

# Simultana inkapsulacija srebrovih i cinkovih iona u biopolimerne mikročestice

---

Krčelić, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:282377>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-20**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET**

**SIMULTANA INKAPSULACIJA SREBROVIH I  
CINKOVIH IONA U BIOPOLIMERNE  
MIKROČESTICE**  
DIPLOMSKI RAD

Ana Krčelić

Zagreb, rujan, 2023.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**AGRONOMSKI FAKULET**

Diplomski studij:  
Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

**SIMULTANA INKAPSULACIJA SREBROVIH I**  
**CINKOVIH IONA U BIOPOLIMERNE**  
**MIKROČESTICE**  
DIPLOMSKI RAD

Ana Krčelić

Mentor:  
prof. dr. sc. Marko Vinceković

Zagreb, rujan, 2023.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA  
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Ana Krčelić**, 0178107651, rođen/a 30.06.1996. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

**SIMULTANA INKAPSULACIJA SREBROVIH I CINKOVIH IONA U  
BIOPOLIMERNE MIKROČESTICE**

Svojim potpisom jamčim:

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

U Zagrebu, dana \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
*Potpis studenta / studentice*

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZVJEŠĆE  
O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA**

Diplomski rad studentice Ane Krčelić, JMBAG 0178107651, naslova

**SIMULTANA INKAPSULACIJA SREBROVIH I CINKOVIH IONA U  
BIOPOLIMERNE MIKROČESTICE**

obranjen je i ocijenjen ocjenom \_\_\_\_\_, dana \_\_\_\_\_.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. prof. dr. sc. Marko Vinceković

\_\_\_\_\_

2. prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka.

\_\_\_\_\_

3. izv. prof. dr. sc. Luna Maslov Bandić

\_\_\_\_\_

## **Zahvala**

Hvala mentoru izv. prof. dr. sc. Marku Vincekoviću na usmjeravanju i stručnom vodstvu, svim djelatnicima Zavoda za kemiju na pomoći pri provedbi pokusa te prijateljima i obitelji na strpljenju i razumijevanju.

## Sažetak

Diplomskog rada studentice Ane Krčelić, naslova

### **SIMULTANA INKAPSULACIJA SREBROVIH I CINKOVIH IONA U BIOPOLIMERNE MIKROČESTICE**

Jedan od najvećih problema u svjetskoj komercijalnoj proizvodnji usjeva i hrane su biljno patogeni bakterije i gljivice, što dramatično povećava troškove proizvodnje i smanjuje produktivnost. Upotreba inovativnih agroekoloških formulacija jedan je od ključnih koraka u zaštiti biljaka. Pripravljene su nove formulacije alginatnih mikročestica i mikrokapsula s  $Zn^{2+}$  ili istovremeno s  $Zn^{2+}$  i  $Ag^+$  i karakterizirane (veličina i morfologija mikročestica, učinkovitost inkapsulacije, kapacitet inkapsulacije i bubrenje). Istraživanje molekulskih interakcija pomoću FTIR spektroskopije otkrilo je složene interakcije između svih konstituenata mikročestica. Karakteristike cinkovih i srebrovih kationa nisu nepovoljno utjecale na inkapsulaciju u mikročesticama biopolimera, a njihova aktivnost ostala je prilično visoka.

*In vitro* profili otpuštanja cinkovih i srebrovih kationa analizirani su pomoću Korsmeyer-Peppas empirijskog modela. Vrlo niske vrijednosti eksponenta  $n$  ukazale su da je Fickova difuzija mehanizam koji kontrolira otpuštanje cinkovih i srebrovih iona. Niže vrijednosti konstante otpuštanja  $k$  za mikrokapsule ukazuju na sporiju brzinu otpuštanja cinkovih i srebrovih kationa u usporedbi s mikrosferama. Rezultati su pokazali da se pripravljene mikročestice mogu potencijalno koristiti u zaštiti i prihrani biljaka.

**Ključne riječi:** mikrokapsule, mikročestice, cinkovi ioni, srebrovi ioni

## Summary

Of the master's thesis – student **Ana Krčelić**, entitled

### **SIMULTANEOUS ENCAPSULATION OF SILVER AND ZINC IONS INTO BIOPOLYMER MICROPARTICLES**

One of the biggest problems to the world's commercial crop and food production are plant pathogenic bacteria and fungi, which raises production costs dramatically and reduces crop productivity. The use of innovative agroecological formulations is one of the most critical steps in plant protection. Novel alginate microparticles (microspheres and microcapsules) loaded with  $Zn^{2+}$  or simultaneously with  $Zn^{2+}$  and  $Ag^+$  were prepared and characterized (microparticle size and surface morphology, encapsulation efficiency, loading capacity, swelling). Investigation of molecular interactions in microparticles using FTIR spectroscopy revealed complex interactions between all constituents. The zinc and silver cations characteristics were not adversely affected by the encapsulation in biopolymer microparticles, and their activity remained quite high.

The *in vitro* release profiles of  $Zn^{2+}$  and  $Ag^+$  ions were analyzed by Korsmeyer–Peppas empirical model. Very low values of the exponent  $n$  revealed Fickian diffusion was rate-controlling mechanism for both cations,  $Zn^{2+}$  and  $Ag^+$ . Lower values of the release constant  $k$  for microcapsules imply a slower release of  $Zn^{2+}$  or  $Ag^+$  ions than from microspheres. The outcomes demonstrated that prepared microparticles can potentially be used in plant protection and nutrition.

**Keywords:** microspheres, microcapsules, zinc ions, silver ions



## Sadržaj

<i>Zahvala</i> .....	5
<b>1. Uvod</b> .....	1
1.1 Uloga srebra u poljoprivredi.....	2
1.2 Uloga cinka u poljoprivredi .....	2
1.3 Tehnologija mikrokapsulacije .....	3
1.3.1 Inkapsulacija metodom ionskog geliranja .....	4
1.3.2 Biopolimeri – materijali za inkapsulaciju aktivnih tvari.....	4
<b>2. Hipoteza, opći i specifični ciljevi rada</b> .....	6
2.1 Hipoteza .....	6
2.2 Opći i specifični ciljevi rada .....	6
<b>3. Materijali i metode</b> .....	7
3.1 Materijali .....	7
3.1.1 Priprava mikročestica .....	7
3.2 Metode.....	8
3.2.1 Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijom .....	8
3.2.2 Mikroskopska analiza .....	8
3.2.3 Učinkovitost inkapsulacije, kapacitet inkapsulacije i stupanj bubrenja.....	8
3.2.3.1. Učinkovitost inkapsulacije .....	8
3.2.3.2 Kapacitet inkapsulacije .....	9
3.2.3.3 Stupanj bubrenja .....	9
3.2.4 In vitro otpuštanje iona cinka i srebra iz formulacija mikročestica.....	10
3.2.5. Određivanje koncentracija cinka i srebra .....	10
<b>4. Rezultati i rasprava</b> .....	12
4.1. Identifikacija molekularnih interakcija između konstituenata mikročestica .....	12
4.2 Morfologija i veličina mikročestica .....	16
4.3 Učinkovitost inkapsulacije, kapacitet inkapsulacije i stupanj bubrenja mikročestica .....	21
4.4. In vitro otpuštanje iona cinka i srebra iz formulacija mikročestica .....	22
<b>5. Zaključak</b> .....	26
<b>6. Popis literature</b> .....	27
<b>7. Prilog</b> .....	36
7.1 Popis kratica .....	36

# 1. Uvod

Jedan od najvećih problema u svjetskom komercijalnom uzgoju usjeva i proizvodnji hrane su biljne patogene bakterije i gljivice koje značajno povećavaju troškove proizvodnje i smanjuju produktivnost. Od različitih prirodnih i umjetnih metoda za suzbijanje biljnih bolesti, najrasprostranjenija je upotreba pesticida. Pretjerana upotreba pesticida ima značajne posljedice za okoliš, sigurnost hrane te ljudsko zdravlje (Ozakara i sur, 2016). Stoga, upotreba inovativnih agroekoloških formulacija jedan je od najvažnijih koraka u zaštiti biljaka. Upotreba metalnih iona kao antimikrobnih sredstava, poput iona srebra i cinka, čini se najboljom alternativom sintetičkim pesticidima (Mahesha i sur., 2021).

Mikroinkapsulacija, svestrana inovativna tehnika, privukla je značajnu pozornost u području znanosti o materijalima i farmaceutike zbog svoje sposobnosti da inkapsulira niz različitih aktivnih tvari i spojeva. Ovaj proces uključuje zadržavanje aktivne tvari unutar zaštitnog matriksa, što rezultira poboljšanom stabilnošću, kontroliranim otpuštanjem i poboljšanom biodostupnošću, minimizirajući negativan utjecaj na okoliš. Jedno zanimljivo područje istraživanja mikroinkapsulacije je inkapsuliranje metala sa znatnim antimikrobnim i terapijskim svojstvima, poput srebra i cinka.

Srebro i cink su davno prepoznati zbog svojih inherentnih antibakterijskih, antifungalnih i zacjeljujućih svojstava. Međutim, njihova direktna primjena može donijeti izazove, od ograničene biodostupnosti do potencijalne toksičnosti. Mikroinkapsulacija se pojavljuje kao strateško rješenje koje pruža kontrolirano okruženje za inkapsulirane metale kako bi ostvarili svoje korisne učinke istovremeno umanjujući negativne posljedice. To omogućuje njihovu upotrebu u raznim područjima, uključujući zdravstvo, poljoprivredu i industriju.

Ovaj rad ima za cilj istražiti mikroinkapsulaciju iona srebra i cinka u mikročestice biopolimera alginata, za primjenu u zaštiti i prihrani bilja. Važno je napomenuti da se specifične tehnike i materijali koji se koriste za mikroinkapsulaciju mogu razlikovati ovisno o namjeni i svojstvima tvari koji se inkapsuliraju. Istraživanje u ovom području i dalje se razvija, nalazeći nove metode inkapsulacije, materijale matrica i primjenu u poljoprivredi.

