

Utjecaj toplinske obrade na sastav i kakvoću pčelinjeg voska

Findrik, Gabrijela

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:581814>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**Utjecaj toplinske obrade na sastav i kakvoću
pčelinjeg voska**

DIPLOMSKI RAD

Gabrijela Findrik

Zagreb, rujan, 2022.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:

Ribarstvo i lovstvo

**Utjecaj toplinske obrade na sastav i kakvoću
pčelinjeg voska**

DIPLOMSKI RAD

Gabrijela Findrik

Mentor:

Izv. prof. dr. sc. Lidija Svečnjak

Zagreb, rujan, 2022.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Gabrijela Findrik**, JMBAG 0178110622, rođen/a 08.06.1997. u Bihaću, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

Utjecaj toplinske obrade na sastav i kakvoću pčelinjeg voska

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Gabrijela Findrik**, JMBAG 0178110622, naslova

Utjecaj toplinske obrade na sastav i kakvoću pčelinjeg voska

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. izv.prof. dr. sc. Lidija Svečnjak, mentor

2. prof. dr. sc. Dragan Bubalo, član

3. prof. dr. sc. Marko Vinceković, član

Zahvala

Ovime zahvaljujem izv.prof.dr.sc. Lidiji Svečnjak na mentorstvu, izdvojenom vremenu, konstruktivnim komentarima, podršci i strpljenju.

Također se zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima, koji su bili uz mene tijekom obrazovanja i koji su mi najveća podrška.

Veliko hvala Ivanu, koji je bio uz mene tijekom cijelog procesa pisanja rada, ne samo kao tehnička podrška, nego i kao netko tko je trpio najviše.

Hvala svima što ste vjerovali u mene i kad ja nisam.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Cilj istraživanja.....	1
2. Pregled literature	2
2.1. Pčelinji vosak	2
2.1.1. Sinteza i lučenje pčelinjeg voska	2
2.1.2. Kemijski sastav pčelinjeg voska.....	4
2.1.3. Fizikalna i senzorska svojstva pčelinjeg voska	5
2.1.4. Konstrukcija saća.....	7
2.2. Tehnologija proizvodnje pčelinjeg voska	8
2.2.1. Prerada voska.....	9
2.2.2. Izrada satnih osnova	11
2.3. Povijest korištenja pčelinjeg voska.....	13
2.4. Analitičke metode za utvrđivanje kakvoće i patvorenja pčelinjeg voska	14
2.4.1. Infracrvena (IR) spektroskopija	15
2.4.2. FTIR-ATR spektroskopija	17
3. Materijali i metode	19
3.1. Prikupljanje i priprema uzoraka pčelinjeg voska za analizu.....	19
3.2. Analiza uzoraka metodom FTIR-ATR spektroskopije	21
4. Rezultati i rasprava	22
4.1. Spektralna analiza referentnih uzoraka	22
4.2. Komparativne spektralne varijacije pčelinjeg voska u odnosu na duljinu toplinskog tretmana	24
4.3. Komparativne spektralne varijacije pčelinjeg voska u odnosu na temperaturu toplinskog tretmana	29
5. Zaključak.....	33
6. Popis literature	34
Životopis	39

Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Gabrijele Findrik**, naslova

Utjecaj toplinske obrade na sastav i kakvoću pčelinjeg voska

Tehnologija proizvodnje satnih osnova uključuje sterilizaciju voska, odnosno izlaganje visokim temperaturama (najčešće 120-140 °C) kako bi se uništile spore bakterije *Paenibacillus larvae*, uzročnika američke gnjiloće pčelinjeg legla. Spomenuta toplinska obrada u određenoj mjeri može utjecati na kakvoću voska, stoga je cilj ovog rada bio istražiti utjecaj različitih toplinskih tretmana na sastav i kakvoću pčelinjeg voska. Istraživanje je bilo provedeno na uzorcima sirovog pčelinjeg voska (n=5) koji su bili izloženi različitim toplinskim tretmanima s obzirom na temperaturu (100 °C, 120 °C, 140 °C i 160 °C) i duljinu trajanja toplinske obrade (30 minuta, 1 sat, 3 sata). Ukupni kemijski sastav uzoraka analiziran je infracrvenom spektroskopijom (FTIR-ATR tehnikom snimanja spektara). Rezultati spektralne analize pokazali su kako većina primijenjenih toplinskih tretmana nije imala značajan utjecaj na cjelokupan kemijski sastav i kakvoću pčelinjeg voska. Međutim, utvrđen je negativan utjecaj izlaganja pčelinjeg voska temperaturi od 160 °C u trajanju od 3 sata na udio slobodnih masnih kiselina u pčelinjem vosku (degradacija frakcije slobodnih masnih kiselina). Također, s porastom temperature zapažen je i porast udjela estera.

Ključne riječi: pčelinji vosak, toplinska obrada, kemijski sastav, kakvoća, FTIR-ATR spektroskopija

Summary

Of the master's thesis – student **Gabrijela Findrik**, entitled

Influence of heat treatment on beeswax composition and quality

The technology of producing beeswax foundation includes beeswax sterilization which represents exposure to high temperatures (mostly between 120-140 °C) in order to destroy the spores of *Paenibacillus larvae*, bacteria causing American foulbrood. Mentioned heat treatment can affect beeswax composition and quality to some extent, so the aim of this study was to examine the influence of different heat treatments on beeswax composition and quality. The study was carried out on beeswax samples (n=5) which were exposed to different heat treatments with regard to the temperature (100 °C, 120 °C, 140 °C and 160 °C), and treatment duration (30 minutes, 1 hour and 3 hours). The overall chemical composition of beeswax samples was analyzed by infrared spectroscopy (FTIR-ATR recording technique). The results of the spectral analysis showed that most of heat treatments did not have a significant impact on the overall chemical composition and quality of beeswax. However, a negative influence of beeswax exposure to a temperature of 160 °C for 3 hours on the proportion of free fatty acids (degradation of the fraction of free fatty acids) in beeswax was observed. Furthermore, with the increase in temperature, an increase in the proportion of esters was also observed.

Keywords: beeswax, heat treatment, chemical composition, quality, FTIR-ATR spectroscopy

1. Uvod

Unutar pčelinje zajednice postoji dobna skupina pčela radilica (radilice u dobi od 12 do 18 dana – pčele graditeljice), čija je uloga sinteza i izlučivanje voska te izgradnja saća, što postižu dodatnom obradom izlučenih voštanih ljuskica. Pčele su sposobne same graditi saće bez određenog uzorka, međutim, ovisno o tipu košnice, obično prate oblik satnih osnova na kojima su prethodno utisnuti počeci stijenki karakterističnih heksagonalnih stanica saća.

Prednost korištenja satnih osnova (koje podrazumijeva prethodno užičavanje i uvoštavanje okvira) u tehnologiji modernog pčelarenja je u tome što tijekom vrcanja meda ne dolazi do destrukcije saća te se isto može ponovno iskoristiti vraćanjem u košnice. Dio pčelinjeg voska (staro saće, medni poklopci, voštano trusje i zaperci) se pretapa, pročišćuje (uklanjaju se mehaničke nečistoće), a glavna pretopljenog pčelinjeg voska koristi se za izradu satnih osnova koje se umeću u košnice te služe pčelama kao kalup za izgradnju novog saća. Izradi satnih osnova prethodi sterilizacija pri čemu se vosak izlaže visokim temperaturama (obično 120 – 140°C). Ovaj korak je posebno bitan jer se sterilizacijom uništavaju spore bakterije *Paenibacillus larvae*, uzročnika američke gnjiloće pčelinjeg legla koja se suzbija po zakonu.

Poznato je da je kemijski sastav pčelinjeg voska složen, a glavnu sastava čine esteri viših masnih kiselina, ugljikovodici i slobodne masne kiseline. Prethodno spomenuta sterilizacija, odnosno toplinska obrada u određenoj mjeri može utjecati na sastav i kakvoću pčelinjeg voska, no u dostupnoj znanstvenoj i stručnoj literaturi nema egzaktnih podataka o učincima uobičajeno korištenih temperatura i duljini trajanja toplinske obrade na pčelinji vosak.

1.1. Cilj istraživanja

Cilj je ovog rada bio istražiti utjecaj različitih toplinskih tretmana na sastav i kakvoću pčelinjeg voska.

2. Pregled literature

2.1. Pčelinji vosak

2.1.1. Sinteza i lučenje pčelinjeg voska

Pčelinji vosak je proizvod četiri para voštanih žlijezdi koje posjeduju pčele graditeljice, stoga ih nemaju ni trutovi niti matica. Ove su voštane žlijezde aktivne u razdoblju od 9. do 21. dana starosti radilice, s tim da vrhunac dosežu 12. dana, dok s 18. danom počinje slabiti njihova funkcija (Hepburn i sur. 1991.). Međutim, mogu se ponovno reaktivirati u izvanrednim situacijama, odnosno kada u zajednici postoji potreba za dodatnom gradnjom saća (Bogdanov 2017.). Vosak se izlučuje u tekućem stanju, no u dodiru sa zrakom on se stvrdnjava i poprima čvrsti oblik, u formi voštanih ljuskica (Slika 2.1.). Pčele zatim nogama prenose te ljuskice do usnog ustroja gdje ih oblikuju gnječenjem i miješanjem sa slinom te ih potom lijepe na saće koje grade. Veličina jedne voštane ljuskice iznosi oko 3 mm (Svečnjak i sur. 2019.), a za proizvodnju jedne ljuskice je potrebno između 24 i 48 sati (Hepburn i Muller 1998.).

Za proizvodnju voštanih ljuskica, nije bitna samo starost pčele, nego i drugi čimbenici koji imaju utjecaja na proizvodnju pčelinjeg voska, kao što je potreba za novim leglom, potreba za gradnjom novih stanica saća, zatim temperatura iznad 15 °C (Hepburn i sur. 1991.; 2014.) te potreba za gradnjom novih stanica za skladištenje hrane (nektara i peludi) zbog obilne paše (Bogdanov 2017.). Stoga je najintenzivnija proizvodnja voska zabilježena u razdoblju od travnja do kraja lipnja, ako su klimatski uvjeti povoljni (Bogdanov 2004a.).



Slika 2.1. Voštane ljuskice

Izvor: <https://www.sierraclub.org/sierra/slideshow/born-bee-wild-honeybees-ingo-arndt-jurgen-tautz#3> - pristup 23.05.2022.

Kao što je spomenuto, sinteza voska se odvija u određenom razdoblju života pčele radilice, jer sa starošću žlijezde odgovorne za izlučivanje voska zakržljaju. Karakteristika anatomije pčela graditeljica jest četiri para voštanih žlijezda na trbušnoj strani zatka, točnije od 4. do 7. kolutića. Građene su od tri tipa stanica: epitelne stanice, enociti i adipociti (Hepburn i sur. 1991.; Cassier i Lensky 1995.). Ove žlijezde izlučuju vosak u tekućem obliku koji prolazi kroz pore kanala epitelnih stanica i kroz hitinski sloj sa sitnim rupicama koji prekriva žlijezde. Izlučena voštana ljuskica teži oko 1 miligram, zbog čega je za proizvodnju 1 kilograma voska potrebno oko milijun ljuskica (Bogdanov 2004a.).

Za proizvodnju pčelinjeg voska potreban je med, odnosno ugljikohidrati iz meda (fruktoza, glukoza i saharoza) s obzirom na to da je pčelinji vosak proizvod metabolizma ugljikohidrata (Bogdanov 2017.). Iz toga proizlazi da će najveća proizvodnja voska biti prilikom bogate medonosne paše, a kada nema dovoljno meda, radilice recikliraju stari vosak i koriste ga za popravke saća. Stoga se, prije izlučivanja voska, radilice napune medom i skupljaju u grozdove kako bi zadržale toplinu. Metabolizmom meda povećava se temperatura, što omogućuje izlučivanje voska iz voštanih žlijezda (MacFawn 2017.). Pored meda, za proizvodnju voska potrebna je i dovoljna količina peludi, budući da pelud sadrži proteine koji su neophodni za razvoj voštanih žlijezdi (Winston 1987.). Goetze i Bessling (1959.) su dokazali nužnost peludi za konstrukciju saća tako što su proveli niz istraživanja u kojima su pčele hranjene s peludi gradile saće (a količina peludi je bila proporcionalna izgrađenom saću), dok su pčele hranjene samo medom ubrzo, bez izgrađenog saća, uginule (citirano prema Hepburn, 1986.).

Uloga voska u pčelinjoj zajednici je primarno konstrukcijska – gradnja saća. Dakle, pčele pomoću voska grade saće karakterističnog oblika, koje služi za skladištenje hrane i razvoj legla. No, osim toga, pčelinji vosak ima veliku ulogu u kemijskoj komunikaciji između pčela unutar pčelinje zajednice (Breed i sur. 1988.; Couvillon 2007.). Budući da pčele komuniciraju putem feromona koji djeluju kao kemijski signali, odnosno kemijske poruke upućene jedinkama iste zajednice (Svečnjak i sur. 2015.), tako i određeni sastojci voska utječu na njihovo ponašanje pa zahvaljujući njima, radilice primaju signale za poklapanje stanica, popravke, konstrukciju matičnjaka i miris zajednice (Hepburn 1998.). Masne kiseline pčelinjeg voska su zaslužne za prepoznavanje jedinki iste zajednice (Breed i sur. 1988.). Pored toga, utječu i na mehanička svojstva voska, budući da su odgovorne za čvrstoću i konzistenciju izgrađenog saća (Buchwald 2009.). Ugljikovodici također imaju značajan utjecaj na prepoznavanje jedinki iz zajednice s obzirom na to da je osjet mirisa pčela iznimno osjetljiv na njegove spojeve (Page i sur. 1991.). Osim konstrukcije i kemijske komunikacije, pčelinji vosak ima ulogu i u termoregulaciji i mehaničkoj komunikaciji, jer saće sudjeluje u prijenosu vibracijskih signala tijekom pčelinjeg plesa (Svečnjak i sur. 2019.).

