

Djelovanje antioksidansa na taloženje kalcijeva karbonata

Vidas, Bernarda

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:240915>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-22**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Odjel za kemiju
Sveučilišni diplomski studij Kemija; istraživački smjer

Bernarda Vidas

**DJELOVANJE ANTIOKSIDANSA NA
TALOŽENJE KALCIJEVA KARBONATA**

Diplomski rad

Osijek, 2024.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Odjel za kemiju
Sveučilišni diplomski studij Kemija; istraživački smjer

Bernarda Vidas

DJELOVANJE ANTIOKSIDANSA NA TALOŽENJE KALCIJEVA KARBONATA

Diplomski rad

Mentor: doc. dr. sc. Anamarija Stanković

Komentor: dr. sc. Branka Njegić Džakula, v. zn. sur.

Neposredni voditelj: Dominik Goman, mag. chem.

Osijek, 2024.

Naziv sveučilišta: **Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Odjel za kemiju**

Naziv studija: **Sveučilišni diplomski studij Kemija; istraživački smjer**

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Znanstvena grana: Anorganska kemija

DJELOVANJE ANTIOKSIDANSA NA TALOŽENJE KALCIJEVA KARBONATA

Bernarda Vidas

Rad je izrađen na: Sveučilištu u Osijeku – Odjel za kemiju

Mentor: doc. dr. sc. Anamarija Stanković

Komentor: dr.sc. Branka Njegić Džakula, v. zn. sur.

Neposredni voditelj: mag. chem. Dominik Goman

Sažetak: U radu je istraženo djelovanje antioksidansa protokatehuinske kiseline, PCA (engl. *protocatechuic acid*), na spontano taloženje kalcijeva karbonata u sustavu početnih vrijednosti: koncentracija kalcija i karbonata $2,5 \text{ mmol dm}^{-3}$, temperatura $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ i $\text{pH} = 10,419$. Proces taloženja praćen je potenciometrijski, a dobiveni talozi su karakterizirani svjetlosnom mikroskopijom, infracrvenom spektroskopijom te rendgenskom difrakcijom. Dodatak PCA u taložni sustav kalcijeva karbonata uzrokovao je: inhibiciju spontanog taloženja kalcijeva karbonata, promjenu morfologije istaloženog kalcita te promjenu sastava taloga pri čemu se maseni udio kalcita u talogu povećavao s povećanjem koncentracije dodane PCA.

Ključne riječi: *kalcijev karbonat, spontano taloženje, inhibicija, antioksidans, protokatehuinska kiselina.*

Jezik izvornika: hrvatski jezik

Diplomski rad obuhvaća: 30 stranica, 8 slika, 2 tablice, 45 literaturnih navoda.

Rad je prihvaćen: 16. rujna 2024. godine

Stručno povjerenstvo za ocjenu:

1. izv. prof. dr. sc. Martina Medvidović – Kosanović, predsjednica
2. doc. dr. sc. Ana Amić, članica
3. doc. dr. sc. Anamarija Stanković, mentorica i članica
4. izv. prof. dr. sc. Tomislav Balić, zamjena člana

Rad je pohranjen: Knjižnica Odjela za kemiju, Kuhačeva 20, 31000 Osijek
Repozitorij Odjela za kemiju, Osijek

University Name: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek – Department of Chemistry**

Name of study programme: **University graduate study programme in Chemistry; research program**

Scientific area: Natural sciences

Scientific field: Chemistry

Scientific branch: Inorganic chemistry

THE EFFECT OF ANTIOXIDANTS ON CALCIUM CARBONATE PRECIPITATION

Bernarda Vidas

The paper was created on: Department of Chemistry

Supervisor: Assist. Prof. Anamarija Stanković

Co-mentor: Branka Njegić Džakula, PhD

Assistant supervisor: mag. chem. Dominik Goman, assistant

Abstract: The effect of the antioxidant protocatechuic acid (PCA) on the spontaneous precipitation of calcium carbonate was investigated in the system with initial values: concentration of calcium and carbonate ions 5 mmol dm^{-3} , temperature $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and pH 10.419. The progress of the precipitation process was followed potentiometrically and the precipitates were characterized by light microscopy, infrared spectroscopy and x-ray diffraction. The addition of PCA to the calcium carbonate precipitation system caused: inhibition of the spontaneous precipitation of calcium carbonate, a change in the morphology of the precipitated calcite, and an alteration in the composition of the precipitate. Specifically, the mass fraction of calcite in the precipitate increased with the increase of concentration of added PCA.

Keywords: *calcium carbonate, spontaneous precipitation, inhibition, antioxidant, protocatechuic acid.*

Original language: Croatian language

Thesis includes: 30 pages, 8 figures, 2 tables, 45 references

Thesis accepted: September 16, 2024

Reviewers:

1. Assoc. Prof. Martina Medvidović – Kosanović, PhD, chair
2. Assist. Prof. Ana Amić, PhD, member
3. Assist. Prof. Anamarija Stanković, PhD, supervisor and member
4. Assoc. Prof. Tomislav Balić, PhD, substitute member

Thesis deposited in: Library of the Department of Chemistry, Ulica Franje Kuhača 20, Osijek
Repository of the Department of Chemistry, Osijek

Zahvale

Zahvaljujem se mentorici, doc. dr. sc. Anamariji Stanković, komentorici dr. sc. Branka Njegić Džakula te neposrednom voditelju. Dominiku Gomanu na trudu, pomoći te motivaciji tijekom izrade rada.

Posebno hvala mojoj obitelji i rodbini na podršci, ljubavi i vjerovanju tijekom studiranja.

Hvala i mojim najdražim PUPA-ma i prijateljima s fakulteta što su mi uljepšali i olakšali studentske dane.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Procesi taloženja.....	2
2.1.1. Nukleacija.....	3
2.1.2. Rast kristala	4
2.1.3. Otapanje.....	5
2.1.4. Starenje kristala	5
2.1.5. Učinak nečistoća.....	5
2.2. Biomineralizacija.....	6
2.3. Kalcijev karbonat	7
2.3.1. Modifikacije kalcijeva karbonata	9
2.4. Antioksidansi.....	10
2.4.1. Protokatehuinska kiselina.....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. Materijali	12
3.2. Eksperimentalni postupci	12
3.2.1. Priprema standardnih otopina.....	12
3.2.2. Priprema reaktantnih otopina Na_2CO_3 i CaCl_2 za spontano taloženje CaCO_3 uz dodatak protokatehuinske kiseline	13
3.2.3. Postupak izvedbe eksperimenta spontanog taloženja CaCO_3 uz dodatak protokatehuinske kiseline	13
3.3. Eksperimentalne tehnike	14
3.3.1. Potencimetrija.....	15
3.3.2. Svjetlosna mikroskopija	15
3.3.3. Infracrvena spektroskopija	16
3.3.4. Rendgenska difrakcija na prahu	17
4. REZULTATI I RASPRAVA	18
4.1. Kinetika spontanog taloženja CaCO_3 uz dodatak protokatehuinske kiseline.....	18
4.2. Promjena faznog sastava spontano istaloženog CaCO_3 uslijed djelovanja protokatehuinske kiseline	21
4.3. Promjena morfologije spontano istaloženog CaCO_3 uz dodatak protokatehuinske kiseline.....	23
5. ZAKLJUČAK	26
6. POPIS LITERATURE	27

1. UVOD

Kalcijev karbonat (CaCO_3) je jedan od najrasprostranjenijih minerala u morskom okolišu. U morskim organizmima nastaje procesima biomineralizacije (proces formiranja biominerala u biološkim sustavima) te se stoga i naziva biogeni kalcijev karbonat [1]. Morski organizmi ga primarno koriste za izgradnju svojih čvrstih tkiva (skelet koralja, školjka školjkaša, bodlje morskog ježinca...). Biomineralizacija je visoko kontrolirani proces čiju fizikalno-kemijsku osnovu čine procesi taloženja (formiranje nove faze iz homogenog sustava). Stoga je očita važnost razumijevanja procesa taloženja prilikom formiranja biominerala kalcijeva karbonata [2].

Prezasićenost otopine pokretačka je sila procesa taloženja te se izdvaja kao jedan od bitnijih čimbenika, no važni su i drugi čimbenici poput temperature, pH, ionske jakosti, koncentracija konstituirajućih iona i otopljenog ugljikova dioksida kao i prisutnost aditiva primjerice antioksidansa [2,3]. U morskom okolišu potencijalno se mogu pronaći antioksidansi kao rezultat adaptacije morskih organizama na promjene u njihovom okruženju. Stoga se postavlja pitanje o mogućoj interakciji između kalcijeva karbonata i antioksidansa [2,3].

Cilj ovog diplomskog rada je proučiti djelovanje antioksidansa protocatehuinske kiseline, PCA (engl. *protocatechuic acid*), na spontano taloženje kalcijeva karbonata, tj. način na koji utječe na kinetiku spontanog taloženja, mineraloški sastav te morfologiju nastalog CaCO_3 .

Istraživalo se napredovanje spontanog taloženja potencijometrijski (mjenjem pH otopine u ovisnosti o vremenu) te su svojstva nastalih taloga, kao što su morfologija i mineraloški sastav, bila određena svjetlosnom mikroskopijom, infracrvenom spektroskopijom i rendgenskom difrakcijom. PCA se koristila kao modelna molekula za polifenolne molekule koje su poznati antioksidansi.

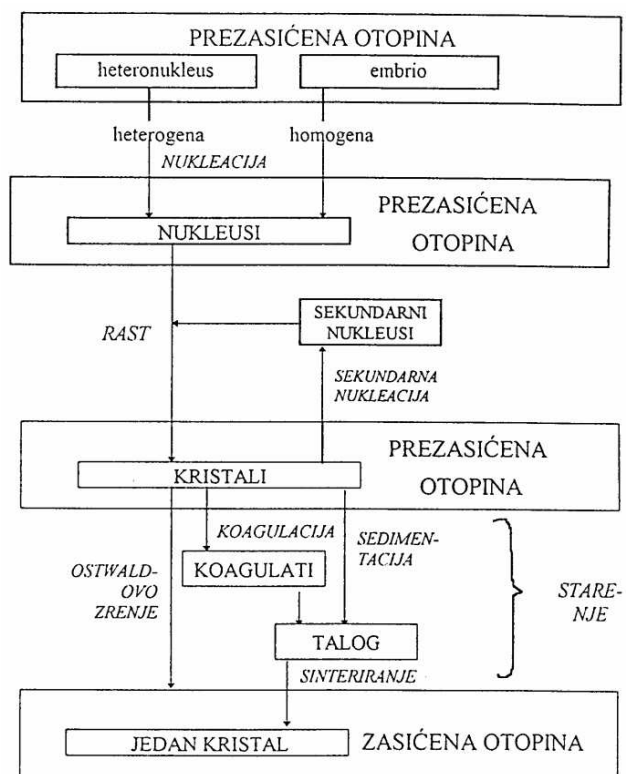
Hipoteza je da će dodatak antioksidansa PCA u taložni sustav kalcijeva karbonata uzrokovati promjene u kinetici spontanog taloženja CaCO_3 , preferencijalno taloženje jednog od polimorfa kalcijeva karbonata te promjenu morfologije spontano istaloženog kalcijeva karbonata.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Procesi taloženja

Taloženje je pojam koji obuhvaća procese nastajanja nove faze iz nekog homogenog sustava [2,3]. U užem smislu taloženje podrazumijeva stvaranje nove, čvrste faze koja se izdvaja iz vodenih elektrolitnih otopina. Taloženje pri kojem nastaje čvrsta faza kristalne strukture nazivamo kristalizacijom. Ti procesi ovise o nizu čimbenika kao što su prezasićenost otopine, koncentracija reaktanata, temperatura, pH. Taloženje pri kojem nastaje čvrsta faza kristalne strukture nazivamo kristalizacijom [2,3].

