterova 14, Beograd,
*Katedra za biohemiju, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Studentski trg 12-16, Beograd

Uvod

Iako je tokom osamdesetih godina prošlog veka smatran egzotičnim voćem, najnovije studije su pokazale da kivi (*Actinidia deliciosa*) spada u prvih 10 alergeni izvora u nekim evropskim zemljama.^{1,2,3} Molekulska osnova alergije na kivi pripisana je proteinima/glikoproteinima iz ovog alergena izvora, i do danas je identifikovano 11 IgE reaktivnih proteina, kao što su aktinidin (Act d 1), taumatinu sličan protein (Act d 2), cistatin (Act d 4), kivelin (Act d 5), profilin (Act d 9) i drugi.

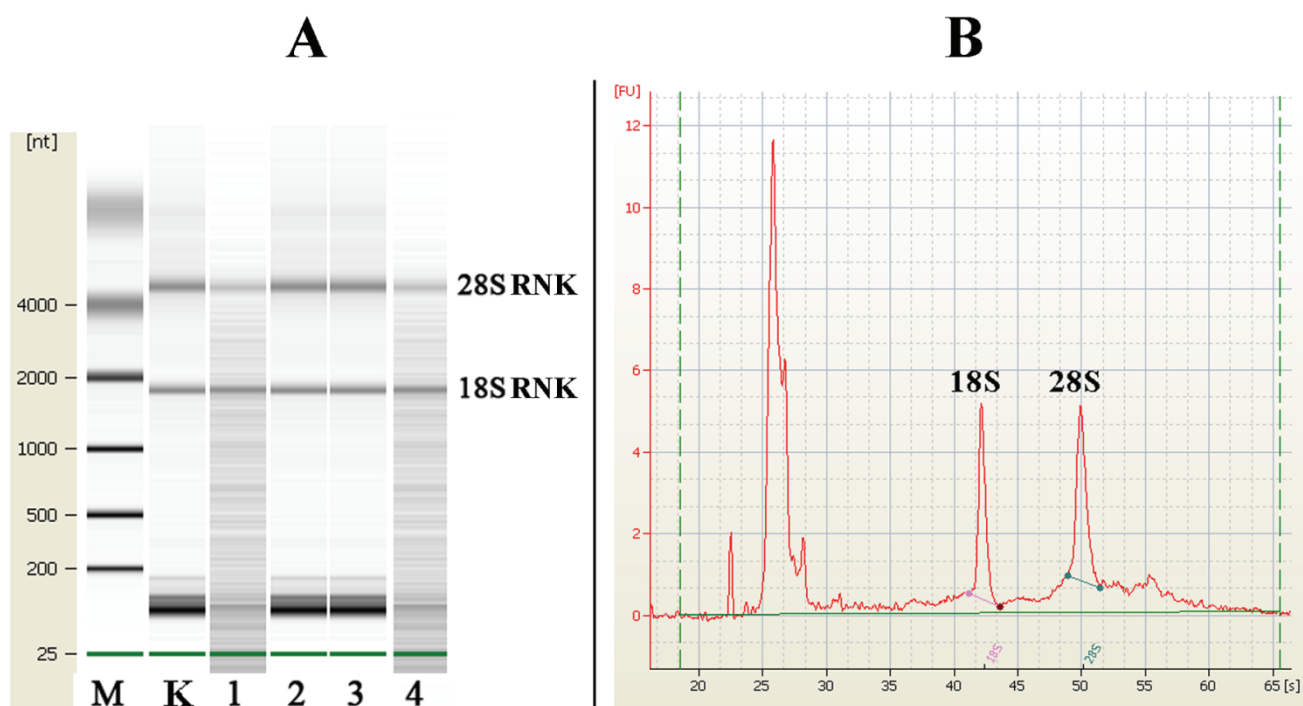
Aktinidin je cistein proteaza koja čini oko 50 % ukupnih solubilnih proteina kivija. Jedan je od glavnih alergena kivija, što verovatno duguje visokoj zastupljenosti u voću, kao i činjenici da može delimično da preživi uslove gastrointestinalne digestije i izazove senzitivaciju u intestinumu.^{4,5,6} Za aktinidin nije pokazana ukrštena reaktivnost sa alergenima polena i trava, a mehanizam kojim izaziva senzitivaciju u intestinumu do sada nije bio detaljno proučen. U najnovijim studijama je pokazano da proteolitički aktivan aktinidin dovodi do promene morfologije, adhezije i integriteta monosloja T84 humanih epitelih ćelija kolona.⁷ Narušeni integritet epitela kolona može biti značajan faktor pri senzitivaciji na alergene hrane u intestinumu. Pokazano je i da neki proinflamatorni citokini povećavaju paracelularnu propustljivost epitelne monosloja intestinalnih ćelija bez uticaja na vijabilnost ćelija, kao i da utiču na ćelije imunog sistema koje se nalaze ispod intestinalnog epitelne monosloja.^{8,9,10}

U cilju ispitivanja da li aktinidin dovodi do promene ekspresije gena za proinflamatorne citokine, u ovom radu je ispitan njegov uticaj na ekspresiju gena za IL-6, IL-8, IL-1 β i TNF α , za koje je poznato da učestvuju u inicijaciji ili pojačanju inflamatornog odgovora u intestinumu. Eksperimenti su izvedeni na T84 ćelijskoj liniji adenokarcinoma kolona, koja obrazuju kompaktni monosloj od čvrsto spojenih ćelija, uz lučenje kolonskog mucina. Ove ćelije se često u literaturi koriste kao model sistema epitela kolona.¹¹ Za T84 ćelije je takođe poznato da se u smislu panela proinflamatornih citokina koje proizvode ne razlikuju od normalnih ćelija kolona i da su sposobne da odreaguju na prisustvo raznih signala indukcijom ekspresije ovih citokina u nivou sličnom fiziološkom.¹²

Rezultati i diskusija

T84 ćelije su gajene u DMEM/F-12 podlozi sa dodatkom fetalnog goveđeg seruma i antibiotika, u inkubatoru na temperaturi 37 °C u atmosferi vazduha sa 5 % CO₂, zasićenog vodenom parom. Ćelije su rasle u vidu adherentnog monosloja, sa apikalno-bazalno polarizovanim ćelijama ovalnog do poligonalnog oblika, što je karakteristično za epitelne ćelije kolona. Aktinidin je izolovan iz ekstrakta kivija kombinacijom jonoizmenjivačkih hromatografija na DEAE-Sephadex A-50 koloni i SP-Sephadex C-50 koloni i okarakterisan. Oko 20 mg prečišćenog aktinidina je dobijeno iz 100 g svežeg kivija. Čistoća ovog preparata je procenjena na >97% pomoću SDS-PAG elektroforeze i N-terminalnog sekvenciranja. Za aktivaciju aktinidina je korišćen 52 mM L-cistein i smeša je zagrevana 1 sat na 45 °C. U cilju ispitivanja da li su efekti aktinidina zavisni od njegove proteolitičke aktivnosti, inaktivacija aktinidina je izvedena temperaturno - zagrevanjem smeše na 95 °C 5 minuta ili dodavanjem koktela inhibitora proteaza u smešu. Aktivnost svih tretmana određena zimografijom i kazeinolitičkim esejom je pokazala da su oba načina inaktivacije aktinidina uspešno smanjila njegovu aktivnost na manje od 10 % početne aktivnosti. Kao pozitivna enzimski kontrola u eksperimentima je korišćen komercijalni papain, cistein proteaza iz papaje (*Carica papaya*) sa sličnom strukturom i specifičnošću kao aktinidin.

Nakon tretmana aktinidinom u trajanju od 4 sata, iz T84 ćelija je izolovana totalna RNK primenom TRI REAGENT[®]-a. Kvalitet izolovane RNK je analiziran na aparatu Agilent 2100 Bioanalyzer uz korišćenje čipova i kita Agilent RNA 6000 Nano, kojim je pokazano da je izolovanje bilo uspešno, uz minimalnu degradaciju uzoraka što se može videti na elektroforetskom gelu i elektroferogramu dobijenim nakon analize uzoraka (Slika 1).

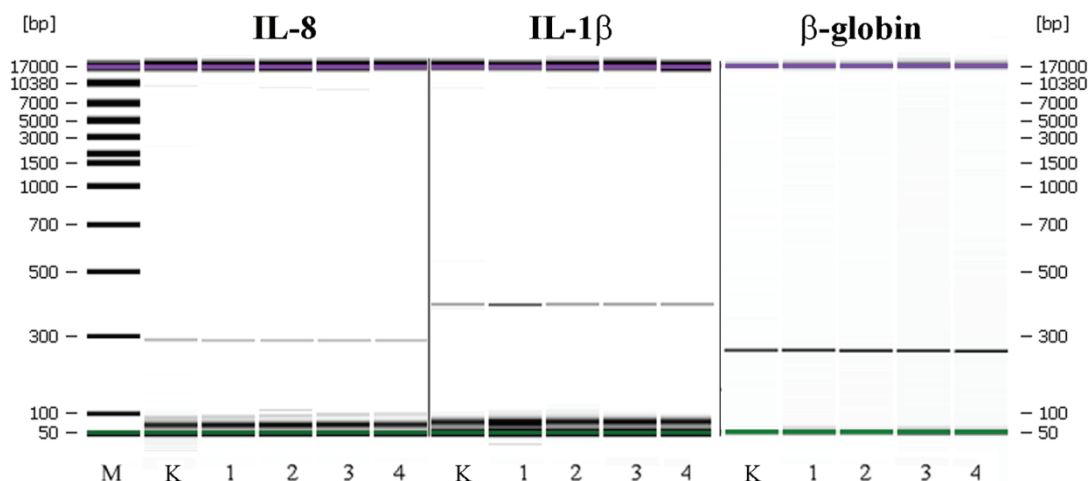


Slika 1. Rezultati analize kvaliteta izolovane RNK iz tretiranih T84 ćelija na aparatu Agilent 2100 Bioanalyzer. **A** – Elektroforetski profil izolovane RNK; K – kontrola (netretirane ćelije), 1 – ćelije tretirane aktinidinom, 2 – ćelije tretirane termalno inaktiviranim aktinidinom, 3 – ćelije tretirane aktinidinom inaktiviranim inhibitorima proteaza, 4 – ćelije tretirane papainom. M – markeri molekulskih masa. **B** – Primer elektroferograma izolovane RNK.

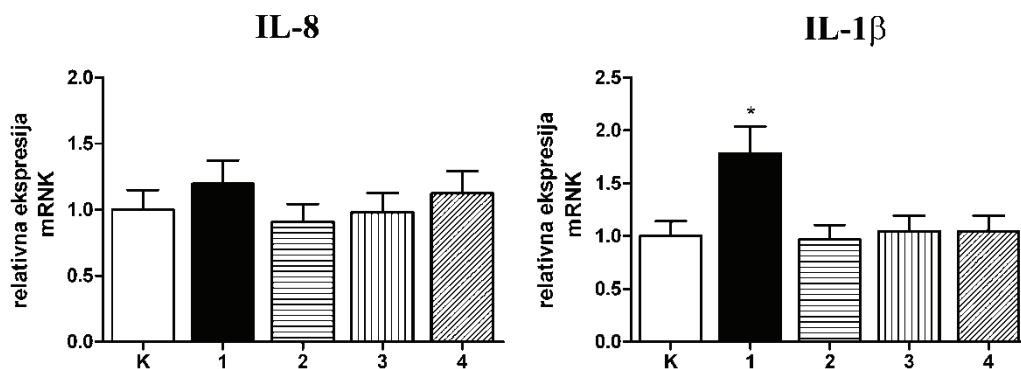
Reverznom transkripcijom je sintetisana cDNK iz uzoraka RNK, a zatim je korišćenjem specifičnih prajmera za IL-6, IL-8, IL-1 β i TNF α ispitana promena ekspresije gena za ove citokine nakon tretmana. Uspešnost PCR-a je inicijalno praćena elektroforezom na agaroznom gelu sa etidijum bromidom, a β -globin je korišćen kao interna kontrola amplifikacije. Prisustvo produkata odgovarajuće dužine (za IL-6 628 bp, za IL-8 289 bp, za IL-1 β 388 bp, za TNF α 355 bp i za β -globin 268 bp) detektovano je korišćenjem markera molekulskih masa na svakom gelu. Analizom dobijenih PCR proizvoda pokazano je da netretirane T84 ćelije nisu konstitutivno ekspimirale mRNK za TNF α i IL-6, što je u skladu sa literaturnim podacima.¹² Ni nakon tretmana aktivnim i inaktiviranim aktinidinom nije došlo do indukcije ekspresije gena za TNF α i IL-6 u datim eksperimentalnim uslovima.

Analizom dobijenih PCR proizvoda pokazano je da su netretirane T84 ćelije konstitutivno ekspimirale nizak nivo mRNK za IL-8 i IL-1 β , što je u skladu sa literaturnim podacima.¹² Nakon primene proteolitički aktivnog aktinidina u trajanju od 4 sata, uočena je povećana ekspresija mRNK za IL-1 β , dok za mRNK za IL-8 nije uočena očigledna promena u ekspresiji, jer su nivoi mRNK nakon svih tretmana dali kvalitativno sličan rezultat. U cilju kvantitativne potvrde ovog rezultata, produkti RT-PCR amplifikacije mRNK za IL-8 i IL-1 β su analizirani na aparatu Agilent 2100 Bioanalyzer uz korišćenje čipova i kita Agilent DNA 12000. Rezultati elektroforeze na čipu su prikazani na Slici 2.

Rezultati kvantifikacije nivoa mRNK za IL-8 i IL-1 β su prikazani na Slici 3. Vrednosti su izražene u vidu odnosa mRNK nivoa tretiranih ćelija u poređenju sa netretiranom kontrolom (uzeto za vrednost 1), nakon normalizacije na osnovu signala za β -globinski gen. Rezultati predstavljaju srednju vrednost \pm standardna devijacija iz tri nezavisna eksperimenta. Program GraphPad Prism verzija 5.04 (GraphPad Software) je korišćen za poređenje srednjih vrednosti pomoću analize varijanse (ANOVA), a razlika u rezultatima je smatrana statistički značajnom ukoliko je $p < 0,05$.



Slika 2. Elektroforetski profil PCR produkata IL-8, IL-1 β i β -globina kao kontrole nakon 4 sata tretmana dobijen na aparatu Agilent 2100 Bioanalyzer. K – kontrola (netretirane ćelije), 1 – ćelije tretirane aktinidinom, 2 – ćelije tretirane termalno inaktiviranim aktinidinom, 3 – ćelije tretirane aktinidinom inaktiviranim inhibitorima proteaza, 4 – ćelije tretirane papainom. M – markeri molekularskih masa.



Slika 3. Kvantitativna analiza ekspresije mRNK za IL-8 i IL-1 β nakon 4 sata tretmana. K – kontrola (netretirane ćelije), 1 – ćelije tretirane aktinidinom, 2 – ćelije tretirane termalno inaktiviranim aktinidinom, 3 – ćelije tretirane aktinidinom inaktiviranim inhibitorima proteaza, 4 – ćelije tretirane papainom. * $p < 0,001$.

Iako je uočen blag porast nivoa ekspresije mRNK za IL-8 nakon 4 sata tretmana proteolitički aktivnim aktinidinom, ova razlika nije bila statistički značajna u zadanom intervalu ($p > 0,05$). Primenom aktinidina inaktiviranog termalno i inhibitorima proteaza takođe nije detektovana statistički značajna razlika u nivou ekspresije mRNK za IL-8 ($p > 0,05$). Primenom papaina nije uočena statistički značajna razlika u nivou ekspresije mRNK za IL-8 i IL-1 β ($p > 0,05$).

Kvantitativnom analizom je pokazano da postoji statistički značajna razlika u nivou ekspresije mRNK za IL-1 β nakon 4 sata tretmana aktinidinom u odnosu na netretiranu kontrolu ($p < 0,001$). Primenom aktinidina inaktiviranog termalno i inhibitorima proteaza nije detektovana statistički značajna razlika u nivou ekspresije mRNK za IL-1 β ($p > 0,05$), što ukazuje da je ovaj efekat zavisao od proteolitičke aktivnosti aktinidina. IL-1 β je tipičan proinflamatorni citokin koji ima važnu ulogu u inicijaciji i pojačanju inflamatorne kaskade u raznim intestinalnim poremećajima influksom inflamatornih ćelija u intestinalnu mukozu i aktivacijom okolnih epitelnih ćelija.^{13,14} Za IL-1 β je ranije takođe pokazano da remeti integritet epitelne barijere dejstvom na proteine čvrste veze i da time doprinosi povećanju paracelularne propustljivosti intestinalnog epitela.¹⁵ Prema tome, indukcija ekspresije gena za IL-1 β od strane aktinidina može biti značajna za inicijaciju proinflamatorne mikrookoline u humanom kolonu, kao i za dodatno povećanje propustljivosti epitela kolona. Postoji mogućnost da narušavanje integriteta epitelne barijere kolona inicirano direktnom proteolitičkom aktivnošću aktinidina⁷ može biti nastavljeno pod dejstvom IL-1 β i nakon uklanjanja aktinidina iz intestinuma digestijom ili pražnjenjem.

Zaključak

U ovom radu ispitan je uticaj aktinidina, glavnog alergena kivi, na ekspresiju gena za proinflamatorne citokine u humanim kolonskim epitelnim ćelijama T84, koji bi mogli da doprinesu razvoju alergijske reakcije u humanom kolonu. Pokazano da proteolitički aktivan aktinidin dovodi do statistički značajno povećane ekspresije mRNA za proinflamatorni citokin IL-1 β nakon 4 sata tretmana. Ovaj efekat aktinidina može imati vrlo važnu ulogu u senzitivizaciji i alergijskom odgovoru na kivi, jer stvara proinflatornu mikrookolinu u kolonu i povećava verovatnoću da alergeni dođu u kontakt sa subepitelnim ćelijama imunog sistema narušavanjem epitelne barijere kolona. Rezultati ovog istraživanja doprinose rasvetljavanju mehanizama pomoću kojih dolazi do senzitivizacije na kivi u humanom intestinalnom sistemu i pružaju osnovu za razvoj novih terapijskih strategija za lečenje alergija na hranu koja sadrži proteolitički aktivne alergene.

Zahvalnica: Ovaj rad je proistekao iz istraživanja na projektu br. 172049 koji finansira Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije.

The effect of actinidin – a kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) cysteine protease on the expression of proinflammatory cytokines in T84 human colonic epithelial cells

Although it was considered as an exotic fruit during the 1980s, latest studies have shown that kiwifruit is among the first 10 food allergen sources in some European countries. Actinidin is an abundant cysteine protease which accounts for around 50 % of the protein content of kiwifruit. It is a major kiwifruit allergen probably because of its high abundance in kiwifruit, and its potential to survive gastrointestinal digestion and reach the intestine partially undegraded. Using the T84 colonic cell line as a model system of the colonic epithelium it has recently been shown that actinidin's proteolytic activity leads to a reduction of the epithelial barrier integrity which might be an important factor for sensitization to kiwifruit allergens in the intestinal system, by enabling their contact with colonic subepithelial immune cells. In this study, the effect of actinidin on the expression of proinflammatory cytokines in T84 human colonic epithelial cells was investigated. It was shown that proteolytically active actinidin upregulated the expression of IL-1 β which is known to contribute to epithelial integrity breach and inflammation. These results contribute to the understanding of intestinal sensitization mechanisms to kiwifruit and should help in designing new therapeutic strategies for allergies to food sources which contain proteolytically active allergens.

Literatura

1. L. Mattila, M. Kilpelainen, E.O. Terho, M. Koskenvuo, H. Helenius, K. Kalimo, *Clin. Exp. Allergy*. **33** (2003) 600
2. N.E. Eriksson, S. Werner, T. Foucard, C. Moller, T. Berg, J. Kiviloog, K. Norrlind, M. Söderberg, J.A. Wihl, *Allergol. Int.* **52** (2003) 199
3. F. Rance, X. Grandmottet, H. Grandjean, *Clin. Exp. Allergy*. **35** (2005) 167
4. L. Kaur, S. Rutherford, P. Moughan, L. Drummond, M. Boland, *J. Agric. Food Chem.* **58** (2010) 5068
5. L. Kaur, S. Rutherford, P. Moughan, L. Drummond, M. Boland, *J. Agric. Food Chem.* **58** (2010) 5074
6. S.M. Rutherford, C.A. Montoya, M.L. Zou, P.J. Moughan, L.N. Drummond, M.J. Boland, *Food Chem.* **129** (2011) 1681
7. M. Cavic, M. Grozdanovic, A. Bajic, T. Srdic-Rajic, P.R. Andjus, M. Gavrovic-Jankulovic, *Phytochem.* **77** (2012) 46
8. R. Al-Sadi, M. Boivin, T. Ma, *Front. Biosci.* **14** (2009) 2765
9. M. Bruewer, A. Luegering, T. Kucharzik, C. Parkos, J. Madara, A. Hopkins, A. Nusrat, *J. Immunol.* **171** (2003) 6164
10. C. Capaldo, A. Nusrat, *Biochim. Biophys. Acta.* **1788** (2009) 864
11. R.P. Donato, A. El-Merhibi, B. Gundsambuu, K.Y. Mak, E.R. Formosa, X. Wang, C.A. Abbott, B.C. Powell, *Methods Mol. Biol.* **763** (2011) 115
12. H.C. Jung, L. Eckmann, S.K. Yang, A. Panja, J. Fierer, E. Morzycka-Wroblewska, M.F. Kagnoff, *J. Clin. Invest.* **95** (1995) 55
13. C.A. Dinarello, *Blood.* **87** (1996) 2095
14. H. Reinecker, M. Steffen, C. Doehn, J. Petersen, I. Pfluger, A. Voss, A. Raedler, *Immunol. Res.* **10** (1991) 247
15. R. Al-Sadi, D. Ye, H.M. Said, T.Y. Ma, *J. Cell. Mol. Med.* **15** (2011) 970.

Metal based photosensitizers of tetradentate Schiff base: Promising role in anti-tumor activity through singlet oxygen generation mechanism

Halehatty S. Bhojya Naik, Sirabadige M. Pradeepa, Atanu Barik*, Indira K. Priyadarsini*

Department of Studies and Research in Industrial Chemistry, Kuvempu University,
Shankaraghatta-577 451, Shimoga, INDIA.

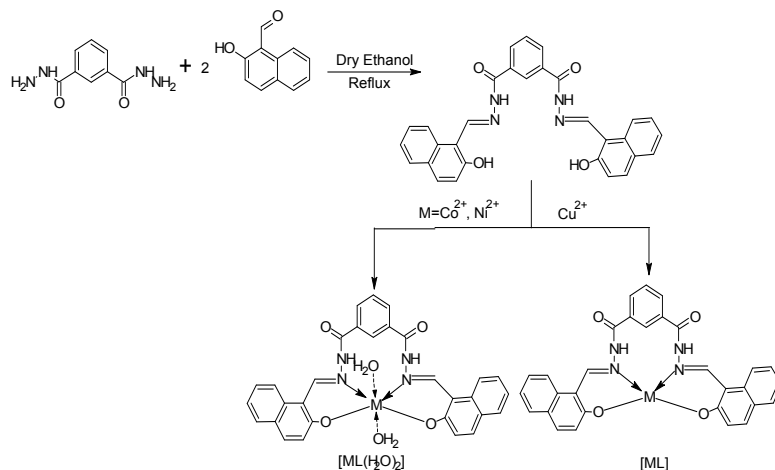
*Radiation Chemistry Section, Radiation and Photochemistry Division,
Bhabha Atomic Research Centre, Mumbai-400085, INDIA.

Introduction

The Coordination compounds have become an integral part of many aspects of medicine today. Photodynamic therapy (PDT) is a growing field of medicine as a treatment modality for variety of cancers, utilizes photosensitizers, typically transition metal complexes. So, design, synthesis of metal complexes and study of their DNA photocleavage activity is of great importance in PDT¹⁻³. Under the irradiation of suitable light, these metal complexes would be excited and further produce reactive oxygen species and exhibit potential utility in photodynamic therapy. Hence, the binding and photocleavage behaviour of the newly synthesized metal complexes with DNA have been investigated as a new class of photosensitizers.

Results and discussion

A schiff base *N*¹,*N*³-bis[(*Z*)-(2-hydroxynaphthyl)methylidene] benzene-1,3-dicarbo dihydrazide (*L*₁) was obtained by the reaction of 2-hydroxynaphthalene-1-carbaldehyde (2 mmol) and benzene-1,3-dicarbohydrazide (1 mmol) in ethanol in presence of acetic acid as catalyst. The metal complexes were prepared by a direct reaction of respective metal salts and the ligand in 1:1 molar ratio, using methanol as the reaction medium. The complexes are stable in air and are soluble in DMF, DMSO and buffer solution. They were characterized by physico-chemical methods.



Scheme1: Synthesis of *N*¹,*N*³-bis[(*Z*)-(2-hydroxynaphthyl)methylidene] benzene-1,3-dicarbo dihydrazide (*L*₁) and its metal complexes.

The observed bands at 3483 cm^{-1} , a strong band at 1650 cm^{-1} and 1270 cm^{-1} in the IR spectrum of the Schiff base are assigned to H-bonded -OH stretching, $\nu(\text{C}=\text{N})$ of azomethine and hydrazinic $\nu(\text{N}-\text{N})$ vibrations, respectively. An intense band at 3058 cm^{-1} is due to the -NH- vibrations of the hydrazine group, the band at 1738 cm^{-1} is assigned to carbonyl $\nu(\text{C}=\text{O})$ of the free ligand. The band due to phenolic -OH and C=N of the ligand was disappeared in the complexes indicates that phenolic -OH and C=N of the ligand coordinates to the metal through oxygen via deprotonation and through nitrogen. The presence of broad stretching vibrations in the 3402-3452 cm^{-1} region can be attributed to coordinated or lattice water molecules in all these complexes. The unaltered position of the $\nu(\text{C}=\text{O})$ (carbonyl) and $\nu(\text{N}-\text{H})$ confirms non-involvement of these groups in coordination. The new bands observed in the region 540-550 cm^{-1} and 425-450 cm^{-1} , have been assigned for $\nu(\text{M}-\text{O})$ and $\nu(\text{M}-\text{N})$ bonds respectively.

The electronic spectra of the free ligand in DMF solution showed $n-\pi^*$ transitions of azomethine nitrogen bands at 440, 460 and 480 nm. The other band absorptions at 320-380 nm were due to the phenyl $\pi-\pi^*$ transitions. The electronic spectrum of Co(II) complex in DMF exhibited characteristic d-d and MLCT transition in the range of 450-470 nm, while the bands at 320, 350 and 378 nm are assigned to the $n-\pi^*$ transitions of the azomethine nitrogens. The bands at 254 and 265 nm are due to phenyl $\pi-\pi^*$ transitions. Similarly, for Ni(II) and Cu(II) complexes the bands were observed in the region 458, 430, 380, 360, 320, 270 and 440, 420, 348, 320, 278 nm, respectively⁴.

The down field shift of the OH proton in the ligand resonates at 12.72 ppm in its ^1H NMR spectrum indicates that the OH proton in ligands are probably involved in the formation of strong intramolecular hydrogen bonding. The NMR spectrum of the ligand exhibits NH proton at 12.41 ppm, aromatic ring protons at 6.8-8.65 ppm. The ^1H NMR spectra of the complexes cannot be obtained due to interference in their paramagnetic properties.

DNA Binding studies

Absorption and Fluorescence spectral studies

Absorption titration experiments were carried out by varying DNA concentration (0 to 100 μM) and maintaining the metal complex concentration constant. The interaction of complexes with CT-DNA was monitored by the red shift (the hypsochromic effect) in UV-visible spectra. The observed maximum wavelength of copper(II) complexes was shifted by the progressive addition of DNA and led to strong hypochromism in the absorption intensities. The hypochromicity, is the characteristic of intercalation as usually attributed to the interaction between the electronic states of the compound chromophores and those of the DNA bases⁵. To further illustrate the DNA binding strength, the intrinsic binding constant K_b was determined for nickel(II), copper(II) and cobalt(II) complexes which were found to be $2.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $5.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ and $4.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, respectively.

The competitive DNA binding properties of the complexes were studied by quenching assay based on the displacement of the intercalating drug EB from CT-DNA⁶. The DNA bound EB was greatly quenched by the addition of Co(II), Ni(II), and Cu(II) complexes and the fluorescence is nearly completely quenched at a concentration ratio $[\text{Ru}]/[\text{EB}] = 2.5$ (Figure 2).

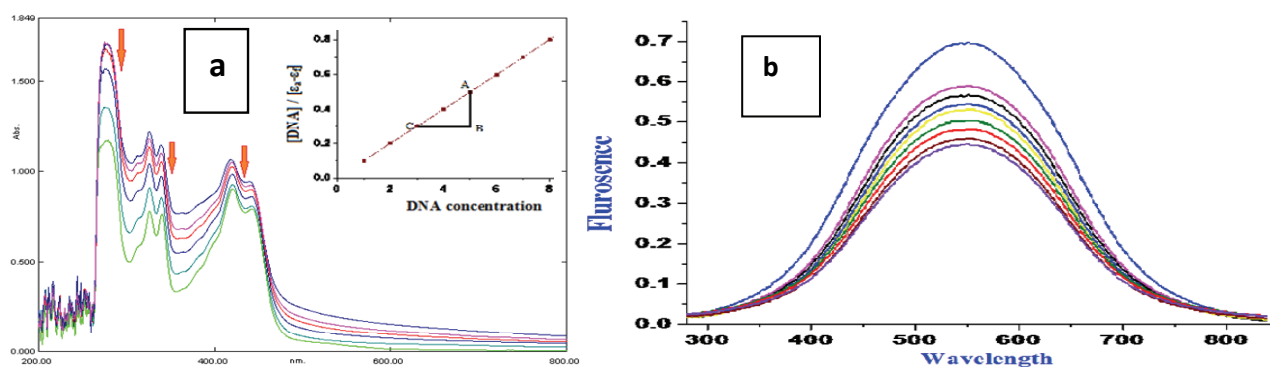


Fig.1: (a). Absorption spectral traces of complexes $[\text{Cu}(\text{L})]\text{H}_2\text{O}$ in Tris-HCl buffer (0.01 M, pH 7.2) upon addition of CT-DNA = 0.5 μM , = 10 μM , drug, 20 μM ; 30 μM ; 40 μM ; 50 μM ; arrow shows the absorbance changing upon an increase of DNA concentration. **(b).** The emission spectra for Cu(II) metal complex in the presence and absence of CT-DNA.

Viscosity Measurements and Thermal denaturation studies

As classical intercalative mode causes a significant increase in viscosity of DNA solution, the viscosity of DNA is increased with the increment of each complexes and it is similar to the behaviour of well-known DNA-intercalator ($[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$). This result suggested an intercalative binding mode of the complex with DNA⁷. The effect of complexes on the viscosity of DNA is shown in Figure 2(a).

The intercalation of small molecules into the double helix is known to increase the DNA melting temperature (T_m), at which the double helix denatures into single stranded DNA, owing to the increased stability of the helix in the presence of an intercalator. The DNA melting studies were carried out with

calf thymus DNA in the absence and presence of metal complexes [1:5 ratio of metal complexes to DNA-c(P)]. T_m for calf thymus DNA was $60 \pm 5^\circ\text{C}$ in the absence of compounds, whereas in presence of complex the T_m of CT-DNA increased⁸. These variations in DNA melting temperature strongly supported the intercalation of complex into the double helix DNA Fig. 2(b).

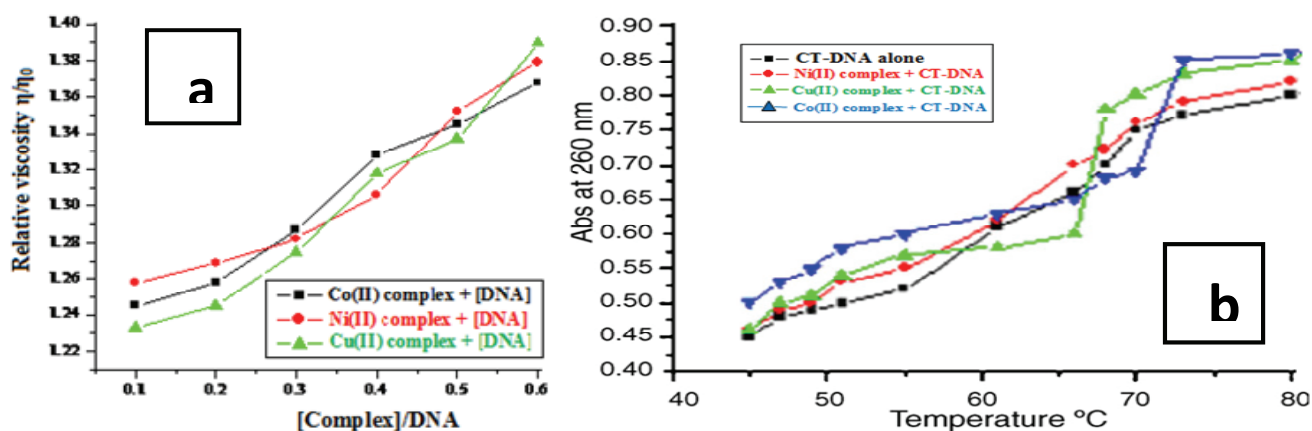


Fig.2: (a). Effects of increasing amount of Co(II), Ni(II) and Cu(II) complexes on the relative viscosity of CT-DNA at $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$. (b). Melting curves of CT-DNA in the presence and absence of Co(II)/Ni(II)/Cu(II) complexes.

DNA Photocleavage studies

The photo-induced DNA cleavage activity of the complexes was studied by gel electrophoresis using supercoiled (SC) pUC19 DNA ($0.5 \mu\text{g}$) in Tris-HCl buffer (pH, 7.2). The gel diagram is shown in Figure 3. The complexes show cleavage of the SC DNA, on 1 hour exposure at 365 nm. Control experiments using DNA alone do not show any significant cleavage of SC DNA. The complexes show the presence of charge-transfer band near 400 nm. It is likely that the photocleavage at 365 nm involves photoexcitation of the charge-transfer band leading to the formation of an excited singlet state that through the triplet state activates molecular oxygen to form reactive singlet oxygen species. To test the possibility that photoinduced cleavage involves the formation of singlet oxygen, which is known to react with guanine residues at neutral pH, the cleavage was tested in the presence of D_2O . Singlet oxygen would be expected to induce more strand scission in D_2O than in H_2O due to its longer lifetime in the former solvent⁹.

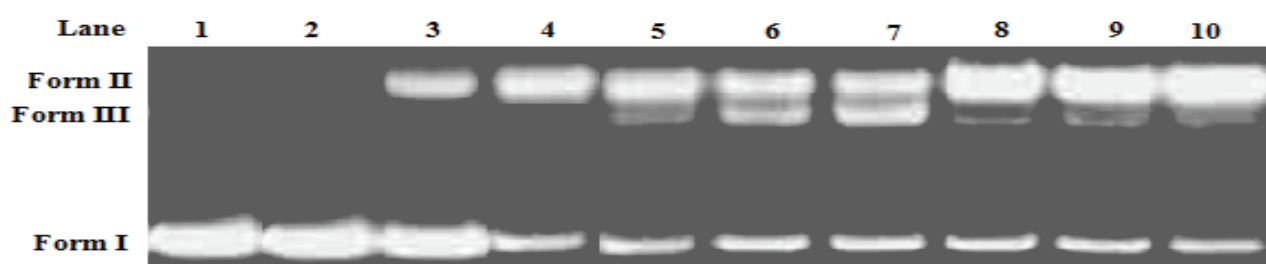


Fig. 3: Gel electrophoresis diagram of the control experiments using SC DNA ($0.5 \mu\text{g}$), metal complexes ($30 \mu\text{M}$), and other additives at 365nm for an exposure time of 1 hour. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA + NaN_3 ($38 \mu\text{M}$) + complexes; lane 3: DNA + D_2O ($14 \mu\text{L}$) + complexes; lane 4: DNA + DMSO ($4 \mu\text{L}$) + complexes; lane 5: DNA + $40 \mu\text{M}$ Co(II) complex ; lane 6: DNA+ $60 \mu\text{M}$ Co(II) complex ; lane 7:DNA+ $40 \mu\text{M}$ Ni(II)complex ; lane 8: DNA+ $60 \mu\text{M}$ Ni(II) complex ; lane 9: DNA+ $40 \mu\text{M}$ Cu(II) complex ; lane 10: DNA+ $60 \mu\text{M}$ Cu(II) complex.

Control experiments have shown that the singlet oxygen quencher sodium azide significantly inhibits the cleavage reaction, while the hydroxyl radical scavenger DMSO has no apparent effect on the cleavage process. The formation of singlet oxygen is further supported by the enhancement of the percentage of SC DNA cleavage in D_2O solvent. From the above results, we conclude that the photocleavage activity of complexes at 365 nm, shows significantly higher cleavage activity based on their DNA binding propensity.

Rate and quantum yield of singlet oxygen generation of photosensitizers

The rate and quantum yield of singlet oxygen generation of photosensitizers was calculated according to the literature method¹⁰. The rate of production of singlet oxygen for Co(II), Cu(II) and Ni(II) complexes is 6.05×10^{-4} , 5.59×10^{-4} and 7.2×10^{-4} respectively. The effective quantum yield of the complexes suggested that these complexes may be useful as potential PDT agents in photochemical therapy.

Anti-tumor study on A549 (lung carcinoma) cell

Compounds, at a concentration range of 5, 10, 25, 50, 75 and 100 μM were used for anti-tumor studies using A549 cell¹¹. The cell viability was calculated taking the control cell value as 100 %.

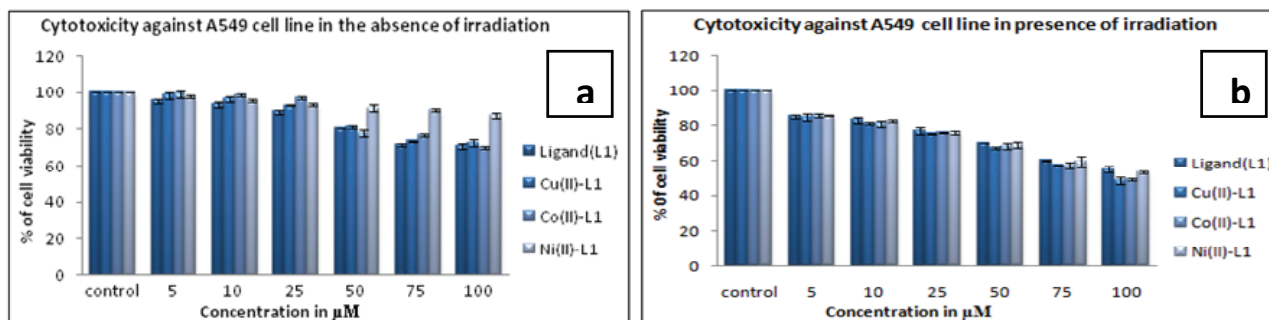


Fig.4: (a). Cytotoxicity of Cu(II), Co(II) and Ni(II) complexes to A549 cells in the absence of irradiation. (b). Cytotoxicity of Cu(II), Co(II) and Ni(II) complexes to A549 cells in the presence of irradiation.

At all concentration, in the absence of irradiation the Cu(II), Co(II) and Ni(II) complexes moderately reduced the viable A549 cells after staining with trypan blue at 72 h (effects on cell proliferation), which was slightly more at higher concentrations (50–100 μM) (Fig.4a). On the other hand, under similar experimental conditions but with irradiation, the complexes show enhanced cytotoxicity and reduced maximum number of viable A549 cells at both lower and higher concentrations (Fig.4b). These results further supporting the conclusion reached by MTT reduction assay that these complexes show significant dose dependent cytotoxicity to A549 cells in presence of light irradiation through singlet oxygen generation.

Conclusion

In summary, three M(II) complexes of Schiff base ligand N^1, N^3 -bis[(Z)-(2-hydroxynaphthyl)methylidene] benzene-1,3-dicarbohydrazide have been synthesized and structurally characterized. The CT-DNA binding abilities resulted that the complexes bind to CT-DNA by an intercalative mode. When irradiated by UV-Visible light the complexes are found to be efficient photocleaving agents of DNA. Hence, these complexes may be useful as potential PDT agents in photochemical therapy.

Acknowledgment: Authors are thankful to Board of Research in Nuclear Sciences, Mumbai, INDIA for supported the work through a Major Research project (No.2009/34/44/BRNS/3227).

Reference:

1. M. R. Detty, S. L. Gibson, and S. J. Wagner, *J. Med. Chem.*, 47 (2004) 3897.
2. R. Bonnett, *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*, Gordon & Breach, London, U. K., 2000.
3. A. K. Patra, T. Bhowmick, S. Ramakumar, M. Nethaji, A. R. Chakravarty, *Dalton Trans.*, (2008) 6966.
4. B. Ulkuseven, T. Bal, M. Sahin, *Rev. Inorg. Chem.* 26 (2006) 367.
5. H. S. Bhojya Naik, B. Sreekanth, G. Krishnamurthy, M. C. Prabhakara, T. K. Vishnuvardhan, *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, Nano-Metal Chemistry*, 40 (2010) 955.
6. Y. HuiJuan, H. ShuMei, K. JunFeng, L. LvYing, J. HaiNa, C. Hui, J. LiangNian, *Sci China Ser B-Chem*, 52 (2009) 1504.
7. A. Komaraiah, K. Ramakrishna, B. Sailu, P. S. N. Reddy, *Arkivoc.*, 14 (2007) 110.
8. H. Nagaraja Naik, Vijay Kumar. *Eur. J. Med.Chem.*, 45 (2010) 2.
9. J. D. Spikes, K. C. Smith, Ed., *The Science of Photobiology*, (1977) 87.
10. I.E. Kochevar, R.W.Redmond, *Methods in enzymology*, 319 (1992) 20.
11. P. Zhang, J. Chen, Y. Liang, *Acta Biochim Biophys Sin*, 42 (2010) 440.

Ispitivanje reakcije paracetamola sa Fentonovim reagensom i određivanje *radical scavenging* aktivnost DPPH metodom

Slavica M. Sunarić, Milica M. Radić

Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet, Katedra za Hemiju,
Bulevar dr Zorana Đinđića 81, 18000 Niš, Srbija ssunaric@medfak.ni.ac.rs

Uvod

Sistemi koji sadrže vodonik peroksid i jone prelaznih metala (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^+ i Cu^{2+}), poznati pod nazivom Fentonov reagens, dosta su ispitivani kako sa hemijskog, tako i sa biološkog i biohemijskog aspekta. Sva istraživanja ukazuju na neosporan značaj ovih reakcija u biohemijskim procesima žive ćelije, a takođe su ove reakcije našle primenu i u nekim industrijskim postupcima, kao što je prečišćavanje otpadnih voda tj. uklanjanje štetnih organskih molekula reakcijama njihove oksidacije i degradacije ovim sistemima.

Metal-katalizovane redoks reakcije vodonik peroksida se široko primenjuju kao model sistemi u proučavanju bioloških oksidacija, oksidativnog stresa i bolesti izazvanih njima. Slobodni radikali nastaju u organizmu pri normalnom metabolizmu endogenih i egzogenih supstanci, ali i kao produkti određenih patoloških procesa.

Katalitičkim raspadom H_2O_2 u prisustvu Cu(II) jona nastaju reaktivne kiseonične vrste od kojih su najznačajniji hidroksilni radikali ¹. Mehanizam Fentonove reakcije je dosta složen i još nedovoljno ispitan, ali se u najjednostavnijem obliku može prikazati sledećom reakcijom:



gde je M^{n+} jon metala, najčešće Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^+ i Cu^{2+} .

Slobodni radikali su veoma reaktivne čestice i kao takvi mogu izazvati značajna oštećenje tkiva i nastanak mnogobrojnih patoloških stanja. U radu je ispitivana reakcija paracetamola sa Fentonovim reagensom tj. proizvodima razlaganja vodonik-peroksida u prisustvu Cu(II) jona u neutralnoj i slabobaznoj sredini.

Paracetamol (acetaminofen) po hemijskom sastavu je acilovani aromatični amid (*N*-acetil-*p*-aminofenol), koji se koristi kao glavni sastojak u mnogim medikamentima antipiretičkog i analgetičkog dejstva ².

Eksperimentalni deo

UV spektrofotometrijsko praćenje reakcije. Rastvor paracetamola koncentracije $1.00 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³ napravljen je rastvaranjem standarda paracetamola, $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_2$ (Zdravlje-Leskovac) u toploj dejonizovanoj vodi. Rastvor Cu(II) koncentracije $1.00 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³, pripremljen je rastvaranjem potrebne mase $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck) u dejonizovanoj vodi. Rastvor H_2O_2 koncentracije 1.00 mol/dm³ je pravljen neposredno pre upotrebe od 35%-tnog vodonik peroksida (Merck). Tris-HCl pufer pH 8.6 dobijen je mešanjem rastvora *tris*-hidroksilmetil-aminometana (1.00 mol/dm³) i HCl (1.00 mol/dm³) u određenom zapreminskom odnosu.

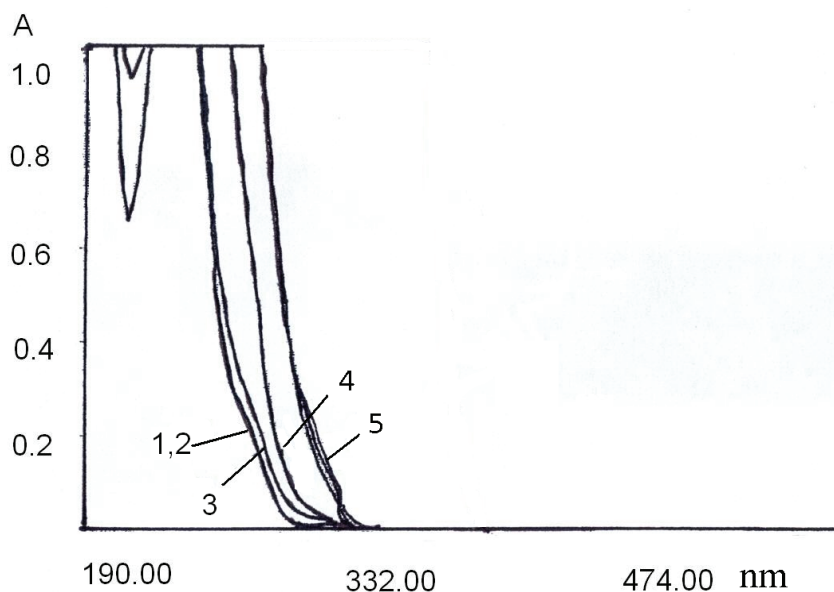
Spektrofotometrijska merenja vršena su na Perkin-Elmer Lambda 15 UV/VIS spektrofotometru, povezanim sa termostatiranim vodenim kupatilom. Reakciona posuda termostatirana je na $20 \pm 0.1^\circ\text{C}$, a reakcija je inicirana istovremenim mešanjem tačno utvrđenih zapremina rastvora reaktanata.

DPPH metoda. Standardni rastvor DPPH reagensa koncentracije 30 μM napravljen je odmeravanjem standardne supstance i rastvaranjem u metanolu. Standardni rastvor paracetamola koncentracije 50 $\mu\text{g/ml}$ dobijen je razblaživanjem osnovnog rastvora. Serija rastvora različitih koncentracija paracetamola dopunjena je metanolom do iste ukupne zapremine, a nakon toga je u svaki dodato po 1 ml metanoloznog rastvora DPPH reagensa. Epruvete su ostavljene da stoje na tamnom mestu na sobnoj temperaturi tokom 45 min. Nakon isteka tog vremena vršeno je merenje apsorbancije rastvora na talasnoj dužini od 520 nm.

Rezultati i diskusija

Ispitujući selektivnost reakcije antibiotika doksiciklina sa Fentonovim reagensom koji sadrži vodonik peroksidom i Cu(II) jone, našli smo da prisustvo paracetamola u mikrogramskoj količini znatno utiče na brzinu ove reakcije, menjajući izgled kinetičkih krivih tj. zavisnosti apsorbancija=f(vreme). Degradacija doksiciklina vodonik peroksidom u prisustvu jona bakra u slabo baznoj sredini praćena je pojavom narandžaste boje intermedijernog degradacionog proizvoda i apsorbance na talasnoj dužini 510 nm³. Kada se u ovaj sistem doda rastvor paracetamola obojenje se pojavljuje znatno kasnije. Ove činjenice ukazuju na to da paracetamol ima inhibitorno dejstvo na reakciju doksiciklina sa H₂O₂-Cu(II) u slabo baznoj sredini. U cilju proučavanja kinetike i određivanja parcijalnih redova ove reakcije ispitan je uticaj koncentracija svih učesnika reakcije. Red reakcije u odnosu na paracetamol određen je za oblast koncentracija od 0.5·10⁻⁵ mol/dm³ do 4.00·10⁻⁵ mol/dm³ (0.8-6.0 µg/ml), na taj način što su selektovane koncentracije svih komponenti reakcionog sistema održavane konstantnim na pH 8.6 i temperaturi 25°C, dok je koncentracija paracetamola varirana. Prema našim rezultatima paracetamol pokazuje zanimljiv efekat u reakciji doksiciklina sa vodonik peroksidom i Cu(II) jonima: u oblasti nižih koncentracija on ispoljava jako inhibitorno dejstvo, dok pri većim koncentracijama paracetamola brzina reakcije doksiciklina ponovo raste, što ukazuje i na antioksidativno i na prooksidativno dejstvo paracetamola u ovoj reakciji. U oblasti koncentracija paracetamola u rastvoru od 0.50·10⁻⁵ mol/dm³ do 2.00·10⁻⁵ mol/dm³ (0.8-3.0 µg/ml) reakcija je negativnog prvog reda, a za interval koncentracija od 2.00·10⁻⁵ mol/dm³ do 4.00·10⁻⁵ mol/dm³ (3.0-6.0 µg/ml) reakcija je prvog reda u odnosu na paracetamol.

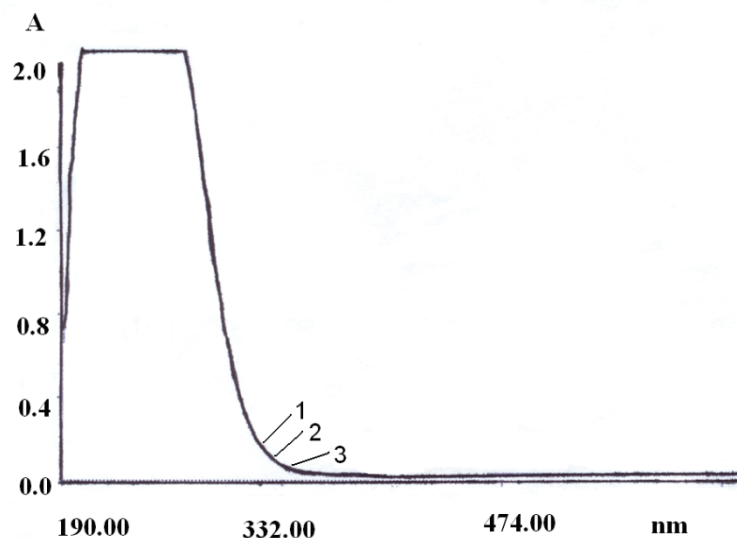
U cilju detaljnijeg objašnjenja inhibitornog efekta paracetamola snimili smo apsorpcione spektre različitih smeša reakcionog sistema paracetamol-H₂O₂-Cu(II)-Tris pufer pH 8.6 (Slika 1).



Slika 1. Apsorpcioni spektri smeša: 1) vodeni rastvor paracetamola, 2) paracetamol-Cu(II), 3) paracetamol-Tris pufer, 4) paracetamol-H₂O₂, 5) paracetamol-Cu(II)-H₂O₂-Tris pufer u vremenskom intervalu od 2-7 minuta. Koncentracije reaktanata u reakcionim smešama: Paracetamol, 1.33·10⁻⁵ mol/dm³; Cu(II), 3.33·10⁻⁵ mol/dm³; H₂O₂, 1.33·10⁻² mol/dm³; Tris-pufer, 0.133 mol/dm³; pH, 8.6; t, 25 °C.

Prisustvo izobestične tačke (kriva 5) ukazuje na nastanak nove čestice, degradacionog proizvoda molekula paracetamola, tj. na odigravanje reakcije u kojoj dolazi do razlaganja vrlo niskih koncentracija paracetamola pod dejstvom vodonik peroksida u slabo baznoj sredini. Ova reakcija katalizovana je jonima Cu(II), jer u samoj reakciji paracetamola i vodonik-peroksida nema sličnih promena u UV spektru (kriva 4), što znači da se degradacija paracetamola ne može izvršiti samo dejstvom H₂O₂. S druge strane, Fentonov reagens sa Tris-puferom na pH 8.6 takođe ne daje apsorpcione krive koje su uočene kada se u taj sistem doda paracetamol (Slika 2.). Neka istraživanja ukazuju na to da i molekul Tris (*tris*-hidroksimetilaminometan) može reagovati sa kompleksom

Cu(II)-peroksid, pri čemu se dobija radikal. Ova hipoteza podržana je ESR podacima, koji pokazuju da Tris inhibira kako građenje DMPO·OH tako i nastanak nitroksid-radikala, a da je sve to praćeno nastankom radikala iz molekula Tris⁴. Reakcija između H₂O₂ i Cu(II) u prisustvu Tris-HCl pufera se odigrava veoma brzo i ne pokazuje vremensku promenu u intervalu od 2-9 minuta nakon započinjanja reakcije (Slika 2.).



Slika 2. Apsorpcioni spektar smeše H₂O₂-Cu(II)-Tris-HCl pufer pH 8.6: 1) nakon 3 min, 2) nakon 5 min, 3) nakon 7 min. Koncentracije supstanci u smeši: pufer, $6.67 \cdot 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$, Cu(II), $3.33 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, H₂O₂, $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$.

Ispitivanje potencijalnih antioksidativnih osobina paracetamola je zatim vršeno praćenjem promene apsorbance rastvora DPPH reagensa u prisustvu različitih koncentracija aktivne supstance. Pri opisanim uslovima primene DPPH metode, paracetamol je pokazao izraženu *radical scavenging* aktivnost u reakciji sa stabilnim DPPH radikalom. Sposobnost reakcije sa slobodnim radikalima posledica je prisustva fenolne grupe u molekulu leka.

Na osnovu izmerenih vrednosti apsorbancija, izračunata je antioksidativna aktivnost ispitivanih rastvora paracetamola. *Radical scavenging* aktivnost paracetamola izražena je kao procenat inhibicije slobodnih DPPH radikala prema formuli:

$$\text{inhibicija, \%} = [(A_B - A_A) / A_B] \times 100 \quad (2)$$

A_B – apsorbancija blank probe

A_A – apsorbancija ispitivanog uzorka

Tabela 1. Zavisnost apsorbancije rastvora DPPH reagensa od koncentracije paracetamola

C / $\mu\text{g ml}^{-1}$ paracetamola	Apsorbancija rastvora DPPH	inhibicija, %
0.0	0.117	/
3.47	0.066	28.81
5.20	0.059	49.57
6.93	0.049	58.12
8.67	0.042	64.10
10.4	0.033	71.79

EC₅₀ vrednost za paracetamol izračunata je ekstrapolacijom sa grafika zavisnosti apsorbancije rastvora DPPH od koncentracije paracetamola. Dobijena EC₅₀ vrednost je 5.21 $\mu\text{g/ml}$ paracetamola, odnosno 8.59 nmol/ μg DPPH.

Zaključak

Degradacija paracetamola odigrava se pod dejstvom Fentonovog reagensa Cu(II)/H₂O₂ u slabo baznoj sredini. Ispitivanje *radical scavenging* aktivnosti primenom DPPH metode daje EC₅₀ vrednost 5.21 µg/ml paracetamola. Pri uzimanju terapijskih doza paracetamola očekivane koncentracije leka u krvi su u opsegu 10-20 µg/ml u vremenskom intervalu 0.5-3h nakon uzimanja leka, pa se može zaključiti da će paracetamol u koncentracijama u kojima je prisutan u krvi ispoljiti značajnu *radical scavenging* aktivnost.

Zahvalnica. Ovo istraživanje urađeno je kao deo projekta broj 142015 koji je finansiralo Ministarstvo za nauku i zaštitu životne sredine Republike Srbije u period od 2006-2010.godine.

Investigation of the reaction of paracetamol with Fenton reagent and determination of DPPH radical scavenging activity

In this paper degradation of analgesic and antipyretic paracetamol in the presence of Fenton reagent Cu(II)/H₂O₂ in weak alkaline aqueous solutions at pH 8.6 was investigated. UV absorption spectra of this reaction system were recorded in the time interval of 2-7 min after the reaction was started. The absorption spectra shows that in the Cu(II)/H₂O₂ system in aqueous solution degradation of paracetamol is occurred. Assuming the radical-chain mechanism of the Fenton reaction, it can be concluded that highly reactive free-radical species react with the phenol group of paracetamol forming a degradation product of drug. In addition, radical scavenging activity was studied by DPPH method. Radical scavenging activity of paracetamol against stable DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical, was determined spectrophotometrically. EC₅₀ values of 5.21 µg/ml of paracetamol and 8.59 nmol/µg of DPPH were found. These values indicate high antioxidant capacity of paracetamol at the concentration level reached in blood after oral administration of drug.

Acknowledgements. This research was supported by the Serbian Ministry of Science and Environmental Protection as a part of project number 142015 for the period 2006-2010.

Literatura

1. Fridovich, *Annu. Rev. Biochem.*, **64** (1995) 97.
2. Delgado J. N. and Remers W. A., *Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, 10th ed., Lippincott Williams &Wilkins, **1998**.
3. S.M.Sunaric, S.S.Mitic, G.Z.Miletic, A.N.Pavlovic, D.Naskovic-Djokic, *J. Anal. Chem.* **64** (3) (2009) 231.
4. K. Yamamoto, Sh. Kawanishi, *J. Biol. Chem.*, **264** (26) (1989) 15435.

Biotehnologija / Biotechnology

Yeast surface display expression and purification of chimera glucose oxidase construct with Aga2 protein

Marija Blazic, Gordana Kovacevic, Nevena Zelenovic, Raluca Ostafe*,
Marija Gavrovic-Jankulovic, Rainer Fischer*, Radivoje Prodanovic

Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg 12, 11000 Belgrade, Serbia

**Faculty of Biology, RWTH Aachen University, Worringerweg 1, 52078 Aachen, Germany*

Introduction

Glucose oxidase (GOx; β -D-glucose:oxygen 1-oxidoreductase, EC 1.1.3.4) from *Aspergillus niger* is a homodimeric flavoprotein with molecular mass of 160 kDa and 10-25 % (w/w) glycosylated.¹ GOx has been used in industry for determining glucose concentration, gluconic acid production and as a source of hydrogen peroxide for food preservative.² It is one of the most used enzymes for manufacture of electrochemical glucose sensors^{3,4} and miniature biofuel cells. The efficiency of these devices is highly dependent on the enzyme activity and electron transfer rate between electrode surface and the enzyme active site where FAD/FADH₂ is situated. Despite good activity/specificity toward glucose and good stability, GOx from *A.niger* has several limitations for use in miniature biofuel cells.⁵ Due to its K_m value for glucose that is around 30 mM and pH optimum around 5 activity of GOx at physiological blood conditions (4 mM glucose, pH 7.4) is not so high. Also, in order to have fast electron transfer between the electrode surface and the deeply buried GOx active site it is necessary to use redox mediators that have to compete with oxygen as the natural substrate for oxidative half reaction. In order to overcome these problems GOx was heterologously expressed in yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris* and directed evolution was performed to decrease K_m value for glucose⁶ and activity with redox mediators at pH 7.4.⁷

Directed evolution is a powerful method for improving properties of enzymes by using iterative rounds of diversity generation and screening.^{8,9,10} Today methods for diversity generation allow us to create libraries with up to 10¹² different mutants. High throughput screening methods based on enzymatic assays in microtiter plates can screen libraries with sizes of up to 100000.¹¹ That is why the most limiting step of directed evolution is the screening process and in order to significantly speed up directed evolution and increase the likelihood of finding improved enzyme variant it is necessary to have an ultrahigh throughput screening method. Recently we have developed an ultrahigh throughput screening technology for GOx gene libraries based on flow cytometry and *in vitro* compartmentalization in emulsion.⁶ This technology that was previously developed for enzymes expressed in *E.coli* and using *in vitro* translation mix enables screening of gene libraries with sizes of up to 10⁹.^{12,13,14} The major idea of this screening technology is to keep physical connection between the gene that encodes the enzyme and the product of enzymatic reaction during screening. Physical connection between the product of enzymatic reaction and the enzyme is kept by compartmentalization of cells inside water microdroplets of single and double emulsions, but in order to keep this connection between the gene and the encoded enzyme it is necessary to use intracellular expression or cell surface display.¹⁵

Recently yeast surface display in *Saccharomyces cerevisiae* was developed for directed evolution of antibodies. In this system the variable region of antibody is fused to the adhesion subunit of the yeast agglutinin protein Aga2p, that is attached to the yeast cell wall through disulfide bonds with Aga1p.¹⁶ Aga1p is a membrane bound protein with GPI-anchor. Expression of Aga2-antibody construct is under the control of a galactose-inducible promotor on pCTCON plasmid vector, whereas Aga1p is expressed from a chromosomally integrated galactose-inducible expression cassette. The same surface display system was employed for expression and directed evolution of HRP¹⁷ and recently glucose oxidase was also successfully expressed in this system for applications in biofuel cells. Drawback of this system is that enzyme is not in its native form and can change activity and kinetic properties. Since in directed evolution experiments you get what you screen for,¹⁸ it is important that activity and stability of these protein chimeras are correlated with the activity of native enzymes.

In order to check if Aga2 based yeast surface display can be used for development of ultrahigh throughput screening system for directed evolution of glucose oxidase from *Aspergillus niger*, we have

cloned wild type and B11 mutant of glucose oxidase at the C terminus of Aga2 protein. These chimeras of GOx are for the first time purified and their kinetic properties determined and compared with the native glucose oxidase forms expressed in the same yeast *S.cerevisiae*.

Results and discussion

The *gox* gene after PCR migrated as a DNA fragment with an apparent size of 1.8 kbp on the electrophoretic gel. After cloning into pCTCON2 vector, size of the plasmid construct had an apparent size of 8 kbp, **Figure 1**.

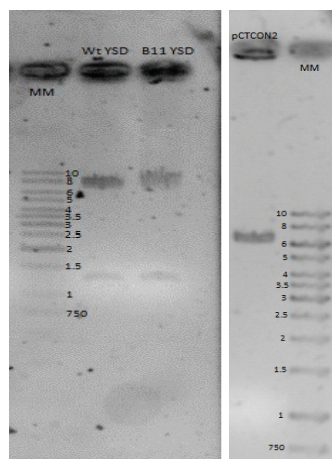


Figure 1 DNA electrophoresis of empty plasmid (pCTCON2) and constructs with *gox* genes for wild type (Wt YSD) and B11 mutant (B11 YSD).

Transformed cells of *S.cerevisiae* EBY100 carrying an active GOx were detected on selective YNB-CAA galactose plates using previously developed ABTS agar plate assay.⁷ Positive clones were picked up and grown in liquid YNB-CAA glucose medium for two days till saturation and afterwards diluted with liquid YNB-CAA galactose medium to O.D. of 0.8 at 600 nm. Expression of GOx was followed in the cell suspension and fermentation media and optimized with respect to time both for wild type and B11 mutant.

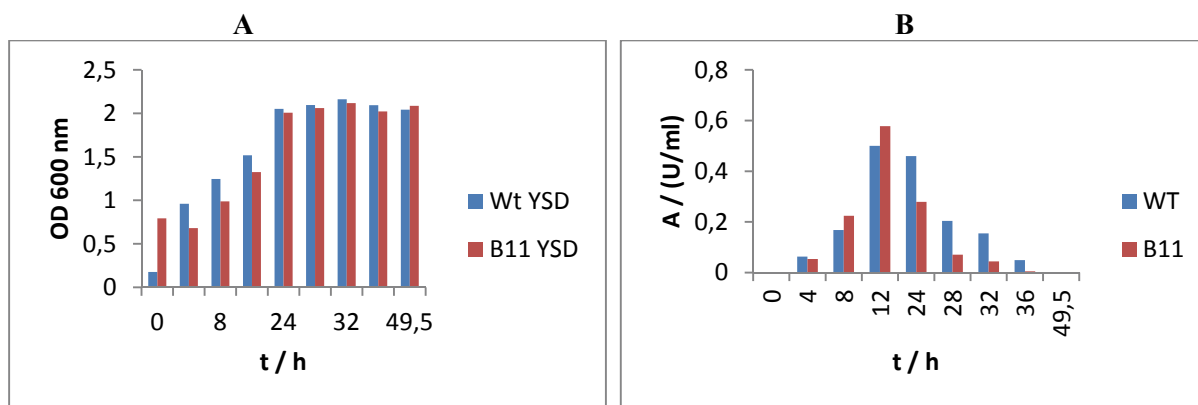


Figure 2 Optimization of GOx production from *S. cerevisiae* EBY 100 fermentation. A) Optical density during fermentation (liquid YNB CAA glucose medium for two days till saturation, diluted with liquid YNB CAA galactose medium to O.D._{600nm} of 0.8) B) Activity of GOx during fermentation.

After expression yeast cells were harvested by centrifugation and GOx constructs were extracted from the cell wall by 1 mM mercapthoethanol for 4 h. Extracts of GOx were dialyzed in 10 mM sodium phosphate buffer pH 6.0 and chromatography was done on DEAE Sepharose in the same buffer. Enzyme was eluted from the column using gradient of sodium phosphate buffer from 10 mM till 500 mM, **Figure 3**.

Fractions containing GOx activity were collected and concentrated using Vivaspin ultrafiltration columns with molecular cutoff of 30 kDa. Purity of the constructs was checked by native electrophoresis and zymogramme where protein bands stained with silver were corresponding to the activity bands in the zymogramme with guaiacol and HRP, **Figure 44**.