2.1.2. Kemijski sastav pčelinjeg voska

Pčelinji je vosak proizvod složenog kemijskog sastava (Tablica 2.1.). Sastoji se od preko 300 sastojaka, od kojih dominiraju esteri viših masnih kiselina (67 %), ugljikovodici (14 %) te slobodne masne kiseline (12 %) (Tulloch 1980., citirano prema Svečnjak i sur. 2015.).

Brojna istraživanja ukazuju na razlike između kemijskog sastava pčelinjeg voska različitih vrsta pčela, ali i različitog zemljopisnog podrijetla. Beverly i sur. (1995.) proveli su analizu voska koji potječe od afričkih i europskih pasmina pčela te afrikanizirane pčele i došli do zaključka kako postoje razlike u udjelu pojedinih sastavnica pčelinjeg voska te kako ne postoje jedinstvene biomolekule koje bi karakterizirale određenu vrstu voska. Tako su alkeni C31 i C33 u većoj količini prisutni u vosku europskih pasmina u odnosu na afričke, dok je količina alkena C35 zastupljenija kod afrikanizirane pčele i afričkih pasmina u odnosu na europske. Slične rezultate su dobili Aichholz i Lorbeer (1999.) koji su u svojem radu zaključili kako se kemijski sastav pčelinjeg voska razlikuje s obzirom na podvrstu pčele, što se očituje u različitim udjelima osnovnih kemijskih sastavnica pčelinjeg voska. Najviše se ističe visoki udio slobodnih masnih kiselina (do 18 %) kod vrste *A. mellifera* u odnosu na azijske pasmine pčela kod kojih je udio ovih sastavnica znatno niži (0,8 – 4,9 %).

Od najzastupljenijih komponenti, pčelinji vosak sadrži između 26.9 % i 40.8 % monoestera, 9 % – 23 % hidroskimonoestera, 7 % – 16 % diestera, 0.3 % – 3.9 % hidroksidiestera, 11 % – 28 % ugljikovodika, 1 % – 18 % slobodnih masnih kiselina. Aichholz i Lorbeer (1999.) u svojim rezultatima ističu da je najzastupljeniji ugljikovodik u pčelinjem vosku C27 heptakozan s udjelom od 6.2 % (za vrstu *A. mellifera*). Međutim, još veću količinu zabilježili su Maia i Nunes (2013.), čiji su rezultati pokazali da je heptakozan u pčelinjem vosku u prosjeku iznosio 13 % te varirao od 9,19 % do čak 16,8 %.

Od slobodnih masnih kiselina, pčelinji vosak sadrži najviše tetrakozanske (lignocerične) kiseline i to 6 % u vosku *A. mellifera*, dok je kod azijskih vrsta pčela zastupljena s manjim udjelom (Aichholz i Lorbeer 1999.). Nešto novije istraživanje proveli su Serra Bonvehí i Orantes Bermejo (2012.) te su naveli da većinu masnih kiselina (oko 85 %) čine zasićene nerazgranate dugolančane masne kiseline. Najzastupljenija kiselina je lignocerična (C24), koju slijede palmitinska (C16) te oktakozanska (C28). Od nezasićenih masnih kiselina, prisutne su oleinska (C18:1) s 3,9 %, koju u manjim količinama slijede linolna (C18:2) te palmitoleinska (C16:1) (Jiménez i sur. 2003.).

Zabilježeni najzastupljeniji esteri su monoesteri, koji primarno potječu od palmitinske (palmitati) i oleinske kiseline (oleati) i koji se u pčelinjem vosku strukturalno pojavljuju kao zasićeni i nezasićeni esteri – alkilpalmitati (C38 – C52) i alkiloleati (C46 – C54) (Aichholz i Lorbeer 1999.; Tulloch 1980.). Ostatak estera u pčelinjem vosku s manjom zastupljenosti čine hidroskimonoesteri (9,2 %) i diesteri (7,4 %) (Aichholz i Lorbeer 1999.).

Od ugljikovodika koji se nalaze u pčelinjem vosku, 67 % otpada na linearne zasićene ugljikovodike (n-alkani), dok je razgranatih ugljikovodika prisutno svega 0,2 % (Svečnjak i sur.

2019.). Lanci nerazgranatih ugljikovodika se uglavnom kreću od C17 do C35, od kojih su najbrojniji heptakozan (C27), nonakozan (C29), hentriakontan (C31) i pentakozan (C25) (Jiménez i sur. 2014.; Maia i Nunes 2013.; Waś i sur. 2014a.; 2014b.). Dakle, u pčelinjem vosku dominiraju n-alkani s neparnim brojem C atoma.

Tablica 2.1. Kemijski sastav voska medonosne pčele (*Apis mellifera*)

SASTAVNICA	KOLIČINA (%)	DULJINA LANCA (broj C atoma)
Ugljikovodici	15,7	C23 – C35
Zasićeni (alkani)	12,8	C23 – C35
Nezasićeni (alkeni)	2,9	C29 – C33
Masne kiseline	18	C20 – C36
Lignocerična kiselina	5,8	C24:O (zasićeni) C14 – C36 ^a
Masni alkoholi	0,6	C33, C35 C24 – C34 ^a
Monoesteri (palmitati, oleati)	40,8	C38 – C54
	6,6	C40
	11,9	C46
	9	C48
Hidroksimonoesteri	9,2	C40 – C50
Diesteri	7,4	C54 – C65
Ukupni ester	57,4	C38 – C64
Ukupno	91,7	C14 – C64

^aPrema navodima drugih autora uz Aichholz i Lorbeer (1999.); Serra Bonvehi i Orantes Bermejo (2012.); Jimenez i sur. (2004.).

Izvor: Svečnjak i sur. 2019.

2.1.3. Fizikalna i senzorska svojstva pčelinjeg voska

Boja pčelinjeg voska varira od bijele, žute, tamnožute do smečkaste. Bijela boja je prisutna kod svježeg proizvedenog voska, a s vremenom se mijenja u žutu ili tamnije nijanse zbog pigmentata iz peludi i propolisa (Coggshall i Morse 1984.), dok su uzrok tamnosmeđe boje saća primarno izmet ličinki i ostaci kokona, koji zaostaju u saću (Bogdanov 2017.).

Karakterističan ugodan miris pčelinjeg voska potječe od peludi, propolisa, meda i pčela (Ferber i Nursten 1977.). Vosak ima nespecifičan i blagi okus, dok je bilo kakav neugodan okus znak prisutnosti stranih tvari (Bogdanov 2017.).

Govoreći o strukturi pčelinjeg voska, ona je kristalinična i ovisi o skladištenju. Stoga se proces kristalizacije voska povećava nakon 3 do 4 mjeseca od početka skladištenja, a ujedno se povećava i njegova elastičnost i tvrdoća (Bogdanov 2017.).

Fizikalna svojstva voska mijenjaju se zagrijavanjem pa tako vosak pri 30 – 35 °C postaje plastičan, na 46 – 47 °C njegova tvrdoća je narušena, a između 60 i 70 °C se počinje topiti. Zagrijavanjem 95 – 105 °C formira se površinska pjena, dok iznad 140 °C hlapljive tvari isparavaju (Bogdanov 2017.).

Pčelinji vosak je netopiv u vodi, a topiv u organskim otapalima, kao što je benzen, toluen, aceton, etanol, kloroform, tetraklormetan, s tim da nije topiv pri sobnoj temperaturi, nego jedino pri temperaturi iznad točke tališta, koja u prosjeku iznosi između 64 i 65 °C. U Tablici 2.2. prikazana su fizikalna i senzorska svojstva pčelinjeg voska.

Tablica 2.2. Fizikalna i senzorska svojstva pčelinjeg voska

PARAMETAR	KARAKTERISTIKA
Boja	Žuta do smeđežuta
Presjek	Fino granuliran
Miris	Poput meda
Konzistencija	Neljepljiv prilikom rezanja
Točka tališta	61 – 65°C
Specifična težina	0,950 – 0,965
Indeks refrakcije	1,440 – 1,445
Kiselinski broj	18 – 23
Esterski broj	70 – 80
Peroksidni broj	Minimalno 8

Izvor: Bogdanov 2004.

Kao i kemijski sastav, vrijednosti fizikalno-kemijskih svojstava ovise o vrsti i podvrsti pčele i njenoj adaptaciji zemljopisnim i okolišnim čimbenicima, koji utječu na sastav voska (Bernal i sur. 2005.). Buchwald i sur. (2008.) su dokazali da postoje razlike u točki tališta pčelinjeg voska, kako unutar roda *Apis*, tako i između rodova. Također, na promjenu fizikalno-kemijskih parametara može utjecati intenzitet i duljina toplinskog tretmana (Tulloch 1973.). Tablica 2.3. prikazuje utjecaj toplinskog tretmana na analitička svojstva i sastav pčelinjeg voska, gdje je vidljivo da se povećanjem temperature i duljine toplinskog tretmana esterski broj povećava uz smanjenje kiselinskog broja, a također dolazi do pada količine ugljikovodika, slobodnih kiselina i dugolančanih estera.

Tablica 2.3. Utjecaj toplinskog tretmana na analitička svojstva i sastav pčelinjeg voska

Vrijeme (h)	Temperatura (°C)	Kiselinski broj(mg KOH/g)	Esterski broj (mg KOH/g)	Omjer kiselinskog i esterskog broja	Ugljikovodici (%)	Slobodne masne kiseline (%)	Dugolančani esteri (%)
0	0	19,1	73,5	3,84	14,6	14,7	36,3
24	100	17,7	75,1	4,24	14,7	14,1	37,3
90	100	16,3	76,0	4,66	15,6	13,7	38,1
170	100	16,2	77,6	4,79	15,1	11,3	37,4
3	150	17,4	74,5	4,29	13,4	14,0	36,8
24	150	11,2	87,9	7,88	8,5	6,0	17,3
1	200	16,1	76,7	4,76	11,4	12,8	37,7
3	200	12,4	83,0	6,70	9,7	9,0	32,0

Izvor: Tulloch 1973.

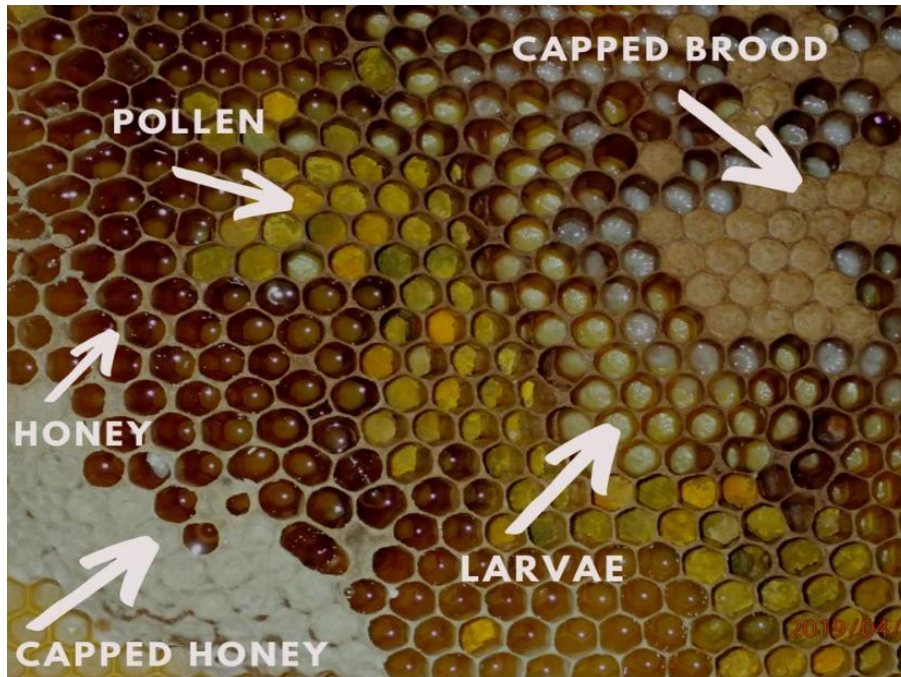
2.1.4. Konstrukcija saća

Kao što je prethodno navedeno, pčele proizvode vosak kako bi ga iskoristile kao građevni materijal za konstrukciju saća. Unutar košnice, saće grade prateći oblik okvira od vrha prema dnu, i to tako da prvi red stanica u okviru grade u poluprizmatičnom obliku kao prihvatne stanice, na koje se zatim nastavljaju pravilne šesterokutne stanice. Saće se sastoji od dva reda šesterostranih stanica, jer ih pčele grade s obje strane, pojačavajući time čvrstoću konstrukcije. Međutim, novoizgrađene stanice su primarno cilindričnog oblika, a postupno poprimaju karakteristični oblik šesterokuta. Još uvijek postoje rasprave o čimbenicima koji utječu na ovaj proces, no novija istraživanja teže pretpostavci da ponašanje pčela uvelike utječe na formiranje šesterokuta. Kako navodi Nazzi (2016.), ako stanicu okružuje šest stanica, ona će poprimiti šesterokutni oblik, dok pet susjednih stanica nerijetko rezultira nepravilnim oblikom stanice.

U prirodi pčele obično grade saće u obliku slova U, a također su češće prisutne pogreške u izgradnji nego u okvirima košnica, djelovanjem vertikalnih i bočnih sila, koje pčele bez problema popravljaju (Hepburn 2014.). Te pogreške se očituju u obliku kvadratičnih, peterostranih ili sedmerostranih stanica. Uzrok tome su popravci oštećenih dijelova saća, promjena iz radiličkih u trutovske stanice te mjesto spajanja saća prilikom gradnje s dva različita mjesta (Svečnjak i sur. 2019.).

Stanice unutar saća služe za skladištenje hrane – meda i peludi te za razvoj legla (Slika 2.2). Pčele imaju običaj radije skladištiti pelud i nektar u stanice starog saća, nego u novoizgrađene stanice (Free i Williams 1974.). Kako su trutovi fizički veći od radilica, postoji razlika u radiličkim i trutovskim stanicama – jedna radilička stanica ima promjer 5 – 6 mm, dok su trutovske nešto veće, s promjerom 6.2 do 6.9 mm (Bogdanov 2017.). Također, trutovske stanice su lako uočljive u saću jer su malo ispupčene kad su poklopljene voštanim poklopcima. Pčele po potrebi posebno grade matičnjake, odnosno stanice za razvoj matica

veliĉine oko 2,5 cm. Prepoznatljivi su po tome Źto imaju oblik Źira i nalaze se u visećem poloŹaju.



