

Analiza adsorpcijskih i desorpcijskih procesa bioaktivnih molekula, proteina i glukoze s alginatnih mikrokapsula

Laljak, Izvorka

Master's thesis / Diplomski 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:159:705705>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-04**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.

Izvorka Laljak

**ANALIZA ADSORPCIJSKIH I
DESORPCIJSKIH PROCESA
BIOAKTIVNIH MOLEKULA,
PROTEINA I GLUKOZE S
ALGINATNIH MIKROKAPSULA**

Rad je izrađen u Kabinetu za osnove inženjerstva Zavoda za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Maje Benković, uz pomoć izv. prof. dr. sc. Davora Valingera i doc. dr. sc. Tamare Jurina.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za procesno inženjerstvo
Kabinet za osnove inženjerstva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

ANALIZA ADSORPCIJSKIH I DESORPCIJSKIH PROCESA BIOAKTIVNIH MOLEKULA,
PROTEINA I GLUKOZE S ALGINATNIH MIKROKAPSULA

Izvorka Laljak, univ. bacc.ing. biotechn.
0058039144

Sažetak: Cilj ovog rada bio je analizirati i usporediti procese adsorpcije i desorpcije proteina (albumin izoliran iz goveđeg seruma, engl. *bovine serum albumin*, BSA), ugljikohidrata (glukoza) i polifenola (galna kiselina kao modelna molekula) s alginatnih mikrokapsula. Procesi adsorpcije i desorpcije zatim su opisani matematičkim modelima kako bi se definirali kinetički parametri procesa i utvrdili dominantni mehanizmi koji su odgovorni za adsorpciju i desorpciju. Usporedbom vrijednosti konstanti brzina adsorpcije (k) i početnih brzina adsorpcije (h_0) dobivenih primjenom modela pseudodrugog reda, najviše vrijednosti zabilježene su za BSA, nakon čega slijede galna kiselina i glukoza. Analizom vrijednosti konstante brzine desorpcije (k), najviše su vrijednosti zabilježene za galnu kiselinu, koju slijedi glukoza i BSA. Za procese adsorpcije glukoze i galne kiseline, najreprezentativniji model je pseudodrugog reda, što sugerira da je limitirajući korak kemijska sorpcija tvari, te da brzina adsorpcije ne ovisi o koncentraciji adsorbata, nego o kapacitetu adsorbensa. Proces desorpcije pokretan je pseudo-Fickovim difuzijskim mehanizmom.

Ključne riječi: *adsorpcija, desorpcija, kinetički modeli, alginat, mikroinkapsulacija*

Rad sadrži: 49 stranica, 22 slike, 4 tablice, 55 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: izv.prof.dr.sc. Maja Benković

Pomoć pri izradi: Davor Valinger, izv.prof.dr.sc.
Tamara Jurina, doc.dr.sc.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Davor Valinger (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Maja Benković (mentor)
3. prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković (član)
4. prof. dr. sc. Mirjana Čurlin (zamjenski član)

Datum obrane: 29. rujna 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of process engineering
Section for fundamental engineering

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Bioprocess Engineering

ANALYSIS OF THE ADSORPTION AND DESORPTION PROCESSES OF BIOACTIVE MOLECULES, PROTEINS AND GLUCOSE ON ALGINATE MICROCAPSULES

Izvorka Laljak, univ. bacc.ing. biotechn.
0058039144

Abstract: The objective of this thesis was to analyze and compare the adsorption and desorption processes of proteins (bovine serum albumin, BSA), carbohydrates (glucose) and polyphenols (gallic acid as a model molecule) on alginate microcapsules. The adsorption and desorption processes were then described by mathematical models in order to define the kinetic parameters of the process and determine the dominant mechanisms responsible for adsorption and desorption. By comparing the values of adsorption rate constant (k) and initial adsorption rate (h_0) obtained using the pseudo-second-order model, the highest values were recorded for BSA, followed by gallic acid and glucose. By analyzing the values of the desorption rate constant (k), the highest values were recorded for gallic acid, followed by glucose and BSA. For the adsorption processes of glucose and gallic acid, the most representative model was pseudo-second-order, which suggests that the limiting step of the process is the chemical sorption of substances, and that the rate of adsorption does not depend on the adsorbate concentration, but on the capacity of the adsorbent. The desorption process is characterized by the pseudo-Fickian diffusion mechanism.

Keywords: *adsorption, desorption, kinetic models, alginate, microencapsulation*

Thesis contains: 49 pages, 22 figures, 4 tables, 55 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Maja Benković, PhD, Associate professor

Technical support and assistance: Davor Valinger, PhD, Associate professor
Tamara Jurina, PhD, Assistant professor

Reviewers:

1. Davor Valinger, PhD, Associate professor (president)
2. Maja Benković, PhD, Associate professor (mentor)
3. Ivana Radojčić Redovniković, PhD, Full professor (member)
4. Mirjana Čurlin, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: 29 September 2022.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. ALGINATI	2
2.1.1. Struktura i svojstva alginata	2
2.1.2. Primjena alginata	4
2.2. MIKROINKAPSULACIJA	4
2.2.1. Metode mikroinkapsulacije	5
2.3. BSA (engl. <i>bovine serum albumin</i>)	7
2.4. GLUKOZA	8
2.5. GALNA KISELINA	9
2.6. PROCESI ADSORPCIJE I DESORPCIJE TVARI S ALGINATNIH MIKROKAPSULA	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. MATERIJALI	13
3.1.1. Reagensi i otapala	13
3.1.2. Aparatura i pribor	13
3.2. METODE	14
3.2.1. Priprema alginatnih mikrokapsula	14
3.2.1.1. Postupak pripreme praznih alginatnih mikrokapsula	14
3.2.1.2. Postupak pripreme alginatnih mikrokapsula s aktivnim tvarima	15
3.2.1.2.1. Priprema alginatnih mikrokapsula koje sadrže protein	15
3.2.1.2.2. Priprema alginatnih mikrokapsula koje sadrže glukozu	15
3.2.1.2.3. Priprema alginatnih mikrokapsula koje sadrže galnu kiselinu	16
3.2.2. Mikroskopska analiza mikrokapsula	16
3.2.3. Adsorpcija aktivnih tvari na alginatne mikrokapsule	16
3.2.3.1. Adsorpcija proteina na mikrokapsule	16
3.2.3.2. Adsorpcija glukoze na mikrokapsule	17
3.2.3.3. Adsorpcija galne kiseline na mikrokapsule	17
3.2.4. Određivanje koncentracije proteina po Bradfordu	17
3.2.5. Određivanje koncentracije glukoze u otopini primjenom glukoza-PAP testa	18
3.2.6. Određivanje ukupnih fenolnih spojeva (TPC)	19
3.2.7. Desorpcija (otpuštanje) aktivnih tvari s alginatnih mikrokapsula	21
3.2.7.1. Desorpcija proteina s mikrokapsula	21
3.2.7.2. Desorpcija glukoze s mikrokapsula	21

3.2.7.3. Desorpcija galne kiseline s mikrokapsula	21
3.2.8. Matematičko modeliranje kinetike procesa adsorpcije i desorpcije.....	21
3.2.8.1. Kinetički modeli za opis procesa adsorpcije	21
3.2.8.2. Kinetički modeli za opis procesa desorpcije	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1. MIKROSKOPSKA ANALIZA MIKROKAPSULA	24
4.2. ADSORPCIJA BSA, GLUKOZE I GALNE KISELINE NA ALGINATNE MIKROKAPSULE	26
4.3. DESORPCIJA BSA, GLUKOZE I GALNE KISELINE S ALGINATNIH MIKROKAPSULA.....	29
4.3. MATEMATIČKO MODELIRANJE KINETIKE PROCESA ADSORPCIJE I DESORPCIJE.....	31
4.3.1. Kinetički modeli za adsorpciju	31
4.3.2. Kinetički modeli za desorpciju.....	37
5. ZAKLJUČCI.....	43
6. LITERATURA.....	44

1. UVOD

Prirodni bioaktivni spojevi i žive stanice smatrani su obećavajućim proizvodima blagotvornima za ljudsko zdravlje. Međutim, konstantni izazov za njihovu uporabu je njihova laka degradacija. Njihova stabilnost može se poboljšati metodama mikroinkapsulacije, kojima se aktivna tvar osjetljiva na vanjske uvjete ugrađuje unutar zaštitnog polimernog materijala. Mikroinkapsulacija je vrlo raširena metoda za očuvanje i stabilizaciju funkcionalnih spojeva za prehrambene, farmaceutske i kozmetičke primjene (Corrêa-Filho i sur., 2019).

Stoga je poboljšanje fizikalno-kemijskih, funkcionalnih i otpuštajućih karakteristika inkapsuiranih biopolimernih matriksa trenutno jedan od najposebnije istraživanih predmeta. Također se nastoji proizvesti ekonomski isplative sustave za dovođenje raznih aktivnih sastojaka na mjesto djelovanja (Belščak-Cvitanović i sur., 2017).

Alginat, prirodni anionski polimer koji se dobiva pretežno iz smeđih algi, zahvaljujući svojoj biokompatibilnosti, biorazgradivosti, dostupnosti i kemijskoj stabilnosti, našao je svoju primjenu u raznim područjima. Na primjer, koristi se za maskiranje neugodnog okusa određenih spojeva, za ciljano dovođenje lijekova na mjesto djelovanja, liječenju rana, tkivnom inženjerstvu ili *in vitro* staničnim kulturama (Bušić i sur., 2018). Procesi mikroinkapsulacije s alginatom kao polimerom su jednostavni i provode se u blagim i netoksičnim uvjetima, te ne zahtijevaju komplicirane uređaje, zbog čega je upravo alginat široko korišten za metode mikroinkapsulacije (Yim i sur., 2010).

Cilj ovog rada bio je analizirati i usporediti procese adsorpcije i desorpcije tri vrste biomolekula s alginatnih mikrokapsula: proteina (albumin izoliran iz govedeg seruma, engl. *bovine serum albumin*, BSA), ugljikohidrata (glukoza) i polifenola (galna kiselina kao modelna molekula). Procesi adsorpcije i desorpcije zatim su opisani prikladnim matematičkim modelima.

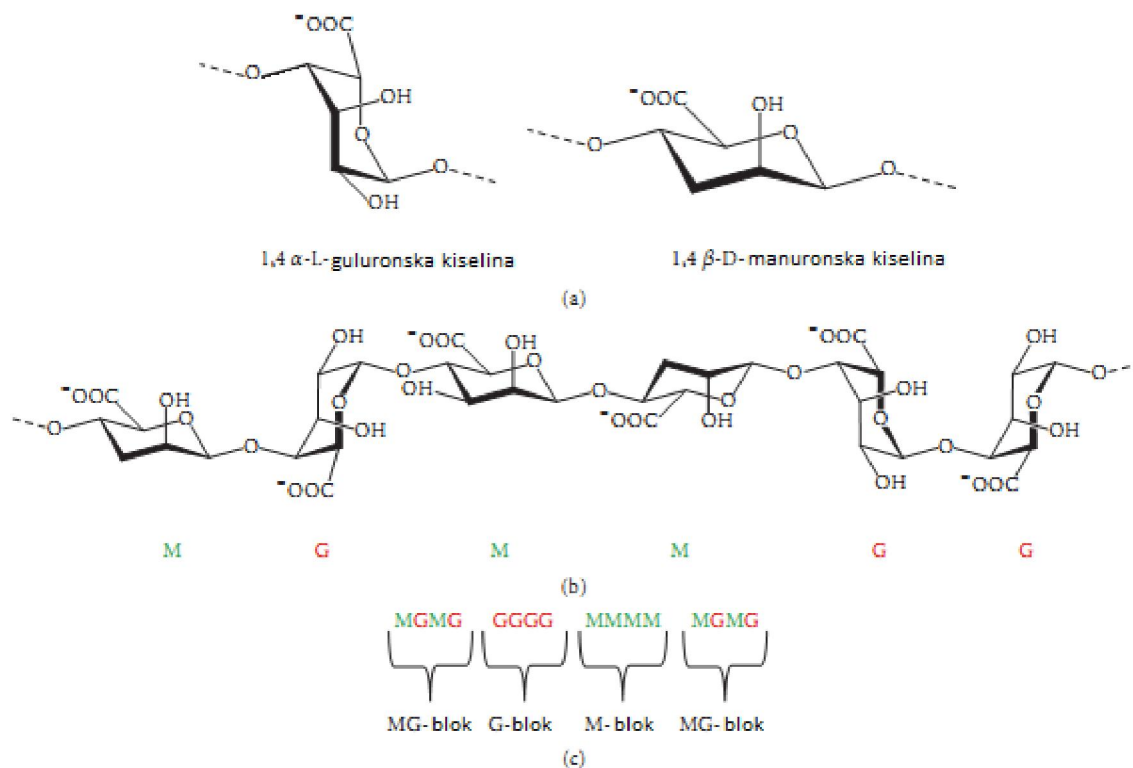
2. TEORIJSKI DIO

2.1. ALGINATI

Alginati su skupina polisaharida prirodno prisutnih u prirodi kao strukturne komponente u smeđim i nekim crvenim algama, te kapsularni polisaridi kod nekih bakterija (Draget, 2009; Khotimchenko i sur., 2001). "Alginat" obično podrazumijeva soli alginske kiseline ili njezine derivate (Szekalska i sur., 2016).

2.1.1. Struktura i svojstva alginata

Alginati su linearni, nerazgranati polisaharidi građeni od β -D-manuronske kiseline (M) i njenog C-5 epimera, α -L-guluronske kiseline (G), povezanih 1,4 glikozidnom vezom. Ta dva monomera raspoređena su u homopolimerne (GG, MM) i heteropolimerne (MG) blokove (slika 1) (Draget, 2009; Khotimchenko i sur., 2001).



Slika 1. Struktura alginata: a) monomeri; b) lančana konformacija; c) rasporedi građevnih blokova (prema Szekalska i sur., 2016)

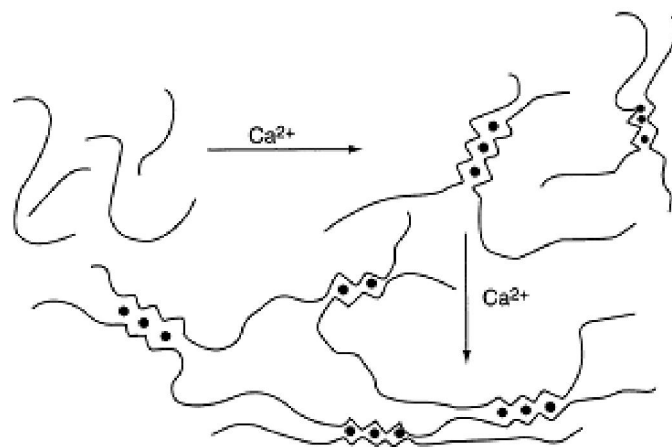
Ovisno o njihovom izvoru, alginati pokazuju veliku raznolikost u sastavu tj. M/G omjeru, kao i u distribuciji M i G blokova unutar lanca, što rezultira velikom raznolikošću njihovih bioloških i fizikalnih karakteristika (Rinaudo, 2014; Draget, 2009).

I manuronska i glukuronska kiselina sadrže karboksilnu skupinu, što u području neutralnog pH alginat čini polianionom.

Komercijalno dostupni alginati imaju prosječnu molekulsku masu od oko 200 kDa, ali dostupni su i do 500 kDa, a najčešće dolaze u obliku natrijevog alginata (Puscaselu i sur., 2020; Donati i Paoletti, 2009).

Najvažnija funkcionalna svojstva alginata su sposobnost ugušćivanja i geliranja. Hidrofilni su, u vodi bubre i povećavaju viskoznost otopine, a sposobni su apsorbirati i 200-300 puta veću količinu vode u odnosu na svoju težinu. Monovalentne soli i esteri alginske kiseline dobro su topljivi u vodi, no sama alginska kiselina te njene divalentne soli nisu (Puscaselu i sur., 2020; Khotimchenko i sur., 2001).

Primjena alginata u prehrambenoj industriji, biotehnologiji i biomedicini povezana je s njegovom sposobnošću vezanja dvovalentnih kationa poput Ca^{2+} i posljedičnog formiranja hidrogela. Pokretačka sila za brzu formaciju gela je mnogo veći afinitet alginata za Ca^{2+} nego za monovalentne katione poput Na^+ . Mehanizam geliranja se temelji na formiranju mreže u kojoj Ca^{2+} ioni drže polisaharidne lance na okupu, tako što tvore kelate vežući se s karboksilnim i hidroksilnim ostacima guluronatnih blokova (tzv. *egg-box* model, slika 2) (Skjåk-Bræk i sur., 2015; Khotimchenko i sur., 2001).



Slika 2. Shema unakrsnog povezivanja alginata u prisustvu kalcijevih iona (●) u kompleksu s L-guluronskim blokovima (Rinaudo, 2014)

Alginate je prvi započeo istraživati britanski kemičar E.C.C. Stanford oko 1881.g, a njihova industrijska proizvodnja je započela 1929. godine. (Draget, 2009; Khotimchenko i sur., 2001). Komercijalni alginati proizvode se iz jeftinih algalnih izvora, najčešće *Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum* te algi iz roda *Laminaria*. Međutim, sve je atraktivnija i bakterijska fermentativna proizvodnja, kojom se mogu dobiti alginati s većom kemijskom i fizikalnom definiranosti, a proizvode ih bakterije iz rodova *Azotobacter* i *Pseudomonas* (Nagarajan i sur., 2016; Lee i Mooney, 2012).

2.1.2. Primjena alginata

Alginati su lako dostupni, ekološki, relativno jeftini, a također i biokompatibilni, biokompostabilni i netoksični, što im omogućava vrlo široku primjenu.

Glavna područja primjene alginata su prehrambena industrija, tekstilna i papirna industrija, kozmetička i farmaceutska industrija. U prehrambenoj industriji, alginati se koriste kao stabilizatori, sredstva za ugušćivanje ili geliranje, a u novije vrijeme i kao sastojak ambalaže odnosno zaštitnih premaza. Primjenu su našli i u obradi otpadnih voda, za imobilizaciju nitrificirajućih bakterija. Također, tržišna dostupnost biokompatibilnih alginata visokog stupnja čistoće omogućila je sve veći razvoj njihove primjene u farmaciji, biomedicini i biotehnologiji. Primjeri takvih primjena su tretiranje rana, regeneracija tkiva, imobilizacija stanica te razvoj terapijskih sustava s modificiranim oslobađanjem (Puscaselu i sur., 2020; Skjåk-Bræk i sur., 2015; Rinaudo, 2014; Khotimchenko i sur., 2001).