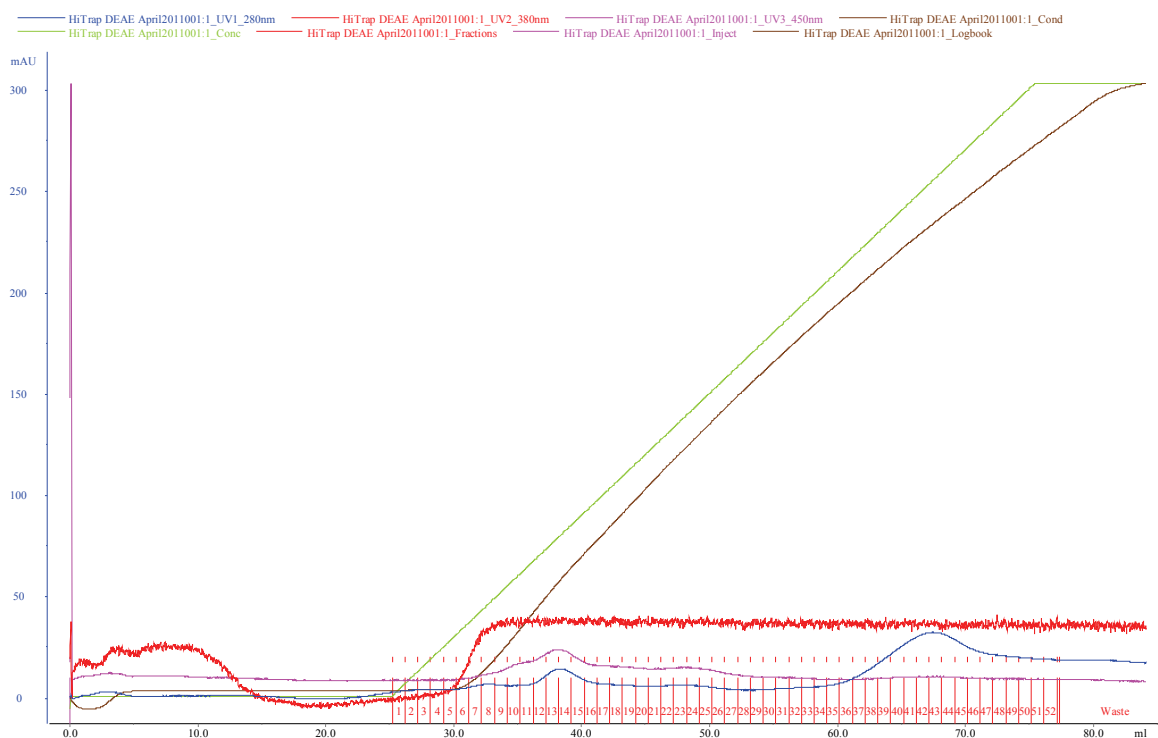


Figure 3. Chromatogram of glucose oxidase constructs on 5 mL Sepharose FF columns in sodium phosphate buffer gradient (10-500 mM) at pH 6.0.

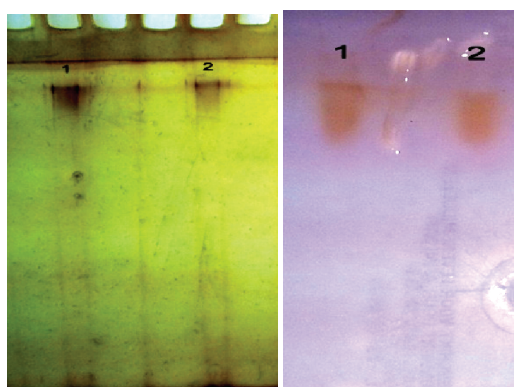


Figure 4. Native electrophoresis with purified constructs on 10% acrylamide gel. 1) Wild type GOx construct, 2) B11 mutant GOx construct.

A) Protein bands in gel after silver staining.
B) Activity bands in the gel after incubation in substrate solution containing 100 mM glucose, 1 U/mL of HRP and 9 mM guaiacol.

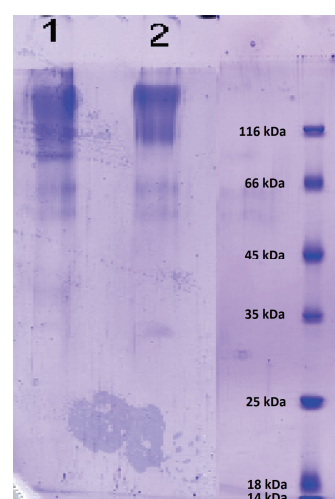


Figure 5. SDS electrophoresis the purified GOx 1) wt-GOx-pCTCON2, 2) B11-GOx-pCTCON2 construct in 10 % acrylamide gel. Proteins were stained using Coomassie brilliant blue.

Table 1 Kinetic constant of Aga2-wt-GOx and Aga2-B11-GOx.
Data for wt- GOx i B11-GOx are taken from literature.⁶

	Aga2-wt-GOx	Aga2-B11-GOx	wt-GOx	B11-GOx
k_{cat} (s^{-1}) _{A280nm}	8.65	17.85	54.8	80.0
K_m (mM)	33.4	27.86	22.0	16.0
k_{cat}/K_m (s^{-1}/mM^{-1}) _{A280nm}	0.259	0.641	2.49	5.00

Molecular weight of the construct was determined on the SDS gel electrophoresis to be between 95-150 kDa. Kinetic constants were determined by measuring activity of purified constructs in different concentrations of glucose (5-100 mM glucose) in 0.1M sodium acetate buffer pH 5.5. Michaelis-Menten

hyperbola was fitted directly using Origin 8.0 software. Kinetic constants were calculated from hyperbola and results are shown in table 1.

This property can represent advantage in case of GOx immobilization for gluconic acid production or biosensor needs on carriers like gold.¹⁹

Conclusions

Experiments showed that combination of GOx construct with Aga2 protein can lead to expression of active enzyme form covalently bond on the yeast surface. Obtained GOx constructs have lower catalytic constant and higher K_m value than native GOx due to diffusion limitations. Mutant construct with Aga2 protein can be used for directed evolution of GOx and development of *high throughput screening* methods due to proportionality of activity with native GOx. Purified construct Aga2-GOx could be also used for GOx immobilization, biosensors and biofuel cells because of sulfhydryl residues via it could be directly immobilized on gold made electrodes.¹⁹ Yeast cells with GOx on the cell wall could be also used as a biocatalyst in food industries and nanobiotechnology for biofuel cell production.²⁰

Acknowledgment: This work was supported by Grant No. ON172049 sponsored by the Ministry of Education and Science, Republic of Serbia.

Prečišćavanje himere Aga2 proteina i glukoza oksidaze eksprimirane na površini ćelija kvasca

Wt i mutant B11 glukoza oksidaze (GOx) su klonirani na C terminus Aga2 proteina da bi se eksprimirali na površini ćelija kvasca S.cerevisiae EBY100. Ekspresija konstrukta je optimizovana i prečišćeni su jonoizmenjivačkom hromatografijom i ultrafiltracijom. Prečišćeni Aga2-GOx konstrukti su pokazali jednu široku traku u opsegu masa od 95 do 150 kDa. Na nativnoj elektroforezi su pokazali višestruke trake na visokim molekulskim masama što odgovara trakama na zimogramu. Vrednosti k_{cat} za wt i B11 kostrukte sa Aga2 su 8, 65 s^{-1} i 17, 85 s^{-1} i K_m vrednosti za glukoza su 33, 4 mM i 27, 86 mM. Optimum pH je između 4 i 5. Kinetičke osobine za wt i B11 konstrukt GOx odražavaju kinetičke osobine nativnih oblika ova dva proteina što čini ovaj ekspresioni sistem pogodnim za eksperimente dirigovane evolucije GOx koristeći protočnu citometriju. GOx imobilizovana na površini ćelija kvasca se takođe može koristiti u izučavanju imobilizacije za proizvodnju glukonske kiseline.

Reference

1. B.E.P. Swoboda, V. Massey, *Journal of Biological Chemistry* **240** (1965) 2209.
2. T. Godfrey, J. Reichelt, *Industrial enzymology: the application of enzymes in industry*, Macmillan, UK, 1983.
3. A. Cavalcanti, B. Shirinzadeh, L. C. Kretly, *Nanomedicine* **4** (2008) 127.
4. S.V. Dzyadevych, A.P. Soldatkin, A.V. El'skaya, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault. *Irbm* **29** (2008) 171.
5. Q. Liu, X. H. Xu, G. L. Ren, W. Wang, *Progress in Chemistry* **18** (2006) 1530.
6. R. Prodanovic, R. Ostafe, A. Scacioc, U. Schwaneberg, *Comb Chem High Throughput Screen* **14** (2011) 55.
7. Z. Zhu, M. Wang, A. Gautam, J. Nazor, C. Momeu, R. Prodanovic, U. Schwaneberg, *Biotechnology Journal* **2** (2007) 241.
8. C. O'Fagain, *Methods Mol Biol* **681** (2011) 103.
9. T. Matsuura, T. Yomo, *Journal of Bioscience and Bioengineering* **101** (2006) 449.
10. N. J. Turner, *Trends in Biotechnology* **21** (2003) 474.
11. V. Taly, B. T. Kelly, A. D. Griffiths, *Chembiochem* **8** (2007) 263.
12. A. Aharoni, G. Amitai, K. Bernath, S. Magdassi, D. S. Tawfik, *Chemistry & Biology* **12** (2005) 1281.
13. K. Bernath, M. Hai, E. Mastrobattista, A.D. Griffiths, D.S. Tawfik, *Anal Biochem* **325** (2004) 151.
14. E. Mastrobattista, V. Taly, E. Chanudet, P. Treacy, B. T. Kelly, A. D. Griffiths, *Chemistry & Biology* **12** (2005) 1291.
15. E. T. Boder, K. D. Wittrup, Applications of Chimeric Genes and Hybrid Proteins, Pt C **328** (2000) 430.
16. G. Chao, W.L. Lau, B.J. Hackel, S.L. Sazinsky, S.M. Lippow, K.D. Wittrup, *Nature Protocols* **1** (2006) 755.
17. E. Antipov, A. E. Cho, K. D. Wittrup, A. M. Klivanov, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105** (2008) 17694.
18. P. A. Romero, F. H. Arnold, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10** (2009) 866.
19. Y. Zhang, W. Jia, M. Cui, C. Dong, S. Shuang, Y. Kwan, M. M. Choi, *Biotechnol J* **6** (2011) 492.
20. S. Fishilevich, L. Amir, Y. Fridman, A. Aharoni, L. Alfonta, *J Am Chem Soc* **131** (2009) 12052.

decreased productivity and cell lysis.¹⁵ Recombinant protein expression in *P.pastoris* can be constitutive or methanol-induced, intracellular or extracellular. Which one will be depends on what expression vector is used (Figure 2). Methanol-induced expression is under influence of AOX1 promoter, which is normally present in *Pichia* genome and controls expression of alcohol-oxidase (enzyme involved in methanol metabolic pathway), and is tightly regulated. When methanol is absent promoter is repressed and there is no synthesis of recombinant protein¹⁴. In constitutive expression biomass and protein synthesis occur at the same time. This is due to GAP promoter which is involved in glucose metabolism, basic pathway in all living cells. Both induced and constitutive expression can produce protein intracellularly and extracellularly, and that is associated with presence of α -factor in expression vector.^{14,15}

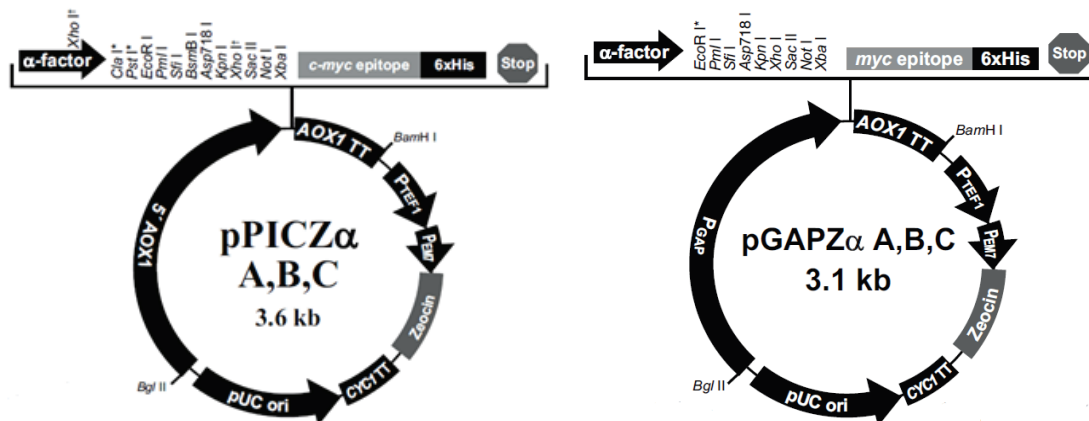


Figure 2. *Pichia pastoris* extracellular expression vectors

In order to overcome problem of low specific activity associated with GOx expression in *S.cerevisiae*,⁷ and to test what system is suitable for GOx large-scale production in *Pichia pastoris*, we have cloned wt and M12 mutant GOx in pGAPZαA and pPICZαA vectors.

Results and discussion

Genes for wt and M12 GOx from *A.niger*, we have multiplied with PCR reaction from plasmids in which they were previously cloned. Specially designed primers used in PCR reaction have *XhoI* and *XbaI* restriction sites that allow cloning in pGAPZαA and pPICZαA vectors. PCR products were analyzed with DNA electrophoresis, and showed size of 1.8 kb that matches the size of GOx gene (Figure 3).

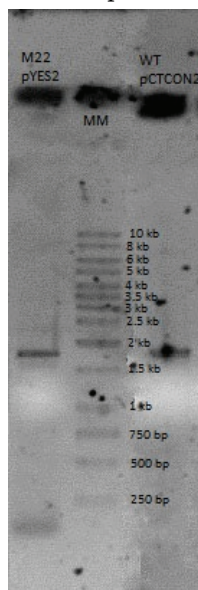


Figure 3. PCR products of wt and M12 GOx

Purified PCR products and vectors were subjected to double digestion with *XhoI* and *XbaI* restriction enzymes. After double digestion, each PCR product was ligated with both pGAPZαA and pPICZαA vectors overnight, and subsequently *E.coli* DH5α competent cells were transformed with ligation mixtures. From several grown colonies of *E.coli* plasmids were isolated, restricted with *EcoRI* restriction enzyme and analyzed with electrophoresis to find plasmids with correct size (~5 kb for GOx-pGAPZαA and ~5.5 kb for GOx-pPICZαA). After restriction, plasmids that showed correct size were tested with PCR reaction with same primers used initially. One plasmid of each construct (wtGOx-pGAPZαA, M12GOx-pGAPZαA, wtGOx-pPICZαA and M12GOx-pPICZαA) was used for *P.pastoris* transformation. We have selected *P.pastoris* colonies with highest activity and optimized fermentation for constitutive and methanol-induced expression.

Constitutive expression was done in YPD (yeast-peptone-dextrose) media. During fermentation of M12 GOx total activity, OD₆₀₀ and pH were measured (Table 1). Beside total activity, activity of GOx was measured in fermentation liquid, and it shows that only a half of enzyme is secreted outside the cells after 48h fermentation. Decrease of pH could be explained with production of gluconic acid in glucose-oxidase reaction.

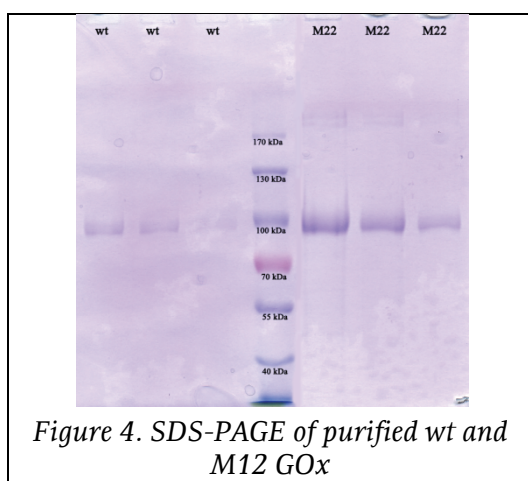
Table 1. Fermentation of M12GOx-pGAPZαA in YPD media

	OD ₆₀₀	Total activity, IU/mL	Activity in fermentation liquid, IU/mL	pH
0 h	0.430	0.33	/	6.22
4 h	/	0.33	/	5.95
8 h	0.980	0.13	/	5.16
12 h	4.350	/	/	4.46
24 h	12.710	3.07	1.23	4.10
30 h	12.700	3.53	/	4.28
36 h	13.850	4.16	/	/
48 h	15.160	4.10	2.06	4.46
72 h	15.050	5.27	/	4.58
96 h	17.750	5.52	/	4.68

Methanol-induced fermentation had two steps. First step was to grow cells on BMGY media (buffered complex media with glycerol) for two days. After cells reached OD₆₀₀ ~2, they were centrifuged and re-suspended in 10 times lower volume of BMMY (buffered complex media with methanol). Fermentation was done with three different concentrations of methanol: 0.5%, 1% and 2%. During fermentation of wtGOx-pPICZαA total activity, activity in fermentation liquid and OD₆₀₀ were measured (Table 2).

Table 2. Fermentation of wtGOx-pPICZαA in BMMY media

0.5% methanol				1% methanol			2% methanol		
Time (days)	OD ₆₀₀	Activity in fermentation liquid (IU/mL)	Total activity (IU/ml)	OD ₆₀₀	Activity in fermentation liquid (IU/mL)	Total activity (IU/ml)	OD ₆₀₀	Activity in fermentation liquid (IU/mL)	Total activity (IU/ml)
1	/	/	/	/	/	/	/	/	/
2	4.55	0.10	0.13	4.73	0.14	0.44	4.91	0.05	0.14
3	13.11	0.91	1.63	13.16	2.02	3.78	11.61	0.79	1.86
4	11.51	2.50	3.55	10.71	5.33	8.34	11.53	2.58	6,54
5	13.74	7.53	7.80	12.23	7.36	10.16	12.32	4.29	5.79
6	14.27	9.92	10.73	13.63	8.80	9.70	14.44	2.42	5.35
7	16.08	9.84	18.80	14.44	8.78	10.84	/	/	/
8	14.05	15.38	16.74	/	/	/	/	/	/
9	15.83	17.47	17.26	/	/	/	/	/	/
10	9.99	12.04	13.51	/	/	/	/	/	/



Fermentation in 2% methanol reached GOx maximum on 5th day, in 1% methanol on 6th day and in 0.5% methanol on 9th day. Since methanol is toxic for *Pichia* cells it was expected that 2% methanol fermentation will give low GOx activity.

Wt and M12 GOx obtained from methanol-induced fermentation was purified with ultrafiltration and ion exchange chromatography, which is showed as a single band on SDS-PAGE with an apparent molecular weight of 90 kDa (Figure 4).

Purified GOx was used for determination of kinetic parameters like K_m and k_{cat} and were compared with the same parameters obtained for GOx expressed in *S.cerevisiae*⁷ and commercial GOx.

Table 3. Kinetic parameters of GOx obtained in different expression systems

	WT <i>P.pastoris</i>	M12 <i>P.pastoris</i>	WT cGOx <i>A.niger</i>	WT <i>S.cerevisiae</i>	M12 <i>S.cerevisiae</i>
K_m / mM	28,5	16,2	24,0	22,0	18,1
k_{cat} / s^{-1}	192	442	325	54,8	150
$(k_{cat}/K_m) / (\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1})$	6,74	27,3	13,6	2,49	8,29

Conclusions

GOx expression yield proved to be higher with pPICZ α A vector than expression with pGAPZ α A vector. This could be due to glucose consumption by GOx during fermentation, production of gluconic acid that cells cannot use as a carbon source and because of that can't grow. Since GOx was cloned in these vectors with one secretion propeptide sequence as opposed to the previously used two propeptide sequences for cloning in *S.cerevisiae*, kinetic parameters as well as specificity constant of GOx from *P.pastoris* were much higher than we previously reported for expression in *S.cerevisiae*⁷. Finally, it was shown that M12 glucose-oxidase mutant has lower K_m value and higher k_{cat} than wt GOx.

Acknowledgment: This work was supported by Grant No. ON172049 sponsored by the Ministry of Education and Science, Republic of Serbia.

Kloniranje, heterologna ekspresija i karakterizacija mutanata glukoza oksidaze iz *Aspegillus niger* u kvascu *Pichia pastoris*

Wt i mutant M12 glukoza-oksidade su klonirani sa jednom sekrecionom sekvencom u vektore pGAPZ α A i pPICZ α A, u cilju ekstracelularne ekspresije u kvascu *Pichia pastoris*. Konstitutivna i metanol-indukovana ekspresija su optimizovane, i indukciona se pokazala kao bolji sistem za ekspresiju sa prinosom glukoza-oksidade od 17 IU/mL za wt. Ekspimirana glukoza-oksida je prečišćena ultrafiltracijom i jonoizmenjivačkom hromatografijom, što je dokazano jednom trakom na SDS elektroforezi koja odgovara molekularnoj masi od 90kDa. Vrednosti K_m i k_{cat} za wt odnosno M12 glukoza-oksidazu dobijene metanol-indukovanom ekspresijom iznose 28,5 mM i 192 s⁻¹, odnosno 16,2 mM i 442 s⁻¹, što je značajno bolje od vrednosti dobijenih u sistemu *S. cerevisiae*. Ovi parametri zajedno sa velikim prinosom glukoza-oksidade, čine metanol-indukovanu ekspresiju u sistemu *P. pastoris* odličnom metodom za large-scale produkciju glukoza-oksidade.

References

1. Q.H. Gibson, B.E. Swoboda, V. Massey, *J Biol Chem.* **239** (1964) 3927.
2. Z. Zhu, M. Wang, A. Gautam, J. Nazor, C. Momeu, R. Prodanovic, U. Schwaneberg, *Biotechnol J.* **2** (2007) 241.
3. B.E.P. Swoboda, V. Massey, *Journal of Biological Chemistry* **240** (1965) 2209.
4. O. Courjean, N. Mano, *J Biotechnol.* **151** (2011) 122.
5. V. Leskovic, S. Trivic, G. Wohlfahrt, J. Kandrac, D. Pericin, *Int J Biochem Cell Biol.* **37**(2005) 731.
6. E.H. Park, Y.M. Shin, Y.Y. Lim, T.H. Kwon, D.H. Kim, M.S. Yang, *J Biotechnol.* **81** (2000) 35.
7. Z. Zhu, C. Momeu, M. Zakhartsev, U. Schwaneberg, *Biosens Bioelectron.* **21** (2006) 2046.
8. Q. Liu, X.H. Xu, G.L. Ren, W. Wang, *Progress in Chemistry* **18** (2006) 1530.
9. R. Prodanovic, R. Ostafe, A. Scacioc, U. Schwaneberg, *Comb Chem High Throughput Screen.* **14** (2011) 55.
10. L. Yuan, I. Kurek, J. English, R. Keenan, *Microbiol Mol Biol Rev.* **69** (2005) 373
11. E.G. Hibbert, F. Baganz, H.C. Hailes, J.M. Ward, G.J. Lye, J.M. Woodley, P.A. Dalby, *Biomol Eng.* **22** (2005) 11.
12. K.L. Tee, U. Schwaneberg, *Angew Chem Int Ed Engl.* **45** (2006) 5380.
13. P. Li, A. Anumanthan, X.G. Gao, K. Ilangovan, V.V. Suzara, N. Duzgunes, V. Renugopalakrishnan, *Appl Biochem Biotechnol.* **142**(2007) 105.
14. G. Potvin, A. Ahmad, and Z. Zhang, *Biochemical Engineering Journal*, **64** (2012) 91.
15. H. Hohenblum, N. Borth, and D. Mattanovich, *J Biotechnol.* **102** (2003) 281.

Zeolite/apatite system - nature mineral fertilizers

Marija L. Mihajlović, Mirjana Stojanović, Zorica Lopičić, Mirko Grubišić, Marija Petrović,
Jelena Milojković, Dragan Radulović

Institute for technology of nuclear and other mineral raw materials, Franchet d'Esperey 86, Belgrade

Abstract Our study is established on design of novel functional material based on the synergistic conjunction of zeolites and raw phosphate, contributing to greater phospho-mobilization in various soil conditions and in a wide pH range. The results presented here indicates that an addition of zeolites to the rock phosphate facilitate the release of phosphorus in the first 24h for about 60%. Furthermore, modified NH_4^+ -zeolite notably promotes the release of phosphorus for an additional 150%. The efficiency of such zeolite enriched fertilizer was investigated through the vegetation experiments in semi-controlled conditions. At the treatment with the addition zeolite to the rock phosphate, content of phosphorus was increased from 0.181% to 0.198%. The highest phosphorus content of 0.263%, was detected in the sample of maize treated with the NH_4^+ -zeolite supplemented fertilizer. Correlation coefficients for Ca^{+2} and P indicate a direct relationship between their content in the growing medium, with the level of adoption by the plant. In relation to a natural phosphate fertilization, treatment with the rock phosphate in which was added natural zeolite and NH_4^+ -zeolite promotes the yield increases of maize for 85% and 95%, respectively.

Introduction

Previous studies have shown that phosphorus from rock phosphate (RP) has a significant impact on increasing crop yields (maize, potatoes, barley, beans) and the content of physiologically active form of phosphorus, as well as plant nutrient.¹ Besides, natural phosphate fertilizers contribute to the improvement of certain soil properties, such as reducing of acidity, increasing the availability of calcium, repairing and improvement of water - aerial physical soil properties.^{1,2} The dissolution of the RP in acid soils depends on the availability of H^+ , humidity, Ca^{+2} and P removal from the solution. Cation exchange capacity of acidic soils are low, the concentration of Ca^{+2} in the soil solution around the particles increases rapidly, delaying RP dissolution.³ Porous minerals, like zeolites (Z), with high cation-exchange capacity, can help control the release of plant nutrients in agricultural systems.⁴ Zeolites also can free soluble nutrients that are already in soil, thus improving the land fertility and water retention. It has been found that when saturated with monovalent nutrient cations, such as NH_4^+ and K^+ , zeolites increase the solubility of RP.⁵ The mechanism proposed for solubilisation of RP is exchange-induced dissolution in which plant uptake of NH_4^+ or K^+ liberates exchange sites which are occupied by Ca^{+2} , lowering the soil solution Ca^{+2} concentration and inducing further dissolution of RP.⁶

This paper presents the results of experiment that investigated the chemical properties of RP/Z and RP/ NH_4^+ -Z mixture, that imitates nutrient release processes that occur naturally in soils. The efficiency of such zeolite enriched fertilizer was further investigated through the vegetation experiments with maize in semi-controlled conditions. Also, correlations of P and Ca^{+2} accumulated in maize shoots, with the concentrations of the same elements in the experimental solutions of used fertilizer systems were presented.

Material and methods

The concentrate of RP, used in these experiments was made by flotation method of apatite, from ore deposit „Lisina“ Bosilegrad, containing 32-35% P_2O_5 . RP was grounded to about 80 μm size particles. The used zeolites was of Romanian origin from deposit Baia Mare. With a wet milling and wet classification process was excluded fraction of < 37 μm , which were used in the experiments. Modification of zeolite with NH_4^+ was performed by treating the natural zeolite with 1M NH_4Cl . The suspension was mixed 2h and left in contact for a 24 h at room temperature. The procedure was repeated three times by adding freshly prepared NH_4Cl . After modifying, the sample was rinsed using distilled water until negative reaction to chlorides and dried.

The sets of three experimental suspensions tested the effect of zeolites on RP dissolution. The first suspension was made of solely RP in the water solution (RP). A second, of RP in the presence of zeolite (RP+Z) and the third of RP in the presence of modified NH_4 -zeolite (RP+ NH_4^+ -Z). The total silicate analysis of the used zeolite is presented in Table 1. Loss of ignition at 1000 °C was 9.81%

Table 1. Composition of used zeolite

Oxide	SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	CaO	MgO	TiO ₂	Na ₂ O	K ₂ O
mass %	63.60	11.81	1.74	7.35	0.688	0.40	4.40	0.169

Vegetation experiment in semi-controlled conditions was set up with a hybrid ZP 434 on soil type distric cambisol. The characteristics of this type of soil are given in Table 2. The total N content in the soil was 0.08%, while the available forms of K₂O (14.9 mg/100 g of soil) and P₂O₅ (12.5 mg/100 g of soil) were at the average level of supply.

Table. 2 Chemical properties of experimental soil

Horizon	Depth, cm	pH		EC / μ S	Humus contents, %	CEC / (meq/100g)
		H ₂ O	KCl			
Ah	0-30	5.55	4.50	71.12	2.12	16.2

Three different growing media placed in the 3 different pots: (RP)/soil, (RP+Z)/soil and (RP+NH₄⁺-Z)/soil, were tested. In each experimental variants were entered 20g of fertilizer per 100 kg of soil. Based on the literature data it was decided that the fertilizer contains initial ratio the zeolite and the RP of 5:1.^{3,6} In each of 1dm³ pot, after the germination, was grown per 3 plants. Plants were collected when they were one month old, with three to five leaves and dried. Maize yield was determined via total increase of dry matter content (m) and its heights (h). A quantitative chemical analysis of samples has been carried out at the atomic adsorption spectrophotometer Perkin Elmer AAS "703", following acid decomposition of dried plants. The amounts of P after sample preparation were measured by analysis of the supernatant by colorimetry. Concentrations of Ca⁺² in all three solutions were determined using AAS.

Results and discussion

The measured concentrations of Ca⁺² and P in all three experimental solutions after 24 h are presented in Table 1. The values for Ca⁺² in the systems of RP, RP+Z and RP+NH₄⁺-Z after 24 h were, 6 mg l⁻¹, 24 mg l⁻¹ and 2.4 mg l⁻¹ respectively. In accordance with the expected the value of Ca⁺² was highest in the system of RP+Z and the lowest in RP+NH₄⁺-Z system. The highest concentration of P of 3.62 mg l⁻¹ was noted in RP+NH₄-Z solution. The results indicates that an addition of zeolites to the RP facilitate the release of P in the first 24h for about 60%. Addition of NH₄-Z, further facilitated release of P for about 150% in comparison with RP system.

The results of the experiment setup with maize, indicate that the addition of natural zeolite to RP increases the content of P in the plant shoot (Table 3). At the treatment with the addition zeolite to the RP, content of P was increased from 0.181% to 0.198%. As what was expected, the highest P content of 0.263%, was detected in the sample of maize treated with the (RP + NH₄⁺-Z) fertilizer. The highest Ca⁺² content of 1.66 % was found in sample with (RP + Z) treatment. The expected decrease in content of Ca⁺² was observed in the sample treated with fertilizer which has the least of this element (0.73%).

Table 3. The results of Ca and P concentrations in the test solutions and in the shoots of maize

System	c _{Ca} / mg dm ^{-3a}	c _P / mg dm ^{-3a}	c _{Ca} / % ^b	c _P / % ^b
RP	6.0	1.54	0.77	0.181
RP+Z	24	2.50	1.66	0.198
RP+ NH ₄ ⁺ - Z	2.4	3.62	0.73	0.263

^aThe concentration of element measured in a solution after 24 h

^bThe percentage of element determined in maize shoots

To examine the effects of zeolite addition to RP on the level of nutrient adoption, we compared the content of Ca⁺² and P in the solutions, with those found in maize, Figure 1. Pearson's correlations coefficients obtained for Ca⁺² and P were $r = 0.99$ and $r = 0.96$, respectively. A high values of

correlation coefficients indicate that the addition of zeolites to the RP facilitate the release of phosphorus, and therefore its better adoption from the fertilized soil by maize.

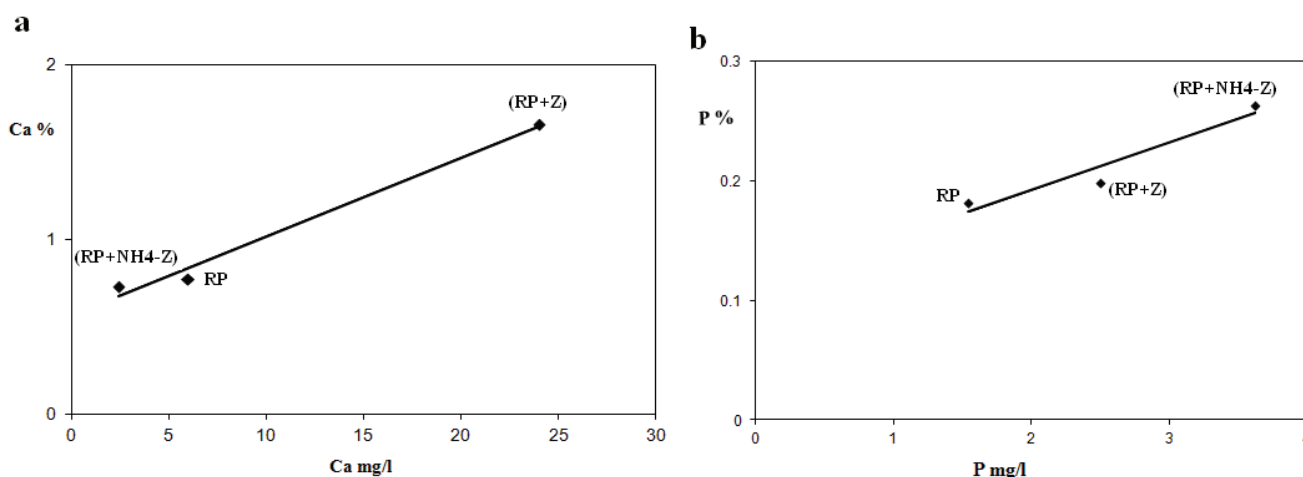


Figure 1. The relationship between the Ca^{+2} and P released from the different fertilizer systems in the solution and the same elements adopted by maize. Pearson's correlations coefficient for Ca^{+2} and P were $r = 0.99$ (1a) and $r = 0.96$ (1b), respectively.

The results of the experiment setup with maize, as test culture, indicate that the addition of natural zeolite to RP favors the growth of the culture and its yield.

Treatment of maize with the RP in which was added natural zeolite (RP + Z), promotes the growth of maize for 43%, in relation to maize which was fertilized only with RP. Likewise, treatment of maize with the RP in which was added modified NH_4^+ - zeolit (RP+ NH_4^+ - Z), favors the growth of maize for 53%. The yield in the mass of maize was increased for an additional 85%, in the treatment with (RP+Z) fertilizer and for 95% in the treatment with (RP+ NH_4^+ -Z), in comparison with the RP treatment.

Conclusion

Results presented here indicate that the presence of zeolites increase the solubility of RP. The addition of zeolites to the RP in the solution facilitated the release of phosphorus in the first 24 h for about 60%. Furthermore, addition of NH_4^+ -Z to the RP facilitated release of P for about 150%, for the same period of time. In accordance with the expected, lowest concentration of Ca^{+2} was found in the solution of RP+ NH_4^+ -Z system. The obtained values of P content in all three shoot samples of maize were higher in plants treated with zeolite enriched fertilizer. Furthermore, presence of NH_4^+ -Z in RP additionally facilitates release of P in soil which affects its increase in maize shoots. Decrease in content Ca^{+2} of in the sample treated with fertilizer with at least of this element, was also expected. The contents of Ca^{+2} and P expressed through Pearson's coefficients in the solution and in maize, indicate a direct connection between their content in the soil and the level of adoption by the plant. Obtained results speak in favor of use NH_4^+ modified zeolites as an additive to the rock phosphate with the aim to achieve its higher solubility and efficient implementation.

Acknowledgement: This study is a part of the project TR31003 supported by the Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia.

Zeolit / apatit sistem – prirodna mineralna đubriva

Upotreba prirodnih fosfata kao mineralnih đubriva je poznata u praksi kao ekonomski isplativija i ekološki podobnija nego primena industrijskih fosfornih đubriva ali sa ograničenom primenom, isključivo, na kiselim tipovima zemljišta. Cilj naših istraživanja je dizajniranje novog prirodnog mineralnog đubriva nastalog u sinergističkoj sprezi zeolita sa sirovim fosfatom koji treba da doprinese većoj mobilnosti fosfatnih jona, u svim zemljišnim uslovima i širokom opsegu pH. U tu svrhu ispitivan je uticaj prirodnog zeolita i zeolita modifikovanog amonijumovim jonom na rastvorljivost prirodnog fosfata- apatita. Rezultati, u vodenom sistemu, ukazuju da prisustvo prirodnog zeolita povećava fosfomobilizaciju apatita u širokom opsegu pH za

60%, a modifikovan zeolit za 150% u prvih 24 h. Efikasnost zeolit/apatit sistema verifikovana je preko vegetacionih ogleda u polu kontrolisanim uslovima sa biljkama kukuruza. Rezultati potvrđuju fitostimulativno dejstvo na prinos biljaka, i to 85% u sistemu sa prirodnim zeolitom i 95% sa modifikovanim zeolitom u odnosu na kontrolu (apatit). Povećanje sadržaja fosfora u biljkama kukuruza je u korelaciji sa povećanjem prinosa. Koeficijent korelacije Ca^{2+} i fosfora ukazuju na direktnu vezu između njihovog sadržaja u vodenim sistemima sa stepenom usvajanja od strane biljaka kukuruza.

References

1. Hinsinger P., Gilkes R.J., *Geoderma* 75 (1997) 231-249.
2. Stojanović M., Milojković J., Grubišić M., Ileš D. I međunarodni kongres „Inženjerstvo, materijali i menadžment u procesnoj industriji, Jahorina, Republika Srpska (2009) 523-526.
3. Lai T.M. and Eberl D.D., *Zeolites* 6 (1986) 129–132.
4. Vaughan, D., *Properties of natural zeolites*. In: Sand, L., Mumpton, F. (Eds.), *Natural Zeolites: Occurrence, Properties, Use*. Pergamon Press, New York, (1978) 353–372.
5. Allen, E. R., Hossner L. R., Ming D. W., *Soil Science Society of America Journal* 57 (1993) 1368–1374.
6. Pickering H. W., Menzies N. W., Hunter M. N., *Scientia Horticulturae*, 94 (2002) 333–343.

Determination of exopolysaccharides production by lactic acid bacteria of water kefir grains

Miona G. Miljković, Sladjana Z. Davidović, Slavica S. Šiler-Marinković,
Suzana I. Dimitrijević-Branković

Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Karnegijeva 4, Belgrade, Serbia

Introduction

Microbial exopolysaccharides (EPS) are finding an increasing number of applications in a considerable diversity of industrial roles. EPSs are long-chain polysaccharides containing branched, repeating units of sugars or sugar derivatives such as glucose, fructose, mannose and galactose.¹ They are secreted into surroundings during growth and are not attached permanently to the surface of the microbial cell. This distinguishes them from the structurally similar capsular polysaccharides, which do remain permanently attached to the surface of the cell.² The polysaccharides are believed to protect bacterial cells from desiccation, penetration of toxic metals, antibiotic, phagocytosis, phage attack and to produce biofilms.³

In recent decades, food and packaging industries have been joining their efforts to find new ways to protect food from environmental conditions like oxygen, light, moisture, microbes, and mechanical stresses. In the food industry, EPS produced by LAB and other bacteria are used as viscosifiers, stabilizers, emulsifiers, or gelling agents to modify the rheological properties and texture of products.

Water or sugar kefir is a mildly sour home made ethanol and CO₂ containing beverage. For its production a sucrose water solution is fermented by a consortium of microorganisms, which originate from so-called waterkefir grains or granula. The single grains have a cauliflower like shape of 5-20 mm in diameter, a transparent appearance and an elastic structure. The grains consist of a sugar polymer, hosting the microbial consortium mainly consisting of different yeasts and lactic acid bacteria (LAB).⁴

The aim of this work is to select and characterize lactic acid bacteria isolated from non-commercial water kefir and to investigate their potential for EPS production.

Materials and methods

Isolation and phenotypic characterization of non-commercial water kefir isolates

Non-commercial water kefir grains (from a household in Belgrade, Serbia) were used for isolation of lactic acid bacteria. The grains were mechanically homogenized and appropriate dilutions were inoculated into sterile Petri dishes with 3 different media: TSA (Tryptic Soy Agar), MRS and M17 agar. After 72 h incubation at 30°C, colonies similar to lactic acid bacteria were picked and strains were further routinely propagated in MRS broth at 30°C in microaerophilic condition.

The first tentative identification of LABs was performed according to morphological characteristics (cells shape, Gram staining) and physiological characteristics (catalase test, growth at different temperatures, growth in milk and litmus milk, growth in media with different concentration of NaCl and sugar fermentation pattern with API 50 CHL system).



Figure 1. Growth of Leuconostoc sp. T1 on surface of modified MRS broth (2% sucrose)

Exopolysaccharide production

First screening of EPS production was performed on modified MRS agar (with 2% sucrose instead of glucose) in microaerophilic conditions at 30°C for 24 and 48 hours. Purified cultures were streaked on surface of agar plates. The slimy colonies were detected for several strains. However, two strains noted as T1 and T5 were dominant EPS producers, so they were selected for EPS quantification.

Exopolisaccharide quantification

Modified MRS broth with 2%, 5% and 10% of sucrose instead glucose was inoculated with 2% of overnight culture inoculums. After 24 h and 48 h incubation at 30°C, samples were vortexed and 5 ml aliquot was taken and further analyzed. Samples for EPS quantification were treated in boiling water for 15 min. After that cells were removed by centrifugation at 4500 rpm for 10 min. The polysaccharide in the supernatant was precipitated by addition of two volume of cold ethanol and left at -20 °C overnight. After that, the mixture was centrifuged at 13500 rpm for 15 min at 4 °C. Pellets were dissolved in hot water and the precipitation procedure was repeated twice. The precipitate was finally dissolved in hot distilled water to the initial volume of samples and analyzed quantitatively.⁵

Phenol-sulfuric method was used for EPS quantification.⁶ In brief, 500 µl of 4% phenol and 2.5 ml of concentrated sulfuric acid were added to 50 µl of sample. After 10 minutes the mixture was shaken and allowed to stand 20 min at room temperature. The absorbance was read at 490 nm and concentration was determined according to standard curve made with glucose.

Results and discussion

In the present study, 5 bacteria were isolated from water kefir grains and they were signed as T1 to T5. Isolated bacteria were able to grow on MRS, M17 and TSA plates at 30°C. All strains tested were catalase-negative and Gram-positive with various shapes ranging from long rods to coccoid rods. Two isolates formed mucous colonies (Figure 1) on modified MRS agar (with sucrose instead of glucose). They were selected for exopolysaccharide (EPS) quantification.

Testing the growth at different temperatures showed that optimal temperature is 30°C for both strains. They can grow at 37°C but T1 cannot grow at 15°C. Isolate T5 was tolerant to NaCl at concentrations of 4% and 6.5%, but not at 9.6%, while T1 did not grow in the presence of NaCl at all. Growth in litmus milk and coagulation of skim milk were also tested. API test was used for determination of fermentation pattern of isolates. The results of physiological characteristics are shown in Table 1 and sugar fermentation patterns are presented in Table 2. According to these results isolate T1 belong to genus *Leuconostoc* and isolate T5 to genus *Lactobacillus*.

Table 1. Growth and some physiological characteristics of selected strains

Isolates	Catalase	Growth at different temperatures, °C			Growth in the present of different concentrations of NaCl, %			Fermentation		Coagulation of skim milk/ pH	Growth in litmus milk/pH
		15	30	37	4	6,5	9,6	Glu/gas	Gln/gas		
T1	-	-	+	+	-	-	-	+/+	-/-	C /4,80	R/5,04
T5	-	+/-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-/-	- /6.51	R/6,76

Glu – glucose, Gln – gluconate

Table 2. Fermentation pattern of *Leuconostoc* sp T1 and *Lactobacillus* sp. T5 strains determined by API 50 CHL system

Substrates	T1 (37°C)		T5 (37°C)	
	24h	48h	24h	48h
0	-	-	0	-
1 GLY Glycerol	-	-	1	-
2 ERY Erytrol	-	-	2	-
3 DARA D-Arabinose	-	-	3	-
4 LARA L-Arabinose	-	-	4	++
5 RIB Ribose	-	-	5	++
6 DXYL D-xylose	-	-	6	++
7 LXYL L- xylose	-	-	7	-
8 ADO D-adonitol	-	-	8	-
9 MDX MetilβD-Xylopyranoside	-	-	9	-
10 GAL Galactose	-	++	10	-
11 GLU Glucose	-/+	++	11	++
12 FRU Fructose	-/+	+	12	++

Substrates			T1 (37°C)		T5 (37°C)		
			24h	48h	24h	48h	
13	MNE	Manose	-/+	++	13	+	++
14	SBF	Sorbose	-	-	14	-	-
15	RHA	Rhamnose	-	-	15	-	-
16	DUL	Dulcitol	-	-	16	-	-
17	INO	Inozitol	-	-	17	-	-
18	MAN	Mannitol	-	-	18	-	-
19	SOR	Sorbitol	-	-	19	-	-
20	MDM	Metil α D-Manopyranoside	-	-	20	-	-
21	MDG	Metil α D-Glucopyranoside	-	-	21	++	++
22	NAG	N-Acetylglucosamine	-	-	22	+	+
23	AMY	Amygdaline	-	-	23	-	-
24	ARB	Arbutine	-	+	24	-	-
25	ESC	Esculin	--	--	25	--	--
26	SAL	Salicin	-/+	++	26	-	-
27	CEL	D-Celobiose	-	++	27	-	-
28	MAL	D-Maltose	-/+	++	28	++	++
29	LAC	D-Lactose	-/+	++	29	-	-
30	MEL	D-Melibiose	-/+	++	30	-	-/+
31	SAC	D-Sucrose	-/+	+	31	++	++
32	TRE	D-Trehalose	-	-	32	++	++
33	INU	Inuline	-	-/+	33	-	-
34	MLZ	D-Melezitose	-	-	34	+	++
35	RAF	D-Rafinose	-	-	35	-	-
36	AMD	AmidonStarch	-	+/-	36	-	-
37	GLYL	Glycogen	-	-	37	-/+	-/+
38	XLT	Xylitol	-	-	38	-	-
39	GEN	Gentibiose	-	-	39	-	-
40	TUR	D-Turanose	-	-	40	+	++
41	LYX	D-Lyxose	-	-	41	-	-
42	TAG	D-Tagatose	-	-	42	-	-
43	DFUC	D-Fucose	-	-	43	-	-
44	LFUC	L-Fucose	-	-	44	-	-
45	DARL	D-Arabitol	-	-	45	-	-
46	LARL	L-Arabitol	-	-	46	-	-
47	GNT	Sodium gluconate	-	-	47	+	-/+
48	2KG	2-Ketogluconate	-	-	48	-/+	-/+
49	5KG	5-Ketogluconate	-	-	49	+	-/+

++ yellow; + green; +/- brownish green; - no change of color

EPS production

Modified MRS broth (with sucrose instead of glucose) was used for investigation of EPS production potential. Sucrose was added in 3 different initial concentrations: 2%, 5% and 10%. Fermentation lasted for 24 and 48 hours. After specified time, pH, biomass production and EPS concentration were measured. Biomass production was monitored by optical density (570 nm). Results are shown in Table 3, 4 and 5.

Table 3 pH changes during fermentation

Sucrose concentration	pH					
	2%		5%		10%	
isolate	T1	T5	T1	T5	T1	T5
Control	6.72	6.82	6.65	6.77	6.52	6.76
24 h	4.90	6.60	4.87	6.46	4.80	6.45
48 h	4.85	4.85	4.80	4.45	4.84	4.38

Table 4 Optical density changes during fermentation

Sucrose concentration	OD ₅₇₀					
	2 %		5 %		10 %	
Isolate	T1	T5	T1	T5	T1	T5
24 h	0.195	0.015	0.170	0.040	0.180	0.045
48 h	0.25	0.710	0.35	0.800	0.52	0.850

Table 5 EPS concentration during fermentation

Sucrose concentration	EPS / (g/l)*					
	2 %		5 %		10 %	
isolate	T1	T5	T1	T5	T1	T5
24 h	1.41	1.90	2.88	2.06	4.38	6.90
48 h	1.92	3.10	3.17	3.00	4.88	8.20

*presented as g/l glucose

According to the results shown in Table 3, after 24 hours medium pH decreased to values below 5 due to the metabolic activity of isolate T1 i.e. lactic acid production. After 48 h there is no further drop in pH which is indication for beginning of stationary phase of growth. Isolate T5 showed slower growth rate with significant pH decrease after 48 h. The results presented in Table 4 shown the greatest increase in biomass for both isolates were achieved in medium containing 10% sucrose, and the lowest one in medium with 2% sucrose.

Table 5 shows that the production of EPS is in direct proportion to the initial concentration of sucrose in the medium. It is evident that the highest yield of EPS was achieved in medium containing 10 % sucrose, after 48 hours.

Conclusion

Overall, the highest EPS yield of 4.88 g/l, and 8.20 g/l was achieved in medium containing 10 % sucrose, after 48 h incubation, by T1 and T5 respectively. More investigation is needed to optimize conditions for EPS production in order to obtain higher yields.

Acknowledgments: This work is the part of the research within the Project TR31035, which is financed by the Ministry of Education and Science, Republic of Serbia.

Ispitivanje proizvodnje egzopolisaharida kod bakterija mlečne kiseline iz vodenog kefir

Za izolaciju i selekciju mlečnih bakterija, potencijalnih producenata egzopolisaharida, korišćena su zrna vodenog kefir (iz domaćinstva iz Beograda, Srbija). Izolovano je 5 bakterija mlečne kiseline koje su označene sa T1 do T5. Preliminarna karakterizacija mlečnih bakterija izvršena je na osnovu morfoloških (oblik ćelija, bojenje po Gramu) i fizioloških karakteristika (katalaza test, rast na različitim temperaturama, rast u obranom i lakmus mleku, rast na podlogama sa različitim koncentracijama NaCl i fermentacija šećera utvrdjena API 50 CHL testom). Prema morfološkim i fiziološkim osobinama izolovani sojevi pripadaju rodovima *Lactobacillus* i *Leuconostoc*. Dva soja su obrazovala jako sluzave kolonije na modifikovanom MRS agaru (sa saharozom umesto glukoze). Oni su odabrani za ispitivanje produkcije egzopolisaharida (EPS).

Sojevi producenti EPS-a su gajeni u modifikovanom MRS bujonu. Saharoza je dodavana u tri različite koncentracije: 2%, 5% i 10%, a fermentacija je trajala 24 i 48 sati. Hladni etanol je korišćen za trostruku precipitaciju EPS-a, a dobijeni talog je rastvaran do početne zapremine uzoraka u toploj destilovanoj vodi. Koncentracija EPS-a je određena fenol-sumpornom metodom.

Najveći prinos egzopolisaharida, od 4.88 g/l i 8.20 g/l (za T1 i T5, respektivno) je ostvaren u podlozi sa 10% saharoze, na 30°C, nakon 48h inkubacije.

References

1. B. Ismail, K. M. Nampoothiri, *Archives of Microbiology* **192** (2010) 1049
2. A. Laws, Y. Gu, V. Marshall, *Biotechnology Advances* **19** (8) (2001) 597
3. S. S. Gauri, S. M. Mandal, K. C. Mondal, S. Dey, B. K. Pati, *Bioresource Technology* **100** (2009) 4240
4. F. W. Waldherr, V. M. Doll, D. Meissner, R. F. Vogel, *Food Microbiology* **27** (2010) 672
5. J. A. Piermaria, A. Pinotti, M. A. Garcia, A. G. Abraham, *Food Hydrocolloides* **23** (2009) 684
6. M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith, *Analytical Chemistry* **28** (3) (1956) 350

Enzymatic production of bioactive protein hydrolysates from egg white: effects of ultrasound on egg white proteins

Andrea B. Stefanović, Milena G. Žuža, Ana D. Gluvić, Verica B. Manojlović*, Dejan I. Bezbradica, Branko M. Bugarski*, Zorica D. Knežević-Jugović

Department of Biochemical Engineering and Biotechnology, Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Karnegijeva 4, 11120 Belgrade, Serbia,

**Department of Chemical Engineering, Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Karnegijeva 4, 11120 Belgrade, Serbia*

Introduction

Egg producers are faced with problems of excess of egg white because mayonnaise industry and bakery industry use relatively high egg yolk amounts and egg white is the remainder. Although egg white proteins (EWPs) present unique functional characteristics such as excellent gelling and foaming and almost perfect amino acid composition, their high viscosity and allergenicity are limiting factors for their widespread use in food products, especially in the case of medical, dietary and infant foods.

Enzymatic hydrolysis of egg white proteins has been proven to be an effective approach to improve their properties such as increased solubility, emulsification, water holding capacity, stability, digestibility, and to reduce protein allergenicity while still retaining their nutrition value.¹ Moreover, certain oligopeptides released during protein hydrolysis have been shown to possess distinctive physiological activities, such as anti-hypertensive activity, antioxidant activity, immunostimulating activity, and as such may contribute to enhanced biological activities and health benefits of the hydrolysate. However, the production of these functional ingredients requires new and innovative technologies because they are sensitive to a variety of environmental processing factors that may cause the loss of nutritional quality and chemical degradation.

Major proteins in chicken egg white including ovalbumin and ovotransferin, in their native forms have a low susceptibility to digestion by alcalase, trypsin or α -chymotrypsin. Heat denatured ovalbumin however, shows an increased susceptibility to these proteases.² However, thermal treatments are obviously the most critical steps able to impair protein functionalities inducing various chemical reactions such as Maillard browning which may lead to nutritional, sensory and safety deterioration in egg white hydrolysates. Several papers reported a decrease in the nutritional properties of different natural protein sources due to thermal processing. Thus, a lot of research works have been performed to investigate the effectiveness of replacing conventional thermal treatment with several non-thermal alternative approaches for improvement the overall process performances of EWP hydrolysis and produce protein solutions with new functional properties.^{3,4}

The purpose of this research was to study the effect of ultrasound pretreatment on the in vitro digestibility of egg white proteins by alcalase. The influence of pretreatment parameters including pH and holding time on enzymatic hydrolysis of pretreated EWPs was studied. The antioxidant activity of the obtained hydrolysates has also been determined and compared.

Experimental

Materials

Chicken egg white obtained from a local supermarket was separated from the yolk and gently stirred without foam formation to provide homogeneous mixture. Alcalase 2.4L (proteinase from *Bacillus licheniformis* Subtilisin) was obtained from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). The enzyme activity is ≥ 2.4 U/g Anson Units, where one Anson unit is defined as the amount of enzyme which, under specified conditions, digests urea-denatured hemoglobin at an initial rate such that there is liberated an amount of TCA-soluble product per minute which gives the same color with Folin-Ciocalteu Phenol reagent as one milliequivalent of tyrosine at 25 °C at pH 7.50. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) used for radical scavenging test was also purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). Other chemicals were of analytical grade.

Sonication pretreatment

Ultrasonic denaturation was investigated in the pH range of 6.0 to 10.0 at 27 °C in an ultrasonic water bath. Prior to sonication, the pH of the 10% (w/w) egg white solution was adjusted to 6.0-10.0 using 0.2 M HCl or 0.2 M NaOH. The ultrasound treatments were performed for 15, 30, 60, and 180 min under a power setting of 30 kHz. The samples were half-immersed in an ice-water bath to avoid temperature increase during sonication. Each treatment was conducted in duplicate.

Enzymatic Hydrolysis of Egg White Proteins

Pretreated aqueous egg white solutions (360 mL, 10 mg of protein/mL, pH 8.0) were hydrolyzed at 50 °C by adding 2.3 Units of alcalase. The pH was kept at 8.0 by adding 0.2 M NaOH, using a pH-stat (Metrohm, Basel, Switzerland) with automatic dosage of the base. The DH was used as a parameter to measure the effect of ultrasound pretreatment on the susceptibility of egg white proteins to enzymatic hydrolysis. After 4 h of incubation, the reaction was terminated by heating during 10 min at a boiling water bath. The degree of hydrolysis (DH) was calculated by the pH stat method based on Adler-Nissen⁵ using the following equation:

$$DH = \frac{h}{h_{tot}} = N_b \times B \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{m_p} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100 \quad (1)$$

where h is the number of equivalents of peptide bonds hydrolysed at time t , h_{tot} is the total number of peptide bonds in protein substrate in mmol/g_{protein}, B is the base consumption in mL, N_b is the base normality, α is the average degree of dissociation of the α -NH groups and m_p is the mass of protein in g.

Antioxidant activity measured by DPPH assay

Antioxidant activity of EWP hydrolysates was measured by their ability to scavenge DPPH radical, which was monitored by decrease of absorbance on 517 nm, as described elsewhere.⁶ A volume of 200 μ L of samples was mixed, in spectrophotometric cuvet, with 1800 μ L of methanolic DPPH solution (0.1 mM), vortexed and left in dark and after 30 min absorbance was measured on 517 nm. Calculations were done as follow:

$$RSA(\%) = \left[1 - \frac{(A_s - A_0)}{A_b} \right] \quad (2)$$

where A_s is the absorbance of the tested sample, A_0 is the absorbance of the sample in methanol, and A_b is the absorbance of the DPPH solution without the sample.

Results and discussion

Sonication pretreatment

As sonication-induced protein denaturation strongly depends on the temperature and pH at which pretreatment occurs, the effect of ultrasound pretreatment was studied at constant temperature and at three pH values: 6.0, 8.3 and 10.0. The aim of optimization was to find the conditions that would lead to irreversible denaturation of the alcalase inhibitor, but would not result in the formation of dense and compact precipitates, which are poor substrate for proteolysis.

As shown in Fig. 1, it appeared that for all cases studied, the ultrasonic pretreatment changed the proteolytic pattern of EWPs resulting in an increase in their digestibility by alcalase. This ultrasound-dependent increase in susceptibility to enzymatic hydrolysis is in accordance with the results of Su *et al.*,⁷ who observed an increase of susceptibility to alcalase hydrolysis of egg white after 120 min treatment at 40 kHz. It is considered that the sonication produces hemolytic water molecule cleavage, generating high energy intermediates such as hydroxyl and hydrogen free radicals, and therefore, causing protein structural changes. In contrast, an increase in the sensitivity of ovotransferrin to proteolysis by using thermolysin after sonication was not observed by Lei *et al.*³ However, these authors studied the effect of ultrasound pretreatments on model egg white protein- ovotransferrin. In this case, the reaction mixture seemed to be free from proteases` inhibitors such as ovomucoid. It is one of the major egg white protein accounting for 11% in egg white, well known as a strong inhibitor of alcalase. The increase in susceptibility of egg white solutions to enzymatic hydrolysis after sonication could also be due to ovomucoid denaturation.

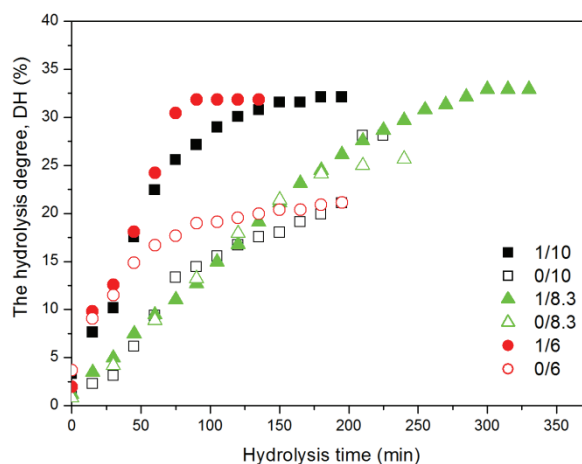


Figure 1. The comparison of the DH profiles of EWPs hydrolysis by alcalase at pH 8.0 and 50 °C. The labels indicate samples with different sonication pre-treatment (0/10 means alkali pretreatment at pH 10 without ultrasound treatment; 1/10 means 1 h sonication at pH 10.0; 0/8.3 means alkali pretreatment at pH 8.3 without ultrasound treatment; 1/8.3 means 1 h sonication at pH 8.3; 0/6 means acid pretreatment at pH 6.0 without sonication; and 1/6 means 1 h sonication at pH 6.0).

The strongest increase in susceptibility of egg white solution to enzymatic hydrolysis could be observed after ultrasound treatment at acid or alkaline pH. The partially unfolded conformation of major EWPs formed by sonication may be attributed to the increase of the susceptibility but this also could be the result of disulfide exchange and formation of non-native disulfide bonds in ovomucoid, resulting in its irreversible denaturation. It appeared that its effective denaturation was attained by combined alkali/acid and ultrasonic treatment.

Longer treatment time resulted in a higher subsequent susceptibility to enzymatic hydrolysis, up to 60 min (Fig. 2). Prolonged exposure to ultrasound of 60 min at pH 10.0 seemed to have a negative effect on the EWPs hydrolysis. Under this condition, a turbid suspension of protein aggregates could be observed, which might lower the accessibility of the unfolded proteins to the alcalase.

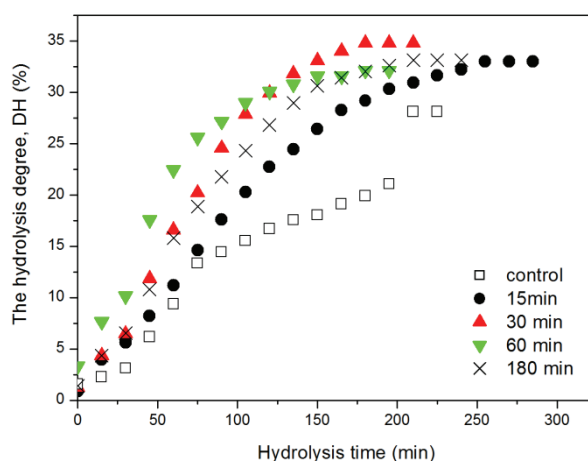


Figure 2. Time-dependent changes in the susceptibility of egg white solutions due to ultrasound pretreatment at pH 10 lasting 0 min (\square); 15 min (\bullet), 30 min (\blacktriangle), 60 min (\blacktriangledown), and 180 min (\times). Hydrolysis condition: 2.3 Units of alcalase, 10% w/w egg white, pH 8.0, 50 °C.

Antioxidant activities of sonication-pretreated alcalase hydrolysates

The release of bioactive peptides from their parent proteins are affected by various factors such as temperature, pH, enzyme, sonication, and among others. The production of bioactive peptides was monitored after hydrolysis. The antioxidant activities of samples treated by different ultrasound

treatment followed by alcalase hydrolysis were compared in Fig. 3. Our results indicated that 1-hour sonication treatment at 8.3 improved the antioxidant activity of raw egg white, while the sonication at 6.0 or at 10.0 did not have significantly effect on RSA activity.

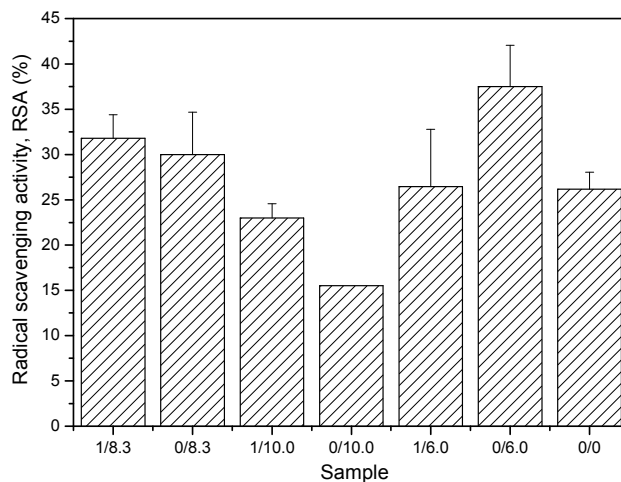


Figure 3. Effects of sonication on the radical scavenging activity of egg white hydrolysates obtained with or sonication treatments. Data were the results of three individual determinations. Labels of 0/0 means raw egg white, 0/6.0 means acid egg white treatment without sonication treatment, 0/10 means alkali but no sonication treatment, 1/6.0, 1/8.3, and 1/10.0 means 1 hours sonication at pH 6.0, 8.3, and 10.0, respectively.

Conclusion

In this study, the effect of ultrasound pretreatment at 27 °C and at atmospheric pressure on the enzymatic hydrolysis of EWPs with alcalase has been investigated. As pH seemed to strongly affect the ultrasound induced protein denaturation, the effect of pH during sonication in the range 6.0-10.0 on the egg white susceptibility to enzymatic hydrolysis has been studied. The functional properties, molecular weight distribution, and antioxidant activity of obtained hydrolysates were also investigated. The ultrasound pretreatment of egg white proteins resulted in an increase in degree of hydrolysis of the enzymatic reaction while the high pressure carbon dioxide processing showed an inhibition effect on the enzymatic hydrolysis of EWPs to some extent. Antioxidant activity of obtained hydrolysates was improved by ultrasound pretreatment of EGPs at pH 8.3. Thus, the combination of ultrasound pretreatment at pH 8.3 and subsequent enzymatic hydrolysis with alcalase at 50 °C and pH 8.0 could offer a new approach to improve the functional properties of EWPs and their biological activity. The sonication procedure is simple, rapid and efficient and could be useful for the industrial production of functional products from egg white.

Acknowledgements: This work was supported by Grant numbers E!6750 from the Ministry of the Education and Science, Republic of Serbia.

Enzimaska proizvodnja bioaktivnih hidrolizata proteina belanceta: uticaj ultrazvuka na proteine belanceta

Hidrolizati proteina belanceta predstavljaju izvor proteina u ljudskoj ishrani koji imaju niz prednosti u odnosu na nehidrolizovane proteinske sastojke. U ovom radu je ispitan uticaj predtretmana ultrazvukom na 27 °C i atmosferskom pritisku na enzimsku hidrolizu proteina belanceta alkalazom. Varirana je pH vrednost u toku ultrazvučnog tretmana u opsegu od 6,0 do 10,0 i utvrđena je osetljivost belanceta na enzimsku hidrolizu. Određena su i funkcionalna svojstva, raspodela molekulske težine i antioksidativna aktivnost dobijenih hidrolizata. Dobijeni rezultati pokazuju da predtretman ultrazvukom dovodi do porasta stepena hidrolize enzimske reakcije. Antioksidativna aktivnost dobijenih hidrolizata je poboljšana predtretmanom ultrazvukom na pH 8,3. Stoga, kombinacija predtretmana ultrazvukom na pH 8,3 i enzimske hidrolize alkalazom na 50 °C i pH 8,0 može da dovede do poboljšanja funkcionalnih svojstava proteina belanceta i njihovu biološku aktivnost.