Slika 2.2. Saće medonosne pĉele

Izvor: <https://hiveworld.ca/blogs/education/hive-checks-queen-and-brood-condition> - pristup 23.05.2022

2.2. Tehnologija proizvodnje pĉelinjeg voska

Tehnologija proizvodnje pĉelinjeg voska kreće od dobrog gospodarenja saćem. Preporučuje se da se starije saće iz okvira košnice vadi svake godinu-dvije, kako bi se pĉele potaklo na gradnju novog saća. Staro saće je prepoznatljivo po tamnijoj boji, koja se javlja uslijed nakupljanja izmeta liĉinki, ostataka kukuljica (kokona) i propolisa. Posljedica tih nakupina su manje stanice, a s tim i nove pĉele manjih dimenzija (Bogdanov 2017.).

Saće u plodištu bi se trebalo zamijeniti novim svake 2 do 3 godine zbog suzbijanja Źirenja bolesti, dok se saće u medištu mijenja ako se ošteti, primjerice prilikom vrcanja. Dakle, godiŹnje treba zamijeniti otprilike 30 % saća. Iz saća je potrebno ukloniti med, kako ne bi doŹlo do fermentacije. Staro se saće zatim pretapa kako bi se uklonile neĉistoće te sterilizira nakon ĉega je spremno za ponovno iskoriŹtavanje u proizvodnji satnih osnova. IskoriŹtivost pĉelinjeg voska ovisi o udjelu starog saća i o naĉinu prerade voska. Obiĉno se radi o 30 – 50 % prinosa, no ako je u pitanju svjeŹe izgraĉeni vosak, prinos je i do 100 % (Bogdanov 2004.).

2.2.1. Prerada voska

Topljenje i kemijska ekstrakcija su dva načina prerade voska, od kojeg je topljenje kako jeftiniji i jednostavniji, tako i češće korišten način, budući da se kemijska ekstrakcija uglavnom koristi u laboratorijskim uvjetima (Bogdanov 2017.). O starosti voska ovisi i iskoristivost, iz čega možemo zaključiti da je iskoristivost svježeg proizvedenog voska veća. Takozvani djevičanski vosak ima veću iskoristivost, budući da u takvom vosku nema puno nečistoća. Stariji vosak ima prepoznatljivu tamniju boju, jer u sebi sadrži ostatke kokona, izmeta ličinki te propolis (Slika 2.3.) (Bogdanov 2017.). Stoga obrada pčelinjeg voska zahtijeva prvo pročišćavanje, koje se obično vrši topljenjem. Nadalje, pretopljeni vosak treba proći postupak sterilizacije kako bi se uništile spore uzročnika američke gnjiloće pčelinjeg legla koja se suzbija po zakonu. To podrazumijeva izlaganje pčelinjeg voska djelovanju visokih temperatura (iznad 100 °C).



Slika 2.3. Novo (lijevo) i staro (desno) saće

Izvor: <https://www.buttsbees.com/2019/10/new-wax-vs-old-wax.html> - pristup 23.05.2022.

Topljenje voska može se provoditi kipućom vodom, parom ili električnom i sunčevom energijom, a to uglavnom provode pčelari uz pomoć električnog, parnog (Slika 2.4.) i sunčanog topionika. Za topljenje se ne smiju koristiti posude od željeza, cinka, bakra i mjedi, jer vosak od spomenutih metala može potamniti (Bogdanov 2004a.). Nakon topljenja, vosak se pročišćava filtracijom. Budući da je vosak lakši od vode, ispliva na površinu, a nečistoće se nakupljaju na dnu voska koje se nakon hlađenja otklanjaju. Vosak treba što dulje ostati u vodenoj kupelji na temperaturi 75 – 80 °C. Isto tako i hlađenje mora trajati što sporije (Bogdanov 2017.).



Slika 2.4. Parni topionik

Izvor: <https://www.beeequipment.eu/round-wax-melter-with-steam-generator> - pristup 29.08.2022.

Prerada prije skladištenja pčelinjeg voska od iznimne je važnosti zbog rizika od vlage, ali i pojave štetnika – voskovog moljca. Naime, pojava velikog voskovog moljca (*Galleria mellonella*) vrlo je česta u pčelarstvu, posebice ako je riječ o starom saću, budući da ono kao takvo sadrži manje voska, a više proteina (Bogdanov 2017.). Upravo se zbog toga preporučuje recikliranje pčelinjeg saća koristeći sunčani topionik.

Odrasle jedinke voskovog moljca ne nanose štete jer nemaju razvijen usni ustroj pa štete na pčelinjacima izazivaju isključivo ličinke moljca (Slika 2.5.). Svoja jaja voskov moljac odlaže u pukotinama unutar košnice, zbog čega je nužno vršiti popravke na košnici. Nakon izlijeganja, ličinke grade svilenkaste niti u koje se mlade pčele lako upletu i ugibaju od gladi (Kwadha i sur. 2017.), što rezultira slabljenjem cjelokupne pčelinje zajednice. Pored voska, ličinke voskovog moljca hrane se i s peludi, izmetom i ostacima kokona prisutnog u saću, a dodatnu štetu čine jedući voštane poklopce, što rezultira istjecanjem i gubitkom meda (Charrière 1999.). U svakom slučaju, postoje razne metode za pročišćavanje voska, ako se sumnja na prisutnost voskovog moljca. Tako primjerice smrzavanje na niskim temperaturama (-7 °C pa do -15 °C) na dulje vrijeme uspješno eliminira sve stadije voskovog moljca. Isto tako i tretiranje voska visokim temperaturama (46 – 49 °C) ima isti učinak na suzbijanje voskovog moljca (Bogdanov 2017.). Pored fizikalnih, postoje i biološke te kemijske metode za uništavanje voskovog moljca u pčelinjem vosku, pri čemu se koriste kemikalije, kao što je sumpor, octena te mravlja kiselina (Gulati R. i Kaushik H. 2004.; Charrière 1999.).



Slika 2.5. Ličinke voskovog moljca

Izvor: <https://biochemtech.eu/products/the-greater-wax-moth-galleria-mellonella> - pristup 4.8.2022.

2.2.2. Izrada satnih osnova

Prve industrijski proizvedene satne osnove s utisnutim dnom tipičnih radiličkih stanica osmislio je njemački stolar Franz Mehring 1857. godine. Ovakav tip satnih osnova usavršio je Amerikanac Samuel Wagner koji je na dno dodao početke stijenki heksagonalnih stanica (Bogdanov 2017.). Spomenute satne osnove danas se naveliko koriste, jer omogućuju bolje iskorištavanje prostora, lakšu manipulaciju saćem te bolju preglednost saća.

U početku su se satne osnove izrađivale pomoću drvenih preša, koje su kasnije zamijenile preše od metala, gipsa i slično. Današnje preše rađene su od bakra prevučenog kositrom (Kezić i sur. 2013.). Satne osnove dobivene prešom (Slika 2.6.) su krute i ne savijaju se te se upravo zbog te krutosti lako lome na nižim temperaturama. Uz to su i deblje, stoga je broj satnih osnova proizveden prešom manji od broja satnih osnova proizvedenih valjkom.

Prvi valjci također nisu bili idealni, jer proizvedene satne osnove nisu bile jednake debljine. Tek je 1895. godine E.B. Weed usavršio način proizvodnje satnih osnova valjkom (Katalinić 1985.). Satne osnove proizvedene valjkom (Slika 2.7.) su savitljive i stoga se mogu namatati na rolu. Savitljivost se postiže upravo tako što je, prilikom prolaska kroz valjke, vosak izložen velikom pritisku zbog kojeg se promijeni raspored molekula. Pčelari mogu sami proizvoditi satne osnove reciklirajući vlastiti vosak (koristeći ručne preše), no ako je riječ o većim količinama, onda svoj vosak odnose specijaliziranim proizvođačima satnih osnova na izradu (zamjena vlastitog voska za satne osnove).



Slika 2.6. Preša za izradu satnih osnova

Izvor: <https://www.pinterest.com/pin/25600156005597791/>- pristup 24.07.2022.



Slika 2.7. Valjak za izradu satnih osnova

Izvor: <https://www.beeequipment.eu/foundation-machine>- pristup 24.07.2022.

2.3. Povijest korištenja pčelinjeg voska

Kroz povijest se pčelinji vosak koristio u raznovrsne svrhe, od praktičnih i terapijskih, do umjetničkih. O tome nam govore dokazi pronađeni u egipatskim grobnicama. Koristio se u svrhu balzamiranja, za zaštitu slika i papirusa (Bogdanov 2004.). Egipćani i Kinezi su pčelinji vosak koristili i u medicini za tretiranje rana, ali i u kozmetici (Ahnert 2015.).

Vosak su za izradu svijeća koristili drevni Egipćani, Grci, Rimljani te Kinezi. Pojavom kršćanstva u Europi, svijeće od voska su naveliko koristile crkve. Stari zakon, da svijeće moraju biti od 100 % pčelinjeg voska, zamijenjen je novim gdje se udio pčelinjeg voska u svijeći kreće između 5 i 50 % (Bogdanov 2016.).

Pored svijeća i ljepila, vosak je svoju ulogu imao i u slikarstvu. Takozvana enkaustika, metoda oslikavanja popularna u starih Grka i Rimljana, koristila je vosak kao glavni sastojak. Naime, otopljeni vosak miješao se s pigmentima i takav nanosio na podlogu. Boje na ovim slikama su jako izdržljive, dobro očuvane i ne privlače prašinu (Bogdanov 2016.). Može se naći mnogo primjeraka u muzejima diljem svijeta, od kojih su najpopularniji Fajumski portreti, odnosno portreti mumija rimskog Egipta iz razdoblja 100 – 300 godine nove ere (<https://allthingsencaustic.com/introduction-encaustic/>).

Danas se pčelinji vosak najviše koristi u izradi satnih osnova, u farmaciji (25 – 30 %), u kozmetici (25 – 30 %) kao sastavni dio sapuna, krema, balzama, masti i sličnih proizvoda za proizvodnju svijeća (20 %) te u ostale svrhe (10 – 20 %) (Bogdanov 2016.).

Primjena voska je prisutna i u prehrambenoj industriji gdje je pčelinji vosak dozvoljen kao prehrambeni aditiv E901 koji se koristi za glaziranje pekarskih proizvoda, grickalica, orašastih plodova (Bogdanov 2016.). Također je dozvoljen kao nosač boja i okusa (EFSA, 2007.; Uredba (EU) 231/2012.; FAO, 2005.).

2.4. Analitičke metode za utvrđivanje kakvoće i patvorenja pčelinjeg voska

Analitičke metode koje se primjenjuju za utvrđivanje kakvoće pčelinjeg voska podrazumijevaju fizikalno-kemijske metode, kao što je određivanje specifične težine, točke tališta, esterskog, kiselinskog te saponifikacijskog broja, kao glavnih parametara. Ove metode imaju svoj nedostatak u nemogućnosti pouzdanog utvrđivanja patvorenja, posebice parafina, stearinske kiseline i karnauba voska (Svečnjak i sur. 2019.). Problem leži u visokim granicama detekcije, što pokazuju rezultati istraživanja kojeg su proveli Bernal i sur. (2005.), gdje je minimalna količina najčešćih patvorina koja se može detektirati visoka i varira od 2 do 50 %. Međutim, određivanje fizikalno-kemijskih parametara, kao kriterija kakvoće pčelinjeg voska, zakonski je regulirano u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji (Vijeće Europe 2020.; Direktiva Komisije 2009/10/EC; Uredba (EU) 1069/2009.), no ne i za provjeru autentičnosti pčelinjeg voska (blokova voska, satnih osnova) u pčelarskom sektoru u kojem je vosak kategoriziran kao nusproizvod životinjskog podrijetla koji nije namijenjen prehrani ljudi (Uredba 1069/2009.). Ostali fizikalno-kemijski parametri koji se rjeđe određuju su specifična težina, peroksidni broj, jodni broj i sadržaj pepela u pčelinjem vosku (Bernal i sur. 2005.; Serra Bonvehí 1990.).

Prednost fizikalno-kemijskih metoda je jednostavnost njihove provedbe, zatim korištenje jeftine opreme i reagensa za analizu te postojanje referentnih vrijednosti za većinu fizikalno-kemijskih parametara (Svečnjak i sur. 2019.). Međutim, kako je već spomenuto, nedostatak ovih metoda je nepouzdanost u detekciji patvorina. Pored toga, analize mogu biti destruktivne, zahtijevaju veliku količinu uzoraka, a rezultate analize potrebno je potvrditi ponavljanjem ili primjenom dodatnih instrumentalnih (kromatografskih ili spektroskopskih) analitičkih metoda (Svečnjak i sur. 2021.).

