

# Priprava alginatnih mikrokuglica obilježenih nanočesticama metalnih oksida

---

Čoklica, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:708976>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Ana Čoklica**  
058213228

**PRIPRAVA ALGINATNIH MIKROKUGLICA  
OBILJEŽENIH NANOČESTICAMA METALNIH  
OKSIDA  
ZAVRŠNI RAD**

**Naziv znanstveno-istraživačkog projekta:** Integrirani sustav uzgoja alternativnih vrsta školjkaša u uvjetima klimatskih promjena

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Damir Iveković

**Zagreb, 2022.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju  
Laboratorij za opću i anorgansku kemiju i elektroanalizu

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

**Priprava alginatnih mikrokuglica obilježenih nanočesticama metalnih oksida  
Ana Čoklica, 058213228**

## **Sažetak:**

U radu je istražen postupak pripreme alginatnih mikrokuglica u emulziji te mogućnost obilježavanja alginatnih mikrokuglica nanočesticama titanijeva(IV) oksida. Alginatne mikrokuglice su pripremane internim geliranjem u emulziji tipa „voda u ulju“, pri čemu je kao vodena faza korištena vodena otopina natrijeva alginata ( $w(\text{alginat}) = 1,5 \%$ ), suncokretovo ulje korišteno je kao uljna faza, a kao interni gelator uporabljen je kalcijev karbonat. Karakterizacija uzoraka provedena je vizualno, optičkom mikroskopijom. Dobiveni rezultati pokazali su da se alginatne mikrokuglice mogu uspješno prirediti metodom u emulziji, pri čemu veličina mikrokuglica i raspodjela njihovih veličina ovisi o hidrodinamičkim uvjetima kojima je podvrgnuta emulzija. U radu je pokazano i da se postupkom u emulziji mogu prirediti i alginatne mikrokuglice obilježene titanijevim(IV) oksidom te da dodatak titanijeva(IV) oksida ne utječe na raspodjelu veličina alginatnih mikrokuglica.

**Ključne riječi:** alginatne mikrokuglice, emulzija, interno geliranje

**Rad sadrži:** 34 stranice, 19 slika, 2 tablice, 10 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Damir Iveković

**Pomoć pri izradi:** Egon Rešetar, mag. ing. bioproc.

**Datum obrane:** 16. rujna 2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study Food Technology

Department of chemistry and biochemistry  
Laboratory for general and inorganic chemistry and electroanalysis

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Food Technology

Production of alginate microspheres labelled with metal oxides  
Ana Čoklica, 058213228

### Abstract:

In this work, the method of preparing alginate microspheres in emulsion and possibility of their labelling with the titanium(IV) oxide nanoparticles were investigated. The samples of alginate microspheres were prepared by internal gelation method in the "water-in-oil" emulsion, in which the aqueous solution of sodium alginate ( $w(\text{alginate}) = 1.5\%$ ) was used as a water phase, sunflower oil served as an oil phase, and calcium carbonate was employed as an internal gelator. Characterization of the samples was carried out visually, by optical microscopy. The results obtained in this work showed that the alginate microspheres can be successfully prepared by the emulsion process. The size of the microspheres and their size distribution was shown to depend on the hydrodynamic conditions to which the emulsion is subjected. It was also shown that the alginate microspheres labelled with titanium(IV) oxide can be successfully prepared using the emulsion process and that the addition of titanium(IV) oxide does not affect the size distribution of alginate microspheres.

**Keywords:** alginate microspheres, emulsion, internal gelation

**Thesis contains:** 34 pages, 19 figures, 2 tables, 10 references

**Original in:** Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** Damir Iveković, PhD, Associate Professor

**Technical support and assistance:** Egon Rešetar, mag. proc. bioing.

**Thesis defended:** September 16, 2022

# Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
2.1. ALGINAT.....	2
2.1.1. KEMIJSKA STRUKTURA I SVOJSTVA ALGINATA .....	2
2.1.2. UPOTREBA ALGINATA .....	4
2.1.3. GELIRAJUĆE SVOJSTVO ALGINATA .....	7
2.1.4. NAČINI PRIPREME HIDROGELOVA .....	11
2.1.5. EMULGIRANJE .....	13
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>16</b>
3.1. KEMIKALIJE .....	16
3.2. INSTRUMENTACIJA .....	16
<b>3.3. METODE .....</b>	<b>17</b>
3.3.1. PRIPREMA ALGINATNIH MIKROČESTICA .....	17
3.3.2. ANALIZA ALGINATNIH MIKROKUGLICA .....	19
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>20</b>
4.1. PRELIMINARNI EKSPERIMENTI .....	20
4.2. EKSPERIMENTI PRIPRAVE ALGINATNIH MIKROKUGLICA .....	21
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>32</b>
<b>6. POPIS LITERATURE .....</b>	<b>33</b>

## 1. UVOD

Alginat je kao biomaterijal često korišten u prehrambenoj, farmaceutskoj i biomedicinskoj industriji zbog svoje biokompatibilnosti, netoksičnosti i biorazgradivosti. U prisutnosti viševalentnih kationa alginat stvara ionski gel, što predstavlja njegovo najcjenjenije svojstvo te je tako formiran gel široko prihvaćen kod inkapsuliranja bioaktivnih komponenata, lijekova i imobilizacije stanica (Ching i sur., 2017).

Ovaj je rad dio preliminarnih eksperimenata usmjerenih na sintezu alginatnih mikrokuglica obilježenih nanočesticama metalnih oksida te je njegov cilj sintetizirati alginatne mikrokuglice emulzijskim postupkom te utvrditi sastav emulzije koji vodi do nastajanja alginatnih mikrokuglica željenog raspona veličine (50-100  $\mu\text{m}$ ).

Alginatne mikrokuglice pripremane su metodom stvaranja emulzije tipa "voda u ulju" s internim geliranjem. Vodenu fazu činila je vodena otopina natrijeva alginata, a uljnu fazu suncokretovo ulje dok je kao interni gelator korišten kalcijev karbonat dispergirani u vodenoj fazi, a geliranje inicirano dodatkom octene kiseline u uljnu fazu. Provedbom eksperimenata pripreme mikrokuglica utvrđen je optimalan sastav emulzije te istražen utjecaj hidrodinamičkih uvjeta na veličinu mikrokuglica.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Alginat

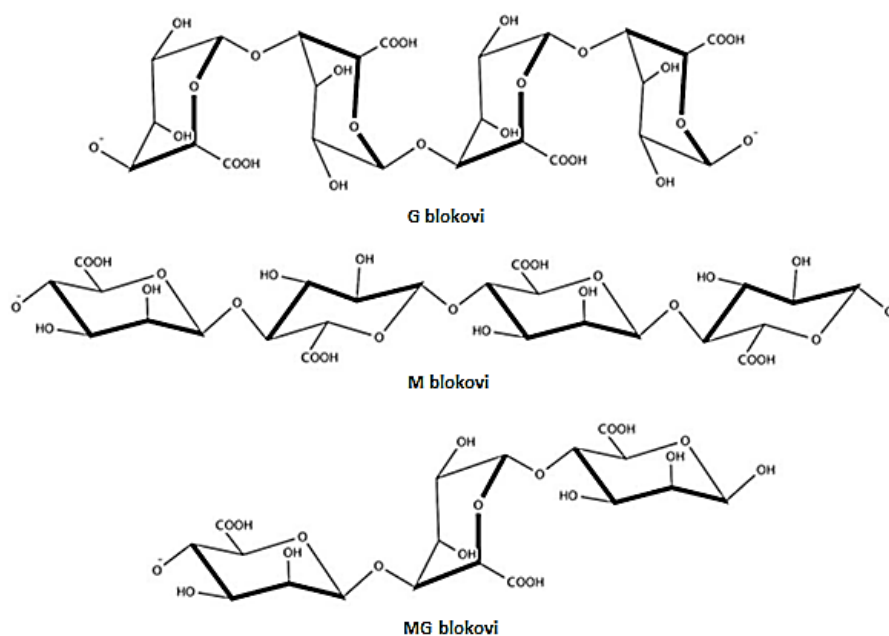
Alginat je biomaterijal, prirodno prisutan polimer, koji čini sastavni dio smeđih algi, iz kojih se najčešće dobiva, te nekih vrsta bakterija. Komercijalno dostupan alginat ekstrahira se iz smeđih algi (*Phaeophyceae*), uključujući *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum* i *Macrocystis pyrifera* tretmanom alkalnih vodenih otopina, najčešće s natrijevih hidroksidom. Dobiven ekstrakt se filtrira te se dodaje natrijev ili kalcijev klorid kako bi se alginat istaložio. Alginatna sol transformira se u alginatnu kiselinu tretmanom razrijeđenom klorovodičnom kiselinom. Nakon daljnjeg pročišćavanja i pretvorbe, proizveden je natrijev alginat topiv u vodi. Alginat se može prizvesti biosintezom iz bakterija te je takav alginat definiranije kemijske strukture i fizikalnih svojstava nego alginat dobiven iz smeđih algi. Bakterijski alginat može biti proizveden iz bakterija *Azotobacter* i *Pseudomonas*. Proces dobivanja iz bakterija dijeli se na nekoliko koraka; sinteza prekursora supstrata, polimerizacija i citoplazmatski membranski prijenos, periplazmatski prijenos i modifikacija te eksportiranje kroz vanjsku membranu. Nedavni napredak u reguliranju biosinteze alginata iz bakterija ima potencijal omogućavanja dobivanja alginata s točno definiranim svojstvima i širokom upotrebom u različitim industrijama (Lee i Mooney, 2012).

#### 2.1.1. Kemijska struktura i svojstva alginata

Kemijski gledano, alginat je sustav nerazgranatih binarnih kopolimera povezanih (1→4) glikozidnim vezama (Smidsrød i Skjåk-Bræk, 1990). Sastavljen od dviju vrsta uronskih kiselina, β-D-manuronske kiseline (M) i α-L-guluronske kiseline (G), svojstva alginata ovise o rasporedu monomernih jedinica. Prisutna su tri načina grupiranja: blokovi izmjeničnih manuronskih i guluronskih jedinica (MGMG-MGM...) zatim blokovi guluronskih jedinica (GGGG...) te manuronskih jedinica (MMM-MMM...) (Slika 1.) (Reis i sur. 2006). Alginat pokazuje veliku raznolikost kemijskog sastava, omjera G i M ostataka, ovisno o biološkom izvoru ekstrakcije i rastu i sezonskim uvjetima biljke (Heng i sur., 2003).

S jednom karboksilnom grupom u svakoj M ili G jedinici, alginat je visoko negativno nabijen polielektrolit u neutralnom ili lužnatom pH. Umrežavanje alginata s viševalentnim kationima

kao što su kalcijev, cinkov ili aluminijski ion dovodi do transformacije alginata u hidrogel. Općenito, uočeno je da GG dijade imaju veću selektivnost za kalcijeve ione nego MM dijade ili MG dijade (Heng i sur., 2003). Udio G i M jedinica u alginatu može značajno utjecati na njegova svojstva geliranja i prema tome je bitno za industrijske i akademske svrhe. Općenito, ako je udio G jedinica velik i dužina G lanca dugačka, rigidnost alginatanih lanaca je velika. Alginat s visokim G udjelom tvori britke i jake gelove, dok alginat s visokim M udjelom tvori mekše i elastičnije gelove. MG blokovi dovode do skupljanja alginata i veće fleksibilnosti. Dodatno tome, alginat ne može tvoriti gel ako je molarni udio G blokova manji od 20-25% (Hu i sur., 2021).



**Slika 1.** Moguće sekvence L-guluronske kiseline (G) i D-manuronske kiseline (M) u alginatnom polimeru (Ching i sur., 2017).

Molekularna masa alginata općenito spada u područje od 32 do 400 kDa ovisno o izvoru, vrsti i procesu ekstrakcije. Molekularna masa alginata može značajno utjecati na njegova svojstva geliranja, uključujući bubrenje, smanjenje, mehaničku rigidnost i sposobnost otpora interferencijama monovalentnih kationa. Alginat može izgubiti dio svoje biološke aktivnosti ako mu je smanjena molekularna masa, što utječe na izvedbu i funkcionalne karakteristike. Alginat s većom molekularnom masom uvijek daje veću stopu brzine geliranja, značajno povećava jačinu gela i pojačava elastičnost i viskoznost naspram alginata s nižom molekularnom masom. Nadalje, jačina alginatnog gela se povećava s povećanjem molekularne mase kad je prosječna molekularna masa manja od 240 kDa. Ako je



molekularna masa veća od 240 kDa, zanemariv je utjecaj na jačinu gela (Hu i sur., 2021).