References

1. C. Chen, Y-J. Chi, *J. Food Biochem.* 2011, in press DOI: 10.1111/j.1745-4514.2011.00555.x
2. I. Van der Plancken, M. Van Remoortere, I. A. Van Loey, M. E. Hendrickx, *J. Agric. Food Chem.* **51** (2003) 3819
3. B. Lei, K. Majumder, S. Shen, J. Wu, *Food Chem.* **124** (2011) 808
4. M. Zeece, T. Huppertz, A. Kelly, *Innov. Food Sci. Emerg.* **9** (2008) 62
5. J. Adler-Nissen, *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*, 1st ed.; Elsevier Applied Science Publishers: London, UK, 1986; p. 427
6. M. S. Blois, *Nature* **181** (1958) 1199
7. Z. Su, X. Li, L. Jin, *Food Sci. Technol. (Chinese)* **31(12)** (2006) 74

Poređenje imobilizacije peroksidaze iz soje na različite glicidil metakrilat polimere

Miloš Prokopijević, Olivera Prodanović, Dragica Spasojević, Željko Stojanović**,
Ksenija Radotić, Radivoje Prodanović*

Institut za multidisciplinarna istraživanja, Univerzitet u Beogradu, Kneza Visešlava 1, Beograd;

**Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Studentski trg 12-16, Beograd;*

***Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Njegoševa 12, Beograd*

Uvod

Peroksidaze (oksidoreduktaze, EC 1.11.1.7) katalizuju oksidaciju velikog broja različitih supstrata pomoću vodonik-peroksida, široko su rasprostranjene u biljnim, mikrobnim i životinjskim tkivima a na osnovu homologije mogu se klasifikovati u tri grupe (klasa I, klasa II i klasa III).¹ Peroksidaza iz ljuspica soje (Soybean Hull Peroxidase - SHP) pripada klasi III biljne superfamilije peroksidaza zajedno sa peroksidazom iz rena (HRP), ječma (BPI) i kikirikija (PNP). SHP je glikoprotein sastavljen od 326 aminokiselina molekulske mase od ~ 37 kDa.² Široka primena peroksidaze iz rena (HRP) ograničena je visokom cenom njene komercijalizacije i dovela je do potrage za alternativnim jeftinijim izvorima biljnih peroksidaza koje bi zamenile HRP.¹ Ljuske soje su jeftin poljoprivredni otpadni proizvod koji se koristi u ishrani životinja kao izvor vlakana u cilju poboljšanja nutritivne vrednosti. Peroksidaza izolovana iz ljuski soje stoga nudi jeftin izvor velike količine sirovog enzima koji se može koristiti u razne svrhe. Zahvaljujući tome, SHP ima potencijalno upotrebu kao biokatalizator i biosenzor, kao i primenu u nefiziološkim procesima koji uključuju tretman otpadnih voda, uklanjanje fenolnih jedinjenja i sinteza fenolnih smola. Enzim se takođe može koristiti za proizvodnju nekih hemikalija, transformaciju lekova, degradaciju aromatičnih jedinjenja, kao sastavni deo analitičkih, dijagnostičkih kitova i imunoeseja koji se koriste za kvantifikaciju raznih metabolita.²

Fenoli predstavljaju ozbiljne zagađivače životne sredine u koju dospevaju pre svega putem otpadnih voda raznih industrijskih postrojenja kao što su rafinerije nafte, industrije smole, plastike, tekstilne industrije itd.³ Poznato je da ovi zagađivači nisu biorazgradivi i da imaju kancerogeno, mutageno i akutno toksično dejstvo. Metode uklanjanja fenola enzimskim putem donose brojne prednosti u odnosu na konvencionalne biološke i fizikohemijske tehike. Biološke metode najčešće koriste mulj za smanjenje organskog sadržaja otpadnih voda, ali nisu efikasne u smanjenju toksičnog dejstva zagađivača. Fizičko-hemijske metode pokazuju malu selektivnost prema ciljanim zagađivačima i efikasnost opada sa povećanjem njihove koncentracije. Procesi hemijske oksidacije su skupi za tretman visokog nivoa zagađenja, ali su efikasni u slučaju razblaženih otpadnih voda. Nasuprot tome, enzimске metode deluju sa visokom specifičnošću, lako se kontrolišu, jeftine su i veoma efikasne za uklanjanje ciljnih jedinjenja ostavljajući minimalan uticaj na životnu sredinu a u poređenju sa mikroorganizmima, enzimi su lakši za rukovanje i skladištenje.⁴

Enzimski tretman uklanjanja fenola iz otpadnih voda pomoću peroksidaze i vodonik-peroksida predložen je početkom 80-ih godina prošlog veka kao veoma efikasan i selektivan metod.⁵ Peroksidaza iz soje sa vodonik-peroksidom katalizuje oksidaciju aromatičnih jedinjenja i proizvodi slobodne radikale, usled čega dolazi do spontane polimerizacije i nastanka oligomera i polimera velike molekulske mase. Ovi proizvodi precipitiraju zbog niske rastvorljivosti i mogu se lako ukloniti iz sredine.³ Međutim, upotreba rastvorne peroksidaze ima nekoliko mana, enzimska aktivnost može se izgubiti usled inhibicije ili deaktivacije, može doći do koprecipitacije enzima sa nastalim polimerom, odvajanje enzima od reakcione smeše nije ni malo lako i ponovna upotreba već korišćenog enzima je nemoguća.³ Enzimi se mogu imobilizovati na različite nosače stičući time neke prednosti u odnosu na rastvorni oblik, uključujući povećanje stabilnosti, mogućnost ponovne upotrebe, kontrolu formiranja proizvoda i lako odvajanje iz reakcionog medijuma sa mogućnošću ponovne upotrebe.⁶ Kada je potrebno obraditi velike količine otpadnih voda, najbolje rezultate daju medijumi koji sadrže imobilizovane enzime.⁷

U ovom radu izvršeno je poređenje imobilizacije peroksidaze iz soje na različite glutaraldehidno aktivirane makroporozne nosače na bazi glicidilmetakrilata. Poređene su specifične aktivnosti i prinosi imobilizata SHP vezanih za polimere različitih dijametara pora kao i uticaj količine dodatog enzima po gramu suve mase polimera na specifičnu aktivnost i prinos imobilizacije. Ispitana je i skladišna stabilnost imobilizata nakon tri meseca od završene imobilizacije.

Rezultati i diskusija

Peroksidaza iz ljuski soje (Soybean hull peroxidase) izolovana je i prečišćena iz polaznog materijala.⁸ Izmerena koncentracija enzimske aktivnosti dobijenog rastvora prečišćene peroksidaze (konc. 1 mg/ml) iznosi 142,25 IU/ml. Jedna jedinica enzimske aktivnosti [IU] definisana je kao ona količina enzima koja oksiduje 1 μ mol pirogalola za 1 minut, na 25°C i pH 7 i računata je po formuli:

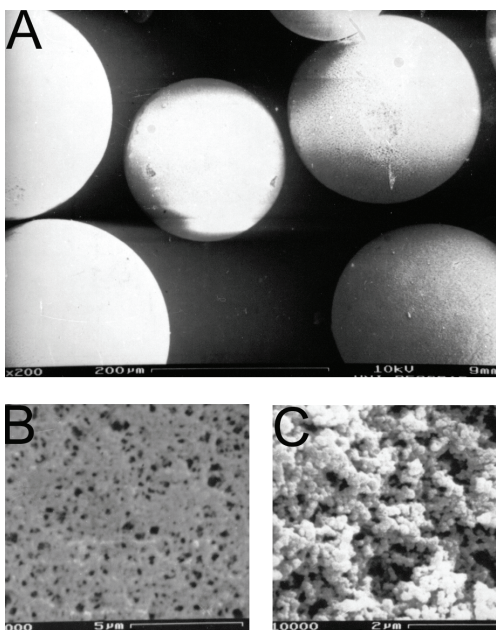
$$\text{Aktivnost peroksidaze (IU / ml)} = \frac{\Delta A_{420} \times V_{RS} \times df}{\epsilon \times \Delta t \times V_U}$$

gde su V_{RS} i V_U zapremine reakcione smeše odnosno uzorka, ϵ ekstencioni koeficijent za pirogalol, df faktor razblaženja. Specifična aktivnost imobilizata (IU/g) dobijena je po istom principu samo umesto V_U jednačina je deljena sa masom suvog polimera (g)

U cilju korišćenja ovog enzima za uklanjanje fenola iz otpadnih voda i dobijanja katalizatora povećane stabilnosti sa mogućnošću ponovne upotrebe, peroksidaza iz soje je imobilizovana na glutaraldehidno aktivirane makroporozne nosače. Korišćena su četiri različita glicidil metakrilat nosača raspona pora od 40 – 200 nm:

1. MP3 150-300 (veličina pora od 40 nm),
2. EDA 10/12 (veličina pora od 50 nm),
3. EDA 20/12 (veličina pora od 150 nm) i
4. SGE 15/16 (veličina pora od 200 nm).

Svi korišćeni polimeri sintetisani su po publikovanoj proceduri i modifikovani etilendiaminom kako je prethodno opisano (Slika 1).^{9, 10}



Slika 1. Elektronska mikrografija kuglica makroporoznog nosača glicidilmetakrilata EDA 20/12 (veličine pora od 120 nm). A – kuglice uveličane 200 puta, B – površina kuglica uveličana 5000 puta, C – ispucala površina kuglica uveličana 10000 puta

Imobilizacija na svaki od nosača rađena je sa različitim koncentracijama peroksidaze iz soje u cilju pronalazanja optimalnog odnosa količine enzima po masi suvog polimera. Nanošene su koncentracije peroksidaze od: 0,034; 0,168; 0,625 i 1,25 mg/ml što odgovara količini od 0,68; 3,36; 12,5 i 25,0 mg enzima na 1 g suvog polimera. Dobijeni imobilizati okarakterisani su merenjem specifične aktivnosti kao i prinosa imobilizacije. Vrednost specifične aktivnosti raste kako sa povećanjem količine dodatog enzima po gramu polimera, tako i sa povećanjem veličine pora (Tabela 1). Zato najveću specifičnu aktivnost od 22,8 IU/g odnosno 21,4 IU/g pokazuju imobilizati na nosačima pora veličina 120 odnosno 200 nm.

Tabela 1. Zavisnost specifične aktivnosti imobilizata [IU/g] od količine dodatog enzima (mg) po gramu suve mase polimera i veličine pora nosača.

$m_{\text{SHP}} / \text{mg}$	Veličina pora, nm	0,68	3,36	12,5	25,0
MP3 150-300	40	1,7	3,3	4,2	8,2
EDA 10/12	50	0,7	1,5	2,6	8,4
EDA 20/12	120	1,5	2,9	8,1	22,8
SGE 15/16	200	1,1	2,3	6,4	21,4

Prinos imobilizacije (Y) opada sa rastućom količinom dodatog enzima, ali raste sa povećanjem veličine pora nosača (Tabela 2), a računat je kao odnos specifične i vezane aktivnosti, izražen u procentima:

$$Y (\%) = \frac{\text{Sp. aktivnost}}{\text{Vezana aktivnost}} \times 100 \%$$

Tabela 2: Zavisnost prinosa imobilizacije [%] od količine dodatog enzima (mg) po gramu suve mase polimera i veličine pora nosača.

$m_{\text{SHP}} / \text{mg}$	Vličina pora, nm	0,68	3,36	12,5	25,0
MP3 150-300	40	13,61	2,61	1,18	1,51
EDA 10/12	50	5,09	1,14	0,48	0,87
EDA 20/12	120	7,37	2,18	1,56	2,45
SGE 15/16	200	7,04	1,72	1,22	2,24

Prinos imobilizacije najveći je pri najmanjoj količini dodate peroksidaze iz soje. Svi imobilizati su posle završene imobilizacije čuvani u 100mM natrijum fosfatnom puferu pH 7 na temperaturi od $5 \pm 3^\circ\text{C}$, nakon tri meseca stajanja određena im je skladišna stabilnost, merenjem specifične aktivnosti i upoređivanjem sa početnom (Tabela 3).

Tabela 3: Procenat preostale specifične aktivnosti imobilizata nakon 3 meseca od imobilizacije u odnosu na početnu.

Imobilizati	Vličina pora, nm	Preostalaaktivnost, %
MP3 150-300	40	46,09
EDA 10/12	50	47,00
EDA 20/12	120	51,91
SGE 15/16	200	53,00

Aktivnost imobilizata je nakon tri meseca ostala na oko 50% od početne, što potvrđuje da su imobilizati stabilni i ukoliko se adekvatno skladište mogu se koristiti duži vremenski period. I u ovom slučaju, najmanji pad aktivnosti zabeležen je kod polimera sa najvećim dimenzijama pora (53% preostale aktivnosti), dok je najveći pad aktivnosti kod polimera sa najmanjim porama (46% preostale aktivnosti).

Tabela 4: Procenat preostale specifične aktivnosti imobilizata nakon 48h inkubacije u 80% dioksanu u odnosu na početnu.

	MP3 150-300	EDA 10/12	EDA 20/12	SGE 15/16
Sp / %	83,3	80,4	57,2	70,0

Merena je i stabilnost imobilizata u organskom rastvaraču, inkubacijom tokom 48h u 80% dioksanu i zatim merenjem aktivnosti u odnosu na početnu. Rezultati stabilnosti imobilizata su poređeni sa rezultatima za rastvorni enzim koji nakon inkubacije od 48h ostaje na 55% od početne aktivnosti (Tabela 4).

Imobilizacijom SHP povećava se stabilnost u organskom rastvaraču sa 55% za rastvorni enzim na preko 80% za imobilizate manjih dimenzija pora (MP3 150-300 i EDA 10/20).

Zaključak

Može se zaključiti da smo uspešno imobilizovali peroksidazu iz soje na glutaraldehidno aktiviran makroporozni glicidilmetakrilat. Analizom dobijenih rezultata i poređenjem imobilizata različitih dimenzija pora vidi se da najveće specifične aktivnosti od 22,8 IU/g i 21,4 IU/g odgovaraju polimerima EDA 20/12 i SGE 15/16 najvećih dimenzija pora od 120 i 200 nm. Stabilnost imobilizata potvrđena je merenjem preostale aktivnosti nakon tri meseca, a u zavisnosti je od veličine pora. Procenat preostale aktivnosti raste sa povećanjem dimenzije pora. Visoka specifična aktivnost i stabilnost imobilizata omogućava primenu imobilizovanog enzima za efikasno uklanjanje fenola iz otpadnih voda.

Zahvalnica: Ovaj rad je podržan od strane projekata (br. 173017 i 172049) Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije.

Comparison of soybean hull peroxidase immobilized on different glycidyl methacrylate polymers

Phenols are considered priority pollutants of wastewaters, they are non-biodegradable and the problem of their removal is a current and important environmental issue. Enzymatic treatment of wastewaters using peroxidase and H₂O₂ is highly effective and selective method. Soybean hulls offer cheap source of large amounts of crude enzyme (soybean hull peroxidase - SHP), which can be used for this purpose. The aim of this research was to test different macroporous carriers for immobilization of soybean hull peroxidase. Our data demonstrate that SHP immobilization using glutaraldehyde activation is influenced by the pore size of the macroporous glycidyl methacrylate matrix. Both specific activity of the immobilized enzyme and immobilization yield were increased with the increase in pore size, and the highest specific activity obtained was 22,8 U/g of carrier.

Acknowledgment: This work was supported by a grants (No. 173017 and No. 172049) from the Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia

Reference

1. F. Ghaemmaghami, I. Alemzadeh, S. Motamed, *Iranian Journal of Chemical Engineering*. **7** (2010) 2.
2. M.C. Lakshmi, K.S.M.S. Raghavarao, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. **15** (2010) 937.
3. A. Bódalo, J.L. Gómez, E. Gómez, A.M. Hidalgo, M. Gomez, A.M. Yelo, *Desalination*. **195** (2006) 51.
4. K. Wilberg, C. Assenhaimer, J. Rubio, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **77** (2002) 851.
5. S. Hejri, A. Saboora, *Journal of Science (University of Tehran)*. **35** (2009) 13-18.
6. M. Gomez, G. Matafonova, J.L. Gomez, V. Batoev, N. Christofi, *Journal of Hazardous Materials*. **169** (2009) 46.
7. I. Alemzadeh, S. Nejati, M. Vossoughi, *Engineering Letters*. **17** (2009) 4.
8. J. Liu, H. Liu, Y. Zhang, L. Qiu, F. Su, F. Li, Z. Su, J. Li, *Applied Microbiology and Biotechnology*. **74** (2007) 249.
9. S.M. Jovanović, A. Nastasović, N.N. Jovanović, K. Jeremić, *Mater. Sci. Forum*. **214** (1996) 155.
10. R. Prodanović, N. Milosavić, S. Jovanović, O. Prodanović, T. Ćirković Veličković, Z. Vujčić, R.M. Jankov, *Biocatalysis and Biotransformation*. **24** (2006) 195.

Covalent immobilization of horseradish peroxidase on macroporous glycidyl methacrylate based copolymer

Olivera Prodanović, Miloš M. Prokopijević, Dragica R. Spasojević, Željko P. Stojanović*, Ksenija D. Radotić, Zorica D. Knežević-Jugović**, Radivoje Prodanović***

Institute for Multidisciplinary Research, University of Belgrade, Kneza Višeslava 1, 11030 Belgrade, Serbia;

**Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy, Njegoševa 12, 11001 Belgrade, Serbia;*

***Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Karnegijeva 4, 11120 Belgrade, Serbia;*

****Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg 12-16, 11000 Belgrade.*

Introduction

Macroporous copolymers are often used as carriers for enzyme immobilization and as adsorbents in chromatography. One of the most widely used is copolymer of styrene and divinylbenzene.¹ Copolymers based on glycidyl methacrylate are more suitable for enzyme immobilization since they have epoxy groups that can be easily transformed into hydroxyl, keto, carboxyl or amino groups to facilitate binding of the enzyme for the carrier. Compared to polystyrene they also have higher hydrophilicity which has been proven to have positive influence on protein stability and enzyme activity.^{2,3} Porosity of the carrier used in enzyme immobilization is also very important parameter influencing activity and stability of immobilized enzyme.⁴ Therefore, precise control of these properties could significantly improve performance of immobilized enzymes.⁵

Horseradish peroxidase (HRP, E.C.1.11.1.7) is the most known peroxidase from plants that can be used for organic synthesis of specialty chemicals like DOPA6 and biphenols,⁶ in polymerization reactions during elimination of pollutants such as phenol and aniline from wastewater,⁷ and in manufacture of biosensors.⁸ The enzyme belongs to the ferroporphyrin group of peroxidases and has limited operational stability due to inactivation by its own substrate. Thus, it is recommended to use HRP in an immobilized form to enable repeated use of the enzyme and enhance its properties such as activity and stability under these extreme operational conditions.^{9,10}

Different methods have been used to immobilize HRP on a solid carrier including covalent bonding,^{9,11} entrapment in a solid matrix^{12,13} or electrodeposition at the electrode surfaces.¹⁴ There are a variety of methods for coupling enzymes to glycidyl methacrylate based copolymers. Glutaraldehyde coupling chemistry is one of the most-used method for enzyme immobilization via amino groups of its exposed amino acids.^{9,15} On the other hand, immobilization of glycoproteins like invertase,¹⁶ lipase² and others through their carbohydrate moiety seems to be effective and site-specific, bringing about little change in the overall conformation of the enzymes or of their active sites.

In the present work, several macroporous poly(GMA-co-EGDMA) samples with the same chemical composition but different surface characteristic and mean pore size diameter were synthesized and screened for immobilization of horseradish peroxidase by applying two different covalent methods. The immobilization methods were compared with regards to the specific activity and thermal stability. Finally, the best carrier and immobilization method were selected for further use and characterization. The pH profile, kinetic properties and operational stability of immobilized and free HRP were compared.

Results and Discussion

Four different copolymer samples with different mean pore diameters were used SGE-10/4 (44 nm), SGE-10/12 (50 nm), SGE-20/12 (120 nm), SGE-15/16 (200 nm). Particles of the obtained copolymers exhibited spherical shape with diameters in the range of 150–500 µm and surface of these particles was highly porous. Recent studies have revealed that the kinetics and stability of enzymes immobilized on porous carriers are usually modified by diffusion effects, depending strongly on the surface characteristics of carriers used for their immobilization.⁴ Thus, in the present study, we wanted to determine which of the copolymer batches were most suitable for horseradish peroxidase (HRP) immobilization by both glutaraldehyde and periodate method previously optimized for hydrolases.^{2,4,17} Different amounts of enzyme were added per gram of copolymers and specific activity of immobilized enzyme was determined for all copolymer samples. The results obtained for both methods are shown in Fig. 1.

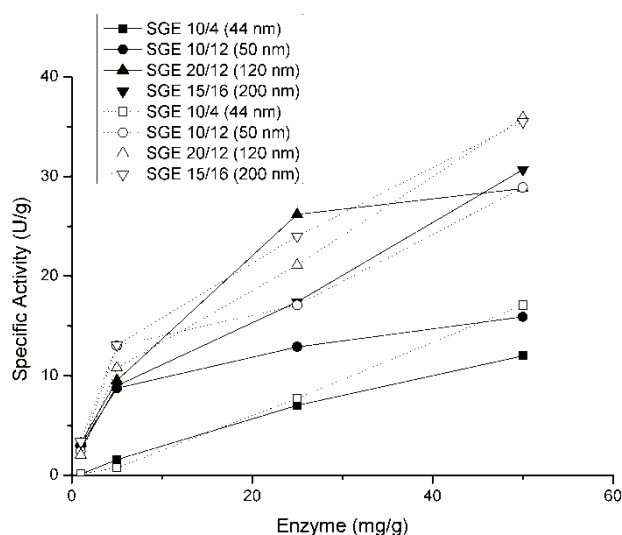


Figure 1. Influence of amount of added enzyme on specific activity of immobilized peroxidase. Open symbols – periodate immobilization, closed symbols – glutaraldehyde immobilization. Copolymer sample used: (□ and ■) SGE-10/4; (○ and ●) SGE-10/12; (△ and ▲) SGE-20/12 and (▽ and ▼) SGE-15/16.

As expected, the specific activity of immobilized HRP increased as the amount of added enzyme per gram of copolymer increased in all experiments. For all cases studied, the periodate method for HRP immobilization gave in average 1.5 times higher specific activity of the immobilized enzyme compared to the glutaraldehyde method when using the same copolymer and the same amount of added enzyme. Similar results have been obtained previously for lipase from *C. rugosa* using Eupergit C or Sepabeads EC-EP as carriers.^{2,3} Surface characteristics of the copolymer were found also to have influence on the specific activity of the immobilized enzyme. For the periodate method, the highest specific activity of around 35 U g^{-1} dry weight of carrier was obtained with the copolymer samples with larger pore size (mean pore diameter 120 and 200 nm), namely SGE 20/12 and SGE 15/16. Similar trend also has been observed for glutaraldehyde method, when the specific activity of HRP immobilized on copolymer with 200 nm mean pore diameter was approximately three times higher than that of HRP immobilized on copolymer with 44 nm. Copolymers with a small pore size provided a large total surface area, but the pores appeared to be too small resulting in restricted mass transfer and pore penetration of the enzyme. The observed enhancement in specific activity of carriers with larger pores was consistent with the study on subtilisin immobilization on different silica carriers which reported that silicas with large mean pore diameter presented higher total and specific activities relative to those with smaller pore sizes.¹⁸ The optimal pore size of carrier appeared to be highly dependent on the particular enzyme and coupling method used. In this work, for HRP (molecular weight 40,000, size of the molecules 5–6 nm) it was found that a 120–200 nm pore size in the carrier microbeads gave the best results that were much higher than recommended value for an efficient enzyme immobilization. Thermal stability of HRP immobilized by two covalent methods has been evaluated and compared the results to the kinetics of deactivation of the free enzyme. For all the cases studied, the immobilized preparations seemed to exhibit increased thermal stability compared with the free enzyme (Fig. 2).

It is apparent that the stability of immobilized HRP obtained by periodate method was higher than that obtained by glutaraldehyde one. HRP that was immobilized onto SGE 20/12 copolymer by periodate method with mean pore diameter of 120 nm showing highest activity and a rather high stability was further characterized.

Both forms of the enzymes exhibited an optimum at pH 7, but immobilized HRP displayed a broadened pH profile relative to the free one. Higher activity of immobilized enzyme was more pronounced at basic pH values, which could be interesting for practical application. The enzyme appeared to follow Michaelis-Menten kinetics and kinetic parameters were determined directly by fitting the experimental data to the kinetic model (data not shown). K_m was determined for pyrogallol when H_2O_2 is maintained at saturating conditions. The value of Michaelis constant for the immobilized enzyme appeared to be 10.8 mM, approximately 5.6 times higher than that of the free enzyme (K_m value for free HRP was 1.93 mM), suggesting decreased accessibility of enzyme to the substrate. V_{\max} of the immobilized enzyme was determined to be 54.9 U g^{-1} dry weight of carrier.

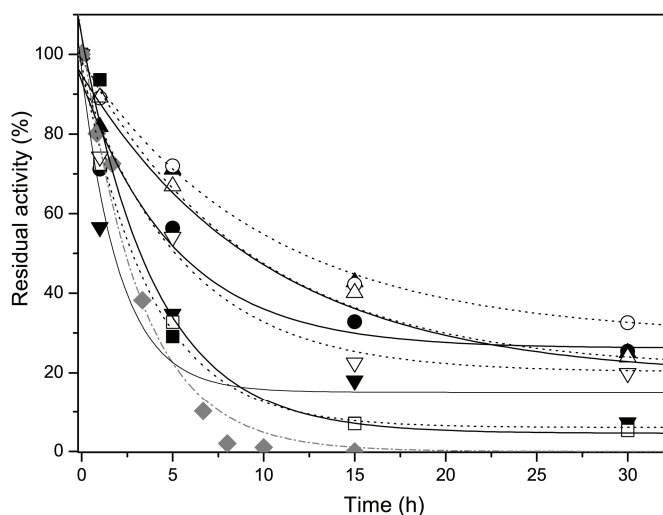


Figure 2. Residual activity of immobilized and free HRP at 65°C versus time. Open symbols – periodate immobilization, closed symbols – glutaraldehyde immobilization, (□) free enzyme. Copolymer sample used: (□ and ■) SGE-10/4; (○ and ●) SGE-10/12; (△ and ▲) SGE-20/12 and (▽ and ▼) SGE-15/16.

This was in accordance with previous immobilization studies of peroxidases where increase of K_m constant for immobilized enzyme was also observed.^{9,11} For instance, 15.6 times higher K_m value for guaiacol has been reported with chitosan immobilized HRP compared to that of free enzyme¹⁹ or K_m value for H_2O_2 was 1.65 times higher in the case of HRP immobilized on the magnetic poly(glycidyl-methacrylate-co-methylmethacrylate) compared to the free one.⁹

In order to test operational stability of immobilized peroxidase during usage the same batch of immobilized enzyme was used in several cycles of pyrogallol oxidation in batch reactor and residual activity of immobilized enzyme was determined after each cycle, Fig. 3.

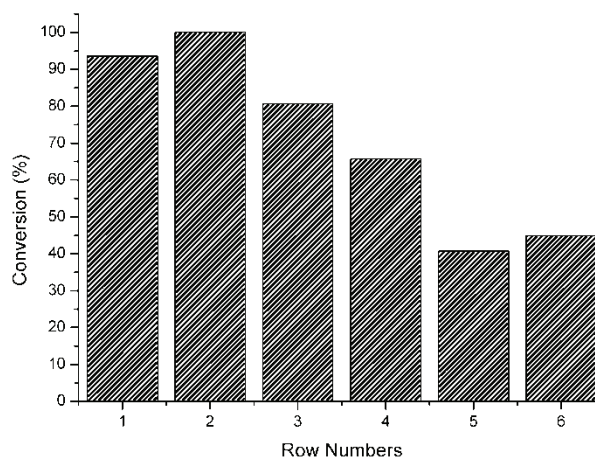


Figure 3. Catalytic activity of HRP immobilized on copolymer SGE-20/12 on repeated batch run.

During first 4 cycles activity was dropping and after that remained constant at 45% of initial activity. Immobilized peroxidase showed good stability under operational conditions and optimization of hydrogen peroxide concentration and delivery to the reaction system could further improve performance of immobilized peroxidase.

Conclusions

In this work HRP was covalent immobilized onto characterized copolymer of glycidyl methacrylate and ethylene glycol dimethacrylate by two covalent methods. The effect of mean pore diameter and surface characteristics of copolymer on enzyme activity and stability has been examined. Overall the enzyme immobilized by periodate method performed substantially better than that immobilized by glutaralde-

hyde. In particular, when HRP was immobilized by periodate method onto copolymer SGE-20/12 with 120 nm mean pore diameter, the biocatalyst showed enhanced specific activity and a rather high thermal stability. The K_m value was determined to be 10.8 mM for the immobilized HRP, approximately 5.6 times higher than that of the free enzyme. Both forms of the enzymes exhibited an optimum at pH 7, but immobilized HRP displayed a broadened pH profile relative to the free one. The operational stability also proved to be satisfactory after five consecutive uses with a residual activity of 45%.

Acknowledgment: This work was supported by Grant No. ON173017 and Grant No. ON172049 sponsored by the Ministry of Education and Science, Republic of Serbia.

Kovalentna imobilizacija peroksidaze rena na makroporozni glicidil metakrilatni kopolimer

U ovom radu peroksidaza iz rena (HRP) je kovalentno imobilizovana na kopolimeru glicidil metakrilata i etilenglikol dimetakrilata pomoću dve kovalentne metode. Ispitani su uticaji prečnika pora i površinskih karakteristika kopolimera na enzimsku aktivnost i stabilnost. Enzim imobilizovan perjodatnom metodom je pokazao veću aktivnost i stabilnost u poređenju sa glutaraldehidnom metodom. HRP imobilizovana na kopolimer SGE-20/12 sa prečnikom pora od 120 nm je pokazala najveću specifičnu aktivnost i dobru termostabilnost. K_m vrednost imobilizata je bila 10,8 mM što je oko 5,6 puta više od rastvornog enzima. Obe forme enzima su pokazale optimum na pH 7, ali je imobilizovana HRP pokazala širi pH optimum u odnosu na rastvornu formu. Operaciona stabilnost je bila zadovoljavajuća i nakon pet uzastopnih upotreba zaostala aktivnost je bila 45%.

References:

1. K. Hernandez, C. Garcia-Galan, R. Fernandez-Lafuente, *Enzyme Microb. Technol.* **49** (2011) 72.
2. Z. Knežević, N. Milosavić, D. Bezbradica, Ž. Jakovljević, R. Prodanović, *Biochem. Eng. J.* **30** (2006) 269.
3. N. Prlainović, Z. Knežević-Jugović, D. Mijin, D. Bezbradica, *Bioproc. Biosyst. Eng.* **34** (2011) 803.
4. R.M. Prodanović, N.B. Milosavić, S.M. Jovanović, T. Ćirković Veličković, Z.M. Vujčić, R.M. Jankov, *Serb. Chem. Soc.* **71** (2006) 339.
5. S.M. Jovanović, A. Nastasović, N.N. Jovanović, K. Jeremić, *Mater. Sci. Forum* **214** (1996) 155.
6. R.D. Schwartz, D.B. Hutchinson, *Enzyme Microb. Technol.* **361** (1981) 361.
7. A.M. Klibanov, T.M. Tu, K.P. Scott, *Science* **221** (1983) 259.
8. M.A. Alonso-Lomillo, O. Dominguez-Renedo, L. del Torno-de Roman, M.J.A. Arcos-Martinez, *Anal. Chim. Acta* **688** (2011) 49.
9. M. Bayramoglu, M.Y.J. Arica, *Hazard. Mater.* **156** (2008) 148.
10. L. Pramparo, F. Stuber, J. Font, A. Fortuny, A. Fabregat, C. Bengoa, *J. Hazard. Mater.* **177** (2010) 990.
11. M. Monier, D.M. Ayad, Y. Wei, A.A. Sarhan, *Int. J. Biol. Macromol.* **46** (2010) 324.
12. S.P. Shukla, K. Modi, P.K. Ghosh, S.J. Devi, *Appl. Polym. Sci.* **91** (2004) 2063.
13. I. Alemzadeh, S. Nejati, *J. Hazard. Mater.* **166** (2009) 1082.
14. S.K. Ozoner, *Chem. Technol. Biotechnol.* **87** (2012) 146.
15. M.Y. Arica, B. Altıntas, G. Bayramoglu, *Bioresource Technol.* **100** (2009) 665.
16. R. Prodanovic, S. Jovanovic, Z. Vujcic, *Biotechnol. Lett.* **23** (2001) 1171.
17. N. Milosavic, R. Prodanovic, S. Jovanovic, Z. Vujcic, *Enzyme Microb. Technol.* **40** (2007) 1422.
18. L. Ferreira, M.A. Ramos, J.S. Dordick, M.H. Gil, *J. Mol. Catal. B- Enzym.* **21** (2003) 189.
19. L.V. Bindhu, E.T. Abraham, *J. Appl. Polym. Sci.* **88** (2003) 1456.

Poređenje četiri metode za imobilizaciju HRP u alginatu radi potencijalne primene u prečišćavanju otpadnih voda

Dragica Spasojević, Miloš Prokopijević, Olivera Prodanović, Ksenija Radotić, Radivoje Prodanović*

*Institut za multidisciplinarna istraživanja, Univerzitet u Beogradu, Kneza Višeslava 1, Beograd,
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Studentski trg 12-16, Beograd

Uvod

Uklanjanje fenola i fenolnih derivata iz spoljašnje sredine predstavlja značajan ekološki problem. Naftna, hemijska i industrija plastičnih masa, samo su neki od izvora otpadnih voda u kojima se nalaze fenol i njegovi derivati. Kao jedan od mogućih načina za uklanjanje ovih toksičnih jedinjenja nameće se njihova enzimaska degradacija. Peroksidaza iz rena (HRP) oksiduje fenole u prisustvu vodonik-peroksida, proizvodeći nestabilne fenoksi radikale, koji onda spontano međusobno reaguju i grade nerastvorne polimere velikih molekulskih masa. Ovi polimeri mogu jednostavno da se uklone iz vode sedimentacijom ili filtracijom.¹

Glavni nedostatak ovog procesa predstavlja inaktivacija enzima. Zbog toga je dosta pažnje usmereno na imobilizaciju HRP u cilju procesovanja velikih količina otpadnih voda. Imobilizacijom enzima prevazilaze se inhibicija krajnjim proizvodom, nemogućnost ponovne upotrebe, nestabilnost, visoka cena i sl.^{2,3}

Mnogi materijali se koriste za imobilizaciju HRP: prirodni i sintetički polimeri, staklene kuglice, jonoizmenjivačke smole i nosači sa magnetnim osobinama.² Alginat se pokazao kao jedan od najpogodnijih polimera za imobilizaciju i mikroenkapsulaciju zahvaljujući svojoj hidrofilnoj prirodi, prisustvu karboksilnih grupa, prirodnom poreklu i stabilnosti pri različitim eksperimentalnim uslovima. Dodatak dvovalentnih katjona (Ca^{2+} , Sr^{2+}) u rastvor natrijum-alginata stimuliše umrežavanje polimernih lanaca i ova gelirajuća osobina koristi se u praksi već mnogo godina. Međutim, usled visoke poroznosti, tokom vremena dolazi do curenja enzima inkapsuliranog u alginat.^{4,5} Da bi se ovo izbeglo razvijaju se različite metode za kovalentnu imobilizaciju HRP.

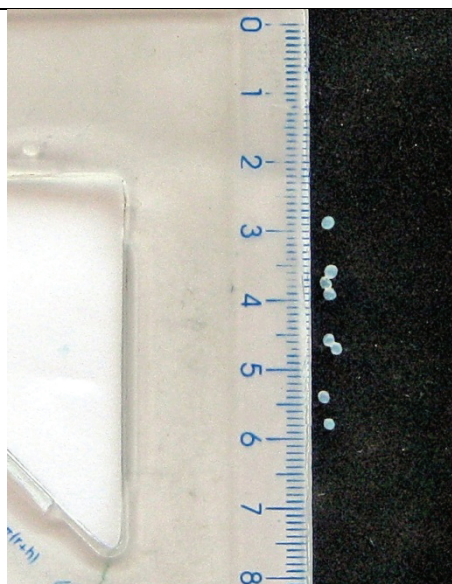
U ovom radu mi smo poredili nekovalentnu imobilizaciju HRP na nativnom alginatu i kovalentne imobilizacije: nemodifikovane HRP na perjodatno aktiviranom alginatu, zatim aminovane HRP na oksidovanom alginatu i oksidovane HRP na aminovanom alginatu.

Rezultati i diskusija

Kako bi pronašli način da što bolje vežemo HRP za alginat, isprobali smo različite metode modifikacije enzima i polimera i uporedili parametre imobilizacije sa klasičnom imobilizacijom nativnog enzima i polimera. Oksidovanje alginata perjodatom rađeno je po proceduri koju je opisao *Le-Tien et al.*⁶ Jedan deo oksidovanog alginata je dalje aminovan etilendiaminom. Postupak oksidovanja i aminovanja je ponovljen i sa HRP po metodi *Husain et al.*⁷ Koncentracija enzima za imobilizacije je iznosila 0,01 mg/ml alginata. 2% rastvor Na-alginata (w/v) koji je korišćen za prvu imobilizaciju je mešan sa modifikovanim alginatima (2%) u odnosu 1:1, da bi se popravile mehaničke osobine imobilizata. Jonotropnim geliranjem u rastvoru CaCl_2 dobijene su kuglice prosečnog prečnika oko 1,5 mm sa imobilisanim enzimima (slike 1 i 2).

Enzimaska aktivnost određivana je spektrofotometrijski na 420 nm, sa pirogalolom kao supstratom uz dodatak vodonik-peroksida.

Količina enzima 1 U je ona koja katalizuje nastanak 1 mol proizvoda za 1 minut na 25 °C i na pH 7,0. Specifična aktivnost predstavlja odnos aktivnosti enzima po masi imobilizata. Vezana aktivnost data je kao razlika nanete i nevezane aktivnosti. Prinos imobilizacije je količnik specifične aktivnosti imobilizata i vezane aktivnosti po jedinici mase kuglica. Zadržana aktivnost u kuglicama imobilizata merena je nakon 5 dana stajanja na 4 °C uz svakodnevno ispiranje kuglica puferom.



Sl. 1. Izgled kuglica sa imobilizovanim enzimom nakon geliranja



Sl. 2. Izgled aparature za ukapavanje i formiranje kuglica imobilizata

Osnovni parametri enzimske aktivnosti imobilizata prikazani su u tabeli 1. Može se videti da svi modifikovani imobilizati imaju veću vezanu aktivnost i veći procenat zadržane specifične aktivnosti (Sp) nakon 5 dana. Imobilizat kod kog je aminovana HRP kovalentno vezana za oksidovani alginat pokazao je najveću specifičnu i vezanu aktivnost, kao i najveći procenat vezivanja enzima i procenat zadržane specifične aktivnosti. Procenat zadržane specifične aktivnosti kod ovog imobilizata je čak 95,56 % u odnosu na početnu aktivnost, što je od posebnog značaja za kontinuiranu upotrebu. Procenat vezivanja enzima od preko 80 % govori u prilog efikasnom iskorišćenju dodatog enzima i time boljoj ekonomičnosti date metode.

Tabela 1. Osnovni parametri za imobilizate, izračunati na osnovu enzimske aktivnosti

Imobilizat:	Sp /(U/g)	vezana aktivnost U/g	vezivanj, %	prinos imobilizacije, %	Sp posle 5 dana, U/g	zadržana Sp, %
alginat+HRP	0,148	0,803	9,69	18,43	0,063	42,57
oksidov.alginat+HRP	0,130	1,108	9,69	11,73	0,081	62,31
aminovani alginat+oksidov.HRP	0,154	1,726	14,10	8,92	0,074	48,05
oks.alginat+amin.HRP	0,428	5,76	81,38	7,43	0,409	95,56

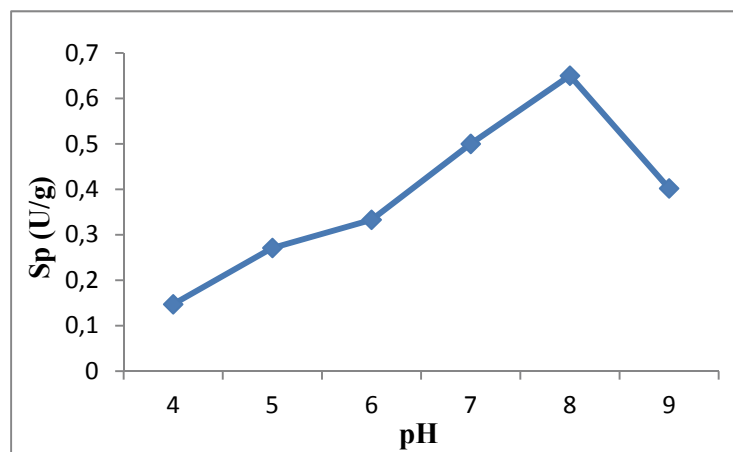
Za najbolji imobilizat – aminovanog enzima na oksidovanom alginatu, odredili smo pH optimum i stabilnost u dioksanu.

pH optimum za naš imobilizat odredili smo koristeći acetatni, HEPES i glicinski pufer za vrednosti pH od 4 do 9 jedinica. Specifična aktivnost na svakom od ovih pH vrednosti prikazana je u tabeli 2.

Tabela 2. Specifična aktivnost imobilizovanog enzima na različitim pH vrednostima

pH	4	5	6	7	8	9
Sp / (U/g)	0,147	0,271	0,333	0,5	0,65	0,402

Sa grafika zavisnosti specifične aktivnosti od pH (slika 3), vidi se da je pH optimum našeg imobilizata na pH 8,0 tj. da naš imobilizat bolje radi u baznijim sredinama u odnosu na nativnu HRP, kojoj je pH optimum 7.⁸



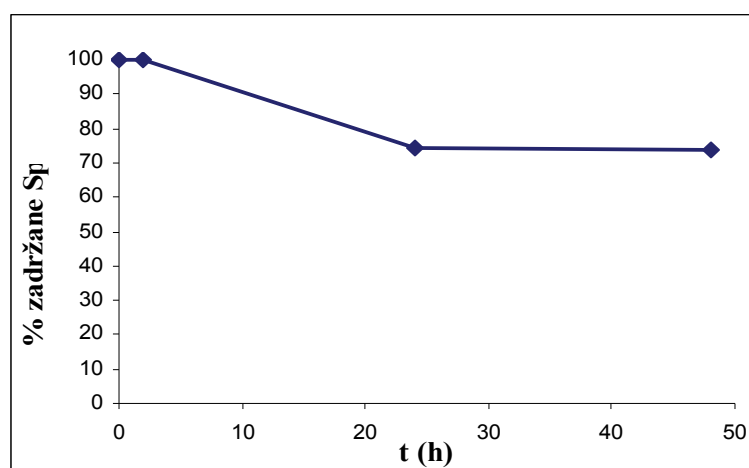
Sl. 3. pH optimum imobilizata

Stabilnost u 80 % dioksanu određena je merenjem specifične aktivnosti imobilizata, nakon inkubacije u ovom organskom rastvaraču, u periodima od 2, 24 i 48 časova.

Tabela 3. Sp imobilizata u 80 % dioksanu

t / h	Sp / (U/g)	zadržana aktivnost, %
0	0,744	100
2	0,743	99,87
24	0,554	74,46
48	0,548	73,66

Vidimo da imobilizovan enzim i nakon 48 časova u organskom rastvaraču zadržava više od 70 % svoje početne aktivnosti. Rastvorna HRP, merena pod istim uslovima, već nakon 2 sata izgubi skoro polovinu početne aktivnosti (zadržana aktivnost je 52,15 %), a nakon 48 časova aktivnost se u potpunosti gubi (zad. aktivnost je 0,15 %).



Sl. 4. Procenat zaostale specifične aktivnosti imobilizata nakon inkubacije u 80 % dioksanu

Zaključak

U ovoj studiji razradili smo jeftinu, jednostavnu i visoko efikasnu metodu za modifikaciju i imobilizaciju HRP na alginatni matriks. Imobilizacijom aminovane HRP na oksidovani alginat dobili smo imobilizat koji pokazuje visoku aktivnost, minimalno curenje i višestruko povećanje procenata vezivanja enzima i zadržane aktivnosti u odnosu na imobilizaciju na nativnom alginatu. Ove osobine predstavljaju dobru osnovu za upotrebu u kontinualnom uklanjanju fenolnih jedinjenja iz vode. Imobilizat je, u odnosu na nativni enzim, pokazao i veću aktivnost u baznoj sredini i mnogo veću aktivnost u dioksanu. Naši budući radovi biće usmereni u pravcu dalje karakterizacije dobijenog imobilizata i pronalaženja optimalnih uslova za rad imobilizovanog enzima, upravo u cilju prečišćavanja otpadnih voda.

Zahvalnica: Ovaj rad je podržan od strane projekta (br. 173017) Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije.

Comparison of four methods for the immobilization of HRP in alginate for potential application in wastewater treatment

Industrial wastewater often contains toxic phenolic compounds, which have been classified as hazardous pollutants. It has been shown that horseradish peroxidase (HRP) is able to react with phenols in water and form non-soluble compounds that could be easily removed from the aqueous phase. The aim of our work was to compare the four methods for the immobilization of HRP on alginate matrix and to find the immobilisate with the best properties. First, we immobilized HRP on the native and periodate oxidized alginate. Then we modified both the enzyme and the polymer and tried immobilizations of aminated HRP on the oxidized alginate and oxidized HRP on the aminated alginate. Immobilizate of aminated enzyme on oxidized matrix showed the best characteristics and potential for application in the continuous removal of phenol from wastewater.

Acknowledgment: This work was supported by a grant (No. 173017) from the Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia

Literatura

1. C. R. Ispas, M. T. Ravalli, A. Steere, S. Andreescu, *Water Research*, **44** (2010) 1961.
2. Alemzadeh, S. Nejati, M. Vossoughi, *Engineering Letters*, **17** (2009) 4.
3. R. Satar, M. Matto, Q. Husain, *J. of Scientific & Industrial Research*, **67** (2008) 609.
4. M. Matto, Q. Husain, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **57** (2009) 164.
5. U. J. Trivedi, A. S. Bassi, J. J. Zhu, *The Canadian Journal of Chemical Engineering* **84** (2006) 239.
6. C. Le-Tien, M. Millette, M. Lacroix, M.-A. Mateescu, *Biotechnology and Applied Biochemistry* **38** (2004) 1.
7. S. Husain, F. Jafri, M. Saleemuddin, *Biochemistry and molecular Biology International* **40** (1996) 1.
8. Alemzadeh, S. Nejati, *Journal of Hazardous Materials*, **166** (2009) 1082.

Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on supports with epoxy groups via covalent attachment

Sonja M. Jakovetić, Rafel Picazo-Espinosa*, Maximino Manzanera*, Željko P. Stojanović**, Radivoje M. Prodanović***, Ružica Đ. Miladinović, Zorica D. Knežević-Jugović

Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Karnegijeva 4, 11000 Belgrade

**Water Research Institute, University of Granada, Ramon y Cajal 4, 18071 Granada*

***IHTM, Njegoševa 12, 11000 Belgrade*

****Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg 12, 11000 Belgrade*

Introduction

Lipases, triacylglycerol acylhydrolase (EC 3.1.1.3), primarily catalyze hydrolysis of triacylglycerols to free fatty acids, di- and monoacylglycerols and glycerol. Nevertheless, lipases have broad substrate specificity and they can catalyze hydrolysis of variety of other esters, as well as formation of ester bonds between acids and alcohols. Unlike esterases, class of enzymes that also catalyze ester bond formation, which mainly hydrolyse water-soluble esters, lipases are activated at the interface of hydrophilic and hydrophobic phase.^{1,2}

Lipases occupy third place in total world enzymes production, just behind proteases and enzymes that catalyze hydrolysis of carbohydrates.³ Main application of lipases, in accordance with their physiological role, is hydrolysis of triglycerides in oleochemical industry.^{4,5} Enantioselectivity made lipases biocatalysts of choice in pharmaceutical and cosmetic industries.⁶ Lipase B from *Candida antarctica*, CALB, due to its stereo- and regioselectivity has been one of the most utilized lipases in pharmaceutical and cosmetic industries. Besides its high selectivity, CALB is also known for its efficiency. These two properties combined made this lipase one of the most studied lipases, mainly used in esterification and transesterification reactions, but also in aminolysis and processes such as kinetic resolutions, etc.

Immobilization of enzymes offers some advantages compared to working with soluble enzymes, mainly concerning operational functioning of an enzyme. Enzymes immobilized on solid supports provide opportunity for working in both, batch and continuous biosystems, facilitation of enzyme recovery and re-usage of biocatalyst, product formation control etc. Increase in enzyme stability may also be achieved. Immobilization of CALB has been tried out with variety of solid supports, including silica functionalized with octyltriethoxysilane, duolite A568, silica gel, CoFoam, activated carbon, octyl- and butyl-agarose, octadecyl-Sepabeads, macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycoldimethacrylate), hydrophobin-agarose, coconut fiber, etc.⁷

Aim of our work was to find optimal method for CALB immobilization on epoxy-activated supports in order to find proper biocatalyst for biodiesel production in a continuous reactor. In order to achieve this, two epoxy-activated supports were chosen, Eupergit C and novel polymer based on poly(glycidylmethacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) (Poly(GMA-co-EGDMA) produced in the form of microbeads. Although the poly(GMA-co-EGDMA) obtained in microbeads form by suspension polymerization has been already successfully used as a carrier for immobilization of invertase, glucoamylase, lipase B and α -glucosidase, most of these studies have been conducted with the copolymer beads with diameters in the range of 150–500 μm . The spherical microbeads produced in this work were a few micrometers in size and rather uniform. First, the effect of pH on conventional immobilization process and activity of obtained biocatalyst has been investigated. After that, the potential of two other covalent methods for immobilization of CALB has been explored including different mechanisms of enzyme attachment on supports, activation with glutaraldehyde and periodate method.

Experimental

Enzyme used in all experiments, *C. antarctica* lipase B (Novozymes CALB), expressed in *Aspergillus niger*, was purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). Immobilization of CALB was done, using two different epoxy activated supports, Eupergit C and novel poly(GMA-co-EGDMA) in the form of microbeads. Eupergit C, was kindly donated by Röhm GmbH & Co. (Darmstadt, Germany), while poly(GMA-co-EGDMA) was synthesized at IHTM. Glutaraldehyde solution, along with 1,2-diaminoethane was purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA).

Immobilization of lipase

Immobilization of lipase was conducted using three different methods in order to find the best way to covalently attach CALB to solid supports. Methods II and III include pre-treatment of epoxy activated carrier with 1,2-diaminoethane, which is described elsewhere.⁸

Method I- lipase immobilization via epoxy groups

Immobilization of lipase was performed simply by binding enzyme to supports directly via epoxy groups. Immobilization was conducted, both with Eupergit C and synthesized novel copolymer, simply by incubating 20 mg of solid support with 1mL of 2% (v/v) lipase solution in 0.1 and 1.25M K-phosphate buffers, pH 7.5 at 25 °C. In order to determine optimal pH for enzyme binding to epoxy activated carrier, immobilization was done in wide range of pH values, pH 4-9, using appropriate 0.1 M buffers for preparation of 2% (v/v) lipase solutions (Na-Acetate buffer for pH 4 and 5, Na-Citrate buffer for pH 6, K-phosphate buffer for pH 7 and 8, Glycine-NaOH buffer for pH 9 and 10).

Method II- lipase immobilization by glutaraldehyde on poly(GMA-co-EGDMA)

Activation of carrier with glutaraldehyde followed treatment of polymer with 1,2-diaminoethane. Immobilization proceeded with enzyme attachment to activated polymer. Glutaraldehyde activation, with 1% glutaraldehyde solution, was conducted according to protocol described elsewhere.^{4,8} After activation, 20 mg of polymer, were incubated with 1mL of 2% (v/v) lipase solution in 0.1M acetic buffer pH 4.

Method III- lipase immobilization by periodate method on poly(GMA-co-EGDMA)

Immobilization of CALB by periodate method included preliminary study of the effect of NaIO₄ concentration in the range of 1-60 µmol/mL, on the activity of the oxidized enzyme. After this, immobilization has been done according to method that has already been described elsewhere^{4,8}.

Determination of lipase activity

Lipase activity was measured spectrophotometrically by using an assay based on the hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate (*p*-NPP) previously described elsewhere.⁹ Assay was adapted for working with immobilized enzymes. 10 mg of immobilized enzyme was supplemented with 2 mL of *p*-NPP solution with continuous stirring. After 3 min, reaction was terminated by centrifuging of reaction mixture, and supernatant absorbance was measured at 410 nm.

Results and discussions

Variety of protocols for covalent immobilization has been developed over the years, but still there are lots of difficulties concerning application of these methods for industrial purposes. Also it should be noted that the immobilization of CALB on different supports can affect and alter enzyme properties, so there is not universally good method applicable for all purposes and conditions. Epoxy-activated supports offer several advantages, involving mild immobilization conditions, stability of supports at neutral pH values suitable for storage and also minimal chemical modifications during immobilization processes.¹⁰

Immobilization of CALB simply by attachment via epoxy groups, was conducted using two different solid supports, commercial Eupergit C, and synthesized poly(GMA-co-EGDMA). All experiments were carried out at two different ionic strengths. Results are presented in Figure 1.

Although both used polymers have epoxy groups, support-enzyme interactions differed, depending on support properties, such as, porosity, number of activated groups available for enzyme binding, particle size etc. Figure 1. shown that the highest activity of 6.2 IU/g of dry support was obtained when synthesized polymer was used. The novel copolymer was proven to be better for CALB immobilization at both applied ionic strengths. This result was probably due to particle size differences, since synthesized polymer particles were fifty times less than Eupergit C (particle size 100 µm), allowing higher specific area for enzyme binding. Fig. 2. shown dependence between particle volume fractions and particle size for novel synthesized copolymer.

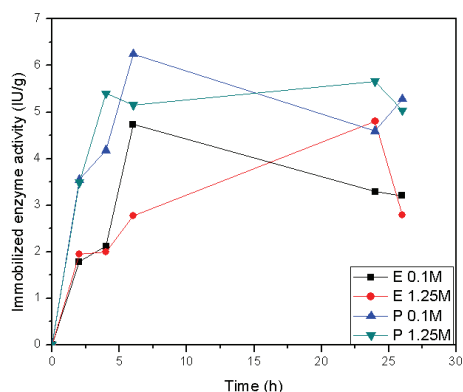


Figure 1. Effect of immobilization time on immobilized enzyme activity. E-Eupergit C; P-poly(GMA-co-EGDMA)

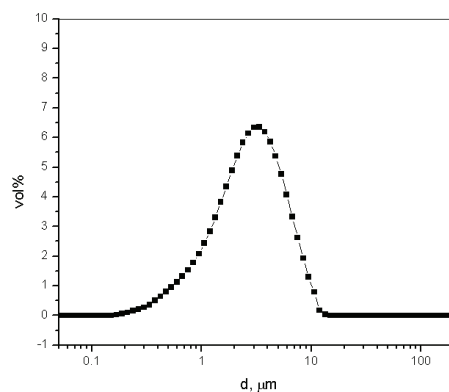


Figure 2. Dependence of the particle volume fractions on particle size

Fig. 1. indicated that immobilization process was completed after 6 hours, when diluted buffer was used, while 24 hours were required for immobilization of CALB in concentrated buffer. At high ionic strengths, hydrophobic interactions between support and enzyme induced enzyme adsorption on support which was followed by reaction between enzyme nucleophilic groups and support epoxy groups. At low ionic strengths enzyme immobilization was faster, indicating that beside hydrophobic interactions, other non-specific interactions may occur between enzyme and support. Considering that both supports have hydrophilic and hydrophobic regions, it was plausible that hydrophilic interactions also occurred. All experiments that followed, were intended to increase immobilized enzyme activity, and therefore only the synthesized polymer was used.

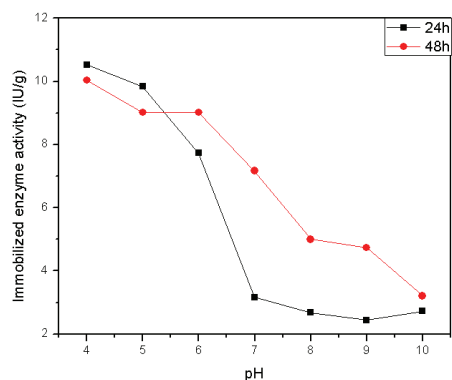


Figure 3. Effect of pH on immobilization of CALB on poly(GMA-co-EGDMA)

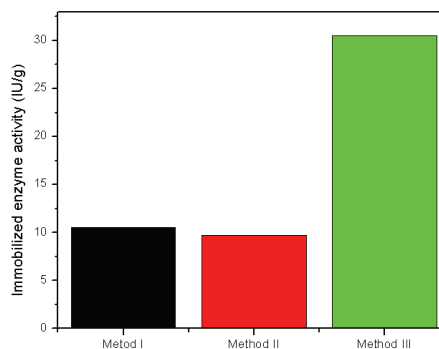


Figure 4. Comparison of enzyme activity obtained with three different immobilization methods at pH 4

The effect of pH on immobilization of lipase B is shown in Fig. 3. The highest activity of immobilized enzymes was achieved when immobilization was conducted in acidic environment. An increase of pH during immobilization process, caused decrease of immobilized enzyme activity, and the lowest activity was obtained at pH 10. Hydrolytic activity, measured by *p*-NPP method, showed that at pH 4, activity increased for 70% compared to pH 7.5. Curves representing immobilized activities after different immobilization periods indicated that immobilization was significantly faster at pH<6. At pH>6 significant discrepancies between two curves can be observed, indicating that immobilization continued in the second day of immobilization. These results were the reason for continuation of experiment using acetic buffer pH 4.

Study of the effect of the concentration of NaIO₄ on the oxidized enzyme activity has shown that activity of the oxidized enzyme remained unchanged at all applied concentrations of oxidizing agent (data not shown).

Three different immobilization methods were employed for immobilization of CALB, in order to design biocatalyst suitable for biodiesel production. As mentioned before, first method involved direct attachment of enzyme via epoxy groups. Second method included binding of enzyme via spacer made from ethylene diamine/glutaraldehyde, and finally the third method involves binding of enzyme using carbohydrate moiety which sustained modification by periodate oxidation.⁴ Results obtained in this study are presented in Fig. 4.

The highest hydrolytic activity of immobilized enzyme, 30.5 IU/g of dry support, was achieved when the third immobilization method was employed. These results suggested that immobilization of CALB by periodate method caused the lowest denaturation of the enzyme among all applied methods. Though, spacer made from ethylenediamine/glutaraldehyde should be expected to improve immobilization by providing distance between enzyme and support, that didn't happen, suggesting that enzyme denaturation occurred during this process. Conventional method for covalent binding of enzyme to epoxy activated supports is allegedly the most natural procedure, since binding occurred directly between enzyme and support.⁴ This is indicating that some loss of activity has occurred during immobilization process, probably due to multiple attachments and reactions with undesirable groups, related to active site and utilized in maintenance of tertiary structure of enzyme.

Comparison of obtained results with literature data may be difficult, because different authors used variety of substrates for determination of both hydrolytic and esterification activities. Nevertheless comparison can be made using commercial CALB preparation, Novozyme 435, as the reference. Hydrolytic activity of commercial CALB has been determined on the same way as it has been described above, and it was found that Novozyme 435 has 111 IU/g of dry support. It can be seen that biocatalysts obtained in this study have 30% less hydrolytic activity, but it is still high comparable to other literature data which achieved only 10% of catalytic activity of commercial immobilized CALB.⁷

Conclusion

The objective of this study was to examine the suitability of novel synthesized macroporous polymer, poly(GMA-co-EGDMA), as an immobilization matrix for CALB in order to obtain biocatalyst applicable for biodiesel production in a continuous systems. The copolymer was designed for the first time in the form of highly porous microbeads being a few micrometers in size (<10 μm) and rather uniform. The immobilization results were compared with those obtained on commercial Eupergit C, showing that the novel copolymer exhibited better performance in terms of enzyme loading and activity. Further, three immobilization methods were employed for immobilization of CALB on synthesized polymer, and all three were conducted successfully. Acidic environment was shown to be the best for immobilization of CALB on this polymer. Results obtained in this research showed that immobilization of CALB using periodate method gave immobilized enzyme with hydrolytic activity comparable with commercial immobilized CALB preparation, Novozyme 435. The synthetic copolymer produced could be very promising for the development of low-cost, easy to prepare and stable biocatalysts because it exhibits some interesting properties such as excellent thermal and chemical stability and provides suitable surface for covalent binding of enzymes.

Acknowledgements: This work was supported by Grant numbers E!6750 and III 46010 from the Ministry of the Education and Science, Republic of Serbia.

Kovalentna imobilizacija lipaze B iz *Candida antarctica* na nosače sa epoksidnim grupama

*U ovom radu izvedena je kovalentna imobilizacija lipaze B iz *Candida antarctica* koristeći tri različite metode imobilizacije i dva različita nosača sa epoksidnim grupama, komercijalni Eupergit C i novi sintetisani makroporozni kopolimer glicidimetakrilata (GMA) i etilenglikoldimetakrilat (EGDMA). Sintetisani polimer se pokazao kao bolji za imobilizaciju CALB, pri obe upotrebljene jonske jačine, 0.1M i 1.25M. Ispitivanjem uticaja pH na aktivnost dobijenih imobilizata, pokazalo se da su biokatalizatori dobijeni imobilizacijom u kiseloj sredini, najaktivniji. Imobilizacija enzima primenom glutaraldehidne metode negativno je uticala na aktivnost dobijenih imobilizata. Najveću aktivnost, 30,5 IU/g suvog nosača, što je skoro šest puta više nego aktivnost dobijena direktnim vezivanjem enzima za nosač preko epoksidnih grupa, ostvarena je kada je za kovalentnu imobilizaciju korišćena perjodatna metoda.*

References

1. J. Uppenberg, M.T. Hansen, S. Patkar, T.A. Jones, *Structure* **2** (1994) 293.
2. D. S. Rodrigues, A. A. Mendes, W. S. Adriano, L. R. B. Gonçalves, R. L. C. Giordano, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **51**, (2008) 100.
3. F. Hasan, A. Shah, A. Hameed, *Enzyme Microb. Technol.* **39** (2006) 235.
4. Z. Knežević, N. Milosavić, D. Bezbradica, Z. Jakovljević, R. Prodanović, *Biochem. Eng. J.* **30** (2006) 269.
5. Z. Knežević, S. Šiler-Marinković, Lj. Mojović, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49** (1998) 267.
6. A. Idris, A. Bukhari, *Biotechnol. Adv.* **30**, (2012) 550.
7. A. Brígida, Á. Pinheiro, A. Ferreira, L. Gonçalves, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **146** (2008) 173.
8. R. Prodanović, S. Jovanović, Z. Vujčić, *Biotechnol. Lett.* **27** (2001) 1171.
9. D. Bezbradica, B. Jugović, M. Gvozdenović, S. Jakovetić, Z. Knežević-Jugović, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **70** (2011) 55.
10. C. Mateo, O. Abian, G. Fernandez-Lorente, C. Benevides, C. Pessela, V. Grazu, J.M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente in *Immobilization-Stabilization of Enzymes by Multipoint Covalent Attachment on Supports Activated With Epoxy Groups*, J.M. Guisan Ed., Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 2006, p. 47

Uklanjanje vodonik-sulfida iz efluenta anaerobno prečišćene otpadne vode

Dragana V. Kukić, Marina B. Šćiban, Mile T. Klašnja, Jelena M. Prodanović, Vesna M. Vasić

Tehnološki fakultet, Bulevar Cara Lazara 1, Novi Sad

Uvod

Otpadne vode prehrambene industrije predstavljaju veliko opterećenje za životnu sredinu jer sa sobom nose veliku količinu organske materije. Njihovim ispuštanjem u prijemnike, bez prečišćavanja, spontano dolazi do razgradnje biorazgradive organske materije mikroorganizmima prirodno prisutnim u vodi, što dovodi do smanjenja koncentracije kiseonika rastvorenog u vodi. Ukoliko je količina organske materije uneta sa otpadnom vodom tolika da nadmašuje kapacitet reoksigenacije vode, dolazi do smanjenja koncentracije rastvorenog kiseonika u vodi čime se ugrožava živi svet recipijenta. Da bi se to sprečilo, ovakve vode se prečišćavaju anaerobnim biološkim postupkom koji se zasniva na metanskom vrenju. Metansko vrenje je niz biohemijskih reakcija posredovanih složenom mikroflorom kojim se organska materija prevodi u biogas.¹ Ukoliko otpadne vode industrije sadrže sulfate, oni se u procesu metanskog vrenja prevode u vodonik-sulfid. Prema Uredbi o graničnim vrednostima emisije zagađujućih materija u vodu, u prečišćenoj tehnološkoj otpadnoj vodi pre ispuštanja u kanalizaciju dozvoljen sadržaj sulfida je 5 mg/dm³, a hemijska potrošnja kiseonika (HPK) 1000 mg/dm³.² Nastali H₂S može ometati proces obrade vode (tokičan je za mikroorganizme) i proizvodnju metana, uzrokovati neprijatne mirise i koroziju, zbog čega ga je neophodno ukloniti kako iz biogasa, tako i iz anaerobno prečišćene otpadne vode.^{3,4} Postoji više načina uklanjanja vodonik-sulfida.⁵

U ovom radu ispitan je uticaj pH vrednosti otpadne vode na uklanjanje vodonik-sulfida iz otpadne vode prođuvavanjem sa vazduhom i dat je predlog tehnološkog postupka uklanjanja sulfida iz anaerobno prečišćene otpadne vode.