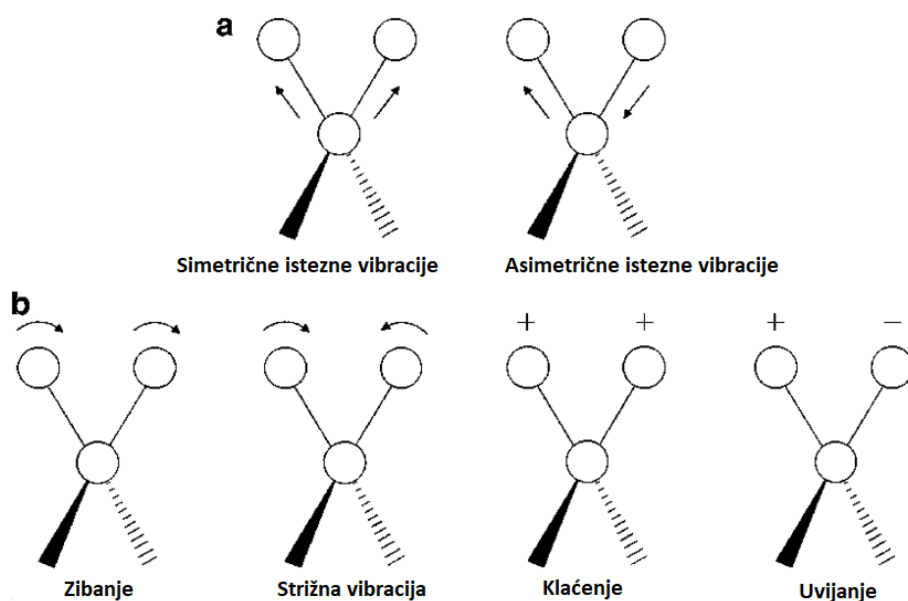
Uz fizikalno-kemijske metode, u novije su vrijeme razvijene i instrumentalne analitičke metode koje omogućuju određivanje kemijskog sastava pčelinjeg voska (kemijsku karakterizaciju), kao i pouzdano kvalitativno i kvantitativno otkrivanje patvorina u pčelinjem vosku. Tu spadaju plinska kromatografija-masena spektrometrija (engl. *gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS), plinska kromatografija s plameno-ionizacijskim detektorom (engl. *gas chromatography with flame ionization detector*, GC-FID) i infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier-transform infrared spectroscopy*, FTIR). Među navedenim instrumentalnim analitičkim metodama se radi brojnih prednosti u analitici pčelinjeg voska posebice ističe FTIR-ATR spektroskopija, odnosno FTIR spektroskopija s ATR tehnikom snimanja spektara (engl. *attenuated total reflectance* – prigušena totalna refleksija). Naime, ova metoda pruža informaciju o ukupnom kemijskom sastavu uzorka, za analizu je dovoljna mala količina uzorka (~ 0,03 g) te nije potrebno korištenje reagensa i prethodna priprema uzoraka za analizu. Radi se o nedestruktivnoj i brzjoj metodi koja je pogodna za različite vrste uzoraka, bilo da se radi o voštanim ljuskicama, blokovima voska ili satnim osnovama.

2.4.1. Infracrvena (IR) spektroskopija

Infracrvena spektroskopija je metoda spektroskopije koja koristi infracrveno zračenje kao medij za detekciju funkcionalnih skupina unutar molekula. Prilikom interakcije infracrvene svjetlosti s materijom, dolazi do pobuđivanja te vibriranja molekula. Te vibracije ovise o čvrstoći veza i masi atoma u molekuli koji vibriraju (Pavia i sur. 2015.). Ono što uzrokuje vibracije jest prelazak na više energetske razine prilikom apsorpiranja infracrvenog zračenja, zbog čega dolazi do pobuđivanja vibracija atoma povezanih kovalentnom vezom, odnosno vibracija funkcionalnih skupina unutar molekule (Stuart 2004.).

Tri bitna pojma u IR spektroskopiji su: valna duljina, frekvencija i valni broj. Infracrveno spektralno područje podrazumijeva valnu duljinu u rasponu od 0.8 do 1000 μm (800 nm–1mm) dakle, valnu duljinu veću od vidljive svjetlosti, a manju od valne duljine mikrovalova. Frekvencija (broj ciklusa u sekundi) za infracrveni dio spektra kreće se od 375 THz do 300 GHz. Valni broj je mjerna veličina koja je najčešća u IR spektroskopiji i predstavlja recipročnu vrijednost valne duljine što označava broj valova u duljini jednog centimetra te se izražava u recipročnim centimetrima (cm^{-1}) (Svečnjak i sur. 2019.). Stoga se, prema valnom broju, IR područje može podijeliti na: blisko IR područje (12500 – 4000 cm^{-1}), srednje IR područje (4000 – 400 cm^{-1}) i daleko IR područje (< 400 cm^{-1}). Upravo u srednjem IR području, posebice između ~1500 i 500 cm^{-1} , što se još naziva područje „otiska prsta“ (engl. *fingerprint region*), očitava se najveći broj signala, budući da većina organskih spojeva daje brojne apsorpcijske vrpce u ovom području (Socrates 2001.).

IR zračenje uzrokuje vibracije funkcionalnih skupina molekule, a te vibracije mogu biti istezne (engl. *stretching*) te deformacijske ili savijajuće (engl. *deformation, bending*) (Slika 2.8.). Istezne vibracije podrazumijevaju promjenu duljine veze i one mogu biti simetrične i asimetrične, a deformacijske vibracije odnose se na promjenu kuta veze. Razlikuje se više deformacijskih vibracija: ravninska njišuća vibracija ili zibanje (engl. *rocking*), strižna vibracija (engl. *scissoring*), izvanravninska njišuća vibracija ili klaćenje (engl. *wagging*) i uvojna vibracija ili uvijanje (engl. *twisting*) (Socrates 2001.; <http://struna.ihji.hr/>).



Slika 2.8. Vrste molekulskih vibracija (vibracijski modovi)

Izvor: https://www.researchgate.net/figure/Types-of-molecular-vibrations-a-Stretching-vibrations-and-b-bending-vibrations_fig7_225065938- pristup 26.08.2022.

S obzirom na vrstu vibracije, analizirana molekula može se identificirati kao IR aktivna i IR neaktivna molekula. IR aktivne molekule apsorbiraju IR zračenje (vidljive su u IR spektru) jer dolazi do promjene dipolnog momenta koju uzrokuju asimetrično istežanje i interne rotacije (Stuart 2004.). Ako nema promjene dipolnog momenta, molekula je IR neaktivna, odnosno ne apsorbira IR zračenje i to se uglavnom odnosi na slobodne atome i dvoatomne molekule s jednakim atomima, ali i neke višeatomne molekule.

IR spektar daje informacije o ukupnom kemijskom sastavu uzorka i molekulskoj strukturi, a dobiva se mjerenjem apsorpcije IR zračenja (Pavia i sur. 2015.). Prilikom snimanja spektra, može se mjeriti njegova apsorpcija i transmitancija, pri čemu se apsorpcija odnosi na količinu IR zračenja koje uzorak apsorbira, dok je transmitancija količina IR zračenja koja prolazi kroz uzorak (Stuart 2004.). Grafičkim prikazom IR spektra nekog uzorka, na y-osi je označena apsorpcija i transmitancija, dok x-osprikazuje valni broj, koji označava položaj IR apsorpcije.

IR spektroskopiju prvi su put u analizi voska koristili Birshtein i Tul'chinskii (1977.), istražujući osnovne komponente sastava voska i moguće nečistoće. Analizirani vosak ekstrahirali su iz boja starih slika od kojih su neke stare i dvije tisuće godina, čime su potvrdili stabilnost kemijskog sastava voska. Maia i sur. (2013.) proveli su napredniju analizu pčelinjeg voska, koristeći FTIR-ATR metodu u detekciji patvorina u pčelinjem vosku. Skratili su vrijeme trajanja analize na 4 minute po uzorku te nisu koristili reagense. Ovom analizom utvrđene su niske granice detekcije (0,5 – 5 %) za parafin, stearinsku kiselinu, loj i mikrokristalni vosak, kao najčešće patvorine. Istu metodu su poboljšali i unaprijedili Svečnjak i sur. (2015.) predstavljajući analitički protokol za pouzdanu rutinsku detekciju različitih patvorina u pčelinjem vosku. U svom daljnjem radu Svečnjak i sur. (2019.) dodatno su optimizirali

metodu za kvalitativno i kvantitativno određivanje patvorina u pčelinjem vosku, pri čemu su skratili vrijeme snimanja spektra na minutu, a granice detekcije ispod 3,5 %. Tanner i Lichtenberg-Kraag (2019.) utvrdili su da se korištenjem FTIR-ATR metode može otkriti, ako je u vosku korišteno, više vrsta patvorina (engl. *multiadulteration* – višestruko patvorenje). Dokazali su da se s velikom preciznošću može otkriti više patvorina u jednom uzorku voska, jednako kao i uzorak voska koji sadrži samo jednu patvorinu.

2.4.2. FTIR-ATR spektroskopija

FTIR-ATR spektroskopija je metoda snimanja koja podrazumijeva infracrvenu spektroskopiju s Fourierovom transformacijom uz dodatak ATR-a. Zahvaljujući Fourierovoj transformaciji, ova analitička metoda ima prednost u odnosu na konvencionalnu spektroskopiju, skraćujući vrijeme mjerenja s obzirom na to da frekvencije koje dolaze od izvora zračenja istovremeno padaju na detektor. Fourierov red označava zapis svake periodičke funkcije kao sumu sinusa različitih amplituda, faza i frekvencija (Tolstov 1976.).

ATR (engl. *attenuated total reflectance*) u prijevodu označava prigušenu totalnu refleksiju, što je zapravo tehnika snimanja bez razaranja tvari (Maia i sur. 2013.). Upravo zbog ovog dodatka nije potrebna prethodna priprema uzorka, nego se provodi mjerenje uzoraka u izvornom stanju (čvrstom ili tekućem) (Maia i sur. 2013.; Stuart 2004.). Ova metoda spektroskopije zahtjeva malu količinu uzorka (~ 0.03 g), što je njezina velika prednost. To je omogućeno zbog ATR dodatka (Slika 2.9.) zbog kojeg, bez obzira na debljinu uzorka, IR snop učinkovito prodire u uzorak, uglavnom između 0.5 i 5 μm (Svečnjak i sur. 2019.).



Slika 2.9. Infracrveni (FTIR) spektrometar s ATR instrumentalnim dodatkom

Kao kristali ATR instrumentalnog dodatka koriste se materijali s visokim indeksom loma svjetlosti, kao što su dijamant, silicij, germanij i cinkov selenid. Uzorak koji se analizira dolazi u dodir s tim internim refleksijskim elementom te dolazi do potpune unutarnje refleksije kada je upadni kut na dodiru kristala s uzorkom veći od kritičnog kuta (Stuart 2004.).

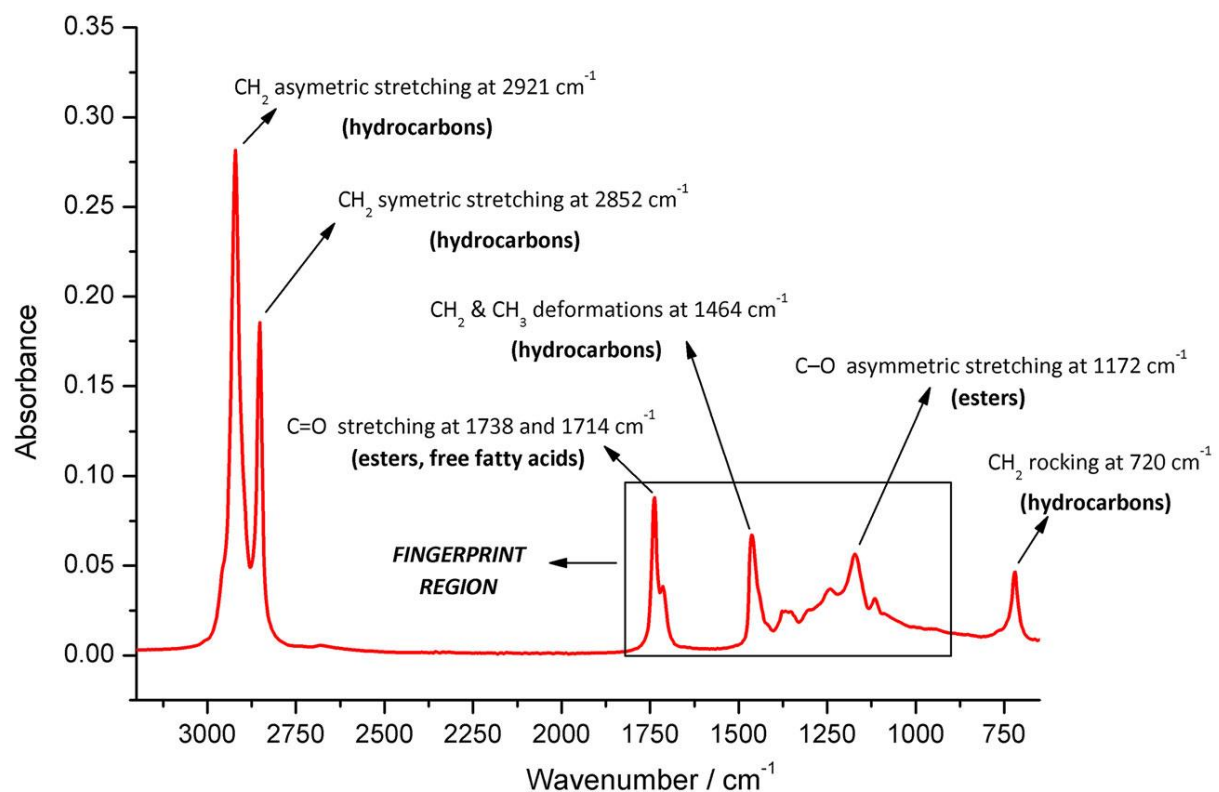
Također, FTIR-ATR spektroskopija je brza i jeftina metoda za koju nisu potrebni reagensi te s visokom preciznošću daje informacije o ukupnom kemijskom sastavu bilo kojeg biološkog uzorka. Zbog visoke preciznosti mjerenja pouzdana je i kao metoda detekcije patvorina u pčelinjem vosku, kao što je prethodno istaknuto.

Slika 2.10. pokazuje karakterističan FTIR-ATR spektar pčelinjeg voska s temeljnim apsorpcijskim vrpama (Svečnjak i sur. 2019.). Analizom IR spektra pčelinjeg voska može se utvrditi kako su najintenzivnije apsorpcije zabilježene na 2921 i 2852 cm^{-1} , a pripisane su isteznim vibracijama ugljikovodika.

U području „otiska prsta“ između 1800 i 800 cm^{-1} , uočljive su slabije apsorpcijske vrpce na 1464 cm^{-1} te 720 cm^{-1} koje također pripadaju ugljikovodicima. Radi se o deformacijskim vibracijama (na 1464 cm^{-1}) i zibujućoj vibraciji (na 720 cm^{-1}). Ove vrpce ugljikovodika su karakteristične za sve vrste voskova (Svečnjak i sur. 2019.).