Alginat je topljiv u vodi, ali netopljiv u organskim otapalima. Kada se otopi u vodi tvori viskozni koloid čiji volumen može nabubriti do 10 puta apsorbiranjem vode. Viskoznost alginatne otopine uglavnom je ovisna o koncentraciji i stupnju polimerizacije. Obično koncentracija alginata varira 1-10% prilikom korištenja u eksperimentima.

Topljivost alginata uglavnom je pod utjecajem 4 parametra: (1) raspodjela G i M blokova. Alginat s većim udjelom G blokova ima veću topljivost od onog s većim udjelom M blokova. U uvjetima niskog pH, alginat s većim udjelom MG blokova je topljiv, ali alginat bogat G- i M- blokovima nije topljiv; (2) pH vrijednost otapala. Važno je otopiti alginat u otapalu pH vrijednosti iznad određene kritične vrijednosti kako bi karboksilne skupine bile deprotonirane; (3) ionska jakost. Topljivost alginata se općenito povećava s povećanjem ionske jakosti sustava (vrijedi osim za ione geliranja), jer visoka ionska jakost može stisnuti molekule lanaca zbog efekta elektrostatskog odbijanja, smanjujući namotaje lanaca i viskoznost sustava; (4) prisutnost gelirajućih iona. Nužno je alginat otopiti u vodenom otapalu bez gelirajućih iona zbog tendencije alginata formiranja gela u prisutnosti gelirajućih kationa kao što su kalcijev, barijev i stroncijev ion. K tome, alginat s protoniranim karboksilnim skupinama ne može biti u potpunosti raspršen u nijednom otapalu uključujući vodene sustave (Hu i sur., 2021).

### 2.1.2. Upotreba alginata

Alginat je često korišten za modificiranje svojstava hrane kao što su reološka svojstva, sposobnost vezanje vode, stabiliziranje emulzija te formiranje filmova. Alginatne čestice najčešće su korištene hidrokolojne čestice gela jer su biokompatibilne, netoksične, biorazgradive, jeftine te jednostavne za proizvesti. Osobito su cijenjene zbog svoje primjene za inkapsulaciju. Inkapsulacija u alginatne čestice nudi zaštitničku ulogu stanicama, DNA, nutrijentima i mikrobima. Sporo otpuštanje aroma, minerala i lijekova također može biti postignuto inkapsulacijom u alginatni gel. Veličina i oblik kuglica gela ovisne o primjeni. Do danas, većina primjene čestica alginatnog gela sastoji se od inkapsulacije prehrambenih, farmaceutskih, biomedicinskih i agrikulturnih materijala. Na primjer, brojni sastojci hrane inkapsulirani su godinama, kao što su ulja/lipidi, probiotičke stanice, arome, polifenoli, vitamini, antioksidansi, peptidi, enzimi,... Stisnuta struktura matrice gela zadržava srž materijala i formira zaštitničku barijeru koja ograničava difuziju molekula ovisno o njihovoj

veličini i naboju ili minimalizira degradaciju osjetljivih materijala jezgre kod vanjskog utjecaja okoliša (Ching i sur., 2017).

### Agens za zgušnjavanje i stabiliziranje

Alginatni polimer široko je korišten u prehrambenoj industriji kao agens za zgušnjavanje i stabiliziranje. Alginat kao agens za zgušnjavanje ima dokazane prednosti u smislu kohezivnosti i adhezivnosti naspram drugih komercijalnih zgušnjivača. Čisti alginat daje viskoznost deset puta veću od komercijalnih zgušnjivača. Nadalje, alginat se uvijek koristi zajedno s drugim dodatnim zgušnjivačima kako bi se poboljšala tekstura proizvoda, organoleptička svojstva i prihvatljivost od strane potrošača. Na primjer, alginat može biti dodan u jogurt kako bi održao njegovu čvrtoću, poboljšao adhezivnost i spriječio pad viskoznosti tijekom termičke obrade, dovodeći do kremastije teksture sistema. Kao agens za stabiliziranje, alginat se može dodati u pivo radi stabiliziranja pjene. Može se pomiješati i s emulgiranim kapljicama ulja za pripremu emulgiranih gelova, koji imaju visoka tiksotropna svojstva i potencijal u korištenju u majonezi i sličnim namirnicama s niskim udjelom masti. Kalcijev alginat se može dodavati u pekmeze ili salate kako bi dao gladak okus. Može se dodati i u sladoled za stabilizaciju kristala leda (Hu i sur., 2021).

### Funkcionalna zaštita: premaz i inkapsulacija

Alginat je izvrtan funkcionalni zaštitnik s kontroliranim geliranjem. Alginat može biti korišten u hrani kao premaz. Na primjer, alginatom se može premazati svježe i prerezano voće i povrće kako bi se smanjila oksidacija masti, rast mikroba, gubitak nutrijenata, spriječilo raspadanje hrane tijekom skladištenja i transporta i također efikasno poboljšao rok trajnosti.

Alginat kao agens za inkapsuliranje široko je korišten za inkapsulaciju specifičnih nutrijenata, kao što su vitamin B<sub>1</sub>, vitamin B<sub>12</sub> i vitamin C. Inkapsulirane tvari mogu se dodati hrani i time pružiti određenu nutritivnost. Inkapsulacija alginatom korištena je u tehnologiji proizvodnje sokova gdje se kao inkapsulant koristi enzim pektinaza koji osigurava bistrinu sokova (Hu i sur., 2021).

### Biomedicina

Alginat je široko korišten u biomedicinskoj industriji zbog svoje biokompatibilnosti, antioksidativne i protuupalne sposobnosti. Korištenje u pripravama za zacjeljivanje rana

pokazuje prednosti naspram konvencionalnih formula, gdje alginat pruža zaštitu rane od patogena, zadržava vlagu oko rane te smanjuje rizik od upale i ubrzava zacjeljivanje.

Kalcijev alginat se koristi u kultiviranju stanica *in vitro* zbog svoje biokompatibilnosti, neimunogenosti, u stanicama kao što su hondrociti, mioblasti i osteoblasti.

Kalcijev alginat dokazan je nosač stanica za okoštavanje u animalnim modelima već od prije 30 godina te može efektivno dovesti do regeneracije kostiju kroz dostavu faktora rasta i osteoinduktivnih faktora. U današnje vrijeme, bio-kompleksni alginatni hidrogel može simulirati biološke funkcije ekstracelularnog matriksa proteina i ima obećavajući potencijal za *in situ* obnovu kostiju (Hu i sur., 2021).

## Farmacija

Alginat je korišten kao vezivno sredstvo u tabletama za kontrolirano otpuštanje i trenutno otpuštanje sustava lijekova. Razvijeno je nekoliko sustava dopremanja lijekova koristeći alginat i svaki je pokazao superiornu biokompatibilnost i sigurnost naspram inorganskih čestica kao što je silika. Kalcijev alginat može biti korišten u dopremanju ciljanih lijekova kao što su bakteriofagi za kontroliranu aktivnost stanica (Hu i sur., 2021).

## Druge upotrebe

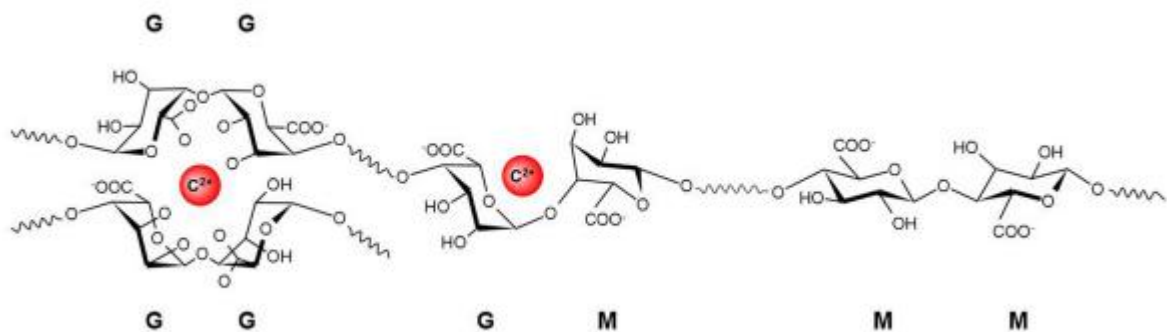
Alginat je smatran efikasnim adsorbentnim materijalom za adsorpciju zagađivača, uglavnom metalnih iona u otpadnoj vodi od pesticida, antibiotika i teških metala te je tako često korišten u svrhu zaštite okoliša.

Alginat kao bio-tinta može biti korišten u tehnologiji 3D-printanja jer pokazuje dobru mehaničku potporu, kompletnost modela printanja i relativno zadovoljavajuća teksturna svojstva. Trodimenzionalno printanje omogućava izradu kompleksnih struktura u kratkom vremenskom periodu i po nižoj cijeni.

Alginat se može koristiti u baterijama kao vezivna tvar zbog svoje kohezivnosti. Također može biti korišten u proizvodnji netoksičnih i biorazgradivih premaza za izolaciju boje u industriji printanja i bojanja. Alginat može biti u dodan u maske za lice radi efektivne difuzije nutrijenata i brze dostave apsorpcije zbog svoje sigurnosti, zadržavanja vlage, neiritirajućih, antioksidativnih, protuupalnih i antibakterijskih svojstva. Također predstavlja povoljan sastojak za kožu kao glavni matriks maske zbog svoje biorazgradivosti (Hu i sur., 2021).

### 2.1.3. Gelirajuće svojstvo alginata

Jedno od najcjenjenijih svojstava aglinata u prehrambenoj industriji je sposobnost stvaranja ionskog gela u prisustvu viševalentnih kationa. Gel formiran ovakvom interakcijom široko je prihvaćen kod inkapsuliranja bioaktivnih komponenata u prehrambenoj industriji, lijekova u farmaceutskoj industriji i imobilizaciji stanica u biotehnološkoj industriji. Vežanje dvovalentnog kationa na alginat selektivan je proces, odnosno alginat ima određeni afinitet za katione ( $Mn < Zn, Ni, Co < Fe < Ca < Sr < Ba < Cd < Cu < Pb$ ). Zbog praktične primjene, upotreba visoko toksičnih kationa kao što su Pb, Cu, Cd je ograničena. Upotreba Sr i Ba koji su slabo toksični, korišteni su u imobilizaciji stanica, ali u jako malim koncentracijama. Ca je netoksičan i prema tome najšire i najčešće korišten kod formiranja alginatnog gela. Jedini nedostatak mu je što je nestabilan u prisutnosti kelata (citrati, fosfati, karbonati, laktati). Afinitet alginata također direktno ovisi o udjelu G-blokova u strukturi (Ching i sur., 2017). Istraživanja su pokazala da kalcijevi ioni imaju veći afinitet za GG blokove nego za MM i MG blokove, formirajući „egg-box“ strukturu s GG blokovima i time povezuju polimerne lance međusobno bliže. Alginati s većim udjelom G blokova imaju polimerne lance manje fleksibilne nego alginti s većim udjelom M blokova (slika 2.) (Lee i sur., 2006).



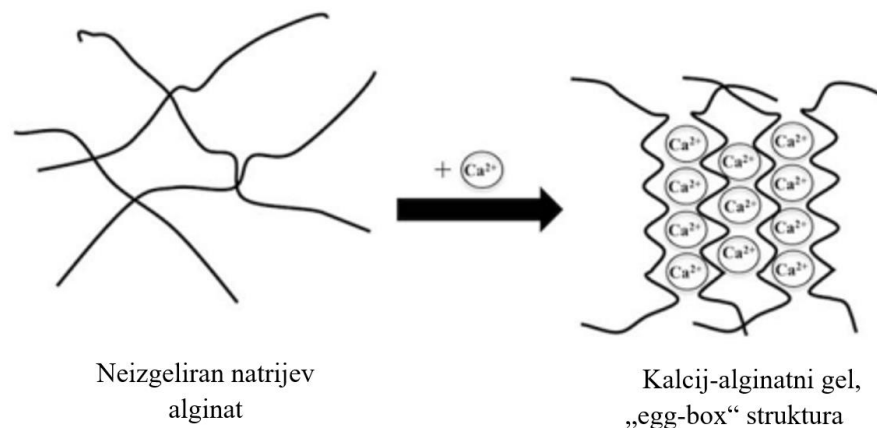
**Slika 2.** Prikaz molekularne strukture alginata poveživanja s dvovalentnim kationima (C: kation, G:  $\alpha$ -L-glukuronska kiselina; M:  $\beta$ -D-manuronska kiselina) (Hu i sur., 2021).