Rezultati i diskusija

Ispitani uzorak vode predstavlja anaerobno prečišćenu otpadnu vodu iz jedne naše fabrike, koja je naknadno obogaćena sa Na₂S. Voda je uzeta iz digestora, sa nivoa sa kog se uzimaju uzorci za analizu i čuvana na odgovarajućim uslovima (4°C). Nakon obogaćivanja sa Na₂S, izvršena je analiza uzorka. U otpadnoj vodi su određeni pH, sadržaj H₂S, HPK i sadržaj azota u različitim oblicima, kao amonijak, organski azot i nitrati, prema standardnim metodama analize.⁶ Rezultati analize prikazani su u tabeli 1.

Tabela 1. Hemijski sastav otpadne vode

Parametar	Vrednost
C _{H₂S} / mg dm ⁻³	236,75
HPK / mg dm ⁻³	3407
C _{Amonijak} / mg dm ⁻³	658,5
C _{Organski azot} / mg dm ⁻³	53,13
C _{Nitrati} / mg dm ⁻³	5,89
pH	9,38

Na osnovu visoke vrednosti HPK analizirane vode može se zaključiti da primenjeni postupak anaerobnog prečišćavanja nije dovoljno efikasan da bi se prečišćena otpadna voda mogla odmah ispustiti u recipijent ili kanalizaciju nego je potrebno da se dodatno prečisti aerobnim biološkim postupkom, što se u pomenutoj fabrici i čini. pH vrednost je visoka, dok su ostali parametri u intervalima koji se očekuju za ovakve otpadne vode. Eksperimenti su izvedeni na aparaturi koja se sastojala od akvarijumske pumpe, ultratermostata, ispiralice i rotametra. Ogledi su rađeni na 35°C, odnosno na temperaturi na kojoj je vršen anaerobni tremtan. Snižavanje pH sa originalne vrednosti za po 0,4 jedinice postignuto je dodavanjem određene količine 0,25M HCl u otpadnu vodu neposredno pre izvođenja oglada. Prođuvavanje vazduha je rađeno u trajanju od 30 minuta pri konstantnom protoku od 15 dm³/h, što u odnosu na količinu uzorka otpadne vode iznosi oko 50 dm³ vazduha po 1 dm³ vode. Nakon svakog oglada urađena je analiza uzorka otpadne vode (tabela 2).

Na osnovu podataka prikazanih u tabeli 2 vidi se da se koncentracija vodonik-sulfida produvanjem na originalnom pH smanjila za 153 mg/dm³ tj., iznosi 124,4 mg/dm³, a smanjenjem pH vrednosti za samo 0,4 jedinice koncentracija vodonik-sulfida nakon produvanja pada na svega 36,1 mg/dm³. Daljim snižavanjem pH vrednosti smanjuje se i koncentracija vodonik-sulfida sve do pH 7,2 pri kom je uklonjen sav vodonik-sulfid. Što se tiče sadržaja vodonik-sulfida, ovako obrađena voda se može ispustiti direktno u recipijent, sa obzirom da je on uklonjen, a i pH vrednost nakon produvanja je u dozvoljenom intervalu.²

Tabela 2. Uticaj pH vrednosti na uklanjanje vodonik-sulfida

pH	pH nakon produvanja	c _{H₂S} / mg dm ⁻³ pre produvanja	c _{H₂S} / mg dm ⁻³ nakon roduvanja	Δ c _{H₂S} / mg dm ⁻³
9,38	9,32	277,4	124,4	153,0
8,80	9,00	277,4	36,1	241,3
8,40	8,90	235,3	27,3	253,6
8,00	8,76	235,4	16,7	268,7
7,60	8,67	234,9	12,8	272,0
7,20	8,51	286,0	00,0	236,0

U tretiranoj otpadnoj vodi je praćena i vrednost hemijske potrošnje kiseonika (HPK) kao pokazatelja ukupnog sadržaja organskih materija u vodi. Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 3.

Tabela 3. Zavisnost HKP od pH vrednosti otpadne vode nakon produvanja sa vazduhom

pH	pH nakon produvanja	HPK / mg dm ⁻³ pre produvanja	HPK / mg dm ⁻³ nakon roduvanja	Δ HPK / mg dm ⁻³
9,38	9,32	3423	3115	307
8,80	9,00	3900	3475	425
8,40	8,90	3423	2926	497
8,00	8,76	3353	2754	599
7,60	8,67	3423	2653	769
7,20	8,51	3673	2692	981

Iz podataka prikazanih u tabeli 3 može se videti da se snižavanjem pH ispitivane otpadne vode smanjivao i HPK nakon produvanja vazduhom, što znači da je voda jednim delom prečišćena. Naime, u otpadnoj vodi ove fabrike, veliki deo zagađenja potiče od masnih kiselina i masnih alkohola, ali i od vodonik-sulfida i amonijaka. Produvanjem je uklonjen slobodni vodonik-sulfid, deo amonijaka, a moguće i neke organske isparljive materije.

Na slici 1 prikazana je zavisnost efikasnosti uklanjanja H₂S (ΔH₂S,%) i smanjenja HPK (ΔHPK, %) od pH vrednosti ispitivane otpadne vode nakon produvanja vazduhom. Može se zaključiti da se sa porastom udela uklonjenog vodonik-sulfida smanjuje koncentracija HPK, tj. samanjuje se zagađenost vode. Pri potpunom izdvajanju H₂S, organsko zagađenje anaerobno prečešćene otpadne vode je smanjeno za 26%, pri neutralnom pH.

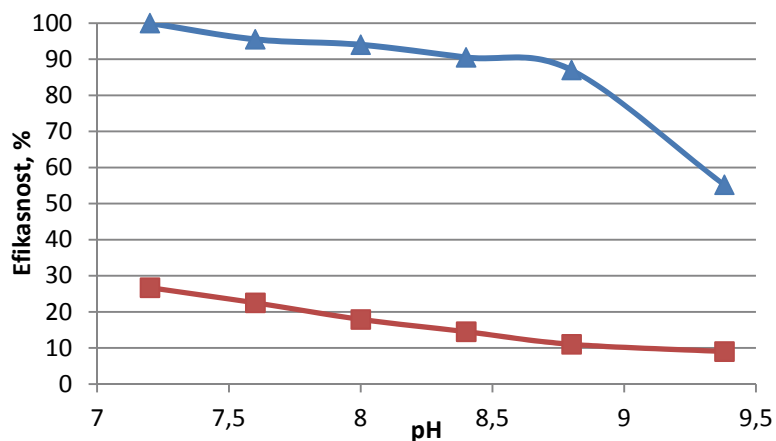
Sa slike 1 se vidi da se smanjenjem pH vrednosti otpadne vode sa 9,38 na 8,8 postiže značajno povećanje efikasnosti uklanjanja H₂S, sa 55,2% na 87,2%, i relativno malo smanjenje HPK od 9 % i 11 %, sledstveno. Iako se sa većom količinom kiseline, kada se pH otpadne vode smanji na 7,2, postiže malo poboljšanje uklanjanja H₂S i HPK, ipak se mora raditi pri ovom pH jer se tada postiže potpuno uklanjanje H₂S.

Na osnovu izvedenih ogleđa i dobijenih rezultata predložen je tehnološki postupak uklanjanja sulfida iz anaerobno prečišćene otpadne vode.

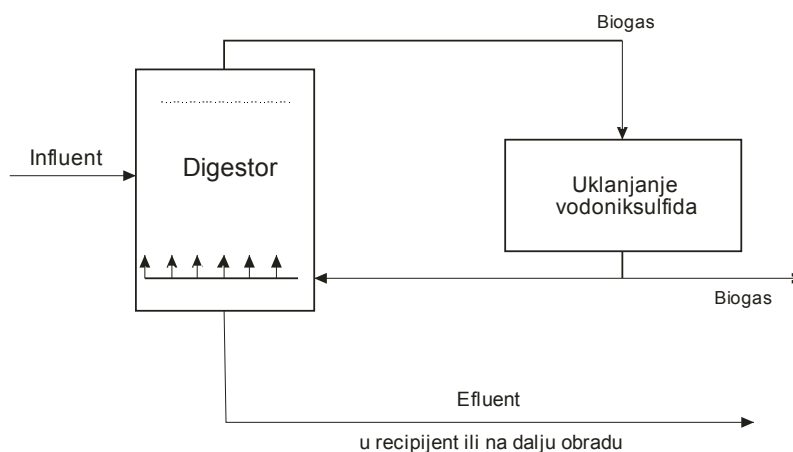
Mogu se postaviti dve šeme tehnološkog postupka:

- uklanjanje H₂S iz tečne faze u samom digestoru ili
- uklanjanje vodonik-sulfida iz efluenta.

Prednost postupka sa uklanjanjem vodonik-sulfida u samom digestoru je taj što se time sprečava, tj. smanjuje inhibicija metanskog vrenja izazvana vodonik-sulfidom. Šema postupka prikazana je na slici 2. Uklanjanje vodonik-sulfida iz digestorske tečnosti vrši se barbotiranjem sa biogasom koji je prethodno prečišćen od H_2S . Za neke digestore, poput digestora sa slojem mulja ili klipnih digestora, ovaj postupak nije pogodan zbog mogućnosti osiromašenja ili ispiranja mikroflore. Za efikasno uklanjanje H_2S iz digestora potrebna je velika površina kontakta biogasa i digestorske tečnosti što se može postići proizvodnjom velikih količina prečišćenog biogasa, što može biti ekonomski neisplativo. Ovaj način rada je opravdan ukoliko je predviđeno da se sadržaj digestora meša barbotiranjem biogasa, a ne na neki drugi način.

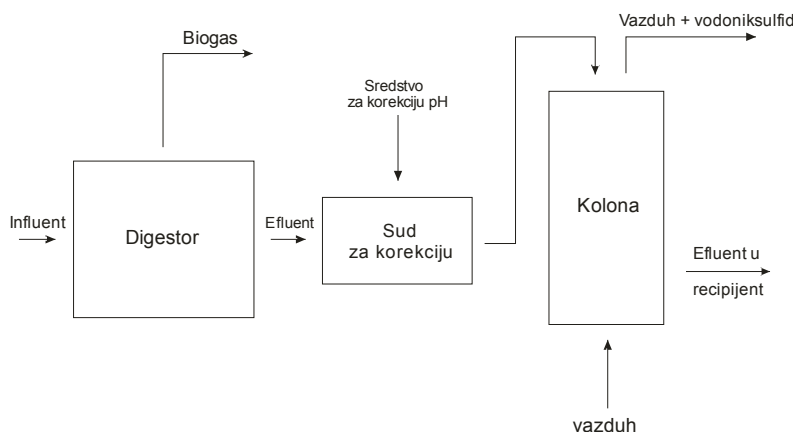


Slika 1. Efikasnost uklanjanja H_2S (-Δ-) i HPK (-□-) u zavisnosti od pH vrednosti otpadne vode



Slika 2. Šema uklanjanja vodonik-sulfida u digestoru

Drugi postupak podrazumeva uklanjanje vodonik-sulfida iz efluenta anaerobno prečišćene otpadne vode. Šema postupka data je na slici 3.



Slika 3. Šema uklanjanja vodonik-sulfida iz efluenta anaerobno prečišćene otpadne vode

Nakon izlaska iz digestora prečišćena otpadna voda se odvodi u poseban prihvatni sud gde se najpre vrši korekcija pH, a zatim se prođuvavanje vazduhom izvodi u koloni, čime se uklanja H₂S. Kao i u slučaju postupka uklanjanja H₂S u digestoru i ovde je vrlo bitno povećati površinu kontakta efluenta i vazduha. To se može ostvariti prođuvavanjem velikih količina vazduha pomoću kompresora. Međutim, ovakvo rešenje je za industrijsku primenu veoma skupo, pa se umesto toga predlaže korišćenje kolone sa podovima ili kolone sa ispunom (rašigovi prstenovi). Na taj način se ostvaruje zadovoljavajuća površina kontakta.

Prednost uklanjanja H₂S prođuvavanjem vazduhom u koloni u kojoj se raspršuje voda preko podova ili ispune, nad barbotiranjem je i u tome što se dobija daleko manja količina vazduha onečišćenog sa H₂S. Ukoliko je potrebno taj vazduh prečistiti pre ispuštanja u atmosferu, za tu svrhu su potrebni i uređaji za prečišćavanje manjih dimenzija. Time ceo postupak prečišćavanja zahteva manje troškove.

Zaključak

Eksperimenti obuhvaćeni ovim radom izvedeni su u cilju ispitivanja uticaja pH vrednosti anaerobno obrađene vode pri uklanjanju vodonik-sulfida barbotiranjem sa vazduhom. Na osnovu dobijenih rezultata, zaključeno je da je za potpuno uklanjanje vodonik-sulfida potrebno smanjiti pH vrednost otpadne vode do 7,2. Pri tome je ostvareno i smanjenje sadržaja organskih materija u otpadnoj vodi, izraženo kao HPK, za preko 25%.

Potpuno uklanjanje vodonik-sulfida iz prethodno anaerobno prečišćene vode postignuto je na pH 7,2 pri konstantnom protoku vazduha u trajanju od 30 minuta. Praćenjem sadržaja organske materije izražene preko HPK, u ovim eksperimentima primećeno je smanjenje vrednosti HPK sa porastom udela uklonjenog H₂S. Pri potpunom uklanjanju vodonik-sulfida postignuto je i smanjenje HPK od 26%. Razmatranjem ovih rezultata predložena su dva tehnološka postupka uklanjanja vodonik-sulfida iz ove otpadne vode - postupak uklanjanja H₂S iz tečne faze u digestoru i postupak njegovog uklanjanja iz efluenta. Drugi predloženi postupak ima veće prednosti koje se u ogledaju u manjoj količini vazduha onečišćenog sa H₂S, a samim tim i manjim troškovima celokupnog postupka.

Zahvalnica: Ovaj rad je deo Projekta TR-31002 koji je finansiran od strane Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije.

Removal of hydrogen sulfide from effluent of anaerobic treated wastewater

Wastewaters from food industry represent a large burden on environment because they contain a large amount of organic matter. If they are released without previous treatment, spontaneous decomposition of organic matter occurs by microorganisms naturally present in water leads to a reduction of oxygen dissolved in water. The reduction of oxygen dissolved in water affects aquatic life of the recipient. To prevent this, wastewaters are treated by biological anaerobic process based on methane fermentation. Some wastewaters contain high level of sulphate that are transformed into hydrogen sulfide in the process of methane fermentation. Hydrogen sulfide is toxic for microorganisms, therefore hinders the process of water treatment and methane production, causing odors and corrosion. Therefore, it is necessary to remove hydrogen sulfide from the biogas and from the anaerobically treated water. The aim of this work is to investigate the effect of pH value of wastewater on removal of hydrogen sulfide by air blowing. We also suggested technological proposition for hydrogen sulfide removal from anaerobically treated wastewater. Total removal of H₂S from anaerobically treated water is achieved on pH 7.2. Also, with the reduction of H₂S percentage the value of COD decreased. Reduction of COD value for 26% is achieved with total removal of H₂S.

Literatura:

1. M. Klašnja, M. Šćiban, *Acta Periodica Tehnologica*, **31**. (2000) 3.
2. Uredba o graničnim vrednostim emisije u zagađujućih materija u vode i rokovima za njihovo dostizanje, *Službeni galsnik RS*, 67/11, 2011.
3. S. Zub, T. Kurisoo, A. Menert, V. Blonskaja, *Water and Environmental Journal*, **22**. (2008) 274.
4. W.C. Kuo, T.Y. Shu, *Journal of Hazardous Materials*, **113**. (2004) 147.
5. Reference Document on Best Available Techniques in the Food, Drink and Milk Industries, European Commission, Integradet Pollution Prevention and Control, http://eippcb.jrc.es/reference/BREF/fdm_bref_0806.pdf, (30. april, 2011.)
6. APHA (American Public Health Association) (1998), *Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwate*, 20th ed., APHA, AWWA, WEF, Washington DC.

Hemija i tehnologija makromolekula / Chemistry and Technology of Macromolecules

Mehanička i termička svojstva nanokompozita na bazi epoksidne smole i nanoglina

Miloš D. Tomić, Branko Dunjić, Violeta Likić*, Jelena Rogan, Nevenka Rajić, Jasna Đonlagić

Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Karnegijeva 4, 11000 Beograd

**Zvezda-Helios, Radovana Grkovića 24, 32000 Gornji Milanovac*

Izvod Poznato je da se mehanička, termička, a posebno barijerna i antikorozivna svojstva polimernih premaza mogu poboljšati dodatkom malih količina nanoglina u polimernu matricu. U ovom radu je prikazana serija nanokompozita (NC) na bazi komercijalne epoksidne smole i hemijski modifikovane nanogline (Cloisite 30B) sa različitim sadržajem gline (1 - 10 mas.%), pripremljena postupkom iz rastvora. Na osnovu WAXD i SEM analize je utvrđeno da NC sa sadržajem gline do 5 mas.% imaju eksfoliranu strukturu i da je glina u potpunosti raslojena do nanometarskih dimenzija. Pri sadržajima gline većim od 5 mas.% struktura NC je mešavina interkalarne i eksfolirane. Termogravimetrijska analiza je pokazala da je NC sa 1 mas.% gline termički najstabilniji što se može pripisati prisustvu eksfolirane strukture i poboljšanju barijernih svojstava. Mehanička svojstva NC, analizirana pomoću dinamičko-mehaničke spektroskopije, značajno se poboljšavaju dodatkom gline što se manifestuje porastom modula sačuvane energije, G' , u staklastom i u gumolikom stanju. Reološka ispitivanja i termička analiza su potvrdila da temperatura ostakljivanja (T_g) nanokompozita opada sa dodatkom gline do 5 mas.% kao posledica eksfolirane strukture, dok pri sadržaju gline od 5 do 10 mas.% T_g se ne menja ili raste kao posledica interkalacione strukture nanokompozita.

Uvod

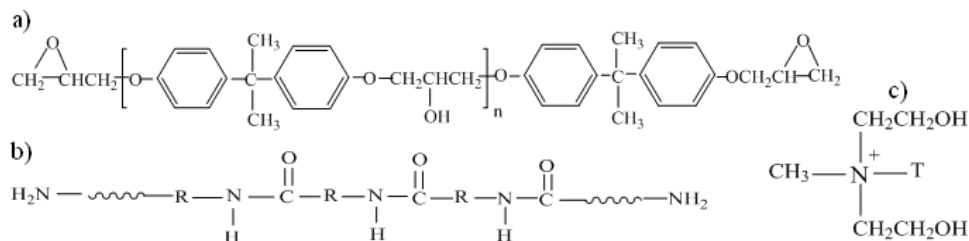
Poslednjih godina polimerni nanokompoziti sa nanoglinama kao puniocima privlače veliku pažnju akademske i industrijske javnosti pošto su dodatkom malih količina nanočestica gline, zahvaljujući velikoj specifičnoj površini ($750 \text{ m}^2/\text{g}$), značajno poboljšana mehanička, termička, a posebno barijerna i antikorozivna svojstva. Nanokompoziti na bazi epoksidne smole i glina imaju značajnu primenu kao antikorozivni premazi budući da epoksidna smola pokazuje izvanrednu hemijsku otpornost i veliki stepen adhezije prema metalnim podlogama, a dodatkom glina nanometarskih dimenzija antikorozivna i barijerna svojstva postaju još bolja¹⁻⁵. Za dobijanje nanokompozita i dispergovanje gline u hidrofobnoj polimernoj matrici neophodno je slojevitou strukturu gline raslojiti⁶ što se postiže modifikovanjem površine gline organskim modifikatorima. Predmet ovog rada je priprema nanokompozita na bazi epoksidne smole i hemijski modifikovane gline – montmorilonita pomoću kvaternernog alkil amonijum-jona i ispitivanje uticaja dodatka ovako modifikovane gline na mehanička i termička svojstva. Serija nanokompozita na bazi komercijalne epoksidne smole CHS-EPOXY 210-X-75 (diglicidil-etar bisfenola A) i višefunkcionalnog vrlo reaktivnog poliamido-amina, umreživača, EPICURE 3115-X-70, je pripremljena polimerizacijom u rastvoru, u prisustvu organo-modifikovane gline nanometarskih dimenzija (Cloisite-a 30B) (slika 1). Struktura nanokompozita je ispitana rendgenskom difrakcijom pri širokim uglovima (WAXD) i skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM). Uticaj količine i stepena dispergovanja gline na mehanička svojstva pripremljenih nanokompozita određen je dinamičko-mehaničkom analizom (DMA). Termička svojstva nanokompozita ispitivana su određivanjem temperature ostakljivanja (T_g) i termičke stabilnosti. Vrednosti T_g određene su pomoću diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC) kao i dinamičko-mehaničkom analizom (DMA), dok je termička stabilnost ispitana termogravimetrijskom analizom (TGA).

Eksperimentalni deo

Reaktanti

Za pripremu nanokompozita korišćena je komercijalna epoksidna smola (CHS-EPOXY 210-X-75, Spolchemie a.s.), dostupna u vidu 75 mas.% rastvora u ksilenu. Epoksidna smola je umrežavana pomoću višefunkcionalnog poliamido-amina (EPICURE 3115-X-70, Momentive) u obliku 70 mas.% rastvora u ksilenu. Kao glina upotrebljen je prirodni montmorilonit modifikovan metil-talovo ulje-bis-2-hidroksietil kvaternernim amonijum solima (Cloisite 30B, Southern clay products Inc.). Takođe, kao

razređivač korišćena je smeša rastvarača sa 79 mas.% ksilena, 10 mas.% butanola i 11 mas.% metil-etil-ketona.



Slika 1. Struktura diglicidil-etra bisfenola A (a), poliamido-amina (b) i modifikatora gline (c).

Priprema nanokompozita

Nanokompoziti su pripremani postupkom iz rastvora. Prvo je pripremljena 10 mas.% disperzija Cloisite-a 30B u smeši rastvarača, na magnetnoj mešalici pri brzini od 1000 ob/min tokom 1 h na sobnoj temperaturi, a zatim 1,5 h na 60 °C. Nakon toga, izvršena je sonifikacija tokom 10 min na 25 °C u ultrazvučnom kupatilu. Zatim su disperzija Cloisite-a 30B i rastvor epoksidne smole umešavani na magnetnoj mešalici tokom 15 min pri 150 ob/min i 5 min pri 200 ob/min na sobnoj temperaturi. U smešu je zatim dodat umreživač (u masenom odnosu 5:1) i mešanje je nastavljeno još 10 min na sobnoj temperaturi pri brzini 150 ob/min. Na kraju je izvršena sonifikacija 10 min na 25 °C. Uzorci nanokompozita su dobijeni izlivanjem u teflonske kalupe, potom su sušeni na sobnoj temperaturi tokom 3 dana, a onda ostavljani u sušnicu do potpunog uklanjanja rastvarača i umrežavanja tokom 1h na 100 °C i 4 h na 150 °C. Da bi se uklonili i poslednji tragovi rastvarača uzorci su 3 dana sušeni u vakuum sušnici na 80 °C. Pripremljena je serija epoksidnih nanokompozita sa 1 mas.% (NC1), 3 mas.% (NC3), 5 mas.% (NC5), 8 mas.% (NC8) i 10 mas.% (NC10) Cloisite-a 30B, kao i umrežena epoksidna smola bez gline (NC0).

Karakterizacija nanokompozita

Rendgenska difrakcija pri širokim uglovima (WAXD) je korišćena za ispitivanje strukture nanokompozita, odnosno za određivanje rastojanja slojeva u organo-modifikovanoj glini. Analiza je izvedena u opsegu 2 θ od 3° do 60° na sobnoj temperaturi, primenom CuK α zračenja talasne dužine 0,15418 nm sa korakom od 0,02° i vremenom zadržavanja od 0,5 s. Za snimanje je korišćen difraktometar za prah ItalStructure APD2000 sa Bragg-Brentano geometrijom. Struktura nanokompozita ispitivana je i SEM metodom. Uzorci nanokompozita su prvo lomljeni u tečnom azotu, a zatim obloženi u tankom filmu legurom zlata. Za SEM analizu korišćen je Jeol JSM 5800 pri naponu od 10 kV, pritisku od 10⁻⁵ Pa. Termička svojstva uzoraka ispitana su pomoću termijske analize i određivanja temperature ostakljivanja (T_g). T_g je određivana DSC metodom. Uzorak je prvo zagrevan do 200 °C brzinom 10 °C/min i ohlađen do 30 °C, a zatim ponovo zagrevan do 200 °C brzinom od 10 °C/min. T_g je određivana u drugom ciklusu zagrevanja. Termička stabilnost uzoraka ispitana je termogravimetrijskom analizom (TG) u oblasti 30 °C do 800 °C pri brzini zagrevanja od 10 °C/min. DSC i TG merenja su izvedena u struji azota pri protoku od 0,1 dm³/min pomoću termogravimetra SDT Q600 (TA instruments). Mehanička svojstva nanokompozita kao i T_g ispitana su metodom DMA. Uzorci nanokompozita pravougaone geometrije (40 mm × 12 mm × 2 mm) ispitivani su u ogledima uvijanja pri deformaciji od 0,1 % i frekvenciji od 1 Hz pri čemu su zagrevani u opsegu 30-220 °C sa korakom od 5 °C i vremenom zadržavanja 0,5 min. Za DMA analizu upotrebljen je mehanički spektrometar RMS 605 (Rheometrics).

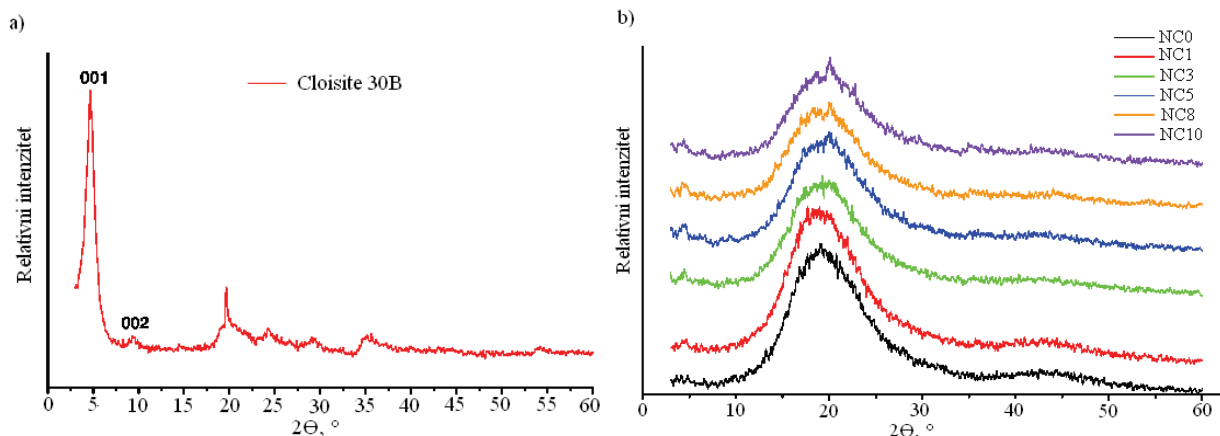
Rezultati i diskusija

Rendgenska difrakcija pri širokim uglovima (WAXD) epoksidnih nanokompozita

WAXD analizom je određivano d -rastojanje čistog Cloisite-a 30B i Cloisite-a 30B u nanokompozitima. Na slici 2 prikazan je difraktogram Cloisite-a 30B i nanokompozita.

Na difraktogramu Cloisite-a 30B (slika 2a) uočava se intenzivna refleksija sa (001) ravni (4,7 °, 2 θ) i refleksija vrlo slabog intenziteta sa (002) ravni (9,4 °, 2 θ), kojoj odgovara vrednost d -rastojanja od 1,88 nm. Na difraktogramu umrežene epoksidne smole postoji i oštar pik na 20 °, karakterističan za neuređenu strukturu epoksidne smole⁶. Kod difraktograma nanokompozita (slika 2b) vidljiv je širok i

razvučen pik na oko 20° koji potiče od umrežene epoksidne smole, dok se ne uočavaju pikovi karakteristični za glinu, Cloisite-a 30B.

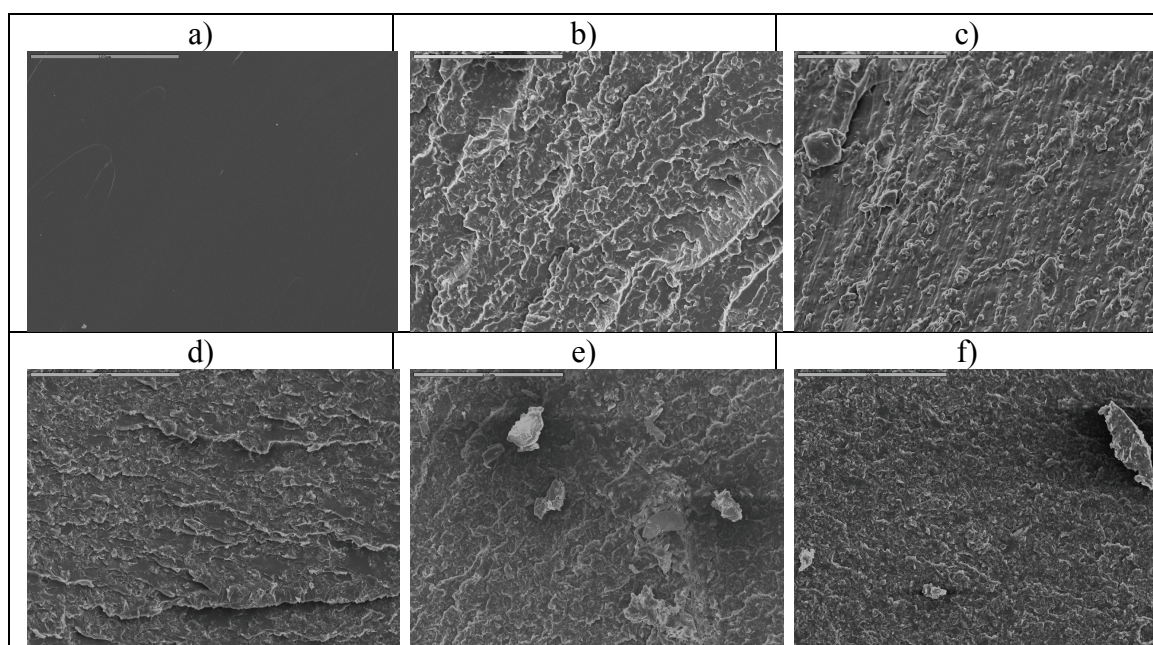


Slika 2. Difraktogram Cloisite-a 30B (a) i nanokompozita (b).

Izostanak pikova koji potiču od gline ukazuje da je došlo do porasta d -rastojanja i da su refleksije pomerene ka manjim uglovima od 3° ili ih uopšte nema. Zbog ograničenosti metode da meri u opsegu $0-3^\circ$ ne može se odrediti da li su pikovi pomereni ispod 3° ili ih nema, odnosno ne može se odrediti da li je došlo do interkalacije ili eksfolijacije. Drugim rečima, može se zaključiti da je vrednost d -rastojanja Cloisite-a 30B u nanokompozitima veća od 2,95 nm ili da je Cloisite 30B potpuno dispergovan u epoksidnoj smoli.

Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) epoksidnih nanokompozita

SEM fotografije uzoraka epoksidne smole i epoksi-nanokompozita sa 1 do 10 mas.% gline pri uvećanju od 500 puta prikazane su na slici 3. Lom uzoraka nanokompozita sa sadržajima gline od 1 do 10 mas.% je analiziran sa ciljem definisanja strukture nanokompozita.



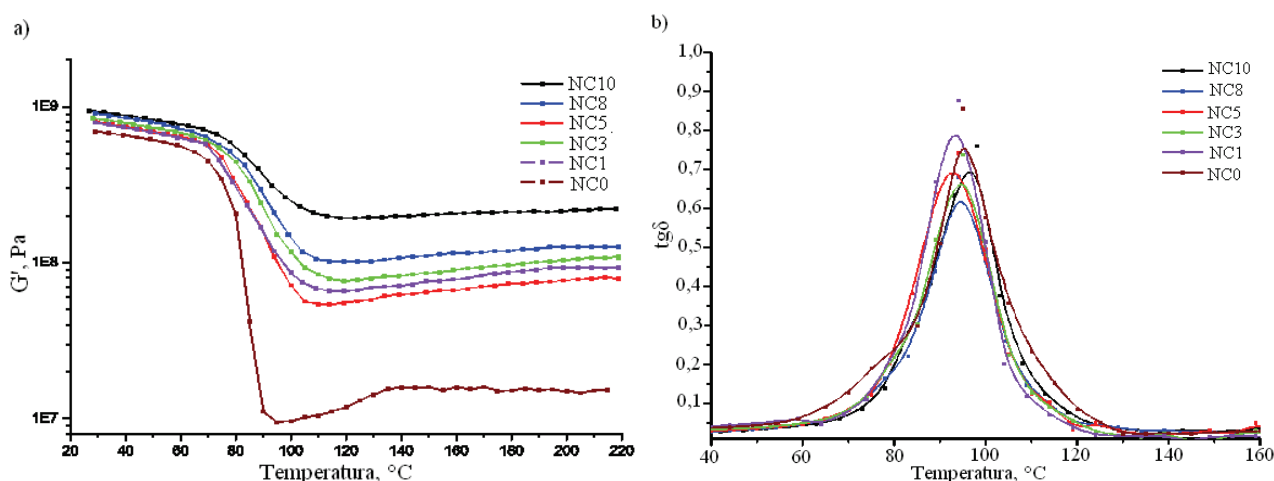
Slika 3. SEM fotografije umrežene epoksidne smole (a) i nanokompozita sa različitim sadržajima Cloisite-a 30B: 1 mas.% (b), 3 mas.% (c), 5 mas.% (d), 8 mas.% (e) i 10 mas.% (f) pri uvećanju od 500 puta.

Zapaža se da je kod umrežene epoksidne smole prisutan krt lom, i da se sa dodatkom gline struktura loma menja. Kod nanokompozita sa 8 mas.% i 10 mas.% gline zapaža se prisustvo aglomerata gline što ukazuje na činjenicu da glina nije u potpunosti dispergovana u polimernoj matrici i da je struktura dobijenih kompozita mešavina eksfolirane i interkalarne strukture. Dimenzije aglomerata zavise od

masenog udela gline: kod kompozita sa 8 mas. % gline najveći aglomerati su dimenzija od 25 μm , dok kompoziti sa 10 mas.% gline sadrže aglomerate i do 80 μm . Kod nanokompozita koji sadrže ispod 5 mas. % gline ne zapaža se prisustvo aglomerata što ukazuje na prisustvo eksfoliranih čestica. Rezultati pokazuju da je struktura nanokompozita mešavina interkalarni i eksfolirane pri sadržaju gline koji je veći od 5 mas.%, dok nanokompoziti sa manje od 5 mas.% gline imaju eksfoliranu strukturu⁶.

Dinamičko-mehanička analiza (DMA) epoksidnih nanokompozita

Temperaturne zavisnosti modula sačuvane energije, G' i tangens ugla mehaničkih gubitaka, $\text{tg}\delta$, jasno pokazuju tri oblasti viskoelastičnog ponašanja nanokompozita: oblast staklastog stanja, oblast prelaska iz staklastog stanja u plato gumolikog ponašanja i plato gumolikog ponašanja (slika 4).



Slika 4. Zavisnost G' (a) i $\text{tg}\delta$ (b) umrežene epoksidne smole i nanokompozita od temperature.

Vrednosti G' nanokompozita u staklastom i gumolikom stanju su veće od vrednosti za umreženu epoksidnu smolu. Promene G' u gumolikom stanju sa dodatkom gline su značajno veće od promena u staklastom stanju. Sa porastom sadržaja gline u nanokompozitu dolazi do rasta G' i u staklastom i u gumolikom stanju, a izuzetak je nanokompozit sa 5 mas.% Cloisite-a 30B. Za umreženu epoksidnu smolu G' u gumolikom stanju iznosi $1,54 \cdot 10^7$ Pa, a za nanokompozit sa 10 mas.% Cloisite-a 30B $2,20 \cdot 10^8$ Pa što je porast za više od jedne dekade odnosno G' se povećao 14,3 puta. U tabeli 1 prikazane su temperature ostakljivanja umrežene epoksidne smole i nanokompozita određene pomoću DMA preko zavisnosti modula izgubljene energije, G'' , G' , i $\text{tg}\delta$ od temperature, kao i DSC metodom. Takođe su prikazane vrednosti širine pika na polovini visine (D) temperaturne zavisnosti $\text{tg}\delta$.

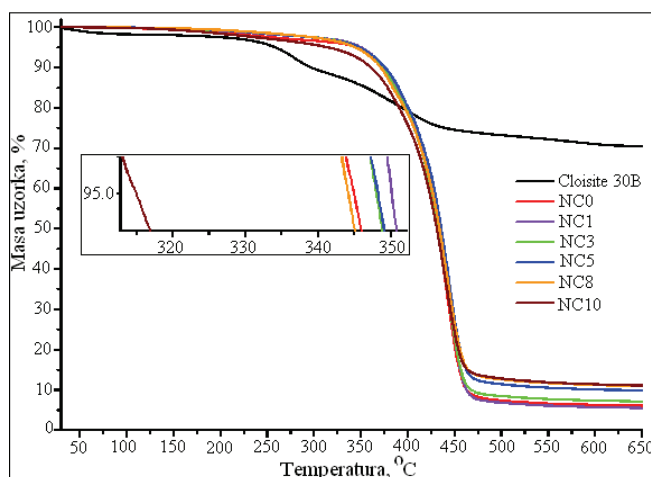
Tabela 1. T_g određene preko $\text{tg}\delta$, G' , G'' i DSC-om i širina pika (D) zavisnosti $\text{tg}\delta$ od temperature umrežene epoksidne smole i nanokompozita.

Uzorak	$T_g / ^\circ\text{C}$				$D / ^\circ\text{C}$
	G''	G'	$\text{tg}\delta$	DSC	
NC0	74	79	95	84	18
NC1	90	76	93	79,5	16,6
NC3	89	84,5	95	77,5	18,6
NC5	89	78	92,5	77	19,3
NC8	90	85	94,5	77,5	18,7
NC10	90	83	96,5	77,5	19,2

Razlike između temperatura ostakljivanja nanokompozita određenih preko G'' su u granicama eksperimentalne greške i uočava se da dodatkom gline dolazi do porasta temperature ostakljivanja umrežene epoksidne smole (tabela 1). Određivanjem T_g preko G' ne može se uočiti neka pravilnost promene T_g sa porastom sadržaja gline u nanokompozitu. Na osnovu $tg\delta$ i DSC-a vidi se da T_g umrežene epoksidne smole opada dodatkom gline sve do 5 mas.%, a daljim porastom sadržaja gline T_g počinje da raste ili se ne menja. Smanjenje T_g pri malim sadržajima Cloisite-a 30B u nanokompozitu se objašnjava time da je u nanokompozitima (NC1, NC3 i NC5) dominantna eksfolirana struktura i da je glina dispergovana do nanometarskih dimenzija. Dispergovanjem gline do nanometarskih dimenzija raste međufazna površina koja stvara dodatnu slobodnu zapreminu, a pokretljivost segmenata polimernih lanaca raste. Porast T_g pri sadržajima gline u nanokompozitu većim od 5 mas.% se može objasniti stvaranjem interkalarnе strukture kod ovih nanokompozita i smanjenjem pokretljivosti segmenata makromolekulskih lanaca koji su fiksirani u međuprostoru gline. Na osnovu širine pika zavisnosti $tg\delta$ od temperature, najhomogeniju strukturu ima nanokompozit sa 1 mas.% gline usled najmanjeg sadržaja gline i eksfolirane strukture dok pri većim sadržajima gline nanokompoziti imaju heterogeniju strukturu¹.

Termogravimetrijska analiza (TGA) epoksidnih nanokompozita

Rezultati TGA merenja umrežene epoksidne smole i nanokompozita prikazani su na slici 5. Zapaža se da se termičko razlaganje gline odigrava u četiri stupnja, dok se umrežena epoksidna smola i nanokompoziti razlažu u jednom stupnju. Ostatak na 650 °C posle termičke degradacije je najmanji za umreženu epoksidnu smolu (5,6 mas. %), a dodatkom gline ostatak se povećava gde za nanokompozit sa 10 mas.% gline ima najveću vrednost (10,6 mas. %). Glavni deo tog ostatka predstavlja neorganska glina^{4,5}.



Slika 5. TGA krive Cloisite-a 30B i nanokompozita.

Na osnovu temperature degradacije pri gubitku 5 mas.%, koja ukazuje na termičku stabilnost uzoraka, nanokompoziti sa manje od 5 mas.% Cloisite-a 30B su se pokazali kao termički stabilniji od umrežene epoksidne smole usled eksfolirane strukture i barijernog efekta nanometarskih slojeva gline prema toploti (isečak na slici 5). Nanokompoziti sa 8 i 10 mas.% su termički nestabilniji od umrežene epoksidne smole jer je kod njih prisutna interkalarna struktura što znači da dodatak ovih količina organo-modifikovane gline nije poboljšao termičku stabilnost umrežene epoksidne smole. Najveću termičku stabilnost pokazuje nanokompozit sa 1 mas.% gline.

Zaključak

Seriya nanokompozita na bazi komercijalne epoksidne smole CHS-EPOXY 210-X-75 (diglicidil-etar bisfenola A) i višefunkcionalnog vrlo reaktivnog poliamido-amina, umreživača, EPICURE 3115-X-70, pripremljena je polimerizacijom u rastvoru u prisustvu hemijski modifikovane (kvaternerni alkil amonijum-joni) gline nanometarskih dimenzija (Cloisite-a 30B) gde je variran sadržaj nanogline od 1 do 10 mas.%. Na osnovu WAXD i SEM analize je utvrđeno da nanokompoziti sa sadržajem gline do 5 mas.% imaju eksfoliranu strukturu i da je celokupna količina gline raslojena do nanometarskih dimenzija. Pri sadržajima Cloisite-a 30B većim od 5 mas.% nastaju aglomerati i struktura nanokom-

pozita je mešavina interkalarne i eksfolirane strukture. Termogravimetrijska analiza je pokazala da se termička stabilnost umrežene epoksidne smole poboljšava dodatkom Cloisite-a 30B ukoliko je glina potpuno raslojena odnosno ukoliko nanokompoziti imaju eksfoliranu strukturu. Nanokompoziti sa 8 mas.% i 10 mas.% Cloisite-a 30B termički su manje stabilniji od umrežene epoksidne smole i nanokompozita sa eksfoliranom strukturom što se pripisuje interkalarnoj strukturi. Mehanička svojstva umrežene epoksidne smole se značajno poboljšavaju dodatkom Cloisite-a 30B što se ogleda u povećanju modula smicanja sačuvane energije, G' , u staklastom i gumolikom stanju. Reološka ispitivanja i DSC analiza potvrdile su da temperatura ostakljivanja nanokompozita opada dodatkom gline sve do 5 mas.% što je posledica eksfolirane strukture. Pri većim sadržajima gline, temperatura ostakljivanja se ili ne menja ili raste zbog interkalarne strukture ovih nanokompozita.

Zahvalnica: Finansijska podrška za ovo istraživanje je delimično obezbeđena projektom Ministarstva nauke i prosvete Republike Srbije br. 172062. Autori se zahvaljuju firmi Zvezda-Helios iz Gornjeg Milanovca na finansijskoj podršci, kao i na obezbeđenim sirovinama.

Mechanical and thermal properties of epoxy-nanoclay nanocomposites

It is well known that the mechanical, thermal, especially barrier and anticorrosive properties of polymer coatings could be significantly improved by incorporation of small quantities of clay nanoparticles into the polymer matrix. In this study, nanocomposites (NC) based on commercial epoxy resin and chemically modified nanoclay (Cloisite 30B) with clay loading (1 - 10 wt.%) were prepared by solution casting method. WAXD and SEM analyses indicated that NC with clay content below 5 wt.% have an exfoliated structure, when the clay dimensions within the polymer matrix are decreased to the nanoscale, while NC with clay loading above 5 wt.% have a mixed intercalated/exfoliated structure. Thermogravimetric analysis showed that NC with 1 wt.% of clay was the most thermally stable due to the exfoliated structure and clay barrier efficiency. Mechanical properties of NC, investigated by dynamical-mechanical analysis, were improved with increasing clay loading as shown by the significant increase of the storage modulus, G' , in both glass and rubbery state. Rheological measurements and DSC analysis revealed that the glass transition temperature, T_g , of NC decrease with incorporation of clay up to 5 wt.% as a result of an exfoliated structure. Further incorporation of clay in NC resulted in an increase or no change of T_g to the presence of intercalated structure.

Literatura

1. J. Brown, I. Rhoney, R. A. Pethrick, *Polym. Int.*, **53** (2004) 2130.
2. C. Basara, U. Yilmazer, G. Bayram, *J. Appl. Polym. Sci.* **98** (2005) 1081.
3. R. Velmurugan, T. Mohan, *J. Mater. Sci.* **39** (2004) 7333.
4. B. Guo, D. Jia, C. Cai, *Eur. Polym. J.*, **40** (2004) 1743.
5. A. Olad, Polymer/Clay Nanocomposites, in *Advances in Diverse Industrial Applications of Nanocomposites*, in Reddy, B., (Ed.), InTech, 2011, p. 550
6. T. P. Mohan, K. Kanny, *ISRN Nanotechnology 2011* (2011) 7.

Mehanička i termička svojstva umreženih poli(uretan-estar-siloksana)

Jasna V. Džunuzović, Marija V. Pergal, Rafał Poręba*, Sanja Ostojić**, Enis S. Džunuzović***, Milena Špírková*, Slobodan Jovanović***

IHTM-Centar za hemiju, Univerzitet u Beogradu, Studentski trg 12-16, Beograd, Srbija,

**Institute of Macromolecular Chemistry AS CR, v.v.i., Nanostructured Polymers and Composites Department, Heyrovského nam. 2, Praha, Czech Republic,*

***Institut za opštu i fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu, Studentski trg 12-16, Beograd, Srbija,*

****Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Karnegijeva 4, Beograd, Srbija*

Izvod U ovom radu ispitana su svojstva poli(uretan-estar-siloksana) na bazi α,ω -dihidroksi-(etilenoksid-poli(dimetilsiloksan)-etilenoksida) (EO-PDMS-EO), 4,4'-diizocijanatodifenilmetana i alifatskog Boltorn[®] hiperrazgranatog poliestra druge pseudo generacije, kao umreživača. Sintetisano je pet uzoraka umreženih poliuretana sa različitim udelom mekih segmenata (EO-PDMS-EO) primenom dvostepene reakcije polimerizacije u rastvoru. Uticaj udela EO-PDMS-EO na mehanička i termička svojstva umreženih poli(uretan-estar-siloksana) ispitan je dinamičko-mehaničkom analizom (DMA), diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom (DSC) i merenjem tvrdoće. Dobijeni rezultati ukazuju da smanjenje udela EO-PDMS-EO utiče na povećanje stepena mikrofazne separacije sintetisanih uzoraka. Istovremeno dolazi do povećanja gustine umrežavanja, heterogenosti mreže i poboljšanja mehaničkih svojstava umreženih poli(uretan-estar-siloksana). Korišćenjem DMA određene su vrednosti temperature ostakljivanja mekih i tvrdih segmenata, kao i temperature koje odgovaraju sekundarnom relaksacionom procesu. Rezultati prikazani u ovom radu ukazuju da se kombinacijom makrodiola na bazi poli(dimetilsiloksana), hiperrazgranatog poliola i odgovarajućeg diizocijanata mogu sintetisati umreženi poliuretanski materijali odgovarajućih termičkih i mehaničkih svojstava za tačno određenu namenu.

Uvod

Umreženi poliuretani su poznati po širokom spektru primene, a naročito u industriji premaza, što je uslovljeno njihovim zanimljivim svojstvima poput dobre otpornosti na vodu, rastvarače, udar i abraziju, fleksibilnost, tvrdoću, visoki sjaj, itd. Pored hemijskog umreženja nastalog primenom tri- ili višefunkcionalnih umreživača, kod ovih polimera dolazi i do uspostavljanja fizičkog umreženja, odnosno do stvaranja vodoničnih veza između karbonilnih i NH grupa susednih lanaca. Svojstva poliuretanskih mreža zavise od hemijskog sastava svih komponenata, molarne mase i polidisperznosti mekih segmenata, a naročito od prirode umreživača. Dobra kombinacija polaznih reaktanata je ključna za dobijanje umreženih poliuretana željenih svojstava za određene namene.

Hiperrazgranati polimeri često privlače pažnju istraživača zbog svojih jedinstvenih fizičkih i hemijskih svojstava, kao što su dobra rastvorljivost u velikom broju različitih rastvarača, mala viskoznost u rastvoru i rastopu, odsustva prepletaja, itd. Specifična svojstva hiperrazgranatih polimera potiču od globularnog oblika njihovih makromolekula i prisustva velikog broja krajnjih funkcionalnih grupa. Jednu od najčešće ispitivanih grupa hiperrazgranatih polimera predstavljaju komercijalno dostupni, hidroksifunkcionalni, alifatski Boltorn[®] hiperrazgranati poliestri na bazi 2,2-bis(hidroksimetil)propionske kiseline kao AB₂ monomera i tetrafunkcionalnog etoksilovanog pentaeritritola kao jezgra.^{1,2} Brojni naučni radovi objavljeni poslednjih godina ukazuju na značaj primene Boltorn[®] hiperrazgranatih poliostara pri sintezi umreženih poliuretana na bazi različitih estarskih i etarskih makrodiola.³⁻⁶ Zahvaljujući jedinstvenoj kombinaciji svojstava poli(dimetilsiloksana) (PDMS), kao što su dobra termička i UV stabilnost, niska temperatura ostakljivanja, velika fleksibilnost, dobra biokompatibilnost, nizak površinski napon i dobra otpornost na vlagu, korišćenje makrodiola na bazi poli(dimetilsiloksana) za sintezu umreženih poliuretana je sve učestalije.⁷⁻⁹ Kombinovanjem Boltorn[®] hiperrazgranatih poliostara i makrodiola na bazi PDMS sa odgovarajućim diizocijanatom dobijaju se poli(uretan-estar-siloksani) koji relativno brzo umrežavaju i dovode do stvaranja veoma umreženog ali elastičnog materijala dobrih mehaničkih, termičkih i površinskih svojstava, i dobre hemijske otpornosti.

Cilj ovog rada je ispitivanje uticaja udela mekih segmenata na mehanička i termička svojstva poli(uretan-estar-siloksana) sintetisanih polazeći od α,ω -dihidroksi-(etilenoksid-poli(dimetilsiloksan)-etilenoksida) (EO-PDMS-EO), 4,4'-diizocijanatodifenilmetana (MDI) i Boltorn[®] hiperrazgranatog poli-

estra druge pseudo generacije kao umreživača. Svojstva sintetisanih uzoraka ispitana su dinamičko-mehaničkom analizom (DMA), diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom (DSC) i merenjem tvrdoće.

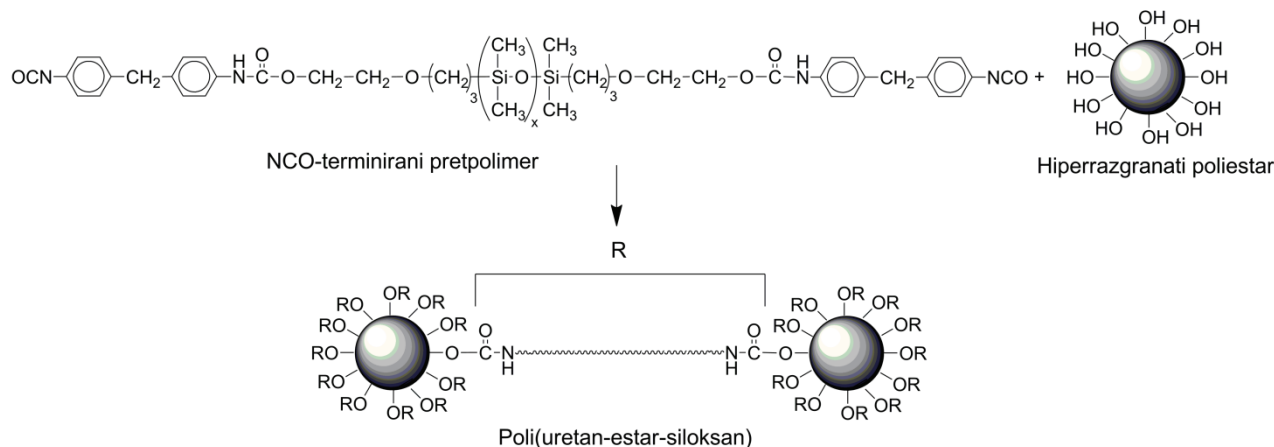
Eksperimentalni deo

Pet uzoraka umreženih poli(uretano-estara-siloksana) (PUS) sa različitim udelom mekih segmenata (60, 50, 30, 20 i 15 mas.%; PUS60, PUS50, PUS30, PUS20 i PUS15) je sintetisano korišćenjem Boltorn[®] hiperrazgranatog poliestra druge pseudo generacije sa 12 krajnjih hidroksilnih grupa (BH-20) (Perstorp Specialty Chemicals AB, Švedska), EO-PDMS-EO ($M_n = 1200$ g/mol, ABCR) i MDI (Aldrich), korišćenjem dvostepene reakcije polimerizacije u rastvoru, opisane u našim prethodnim radovima.^{7,8} Kao rastvarač korišćena je smeša *N*-metil-2-pirolidona i tetrahidrofurana (7/1, v/v).

DMA sintetisanih uzoraka je izvedena primenom ARES G2 reometra (TA Instruments) pri frekvenciji od 1 Hz, deformaciji 0,1%, pri brzini zagrevanja od 3 °C/min, u oblasti temperatura od -135 do 180 °C. Eksperiment dinamičkog uvijanja izveden je na uzorcima dimenzije 15,0 mm × 7,8 mm × 1,0 mm ± ± 0,2 mm. DSC analiza uzoraka je izvedena na instrumentu DSC Q1000V9.0 Build 275 u atmosferi azota, pri brzini zagrevanja od 10 °C/min i hlađenja od 5 °C/min, u temperaturnom intervalu od -90 do 200 °C. Tvrdoća sintetisanih umreženih poliuretana izmerena je primenom Shore A instrumenta (Hildebrand, Nemačka). Korišćena je srednja vrednost tvrdoće, određena na osnovu minimum pet merenja.

Rezultati i diskusija

Sinteza umreženih PUS je izvedena primenom dvostepene reakcije polimerizacije u rastvoru kako bi se poboljšala kompatibilnost između nepolarnog EO-PDMS-EO mekog segmenta i polarnih MDI/BH-20 tvrdih segmenata i na taj način izbeglo nastajanje heterogene mreže i pojava makroskopske fazne separacije. U prvom stupnju reakcije polimerizacije reakcijom između EO-PDMS-EO i MDI došlo je do nastajanja NCO-terminiranog prepolimera, koji je zatim u drugom stupnju reakcije reagovao sa odgovarajućom količinom umreživača (Slika 1). Na taj način sintetisani su uzorci umreženih PUS čija je dužina mekog segmenta ista.

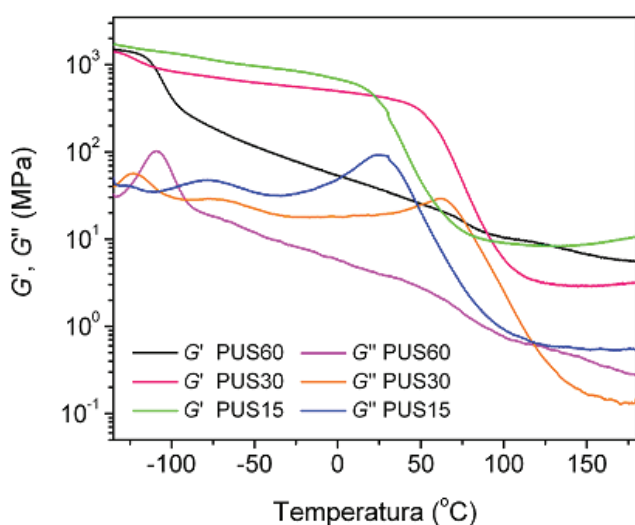


Slika 1. Šematski prikaz sinteze umreženog poli(uretano-estara-siloksana)

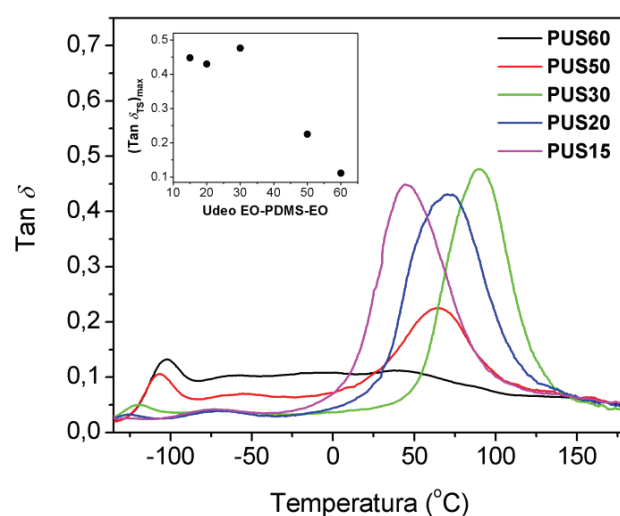
DMA rezultati prikazani na slici 2 ukazuju da je u celoj ispitivanoj oblasti temperatura modul sačuvane energije, G' , veći od modula izgubljene energije, G'' , što ukazuje da sintetisani uzorci PUS pokazuju elastično ponašanje pri korišćenim eksperimentalnim uslovima. Pri nižim temperaturama vrednost G' raste sa povećanjem udela tvrdih segmenata, dok je u temperaturnoj oblasti 20-100 °C trend obrnut i pri tom dolazi do naglog pada vrednosti G' zbog povećane pokretljivosti lanaca nastale usled prelaza tvrdih segmenata iz staklastog u gumoliko stanje. U platou gumolikog ponašanja (oko 130 °C) vrednost G' ponovo raste sa povećanjem udela tvrdih segmenata, što ukazuje na istovremeno povećanje gustine umrežavanja.

Kod svih sintetisanih uzoraka umreženih PUS, osim za uzorak PUS60, temperaturna zavisnost G'' sadrži tri pika. Tri pika se takođe mogu uočiti i kod temperaturne zavisnosti $\tan \delta$, čak i za uzorak PUS60, što ukazuje na postojanje visokog stepena mikrofazne separacije kod ovih polimera (slika 3). Pored toga, razlika u izgledu krivih između uzorka PUS60 i ostalih sintetisanih PUS prikazanih na slikama 2 i 3 ukazuje na značajan uticaj udela EO-PDMS-EO na viskoelastična svojstva PUS. Vrednosti temperatura

koje odgovaraju položaju tri različita $\tan \delta$ pika date su u tabeli 1. Temperatura koja odgovara prvom piku u oblasti između -126 i -102 °C predstavlja temperaturu ostakljivanja mekih segmenata, $(T_g)_{MS}$. Literaturni podaci pokazuju da EO-PDMS-EO ima dve T_g , jednu na -105 °C kao posledica pokretljivosti glavnog PDMS lanca i drugu na -8 °C, pripisanu pomeranju krajnjih grupa (rezultati dobijeni DSC analizom).¹⁰ Jedino je za uzorak PUS60 uočena i druga $(T_g)_{MS}$ na oko -9 °C (slika 3). Kod ostalih uzoraka ovaj temperaturni prelaz nije uočen što ukazuje da je pokretljivost etilenoksidnih grupa smanjena usled prisustva tvrdih segmenata, odnosno umreženja. Takođe, vrednost $(T_g)_{MS}$ opada sa smanjenjem udela EO-PDMS-EO što ukazuje na povećanje stepena mikrofazne separacije. Pik koji se javlja u oblasti između -74 i -59 °C (T_S) odnosi se na sekundarni relaksacioni proces koji je povezan sa pomeranjem dela lanca koji sadrži uretansku grupu vezanu za umreživač.³ Temperatura koja odgovara trećem piku u oblasti između 40 i 90 °C predstavlja temperaturu ostakljivanja tvrdih segmenata, $(T_g)_{TS}$. Vrednost $(T_g)_{TS}$ prvo raste sa povećanjem udela tvrdih segmenata usled smanjenja pokretljivosti lanaca, a zatim za uzorke PUS20 i PUS15 $(T_g)_{TS}$ opada.



Slika 2. Temperaturna zavisnost modula sačuvane i izgubljene energije izabranih uzoraka PUS



Slika 3. Temperaturna zavisnost $\tan \delta$ sintetisanih uzoraka PUS i zavisnost $(\tan \delta_{TS})_{max}$ od udela EO-PDMS-EO

Sa slike 3 se može videti da je treći $\tan \delta$ pik najizraženiji i da njegov intenzitet opada sa povećanjem udela EO-PDMS-EO, dok istovremeno intenzitet prvog pika raste. Pored toga, sa povećanjem udela tvrdih segmenata dolazi do širenja $(\tan \delta)_{TS}$ pika što ukazuje na postojanje lanaca različitih dužina između tačaka umreženja, odnosno neuniformnog umrežavanja i prisustva više od jednog relaksacionog procesa.

Tabela 1. Rezultati DMA, DSC analize i merenja tvrdoće sintetisanih uzoraka PUS

Uzorak	$(T_g)_{MS}$ / °C	T_S / °C	$(T_g)_{TS}$ / °C	$(T_g)_{TS-DSC}$ / °C	Tvrdoća, ° Shore A)
PUS60	-102	-59	40	36	78
PUS50	-107	-59	64	45	80
PUS30	-120	-69	90	65	88
PUS20	-126	-69	72	44	88
PUS15	-126	-74	46	40	88

Usled manje osetljivosti standardne DSC analize u odnosu na DMA i ograničenja korišćenog instrumenta, pomoću DSC eksperimenta bilo je moguće odrediti samo T_g tvrdih segmenata, $(T_g)_{TS-DSC}$, čije vrednosti prate isti trend kao i vrednosti određene primenom DMA (tabela 1). Vrednosti tvrdoće (Shore A) sintetisanih PUS date su u tabeli 1 i može se videti da one rastu sa povećanjem udela tvrdih segmenata.

Zaključak

Promena udela mekih segmenata sintetisanih umreženih poli(uretan-estar-siloksana) ima značajan uticaj na njihova mehanička i termička svojstva i stepen mikrofazne separacije. Pokazano je da sa smanjenjem udela EO-PDMS-EO dolazi do povećanja gustine umrežavanja, heterogenosti mreže, tvrdoće i stepena mikrofazne separacije. Vrednosti temperatura ostakljivanja mekih i tvrdih segmenata određene su primenom DMA i njihove promene ukazuju na promene stepena mikrofazne separacije.

Zahvalnica: Ovaj rad je finansijski potpomoglo Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije u okviru projekta (172062) i Grant Agency Republike Češke (P108/10/0195).

Mechanical and Thermal Properties of Poly(urethane-ester-siloxane) Networks

Properties of poly(urethane-ester-siloxane)s based on α,ω -dihydroxy-(ethylene oxide-poly(dimethylsiloxane)-ethylene oxide) (EO-PDMS-EO), 4,4'-methylenediphenyl diisocyanate and aliphatic Boltorn[®] hyperbranched polyester of the second pseudo generation as crosslinking agent were investigated in this work. Five samples of polyurethane networks having different soft segment (EO-PDMS-EO) content were synthesized using two-step polymerization reaction in solution. The effect of EO-PDMS-EO content on the mechanical and thermal properties of poly(urethane-ester-siloxane) networks was investigated using dynamic mechanical analysis (DMA), differential scanning calorimetry (DSC) and hardness measurements. Obtained results revealed that decrease of EO-PDMS-EO content enhanced microphase separation in the synthesized networks. Simultaneously, increase of the hard segment content improved mechanical properties and induced increase of the crosslinking density and network heterogeneity of poly(urethane-ester-siloxane)s. DMA results revealed existence of two glass transition temperatures, of the soft and hard segments and the presence of secondary relaxation process. Results presented in this work indicate that this specific combination of poly(dimethylsiloxane)-based macrodiol, hyperbranched polyol and adequate diisocyanate can be applied to obtain polyurethane networks of good thermal and mechanical properties, which can be relatively easily tailored for exact application requirements by changing soft/hard segment ratio.

Literatura

1. E. Žagar, M. Žigon, *Prog. Polym. Sci., (Oxford)*, **36** (2011) 53
2. J. Vuković, M. D. Lechner, S. Jovanović, *Macrom. Chem. Phys.*, **208** (2007) 2321
3. P. Czech, L. Okrasa, J. Ulanski, G. Boiteux, F. Mechin, P. Cassagnau, *J. Appl. Polym. Sci.*, **105** (2007) 89
4. P. K. Maji, A. K. Bhowmick, *J. Polym. Sci. Part A., Polym. Chem.*, **47** (2009) 731
5. Q. Cao, P. Liu, *Polym. Bull.*, **57** (2006) 889
6. A. Asif, W. Shi, X. Shen, K. Nie, *Polymer*, **46** (2005) 11066
7. M. V. Pergal, J. V. Džunuzović, M. Kićanović, V. Vodnik, M. M. Pergal, S. Jovanović, *Russ. J. Phys. Chem., A*, **85** (2011) 2251
8. M. V. Pergal, J. V. Džunuzović, S. Ostojić, M. M. Pergal, A. Radulović, S. Jovanović, *J. Serb. Chem. Soc.*, doi: 10.2298/JSC111013006P
9. R. Adhikari, P. A. Gunatillake, S. J. McCarthy, G. F. Meijs, *J. Appl. Polym. Sci.*, **78** (2000) 1071
10. R. Hernandez, J. Weksler, A. Padsalgikar, J. Runt, *Macromolecules*, **40** (2007) 5441

Termoosetljivi mikrogelovi na bazi poli(*N*-izopropilakrilamida) i alginata namenjeni kontrolisanom otpuštanju lekova

Stojanka M. Petrušić, Petar Jovančić, Branko Bugarski, Svetlana Grujić,
Smilja Marković*, Jasna Đonlagić

Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Karnegijeva 4, 11000 Beograd

*Institut tehničkih nauka SANU, Univerzitet u Beogradu, Knez Mihailova 35/IV,
11000 Beograd

Izvod U ovom radu prikazani su sinteza i karakterizacija termoosetljivih mikrogelova na bazi umreženog poli(*N*-izopropilakrilamida) (PNIPAAm) i alginata strukture interpenetrirajućih polimernih mreža (IPN). Mikrogelovi su pripremljeni metodom inverzne suspenzione polimerizacije. Ispitivan je uticaj alginata na različita svojstva mikrogelova: veličinu i raspodelu veličina, temperaturu zapreminske fazne transformacije (VPTT), ravnotežni stepen bubrenja, kao i morfologiju. Dodatak linearnog ili umreženog alginata je uticao na povećanje prečnika IPN mikrogelova, dok je njegova hidrofилna priroda doprinela poboljšanju sposobnosti bubrenja u odnosu na čiste PNIPAAm mikrogelove. Pokazano je da je termoosetljivost mikrogelova nezavisna od udela alginata. Sačasta struktura pora, karakteristična za čiste PNIPAAm mikrogelove, zadržana je i kod mikrogelova sa alginatom. Otpuštanje prokain hidrohlorida iz izabranih mikrogelova praćeno je pomoću Francove difuzione ćelije na temperaturi ispod i iznad VPTT mikrogelova. Dobijeni rezultati ukazuju na potencijalnu primenu analiziranih termoosetljivih mikrogelova kao matrica za transdermalno otpuštanje leka kontrolisano promenom temperature.