U području „otiska prsta“ najistaknutija je apsorpcijska vrpca estera zabilježena na 1738 cm^{-1} koja se javlja zbog isteznih vibracija karboksilnih skupina C=O (Svečnjak i sur. 2019.).

Nešto niže od te vrpce, na 1714 cm^{-1} nalazi se vrpca dodijeljena isteznim vibracijama C=O skupina, koja je pripisana slobodnim masnim kiselinama. Na 1172 cm^{-1} zabilježene su asimetrične istezne vibracije povezane s esterima dugolančanih alifatskih masnih kiselina (oleatima, palmitatima i stearatima) (Svečnjak i sur. 2019.).



Slika 2.10. Karakterističan FTIR-ATR spektar pčelinjeg voska
Izvor: Svečnjak i sur. 2019.

3. Materijali i metode

3.1. Prikupljanje i priprema uzoraka pčelinjeg voska za analizu

Uzorci pčelinjeg voska korišteni u ovom istraživanju prikupljeni su iz arhiva uzoraka pčelinjeg voska pohranjenih u Laboratoriju za analizu pčelinjih proizvoda i biologiju pčela na pokusnom pčelinjaku Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Zavod za ribarstvo, pčelarstvo, lovstvo i specijalnu zoologiju). Ukupno je izdvojeno pet uzoraka pčelinjeg voska (satne osnove i blokovi voska) koji su označeni internom šifrom radi adekvatne i indikativne pohrane podataka: Novi Zeland, 2017. (1NZ), Cipar, 2019. (2CY), Hrvatska, 2020. (3HR), Slovenija, 2019. (4SI) i Etiopija, 2019. (5ET). Za istraživanje su odabrani uzorci autentičnog pčelinjeg voska (bez prisustva patvorina), što je dokazano prethodnim analizama istih kako bi se mogla provesti analiza ukupnog kemijskog sastava bez nečistoća ili stranih tvari koje bi narušavale pouzdanost rezultata daljnjih analiza vezanih za toplinske tretmane istraživanih uzoraka.

Na uzorcima pčelinjeg voska primijenjeno je 12 različitih toplinskih tretmana s obzirom na temperaturu (četiri varijante: 100 °C, 120 °C, 140 °C i 160 °C) i duljinu trajanja toplinskog tretmana (tri varijante: 30 minuta, 1 sat, 3 sata). Priprema uzoraka pčelinjeg voska za toplinsku obradu provedena je tako da je od svakog uzorka voska (1NZ, 2CY, 3HR, 4SI, 5ET) analitičkom preciznom vagom (Mettler Toledo) izvagano po 5g koji su zatim pohranjeni odvojeno u male staklenke označene s temperaturom i duljinom trajanja tretmana (n=12 po uzorku) (Slika 3.1.; 3.2. i 3.3.).

Toplinski tretmani provedeni su zagrijavanjem uzoraka na željenu temperaturu i duljinu trajanja tretmana u laboratorijskom sušioniku-sterilizatoru s mjeračem i regulatorom temperature. Uzorci su nakon tretmana ostavljeni da se ohlade (stvrđnu) na sobnoj temperaturi (23 ± 2 °C) (Slika 3.4). Uzorci su na istoj sobnoj temperaturi i tamnom mjestu čuvani do analize.



Slika 3.1. i 3.2. Vaganje uzoraka pčelinjeg voska



Slika 3.3. Uzorci pčelinjeg voska prije toplinske obrade



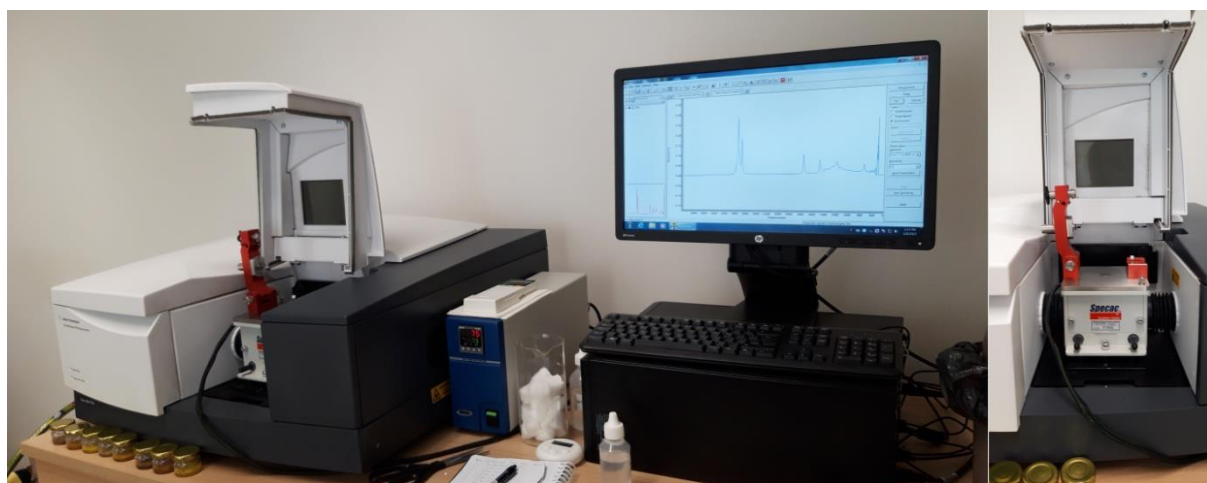
Slika 3.4. Uzorci pčelinjeg voska nakon toplinske obrade

3.2. Analiza uzoraka metodom FTIR-ATR spektroskopije

Ukupan kemijski sastav istraživanih uzoraka pčelinjeg voska prije (referentni uzorci) i nakon toplinskih tretmana analiziran je infracrvenim (FTIR) spektrometrom Cary 660 (Agilent Technologies) s instrumentalnim dodatkom (jednorefleksijski Golden Gate ATR dodatak s dijamantom kao internim refleksijskim elementom i temperaturnim kontrolerom, Specac) (Slika 3.5.). Spektralna analiza provedena je sukladno metodologiji koju su opisali Svečnjak i sur. (2019.).

Apsorpcijski spektri svakog uzorka snimljeni su dva puta, a u kasnijoj obradi rezultata u obzir se uzimala srednja vrijednost, odnosno srednji spektar.

FTIR-ATR spektri analiziranih uzoraka pčelinjeg voska pohranjeni su pomoću softverskog paketa Agilent ResolutionsPro (version 5.3.0, Agilent Technologies), a daljnja kvalitativna obrada i analiza spektralnih podataka provedena je programskim paketom Spectragryph (version 1.2.15). Za grafički prikaz rezultata (spektralnih podataka) korišten je programski paket Origin version 8.1 (Origin Lab Corporation).



Slika 3.5. FTIR spektrometar (lijevo) s ATR instrumentalnim dodatkom (desno)

4. Rezultati i rasprava

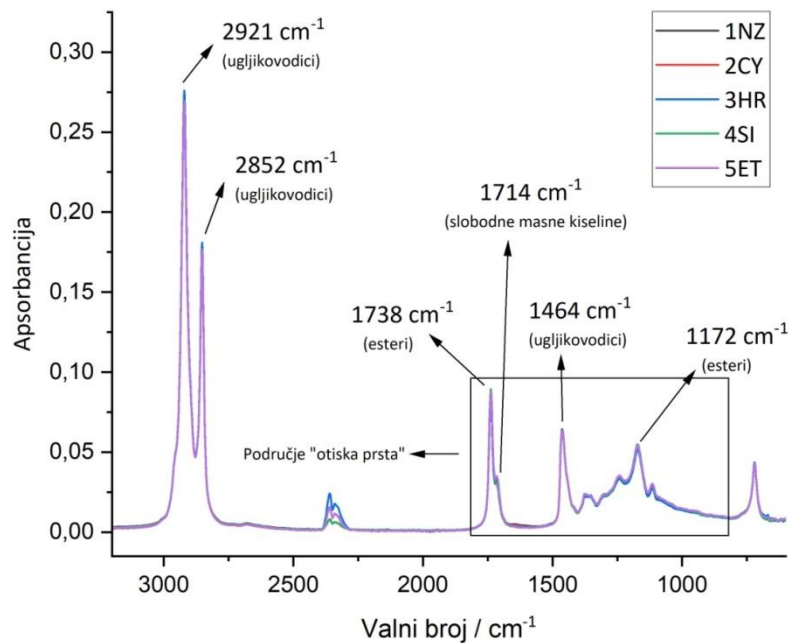
4.1. Spektralna analiza referentnih uzoraka

Na Grafikonu 4.1. prikazani su karakteristični FTIR-ATR spektri svih pet uzoraka pčelinjeg voska prije toplinskih tretmana, označeni kao referentni uzorci. Premda je za cilj ovog rada ključna analiza IR spektra uzoraka pčelinjeg voska nakon toplinskog tretmana, spektri referentnih uzoraka prikazani su radi usporedbe njihovih spektralnih profila, budući da se radi o pet uzoraka pčelinjeg voska različitog zemljopisnog podrijetla – Novi Zeland (1NZ), Cipar (2CY), Hrvatska (3HR), Slovenija (4SI) i Etiopija (5ET). Iz Grafikona 4.1. razvidno je da su neznatne spektralne razlike uočene već na ovoj razini, što je potvrđeno i prethodnim istraživanjima koja su pokazala da postoje neznatne razlike u kemijskom sastavu različitih uzoraka autentičnog pčelinjeg voska. Naime, u svojem istraživanju Aichholz i Lorbeer (1999.) su pomoću plinske kromatografije analizirali i usporedili kemijski sastav pčelinjeg voska podrijetlom od 9 različitih podvrsta pčela, te su utvrdili male razlike u udjelu pojedinih sastavnica pčelinjeg voska. Svečnjak i sur. (2019.) također su istaknuli neznatne razlike i prirodne varijacije u kemijskom sastavu na primjeru IR spektara 20 uzoraka pčelinjeg voska (zaperaka) prikupljenih iz različitih zajednica medonosne pčele. Te se neznatne varijacije očituju u udjelu svih glavnih sastavnica pčelinjeg voska (estera, ugljikovodika i masnih kiselina).

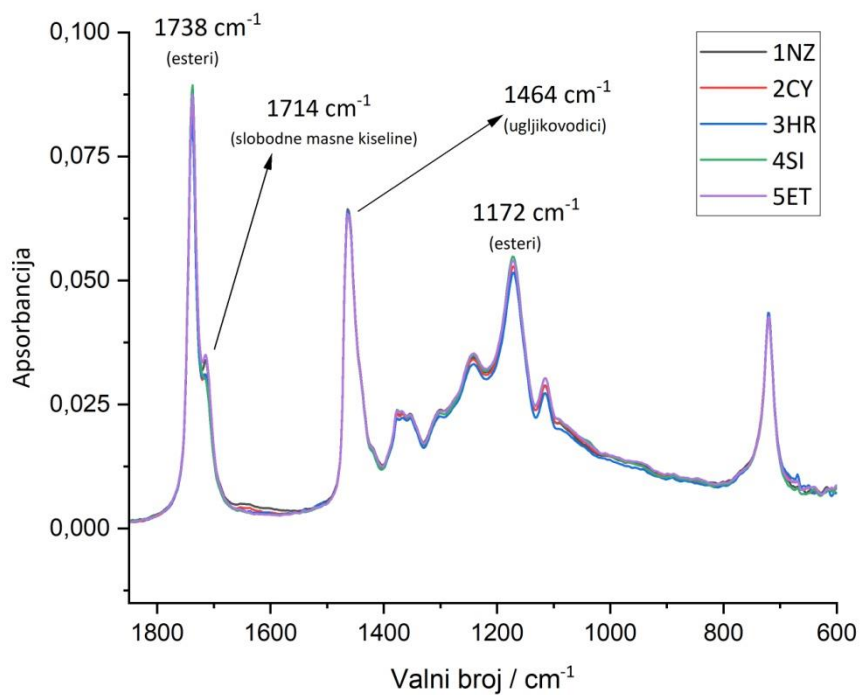
Na Grafikonu 4.2. prikazani su FTIR-ATR spektri analiziranih referentnih uzoraka pčelinjeg voska s istaknutim područjem “otiska prsta” ($1800-900\text{ cm}^{-1}$) u kojem su spomenute neznatne spektralne varijacije uočljivije u odnosu na integralne spektralne značajke, odnosno cijelo spektralno područje.

U složenom kemijskom sastavu pčelinjeg voska dominiraju esteri viših masnih kiselina (67 %), ugljikovodici (14 %) i slobodne masne kiseline (12– 18 %), čije su apsorpcijske vrpce ujedno i najintenzivnije u karakterističnom IR spektru pčelinjeg voska. Grafikon 4.1. prikazuje komparativne razlike između pet analiziranih uzoraka, pri čemu se ističe nekoliko apsorpcijskih vrpca koje su od ključne važnosti i za analizu rezultata dobivenih izvršenim toplinskim tretmanima.

Apsorpcijska vrpca s najvišim intenzitetom na 2921 cm^{-1} javlja se zbog asimetričnih isteznih vibracija CH_2 skupina (metilenska funkcionalna skupina) ugljikovodika, a slijedi ju manje intenzivna apsorpcija na 1738 cm^{-1} koja se javlja zbog isteznih vibracija karboksilnih skupina estera, slaba apsorpcijska vrpca (rame) na 1714 cm^{-1} koja pripada isteznim vibracijama karboksilnih skupina slobodnih masnih kiselina, te vrpca na 1172 cm^{-1} koja je pripisana vibracijama funkcionalnih (C—O) skupina estera. Vibracije funkcionalnih skupina ugljikovodika su također zabilježeni na 2852 cm^{-1} , gdje se javljaju simetrične istezne vibracije CH_2 skupina te na 1464 cm^{-1} , apsorpciji koja je pripisana deformacijskim vibracijama CH_2 i CH_3 skupina. Ovi su rezultati u skladu s prethodno prikazanim spektralnim značajkama autentičnog pčelinjeg voska (Maia i sur. 2013.; Svečnjak i sur. 2015.; 2019.).