## 1.1 Uloga srebra u poljoprivredi

Ioni srebra ( $\text{Ag}^+$ ) privukli su značajnu pozornost u području mikrokapsulacije zbog svojih antimikrobnih svojstava i potencijalnih prednosti u sustavima s kontroliranim otpuštanjem. Ioni srebra dobro su poznati po svom snažnom antimikrobnom djelovanju protiv širokog spektra mikroorganizama, uključujući bakterije, gljivice i viruse. Njihova sposobnost da razbiju stanične membrane mikroba i ometaju stanične procese čini ih vrijednima za kontrolu infekcija. Ioni srebra svoje antimikrobne učinke ostvaruju kroz različite mehanizme:

- a) Razbijanjem staničnih membrana: ioni srebra mogu poremetiti stanične membrane mikroba, što dovodi do istjecanja staničnog sadržaja i eventualne stanične smrti.
- b) Inhibicijom enzima: ioni srebra mogu ometati enzime potrebne za metabolizam mikroba, što dovodi do poremećaja bitnih staničnih procesa.
- c) Vežanjem DNA: ioni srebra mogu se vezati na mikrobnu DNA, inhibirajući replikaciju i transkripciju DNA.

Srebro ima iznimno antimikrobno djelovanje, a njegova prednost je da je toksičnije za mikroorganizme od drugih metala, a pokazuje smanjenu toksičnost prema stanicama sisavaca. Srebrni nanokristali postali su jedna od najčešće korištenih alternativa kao sredstvo protiv različitih biljno štetnih mikroorganizama (Prasad R., 2014). Također, osim antimikrobnog djelovanja protiv različitih biljnih patogena, srebro pomaže biljkama da apsorbiraju hranjive tvari iz tla, tj. djeluje kao pesticid i gnojivo (Anand i Bhagat, 2019). Nedostatak primjene srebra je taj da u većim koncentracijama postaju toksični te narušavaju ekosustav ako se nekontrolirano ispuste u okoliš (Gupta i sur., 2019).

## 1.2 Uloga cinka u poljoprivredi

Cink je esencijalni mikroelement važan u metaboličkim procesima s ključnom ulogom u rastu, razvoju i obrani biljaka. Igra izuzetno važnu ulogu u fiziološkim procesima biljaka (sudjeluje u izgradnji mnogih enzima i strukturi auksina, bitan je za fotosintezu, sintezu nukleinskih kiselina i nekih proteina, itd.) te igra ključnu ulogu u biljnom odgovoru na štetnike i bolesti (Cabot i sur., 2019). Različita gnojiva s cinkom (anorganski spojevi, sintetički kelati, prirodni organski kompleksi i anorganski kompleksi) koriste se kako bi se poboljšala zaštita i prihrana biljaka cinkom.  $\text{ZnO}$  i  $\text{ZnSO}_4$  se najčešće koriste, no sve popularnija postaje inkorporacija iona cinka u formulacije makronutrijenata, jer omogućava ravnomjerniju

raspodjelu u tlu. Dostupnost iona cinka biljkama ovisi o sastavu gnojiva, interakciji s tlom i načinu primjene. Učinkovitost gnojiva s cinkom nastoji se povećati primjenom novih tehnologija (nanotehnologija, novi polimeri i kelati) (Montalvo i sur., 2016). Važno je naglasiti da se u slučaju pretjerane upotrebe gnojiva s cinkom, mogu javiti različiti štetni učinci na biljke, kao što su smanjeni rast, fotosinteza i brzina disanja, neuravnotežena mineralna prehrana i povećano stvaranje reaktivnih spojeva kisika (Kaur i Garg, 2021).

### **1.3 Tehnologija mikroinkapsulacije**

Pretjerana upotreba i srebra i cinka može naštetiti biljkama i okolišu, stoga je važno kontrolirati količinu dodanu biljkama. Relativno jednostavno rješenje je inkapsulacija u biopolimerimerne mikročestice, tehnologija kojom se kontrolirano i/ili produljeno oslobađa aktivna tvar za zaštitu ili prihranu biljaka (Vinceković i sur., 2016).

Inkapsulacija je metoda pakiranja čvrstog, tekućeg ili plinovitog materijala unutar drugog materijala (uglavnom polimeri, sintetički i prirodni) pri čemu nastaju formulacije (Sing i sur., 2010.) Biopolimerne mikročestice su najčešće sferične, ali oblik, sastav i veličina (od nano do makrodimenzija) mogu varirati ovisno o inkapsuliranom materijalu, biopolimeru i metodi izrade mikročestica. U literaturi, inkapsulirani materijal se najčešće naziva: punilo, jezgra ili unutarnja faza, dok se materijal korišten za inkapsulaciju naziva: matriks, nosač, omotač, ljuska ili vanjska faza.

Općenito, mikročestice štite inkapsulirane tvari od vanjskih uvjeta, smanjuju toksičnost i količinu aktivne tvari potrebne za primjenu, no najvažnija uloga je mogućnost ciljanog i kontroliranog otpuštanja. Strukturno razlikujemo dvije glavne vrste mikročestica, matrične čestice i kapsule. U matričnoj čestici je aktivan sastojak jednoliko raspršen ili otopljen u matriksu, dok kapsula ima unutarnju jezgru u koju je smještena inkapsulirana tvar. Fizičko-kemijska svojstva mikročestica ovise o izboru materijala nosača, vrsti inkapsulirane aktivne tvari i primjeni. Najčešće korišten materijal za pripravu mikročestica u poljoprivredi i prehrambenoj industriji je biopolimer alginat. Mikrosfere alginata nastaju geliranjem s viševalentnim kationima (obično dvovalentnim), odnosno vezanjem kationa na negativne naboje karboksilnih skupina alginatnih polisaharidnih lanaca, stvarajući trodimenzionalnu mrežastu strukturu gela sličnu "kutiji za jaja" (Simó i sur., 2017). Prednosti alginata, kao nositelja, su netoksičnost, biorazgradivost, biokompatibilnost, niski troškovi, jednostavno stvaranje gel matrice i blagi uvjete obrade (Krasaekoopt i sur., 2003). Uobičajeni način

poboljšanja održivog oslobađanja aktivnog sredstva iz alginatnih mikrosfera je dodavanje sloja suprotno nabijenih biopolimera (poput kitozana) kako bi se formirale mikrokapsule. Polielektrolitni sloj na površini mikročestice predstavlja dodatnu prepreku koja usporava otpuštanje aktivnih tvari u okoliš.

### 1.3.1 Inkapsulacija metodom ionskog geliranja

Metode inkapsulacije se dijele na kemijske (granična polimerizacija, umreživanje i in situ polimerizacija), fizikalne (sušenje raspršivanjem, centrifugalna ekstruzija, sterilizacija ekstruzijom, metode koje se koriste superkritičnim tekućinama) i fizikalno-kemijske (ionsko geliranje, hlađenje raspršivanjem, ekstrakcija otapala hlađenjem i kompleksna koacervacija (Gallo i Carbo, 2010.; Teixeira i Da Silva i sur, 2014.)). Razlike u metodama inkapsulacije rezultiraju nastajanjem čestica različitih fizikalnih i mehaničkih svojstava. Odabir određene metode ovisi o svojstvima materijala jezgre, aktivnoj tvari koja se inkapsulira i primjeni.

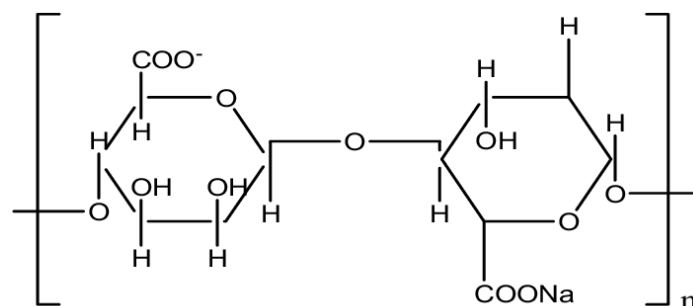
Metoda ionskog geliranja temelji se na interakciji ionskog polimera sa suprotno nabijenim ionom što rezultira poprečnim povezivanjem polimernih lanaca i stvaranjem trodimenzionalne mreže gela. Jednostavna je metoda koja se najviše koristi u pripravi alginatnih mikročestica. Alginat je važan prirodni biopolimer i često se koristi u prehrambenoj, biomedicinskoj i kemijskoj industriji. Građen je od  $\beta$ -D-manuronske kiseline koja tvori M jedinice i  $\alpha$ -L-guluronske kiseline koja tvori G-jedinice. M i G jedinice su povezane 1.4 glikozidnom vezom i tvore GG, MG i MM blokove (Ching i sur., 2015.) Mehanizam ionski potaknutog geliranja alginata temelji se na vezanju kationa (uglavnom dvovalentni i viševalentni) na uronate. Geliranje s dvovalentnim kationima je selektivno prema G, M i GM blokovima, dok se trovalentni ioni neselektivno vežu na karboksilne skupine uronata (Hu i sur, 2021).

### 1.3.2 Biopolimeri – materijali za inkapsulaciju aktivnih tvari

Biopolimeri su biorazgradivi, ima ih u izobilju u prirodi, obnovljivi su, netoksični i relativno jeftini te ekološki prihvatljivi. U usporedbi sa sintetičkim polimerima imaju visoku razinu molekulske složenosti koja se može postići samo u prirodnim sustavima. Drugo važno svojstvo biopolimera je visok sadržaj funkcionalnih skupina uključujući hidroksilne, amino i karboksilne koje omogućuju prilagođavanje njihovih svojstava (Oh i sur, 2009). Uloga biopolimera kao nosača za inkapsulaciju bioaktivnih tvari je sve veća u prehrambenoj industriji

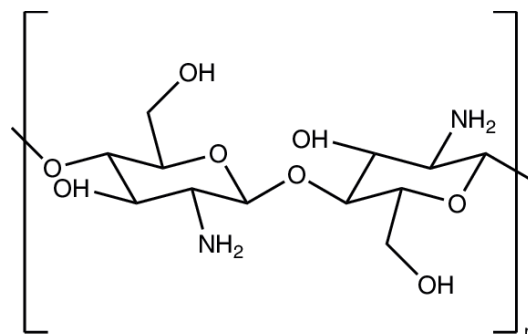
i poljoprivrednoj proizvodnji. Polisaharidi poput alginata i kitozana su biopolimeri koji lako stvaraju biorazgradive mikročestice u koje se aktivni sastojak može jednostavno ugraditi na sobnoj temperaturi.