Uvod

Termoosetljivi hidrogelovi na bazi poli(*N*-izopropilakrilamida) (PNIPAAm) imaju svojstvo da se skupljaju na temperaturama iznad temperature zapreminske fazne transformacije (VPTT) i bubre ispod te temperature. Zahvaljujući ovom svojstvu, oni su naročito značajni u kontroli brzine otpuštanja leka jednostavnom promenom temperature^{1,2}. Uvođenjem linearnog natrijum-alginata, odnosno umreženog kalcijum-alginata u polimernu mrežu termoosetljivog PNIPAAm, tj. formiranjem semi- odnosno punih-interpenetrirajućih polimernih mreža (IPN) poboljšavaju se svojstva hidrogelova u pogledu povećanja stepena bubrenja i brzine odgovora na promenu temperature u odnosu na čiste PNIPAAm hidrogelove^{3,4}. U ovom radu su sintetisani termoosetljivi PNIPAAm hidrogelovi u obliku sfera mikro dimenzija, tj. mikrogelovi, inverznom suspenzionom polimerizacijom. Za dizajn sistema mikrogel-tekstil za transdermalnu isporuku leka, dimenzije mikrogelova su veoma značajne i neophodno je da dimenzija čestica budu bliske srednjem prečniku tekstilnog vlakna (za pamuk oko 20 μm)⁵. Prvo su sintetisani semi-IPN mikrogelovi sa Na-alginatom (SA). Natrijum-alginat je so linearnog polisaharida prirodnog porekla, sastavljen od β-D-manuronskih i α-L-guluronskih jedinica koje su međusobno povezane 1,4-glikozidnim vezama. Zatim su semi-IPN mreže na bazi Na-alginata prevedene u pune-IPN mreže umrežavanjem alginata pomoću Ca²⁺- jona. Ispitivan je uticaj prisustva linearnog i umreženog alginata na različita svojstva mikrogelova: na njihovu morfologiju, veličinu i raspodelu veličina, temperaturu zapreminske fazne transformacije kao i na ravnotežni stepen bubrenja. U sintetisane mikrogelove inkapsuliran je vodorastvorni anestetik, prokain hidrohlorid. Za otpuštanje prokain hidrohlorida iz izabranih termoosetljivih mikrogelova korišćena je Francova difuziona ćelija. Profili otpuštanja leka dobijeni na 25 °C i 37 °C korišćeni su za procenu uticaja termoosetljivosti mikrogelova.

Eksperimentalni deo

Sinteza mikrogelova

Serijski mikrogelovi na bazi PNIPAAm-a sintetisani su inverznom suspenzionom polimerizacijom. Polimerizacija je izvođena u reaktoru sa okruglim dnom od 500 ml. Kao kontinualna faza, korišćeno je parafinsko ulje (Carlo Erba) i emulgator Tween 80 (Riedel-de Haen) u koncentraciji 1 vol.% u odnosu na ulje. Pri sintezi čistih PNIPAAm mikrogelova (označenih sa PN), dispergovanu fazu je činilo 10 mas.% vodeni rastvor monomera (NIPAAm, Sigma-Aldrich), 2 mas.% rastvor umreživača *N,N'*-metilenbis(akrilamida) (MBAAm, Sigma-Aldrich) i 2 mas.% rastvor inicijatora amonijum-persulfata (APS, Fluka). Udeli MBAAm i APS su dati u odnosu na monomer. Nakon dispergovanja vodene faze u uljanoj fazi (za-

preminski odnos 1:5) polimerizacija je inicirana dodatkom *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamina (TEMED, Sigma-Aldrich) u koncentraciji 0,6 vol.% u odnosu na vodenu fazu. Reakciona smeša je mešana brzinom od 280 min^{-1} a reakcija je trajala 3 h na $25 \text{ }^\circ\text{C}$ u atmosferi azota. Mikrogelovi su odvojeni od uljane faze serijom ciklusa centrifugiranja u smeši acetona i vode. Pri istom odnosu NIPAAm i MBAAm, formirani su mikrogelovi strukture semi- i punih-IPN sa linearnim alginatom (Na-aginatom, SA) i umreženim alginatom (Ca-alginatom, CA), respektivno. Sinteza semi- i punih-IPN mikrogelova obuhvatala je pripremu 0,5 ili 1 mas.% rastvora SA u vodi, koje je praćeno dodavanjem NIPAAm, MBAAm i APS. Svi naredni koraci su isti kao prethodno objašnjeni za sintezu čistih PNIPAAm mikrogelova i odnose se na semi-IPN mikrogelove. Poslednji korak u pripremi punih-IPN mikrogelova bio je inkubacija prečišćenih semi-IPN mikrogelova u rastvoru CaCl_2 (1,5 mas.%) u cilju umrežavanja alginata jonima kalcijuma. U zavisnosti od udela SA u vodenoj fazi, semi-IPN mikrogelovi su označeni kao PN/SA-0,5 i PN/SA-1 dok su, po analogiji, oznake punih-IPN mikrogelova bile PN/CA-0,5 i PN/CA-1.

Karakterizacija mikrogelova

Mikrogelovi su posmatrani pod optičkim mikroskopom Ergaval (Carl Zeiss-Jena), povezanim sa TP-001C Topica CCD kamerom (Krüss). Merenja veličine i raspodele veličina mikrogelova metodom rasipanja svetlosti izvedena su na uređaju MasterSizer 2000 (Malvern Instruments). Termoosetljivost mikrogelova je ispitivana korišćenjem diferencijalnog skenirajućeg kalorimetra (Q1000 DSC, TA Instruments), pri zagrevanju brzinom od $3 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ i protoku azota od 50 ml min^{-1} . Ravnotežni stepen bubrenja (ESR) na $25 \text{ }^\circ\text{C}$ određivan je gravimetrijski i računat kao odnos mase vode u nabubrelim mikrogelovima i mase suvih mikrogelova. Morfologija liofilizovanih mikrogelova je ispitivana pomoću SEM-a (JEOL 5800 SEM, JEOL).

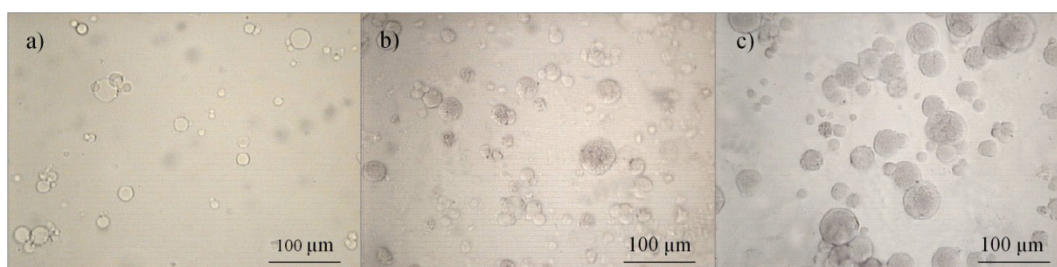
Inkorporacija i otpuštanje leka

Prokain HCl je inkorporiran u mikrogelove sorpcijom iz koncentrovanog rastvora. Suvi mikrogelovi PN/CA-1 (150 mg) su inkubirani u 30 ml rastvora prokain HCl koncentracije 10 mg ml^{-1} tokom 20 h na sobnoj temperaturi. Količina zarobljenog leka određivana je analizom rastvora pre i posle perioda inkubiranja mikrogelova korišćenjem sistema HPLC-UV (Surveyor HPLC, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). UV spektar prokain HCl je dobijen pomoću Surveyor PDA detektora ($\lambda_{\text{max}}=290 \text{ nm}$). Francova difuziona ćelija (PermeGear, Inc.) sa omotačem i oko donorske i oko receptorske komore korišćena je za analizu otpuštanja leka iz izabranih mikrogelova. Površina za difuziju bila je $\sim 0,69 \text{ cm}^2$, a kapacitet receptorske komore 5,65 ml. Receptorska komora je održavana na temperaturi od $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Destilovana voda je bila donorski i receptorski fluid. Celulozno-acetatna membrana ($0,45 \text{ }\mu\text{m}$ mesh, Fisher Scientific) korišćena je kao semi-permeabilna membrana u cilju imitacije ljudske kože. Izvedene su dve serije otpuštanja leka, kada je donorska komora termostatirana na $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i $37 \text{ }^\circ\text{C}$. U donorskoj komori je 10 mg suvih mikrogelova sa inkorporiranim lekom suspendovano u $0,5 \text{ ml}$ destilovane vode. Alikvoti od $0,2 \text{ ml}$ su periodično uzorkovani iz receptorske komore tokom 4 h. Uzorkovani alikvoti su zamenjeni istom zapreminom termostatirane destilovane vode ($37 \text{ }^\circ\text{C}$). Količina leka u uzorcima je analizirana pomoću HPLC-UV sistema, na isti način kao pri detekciji inkorporiranog leka.

Rezultati i diskusija

Optička mikroskopija

Za razliku od čistih PNIPAAm mikrogelova koji imaju glatku površinu, mikrogelovi sa alginatom nemaju glatku površinu (slika 1).

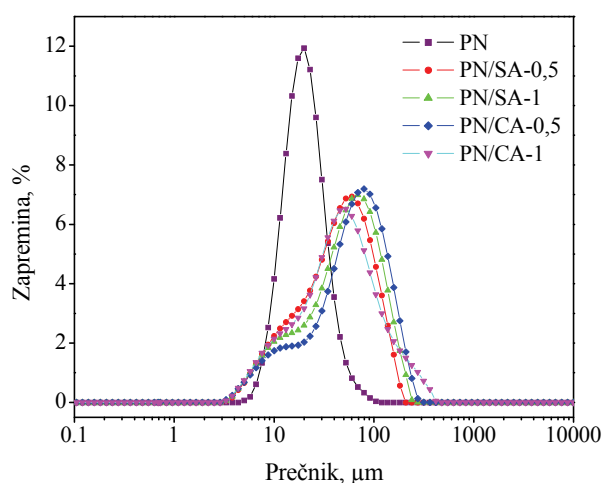


Slika 2. Snimci mikrogelova optičkim mikroskopom: PN (a), PN/SA-0,5 (b) i PN/SA-1 (c)

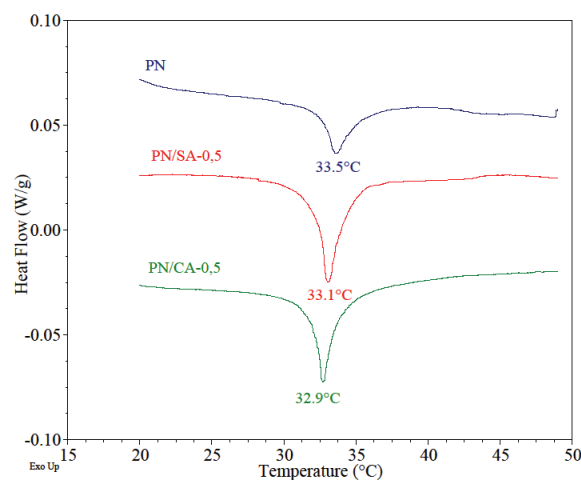
Ovo se objašnjava velikom koncentracijom alginatnih lanaca. Prisustvo alginata doprinelo je izuzetno visokoj viskoznosti dispergovane vodene faze koju je bilo teško razbiti u male pravilne kapljice mešalicom. Male nepravilnosti u obliku mikrogelova i sklonost ka formiranju aglomerata uočene su u uzorcima PN/SA-0,5 i PN/SA-1 (slika 1).

Veličina i raspodela veličina mikrogelova

Na slici 2 se jasno vidi da širina raspodele veličina mikrogelova znatno raste sa dodatkom alginata i porastom njegove koncentracije. U slučaju mikrogelova PN/SA-1, raspodela veličina mikrogelova čak postaje bimodalna. Najmanji srednji prečnik izmeren je za čiste PNIPAAm mikrogelove (20,7 μm). Semi- i puni-IPN mikrogelovi sa alginatom imaju tri do pet puta veći srednji prečnik u poređenju sa čistim PNIPAAm mikrogelovima. Ovo se, pre svega, može pripisati porastu viskoznosti početne vodene faze pri dodatku SA. Srednji prečnik semi-IPN mikrogelova raste od 56,1 do 66,2 μm kada udeo SA u početnom vodenom rastvoru poraste dva puta (od 0,5 do 1 mas.%). Srednji prečnici punih-IPN mikrogelova (67,8 μm za PN/CA-0,5 i 76,8 μm za PN/CA-1) su malo veći od odgovarajućih semi-IPN mikrogelova. Ovaj odnos veličina mikrogelova može da potiče od aglomerata semi-IPN mikrogelova koji izazivaju umrežavanje alginatnih lanaca u površinskim slojevima susednih mikrogelova.



Slika 3. Raspodele veličina mikrogelova



Slika 4. DSC termogrami mikrogelova

Temperatura zapreminske fazne transformacije

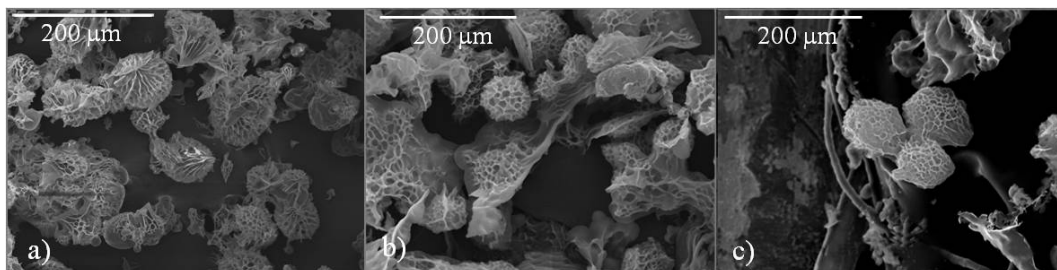
Temperatura endoternog maksimuma je uzeta za temperaturu zapreminske faze transformacije (VPTT). Pokazano je da prisustvo alginata, bilo u linearnom (SA) ili umreženom (CA) obliku, ne utiče značajno na VPTT mikrogelova. Ovo je karakteristično za IPN hidrogelove u kojima svaka individualna komponenta zadržava svoja svojstva pošto ne postoje hemijske veze između njih. Dakle, svojstvo termoosetljivosti PNIPAAm nije poništeno prisustvom alginatnih lanaca. Ovo potvrđuju i oštri i uzani endotermni pikovi u DSC termogramima (slika 3).

Ravnotežni stepen bubrenja

Čisti PNIPAAm mikrogelovi su karakterisani najmanjom sposobnošću bubrenja ($\text{ESR}=15,0$). ESR semi-IPN mikrogelova sa većim sadržajem alginata PN/SA-1 (24,3) je veći od PN/SA-0,5 (16,3) zahvaljujući većem sadržaju karboksilatnih grupa. Ovi rezultati se objašnjavaju formiranjem proširene strukture mreže tokom polimerizacije zahvaljujući elektrostatičkim odbijanjima između karboksilatnih grupa alginatnih lanaca⁶. Pored toga, sadržaj PNIPAAm-a u suvoj masi mikrogela je značajno smanjen u semi- i punim-IPN mikrogelovima u poređenju sa čistim PNIPAAm uzorkom (PN), što znači da je hidrofobnost smanjena i time se povećan stepen bubrenja. Kao rezultat porasta sadržaja alginata u semi-IPN mikrogelovima raste njihov kapacitet bubrenja, dok je suprotan efekat uočen kod punih-IPN mikrogelova sa porastom sadržaja kalcijumovih jona ($\text{ESR}=33,5$ za PN/CA-0,5 i $\text{ESR}=29,3$ za PN/CA-1). Ovaj efekat smanjenja vrednosti ESR punih-IPN mikrogelova se objašnjava dodatnim umrežavanjem alginatnih lanaca putem kompleksacije karboksilatnih grupa kalcijumovim jonima. Najzad, bolja sposobnost bubrenja punih-IPN u odnosu na semi-IPN mikrogelove sa istim sadržajem alginata može delimično poticati od njihove veće veličine, tj. od formiranja aglomerata koji mogu "skladištiti" određenu količinu vode u "intersticijalnom" prostoru između individualnih mikrogelova.

Struktura pora

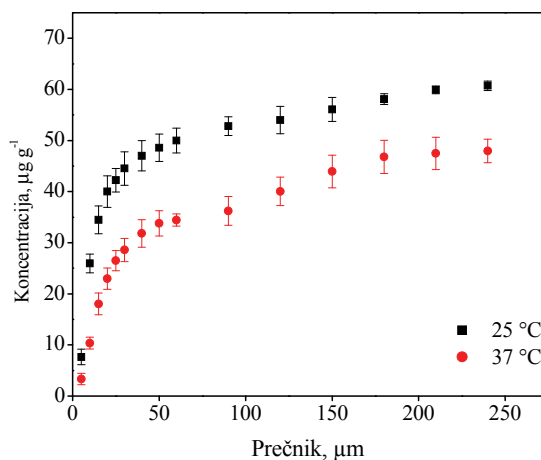
Pokazano je da termoosetljivi mikrogelovi imaju vrlo poroznu strukturu sa povezanim porama. Takva morfologija je povoljna za primenu u inkorporaciji/otpuštanju lekova. Vidi se da mikrogelovi modifikovani alginatom (slike 4b i 4c) zadržavaju poroznu, sačastu strukturu koja je karakteristična za čiste PNIPAAm mikrogelove (slika 4a). Uvođenje hidrofilnih funkcionalnih grupa u mrežu PNIPAAm-a nije poremetilo poroznost krajnjih mikrogelova, poželjnu za efikasne matrice namenjene otpuštanju leka.



Slika 5. SEM snimci mikrogelova: PN (a), PN/CA-0,5 (b), PN/CA-1 (c)

Profili otpuštanja leka

Stepen inkorporacije prokain HCl izračunat za čiste PNIPAAm mikrogelove (PN) i za pune-IPN mikrogelove (PN/CA-1), izražen je kao masen odnos inkorporiranog leka i suvog mikrogela, tj. suve polimerne matrice. Manja količina leka je inkorporirana u čiste PNIPAAm mikrogelove ($0,45 \text{ mg mg}^{-1}$) nego u mikrogelove sa alginatom ($0,63 \text{ mg mg}^{-1}$). Sposobnost bubrenja može uticati na količinu leka koja se može inkorporirati u polimernu matricu putem sorpcije iz rastvora leka od strane suvih mikrogelova. Veći stepen inkorporacije leka u PN/CA-1 nego u PN se može delimično objasniti njihovom većom vrednošću ESR (29,3 u odnosu na 15,0), kao i hidrofilnošću alginatnih lanaca velike koncentracije.



Slika 6. Profili otpuštanja prokain HCl iz mikrogelova PN/CA-1 na 25 °C i 37 °C

Profili otpuštanja prokain HCl iz mikrogelova PN/CA-1 na dve temperature su prikazani na slici 5. Jasno se vidi da ispitivani mikrogelovi pokazuju da je količina otpuštenog leka temperaturno zavisna, odnosno da mikrogelovi otpuštaju više leka na nižoj temperaturi. Ovo se delom može objasniti gustom polimernom mrežom koja se formira pri skupljanju mikrogelova usred kolapsa lanaca PNIPAAm na 37 °C. Na taj način lek može ostati zarobljen u matrici. U obzir se moraju uzeti i moguće jake interakcije između molekula leka i polimernih lanaca u strukturi mikrogelova koje mogu uticati na malo kumulativno otpuštanje leka.

Zaključak

Metodom inverzne suspenzione polimerizacije sintetisani su termoosetljivi mikrogelovi na bazi čistog PNIPAAm i alginata. Semi- i puni-IPN mikrogelovi sa linearnim, odnosno umreženim alginatom su imali značajno veći srednji prečnik, različitu topologiju i sklonost ka formiranju aglomerata za razliku od čistih PNIPAAm mikrogelova. VPTT pripremljenih mikrogelova nije zavisila od prisustva i

koncentracije alginata i iznosila je oko 33 °C. Takođe, dodatak alginata u mrežu PNIPAAm-a doprineo je povećanoj sposobnosti bubrenja i semi- i punih-IPN mikrogelova. Zajedničko svojstvo pripremljenih mikrogelova je porozna, sačasta struktura. Otvorene pore ukazuju na postojanje međusobno povezanih kanala koji čine mikrogelove pogodnim matricama za primenu u otpuštanju lekova. Izabrani mikrogelovi na bazi PNIPAAm i alginata pokazali da otpuštaju više leka, prokain HCl, na nižim temperaturama. Sintetisani termoosetljivi mikrogelovi mogu se smatrati potencijalno uspešnim matricama u studijama kontrolisanog otpuštanja lekova. Dati mikrogelovi namenjeni su za primenu na tekstilni materijal u cilju stvaranja sistema za transdermalno otpuštanje leka, kontrolisano promenom temperature.

Zahvalnica: Finansijska podrška za ovo istraživanje je obezbeđena projektom Ministarstva nauke i prosvete Republike Srbije broj III46010.

Thermosensitive microgels based on poly(*N*-isopropylacrylamide) and alginate intended for controlled drug release

*This study refers to synthesis and characterization of thermosensitive microgels based on crosslinked poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) and alginate with structure of interpenetrating polymer networks (IPNs). The microgels were prepared by inverse suspension polymerization. Influence of alginate on the following microgels properties was examined: size and size distribution, volume phase transition temperature (VPTT), equilibrium swelling ratio, as well as morphology. Addition of linear or crosslinked alginate in PNIPAAm network impacted the increase of microgels size, while its hydrophilic nature improved microgels swelling capacity in comparison with pure PNIPAAm microgels. It was shown that thermosensitivity of microgels is not affected by the presence of alginate chains. Honeycomb-like pore structure, characteristic for pure PNIPAAm microgels, was also maintained in the microgels with alginate. Release of procaine hydrochloride from the selected microgels was studied using Franz diffusion cell at temperatures below and above VPTT of the microgels. The analyzed thermosensitive microgels could be regarded as potential matrices in transdermal drug release controlled by temperature changes.*

Literatura

1. C.C. Lin, A.T. Metters, *Adv Drug Delivery Rev*, **58** (2006) 1379.
2. A.K Anal, *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*, **1** (2007) 83.
3. R.P. Dumitriu, A.M. Oprea, C. Vasile, in *Smart Materials for Smart Devices and Structures*, M. Leonowicz, D. Oleszak Eds., Trans Tech Publications Ltd. (2009) 17.
4. S. Petrusic, M. Lewandowski, S. Giraud, P. Jovancic, B. Bugarski, S. Ostojic, V. Koncar, *J Appl Polym Sci*, **124** (2012) 890.
5. V. Karande, A. Bharimalla, G. Hadge, S. Mhaske, N. Vigneshwaran, *Fiber and Polym*, **12** (2011) 299.
6. G.Q. Zhang, L.S. Zha, M.H. Zhou, J.H. Ma, B.R. Liang, *Colloid Polym Sci*, **283** (2005) 431.

Biokompatibilni termoplastični poliuretani na bazi poli(ϵ -kaprolaktona)-b-poli(dimetilsiloksana)

Marija V. Pergal, Vesna V. Antić*, Gordana Tovilović**, Jelena Nestorov**, Jasna Đonlagić***

Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerzitet u Beogradu, Studentski trg 12-16, Beograd,

*Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, Njegoševa 6, Beograd,

**Institut za Biološka Istraživanja, Univerzitet u Beogradu, Bul. Despota Stefana 142, Beograd,

***Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Karnegijeva 4, Beograd

Izvod Termoplastični poliuretani sa mekim segmentima na bazi poli(ϵ -kaprolaktona)-b-poli(dimetilsiloksana)-b-poli(ϵ -kaprolaktona) i tvrdim segmentima na bazi 4,4'-metilendifenildiizocijanata i 1,4-butandiola imaju potencijalnu biomedicinsku primenu i zbog toga je ispitana njihova biokompatibilnost. Površinska svojstva kopolimera su analizirana atomskom mikroskopijom sila i određivanjem kontaktnih uglova. In vitro biokompatibilnost kopolimera je ispitana koristeći endotelne EA.hy926 ćelije primenom direktnog kontakta, metodom ekstrakcije i nakon prethodnog tretiranja površine kopolimera razblaženom plazmom. Sintetisani poliuretani nisu bili toksični prema endotelnim ćelijama. Poliuretani sa niskim sadržajem mekih segmenata i/ili velikim koeficijentom hrapavosti pokazuju dobra površinska svojstva i biokompatibilnost, što potvrđuju netoksičnost prema ćelijama i dobra adhezija ćelija. Prethodnim tretiranjem površine kopolimera razblaženom plazmom poboljšava se biokompatibilnost nekih kopolimera. Poliuretani sa dobrom mikrofaznom separacijom i hrapavijom površinom, kao i sposobnošću da vežu ćelije, su potencijalni biomaterijali koji mogu da se koriste kao implantati.

Uvod

Termoplastični poliuretanski elastomeri (TPU), zahvaljujući dobrim mehaničkim svojstvima i dobroj biokompatibilnosti, se koriste kao biomaterijali u medicini, i to kao implantati, matrice za kontrolisano otpuštanje lekova i nosači u inženjerstvu tkiva. Poznato je da su TPU na bazi polietara i poliestara, koji su prvi našli biomedicinsku primenu, podložni oksidativnoj i hidrolitičkoj degradaciji zbog prisustva etarskih i estarskih veza.¹ Jedan od načina da se poboljša biostabilnost i biokompatibilnost TPU je uvođenje poli(dimetilsiloksanskih) (PDMS) segmenata u polimerni lanac. PDMS su poznati po dobroj termičkoj i oksidativnoj stabilnosti, hidrofobnosti i fiziološkoj inertnosti.² Ugradnja PDMS-a u poliuretanski lanac nije jednostavna zbog nekompatibilnosti između nepolarnog PDMS pretpolimera i polarnih uretanskih komonomera. Jedan od načina da se poveća kompatibilnost komponenti reakcione smeše, a samim tim postignu veće molarne mase i bolja mehanička svojstva poliuretana, je primena makrodiola u obliku triblok kopolimera, kao što je to na primer α,ω -dihidroksi-poli(ϵ -kaprolakton)-b-poli(dimetilsiloksan)-b-poli(ϵ -kaprolakton), [α,ω -dihidroksi-(PCL-PDMS-PCL)]. Spoljašnji poli(ϵ -kaprolaktonski) segmenti (PCL) triblok kopolimera imaju ulogu kompatibilizera reakcione smeše, a ujedno doprinose biokompatibilnosti TPU. Pored toga, PCL je interesantan zbog odlične otpornosti na vodu, spore hidrolitičke i enzimske degradacije kao i biokompatibilnosti. Zahvaljujući kombinaciji svojstava PCL-a i PDMS-a, ovi blok-kopolimeri imaju potencijalnu primenu kao biomaterijali.^{3,4}

Pravoj ekspanziji u istraživanju novih biomaterijala doprinela je mogućnost kreiranja ili modelovanja fizičkih i hemijskih svojstava TPU za specifične namene, zahvaljujući poznavanju uticaja strukture polimera na njihova svojstva. Tako na primer, na biokompatibilnost poliuretanskih kopolimera se može uticati promenom hemijskog sastava, hidrofilitnosti površine, stepena kristaliničnosti i površinskom topografijom polimera. Sa stanovišta biokompatibilnosti, postoje različiti standardi i procedure za procenu biološkog odgovora implantata. Danas se za *in vitro* proučavanje biomaterijala koriste najmanje tri metode istraživanja: direktni kontakt, agar analiza i metoda ekstrakcije. Kao što nomenklatura nalaže, materijal za testiranje se može direktno staviti na ćeliju ili ekstrahovati u određenom rastvoru koji se zatim stavlja na ćeliju.⁵

Cilj ovog rada je ispitivanje uticaja sadržaja mekih segmenata na površinska svojstva kao i na biokompatibilnost poliuretanskih kopolimera sintetisanih polazeći od α,ω -dihidroksi-(PCL-PDMS-PCL), 4,4'-metilendifenildiizocijanata (MDI) i 1,4-butandiola (BD). Površinska svojstva su analizirana određivanjem kontaktnih uglova i atomskom mikroskopijom sila (AFM). In vitro biokompatibilnost kopolimera je ispitana koristeći endotelne EA.hy926 ćelije i to putem direktnog kontakta sa ćelijama, kao i nakon prethodnog tretiranja površine kopolimera razblaženom plazmom. Citotoksičnost kopolimera je ispitana pomoću LDH testa, a adhezija ćelija na površinu TPU je analizirana pomoću optičke mikroskopije.

EKSPERIMENTALNI DEO

Serija poliuretanskih kopolimera (TPU) sa različitim sadržajem mekih segmenata je sintetisana polazeći od α,ω -dihidroksi-(PCL-PDMS-PCL) (ABCR), MDI (Aldrich) i BD (Aldrich) reakcijom dvostepene poliadiacije u rastvoru *N,N*-dimetilacetamida i tetrahidrofurana (1:1, v/v).^{3,4}

Karakterizacija uzoraka AFM-om izvedena je korišćenjem AutoProbe CP-Research SPM (TM Microscopes-Veeco) instrumenta. Merenja su izvedena primenom kontaktnog moda. Merenje kontaktnog ugla (WCA) poliuretanskih filmova izvedeno je pomoću Krüss DSA100, primenom "sessile drop" metode. Korišćena je srednja vrednost WCA, određena na osnovu pet merenja.

Pre zasejavanja endotelnih EA.hy926 ćelija (poklon od Dr. Cora Edgell, Univerzitet u Severnoj Karolini, Amerika), TPU filmovi su sterilisani pomoću ultraljubičastog zračenja u vremenskom periodu od 30 min. i stavljeni su u polistirenske ploče za gajenje ćelija (Sarstedt, Nemačka). Ćelije su zasejavane u gustini od 30 000 ćelija po „bunaru“ (kiveti). Aktivnost LDH (laktat dehidrogenaze) u ćelijskom medijumu bez fenol crvenog, je određivana 24, 48 i 96 h posle zasejavanja. Količina oslobođenog LDH je merena na osnovu pretvaranja tetrazolijum soli INT (2-*p*-jodofenil-3-*p*-nitrofenil-5-fenil tetrazolijum-hlorid) u svetlo crveni formazan, pri čemu je intenzitet nastale boje bio proporcionalan broju liziranih ćelija. 100 μ l medijuma je mešano sa LDH supstratom (54 mM mlečne kiseline, 1,3 mM NAD, 0,28 mM *N*-metilfenazolijum metil-sulfata, 0,66 mM INT u 0,2 M Tris puferu; pH = 8,2) i inkubirano u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi. Absorbanca je merena spektrofotometrijski na 492 nm koristeći čitač ploča za mikrokulturu (Multiskan spectrum, Thermo). Procenat citotoksičnosti je izračunat i izražen u odnosu na kontrolni uzorak (ćelije gajene bez TPU), koji se uzima kao 100 %. Ćelije koje su adherirale na netretiranim TPU filmovima i filmovima tretiranim razblaženom plazmom su fotografisane optičkim mikroskopom "Carl Zeiss Axiovision", posle 96 h. Svi testovi su rađeni u triplikatima.

Rezultati i diskusija

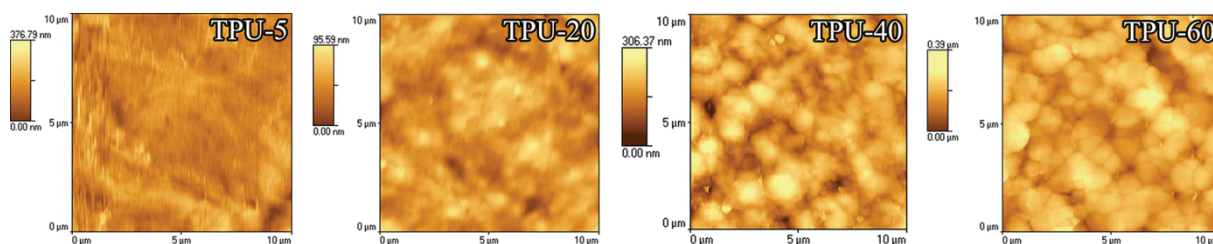
Osam uzoraka TPU je sintetisano reakcijom dvostepene poliadiacije u rastvoru. Sadržaj mekih segmenata pri sintezi serije kopolimera variran je u opsegu od 40 do 95 mas. %. Prema tome, struktura kopolimera je modifikovana variranjem molskog odnosa α,ω -dihidroksi-(PCL-PDMS-PCL) pretpolimera, MDI i BD u opsegu od 1:2:1 do 1:27:26. Sintetisani kopolimeri su po završetku sinteze pretaloženi u smeši metanol/voda da bi se uklonili eventualno zaostali neproreagovali monomeri, katalizator i oligomeri.

Tabela 1. Sastav, površinska svojstva termoplastičnih poliuretana i gustina ćelija

Oznaka uzorka ^{a)}	Molski odnos ^{b)}	Udeo PCL-PDMS-PCL, mas.% (NMR)	Kontaktни ugao, °	R_q / nm	Gustina ćelija, ćelije/mm ² (netretirani TPU)	Gustina ćelija, ćelije/mm ² (tretirani TPU)
TPU-5	1:2:1	95,5	99,8±0,9	84	600±100	1060±150
TPU-10	1:3:2	88,7	96,4±0,7	42	240±110	460±90
TPU-15	1:4:3	86,6	94,7±1,0	22	200±40	120±80
TPU-20	1:5:6	83,7	92,1±1,0	38	260±70	500±290
TPU-30	1:8:7	73,1	88,6±0,2	48	480±160	420±190
TPU-40	1:12:11	63,8	84,0±0,5	53	220±60	960±190
TPU-50	1:18:17	52,8	81,5±0,9	59	1230±310	1100±310
TPU-60	1:27:26	37,8	78,9±0,9	62	1430±180	1260±210

^{a)} Broj u nazivu uzorka označava maseni udeo tvrdog segmenta (%); ^{b)} PCL-PDMS-PCL:MDI:BD

Za karakterisanje površinske topologije sintetisanih kopolimera korišćene su AFM slike dobijene kontaktnim modom i rezultati su prikazani na Slici 1. Distribucija (raspodela) faza izgrađenih od tvrdih i mekih segmenata na površini kopolimernih filmova analizirana je pomoću 2D i 3D topografskih slika. Na osnovu prethodnih istraživanja, poznato je da svetli regioni predstavljaju tvrdu fazu (uređeni tvrdi domeni ili kristalinični regioni u poliuretanim), dok tamni regioni predstavljaju meku fazu.

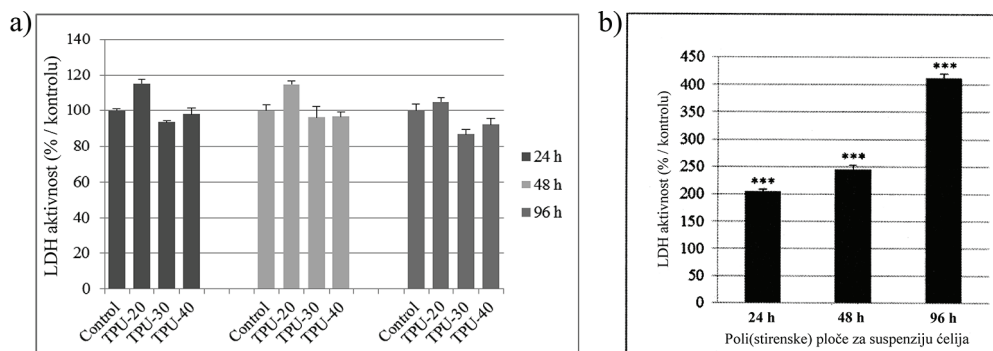


Slika 1. 2D AFM slike veličine 10 μm nekih sintetisanih poliuretana sa različitim sadržajem PCL-PDMS-PCL

Dvodimenzionalne AFM slike jasno pokazuju da se mikrostruktura površine kopolimera menja i da su kopolimeri (TPU-5, TPU-40, TPU-50 i TPU-60) imali hrapaviju površinu (Tabela 1). Rezultati AFM analize su jasno pokazali da se formiranje sferulitne superstrukture na mikro-skali sintetisanih kopolimera povećava sa povećanjem sadržaja tvrdih MDI-BD segmenata. Prosečna veličina sferulita određena AFM-om bila je između 1,2 i 1,5 μm .

Površina sintetisanih TPU je okarakterisana određivanjem statičkog kontaktnog ugla u vodi sa posebnim osvrtom na ispitivanje kvašljivosti i hidrofobnosti uzoraka. Vrednost kontaktnog ugla sintetisanih poliuretanskih kopolimera se povećavala od 79 do 100° sa povećanjem sadržaja PDMS-a u kopolimerima. Ovo ponašanje se može pripisati tendenciji PDMS segmenata da migriraju na površinu zbog male površinske energije PDMS. Vrednosti kontaktnih uglova za uzorke TPU-40, TPU-50 i TPU-60 su uporedivi sa kontaktnim uglovima termoplastičnih poliuretana koji se koriste u komercijalnim medicinskim uređajima, odnosno implantima (75-80°) i kontrolnim polistirenskim uzorcima (80-85°).⁶

U ovom radu biokompatibilnost je ispitivana putem direktnog kontakta sa endotelnim ćelijama kao i nakon prethodnog tretiranja površine TPU razblaženom plazmom. Endotelne EA.hy926 ćelije, korišćene u ovom radu, pripadaju sekundarnoj ćelijskoj liniji, i predstavljaju fuzionisane kancerogene ćelije sa endotelnim ćelijama iz pupčane vrpce. Ove ćelije mogu da se umnožavaju neograničeni broj puta. Kvantitativna procena citotoksičnosti TPU pomoću LDH testa posle kontakta ćelija sa TPU je pokazala da je statistički značajno povećanje aktivnosti LDH za 91% i 227% primećeno u ćelijskom medijumu sa TPU-40 posle 48 i 96 h. Dvostruko povećanje LDH aktivnosti je registrovano u ćelijskom medijumu inkubiranom posle 96 h sa TPU-20 i TPU-30.

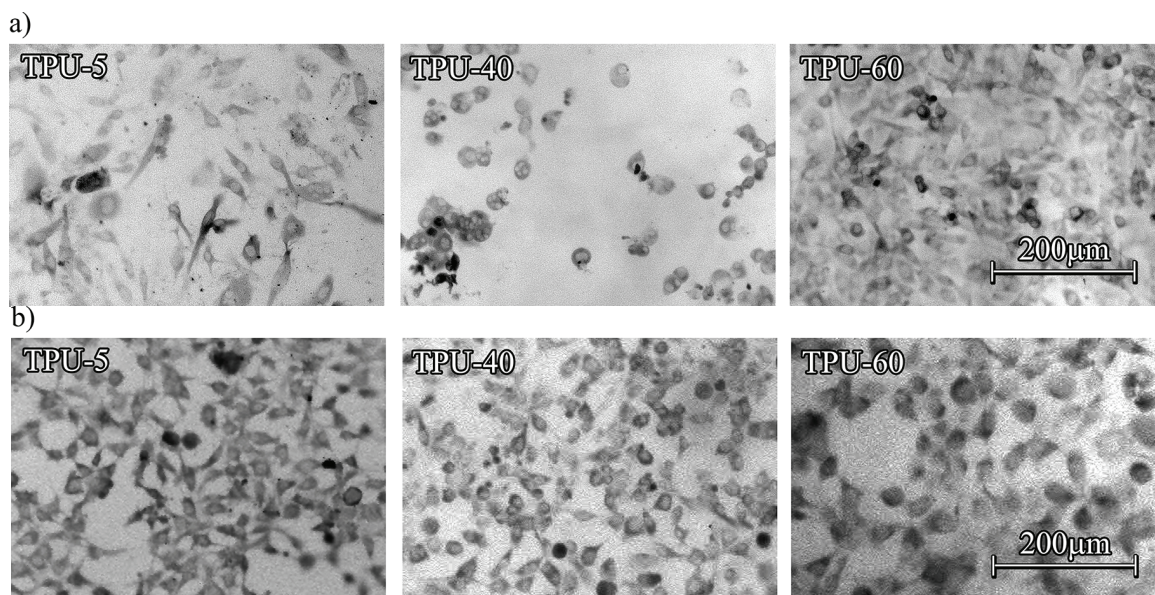


Slika 2. LDH aktivnost u medijumu endotelnih ćelija: a) inkubiranih sa ekstraktima poliuretana i b) zasejanih na poli(stirenskim) pločama

Rezultati LDH testova sa ekstraktima kopolimera su pokazali da ekstrakti uzoraka TPU-20, TPU-30 i TPU-40 nisu toksični za endotelne EA.hy926 ćelije posle 24, 48 i 96 h (Slika 2 a)). Može se zaključiti da je povećana aktivnost LDH kod ovih uzoraka najverovatnije rezultat nevezivanja ćelija na površinu TPU filmova. Ovo je indirektno potvrđeno u eksperimentima sa endotelnim ćelijama gajenim na poli(stirenskim) pločama za suspenziju ćelija (Slika 2 b)). LDH aktivnost u medijumu endotelnih ćelija zasejanih na poli(stirenskim) pločama sa površinama za koje se zna da ne adheriraju ćelije posle 24, 48 i 96 h je bila značajno povećana. Ovi rezultati su pokazali da nesposobnost vezivanja na odgovarajućoj površini predstavlja stres za ove ćelije, što je dovelo do oslobađanja LDH u medijumu.

Na osnovu rezultata adhezije endotelnih EA.hy926 ćelija na netretiranim TPU filmovima (Slika 3a)) može se zaključiti da se broj ćelija na površini kopolimera posle 96 h od zasejavanja očigledno povećavao na uzorcima TPU-5, TPU-50 i TPU-60 (Tabela 1), u odnosu na druge uzorke, najverovatnije zbog veće hrapavosti površine i povećane hidrofilitnosti. Na površini uzoraka TPU-5, TPU-50 i TPU-60, ćelije su bile pljo-

snatog, poligonalnog oblika i bile su ravnomerno raspoređene u poređenju sa površinama drugih sintetisanih kopolimera. Gustina ćelija kod netretiranih uzoraka iznosila je 200-1430 ćelija/mm² (Tabela 1).



Slika 3. Fotografije adhezije endotelnih ćelija na površini nekih TPU: a) netretiranih i b) prethodno tretiranih sa razblaženom plazmom

Da bi se ustanovilo da li prethodno tretiranje površine uzoraka razblaženom plazmom odgovara aktuelnoj situaciji koja se javlja u *in vivo* uslovima, uzorci su prethodno inkubirani sa razblaženom plazmom a zatim je analizirana adhezija ćelija na prethodno tretiranim uzorcima (Slika 3 b)). Gustina ćelija za TPU-5, TPU-10 i TPU-40 uzorke, prethodno inkubirane razblaženom plazmom, je bila značajno povećana u odnosu na netretirane uzorke (Tabela 1). Poznato je da adsorbovani proteinski sloj iz plazme može sadržavati fibrinogen, fibronektin, imunoglobulin i vitronektin, koji su adhezioni proteini. Prethodna adsorpcija određenih vrsta proteina na površini biomaterijala može povećati adhezivnost proteinskog sloja za mnoge vrste ćelija, zato što mnoge ćelije imaju receptore (integrine) na njihovoj ćelijskoj membrani za specifično vezivanje sa adhezionim proteinima iz plazme.

Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da sadržaj mekih segmenata, hrapavost površine kao i pretretiranje uzoraka plazmom imaju značajan uticaj na površinska svojstva TPU neophodna za vezivanje i rast endotelnih ćelija. Na ovom stupnju istraživanja, najpogodniji kopolimeri za biomedicinsku primenu, i za dalja ispitivanja u *in vivo* uslovima, su uzorci TPU-5 i TPU-60, koji sadrže 95 i 40 mas. % mekih segmenata. Bilo bi interesantno ispitati razliku između ova dva uzorka u *in vivo* uslovima i na osnovu toga bi se moglo zaključiti koja svojstva sintetisanih TPU su najvažnija za biokompatibilnost u *in vivo* uslovima.

Zaključak

Biokompatibilnost sintetisanih poliuretana zavisi od sadržaja tvrdih segmenata, hrapavosti površine i hidrofилности. Najveća gustina ćelija primećena je kod uzoraka sa niskim sadržajem mekih segmenata kao i kod uzorka sa najvećim sadržajem mekih segmenata, najverovatnije zbog velikog koeficijenta hrapavosti ovih kopolimera. Pored toga, pretretiranjem površine kopolimera razblaženom plazmom poboljšava se adhezija ćelija na površini nekih uzoraka. Sintetisani poliuretani nisu pokazivali citotoksični efekat prema endotelnim ćelijama. Prema tome, poliuretani sa dobrom mikrofaznom separacijom i hrapavijom površinom, kao i sposobnošću da adheriraju endotelne ćelije, su potencijalni biomaterijali koji bi se mogli koristiti kao medicinski implantati.

Zahvalnica: Ovaj rad je finansiran od strane Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije u okviru Projekta (172062).

Biocompatible thermoplastic polyurethanes based on poly(dimethylsiloxane)

A series of polyurethane copolymers based on poly(ϵ -caprolactone)-block-poly(dimethylsiloxane)-block-poly(ϵ -caprolactone) as soft segment and 4,4'-methylenediphenyl diisocyanate and 1,4-butanediol as hard segment, was synthesized by two-step polyaddition in solution. Surface properties of copolymers were analyzed by static water contact measurements and atomic force microscopy. Synthesized polyurethanes have potential biomedical applications, and because of that their biocompatibility was evaluated. In order to assess the biocompatibility of copolymers with different soft segment content, cytotoxicity and cell adhesion of copolymers using the EA.hy926 endothelial cell line, were examined. Biocompatibility of copolymers was investigated by direct contact with endothelial cells, extraction method and after pre-treatment of copolymer surface with diluted plasma. Polyurethane films with low soft segment content and/or high roughness coefficient show good surface properties and biocompatibility, which was confirmed by having no toxic effects to cells and by good cell adhesion. Therefore, the non-cytotoxic effect of the copolymers makes them interesting for further development and potential application as biomedical implants.

Literatura

1. S. Gogolewski, *Colloid Polym. Sci.* **267** (1989) 757
2. D.J. Martin, L.A. Poole Warren, P.A. Gunatillake, S.J. McCarthy, G.F. Meijs K. Schindhelm, *Biomaterials* **21** (2000) 1021
3. M. Pergal, V.V. Antic, M.N. Govedarica, D. Godjevac, S. Ostojic, J. Djonlagic, *J. Appl. Polym. Sci.* **122** (2011) 2715
4. M.V. Pergal, V.V. Antić, G. Tovilović, J. Nestorov, D. Vasiljević-Radović, J. Djonlagić, *J. Biomat. Sci., Polym. E.* (2011), DOI: 10.1163/092050611X589338
5. E. Briganti, P. Losi, A. Raffi, M. Scocianti, A. Munaò, G. Soldani, *J. Mater. Sci.:Mater. Med.* **17** (2006) 259
6. H. Li, J. Chang, A. Cao and J. Wang, *Macromol. Biosci.* **5** (2005) 433.

Organska hemija / Organic Chemistry

Aryldiketoacids. Synthesis, high resolution mass spectra, and pharmacophoric similarity with floxacins

Ilija N. Cvijetić, Tatjana Ž. Verbić,* Ivan O. Juranić,** Branko J. Drakulić**

Innovation Center of the Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg 12-16, 11000 Belgrade,

* Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg 12-16, 11000 Belgrade

** Department of Chemistry-ICHTM, University of Belgrade, Njegoševa 12, Belgrade, Serbia

(ilija@chem.bg.ac.rs)

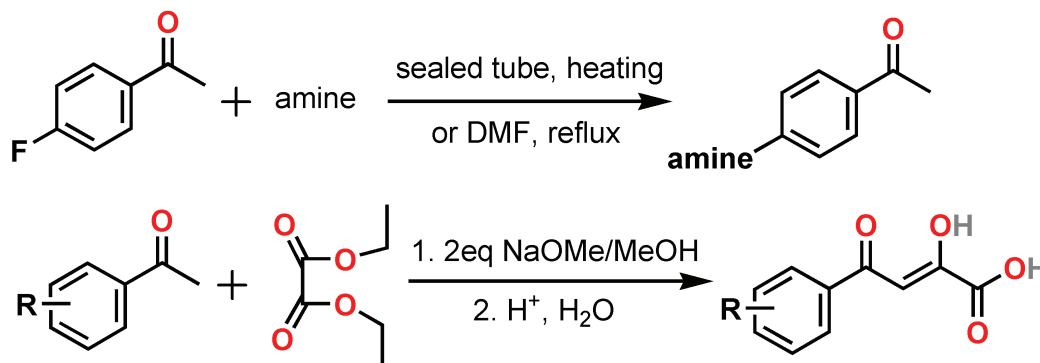
Introduction

Aryldiketoacids (ADKs) are proved as highly biologically active molecules, targeting several important enzymes associated with the life-threatening pathogens. One of the most important is Human immunodeficiency virus (HIV-1) integrase, the enzyme responsible for the integration of viral DNA in host genome.¹ Diketoacids bind to the active site Mg^{2+} /Asp domain in HIV-1 integrase, sequester Mg^{2+} ion, and inhibit the enzyme.

There is an urgent need for the new antibacterial drugs, because of the rapid development of bacterial resistant toward wide spectrum of commercially available antibacterial drugs. Methicilin-drug resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) are one of the most spread bacteria, especially in hospital conditions. Discovery of the new drug targets in bacteria is crucial for overcoming resistance. Inhibition of isoprenoid biosynthesis, involved in lipid biosynthesis, could be accomplished by targeting farnesyl diphosphate synthase (FPPS), or undecaprenyl diphosphate synthase (UPPS). Dehydrosqualene synthase (CrtM) is another prenyl transferase involved in cell wall biosynthesis. UPPS and CrtM possess similar active site Mg^{2+} /Asp domain as HIV-1 integrase. Several well-known HIV-1 integrase inhibitors are proved as very potent inhibitors of prenyl transferases.²

Results and discussion

Ciprofloxacin and other floxacins are antibacterial drugs, highly potent against gram-positive and gram-negative strains, and inhibit DNA replication by targeting DNA-topoisomerase complex. We observed structural similarity between floxacins and aryldiketoacids. Biological test showed that several ADK, synthesized by us, act against MRSA in micromolar range of concentrations.³ In order to design more potent inhibitors of MRSA, new series of ADK have been synthesized. Along with this, we showed that *meta*-alkyl substituted ADK have higher affinity toward Mg^{2+} ion, compared to *ortho*- and *para*-substituted congeners, and form complexes with ML_2 stoichiometry ($\log\beta_2 \sim 10$).⁴ The indication on different complexation ability within congeneric series of ADK, was initially obtained by analyzing high resolution mass spectra. *Meta*-alkyl substituted ADK show peak corresponding to $2(M-1)+Na$ of high intensity, where M is a mass of molecular ion.



R = 3-Me-, 2,4-di-Me-, 2,4,5-tri-Me-, 2,3,5,6-tetra-Me-, 2,4,6-tri-*i*-Pr-, 2,5-di-cyclohexyl-, 3-fluorenyl-, 2-tetralinyl-, 3-Br-, 4-Br-2,5-di-Me-, 4-MeO-2,5-di-Me-, 4-OH-3,5-di-Me-, 2-MeO-, 3-MeO-, 3-CF₃-, 4-piperidinyl-, 4-pyrrolidinyl-, 4-morpholinyl-, 4-(*N,N*-di-Me)-, 4-*N*-Me-piperazinyl-, 4-imidazolyl-, 4-*N*-cyclohexyl-

Figure 1. Synthesis of compounds reported.

ADKs were synthesized by Claisen condensation of substituted acetophenones with diethyl-oxalate, followed by *in-situ* base hydrolysis of ethyl ester formed, to give aryldiketoacids (Figure 1). Substituted acetophenones used were commercially available (3-CH₃, 2-OCH₃, 3-OCH₃, 3-CF₃), or synthesized using different procedures. Alkyl- and halogen- substituted acetophenones were obtained by Friedel-Crafts acylation of corresponding substituted benzenes, using AlCl₃ as a catalyst in CH₂Cl₂ as a solvent. The 4-amino-substituted acetophenones were obtained starting from commercially available 4-F acetophenone. Condensation with cyclic secondary amines (piperidine, *N*-methylpiperazine, morpholine, pyrrolidine, imidazole) proceeded easily, with yields over 90%, mixing the excess of amine with 4-F acetophenone and heating for 2-3 hours on 130-140 °C in the pressure-resistant steel tube, without any solvent. Similarly, refluxing the mixture of 4-F acetophenone, amine, and K₂CO₃ in DMF on 110-120 °C for 24^h, we obtained the same products in high yields. Synthesized compounds were purified by crystallization or by dry-flash chromatography, and characterized by ¹H and ¹³C NMR, ESI-MS, IR spectra and melting points.

The difference of complexation ability of ADK was confirmed in the newly prepared set by ESI-MS spectra. Selected examples are shown on Figure 2 and in Table 1. Obviously, compounds bearing *meta*-alkyl substituents show much more intensive [2(M-1)+Na] ions than the rest in the set. Highest ratio is observed for the 3-Me- derivative. Presence of the both *meta*-alkyl and *ortho*-alkyl substituents, as in 2,4,5-tri-CH₃-, and 2,3,5,6-tetra-CH₃- derivatives, attenuate such effect in some extent, probably because aryl to Ar-C(O)- torsion. *Ortho*-substituents increase this torsion angle, and probably decrease the resonance between diketo moiety and aryl ring. Alkoxy and halogens, as substituents in *meta*-position, did not influence in the same manner as alkyl substituents.

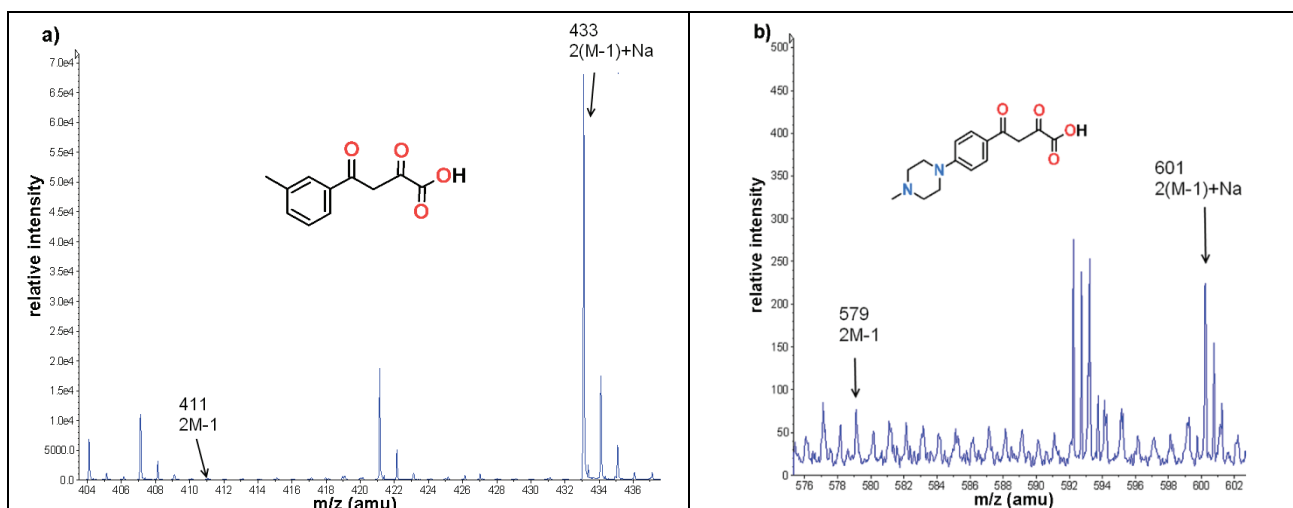


Figure 2. Selected regions of ESI-MS spectra. (a) 3-CH₃ADK, and (b) 4-*N*-Me-piperazinyl ADK.

Table 1. Intensities of observed peaks in ESI-MS spectra and their relative ratios, displayed for selected compounds.

Compound	Ion intensity		$\frac{2(M-1)+Na}{2M-1}$
	2M-1	2(M-1)+Na	
3-CH ₃ -	211	57222	271
2,4,5-tri-CH ₃ -	766	85509	112
3-OCH ₃ -	227	14011	62
4-OCH ₃ -2,5-di-CH ₃ -	1226	102381	84
2,3,5,6-tetra-CH ₃ -	847	151487	179
3-Br-	707	33065	47
4-(<i>N</i> -CH ₃ -piperazinyl)-	35	69	2

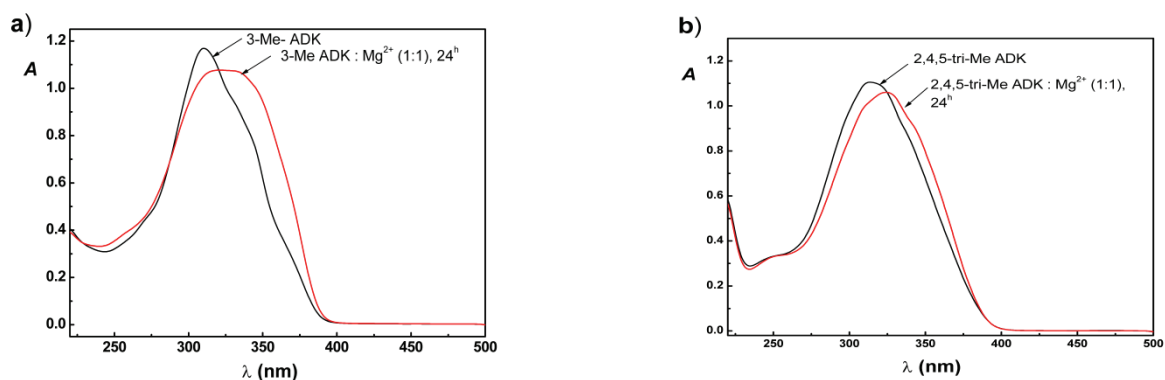


Figure 3. UV/Vis absorption spectra of a) 3-CH₃-, and b) 2,4,5-tri-Me- derivatives; before (black) and after the addition of Mg²⁺ (red):

Complexation ability of *meta*-substituted ADK with Mg²⁺ was determined by UV/Vis spectroscopy (Figure 3); bathochromic shift of absorption maximum was recorded upon complexation. Those results are in agreement with our previous findings.⁴

Pharmacophoric similarity of floxacins and reported compounds:

Reported set is prepared as continuation of our work on ADK derivatives that can overcome multidrug resistance in MDRSA.³ Pharmacophoric similarity with known fluoroquinolone antibiotics (Figure 4) was examined by superimposition in the ROCS program.⁵ The crystal structure of the norfloxacin (Figure 4a)⁶ is used as a template. Ten conformations of the each compound studied were obtained by OMEGA,⁷ from the SMILES notation, and 'rms' keyword was set to 0.15. 100 random starts per molecule were used. Both template and queries are treated in their neutral forms. Tanimoto and Tanimoto combo (include shape and OpenEye 'color' force field (ff)) similarity scores were used for the quantification of results.

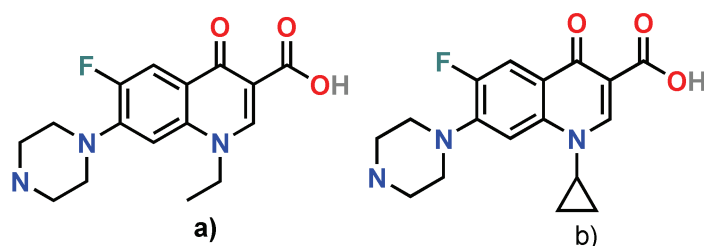


Figure 4. Structures of norfloxacin (a) and ciprofloxacin (b)

The highest similarity between norfloxacin, by both shape and pharmacophore (color ff) similarity, not surprisingly, were observed for derivatives having 4-hetero(alicyclic) substituents. Best overlap was found for 4-*N*-Me-piperazinyl derivative (Tanimoto Combo 1.074, Shape Tanimoto 0.696, Color Tanimoto 0.378) Figure 5a, followed by 4-pyrrolidinyl- derivative (Tanimoto Combo 1.037, Shape Tanimoto 0.733, Color Tanimoto 0.304).

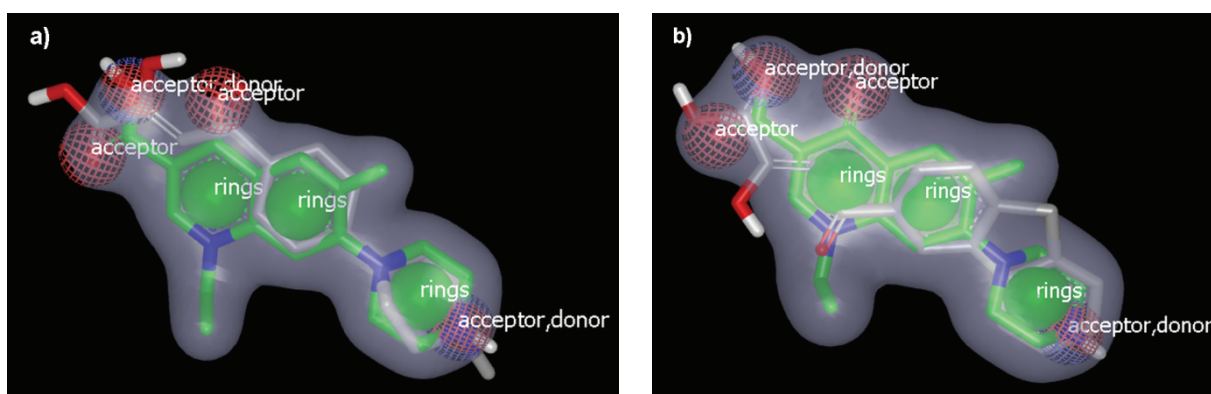


Figure 5. a) 4-*N*-Me-piperazinyl- and b) 3-fluorenyl derivatives superimposed on norfloxacin.

It should be noted that among highly ranked derivatives we found 3-fluorenyl- derivative (Tanimoto Combo 1.030, Shape Tanimoto 0.742, Color Tanimoto 0.287), that show better shape similarity than previous two, but is positioned with their diketo moiety opposite to the -C(O)-C-COOH moiety of the norfloxacin, Figure 5b. Favored overlap of norfloxacin Ph-piperazinyl moiety with fluorenyl moiety of ADK contributes to relatively high shape score.

Conclusion

We reported preparation and characterization of 22 aryldiketo acids, designed to confirm significant observations obtained by our group on congeners in the same series. High-resolution ESI-MS spectra showed better complexation of monovalent metal ions for *meta*-alkyl substituted derivatives. Introduction of *ortho*-alkyl substituents attenuate such effect in some extent. The same derivatives exert good complexation of Mg²⁺ ion, and this is proved by UV/Vis spectroscopy. This observation has pharmacological relevance, due to significance of Mg²⁺ ion in HIV-1 integrase active site. 4-Hetero(alicyclic substituted derivatives show significant pharmacophoric similarity with floxacin antibiotics. Biological tests of prepared compounds against multidrug resistant *Staphylococcus aureus* are in preparation.

Acknowledgement: The Ministry of Education and Science of Serbia supports this work. Grant 172035.

Арилдикетокиселине. Синтеза, масени спектри високе резолуције и фармакофорна сличност са антибиотицима из класе флоксацина

Арилдикетокиселине (АДК) су биолошки активни молекули који делују на ензим интегразу HIV-1 вируса. Наша прелиминарна истраживања су показала већи афинитет *meta*-субституисаних АДК ка комплексирању Mg²⁺ јона у односу на остале субституционе обрасце. Још важније, АДК показују антибактеријску активност према сојевима бактерија *Staphylococcus aureus* резистентним према више антибиотика (MDRSA). Као наставак ових истраживања, синтетисали смо серију од 22 нова конгенера, као потенцијално боље антибактеријске агенсе (MDRSA). У овом саопштењу је укратко описана њихова синтеза, афинитет ка комплексирању једно- и двовалентних металних јона, као и фармакофорна сличност са антибиотикима из класе флоксацина.