Geliranje alginata može biti inducirano u prisutnosti kationa kao što su  $H^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Al^{3+}$  itd. Gelovi alginata dobiveni pomoću iona formirani su uglavnom zbog elektrostatskih interakcija između negativno nabijenih karboksilnih skupina molekula alginata i pozitivno nabijenih kationa, dovodeći do stvaranja polielektrolitnih kompleksa. Sposobnost stvaranja gelova (polielektrolitnih kompleksa) povećava potencijal alginata kao hidrogelne komponente. Gelovi dobiveni drugačijim ionima imaju drugačija svojstva geliranja i

karakteristike (Hu i sur., 2021). Većina dvovalentnih kationa može formirati alginatni gel formiranjem „egg-box“ strukture, ali je nepoznato je li mehanizam stvaranja gela u potpunosti jednak za ostale dvovalentne katione (Ching i sur., 2017).

### $Ca^{2+}$

Geliranje alginata izazvano je kooperativnim povezivanjem dvovalentnih kationa i regija G-blokova polimera, odnosno dimerizacijom G ostataka. Dodatak kalcijevih iona alginatnom polimeru uzrokuje povezivanje dva G lanca sa suprotnih strana. Ovakvo usklađivanje stvara prazinu u obliku dijamanta, hidrofilnu šupljina koja povezuje kalcijeve ione multikoordinacijom koristeći atome kisika iz karboksilnih skupina. Takav tijesan oblik polimera rezultira stvaranjem čvorišta oblikovanog kao „egg-box“ (slika 3.). Svaki kation je povezan s 4 ostatka G bloka u „egg-box“ obliku i formira trodimenzionalnu mrežu (Ching i sur., 2017).



**Slika 3.** Prikaz „egg-box“ modela umrežavanja alginata kalcijevim ionima (Ching i sur., 2017).

Tri su jasna i uspješna koraka geliranja kalcija i alginata: (1) interakcija kalcijevih iona s jednom G jedinicom i formiranje monokompleksa; (2) formiranje egg-box dimera uparivanjem monokompleksa; i (3) bočno povezivanje egg-box dimera i tvorba višekompleksa. Bočno povezivanje dimera nije samo pod utjecajem kalcija, nego i natrijeva iona, molekula vode i vodikovih veza između karboksilne i hidroksilne skupine uparenih G ostataka (Hu i sur., 2021).

### Ba<sup>2+</sup>

Barijev ion pokazuje veći afinitet prema alginatu naspram kalcijeva iona. Ba-alginat daje jači gel s većom stabilnosti nego Ca-alginat. Ba-alginat stabilan je u kiselom i neutralnom okruženju, ali može se raspasti u lužnatim uvjetima. Nadalje, uočen je neobičan efekt na svojstva gela u alginatu visokog M udjela kod zamjene Ca<sup>2+</sup> s Ba<sup>2+</sup> ionima. Istraživanja pokazuju da Ba<sup>2+</sup> može stvarati veze usporedive jačine s oba G i M bloka, ali ne i s MG blokovima. Najjači Ba-alginatni gel može biti dobiven koristeći Ba<sup>2+</sup> u koncentraciji od 20 mM za alginat bogate i G i M blokovima.

Međutim, Ba<sup>2+</sup> je toksičan te djeluje kao inhibitor K<sup>+</sup> tunela u bio-membranama u koncentracijama većim od 5 do 10 mM. Prema tome, koncentracija Ba<sup>2+</sup> mora biti kontrolirana u prikladnom području prilikom *in vivo* korištenja (Hu i sur., 2021).

### Cu<sup>2+</sup>

Mehanizam geliranja alginata pomoću bakrovih iona značajno je drugačiji od onoga pomoću kalcijevih iona. U procesu geliranja Cu-alginata, 4 kisikova atoma (dva iz negativno nabijenih karboksilnih skupina i druga dva iz nenabijenih karboksilnih skupina) koordiniraju s jednim središnjim Cu<sup>2+</sup> ionom i tvore Cu-alginatnu „egg-box“ strukturu. Nadalje, ne postoji selekcija G ili M za povezivanje Cu<sup>2+</sup> s alginatnim lancima. „Egg-box“ dimer formiran između Cu<sup>2+</sup> i alginata uvijek je dulji od onoga formiranog s Ca<sup>2+</sup> te pokazuje uredan uzorak umrežavanja. Nasuprot tome, Ca-alginatni dimeri su kratki i vode prema nasumičnom umrežavanju kalcija i alginata (Hu i sur., 2021).

K tome, istraživanja su pokazala da je afinitet bakrova iona za alginatne lance 10 puta veći od kalcijeva iona. Kada bakrov ion dođe u kontakt s alginatom, brzo tvori gusti i debeli sloj gela koji sprječava daljnu difuziju bakrovih iona kroz gel. Prema tome, bakrovi ioni teško dopiru do unutrašnjosti gela. Takav gust i debeo sloj gela na površini povećava rigidnost gela i stvara „zid“, inhibirajući smanjivanje gela. Također je otkriveno da je za isti uzorak alginata s istom koncentracijom, točka geliranja s bakrovim ionima niža nego s kalcijevim ionima. Zato je količina bakrovih iona potrebna za početak geliranja manja od potrebne količine kalcijevih iona (Hu i sur., 2021).

### Sr<sup>2+</sup>

Stroncijev ion netoksičan je dvovalentni kation. Sr<sup>2+</sup> se dobro veže za G blokove, ali ne i za

M blokove, a povezivanje s MG blokovima jako je ograničeno. Interakcija  $\text{Sr}^{2+}$  s alginantim lancima tvori analognu strukturu jezgra-ljuska, koja je slična „egg-box“ strukturi. Uspredno s  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  pokazuje veću urednost i snažnije vezanje s molekulama alginata. Dakle, Sr-alginatni gel ima značajno veću kemijsku stabilnost i jaču mehaničku izvedbu nego Ca-alginatni gel, u istim uvjetima koncentracije alginata i iona (Hu i sur., 2021).

### $\text{Fe}^{2+}$

Iako je afinitet povezivanja željezovih (II) iona za alginatne molekule slab, otkriveno je da povezivanje  $\text{Fe}^{2+}$  s ostacima uronata nije specifično za G blokove te da i G i M blokovi sudjeluju u formiranju Fe(II)-alginatnog hidrogela. Nadalje, uspoređujući s M blokovima, G blokovi pokazuju veću sposobnost povezivanja s  $\text{Fe}^{2+}$  i lakše tvore gel na niskim koncentracijama  $\text{Fe}^{2+}$ . Nasuprot tome, alginat s većim udjelom M blokova treba veću koncentraciju  $\text{Fe}^{2+}$  za tvorbu integralne mreže gela (Hu i sur., 2021).

K tome, umrežavanje alginata  $\text{Fe}^{2+}$  ionima može biti snažno povezano sa oksidativno-reduktivnim stanjem iona. Oksidacija  $\text{Fe}^{2+}$  u Fe(II)-alginatnu otopinu može dovesti do formiranja Fe(III)-alginatnog gela kako će biti opisano kasnije (Hu i sur., 2021).

### $\text{Al}^{3+}$

Alginatni gelovi formirani u prisutnosti aluminijevog iona puno su stabilniji nego oni formirani kalcijevim i barijevim, jer  $\text{Al}^{3+}$  ima produženu trodimenzionalnu povezanu strukturu. Međutim, detaljan mehanizam geliranja Al-alginata nije jasan. K tome, Al-alginatni gel pokazuje veću sposobnost vezanja vode od Ca-alginatnog i Ba-alginatnog gela.

Pored toga, aluminij je potencijalno toksičan i nije uvijek odabir za upotrebu u prehrambenim proizvodima. Ponekad može biti upotrijebljen kao materijal za pakiranje konzerviranih proizvoda u sigurnom i kontroliranom načinu (Hu i sur., 2021).

### $\text{Fe}^{3+}$

Željezov (III) ion može dati „egg-box“ helikalnu strukturu kroz snažne elektrostatske interakcije s karboksilnim skupinama alginata i prema tome tvori stabilnu trodimenzionalnu međupovezanu strukturu gela. Nadalje,  $\text{Fe}^{3+}$  može vezati deprotonirane karboksilne skupine alginata puno jače nego protonirane karboksilne skupine. Kada  $\text{Fe}^{3+}$  dođe u kontakt s

molekulama alginata, preferencijalno tvori koordinirane veze s 3 termalne karboksilne skupine alginata, ubrzavajući umrežavanje i produljivanje alginatnih lanaca. S povećanjem koncentracije  $\text{Fe}^{3+}$ , stvara se koordinacija između  $\text{Fe}^{3+}$  i netermalnih karboksilnih skupina, koja zato čini alginatne lance nagomilanimi i namotanimi. Takva koordinacija započinje daljnje stvaranje sluzave i homogene strukture gela (Hu i sur., 2021).

Poznato je da  $\text{Fe}^{3+}$  lako deoksidira. Pokazano je da umrežavanje alginata s  $\text{Fe}^{3+}$  u prisutnosti natrijeva laktata podilazi lakoj fotoredukciji. Štoviše, elektrokemijska oksidacija homogene Fe(II)-alginatne otopine može tvoriti Fe(III)-alginatne hidrogelova, koji mogu biti pretvoreni natrag u Fe(II)-alginatnu otopinu kroz elektrokemijsku redukciju.  $\text{Fe}^{2+}$  ima smanjenu sposobnost koordiniranja alginatnim lancima, što dovodi do otapanja hidrogela i formiranja homogene otopine. Nadalje,  $\text{Fe}^{3+}$  veže karboksilne skupine alginata značajno jače od  $\text{Fe}^{2+}$ . Može se zaključiti da  $\text{Fe}^{3+}$  ima veću sposobnost umrežavanja alginatnih lanaca nego  $\text{Fe}^{2+}$  ion (Hu i sur., 2021).

#### 2.1.4. Načini pripreme hidrogelova

Usporedno s drugim polisaharidima kao što su želatin ili agar, alginat stvara gel neovisno o temperaturi. Stvaranje alginatnog gela može se postići uz dvije metode: ionsko povezivanje s kationima ili kiselinsko taloženje (kiselni gel) (Ching i sur., 2017).

Stvaranje ionskog gela u prisustvu viševalentnih kationa razlikuje se ovisno o načinu na koji se ioni dodaju alginatnom polimeru. Kod unutarnje metode geliranja inaktivni oblici kalcija ( $\text{CaCO}_3$  ili  $\text{CaSO}_4$ ) pomiješaju se s alginatom te kao smjesa dispergiraju u ulju. Na taj se način geliranje pojavljuje simultano na više lokacija te se tako kontrolira izloženost alginata kationima i postiže homogena raspodjela unutar hidrogela. Zatim se smjesa zakiseljava, trenutno direktno ili kontrolirano, čime se oslobađaju kalcijevi ioni iz komponenata i nastaju čestice alginata. Kod metode vanjskog geliranja kationi difundiraju iz područja veće koncentracije u unutrašnjost čestica alginata. Formiranje gela odvija se trenutačno na vanjskom sloju hidrogela no nastaje nehomogeni gel, gdje je visok gradijent kationa i alginata blizu površine gela, a smanjen u unutrašnjosti. Geliranje započinje izvana, kationi kontinuirano difundiraju prema centru čestica (Ching i sur., 2017).

Alginatni kiselni gel nastaje spuštanjem pH otopine ispod konstante disocijacije ( $\text{pK}_a$ ) polimera. Zbog brzog spuštanja pH dolazi do taloženja alginatnih molekula u obliku



nakupina dok sporo spuštanje pH vrijednosti rezultira stvaranjem kontinuirane alginatne mase kiselog gela. Alginatni kiseli gel sličan je ionskog gelu u jačini gela što je povezano s udjelom G blokova u polimernom lancu. Alginatni kiseli gel slabije je proučavan od ionskog, ali je i dalje uspješno korišten kao antacid kod liječenja žgaravice (Ching i sur., 2017).

Morfologija i veličina čestica alginata ovisi o korištenoj proizvodnoj metodi. Za većinu upotrebe, veličina čestica alginata važan je čimbenik kod odabira prikladne metode inkapsuliranja (Ching i sur., 2017).

Glavna svrha ovih metoda je slomiti masu alginatnog polimera u manje čestice tijekom geliranja. Stvaranje čestica gela postiže se u dva procesa: (1) stvaranja kontinuirane faze – prvo se stvara masa alginata nakon čega se mehanički razbija u čestice manjih dimenzija. (2) formiranje dispergirane faze: neizgelirana polimerna otopina se razbija u sitne kuglice prije nego dođe do geliranja. Varijacije između procesa leže u drugačijim tehnikama stvaranja kuglica. Uvjeti u kojima se stvaraju kuglice i gel određuju fizikalne karakteristike čestica gela (Ching i sur., 2017).

Moguće je proizvesti makrogelove reda veličine iznad 1000  $\mu\text{m}$  u dijametri metodom jednostavnog kapanja (ekstruzije) gdje se štrcaljkom kapa otopina alginata u otopinu za geliranje (kalcijeva kupka). Veličina kuglice raste sve dok se ne odvoji od vrha štrcaljke. To je najjednostavnija metoda koja se može odrađivati ručno ili strojno (Ching i sur., 2017).