Proces taloženja sastoji se od nekoliko međufaza čiji se slijed može prikazati Nielsenovom shemom procesa taloženja (**slika 1.**).



Slika 1. Nielsenova shema procesa taloženja [4]

Glavni preduvjet koji mora biti zadovoljen da dođe do procesa taloženja je formiranje prezasićene otopine.

Prezasićenost otopine najčešće je definirana kao:

- 1) Stupanj zasićenosti: $S = \left(\frac{\pi}{K_s}\right)^{\frac{1}{v}}, v \equiv \alpha + \beta$ ili $\frac{c}{c_s}$
- 2) Apsolutna prezasićenost: $c - c_s$
- 3) Relativna prezasićenost: $\frac{(c-c_s)}{c_s} \equiv S - 1$

gdje je π produkt aktiviteta konstitucijskih iona, K_s produkt topljivosti, α i β su stehiometrijski koeficijenti, c koncentracija, a c_s topljivost (ravnotežna koncentracija) [2].

Ukoliko definiramo prezasićenost preko stupnja zasićenosti, stabilnost otopine s obzirom na mogućnost izdvajanja čvrste faze iz takve otopine iskazana je na slijedeći način:

- Za $S < 1$ (podzasićena – taloženje čvrste faze iz takve otopine nije moguće, a postojeći kristali će se u dodiru s otopinom otapati).
- Za $S = 1$ (zasićena – ravnotežni sustav) otopina je stabilna
- Za $S > 1$ (prezasićena) otopina nestabilna te jedino u ovom slučaju taloženje može započeti.

Taloženje započinje nukleacijom iz prezasićene otopine koja se može događati na česticama nečistoća ili formiranjem embrija i nastavlja se rastom stvorenih nukleusa i formiranjem i rastom kristala, a završava starenjem čvrste faze. Teoretski gledano starenje taloga rezultira stvaranjem jednog kristala u ravnoteži s otopinom, no ako pratimo taloženje u nekom konačnom vremenu, sedimentacija je posljednja faza procesa taloženja [2].

2.1.1. Nukleacija

Nukleacija je početni proces koji se događa u formiranju čvrste faze iz homogene otopine [2,3]. Da bi došlo do stvaranja nukleusa trebaju biti zadovoljena 2 uvjeta. Prvi uvjet je uspostavljanje odgovarajuće prezasićenosti. Naime, da bi se osigurala energija za svladavanje energetske barijere povezane s površinskom energijom formiranja nukleusa, potrebno je postići dovoljno prezasićenu otopinu. Drugi uvjet je postojanje indukcijskog perioda. Vremenski period, od uspostavljanja prezasićene otopine do prve uočljive promjene u sustavu, povezane s formiranjem kristala, naziva se indukcijski period. Period može biti kratak, ali i trajati nekoliko godina ovisno o tome koliko su povoljni uvjeti za nastanak nukleusa [2,3].

Nukleacija može biti homogena i heterogena [3]. Homogena nukleacija započinje kada se postigne kritična prezasićenost. Pri tom uslijed sudaranja iona i molekula dolazi do stvaranja

kritičnog nukleusa (asocijata ili embrija). S druge strane heterogena nukleacija nastaje u otopinama s nižim prezasićenostima. Događa se na česticama nečistoća. Sam mehanizam heterogene nukleacije nije u potpunosti razjašnjen, ali se pretpostavlja da se na česticama nečistoća adsorbiraju molekule ili ioni taložne faze stvarajući plohu veću od plohe kritičnog nukleusa. Heterogena nukleacija je češća, ali homogeni mehanizam postaje vjerojatniji kako se povećava prezasićenosti sustava. Iako pri prezasićenostima višim od kritične dominantna je homogena nukleacija, jedan dio nukleusa nastaje i heterogenom nukleacijom obzirom da u realnim sustavima uvijek postoje određene nečistoća [5].

2.1.2. Rast kristala

Nakon nukleacije proces taloženja se nastavlja rastom stvorenih nukleusa i nastajanjem kristala pri čemu dolazi do izdvajanja većeg dijela čvrste faze [2]. Brzinu rasta kristala moguće je izraziti kao:

- Količinu izlučene tvari podijeljene s površinom kristala po vremenu, $dn/(dt A_s)$
- Pomak jedne plohe rastućeg kristala u smjeru normale u vremenu, dl/dt
- Promjenu radijusa kugle volumena jednakog volumenu kristala u vremenu, dr/dt (takozvana brzina linearnog rasta).

Rast kristala je rezultat niza procesa koji se odvijaju u otopini ili na površini rastućeg kristala, a slijede nakon nukleacije [2,3]. Dva su tipa procesa:

- procesi u otopini koji uključuju miješanje reakcijskih komponenata te transport materijala difuzijom ili konvekcijom do površine kristala.
- procesi na površini koji uključuju adsorpciju molekula / iona na površinu, njihovu migraciju po površini, dehidrataciju, stvaranje površinskih nukleusa i ugradnju u aktivna mjesta kristalne rešetke.

Procesi u otopini prethode procesima na površini rastućeg kristala te najsporiji od ovih procesa ujedno određuje ukupnu brzinu rasta kristala i mehanizam rasta kristala. Na ovome se i zasniva jedna od podjela mehanizama rasta kristala prema kojoj rast može biti kontroliran transportom materijala u otopini ili procesima na površini kristala [2].

2.1.3. Otapanje

Osnovni mehanizmi rasta i otapanja kristala u elektrolitnim otopinama su u principu isti procesi koji se zbivaju u suprotnim smjerovima [2,3]. Stoga je moguće otapanje kristala definirati kao taloženje pri prezasićenostima $S < 1$. Razlika između procesa rasta i otapanja kristala je ta da za vrijeme otapanja kristala njegove građevne jedinice su lako dostupne otapalu i nema potrebe za procesima ekvivalentnim nukleaciji ili spiralnom rastu plohe. Za razliku od rasta kristala koji je najčešće kontroliran površinskim procesima, otapanje je kontrolirano difuzijom[2,3].

2.1.4. Starenje kristala

Pod starenje kristala ubraja se niz fizikalno-kemijskih promjena koje se događaju kada se čvrsta faza stvorena taloženjem iz otopine ostavi u kontaktu s matičnicom [2,3]. Flokulacija (agregacija, koagulacija, aglomeracija), rekristalizacija, Ostwaldovo zrenje (rast većih kristala na račun manjih) i transformacija metastabilne čvrste faze u stabilnu modifikaciju ubrajaju se u najvažnije procese starenja kristala. Sve te promjene posljedica su težnje sustava da uspostavi ravnotežu, čime se smanjuje ukupna Gibbsova energija. Prema Ostwaldovom pravilu faza prvotno nastaje najnestabilnija (tj. najtopljivija faza) koja potom s vremenom transformira u termodinamički najstabilniju fazu. U nastavku stvoreni kristali raznih veličina teže formiranju većih kristala što znači da dolazi do otapanja manjih kristala na račun rasta većih (Ostwaldovo zrenje)[6,13].

Transformacija metastabilnih čvrstih faza u stabilne modifikacije moguća je na dva načina:

- a) transformacijom u čvrstoj fazi (interno premještanje atoma, iona ili molekula)
- b) transformacijom putem otopine (otapanje nestabilne i simultana nukleacija te rast stabilne faze).

2.1.5. Učinak nečistoća

Ioni i molekule koji nisu građevne jedinice neke čvrste faze, a nalaze se u taložnom sustavu smatraju se nečistoćama [2,3]. Iako nečistoće prirodno postoje u svim sustavima, svaka strana molekula / ion koja je namjerno dodana u sustav naziva se aditiv. I pri najmanjim količinama nečistoća moguće je primijetiti određeni utjecaj na kinetiku taloženja, veličinu i oblik čestica te kemijski sastav i druga svojstva čvrste faze [14,15].

Razlikujemo dvije vrste nečistoća: ugrađene i adsorbirane. Ugrađene nečistoće lako ulaze u kristalnu rešetku i zamjenjuju se s građevnim ionima te stvaraju čvrste otopine. Uglavnom su to anorganski ioni i metalni kompleksi. Adsorbirane nečistoće su obično organske molekule koje se zadržavaju na površini i potencijalno usporavaju rast [16-18].

2.2. Biomineralizacija

Biomineralizacija je proces nastajanja funkcionalnih anorgansko-organskih hibridnih materijala, tzv. biominerala, koji se odvija u živim organizmima [1]. Proces biomineralizacije uključuje strogo kontrolirano izdvajanje anorganskih i organskih konstitucijskih jedinica (iona, molekula) iz organizma te njihovu ugradnju u funkcionalne nadstrukture. Funkcije biomineraliziranih organa i tkiva su raznolike. Mogu služiti npr. kao zaštita (oklop), strukturna potpora (kosti), ili za usitnjavanje hrane (zubi). Mineralizirana tkiva su u stalnom kontaktu s tjelesnim tekućinama koje su složene, imaju visoku ionsku jakost, sadrže biološke makromolekule, anorganske ione i organske molekule. Do danas je u biološkim sustavima otkriveno 60 biominerala, od kojih 20 % su amorfni, a 80 % kristalinični minerali [4].

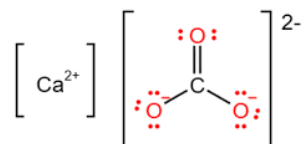
Dva su osnovna mehanizma nastajanja biominerala: biološki inducirana mineralizacija i biološki kontrolirana mineralizacija [1]. Biominerali nastali biološki induciranom mineralizacijom talože se nasumično što je posljedica sekundarnih interakcija između različitih metaboličkih produkata i okoline. Za razliku od biološki inducirane mineralizacije, biološki kontrolirana mineralizacija je strogo regulirani proces kojim nastaju organsko-anorganski kompozitni materijali koji čine tkivo i organe kao što su oklopi školjaka, zubi, kosti... Najčešće se pod pojmom biomineralizacija upravo podrazumijeva biološki kontrolirana mineralizacija. Biomineralizacija se u biološkim sustavima može odvijati na 4 specifična mjesta: epicelularno (na stijenkama stanice), intercelularno (u prostoru između gusto složenih stanica), intracelularno (u ograđenom prostoru, odjeljcima, unutar stanice) i ekstracelularno (izvan stanice, na površini ili unutar netopljive makromolekulske matrice). Nastajanje biominerala biološki kontroliranom mineralizacijom najčešće se odvija intracelularno i ekstracelularno. Procesi nastajanja biominerala i njihova svojstva kontrolirani su na više nivoa: kemijski, strukturno, prostorno, građevno i morfološki [1]. Kemijska kontrola je glavno polazište za procese kontrolirane biomineralizacije i očituje se kroz svojstva sustava kao što su topljivost, prezasićenost, brzina nukleacije i brzina kristalnog rasta. Na navedena svojstva moguće je utjecati na molekulskom nivou reguliranjem uvjeta biološke otopine koja se nalazi na mjestu mineralizacije. Ovo se u biološkim sustavima primarno ostvaruje reguliranjem prijenosa iona,

te „korištenjem“ posebnih organskih molekula tzv organskih matrica koje imaju ulogu promotora ili inhibitora rasta kristala i transformacije. Jedan od najistraživanijih minerala koji formiraju biominerale, a od kojih su izgrađena čvrsta tkiva morskih organizama, je kalcijev karbonat (CaCO₃) [1].