References

1. N. Neamati, *Expert Opin. Ther. Pat.* **12** (2002), 709-724
2. Y. Zhang, F. Yang, L. Li, W. Zhu, Y. Liu, R. Cao, R. Pang, E. Lee, J. Axelson, M. Hensler, K. Wang, K. J. Molohon, Y. Wang, D. A. Mitchell, V. Nizetand, E. Oldfield, *ACS Med Chem Lett* (2012), dx.doi.org/10.1021/ml300038t
3. B. J. Drakulić, M. Stavri, S. Gibbons, Ž. S. Žižak, T. Ž. Verbić, I. O. Juranić, M. Zloh, *ChemMedChem* **4** (2009), 1971-1975
4. T. Ž. Verbić, B. J. Drakulić, M. Zloh, I. O. Juranić, *Let. Org. Chem.* **5** (2008), 692-699
5. a) S. L. Swann, S. P. Brown, S. W. Muchmore, H. Patel, P. Merta, J. Locklear, P. J. Hajduk, *J. Med. Chem.* **54** (2011), 1223-1232; b) S. W. Muchmore, D. A. Debe, J. T. Metz, S. P. Brown, Y. C. Martin, P. J. Hajduk, *J. Chem. Inf. Model.*, **48** (2008) 941-948; ROCS v 3.1.1 www.eyesopen.com
6. S. Basavoju, D. Bostrom, S. P. Velaga, *Cryst. Growth Des.* **6** (2006), 2699-2708
7. a) P. C. D. Hawkins, A. G. Skillman, G. L. Warren, B. A. Ellingson, M. T. Stahl, *J. Chem. Inf. Model.* **50** (2010), 572-584; b) J. Boström, J. R. Greenwood, J. Gottfries, *J. Mol. Graph. Modell.* **21** (2003), 449-462; OMEGA v 2.4.2 www.eyesopen.com

Molecular modeling and SAR between phenyl-piperazine-acetamides, phenyl-piperazine-ureas and D2, 5HT1A receptors

Vladimir B. Sukalovic, Vukic Soskic*, Deana Andric**, Goran Roglic**, Sladana Kostic-Rajacic

ICTM- Center of Chemistry, University of Belgrade, Njegoseva 12, Belgrade, Serbia

*Proteosys AG, Carl-Zeiss-Str. 51, 55129 Mainz, Germany

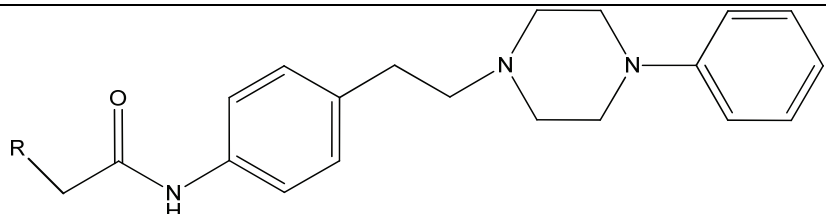
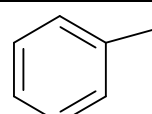
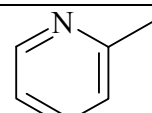
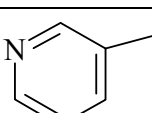
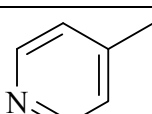
**Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg 12-16, Belgrade, Serbia,

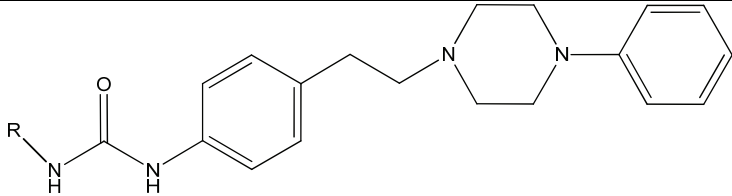
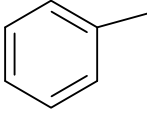
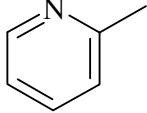
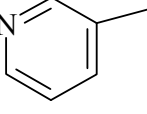
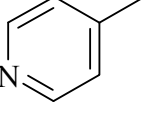
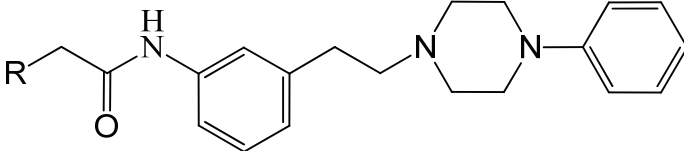
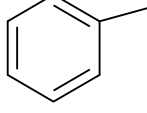
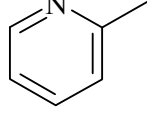
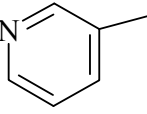
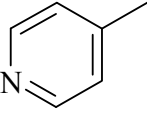
Introduction

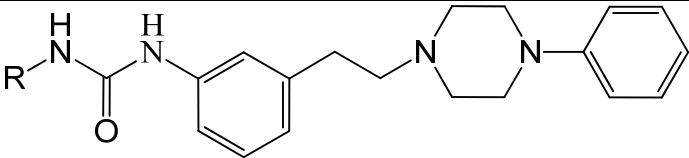
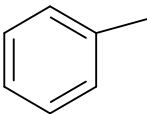
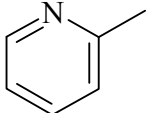
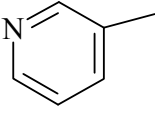
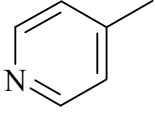
Dopamine (DA) and 5-hydroxytryptamine (5-HT) are two of the major neurotransmitters in the central nervous system (CNS) and play crucial roles in behavior and cognition. The focus of this study are the D2 DA and 5HT1A receptors and their ligands, that are suggested to be a potential target in the treatment of neurological disorders such as schizophrenia, depression, anxiety and drug abuse^{1,2}. It has been considered that D2 DA receptors are the main mechanism responsible for the efficacy of antipsychotics. That assumption was challenged by the discovery of atypical antipsychotics due their activities at multiple receptors. This notion was supported by clinical evidence that multi-target drugs are more effective than single target agents in the treatment of CNS conditions ^{3, 4}. Among others, 5HT1A receptors have been proposed as one of the targets for atypical antipsychotic drugs. Some works suggest that the D2/5HT1A ratio is an important parameter that determines the efficiency of antipsychotic drugs⁵. Despite a rather high homology among D2 DA and 5HT1A there is a significant diversity in ligand's specificity towards these two receptor subtypes. Understanding of molecular mechanisms of ligand receptor interaction would contribute significantly to the drug discovery process.

According to the model proposed by us D2 DA can easily adopt rather long linear ligands and form a stable complex through interactions with two binding pockets, one located in the helical part and the second in the extracellular loop (ecl2) of the receptor⁶. Similarly, for high affinity binding of large ligands two binding pockets are required for the 5HT1A receptor⁷. Both of these binding pockets are located in the helical part of the 5HT1A receptor and require a curved shaped ligand to access each of them. To confirm the quality of those two receptor models we designed two sets of ligands of different molecular shape (Table 1) and performed the biological and molecular docking test on the D2 DA and 5HT1A receptors.

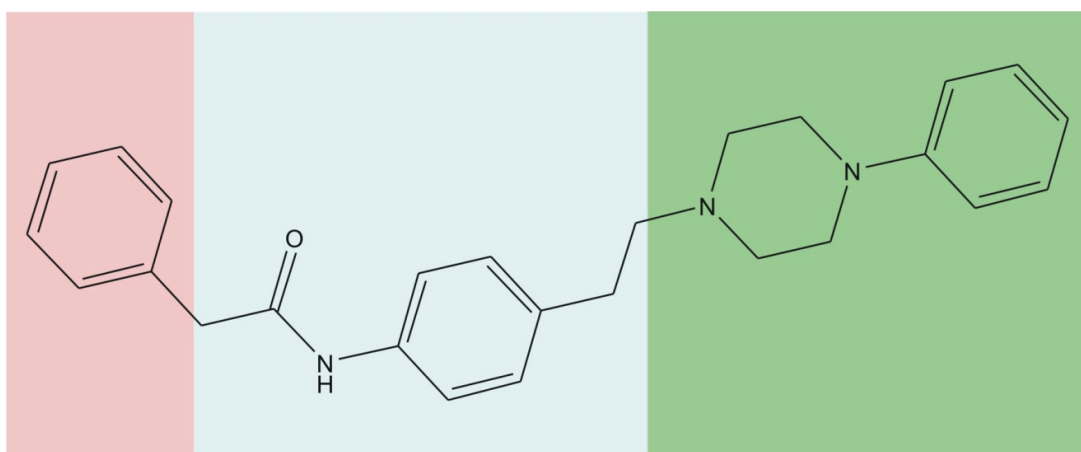
Table 1. Ligand structures and activities used for docking analysis.

			
No	R	Ki D2	Ki 5HT1A
1		4189.5	902.6
2		70.7	95.3
3		69.6	159.8
4		48.6	122.5

			
No	R	Ki D2	Ki 5HT1A
5		482.5	2264.1
6		14.2	125.8
7		8.2	397.9
8		3.6	226.8
			
No	R	Ki D2	Ki 5HT1A
9		3575.5	0.58
10		277.8	4.73
11		82.4	1.39
12		201.6	2.26

			
No	R	Ki D2	Ki 5HT1A
13		3250	5.78
14		364	7.53
15		29.7	0.95
16		48.7	0.50

Newly designed ligands consist of: a tail part (phenylpiperazine), a linker part (phenylcarbamate or phenylacetamid) and a head part (phenyl or piridyl group), (Figure 1).



HEAD LINKER TAIL

Figure 1. Investigated molecules are divided into three substructures: head part (red), linker part (blue) and tail part (green) for clarity of discussion.

Experimental

Receptor 3D models

For docking analysis we used our dopamine D2 model based on crystal D3 structure and serotonin 5HT1A8 receptor model. The receptors binding sites were determined by combining results from experimental data and the Discovery Studio bind site analysis module⁹. Amino acid residues charges were adjusted where needed, assuming physiological conditions, and using CHARMM force field. To speed up calculations, dopamine D2 third intracellular loop was removed and dynamic length constrain was used in its place to hold the helices in place.

Ligand Construction

Ligand 3D structures were generated using the Discovery Studio program⁹. Assuming physiological conditions, the basic aliphatic nitrogen atom of the piperazine was protonated. The geometry was optimized using the CHARMM force field applying the conjugate gradient method until the energy difference between successive cycles was below 0.0042 kJ/mol¹⁰.

Docking analysis

Docking of the selected ligands as presented in Table 1 was done by simulated annealing using the LIBDOCK module from Discovery Studio9. All ligands were docked as protonated, using the CHARMM force field. Initial position of the ligand in the binding site, was arbitrary, while protonated nitrogen on the ligand part was kept in close proximity of Asp 114 of the D2 receptor and Asp 116 of the 5HT1A receptor. After initial ligand placement, no further ligand constrains were applied and the docking procedure based on Monte-Carlo methodology was carried out. Up to 100 structures were produced in every run and each finally optimized in order to remove steric interaction with a gradient limit of 0.0042 kJ/mol or 4000 optimization steps. Obtained docked structures were examined, and 10 of those with the lowest total energy were further filtered to obtain docking structure with the best ligand fit. We selected structure based on the following criteria: lowest total energy of the complex, shortest salt bridge formed between Asp 114 of the D2 receptor (Asp 116 of the 5HT1A receptor), and proton on nitrogen, chair conformation of arylpiperazine ring, and aryl part of the molecule positioned in the rear hydrophobic pocket of the receptors (PHE 386, TRP 390, TYR 420 – for D2DAR, and PHE 112 and TYR 390 – for 5HT1A). After an initial criterion was satisfied, the second step was examination of different interactions that can be formed between receptor and ligand (hydrogen bonds, aromatic–aromatic interactions, etc.). In that way, the best possible docking structures were selected.

Visualization

Structures were visualized using DS Visualize v2.5.19 and obtained images were rendered using PovRay Raytracer v3.612.

Results and Discussion

Docking analysis results (Figure 2 and 3) show common interactions, shared by all investigated ligands.

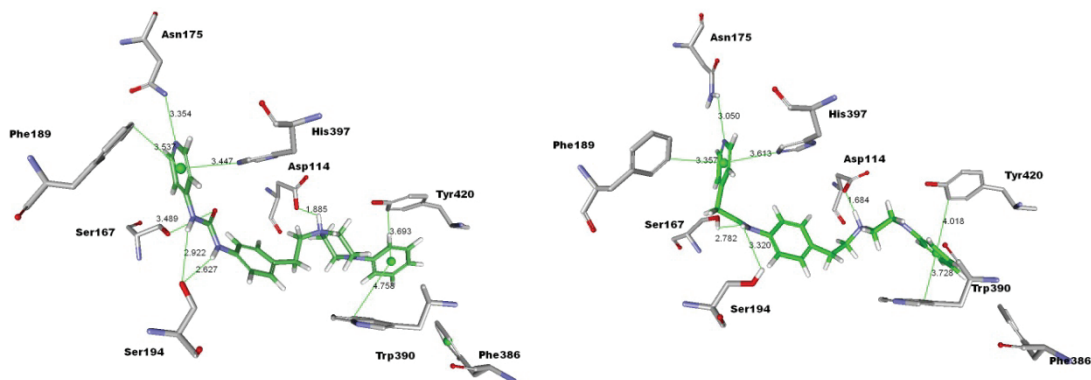


Figure 2. Docking analysis of D2 receptor and ligands 4 (right) and 8 (left). Only key amino acid residues are shown.

Those interactions are: in case of D2 receptor: salt bridge formed between ASP 114 and protonated piperazine nitrogen, hydrophobic interactions between PHE 386, TRP 390, TYR 420 and aryl-piperazine, hydrogen bond formed between ligand and SER 194 or SER 167.

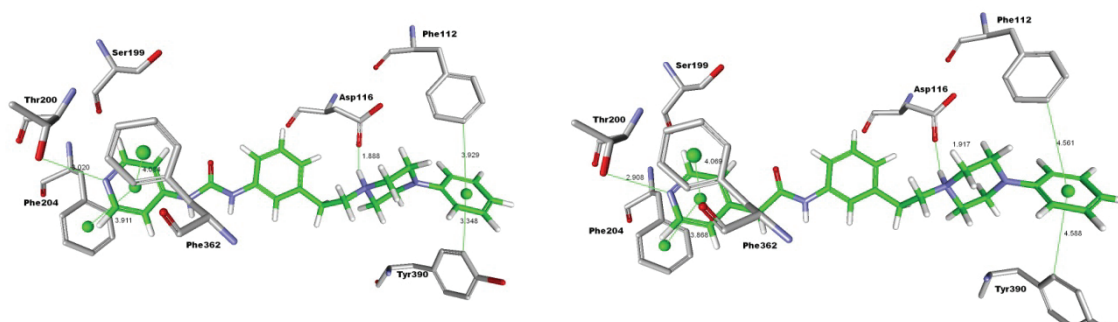


Figure 3. Docking results of 5HT1a receptor and ligands 12 (right) and 16 (left). Only key amino acid residues are shown.

In case of 5HT1A receptor, observed interactions are: salt bridge between ASP 116 and protonated piperazine nitrogen, hydrophobic interactions between ligand aryl-piperazine and receptor hydrophobic pocket formed by PHE 112 and TYR 390 as well as hydrogen bonds between ligand and SER 199 and THR 200. All listed interactions are located in transmembrane domain of receptor molecules and are described in our earlier publications 11, 7.

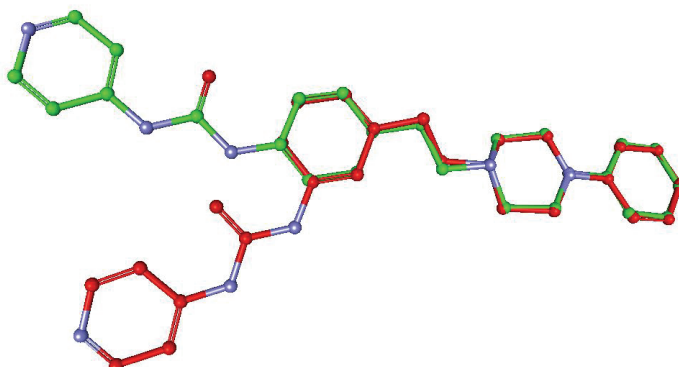


Figure 4. Overlay of ligands 8 (green) and 16 (red). Although tail structure occupies the same space in the receptor hydrophobic pocket, difference in linker segment leads to different placement of head segment and ultimately to higher affinity towards D2 (green) or 5HT1a receptor (red).

All investigated ligands bind to D2 and 5HT1a receptors to a various degree. Ligands 1 - 8 show higher D2 affinity, while ligands 9 - 16 bind stronger to 5HT1a. Particular ligand activity towards D2 or 5HT1a receptor is in first place influenced by the shape and length of the ligand (Figure 4). Ligands 1 - 8 have elongated, shape that can form better fit with ecl2 amino acid residues of D2 receptor together with interactions in the hydrophobic pocket located deep inside the binding site. On the other hand, ligands 9 - 16 are curved, and that shape is preferable by 5HT1a receptor. Those ligands can interact with both 5HT1a hydrophobic pockets described above.

Linker ligand segments have important two-fold role in ligand activity. First is head segment positioning to facilitate interactions between receptor and head segment, and second is forming of one (or more) hydrogen bonds, with receptor amino acid residues. In that way, ligands 5 - 8 that have linker capable of forming multiple hydrogen bonds with D2 receptor have higher affinity than their counterpart (ligands 1 - 4). In case of 5HT1a receptor both linker types have sufficient size to achieve optimal head positioning inside the hydrophobic pocket formed by PHE 204 and PHE 362.

Head part has significant influence on receptor ligand interactions. Ligands 1 - 8 that have higher D2 receptor affinity bind into space formed in part by ecl2 segment. Since loop segment is far less rigid than the rest of the receptor, correct orientation and number of receptor - ligand interactions leads to increase in affinity. Ligands 1 and 5 are clear example of this, since ligand 5, forming multiple hydrogen bonds in linker part with receptor, has stronger anchor and that leads to less head part mobility. On the other hand, less mobile head part, forms stronger interactions with loop segment. Since those interactions are weak and aromatic in nature, correct orientation and distance between corresponding groups lead to increase in affinity. Further increase in affinity is observed in case of ligands 2 - 4 and 6 - 8. Introduction of nitrogen atom in aromatic ring, lead to increased affinity, most probably by forming additional interactions with ASN 175. This is supported by fact that nitrogen atom in position 4 of the aromatic ring has best orientation toward ASN 175, but influence of nitrogen atom on aromatic interactions cannot be neglected. It is possible that both types of interactions contribute to affinity.

Ligand affinity toward 5HT1a receptor, show mixed results when nitrogen atom is introduced in aromatic head segment. Our research pointed out that for high 5HT1a receptor affinity, aromatic interactions between head segment and hydrophobic pocket of receptor formed by PHE 204 and PHE 362, play important role, but exact type of those interactions are still in dispute. In case of ligands 10 - 12 introduction of nitrogen atom does not alter affinity considerably, while in 14 - 16 we observe increase in affinity in case of ligands 15 and 16. Those results can be explained by either increased rigidity of ligands 14 - 16 or altering ligand electrostatic potential surface, and in that way contribute to better (or worst) aromatic interaction.

Conclusion

Ligand shape and size together with correct orientation and number of functional groups play pivotal role in receptor – ligand interactions. Numerous interactions that lead to high complex affinity must be formed between ligand and different parts of the receptor. In case of D2 receptor, ligand must occupy hydrophobic pocket located deep inside the binding site, as well as, part of the bind site formed by ecl2 loop. Only by forming interactions with both parts of the receptor, together with salt bridge with ASP 144 and hydrogen bonds with SER 167, 194 or 197, high affinity can be achieved.

5HT1a receptor has similar layout, and ligand have to bind into two hydrophobic pockets, one located near ASP 116, in the binding site interior, while second is adjacent to SER 199 and THR 200. Salt bridge between ligand and ASP 116, hydrogen bond with SER 199 or THR 200 together with aromatic interactions are the key to high affinity. In need of ligands that are selective toward 5HT1a receptor, ligands 9 and 13 may be considered as good candidates.

Dopamine D2 receptor bind site is comprised of several distinct parts. Near key amino acid residue ASP 114, that plays anchor role in ligand binding, hydrophobic pocket formed by amino acid residues PHE 386, TRP 390, TYR 420 is responsible for correct orientation of the ligand. Number of edge-to-face interactions formed between those amino acid residues and ligand are key factor for high affinity. On the receptor top side, several serine residues (SER 167, 194 or 197) are important for correct ligand positioning and second extra cellular loop, fold down and form important part of bind site. Several amino acid residues (PHE 189, ASN 175 and HIS 397) contribute to receptor ligand interactions, by forming aromatic interactions (most probably edge-to-face in nature) and hydrogen bonds, but we cannot exclude hydrophobic interactions with the other ecl2 amino acid residues, which define border of the receptor bind site.

Serotonin 5HT1a have similar bind site layout. Key interaction point is ASP 116. Hydrophobic pocket formed by PHE 112 and TYR 390, forms aromatic (edge-to-face) interaction with ligand and ensures correct ligand orientation inside the bind site. Another area, near the top receptor side, formed by SER 199, THR 200, PHE 204 and PHE 362 is important for ligand affinity. SER 199 and THR 200 form hydrogen bond with receptor that is key interaction in case of 5HT1a and PHE 204 with PHE 362 form hydrophobic pocket. High affinity ligands, for 5HT1a receptor, usually occupy that hydrophobic pocket, and aromatic interactions between receptor and ligand, together with other listed interactions, lead to high affinity. Extra cellular loops in 5HT1a receptor do not play significant role in ligand binding.

Acknowledgments: This research was part of project 172032 funded by the Serbian Ministry of Education and Science

Molekulsko modelovanje i SAR analiza fenil-piperazin-acetamida, fenil-piperazin-urea i D2, 5HT1A receptora

Smatra se da je odnos aktivnosti liganda prema dopaminskom D2 u odnosu na serotoninški 5HT1A receptor, važan parametar koji određuje efikasnost antipsihotika. U ovom radu, predstavljamo molekulsko modelovanje N-[[2-(4-fenil-piperazin-1-il)-etil]-fenil]-2-aril-2-il-acetamida i 1-[[2-(4-fenil-piperazin-1-il)-etil]-fenil]-3-aril-2-il-urea, kao i proučavanje odnosa njihove strukture i aktivnosti prema D2 i 5HT1A receptorima. Dosadašnja istraživanja su pokazala da selektivnost liganda kao i afinitet vezivanja za različite klase receptora u velikoj meri zavise od njihovog oblika i veličine. Metodama molekulskog modelovanja, koristeći homologe modele receptora i dokovanje liganada, došli smo do rezultata koji objašnjavaju aktivnost liganada. Dobijeni eksperimentalni rezultati, kao i rezultati modelovanih receptor-ligand interakcija ukazali su na moguće pravce optimizacije selektivnosti liganada prema 5HT1A receptoru.

References and Notes

1. C. Missale, S. R. Nash, S.W. Robinson, M. Jaber, M. G. Caron, *Physiol. Rev.*, 78. (1998) 189.
2. D. J. Hayes, A. J. Greenshaw, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 35. (2011) 1419.
3. A. J. Farah, *Clin. Psychiatry*, 7. (2005) 268.
4. H. A. Nasrallah, *Mol. Psychiatry*. 13. (2008) 27.
5. A. Newman-Tancredi, M. B. Assie, N. Leduc, A. M. Ormière, N. Danty, C. Cosi, *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 8. (2005) 341.

6. V. Sukalovic, V. Soskic, D. Andric, G. Roglic, S. J. Kostić-Rajacic, J. Serb. Chem. Soc. (2011) doi: 10.2298/JSC111028212S.
7. M. V. Zlatovic, V. Sukalovic, C. Schneider, G. M. Roglic, Bioorg. Med. Chem. 14. (2006) 2994.
8. V. Soskic, J. Joksimovic, J. Curr. Med. Chem. 5. (1998) 493.
9. Accelrys Software Inc.; Discovery Studio Modeling Environment, Release 2.5, San Diego: Accelrys Software Inc. (2009).
10. B. R. Brooks, B. D. Brucoleri, D. J. Olafson, S. States, M. J. Swaminathan, Karplus, Comp. Chem. 4. (1983) 4, 187.
11. V. Sukalovic, D. Andric, G. Roglic, S. Kostic-Rajacic, A. Schrattenholz, V. Soskic, Eur. J. Med. Chem. 40. (2005) 481.
12. Pov-Ray; The Persistence of Vision Ray-Tracer, Version 3.6 2003-2011, <http://www.povray.org/> (Accessed Jan 12, 2012).

Nastava hemije / Chemistry Education

Примена иконичне репрезентације у провери знања студената хемије

Игор М. Матијашевић и Јасминка Н. Королија

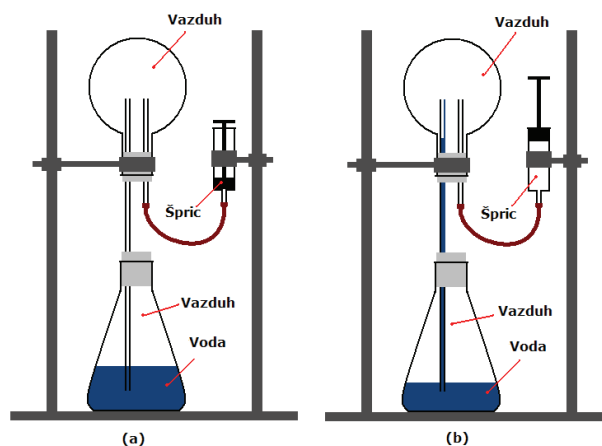
Хемијски факултети, Универзитети у Београду, Студентски шри 12-16

Увод

Репрезентације су од суштинске важности за природне науке и развој нових репрезентација „иде руку под руку“ са развојем науке.^{1,2} Неминовно, важност репрезентација у науци преноси се и на наставу предмета тих наука. Репрезентација се може односити и на вербалне исказе, и на невербалне. Шоц дели репрезентације на две групе: дескриптивне (описне) и депиктивне (сликовите, иконичне).³ Текст, хемијске формуле, математичке једначине, формуле физичких закона јесу дескриптивне репрезентације, док су иконичне репрезентације дијаграми, графикони, илустрације итд. Дескриптивне репрезентације су погодније за репрезентовање различитих врста садржаја, док иконичне репрезентације више доприносе при доношењу закључака.⁴ Козма и сарадници разматрали су улогу репрезентација у разумевању хемијских феномена.² Њихов закључак је да хемијске репрезентације имају централно место у разумевању феномена. Употреба репрезентација представља компетенцију коју треба сагледати и као кључну културолошку активност.⁵ Истраживањем репрезентационих компетенција студената на садржају гасних закона утврђено је да компетенција за једну врсту репрезентације не имплицира компетенције за репрезентације. Са већим репрезентационим компетенцијама долази до изражаја све већа употреба различитих репрезентација. Осим тога, студенти који су показали напредне репрезентационе компетенције, углавном узимају једну репрезентацију као референтну, тако да решавање проблема укључује и превођење других репрезентација у референтне.⁶

Резултати недавних истраживања показали су постојање значајних потешкоћа у разумевању гасних закона без обзира на узраст испитаника (ученици, студенти, наставници).⁶⁻⁸ У појединим студијама^{7,8} испитаници су решавали тзв. концептуална питања у смислу давања објашњења за промену стања гаса, приказану иконичном репрезентацијом. При таквим условима покрећу се когнитивни процеси испитаника који су одраз њиховог разумевања датог садржаја, под условом да је иконична репрезентација непозната.⁹ Аутори поменутих студија сматрају да су потешкоће у разумевању гасних закона резултат алгоритамског приступа учењу. У таквом приступу ученици само решавају рачунске задатке применом алгоритама. Овакав став аутора утемељен је на резултатима студија којима је показано да студенти који успешно решавају рачунске задатке помоћу алгоритама могу бити неуспешни у решавању концептуалних питања.¹⁰⁻¹³ Такође је показано да многи студенти не разумеју под којим условима важе гасни закони и да не разумеју узрочно-последичне везе које постоје између макро и субмикросвета.⁸

Циљ овог истраживања био је сагледати како студенти хемије објашњавају промену приказану



Слика 1. Пример иконичне репрезентације употребљене у истраживању.

За објашњавање приказане репрезентације потребно је употребити знања о Бојл-Мариотовом закону и кретању течности. Резултати у овом раду произашли су из истраживања чији је циљ испитивање утицаја површинских елемената репрезентација на способност давања објашњења као когнитивног процеса (видети дефиницију у референци 9). У ту сврху употребљене су две слике; једна приказана на слици 1 и друга на којој, за разлику од приказане репрезентације, није експлицитно назначено да је ваздух у ерленмајеру. С обзиром да нису примећене разлике у студентским објашњењима то су у даљем тексту дати обједињени резултати за обе групе испитаника.

Методологија

Учесници у истраживању били су студенти прве године Хемијског факултета у Београду (110). Истраживање је урађено у оквиру курса Општа хемија јануара 2012. године.

За реализацију постављеног циља припремљен је и коришћен инструмент који је садржао икониичну репрезентацију приказану на слици 1. Приказана репрезентација је студентима била дата у црно-белој техници. Са приказаном репрезентацијом студенти су се срели први пут.

Резултати и дискусија

Захтев за објашњењем промена на икониичној репрезентацији (слика 1) испунио је велики број студената (91%). Да би одговор био сматран тачним, неопходно је да се на основу објашњења може закључити да студент разуме да је приказанА промену (улазак течности у цев) последица изједначавања притиска ваздуха над водом у цеви која је спојена са балоном и притиска ваздуха (или неког другог гаса) над водом у ерленмајеру. С обзиром да је у задатку наведено да се хидростатички притисак занемарује, то је довољан критеријум вредновања тачности одговора био *изједначавање притисака ваздуха у балону и ерленмајеру*, као што је на пример дато у следећем одговору:

„На слици а) притисак ваздуха у балону једнак је са притиском у ерленмајеру. На слици б) када се подигне клип шприца, притисак у балону се смањује, а да би се притисак у ерленмајеру и балону изједначио долази до подизања нивоа воде у стакленој цеви“.

Сличних одговора, који су се заснивали на „изједначењу притисака“ било је свега 8% (дат у односу на број студената који су испунили захтев и дали објашњење, што се односи и на остале проценте). Око 16% студената доводило је промену притиска у балону (односно у цеви) са уласком воде у цев, али нису је повезали са улогом ваздуха у ерленмајеру. На пример, следећи одговор:

„Повлачењем шприца снижен је притисак у балону. И ниво воде у цеви се повећао.“

не испуњава постављени критеријум за тачност одговора, али због тога што овај и слични одговори не садрже алтернативне концепције (погрешно усвојени научни појмови) и због тога што су недвосмислени, могу се одвојити од нетачних одговора. Нетачних одговора било је 76% и сврстани су у две групе: одговор у којима се помиње притисак (50%) и одговори у којима се притисак не помиње (26%). Оваква подела нетачних одговора урађена је из разлога што се на тај начин прати колико студената као објашњење наводи само површинске елементе репрезентације, а колико њих доводи површинске елементе у везу са теоријским конструктима као што је притисак у посматраном случају. Следећа два навода илуструју наведене категорије:

„Повлачењем шприца извлачи се ваздух из балона, а самим тим се вода из ерленмајера увлачи у цев.“

„Повлачењем шприца ствара се притисак због којег се ниво течности подиже“.

Добијени одговори показују постојање алтернативних концепција, које се могу сврстати у следеће групе:

- 1) Поистовећивање запремине гаса са његовом количином, о чему постоје литературни подаци⁸. На пример, као објашњење студент је навео:

„Запремина ваздуха у балону се смањила, смањило се и притисак који је тај ваздух вршио на воду што (је) довело до повећања нивоа стуба течности на слици 1б.“

Наведена алтернативна концепција, далеко је од „терминолошке недоследности или непрецизности“ и вероватно указује да студенти који дају слична објашњења нису правилно усвојили ни

појам гасовито агрегатно стање, који се обрађује од самих почетака учења садржаја природних наука (предмет Познавање природе у нижим разредима основне школе).

- 2) Примена гасних закона на воду. Код једног броја студената на основу одговора са сигурношћу се може рећи да је смањење запремине воде у ерленмајеру, објашњено на начин да је гасни закон примењен и на воду. На пример, следећи исказ узет је као поткрепљење наведеног става:

„ $T=\text{const}$. $V/T=\text{const}$. $P/T=\text{const}$, $PV=\text{const}$. Смањила се запремина воде у другом суду, јер је дошло до повећања притиска.“

Интерпретација оваквих одговора је отежана чињеницом да студенти не указују прецизно о ком суду се ради, или чему се смањила запремина, те је тешко тврдити са сигурношћу на шта се конкретно мислило у одговору. Ипак, оправдана је забринутост да поменута алтернативна концепција постоји код једног броја испитиваних студената. Зато су неопходна даља истраживања, посебно из разлога што у литератури нису, колико је нама познато, забележене сличне алтернативне концепције.

- 3) Водена пара и испаравање као узрок промене нивоа воде у цевчици. Следећи одговори илуструју речено:

„...Запремина воде се смањила јер је долазило до испаравања воде тј. вода је одлазила у балон са ваздухом.“

„Подизањем клипа повећала се запремина, а притисак, како компоненти ваздуха, тако и водене паре, опао. С обзиром да је притисак паре над течности при константној температури константан, нова количина течности морала је испарити како би се он поново досегао, односно изједначио са напоном водене паре под датим условима. Као последица тога, ниво воде у ерленмајеру опада.“

Други цитат указује на извесну усвојеност појма напон паре, али примена тог знања је нерелевантна за објашњавање промене која је сликовито приказана у разматраном примеру.

Један број студената користи појам „концентрација“ као начин објашњавања промене. Због недовољно јасног изражавања нисмо у могућности са сигурношћу тврдити за све одговоре где се помиње „концентрација“ да је у питању алтернативна концепција. На пример, то ае може видети кроз следећи одговор:

„Када се шприц повуче горе он за собом повуче ваздух из балона а тај ваздух повлачи воду из ерленмајера. Вода прелази из средине са већом концентрацијом у средину мање концентрације.“

С обзиром да се у одговору не види експлицитна веза између промене и притисака ваздуха (или другачије речено концентрације ваздуха) у балону и ерленмајеру, ипак остаје нејасно, на шта је студент мислио. Овакве ситуације су углавном последица претходног школовања. Наиме, свођење тестова на просту репродукцију дефиниција, решавање алгоритамских задатака и надамне смањење критеријума у погледу вредновања тачности одговора довело је до тога да се студенти веома тешко вербално изражавају.

Постигнути резултати су, дакле, незадовољавајући и последица су бројних фактора. С аспекта когнитивног и конструктивистичког схватања учења може се претпоставити да је један од фактора недовољна ментална ангажованост студената у току предавања, теоријских и практичних вежби. Фронтални облик рада, као најзаступљенији, сигурно доприноси оваквим резултатима јер се најчешће своди на испоручивање информација студентима. Због тога не чуди што је такав облик рада критикован због значајних ограничења у развоју виших менталних способности.¹⁴ Међутим, одређене измене могле би значајно побољшати резултат. Важно је да се промене примене на различите аспекте наставе и у процесу подучавања и у процесу провере знања те да буду сталне.

Најважнија препорука била би да се обезбеде наставне ситуације које студенте што више ментално ангажују. Репрезентације имају истакнуто место у овој препоруци. На пример, захтев да се објасни промена на репрезентацији приказаној у овом раду, дала нам је могућност процене изграђености знања у погледу једног сегмента садржаја. Уколико би се студенти далеко чешће суочавали са сличним захтевима, несумњиво би резултати били бољи. Израда оваквих задатака не захтева много

времена и сигurno je da se s lakošom mogu ugraditi u predavanja ili u vežbe. Međutim, nije dovoljno samo isporučiti захтеве студентима. Подједнако је важно пружити им повратне информације о постигнутим резултатима. Студентима ће релативно мало значити ако им се саопшти да је само неколико % процената студената дало тачан одговор. Оно што треба применити у раду са студентима је детаљно коментарисање њихових одговора, с посебним освртом на алтернативне концепције.

Колоквијуми и испити углавном се свде на решавање рачунских задатака. Треба имати на уму да су рачунски задаци веома подложни могућности решавања уз помоћ алгоритама: низа корака који се примењују. Студенти који решавају задатке на тај начин не морају имати дубље знање и штавише довољно је само мало променити поставку задатка па да се изгуби могућност примене алгоритма. Због тога је неопходно што чешће замењивати алгоритамске задатке са концептуалним. Према томе, много је важније да студенти имају задатак да прво на пример речима искажу значење репрезентације $V=k/p$ него да се одмах пређе на решавање задатака.

Закључак

У овом раду изнети су резултати истраживања у коме су студенти имали задатак да дају објашњење промене приказане иконичном репрезентацијом. Познавање Бојл-Мариотовог закона и услова кретања течности су били неопходни за успешно решавање задатка. Овакви задаци су концептуални и захтевају разумевање појмова да би били тачно решени. Добијени резултати указују да већина студената нема довољно знања за решавање оваквог концептуалног задатка. Заправо само је 8% студената (у односу на број студената који су испунили постављени захтев задатка) дало тачно објашњење. Осим тога један број студената је развио алтернативне концепције. Наша препорука је да је неопходно што више користити концептуалне задатке. С обзиром да репрезентације несумњиво чине језгро таквих задатака, оваква пракса допринела би већем разумевању садржаја и развоју репрезентационих компетенција.

Захвалница: Захваљујемо се доценту др Илији Брческом, са Хемијској факултету у Београду на корисним савештањима при изради инструмената. Захваљујемо се проф. др Каширини Анђелковић, проф. др Гордани Вучковић, доценту др Маји Груден-Павловић и доценту др Милошу Милчићу са Хемијској факултету у Београду који су нам омогућили шестирање. Захваљујемо се др Војину Крмановићу на помоћи у вези с преводом аустралијана. Рај је резултат истраживања на пројекту 179048 које финансира Министарство просвете и науке Републике Србије.

Application of iconic representation in student assessment of chemistry knowledge

This paper presents results of a research in which 110 undergraduate chemistry students were tasked to solve conceptual tasks based on Boyle-Mariotte law. The students were expected to provide an explanation of the change represented by iconic representations. The results obtained were unsatisfactory since only 8% of students gave acceptable answers. Some students developed alternative concepts. Consequently, recommendations for effective teaching were offered. It is important that both teaching and testing knowledge be guided by the principles of increasing student critical thinking skills. Therefore, it was proposed that lectures, exercises, and exams contain far more conceptual questions based on descriptive and depictive representations.

This article was supported by the Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia (Project No. 179048).

Литература

1. A. A. diSessa, (2004), *Cognition Instruct.*, **22** (2004) 293
2. R. B. Kozma, E. Chin, J. Russell, N. Marx, *J. Learn Sci.s*, **9** (2000) 105
3. W. Schnotz, *Educ. Psychol. Rev.*, **14** (2002) 101
4. W. Schnotz, C. Kürschner, *Instr. Sci.*, **36** (2008) 175
5. R. B. Kozma, J. Russell, *J. Res. Sci. Teach.*, **34** (1997) 949
6. S. P. Madden, L. L. Jones, J. Rahm, *Chem. Educ. Res. Pract.*, **12** (2011) 283
7. H.-S. Lin, H.-S. Cheng, F. Lawrenz, *J. Chem. Educ.*, **77** (2000) 235

8. C. H. Kautz, P. R. L. Heron, M. E. Loverude, L. C. McDermott, *Am. J. Phys.*, **73** (2005) 1055
9. L. W. Anderson, D. R. Krathwohl, P.W. Airasian, K.A. Cruikshank, R. E. Mayer, P. R. Pintrich, J. Raths, M. C. Wittrock, *Taxonomy for Learning, Teaching, and Assessing: A Revision of Bloom's Taxonomy of Educational Objectives, Abridged Edition*, Pearson, New York, USA, 2001, p.75
10. S. C. Nurrenbern, M. Pickering, *J. Chem. Educ.*, **64** (1987) 508
11. M. Pickering, *J. Chem. Educ.*, **67** (1990) 254
12. M. B. Nakhleh, *J. Chem. Educ.*, **70** (1993) 52
13. S. C.; Nurrenbern, W. R. Robinson, *J. Chem. Educ.*, **71** (1994) 181
14. U. Zoller, *J. Chem. Educ.*, **70** (1993) 195

Евалуација репрезентација у уџбеницима хемије

Игор М. Матијашевић, Милена Благојевић и Јасминка Н. Королија

Хемијски факултет, Универзитет у Београду, Студентски бр 12-16

Увод

Под уџбеником се сматра свако наставно средство које садржи систематизована знања из неке области која су дидактички тако обликована, за одређени ниво образовања и одређени узраст ученика, да има развојно-формативну улогу и учествује у изградњи ученичких знања.¹ Саставни део сваког уџбеника су структурне компоненте уџбеника. Руски дидактичар Зујев дели компоненте у две групе: текстуалне и вантекстуалне.² Од вантекстуалних компоненти, за овај рад је од значаја илустративни материјал. Зујев² сматра да је доминантна функција илустративних материјала да буду „очигледан ослонац мишљења“ и да би они требало да повећају „сазнајни, идејни, естетски и емоционални аспект школског градива у уџбенику“. У илустративни материјал се убрајају следећи елементи: илустрације (чији је садржај изражен на уметнички начин), цртежи, схеме, дијаграми, графикони, карте итд.⁶ Пронаћи оптималан однос у заступљености текстуалних и илустративних елемената структуре уџбеника није једноставно. Заправо, то је једно од најбитних питања у дидактичком обликовању уџбеника са аспекта укључивања илустративног материјала.² Дидактичари указују на слаб квалитет текстуалних и вантекстуалних, пре свега илустративних, компоненти уџбеника који отежавају њихову интерпретацију и схватање. Проблеми у вези са илустративним материјалом су, пре свега, лош дизајн и слаб квалитет и недовољна повезаност са текстом. На пример, недавне студије фотографија³ и графика⁴ у уџбеницима биологије указале су на недовољну вербалну елаборацију њиховог значења. Штавише, упоређујући график у школском уџбенику и график у научном часопису, Боувн и Рутх су запазили низ трансформација на графику у уџбенику у односу на његову верзију која је публикована у научном часопису. Њихов закључак је да је више информација за разумевање графика дато у научном часопису него у школском уџбенику, што је парадокс.

У овом раду саопштени су резултати евалуације репрезентација уџбеника хемије за природно-математички смер гимназије.⁵⁻⁸ Уместо термина илустративни материјал, у даљем тексту користиће се термин (хемијске) репрезентације под којима се подразумевају и репрезентације специфичне за хемију као што су формуле и једначине реакција. Кључни параметар у анализи квалитета уџбеника према Пешићевој⁹ јесте њихова ефикасност у омогућавању смисленог учења и усвајање систематизованог знања из одређене области. Недавно су публиковани критеријуми за процену квалитета репрезентација у уџбеницима.¹⁰ Критеријуми су дефинисани на основу савремених схватања учења и наставе хемије и формулисани су на основу тога у којој мери репрезентације, као део уџбеника, омогућавају смислено учење. Дефинисано је пет критеријума: тип репрезентације (К1); интерпретација површинских елемената репрезентације (К2); сродност и повезаност репрезентација са текстом (К3); постојање и карактеристика потписа која се односи на репрезентацију (К4). Критеријум К5 допуњује први критеријум (К1) за вишеструки тип репрезентације. Према првом критеријуму (К1) постоји шест типова репрезентација (макро, субмикро, симболичке, вишеструке, хибридне и мешовите). Овим критеријумом процењује се степен заступљености ових различитих типова репрезентација. Другим критеријумом се вреднује у којој мери је објашњење значење површинског елемента репрезентације. Трећим критеријумом процењује се постоји ли довољна повезаност текста и репрезентација, а четвртим критеријумом квалитет потписа (назива) репрезентација, уколико је дат. Намера ових аутора је била да дефинишу критеријуме које би требало да испуњавају хемијске репрезентације у уџбенику како би омогућиле што боље разумевање садржаја. Самим тим, корист од предложених критеријума је двострука: они су смерница онима који пишу уџбенике и алат су за евалуацију квалитета уџбеника.

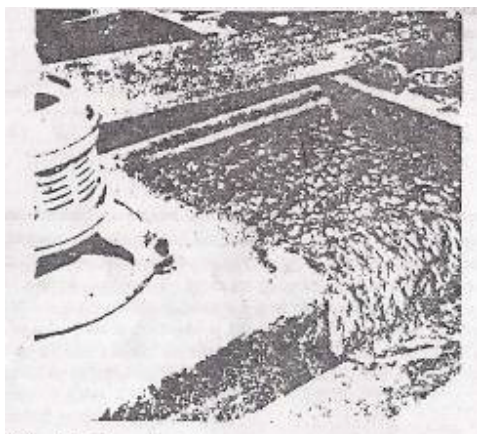
Стога је циљ овог рада био примена наведених критеријума за евалуацију хемијских репрезентација у уџбеницима хемије за природно-математички смер гимназије. Неки облици репрезентација, као што су табеле, нису били укључени у евалуацију уџбеника. Формуле и једначине (било ког типа) биле су укључене само ако је аутор назначио као посебан елемент (на пример као слику). Зато се бројеви и ставови дати у наредном одељку не односе на све репрезентације у уџбеницима.

Разматране репрезентације не представљају узорак и добијене резултате не треба гледати као резултате узорка и генерализацију за целину, већ као карактеристику једног броја приказаних структурних елемената уџбеника.

Резултати и дискусија

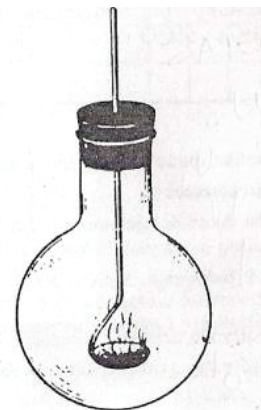
Укупан број евалуираних репрезентација је 258 у сва четири уџбеника. Све репрезентације су црно-беле. Један број репрезентација је изузетно слабог квалитета (један пример дат на слици 1) и представља прави пример небриге у погледу осигурања квалитетног уџбеника тим пре што су сви уџбеници стари у просеку 20 година.

Примена К1 даје увид у заступљеност појединих типова репрезентација. Највише су заступљене симболичке репрезентације чији број се налази у интервалу од 46,0% у уџбенику за II разред до 91,5% у уџбенику за IV разред. Ово је разумљиво с обзиром на то да се у хемији супстанца посматра на макро, субмикро и симболичком нивоу. Међутим, недопустиво је што је број макро изразито мали. У уџбенику за IV разред путпуно је изостао овај тип репрезентације, док се у осталим уџбеницима он креће у интервалу 2,2 - 20,6%. Највећи број макро репрезентација у уџбеницима за I и II разред представљају фотографије научника и цртежи апаратура. Поставља се питање зашто не постоји ни једна фотографија апаратуре(а) него су све цртежи. С обзиром да су цртежи црно-бели, не може се видети ниједан аспект хемијске промене па је корисност репрезентације веома мала (пример дат на слици 2).



Слика 10.3. Обогаћивање бакарне руде флотацијом помоћу пене

Слика 1. Пример репрезентације изузетно слабог квалитета из уџбеника за I разред



Слика 7.5. Сагоревање сумпора

Слика 2. Пример макроскопске репрезентације из уџбеника за II разред.

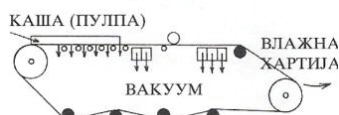
Слична замерка је и у погледу броја вишеструких репрезентација (репрезентација која обједињује макро, субмикро и симболичку репрезентацију). Оне су веома значајне као начин да се истовремено укаже на неке макроскопске карактеристике супстанце, научно поимање структуре и симболичког начина приказивања. Број вишеструких репрезентација је веома мали у свим обрађеним уџбеницима у односу на укупан број репрезентација. Посебно се издваја податак да у уџбенику за I разред нема ниједне вишеструке репрезентације, а са аспекта да је Планом и програмом предвиђено учење о честичној структури супстанце, очекивало би се да их буде. На пример, учење садржаја о кристалним структурама требало би пропатити вишеструком репрезентацијом које би чиниле: слика те супстанце, слика модела кристалне решетке и хемијска формула те супстанце.

Даља евалуација, према К2 показала је да је у уџбеницима велики број репрезентација имплицитан и двосмислен, што значи да је дато недовољно (или нимало) информација за тумачење површинских елемената. Самим тим непожељно је да репрезентације буду у овим категоријама. Анализом је утврђено да је њихов број значајан – од укупно 258 анализираних репрезентација у свим уџбеницима 122 (47,3%) припадају категоријама “имплицитне” и „двосмислене”. Аутори уџбеника често превиђају да експлицитно означи површинске елементе који се први пут појављују. Према томе, за сваки површински елемент неке репрезентације требало би да се може одговорити на питања: *Да ли је површински елемент за ученика/цу нови са аспекта Плана и програма и претходне наставе? Или, уколико је површински елемент и познат, одакле је познат?* На пример,

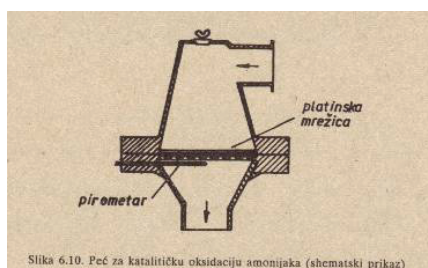
репрезентација на слици 3 је дата у оквиру текста о производњи хартије у уџбенику за IV разред. Сам текст написан је на једној страници, и није прилагођен узрасту и претходним знањима ученика. У извесној мери може се пратити који површински елементи репрезентације одговарају тексту и зато је дата репрезентација сврстана у категорију “имплицитних”. Међутим, чак и да су текстом “дешифровани” сви површински елементи репрезентације, било би боље да су сви површински елементи (још једном) назначени и на репрезентацији Овакав став је у сагласности са савременим истраживањима феномена “подељене пажње”.

Несумњиво је да репрезентације треба да буду потпуно сродне (једнакост информација у тексту и на репрезентацији) и повезане са текстом, што се разматра кроз КЗ. Већина репрезентација су сродне, поготово у уџбеницима за III и IV разред. Нешто већи број несродних репрезентација налази се у уџбенику за I разред. Једино је у уџбенику за II разред број делимично сродних репрезентација већи од броја потпуно сродних репрезентација. Даље, чини се да су аутори уџбеника за III и IV разред били доследни у погледу упућивања на репрезентације (тј. репрезентације су повезане). С друге стране, готово 70% репрезентација у уџбенику за II разред није повезано с текстом. На пример, разлог зашто је репрезентација на слици 4 у категорији делимично сродних је што репрезентација садржи површинске елементе који, иако су наведени, у тексту су у потпуности изостављени.

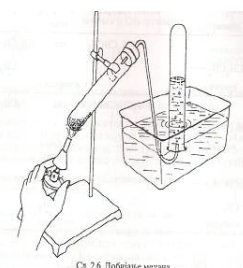
Слика 1.5. Схематски приказ уређаја за добијање бескрајног листа хартије



Слика 3. Пример имплицитне репрезентације из уџбеника за IV разред.



Слика 4. Пример репрезентације која је делимично сродна са текстом из уџбеника за II разред.



Слика 5. Пример репрезентације уз коју стоји неоптичан потпис из уџбеника за III разред.

Савремена истраживања указују на важност постојања потписа репрезентације, што се разматра кроз четврти критеријум. Најбоље је када је потпис довољно информативан да може указати на значење репрезентације и без осврта на текст тзв. потпун потпис. Анализа је показала да је највећи број репрезентација у уџбеницима за I, III и IV разред у категорији “потпуни потпис”. Међутим, у уџбенику за II разред највише је потписа у категорији непотпуних (60,3%). Од свих прегледаних репрезентација само је једна без потписа у уџбенику за I разред. Један пример репрезентације са непотпуним потписом дат је на слици 5.

Синтагма “добијање метана” чини се недовољна да би била потпун потпис. Наиме, ако је основни захтев да потпис буде јасан, кратак и садржајан обезбеђујући аутономију за репрезентацију¹⁵ онда се јасно могу поставити питања на која постојећи потпис репрезентације са слике 5, не даје одговоре. На пример: *Из којих реактаната настаје метан?; Који су производи реакције?; Шта се налази у кади за скупљање метана?*

Закључак

Уџбеници су веома сложена наставна средства и још увек не постоје јединствени инструменти за њихову анализу. Самим тим, предложени критеријуми за евалуацију репрезентација представљају значајно оруђе у рукама дидактичара у анализи обавезне школске литературе. Сврхисходност овог рада огледа се у томе што код нас нису анализиране репрезентације у уџбеницима хемије. У раду су приказани резултати евалуације хемијских репрезентација према недавно публикованим критеријумима у четири гимназијска уџбеника хемије. Евалуацијом су обухваћени уџбеници од првог до четвртог разреда гимназије природно-математичког смера.

Добијени резултати указују на слаб квалитет репрезентација у обрађеним уџбеницима. Репрезентације су црно-беле. Број макро и вишеструких репрезентација је недопустиво мали. Код већине репрезентација дато је тумачење површинских елемената и сродне су са текстом. Међутим, уџбеник за II разред садржи најмањи број репрезентација и према ова два критеријумима. Иако у овом уџбенику у већини случајева постоји потпис, он је веома често недовољно информативан.

Урађена евалуација хемијских репрезентација требало би да да бољи увид у то како би требало писати уџбенике из хемије, што је од важности због реформе средњошколског образовања која је у току.

Овај рад резултат је рада на пројекту 179048 који финансира Министарство просвете и науке Републике Србије.

Evaluation of chemical representations in chemistry textbooks

Textbooks are very complex teaching tools and there are still no common criteria established for their analysis. Therefore, suggested criteria for evaluation of representations provide a substantial tool in the hands of didacts when analyzing mandatory school literature. The validity of this work lies in the fact that previous analysis of chemistry textbook representations were never done before. This paper presents results of chemical representations (illustrations, charts, diagrams) included in four chemistry textbooks, and based on recently published criteria. The evaluation incorporates textbooks for high-school students with science/math emphases, grades 1 through 4. The data retrieved reveal poor quality of representations in the four textbooks. All representations are black and white and graphically inadequate. The number of macro, submicro and symbolic representations is extremely low. Furthermore, the 2nd grade textbook has the fewest number of representations. Although most representations correspond to the text, most titles lack sufficient information.

The evaluation of chemical representations is intended to provide an overview and a guideline how chemistry textbooks should be written, particularly since secondary school reform is underway in Serbia.

This article was supported by the Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia (Project No. 179048).

Литература

1. Љ. Коцић, у *Савремени основношколски уџбеник*, Б. Требјешанин, Д. Лазаревић (уредници), Завод за уџбенике и наставна средстава, Београд, 2001., стр. 131
2. Д. Д. Зујев, *Школски уџбеник* (превод), Завод за уџбенике и наставна средства, Београд, 1988.
3. L. L. Pozzer, W.-M. Roth, *J. Res. Sci. Teach.*, **40** (2003) 1089
4. G. M. Bowen, W.-M. Roth, *Res. Sci. Educ.*, **32** (2002) 303
5. М. Ракочевић, Р. Хорват, *Општа хемија за I разред средње школе*, 20. Издање, Завод за уџбенике, Београд, 2011
6. Р. Хорват, *Неорганска хемија за II разред средње школе*, 13. издање, Завод за уџбенике, Београд, 2004
7. А. Стојиљковић, *Хемија за III гимназије природно-математичког смера, медицинске, ветеринарске и школе за негу лепошце*, 10. Издање, Завод за уџбенике, Београд, 2008
8. Ј. Петровић, С. Велимировић, *Хемија за IV гимназије природно-математичког и општег смера*, 11. Издање, Завод за уџбенике, Београд, 2008
9. Ј. Пешић, *Иновације у настави – часопис за савремену наставу*, **22** (2009) 40
10. V. Gkitzia, K. Salta, C. Tzougraki, *Chem. Educ. Res. Pract.*, **12** (2011) 5

Hemijska pismenost studenata hemije

Jasna Adamov, Stanislava Olić*, Mirjana Segedinac

Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3

**Stipendista Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije*

Uvod

Na međunarodnom ispitivanju naučne pismenosti (PISA) 2009. godine prosečan skor učenika iz Srbije iznosio je 443 poena. U oblasti prirodnih nauka, oko 34% učenika nije uspelo da dostigne nivo funkcionalne pismenosti, što znači da je procenat učenika koji nisu funkcionalno pismeni snižen za oko 4 procentna u odnosu na testiranje iz 2006. godine. Sa ukupnim prosečnim postignućem od 443 poena učenici iz Srbije su ostvarili izvestan napredak od 7 poena u odnosu na prethodna dva testiranja 2003. i 2006. godine¹. Uprkos ostvarenom napretku, izneti podaci podstiču ozbiljne rasprave o pismenosti u obrazovanju.

Pismenost u Srbiji se ne može povećati ukoliko ne postoji svest društva o njenoj važnosti. U skladu sa ovim, postoji potreba da se unapredi obrazovni i istraživački proces na fakultetima, prvenstveno onih fakulteta koji obrazuju studente opredeljene za nastavnički poziv. Ti fakulteti treba da imaju veliku ulogu i odgovornost.

U ovom radu otvaramo pitanje hemijske pismenosti studenata hemije završnih godina koji će biti u prilici da kao potencijalni budući nastavnici hemije sami osmišljavaju programe rada, utiču na razvijanje učeničke pismenosti i preispituju sopstvenu praksu.

Naučna pismenost je širok termin koji obuhvata naučne ideje i pojmove u okviru različitih naučnih disciplina te stoga postoji permanentna potreba da se ispituju jedinstvene komponente pismenosti u različitim naučnim temama. Različiti autori različito definišu naučnu pismenost. Holbrook and Rankin² ukazuju na dva viđenja naučne pismenosti. Prvo gledište, danas široko rasprostranjeno, centralnu ulogu daje naučnom znanju, a zasniva se na tezi da postoje fundamentalne ideje u nauci koje predstavljaju osnovu naučne pismenosti. Drugo gledište je šire i naučnu pismenost stavlja u funkciju društvene korisnosti, odnosno, naučnu pismenost vidi kao sposobnost suočavanja sa izazovima brzih društvenih promena povezanih sa razvojem životnih veština.

Bybee³ je predložio skalu naučne pismenosti koja je prilagođena školskom obrazovanju prema kojoj postoji pet nivoa naučne pismenosti: (1) naučna nepismenost, (2) nominalna naučna pismenost, (3) funkcionalna naučna pismenost, (4) konceptualna i proceduralna naučna pismenost i (5) multidimenzionalna naučna pismenost.

Naučna nepismenost. Naučno nepismeni učenici nisu u stanju da argumentovano odgovaraju na osnovna pitanja vezana za nauku. Ne poseduju stručnu terminologiju, koncepte, kontekst ili kognitivni kapacitet da pitanje identifikuju kao naučno.

Nominalna naučna pismenost. Nominalno-naučno pismen učenik prepoznaje da je pojam vezan za nauku, ali najčešće ima pogrešne predstave o njemu.

Funkcionalna naučna pismenost. Termin „funkcionalna pismenost“ uvedena je u praksu 1960-tih godina od strane UNESCO-a. Funkcionalno-naučno pismeni učenici mogu ispravno da opišu koncept, ali ga samo ograničeno razumeju. Ovaj nivo naučne pismenosti podrazumeva adekvatan odgovor i korišćenje naučne terminologije, kao i povezivanje terminologije sa opštijim pojmovnim šemama.

Konceptualna i proceduralna naučna pismenost. Konceptualno-naučno pismeni učenici razvijaju određeni nivo razumevanja osnovnih pojmovnih šema određene naučne discipline i povezuju te šeme sa svojim opštim poimanjem nauke. Ovaj nivo pismenosti obuhvata i proceduralne sposobnosti i razumevanje procesa naučnog istraživanja.

Multidimenzionalna naučna pismenost. Ovaj oblik naučne pismenosti uključuje razumevanje nauke i metoda naučnog istraživanja koje prevazilaze pojmove pojedinih naučnih disciplina. Uključuje filozofsku, istorijsku i društvenu dimenziju nauke i tehnologije. Učenici koji poseduju multidimenzionalnu naučnu pismenost razumeju i cene nauku i tehnologiju kroz aspekte koji ih povezuju sa svakodnevnim životom. U stanju su da povezuju naučne discipline međusobno kao i sa izazovima društvene

sredine. Bybee je ukazao da je gotovo nemoguće dostići multidimenzionalnu naučnu pismenost u svim naučnim oblastima. Pojedinaac može dostići visok nivo naučne pismenosti samo u specifičnoj oblasti.

Organizacija za ekonomsku saradnju i razvoj (OECD) u svom programu za međunarodnu ocenu studenata (Programme for International Student Assessment – PISA) definišu naučnu pismenost kao sposobnost za primenu naučnog znanja tako da ono omogući identifikovanje pojava, postavljanje pitanja i izvlačenje zaključaka zasnovanih na dokazima, kako bi se razumeo svet prirode i sve promene koje u njemu izaziva ljudska aktivnost. Naučna pismenost znači da pojedinac može da postavi pitanja koja proizilaze iz njegove radoznalosti u svakodnevnom iskustvu i da na ta pitanja nalazi ili određuje odgovore. Naučno pismen građanin mora biti sposoban da procenjuje kvalitet naučne informacije na osnovu svojih izvora i metoda koje je sposoban da koristi¹.

S obzirom da se pod terminom nauka podrazumeva sadržinski integrisana oblast koja pokriva teme fizike, hemije, biologije, astronomije, fizičke geografije, značajan doprinos postignuću u naučnoj pismenosti zauzima hemijska pismenost. Šišović i saradnici⁴ navode da hemijska pismenost obuhvata razumevanje svojstava supstanci koje se koriste u svakodnevnom životu i na osnovu toga, bezbedno rukovanje njima. Obuhvata znanja koja omogućavaju procenu tačnosti informacija, odnosno pouzdanosti različitih izvora. Radi očuvanja sopstvenog zdravlja i zaštite životne sredine, važno je da svaki građanin raspolaze znanjem hemije na osnovu koga može proceniti potencijalnu opasnost nekog incidenta u hemijskoj industriji ili transportu supstanci i preduzeti potrebne mere zaštite. Hemijska pismenost trebalo bi da omogući sagledavanje valjanosti rešavanja pitanja zaštite životne sredine i preduzimanje odgovarajućih aktivnosti. Hemijska pismenost bi trebalo da obuhvati osnovna znanja i umenja neophodna za razumevanje ličnog i društvenog okruženja, znanja i umenja koja obezbeđuju osnovu za nastavak obrazovanja i deo su opšteg obrazovanja i kulture svakog pojedinca. Cilj nastave hemije jeste formiranje funkcionalne hemijske pismenosti učenika.

Rezultati i diskusija

Viši nivo hemijske pismenosti nastavnika povećava verovatnoću da učenici dobiju veću podršku od njihovih nastavnika. S toga, centralno mesto ovog istraživanja zauzima hemijska pismenost studenata hemije završnih godina, a posebno studenata smera *profesor hemije*, koje će u budućnosti opismenjivati mlade generacije. Cilj ovog istraživanja je da se ispita hemijska pismenost studenata završnih godina studija Departmana za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu u oblasti neorganske hemije, organske hemije i biohemije.

Istraživanje je sprovedeno nad 93 studenta, od čega 74 studenta četvrte godine osnovnih akademskih studija i 19 studenata master akademskih studija Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu u toku letnjeg semestra školske 2010/2011 godine. Ispitanici su bili studenti četiri studijske grupe: diplomirani hemičar (H), diplomirani hemičar – profesor hemije (PH), diplomirani hemičar – kontrola kvaliteta i upravljanje životnom sredinom (KK) i diplomirani biohemičar (BH).

Primenjena tehnika istraživanja bila je testiranje. Za potrebe ovog istraživanja konstruisan je test koji se sastojao od 30 pitanja. Sadržaji na kojima se ispituje hemijska pismenost organizovani su u tri kategorije: neorganska hemija, organska hemija i biohemija, a obuhvatala su pitanja vezana za funkcionalnu i konceptualno-proceduralnu hemijsku pismenost. Na testu su dominirala pitanja višestrukog izbora, a pored njih bili su zastupljeni i zadaci dopunjavanja i alternativni tip zadataka. Korišćeni test je konstruisan tako da meri postignuće studenata u razumevanju hemijskih pojmova koji pokazuju nivo hemijske pismenosti. Test je bio podeljen na tri subtesta, a svaki zadatak bodovan je sa 4 boda. Bilo je moguće i parcijalno bodovanje rezultata studenata. Maksimalni skor na svakom subtestu je bio 40 bodova, a maksimalni ukupni broj poena bio je 120.

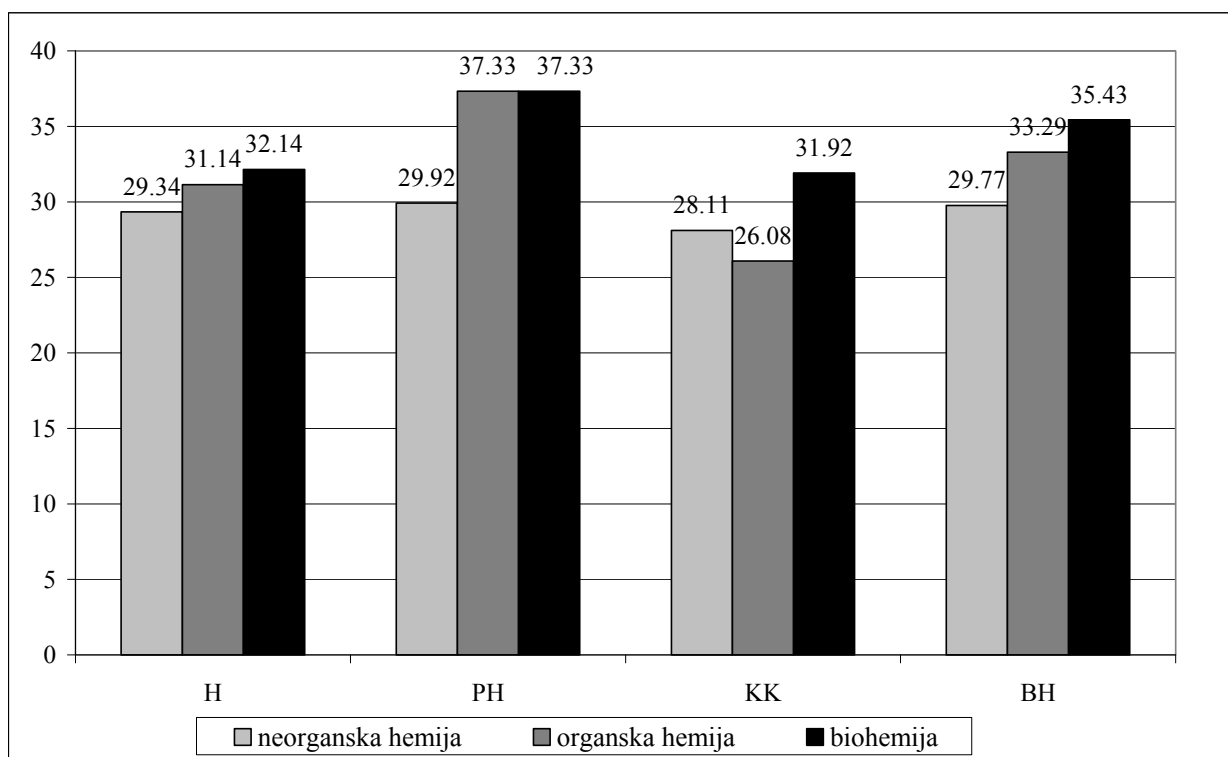
Prosečan skor svih studenata hemije na skali hemijske pismenosti iznosi $99,35 \pm 6,77$ poena, odnosno $33,86 \pm 4,34$ poena u oblasti neorganske hemije, $31,63 \pm 7,43$ poena u oblasti organske hemije i $33,86 \pm 6,12$ poena u oblasti biohemije. Postoji razlika u postignuću studenata četvrte godine osnovnih akademskih studija koji su prosečno ostvarili $93,51 \pm 6,81$ poena i studenata master akademskih studija sa postignućem od $100,61 \pm 5,94$ poena. Studenti osnovnih akademskih studija najbolje su rezultate postigli u oblasti biohemije (34,2 poena), a najlošije u oblasti neorganske hemije (28,9) poena, dok su u oblasti organske hemije postigli prosečno 30,41 poen. I studenti master akademskih studija ostvarili su najbolje rezultate u oblasti biohemije (36,4 poena), zatim u oblasti organske hemije (33,8 poena), a najlošije su uradili zadatke iz oblasti neorganske hemije (30,41 poena).