Alginati imaju dugu povijesti korištenja na području biomedicinskih znanosti, uključujući „drug delivery system“ jer su biorazgradivi, biokompatibilni, jeftini i jednostavno se primjenjuju. Polimeri alginata su također hemokompatibilni, ne akumuliraju se u većim organima te ne pokazuju znakove *in vivo* degradacije. Natrijev alginat je natrijeva sol alginske kiseline, linearni polisaharid koji se prirodno nalazi u morskim smeđim algama. Struktura natrijevog alginata prikazana je na Slici 1.



**Slika 1:** Struktura natrijevog alginata

Kitozan je prirodni polimer dobiven iz hitina, alkalnom deacetilacijom. Hitin je glavni sastojak egzoskeleta člankonožaca kao i dio stanične stijenke nekih gljiva kao što su *Aspergillus* i mukor (Racovita i sur., 2018). Bogat je jedinstvenim značajkama, koje ga čine zanimljivim, za primjenu u medicini, poljoprivredni i prehrambenoj industriji. Ima visoko antimikrobno djelovanje, biokompatibilan je, neotrovan, jača biljke te ima i prehrambenu funkciju (Ferrandiz i sur., 2017.). Struktura kitozana prikazana je na Slici 2.



**Slika 2:** Struktura kitozana

## 2. Hipoteza, opći i specifični ciljevi rada

### 2.1 Hipoteza

Hipoteza ovoga istraživanja je da se boljim razumijevanjem molekulskih međudjelovanja konstituenata mikročestica alginata ispunjenih ionima srebra i cinka potakne korištenje novih, ekološko prihvatljivih formulacija za zaštitu i prihranu bilja.

### 2.2 Opći i specifični ciljevi rada

*Opći ciljevi istraživanja su sljedeći:*

1. Pripraviti nove formulacije mikročestica: mikrosfera, inkapsulacijom iona srebra i cinka u biopolimer, natrijev alginat, te mikrokapsula, oblaganjem mikrosfera slojem polielektrolitnog kompleksa kazeina i alginata.
2. Provesti fizikalno - kemijsku karakterizaciju novih formulacija mikročestica.
3. Istražiti kinetiku i mehanizam otpuštanja iona srebra i cinka iz formulacija mikročestica u cilju jednostavne, sigurne i učinkovite primjene u zaštiti i prihrani bilja.

*Specifični ciljevi istraživanja su:*

1. Pripraviti:
  - a) mikrosfere alginata cinkom te cinkom i srebrom postupkom ionskog geliranja,
  - b) mikrokapsule, polielektrolitnom kompleksacijom suprotno nabijenih biopolimera (kitozan i alginat) na površini mikrosfera.
2. Identificirati molekulske interakcije između konstituenata mikročestica.
3. Istražiti morfološke karakteristike mikročestica
4. Odrediti učinkovitost i kapacitet inkapsulacije te stupanj bubrenja mikročestica.
5. Ustanoviti mehanizam i kinetiku otpuštanja cinkovih i srebrovih iona iz formulacija mikročestica u vodu.

## 3. Materijali i metode

### 3.1 Materijali

Natrijev alginat niske viskoznosti (ALG) (CAS broj: 9005-38-3; Brookfield viskoznost 4 - 12 cps (1% u H<sub>2</sub>O pri 25 °C) nabavljeni od Sigma Aldricha (SAD). Kitozan niske molekulske mase (CS) (CAS RN: 9012-76-4, molekulska masa: 100000–300000) dobiven je od Acros Organic (SAD). ZnSO<sub>4</sub> i AgNO<sub>3</sub> nabavljeni u od tvrtke Gram-mol d.o.o. (Hrvatska). Svi ostali spojevi bili su analitičke kvalitete i koristili su se u nepromijenjenom stanju, bez dodatnog pročišćavanja.

#### 3.1.1 Priprava mikročestica

Mikročestice su pripravljene prema postupku predloženom od Vincekovića i suradnika (Vinceković i sur, 2015). Pripravljene su dvije vrste mikročestica, mikrosfere i mikrokapsule. Mikrosfere su pripravljene u jednom koraku putem ionskog geliranja alginata s cinkom, dok su mikrokapsule pripravljene u dva koraka putem ionskog geliranja alginata s cinkom i kompleksacije polielektrolita (kitozan s alginatom) na površini mikrosfera.

Ionsko geliranje uključuje pripravu mikrosfera kapanjem 500 ml otopine natrijevog alginata (1,5 %) u 500 ml ZnSO<sub>4</sub> (1 mol dm<sup>-3</sup>) (skraćeno kao ALG/Zn) ili u 500 mL smjesu ZnSO<sub>4</sub> (1 mol dm<sup>-3</sup>) i AgNO<sub>3</sub> (0,0032 %) (skraćeno kao ALG/(Zn+Ag)) koristeći Encapsulator Büchi-B390 (BÜCHI Labortechnik AG, Švicarska) i veličinu mlaznice od 120 µm. Mikrosfere (ALG/Zn ili ALG/(Zn+Ag)) su se formirale u otopini za umreživanje uz mehaničko miješanje, zatim su nekoliko puta isprane steriliziranom vodom, odvojene filtracijom kroz Büchnerov lijevak i pohranjene na 4 °C do daljnjih istraživanja.

Mikrokapsule su pripravljene oblaganjem mikrosfera slojem koji nastaje kompleksacijom dva suprotno nabijena polielektrolita, alginata i kitozana. Isprane mikrosfere (ALG/Zn ili ALG/(Zn+Ag)) su dispergirane u 500 ml otopine kitozana (0,5 % CS u 1,0 % CH<sub>3</sub>COOH) uz kontinuirano miješanje za pripravu mikrokapsula. Mikrokapsule (skraćeno kao CS/(ALG/Zn) ili CS/(ALG/(Zn+Ag))) su odvojene filtracijom, isprane deioniziranom vodom i fosfatnim puferom te pohranjene na 4 °C do daljnjih istraživanja.



## 3.2 Metode

### 3.2.1 Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijom

Molekulske interakcije između konstituenata mikročestica analizirane su pomoću infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom (FTIR instrument Cary 660 FTIR (MIR sustav) Agilent Technologies, SAD). Uzorci su pomiješani s kalijevim bromidom kako bi se dobile pastile. Spektralno skeniranje izvršeno je u rasponu od 500-4000  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.2.2 Mikroskopska analiza

Veličina, oblik i morfologija mikročestica analizirani su pomoću dvije mikroskopske tehnike: (i) svjetlosni mikroskop (OM) (Leica MZ16a stereo-mikroskop, Leica Microsystems Ltd., Švicarska) i (ii) pretražni elektronski mikroskop (SEM) (FE-SEM, model JSM-7000F, Jeol Ltd., Japan). Prosječni promjer vlažnih i suhih mikročestica određen je pomoću svjetlosnog mikroskopa koristeći Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, verzija E\_LCmicro\_09Okt2009. Iz tri serije pripremljenih mikročestica slučajno je odabrano dvadeset mikročestica kako bi se odredila raspodjela veličina.

Suhe mikročestice za SEM analizu stavljene su na visoko vodljivu grafitnu traku. FE-SEM je povezan s EDS/INCA 350 (energijsko disperzivni rendgenski analizator) proizvedenim od strane Oxford Instruments Ltd. (UK). Softver ImageJ korišten je za određivanje veličine pora na površini mikročestica.

### 3.2.3 Učinkovitost inkapsulacije, kapacitet inkapsulacije i stupanj bubrenja

#### 3.2.3.1. Učinkovitost inkapsulacije

Učinkovitost inkapsulacije (EE) izračunata je iz količine ukupno korištenog  $\text{Zn}^{2+}$  ili  $\text{Ag}^+$  za inkapsulaciju ( $c_{\text{tot}}$ ) te inkapsulirane količine  $\text{Zn}^{2+}$  ili  $\text{Ag}^+$  u suhim mikročesticama ( $c_{\text{inkaps}}$ ) metodom prema Xue i sur. (Xue i sur, 2004). Učinkovitost inkapsulacije izražena je kao postotak ukupno korištenog  $\text{Zn}^{2+}$  ili  $\text{Ag}^+$  ( $c_{\text{tot}}$ ) te izračunata pomoću jednadžbe:

$$EE = \left( \frac{c_{\text{inkaps}}}{c_{\text{tot}}} \right) \times 100$$

gdje je  $c_{\text{inkaps}} = c_{\text{tot}} - cf$ , a  $cf$  je koncentracija iona  $\text{Zn}^{2+}$  ili  $\text{Ag}^+$  u filtratu određena spektrometrom. Mjerenja su ponovljena 3 puta, a rezultati su izraženi u % te prikazani kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom.

### 3.2.3.2 Kapacitet inkapsulacije

Mokre mikročestice su sušene na zraku pri sobnoj temperaturi nekoliko dana dok se sva tekućina nije isparila. Sadržaj  $\text{Zn}^{2+}$  ili  $\text{Ag}^+$  određen je otapanjem 1 mg suhih mikročestica u 10 ml smjese 0,2 M  $\text{NaHCO}_3$  i 0,06 M  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$  pri pH 8 (Li i sur., 2007). Dobivena otopina je filtrirana i koncentracija  $\text{Zn}^{2+}$  ili  $\text{Ag}^+$  u filtratu je određena spektrometrom. Kapacitet inkapsulacije je izražen kao količina  $\text{Zn}^{2+}$  ili  $\text{Ag}^+$  po 1 g suhih mikročestica i izračunat je pomoću jednadžbe:

$$LC = ((c_{\text{Zn or Ag}} \times V/1000)/w_c)$$

gdje je  $c_{\text{Zn}}$  ili  $c_{\text{Ag}}$  koncentracija  $\text{Zn}^{2+}$  ili  $\text{Ag}^+$  iona u filtratu,  $V$  je volumen uzorka, a  $w_c$  je težina korištenih mikročestica.