Grafikon 4.1. FTIR-ATR spektri pet referentnih uzoraka autentičnog pčelinjeg voska (cijelo spektralno područje: 3200-700 cm^{-1})

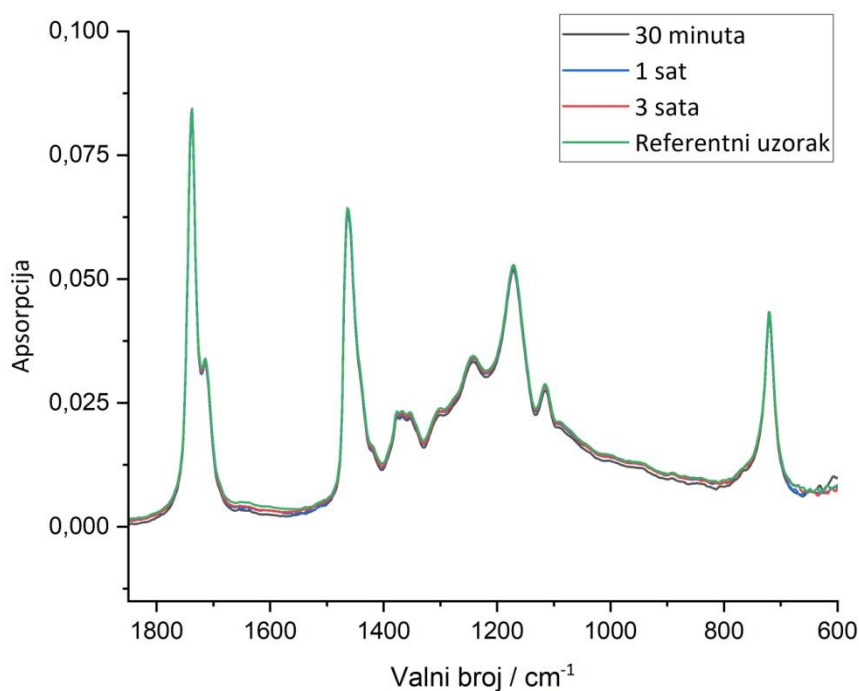


Grafikon 4.2. FTIR-ATR spektri pet referentnih uzoraka autentičnog pčelinjeg voska (područje "otiska prsta": 1800-600 cm^{-1})

4.2. Komparativne spektralne varijacije pčelinjeg voska u odnosu na duljinu toplinskog tretmana

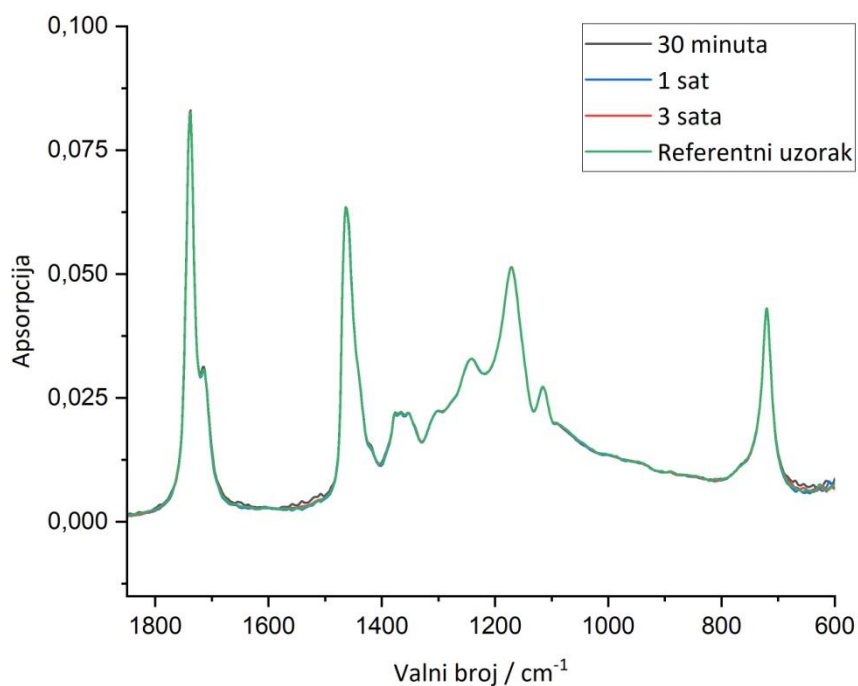
Temeljem analize srednjih spektara uzoraka pčelinjeg voska koji su bili izloženi različitim duljinama toplinskog tretmana (30 minuta, 1 sat i 3 sata) uočene su neznatne razlike u intenzitetu temeljnih apsorpcijskih vrpca. Prikazana su po četiri grafikona za svaku temperaturu (100°C, 120°C, 140°C i 160°C), budući da se analiza spektralnih podataka u odnosu na duljinu toplinskog tretmana (30 minuta, 1 sat i 3 sata) provela zasebno za svaki od pet referentnih uzoraka pčelinjeg voska.

Grafikon 4.3. prikazuje spektralno područje od 1850 do 600 cm^{-1} u kojem se uočavaju gotovo jednaki intenziteti apsorbanције srednjih spektara na primjeru uzorka pčelinjeg voska s Novog Zelanda (1NZ) pri 100 °C i sve tri duljine trajanja (30 minuta, 1 sat i 3 sata), uključujući i referentni (kontrolni) uzorak, odnosno uzorak netretiran toplinskim tretmanom. Manje promjene uočene su u intenzitetu apsorbancije isteznih vibracija karboksilnih skupina estera na 1738 cm^{-1} , gdje dolazi do promjene intenziteta apsorbancije te je najviši signal zabilježen kod uzorka pri tretmanu od 3h. Također, uočene su neznatne razlike u intenzitetu apsorbancije isteznih vibracija slobodnih masnih kiselina na 1714 cm^{-1} , gdje je najviši intenzitet signala zabilježen kod referentnog uzorka. Međutim, spomenute razlike u intenzitetu svih promatranih signala u spektru iznimno su male (u domeni instrumentalnog šuma), stoga se ne mogu povezati s utjecajem duljine trajanja toplinske obrade pčelinjeg voska pri 100 °C. Ista su zapažanja uočena u slučaju preostala četiri ispitivana uzorka s Cipra (2CY), iz Hrvatske (3HR), Slovenije (4SI) i Etiopije (5ET).



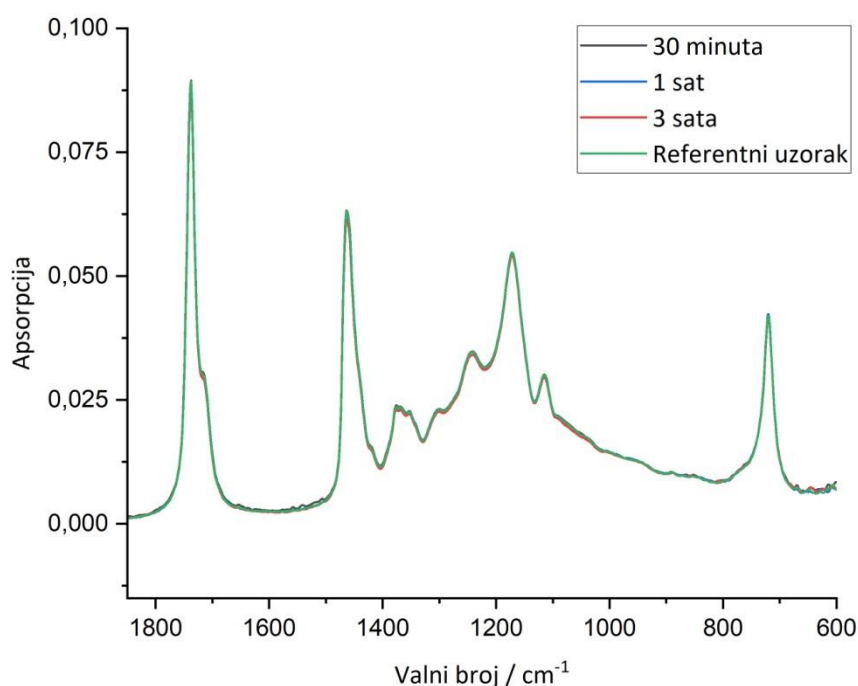
Grafikon 4.3. FTIR-ATR spektri uzorka 1NZ tretiranog različitom duljinom trajanja toplinskog tretmana pri 100 °C (područje “otiska prsta”: 1800-600 cm^{-1})

Na Grafikonu 4.4. prikazano je spektralno područje istog intervala za uzorak 3HR pri 120 °C i sve tri duljine trajanja toplinske obrade, uz referentni uzorak. Također su uočene manje razlike u intenzitetu apsorbancije između uzorka tretiranog toplinskim tretmanom od 3 sata, 30 minuta i referentnog uzorka, dok je najniži intenzitet signala zabilježen pri trajanju od 1 sat. Apsorpcijske vrpce ugljikovodika pokazuju stabilnost. Kao i kod primjene temperature od 100 °C, i u ovom su slučaju uočene spektralne varijacije u domeni instrumentalnog šuma te se ne može zaključiti kako primjena temperature od 120°C ima negativan utjecaj na sastav pčelinjeg voska (navedena su zapažanja potvrđena i na uzorcima 1NZ, 2CY, 4SI i 5ET).



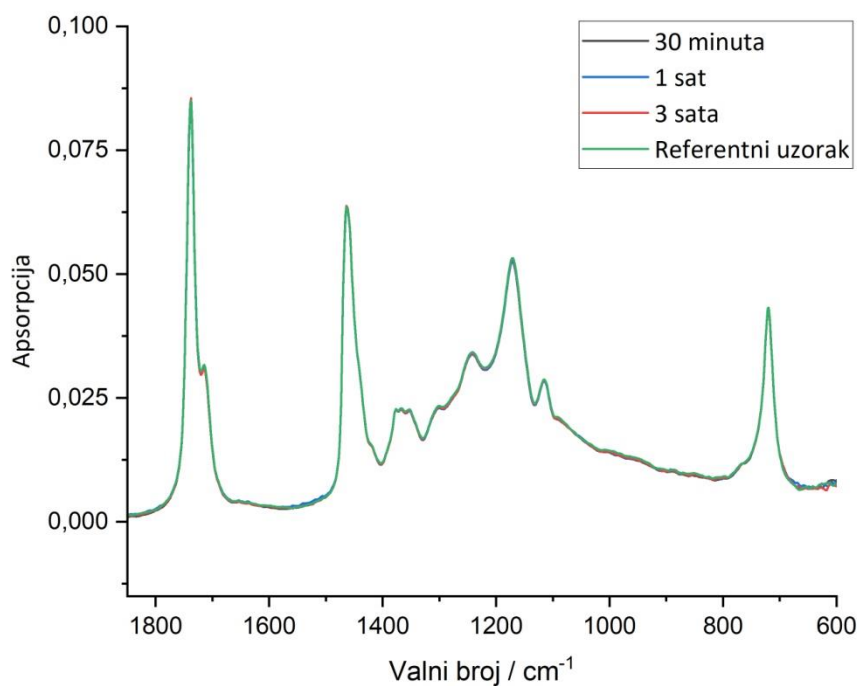
Grafikon 4.4. FTIR-ATR spektri uzorka 3HR tretiranog različitom duljinom trajanja toplinskog tretmana pri 120 °C (područje “otiska prsta”: 1800-600 cm⁻¹)

Grafikon 4.5. prikazuje srednje spektre uzorka 5ET koji je tretiran toplinskim tretmanom od 140 °C sa sve tri duljine trajanja uz komparativni prikaz sa spektrom referentnog uzorka. Uočeno je da su čak i pri višoj temperaturi ugljikovodici zabilježeni kao najstabilniji spojevi budući da nisu uočene spektralne razlike u području isteznih vibracija CH₂ skupina ugljikovodika. Esteri i slobodne masne kiseline također su pokazali stabilnost pri svim duljinama toplinske obrade pri 140 °C, a spomenuta su zapažanja potvrđena na preostala četiri ispitivana uzorka (1NZ, 2CY, 3HR i 4SI).

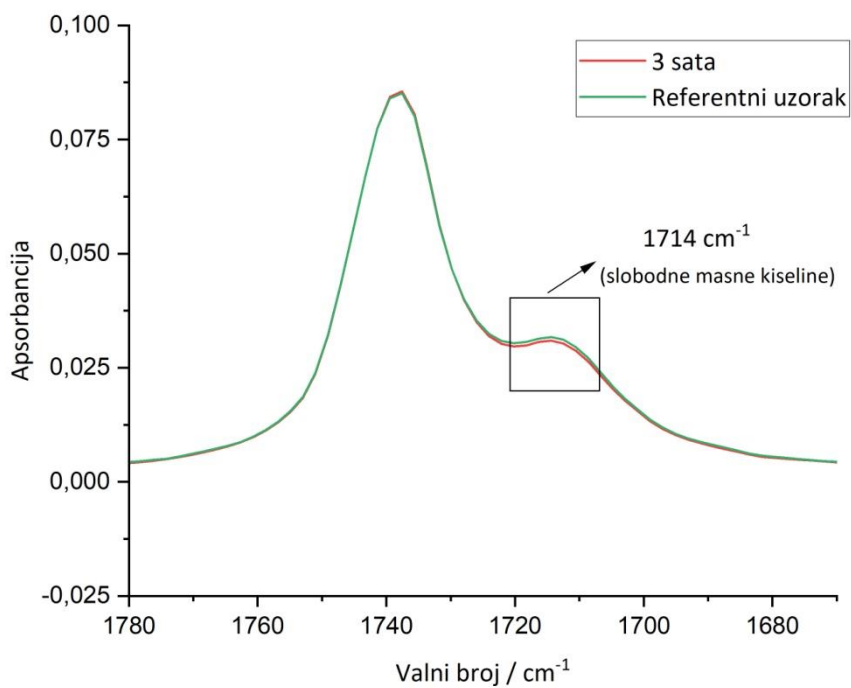


Grafikon 4.5. FTIR-ATR spektri uzorka SET tretiranog različitom duljinom trajanja toplinskog tretmana pri 140 °C (područje “otiska prsta”: 1800-600 cm^{-1})

Na Grafikonu 4.6. prikazano je spektralno područje uzorka pčelinjeg voska 2CY tretiranog sa sve tri duljine trajanja toplinskog tretmana pri 160 °C uz komparativni prikaz sa spektrom referentnog uzorka. U slučaju primjene najviše ispitivane temperature (160 °C), uočene su razlike u intenzitetu apsorbancije isteznih vibracija karboksilnih skupina estera na 1738 cm^{-1} te posebice slobodnih masnih kiselina na 1714 cm^{-1} (Grafikon 4.7.), dok su ugljikovodici pokazali stabilniji trend glede promjene intenziteta signala. Navedena spektralna zapažanja sugeriraju kako primjena duljeg toplinskog tretmana (3 sata) pri višim temperaturama (160 °C) može negativno utjecati na sastav i kakvoću pčelinjeg voska. Navedeno je u skladu s rezultatima istraživanja koje je proveo Tulloch (1973.) koja prikazuju trend smanjenja kiselinskog broja pčelinjeg voska povećanjem temperature, ali i duljine trajanja toplinske obrade. Kiselinski broj pčelinjeg voska prije zagrijavanja iznosio je 19,1 mg KOH/g, dok je pri 150 °C i zagrijavanju u duljini od 3 sata iznosio 17,4 mg KOH/g, da bi se pri 200 °C i toplinskom tretmanu od 3 sata kiselinski broj smanjio na 12,4 mg KOH/g.