Rezultati istraživanja po studijskim programima prikazani su u tabeli 1.

Tabela 1. Prosečno postignuće studenata različitih studijskih programa na testu hemijske pismenosti

	Maksimalni skor	Studijska grupa			
		H	PH	KK	BH
Prosečno postignuće na testu [bodovi]	120	95,42	111,99	89,92	104,15
Prosečno postignuće na testu [% maksimalnog skora]	100	79,5	93,3	75,9	86,8

Najbolje rezultate postigli su studenti smera *profesor hemije* u sve tri hemijske discipline (slika 1). Najlošije rezultate imali su studenti smera *kontrola kvaliteta i upravljanje životnom sredinom*, takođe u sve tri oblasti hemije.



Slika 1. Postignuća studenata završne godine osnovnih akademskih studija hemije po studijskim grupama
H – diplomirani hemičar; PH – profesor hemije; KKZZS – diplomirani hemičar – kontrola kvaliteta i zaštita životne sredine; BH – diplomirani biohemičar

Postignuće u zadacima koji mere konceptualnu hemijsku pismenost bilo je nešto niže nego kod zadataka koji mere funkcionalnu hemijsku pismenost. Prosečno postignuće u zadacima funkcionalne pismenosti iznosilo je 51,98 poena, a u zadacima konceptualne pismenosti 47,37 poena.

Podaci dobijeni ovim istraživanjem omogućavaju da se uvidi kvalitet i efikasnost visokog hemijskog obrazovanja da bi se planiralo i donosili odluke o daljim pravcima razvoja celokupnog obrazovanja.

Zaključak

Na testu hemijske pismenosti, studenti završnih godina Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine su pokazali dobre rezultate. Ovim istraživanjem se utvrđuje da su ispitivani studenti usvoji znanja i veštine neophodne za svoju profesiju i odgovorno učestvovanje u društvu. Svakako postoji prostor za poboljšanje postignuća u svim oblastima i angažman fakulteta u pravcu povećanja hemijske pismenosti studenata mora biti nastavljen.

Pošto je istraživanje obuhvatilo studente četvrte godine osnovnih akademskih studija i master akademskih studija, rezultati istraživanja su pokazali da postoji razlika u njihovom postignuću. Smatra se da se pismenost razvija tokom celog života što ukazuje na potrebu celoživotnog učenja.

Veoma važno je napomenuti da će studenti koji su tokom studija ostvarili određeni broj ESPB iz psihološko-pedagoško-metodičkog bloka predmeta biti zaposleni u osnovnoškolskim odnosno srednjoškolskim obrazovnim institucijama čiji će zadatak tokom profesionalnog rada upravo biti razvijanje hemijske pismenosti učenika, što je prioritet koji postavlja reforma obrazovnog sistema, kako u svetu, tako i u Srbiji.

Zahvalnica: Istraživanja opisana u ovom radu finansirana su od strane naučno-istraživačkog projekta Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije (Projekat br. 179010, Kvalitet obrazovnog sistema Srbije u evropskoj perspektivi – KOSSEP).

Chemical literacy of chemistry students

In this work chemical literacy of chemistry students was investigated on the sample consisting of 93 students of the final years of B.Sc. and M.Sc. study programmes of Chemistry, Biochemistry, Chemistry Teaching and Quality Control and Environmental Protection. Chemical literacy was tested within inorganic and organic chemistry and biochemistry. Research instrument was the specially designed test which was used to measure students' achievement in the area of functional and conceptual-procedural literacy. The results indicate that all students have achieved the satisfactory level of chemical literacy, as well as knowledge and skills necessary for professional work. Certainly there exists a space to improve students' achievements and for the Chemistry department to engage more on the improvement of students' chemical literacy. The best scores were achieved by the students of the teaching module, which is very satisfactory, since they will be engaged in primary and secondary education with the task to develop chemical literacy of their students, which is the priority set by the educational system reform in Serbia.

Literatura

1. A. Baucal, A., D. Pavlović Babić, D., Nauči me da mislim, nauči me da učim, Beograd: Institut za psihologiju, (2010): (preuzeto 29.04.2012. sa http://www.pisaserbia.org/izvestaji/PISA2009_u_Srbiji.pdf)
2. J. Holbrook, M. Rannikmae, The Meaning of Scientific Literacy, International Journal of Environmental & Science Education, 4(3), (2009) 275-288.
3. Y. Shwartz, R. Ben-Zvi, A. Holfstein, The use of scientific literacy taxonomy for assessing the development of chemical literacy among high-school students, *Chemistry Education Research and Practise*, 7(4), (2006) 203-225.
4. D. Šišović, R. Jankov, G. Zindović-Vukadinović, Standardi za učenička postignuća u nastavi hemije – I deo, *Nastava i vaspitanje*, 53(2-3), (2004) 168-179.

Keramika / Ceramics

Prikaz metoda za izračunavanje efektivnog koeficijenta difuzije pri sušenju glinenih proizvoda

Miloš Vasić

Institut za ispitivanje materijala a.d., Bulevar vojvode Mišića 43, 11000 Beograd

Uvod

U prošlosti a u nekom stepenu i današnjici, mnoge operacije sušenja su bile više zasnovane na praktičnom, iskustvenom znanju u odnosu na teorijski dostupna saznanja. U savremenom svetu, široko je prihvaćeno mišljenje da je nemoguće efikasno osušiti proizvode od gline bez posedovanja kompletnih i preciznih ispitivanja kako fizičko-hemijskih parametara same glinene sirovine tako i mehanizama transporta vlage unutar oblikovanih proizvoda. Složeni procesi istovremenog prenosa mase i energije, koji su često nestacionarnog karaktera, kao i različita priroda i osobine materijala (higroskopsnost, kapilarnost, distribucija i veličina pora, pojava skupljanja prilikom sušenja i prslina prilikom sušenja glina i drugih keramičkih materijala) još više komplikuju opis načina procesa sušenja. Zbog toga jedinstvena teorijska postavka sušenja, koja bi univerzalno opisala ovaj proces za različite tipove glinenih materijala još uvek nije razvijena. Proces difuzije, posmatran kao transport materije usled nasumičnog kretanja molekula, je svojstven za sušenje. Tranfer vlage unutar čvrstog tela na određenoj temperaturi, obavlja se usled različitog sadržaja vlage u unutrašnjosti i na površini čvrstog tela. Brzina masenog transfera čistom difuzijom je prema tome proporcionalana gradijentu koncentracije sadržaja vlage, pri čemu difuzioni koeficijent predstavlja faktor proporcionalnosti. Poznavanje difuzivnosti vlage proizvoda je ključno za proces simulacije i optimizacije procesa sušenja. Difuzivnost vlage je kompleksna i sistemski specifična funkcija koju pored čiste difuzije, karakteriše i postojanje drugih, sekundarnih tipova unutrašnjeg masenog prenosa, kao što su površinska difuzija, Knudsenova difuzija kapilarni tok, isparavanje i kondenzacija, termodifuzija idr. koji u određenom manjem iznosu utiču na sveobuhvatni proces prenosa mase. Proces difuzije je najčešće najdominantniji transportni mehanizam prilikom sušenja opekarskih proizvoda¹. Njegov matematički opis se karakteriše relativno jednostavnošću i opšte poznatom jednačinom drugog Fikovog zakona. Opis celokupnog transporta vlage prilikom sušenja opekarskih proizvoda može se matematički opisati na isti način kao i proces čiste difuzije, s tim što se umesto koeficijenta difuzije uvodi efektivni koeficijent difuzije, koji predstavlja zbirnu konstantu proporcionalnosti u zakonu difuzije, i koji u sebi sadrži sve moguće transportne mehanizme prenosa vlage kroz opekarski proizvod. U literaturi se srećemo sa malim brojem radova u kojima se razmatra proces sušenja samo keramičkih, odnosno glinenih materijala. Tako je Efremov², proučavajući sušenje cigli, dao analitičko rešenje diferencijalne jednačine difuzije sa graničnim uslovima u formi fluksa. Nadovezujući se na ta istraživanja M. Vasić i saradnici³ su razvili model sušenja na osnovu modifikacije Efremove jednačine i kompjuterski program za određivanje efektivnog koeficijenta difuzije. Chemki i Zagrouba⁴ su ispitivali proces sušenja glina, a njihov doprinos se ogleda u izučavanju uticaja difuzionih koeficijenata, određenih na osnovu izgleda krivih sušenja, na proces sušenja. F. Zagrouba i saradnici⁵ su razvili model sušenja, pokušavši da opišu objedinjeni toplotni i maseni prenos, kao i deformacije koje nastaju prilikom sušenja pločastih uzoraka od gline. U njihovom radu je dat i prikaz načina određivanja vrednosti koeficijenta prenosa toplote i efektivnog koeficijenta difuzije. Zanden i Kerkhof⁶ su izvršili obimna istraživanja izotermnog transporta mase mehanizmima difuzije, isparavanja i kondenzacije, prilikom sušenja glinenih proizvoda. U radovima Skansija i saradnika⁷ date su osnove „fitovanja“ eksperimentalnih podataka sušenja glinenih crepova pomoću tankoslojnih modela, kao i određivanja efektivnog koeficijenta difuzije, koeficijenta prenosa toplote i konstante sušenja.

Teorijski deo

U ovom radu je razmatrano ponašanje jedne opekarske sirovine u toku procesa sušenja. Određivanje efektivnog koeficijenta difuzije vlage se određuje: pomoću metode nagiba krive sušenja^{8,9} ili poređenjem eksperimentalnih krivi sa teorijskim krivama izračunatih analitičkim¹⁰ ili numeričkim rešavanjem Fikovih jednačina¹¹. Razvijen je metod i napravljeno je nekoliko kompjuterskih programa za određivanje efektivnog koeficijenta difuzije zasnovanih na metodi nagiba i numeričkoj metodi rešavanja Fikove

jednačine Po prvi put uzeto je u razmatranje i skupljanje opekarskih proizvoda u toku sušenja a odgovarajuća korekcija je uneta u proračun. U ovom radu će se koristiti metoda numeričkog rešavanja, Fikove jednačine koja je detaljno predstavljena u radu¹², kao i modifikovana metoda nagiba koja uključuje korekciju linearnog skupljanja koja je detaljnije opisana u nastavku rada. Kompletan profil sušenja sastoji se iz prve faze sušenja, faze konstantne brzine i faze opadajuće brzine sušenja. Često se prihvata da je mehanizam kretanja vlage unutar higroskopnog čvrstog tela za vreme sušenja u toku faze opadajuće brzine sušenja predstavljen difuzionom jednačinom uskladu sa drugim Fik-ovim zakonom. Ograničenje na jednodimenzionu difuziju daje dobru aproksimaciju u mnogim praktičnim sistemima. Analitičko rešenje fikove jednačine je dato za različite geometrijske oblike. Njeno rešenje uz uslov da je konstantna difuzivnost D i za slučaj geometrije tanke pločice dao je Cranck.

$$W = \frac{X - X_{eq}}{X_0 - X_{eq}} = \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp\left(-\frac{(2n+1)^2}{4} \pi^2 \frac{Dt}{l^2}\right) \quad (1)$$

Određivanje difuzije vlage materijala preko nagiba krive sušenja kada se linearno skupljanje ne uzima u obzir vrši se na sledeći način:

- Pri dovoljno dugačkim vremenima samo početni članovi iz jednačine (1) se mogu uzeti u obzir. Tada se difuzioni koeficijent tipično određuje iz nagiba dijagrama $\ln(W) - t$ konstruisanog na osnovu eksperimentalno određenih podataka.
- U opštem slučaju nelinearnih krivi sušenja, metod nagiba se primenjuje kako bi se odredila difuzivnost vlage pri različitim sadržajima vlage.

Tada se eksperimentalna kriva sušenja ($W - t$) poredi sa teorijskom difuzionom krivom ($W - F_0$). Nagibi eksperimentalne krive $\left(\frac{\partial W}{\partial t}\right)_{eks}$ i teorijske krive $\left(\frac{\partial W}{\partial F_0}\right)_{teor}$ se određuju za zadatu vrednost vlažnosti (W).

Efektivna difuzivnost vlage (D_{eff}) pri datoj toj vrednosti vlažnosti se procenjuje na osnovu sledećeg izraza:

$$D_{eff} = \frac{\left(\frac{\partial W}{\partial t}\right)_{eks}}{\left(\frac{\partial W}{\partial F_0}\right)_{teor}} l^2 \quad (2)$$

gde je F_0 Furijev broj za difuzivnosti koja se izračunava kao $F_0 = \frac{Dt}{l^2}$.

Praktično prvo se konstruiše dijagram zavisnosti $\ln(W) - t$ i pomiču njega određuje vrednost D . Metod nagiba daje indikativnu vrednost za efektivnu difuzivnost, pretpostavljajući da se difuziona jednačina može primeniti na sve delove krive. Ta vrednost D_{eff} (D) dobijena iz nagiba $\ln(W) - t$, se koristi kao difuzivna vrednost za crtanje teorijske krive $W - F_0$. Nakon toga se određuju eksperimentalni i teorijski nagibi koji se ubacuju u jednačinu (2) čime se dobija vrednosti za D_{eff} .

Da bi se u obzir uzelo i skupljanje, debljina uzorka se mora uzeti u obzir kao funkcija vremena (zavisnost $l(t)$), pri čemu se ona određuje iz eksperimentalnih merenja skupljanja. Postupak određivanja D_{eff} je isti kao i gore naveden stimo što u prethodnim jednačinama je vrednost debljine uzorka zamnjenjena zavisnošću $l(t)$

Priprema uzoraka

Korišćena je opekarska gline sa lokaliteta Banatski Karlovac. Početna karakterizacija ove sirovine se sastojala od određivanja hemijskog, mineralošskog i granulometrijskog sastava. Nakon karakterizacije pristupilo se klasičnom tretmanu prerade opekarskih sirovina, u laboratorijskim uslovima rada. Ovaj tretman obuhvata: prethodno sušenje sirovina na 60°C do konstantne težine, a potom usitnjavanje u laboratorijskom kolnom mlinu. Samlevene sirovine su zatim navlažene i dalje usitnjavane u laboratorijskom diferencijalnom mlinu pri zazoru između valjaka od 3 mm a kasnije i od 1mm. Oblikovanje laboratorijskih uzoraka od ovih opekarskih sirovina je izvršeno na laboratoriskoj vakum presi „Hendle“ Tip 4 pri vakumu od 0,8 bar-a. Uzoraci opekarskih sirovina – glina u obliku pločica dimenzija 120x50x14mm korišćeni su u daljem eksperimentalnom radu.

U laboratorijskoj recirkulacionoj sušnici je moguće obezbediti:

- regulaciju temperature vazduha za sušenje u granicama od 0-125°C, sa tačnošću $\pm 0,2^\circ\text{C}$
- regulaciju relativne vlažnosti od 20-100%, sa tačnošću od $\pm 0,2\%$
- regulaciju brzine strujanja medijuma za sušenje od 0-3,5 m/s, sa tačnošću $\pm 1\%$.
- praćenje gubitka mase uzorka koji se suši u opsegu od 0-2000g, sa tačnošću $\pm 0,01\text{g}$
- praćenje linearnog skupljanja u opsegu od 0-23 mm, sa tačnošću od $\pm 0.2\text{ mm}$.

Rezultati i diskusija

U tabeli br.1. je dat prikaz eksperimentalnih uslova, u laboratorijskoj recirkulacionoj sušnici, pri kojima je izvršeno sušenje uzoraka glina i snimanje krivih sušenja.

Tabela 1 - Eksperimentalni uslovi u toku sušenja glina u recirkulacionoj laboratorijskoj sušnici

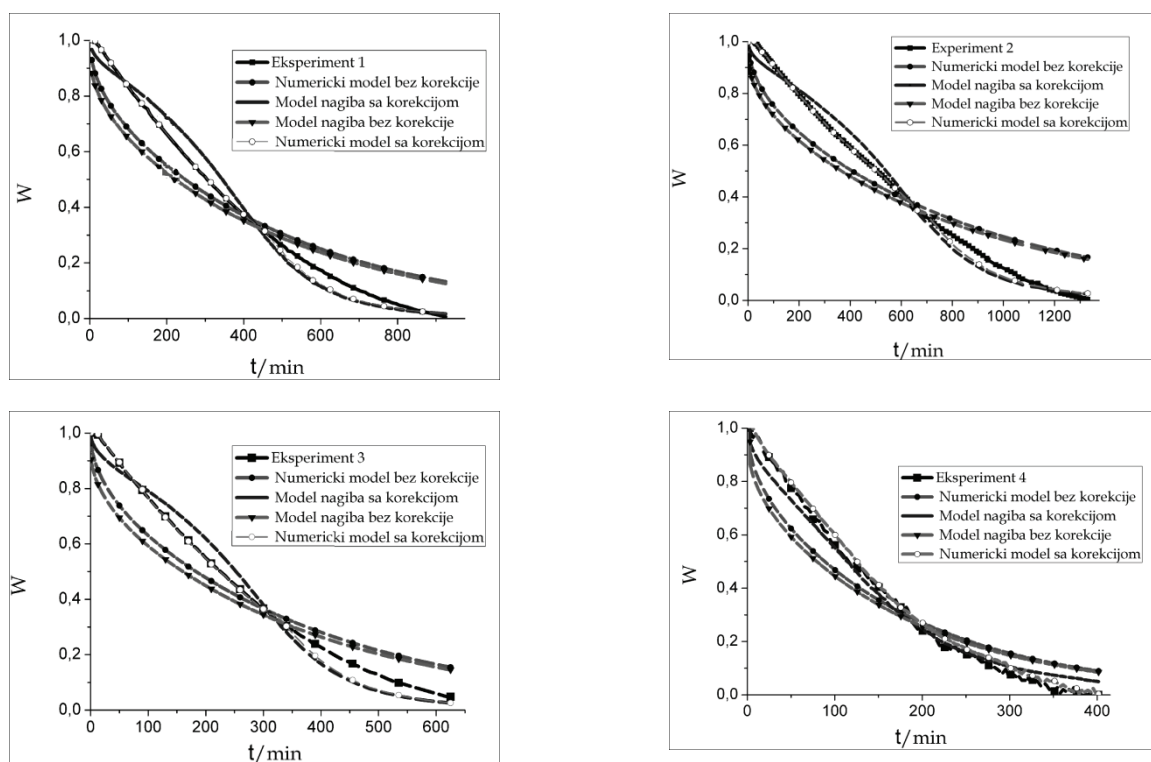
Redni broj eksperimenta	Brzina vazduha $W / (\text{m/s})$	Temperatura vazduha $T / ^\circ\text{C}$	Vlažnost vazduha $V / \%$
1	3	40	70
2	1	50	70
3	1	75	65
4	3	85	45

Obrada dobijenih eksperimentalnih podataka dobijenih u procesu sušenja izvršena je po metodi nagiba predstavljenoj u ovom radu (model sa i model bez korekcije za skupljanje) i po metodi numeričkog rešavanja Fikove jednačine (model sa i model bez korekcije za skupljanje) predstavljene u radu¹². Vrednosti efektivnog koeficijenta difuzije D_{eff} , dobijeni primenom ovih metoda, su prikazani u tabeli 2. Podaci o kinetici sušenja, dobijeni na osnovu izračunatih vrednosti za D_{eff} , grafički su prikazani na dijagramu 1.

Tabela 2 - Izračunate vrednosti efektivnog koeficijenta difuzije

Redni broj eksperimenta	$D_{\text{eff}} \cdot 10^9 / \text{m}^2 \text{s}^{-1}$			
	Model nagiba		Numerički model	
	Bez korekcije	Sa korekcijom	Bez korekcije	Sa korekcijom
1	1,96	0,790	0,630	0,209
2	1,50	0,600	0,440	0,155
3	2,20	1,203	0,790	0,295
4	2,75	1,504	0,980	0,310

Analizom podataka iz tabele br. 2 jasno se uočava da je, u svim eksperimentima, vrednost Efektivnog koeficijenta D_{eff} (m^2/s) izračunata, po modelima sa uključenom korekcijom za skupljanje uzoraka, manja u odnosu na vrednost izračunatu po modelima koji ne uključuje korekciju za skupljanje uzoraka. Ako se posmatraju eksperimenti od 1 do 4 uočava se da se sa povećanjem brzine medijuma za sušenje sa 1 na 3 m/s povećava vrednost efektivnog koeficijenta difuzije. Vrednosti D_{eff} izračunati po modelima nagiba veće su od vrednosti D_{eff} izračunatih po numeričkim modelima. To je i bilo očekivano obzirom na način određivanja D_{eff} . Očigledno je da numerički model proračuna koji u sebe uključuje skupljanje uzorka daje preciznije vrednosti za D_{eff} . Literaturni podatci^(13,14) ukazuju da se vrednosti efektivnog koeficijenta difuzije za ispitivane opekarske proizvode proizvedene od opekarskih glina kreću od 10^{-7} pa do $10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$. Ovaj relativno široki opseg vrednosti za D_{eff} je posledica razlika u mineraloškom sastavu ispitivanih opekarskih sirovina, premda se ne može isključiti ni uticaj primenjenog matematičkog modela korišćenog u različitim vrstama proračuna. Vrednosti prikazane u tabeli br. 2 se nalaze u ovom opsegu. Analizom dijagrama sušenja konstatovano je da oblik krivih, za model koji ne uključuje skupljanje ne prati u celini oblik eksperimentalno određenih krivi, odnosno da se poklapaju samo u određenim delovima. Krive numeričkog modela prognoznog sušenja koji uključuje skupljanje prate oblik eksperimentalnih krivi u celini a poklapanja sa eksperimentalnim podacima su u rasponu od 93 do 98 %.



Dijagram 1 - Grafički prikaz rezultata sušenja

Zaključak

Razvijene su metode određivanja efektivnog koeficijenta difuzije kod opekarskih glina, koji se zasnivaju na grafičkom i numeričkom rešavanju Fikove odnosno Crancove difuzione jednačine. U toku matematičkog modelovanja procesa sušenja opekarskih glina uneta je u proračun i korekcija izazvana skupljanjem proizvoda u toku sušenja. Analiza dijagrama sušenja ispitivane opekarske gline, pokazala je da prognozne krive sušenja po numeričkom modelu koji uključuje skupljanje pokazuje bolje poklapanje sa eksperimentalno određenom krivom nego prognozne krive sušenja konstruisane na osnovu matematičkih modela koji ne uključuje korekciju na skupljanje.

Rad je proistekao kao rezultat istraživanja unutar projekta ИИИ 45008 koji je finansiran od strane ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije.

Presentation of methods for determination of effective diffusion coefficient during convective drying of clay masonry units

The aim of this study was to calculate the effective diffusion coefficient based on experimentally recorded drying curves for masonry clay samples. The calculation method was based on the mathematical calculation of the second Fick's law and Crank diffusion equation. Two models were developed, the slope model and numerical model. Masonry product shrinkage during drying was taken into consideration and the appropriate correction was entered into the calculation. The results presented in this paper show that the values of the effective diffusion coefficient determined by these two models and its variations (with and without the correction for shrinkage) have similar values to those available in the literature for the same coefficient for different clays. In case of the numerical drying model which has included the shrinkage correction within the calculation step, there is 95% agreement of the calculated prognostic drying curves with the experimentally recorded ones.

Literatura:

1. G. Efremov, T. Kudra, *Drying Technolol.* **22** (2004) 2273
2. G.I. Efremov, *Drying Technol.* **20** (2002) 55
3. M. Vasić, Z. Radojević, M. Arsenović, Ž.Grbavčić, *Rom. J. Mat.* **41** (2011)
4. S. Chemkhi, F.Zagrouba, *Desalination* **185** (2005) 491

5. F. Zagrouba, D. Mihoubi, A. Bellagi, *Drying Technol.* **20** (2002) 1895
6. A. Zeden, P. Kerkhof, *Drying Technolol.* **14** (1996) 647-676.
7. A. Sander, D.Skansi, N. Bolf, *Ceram. Int.* **29** (2003) 641
8. N. Hamdami, J.Y.Monteau, A. Le Bail, *J. Food Eng.* **62** (2004) 85
9. G. Efremov, M. Markowski, I. Bialobrzewski, M. Zielinska, *Int. Commun. Heat Mass Transfer.* **35** (2008) 1069
10. W. P. da Silva, J. W. Precker, C. M.D.P.S. e Silva, D. D.P.S. e Silva, *J. Food Eng.* **95** (2009) 298
11. W. P. da Silva, J. W. Pecker, C. M.D.P.S. e Silva, J. P. Gomes, *J. Food Eng.* **98** (2010)
12. M. Vasić, Z. Radojević, Ž.Grbavčić, *J. Ser. Chem. Soc.* doi: 10.2298/JSC110717191V
13. S. Chemkhi, F.Zagrouba, *Desalination* **185** (2005) 491
14. A. Sander, D.Skansi, N. Bolf, *Ceram. Int.* **29** (2003) 641

Tekstilno inženjerstvo / Textile Engineering

Полисахаридни влакнасти биополимери као супстрат за добијање вештачког депоа инсулина

Адела Х. Медовић Баралић, Петар Д. Шкундрић, Љиљана М. Сретковић, Мирјана М. Костић

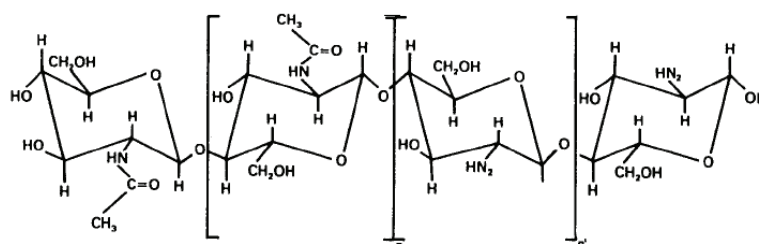
Технолошко-металурички факултет, Универзитет у Београду

Увод

Примена биодеградабилних полимера у медицини данас је веома актуелна из једноставног разлога што такве полимер-лек комплексне системе није потребно накнадно уклањати из организма, што је веома повољно за имплантибилне биолошки-активне комплексе, а контрола отпуштања лека се може регулисати и преко процеса деградације полимера [1]. Од природних биодеградабилних полимера најширу примену у медицини нашли су алгинат, колаген [2], хиалуронска киселина [3-6], хитин, хитозан и њихови деривати [7-14].

Отпуштање инсулина из биолошки активних имплантабилних комплекса полимер-инсулин је предмет изучавања великог броја истраживача широм света. Иако се ови системи могу сврстати у групу „паметних“ био-материјала, они још увек нису укључени у клиничку праксу. Имплантабилни полимер-инсулин системи су дизајнирани тако да пролонгирано отпуштају инсулин директно у крвоток чиме се искључује свакодневно ињектирање инсулина у вену. Досадашња истраживања на овом пољу дала су обећавајуће резултате у виду развоја високо сензитивних полимер – инсулинских система код којих отпуштање инсулина отпочиње променом неког од параметара околне средине. Влакнасти биодеградабилни инсулин-отпуштајући имплантати припадају новим правцима истраживања везаним за унапређење инсулинске терапије дијабетичара и предмет су овог рада. [15].

Хитозан и алгинатна влакна припадају полисахаридним биополимерима и по молекулској структури су слична целулозним влакнима. Хитозан (слика 1) је најважнији дериват хитина који се добија реакцијом N-деацетилације хитина из оклопа ракова, шкољки и једне врсте гљива. Степен деацетиловања може да варира од 50 до 95%. На тај начин се у хитозан уводе реактивне амино групе које му дају карактер катјонског полиелектролита ($pK_a \approx 6,5$), што га издваја од већине осталих природних полимера који су најчешће неутрални [16]

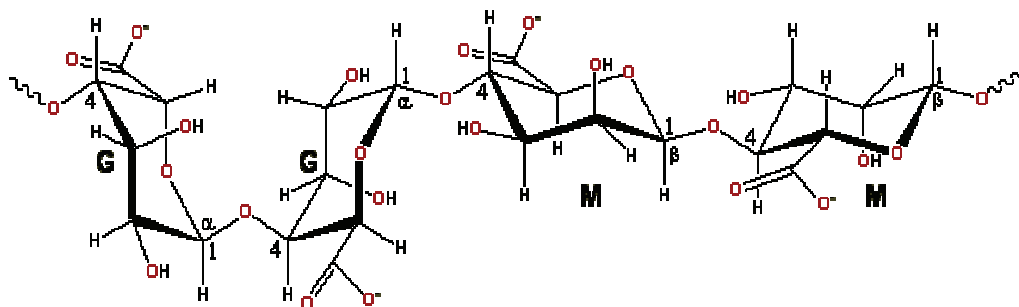


Слика 1. Хитозан

Хитозан влакна се формирају из полимера веће молекулске масе и веће кристалности по мокром поступку [17]. Изграђена су из изразито позитивно наелектрисаних молекула који имају способност да ступе у реакцију са негативним крајем молекула масти, липида или протеина. Велика сорпциона моћ последица је растресите структуре богате порама и микровакуолама, као и присуства $-NH_2$ и $-N$ група способних да образују водоничне везе са водом. Поред велике сорпционе моћи, хитозан влакна поседују и јоноизмењивачки карактер обзиром на присуство наелектрисане (јоногене) групе у њиховој структури. То им даје још један квалитет потенцијалног носача лекова, у погледу могућности стварања хемијске везе са лековитом супстанцом или леком [18]. У складу са наведеним, хитозан влакна могу бити и потенцијално добар носач инсулина или неког другог протеина, односно макромолекула, са којим могу успоставити хемијске везе. [15]. Хитозан има висок афинитет према протеинима, а када је у влакнастој форми, обезбеђује и велику слободну анион-активну површину погодну за везивање веће количине инсулина [15,19]. Обзиром на низ јако добрих својстава хитозана, биолошки активни комплекс хитозан – инсулин (као имплантибилни

вештачки депо инсулина) би могао дати значајан напредак у изналажењу оптималне терапије у лечењу дијабетеса. [15]

Слично хитозану, алгинат (слика 2) такође представља високо хидрофилан, биокомпатибилан и биодеградибилан материјал [20-22]. По хемијском саставу је кополимер $\beta(1,4)$ -D-мануронске и $\beta(1,4)$ -L-гулуронске киселине. Добија се екстракцијом мрких и црвених морских алги.



Слика 2. Алгинат

Веома широка примена алгината је базирана на његовим трима главним карактеристикама: добра растворљивост у води и способност згрушњавања, гелирање у присуству калцијумових јона (образовање гела не зависи од температуре) и могућност обликовања у филм (Na-алгинат и Ca-алгинат филмови) и влакна (Na-алгинатна влакна). Главна функционална својства алгината повезана су са његовом вискоеластичношћу.

Алгинатна влакна су по хемијском саставу типичне калцијумове соли које се у интеракцији са излучевинама ране преводу у гел форму која настаје као резултат јонске измене Ca^{2+} јона из влакна јонима Na^{+} из околне средине. Ова измена битно побољшава апсорпциона својства алгинатних влакана што их чини идеалним у третманима засушивања рана [23,24]. Обзиром на изузетно развијену површину, хемијска и физичка својства и присуство великог броја јоноактивних COO^{-} група алгинатна влакна су веома атрактивна и за образовање депоа лековитих супстанци са контролисаним отпуштањем [25].

Алгинатна и хитозан влакна, одликују се низом позитивних структурних својстава. Захтеви који се тичу биокомпатибилности, нетоксичности и хидрофилности, оба влакнаста јонита у потпуности задовољавају, тако да се практично без ограничења могу користити у медицинске сврхе. Са становишта порозне структуре и јоноизмењивачких способности су веома погодна за сорпцију великих молекула инсулина из водених раствора [15].

Материјал и методе

Алгинатна влакна

У овом раду коришћена су алгинатна влакна руског порекла, финоће 2.5 dtex и јачине 17-22 cN/dtex.

Хитозан влакна

У оквиру ових истраживања коришћена су хитозан влакна добијена на пилот постројењу Института за хемијска влакна у Лођу, Пољска, финоће 1,7-2,5 dtex, јачине 14-15 cN/tex.

Инсулин

За добијање вештачког депоа инсулина коришћене су следеће врсте инсулина:

- Свињски инсулин, хроматографски, "Novo Nordisk", Данска
- Свињски инсулин, кристални, "Novo Nordisk", Данска
- Хумани инсулин, кристални Zn "Novo Nordisk", Данска

УВ спектрофотометрија

Хемисорпција инсулина хитозан и алгинатним влакнима је праћена УВ спектрофотометријом. УВ спектри су снимани на спектрофотометру Shimadzu UV-Visible Recording Spektrofotometre, UV-260, у интервалу таласних дужина 200-400 nm, односно у блиској или кварцној УВ области.

Скенинг-електронска микроскопија

Морфолошке карактеристике добијених влакнастих депоа инсулина проучаване су скенирајућом електронском микроскопијом (JEOL JSM-T 20 i JEOL JSM-35). Узорци влакана направани су златом под високим вакуумом.

Резултати и дискусија

Вештачки депо инсулина у облику биолошки активног комплекса хитозан влакно - инсулин, представљао би веома атрактивну формулацију у лечењу инсулин зависних стања. У том смислу извршен је сет експерименталних истраживања везаних за депоновање, односно везивање инсулина на хитозанском влакнастом узорку. Вештачки депо инсулина на бази хитозан влакана добијен је сорпцијом из инсулинских раствора концентрације 0.25 i 0.5 g/dm³. Параметри процеса су рН 6.5-7, температура 25 +2°C, модул купатила 1:500. Резултати хемисорпције инсулина приказани су табели 1.

Табела 1. Хемисорпција инсулина хитозан влакнима

Врста инсулина	Конц. раствора инсулина, g/dm ³	Време min	Везана колич. инсулина Q / (mg/g)	Исцрпљење %
Хроматографски свињски	0.25	2880	102.2	95.5
	0.5	2400	224	89,6
Кристални свињски	0.25	1440	237.6	97.9
	0.5	2880	202	80.4
Хумани Zn	0.25	1880	110	89.8
	0.5	2880	204	80.8

Експериментални резултати указују да се хемисорпцијом инсулина из раствора концентрације 0.25 g/dm³ могу добити вештачки депои инсулина са количинама од 102-237.6 mg/g, а из раствора концентрације 0.5 g/dm³ 202-224 g/dm³.

Хемисорпција инсулина из раствора концентрације 0.5 g/dm³, показала је као што се и очекивало нижа исцрпљења инсулинских раствора у односу на хемисорпцију из концентрације 0.25 g/dm³ за исти временски период. Поређењем резултата везаних за хемисорпцију свињског кристалног инсулина хитозан влакнима, уочава се да је при концентрацији 0.5 g/dm³ исцрпљење слабије за скоро 17 % за време трајања реакције од приближно 40 h. При продуженом времену хемисорпције исцрпљење је достигло 80%, што одговара депонованој количини инсулина од 202 mg/g влакнастог јонита.

Кинетика и интензитет хемисорпције инсулина јонизмењивачким алгинатним влакнима проучавани су у зависности од концентрације раствора инсулина из кога се врши сорпција. Алгинатна влакна су коришћена у својој Н-форми. Инсулин је сорбован из пуферских раствора концентрације 0.5, 1.0 и 2.0 g/dm³. На основу прелиминарних истраживања утврђени су оптимални рН 2.7±0.1, температура 20+2°C. Хемисорпција је вршена из купатила модула 1: 500. Резултати хемисорпције хроматографског инсулина алгинатним влакнима приказани су у табели 2.

Табела 2. Хемисорпција хроматографског инсулина алгинатним влакнима

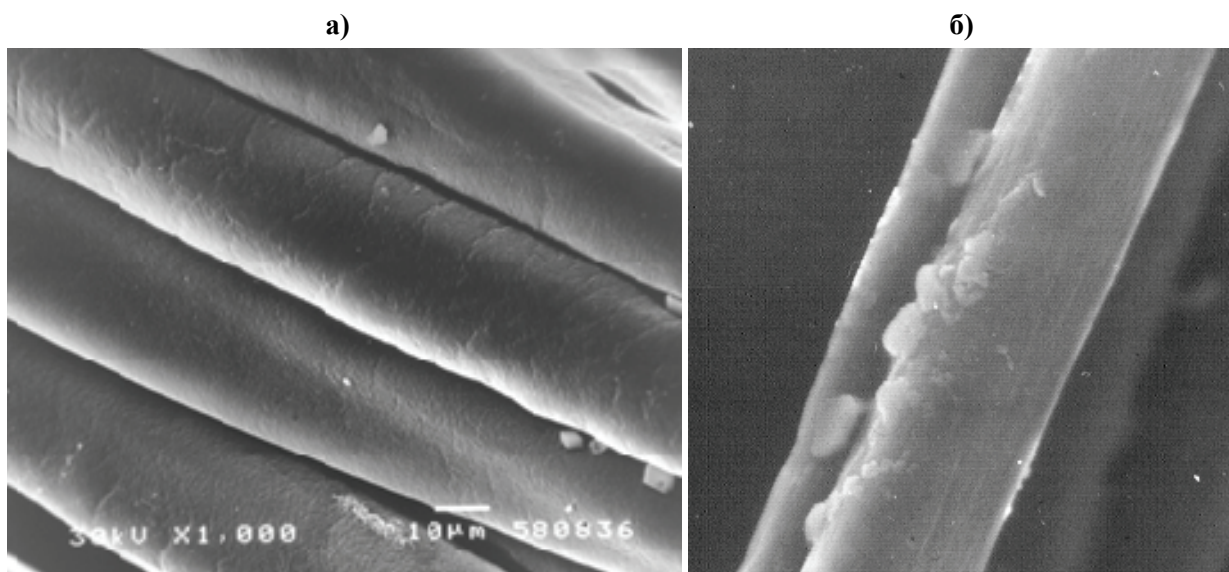
Конц. раст. инсулина g/dm ³	Време, min	Везана колич. инсулина Q / (mg/g)	Исцрпљење, %
0.5	60	49.9	96.9
1.0	420	95.3	95.3
2.0	1200	175,2	88,7

Експериментални резултати су показали да хемисорпција тече несметано при све три концентрације инсулина уз веома висока исцрпљења инсулинских раствора. Уз информацију о молекулској маси алгината и времену потребном за његову биоразградњу у организму, могуће је унапред прорачунати и сорбовати потребну количину инсулина у депоу. Максимална количина

везаног инсулина из концентрације 0.5 g/dm^3 износи 49.9 mg/g влакна, из концентрације 1.0 g/dm^3 износи 95.3 mg/g влакна а из 2.0 g/dm^3 достиже 175.2 mg/g влакнастог носача.

Објашњења везана за количине инсулина сорбованог хитозан и алгинатним влакнима, леже у природи влакнастих носача и њиховој интеракцији са инсулином. Ова влакна се карактеришу слојевитом структуром. Слојевита структура је нарочито карактеристична за оријентисане полимере добијене било регенерисањем природних полимера, што је случај са алгинатним и хитозан влакнима. Присуство ситних пора и микровакуола се позитивно одражава на повећање приступачности активних центара, односно јоногених група влакна у процесима хемисорпције инсулина, као крупног протеинског макромолекула.

Хитозан и алгинатна влакна се карактеришу релативно глатком површином и слабо израженим попречним структурним елементима, што је вероватно последица интензивног бубрења ових влакана при производњи. Приликом хемисорпције инсулина већи део макромолекула инсулина, путем система пора продре у влакно. На слици 3 је дата топографија вештачког депоа инсулина добијеног хемисорпцијом свињског кристалног инсулина хитозан влакнима и вештачког депоа инсулина добијеног алгинатним влакнима.



Слика 3. Топографија вештачког депоа инсулина добијеног хемисорпцијом свињског кристалног инсулина хитозан влакнима (а) и вештачког депоа инсулина добијеног хемисорпцијом хромиграфског инсулина алгинатним влакнима (б).

На основу електрон-микроскопских снимака се уочава да влакна хитозана, као и влакна алгината, не депонују инсулин на својој површини. Влакнасти депои имају релативно глатку, заобљену површину, па се као закључак намеће да хемисорпција инсулина не утиче на рељеф површине влакнастог депоа инсулина, односно да је главна количина сорбованог инсулина депонована у унутрашњост, тј. по маси влакна. Ситни и у малом броју, примећују се агрегати инсулина на површини алгинатних влакна, али је такође главна количина инсулина у унутрашњости влакна.

Закључак

Развијен је нови тип биолошки активног влакна - хормонактивно влакно са програмираним својствима у облику вештачког депоа инсулина. Биополимери на бази полисахарида –хитозан и алгинат су показали висок афинитет према молекулу инсулина, тако да се путем хемисорпције могу добити вештачки депои инсулина са преко 230 mg/g влакна.

У зависности од природе биополимерне матрице, тј. од молекулске масе и брзине разградње хитозана и алгината, као и количине сорбованог инсулина, могу се пројектовати вештачки депои са жељеном количином инсулина и жељеним веком трајања у организму. Обзиром на низ јако добрих својстава хитозана и алгината, биолошки активни комплекси хитозан – инсулин, као и алгинат-инсулин, (као имплатабилних вештачких депоа инсулина) би могли дати значајан напредак у изналагању оптималне терапије у лечењу дијабетеса.

Захвалница: Раг је подржан од стране пројекта „ Функционализација, карактеризација и примена целулозе и деривата целулозе“ ПРОЈЕКАТ Министарства просвете и науке, Република Србија, ОИ172029 (2011-2014)

Polysaccharide fibrous biopolymers as a substrate for obtaining artificial insulin depot

This paper presents the results of obtaining hormonactive fibers in the fibrous form, of artificial insulin depots based on polysaccharide fibrous biopolymers. Optimum process parameters of insulin chemisorption by resorptive polysaccharide biopolymer in fibrous form - alginate and chitosan fibers were found. The influence of the fibrous biopolymers nature and the effect of insulin type of intensity chemisorption of insulin was studied. The location and deposition of insulin in and on the fiber, topography of insulin fibrous depot were explored. The maximum amount of bound insulin: on alginate fibers about 300 mg of porcine insulin chromatographic / g of fiber, on chitosan fiber and about 230 mg of porcine insulin chromatographic / g of fiber, 330 mg of porcine insulin crys / g of fiber and 200 mg human insulin / g of fiber.

Compared to other implantable systems for the insulin release, this artificial insulin depot would have the advantage of simpler application and sufficiently long time of control release of insulin on the level of needs of basal metabolic processes of the human body.

Литература

1. P.V Divya, K. Nandakumar, Trends Biomater.Artif.Organs, Vol 19(2), (2006) 74-80
2. C.H. Lee, A. Singla, Y.Lee, M. Minabe, F. Suzuki, T. Umamoto, Int. J. Pharm., Jun 19, Vol 221(1-2), (2001) 1-22
3. M. Rajaonarivony, C. Vauthier, G. Couarraze, F. Puisieux, P.Couvreux, J Pharm Sci. Sep, Vol 82(9), (1993) 912-7
4. S. Oerther, H. L. Gall, E. Payan, F. Lapique, N. Presle, P. Hubert, J. Dexheimer, P. Netter, Biotechnology and Bioengineering, Vol 63(2), (1999) 206 – 215
5. G. Coppi, V. Iannuccelli, E. Leo, M.T. Bernabei, R. Cameroni, Journal of Microencapsulation, Vol 19(1), (2002) 37– 44
6. R.S. Hermes, R. Narayani, Polymeric Trends. Biomater. Artif. Organs, Vol 5 (2) (2002)54-56
7. M.N.V. Ravi Kumar, Reactive and Functional Polymers, Vol 46, (2000) 1-27
8. Z. Cui and R. J. Mumper, Journal of Controlled Release, Vol. 75 (3), (2001) 409-419
9. S. Puttipipatkachorn , J. Nunthanid , K. Yamamoto and G.E. Peck, Journal of Controlled Release, Vol. 75 (1-2), (2001) 143-153
10. YW. Yokogawa, KW. Nishizawa, FW. Nagata and TW. Kameyama, Journal of Sol-Gel Science and Technology, Vol 21 (1 – 2), (2001) 105 – 113
11. S. Blau, T.T. Jubeh, S.M. Haupt, A. Rubinstein, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst., Vol 17(5), (2000) 425-65
12. F.L Mi, Y.C Tan, H.F Liang, H.W Sung., Biomaterials. Jan, Vol 23(1), , (2002) 181-91
13. P. Arthur Felse, T. Panda, Bioprocess and Biosystems Engineering, Vol 20 (6), (1999) 505 - 512
14. 22. G. Coppi, V. Iannuccelli, E. Leo, M.T. Bernabei, R.Cameroni, Drug Dev Ind Pharm. May, Vol 27(5), (2001) 393-400
15. A. Медовић, Докторска дисертација, Технолошко-металуршки факултет, Универзитет у Београду, 2006
16. T. Çaykara, A. Alaslan, M.S. Eroğlu, O. Güven, Appl. Surf. Sci. 252 (2006) 7430-7435
17. S. Hirano, K. Nagamura, M. Zhang, S. K. Kim, B. G. Chung, M. Yoshikawa, T. Midorikawa, Carbohydr. Polym., Vol 38(4), (1999) 293-298
18. K. Tuzlakoglu, C. M. Alves, J. F. Mano, R. L. Reis, Macromol. Biosci., Vol 4(8), (2004) 811–819
19. T.M. Kumar, W. Paul, C.P. Sharma and M. A. Kuriachan, Trends Biomater. Artif. Organs, Vol 18 (2), January, (2005) 198-202
20. T. Mikolajczyk, Fibers&Textile in Eastern Europe, Vol 9, , (2001) 20-24
21. G .Skjak-Braek, T. Espevik, Vol 14, (1996) 19-25
22. Y. Qin, C. Agboh, X. Wang, K. Gilding, Proceedings Vol. 1(2), p: 407-413, May 21-24, Tampere, Finland, (1996)
23. Y. Qin, C. Agboh, X. Wang, D.K. Gilding, Men-made Fiber Year Book, Septembar, , (1996) 29 –30
24. W. Paul, Ch. P. Sharma, Trends Biomater. Artif. Organs, Vol 18 (1), (2004) 18-23
25. J.Fabia, Cz. Slusarczyk., A. Gawlowski, Supermolecular Structure of Alginate Fibers for Medical Applications Studied by Means of WAXS and SAXS Methods, FIBER TEXTILES in Eastern Europe, Vol 13, No 5(53), p: 114-117, (2005)

Primena GPC/MALLS metode sa fluorescentnim FDAM markerima za određivanje sadržaja funkcionalnih grupa selektivno oksidisanih celuloznih vlakana

Jovana Ž. Milanović*, Antje Potthast**, Sonja Schiehser**, Predrag Milanović*, Mirjana Kostić*

**Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Karnegijeva 4, 11120 Beograd, Srbija*

***University of Natural Resources and Life Sciences, Muthgasse 18, A-1190 Beč, Austrija*

U ovom radu je, primenom napredne instrumentalne metode sa fluorescentnim markerima u kombinaciji sa GPC/MALLS sistemom, proučavan uticaj selektivne oksidacije katalizovane 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil radikalom (TEMPO) u prisustvu NaClO i NaBr, na sadržaj uvedenih COOH grupa modifikovanih vlakana liocela. Metoda je pružila mogućnost da se pored određivanja ukupnog sadržaja funkcionalnih grupa dobiju i profili funkcionalnih grupa u odnosu na raspodelu molekulskih masa. Dobijeni rezultati omogućili su detaljnu analizu procesa TEMPO-oksidacije, što je obezbedilo uspostavljanje korelacije između parametara oksidacije i kontrolisanog uvođenja COOH grupa u liocel vlakna, kako u pogledu ukupne količine, tako i raspodele grupa u celuloznim frakcijama različitog stepena polimerizovanja. Primenom TEMPO-oksidacije u vremenu modifikovanja do 1 h, sa svim koncentracijama NaClO, COOH grupe uvode se uglavnom u niskomolekulske frakcije. Uvođenje značajnijih količina COOH grupa i u visokomolekulske frakcije moguće je postići izvođenjem oksidacije pomoću većih koncentracija NaClO u trajanju duže od 1 h.

Uvod

Funkcionalne grupe predstavljaju jedan od ključnih faktora koji utiče na hemijska svojstva i brojne makroskopske karakteristike celuloznih vlakana, kao što su npr.: površinsko naelektrisanje, sposobnost zadržavanja vode, starenje, umrežavanje, itd. Stoga je za karakterisanje celuloze, određivanje sadržaja funkcionalnih grupa izuzetno važno, dok se postupcima za uvođenje i povećanje sadržaja funkcionalnih grupa posvećuje posebna pažnja. Kao izuzetno efikasna metoda za uvođenje funkcionalnih grupa u polisaharide na C6 atomu, veoma je aktuelna katalitička oksidacija sa vodorastvornim i stabilnim nitrosilnim radikalima, kao što je 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksi radikal, poznat kao TEMPO radikal. Prednosti vezane za proces TEMPO-oksidacije su velika brzina reakcije i visok prinos, velika selektivnost, zatim kataliza procesa, kao i umerena degradacija polisaharida u toku oksidacije^{1,2}.

U ovom radu je za proučavanje uticaja parametara TEMPO-oksidacije na sadržaj i raspodelu uvedenih funkcionalnih grupa modifikovanih vlakana liocela primenjena napredna instrumentalna metoda sa fluorescentnim markerima u kombinaciji sa GPC/MALLS sistemom. Pomenuta instrumentalna metoda je veoma pogodna za praćenje oksidativnih promena, jer pored određivanja ukupnog sadržaja funkcionalnih grupa, takođe, pruža mogućnost za dobijanje profila funkcionalnih grupa u odnosu na raspodelu molekulskih masa³. Dobijeni rezultati omogućili su detaljnu analizu procesa TEMPO-oksidacije, što je omogućilo uspostavljanje korelacije između parametara oksidacije i kontrolisanog uvođenja funkcionalnih grupa u liocel vlakna, kako u pogledu ukupne količine, tako i raspodele grupa u različitim celuloznim frakcijama.

Ekperimentalni deo

Materijal: U radu su korišćena liocel vlakna, proizvođača "Lencing AG", Austrija. Finoća vlakana iznosi 1,3 dtex, a dužina 38 mm. Sve upotrebljene hemikalije bile su p.a. čistoće.

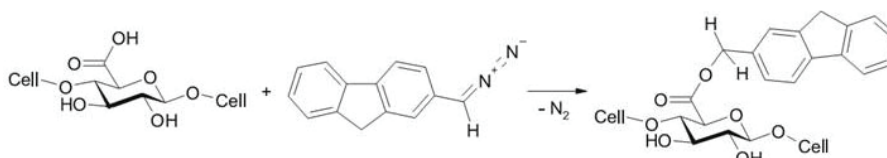
Metode

TEMPO-oksidacija vlakana liocela: Postupak TEMPO-oksidacije baziran je na metodi koju su predložili Saito i Isogai^{4,5}. Liocel vlakna (10 g), potapaju se u destilovanu vodu, u kojoj su prethodno rastvoreni TEMPO (0,025 g) i NaBr (0,25 g). Rastvaranje se vrši na sobnoj temperaturi, lagano, uz mešanje magnetnom mešalicom. Potom se, uz neprestano mešanje, dodaje potrebna količina 13 % NaClO kojoj odgovara: 0; 0,30; 2,42 i 4,84 mmol NaClO/g cel. Za vreme trajanja reakcije, pH vrednost održava se na $10,5 \pm 0,1$ dodavanjem 0,5 M NaOH. Modifikovanje se odvija na sobnoj temperaturi, u različitim vremenskim intervalima. Prati se tok reakcije; vreme, količina dodatog NaOH, promena temperature i pH vrednost. Promena pH vrednosti praćena je na pH-metru tipa: MA 5740 (Iskra, Slovenija). Uslovi oksidacije i oznake uzoraka prikazani su u tabeli 1.

Određivanje sadržaja uvedenih funkcionalnih grupa: Za određivanje sadržaja karboksilnih grupa modifikovanih liocel vlakana primenjena je instrumentalna metoda sa fluorescentnim markerom FDAM (9H-fluoren-2-il-diazometan) u kombinaciji sa GPC/MALLS sistemom (Gel Permeation Chromatography/Multi-Angle Laser Light Scattering). Princip markiranja COOH grupa pomoću FDAM markera prikazan je na slici 1, dok je postupak opisan u literaturi ³. GPC (gel propusna hromatografija) je izvođena pomoću: protočnog degazatora, Dionex DG-2410; pumpe, Kontron 420; autosamplera HP series 110 (GPC); kolone, Gynkotek STH 585; MALLS detektora, Wyatt Dawn DSP sa argon-jonskim laserom ($\lambda_0 = 488 \text{ nm}$) i refraktometra (RI), Shoed RI-71. Sledeći parametri su korišćeni tokom GPC analize: protok 1,00 ml/min; kolona-četiri, PL gel mixed ALS, 20 μm , 7,5 x 300 mm; zapremina ubrizgavanja 100 μl ; vreme trajanja 45 min. DMAc/LiCl (0,9 % w/v), filtriran kroz 0,02 μm filter, je korišćen kao rastvarač. Obrada dobijenih podataka je izvršena pomoću standardnih programa Astra i GRAMS/32 ⁶.

Tabela 1. Oznake uzoraka i uslovi izvođenja TEMPO-oksிடacije

Oznaka uzoraka	Uslovi oksிடacije	
	$c_{\text{NaClO}} / (\text{mmol/g cel})$	t / h
LO	0	0,00
LI ₁	0,30	1,00
LI ₂		2,00
LI ₃		3,00
LI ₄		4,00
LII ₁	2,42	1,00
LII ₂		2,00
LII ₃		3,00
LII ₄		4,00
LIII _{0,25}	4,84	0,25
LIII _{0,50}		0,50
LIII ₁		1,00
LIII ₂		2,00
LIII ₄		4,00



Slika 1. Struktura fluorescentnog markera FDAM i primer markiranja COOH grupe na C-6 atomu anhidroglukozidnog prstena celuloze ^{3,6}

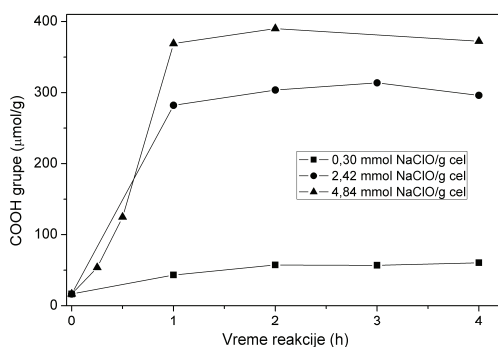
Rezultati i diskusija

Na slici 2. prikazan je uticaj vremena oksிடacije i količine modifikujućeg agensa (NaClO) na sadržaj uvedenih karboksilnih grupa u TEMPO-oksிடisanim liocel vlaknima.

Sadržaj karboksilnih grupa nemođifikovanih vlakana liocela iznosi 16,46 $\mu\text{mol/g}$ celuloze, dok se kod svih modifikovanih uzoraka sadržaj karboksilnih grupa povećava u opsegu od 53,69 do 390,07 $\mu\text{mol/g}$ celuloze, u zavisnosti od uslova modifikovanja. Dobijeno povećanje sadržaja uvedenih karboksilnih grupa može se objasniti konverzijom karbonilnih grupa u karboksilne grupe usled odvijanja procesa TEMPO-oksிடacije. Konverziju karbonilnih grupa u karboksilne grupe omogućava *in situ* generisanje hipobromita u reakciji hipohlorita i bromida ^{4,5}.

Modifikovanje liocel vlakana sa najmanjom koncentracijom modifikujućeg agensa (0,30 mmol NaClO/g celuloze), uzrokuje lagano povećanje sadržaja karboksilnih grupa sa produženjem vremena tretmana. U slučaju oksிடacije sa većim koncentracijama modifikujućeg agensa: 2,42 i 4,84 mmol NaClO/g celuloze, sadržaj karboksilnih grupa se povećava sa produženjem vremena modifikovanja do 3, tj. do 2 sata, respektivno, i nakon dostizanja maksimuma, sadržaj uvedenih funkcionalnih grupa se lagano smanjuje u oba slučaja. Smanjenje sadržaja karboksilnih grupa može se objasniti rastvaranjem celuloznih frakcija

oksidisanih u velikom stepenu, koje bivaju uklonjene u procesu ispiranja nakon oksidacije⁷. Oksidacijom sa 4,84 mmol NaClO/g celuloze u toku dva časa, uvedeno je najviše grupa, do 23,7 puta više nego kod polaznog uzorka.



Slika 2. Veza između vremena oksidacije i sadržaja karboksilnih grupa u TEMPO-oksidisanim vlaknima liocela, gde je 0,30; 2,42 i 4,84 mmol NaClO/g celuloze upotrebjeno za oksidaciju na sobnoj temperaturi i pri pH 10,5

Pored određivanja ukupnog sadržaja COOH grupa, primena GPC/MALLS metode sa fluorescentnim markerima, omogućava i detaljnu analizu uticaja uslova izvođenja TEMPO-oksidacije na raspodelu COOH grupa u frakcijama vlakana različitog stepena polimerizovanja. U svakom uzorku posmatrane su 4 frakcije sa sledećim stepenom polimerizovanja: DP < 100; 100 < DP < 200; 200 < DP < 2000 i DP > 2000, i količina COOH grupa u svakoj od navedene 4 frakcije. U tabeli 2, prikazani su dobijeni rezultati za uzorke modifikovane pomoću 4,84 mmol NaClO/g celuloze.

Tabela 2. Procentni udeo različitih molekularskih frakcija i sadržaja COOH grupa u različitim opsezima molekularskih masa, za nemođifikovane i uzorke liocela oksidisane pomoću 4,84 mmol NaClO/g celuloze

Uzorak	DP	Mw / (kg/mol)	DP / %	COOH I %	COOH _{ukupno} , µmol/g
LO	< 100	0 - 16,216	4,63	23,76	16,46
	100 - 200	16,216 - 32,432	8,84	17,13	
	200 - 2000	32,432 - 324,32	80,20	56,68	
	> 2000	324,32 - 20000	6,31	2,38	
LIII _{0,25}	< 100	0 - 16,216	12,69	33,81	53,69
	100 - 200	16,216 - 32,432	25,32	28,74	
	200 - 2000	32,432 - 324,32	61,82	37,37	
	> 2000	324,32 - 20000	0,15	0,04	
LIII _{0,50}	< 100	0 - 16,216	40,63	58,30	124,69
	100 - 200	16,216 - 32,432	32,64	26,10	
	200 - 2000	32,432 - 324,32	26,69	15,57	
	> 2000	324,32 - 20000	0,02	0,00	
LIII ₁	< 100	0 - 16,216	48,99	62,63	368,98
	100 - 200	16,216 - 32,432	38,22	30,49	
	200 - 2000	32,432 - 324,32	12,76	6,85	
	> 2000	324,32 - 20000	0,00	0,00	
LIII ₂	< 100	0 - 16,216	25,74	37,18	390,07
	100 - 200	16,216 - 32,432	20,28	21,54	
	200 - 2000	32,432 - 324,32	51,39	40,23	
	> 2000	324,32 - 20000	2,56	1,03	
LIII ₄	< 100	0 - 16,216	54,19	65,02	372,31
	100 - 200	16,216 - 32,432	34,45	27,73	
	200 - 2000	32,432 - 324,32	11,34	6,92	
	> 2000	324,32 - 20000	0,00	0,00	

U slučaju oksidacije pomoću 4,84 mmol NaClO/g celuloze, u prvih 15 min modifikovanja najveći udeo COOH grupa (37.37 %) prisutan je u lancima sa stepenom polimerizovanja od 200 do 2000 kojih ima 61.82 %. Produženjem vremena oksidacije 30 min i 1 h, dolazi do uvođenja COOH grupa najviše u kratke lance (DP < 200), da bi nakon 2 h modifikovanja, najviše COOH grupa (40.23 %) ponovo bilo uvedeno u lance sa stepenom polimerizovanja 200 < DP < 2000, kojih ima 51.39 %. U ovom slučaju je očigledno da se sa produžavanjem vremena modifikovanja duže od 1 h, uvodi znatno više COOH grupa kako u niskomolekulske, tako i u frakcije sa većim stepenom polimerizovanja (200 < DP < 2000).

Zaključak

TEMPO-oksidacija predstavlja izuzetno efikasan postupak za uvođenje funkcionalnih grupa u celulozna vlakna. Kod svih modifikovanih vlakana liocela dobijeno je povećanje sadržaja karboksilnih grupa u odnosu na nemodifikovani liocel. Primenjena instrumentalna metoda sa fluorescentnim markerima u kombinaciji sa GPC/MALLS detektorom omogućila je, pored određivanja ukupnog sadržaja uvedenih COOH grupa, dobijanje profila funkcionalnih grupa u odnosu na raspodelu molekulskih masa. Rezultati pokazuju da su primenom TEMPO-oksidacije u trajanju modifikovanja do 1 h, sa svim koncentracijama modifikujućeg agensa (0.30 - 4.84 mmol NaClO/g celuloze), COOH grupe uvedene uglavnom u niskomolekulske frakcije, dok je uvođenje značajnijih količina COOH grupa i u visokomolekulske frakcije moguće postići izvođenjem oksidacije pomoću većih koncentracija NaClO u vremenu modifikovanja duže od 1 h.

Zahvalnica: Ovaj rad je proistekao iz rada na Projektu koji finansira Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije (OI 172029).

Application of GPC/MALLS method with fluorescence FDAM labeling for determination of functional groups in selectively oxidized cellulose fibers

In this paper the effects of TEMPO-oxidation, i.e. oxidation with NaClO and catalytic amount of NaBr and 2,2',6,6'-tetramethylpiperidine-1-oxy radical (TEMPO), on lyocell fibers were studied by gel permeation chromatography (GPC) using multiple detection and group-selective fluorescence labeling, according to FDAM methodology. In addition to determination of functional groups content as a sum parameter, the applied method also provides a functional group profile in relation to the molecular weight of the cellulose. This method gives the possibility to get some deeper insight into TEMPO-oxidation. Therefore, it was possible to establish a correlation between oxidation conditions and controlled introduction of COOH groups in lyocell fibers, both in terms of total amount of COOH groups, and groups distribution in different molecular weight fractions of cellulose.

The obtained results showed that during the first hour of oxidation, with all concentration of NaClO, the COOH groups are introduced mostly in low molecular weight fractions. Introduction of significant amounts of COOH groups in the high molecular weight fractions can be achieved by performing the oxidation using higher concentrations of NaClO at the time of modification longer than one hour.

Literatura:

1. A. E. de Nooy, A. C. Besemer, H. van Bekkum. *Carbohydrate Research*, **269**. (1995) 89–98.
2. T. Saito, A. Isogai, *Colloids and Surfaces*, **289**. (2006) 219–225.
3. R. Bohrn, A. Potthast, S. Schiehser, T. Rosenau, H. Sixta, P. Kosma. *Biomacromolecules*, **7**. (2006) 1743–1750.
4. T. Saito, A. Isogai, *Biomacromolecules*, **5**. (2004) 1983–1989.
5. T. Saito, A. Isogai, *Carbohydrate Polymers*, **61**. (2005) 183–190.
6. A. Potthast, T. Rosenau, P. Kosma, *Advances in Polymer Science*, **205**. (2006) 1–48.
7. J. Praskalo, M. Kostic, A. Potthast, G. Popov, B. Pejic, P. Skundric, *Carbohydrate Polymers*, **77**. (2009) 791–798.

Uticaj parametara neselektivne oksidacije na sadržaj funkcionalnih grupa u celuloznim vlaknima

Ana D. Kramar, Matea Korica, Jovana Ž. Milanović, Mirjana M. Kostić

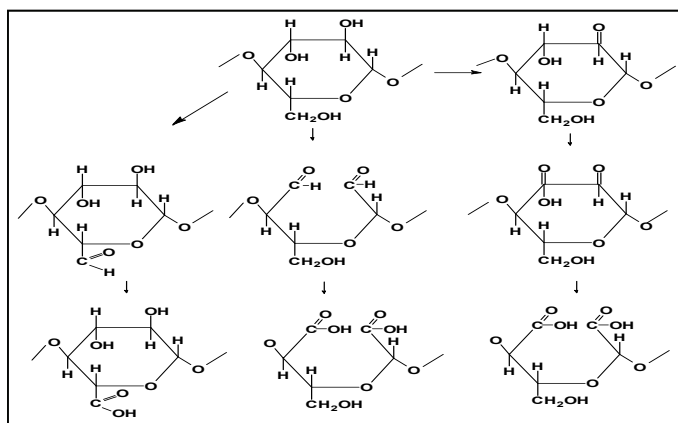
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, Katedra za Tekstilno inženjerstvo, Karnegijeva 4, Beograd

Uvod

Oksidacija predstavlja jedan od najčešće korišćenih postupaka za funkcionalizaciju celuloze i celuloznih vlakana. Celuloza je izuzetno pogodan supstrat za modifikovanje zbog prisustva tri hidroksilne grupe na glukopiranoznom prstenu, jedne primarne i dve sekundarne.