Mjerenja su ponovljena 3 puta, a rezultati su izraženi u  $\text{mg g}^{-1}$  suhih mikročestica te prikazani kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom.

### 3.2.3.3 Stupanj bubrenja

Stupanj bubrenja ( $S_w$ ) određen je mikročesticama dispergiranim u deioniziranoj vodi. Uzorci su pripremljeni disperzijom 0,1 g suhih mikročestica u staklenoj bočici koja sadrži 10 ml deionizirane vode te su ostavljeni da bubre na sobnoj temperaturi tri sata. Težina nabubrenih mikročestica određena je poslije upijanja viška vlage sa površine pomoću filter papira, nakon čega je uslijedilo vaganje (Mokale i sur., 2014). Bubrenje je zatim izračunato pomoću sljedeće jednadžbe:

$$S_w \% = \frac{w_t - w_0}{w_0},$$

gdje je  $w_t$  masa nabubrenih mikročestica a  $w_0$  njihova početna masa.

### 3.2.4 In vitro otpuštanje iona cinka i srebra iz formulacija mikročestica

Uzorci za određivanje koncentracije otpuštenih  $Zn^{2+}$  i  $Ag^+$  iona iz formulacija mikročestica pripremljeni su dispergiranjem 1 g suhih mikročestica u 10 mL deionizirane vode i ostavljeni da stoje bez miješanja tijekom eksperimenata na sobnoj temperaturi. U odgovarajućim vremenskim intervalima, disperzija je promiješana tijekom 60 sekundi, uzeti su uzorci i koncentracija  $Zn^{2+}$  ili  $Ag^+$  je određena spektrometrom. Rezultati su prikazani kao frakcija otpuštenog iona prema jednadžbi:

$$f = (R_t/R_{tot}),$$

gdje je  $R_0$  koncentracija otpuštenih  $Zn^{2+}$  ili  $Ag^+$  iona u otopinu u odgovarajućem vremenu, a  $R_{tot}$  je koncentracija  $Zn^{2+}$  ili  $Ag^+$  iona koja je inkapsulirana u mikročestici.

Mjerenja su ponovljena 3 puta, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom.

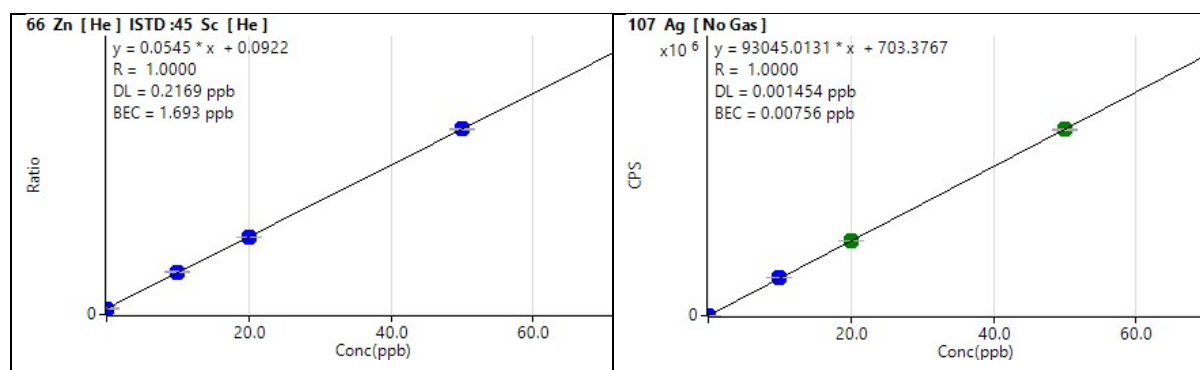
### 3.2.5. Određivanje koncentracija cinka i srebra

Za određivanje koncentracije iona srebra i cinka u vodenim otopinama korišten je spektrometar Agilent 7900 ICP-MS (Agilent Technologies, Singapur) opremljen standardnim Ni konusima, pneumatskim raspršivačem, kvarcnom komorom i plamenikom promjera 2.5 mm. U tablici 1 navedeni su radni parametri spektrometra:

**Tablica 1. Radni parametri spektrometra**

Sample depth (mm)	10
ORS mode	NO GAS/ He
Nebulizer carrier gas flow (L min <sup>-1</sup> )	1.09
Ext 1 lens (V)	0
Ext 2 lens (V)	-190
RF power (W)	1550
RF matching (W)	1.80
Detection mode	Spectral
Integration time (s)	0.1
Repetitions	3

Prije samog mjerenja izrađeni su kalibracijski pravci pri čemu su mjereni intenziteti signala za izotope, Ag<sup>107</sup> i Zn<sup>66</sup>. Mjerne standardne otopine pripravljene su razrjeđivanjem standardne otopine ishodne koncentracije 10 mg mL<sup>-1</sup>. Na slikama su prikazane dobivene jednadžbe pravaca kao i pripadajući koeficijenti korelacije *R*.

**Slika 3.** Baždarni pravci za određivanje koncentracija cinka i srebra u otopini

Uzorci su prije mjerenja razrijeđeni 100 puta u dušičnoj kiselini, 2 % v/v. Za kontrolu analitičkog postupka mjerenja korišten je standardni referentni materijal NIST 1643 f. Određena odstupanja bila su manja od 1 % u odnosu na sadržaj deklariran u referentnom materijalu.

## 4. Rezultati i rasprava

U ovom radu pripravljene su i karakterizirane formulacije mikrosfera i mikrokapsula cinkovog alginata bez i sa srebrovim ionina. Za pripravu mikrokapsula korišten je kitozan. Fizikalno-kemijska svojstva pripremljenih formulacija mikročestica analizirana su infracrvenom spektroskopijom s Fourierovim transformacijama (FTIR) te svjetlosnim i pretražnim elektronskim mikroskopom. Provedena je i analiza učinkovitosti i kapaciteta inkapsulacije, stupanj bubrenja te mehanizam i kinetika otpuštanja cinkovih i srebrovih iona iz formulacija mikročestica.

### 4.1. Identifikacija molekulskih interakcija između konstituenata mikročestica

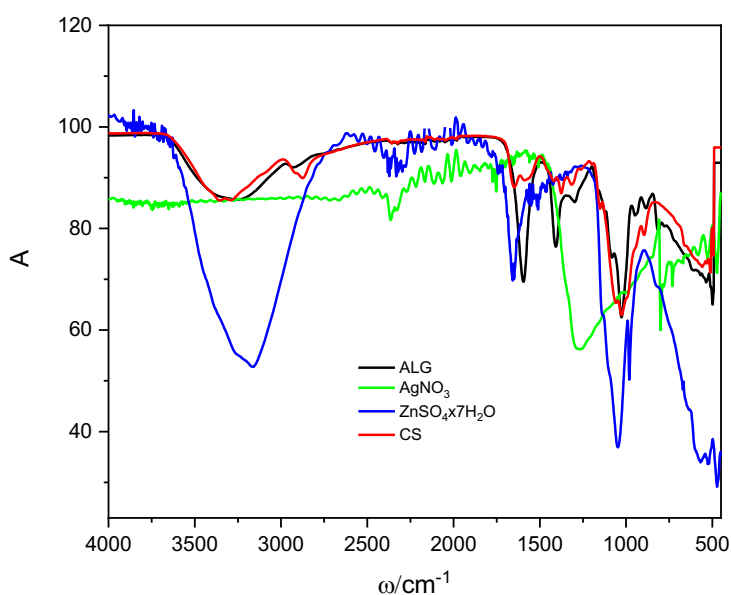
Snimljeni su infracrveni spektri početnih komponenata natrijevog alginata, kitozana, cinkovog sulfata i srebrovog nitrata (Slika 4), te uspoređeni sa spektrima formulacija mikročestica (Slika 5). Unatoč složenosti spektara zbog preklapanja različitih apsorpcijskih vrpca kao i sprege različitih vibracija, dobivene su vrijedne informacije o molekulskim interakcijama konstituenta mikročestica. Pri analizi spektara veća je pozornost usmjerena na one apsorpcijske vrpce koje odgovaraju karakterističnim vibracijama veza kod kojih dolazi do promjena uslijed geliranja alginata. Najuočljivije promjene prisutne su u području hidroksilnih i karboksilnih funkcionalnih skupina.

Spektar natrijevog alginata pokazuje intenzivnu široku vrpcu istezanja hidroksilnih skupina ( $\text{-OH}$ ) s vrhom pri  $3300\text{ cm}^{-1}$  i ramenom pri  $3198\text{ cm}^{-1}$ . Vibracije istezanja slabog intenziteta pri  $2900\text{ cm}^{-1}$  odgovaraju  $\text{-CH}_2$  skupinama, a jako oštro istezanje pri  $1595\text{ cm}^{-1}$  i srednje oštro istezanje pri  $1405\text{ cm}^{-1}$  vibracijama asimetričnih i simetričnih karboksilnih skupina ( $\text{COO}^-$ ). Slabo široko CO istezanje može se uočiti na  $1295\text{ cm}^{-1}$ , dok su vrpce smještene oko  $1026\text{ cm}^{-1}$  karakteristične za polisaharide (Sartori i sur, 1997).

Za spektar kitozana karakteristična je široka vrpca vibracije od  $3291\text{--}3610\text{ cm}^{-1}$  koja odgovara preklapanju vrpca hidroksilnih ( $\text{-OH}$ ) i amino ( $\text{-NH}_2$ ) skupina uslijed vibracijskog istezanja, te intermolekularnim vodikovim vezama. Vibracije pri  $2925\text{ cm}^{-1}$  (vrh nižeg intenziteta) i  $2875\text{ cm}^{-1}$  (vrh višeg intenziteta) pripisuju se asimetričnim i simetričnim istezanju  $\text{CH}_2$  skupina. Karakteristične vrpce N-acetilnih skupina: istezanje  $\text{C=O}$  skupine (amid I), savijanje  $\text{-NH}$  (amid II) i istezanje  $\text{C-N}$  (amid III), nalaze se na valnim brojevima 1645, 1550

i  $1325\text{ cm}^{-1}$  (Sankalia, i sur, 2007). Vrh srednjeg intenziteta pri  $1373\text{ cm}^{-1}$  pripada simetričnoj  $\text{CH}_3$  deformaciji, dok vibracije u području  $1190\text{--}920\text{ cm}^{-1}$  pripadaju C-N istezanju i preklapanju vibracija iz ugljikohidratnog prstena (Lawrie i sur, 2007).