2.3. Kalcijev karbonat

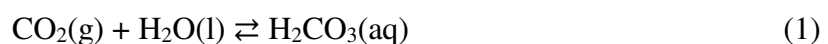
Kalcijev karbonat je teško topljiva sol ugljične kiseline, netoksičan je i lako dostupan. Iz vodenih otopina nastaje taloženjem. Čini 4 % Zemljine površine gdje se pojavljuje u obliku nekoliko vrsta stijena, od kojih su najpoznatije: kreda, vapnenca, mramor i dolomit. Kreda i vapnenac su sedimentne stijene koje su nastale sedimentacijom fosiliziranih morskih mikroorganizama tijekom milijuna godina, dok je mramor metamorfna stijena koja nastaje metamorfozom vapnenca ili dolomita pod utjecajem visokog tlaka i temperature. Dolomit je također sedimentna stijena nastala procesom dolomitizacije pri kojem mineral dolomit (kalcijev-magnezijev karbonat, CaMg(CO₃)₂) zamjenjuje ili obogaćuje kalcit (polimorf kalcijeva karbonat) u vapnencu. Kalcijev karbonat je jedan od najzastupljenijih minerala u čvrstim tkivima morskih organizama poput školjki kod školjkaša i koraljnih skeleta kod koralja, gdje se formira tijekom procesa biomineralizacije [19].

Na **slici 2.** prikazana je Lewisova struktura kalcijeva karbonata. Kalcijev karbonat se sastoji od kationa kalcija (Ca²⁺) i karbonatnog iona (CO₃²⁻).

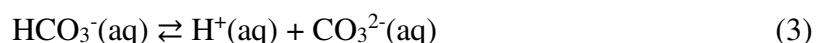
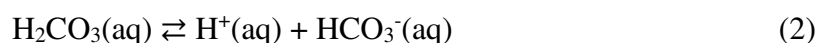


Slika 2. Lewisova struktura kalcijeva karbonata [20]

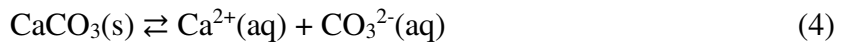
Topljivost kalcijeva karbonata niska je u čistoj vodi, ali u kišnici zasićenoj ugljikovim dioksidom njegova topljivost raste [19]. Naime, uslijed otapanja ugljikovog dioksida u vodi nastaje karbonatna (ugljična) kiselina:



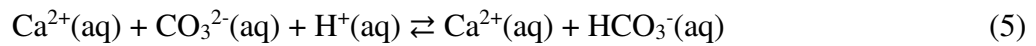
Nastala kiselina disocira u dva stupnja:



Istovremeno u sustavu u kojem se kalcijev karbonata nalazi u vodi postoji i ravnoteža između kalcijeva karbonata u krutoj fazi i hidratiziranih iona:



U nastavku, dolazi do interakcije između Ca^{2+} i CO_3^{2-} iona i vodikovih iona nastalih disocijacijom karbonatne kiseline pri čemu nastaje otopina kalcijeva hidrogenkarbonat koji je bitno topljiviji od kalcijeva karbonata.



Povećana topljivost kalcijevog karbonata u kišnici zasićenoj ugljikovim dioksidom pokretačka je sila za erozije vapnenačkih stijena te dovodi do stvaranja spilja, stalagmita i stalaktita tijekom dugih vremenskih razdoblja [19].

Uz kalcijev karbonat se veže i zanimljivo neuobičajeno opažanje: topljivost kalcijeva karbonata u vodi se povećava sa smanjenjem temperature vode, što je direktno vezano uz otapanje CO_2 u vodi. Naime, što je temperatura vode niža to je topljivost CO_2 veća, pa je onda posljedično veća i topljivost kalcijeva karbonata [19].

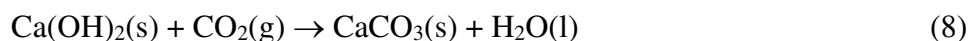
Kada se zagrije iznad $840\text{ }^\circ\text{C}$ kalcijev karbonat se razgrađuje na plin ugljikov dioksid i bijelu krutinu kalcijev oksid (CaO):



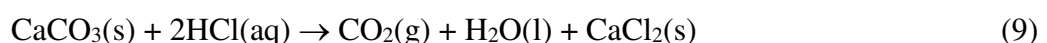
Kalcijev oksid poznat je kao vapno i jedna je od 10 kemikalija koja se proizvede termičkom razgradnjom vapnenca. Toplinska razgradnja kalcijeva karbonata u vapno jedna je od najstarijih poznatih kemijskih reakcija. Vapno se gasi vodom kako bi se proizveo kalcijev hidroksid (gašeno vapno)[19].



Tijekom vremena on reagira s ugljikovim dioksidom u zraku stvarajući kristale kalcijeva karbonata koji spajaju zrnca pijeska i tvore čvrst materijal sličan stijeni[19].



Kao i ostali metalni karbonati, kalcijev karbonat reagira s kiselim otopinama i proizvodi ugljikov dioksid. Ta reakcija je odgovorna za pjenjenje vapnenca kada se na njegovu površinu stavi razrijeđena klorovodična kiselina [19].



Kalcijev karbonat se koristi u medicini za liječenje stanja s niskim kalcijem, gastroezofagealne refluksne bolesti, GERB-a (engl. *gastroesophageal reflux disease*), kronične bubrežne bolesti, CKD-a (engl. *chronic kidney disease*), i drugih stanja. Ima i široku primjenu u industriji, proizvodnji keramike i gume, hrane i pića te u farmaceutskoj industriji. Značajna

je njegova uloga i u patološkoj mineralizaciji jer čini jednu od mineralnih komponenti žučnih kamenaca [19].

2.3.1. Modifikacije kalcijeva karbonata

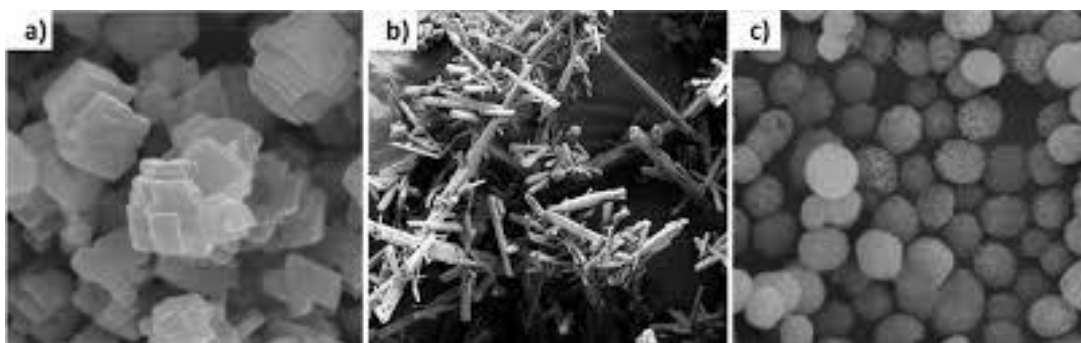
Kalcijev karbonat taloži iz elektrolitnih otopina u obliku hidratiziranih soli (kalcijev karbonat monohidrat, $\text{CaCO}_3 \times \text{H}_2\text{O}$, kalcijev karbonat heksahidrat $\text{CaCO}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, amorfni kalcijev karbonat $\text{CaCO}_3 \times n \text{H}_2\text{O}$) ili polimorfa (kalcit, vaterit, aragonit). Polimorfi su spojevi istog kemijskog sastava, a različite strukture. Pri atmosferskom tlaku i temperaturama koje vladaju na površini Zemlje kalcit je jedina stabilna modifikacija kalcijeva karbonata, dok su sve ostale nestabilne i podliježu transformaciji [2].

Kalcit kristalizira u heksagonskom sustavu u prostornoj grupi $R3c$ (kalcijev atom je koordiniran sa 6 atoma kisika) i najčešće kristalizira u obliku romboedra [21]. Bezbojan je ili bijel kada je čist, ali može biti i crvenkaste, ružičaste, žute, zelenkaste, plave, smeđe, ali i crne boje zbog prisutnosti različitih nečistoća. Njegov sjaj varira od staklastog do mutnog. Najznačajnija tri oblika kalcita su: prizmatični, romboedarski i skalenoedarski [22].

Aragonit kristalizira u rompskom sustavu u prostornoj grupi $Pmcn$ (kalcijev atom je koordiniran s 9 atoma kisika) i najčešće kristalizira u obliku igličastih kristala. Iako ga pronalazimo u prirodi (npr. u školjkama školjkaša ili u skeletima koralja), u vodenim otopinama na sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku je metastabilan te lako transformira u kalcit [23].

Za razliku od kalcita i aragonita, koje puno češće nalazimo u prirodi, vaterit je zbog svoje nestabilnosti vrlo rijedak. Međutim, pri određenim uvjetima koji stabiliziraju vaterit i na taj način sprječavaju transformaciju u aragonit ili kalcit, pronađen je kao mineral u metamorfnim stijenama [24], sedimentima [25], žučnim kamencima [26], ribljim otolitima i oklopima školjaka [27]. Sintetski vaterit gotovo uvijek taloži u obliku kuglica nastalih agregacijom primarnih nanometarskih kristala vaterita [28]. Vaterit se smatra važnim prekursorom u procesima formiranja kalcijevog karbonata. Međutim, put kristalizacije vaterita nije jasan i vrlo je teško dobiti velike i čiste monokristale vaterita. Iz tog razloga, točna kristalna struktura vaterita još nije u potpunosti riješena. Donedavno se pretpostavljalo da je kristalna struktura vaterita heksagonska u kojoj je kalcij koordiniran s 8 kisikovih atoma [29]. Međutim, najnovija istraživanja u kojima je korišten transmisijski elektronski mikroskop (TEM) visoke razlučivosti, ukazuju na to da je vaterit zapravo sastavljen od najmanje dvije različite kristalografske strukture koje koegzistiraju unutar pseudo-monokristala. Glavna struktura je heksagonska, dok je ona koja je manje zastupljena za sad još uvijek nepoznata [30].

Na **slici 3.** prikazane su pretražne elektronske mikrofotografije polimorfa kalcijeva karbonata [31].



Slika 3. Prikaz polimorfa kalcijeva karbonata: a) kalcita, b) aragonita i c) vaterita [31]

2.4. Antioksidansi

Antioksidansi su molekule koje štite od oštećenja izazvanih slobodnim radikalima. Mogu sniziti energiju slobodnih radikala, prekinuti lančanu reakciju oksidacije ili spriječiti njihovo nastajanje. U svrhu određivanja antioksidacijskog kapaciteta razvijene su metode temeljene na raznovrsnim mehanizmima obrambenih sustava antioksidansa, kao što su primjerice inhibicija slobodnih radikala ili keliranje metalnih iona koji bi u suprotnome doveli do nastanka slobodnih radikala [32]. Na taj način štite od oksidacijskog stresa, djelovanja slobodnih radikala, usporavaju starenje te jačaju imunološki sustav. Izvori antioksidansa mogu biti prirodni i umjetni. Biljni antioksidansi su vrsta fitonutrijenata, tj. hranjivih tvari biljnog podrijetla. Tijelo proizvodi i antioksidanse poznate kao endogeni antioksidansi. Egzogeni antioksidansi su oni koji dolaze izvan tijela. Antioksidansi djeluju kao hvatači radikala, donori elektrona, razlagači peroksida, inhibitori enzima, sinergisti te sredstva za keliranje metala. Hrana za koju se vjeruje da je bogat izvor antioksidansa je crna čokolada, grejp, crni i zeleni čaj, špinat, brokula, jabuke [32].

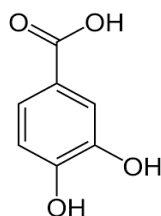
Slobodni radikali predstavljaju atome, molekule i ione koji imaju nespareni valentni elektron koji ih čini reaktivnim s drugim spojevima. Kada se naruši ravnoteža između stvaranja slobodnih radikala i obrambenih mehanizama antioksidansa dolazi do oksidativnog stresa što dovodi do oštećenja molekulskih skupina uključujući proteine, lipide i nukleinske kiseline. Oksidativni stres povezan je s bolestima srca, artritisom, moždanim udarom, Parkinsonovom bolešću i drugim upalnim bolestima [33].