Čestice alginata reda veličine ispod 1000  $\mu\text{m}$  u dijametri spadaju u mikrogelove te su najčešće veličine 30  $\mu\text{m}$  u dijametri. Nekoliko metoda ekstruzije razvijeno je kako bi se proizvele čestice mikronske veličine. Metode se mogu svrstati u 3 općenite kategorije ovisno o metodi stvaranja polimerne kapljice: (1) ekstruzija lomljenjem mlaza: elektrostatskom atomizacijom se lomi mlaz polimera koji pod pritiskom laminarno teče kroz otvor štrcaljke te nastaju diskretne kuglice; (2) rotirajući disk: formiranje kuglica nastaje zbog efekta centrifugalne sile na mlaz otopine polimera, kapanjem na rotirajući diska ili ispuštanjem otopine iz rotirajuće mlaznice; (3) atomizacija: pumpanjem zraka i polimerne otopine istovremeno velikom brzinom u štrcaljku stvaraju se polimerne kuglice kod doticaja jedno s drugim. Mikrogelovi se također mogu stvoriti metodom emulgiranja gdje se vodena alginatna otopina raspršuje u uljnoj fazi i homogenizira kako bi se dobila stabilna emulzija tipa „voda u ulju“ (Ching i sur., 2017).

Submikronske veličine čestica alginatnog gela, manje od 500 nm, spadaju u nanogelove. Nanogelovi se mogu proizvesti pomoću nanovezikula ili pomoću kapljica emulzija kao podloge. Kao podloga mogu se kositi i mikroemulzije. Iako su ove metode bile korištene samo kod inkapsulacije proteina, sposobnost stvaranja nanogelova otvara mogućnost upotrebe u staničnom dopremanju lijekova. Ipak, ove metode su kompleksne i daju mali prinos, što ih čini neprikladnim za veće proizvodnje (Ching i sur., 2017).

### 2.1.5. Emulgiranje

Emulzija je mješavina dviju tekućina koje se ne miješaju, jedna je raspršena u drugoj u obliku malih kapljica. Ako je emulzija sustav ulje-voda, kažemo da je to ulje u vodi (U/V) jer je ulje dispergirana faza ili voda-u-ulju (V/U) emulzija ako je voda dispergirana faza (Davis, 1994).

Metoda emulgiranja široko je korištena tehnika inkapsulacije različitih mikrobnih stanica gdje se alginatni mikrogel stvara u nevodenoj kontinuiranoj fazi. Tehnika emulgiranja obično se koristi zajedno s tehnikom unutarnjom geliranja. Metoda obuhvaća proces emulgiranja dviju faza, zatim proces dodatka otopine za geliranje, odnosno zakiseljavanje, te sakupljanje dobivenih kuglica, odnosno razbijanje emulzije. Polimerna suspenzija se raspršuje u uljnu/organsku fazu koja predstavlja kontinuiranu fazu (Rathore i sur., 2013). Smjesa se homogenizira uz vigorozno miješanje u svrhu stvaranja emulzije tipa „voda u ulju“ budući da raspršivanje vodene alginatne otopine s organskom fazom nije termodinamički povoljno te se odvija uz pomoć emulgatora (Heng i sur., 2003.). Do očvršćivanja dispergirane faze dolazi uslijed dodatka otopine za geliranje. Kapljice alginata i otopina za geliranje dolaze u kontakt i geliranje započinje. Emulzija se razbija dodatkom pufera te se dobivene mikrokuglice sakupljaju filtracijom ili centrifugiranjem. Veličina mikrokuglica ovisi o brzini miješanja i brzini dodavanja otopine za umrežavanje (Rathore i sur., 2013). Njihova veličina varira u rangu 100-1000  $\mu\text{m}$ , 0.2-1 mm i 20-200  $\mu\text{m}$ . Raspodjela veličine i dijametara alginatnog mikrogela ovisi o tipu emulgatora i koncentraciji, udjelu ulja naspram natrijevog alginata te posmičnim silama homogenizacije. Upotreba emulgatora nije nužna, ali oni pospješuju smanjenje prosječnog promjera alginatnih mikročestica. Emulgatori kao što su Span80, Tween80, Tween85, natrijev deoksiholat, polivinil alkohol (PVA) i Pluronic F68 u izooktanu korišteni su za proizvodnju mikrogelova veličine 1 do 150 $\mu\text{m}$  u dijametru. Smanjenje

dijametra alginatnih čestica pospješuje i veći udio alginatne otopine naspram ulja (Ching i sur., 2017).

Otopina za geliranje predstavlja otopinu kiseline topive u ulju te označava kritičan korak u emulgiranju/unutarnjem geliranju. Kiselina se dodaje emulziji kao bi se oslobodili kalcijevi ioni iz kalcijeva karbonata i pokrenulo trenutačno geliranje, formirajući alginatne mikrokuglice. Proces zakiseljavanja može se podijeliti na 4 koraka: (1) difundiranje octene kiseline iz uljne faze u vodenu fazu kroz granicu ulje/voda; (2) oslobađanje vodikova iona iz octene kiseline u vodenu fazu; (3) reakcija kalcijeva karbonata s vodikovim ionom, oslobađanje kalcijeva iona; i (4) geliranje alginata umrežavanjem kalcijevih iona. Međutim, bioaktivne supstance, pogotovo enzimi i stanice, osjetljive su na kiselinu te mogu ostati oštećene tijekom koraka zakiseljavanja. S druge strane, više kiseline u sustavu kiseline, kalcijeva karbonata i alginata i dužeg vremena zakiseljavanja rezultira jačom mehaničkom snagom gela, što može ići u korist zaštite mikrokapsula. Proces zakiseljavanja treba biti uravnotežen kako bi osigurao dovoljnu mehaničku zaštitu i kako bi se izbjeglo oštećenje bioaktivnih inkapsulanata zbog visoke koncentracije kiseline (Qu i sur., 2015).

Teoretski, 1 mol kalcijeva karbonata reagira s 2 mola octene kiseline. Dodaje se više octene kiseline kako bi se kalcijev karbonat u potpunosti razgradio i oslobodio kalcijeve ione. Što je veći udio kiseline naspram kalcija, više se kalcijevih iona oslobađa da reagira s alginatom, dovodeći do veće gustoće umreženosti i prema tome kompaktnijom strukturom mreže alginata. To objašnjava manje mikrokuglice dobivene većim omjerom kiselina/kalcij i duljim vremenom zakiseljavanja (Qu i sur., 2015).

Dvije su uzastopne reakcije nakon difuzije kiseline kroz granicu ulje-voda. Protoni koji difundiraju kroz vodenu fazu nailaze na jednoliko dispergirane kalcijeve mikrokristale, najčešće  $\text{CaCO}_3$ , dolazi do trenutačnog otpuštanja kalcijevih iona (jednadžba 1) te alginat gelira *in situ*, formirajući homogenu mrežu gela (jednadžba 2) (Reis i sur. 2006.).

1.  $2 \text{H}^+ + \text{CaCO}_3 \rightarrow \text{Ca}^{2+} + \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$
2.  $\text{Ca}^{2+} + 2 \text{Na}^+ \text{Alg}^- \rightarrow \text{Ca}^{2+}(\text{Alg}^-)_2 + 2 \text{Na}^+$

Doprinos mehaničke stabilnosti mikrokuglica jako je važan za njihovu uspješnu primjenu u različitim procesima. Mikrokuglice bi trebale posjedovati dovoljnu mehaničku otpornost kako bi izdržale različite vanjske sile tijekom trajanja cijele upotrebe. Na primjer, unatoč

pogodnosti natrijeva alginata kao materijala za inkapsulaciju, niska mehanička stabilnost alginata u prisutnosti kelirajućih sredstava, kao što su fosfati, laktati ili citrati, njegovo je najveće ograničenje. Također je uočen mehanički poremećaj mikrokuglica uslijed povećanja zbijenosti/gustoće inkapsuliranih stanica i proizvodnje plinova fermentacije. Zbog toga se posebni tretmani kao što je premazivanje/umrežavanje s drugim polimerima, miješanje sa škrobom i drugim aditivima i inkorporiranih surfaktanata istražuju zbog poboljšanja stabilnosti proizvedenih kuglica (Rathore i sur., 2013).

Emulgiranje, odnosno unutarnje geliranje, u formiranju alginatnih mikro- i nanokuglica pokazalo je nekoliko prednosti. Metoda se smatra sigurnim, jednostavnim i ekonomičnim sistemom s dobrom mehaničkom stabilnosti. Bez korištenja toksičnih reagensa ili otapala, biološka i prehrambena upotreba uzimaju se u obzir. Metoda unutarnjeg geliranja dozvoljava efikasnu proizvodnju velikih količina malih i kontroliranog promjera alginatnih mikro- i nanokuglica u većim industrijskim postrojenjima (Reis i sur. 2006.).

Glavni nedostatak ove metode je nasumično spajanje kuglica (agregacija) koje dovodi do nastanka mikrogelova koji variraju u veličini i obliku. Nadalje, potrebna je dodatna procedura odvajanja produkta mikrogela od uljne faze. To uobičajeno zahtjeva centrifugiranje smjese s popratnim koracima ispiranja s otapalima koja uklanjaju višak ulja. Dodatno, stres zbog velikih sila smicanja i generiranja topline ovom metodom može uzrokovati denaturaciju bioloških komponenata i stanica (Ching i sur., 2017). Poroznost alginatnih čestica može biti ograničavajući faktor. Unutarnjim geliranjem nastale kuglice imaju više pora nego kuglice nastale vanjskim geliranjem. Površinska kompaktnost čestica formiranih vanjskim geliranjem pruža veću otpornost difuziji nego homogeniji gel formiran unutarnjim geliranjem. K tome, neka istraživanja pokazuju da unutarnje geliranje može izazvati gubitak ili neaktiviranje inkapsuliranih proteina tijekom procesa formiranja i ispiranja (Reis i sur., 2006).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Kemikalije

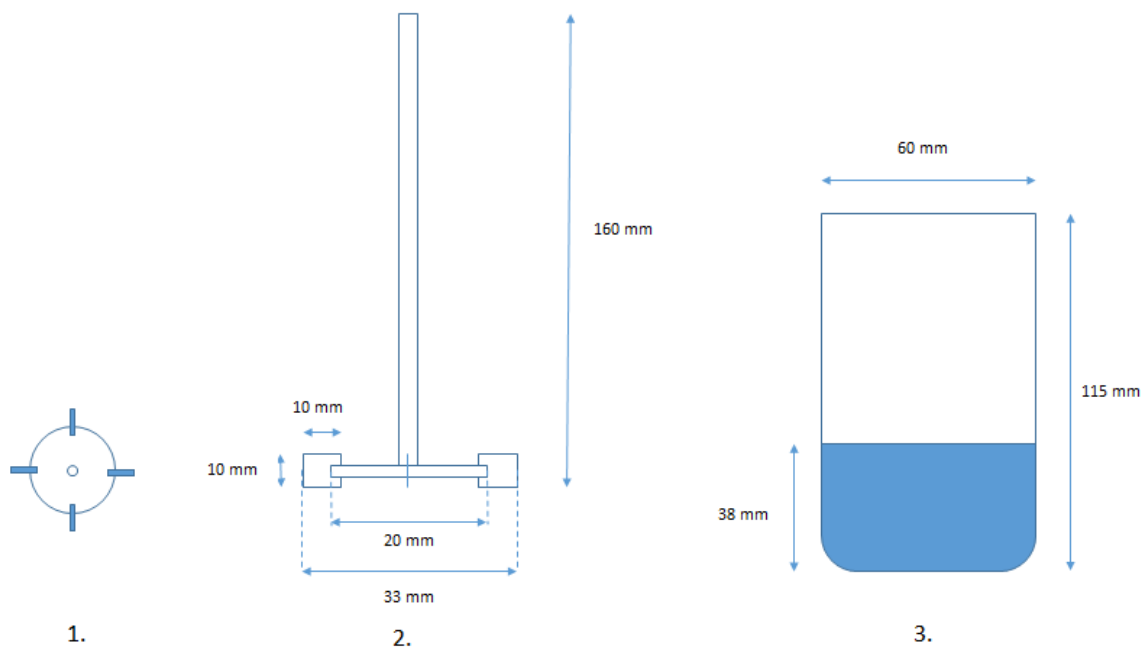
Natrijev alginat (viskoznost (1%) 350-550 mPa\*s) dobavljen je od proizvođača Fisher Scientific. Površinski aktivne tvari Span80 (sorbitan monooleat) i Tween20 (polioksietilen sorbitan monolaurat) dobavljene su od Sigme-Aldrich i bile su čistoće 98 %. Za geliranje alginata korišten je čvrsti kalcijev karbonat (*p.a.*) u obliku finog praha. Sve ostale kemikalije korištene u radu bile su *p.a.* čistoće i korištene su bez daljnjeg pročišćavanja. Kao uljna faza prilikom pripreme emulzija korišteno je komercijalno jestivo suncokretovo ulje (Zvijezda, Zagreb).