Međutim, alginati imaju i svoja ograničenja, poput slabe stabilnosti i niskog stupnja pružanja mehaničke barijere, nestabilnosti prilikom tretiranja toplinom ili inkompatibilnosti s teškim metalima. Ove osobine mogu se poboljšati kombiniranjem alginata s drugim biopolimerima, poput proteinskih, ili sintetičkim polimerima (Puscaselu i sur., 2020).

2.2. MIKROINKAPSULACIJA

Mikroinkapsulacija je proces pakiranja aktivne komponente (krute, tekuće ili plinovite) unutar omotača ili matriksa pri čemu se dobivaju mikročestice. U mikročestice se ubrajaju mikrokapsule, mikrosfere i mikroemulzije, a raznolike su po veličini, građi i funkciji (Bodade i Bodade, 2020; Grgić i sur., 2020; Poshadri i Kuna, 2010).

U mikrokapsulama, aktivna tvar (jezgra) obavijena je zaštitnim polimerom (omotač ili membrana). Inkapsulirani materijali mogu biti farmaceutici, proteini i peptidi, nutrijenti, hlapljivi spojevi, boje i pigmenti, katalizatori, pesticidi i dr. Također, mogu se imobilizirati i cijele bakterijske ili životinjske stanice za primjenu u staničnom i tkivnom inženjerstvu. Polimerni nosači mogu biti razni prirodni ili sintetski materijali. Za blagu i biokompatibilnu inkapsulaciju koriste se najčešće proteini poput kolagena i želatine, i polisaharidi poput agara, kalcijevog alginata i karagenana (Bodade i Bodade, 2020; Amaral i sur., 2019; Singh i sur., 2010).

Ovisno o primjeni, neki od razloga za mikroinkapsulaciju su sljedeći (Ahirrao i sur., 2014; Singh i sur., 2010):

- maskiranje neugodnih okusa i mirisa lijekova
- zaštita sastojaka od okolišnih uvjeta (svjetlosti, vlage, kisika ili topline)
- razdvajanje inkompatibilnih sastojaka
- smanjenje hlapljivosti ili higroskopsnosti aktivnog sastojka
- smanjenje iritacije probavnog sustava prilikom primjene lijeka
- smanjenje opasnosti kod rukovanja toksičnim supstancama, npr. pesticidima
- postizanje odgođenog ili produženog djelovanja aktivnog sastojka, odnosno njegovog ciljanog dovođenja na mjesto djelovanja

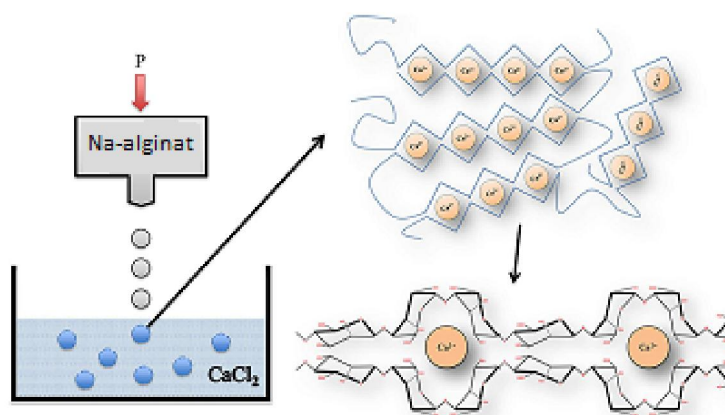
2.2.1. Metode mikroinkapsulacije

Za proizvodnju mikrokapsula mogu se koristiti brojne kemijske (emulgiranje, polimerizacija, liposomi), fizikalno-kemijske (koacervacija, sol-gel inkapsulacija) ili fizikalne (liofilizacija, sušenje raspršivanjem, kokristalizacija, ekstruzija) metode, a česte su i njihove kombinacije.

Izbor metode ovisi o zadanim kriterijima za karakteristike mikrokapsula, ali i kriterijima koje sama tehnika mora zadovoljiti da bi bila zastupljena u određenoj industriji. Dok su uvjeti za prehrambenu, agronomsku i kozmetičku industriju obično fokusirani na brzinu proizvodnje i niske troškove, medicinski i biotehnološki procesi imaju strože kriterije (Bodade i Bodade, 2020; Demont i Marison, 2015).

Uporaba agresivnijih kemikalija ili povišene temperature tijekom procesa ograničava mogućnosti inkapsulacije osjetljivijih spojeva, kao što su proteini, enzimi i žive stanice. Rješenje ovog problema je uporaba tehnika koje se temelje na principu ionske gelacije (polielektrolitske kompleksacije). Ionska gelacija se temelji na interakciji kationa ili aniona s ionskim polimerom koja rezultira formiranjem umrežene strukture, u jednostavnim i blagim uvjetima. Na primjeru Ca-alginata, Ca^{2+} ioni djeluju kao mostovi između lanaca anionskog polimera, formirajući mrežu hidrogela, kao što je već opisano u prošlom poglavlju. Ovo svojstvo alginata omogućilo mu je široku uporabu kao polimera za mikroinkapsulaciju, u prehrambenoj, farmaceutskoj i biotehnoškoj primjeni (Ahirrao i sur., 2014).

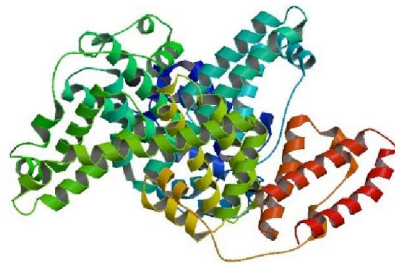
Najjednostavnija metoda laboratorijske proizvodnje mikrokapsula je metoda ekstruzijskog kapanja (slika 3). Otopina natrijevog alginata s dodatkom aktivne tvari propušta se (ekstrudira) kroz mlaznicu, na otvoru mlaznice formira se kapljica koja pada nakon što gravitacijska sila viseće kapi nadjača površinsku napetost. Kapljice padaju u prihvatnu otopinu koja sadrži Ca^{2+} ione, čime odmah započinje proces ionske gelacije na površini kapljica, čime se one skrućuju. Umjesto ekstrudera, može se primijeniti i obična šprica s medicinskom iglom. Ovisno o promjeru igle, promjeri mikrokapsula dobiveni ovom metodom kreću se između 1 i 4 mm, što su relativno velike kuglice. Za postizanje sitnijih promjera, kao i za prijenos u veća mjerila, primjenjuju se sustavi s koaksijalnim protokom zraka, vibrirajućom mlaznicom, rezačem mlaza ili atomizacija rotirajućim diskom. Primjena alginata u ovoj metodi za imobilizaciju stanica, organela i enzima je jako dobro proučena (Demont i Marison, 2015; Vemmer i Patel, 2013).



Slika 3. Shema procesa ionske gelacije alginata metodom kapanja (prema Paredes Juárez i sur., 2014)

2.3. BSA (engl. *bovine serum albumin*)

Goveđi serumski albumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA) je protein albumin izoliran iz goveđeg seruma. Sastoji se od jednog polipeptidnog lanca sa ukupno 583 aminokiselinska ostatka, molekulska masa mu je 66,5 kDa, a izoelektrična točka 4,7, u vodi pri temperaturi od 25 °C (slika 4) (Wikipedia, 2021a; Assadpour i Jafari, 2019; Zhang i sur., 2006).



Slika 4. Prikaz molekule albumina iz goveđeg seruma (BSA) (Majorek i sur., 2012)

BSA je najzastupljeniji protein u plazmi goveda, a prisutan je i u sirutki. U tijelu sisavaca je odgovoran za 99 % transporta slobodnih masnih kiselina. Njegova strukturna i fizikalno-kemijska svojstva su vrlo dobro istražena i karakterizirana. Zbog svega navedenog, kao i zbog njegove dobre topljivosti u vodi, često se koristi kao modelni protein u raznim istraživanjima (Assadpour i Jafari, 2019; Xu i sur., 2019).

BSA se često koristi kao standard koncentracije proteina u laboratorijskim eksperimentima (tzv. Bradfordov test proteina). Ima brojne biokemijske primjene, npr. u ELISA testovima (enzimski povezani imunosorbentni test, engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) i imunoblot testovima. Budući da je BSA malen, stabilan, umjereno nereaktivan protein, često se koristi kao blokator u imunohistokemiji.

Također, BSA se koristi kao hranjiva tvar u kulturama stanica i mikroorganizama. Glavni je sastojak fetalnog goveđeg seruma, uobičajenog medija za kulturu stanica, gdje ima ulogu nosača malih molekula. Veže vodu, soli, masne kiseline, vitamine i hormone te ih prenosi između stanica i tkiva. Zahvaljujući svojem svojstvu velikog kapaciteta vezanja liganada, albumini imaju široku kliničku, farmaceutsku i biokemijsku primjenu (Wikipedia, 2021a; Biowest, 2021, Majorek i sur., 2012).

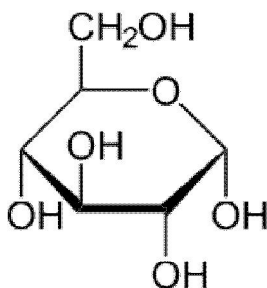
BSA ima široku primjenu u sustavima ciljanog dovođenja djelatnih tvari lijekova na mjesto djelovanja, zahvaljujući niskoj cijeni i jednostavnosti pripreve. Njegova struktura i raznolikost aminokiselinskih ostataka omogućavaju vezanje lijekova i bioaktivnih tvari, čime se mogu postići raznolike fizikalno-kemijske karakteristike. BSA je biorazgradiv, biokompatibilan, netoksičan i neimunogeničan. Kao i alginat, atraktivan je za ulogu matriksa u nanočesticama (Assadpour i Jafari, 2019).

Postoji rastuća potreba za razvojem sustava kontroliranog dovođenja proteinskih i peptidnih lijekova na mjesto djelovanja, zbog rastuće važnosti te skupine lijekova. Međutim, postoje određeni problemi vezani za njihovu primjenu, poput kratkog roka trajanja zbog njihove enzimске razgradnje ili otežanog prolaza kroz biološke barijere, zbog njihove difuzivnosti i niskog koeficijenta particije. Iz tog razloga proučavane su razne mogućnosti uklopljivanja proteinskih lijekova u biokompatibilne polimerne sustave za ciljani transport, a najviše su korištene metode mikroinkapsulacije (Nochos i sur., 2008).

2.4. GLUKOZA

Glukoza ($C_6H_{12}O_6$) je najrasprostranjeniji monosaharid u prirodi. Sastojak je voća (grožđa pretežito), meda, životinjskih tkiva, saharoze, te različitih polisaharida (celuloza, škrob, glikogen, dekstran). Kao izomer prisutna je u krvi svih sisavaca.

Glukozu proizvode biljke i većina algi procesom fotosinteze iz vode i ugljičnog dioksida, koristeći energiju sunčeve svjetlosti. U metabolizmu energije, glukoza je najvažniji izvor energije u svim organizmima (Wikipedia, 2021b; Anonymus, 2021; Shendurse i Khedkar, 2016).



Slika 5. Haworth-ova projekcija molekule glukoze (α -D-glukopiranoza) (Ashenhurst, 2022)

S obzirom da sadrži šest atoma ugljika i aldehidnu skupinu, glukoza pripada skupini tzv. aldoheksoza. Molekula glukoze, mase 180,156 Da, može poprimiti oblik otvorenog lanca, no pretežito tvori ciklički oblik (glukopiranoza, slika 5), koji je najstabilniji oblik za aldoheksoze. Bioaktivni oblik glukoze, koji se javlja u prirodi, je D-glukoza (dekstroza), dok se L-glukoza proizvodi sintetički u razmjerno malim količinama. Svi oblici glukoze su bezbojni i lako se tope u vodi i octenoj kiselini, a slabo u etanolu i metanolu (Wikipedia, 2021b; Anonymus, 2021). Čista glukoza je pH neutralna tvar, te dodatkom u tekućine ne utječe na njihovu pH vrijednost (Gillespie, 2021).

Glukoza se komercijalno proizvodi od škroba enzimskom hidrolizom. U proizvodnji hrane glukoza se koristi kao zaslađivač, ovlaživač ili za povećanje volumena, a glukozni sirup koristi se u proizvodnji raznih slatkiša. Također, razne organske kiseline mogu se biotehnološki proizvesti iz glukoze, na primjer fermentacijom pomoću *Clostridium thermoaceticum* dobiva se octena kiselina, a pomoću *Lactobacillus delbrueckii* dobiva se mliječna kiselina (Wikipedia, 2021b; Anonymus, 2021).

Unatoč raširenom interesu za alginatne biomaterijale, provedeno je relativno malo studija o kontroliranom transportu malih molekula poput glukoze kroz alginatni matriks. Takve informacije su bitne za dizajniranje alginatnih gelova za inkapsulaciju stanica i tkivno inženjerstvo. Sustav kontroliranog otpuštanja aktivne tvari na bazi alginatnog gela može se primijeniti za kontrolirano dovođenje glukoze kod dijabetičkih pacijenata ili atletičara (McEntee i sur., 2008).

2.5. GALNA KISELINA

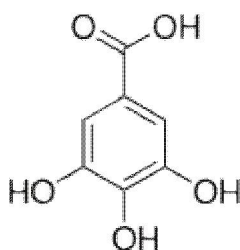
Fenolni spojevi predstavljaju jednu od najvećih skupina prirodnih spojeva te posjeduju širok raspon bioloških aktivnosti, povezan s njihovom strukturalnom raznolikosti. Neki primjeri takvih aktivnosti su antioksidativna, protuupalna, antialergijska, antimikrobna, antiviralna, antikancerogena, antimutagena, kardioprotektivna, neuroprotektivna i antidiijabetička.

Prehrambeni fenolni spojevi se dnevno konzumiraju kroz razno voće (citrusi, grožđe, bobičasto voće), povrće (brokula, kupus, luk) i pića (kava, čaj, vino). Odgovorni su za razna svojstva određene hrane, poput okusa, mirisa, boje i adstrigentnosti (Grgić i sur., 2020).

Postoje mnoge klasifikacije fenolnih spojeva, s obzirom na visoku strukturalnu raznolikost, ali zajedničko svim skupinama je da imaju barem jedan aromatični prsten, s jednom ili više hidroksilnih grupa.

Fenolne kiseline sadrže jedan aromatski prsten i najmanje jednu karboksilnu skupinu, a mogu se razvrstati u derivate benzojeve kiseline, s C6-C1 strukturom, kamo spada i galna kiselina, i derivate cinaminske kiseline s C6-C3 strukturom. Pojavljuju se u biljkama, kao esteri ili glikozidi konjugirani s drugim prirodnim spojevima, ili u manjoj mjeri u obliku slobodne kiseline (Grgić i sur., 2020).

Među fenolnim spojevima, galna kiselina je najviše istražena, karakterizirana i koristi se kao standard u Folin–Ciocalteu testu za određivanje ukupnih fenolnih spojeva (Vallejo-Castillo i sur., 2020).



Slika 6. Kemijska struktura galne kiseline (Daglia i sur., 2014)

Galna kiselina (3,4,5-trihidroksibenzojeva kiselina) je fenolni spoj dosta prisutan u voću, crvenom vinu, zelenom čaju i mnogim drugim biljnim izvorima. Može se ekstrahirati i iz nekih tvrdih drvetu, poput hrasta, ili ljekovitog bilja. Kristali galne kiseline su žućkastobijele boje, a molekularna masa je $170,12 \text{ g mol}^{-1}$ (Grgić i sur., 2020; Zhang i sur., 2013; Verma i sur., 2013).

Galna kiselina i njeni derivati privukli su pažnju zbog raznih mogućnosti iskorištavanja njihovog antioksidativnog, ali i prooksidativnog djelovanja. Njihovo široko polje bioaktivnosti obuhvaća antitumorsko, antimikrobno, antidiabetičko, antikolesterolsko, hepatoprotektivno i antidepresivno djelovanje (Singh i sur., 2018; Badhani i sur., 2015).

Međutim, galna kiselina posjeduje snažnu adstringentnost i neugodan okus, te visoku osjetljivost na pH, temperaturu, svjetlo i kisik. Također, u vodenim otopinama teži autooksidiranju u dimernu ili oligomernu strukturu. Stoga, kako bi se riješio problem neugodnog okusa i spriječila autooksidacija, potreban je odgovarajući sustav dovođenja na

mjesto djelovanja. Mikroinkapsulacija je obećavajuća tehnika za tu svrhu, kao i za bioraspoloživost aktivnog spoja, jer osigurava kontroliranu opskrbu i otpuštanje aktivnog spoja na ciljanom mjestu, gdje je omogućena njegova najbolja apsorpcija i prijenos u ciljana tkiva. Mikro- i nanočestice kao sustavi dovođenja aktivne tvari na ciljano mjesto nalaze sve veću primjenu u farmaceutskoj industriji (Essifi i sur., 2020; Grgić i sur., 2020; Li i sur., 2016).

2.6. PROCESI ADSORPCIJE I DESORPCIJE TVARI S ALGINATNIH MIKROKAPSULA

Pojam 'sorpcija' odnosi se na vezanje tvari (sorbata) na površinu sorbensa, stvarajući interakciju koja može biti fizikalna, kemijska ili elektrostatska. Adsorpcija na granici čvrste i tekuće faze je vrlo kompleksne prirode, jer je ta granična površina prekrivena molekulama otapala, koje mogu biti čvrsto adsorbirane i prvo se moraju otpustiti da bi adsorbat mogao doseći površinu (Sahoo i Prelot, 2020).

Procesi adsorpcije i desorpcije su važni za heterogene sustave i stoga dosta istraživani. To su procesi u ovisnosti o vremenu, te je nužno znati brzine adsorpcije i desorpcije, radi dizajna i procjene adsorbensa. Stoga je važno proučiti kinetiku adsorpcije i desorpcije te odrediti njihove fenomenološke koeficijente koji karakteriziraju transport sorbata unutar sorbensa (Azizian, 2004).

Uporaba kinetičkih modela daje nam uvid u učinkovitost adsorbensa, brzinu uklanjanja adsorbata iz otopine i vjerojatni termodinamički profil adsorpcijskog sustava (Unuabonah i sur., 2019).

Za razumijevanje karakteristika adsorpcijskog procesa, pretežno se koriste modeli kinetike pseudoprvog reda, pseudodrugog reda i Elovich. Za opis mehanizma unutarčestične difuzije adsorbata dizajniran je Webber-Morris model (Sahoo i Prelot, 2020; Sharma i sur., 2017).