Primjeri antioksidansa koji dolaze izvan tijela su: vitamin A, C, E, beta karoten, likopen, lutein i brojni drugi. Flavonoidi, katehini i polifenoli su vrste antioksidansa i fitonutrijenata koje možemo pronaći u hrani biljnog podrijetla. Svaki antioksidans ima različitu ulogu i nije zamjenjiv jedan s drugim [34].

Metabolizam različitih lijekova i toksina može dovesti do oksidacijskog stresa. Antioksidansi iz prehrane imaju važnu ulogu u pomaganju endogenim antioksidansima pri neutralizaciji oksidacijskog stresa. Nedostatak hranjivih antioksidansa uzrok je kroničnih i degenerativnih bolesti [33].

2.4.1. Protokatehuinska kiselina

Flavonoidi i polifenoli heterocikličke su molekule koje imaju pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje poput smanjena rizika od raka, dijabetesa te kardiovaskularnih i moždanih bolesti. Fenolni spojevi smatraju se sekundarnim metabolitima i izvode se iz fenilalanina putem šikiminske kiseline. Posjeduju aromatski prsten i imaju jednu ili više hidroksilnih skupina. Značajan znanstveni interes proizlazi iz antioksidacijskog, antibakterijskog, antikancerogenog, antivirusnog, protuupalnog te analgetskog djelovanja koje takvi spojevi posjeduju [35]. Protokatehuinska kiselina (PCA), poznata još i kao 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina, pripada skupini polifenolnih spojeva koja je ujedno i vrsta široko rasprostranjene prirodne fenolne kiseline. Ima strukturnu sličnost s galnom, vanilinskom i siringinskom kiselinom koje su poznati antioksidansi [36]. Na **slici 4.** prikazana je struktura PCA. Bijeli je do svijetložuti kristalni prah fenolnog mirisa, topljiv u vrućem alkoholu i eteru dok je slabo topljiv u vodi. Točka tališta iznosi 221 °C, dok je točka vrelišta na 410 °C pri tlaku od 760 mmHg. Stabilna je i nekompatibilna s jakim oksidansima i bazama. Za PCA karakteristična su protuupalna, antioksidacijska i antibakterijska aktivnost kao i neuralna zaštita [36].



Slika 4. Struktura PCA [37]

Više od 500 biljaka sadrži PCA kao aktivni sastojak koji ima različite farmakološke aktivnosti, a koje su rezultat njihove antioksidacijske aktivnosti zajedno s drugim mehanizmima. Mehanizam kemopreventivnog djelovanja PCA povezan je s antioksidativnim djelovanjem, uključujući inhibiciju stvaranja, kao i uklanjanje slobodnih radikala te regulaciju antioksidativnih enzima [35].

PCA je otkrivena u voću kao što su šljive, grožđe i orašasti plodovi. Prisutna je u proizvodima biljnog podrijetla kao što su maslinovo ulje ili bijelo vino. Također se nalazi u mnogim biljkama i začinima (npr. zvjezdasti anis, medicinski ružmarin) [36]. Osim toga, PCA je pronađena i u organizmima poput morskih cvjetnica i algi koje otpuštaju i brojne druge fenolne spojeve kako bi se prilagodile sve toplijim i kiselijim uvjetima uslijed globalnog zatopljenja i zakiseljavanja mora i oceana [38]. Stoga, postavlja se pitanje hoće li protokatehuiska kiselina reagirati s CaCO_3 ?

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Za pripremu standardnih otopina kao i taložnih sustava upotrijebljene su sljedeće kemikalije: $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, Na_2CO_3 , NaOH , NaCl (proizvođača Gram-mol) i protokatehuiska kiselina (proizvođača Acros organics, p.a. kemijske čistoće) te ultra čista voda provodnosti manje od $0,055 \mu\text{S cm}^{-1}$. Prilikom standardizacije navedenih otopina korišteni su titrivali EDTA (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*) ($c = 0,1000 \text{ mol dm}^{-3}$) i HCl ($c = 0,1000 \text{ mol dm}^{-3}$) proizvođača Gram-mol.

3.2. Eksperimentalni postupci

3.2.1. Priprema standardnih otopina

U svrhu provođenja pokusa priređene su standardne otopine NaOH , NaCl , CaCl_2 i PCA. Standardna otopina NaOH priređena je otapanjem poznate mase u ultra čistoj vodi. Spomenuta otopina je zatim profiltrirana i standardizirana otopinom HCl . Određena koncentracija iznosila je $1,0162 \text{ mol dm}^{-3}$.

Otopina NaCl priređena je otapanjem neposredno posušene krutine u ultra čistoj vodi, nakon što je krutina precizno odvagana na analitičkoj vagi. Koncentracija priređene i profiltrirane otopine iznosila je $3,000 \text{ mol dm}^{-3}$.

Standardna otopina CaCl_2 priređena je otapanjem krutine $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ u ultra čistoj vodi. Dobivena otopina je zatim profiltrirana i standardizirana otopinom EDTA s ciljem određivanja točne koncentracije koja je u konačnici iznosila $0,9883 \text{ mol dm}^{-3}$.

3.2.2. Priprema reaktantnih otopina Na_2CO_3 i CaCl_2 za spontano taloženje CaCO_3 uz dodatak protokatehuinske kiseline

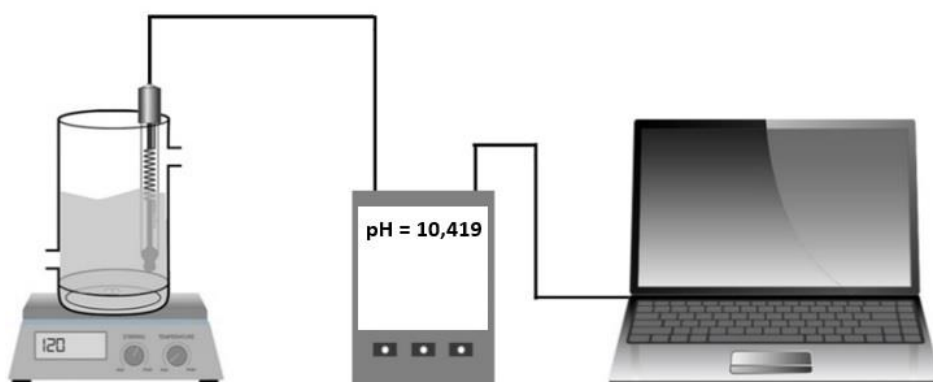
Reaktantne otopine kalcijeva klorida i natrijeva karbonata priređene su u svrhu provođenja eksperimenata, kako modelnih (sustavi bez dodatka PCA) tako i sustava uz dodatak PCA. Volumen pojedinačnih navedenih reaktantnih otopina iznosio je 200 cm^3 . Karbonatna otopina priređena je svaki put neposredno prije eksperimenta, otapanjem $0,1060 \text{ g Na}_2\text{CO}_3$ u ultra čistoj vodi. Kalcijeva otopina priređena je razrjeđivanjem odgovarajuće količine standardne otopine ($c(\text{CaCl}_2) = 0,9883 \text{ mol dm}^{-3}$). Ionska jakost (I_c) namještena je na $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ dodatkom standardne otopine NaCl, na način da je polovica od cjelokupnog potrebnog volumena NaCl dodana u svaku reaktantnu otopinu. Početni pH sustava podešen je dodatkom izračunatog volumena standardne otopine natrijeva hidroksida ($c(\text{NaOH}) = 1,0162 \text{ mol dm}^{-3}$) u karbonatnu otopinu. Za potrebe eksperimenata uz dodatak PCA, karbonatna otopina sadržavala je odgovarajuću masu PCA ovisno o željenoj koncentraciji iste u sustavu dok su ostale otopine priređene na jednak način. Pripremljene koncentracije PCA bile su: $0,01 \text{ mmol dm}^{-3}$; $0,05 \text{ mmol dm}^{-3}$; $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$; $0,25 \text{ mmol dm}^{-3}$ i $0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$.

3.2.3. Postupak izvedbe eksperimenta spontanog taloženja CaCO_3 uz dodatak protokatehuinske kiseline

Za izvedbu eksperimenta spontanog taloženja CaCO_3 uz dodatak PCA korišteni su sljedeći instrumenti: protočni termostat, reakcijska posuda dvostrukih stijenki ukupnog volumena 400 cm^3 , kombinirana staklena elektroda te računalo.

Svi eksperimenti spontanog taloženja provedeni su na jednak način pri stalnoj temperaturi od $25 \text{ }^\circ\text{C}$ upotrebom protočnog termostata. Svi pokusi izvedeni su u reakcijskoj posudi dvostrukih stijenki, ukupnog volumena 400 cm^3 . Redoslijed dodavanja reaktantnih otopina također je uvijek bio isti, odnosno najprije je dodano 200 cm^3 karbonatne otopine, a

zatim što je brže moguće i 200 cm³ kalcijeve otopine. Teflonskim poklopcem je potom zatvorena reakcijska posuda koji je dodatno bio pričvršćen parafilmom zbog što boljeg fiksiranja poklopca s ciljem što učinkovitijeg smanjenja unosa ugljikova dioksida iz okoline u sustav. Sustav za vrijeme eksperimenta bio je neprestano miješan pomoću magnetskog mješača presvučenog teflonom, uz stalan broj okretaja. Napredovanje reakcije praćeno je pomoću kombinirane staklene elektrode mjerenjem pH vrijednosti otopine sustava (**slika 5**). Uspostavljanje približno jednake vrijednosti pH najčešće bi predstavljalo kraj eksperimenta. Upotrebom svjetlosnog mikroskopa (Motic B1 s digitalnom kamerom Moticam 2) provedena je preliminarna identifikacija morfologije čestica u dobivenoj suspenziji koja je potom profiltrirana na celulozno nitratnom membranskom filmu (Millipore) veličine pore 0,22 μm. U konačnici je dobiveni talog ispran malim količinama vode te osušen u sušioniku na temperaturi od 105 °C, nakon čega je uslijedila analiza izoliranog taloga infracrvenom spektroskopijom i rendgenskom difrakcijom.



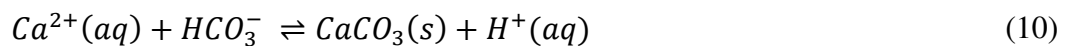
Slika 5. Prikaz aparature za praćenje spontanog taloženja kalcijeva karbonata uz dodatak antioksidansa PCA [39]

3.3. Eksperimentalne tehnike

U ovom radu korištene su sljedeće tehnike: potenciometrija, svjetlosna mikroskopija, infracrvena spektroskopija i rendgenska difrakcija na prahu.

3.3.1. Potencimetrija

Elektrokemijska analiza kojom se mjeri razlika potencijala dviju elektroda u elektrokemijskoj ćeliji pri uvjetima ravnoteže, naziva se potencimetrija. Prilikom mjerenja uvijek su prisutne referenta i radna (mjerna ili indikatorska) elektroda. Razlika među navedenim elektrodama je u tome što referentna ima poznat i stalan potencijal koji ne ovisi o aktivitetima aktivnih ionskih vrsta, dok radna (mjerna ili indikatorska) elektroda ima promjenjiv potencijal koji se mjeri, jer ovisi o aktivitetu, to jest o koncentraciji ionskih vrsta. Potencimetrija se najčešće upotrebljava prilikom određivanja koncentracije analita u proučavanoj otopini te za određivanje točke ekvivalencije prilikom potencimetrijske titracije. Tom metodom, primjerice, može se odrediti koncentracija H^+ iona, što omogućuje određivanje pH vrijednosti. Taloženje kalcijeva karbonata popraćeno je promjenom pH:



Upravo zbog toga, napredovanje kemijske reakcije tijekom procesa taloženja bilo je bilježeno kontinuiranim mjerenjem pH vrijednosti otopine kombiniranom staklenom elektrodom (HI1131B, Hanna instruments) povezanom s pH-metrom (HI5522, Hanna instruments). Uređaj je kalibriran puferima pH vrijednosti 4,001; 7,001 i 10,001. Svi eksperimenti su provedeni pri 25 °C te su mjerenja za svaku ispitivanu koncentraciju provedena minimalno tri puta.