U zavisnosti od korišćenog oksidacionog sredstva, moguće je oksidisati jednu, dve ili sve tri hidroksilne grupe. Neka oksidaciona sredstva oksidišu samo primarnu OH grupu u celulozi ili samo sekundarne OH grupe i takva sredstva se nazivaju *selektivna oksidaciona sredstva*. Takva su npr. perjodatna jedinjenja, sistem 2,2',6,6'-tetrametilpiperidin-1-oksil radikal (TEMPO)/NaClO/NaBr i druga¹⁻⁴.

Neselektivna oksidaciona sredstva, poput peroksida i permanganata, mogu da, u zavisnosti od uslova pod kojima se vrši oksidacija, oksidišu OH grupe na različitim C-atomima i do različitog stepena (slika 1). Sekundarne hidroksilne grupe, na C2 i C3 atomu, mogu se oksidisati do keto grupa uz očuvanje strukture prstena, odnosno do aldehidnih grupa uz otvaranje glukopiranoznog prstena. Primarne hidroksilne grupe oksiduju do karboksilnih, preko karbonilnih grupa kao intermedijera oksidacije¹⁻².



Slika 1. Šema reakcionih puteva neselektivne oksidacije

Oksidaciona sredstva, pored uticaja na postojeće funkcionalne grupe, imaju uticaj i na glikozidne veze u celulozi. U zavisnosti od jačine primenjenog sredstva, može doći do kidanja celuloznih lanaca na više mesta, pri čemu se na krajevima takođe mogu formirati aldehidne grupe, uz smanjenje kristalnosti uzorka, odnosno povećanja amornih područja u vlaknu. Svi ovi efekti oksidacije se, pored sadržaja funkcionalnih grupa, ispoljavaju kroz promenu u sorpcionim svojstvima vlakana, jer sorpciona svojstva vlakana direktno zavise od količine i dostupnosti amornih područja u vlaknu¹⁻⁴.

Oksiceluloza se pored poboljšanih sorpcionih svojstava, može iskoristiti kao supstrat za dalje hemijsko modifikovanje, tačnije vezivanje biološki aktivnih supstanci za vlakno, poput jona srebra³, raznih vrsta enzima⁴ itd. Poznavanjem sadržaja funkcionalnih grupa pri različitim uslovima oksidacije, moguće je optimizovati proces oksidacije prema kasnijoj upotrebi uzorka za hemijsko modifikovanje.

U ovom radu proučavan je uticaj neselektivne oksidacije vodonik-peroksidom na sadržaj funkcionalnih grupa u prirodnim celuloznim vlaknima.

Eksperimentalni materijal i metode

Kao eksperimentalni materijal korišćena je pamučna pređa nominalne finoće 20 tex. Sve hemikalije korišćene u radu su p.a. čistoće.

Postupak oksidacije

Kao oksidaciono sredstvo korišćen je vodonik-peroksid koncentracije 3 vol % i 6 vol %. pH vrednost rastvora je podešavana pomoću NaOH na 7, 9 i 11. Vreme tretmana je iznosilo 10, 20 i 30 minuta. Sva modifikovanja vršena su na sobnoj temperaturi. Nakon oksidacije uzorci su ispirani destilovanom vodom do neutralizacije i ostavljeni da se suše u laboratorijskim uslovima. Karakterizacija je urađena na kontrolnom i modifikovanim uzorcima.

Određivanje sadržaja karboksilnih grupa- Ca-acetatna metoda

Uzorci mase 0,5 g tretiraju se sa 100 ml 0,01 M HCl u trajanju od 1 h nakon čega se ispiraju destilovanom vodom. Zatim se uzorci potapaju u 30 ml 0,25M Ca-acetata i 50 ml destilovane vode i ostaju u rastvoru 2h uz mešanje. Sadržaj karboksilnih grupa se određuje titracijom 30 ml rastvora, natrijum-hidroksidom koncentracije 0,01M, uz fenolftalein kao indikator, prema formuli⁵:

$$COOH = \frac{80/30 \times 0.01 \times V(NaOH)}{m \times (1-w/100)}, \frac{\text{mmol}}{\text{g}} \text{ celuloze}$$

gde je: 0,01- molaritet NaOH;
 V(NaOH)- zapremina rastvora NaOH utrošena za titraciju, cm³;
 m- masa vlakna koje se tretira, g;
 w- sadržaj vlage, %;

Sadržaj vlage je određen prema standardnoj metodi ASTM D, 2654-76.

Određivanje sadržaja karbonilnih grupa

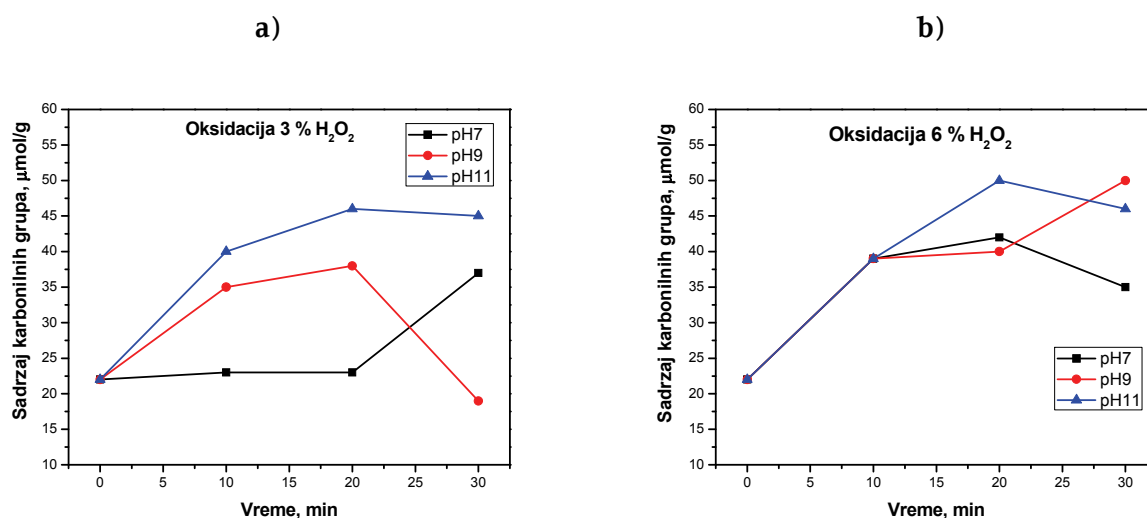
Prevođenje karbonilnih grupa u karboksilne pomoću natrijum-hlorita se vrši tako što se u 50 ml vode doda 10 ml 5M CH₃COOH, uzorak mase 1 g i 0.905 g NaClO₂. Uzorci stoje u drmalici 48 h na sobnoj temperaturi, nakon čega se ispiraju destilovanom vodom i acetonom i suše na vazduhu do konstantne mase. Dalje se primenjuje Ca-acetatna metoda. Od tako dobijene vrednosti oduzme se vrednost tj. sadržaj karboksilnih grupa u uzorku pre oksidacije hloritom, a razlika predstavlja sadržaj karbonilnih grupa⁶.

Rezultati i diskusija

Sadržaj funkcionalnih grupa u pamučnoj pređi se promenio u odnosu na sadržaj u polaznom uzorku usled oksidacionog dejstva vodonik-peroksida. Povećanjem koncentracije vodonik-peroksida, pH vrednosti reakcione sredine i dužim vremenom oksidacije, povećava se i sadržaj karbonilnih grupa u pamuku.

Na slici 2.a. prikazana je zavisnost količine karbonilnih grupa (C=O) od vremena oksidacije, za različite pH vrednosti rastvora, pri koncentraciji 3 vol % H₂O₂, a na slici 2.b. dat je grafik zavisnosti za 6 vol % H₂O₂. Na slikama 3.a. i 3.b. date su zavisnosti količine karboksilnih grupa (COOH) od vremena tretmana za različite koncentracije vodonik-peroksida i različite pH vrednosti rastvora. Kao što se vidi sa slika, oksidacija vodonik-peroksidom najviše utiče na sadržaj C=O grupa, dok su kod sadržaja COOH grupa promene ili vrlo male ili ih nema, osim u slučaju oksidacije sa 6 vol % vodonik-peroksidom pri pH 11 tokom 30 minuta, gde je dobijeno značajno povećanje sadržaja COOH grupa.

S obzirom na kratka vremena oksidacije i nisku koncentraciju oksidacionog sredstva, očekivano je da pri ovim uslovima dolazi do oksidacije OH grupa do aldehidnih i/ili keto grupa, a u vrlo maloj meri do COOH grupa.



Slika 2. Zavisnost sadržaja karbonilnih grupa u pamučnom vlaknu od parametara oksidacije za a) 3 vol % i b) 6 vol % rastvor H₂O₂

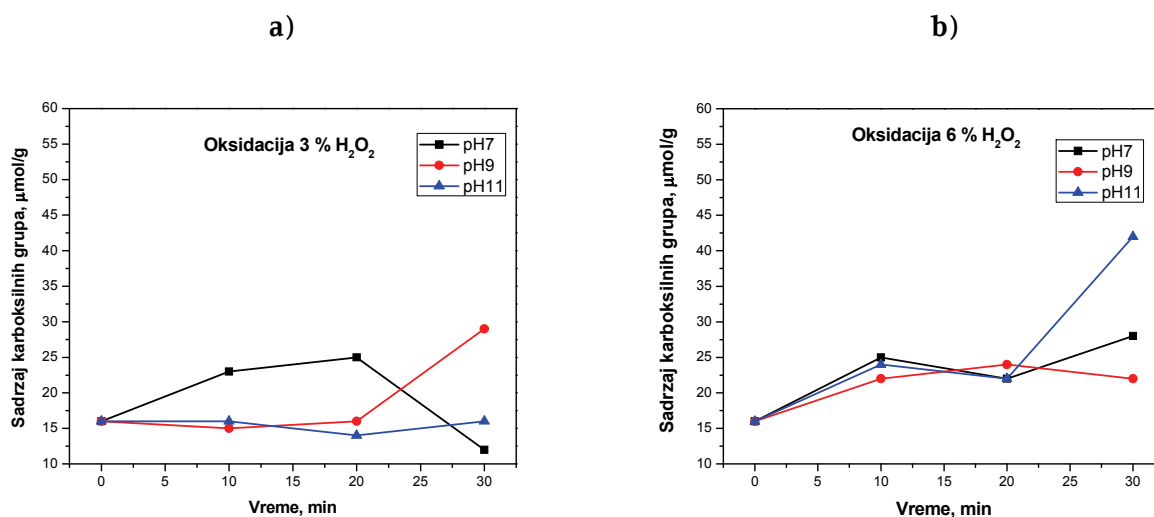
Sadržaj karbonilnih grupa

Na slikama 2.a. i 2.b. prikazano je da tokom prvih 20 minuta oksidacije dolazi do povećanja sadržaja C=O grupa u oksidisanim uzorcima u odnosu na polazni, u slučaju obe koncentracije H₂O₂. Izuzetak je uzorak tretiran 3 vol % H₂O₂ pri pH 7 gde prvih 20 minuta oksidacije ne dolazi do promene u sadržaju C=O grupa, da bi sa produženjem vremena do 30 min pri ovim uslovima došlo do značajnog povećanja količine grupa. Povišeni pH dovodi do trenutne aktivacije procesa oksidacije, što je povezano sa svojstvom peroksida da je aktivniji u alkalnoj sredini, odnosno brzina razlaganja vodonik-peroksida je veća u alkalnim uslovima⁷. Takođe, svojstvo supstrata, odnosno pamuka da bubri u alkalnim rastvorima¹, dodatno omogućava da oksidaciono sredstvo lakše proдре u vlakno. Posebno je interesantno istaći da pri korišćenju veće koncentracije vodonik-peroksida (6 vol %), kako prikazuje grafik na slici 2.b., pH rastvora nema uticaj na aktivaciju i brzinu reakcije u prvih 10 minuta.

Duže vreme tretmana dovodi do uvođenja veće količine C=O grupa u uzorcima, pri čemu se maksimalna količina grupa u ovom radu dobija tretiranjem uzoraka 6 vol % rastvorom H₂O₂, pri pH 11 tokom 20 minuta (50 μmol/g celuloze). U odnosu na kontrolni, netretirani uzorak, ovo povećanje iznosi 2,3 puta. Povećanjem vremena oksidacije iznad 20 minuta, dolazi do smanjenja količine C=O grupa, jer tada nastaje druga faza oksidacije, u kojoj se daljom oksidacijom karbonilne grupe prevode u karboksilne. Izuzetak je uzorak tretiran 6 vol % H₂O₂ pri pH 9, gde se maksimalna količina C=O grupa dobija tokom 30 minuta oksidacije. S obzirom da se pri ovim uslovima dobija ista količina C=O grupa kao i pri pH 11 tokom 20 min (50 μmol/g celuloze), dolazi se do zaključka da veća pH vrednost skraćuje vreme oksidacije, olakšava prodiranje oksidacionog sredstva u vlakno i povećava aktivnost vodonik-peroksida.

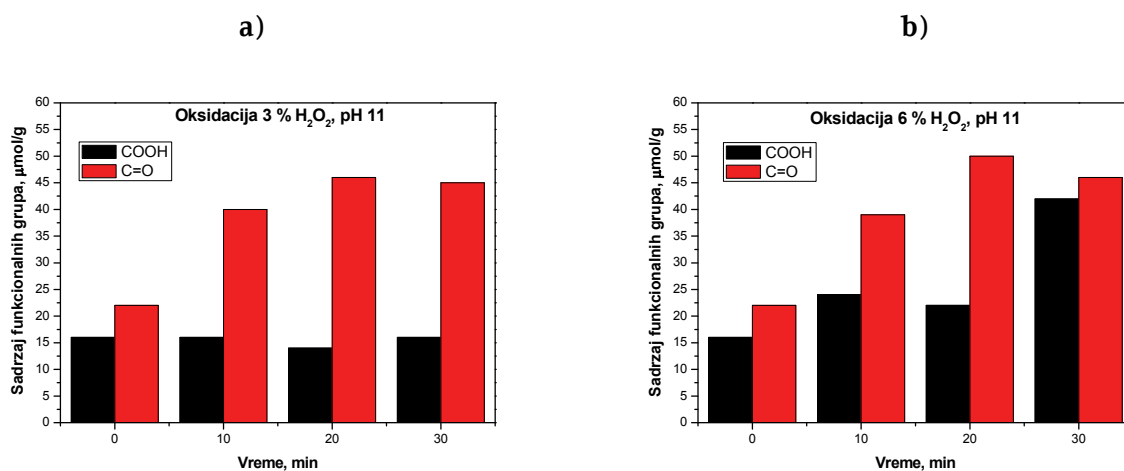
Sadržaj karboksilnih grupa

U slučaju karboksilnih grupa, kako je prikazano na slikama 3.a. i 3.b., pri koncentraciji 3 vol % i pH 7, u prvih 20 minuta dolazi do blagog porasta u sadržaju, dok pri ostalim pH nema promene. Ovo je potvrda da 3 vol % vodonik-peroksid u neutralnoj sredini tokom 20 minuta, ne može da proдре u vlakno i započne reakciju oksidacije, a porast karboksilnih grupa potiče od oksidacije slabo vezanih, niskomolekularnih frakcija na površini vlakna. Nakon 20 minuta dolazi do opadanja sadržaja karboksilnih grupa, što znači da su se zaista oksidisale niskomolekularne frakcije na površini vlakna. Naime, s obzirom na polarnost COOH grupa, jasno je da produžetkom vremena oksidacije i stajanjem vlakana u vodenom rastvoru, dolazi do rastvaranja niskomolekularnih frakcija te otuda i smanjen sadržaj karboksilnih grupa tokom 30 minuta tretmana pri pH 7 u 3 vol % rastvoru H₂O₂.



Slika 3. Zavisnost sadržaja karboksilnih grupa u pamučnom vlaknu od parametara oksidacije za a) 3 vol % i b) 6 vol % rastvor H_2O_2

Oksidacijom vlakana 6 vol % rastvorom H_2O_2 , pri pH 11 dolazi do značajnijeg povećanja sadržaja COOH grupa, pri čemu se tokom 30 minuta oksidacije dobija maksimalni sadržaj karboksilnih grupa u ovom radu (42 $\mu\text{mol/g}$ celuloze). Histogram na slici 4.b. pokazuje da se tek pri gore pomenutim uslovima, postiže prevođenje karbonilnih grupa u karboksilne u pamučnom vlaknu. Nakon 20 minuta sadržaj C=O grupa počinje da opada, dok istovremeno sadržaj COOH grupa naglo raste.



Slika 4. Sadržaj funkcionalnih grupa u pamučnom vlaknu oksidisanom pri pH 11 u a) 3 vol % i b) 6 vol % rastvoru H_2O_2

Sa slike 4 se može zaključiti i da je za značajniji porast sadržaja COOH grupa potrebna viša koncentracija vodonik-peroksida, dok je za oksidaciju do karbonilnih grupa dovoljna i manja koncentracija, odnosno 3 vol % rastvor vodonik-peroksida.

Zaključak

Oksidacija neselektivnim oksidacionim sredstvom, poput vodonik-peroksida, može se koristiti za uvođenje i karboksilnih i karbonilnih grupa u pamučno vlakno. U ovom radu je prikazano da koncentracija ima uticaj na prirodu funkcionalnih grupa, odnosno većom koncentracijom rastvora postiže se uvođenje COOH grupa, dok se sa manjom koncentracijom rastvora (3 vol % H_2O_2) dobijaju zadovoljavajući rezultati u vezi uvođenja karbonilnih grupa u pamučno vlakno.

Pri većoj koncentraciji vodonik-peroksida, aktivacija oksidacionog sredstva je veoma brza i vreme za koje se postiže maksimalna količina grupa u uzorku se skraćuje u slučaju karbonilnih na 20 minuta, a u

slučaju karboksilnih grupa, za dostizanje većeg sadržaja grupa potrebno je duže vreme jer je mehanizam oksidacije takav da se COOH grupe dobijaju prevođenjem prethodno formiranih karbonilnih grupa. Zbog prirode samog supstrata, alkalna sredina je neophodna da bi se postiglo povećanje sadržaja funkcionalnih grupa, odnosno da bi vlakno nabubrilo čime je olakšan prodor oksidacionog sredstva u strukturu vlakna. Takođe, u alkalnoj sredini, brzina razlaganja vodonik-peroksida je veća.

Odgovarajućim izborom parametara moguće je optimizovati proces oksidacije u skladu sa krajnjom namenom, bilo da se oksidacija vrši u cilju poboljšanja sorpcionih svojstava, bilo da je cilj uvođenje funkcionalnih grupa zbog dalje modifikacije materijala radi dobijanja novih, specijalnih svojstava celuloznog tekstilnog materijala.

Zahvalnost: Ovaj rad je proistekao iz rada na projektu koje finansira Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije (projekat OI 172029).

Influence of the nonselective oxidation conditions onto functional groups content in cellulose fibers

In this paper, the influence of oxidation with hydrogen peroxide onto functional groups content in natural cellulose fibers was studied. Changes in fibers obtained at various modification conditions were evaluated by determination of carbonyl and carboxyl group content in samples before and after modification. Oxidation with H₂O₂ leads to a significant increase in carbonyl group content already at shorter times and milder treatment conditions. Small change in carboxyl group content occurs at higher pH values (pH 11) and 6 vol % solution concentration. Taking into account nonselective nature of hydrogen peroxide as an oxidizing agent, the optimization of process in accordance with ultimate application of modified cellulose material can be performed by careful selection of oxidation conditions.

Literatura

1. R. Jovanović, *Edicija: Nauka o vlaknima i tehnologija vlakana, II Celulozna prirodna i hemijska vlakna*, Građevinska knjiga, Beograd, 1988.
2. Kostic, Mirjana M., Skundric, Petar D., Praskalo, Jovana Z., Pejic, Biljana M., and Medovic, Adela H. *Hemijaska industrija*, **61**. (2007), 233-237.
3. Praskalo-Milanovic, J. Z., Kostic, M. M., Dimitrijevic-Brankovic, S. I. and Skundric, P. D. *Journal of Applied Polymer Science*, **117**. (2010), 1772-1779.
4. Nikolic, T.; Kostic, M.; Praskalo, J.; Pejic, B.; Petronijevic, Z.; Skundric, P. *Carbohydrate Polymers*. **82**. (2010), 976-981.
5. E. Yackel, W. Kenyon, *Journal of the American Chemical Society*, **64**. (1942), 121-127.
6. E. J. Parks, R.L. Hebert, *Tappi Journal*, **55**. (1972), 1510-1514
7. D. Džokić, *Hemijaska dorada tekstilnog materijala*, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 1976.

Netkani materijal na bazi vune sekundarnog porekla modifikovan nanočesticama TiO₂ za uklanjanje direktnih boja iz vode

Darka D. Marković, Bojan M. Jokić*, Zoran V. Šaponjić**, Petar M. Jovančić*** i Maja M. Radetić***

*Inovacioni centar Tehnološko-metalurškog fakulteta,
Univerzitet u Beogradu, Karnegijeva 4, 11120 Beograd, Srbija*

**Katedra za neorgansku hemijsku tehnologiju, Tehnološko-metalurški fakultet,
Univerzitet u Beogradu, Karnegijeva 4, 11120 Beograd, Srbija*

***Institut za nuklearne nauke „Vinča“, Univerzitet u Beogradu, PO BOX 522, 11001 Beograd, Srbija*

****Katedra za tekstilno inženjerstvo, Tehnološko-metalurški fakultet,
Univerzitet u Beogradu, Karnegijeva 4, 11120 Beograd, Srbija*

Uvod

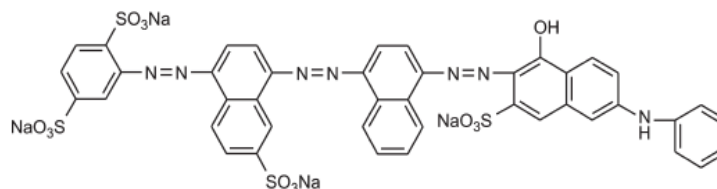
U tekstilnoj industriji se generišu velike količine otpadnih voda, pri čemu su vode iz bojačnica posebno problematične zbog toksičnosti i loše biorazgradivosti boja. Osim ekološkog, prisustvo boja u vodi predstavlja i veliki estetski problem obzirom da su boje i u malim količinama (ispod 1 mg/L) u vodi vidljive. Među brojnim metodama za uklanjanje boja iz otpadnih voda (sorpcija, filtracija, koagulacija, reversna osmoza itd.), fotohemijski oksidacioni procesi imaju sve značajnije mesto. Posebno su se pokazali efikasnim heterogeni fotohemijski oksidacioni procesi sa titan-dioksidom (TiO₂)¹. Utvrđeno je da čestice TiO₂ nanometarskih dimenzija izložene UV zracima obezbeđuju potpunu razgradnju organskih boja do CO₂ i H₂O². Nedostatak ovog postupka ogleda se u potrebi za uklanjanjem nanočestica TiO₂ iz otpadne vode tj. javlja se dodatni zahtev za filtracijom³. Rešenje ovog problema može se naći u imobilizaciji nanočestica TiO₂ na različitim nosačima^{3,4}.

Prethodna istraživanja su pokazala da je netkani tekstilni materijal na bazi vune sekundarnog porekla jeftin i efikasan sorbent za veliki broj organskih boja⁵. Imajući u vidu ovu činjenicu kao i ekološku prihvatljivost netkanog materijala na bazi vune sekundarnog porekla, u ovom radu je ispitana mogućnost njegove primene kao nosača za nanočestice TiO₂. Pored ispitivanja fotokatalitičke efikasnosti nanočestica TiO₂ deponovanih na netkani materijal ispitana je i mogućnost višekratne upotrebe ovog nanokompozitnog tekstilnog materijala za obezbojavanje otpadnih voda.

Materijal i metode

Materijal

Netkani materijal na bazi vune sekundarnog porekla (NM, 78% vuna/ 22% poliestar), proizveden po postupku opisanom u literaturi⁶, korišćen je kao nosač za nanočestice TiO₂ (Degusa P25). Nečistoće sa netkanog materijala su uklonjene acetonom (Lachner, Česka). Fotokatalitička aktivnost nanočestica TiO₂ deponovanih na netkani materijal ispitana je u vodenom rastvoru direktne boje C.I. Direct Blue 78 (DB 78, Bezema). Strukturna formula boje je prikazana na Slici 1.



Slika 1. Strukturna formula boje C.I. Direct Blue 78

NM je modifikovan nanočesticama TiO₂ (NM+TiO₂) prema sledećem postupku: 0,60 g NM je potapano u 24 ml vodenog rastvora nanočestica TiO₂ određene koncentracije u vremenu od 10 min, nakon čega je vršeno ceđenje uzorka na fulardu (2 kg/cm²) i sušenje na sobnoj temperaturi. Osušeni uzorak je termički tretiran na 100 °C u trajanju od 30 min i ispiran dva puta (5 min) u dejonizovanoj vodi.

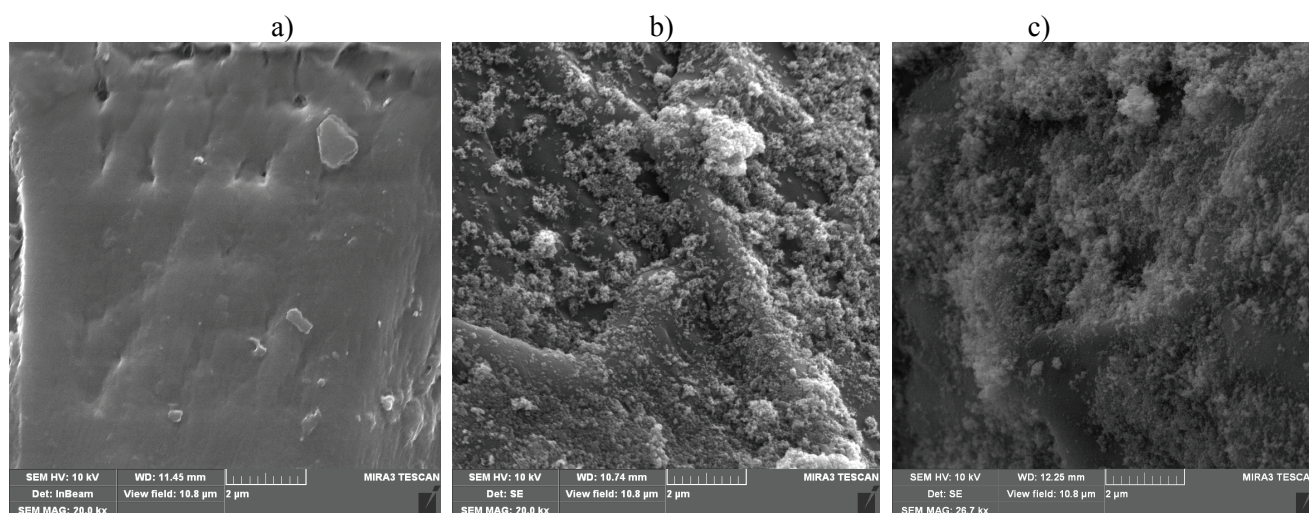
Metode

0,50 g NM ili NM+TiO₂ je stavljano u 20 ml vodenog rastvora boje DB78 početne koncentracije 50 mg/L i preneto u tresilicu. Uzorci su potom osvetljavani lampom (Ultra-Vitalux 300 W, Osram) koja simulira sunčevo zračenje, u vremenu od 24 h. Fotodegradacija boje u rastvoru je praćena merenjem apsorpcije ($\lambda_{\max}=603$ nm) UV/VIS spektrofotometrom (Cary 100 Scan Varian) nakon 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 i 24 h osvetljavanja. Takođe je praćena promena obojenja NM ili NM+TiO₂ uzoraka nakon 24 h osvetljavanja. Vršena su tri ciklusa osvetljavanja. Paralelno je praćena sorpcija boje na NM i NM+TiO₂ uzorcima u mraku.

Skenirajući elektronski mikroskop visoke rezolucije (FESEM, Mira3 XMU Tescan) je korišćen za ispitivanja morfologije površine NM i NM+TiO₂. Ispitivani uzorci su prethodno napareni legurom Au-Pd.

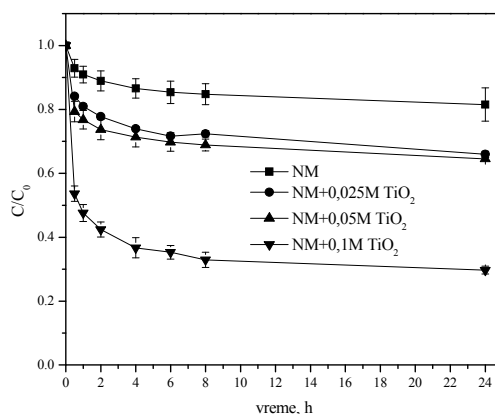
Rezultati i diskusija

U cilju ispitivanja uticaja koncentracije nanočestica TiO₂ na brzinu fotodegradacije i sorpcije boje DB 78, NM je modifikovan 0,025, 0,05 i 0,1 M disperzijama nanočestica TiO₂ (NM+0,025M TiO₂, NM+0,05M TiO₂ i NM+0,1M TiO₂). FESEM mikrofotografije površine NM, NM+0,025M TiO₂ i NM+0,1M TiO₂ vlakana su prikazane na Slici 2. Na Slici 2b i 2c se jasno vide nanočestice TiO₂ koje prekrivaju površinu vlakna. Poređenjem prikazanih mikrofotografija (Slika 2b i 2c) se može zaključiti da je veći broj nanočestica TiO₂ prisutan na uzorku koji je modifikovan disperzijom nanočestica TiO₂ veće koncentracije. Takođe, na NM+0,1M TiO₂ uzorku se uočava prisustvo većeg broja aglomerata nanočestica u odnosu na NM+0,025M TiO₂.



Slika 2. FESEM mikrofotografije: a) NM, b) NM+0,025M TiO₂ i c) NM+0,1M TiO₂ vlakana

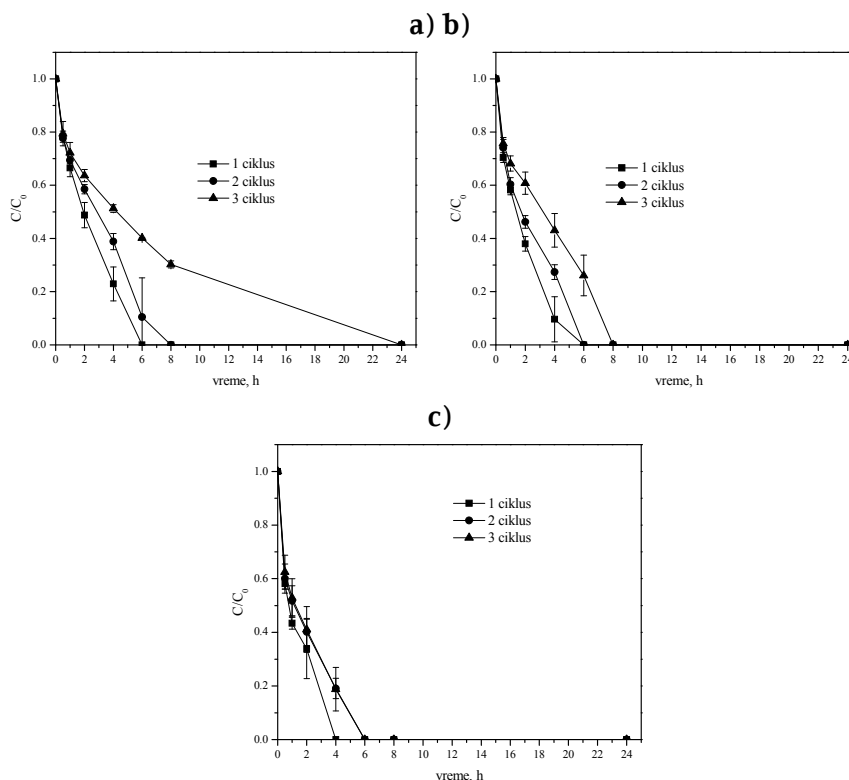
Na Slici 3 prikazana je kinetika sorpcije boje DB 78 na NM i NM+TiO₂ uzorcima. Postojanje četiri sulfonske grupe u molekulu boje (anjonska boja) kao i negativni ζ -potencijal vunenog vlakna utiču na slabu sorpciju boje na NM uzorku (Slika 3)⁵.



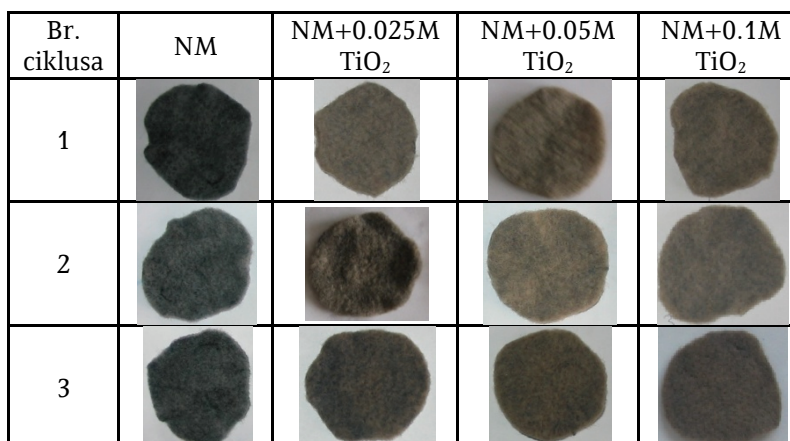
Slika 3. Kinetika sorpcije boje DB 78 na NM i NM+TiO₂ uzorcima

Neznatno bolja sorpcija boje koja je uočena kod NM+TiO₂ uzoraka se pripisuje prisustvu nanočestica TiO₂ na površini vlakana. Na Slici 3 se takođe može zapaziti da NM+0,1M TiO₂ uzorak iz rastvora uklanja za 50% više boje u odnosu na NM+0,025M TiO₂ i NM+0,05M TiO₂ uzorke što je posledica veće količine deponovanih nanočestica TiO₂ na površini vlakna. Veća količina nanočestica TiO₂ na NM+0,1M TiO₂ vlaknima značajno utiče na povećanje reljefnosti površine dok prisustvo vazduha zarobljenog između agregata nanočestica (Slika 2c) čini površinu poroznijom, a time i pristupačnijom za veći broj molekula boje. Pretpostavlja se da je u rastvoru takođe prisutno elektrostatičko privlačenje između negativno naelektrisanih jona boje i pozitivno naelektrisanih nanočestica TiO₂ jer je pH rastvora boje ispod izoelektrične tačke nanočestica TiO₂.

Na Slici 4 prikazana je mogućnost višekratnog korišćenja NM+TiO₂ u cilju obezbojavanja vodenog rastvora DB 78 (50 mg/L). Kao što se može videti sa Slike 4a i 4b NM+0,025M TiO₂ i NM+0,05M TiO₂ uzorci obezbojavaju rastvor DB 78 za 6 h osvetljavanja lampom dok je NM+0,1M TiO₂ uzorku potrebno samo 4 h osvetljavanja (Slika 4c). Bolja fotokatalitička aktivnost NM+0,1M TiO₂ u odnosu na NM+0,025M TiO₂ i NM+0,05M TiO₂ uzorke je posledica veće količine deponovanih nanočestica TiO₂ na površini vlakana. Veći sadržaj nanočestica na uzorku obezbeđuje stvaranje većeg broja reaktivnih vrsta (OH[·], HO₂[·], O₂^{·-}) koje nastaju u sadejstvu nanočestica TiO₂, UV svetlosti i okolnih molekula (H₂O i O₂), i učestvuju u procesu razgradnje molekula boje⁷. Izgled uzoraka nakon prvog ciklusa (Slika 5) ukazuje na činjenicu da se boja osim u rastvoru fotodegradira i na uzorcima što je veoma bitno sa aspekta višekratnog korišćenja NM+TiO₂ u obezbojavanju voda. Na Slici 4a se može uočiti da fotokatalitička aktivnost NM+0,025M TiO₂ uzorka značajno opada tek u trećem ciklusu. Ova pojava je posledica sorpcije boje na uzorku u toku drugog ciklusa što se može videti i po izgledu NM+0,025M TiO₂ uzorka (Slika 5). Molekuli boje koji su se vezali za nanočestice TiO₂ u toku drugog ciklusa ometaju kontakt novih molekula boje i nanočestica što direktno usporava fotodegradaciju boje. Kao što se može videti sa Slika 4b i 4c i Slike 5 kod NM+0,05M TiO₂ i NM+0,1M TiO₂ uzoraka je prisutna potpuna fotodegradacija boje u rastvoru kao i na uzorcima i u drugom ciklusu. Iako se u trećem ciklusu osvetljavanja vodeni rastvor boje obezbojava već nakon 6 h ili 8 h osvetljavanja, kod NM+0,05M TiO₂ i NM+0,1M TiO₂ uzoraka (Slika 4b i 4c) ne dolazi do potpune fotodegradacije boje na uzorku posle 24 h (Slika5).



Slika 4. Fotodegradacija boje DB 78 po ciklusima osvetljavanja: a) NM+0,025M TiO₂, b) NM+0,05M TiO₂ i c) NM+0,1M TiO₂ uzorak



Slika 5. Izgled NM i NM modifikovanog nanočesticama TiO₂ nakon fotodegradacije vodenog rastvora boje DB 78 u vremenu od 24 h

Zaključak

Rezultati prikazani u ovom radu ukazuju da je moguće izvršiti imobilizaciju nanočestica TiO₂ na netkanom materijalu na bazi vune sekundarnog porekla u cilju uklanjanja direktnih boja iz vode. Dokazano je da nezavisno od upotrebene koncentracije rastvora nanočestica TiO₂ za modifikovanje NM, NM+TiO₂ uspešno fotodegradira boju u vodenom rastvoru i nakon tri ciklusa osvetljavanja. NM+0,05M TiO₂ i NM+0,1M TiO₂ uzorci pokazuju zadovoljavajuću sposobnost fotodegradacije boje na uzorku i nakon trećeg ciklusa osvetljavanja. Mogućnost višekratne upotrebe NM+TiO₂ je veoma bitna sa aspekta industrijske primene jer je ekonomski i ekološki opravdana.

Zahvalnica: Zahvaljujemo se Ministarstvu prosvete i nauke Republike Srbije za finansiranje projekta OI-172056 i projekta III-45020.

Recycled wool-based nonwoven material modified with TiO₂ nanoparticles for removal of direct dyes from water

This paper discusses the possibility of immobilization of TiO₂ nanoparticles on the recycled wool-based nonwoven material which can be utilized for removal of direct dyes from water. The photocatalytic activity of TiO₂ nanoparticles deposited on the nonwoven material was examined in the aqueous solution of C.I. Direct Blue 78 under the UV light. The results indicate that nonwoven material modified with TiO₂ nanoparticles provides complete photodegradation of dye already after 4-6 hours of UV illumination. The rate of dye photodegradation depends on the amount of deposited TiO₂ nanoparticles. Photocatalytic activity of nanocomposite textile material was preserved even after three photodegradation cycles. Therefore, this material is appropriate for multiple use.

Literatura

1. I.K. Konstantinou, T.A. Albanis, *Applied Catalysis B. Environmental*, **49** (2004) 1
2. Y.L. Song, J.T. Li, B.Bai, *Water Soil Pollut*, **213** (2010) 311
3. B. Damarđji, H. Khalaf, L. Dudaux, B. David, *Applied Clay Science*, **44** (2009) 201
4. J.S. Im, B.C. Bai, S.J. In, Y.S. Lee, *Journal of Colloid and Interface Science*, **346** (2010) 216
5. M. Radetic, D. Radojevic, V. Ilic, D. Mihailovic, P. Jovancic, *International Journal of Clothing Science and Technology*, **21** (2009) 109
6. M. Radetic, D. Jovic, P. Jovancic, L.J. Rajakovic, H. Thomas, Z.LJ. Petrovic, *Journal of Applied Polymer Science*, **90** (2003) 379
7. J. Saien, A.R. Soleymani, *Journal of Hazardous Materials*, **144** (2007) 506

Ekološki i ekonomski prihvatljiv biosorbent na bazi kratkih vlakana konoplje: Uticaj strukture na parametre procesa sorpcije jona cinka

Biljana M. Pejić, Marija M. Vukčević, Ivana Pajić-Lijaković, Mila D. Laušević, Mirjana M. Kostić

Tehnološko metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Karnegijeva 4, Beograd

1. Uvod

Zagađenje životne sredine, u poslednje vreme predstavlja sve veći problem za zdravlje i život ljudi. Teški metali se mogu izdvojiti kao posebno agresivni zagađivači, jer se kao nedegradabilne supstance akumuliraju u zemljištu i vodi. Na taj način teški metali, preko namirnica biljnog i životinjskog porekla, veoma lako dospevaju u lanac ishrane ljudi i dovode do ozbiljnih zdravstvenih tegoba¹. U tom smeru, istraživači se sve više bave optimizacijom postojećih i iznalaženjem novih metoda i sorbenata za uklanjanje ovih zagađujućih materija iz zemljišta i vode. Uklanjanje teških metala iz vode do sada se uglavnom vršilo komercijalnim metodama i sorbentima, koji su često skupi i ograničeni na određen nivo koncentracija teških metala u vodi. Posebna pažnja, u poslednjih desetak godina, se poklanja postupku biosorpcije, koji podrazumeva korišćenje biodegradabilnih i biokompatibilnih sorbenata na bazi biomase²⁻⁴. Na taj način ovaj postupak biva sve više prihvaćen kako sa ekološkog, tako i sa ekonomskog aspekta. Za uklanjanje jona teških metala iz vode, najčešće se koriste biosorbenti na bazi lignoceluloznih materijala⁵⁻⁷. U ovom radu, kao biosorbent upotrebljena su kratka i zamršena vlakna konoplje (predstavljaju otpad u tekstilnoj industriji), koja su se pokazala kao materijal sa veoma dobrim sorpcionim kapacitetom u odnosu na jone teških metala⁷. U cilju daljeg poboljšanja njihovih sorpcionih svojstava, vlakna konoplje su hemijski modifikovana (17,5 % NaOH i 0,7 % NaClO₂) i ispitan je uticaj postupka modifikovanja na njihovu strukturu i sorpcioni kapacitet u odnosu na jone cinka.

2. Materijal i metode

Materijal. Kao materijal u ovom radu su korišćena kratka i zamršena vlakna konoplje (uzorak C), dobijena iz ITES Odzaci, uzorci oksidisanih vlakna konoplje L5 i L60 (vlakna modifikovana sa 0,7 % NaClO₂, tokom 5 i 60 minuta, na temperaturi ključanja) iz kojih je progresivno uklonjen lignin i alkalno tretirani uzorci H5 i H45 (vlakna modifikovana 17,5 % NaOH, tokom 5 i 45 minuta, na sobnoj temperaturi) iz kojih su progresivno uklonjene hemiceluloze.

Biosorpcija jona Zn²⁺. Biosorpcija jona Zn²⁺ iz rastvora koncentracije 0,1 mmol/dm³, izvršena je prema proceduri prikazanoj u literaturnom izvoru⁷. Promena koncentracije jona u rastvoru određivana je na atomskom apsorpcionom spektrometru (PYE UNICAM SP9, Pye Unicam, Ltd., UK).

Određivanje hemijskog sastava i gubitka mase. Hemijski sastav polaznih i modifikovanih vlakna konoplje određen je prema proceduri predloženoj u literaturnom izvoru⁸, a gubitak mase vlakana nastao tokom hemijskog modifikovanja određen je gravimetrijskom metodom.

Određivanje bakrovog broja i stepena bubrenja. Bakrov broj na polaznim i modifikovanim uzorcima, određen je prema standardu SRPS H.N8.132. Stepen bubrenja ispitivanih uzoraka određen je na osnovu razlike u prečnicima vlakana pre i posle potapanja u vodu. Prečnici su određeni pomoću mikroskopa tipa ERGAVAL (CARL ZEISS-JENA).

Određivanje sadržaja karbonilnih i karboksilnih grupa: Određivanje sadržaja CHO i COOH grupa vršeno je volumetrijskom metodom (kalcijum acetatna metoda⁹).

Određivanje efektivnog koeficijenta difuzije (D_{eff}) i koeficijenta otpora vlakna (β) prolasku jona Zn²⁺. Efektivni koeficijent difuzije i koeficijent otpora koji vlakno pruža prolasku jona Zn²⁺ prilikom sorpcije određeni su na osnovu matematičkog modela baziranog na drugom Fickovom zakonu, Mittag-Leffler-ovoj funkciji¹⁰ i podataka iz literaturnog izvora^{7,11}.

Određivanje specifične površine vlakana. Specifična površina vlakana dobijena je adsorpcijom azota na temperaturi tečnog azota, i izračunata prema BET jednačini. Određivanje specifične površine vršeno je na opremi tipa MICROMERITICS ASAP 2020, Surface and Porosity Analyzer.

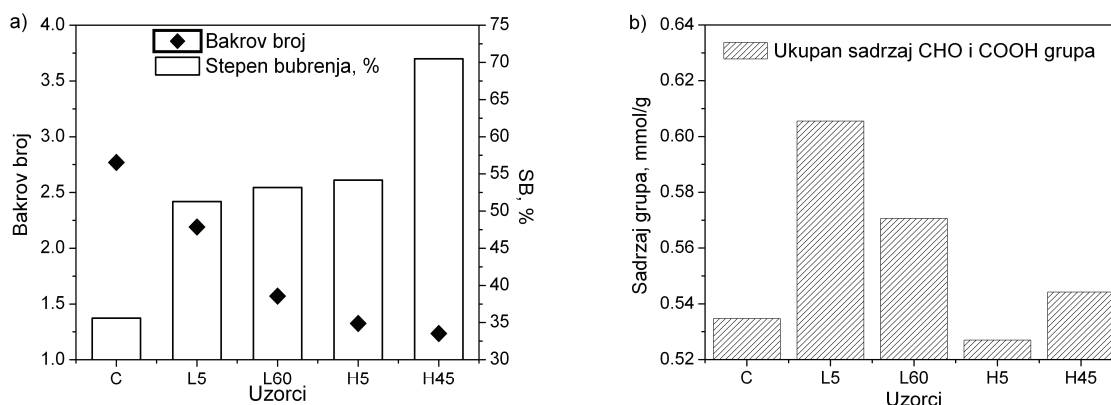
3. Rezultati i diskusija

Tokom postupka modifikovanja vlakana konoplje, došlo je do promene u njihovom hemijskom sastavu i do određenog gubitka mase kao posledice agresivnosti hemijskog tretmana i progresivnog uklanjanja hemiceluloza i lignina. Vrednosti za gubitak mase i sadržaj hemiceluloza i lignina prikazani su u tabeli 1.

Tabela 1. Gubitak mase i sadržaj hemiceluloza i lignina u polaznim i modifikovanim vlaknima konoplje

Uzorak	Sadržaj hemiceluloza, %	Sadržaj lignina, %	Gubitak mase, %
C	10,72	6,06	-
L5	8,89	4,09	4,16
L60	8,99	3,09	6,17
H5	4,69	5,66	8,15
H45	3,59	5,41	9,90

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 1 može se zaključiti da se prilikom progresivnog uklanjanja lignina u uzorcima L5 i L60 javlja manji gubitak mase, u odnosu na vlakna konoplje obrađena alkalnim tretmanom (uzorci H5 i H45) u cilju progresivnog uklanjanja hemiceluloza. Ovo upućuje na zaključak da je postupak obrade vlakana 0,7 % NaClO₂ manje agresivan, u poređenju sa alkalnim tretmanom. Promene u strukturi vlakana, nastale tokom njihovog modifikovanja okarakterisane su bakrovim brojem, stepenom bubrenja i sadržajem karbonilnih i karboksilnih grupa kao aktivnih mesta za vezivanje jona teških metala (slika 1).

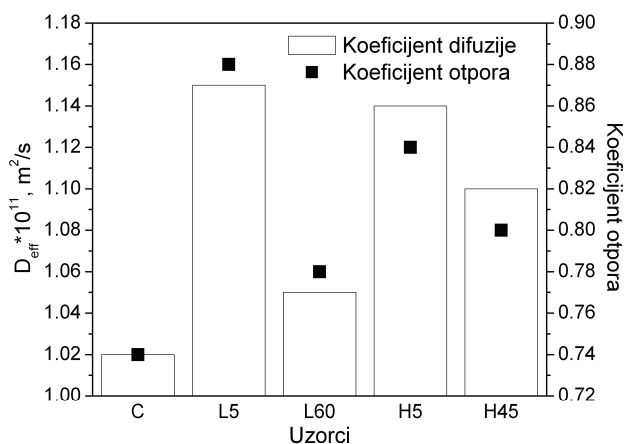


Slika 1. Bakrov broj i stepen bubrenja (1a) i ukupan sadržaj grupa (1b) u ispitivanim uzorcima

Sa slike 1a, može se primetiti da uzorci L5 i L60 pokazuju veće vrednosti za bakrov broj u odnosu na uzorke H5 i H45, što bi moglo upućivati na zaključak da je u ovim uzorcima došlo do većeg stepena oksidativne destrukcije makromolekula celuloze. Međutim, treba imati u vidu da je u tim uzorcima zaostala i veća količina hemiceluloza (niskomolekulskih frakcija celuloze) koje su takođe mogle za sebe vezivati bakar i na taj način maskirati vrednosti za bakrov broj. Ovo bi se moglo vezati i za vrednosti ukupnog broja grupa koje su prikazane na slici 1b, gde se vidi da upravo uzorci L5 i L60 imaju najveći broj CHO i COOH grupa. Sa druge strane stepen bubrenja, pokazuje suprotan trend, što se može objasniti uklanjanjem veće količine hemiceluloza iz interfibrilarnih oblasti vlakana konoplje (H5 i H45), čime one postaju manje guste i daleko sposobnije da u sebe prime veću količinu molekula vode.

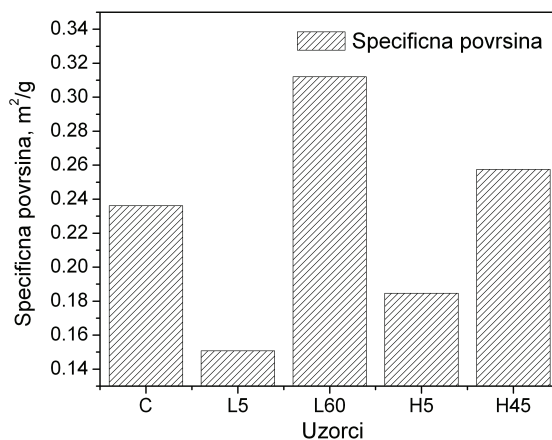
Navedene promene u strukturi kao i vrsti i količini funkcionalnih grupa, nastale hemijskom modifikacijom vlakana, imaju značajan uticaj na proces sorpcije jona Zn²⁺. Naime, u okviru prethodnih istraživanja⁷ pokazalo se da uzorak L5 ima najveću efikasnost sorpcije jona Zn²⁺ i najveći sorpcioni kapacitet u odnosu na ove jone (C-0,034 mmol/g; L5-0,039 mmol/g; L60-0,036 mmol/g; H5-0,038 mmol/g i H45-0,037 mmol/g). Ovo se može objasniti vrednostima efektivnog koeficijenta difuzije i koeficijenta otpora (β) koji vlakno pruža prolasku jona Zn²⁺ prilikom njihove sorpcije iz vodenih rastvora. Pri tome, mora se imati na umu da su obe pomenute veličine u direktnoj zavisnosti sa strukturom ispitivanih uzoraka. Na slici 2, može se primetiti da uzorak L5 oksidisanih vlakana konoplje

pokazuje najveće vrednosti i za efektivni koeficijent difuzije Zn^{2+} jona i za koeficijent otpora (β). Najveće vrednosti efektivnog koeficijenta difuzije upućuju na najlakšu i najbržu penetraciju Zn^{2+} jona u strukturu vlakana, a najveće vrednosti koeficijenta β na najmanji otpor koji vlakno pruža prilikom sorpcije ovih jona.



Slika 2. Vrednosti efektivnog koeficijenta difuzije i koeficijenta otpora koje vlakno pruža penetraciji jona Zn^{2+} za sve ispitivane uzorke vlakana konoplje

Razlog za najviše vrednosti D_{eff} i β za uzorak L5 i pored toga što uzorci vlakana konoplje H5 i H45 usled uklanjanja hemiceluloza imaju veći broj interfibrilarnih oblasti koje bi u sebe lakše i brže mogle primiti Zn^{2+} jone, mogao bi se tražiti u vrednostima njihove specifične površine (slika 3.) i obliku pora i pukotina na njihovoj površini. Naime, prilikom uklanjanja lignina tokom oksidisanja vlakana konoplje verovatno je došlo do značajnijih promena na površini vlakana, usled uklanjanja lignina iz srednje lamele. Na taj način došlo je do uklanjanja postojećih pora, ali i do stvaranja novih mikropukotina na njihovoj površini. Sve ovo je uticalo i na povećanje hrapavosti površine vlakana, što je uslovalo, kako hemijsku, tako i fizičku sorpciju jona Zn^{2+} koja se ogleda u deponovanju jona u mikroporama i mikropukotinama vlakna. Na taj način se može zaključiti, da je u uzorku vlakana konoplje L5 došlo do hemijskog vezivanja velikog broja jona za dostupne funkcionalne grupe (vlakno sa najvećom količinom grupa), ali i do deponovanja jona u porama i pukotinama na njihovoj površini. Sa druge strane, najniže vrednosti koeficijenta difuzije i najveći otpor prolasku jona cinka kroz vlakno, pokazuje uzorak L60. Ovo upućuje na činjenicu da je dužina trajanja postupka oksidacije, uticala na dimenzije novoformiranih pora i pukotina na površini vlakana, čime su one verovatno postale dublje, duže i krivudavije, pa je time bio i otežan prolazak jona kroz njih. Ovoj pretpostavci doprinose i vrednosti specifične površine ispitivanih uzoraka, koje su prikazane na slici 3.



Slika 3. Specifična površina ispitivanih uzoraka vlakana konoplje

Na osnovu rezultata sa slike 3, može se pretpostaviti da najveće vrednosti specifične površine uzorka L60, upravo potiču od novoformiranih pora i pukotina u strukturi vlakna i njihove geometrijske dužine. Međutim, moglo bi se pretpostaviti da specifična površina uzorka L5 i pored toga što je najmanja, potiče od pora i pukotina čija je geometrijska dužina manja, ali je zato efektivnija za fizičko deponovanje jona

Zn²⁺. Veće vrednosti specifične površine uzoraka H5 i H45, verovatno potiču od većeg broja interfibrilarnih obalasti u strukturi vlakna, čija se veličina povećava sa dužinom trajanja alkalnog tretmana i povećanjem uklonjene količine hemiceluloza. Kako specifične površine svih ispitivanih vlakana imaju veoma male vrednosti može se reći da na proces sorpcije jona cinka daleko veći uticaj imaju strukturne promene, sadržaj hemiceluloze i lignina a samim tim i količina funkcionalnih grupa.

4. Zaključak

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da hemijsko modifikovanje vlakana konoplje direktno utiče na sadržaj hemiceluloza i lignina u njima, a samim tim i na njihova svojstva, obzirom na različit položaj ovih komponenata u strukturi vlakana. Pokazano je da uklanjanjem različitih količina hemiceluloza iz interfibrilarnih oblasti vlakana i lignina iz srednje lamele dolazi do strukturnih promena koje direktno utiču na sorpciona svojstva vlakna, što je posledica promene u sadržaju funkcionalnih grupa i njihovoj specifičnoj površini. Sve ove promene, direktno su povezane i sa efektivnim koeficijentom difuzije, koeficijentom otpora koji vlakna pružaju prolasku jona Zn²⁺ kroz njihovu strukturu i kapacitetom sorpcije vlakana konoplje u odnosu na jone Zn²⁺. Rezultati ovog rada predstavljaju bazu za dalja istraživanja, čiji rezultati mogu poslužiti za projektovanje i konačnu proizvodnju filtera za prečišćavanje otpadnih voda od jona teških metala.

Zahvalnica: Autori se zahvaljuju Ministarstvu prosvete i nauke Republike Srbije na finansijskoj podršci. Ovaj rad predstavlja deo ispitivanja na projektima Osnovnih istraživanja iz oblasti hemije, broj 172029 i 172007.

Environmentally and economically acceptable biosorbent based on short hemp fibers: Influence of fibers structure parameters on the sorption process of zinc ions

The discharge of toxic heavy metals into the environment is a serious pollution problem that affects water and soil quality, hence presenting a direct danger to human health. Recently, lignocellulosic materials as biosorbents are often used for wastewater treatment. In this paper, we have used unmodified and chemically modified (NaClO₂ 0.7% and 17.5% NaOH) short hemp fibers for wastewater treatment of zinc ions. The tested samples were characterized by determination of: chemical composition, degree of swelling, copper number, specific surface, the effective diffusion coefficient of zinc ions and dumping coefficient. It is shown that chemically modified hemp fiber samples have better sorption properties and sorption capacity of zinc ions (especially sample L5), compared to the unmodified sample. The results of this paper are the basis for further research, which results can be used for designing and production of filter for wastewater treatment of heavy metal ions.

Literatura

1. N.A. Adesola Babarinde, O.O. Oyesiku, J. Oyebamiji Babalola, J.O. Olatunji, *J. Appl. Sci. Res.* **4** (2008) 716-721.
2. J.C.Igwe, A. A. Abia, *Afr. J. Biotechnol.*, **5** (2006) 1167-1179.
3. W.S. Wan Ngah, M.A.K.M. Hanafiah, *J. Environ. Sci.*, **20** (2008) 1168–1176.
4. S.E. Bailey, T.J. Olin, R.M. Bricka, D.D. Adrian, A review of potentially low-cost sorbents for heavy metals, *Water Res.* **33** (1999) 2469-2479.
5. B. Volesky, Biosorption and me, *Water Res.* **41** (2007) 4017-4029.
6. A. Demirbas, Heavy metal adsorption onto agro-based waste materials: A review, *J. Hazard. Mater.* **157** (2008) 220-229.
7. B. Pejic, M. Vukcevic, M. Kostic, P. Skundric, *J. Hazard. Mater.* **164** (2009) 146-153.
8. W. Garner, *Textile Laboratory Manuel*. Fibres, vol. 5. Heywood Books, London, 1967, pp.52–113.
9. J. Praskalo, M. Kostic, A. Potthast, G. Popov, B. Pejic, P. Skundric, *Carbohydr. Polym.* **77** (2009) 791-798.
10. I. Podlubny (1999) Fractional Differential Equations, Mathematics in Science and Engineering, vol. 198 Academic Press, San Diego, 1999, (ISBN 0-12 558840-2).
11. B. Pejic, M. Vukcevic, I. Pajic-Lijakovic, M. Lausevic, M. Kostic, P. Skundric, *Chem. Eng. J.* **172** (2011) 354-360.

Index Autora / Author Index

A

Adamov, J.....	252
Adamović, D.....	116
Adamović, S.....	116
Andric, D.....	236
Andrić, N.....	112
Andrić, V.....	75
Antić, N.....	137
Antić, V.....	227
Antonović, A.....	141
Antonović, D.....	102, 132
Arsenijević, Z.....	46, 51, 56, 70

B

Babić, B.....	16
Babović, N.....	124
Bajić, D.....	36
Barik, A.....	161
Bartula, M.....	124
Bezbradica, D.....	186
Bhojya Naik, H.....	161
Bjelajac, A.....	99
Blagojević, M.....	248
Blažić, M.....	169, 173
Bošković-Vragolović, N.....	70
Bugarski, B.....	186, 222
Buntić, A.....	132
Bursić, V.....	12

C

Čavić, M.....	157
Chandrashekar, B.....	20
Čoporda-Mastilović, T.....	124
Cvijetić, I.....	232

D

Daniels, R.....	80
Davidović, S.....	181
Dimitrijević-Branković, S.....	132, 181
Djordjević, B.....	41
Đonlagić, J.....	212, 222, 227
Đorđević, J.....	128
Draganić, B.....	173
Drakulić, B.....	146, 232
Drašković, L.....	65
Dunjić, B.....	212

Đuran, M.....	2
Đurić, Z.....	25
Đuriš, J.....	25
Đuriš, M.....	51, 56, 70
Džunuzović, E.....	218
Džunuzović, J.....	218

F

Fischer, R.....	169, 173
-----------------	----------

G

Garić-Grulović, R.....	51, 56, 70
Gavrović-Jankulović, M.....	157, 169, 173
Glišić, B.....	2
Gluić, A.....	186
Grbavčić, Ž.....	46, 51, 56, 70
Grozdanić, D.....	36
Grozdanić, N.....	61
Grozdanović, M.....	157
Grubišić, M.....	177
Grujić, S.....	91, 99, 137, 222
Gusković, D.....	95

H

Honigmann, A.....	150
-------------------	-----

I

Ibrić, S.....	25, 30
Ivaniš, G.....	61

J

Jaćimovski, D.....	56, 70
Jakovetić, S.....	203
Janković, R.....	157
Jokić, B.....	275
Jovančić, P.....	222, 275
Jovanović, S.....	218
Juranić, I.....	146, 232

K

Kačarević-Popović, Z.....	86
Kachrimanis, K.....	25
Kalagasidis-Krušić, M.....	86
Kalijadis, A.....	16
Kaluđerović Radoičić, T.....	46, 51
Kijevčanin, M.....	36, 41, 46, 61, 65

Kiurski, J.....	116
Klašnja, M.....	208
Knežević Stevanović, A.....	36
Knežević-Jugović, Z.....	186, 195, 203
Korica, M.....	270
Korolija, J.....	243
Kostić, M.....	261, 266, 270, 279
Kostic-Rajacic, S.....	236
Kovačević, G.....	169, 173
Kramar, A.....	270
Krstić, J.....	86, 116
Kukić, D.....	208
Kumara Swamy, B.....	20

L

Laušević, M.....	16, 137, 279
Laušević, Z.....	16
Lazić, S.....	12
Likić, V.....	212
Lopičić, Z.....	177
Lukić, M.....	80

M

Manojlović, V.....	186
Manzanera, M.....	203
Marković, D.....	95, 112, 124
Marković, DD.....	275
Marković, I.....	95
Marković, M.....	120
Marković, S.....	222
Matijašević I.....	248
Matijašević, I.....	243
Matijašević, S.....	91, 99
Medović Baralić, A.....	261
Mihajlović, I.....	75
Mihajlović, M.....	177
Mihajlovski, K.....	132
Miladinović, R.....	203
Milanović, J.....	266, 270
Milanović, P.....	266
Miljković, M.....	181
Milojković, J.....	177
Milovanovic, M.....	150
Milović, M.....	30
Miškov, S.....	36
Mitovski, A.....	75
Momić, J.....	107
Munčan, M.....	46

N

Nešić, A.....	102
Nestorov, J.....	227
Nestorović, S.....	95
Nikolakakis, I.....	25
Nikolić, J.....	91, 99
Nikolić, V.....	141

O

Olić, S.....	252
Oros, I.....	116
Ostafe, R.....	169, 173
Ostojić, S.....	218

P

Pajić-Lijaković, I.....	279
Panić, V.....	107
Pantelić, I.....	80
Pavlović, M.....	132
Pejić, B.....	279
Pergal, M.....	218, 227
Petrović, M.....	177
Petrušić, S.....	222
Picazo-Espinosa, R.....	203
Popović, A.....	141
Poręba, R.....	218
Potthast, A.....	266
Pradeepa, S.....	161
Priyadarsini, I.....	161
Prodanović, J.....	208
Prodanović, O.....	191, 195, 199
Prodanović, R.....	169, 173, 191, 195, 199, 203
Prokopijević, M.....	191, 195, 199

R

Radetić, M.....	275
Radić, M.....	165
Radišić, M.....	137
Radosavljević, A.....	86
Radotić, K.....	191, 195, 199
Radović, I.....	65
Radulović, D.....	177
Rajić, N.....	132, 212
Randelović, M.....	132
Rihlevska, U.....	2
Rogan, J.....	212
Roglic, G.....	236

S

Šaponjić, Z.....	275
Savić, S.....	80
Schiehser, S.....	266
Šćiban, M.....	208
Segedinac, M.....	252
Šerbanović, S.....	41, 61
Šiler-Marinković, S.....	132, 181
Škundrić, P.....	261
Sokić, M.....	75
Soskić, V.....	236
Spasojević, D.....	191, 195, 199
Spasojević, J.....	86
Spasojević, V.....	41
Špirkova, M.....	218
Špirović, B.....	12

Sretković, Lj.....	261
Stefanović, A.....	186
Stojanović, J.....	91
Stojanović, M.....	177
Stojanović, Ž.....	191, 195, 203
Štrbac, N.....	75
Sukalovic, V.....	236
Sunarić, S.....	165

T

Tasić, A.....	65
Tomić, M.....	212
Tošić, M.....	91, 99
Tovilović, G.....	227
Trtić-Petrović, T.....	8, 128

V

van den Bogaart, G.....	150
-------------------------	-----

Vasić, M.....	256
Vasić, V.....	208
Vasiljević, T.....	137
Veličković, S.....	102, 107, 141
Verbić, T.....	232
Veselinović, D.....	120
Višak, Z.....	61
Vukčević, M.....	16, 279
Vuković, G.....	12
Vuksanović, J.....	65
Vuleta, G.....	80

Z

Ždrale, S.....	91, 99
Zelenović, N.....	169
Zildžović, S.....	99
Živanović, V.....	91, 99
Žuža, M.....	186