Otopina natrijeva alginata, masenog udjela  $w(\text{alginat}) = 0,015$ , pripravljena je otapanjem natrijeva alginata u vodi. Prije uporabe u eksperimentima, otopina alginata ostavljena je stajati preko noći, kako bi se alginat u potpunosti otopio i dobila homogena otopina.

#### 3.2. Instrumentacija

Za miješanje emulzije korišteno je turbinsko miješalo (Rushton) sa četiri lopatice, za čiji je pogon korišten elektromotor čija se brzina rotacije mogla podešavati u rasponu od 25 do 2500 o/min (slika 5.; 1., 2.). Miješalo se nalazilo na otprilike četvrtini visine čaše (slika 5.; 3.).

Za vizualnu karakterizaciju uzoraka alginatnih mikrokuglica korišten je trinokularni mikroskop Euromex bScope (Nizozemska), opremljen s infinitivnim planakromatskim objektivima i Koehlerovim iluminacijskim sustavom. Na mikroskop je pomoću optičkog demagnifikatora (2x) bio priključen digitalni fotoaparat Pentax K10, koji je služio za snimanje mikrografija uzoraka.



**Slika 4.** 1.: okomiti presjek miješala; 2.: bočni presjek miješala s dimenzijama; 3.: dimenzije korištene čaše za pripremu emulzija

### 3.3. Metode

#### 3.3.1. Priprema alginatnih mikročestica

Za pripremu alginatnih mikrokuglica korišten je emulzijski postupak s internim geliranjem. Emulzija je bila tipa "voda u ulju", s vodenom otopinom natrijeva alginata kao vodenom fazom i suncokretovim uljem kao uljnom fazom. Za stabilizaciju emulzije korišten je Span 80. Kao interni gelator korišten je kalcijev karbonat dispergirani u vodenoj fazi, a geliranje je inicirano dodatkom octene kiseline u uljnu fazu.

Vodena faza sadržavala je natrijev alginat u masenom udjelu od 1,50 % i kalcijev karbonat u masenom udjelu od 0,12 %. Emulzija je priređena miješanjem vodene i uljne faze u omjeru masa 1:9. Uljnu fazu činilo je suncokretovo ulje kojem je dodan emulgator Span 80 u količini od 1,0 % ( $w/v$ ). Otopina octene kiseline u ulju pripremljena je otapanjem 10 mL bezvodne octene kiseline u 40 mL ulja. Otopina je korištena za zakiseljavanje emulzije i iniciranje geliranja alginata.

Uzorci alginatnih mikrokuglica pripremljeni su metodom emulgiranja, odnosno raspršivanjem vodene faze u uljnoj fazi, u laboratorijskoj čaši (slika 5.; 3.). Masa od 10 g vodene faze dispergirana je u 90 g uljne faze korištenjem turbinske miješalice (slika 5.; 1., 2.). Radi disperzije vodene faze u ulju i postizanja stabilne emulzije koja se ne raslojava, smjesa u čaši je miješana 20 minuta pri brzini miješala od 1000 o/min. Nakon toga u emulziju je dodano 2 mL otopine octene kiseline u ulju te je emulzija miješana dodatnih 20 minuta pri brzini od 500, 750 i 1000 o/min. Nakon 20 min, brzina miješanja je smanjena i u emulziju je dodano 100 mL deionizirane vode te je emulzija lagano miješana nekoliko minuta. Nakon toga miješanje je zaustavljeno i emulzija je ostavljena mirovati 60 minuta, tijekom kojeg vremena je došlo do raslojavanja emulzije i sedimentacije alginatnih mikrokuglica. Smjesa je potom filtrirana gravitacijskom filtracijom preko filter-papira. Alginatne mikrokuglice na filter-papiru isprane su od ulja detergentom Tween 20 te potom obilno s deioniziranom vodom. Uvjeti pod kojima su provedeni eksperimenti prikazani su u Tablici 1.

**Tablica 1.** Uvjeti pripreme alginatnih mikrokuglica postupkom internog geliranja u emulziji.

uzorak	faza		w (CaCO <sub>3</sub> ) / %	V (kiselina) / mL	o / min	
	% uljna	% vodena			prije zakiseljavanja	nakon zakiseljavanja
1	90	10	0,12	2	1000	500
2	90	10	0,12	2	1000	750
3	90	10	0,12	2	1000	1000
4	90	10	0,12	2	1000	500

S obzirom da je ovaj rad bio dio preliminarnih eksperimenata usmjerenih na sintezu alginatnih mikrokuglica obilježenih nanočesticama metalnih oksida, jedan od uzoraka priređen je i uz dodatak nano-TiO<sub>2</sub> (anatas) u vodenu fazu emulzije, uz brzinu miješanja emulzije tijekom geliranja od 500 o/min. Ostali uvjeti eksperimenta bili su identični prethodno opisanim eksperimentima.

### 3.3.2. Analiza alginatnih mikrokuglica

Priređene alginatne mikrokuglice karakterizirane su optičkom mikroskopijom, u koju svrhu su snimljene mikrografije svih priređenih uzoraka. Mikrografije alginatnih mikrokuglica su zatim obrađene u programu ImageJ (v.1.53), optimiranjem raspona sivih tonova, podešavanjem svjetline i suptrakcijom pozadine kako bi se povećao kontrast i poboljšala vidljivost alginatnih mikrokuglica. Veličina alginatnih mikrokuglica u pojedinom uzorku određena je mjerenjem promjera pojedine kuglice u programu za obradu fotografija IrfanView, nakon čega je promjer pojedine mikrokuglice (u pikselima) preračunat u promjer u mikrometrima, pomoću relacije dobivene snimanjem kalibrirane skale pri istim uvjetima pri kojima su snimane i mikrografije alginatnih mikrokuglica. Za svaki uzorak određen je promjer otprilike 150-200 mikrokuglica.



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

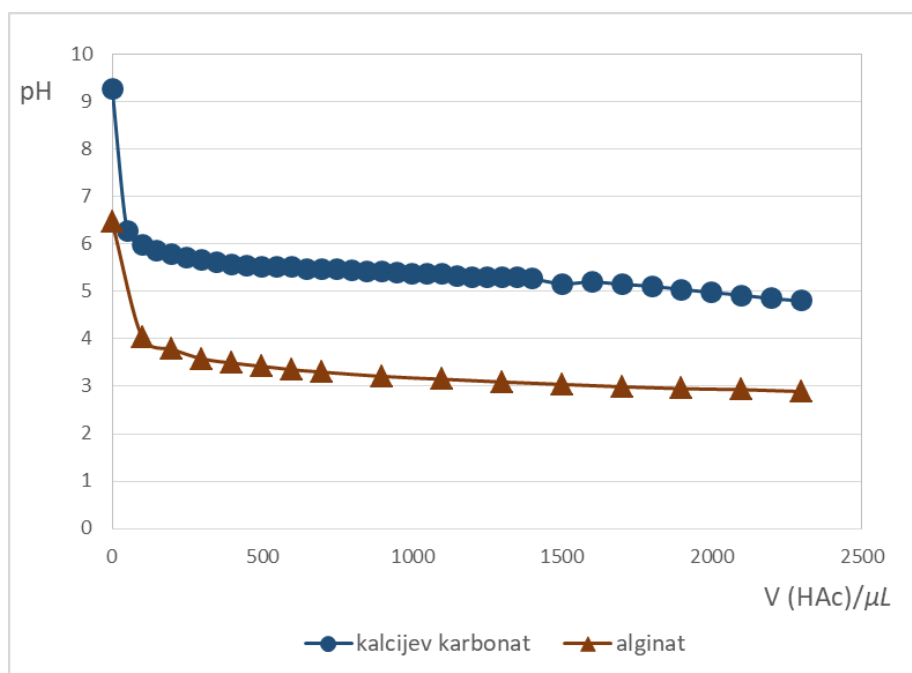
### 4.1. Preliminarni eksperimenti

Priprema alginatnih mikrokuglica namjeravala se provesti metodom internog geliranja u emulziji voda u ulju, u kojoj je vodena faza otopina natrijeva alginata sa suspendiranim čvrstim kalcijevim karbonatom, kao izvorom iona  $\text{Ca}^{2+}$  potrebnih za geliranje. S obzirom da se geliranje iniciralo dodatkom octene kiseline u emulziju, kako bi se provjerilo ponašanje alginata i kalcijeva karbonata u uvjetima dodatka octene kiseline, kao preliminarni eksperimenti provedene su potenciometrijske titracije suspenzije kalcijeva karbonata i otopine alginata octenom kiselinom.

Suspenzija kalcijeva karbonata pripremljena je dispergiranjem  $\text{CaCO}_3$  u vodi, kako bi se dobila suspenzija s masenim udjelom  $\text{CaCO}_3$  od 3,0 %. U priređenu suspenziju dodavana je bezvodna octena kiselina u obrocima od 50  $\mu\text{L}$ , uz praćenje pH. Titracija je završena kad se otopina razbistrila (tj. kad se otopio sav suspendirani kalcijev karbonat).

Titracija vodene otopine alginata, masenog udjela  $w(\text{alginat}) = 1,5 \%$ , provedena je na analogan način, uz razliku da je bezvodna octena kiselina u otopinu dodavana u obrocima od 100  $\mu\text{L}$ . Titracija je smatrana završenom nakon što su se uzastopna očitavanja pH počela razlikovala za manje od 0,1 jedinice.

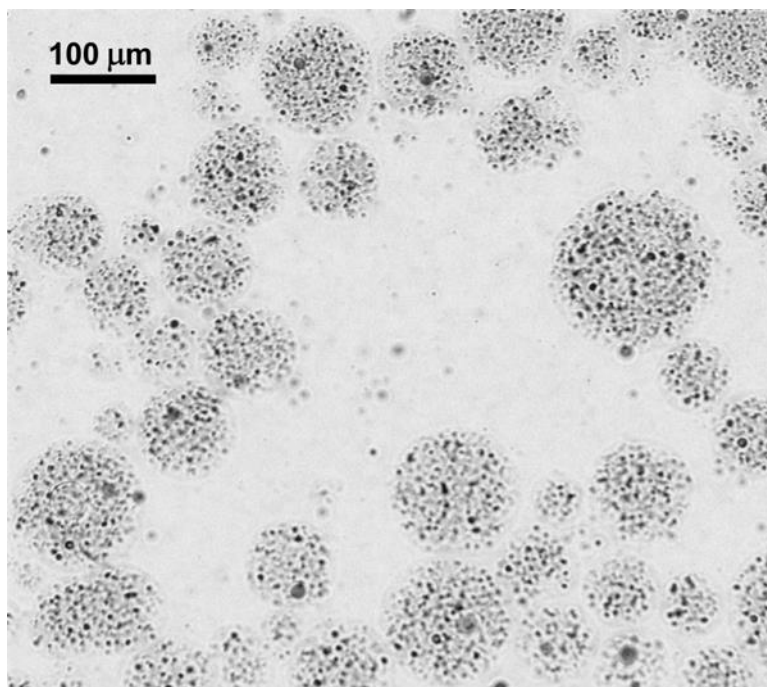
Provedbom preliminarnih eksperimenata titracije vodene otopine natrijeva alginata i vodene otopine kalcijeva karbonata octenom kiselinom dobivene su vrijednosti pomoću kojih su izrađene titracijske krivulje. Na temelju titracijskih krivulja (slika 4.) može se zaključiti da obje otopine pokazuju slično ponašanje prilikom dodavanja octene kiseline. Prvih nekoliko dodataka octene kiseline uzrokuje značajno smanjenje pH otopine, za otprilike 3 pH-jedinice, nakon čega promjena pH postaje značajno blaža. Razlike u konačnom pH otopina (otprilike 3 u slučaju titracije otopine alginata, odn. 5 u slučaju titracije suspenzije  $\text{CaCO}_3$ ) mogu se objasniti puferskim efektom koji dolazi do izražaja u suspenziji kalcijeva karbonata, u kojoj tijekom titracije nastaje kalcijev acetat te se po otapanju kalcijeva karbonata u otopini pojavljuje suvišak octene kiseline. Rezultati provedenih titracija pokazuju da je dodatkom octene kiseline moguće uspješno ostvariti uvjete za otapanje kalcijeva karbonata suspendiranog u alginatu, s obzirom da je za potpuno otapanje kalcijeva karbonata dovoljna vrijednost pH od otprilike 5, dok se dodatkom iste količine octene kiseline u čistu otopinu alginata može ostvariti vrijednost pH manja od 3.