3.3.2. Svjetlosna mikroskopija

Svjetlosna mikroskopija koristi se za proučavanje i prikaz malih struktura i uzoraka pružajući povećanu sliku ovisno o tome kakvu interakciju ostvaraju s vidljivom svjetlošću, npr. apsorpcija, raspršenje ili refleksija. Ovom metodom se najčešće ispituju morfološke karakteristike dobivenih kristala [34].

Kod ove vrste mikroskopa, svjetlost iz izvora se obično skuplja pomoću kondenzatorske leće, a zatim oblikuje i optički filtrira prije nego što se fokusira na uzorak. Oblikovanje svjetlosti ključno je za postizanje visoke rezolucije i kontrasta, a često uključuje i odabir područja uzorka koje će biti osvijetljeno kao i kutova pod kojima svjetlost pada na njega. Optičko filtriranje svjetlosti izvora, upotrebom optičkih filtera koji mijenjaju njezin spektar i polarizaciju, može

se koristiti za isticanje određenih značajki uzorka, poboljšanje vidljivosti slabih signala ili promatranje fluorescencije uzorka [34].

Sustav za prikaz povećane slike koji prikuplja svjetlost nakon njezine interakcije s uzorkom, sastoji se od dvije glavne skupine optičkih elemenata. Prvi objektiv, odnosno njegova leća koja prikuplja što je više moguće svjetla od uzorka, dok je drugi okular koji prenosi prikupljenu svjetlost do oka promatrača ili sustava kamere. Sustav za prikaz također može uključivati elemente poput otvora i filtera koji odabiru određene dijelove svjetlosti koja dolazi od uzorka, kako bi se primjerice vidjela samo svjetlost koja je raspršena od uzorka, određene boje ili valne duljine. Ova vrsta filtriranja može biti iznimno korisna za izdvajanje određenih značajki od interesa koje bi ostale skrivene pri prikazu cjelokupne svjetlosti koja dolazi od uzorka [40].

Polarizacija svjetla donijela je popriličan napredak zahvaljujući kojem se moć karakterizacije anizotropnih kristala pomoću svjetlosnog mikroskopa znatno povećala. Tehnološkim napretkom također je omogućeno snimanje uzoraka s bitno većim povećanjem. Maksimalno povećanje u slučaju svjetlosne mikroskopije je i do 1000 puta, dok moć razlučivanja osim što ovisi o kvaliteti leća, ovisi i o valnoj duljini svjetlosti koja se koristi za osvjetljavanje uzorka [40].

3.3.3. Infracrvena spektroskopija

Infracrvena spektroskopija Fourierove transformacije poznata kao FTIR (engl. *Fourier transform infrared spectroscopy*) analiza ili FTIR spektroskopija je analitička tehnika koja se najčešće koristi za identifikaciju organskih, polimernih te anorganskih materijala. FTIR metoda koristi infracrveno svjetlo za skeniranje ispitnih uzoraka i promatranje kemijskih svojstava [41].

FTIR instrument šalje infracrveno zračenje od 10 000 do 100 cm^{-1} kroz uzorak pri čemu je dio zračenja apsorbiran, a dio prolazi kroz njega. Molekule uzorka pretvaraju apsorbirano zračenje u rotacijsku i/ili vibracijsku energiju. Rezultirajući signal na detektoru prikazuje se u obliku spektra od 4000 do 400 cm^{-1} predstavljajući molekularni otisak uzorka. Svaka kemijska struktura ili molekula proizvest će jedinstveni spektralni otisak što FTIR analizu čini alatom za kemijsku identifikaciju [41].

FTIR analiza se koristi za :

- Identifikaciju i karakterizaciju nepoznatih materijala (krutine, prahove, tekućine)

- Identifikaciju zagađenja na ili u materijalu
- Identifikaciju aditiva nakon ekstrakcije iz polimerne matrice
- Identifikaciju nestvrdnutih monomera u ispitivanjima analiza kvarova, identifikaciju oksidacije ili razgradnje.

Apsorpcijske vrpce prikazane u spektru djelomično su diskretne i degenerativne. Određeni stupanj energije na određenom valnom broju može se kretati na temelju drugih kemijskih i matričnih čimbenika stoga se spektar mora tumačiti kao cijeli sustav. Ispravna FTIR analiza dobra je koliko je dobra sposobnost uvođenja i promatranja energije iz određene matrice [41].

Infracrvenom spektroskopijom pomoću instrumenta FT-IR Mattson spectrometer, Genesis series te upotrebom KBr pastila određeni su polimorfi kalcijeva karbonata i njihovi udjeli u uzorcima sintetiziranim u ovom istraživanju. Miješanjem 200 mg suhog kalijevog bromida s 1 mg uzorka dobivene su KBr pastile prikladne za daljnju analizu. Kako bi se rasipanje zračenja na kristalima kalijeva bromida i uzorka umanjilo što je moguće više, navedena smjesa je najprije usitnjena i homogenizirana u tarioniku, a zatim prešana 2 min pod tlakom od 8 tona nakon čega je dobivena pastila promjera 1 cm i debljine 1 mm. Pomoću odgovarajućeg nosača pripremljena pastila postavljena je u uređaj te je snimljen IR spektar.

Dobiveni IR spektri uzoraka uspoređeni su sa spektrima standarda sva 3 polimorfa kalcijeva karbonata kako bi se utvrdio sastav uzorka. Maseni udio pojedinog polimorfa prisutnog u sintetiziranim uzorcima utvrđen je upotrebom baždarnih pravaca priređenih od strane kolega iz Laboratorija za procese taloženja na Institutu Ruđer Bošković prema metodi Vagenasa i sur. [42]. Specifična apsorpcijska vrpca ν_4 O-C-O svijanja (deformacije u ravnini) je za aragonit pri 713 cm^{-1} i 700 cm^{-1} , za kalcit 713 cm^{-1} , dok je za vaterit 745 cm^{-1} .

3.3.4. Rendgenska difrakcija na prahu

Difrakcija rendgenskih zraka, XRD (engl. *X-ray diffraction*), nedestruktivna je analitička tehnika koja se koristi za analizu fizičkih svojstava kao što su fazni sastav, kristalna struktura, orijentacija praškastih, krutih i tekućih uzoraka. XRD je brza i često najpouzdanija i najtočnija metoda za identifikaciju nepoznatih materijala. Priprema uzorka je minimalna. S pravim analitičkim softverom analiza podataka može biti jednostavna, a za industrijske procese može se i automatizirati [43].

Materijali mogu biti jednofazne ili višefazne smjese i mogu sadržavati kristalne i nekristalne komponente. U rendgenskom difraktogramu različite kristalne faze daju različite difrakcijske slike. Identifikacija faza izvodi se usporedbom rendgenske difrakcijske slike dobivenih od nepoznatih uzoraka s difrakcijskim slikama u referentnim bazama podataka [43].

Rendgenski instrument sadrži 3 glavne komponente: izvor rendgenskih zraka, držač uzorka i XRD detektor. Rendgenske zrake osvjetljaju uzorak, koji se reflektira na fazi uzorka i ulazi u detektor. Pomicanjem uzorka i detektora radi promjene kuta difrakcije, mjeri se intenzitet, a bilježe se podatci o difrakciji [43].

Tijekom interakcije rendgenskih zraka s čvrstim materijalima dolazi do njihova raspršivanja od elektrona koji kruže oko jezgre atoma. Pri nailasku na mrežnu ravninu, dio ulaznog zračenja se reflektira na graničnoj plohi dok drugi dio prođe dublje. Zatim pri nailasku na drugu mrežnu ravninu se ponovno reflektira te nastaje fenomen difrakcije. Difraktogrami kristalnih materijala karakterizirani su oštrim maksimumima zbog periodičnog rasporeda atoma stoga je rendgenska difrakcija učinkovita metoda za procjenu utjecaja pojedinog tretmana na kristalnost materijala. Difrakcija rendgenskih zraka rezultat je konstruktivne interferencije između rendgenskih zraka i kristalnog uzorka. Valna duljina korištenih rendgenskih zraka je istog reda veličine udaljenosti između atoma u kristalnoj rešetci. Dovodi do difrakcijske slike koja se može analizirati na brojne načine, najpoznatiji je Braggov zakon koji se koristi u mjerenju kristala i njihovih faza [43]. Intenziteti difrakcijskih maksimuma daju uvid o atomskom broju te položaju atoma unutar jedinične ćelije, a položaj difrakcijskih maksimuma uvid u oblik i veličinu jedinične ćelije [44].

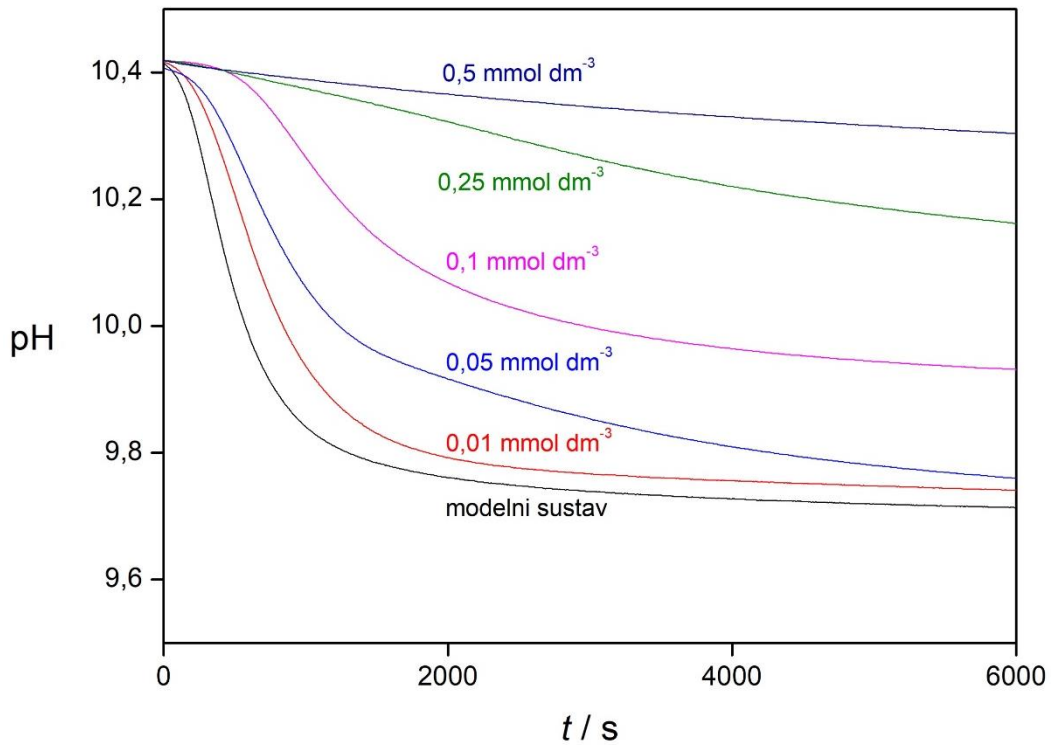
4. REZULTATI I RASPRAVA

Kako bi se istražilo djelovanje PCA na taloženje kalcijeva karbonata provedeni su pokusi spontanog taloženja CaCO_3 uz dodatak različitih koncentracija PCA te su promjene u sastavu i morfologiji istaloženih krutih faza identificirane svjetlosnom mikroskopijom, FTIR spektroskopijom te rendgenskom difrakcijom.