Za spektar srebrovog nitrata karakterističan je široki vrh visokog intenziteta pri  $1300\text{ cm}^{-1}$  uslijed vibracije istezanja N=O veze u  $\text{NO}_3^-$  skupini (Gan i sur, 2016). Zbog prisutnosti vode spektar cinkovog sulfata heptahidrata pokazuje u području OH vibracija istezanja, široku vrpču oko  $3100\text{ cm}^{-1}$  i užu vrpču pri  $1657\text{ cm}^{-1}$ . Vrhovi uočeni pri  $1100, 983$  i  $612\text{ cm}^{-1}$  pripisuju se vibraciji istezanja sulfatnih skupina (Saha i sur, 2012).



**Slika 4.** FTIR spektri natrijevog alginata (ALG), srebrovog nitrata ( $\text{AgNO}_3$ ), cinkovog sulfata heptahidrata ( $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) i kitozana (CS).

FTIR spektri mikročestica prikazani su na Slici 5. Prisutnost kationa u alginatnoj matrici uzrokuje najznačajnije promjene u području funkcionalnih skupina alginata: hidroksilnih (OH) i karboksilnih ( $\text{COO}^-$ ), što ukazuje da su interakcije konstituenata mikročestica uglavnom vodikove veze i elektrostatske interakcije (Vinceković i sur, 2016). U odnosu na spektar natrijevog alginata, spektar cinkovog alginata pokazuje intenzivniju i širu vrpču istezanja hidroksilnih skupina ( $-\text{OH}$ ) što upućuje na stvaranje novih vodikovih veza. Intenzivnije, nešto šire vrpce asimetričnih (pri  $1589\text{ cm}^{-1}$ ) i simetričnih (pri  $1409\text{ cm}^{-1}$ ) karboksilnih skupina ( $\text{COO}^-$ ) posljedica su elektrostatskih interakcija sa  $\text{Zn}^{2+}$  ionima i umreživanja vezanjem na karboksilne skupine guluronske i manuronske kiseline, za razliku od  $\text{Ca}^{2+}$  iona koji se vežu uglavnom na guluronskim karboksilnim skupinama (Straccia i sur,

2015). Uspoređujući s kalcijevim ionima, koji mogu stvarati ionske veze s dvije karboksilne skupine, cinkovi ioni stvaraju veze s jednom karboksilnim skupinom te je struktura trodimenzionalne mreže cinkovog alginata labavija i sadrži veće količine vode od kalcijevog alginata.

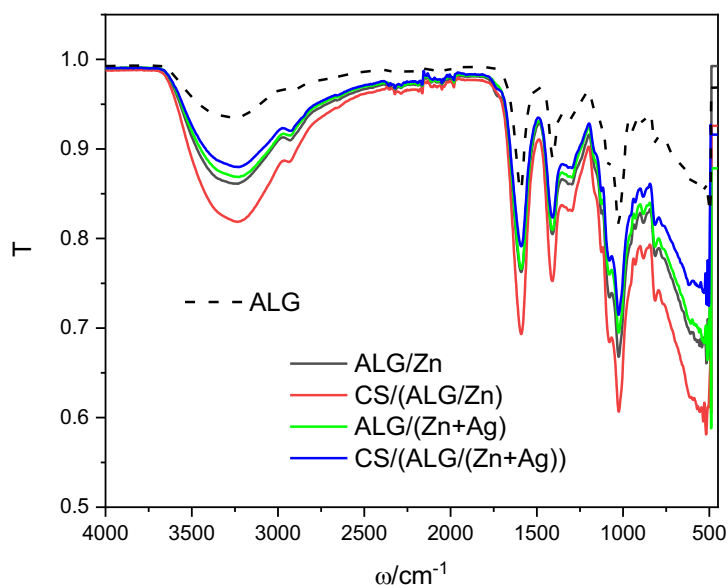
Mehanizam ionski potaknutog umreživanja alginatnih lanaca temelji se uglavnom na interakciji viševalentnih kationa i karboksilnih skupina. Prema kvantno kemijskoj računalnoj metodi zemnoalkalijski kationi tvore ionske veze s alginatnim lancima, dok ioni prijelaznih metala tvore komplekse koordinacijsko-kovalentnim vezama (Agulhon, i sur, 2012). Vezanje cinkovih iona je pripisano, od strane nekih autora, isključivo kovalentno koordinacijskoj vezi s karboksilnim skupinama (Taha i sur., 2008 i Campanone i sur., 2014). Međutim, iako je  $Zn^{2+}$  prijelazni metal (ali s ionskim radijusom usporedivim sa zemnoalkalijskim metalima), analiza glavnih značajki cinkovih hidrogelova pokazala je više sličnosti sa zemnoalkalijskim hidrogelovima. Zaključeno je da je veza  $Zn^{2+}$  s alginatom, iako dosta slaba, prevladavajuće ionska (Makarova i sur, 2023).

Spektri cinkovog alginata sa srebrom pokazuju nešto manje intenzitete karakterističnih vrhova bez značajnih pomaka. Nešto uža i manje intenzivna apsorpcijska vrpca hidroksilnih skupina oko  $3300\text{ cm}^{-1}$  te smanjeni intenziteti vrhova pripisanih karboksilnim skupinama u ALG/(Zn+Ag) spektru ukazuju na neznatno oslabljene vodikove veze i elektrostatske interakcije u odnosu na ALG/Zn. Manji intenzitet široke vrpce u području vibracija hidroksilnih skupina implicira kidanje dijela inter- i intramolekularnih vodikovih veza u ALG/(Zn + Ag) moguće zbog nastajanja kompleksa između  $Ag^+$  i atoma kisika iz O-H skupina. (Gan i sur, 2016). Nadalje, iz neznatnih razlika spektara mikročestica cinkovog alginata i onih s inkapsuliranim srebrom nije bilo moguće jednoznačno detektirati nastajanje veze između natrijevog alginata i srebrovog iona. Lin i suradnici (Lin i sur, 2013) su interakciju  $Ag^+$  iona s matriksom natrijevog alginata pripisali van der Waalsovima interakcijama, dok su Zhang i suradnici (Zhang i sur, 2023) pokazali da  $Ag^+$  također može elektrostatski reagirati s anionskim alginatom, tj. uz određene uvjete moguće je gelirati alginat ionskim umreživanjem s monovalentnim kationom  $Ag^+$  slično umreživanju  $Ca^{2+}$  kationima.

Nisu uočene značajne razlike u položajima vrpce nakon oblaganja mikrosfera slojem polielektrolitnog kompleksa nastalog interakcijom između amino skupina kitozana i karboksilnih skupina alginata. U usporedbi sa spektrima ALG/Zn mikrosfera, svi vrhovi u spektrima mikrokapsula ispunjenih  $Zn^{2+}$  su intenzivniji, dok su spektri mikrokapsula ispunjenih  $Zn^{2+}$  i  $Ag^+$  pokazali suprotan učinak, tj. intenziteti su smanjeni.

Značajan porast intenziteta i proširenje apsorpcijske vrpce oko  $3300\text{ cm}^{-1}$  te porast intenziteta vibracija pri  $1406$ ,  $1292$  i  $1020\text{ cm}^{-1}$  u spektru cinkovog alginata obloženog slojem kitozana posljedica su nastajanja vodikovih veza uslijed kompleksiranja  $\text{Zn}^{2+}$  iona s amino i hidroksilnim skupinama kitozana (Li i sur, 2010). Nedostatak drugih karakterističnih vrpca kitozana u spektrima može se objasniti kompleksiranjem natrijevog alginata i kitozana (Vinceković i sur., 2016).

Svi intenziteti karakterističnih vrpca u spektru  $\text{CS}/(\text{ALG}/(\text{Zn}+\text{Ag}))$  su malo smanjeni u odnosu na  $\text{ALG}/(\text{Zn}+\text{Ag})$ . Široka vrpca oko  $3300\text{ cm}^{-1}$  pripisuje se uglavnom N-H vibracijama istezanja, iako se u tom područje preklapaju N-H i O-H vibracije istezanja (Jin i sur, 2002). Smanjenje transmisije u ovom pojasu pokazuje da je  $\text{Ag}^+$  vezan za N-H skupine. Ostale promjene primijećene na valnim brojevima (pomak od  $1585$  do  $1571\text{ cm}^{-1}$ ,  $1406$  na  $1392\text{ cm}^{-1}$  i od  $1020$  do  $1045\text{ cm}^{-1}$ ) povezane su sa savijanjem N-H skupina, istezanjem C-N skupina te N-H njihovom deformacijom. Sve te promjene upućuju da se  $\text{Ag}^+$  ioni vežu na atome dušika te time smanjuju intenzitete vibracija N-H veza (Wei i sur, 2009).