Od mnogih kinetičkih modela za procese desorpcije, neki od glavnih su model kinetike nultog reda, model kinetike prvog reda, Korsmeyer-Peppas, Higuchi, Hixson–Crowell, Baker–Lonsdale, Weibull, Hopfenberg i Gompertz (Bruschi, 2015).

Adsorpcija je jedno od najboljih rješenja za uklanjanje boja i drugih kontaminanata (npr. fenola, metalnih iona, gnojiva) iz otpadnih voda, zahvaljujući svojoj ekonomičnosti.

Adsorpcija pomoću nanočestica hidrogelova je pridonijela važnosti ovog polja, jer se ovakve nanočestice koriste za brojne primjene, poput dovođenja lijekova na mjesto djelovanja (Sharma i sur., 2017).

Jedan od većih izazova za prehrambenu industriju je razvoj učinkovitih sustava za kontrolirano otpuštanje inkapsuliranih aktivnih spojeva (Corrêa-Filho i sur., 2019).

Kako bi se dizajnirao sustav s kontroliranim, predodređenim profilom otpuštanja aktivne tvari, nužno je znati točne mehanizme prijenosa mase, te kvantitativno predvidjeti rezultirajuću kinetiku otpuštanja. Matematički modeli su važan alat za dizajn farmaceutskih formulacija, procjenu procesa otpuštanja lijekova *in vitro* i *in vivo* i, općenito, optimiranje dizajna za nove sustave (Bruschi, 2015).

Zbog svega navedenog, provedena su mnoga istraživanja procesa adsorpcije i desorpcije aktivnih tvari na mikrokapsule. Geetha i sur. (2015) su istraživali potencijal alginatnih nanočestica za uklanjanje boje (*Malachite green*) iz vode tehnikom šaržne adsorpcije. Ispitivani su utjecaji pH, početne koncentracije boje, vremena kontakta, temperature i doze adsorbensa na uspješnost adsorpcije.

Nochos i sur. (2008) istraživali su kinetiku otpuštanja proteina s alginatnih mikrokapsula različitog sastava tj. koncentracije alginata i omjera Na-alginata i HPMC (hidroksipropil metil celuloze).

Bušić i sur. (2018) su ispitivali utjecaj sastava alginatnih mikrokapsula kombiniranih s filerima (kakao i rogač) na uspješnost inkapsulacije i desorpciju fenolnih spojeva iz maslačka. Benković i sur. (2021) analizirali su procese adsorpcije i desorpcije bioaktivnih spojeva iz biljaka na alginatnim mikročesticama.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

U eksperimentalnom dijelu ovog rada za izradu mikropkapsula korišteni su:

- natrijev alginat (Fisher Scientific, Bishop Meadow Road, Loughborough)
- kalcijev klorid (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- BSA protein (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- Glukoza (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- galna kiselina 98 % (Acros Organics, Geel, Belgija)

3.1.1. Reagensi i otapala

Za potrebe eksperimenta korišteni su sljedeći reagensi i otapala:

- Coomasie Brilliant Blue G250 (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Kalcijev klorid bezvodni (CaCl_2) (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev karbonat (Na_2CO_3) (Gram Mol, Zagreb, Hrvatska)
- etanol, (J.T.Baker, Deventer, Nizozemska)
- Glukoza PAP test (Dijagnostika d.o.o., Sisak Hrvatska)
- Fosforna kiselina H_3PO_4 (85 %) (Carlo Erba, Emmendingen, Njemačka)
- Destilirana voda

3.1.2. Aparatura i pribor

Pribor:

- staklene epruvete
- plastične epruvete, 2 mL
- stalci za epruvete
- staklene laboratorijske čaše
- staklene pipete
- mikropipete
- celulozni filter papir
- menzure
- stakleni lijevak
- stakleni štapići

- laboratorijska boca
- špatule
- šprice
- igle za šprice
- cjedilo
- kivete za spektrofotometar
- odmjerne tikvice
- štoperica
- skalpel

Aparatura:

- UV-VIS spektrofotometar (Biochrom Libra S11, Cambridge, Engleska)
- analitička vaga Sartorius TE214-S0CE, (Sartorius, Goettingen, Njemačka)
- štapni mikser (Superior XB955F, Guangdong Xinbao Electric, Foshan, China)
- vorteks (Biosan Vortex V1 Plus, Riga, Latvija)
- Magnetna miješalica (SB 162-3, Stuart, Staffordshire, Velika Britanija)
- Mikroskop s kamerom (Motic B series, Motic Europe, Barcelona, Španjolska)
- Uljna kupelj (IKA HBR 4 digital, IKA-Werk, Staufen, Njemačka)
- Ultrazvučna kupelj (Velleman, Gavere, Belgija)

3.2. METODE

3.2.1. Priprema alginatnih mikrokapsula

3.2.1.1. Postupak pripreme praznih alginatnih mikrokapsula

Pripremi se 150 mL 2 % (w/v) otopine natrijeva alginata u destiliranoj vodi te se izmiješa štapnim mikserom kako bi se osigurala dobra homogenizacija. Nakon miješanja, kako bi se uklonili mjehurići, otopina se stavlja u ultrazvučnu kupelj ili se stavlja u hladnjak preko noći. Zatim se pripremi i 2 % (w/v) prihvatna otopina CaCl₂. Kad su mjehurići otklonjeni, otopina alginata se unosi u špricu, na špricu se stavlja medicinska igla te se ručno istiskuju kuglice alginata u prihvatnu otopinu CaCl₂. Pritom je potrebno paziti da je udaljenost vrha igle od površine prihvatne otopine ista za svaku šaržu te da se kuglice istiskuju ujednačenom brzinom kako bi se dobile kuglice što sličnijih dimenzija.

Nakon završetka pripreme, mikrokapsule se ostavljaju u otopini CaCl_2 preko noći kako bi se stabilizirale. Nakon toga se profiltriraju i temeljito isperu destiliranom vodom kako bi se uklonili ostaci kalcijevih iona s površine mikrokapsula. Nakon ispiranja kapsule se procijede i skladište u hladnjaku na 4 – 6 °C.

3.2.1.2. Postupak pripreme alginatnih mikrokapsula s aktivnim tvarima

3.2.1.2.1. Priprema alginatnih mikrokapsula koje sadrže protein

Pripremi se 75 mL otopine alginata (2 % w/v) i BSA (0,5 % w/v) u destiliranoj vodi. Izmiješa se štapnim mikserom kako bi se osigurala dobra homogenizacija. Nakon miješanja otopina se stavlja u ultrazvučnu kupelj da se uklone mjehurići ili se stavlja u hladnjak preko noći. U međuvremenu se priprema 2 % (w/v) prihvatna otopina CaCl_2 u 0,5 % (w/v) otopini BSA.

Nakon što su uklonjeni mjehurići, otopina BSA-alginata unosi se u špricu, na špricu se stavlja medicinska igla te se ručno istiskuju kuglice BSA-alginata u prihvatnu otopinu BSA- CaCl_2 . Pritom je potrebno paziti da je udaljenost vrha igle od površine prihvatne otopine ista za svaku šaržu te da se kuglice istiskuju ujednačenom brzinom kako bi se dobile kuglice što sličnijih dimenzija.

Nakon završetka pripreme, mikrokapsule se ostavljaju u otopini BSA- CaCl_2 preko noći kako bi se stabilizirale. Nakon toga se profiltriraju i temeljito isperu 0,5 % (w/v) otopinom BSA kako bi se uklonili ostaci kalcijevih iona s površine mikrokapsula. Nakon ispiranja kapsule se procijede i skladište u hladnjaku na 4 – 6 °C.

3.2.1.2.2. Priprema alginatnih mikrokapsula koje sadrže glukozu

Pripremi se 75 mL otopine alginata (2% w/v) i glukoze (0,5 % w/v) u destiliranoj vodi. Izmiješa se štapnim mikserom radi dobre homogenizacije. Nakon miješanja otopina se stavlja u ultrazvučnu kupelj da se uklone mjehurići ili se stavlja u hladnjak preko noći. U međuvremenu se priprema 2 % (w/v) prihvatna otopina CaCl_2 u 0,5 % (w/v) otopini glukoze.

Nakon što su uklonjeni mjehurići, otopina Glc-alginata prebacuje se u špricu, na špricu se stavlja medicinska igla te se ručno istiskuju kuglice Glc-alginata u prihvatnu otopinu Glc- CaCl_2 . Pritom je potrebno paziti da je udaljenost vrha igle od površine prihvatne otopine ista za svaku šaržu te da se kuglice istiskuju ujednačenom brzinom kako bi se dobile kuglice čim sličnijih dimenzija.

Nakon završetka pripreme, mikrokapsule se ostavljaju u otopini Glc-CaCl₂ preko noći kako bi se stabilizirale. Nakon toga se profiltriraju i temeljito isperu 0,5 % (w/v) otopinom glukoze kako bi se uklonili ostaci kalcijevih iona s površine mikrokapsula. Nakon ispiranja kapsule se procijede i skladište u hladnjaku na 4 – 6 °C.

3.2.1.2.3. Priprema alginatnih mikrokapsula koje sadrže galnu kiselinu

Pripremi se otopina alginata (2% w/v) i galne kiseline (0,5 % w/v, $\gamma=5$ g/L) u destiliranoj vodi. Izmiješa se štapnim mikserom radi dobre homogenizacije. Nakon miješanja otopina se stavlja u ultrazvučnu kupelj ili u hladnjak preko noći, radi uklanjanja mjehurića. U međuvremenu se pripremi 2 % (w/v) prihvatna otopina CaCl₂ u 0,5 % (w/v) otopini galne kiseline (engl. *gallic acid*, GA) u destiliranoj vodi.

Nakon što su uklonjeni mjehurići, otopina GA-alginata unosi se u špricu, na špricu se stavlja medicinska igla te se ručno istiskuju kuglice GA-alginata u prihvatnu otopinu GA-CaCl₂. Pritom je potrebno paziti da je udaljenost vrha igle od površine prihvatne otopine ista za svaku šaržu te da se kuglice istiskuju ujednačenom brzinom kako bi se dobile kuglice čim sličnijih dimenzija.

Nakon završetka pripreme, mikrokapsule se ostavljaju u otopini GA-CaCl₂ preko noći kako bi se stabilizirale. Nakon toga se profiltriraju i temeljito isperu 0,5 % (w/v) otopinom GA kako bi se uklonili ostaci kalcijevih iona s površine mikrokapsula. Nakon ispiranja kapsule se procijede i skladište u hladnjaku na 4 – 6 °C.

3.2.2. Mikroskopska analiza mikrokapsula

Sve vrste pripremljenih mikrokapsula mikroskopirane su pomoću svjetlosnog mikroskopa Motic B series s kamerom Moticom 3 (Moticam, Barcelona, Španjolska) pod povećanjem 40x. Analiziran je izgled površine i presjek svih uzoraka mikrokapsula.

3.2.3. Adsorpcija aktivnih tvari na alginatne mikrokapsule

3.2.3.1. Adsorpcija proteina na mikrokapsule

Prije provođenja adsorpcijskog pokusa potrebno je pripremiti 120 mL 0,5 % (w/v) otopine proteina u destiliranoj vodi, te tako pripremljenu otopinu staviti na temperiranje na 30 °C u uljnu kupelj, uz konstantno miješanje (200 rpm). Kad se otopina proteina temperira,

izbroji se 1000 praznih mikrokapsula koje se dodaju u temperiranu otopinu proteina. U trenutku dodavanja kuglica u otopinu proteina pokrene se štoperica i započinje adsorpcijski pokus. Uzorci ($V=800 \mu\text{L}$) se uzimaju iz reakcijske smjese u vremenskim intervalima 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 20, 30, 60 i 120 minuta.

3.2.3.2. Adsorpcija glukoze na mikrokapsule

Potrebno je pripremiti 120 mL otopine glukoze u destiliranoj vodi ($\gamma=100 \text{ mgL}^{-1}$), te tako pripremljenu otopinu staviti na temperiranje na $30 \text{ }^\circ\text{C}$ u uljnu kupelj, uz konstantno miješanje (200 rpm). Kad se otopina glukoze temperira, izbroji se 1000 praznih mikrokapsula koje se dodaju u temperiranu otopinu glukoze. U trenutku dodavanja kuglica u otopinu glukoze pokrene se štoperica i započinje adsorpcijski pokus. Uzorci ($V=800 \mu\text{L}$) se uzimaju iz reakcijske smjese u vremenskim intervalima 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 i 90 minuta.

3.2.3.3. Adsorpcija galne kiseline na mikrokapsule

Prije provođenja adsorpcijskog pokusa potrebno je pripremiti 120 mL otopine galne kiseline u destiliranoj vodi ($\gamma=5 \text{ gL}^{-1}$), te tako pripremljenu otopinu staviti na temperiranje na $30 \text{ }^\circ\text{C}$ u uljnu kupelj, uz konstantno miješanje (200 rpm). Kad se otopina galne kiseline temperira, izbroji se 1000 praznih mikrokapsula koje se dodaju u temperiranu otopinu galne kiseline. U trenutku dodavanja kuglica u otopinu galne kiseline pokrene se štoperica i započinje adsorpcijski pokus. Uzorci ($V=800 \mu\text{L}$) se uzimaju iz reakcijske smjese u vremenskim intervalima 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120 i 180 minuta.

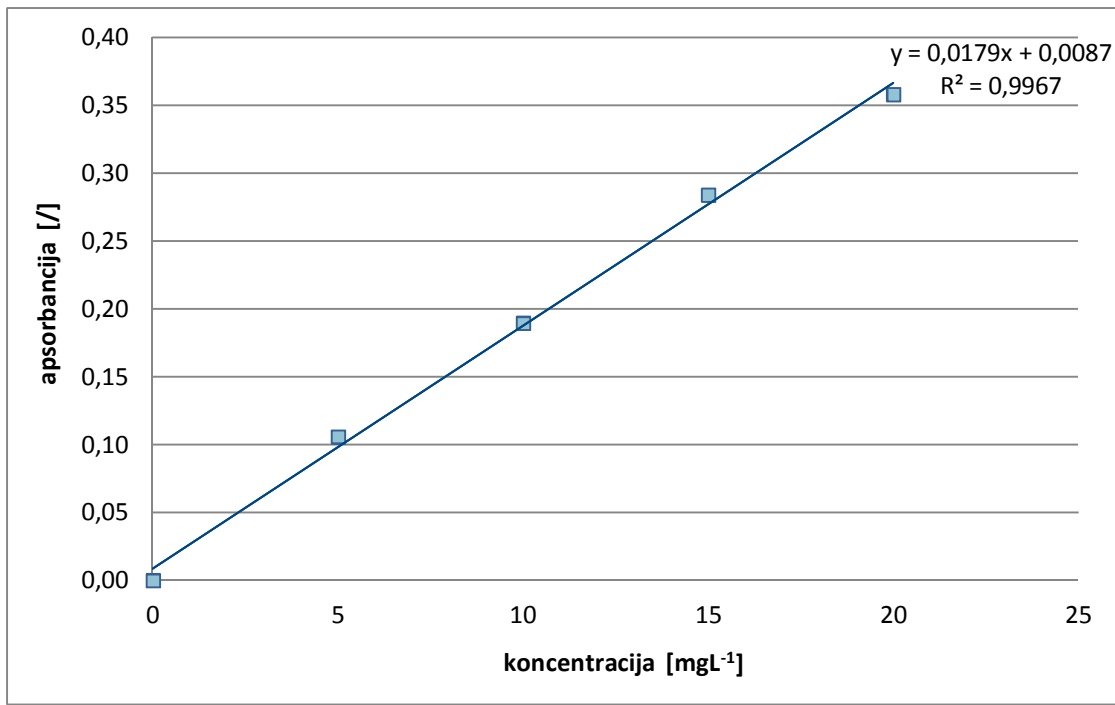
3.2.4. Određivanje koncentracije proteina po Bradfordu

Koncentracija proteina u uzorcima određuje se spektrofotometrijski ($\lambda=595 \text{ nm}$) po Bradfordu. Bradfordov reagens priprema se miješanjem 100 mg Coomassie Brilliant Blue G250 reagensa sa 50 mL etanola, 100 mL H_3PO_4 (85 %) i 850 mL destilirane vode.

Nakon što se izmjeri apsorbancija plastičnih kiveta sa destiliranom vodom pri $\lambda=595 \text{ nm}$, iz kiveta se izljuje voda te se dodaje reakcijska smjesa koja sadrži 500 μL Bradfordovog reagensa i 500 μL uzorka odgovarajućeg razrjeđenja. Smjesa se vorteksira i ostavi da stoji 10 minuta nakon čega se očita apsorbancija pri 595 nm.

Prije određivanja koncentracije proteina u uzorcima, potrebno je izraditi baždarni dijagram (slika 7) sa sljedećim koncentracijama BSA standarda: 0, 1, 5, 10, 15 i 20 mg L^{-1} . Za

pripremu standardnih otopina BSA najprije se priprema *stock* otopina BSA koncentracije 1 mg mL⁻¹ čija se apsorbancija provjerava na 280 nm (mora biti oko 0,66). Nakon toga *stock* otopina se razrjeđuje 10 puta kako bi se dobila otopina koncentracije 0,1 mg mL⁻¹ iz koje se dalje pripremaju razrjeđenja.