4.1. Kinetika spontanog taloženja CaCO_3 uz dodatak protokatehuinske kiseline

Spontano taloženje CaCO_3 kako u modelnom tako i u sustavima uz dodatak PCA, praćeno je potenciometrijski, mjerenjem pH u ovisnosti o vremenu. Na **slici 6.** su prikazane

eksperimentalne krivulje promjene pH u ovisnosti o vremenu tijekom spontanog taloženja kalcijeva karbonata pri $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ u sustavima početnih koncentracija reaktanata $c(\text{Ca}^{2+})_0 = c(\text{CO}_3^{2-})_0 = 2,5 \text{ mmol dm}^{-3}$, ionske jakosti $I_c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, bez dodatka PCA (modelni sustav) i uz dodatak različitih koncentracija PCA ($0,01 \text{ mmol dm}^{-3} \leq c(\text{PCA}) \leq 0,25 \text{ mmol dm}^{-3}$).



Slika 6. Promjena pH s vremenom tijekom spontanog taloženja CaCO_3 pri $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ u sustavima početnih koncentracija reaktanata $c(\text{Ca}^{2+})_0 = c(\text{CO}_3^{2-})_0 = 2,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ te ionske jakosti $I_c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, bez dodatka PCA (modelni sustav) i uz dodatak različitih koncentracija PCA ($0,01 \text{ mmol dm}^{-3} \leq c(\text{PCA}) \leq 0,25 \text{ mmol dm}^{-3}$).

pH krivulja koja je zabilježena u modelnom sustavu karakteristična je za spontano taloženje kalcijeva karbonata. U prvom dijelu krivulje pH je relativno konstantan. Nakon određenog vremena (indukcijski period (t_{ind})) pH počinje značajno padati što ukazuje na rast kristala kalcijeva karbonata što se tijekom eksperimenta moglo uočiti i kao početak zamućenja otopine. U zadnjem dijelu krivulje pH je ponovno relativno konstantan. Usporedbom modelne pH krivulje s pH krivuljama zabilježenim u pokusima uz dodatak PCA u rasponu koncentracija od $0,01 \text{ mmol dm}^{-3}$ do $0,25 \text{ mmol dm}^{-3}$ moguće je uočiti sličnost u njihovom obliku. Međutim, nagib ovih krivulja se smanjuje s povećanjem koncentracije PCA, a induksijski period produžuje. Samo u slučaju dodatka najviše istražene koncentracije PCA ($0,50 \text{ mmol dm}^{-3}$)

tijekom zadanog vremena izvođenja pokusa (6000 s) nije došlo do značajne promjene pH vrijednosti niti do zamućenja otopine. Također, s povećanjem dodane koncentracije PCA moguće je uočiti povećanje konačne pH vrijednosti sustava. U **tablici 1.** prikazane su očitane vrijednosti induksijskog perioda za svaki pojedinačni sustav (modelni i sustavi uz dodatak PCA) iz kojih je vidljiv porast induksijskog perioda uslijed povećanja koncentracije dodane PCA.

Tablica 1. Induksijsko vrijeme t_{ind} , (tri ponavljanja za modelni sustav i sve koncentracije PCA) tijekom spontanog taloženja kalcijeva karbonata pri $t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ u sustavima početnih koncentracija reaktanata $c(\text{Ca}^{2+})_0 = c(\text{CO}_3^{2-})_0 = 2,5\text{ mmol dm}^{-3}$ te ionske jakosti $I_c = 0,1\text{ mol dm}^{-3}$, bez dodatka PCA (modelni sustav) i uz dodatak različitih koncentracija PCA ($0,01\text{ mmol dm}^{-3} \leq c(\text{PCA}) \leq 0,25\text{ mmol dm}^{-3}$); $t_{ind}(\text{sr. v.})$ je srednja vrijednost induksijskog vremena pri zadanoj koncentraciji PCA.

$c(\text{PCA}) / \text{mmol dm}^{-3}$	t_{ind} / s			$t_{ind}(\text{sr. v.}) / \text{s}$
	1. mjerjenje	2. mjerjenje	3. mjerjenje	
Modelni sustav	5	5	10	6,67
0,01	5	5	10	6,67
0,05	15	15	20	16,67
0,10	15	15	35	21,67
0,25	20	35	35	30,00

Navedena promjena (porast induksijskog perioda s povećanjem koncentracije dodane PCA) ukazuju na inhibiciju spontanog taloženja kalcijeva karbonata uslijed dodatka PCA. Naime, ukoliko zbog dodatka nekog aditiva u taložni sustav dođe do produženja induksijskog perioda to nam ukazuje da je aditiv uzrokovao smanjenje brzine nukleacije, tj. inhibiciju nukleacije. Istovremeno smanjenje nagiba krivulja uslijed dodatka aditiva ukazuje na smanjenje brzine rasta kristala, tj. inhibiciju rasta kristala u tom sustavu. Stoga je moguće zaključiti da je dodatak PCA uzrokovao inhibiciju spontanog taloženja kalcijeva karbonata te da je pri najvišoj upotrijebljenoj koncentraciji PCA ($0,50\text{ mmol dm}^{-3}$) došlo do potpune inhibicije taloženja.

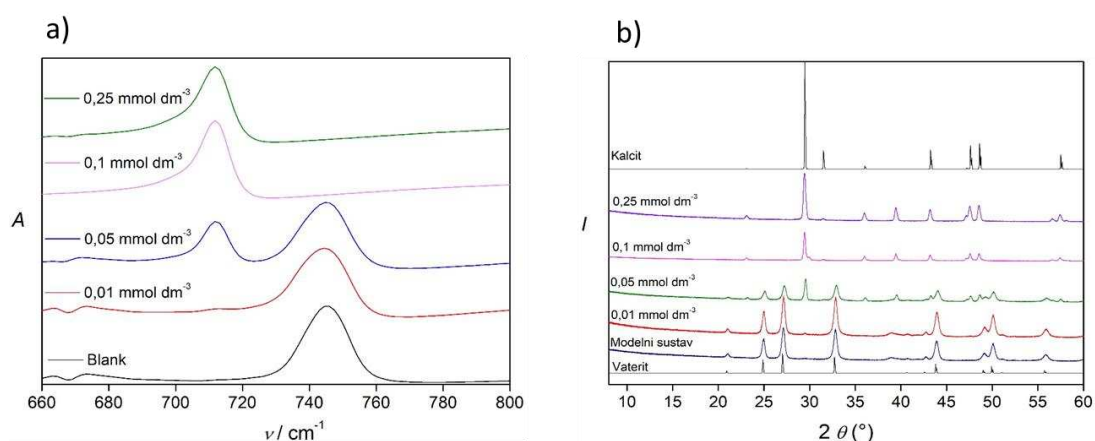
4.2. Promjena faznog sastava spontano istaloženog CaCO_3 uslijed djelovanja protokatehuinske kiseline

Kako bi se istražio utjecaj PCA na fazni sastav istaložene čvrste faze provedena je fazna analiza uzoraka FT-IR spektroskopijom i rendgenskom difrakcijom. Snimljeni FT-IR spektri uzoraka istaloženih pri $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ u sustavima početnih koncentracija reaktanata $c(\text{Ca}^{2+})_0 = c(\text{CO}_3^{2-})_0 = 2,5 \text{ mmol dm}^{-3}$, ionske jakosti $I_c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, bez dodatka PCA (modelni sustav) i uz dodatak različitih koncentracija PCA ($0,01 \text{ mmol dm}^{-3} \leq c(\text{PCA}) \leq 0,25 \text{ mmol dm}^{-3}$), prikazani su na **slici 7. a)**, a difraktogrami istih tih uzoraka na **slici 7. b)**.

Analizom snimljenih FT-IR spektara (**slika 7. a)** uočeno je da su nastale samo dvije čvrste faze CaCO_3 , kalcit i vaterit (zabilježene su karakteristične apsorpcijske vrpce pri 713 cm^{-1} za kalcit i 745 cm^{-1} za vaterit). U FT-IR spektru uzorka izoliranog iz modelnog sustava, vidljiva je samo karakteristična apsorpcijska vrpca za vaterit pri 745 cm^{-1} što ukazuje na to da je u ovom sustavu istaložio čisti vaterit. U FT-IR spektru uzorka izoliranog iz sustava s najnižom primijenjenom koncentracijom PCA ($0,01 \text{ mmol dm}^{-3}$) dominantno se uočava apsorpcijska vrpca za vaterit pri 745 cm^{-1} ali se vrlo blago nazire i karakteristična apsorpcijska vrpca za kalcit pri 713 cm^{-1} što znači da kalcita ima izrazito malo. FT-IR spektar uzorka izoliranog iz sustava s dodatkom PCA koncentracije $0,05 \text{ mmol dm}^{-3}$, bilježi obje karakteristične apsorpcijske vrpce, tj. i vrpcu pri 713 cm^{-1} i vrpcu pri 745 cm^{-1} iz čega je moguće zaključiti da je u ovom sustavu istaložila smjesa kalcita i vaterita. U preostala dva FT-IR spektra uzorka izoliranih iz sustava s dodatkom PCA koncentracija $0,10 \text{ mmol dm}^{-3}$ i $0,25 \text{ mmol dm}^{-3}$, moguće je uočiti samo karakterističnu apsorpcijsku vrpcu za kalcit pri 713 cm^{-1} što znači da je u ova dva sustava nastao čisti kalcit.

Na **slici 7. b)** prikazani su difraktogrami istih uzoraka koji su analizirani i FT-IR spektroskopijom, a koji su izolirani iz pokusa spontanog taloženja kalcijeva karbonata uz dodatak PCA. (Dodatna dva difraktograma, čistog kristalnog sjemena kalcita i vaterita, prikazani su radi usporedbe). Rendgenskom difrakcijom izoliranih uzoraka potvrđeni su rezultati dobiveni FT-IR analizom. Naime, difraktogram uzorka izoliranog iz modelnog sustava pokazuje samo karakteristične difrakcijske maksimume za vaterit pri $2\theta = 20,93 \text{ }^\circ$; $24,8 \text{ }^\circ$; $27,0 \text{ }^\circ$; $32,7 \text{ }^\circ$; $43,8 \text{ }^\circ$; $49,05 \text{ }^\circ$; $50,0 \text{ }^\circ$ i $55,75 \text{ }^\circ$ [45]. Na osnovu ovog moguće je zaključiti da je u ovom sustavu istaložio čisti vaterit. U difraktogramu uzorka izoliranog iz sustava s najnižom primijenjenom koncentracijom PCA ($0,01 \text{ mmol dm}^{-3}$) dominantni su difrakcijski maksimumi karakteristični za vaterit, ali je moguće i uočiti vrlo slabi difrakcijski maksimum pri $29,3^\circ$, koji je najjači difrakcijski maksimum kalcita, što ukazuje na to da se u ovom uzorku nalazi osim

vaterita i vrlo mala količina kalcita. U difraktogramu uzorka izoliranog iz sustava s dodatkom PCA koncentracije $0,05 \text{ mmol dm}^{-3}$ moguće je uočiti difrakcijske maksimume karakteristične za vaterit, ali i za kalcit pri $2\theta = 23,0^\circ$; $29,3^\circ$; $35,9^\circ$; $39,3^\circ$; $43,1^\circ$; $47,4^\circ$; $48,4^\circ$; $56,5^\circ$ i $57,3^\circ$ [45] iz čega se može zaključiti da je u ovom sustavu istaložila smjesa vaterita i kalcita. U preostala dva difraktograma uzoraka izoliranih iz sustava s dodatkom PCA koncentracija $0,10 \text{ mmol dm}^{-3}$ i $0,25 \text{ mmol dm}^{-3}$ moguće je uočiti samo karakteristične difrakcijske maksimume za kalcit što znači da je u ova dva sustava nastao čisti kalcit.