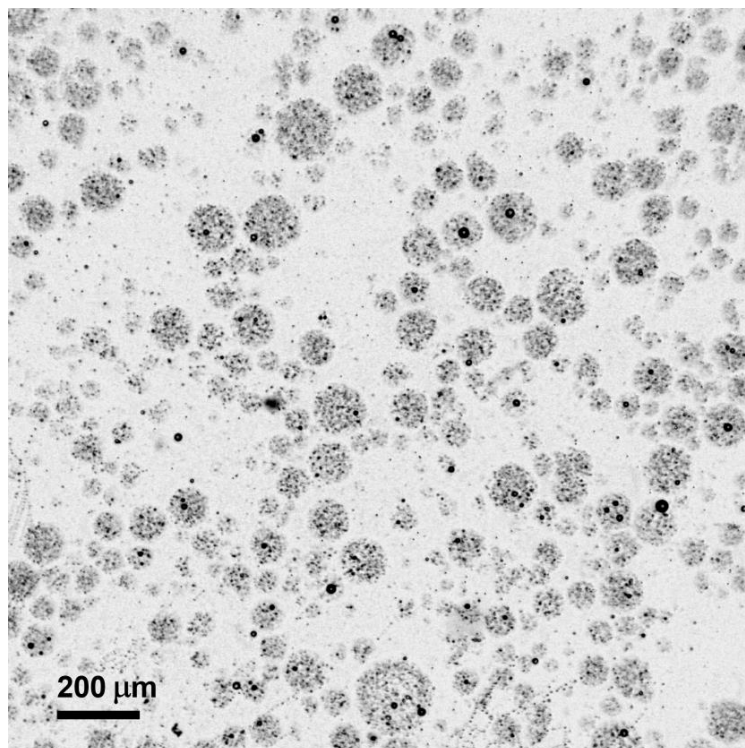
**Slika 5.** Titracijska krivulja vodene otopine alginata,  $w(\text{alginat}) = 1,5\%$ , i suspenzije kalcijeva karbonata u vodenoj otopini alginata,  $w(\text{CaCO}_3) = 3\%$ , s koncentriranom octenom kiselinom.

#### 4.2. Eksperimenti pripreve alginatnih mikrokuglica

Da bi se provjerio utjecaj hidrodinamičkih uvjeta na veličinu alginatnih mikrokuglica, provedena je serija eksperimenata pri optimiranim sastavima emulzije, u kojima je brzina rotacije turbinskog miješala varirana u području između 500 i 1000 o/min (pogl. 3.3.1.). Optičke mikrografije dobivenih uzoraka alginatnih mikrokuglica prikazane su na slikama 7-10. Pri najmanjoj brzini vrtnje miješala od 500 o/min, alginatne mikrokuglice su pravilnog, sferičnog oblika, a raspon veličina im se kreće u području od 27 do 185  $\mu\text{m}$ . Dobivene mikrokuglice heterogene su strukture, sa mnoštvom sitnih mjehurića uhvaćenih u strukturu alginatnog gela, kako se jasno vidi na mikrografiji snimljenoj pri većem povećanju (slika 5.), na kojoj mjehurići ispadaju tamno radi velike razlike u indeksu loma svjetlosti između plina u unutrašnjosti mjehurića i alginatnog gela u kojem se mjehurić nalazi. Mjehurići u strukturi alginatnih mikrokuglica potječu od ugljikova(IV) oksida koji se oslobađa prilikom reakcije kalcijeva karbonata, korištenog kao interni gelator, s octenom kiselinom.

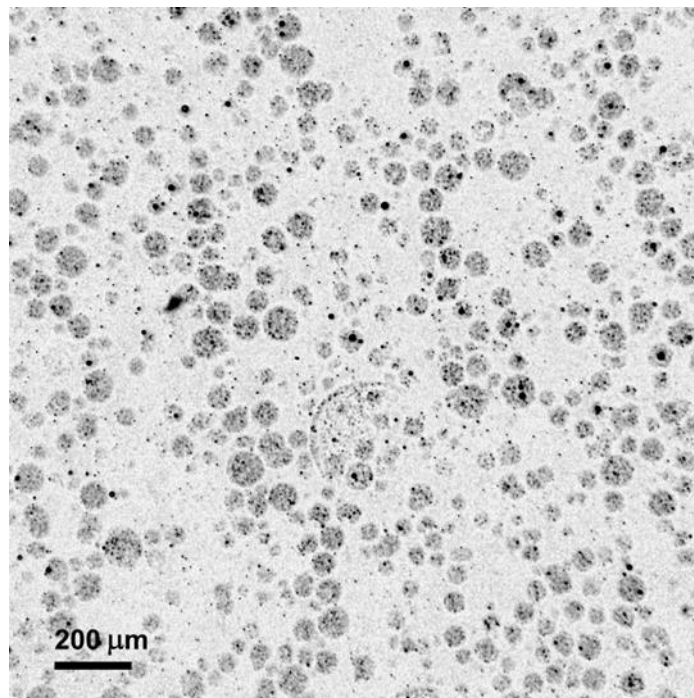


**Slika 6.** Optička mikrografija alginatnih mikrokuglica priređenih emulzijskim postupkom s internim geliranjem, uz brzinu rotacije miješala od 500 o/min (veće povećanje).

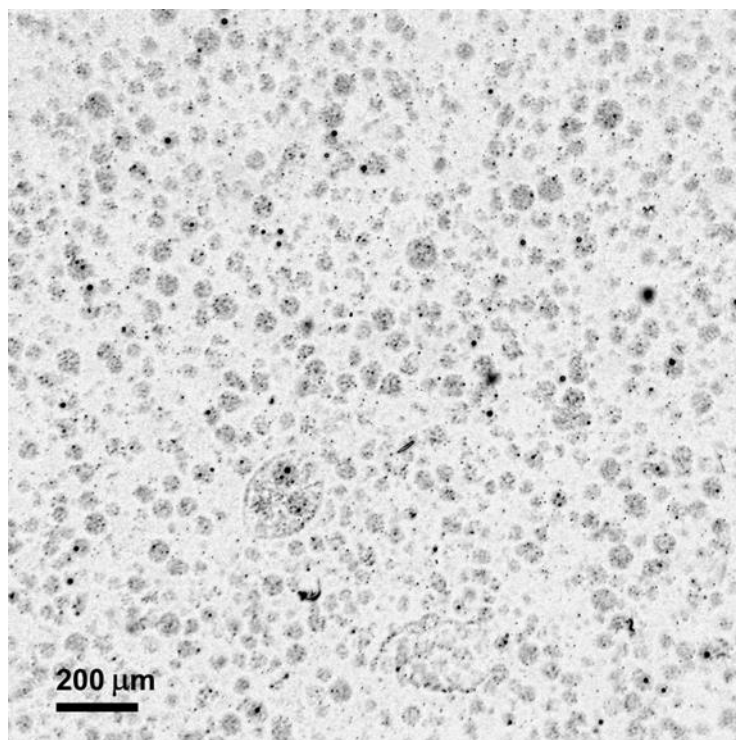


**Slika 7.** Optička mikrografija alginatnih mikrokuglica priređenih emulzijskim postupkom s internim geliranjem, uz brzinu rotacije miješala od 500 o/min.

Pravilan sferični oblik alginatnih mikrokuglica zadržan je i pri većoj brzini vrtnje miješala od 750 o/min (slika 7.), no iz prikazane mikrografije je jasno uočljivo kako je veličina dobivenih mikrokuglica manja od veličine mikrokuglica dobivenih pri manjoj brzini miješanja te kako se kreće u području od 35 do 91  $\mu\text{m}$ . Pri najvećoj ispitivanoj brzini vrtnje od 1000 o/min (slika 8.), primjetno je daljnje smanjenje veličina mikrokuglica alginata (25-69  $\mu\text{m}$ ), no dio dobivenih čestica pokazuje odstupanje od idealnog sferičnog oblika. Razlog nastajanju nepravilnih mikročestica alginata pri brzini rotacije miješala od 1000 o/min vjerojatno su turbulencija koja pri tim uvjetima nastaje u emulziji te snažne udarne i smične sile koje nastaju prilikom kontakta kapljica emulzije i geliranih mikročestica alginata s lopaticama turbinskog miješala. Iz navedenog razloga, brzine rotacije miješala veće od 1000 o/min nisu korištene u ovom radu.

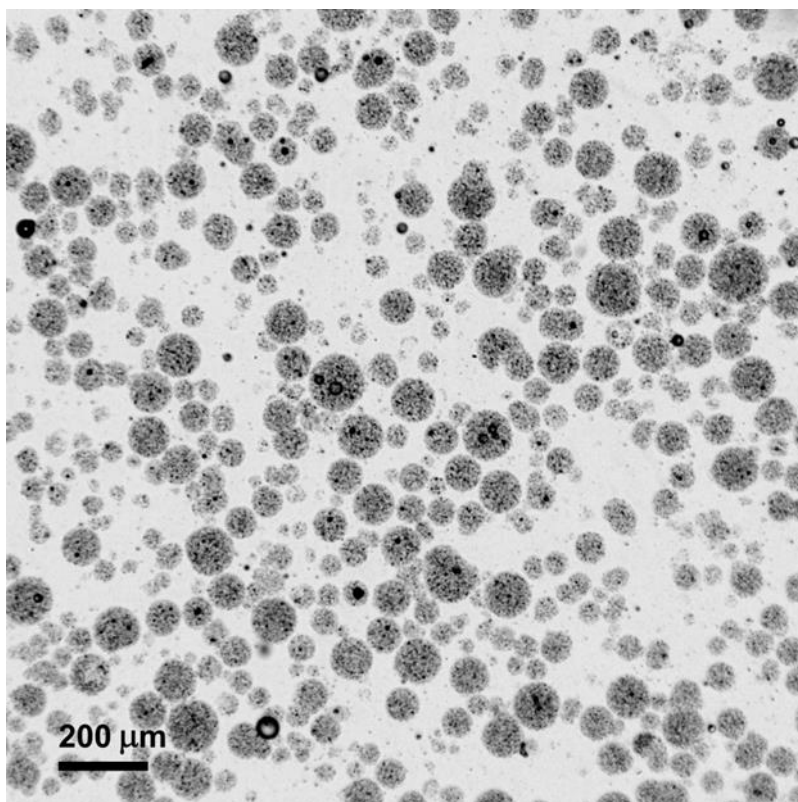


**Slika 8.** Optička mikrografija alginatnih mikrokuglica priređenih emulzijskim postupkom s internim geliranjem, uz brzinu rotacije miješala od 750 o/min.



**Slika 9.** Optička mikrografija alginatnih mikrokuglica priređenih emulzijskim postupkom s internim geliranjem, uz brzinu rotacije miješala od 1000 o/min.

S obzirom da je ovaj rad bio dio preliminarnih eksperimenata u okviru šireg istraživanja, koje je za cilj imalo pripremu alginatnih mikrokuglica obilježenih nanočesticama metalnih oksida, priređene su i alginatne mikrokuglice modificirane sa nano-TiO<sub>2</sub> (anatas), na način da je u vodenu fazu emulzije, pored alginata i kalcijeva karbonata dodan i titanijev(IV) oksid. Uzorak alginatnih mikrokuglica modificiranih s nano-TiO<sub>2</sub> priređen je pri identičnim uvjetima kao i ostali dosad opisani uzorci, uz brzinu rotacije miješala od 500 o/min. Dobivene alginatne mikrokuglice prikazane su na slici 9. Uočljivo je da mikrokuglice pokazuju jači kontrast prema pozadini, zbog sadržaja čvrste faze (TiO<sub>2</sub>) u masi alginatnog gela. Jasno se ističe pravilan sferični oblik mikrokuglica, čije se veličine kreću u istom području kao i kod uzorka sintetiziranog pri identičnim hidrodinamičkim uvjetima, ali bez dodatka TiO<sub>2</sub> (slika 6).