Slika 7. Baždarni dijagram po Bradfordu, za određivanje koncentracije BSA

Iz baždarnog dijagrama je vidljivo da je jednadžba pravca:

$$y=0,0179x + 0,0087 \quad [1]$$

pri čemu je

x-koncentracija otopine BSA (mg L⁻¹)

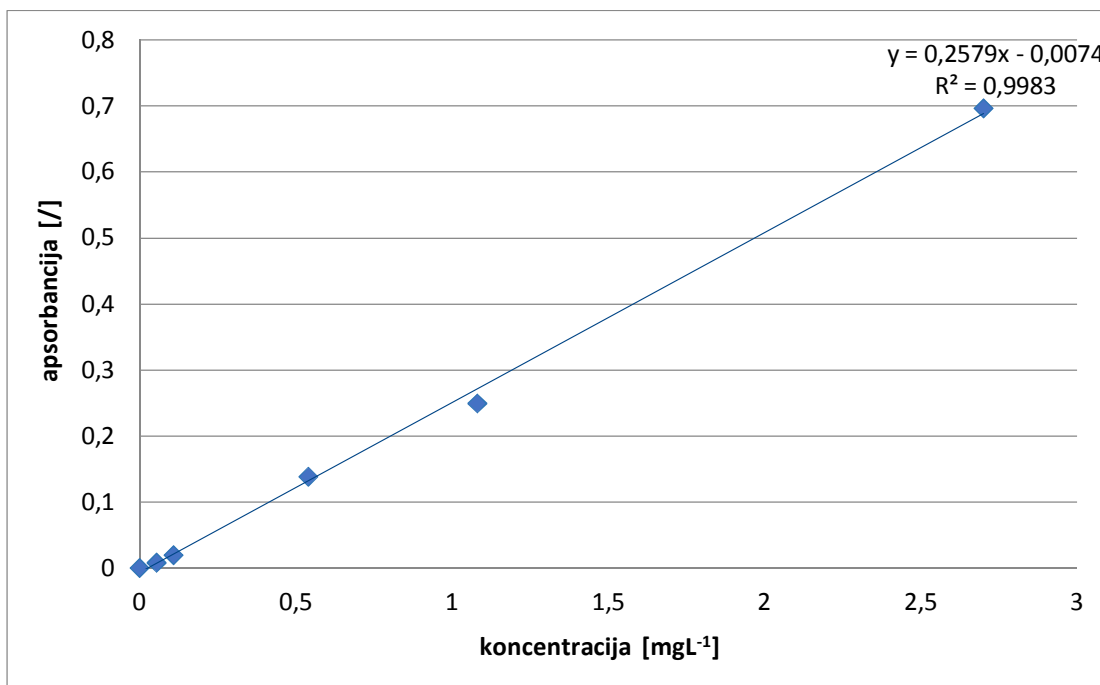
y-izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 595 nm

3.2.5. Određivanje koncentracije glukoze u otopini primjenom glukoza-PAP testa

Glukoza-PAP test provodi se prema proceduri opisanoj u uputama originalno zapakiranog testa. Koncentracija se mjeri spektrofotometrijski pri $\lambda=500$ nm u plastičnim kivetama od 1 cm³. Za mjerenje koncentracije koristi se PAP otopina koja se priprema otapanjem sadržaja bočice u 250 mL destilirane vode. Najprije je potrebno izmjeriti i zabilježiti apsorbanciju praznih plastičnih kiveta na $\lambda=500$ nm. Nakon što je izmjerena

apsorbancija praznih kiveta, direktno u kivete se dodaje 1 mL PAP otopine i 10 μ L uzorka, vorteksira se i izmjeri apsorbanacija pri 500 nm nakon 30 min stajanja na sobnoj temperaturi.

Također je potrebno izraditi i baždarni pravac (slika 8), korištenjem različitih koncentracija standardne otopine glukoze dostupne u kutiji sa testom (otopina 5,4 g L^{-1} razrjeđuje se 2, 5, 10, 50 i 100 puta). Linearnost Glc-PAP je do 40 mmol L^{-1} , te treba pripaziti da se uzorci razrijede do koncentracije koja ulazi u raspon linearnosti baždarnog dijagrama.



Slika 8. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbanacije o koncentraciji za glukozu

Iz baždarnog dijagrama je vidljivo da je jednadžba pravca:

$$y=0,2579x - 0,0074 \quad [2]$$

gdje je

x-koncentracija otopine glukoze (mg L^{-1})

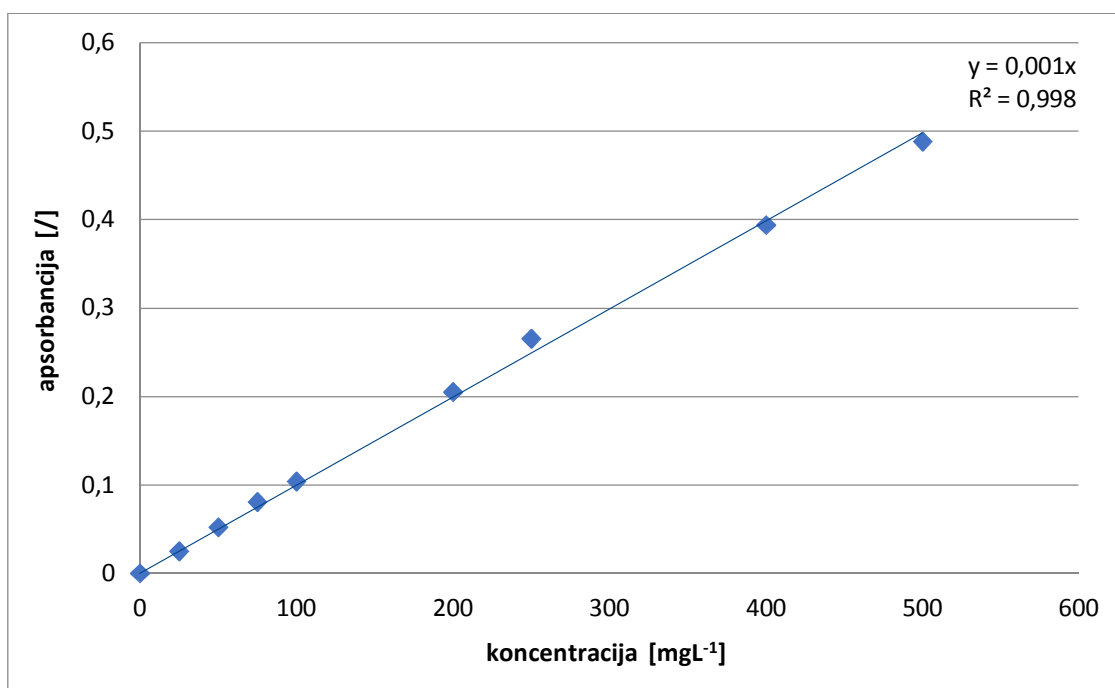
y-izmjerene vrijednosti apsorbanacije pri 500 nm

3.2.6. Određivanje ukupnih fenolnih spojeva (TPC)

Ukupan sadržaj fenolnih spojeva (engl. *Total Phenolic Content*, TPC) odnosno koncentracija galne kiseline kao modelne molekule, utvrđuje se spektrofotometrijski upotrebom Folin-Ciocalteu reagensa.

U epruvetu se otpipetira 7,9 mL destilirane vode, 100 μL uzorka, 500 μL Folin-Ciocalteu reagensa i 1,5 mL 20 %-tne otopine Na_2CO_3 . Nakon dodatka 20 %-tne otopine Na_2CO_3 pokreće se reakcija te se uzorci ostave 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbanacija razvijenog plavog obojenja spektrofotometrijski na 765 nm. Osim uzoraka priprema se i slijepa proba, na isti način kao i reakcijska smjesa za uzorke samo što umjesto uzorka sadrži 100 μL destilirane vode. Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost.

Udio ukupnih polifenola računa se na osnovu jednadžbe baždarnog pravca (slika 8) galne kiseline (0, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 400 i 500 mg/L), a rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) L^{-1} ili g uzorka.



Slika 9. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji za galnu kiselinu

Iz baždarnog dijagrama je vidljivo da je jednadžba pravca:

$$y=0,001x \quad [3]$$

Pri čemu je:

y=razlika apsorbancije uzorka i slijepa probe pri 765 nm

x=ekvivalent galne kiseline (mg L^{-1})

3.2.7. Desorpcija (otpuštanje) aktivnih tvari s alginatnih mikrokapsula

3.2.7.1. Desorpcija proteina s mikrokapsula

Izbroji se 1000 BSA-alginat kuglica koje se zatim dodaju u 120 mL destilirane vode prethodno temperirane na 30 °C u uljnoj kupelji pri 200 rpm. U trenutku dodavanja kuglica u destiliranu vodu pokrene se štoperica i započinje desorpcijski pokus. Uzorci ($V=800 \mu\text{L}$) se uzimaju iz reakcijske smjese u vremenskim intervalima 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 120, 180, 240 i 300 minuta. Određivanje koncentracije proteina u uzorcima provodi se po gore opisanom protokolu (Bradford).

3.2.7.2. Desorpcija glukoze s mikrokapsula

Izbroji se 1000 Glc-alginat kuglica koje se zatim dodaju u 120 mL destilirane vode prethodno temperirane na 30 °C u uljnoj kupelji pri 200 rpm. U trenutku dodavanja kuglica u destiliranu vodu pokrene se štoperica i započinje desorpcijski pokus. Uzorci ($V=800 \mu\text{L}$) se uzimaju iz reakcijske smjese u vremenskim intervalima 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50, 60 i 90 minuta. Određivanje koncentracije glukoze u uzorcima provodi se po gore opisanom protokolu (glukoza PAP-test).

3.2.7.3. Desorpcija galne kiseline s mikrokapsula

Izbroji se 1000 GA-alginat kuglica koje se zatim dodaju u 120 mL destilirane vode prethodno temperirane na 30 °C u uljnoj kupelji pri 200 rpm. U trenutku dodavanja kuglica u destiliranu vodu pokrene se štoperica i započinje desorpcijski pokus. Uzorci ($V=800 \mu\text{L}$) se uzimaju iz reakcijske smjese u vremenskim intervalima 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 i 90 minuta. Određivanje koncentracije galne kiseline u uzorcima provodi se po gore opisanom protokolu (TPC).

3.2.8. Matematičko modeliranje kinetike procesa adsorpcije i desorpcije

Matematičko modeliranje kinetike adsorpcije i desorpcije provedeno je pomoću softvera Statistica v. 14.0 (Tibco Software, Palo Alto, SAD).

3.2.8.1. Kinetički modeli za opis procesa adsorpcije

Za predviđanje kinetike procesa adsorpcije korištena su tri kinetička modela: Model kinetike pseudo-prvog reda, model kinetike pseudo-drugog reda te Webber-Morrisov model

unutarčestične difuzije. Matematičke jednadžbe pojedinih modela prikazane su u tablici 1, pri čemu je:

q_t – koncentracija adsorbiranog adsorbata u vremenu t [mg g^{-1}]

q_e – ravnotežna koncentracija, odnosno kapacitet adsorpcije [mg g^{-1}]

k_1, k_2 – konstante brzine za kinetiku prvog odnosno drugog reda [min^{-1}]

h_0 – početna brzina adsorpcije [$\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1}$]

k_i – konstanta brzine unutarčestične difuzije [$\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-0.5}$]

C – konstanta otpora difuziji [mg g^{-1}]

Tablica 1. Kinetički modeli za opis procesa adsorpcije

kinetika pseudoprvog reda	$q_t = q_e[1 - \exp(-k_1 t)]$ $h_0 = k_1 q_e$
kinetika pseudodrugog reda	$q_t = \frac{k_2 q_e^2 t}{1 + k_2 q_e t}$ $h_0 = k_2 q_e^2$
unutarčestična difuzija (Webber-Morris)	$q_t = k_i t^{0.5} + C$

3.2.8.2. Kinetički modeli za opis procesa desorpcije

Za predviđanje kinetike procesa desorpcije korištena su tri kinetička modela: model kinetike prvog reda, Korsmeyer-Peppas te Higuchi. Matematičke jednadžbe pojedinih modela prikazane su u tablici 2, pri čemu je:

M_t – količina otpuštenog adsorbata u otopini u vremenu t [$\text{mg g}_{\text{kuglice}}^{-1}$]

M_0 – početna koncentracija adsorbata u otopini [$\text{mg g}_{\text{kuglice}}^{-1}$]

k – konstanta brzine [min^{-1}]

n – difuzijski eksponent

Tablica 2. Kinetički modeli za opis procesa desorpcije

kinetika prvog reda	$M_t = M_0 e^{-kt}$
Korsmeyer-Peppas	$M_t = kt^n$
Higuchi	$M_t = kt^{0.5}$

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu cilj je bio provesti adsorpciju BSA proteina, glukoze i galne kiseline iz vodene otopine na kuglice Ca-alginata, kao i desorpciju istih tvari sa alginatnih mikrokapsula u vodeni medij. Za tu svrhu prvo je bilo potrebno izraditi prazne alginatne mikrokapsule za adsorpciju, te mikrokapsule s inkapsuliranim navedenim aktivnim tvarima za desorpciju. Izgled i morfologija dobivenih kuglica promotreni su mikroskopom i snimljeni kamerom. Adsorpcija i desorpcija su praćene kroz mjerenje koncentracije aktivne tvari u supernatantu nakon stavljanja mikrokapsula u otopinu, u zadanim vremenskim intervalima. Na kraju je provedeno i matematičko modeliranje procesa adsorpcije i desorpcije, te je na temelju koeficijenata determinacije i vrijednosti standardnih pogrešaka ispitana kompatibilnost korištenih modela sa kinetikom provedenih procesa.

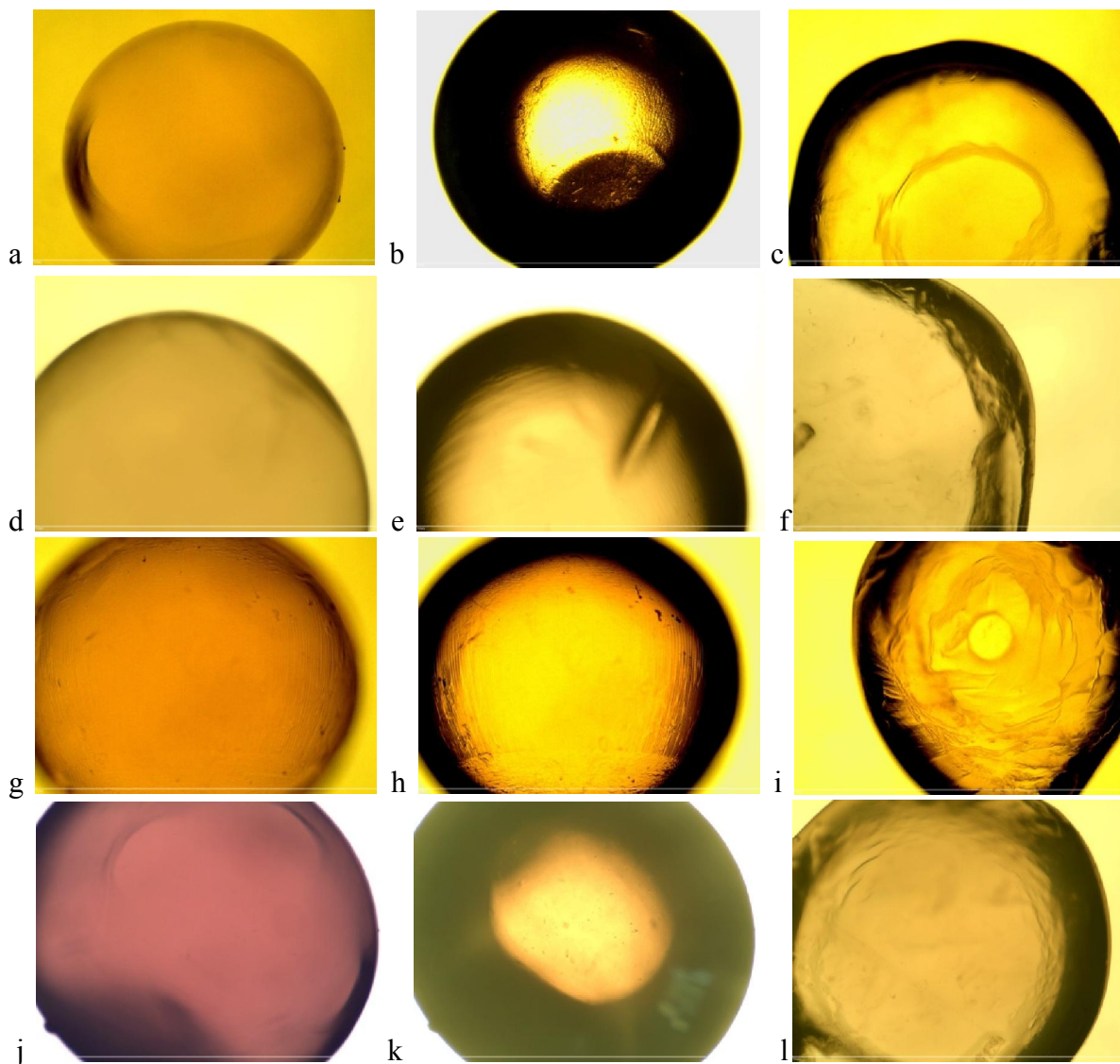
Rezultati dobiveni navedenim metodama prikazani su slikama, tablično i grafički.

4.1. MIKROSKOPSKA ANALIZA MIKROKAPSULA

Oblik i morfologija mikrokapsula su bitni jer utječu na njihovu gustoću, mehaničku otpornost, bubrenje, te zaštitu i otpuštanje inkapsuliranih biokomponenta (Dima i sur., 2016). Mikrokapsule Ca-alginata proizvedene u ovom istraživanju dobivene su metodom ionske gelacije, a napravljene su 4 različite vrste: mikrokapsule bez aktivne tvari tj. od čistog Ca-alginata; mikrokapsule sa BSA proteinom; mikrokapsule s glukozom i mikrokapsule s galnom kiselinom.

Radi boljeg uvida u njihovu morfologiju, mikrokapsule su snimljene pod svjetlosnim mikroskopom. Mikrografi su prikazani na slici 10.

Na slici 10 je vidljivo da su sve vrste mikrokapsula sferičnog oblika, s tim da mikrokapsula bez aktivne tvari ima najpravilniji sferni oblik. Sve mikrokapsule imaju relativno glatke i homogene površine, uz prisustvo rijetkih plitkih brazdi na površini kod mikrokapsula bez aktivne tvari i mikrokapsula s glukozom. Linije odnosno brazde su najbolje vidljive na slici kuglice s glukozom (slika 10 h), i predstavljaju tragove nastale prilikom istiskivanja otopine glukoza-alginata kroz špricu. Nabori su vidljivi i na slici površine mikrokapsule sa BSA (slika 10 e).



Svaka prva slika u retku je snimka površine kuglice, svaka druga je snimka površine s primjenom filtera, a svaka treća je prikaz presjeka kuglice.