Grafikon 4.6. FTIR-ATR spektri uzorka 2CY tretiranog različitim duljinom trajanja toplinskog tretmana pri 160 °C (područje “otiska prsta”: 1800-600 cm⁻¹)

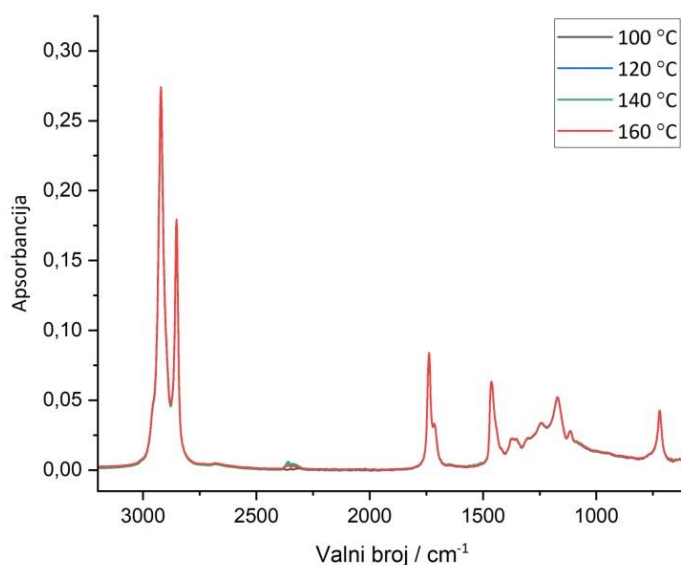


Grafikon 4.7. FTIR-ATR spektri uzorka 2CY tretiranog različitim duljinom trajanja toplinskog tretmana pri 160 °C (područje ramena: 1714 cm⁻¹)

Iz prikazanih rezultata možemo zaključiti da duljina trajanja toplinskog tretmana nema značajan utjecaj na sastav i kakvoću voska s obzirom da je spektralnom analizom uočeno da se intenziteti apsorpcijskih vrpca dominantnih sastavnica pčelinjeg voska ne mijenjaju izlaganjem većini primijenjenih tretmana. Iz prikazanih grafikona vidljivo je da su spektralne značajke tretiranih uzoraka slične u usporedbi s referentnim uzorcima. Izuzetak predstavlja primjena duljeg toplinskog tretmana (3 sata) u slučaju primjene viših temperatura, što je potvrđeno na uzorcima 2CY, 3HR i 5ET. Ova bi zapažanja trebalo potvrditi daljnjim istraživanjima.

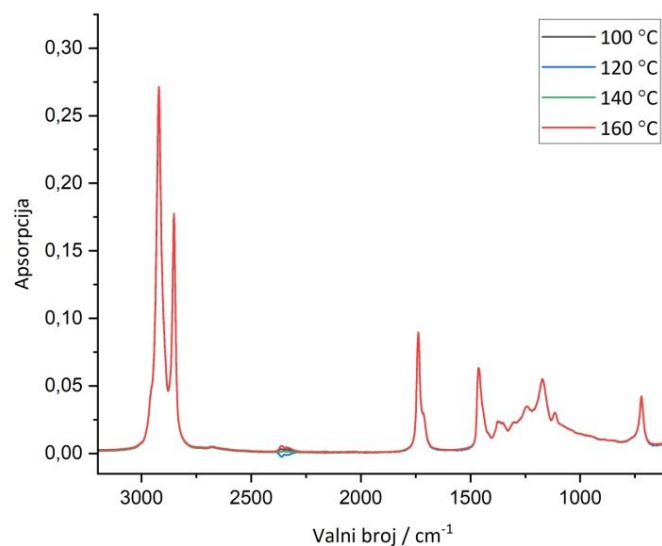
4.3. Komparativne spektralne varijacije pčelinjeg voska u odnosu na temperaturu toplinskog tretmana

Spektralne varijacije u kemijskom sastavu pčelinjeg voska uočene su prilikom analize srednjih spektara uzoraka koji su bili izloženi različitim temperaturama (100 °C, 120 °C, 140 °C i 160 °C). Grafikon 4.8. prikazuje spektre uzorka 1NZ tretiranog sa sve četiri temperature u duljini trajanja toplinskog tretmana od 30 minuta pri čemu su uočene manje razlike u intenzitetu apsorpcije između uzorka tretiranog sa 100 °C, 160 °C i 140 °C, dok je najniži intenzitet signala zabilježen pri 120 °C. Navedene neznatne spektralne varijacije potvrđuje zaključak iz prethodnog potpoglavlja, gdje najniža temperatura (100 °C) nema negativan utjecaj na sastav pčelinjeg voska; na isti način primjena najkraćeg toplinskog tretmana (30 minuta) također nema negativan utjecaj na sastav pčelinjeg voska. Ista su zapažanja potvrđena na preostala četiri ispitivana uzorka (2CY, 3HR, 4SI i 5ET).



Grafikon 4.8. FTIR-ATR spektri uzorka 1NZ tretiranog različitim temperaturama u trajanju toplinskog tretmana od 30 minuta

Na Grafikonu 4.9. prikazani su spektri uzorka 4SI tretiranog sa sve četiri temperature u trajanju od 1 sat. Uočene spektralne varijacije potvrđuju stabilnost kemijskog sastava pčelinjeg voska i u duljini trajanja toplinskog tretmana od 1 sat. Isto je potvrđeno i na uzorcima 1NZ, 2CY, 3HR i 5ET.



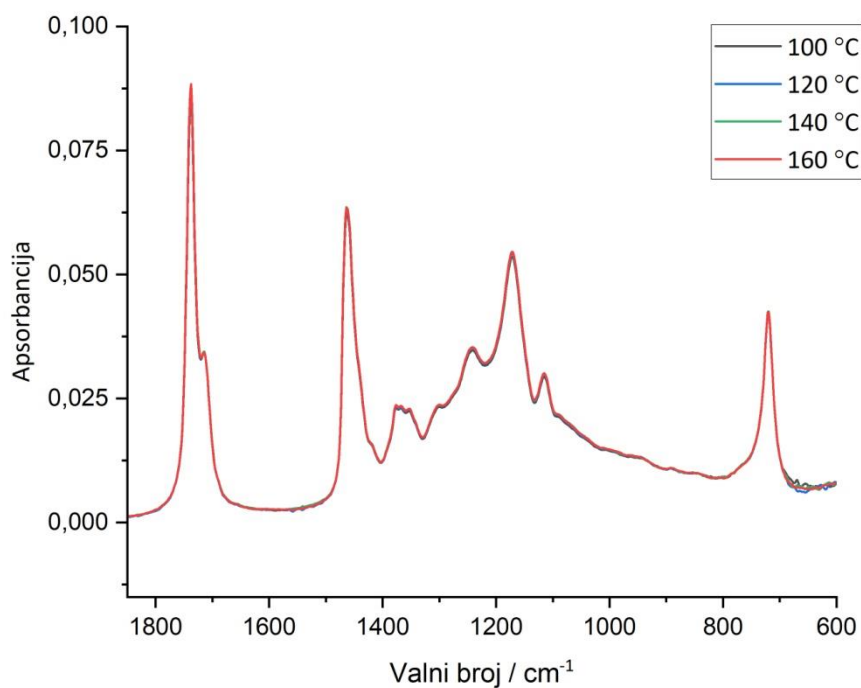
Grafikon 4.9. FTIR-ATR spektri uzorka 4SI tretiranog različitim temperaturama u trajanju toplinskog tretmana od 1 sat

Grafikon 4.10. prikazuje spektre uzorka 5ET tretiranog sa sve četiri temperature i najdužim toplinskim tretmanom u trajanju od 3 sata. Zabilježene spektralne varijacije prikazuju promjenu intenziteta apsorpcije isteznih vibracija karboksilnih skupina estera na 1738 cm⁻¹ i slobodnih masnih kiselina na 1714 cm⁻¹. Uočena promjena odnosi se na degradaciju slobodnih masnih kiselina uz neznatan porast udjela estera (Grafikon 4.11.), što se ponavlja i kod ostalih uzoraka (1NZ, 2CY, 3HR i 4SI). Prema Tullochu (1973.), izlaganje pčelinjeg voska 3 sata temperaturi od 150 °C utjecalo je na porast esterskog broja sa 73,5 mg KOH/g (vrijednost esterskog broja pčelinjeg voska prije zagrijavanja) na 74,5 mg KOH/g, da bi nakon toplinskog tretmana od 3 sata pri temperaturi od 200 °C esterski broj iznosio 83,0 mg KOH/g.

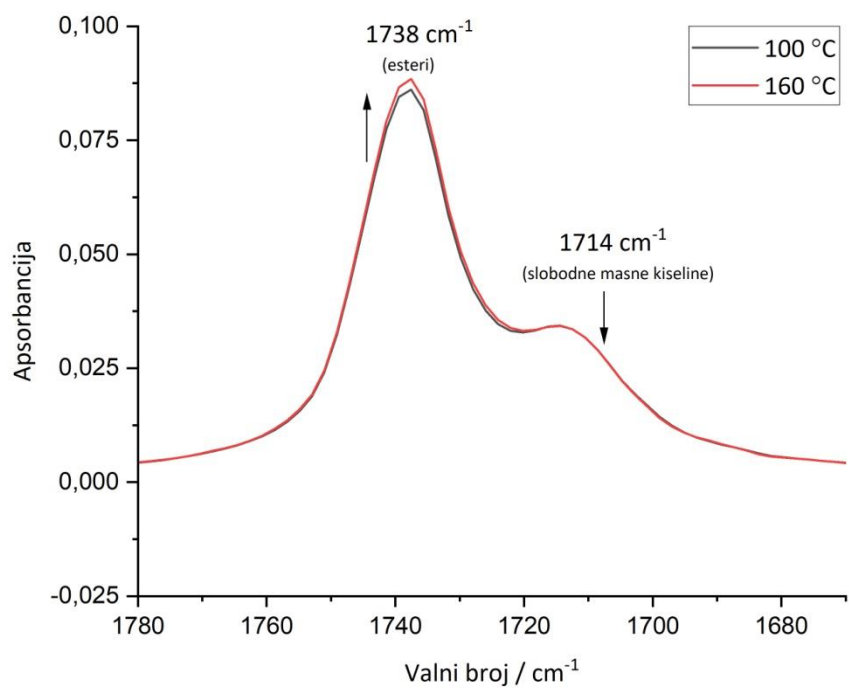
Također, temeljem analize spektralnih podataka možemo zaključiti da su slobodne masne kiseline podložne degradaciji uslijed primjene visokih temperatura, što potvrđuje prethodno navedene rezultate kako visoka temperatura pri duljem trajanju toplinskog tretmana utječe na udio slobodnih masnih kiselina.

Ovaj zaključak se u određenoj mjeri može usporediti s rezultatima istraživanja kojeg su proveli Zhuang i sur. (2022.) u kojem su tretirali nekoliko vrsta jestivih ulja visokim temperaturama (do 200 °C) i uočili značajno smanjenje udjela nezasićenih masnih kiselina.

Slične rezultate prikazali su Nduka i sur. (2021.) koji su također izlagali jestiva ulja visokoj temperaturi ($185 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$) te uočili da je došlo do smanjenja nezasićenih masnih kiselina. Stoga bi se trend smanjenja udjela slobodnih masnih kiselina mogao povezati s prisutnošću nezasićenih masnih kiselina u pčelinjem vosku (palmitoleinske, oleinske, linolne i linolenske kiseline) te njihovoj sklonosti degradaciji pri visokim temperaturama, odnosno na $160 \text{ }^\circ\text{C}$. Može se pretpostaviti da su zasićene masne kiseline u pčelinjem vosku (primarno palmitinska i tetrakozanska kiselina) stabilnije s obzirom na to da imaju više atoma vodika vezanih za atome ugljika (zasićene su) i višu točku tališta.



Grafikon 4.10. FTIR-ATR spektri uzorka 5ET tretiranog različitim temperaturama u trajanju toplinskog tretmana od 3 sata (područje "otiska prsta": $1800\text{-}600 \text{ cm}^{-1}$)



Grafikon 4.11. FTIR-ATR spektri uzorka 5ET tretiranog različitim temperaturama u trajanju toplinskog tretmana od 3 sata (područje ramena: 1714 cm⁻¹)

5. Zaključak

Rezultati ovog istraživanja pokazali su utjecaj toplinskih tretmana na kemijski sastav pet različitih uzoraka pčelinjeg voska komparativnom analizom spektara na dvije razine s obzirom na duljinu toplinskog tretmana i temperaturu. Pratilo su se moguće promjene u kemijskom sastavu praćenjem alteracija spektralnih značajki u analiziranim uzorcima pčelinjeg voska (dominantnih apsorpcijskih vrpca u spektru pčelinjeg voska koje reflektiraju udio estera, ugljikovodika i slobodnih masnih kiselina).