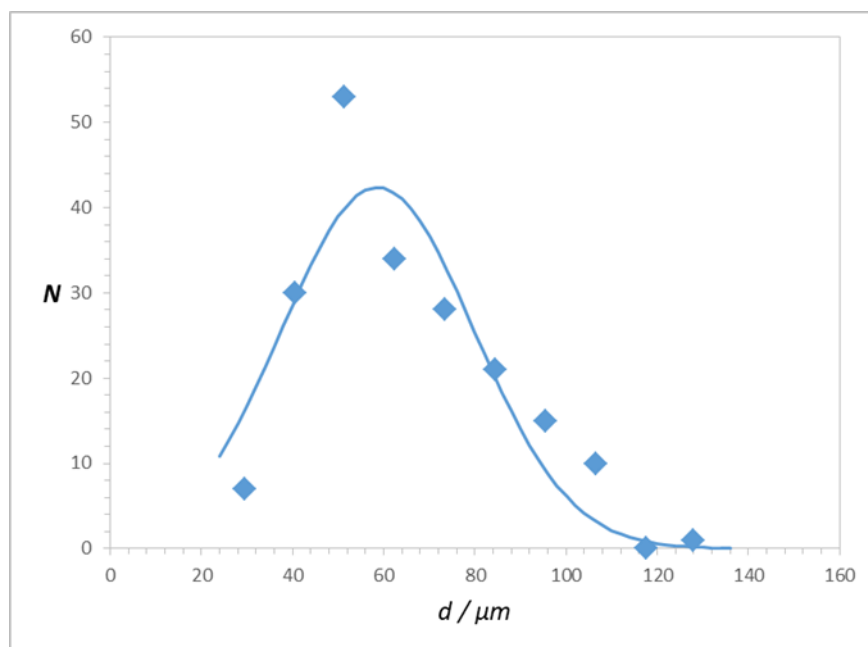
**Slika 10.** Optička mikrografija alginatnih mikrokuglica priređenih emulzijskim postupkom s internim geliranjem uz dodatak nano-TiO<sub>2</sub>, pri brzini rotacije miješala od 500 o/min.

Kako bi se dobio kvantitativni podatak o veličini i raspodjeli veličina alginatnih mikrokuglica dobivenih pri različitim hidrodinamičkim uvjetima u emulziji, izmjeren je promjer 150-200 mikrokuglica na svakoj od snimljenih mikrografija uzoraka. Dobiveni podaci podijeljeni su u 10 jednakih intervala te je određen broj mikrokuglica u svakom intervalu. Prikazom broja mikrokuglica u određenom intervalu promjera u ovisnosti o srednjoj vrijednosti intervala konstruirani su dijagrami raspodjele veličina mikrokuglica prikazani na slikama 10-17. Kroz dobivene točke metodom optimiranja provučene su krivulje gustoće vjerojatnosti (diferencijalne krivulje razdiobe) koje odgovaraju normalnoj i log-normalnoj razdiobi. Analizom sume kvadrata odstupanja zaključeno je da se za sve uzorke bolje slaganje između eksperimentalnih podataka i usklađivane krivulje razdiobe dobiva za log-normalnu razdiobu. Parametri log-normalne razdiobe (karakteristični promjer maksimuma razdiobe,  $X_c$ ; širina razdiobe, sigma; i granični promjer  $d_{90\%}$ , od kojeg je manji promjer 90 % mikrokuglica u uzorku) prikazani su u tablici 2. Iz prikazanih podataka jasno se uočava da se karakteristični promjeri  $X_c$  i  $d_{90\%}$  smanjuju s povećanjem brzine rotacije turbinskog miješala. Također, prikazani podaci pokazuju da dodatak nano-TiO<sub>2</sub> u vodenu fazu emulzije ne utječe značajno

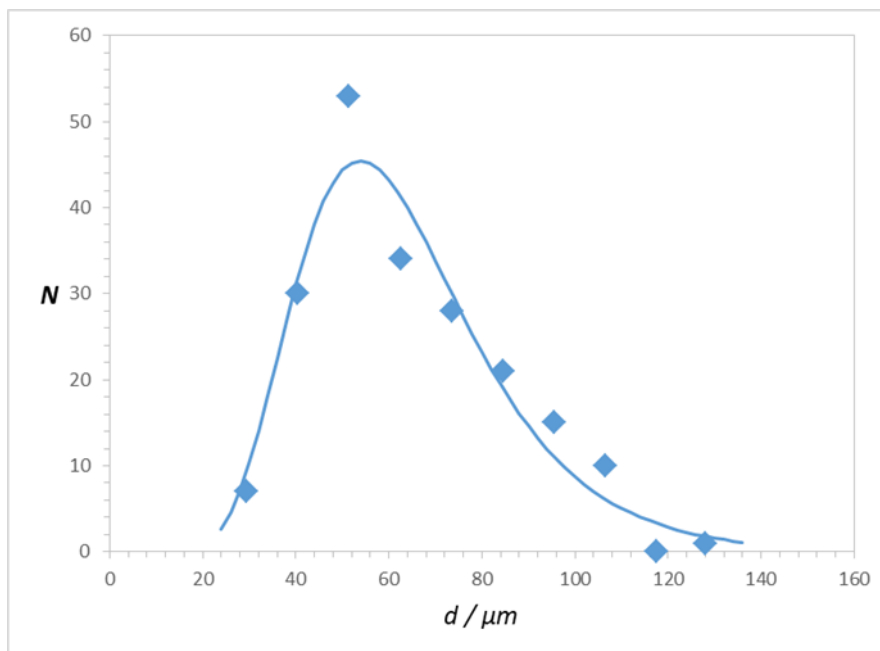
na razdiobu veličina alginatnih mikrokuglica, što odgovara ranije iznesenom kvalitativnom zaključku.

**Tablica 2.** Parametri log-normalne razdiobe (karakteristični promjer maksimuma razdiobe,  $X_c$ ; širina razdiobe,  $\sigma$ , i granični promjer  $d_{90\%}$ ) u ovisnosti o brzini miješanja emulzije.

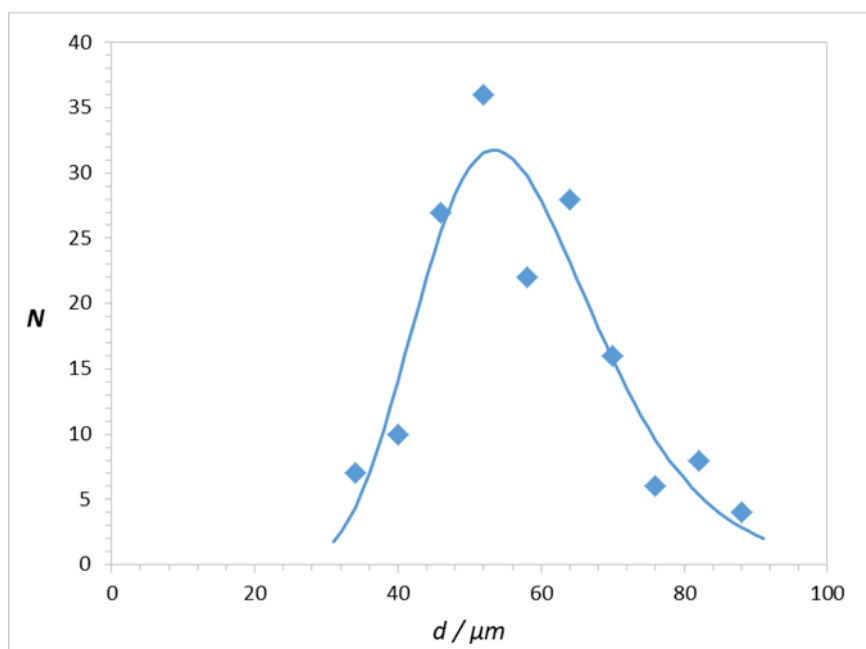
Brzina rotacije miješala / $\text{o}\cdot\text{min}^{-1}$	$X_c / \mu\text{m}$	$\sigma$	$d_{90\%} / \mu\text{m}$
500	58,522	0,166	95
750	56,284	0,099	76
1000	45,255	0,100	61
500 ( $\text{TiO}_2$ )	60,519	0,148	94



**Slika 11..** Raspodjela veličina alginatnih mikrokuglica priređenih emulzijskim postupkom s internim geliranjem, uz brzinu rotacije miješala od 500 o/min. Krivulja prikazuje normalnu raspodjelu usklađenu s eksperimentalnim točkama.

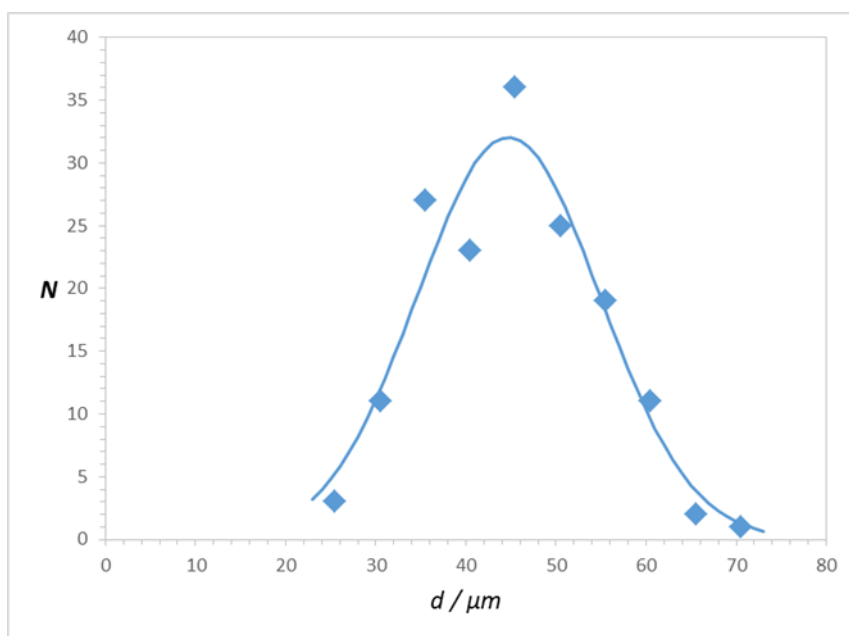


**Slika 12.** Raspodjela veličina alginatnih mikrokuglica priređenih emulzijskim postupkom s internim geliranjem, uz brzinu rotacije miješala od 500 o/min. Krivulja prikazuje log-normalnu raspodjelu usklađenu s eksperimentalnim točkama.

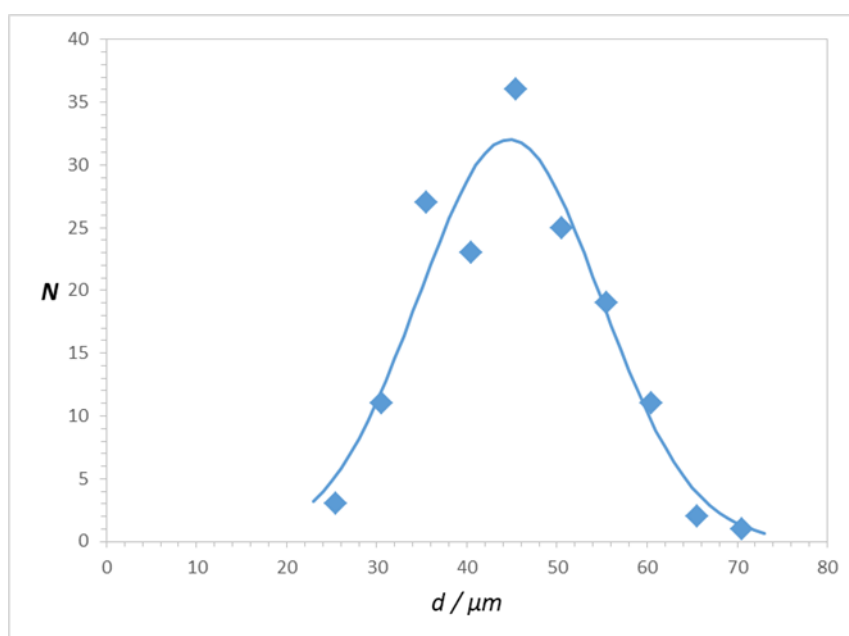


**Slika 13.** Raspodjela veličina alginatnih mikrokuglica priređenih emulzijskim postupkom s internim geliranjem, uz brzinu rotacije miješala od 750 o/min. Krivulja prikazuje normalnu raspodjelu usklađenu s eksperimentalnim točkama