Slika 10. Mikroskopski prikaz mikro kapsula: a-b-c) alginat; d-e-f) BSA-alginat; g-h-i) glukoza-alginat; j-k-l) GA-alginat

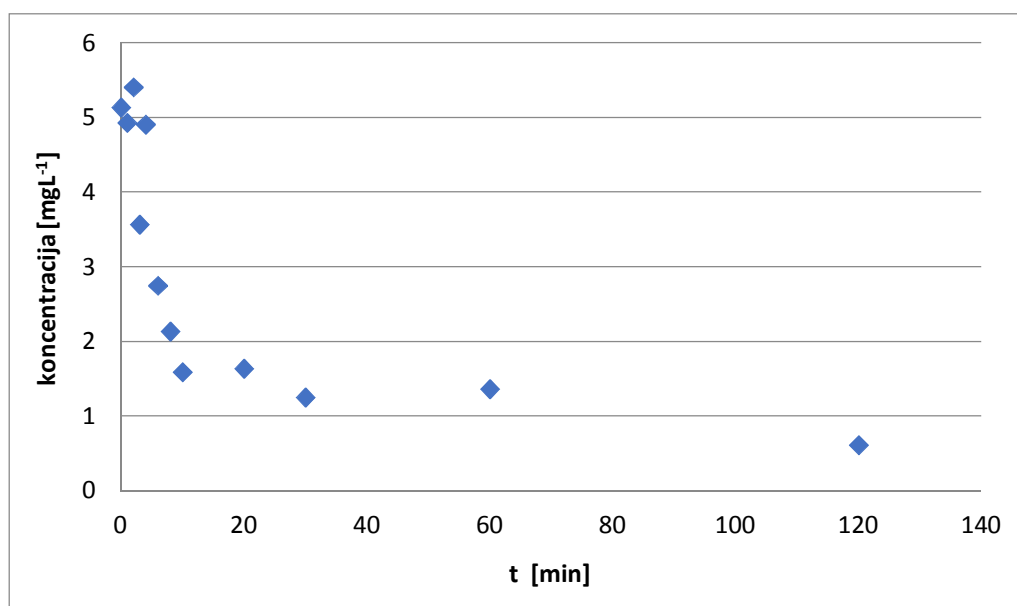
Analizom slika presjeka mikro kapsula (slike 10. c, f, i, l), vidljivo je da je debljina stijenke svih mikro kapsula ravnomjerna na svim djelovima. Može se uočiti da su na analiziranim kuglicama s BSA i s galnom kiselinom omotači tanji, dok je najdeblji omotač vidljiv na kuglici s glukozom.

Rezultati mikroskopiranja mikro kapsula s BSA mogu se usporediti s onima autora Nochos i sur. (2008), koji su pripremili mikro kapsule različitih koncentracija alginata i konstantne koncentracije BSA. Sve mikro kapsule su imale sferičan oblik, a SEM mikroskopijom dobiven je uvid u njihovu površinu, koja je za sve formulacije bila hrapava, s velikim naborima i vidljivim mikroporama.

Essifi i sur. (2019) u svom radu ispitivali su morfologiju praznih alginatnih mikrokapsula i mikrokapsula s galnom kiselinom raznih veličina, pomoću skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM). Rezultati su pokazali da sve mikrokapsule imaju sferični oblik. Prazne mikrokapsule imale su glatku i homogenu površinu, dok je površina onih s galnom kiselinom opisana kao naborana s pravilnom teksturom. Pod velikim povećanjem vidljive su bile pravilno raspoređene linije, koje odgovaraju polimernim lancima. Mikrokapsule veće veličine imale su veće razmake između linija. Veličina praznih mikrokapsula bila je manja u odnosu na sve one inkapsulirane s galnom kiselinom, što je objašnjeno interakcijama između polimernih lanaca, molekula vode i galne kiseline uklopljene u matriks. Boja mikrokapsula s galnom kiselinom bila je mliječno bijela.

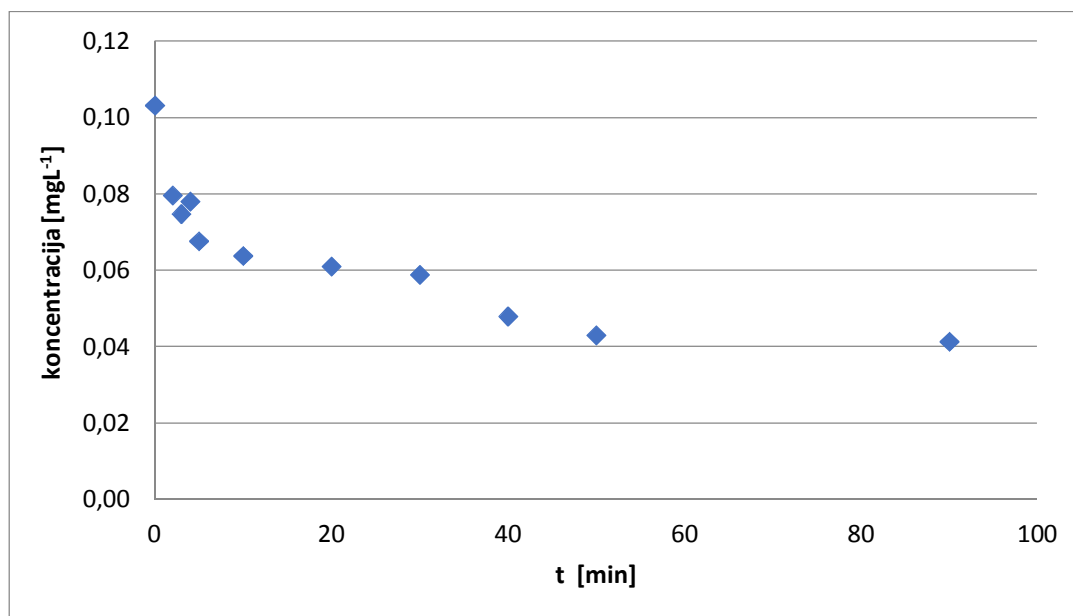
4.2. ADSORPCIJA BSA, GLUKOZE I GALNE KISELINE NA ALGINATNE MIKROKAPSULE

Adsorpcija aktivnih tvari provedena je kako je opisano u poglavlju Metode, dodavanjem praznih alginatnih kapsula u vodene otopine BSA, glukoze odnosno galne kiseline te miješanjem navedenih otopina magnetskim miješalom. Ukupno trajanje adsorpcije je iznosilo 120 min za BSA, 90 min za glukozu te 180 min za galnu kiselinu. Uzorci supernatanta su uzimani u zadanim vremenskim intervalima, te nakon odgovarajućih obrada analizirani spektrofotometrijski. Koncentracije dobivene baždarnim dijagramima korištene su za prikaz kinetike adsorpcije. Rezultati promjene koncentracije aktivne tvari u otopini prikazani su na slikama 11, 12 i 13.



Slika 11. Promjena koncentracije BSA u otopini tijekom adsorpcijskog pokusa

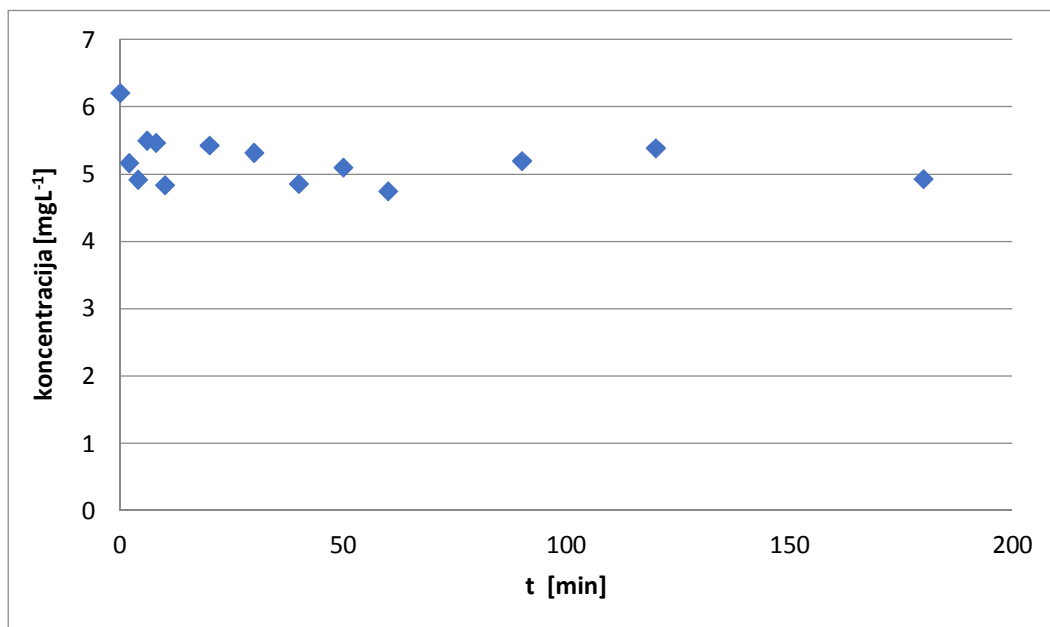
Na grafičkom prikazu adsorpcije BSA vidi se da se 75 % proteina dodanih u početnu otopinu (supernatant) adsorbiralo u prvih 10 min. U tom periodu koncentracija otopine se smanjila s početnih $5,14 \text{ g L}^{-1}$ na $1,25 \text{ g L}^{-1}$. Nakon toga proces se znatno usporio, a u zadnjoj točki mjerenja (120 min) koncentracija proteina u supernatantu iznosila je $0,61 \text{ g L}^{-1}$ odnosno 12 % početne vrijednosti. Znači da se u 120 min adsorpcije ukupno adsorbiralo 88 % proteina, što predstavlja visoku efikasnost samog procesa i potvrđuje prikladnost alginata kao materijala za mikroinkapsulaciju proteinskih molekula.



Slika 12. Promjena koncentracije glukoze u otopini tijekom adsorpcijskog pokusa

Početna koncentracija otopine glukoze u supernatantu iznosila je $0,103 \text{ g L}^{-1}$, a brzi pad koncentracije trajao je do 5. minute, kad je iznosila $0,068 \text{ g L}^{-1}$. Nakon toga smanjenje koncentracije bilo je sporije, a nakon 50. minute ($0,043 \text{ g L}^{-1}$) koncentracija se promijenila sasvim neznatno te je na kraju iznosila $0,041 \text{ g L}^{-1}$. To znači da se ukupno adsorbiralo 60 % glukoze, od čega 35 % u prvih 5 min, dodatnih 23 % između 5. i 50. min, i samo 2 % tijekom preostalih 40 minuta procesa.

Jedan od mogućih razloga nižem postotku adsorpcije glukoze je u niskoj početnoj koncentraciji otopine glukoze što je ograničilo kontakte molekula glukoze s alginatom. Naime, u radu Tanake i sur. (1984), analizirane su različite početne koncentracije otopine glukoze za adsorpciju te je zaključeno da je pri previsokim koncentracijama otopine glukoze difuzija usporena, te su niže koncentracije preporučene kao optimalne ($100\text{-}200 \text{ mg mL}^{-1}$). Ipak, bitno je pripaziti i kako preniska koncentracija ne bi usporila proces adsorpcije.



Slika 13. Promjena koncentracije galne kiseline u otopini tijekom adsorpcijskog pokusa

Izmjerene koncentracije galne kiseline u supernatantu pokazale su padajući trend koncentracije, ali uz brojna odstupanja od ravnomjernog trenda pada, što se može objasniti korištenom analitičkom metodom koja je pokazala preisku osjetljivost za toliko male promjene koncentracije koje su detektirane u danom uzorku. U prve 4 min koncentracija je dosljedno opadala, zatim od 6 do 60. minute izmjereno je nekoliko naizmjeničnih skokova i padova, zatim rast do 120. minute, i pad u 180. min. Ukupno se adsorbiralo oko 20 % galne kiseline, što je postignuto već u 4. minuti, nakon čega je učinak adsorpcije varirao i kretao se između 11 % (6. minuta) i 23,5 % (60. minuta). Dakle, može se zaključiti da je adsorpcija imala vrhunac u 60. minuti.

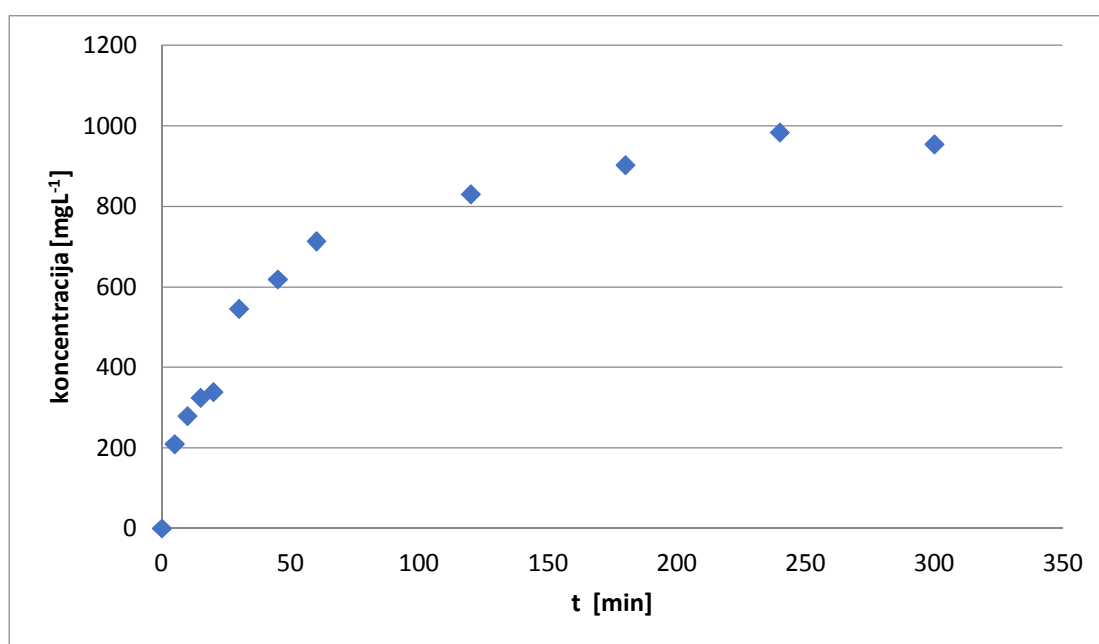
Usporedbom rezultata za adsorpciju BSA, glukoze i galne kiseline vidimo da je stupanj adsorpcije na alginat bio uvjerljivo najviši za BSA (88 %), dok je za galnu kiselinu on bio uvjerljivo najmanji (20 %). Glukoza je pokazala srednji rezultat. Može se zaključiti da je u ovom eksperimentu uspješnost adsorpcije bila proporcionalna molekulskoj masi tvari. Općenito, alginatne mikrokapsule inkapsulirane s hidrofilnim spojevima ili vodenim ekstraktima imaju karakteristiku brzog otpuštanja tvari, zbog porozne strukture alginata koja ne vrši efekt barijere takvoj inkapsuliranoj tvari (Essifi i sur. 2020).

Nadalje, BSA kao protein, se veže na alginat elektrostatskim protein-polisaharidnim vezama, pri čemu se pozitivno nabijene skupine na BSA vežu sa negativnim skupinama alginata (Neiser i sur., 1999). Zbog takvih unakrsnih elektrostatskih veza između dva

polimera, taj kompleks je stabilniji od smjese alginata i sitnijih hidrofilnih molekula, poput glukoze i galne kiseline.

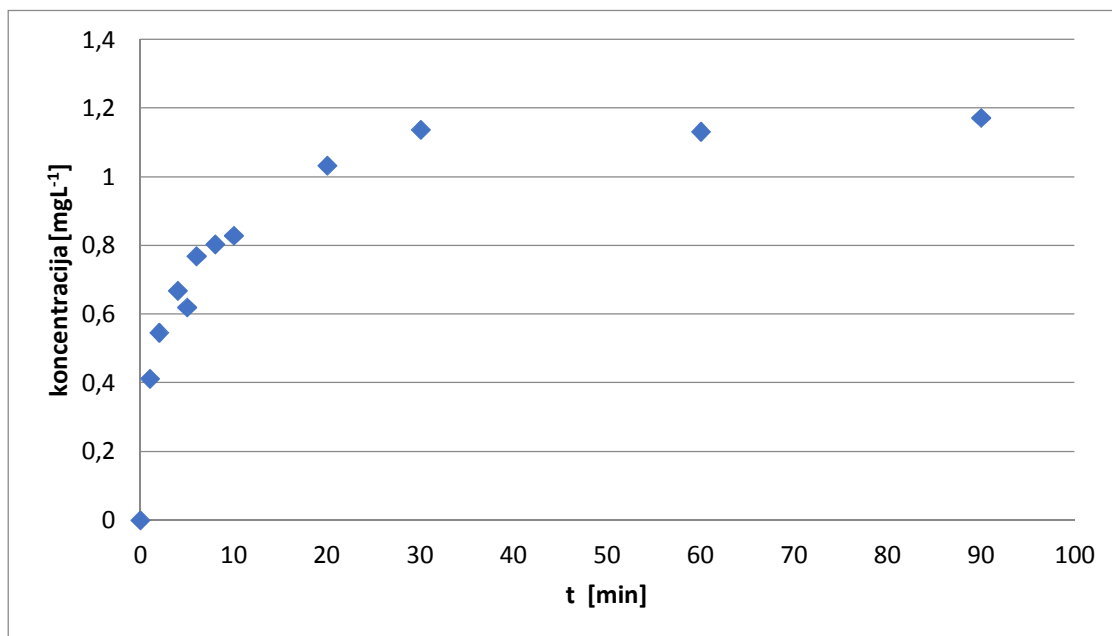
4.3. DESORPCIJA BSA, GLUKOZE I GALNE KISELINE S ALGINATNIH MIKROKAPSULA

Desorpcija je provedena uranjanjem alginatnih kuglica s inkapsuliranim tvarima u čaše s destiliranom vodom i praćenjem promjene koncentracija supernatanata. Uzorci su uzimani u zadanim vremenskim intervalima za svaku tvar, kao što je opisano u poglavlju Metode, te su im određivane koncentracije na isti način kao kod adsorpcije. Rezultati su prikazani na slikama 14, 15 i 16.