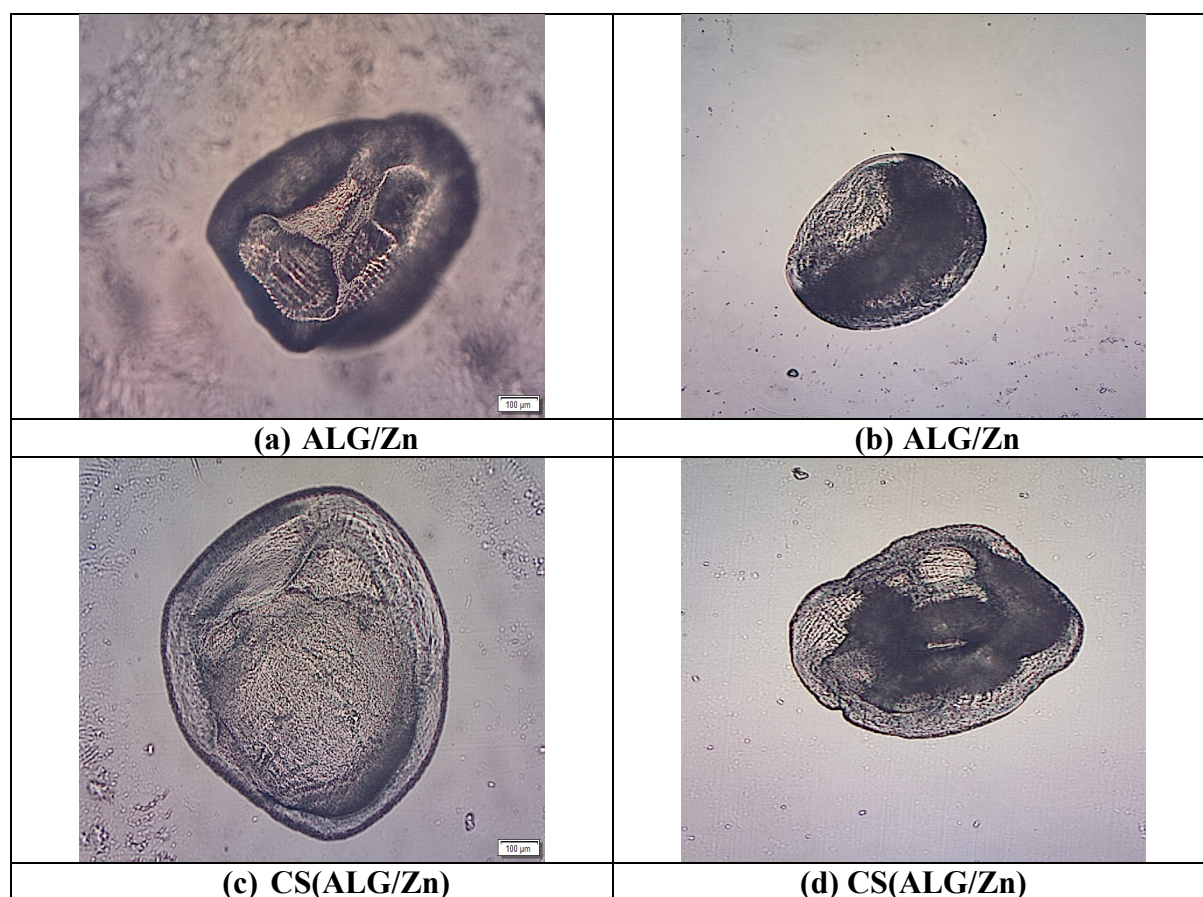


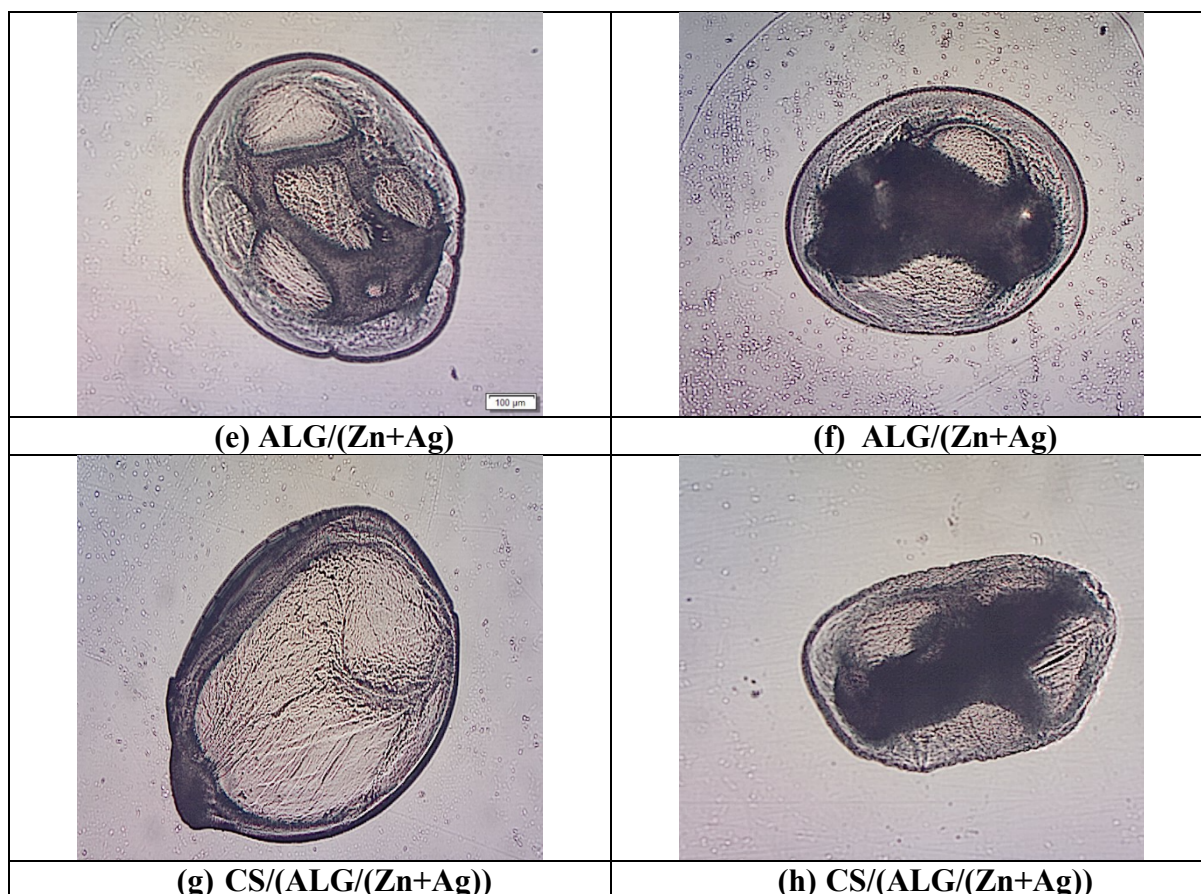
**Slika 5.** FTIR spektar mikrosfera cinkovog alginata ( $\text{ALG}/\text{Zn}$ ), mikrokapsula cinkovog alginata ( $\text{CS}/(\text{ALG}/\text{Zn})$ ), mikrosfera cinkovog alginata s inkapsuliranim  $\text{Ag}^+$  ( $\text{ALG}/(\text{Zn}+\text{Ag})$ ) i mikrokapsule cinkovog alginata s inkapsuliranim  $\text{Ag}^+$  ( $\text{CS}/(\text{ALG}/(\text{Zn}+\text{Ag}))$ ). Spektar natrijevog alginata ( $\text{ALG}$ ) (crtkana crna linija) prikazan je za usporedbu.



## 4.2 Morfologija i veličina mikročestica

Općenito, veličina i oblik mikročestica uglavnom su određeni viskozitetom otopine alginata, promjerom mlaznice, koncentracijom gelirajućeg kationa, brzinom protoka otopine i udaljenošću između točke izlaza mlaznice i otopine za geliranje (Blandino i sur., 1999). Pri našim eksperimentalnim uvjetima pripravljene mikročestice bile su većinom sfernog oblika (Slika 6 a, c, e, g), iako su neke od njih bile lagano deformirane. Površina mokrih mikrosfera je glatka, dok se na površini mokrih mikrokapsula lako uočava namreškani dodatni sloj kitozana. Liofilizacijom mikrosfera i mikrokapsula dolazi do značajnih promjena u veličini i obliku mikročestica te morfologiji površine (Slike 6 b,d,f,h). To se može objasniti naglim gubitkom vode. Posljedično, struktura mikrosfera i mikrokapsula postaje porozna i krhka.





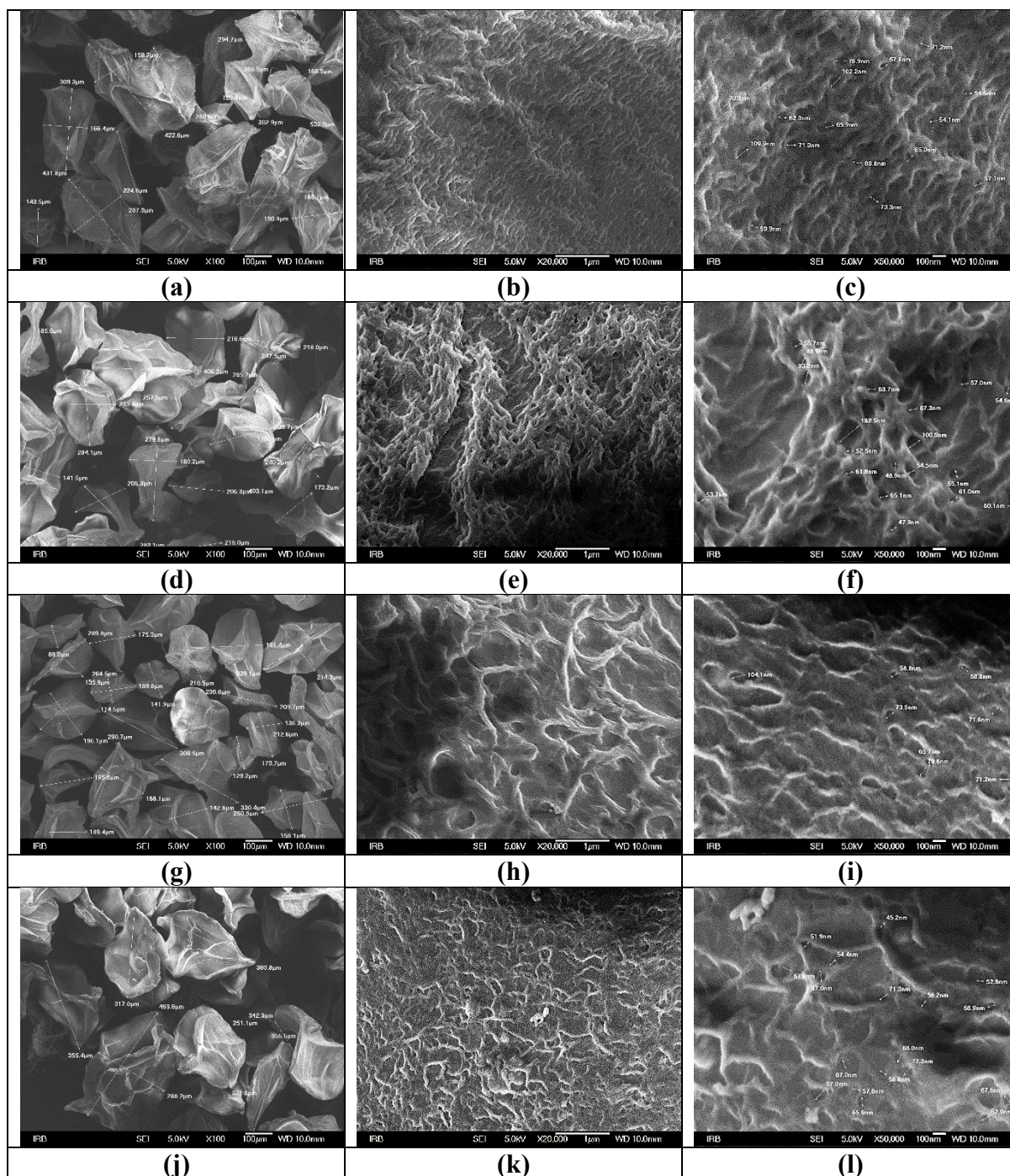
**Slika 6.** Mikrofotografije mokrih (lijeva kolona) i suhih (desna kolona) mikročestica snimljene pomoću svjetlosnog mikroskopa uz povećanje 10x.