Slika 7. FT-IR spektri (a) i difraktogrami (b) uzoraka istaloženih pri $t = 25^\circ\text{C}$ u sustavima početnih koncentracija reaktanata $c(\text{Ca}^{2+})_0 = c(\text{CO}_3^{2-})_0 = 2,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ te ionske jakosti $I_c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, bez dodatka PCA (modelni sustav) i uz dodatak različitih koncentracija PCA ($0,01 \text{ mmol dm}^{-3} \leq c(\text{PCA}) \leq 0,25 \text{ mmol dm}^{-3}$).

Za semikvantitativnu analizu uzoraka korištena je FT-IR metoda opisana u poglavlju 3.4.3. te su u **tablici 2.** prikazane vrijednosti masenog udjela kalcita i vaterita u izoliranim talozima u ovisnosti o koncentraciji dodane PCA u taložni sustav.

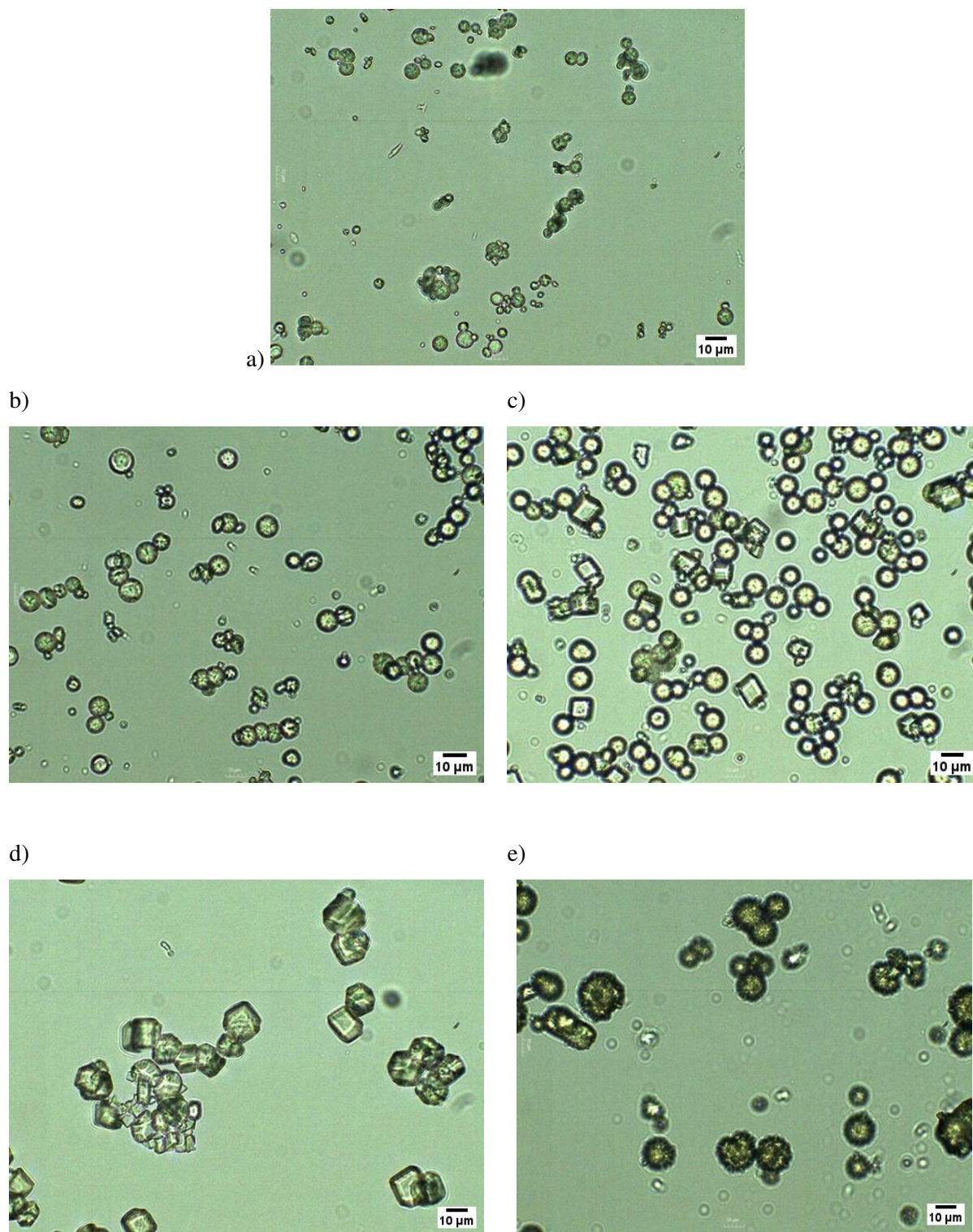
Tablica 2. Maseni udio ($w / \%$) vaterita i kalcita u uzorcima nastalim spontanom taloženjem CaCO_3 pri $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ u sustavima početnih koncentracija reaktanata $c(\text{Ca}^{2+})_0 = c(\text{CO}_3^{2-})_0 = 2,5 \text{ mmol dm}^{-3}$, ionske jakosti $I_c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, bez dodatka PCA (modelni sustav) i uz dodatak različitih koncentracija PCA ($0,01 \text{ mmol dm}^{-3} < c(\text{PCA}) \leq 0,25 \text{ mmol dm}^{-3}$).

$c(\text{PCA}) / \text{mmol dm}^{-3}$	$w(\text{vaterit}) / \%$	$w(\text{kalcit}) / \%$
modelni sustav	100	0
0,01	99	1
0,05	72	28
0,10	0	100
0,25	0	100

Iz **tablice 2.** je u modelnom sustavu istaložio čisti vaterit. Pri najnižoj upotrijebljenoj koncentraciji PCA ($0,01 \text{ mmol dm}^{-3}$) dominantno je istaložio vaterit (99 %) te svega 1 % kalcita. Porastom koncentracije dodane PCA na $0,05 \text{ mmol dm}^{-3}$ u talogu je zabilježen i kalcit u smjesi s vateritom ($w(\text{kalcit}) = 28 \%$, $w(\text{vaterit}) = 72 \%$). Daljnjim povećanjem koncentracije PCA na $0,10 \text{ mmol dm}^{-3}$ i $0,25 \text{ mmol dm}^{-3}$ u talogu je zabilježen samo kalcit ($w(\text{kalcit}) = 100 \%$). Na osnovu ovih rezultata moguće je zaključiti da je dodatak PCA u taložne sustave uzrokovao značajnu promjenu u sastavu taloga pri čemu je uslijed porasta koncentracije PCA došlo do preferencijalnog taloženja kalcita. Uočeni trend moguće je objasniti jačim inhibicijskim djelovanjem PCA na taloženje vaterita nego na taloženje kalcita što onda u konačnici rezultira većim udjelom kalcita u talogu.

4.3. Promjena morfologije spontano istaloženog CaCO_3 uz dodatak protokatehuinske kiseline

Za daljnje proučavanje djelovanja PCA na kalcijev karbonat izolirani talozi analizirani su svjetlosnom mikroskopijom. Dobivene snimke uzoraka CaCO_3 izoliranih iz modelnog sustava kao i iz sustava u koje su dodane različite koncentracije PCA ($0,01 \text{ mmol dm}^{-3} \leq c(\text{PCA}) \leq 0,25 \text{ mmol dm}^{-3}$) prikazane su na **slici 8.** Na **slici 8. a)** (modelni sustav) i **8. b)** ($c(\text{PCA}) = 0,01 \text{ mmol dm}^{-3}$) vidljivi su isključivo kristali u obliku pravilnih kuglica, za razliku od **slike 8. c)** ($c(\text{PCA}) = 0,05 \text{ mmol dm}^{-3}$) gdje se vidi da je nastala smjesa kristala u obliku kuglica i kockica. Isključivo kockice vidljive su na **slici 8. d)** ($c(\text{PCA}) = 0,10 \text{ mmol dm}^{-3}$), a **slika 8. e)** ($c(\text{PCA}) = 0,25 \text{ mmol dm}^{-3}$) prikazuje kristale u obliku nepravilnih (nazubljenih) kuglica.



Slika 8. Fotografije, snimljene svjetlosnim mikroskopom, uzoraka kalcijeva karbonata koji je spontano istaložio pri 25 °C u sustavu početnih koncentracija reaktanata $c(\text{Ca}^{2+})_0 = c(\text{CO}_3^{2-})_0 = 2,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ te ionske jakosti $I_c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ u: a) modelnom sustavu te u sustavima uz dodatak različitih koncentracija PCA: b) $0,01 \text{ mmol dm}^{-3}$, c) $0,05 \text{ mmol dm}^{-3}$, d) $0,10 \text{ mmol dm}^{-3}$ i e) $0,25 \text{ mmol dm}^{-3}$.

Kristali kalcita najčešće talože u obliku romboedra, dok se vaterit najčešće pojavljuje u obliku pravilnih kuglica. Prethodno je IR spektroskopijom i rendgenskom difrakcijom utvrđeno da u modelnom sustavu taloži isključivo vaterit što je u skladu i s prikazanom snimkom ovog uzorka, a koja prikazuje kristale u obliku pravilnih kuglica (**Slika 8. a**). Naime, iako morfologija vaterita može biti raznolika i ovisi o nizu kemijskih i fizikalnih parametara koji određuju procese taloženja, vaterit najčešće taloži upravo u obliku pravilnih kuglica. Kao što je ranije otkriveno, vateriti u obliku pravilnih kuglica su agregati kristala veličine 25-35 nm. Proučavanjem vaterita koji je dobiven u sustavima uz dodatak PCA koncentracije $c(\text{PCA}) = 0,01 \text{ mmol dm}^{-3}$ (**Slika 8. b**) i $c(\text{PCA}) = 0,05 \text{ mmol dm}^{-3}$ (**Slika 8. c**) vidljivo je da se morfologija vaterita nije promijenila te da je u oba ova sustava također nastao vaterit u obliku pravilnih kuglica. Stoga je moguće zaključiti da PCA nije uzrokovala promjenu morfologije vaterita u istraženom području PCA koncentracija.

Međutim, morfologija istaloženog kalcita se značajno promijenila uslijed dodatka PCA u taložni sustav. Naime, kao što je već IR spektroskopijom i rendgenskom difrakcijom utvrđeno u svim sustavima u koje je dodana PCA, osim u sustavu s najnižom koncentracijom PCA ($c(\text{PCA}) = 0,01 \text{ mmol dm}^{-3}$), uz vaterit je nastala i značajna količina kalcita. Pri tom je u sustavu u kojem je koncentracija dodane PCA bila $0,05 \text{ mmol dm}^{-3}$ nastala smjesa vaterita i kalcita, dok je u preostala dva sustava ($c(\text{PCA}) = 0,10 \text{ mmol dm}^{-3}$ i $0,25 \text{ mmol dm}^{-3}$) nastao čisti kalcit. Proučavanjem snimljenih fotografija moguće je uočiti da je pri koncentracijama PCA $0,05 \text{ mmol dm}^{-3}$ (**Slika 8. c**) i $0,10 \text{ mmol dm}^{-3}$ (**Slika 8. d**) kalcit istaložio u svom tipičnom romboedarskom obliku (kristali nalik kockicama). Međutim, pri najvišoj dodanoj koncentraciji PCA $0,25 \text{ mmol dm}^{-3}$ (**Slika 8. e**) snimljeni su kristali kalcita u obliku nepravilnih (nazubljenih) kuglica. Ovo nam ukazuje na to da je povećanje koncentracije PCA dodane u taložni sustav uzrokovalo promjenu morfologije kristala kalcita. Uočenu promjenu morfologije kalcita moguće je objasniti jakom, ireverzibilnom adsorpcijom PCA na rastuće plohe kalcita.