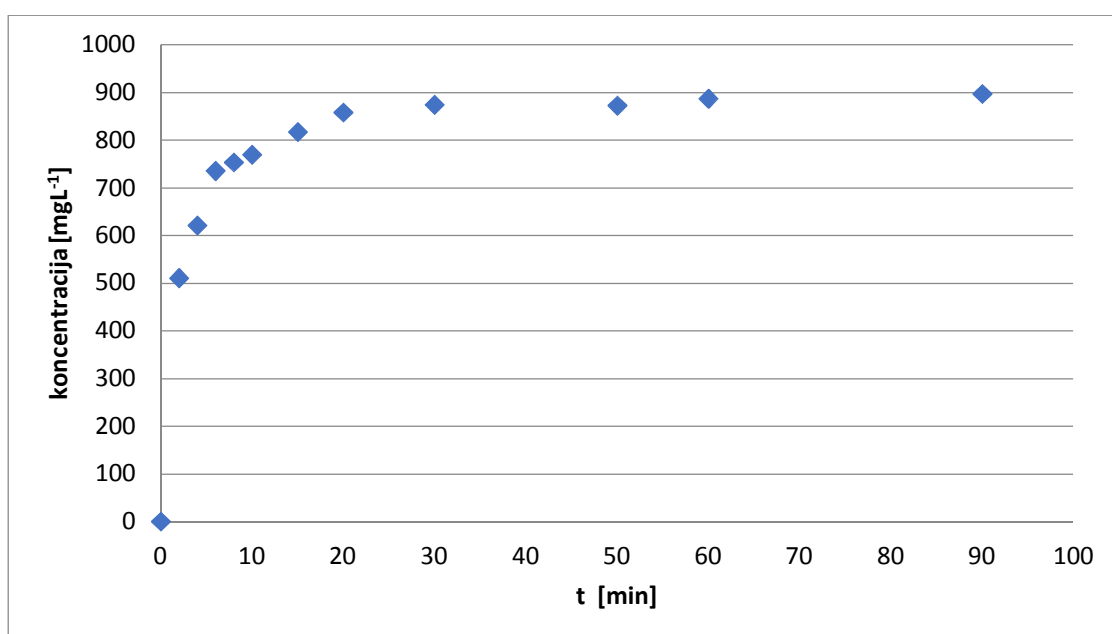
Slika 14. Promjena koncentracije BSA u otopini tijekom desorpcijskog pokusa

Krivulja desorpcije BSA s alginatnih mikrokapsula u prihvatnu vodenu otopinu pokazuje postupni rast koncentracije BSA u vodenoj otopini, koji je izražen tijekom prvih 60 minuta eksperimenta, kad koncentracija dostiže 713,7 mg L⁻¹. Nakon toga se porast koncentracije usporava, a maksimalna dosegnuta vrijednost koncentracije je 983,6 mg L⁻¹. Može se zaključiti da desorpcija BSA sa alginatnih mikrokapsula ima stabilan i postupan tijek i da s vremenom sve više usporava, dok nakon određenog vremena (240. min) doseže stacionarno stanje. Ova postupnost oslobađanja BSA iz alginata se može pripisati već ranije opisanim nekovalentnim BSA-alginat vezama, koje su po prirodi elektrostatske i vodikove (Xu i sur., 2019).



Slika 15. Promjena koncentracije glukoze u otopini tijekom desorpcijskog pokusa

Kod glukoze, najveći skok koncentracije vidljiv je odmah u prvoj minuti, nakon čega je rast postupniji, a nakon 20. minute doseže stacionarno stanje, te finalna i maksimalna koncentracija glukoze u desorpcijskoj otopini iznosi $1,17 \text{ g L}^{-1}$. Iz navedenih rezultata je vidljivo da proces desorpcije glukoze s alginatnih mikrokapsula započinje odmah nakon uranjanja mikrokapsula u vodu, što se može pripisati malim dimenzijama molekula glukoze čime je omogućeno njezino brzo otpuštanje.



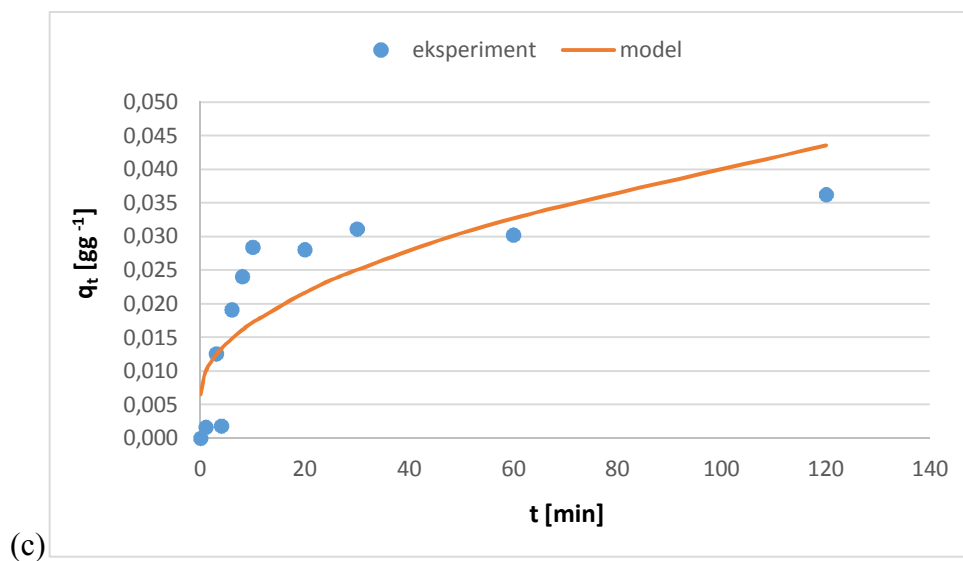
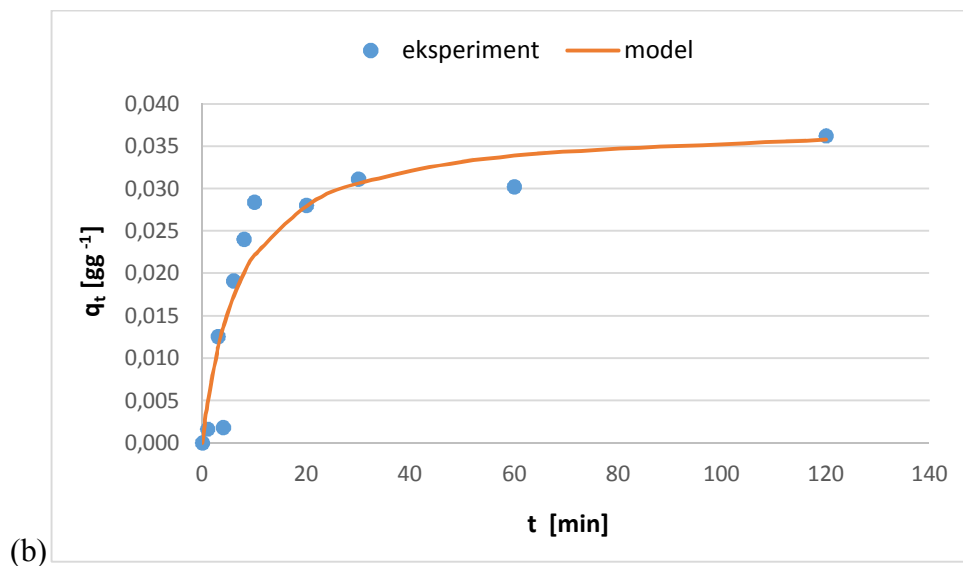
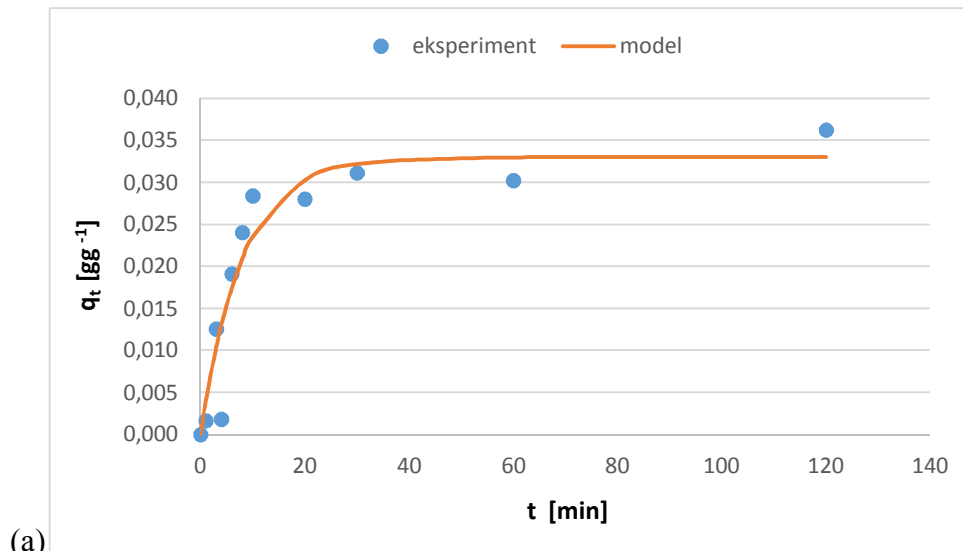
Slika 16. Promjena koncentracije galne kiseline u otopini tijekom desorpcijskog pokusa

Iz grafičkog prikaza za galnu kiselinu, može se vidjeti da je u 1. minuti procesa postignut veliki skok na $510,5 \text{ mg L}^{-1}$, što predstavlja više od polovice (57 %) ukupno otpuštene tvari tijekom procesa. Nakon 20. minute (858 mg L^{-1}) porast je dosta malen i spor, i maksimum izmjeren u 90. min iznosi 897 mg L^{-1} . Na temelju toga se može zaključiti da se u prvih 20 min otpustilo 96 % galne kiseline te je nakon 20. minute dosegnuto stacionarno stanje procesa desorpcije. Slično kao u slučaju glukoze, brzo otpuštanje u početnoj fazi procesa može se povezati s malim dimenzijama molekule koja se otpušta. Nadalje, prema literaturnim podacima, ovakav profil desorpcije galne kiseline je uobičajen, npr. Essifi i sur. (2019) su proučavali kinetiku otpuštanja galne kiseline s alginatnih mikrokapsula u 3 različite veličine. Za sve 3 veličine, grafovi su pokazivali dvije faze: početnu fazu brzog otpuštanja, gdje je u prvih 20 min otpušteno 85 % galne kiseline; te drugu fazu karakteriziranu postupnim i sporijim otpuštanjem. Autori navode dva objašnjenja za brzu fazu, a prvo objašnjenje je prisustvo molekula galne kiseline na samoj površini mikrokapsula. Drugi razlog je taj što alginatne mikrokapsule inkapsulirane s hidrofilnom supstancom ili vodenim ekstraktom općenito pokazuju karakteristiku brzog otpuštanja, zbog svoje porozne strukture koja ne pruža dovoljnu barijeru tim tvarima. Smanjena brzina otpuštanja u drugoj fazi pripisana je otpuštanju galne kiseline iz jezgri mikrokapsula (Essifi i sur., 2020). Ovakav profil kinetike otpuštanja bioaktivne tvari opisuju i Benković i sur. (2021) koji su proučavali otpuštanje bioaktivnih spojeva iz biljnih ekstrakata s alginatnih kuglica.

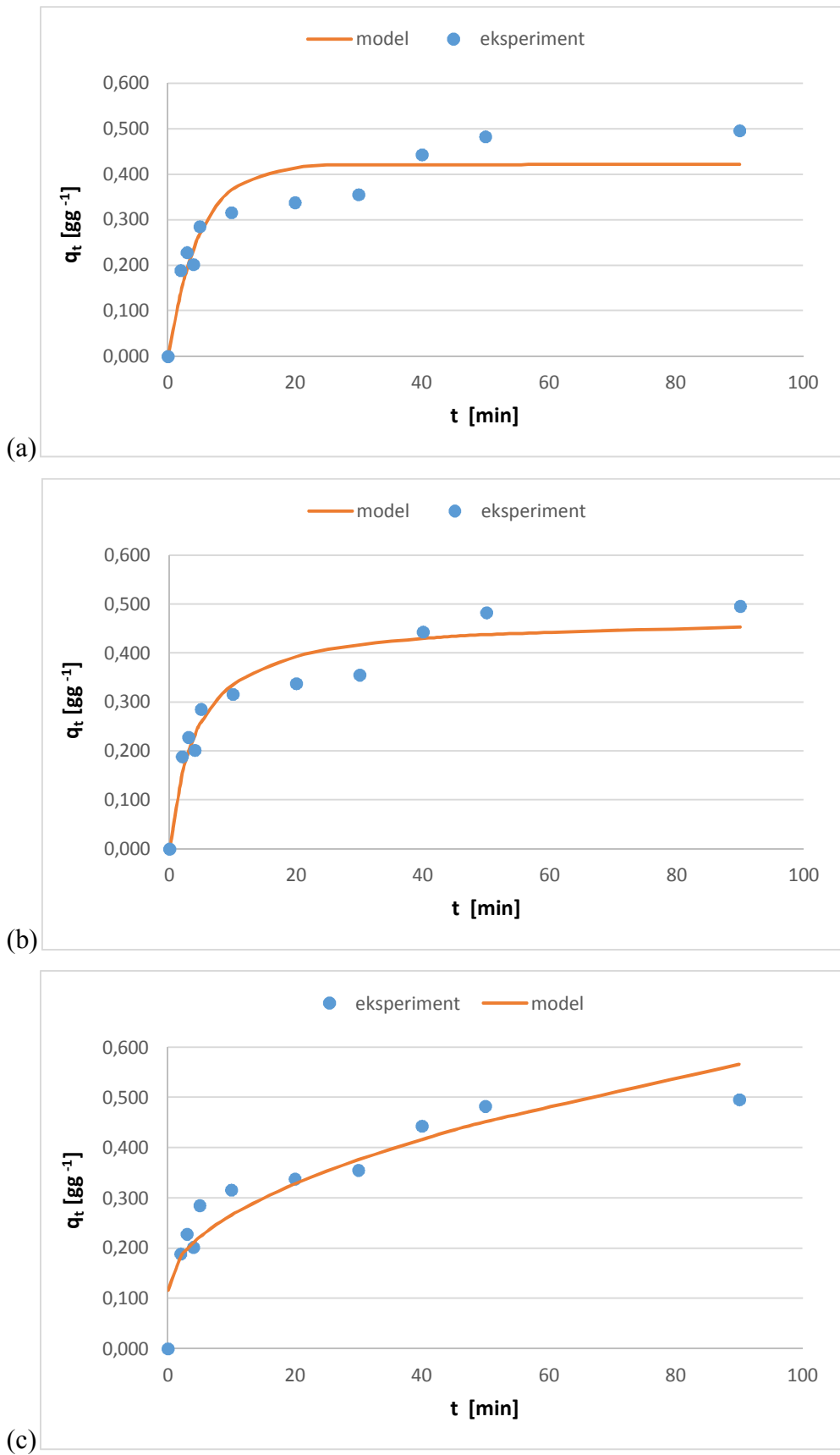
4.3. MATEMATIČKO MODELIRANJE KINETIKE PROCESA ADSORPCIJE I DESORPCIJE

4.3.1. Kinetički modeli za adsorpciju

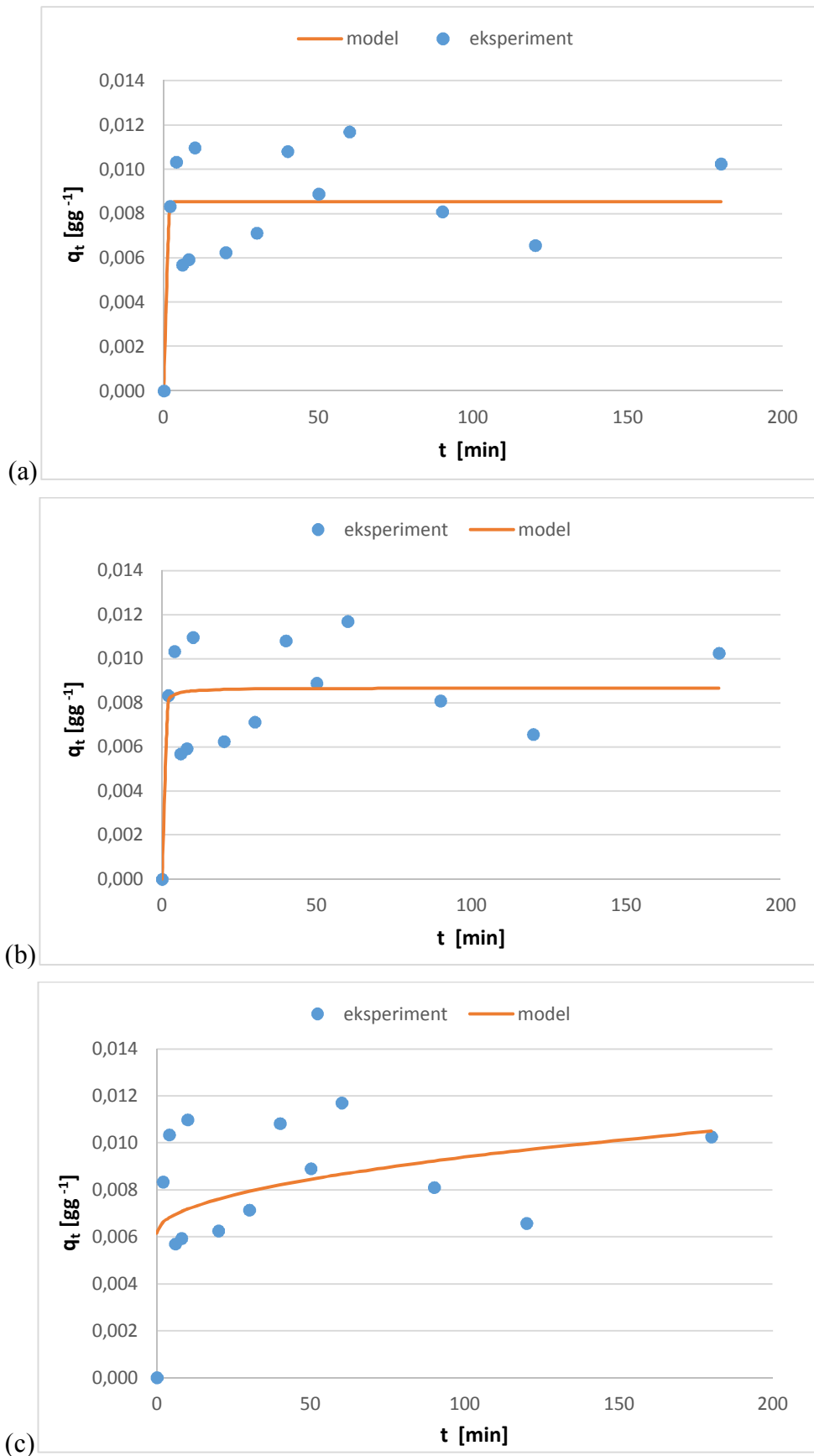
Za modeliranje kinetike procesa adsorpcije korištena su tri kinetička modela: Model kinetike pseudo-prvog reda, model kinetike pseudo-drugog reda te Webber-Morrisov model unutarčestične difuzije. Rezultati su prikazani slikama i tablično. Na slikama 17-19 prikazane su ovisnosti koncentracije adsorbiranog adsorbata o vremenu.