U Tablici 2. prikazane su veličine mokrih i suhih mikročestica. Dodavanjem  $\text{Ag}^+$  i kitozana uočen je porast veličina. Nakon sušenja, sve mikročestice su približno 60% manje. Također, mikročestice postaju poroznije i imaju manju gustoću što utječe na adsorpciju vode, a samim time i na kinetiku oslobađanja aktivnih komponenata (Sriamornsak i sur., 1998).

**Tablica 2.** Prosječna veličina ( $d/\mu\text{m}$ ) vlažnih i suhih mikročestica određena svjetlosnim mikroskopom

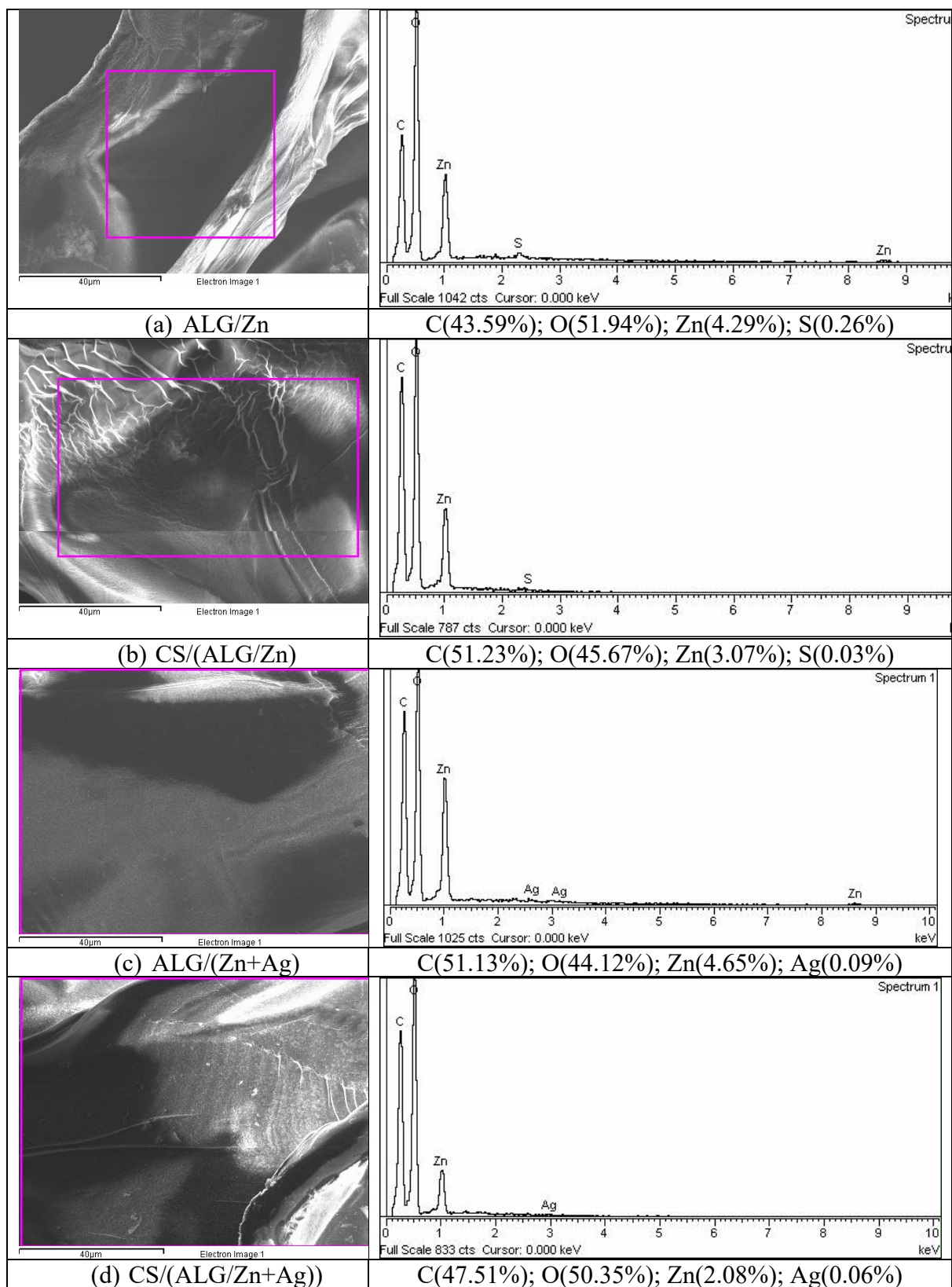
MIKROČESTICE	$d_{\text{wet}}$	$d_{\text{dry}}$
ALG/Zn	681,06±92,52	381,54±41,27
CS/(ALG/Zn)	852,17±47,35	515,50±1,93
ALG/(Zn+Ag)	915,46±23,88	598,24±6,85
CS/(ALG/(Zn+Ag))	1112,48±33,81	557,52±2,03

Morfologija liofiliziranih mikročestica opažena pri različitim SEM uvećanjima prikazana je na Slici 7. Nakon liofilizacije sve su se mikročestice deformirale i smanjile (7 a, d, g, j). Površina im je naborana s više ili manje isprepletenih vlakana i izraženim porama. Pojava pora može se pripisati gubitku vode koji je povezan s procesima opuštanja stresa biopolimera (Jurić i Vinceković, 2019). Oblaganje mikrosfera cinkovog alginata s kitozonom (Slika 7e) rezultiralo je izraženijim valovitim naborima s nešto debljim vlaknima. U usporedbi s mikrosferama cinkovog alginata s prosječnom veličinom pora od 68,9 nm (Slika 7c), prosječna veličina pora na mikrokapsulama bila je manja, 64,9 nm (Slika 7f). Inkapsulacijom iona srebra u mikrosfere cinkovog alginata vlaknasta tekstura na površini postaje deblja uz nešto veću prosječnu veličinu pora (72,9 nm) (Slika 7i). To implicira promjenu u strukturi mreže gela zbog elektrostatskog privlačenja pozitivno nabijenih iona srebra i slobodnih dijelova alginatnih lanaca te mehaničkog djelovanja kationa većeg ionskog radijusa (ionski radijus cinkovih iona je 0,074 nm, a srebrovih iona 0,126 nm). Sloj kitozana na površini ALG/(Zn+Ag) mikrokapsula izgleda tanje u odnosu na površinu mikrosfera cinkovog alginata (vlakna su tanja i manje isprepletena) (Slika 7k) s nešto manjom prosječnom veličinom pora (63,2 nm).



**Slika 7.** SEM mikrofotografije ALG/Zn, CS/(ALG/Zn), ALG/(Zn+Ag) i CS/(ALG/(Zn+Ag)) s pripadajućim skalama 100, 20 000 i 50 000  $\mu\text{m}$ .

Analiza EDS spektara područja bliskog površini mikročestice (elektronska sonda prodire do dubine  $\sim 1 \mu\text{m}$ ) pokazala je da najveći udio elemenata odgovara C i O (Slike 8 a,b,c,d). Detekcija Zn ukazuje da je dio lokaliziran blizu površine (Slike 8a do 8d). Mala količina detektiranog sumpora vjerojatno je ostatak sulfata korištenog tijekom pripreme formulacija (Slike 8 a,b). Nakon inkapsulacije mikročestica srebrom, dio se također nalazi blizu površine (Slike 8 c,d).



**Slika 8.** Morfologija i analiza elemenata pri površini pomoću energijski disperzivne rendgenske analize (EDS) (izražena u postotku atomske težine) mikročestica ALG/Zn, CS/(ALG/Zn), ALG/(Zn+Ag) i CS/(ALG/(Zn+Ag)). Pripadajuće skale su 40 µm.

### 4.3 Učinkovitost inkapsulacije, kapacitet inkapsulacije i stupanj bubrenja mikročestica

Određivanje učinkovitosti inkapsulacije (EE) i kapaciteta inkapsulacije (LC) provedeno je kako bi se dobile informacije o količini  $Zn^{2+}$  i  $Ag^+$  inkapsuliranih u mikročesticama. Rezultati o učinkovitosti inkapsulacije, inkapsulacije iona cinka i srebra te stupanj bubrenja mikročestica prikazani su u Tablici 3. Učinkovitost inkapsulacije za  $Zn^{2+}$  je vrlo visoka i skoro ista za sve mikročestice. 100% EE za  $Ag^+$  ukazuje na to da je gotovo potpuno inkapsulirano. Dodatak kitozana smanjuje kapacitet inkapsulacije mikrokapsula u usporedbi s mikrosferama. Kada se dispergiraju otopini, mikročestice bubre mijenjajući mnoga svojstva, kao što su mehanička čvrstoća, propusnost, otpuštanje aktivnih sastojaka, stabilnost i brzina dezintegracije. Proces bubrenja uključuje dva temeljna molekulska procesa: (i) prodiranje otopine u matricu i (ii) relaksacija naprežanja polimera (prijelaz iz staklaste strukture u gumasto stanje) (Siepmann i Siepmann, 2012).