Temeljem rezultata spektralne analize provedene nakon većine primijenjenih toplinskih tretmana (temperatura: 100 °C, 120 °C, i 140 °C; duljina trajanja toplinskog tretmana: 30 minuta, 1 sat i 3 sata), nije uočen jasan linearan trend pada ili porasta intenziteta dominantnih apsorpcijskih vrpca u spektrima tretiranog pčelinjeg voska da bi se moglo zaključiti kako navedena toplinska obrada utječe na cjelokupan kemijski sastav pčelinjeg voska. Zabilježene promjene u intenzitetu apsorpcijskih vrpca tijekom spektralne analize su bile neznatne i kao takve, nedostatne za potvrdu takve hipoteze.

Međutim, primjenom viših temperatura (160 °C) uočena je degradacija frakcije slobodnih masnih kiselina u pčelinjem vosku koja ukazuje na termolabilnost ovih sastavnica pčelinjeg voska. Navedeni degradacijski efekt nije uočen u slučaju primjene kraćeg toplinskog tretmana (30 minuta i 1 sat), nego samo kod duljine trajanja od 3 sata. Usporedno sa smanjenjem frakcije slobodnih masnih kiselina, kod navedenog toplinskog tretmana (3 sata na 160 °C), u pčelinjem je vosku uočen neznatan porast frakcije estera.

Navedeni rezultati ukazuju na to kako uobičajeno primijenjena toplinska obrada pčelinjeg voska (toplinska obrada koja se najčešće primjenjuje tijekom procesa izrade satnih osnova) ne narušava njegov sastav i kakvoću, ali primjena viših temperatura (> 140 °C) kroz dulje razdoblje može imati degradacijski učinak u tom kontekstu.

6. Popis literature

1. Aichholz R., Lorbeer E. (1999). Investigation of comb wax of honeybees with high-temperature gas chromatography and high-temperature gas chromatography-chemical ionisation mass spectrometry I. High-temperature gas chromatography. *Journal of Chromatography*. 855(2): 601-615
2. Bernal J.L., Jiménez J.J., Del Nozal M.J., Torbio L., Martín M.T. (2005). Physico – chemical parameters for the characterization of pure beeswax and detection of adulterations. *European Journal of Lipid Science And Technology*. 107: 158-166
3. Beverly M.B., Kay P.T., Voorhees K.J. (1995). Principal component analysis of the pyrolysis mass spectra from African, Africanized hybrid and European beeswax. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 34(2): 251-263
4. Birshstein V.Y., Tul'chinskii V.M. (1977). Determination of beeswax and some impurities by IR spectroscopy. *Chemistry of Natural Compounds*. 13(2): 232-235
5. Bogdanov S. (2004a). Quality and standards of pollen and beeswax. *Apiacta*. 38: 334-341
6. Bogdanov S. (2004b). Beeswax: Quality issues today. *Bee World*. 85: 46-50
7. Bogdanov S. (2016). Beeswax: History, Uses and Trade. *Beeswax book*. Chapter 2. *Bee Product Science*
8. Bogdanov S. (2017). Beeswax: Production, Properties, Composition and Control. *Beeswax book*. Chapter 1. *Bee Product Science*
9. Breed M.D., Williams K.R., Fewell J.H. (1988). Comb wax mediates the acquisition of nest-mate recognition cues in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 85: 8766-8769
10. Buchwald R., Breed M.D., Greenberg A.R. (2008). The thermal properties of beeswaxes: unexpected findings. *Journal of Experimental Biology*. 211: 121-127. <https://doi.org/10.1242/jeb.007583>
11. Buchwald, A.R., Breed, M.D., Bjostad, L., Hibbard, B.E., Greenberg, A.R. (2009). The role of fatty acids in the mechanical properties of beeswax. *Apidologie*. 40(5): 585-594

12. Cassier P., Lensky Y. (1995). Ultrastructure of the wax gland complex and secretion of beeswax in the worker honey bee *Apis mellifera* L. *Apidologie*. 26: 17-26
13. Charrière J.-D., Imdorf A. (1999). Protection of honey combs from wax moth damage. *American Bee Journal*. 139(8): 627-630
14. Coggshall W.L., Morse R.A. (1984). *Beeswax: Production, harvesting and products*. Wicwas Press New York. New York
15. Couvillon M.J., Caple J.P., Endsor S.L., Kächer M., Russell T.E., Storey D.E., Ratnieks F.L.W. (2007). Nest-mate recognition template of guard honeybees (*Apis mellifera*) is modified by wax comb transfer. *Biology Letters*. 3(3): 228-230
16. Direktiva Komisije. (2009.). Direktiva Komisije 2009/10 / EZ od 13. veljače 2009. o izmjeni Direktive 2008/84 / EZ kojom se utvrđuju posebni kriteriji čistoće za aditive za hranu osim boja i zaslađivača. *Službeni list Europske unije*, L 44, 62–78. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32009L0010>
17. EFSA (2007). European Food Safety Authority. Beeswax (E 901) as a glazing agent and as carrier for flavours. *The EFSA Journal* 615. 128 <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/615>
18. Ferber C.E.M., Nursten H.E. (1977). The aroma of wax. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 28: 511-518
19. Free J.B., Williams I.H. (1974). Factors determining food storage and brood rearing in honeybee (*Apis mellifera* L.) comb. *Journal of Entomology*. 49: 47-63. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1974.tb00067.x>
20. Gulati R., Kaushik H. (2004). Enemies of honeybees and their management- A review. *Agricultural Reviews*. 25: 189-200
21. Hepburn H.R., Bernard R.T.F., Davidson B.C., Muller W.J., Lloyd P., Kurstjens S.P., Vincent S.L. (1991). Synthesis and secretion of beeswax in honeybees. *Apidologie*. 22(1): 21-36
22. Hepburn H.R., Muller W.J. (1998). Wax secretion in honeybees. Thermal integrity of the festoon. *Naturwissenschaften*. 75: 628-629
23. Hepburn H.R., Pirk C.W.W., Duangphakdee O. (2014). *The Chemistry of Beeswax Honeybee Nests*. Springer. pp. 319-339

24. Hepburn, H.R. (1986). Pollen and Wax Production. In: Honeybees and Wax. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-71458-0_12
25. Hepburn H.R., Magnuson P.C. (1988). Nectar storage in relation to wax secretion by honeybees. *Journal of Apicultural Research*. 27(2): 90-94
26. Jiménez J.J., Bernal J.L, Aumente S., del Nozal M.J., Martín M.T., Bernal J. (2004). Quality assurance of commercial beeswax. I. Gas chromatography-electron impact ionization mass spectrometry of hydrocarbons and monoesters. *Journal of Chromatography A*. 1024: 147-154
27. Jiménez J.J., Bernal J.L, Aumente S., Toribio L., Bernal J. (2003). Quality assurance of commercial beeswax. II. Gas chromatography-electron impact ionisation mass spectrometry of alcohols and acids. *Journal of Chromatography A*. 1007: 101-116
28. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). (2005). Beeswax Chemical and Technical Assessment (CTA), 65th JECFA meeting. Preuzeto sa: <http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jecfa/cta/65/beeswax.pdf>
29. Katalinić J. (1985). *Pčelarstvo*. Zagreb: Nakladni zavod Znanje. p. 224
30. Kwadha C.A., Ong'amo G.O., Ndegwa P.N., Raina S.K., Fombong A.T. (2017). The Biology and Control of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*. doi: 10.3390/insects8020061
31. MacFawn D.E. (2017). Honey Bee Anatomy and Physiology, <https://scstatebeekeepers.wildapricot.org/resources/Documents/2017%20Journeyman%20Lancaster%20Class/Honey%20Bee%20Anatomy%20and%20Physiology.pdf> (pristup: 27.07.2022.)
32. Maia M., Barros A.I.R.N.A., Nunes F.M., (2013). A novel, direct, reagent-free method for the detection of beeswax adulteration by single-reflection attenuated total reflectance mid-infrared spectroscopy. *Talanta*. 107: 74-80
33. Maia M., Nunes F.M. (2013). Authentication of beeswax (*Apis mellifera*) by high-temperature gas chromatography and chemometric analysis. *Food chemistry*. 136(2): 961-968
34. Nazzi, F. (2016). The hexagonal shape of the honeycomb cells depends on the construction behavior of bees. *Scientific Reports* 6. 28341. doi: 10.1038/srep28341
35. Nduka J.K.C., Omozuwa P.O., Imanah O.E. (2021). Effect of heating time on the physicochemical properties of selected vegetable oils. *Arabian Journal of Chemistry*. 14: 103063. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103063>

36. Page R.E.Jr., Metcalf R.A., Metcalf R.L., Erickson E.H.Jr., Lampman R.L. (1991). Extractable hydrocarbons and kin recognition in honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Chemical Ecology*. 17: 745-756
37. Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G.S. (1979). *Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry*. Philadelphia, W.B. Saunders Co
38. Serra Bonvehí J.S. (1990). Estudio de la adulteración de la cera de abejas (*Apis mellifera* L.). *Grasas y Aceites*. 41(1): 69-72
39. Serra Bonvehí J.S., Orantes Bermejo F.J. (2012). Detection of adulterated commercial Spanish beeswax. *Food Chemistry*. 132(1): 642-648
40. Socrates G. (2001). *Infrared and Raman characteristic group frequencies tables and charts*, 3rd Edition. John Wiley and Sons, Ltd, Chichester, United Kingdom
41. Stuart, B. (2004). *Infrared spectroscopy: Fundamentals and applications*. John Wiley and Sons, Ltd, Chichester, United Kingdom. Preuzeto sa: <https://vdoc.pub/documents/infrared-spectroscopy-fundamentals-and-applications-5840k4ho4bt0>
42. Svečnjak L., Chesson L.A., Gallina A., Maia M., Martenello M., Mutinelli F., Necasti Muz M., Nunes F.M., Saucy F., Tipple B.J., Wallner K., Waś E., Waters T.A. (2019). Standard methods for *Apis mellifera* beeswax research. *Journal of Apicultural Research*. 58(2): 1-108
43. Svečnjak L., Baranović G., Vinceković M., Prđun S., Bubalo D., Tlak Gajger I. (2015). An approach for routine analytical detection of beeswax adulteration using FTIR-ATR spectroscopy. *Journal of Apicultural Science*. 59(2): 37-49
44. Svečnjak L., Nunes F.M., Garcia Matas R., Cravedi J-P., Christodoulidou A., Rortais A., Saegerman C. (2021). Validation of analytical methods for the detection of beeswax adulteration with a focus on paraffin. *Food control*. Doi: 10.1016/j.foodcont.2020.107503
45. Tanner N., Lichtenberg-Kraag B. (2019). Identification and Quantification of Single and Multi-Adulteration of Beeswax by FTIR-ATR Spectroscopy. *European Journal of Lipid Science and Tehnology*. 121: 1-10
46. The Ancient History of Beeswax by Petra Ahnert (2015). <https://www.motherearthliving.com/health-and-wellness/natural-beauty/the-ancient-history-of-beeswax-ze0z1506zdeb/> (pristup- 12.05.2022.)

47. The History of Encaustic Painting from Fayum Funeral Portraits to Today (2011). <https://allthingsencaustic.com/introduction-encaustic/> (pristup- 26.05.2022.)
48. Tolstov, G.P. (1976). Fourier Series. Dover Publications, New York
49. Tulloch A.P. (1973). Factors affecting values of beeswax and detection of adulteration. Journal of the American Oil Chemist'S Society. 50(7): 269-272
50. Tulloch A.P. (1980). Beeswax – composition and analysis. Bee world. 61: 47-62
51. Uredba komisije (EU) br. 1069/2009 o utvrđivanju zdravstvenih pravila za nusproizvode životinjskog podrijetla i od njih dobivene proizvode koji nisu namijenjeni prehrani ljudi te o stavljanju izvan snage Uredbe (EZ) br. 1774/2002 (Uredba o nusproizvodima životinjskog podrijetla) <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1069&from=EN>
52. Uredba Komisije (EU) br. 231/2012 o utvrđivanju specifikacija za prehrambene aditive navedene u prilogima II. i III. Uredbi (EZ) br. 1333/2008 Europskog parlamenta i Vijeća <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/?uri=celex%3A32012R0231>
53. Vijeće Europe (2020). European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 10th ed. Supplement 2. EDQM -European Directorate for the Quality of Medicine and Healthcare. Strasbourg, France. pp. 1804-1805
54. Waś E., Szczęsna T., Raybak-Chmielewska H. (2014a). Determination of beeswax hydrocarbons by gas chromatography with a mass detector (GC-MS) technique. Journal of Apicultural Science. 58(1): 145-157
55. Waś E., Szczęsna T., Raybak-Chmielewska H. (2014b). Hydrocarbon composition of beeswax (*Apis mellifera*) collected from light and dark coloured combs. Journal of Apicultural Science. 58: 99-106
56. Winston M.L. (1987). The Biology Of The Honey Bee. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. pp. 281
57. Zhuang Y., Dong J., He X., Wang J., Li C., Dong L., Zhang Y., Zhou X., Wang H., Yi Y., Wang S. (2022). Impact of Heating Temperature and Fatty Acid Type on the Formation of Lipid Oxidation Products During Thermal Processing. Frontiers in Nutrition. 9: 913297. doi: 10.3389/fnut.2022.913297

Životopis

Gabrijela Findrik rođena je 8. lipnja 1997. godine u Bihaću, u Bosni i Hercegovini. Završila je Osnovnu školu „Harmani II“ u Bihaću. Opću gimnaziju Katoličkog školskog centra „Ivan Pavao II“ u Bihaću pohađala je od 2012. do 2016. godine. Iste godine upisuje preddiplomski studij Animalnih znanosti Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i završava ga 2019. godine obranom završnog rada na temu „Konstrukcija saća u medonosne pčele (*Apis mellifera L.*)“, nakon čega upisuje diplomski studij Ribarstva i lovstva na istom fakultetu. Od stranih jezika, odlično se služi engleskim jezikom u govoru i pismu. U slobodno vrijeme uči švedski jezik te svira bas gitaru. Pored toga, izrazito je zanimaju informacijske tehnologije, gdje vješto vlada mnogim alatima.