5. ZAKLJUČAK

U radu je istraženo djelovanje antioksidansa PCA na spontano taloženje kalcijeva karbonata u sustavu početnih vrijednosti: koncentracija kalcija i karbonata $2,5 \text{ mmol dm}^{-3}$, temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 10,419$. Proces taloženja praćen je potenciometrijski, a dobiveni talozi su karakterizirani svjetlosnom mikroskopijom, infracrvenom spektroskopijom te rendgenskom difrakcijom. Na temelju provedenih istraživanja moguće je zaključiti:

- U modelnom sustavu (sustav bez dodatka PCA) taložio je isključivo vaterit u obliku pravilnih kuglica.
- Dodatak PCA u istraživanom rasponu koncentracija ($0,01 \text{ mmol dm}^{-3} \leq c(\text{PCA}) \leq 0,25 \text{ mmol dm}^{-3}$) u taložni sustav kalcijeva karbonata uzrokovao je:
 - Povećanje indukcijskog vremena te smanjenje nagiba krivulja što ukazuje na inhibicijsko djelovanje PCA na proces taloženja CaCO_3 .
 - Promjenu faznog sastava taloga; s porastom koncentracije dodane PCA smanjio se maseni udio vaterita, a povećao maseni udio kalcita u talogu. Pri najvišim upotrebljenim koncentracijama PCA ($c(\text{PCA}) = 0,10 \text{ mmol dm}^{-3}$ i $0,25 \text{ mmol dm}^{-3}$) nastao je isključivo kalcit što ukazuje na totalnu inhibiciju rasta vaterita uslijed djelovanja PCA.
 - Promjenu morfologije kalcita (morfologija vaterita se nije uočljivo promijenila); s porastom koncentracije dodane PCA morfologija kalcita se promijenila od tipičnih romboedara (kristali nalik kockicama) do nepravilnih nazubljenih kuglica. Uočenu promjenu morfologije kalcita moguće je objasniti jakom adsorpcijom PCA na rastuće plohe kristala kalcita.

Dobiveni rezultati ukazuju na jake efekte PCA na kinetiku procesa taloženja, polimorfizam i morfologiju kalcijeva karbonata.

6. POPIS LITERATURE

- [1] S. Mann, *Biomaterialization: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*, 1. izd., New York, Oxford University Press, **2001**, p. 6.
- [2] D. Kralj, Procesi taloženja: poseban osvrt na kinetiku i mehanizme nastajanja metastabilnih čvrstih faza iz elektrolitnih otopina. *Kem. Ind.* **1996**, *45(1)*, 13-26.
- [3] Lj. Brečević, D. Kralj, *Kinetics and Mechanisms of Crystal Growth in Aqueous Systems. // Interfacial Dynamics / Nikola Kalay*. New York: Marcel Dekker, **2000**. Str. 435-474.
- [4] A. E. Nielsen, Precipitation. *Croat. Chem. Acta.* **1970**, *42*, 319-333.
- [5] J. Carter, D. Lama, D. Tutu, M. Albright, K. Abdul-Jabbar. Crystallography: nucleation. URL: <https://www.britannica.com/science/nucleation> (10.06.2024.)
- [6] Lj. Brečević, H. Füredi-Milhofer, *Nucleation and Growth Kinetics of Potassium Acid Phthalate Crystals. // Industrial Crystallization / John William Mullin*. New York: Plenum Publ. Co, **1976**. Str. 277-284.
- [7] W. J. Dunning, *The Role of Brownian Motion and Diffusion. // Particle Growth in Suspension / Alfred Emanuel Smith*. London: Academic. Press, **1973**. Str. 3-28.
- [8] C. H. Bamford, C. F. H. Tipper, *Reactions in solid state. // Comprehensive Chemical Kinetics / Ian Macmillan Ward*. Amsterdam: Elsevier, **1980**. Str. 41-109.
- [9] P. T. Cardew, R. J. Davey, A. J. Ruddick, Precipitation of calcium carbonate. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II.* **1984**, *80*, 659-668.
- [10] A. L. Boskey, A. S. Posner, Studies on Calcium Phosphate Crystallization In Vitro. II. *J. Phys. Chem.* **1973**, *77*, 2313-2317.
- [11] P. T. Cardew, R. J. Davey, Nucleation and growth of solids from solution. *Proc. Roy. Soc. London A.* **1985**, *398*, 415-428.
- [12] Lj. Brečević, D. Škrtić, J. Garside, Growth of calcium oxalate crystals from aqueous solution in the presence of poly(ethylene oxide) and poly(acrylic acid). *J. Cryst. Growth.* **1986**, *74*, 399-408.
- [13] R. J. Davey, A. J. Ruddick, P. D. Guy, B. Mitchell, S. J. Maginn, L. A. Polywka, Deposition of tetrahedral amorphous carbon films using a filtered cathodic arc source. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **1991**, *24*, 176-185.
- [14] K. Sangwal, Additives and crystallization processes: *From Fundamentals to Applications*, Chichester, John Wiley & Sons Ltd, **2007**, p. 21-63.

- [15] N. Kubota, J. W. Mullin, The influence of agitator type and stirring intensity on the size distribution of crystals grown in agitated solutions. *J. Cryst. Growth*. **1995**, *152*, 203-208.
- [16] Z. Berkovitch - Yellin, J. van Mil, L. Addadi, M. Idelson, M. Lahav, L. Leiserowitz, Controlled Crystallization of Calcium Carbonate: Influence of Magnesium Ions and Alginate Matrix Properties. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3111-3122.
- [17] N. Cabrera, D. A. Vermilyea, *Growth and Perfection of Crystals*. // Nucleation and Crystal Growth / Robert H. Doremus, Brent W. Roberts, Doug Turnbull. New York: Wiley, **1958**. Str. 393-408.
- [18] B. Simon, R. Boistelle, Two-dimensional nucleation: a new interpretation of the two-step mechanism. *J. Cryst. Growth*. **1981**, *52*, 779-788.
- [19] Science Learning Hub: Carbonate chemistry, URL: <https://www.sciencelearn.org.nz/resources/469-carbonate-chemistry> (10. 6. 2024.)
- [20] Chemical Book: Charge and uses of calcium carbonate, URL: <https://www.chemicalbook.com/article/charge-and-uses-of-calcium-carbonate.htm> (10. 6. 2024.)
- [21] R. J. Reeder, *Crystal Chemistry of the Rhombohedral Carbonates*. //Carbonates: Minerology and Chemistry / Richard. J. Reeder, Paul. H. Ribbe. Washington: Mineralogical Society of America, **1983**. Str. 1-47.
- [22] R. V. Dietrich. Mineral: calcite, URL: <https://www.britannica.com/science/calcite> (11. 6. 2024.)
- [23] E. N. Caspi, B. Pokroy, P. L. Lee, J. P. Quintana, E. Zolotoyabko, On the structure of aragonite. *Acta Crystallogr. B*. **2005**, *61*, 129-132.
- [24] J. D. C. McConnell, Vaterite from Ballycraigy, Larne, Northern Ireland. *Mineral. Mag.* **1960**, *32*, 535-545.
- [25] D. L. G. Rowlands, R. K. Webster, Precipitation of vaterite in lake water. *Nature Phys. Sci.* **1971**, *229*, 158.
- [26] D. J. Sutor, S. E. Wooley, Gallstone of unusual composition: calcite, aragonite and vaterite. *Science*. **1968**, *159*, 1113-1114.
- [27] A. Hall, J. D. Taylor, The occurrence of vaterite in gastropod egg-shells. *Mineral. Mag.* **1971**, *38*, 521-522.
- [28] Lj. Brečević, V. Nöthig - Laslo, D. Kralj, S. Popović, Kinetic Approach to Biomineralization: Interactions of Synthetic Polypeptides with Calcium Carbonate Polymorphs. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1996**, *92*, 1017-1022.
- [29] S. R. Kamhi, On the structure of vaterite CaCO₃. *Acta Crystallogr.* **1963**, *16*, 770-772.

- [30] L. Kabalah-Amitai, B. Mayzel, Y. Kauffmann, A. N. Fitch, L. Bloch, P. U. P. A. Gilbert, B. Pokroy, Vaterite crystals contain two interspersed crystal structures. *Science*. **2013**, *340*, 454-457.
- [31] A. Sergeeva, A S. Vikulina and D. Volodkin, Porous Alginate Scaffolds Assembled Using Vaterite CaCO₃ Crystals. *Micromachines*. **2019**, *10*, 357.
- [32] M. Dujmović, *Sadržaj fenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet pekinškog kupusa (Brassica rapa L. subsp. pekinensis (Lour.) Hanelt) u različitim razvojnim stadijima*, Diplomski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno- matematički fakultet, **2018**.
- [33] I. Lukić, *Slobodni radikali u zdravlju i bolesti*, Diplomski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, **2014**.
- [34] Antioxidants. URL: <https://medlineplus.gov/antioxidants.html> (11. 6. 2024.)
- [35] R. Masella, C. Santangelo, M. D'Archivio, G. LiVolti, C. Giovannini, F. Galvano, Protocatechuic acid and human disease prevention. *Curr Med Chem*. **2012**, *19*, 2901-2917.
- [36] S. Kakkar, S. Bais. A review on Protocatechuic acid and Its Pharmacological Potential, 2014. URL: <https://doi.org/10.1155/2014/952943> (11. 6. 2024.)
- [37] K. Krzysztoforska, D. Mirowska, E. Widy-Tyszkiewicz. Pharmacological effects of protocatechuic acid and its therapeutic potential in neurodegenerative diseases: Review on the basis of in vivo and in vitro studies in rodents and humans, 2017. URL: <http://dx.doi.org/10.1080/1028415X.2017.1354543> (12. 6. 2024.)
- [38] N. Yuvaraj, P. Kanmani, R. Satishkumar, A. Paari, V. Pattukumar, V. Arul, Seagrass as a potential source of natural antioxidant and anti-inflammatory agents. *Pharm. Biol.* **2012**, *50*, 458-467.
- [39] S. Šafranko, *Taloženje kalcijeva oksalata u umjetnom urinu*, Diplomski rad. Osijek: Sveučilište Josip Juraj Strossmayer u Osijeku, Odjel za kemiju, **2018**.
- [40] K. Schadler. An Introduction to the Light Microscope: Light Microscopy Techniques and Application, 2021. URL: <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/an-introduction-to-the-light-microscope-light-microscopy-techniques-and-applications-351924> (12. 6. 2024.)
- [41] Photometry and reflectometry. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/photometry-and-reflectometry/ftir-spectroscopy> (12. 6. 2024.)
- [42] N. A. Vagenas, A. Gatsouli, C. G. Kontoyannis, A comparative study of FT-IR transmission and DRIFT spectra of benzoic acid, benzoate ion and their mixtures. *Talanta*. **2003**, *59*, 831-836.

- [43] X-ray Diffraction: A non-destructive technique to study all types of mineral. URL:<https://www.malvernpanalytical.com/en/products/technology/xray-analysis/x-ray-diffraction> (12. 6. 2024.)
- [44] D. Kopilović, *Analiza mineralne faze tla rendgenskom difrakcijom*, Završni rad. Rijeka: Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet, **2023**.
- [45] P. Ranjane, M. Deshpande, P. S. Kulkarni, Various polymorphs of calcium carbonate and polyethylene glycol as thermal energy storage materials. *J Appl Polym Science*. **2023**, *140*, e54533.