Slika 17. Kinetički modeli adsorpcije BSA: (a) pseudo-prvi red, (b) pseudo-drugi red i (c) Webber-Morris



Slika 18. Kinetički modeli adsorpcije glukoze: (a) pseudoprvi red, (b) pseudodrugii red i (c) Webber-Morris



Slika 19. Kinetički modeli adsorpcije galne kiseline: (a) pseudoprvi red, (b) pseudodrugii red i (c) Webber-Morris

Tablica 3. Kinetički parametri za procese adsorpcije dobiveni matematičkim modelima

	model	ravnotežna koncentracija (q_e) [mg g ⁻¹]	konstanta brzine (k) [min ⁻¹]	konstanta brzine unutarčestične difuzije (k_i) [mg g ⁻¹ min ^{-0.5}]	početna brzina adsorpcije (h_0) [mg g ⁻¹ min ⁻¹]	konstanta otpora difuziji (C) [mg g ⁻¹]	koeficijent determinacije (R ²)
BSA	pseudoprvi red	32,992 ± 2,688	0,124 ± 0,03	-	4,104	-	0,9429
	pseudodrugii red	37,955 ± 4,094	3,678 ± 1,635	-	5298	-	0,9347
	Webber-Morris	-	-	3,379 ± 0,796	-	6,537 ± 3,885	0,8167
glukoza	pseudoprvi red	0,421 ± 0,025	0,203 ± 0,043	-	0,0854	-	0,934
	pseudodrugii red	0,474 ± 0,026	0,512 ± 0,138	-	0,1152	-	0,9649
	Webber-Morris	-	-	0,047 ± 0,006	-	0,116 ± 0,029	0,9321
galna kiselina	pseudoprvi red	8,547 ± 0,612	2,008 ± 7,125	-	17,165	-	0,7469
	pseudodrugii red	8,661 ± 0,001	771,025 ± 2914,1	-	57834,9	-	0,7847
	Webber-Morris	-	-	0,324 ± 0,205	-	6,149 ± 1,366	0,4145

BSA- engl. *bovine serum albumin*, albumin izoliran iz govedeg seruma

Iz priložene Tablice 3. za proces adsorpcije BSA na alginatne mikrokapsule vidljivo je da su koeficijenti determinacije za kinetiku pseudoprvog i pseudodrugog reda redom 0,9429 i 0,9347. Za Webber-Morrisov model on iznosi 0,8167. Znači da se kinetika adsorpcije BSA na alginatne mikrokapsule može zadovoljavajuće opisati pseudoprvim redom i pseudodrugim redom, ali je pseudoprvi red reprezentativniji. Navedeno najbolje slaganje modela sa kinetikom pseudoprvog i pseudodrugog reda sa eksperimentalnim podacima može se vidjeti i na slikama 17 a, b i c iz kojih je vidljivo da su eksperimentalni podaci (plavo) najbliži liniji predikcije modela (narančasto) u slučaju kinetike pseudoprvog reda (slika 17 b). To sugerira da je adsorpcija BSA temeljena na difuziji (Sahoo i Prelot, 2020). Ravnotežna koncentracija adsorbiranog BSA iznosi 32,99 mg BSA po gramu alginata.

Za adsorpciju glukoze (tablica 3), sva tri ispitana modela dala su dobru vrijednost koeficijenta determinacije, koji je iznad 0,9. Za pseudodrugog red on je najveći i iznosi 0.9649. Najbolje slaganje modela pseudodrugog reda s eksperimentalnim podacima vidljivo je i na slici 18 b, dok je slabije slaganje vidljivo za kinetiku prvog reda (slika 18 a) i Webber-Morrisov model (slika 18 c).

Kinetički parametri za galnu kiselinu prikazani su u tablici 3, a eksperimentalni podaci i njihovo odstupanje od modelom predviđene linije vidljivo je na slikama 19 a, b i c. Za galnu kiselinu nijedan model nije pokazao visoki koeficijent determinacije. Za pseudoprvi i pseudodrugog red oni iznose 0,7469 i 0,7847, što sugerira da modeli nisu pouzdani za kinetička predviđanja. Webber-Morrisov model je ovdje imao nizak koeficijent determinacije u iznosu 0,4145, stoga ovaj model nikako nije prikladan.

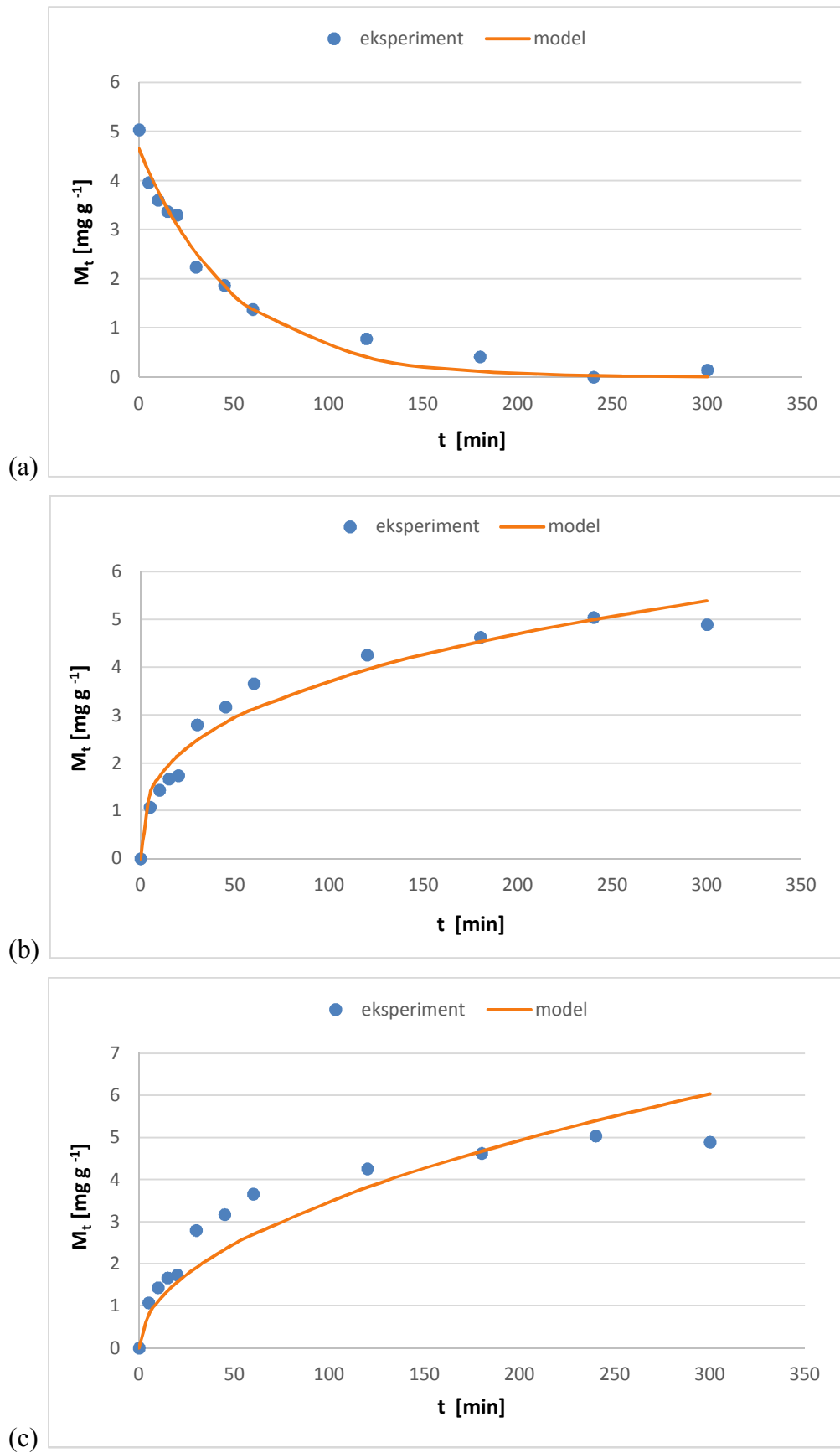
Za glukozu i galnu kiselinu, najreprezentativniji model je pseudodrugog red, što sugerira da je limitirajući korak adsorpcije kemijska sorpcija tvari, te da brzina adsorpcije ne ovisi o koncentraciji adsorbata, nego o kapacitetu adsorbensa (Sahoo i Prelot, 2020). Nadalje, usporedbom vrijednosti konstanti brzina adsorpcije (k) i početnih brzina adsorpcije (h_0), najviše vrijednosti zabilježene su za BSA, nakon čega slijede galna kiselina i glukoza. Navedene razlike u brzini procesa adsorpcije u skladu su sa istraživanjem Neiser i suradnika (1999) koji su utvrdili da se BSA kao protein, veže na alginat elektrostatskim protein-polisaharidnim vezama, pri čemu se pozitivno nabijene skupine na BSA vežu s negativnim skupinama alginata. Zbog takvih unakrsnih elektrostatskih veza između dva polimera, taj kompleks je stabilniji od smjese alginata i sitnijih hidrofilnih molekula, poput glukoze i galne kiseline.

4.3.2. Kinetički modeli za desorpciju

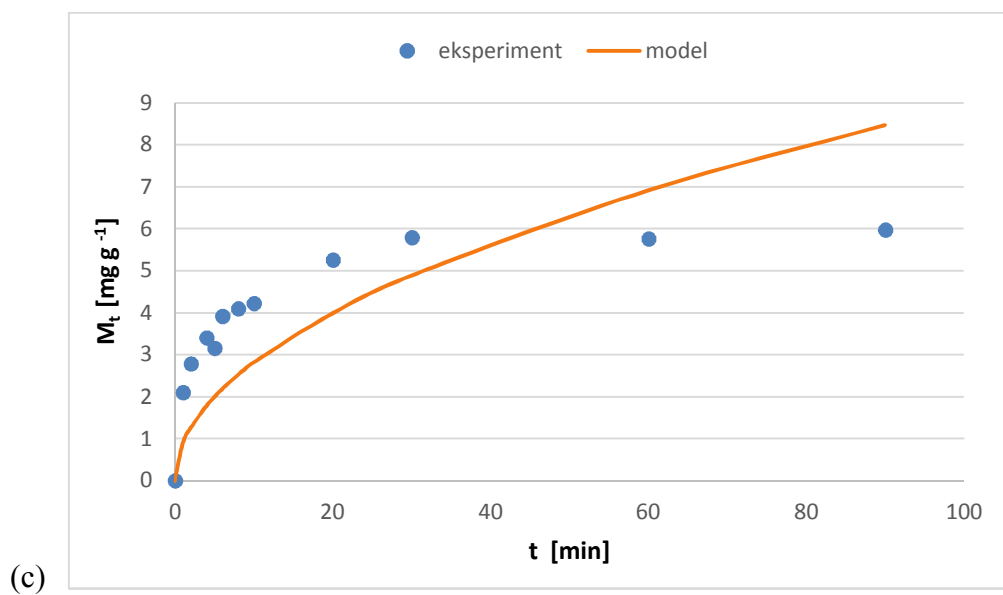
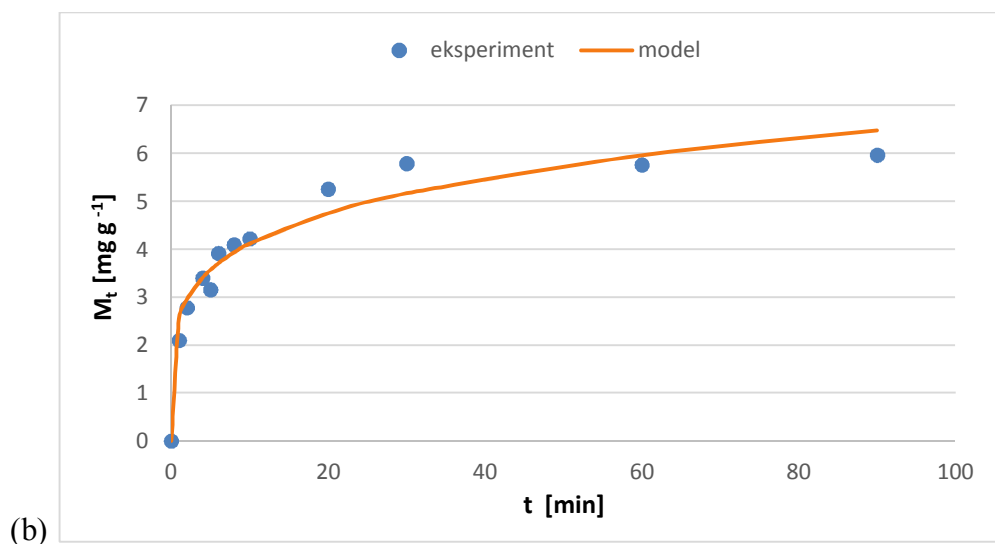
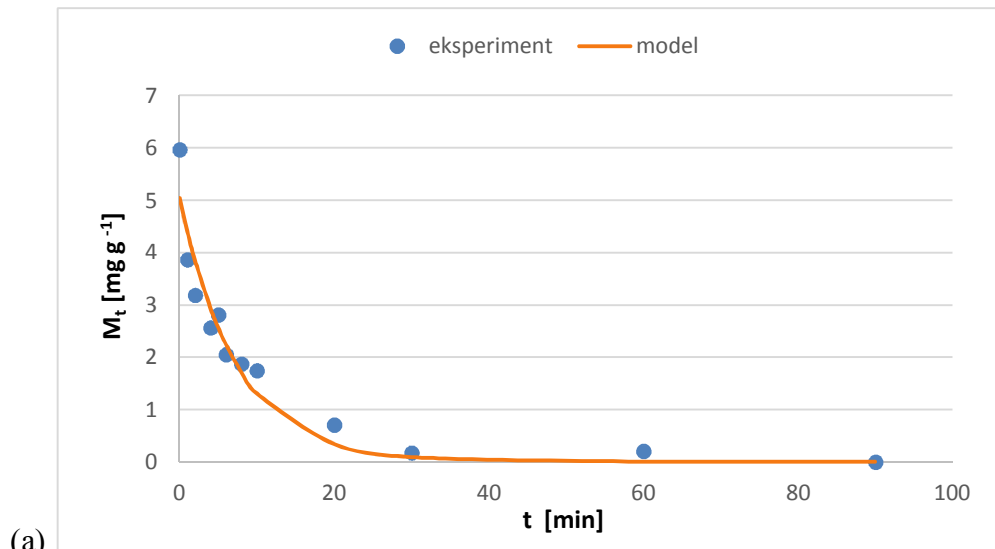
Za predviđanje kinetike procesa desorpcije korištena su tri kinetička modela: model kinetike prvog reda, Korsmeyer-Peppas te Higuchi. Rezultati su prikazani slikama i tablično.

Na slikama 20-22 prikazane su ovisnosti količine otpuštenog adsorbata u otopini (M_t) o vremenu (t).

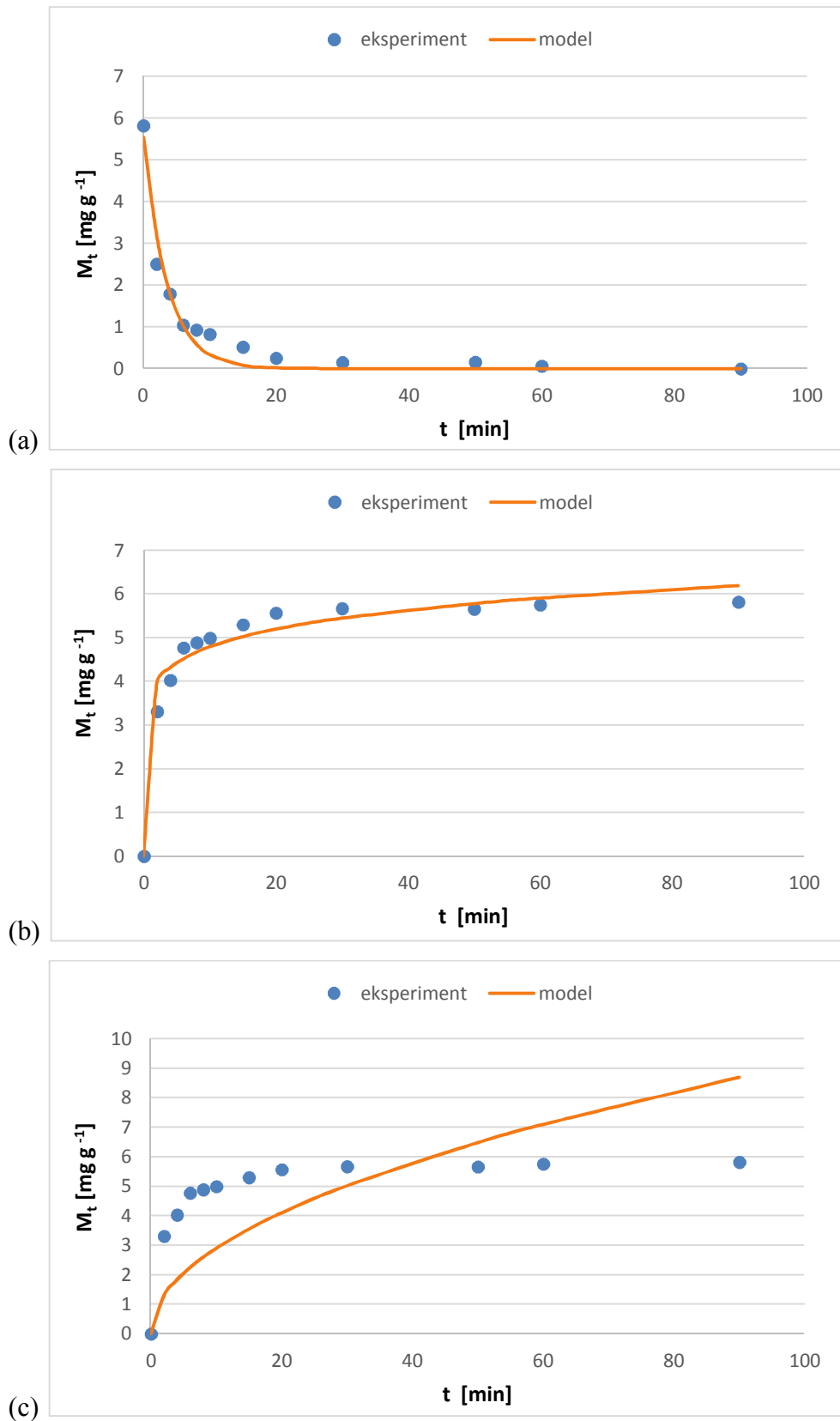
U tablici 4 prikazani su kinetički parametri desorpcijskih procesa dobiveni matematičkim modelima: početna koncentracija adsorbata u otopini (M_0), konstanta brzine (k) i difuzijski eksponent (n).