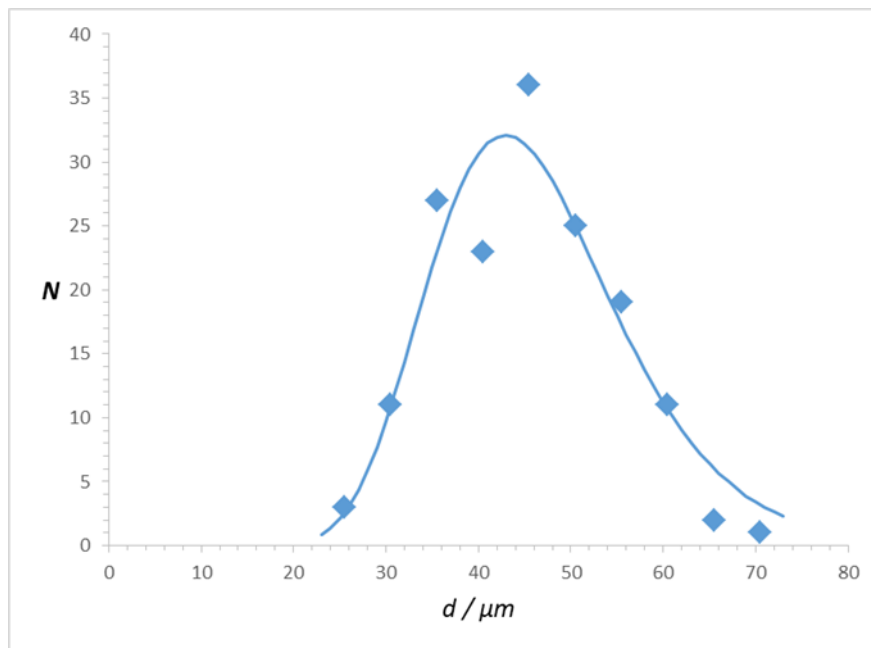




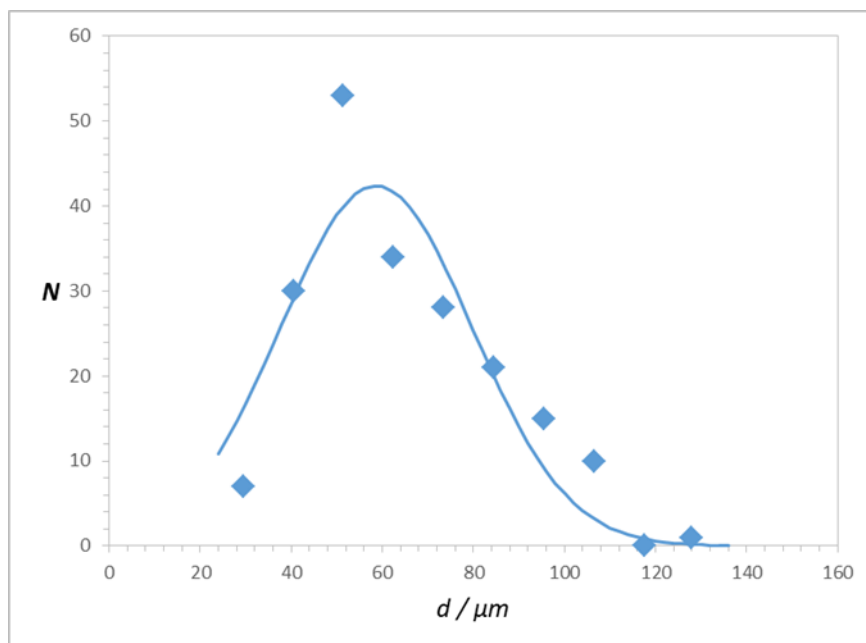
**Slika 14.** Raspodjela veličina alginatnih mikrokuglica priređenih emulzijskim postupkom s internim geliranjem, uz brzinu rotacije miješala od 750 o/min. Krivulja prikazuje log-normalnu raspodjelu usklađenu s eksperimentalnim točkama.



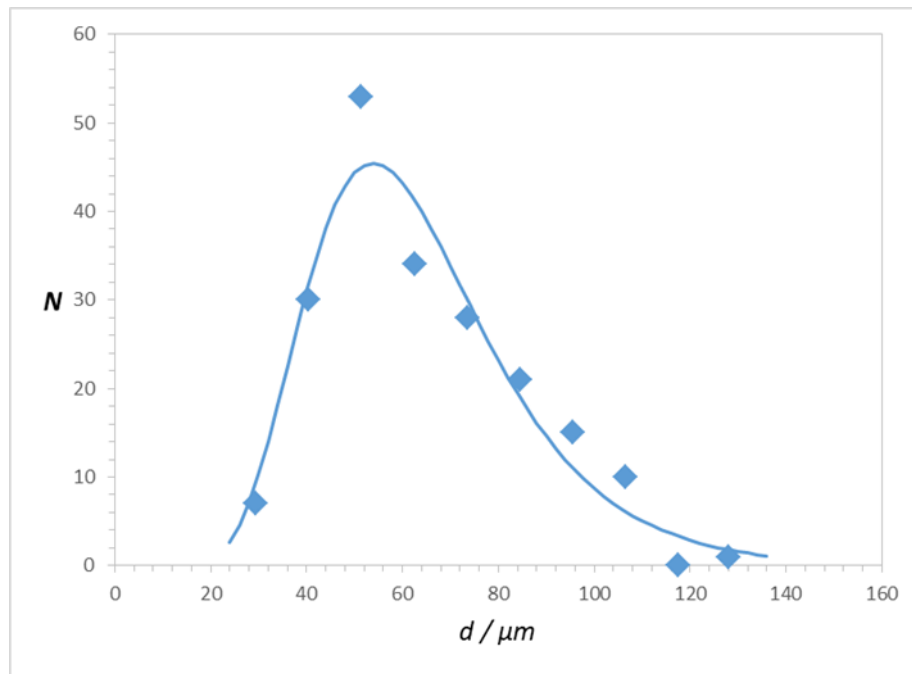
**Slika 15.** Raspodjela veličina alginatnih mikrokuglica priređenih emulzijskim postupkom s internim geliranjem, uz brzinu rotacije miješala od 1000 o/min. Krivulja prikazuje normalnu raspodjelu usklađenu s eksperimentalnim točkama.



**Slika 16.** Raspodjela veličina alginatnih mikrokuglica priređenih emulzijskim postupkom s internim geliranjem, uz brzinu rotacije miješala od 1000 o/min. Krivulja prikazuje log-normalnu raspodjelu usklađenu s eksperimentalnim točkama.



**Slika 17.** Raspodjela veličina alginatnih mikrokuglica priređenih emulzijskim postupkom s internim geliranjem uz dodatak nano-TiO<sub>2</sub>, uz brzinu rotacije miješala od 500 o/min. Krivulja prikazuje normalnu raspodjelu usklađenu s eksperimentalnim točkama.

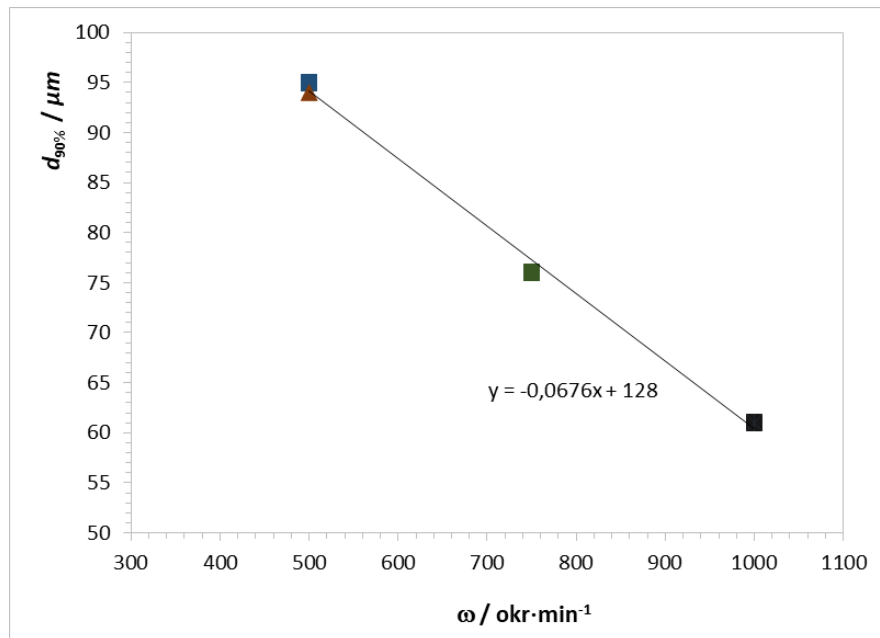


**Slika 18.** Raspodjela veličina alginatnih mikrokuglica priređenih emulzijskim postupkom s internim geliranjem uz dodatak nano-TiO<sub>2</sub>, uz brzinu rotacije miješala od 500 o/min. Krivulja prikazuje log-normalnu raspodjelu usklađenu s eksperimentalnim točkama.

Ovisnost parametra  $d_{90\%}$  o brzini rotacije turbinskog miješala prikazana je na slici 18. Uočava se da je u promatranom području brzina rotacije ovisnost linearna te opisana jednačinom:

$$d_{90\%} = -0,676 \cdot \omega + 128$$

Na temelju dobivene linearne ovisnosti veličine alginatnih mikrokuglica o brzini rotacije turbinskog miješala može se zaključiti da se promjenom hidrodinamičkih uvjeta (tj. brzine miješanja u području od 500 do 1000 o/min) veličina i raspodjela veličina alginatnih mikrokuglica može vrlo fino kontrolirati i podešavati pri uvjetima pripreme mikrokuglica korištenima u ovom radu.



**Slika 19.** Ovisnost graničnog promjera ( $d_{90\%}$ ) alginatnih mikrokuglica, ispod kojeg se nalazi 90 % mikrokuglica, o brzini rotacije miješala ( $\omega$ ). Točke pri 500 o/min odgovaraju uzorku bez dodanog  $\text{TiO}_2$  (kvadratić) i s dodanim  $\text{TiO}_2$  (trokutić).

## 5. ZAKLJUČCI

1. Mikrokuglice alginata mogu se s uspjehom prirediti geliranjem u emulziji tipa *voda u ulju*, uz primjenu kalcijeva karbonata kao internog gelatora. U emulzijama koje su sadržavale vodenu otopinu natrijeva alginata,  $w(\text{alginat}) = 1,5 \%$ , kao vodenu fazu, suncokretovo ulje kao uljnu fazu i Span 80 kao stabilizator emulzije, u omjeru masa 1:9:0.09, priređene su alginatne mikrokuglice promjera od 25 do 185  $\mu\text{m}$ , pri čemu veličina mikrokuglica i raspodjela njihovih veličina ovisi o hidrodinamičkim uvjetima (brzini miješanja) kojima je podvrgnuta emulzija.
2. U području brzina rotacije turbinskog miješala od 500 do 1000 o/min, vrijednost graničnog promjera, od kojeg je manje 90 % sintetiziranih mikrokuglica, mijenja se gotovo linearno s brzinom rotacije miješala. U navedenom području, granični promjer alginatnih mikrokuglica varirao je od 59  $\mu\text{m}$  (500 o/min) do 45  $\mu\text{m}$  (1000 o/min).
3. Alginatne mikrokuglice priređene emulzijskim postupkom s internim gelatorom moguće je modificirati dodatkom titanijeva (IV) oksida, kao specifičnog markera koji omogućuje lakšu detekciju mikrokuglica mikroprobnom analizom. Dodatak do 0,5 %  $\text{TiO}_2$  u vodenu otopinu alginata ne utječe na raspodjelu veličina alginatnih mikrokuglica.

## 6. POPIS LITERATURE

Ching SH, Bansal N, Bhandari B (2017) Alginate gel particles – A review of production techniques and physical properties, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **57**, 1133-1152. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.965773>

Davis HT (1994) Factors determining emulsion type: Hydrophile—lipophile balance and beyond. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **91**, 9-24. [https://doi.org/10.1016/0927-7757\(94\)02929-6](https://doi.org/10.1016/0927-7757(94)02929-6)

Heng PWS, Chan LW, Wong TW (2003) Formation of alginate microspheres produced using emulsification technique, *Journal of Microencapsulation* **20**, 401-413. <https://doi.org/10.3109/02652040309178078>

Hu C, Lu W, Mata A, Nishinari K, Fang Y (2021) Ions-induced gelation of alginate: Mechanisms and applications. *International Journal of Biological Macromolecules* **177**, 578-588. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.086>

Lee HY, Chan LW, Dolzhenko AV, Heng PWS (2006) Influence of viscosity and uronic acid composition of alginates on the properties of alginate films and microspheres produced by emulsification. *Journal of Microencapsulation* **23**, 912–927. <https://doi.org/10.1080/02652040601058368>

Lee KY, Mooney DJ (2012) Alginate: properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci* **37**, 106-126. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3223967/>

Qu F, Zhao M, Fang Y, Nishinari K, Phillips GO, Wu Z i sur. (2015) *Journal of the Science of Food and Agriculture* **96**, 4358-4366. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7645>

Rathore S, Desai PM, Liew CV, Chan LW, Heng PWS (2013) Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering* **116**, 369-381. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.12.022>

Reis CP, Neufeld RJ, Vilela S, Ribeiro AJ, Veiga F (2006) Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles. *Journal of Microencapsulation* **23**, 245–257. <https://doi.org/10.1080/02652040500286086>

Smidsrød O, Skjåk-Bræk G (1990) Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends biotechnol* **8**, 71-78. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(90\)90139-O](https://doi.org/10.1016/0167-7799(90)90139-O)

## **Izjava o izvornosti**

Ja                     Ana Čoklica                     izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Vlastoručni potpis