Slika 20. Kinetički modeli desorpcije BSA: (a) prvi red, (b) Korsmejer-Peppas i (c) Higuchi



Slika 21. Kinetički modeli procesa desorpcije glukoze: (a) prvi red, (b) Korsmeyer-Peppas i (c) Higuchi



Slika 22. Kinetički modeli procesa desorpcije galne kiseline: (a) prvi red, (b) Korsmeyer-Peppas i (c) Higuchi

Tablica 4. Kinetički parametri za procese desorpcije dobiveni matematičkim modelima

	model	početna koncentracija adsorbata (M_0) [mg g _{kuglice} ⁻¹]	konstanta brzine (k) [min ⁻¹]	difuzijski eksponent (n)	koeficijent determinacije R ²
BSA	prvi red	4,643 ± 0,165	0,020 ± 0,002	-	0,9899
	Korsmeyer-Peppas	-	0,789 ± 0,119	0,337 ± 0,031	0,9794
	Higuchi	-	0,349 ± 0,020	-	0,9264
glukoza	prvi red	5,037 ± 0,345	0,135 ± 0,020	-	0,9665
	Korsmeyer-Peppas	-	2,558 ± 0,170	0,206 ± 0,021	0,9784
	Higuchi	-	0,893 ± 0,098	-	0,5064
galna kiselina	prvi red	5,529 ± 0,323	0,282 ± 0,031	-	0,9804
	Korsmeyer-Peppas	-	3,662 ± 0,208	0,117 ± 0,018	0,9813
	Higuchi	-	0,916 ± 0,112	-	0

BSA- engl. *bovine serum albumin*, albumin izoliran iz govedeg seruma

Prema podacima prikazanima u Tablici 4 i usporedbi eksperimentalnih podataka sa linijom modela (slika 20 a, b i c), uspoređujući koeficijente determinacije za desorpciju BSA, vidi se da model kinetike prvog reda prikazuje najbolje slaganje s ekperimentalno dobivenim podacima, iako su sva tri modela relativno zadovoljavajuća, s R² vrijednostima iznad 0,9. Ako se uzme u obzir standardna devijacija, ona je najmanja za model prvog reda, dok je za Korsmeyer-Peppas nešto veća, tako da se može zaključiti da je za kinetiku desorpcije BSA najbolji model prvog reda.

Za desorpciju glukoze (tablica 4; slika 21 a, b i c), vrijednosti parametara pokazuju da je najtočniji model Korsmeyer-Peppas (R²=0,9784), zbog najviše vrijednosti koeficijenta determinacije. U slučaju galne kiseline, Korsmeyer-Peppas se također pokazao kao najbolji model za opis procesa desorpcije (R²=0,9813), dok za Higuchijev model odgovarajuću procjenu nije bilo moguće provesti zbog prirode eksperimentalnih podataka (tablica 4; slika 22 a, b i c).

Analizom vrijednosti konstante brzine desorpcije (k) vidljivo je da su najviše vrijednosti zabilježene za galnu kiselinu ($k = 3,662 \pm 0,208 \text{ min}^{-1}$), koju slijedi glukoza ($k = 2,558 \pm 0,170 \text{ min}^{-1}$) i BSA ($k = 0,789 \pm 0,119 \text{ min}^{-1}$), čime se zaključuje da se BSA duže zadržava vezan za alginat u mikrokapsuli zbog djelovanja elektrostatskih protein-polisaharidnih veza (Neiser i sur., 1999).

Nadalje, primjenom Korsmeyer-Peppas modela izračunata je i vrijednost difuzijskog koeficijenta (n) koji je najviši za BSA, nakon čega slijede glukoza i galna kiselina. Vrijednosti parametra n definiraju dominantan proces prilikom desorpcije: vrijednosti $n < 0.5$ znače pseudo Fickovu difuziju; $n = 0.5$ Fickovu difuziju; $0.5 < n < 1$ hibridni difuzijski mehanizam; i $n = 1$ difuziju koja ne slijedi Fickov zakon (Rezaei i Nasirpour 2019). U slučaju sve tri promatrane molekule, prema vrijednostima parametra n , utvrđeno je da se radi o pseudo-Fickovoj difuziji.

5. ZAKLJUČCI

1. Mikroskopskom analizom mikrokapsula utvrđeno je da su sve kapsule sferičnog oblika, glatke površine i omotača ravnomjerne debljine.
2. Analizom koncentracija adsorbata utvrđeno je da se tijekom procesa adsorpcije na alginat adsorbiralo najviše proteina (88 %), što je rezultat djelovanja elektrostatskih protein-polisaharidnih veza. Nakon toga slijedi glukoza (60 %) i galna kiselina (23,5 %).
3. Usporedbom vrijednosti konstanti brzina adsorpcije (k) i početnih brzina adsorpcije (h_0), najviše vrijednosti zabilježene su za BSA, nakon čega slijede galna kiselina i glukoza.
4. Proces adsorpcije najbolje je opisao kinetički model pseudodrugog reda, prema kojem je limitirajući korak procesa kemijska sorpcija tvari, te brzina adsorpcije ovisi o kapacitetu adsorbensa.
5. Tijekom procesa desorpcije, na temelju izmjerenih koncentracija adsorbata otpuštenog u otopinu, utvrđeno je da je za glukozu i galnu kiselinu otpuštanje s alginata brzo na početku procesa, a nakon 20. minute se usporava i postiže stacionarno stanje. Desorpcija BSA s alginata najveća je tijekom prvih 60 minuta procesa, nakon čega usporava.
6. Analizom vrijednosti konstante brzine desorpcije (k), najviše su vrijednosti zabilježene za galnu kiselinu, koju slijedi glukoza i BSA.
7. Prema modelom izračunatim vrijednostima difuzijskog koeficijenta (n), utvrđeno je da se proces desorpcije odvijao prema pseudo-Fickovoj difuziji.

6. LITERATURA

Ahirrao S, Gide PS, Shrivastav B, Sharma PK (2014) Ionotropic Gelation: A Promising Cross Linking Technique for Hydrogels. *Res Rev J Pharm Nanotechnol* **2**, 1-6.

Amaral PHR, Andrade PL, de Conto LC (2019) Microencapsulation and Its Uses in Food Science and Technology: A Review. U: Salaün F (ured.) *Microencapsulation - Processes, Technologies and Industrial Applications*, IntechOpen, London, 1-18.

Anonymus (2021) Molecules of taste – glucose
<https://www.scienceofcooking.com/glucose.htm> Pristupljeno 15. kolovoza 2021.

Ashenhurst J (2022) The Haworth Projection - MOC
<https://www.masterorganicchemistry.com/2018/01/11/haworth-projections/> Pristupljeno 25. kolovoza 2022.

Assadpour E, Jafari SM (2019) An overview of biopolymer nanostructures for encapsulation of food ingredients. U: Jafari SM (ured.) *Biopolymer Nanostructures for Food Encapsulation Purposes*, 1. izd., str. 1–35.

Azizian S (2004) Kinetic models of sorption: a theoretical analysis. *J Colloid Interf Sci* **276**(1), 47–52. doi:10.1016/j.jcis.2004.03.048

Badhani B, Sharma N, Kakkar R (2015) Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *RSC Adv* **5**(35), 27540–27557. doi:10.1039/c5ra01911g

Belščak-Cvitanović A, Jurić S, Đorđević V, Barišić L, Komes D, Ježek D i sur (2017) Chemometric evaluation of binary mixtures of alginate and polysaccharide biopolymers as carriers for microencapsulation of green tea polyphenols. *Int J Food Prop* **20**(9), 1971-1986. doi: 10.1080/10942912.2016.1225762

Benković M, Sarić I, Jurinjak Tušek A, Jurina T, Gajdoš Kljusurić J, Valinger D (2021) Analysis of the Adsorption and Release Processes of Bioactives from *Lamiaceae* Plant Extracts on Alginate Microbeads. *Food Bioprocess Tech* **14**(7), 1216–1230. doi:10.1007/s11947-021-02632-z

Biowest (2021) Bovine serum albumin – Biowest <https://www.biowest.net/products/serum/bovine-serum-albumin/> Pristupljeno 12. kolovoza 2021.

Bodade RG, Bodade AG (2020) Microencapsulation of bioactive compounds and enzymes for therapeutic applications. U: Pal K, Banerjee I, Sarkar P, Kim D, Deng WP, Dubey NK, Majumder K (ured.) Biopolymer-Based Formulations, Elsevier, Amsterdam, str. 381–404.

Bruschi M (2015) Mathematical models of drug release. U: Bruschi M (ured.) Strategies to modify the drug release from pharmaceutical systems, Woodhead Publishing, Cambridge, str. 63-86.

Bušić A, Belščak-Cvitanović A, Vojvodić Cebin A, Karlović S, Kovač V, Špoljarić I, Mršić G, Komes D (2018) Structuring new alginate network aimed for delivery of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) polyphenols using ionic gelation and new filler materials. *Food Res Int* **111**, 244-255. doi:10.1016/j.foodres.2018.05.034

Corrêa-Filho LC, Moldão-Martins M, Alves VD (2019) Advances in the Application of Microcapsules as Carriers of Functional Compounds for Food Products. *Appl Sci* **9**(3), 571. <https://doi.org/10.3390/app9030571>

Daglia M, Di Lorenzo A, Nabavi S, Selamoglu Z (2014) Gallic Acid and Related Compounds as Neuroprotective Agents: You are What you Eat!. *Curr Pharm Biotechnol* **15**(4), 1-11.

Demont A, Marison I (2015) Microencapsulation by Dripping and Jet Break-Up. U: Mishra M (ured.) Handbook of Encapsulation and Controlled Release, 1. izd., Taylor & Francis, Philadelphia, str. 177–199.

Dima C, Pătrașcu L, Cantaragiu A, Alexe P, Dima Ș (2016) The kinetics of the swelling process and the release mechanisms of *Coriandrum sativum* L. essential oil from chitosan/alginate/inulin microcapsules. *Food Chem* **195**, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.044>

Donati I, Paoletti S (2009) Material Properties of Alginates. U: Rehm, B. (ured.) Alginates: Biology and Applications, Springer, Berlin, str. 1–53.

Draget K (2009) Alginates. U: Phillips GO, Williams PA (ured.) Handbook of Hydrocolloids,

Woodhead Publishing, Cambridge, 2. izd., str. 807-828.

Essifi K, Lakrat M, Berraouan D, Fauconnier ML, El Bachiri A, Tahani A (2020) Optimization of gallic acid encapsulation in calcium alginate microbeads using Box-Behnken Experimental Design. *Polym Bull* **78**, 5789–5814. doi:10.1007/s00289-020-03397-9

Geetha P, Latha MS, Koshy MK (2015) Biosorption of malachite green dye from aqueous solution by calcium alginate nanoparticles: Equilibrium study. *J Mol Liq* **212**, 723-730.

Gillespie, C (2021) "What Is the PH of a Sugar Solution?" sciencing.com, <https://sciencing.com/ph-sugar-solution-6077753.html> Pristupljeno 28. kolovoza 2021.

Grgić J, Šelo G, Planinić M, Tišma M, Bucić-Kojić A (2020) Role of the Encapsulation in Bioavailability of Phenolic Compounds. *Antioxidants* **9**(10), 923. <https://doi.org/10.3390/antiox9100923>

Khotimchenko YS, Kovalev VV, Savchenko OV, Ziganshina OA (2001) Physical–Chemical Properties, Physiological Activity, and Usage of Alginates, the Polysaccharides of Brown Algae. *Russ J Mar Biol* **27**, 53–64. doi:10.1023/a:1013851022276

Lee K. Y., Mooney D. J. (2012) Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci* **37**(1), 106–126. doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003

Li J, Kim SY, Chen X, Park HJ (2016) Calcium-alginate beads loaded with gallic acid: Preparation and characterization. *LWT - Food Sci Technol* **68**, 667–673. doi:10.1016/j.lwt.2016.01.012

Majorek KA, Porebski PJ, Dayal A, Zimmerman MD, Jablonska K, Stewart AJ, i sur. (2012) Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Mol immunol* **52**(3-4), 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.05.011>

McEntee MK, Bhatia S, Tao L, Roberts S, Bhatia S (2008) Tunable transport of glucose through ionically-crosslinked alginate gels: Effect of alginate and calcium concentration. *J Appl Polym Sci* **107**, 2956-2962. doi:10.1002/App.27478

Nagarajan A, Shanmugam A, Zackaria A (2016) Mini review on Alginate: Scope and Future perspectives. *J Algal Biomass Utln* **7**(1), 45-55.

Neiser S, Draget K, Smidsrød O (1999) Interactions in bovine serum albumin–calcium alginate gel systems. *Food Hydrocolloid*, **13**(6), 445–458. doi:10.1016/s0268-005x(99)00019-3

Nochos A, Douroumis D, Bouropoulos N (2008) In vitro release of bovine serum albumin from alginate/HPMC hydrogel beads. *Carbohydr Polym* **74**(3), 451–457. doi:10.1016/j.carbpol.2008.03.020

Paredes Juárez GA, Spasojevic M, Faas MM, de Vos P (2014) Immunological and Technical Considerations in Application of Alginate-Based Microencapsulation Systems. *Front Bioeng Biotechnol* **2**, 1-15. doi:10.3389/fbioe.2014.00026

Plazinski W, Plazinska A (2011) Molecular dynamics study of the interactions between phenolic compounds and alginate/alginate acid chains. *New J Chem* **35**(8), 1607. doi:10.1039/c1nj20273a

Poshadri A, Kuna A (2010) Microencapsulation technology: A review. *J Res Angra* **38**(1), 86-102.

Puscaselu RG, Lobiuc A, Dimian M, Covasa M (2020) Alginate: From Food Industry to Biomedical Applications and Management of Metabolic Disorders. *Polymers*, **12**(10), 2417. <https://doi.org/10.3390/polym12102417>

Rezaei A, Nasirpour A (2019) Evaluation of Release Kinetics and Mechanisms of Curcumin and Curcumin- β -Cyclodextrin Inclusion Complex Incorporated in Electrospun Almond Gum/PVA Nanofibers in Simulated Saliva and Simulated Gastrointestinal Conditions. *BioNanoSci* **9**(2), 438–445. <https://doi.org/10.1007/s12668-019-00620-4>

Rinaudo M (2014) Biomaterials based on a natural polysaccharide: alginate. *TIP*, **17**(1), 92–96. doi:10.1016/s1405-888x(14)70322-5

Sahoo TR, Prelot B (2020) Adsorption processes for the removal of contaminants from wastewater. U: Bonelli B, Freyria FS, Rossetti I, Sethi R (ured.) *Nanomaterials for the Detection and Removal of Wastewater Pollutants*, Elsevier, Amsterdam, str. 161–222.

Sharma G, Naushad M, Kumar A, Rana S, Sharma S, Bhatnagar A, Stadler FJ, Ghfar AA, Khan MR (2017) Efficient removal of coomassie brilliant blue R-250 dye using

starch/poly(alginic acid-cl-acrylamide) nanohydrogel. *Process Saf Environ* **109**, 301-310.

Shendurse AM, Khedkar CD (2016) Glucose: Properties and Analysis. U: Caballero B, Finglas P, and Toldrá F (ured.) *The Encyclopedia of Food and Health*, 3. izd., Oxford: Academic Press, str. 239-247.

Singh MN, Hemant KS, Ram M, Shivakumar HG (2010) Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. *Res Pharm Sci* **5**(2), 65–77.

Singh MP, Gupta A, Sisodia SS (2018) Gallic Acid: Pharmacological Promising Lead Molecule: A Review. *Int J Pharmacogn Phytochem Res* **10**(4), 132-138.

Skjåk-Bræk G, Donati I, Paoletti S (2015) Alginate Hydrogels: Properties and Applications. U: Matricardi P, Alhaique F, Coviello T (ured.) *Polysaccharide Hydrogels*, 1. izd., Taylor & Francis, London, str. 449–498.

Szekalska M, Puciłowska A, Szymańska E, Ciosek P, Winnicka K (2016) Alginate: Current Use and Future Perspectives in Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Int J Polym Sci* **2016**, 1-17. <https://doi.org/10.1155/2016/7697031>

Tanaka H, Matsumura M, Veliky IA (1984) Diffusion characteristics of substrates in Calcium alginate gel beads. *Biotechnol Bioeng* **26**, 53-8. doi: 10.1002/bit.260260111.

Unuabonah EI, Omorogie MO, Oladoja NA (2019) Modeling in Adsorption: Fundamentals and Applications. U: Kyzas GZ, Mitropoulos AC (ured.) *Composite Nanoadsorbents*, Elsevier, Amsterdam, str. 85–118.

Vallejo-Castillo V, Rodríguez-Stouvenel A, Martínez R, Bernal C (2020) Development of alginate-pectin microcapsules by the extrusion for encapsulation and controlled release of polyphenols from papaya (*Carica papaya* L.). *J Food Biochem* **44**(9), 1-17. doi:10.1111/jfbc.13331

Vemmer M, Patel AV (2013) Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. *Biol Control* **67**(3), 380–389. doi:10.1016/j.biocontrol.2013.09.003

Verma S, Singh A, Mishra A (2013) Gallic acid: Molecular rival of cancer. *Environ Toxicol Pharm* **35**(3), 473–485. doi:10.1016/j.etap.2013.02.011

Wikipedia (2021a) Bovine serum albumin – Wikipedia <https://en.wikipedia.org/wiki/Bovine_serum_albumin>. Pristupljeno 12. kolovoza 2021.

Wikipedia (2021b) Glukoza– Wikipedia <<https://bs.wikipedia.org/wiki/Glukoza>>. Pristupljeno 15. kolovoza 2021.

Xu X, Han Q, Shi J, Zhang, H, Wang, Y (2019) Structural, thermal and rheological characterization of bovine serum albumin binding with sodium alginate. *J Mol Liq* **299**, 1-35. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.112123>

Yim ZH, Tiong CB, Mansa RF, Ravindra P, Chan ES (2010) Release kinetics of encapsulated herbal antioxidants during gelation process. *J Appl Sci* **10**, 2668-2672.

Zhang F, Cheng G, Ying X (2006) Emulsion and macromolecules templated alginate based polymer microspheres. *React Funct Polym* **66**(7), 712–719. doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2005.10.022

Zhang X, Ferraris S, Prenesti E, Verné E (2013) Surface functionalization of bioactive glasses with natural molecules of biological significance, Part I: Gallic acid as model molecule. *Appl Surf Sci* **287**, 329–340. doi:10.1016/j.apsusc.2013.09.151

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, IZVORKA LALJAK, izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

J. Laljak

Vlastoručni potpis