Veći stupanj bubrenja mikrosfera istovremeno ispunjenih sa  $Zn^{2+}$  i  $Ag^+$  u usporedbi s onima samo sa  $Zn^{2+}$  može se pripisati manjoj gustoći mreže gela. Tijekom geliranja natrijevog alginata, cinkovi kationi reagiraju karboksilnim skupinama stvarajući trodimenzionalnu mrežu gela. Inkapsulacija iona srebra umanjila je opseg umreženosti alginatnih lanaca zbog elektrostatskih i mehaničkih učinaka. Poznato je da opseg umreženosti određuje gustoću hidrogela koja utječe na njegovo bubrenje, odnosno, stupanj bubrenja hidrogela  $S_w$  je obrnuto proporcionalan gustoći gela. Otkriveno je da se bubrenje može koristiti za određivanje stupnja umrežavanja (Roger i sur., 2006).

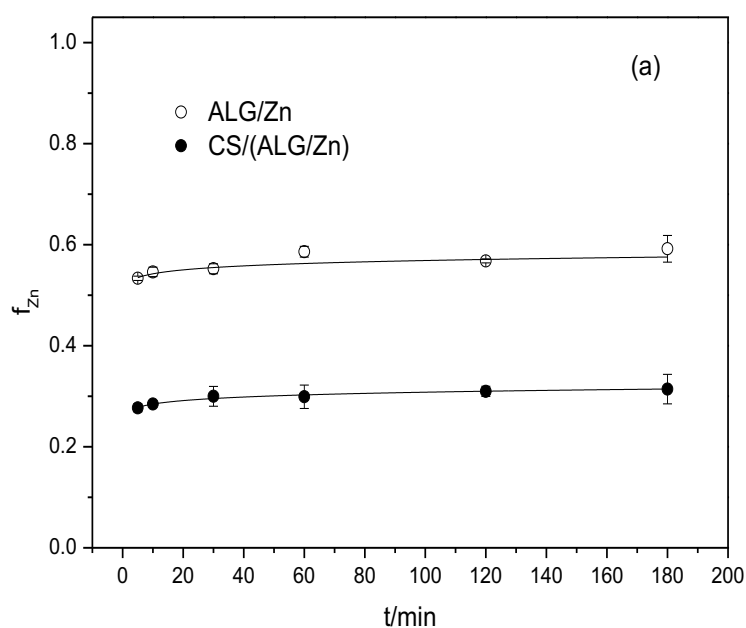
U usporedbi s mikrosferama, mikrokapsule imaju veći stupanj bubrenja. To se može pripisati većim sposobnostima kitozana da upija vodu (Silva i sur., 2004). Kada se mikrokapsula dispergira u vodi, početno bubrenje je kontrolirano interakcijama između sloja kitozana i vode, pH i elektrolita prisutnih u mediju za bubrenje (Lee i sur, 1997). Stupanj bubrenja je nizak u kiseloj sredini, dok porastom pH izrazito raste. Nizak stupanj bubrenja u kiselim uvjetima posljedica je sporog prodiranja medija u mikrokapsule zbog gušće strukture polielektrolitnog sloja kao rezultat jakih interakcija između protoniranih amino skupina kitozana i karboksilnih skupina alginata. Porastom pH te interakcije slabe i voda lakše prodire u mikročesticu. Pri neutralnim uvjetima (deionizirana voda pH  $\cong$  5,9) medij, u kojem mikrokapsula bubri, lako prodire u mikrokapsule zbog slabijih elektrostatskih interakcija u polielektrolitnom sloju (Zhang i sur., 2004).

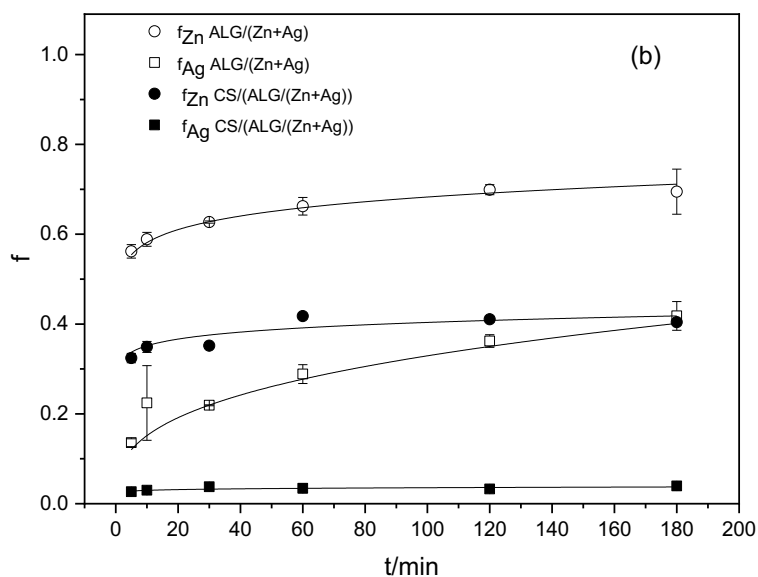
**Tablica 3:** Učinkovitost inkapsulacije (EE/%), kapacitet inkapsulacije (LC/mg g<sup>-1</sup>) i stupanj bubrenja (S<sub>w</sub> /%) mikročestica.

Mikročestice	EE <sub>Zn</sub>	EE <sub>Ag</sub>	LC <sub>Zn</sub>	LC <sub>Ag</sub>	S <sub>w</sub>
ALG/Zn	87,21±0,49	-	14,19±0,83	-	15,43±3,82
CS/(ALG/Zn)	87,21±0,49	-	8,91±0,11	-	43,8±1,65
ALG/(Zn+Ag)	87,32±0,40	99,99±0,001	15,27±0,83	19,48±0,50	25,12±0,11
CS/(ALG/(Zn+Ag))	87,32±0,40	99,99±0,001	7,71±0,52	4,22±0,47	66,33±0,45

#### 4.4. In vitro otpuštanje iona cinka i srebra iz formulacija mikročestica

Moguća primjena mikročestica biopolimera nameće istraživanje u vezi njihove sposobnosti otpuštanja u određenim fizičko - kemijskim uvjetima. Sve formulacije mikročestica su stabilne i nakon dispergiranja u vodi otpuštanje metalnih iona je naglo unutar prvih 20 minuta; nakon tog vremena, otpuštanje poprima približno konstantne vrijednosti tijekom 1 tjedna. Na Slikama 9a i 9b prikazani su profili otpuštanja Zn<sup>2+</sup> i Ag<sup>+</sup> iona do 180 minuta. Jasno se vidi da količina oslobođenih kationa ovisi o aktivnim tvarima i prisutnosti kitozana; količina otpuštanih srebrovih iona je manja od cinkovih za sve formulacije mikročestica.





**Slika 9.** (a) Frakcija otpuštenih  $Zn^{2+}$  iona ( $f_{Zn}$ ) iz mikročestica ALG/Zn i CS/(ALG/Zn) i (b) frakcija otpuštenih  $Zn^{2+}$  ( $f_{Zn}$ ) i  $Ag^+$  ( $f_{Ag}$ ) iz formulacija mikročestica ALG/(Zn+Ag) i CS/(ALG/(Zn+Ag)) s vremenom ( $t$ ). Na slici su označene i pripadajuće standardne devijacije.

Sve krivulje prikazane na Slici 9. mogu se opisati jednadžbom:

$$f = kt^n \quad ,$$

gdje  $f$  predstavlja frakciju otpuštenih kationa,  $k$  je konstanta karakteristična za sustav aktivna tvar/polimer koji uzima u obzir strukturne i geometrijske karakteristike sustava,  $n$  je eksponent koji karakterizira mehanizam koji kontrolira otpuštanje iz mikročestica. Vrijednosti konstanti otpuštanja  $k$  i eksponenata  $n$  navedene su u Tablici 4. Korelacijski koeficijenti varirali su od 0,97 do 0,99.



**Tablica 4:** Vrijednosti konstante  $k$  otpuštanja ( $k/\text{min}$ ) i eksponenta  $n$  za  $\text{Zn}^{2+}$  i  $\text{Ag}^+$  ione otpuštenih formulacija mikročestica.

Formulacija mikročestica	$k_{\text{Zn}}$	$n_{\text{Zn}}$	$k_{\text{Ag}}$	$n_{\text{Ag}}$
ALG/Zn	0,51	0,02	-	-
CS/(ALG/Zn)	0,26	0,03	-	-
ALG/(Zn+Ag)	0,50	0,07	0,07	0,06
CS/(ALG/(Zn+Ag))	0,31	0,06	0,02	0,07

Razni mehanizmi ili njihova kombinacija mogu biti uključeni u otpuštanje aktivnih tvari iz mikročestica, prodiranje okolne otopine u mikročesticu, bubrenje mikročestica, difuzija inkapsulirane aktivne tvari kroz sloj gela, otapanje aktivne tvari u mediju i erozija nabubrene matrice. Najvažniji mehanizmi koji kontroliraju otpuštanje iz hidrofilnih mikročestica su bubrenje i otapanje/erozija na površini mikročestice (Siepmann i Siepmann, 2012).

Kada se mikročestice dispergiraju deioniziranoj vodi, hidrofilni polimer bubri, što utječe na otpuštanje inkapsulirane aktivne tvari. Kako bi se identificirao mehanizam koji kontrolira otpuštanje kationa, primijenjen je poluempirijski model Korsmeyer–Peppas (Korsmeyer i sur., 1983). Prema Korsmeyer–Peppas modelu, eksponent otpuštanja  $n$  karakterizira mehanizam koji kontrolira otpuštanje. Vrijednosti  $n < 0,43$  ukazuju na otpuštanje koje je kontrolirano klasičnom Fickovom difuzijom,  $n > 0,85$  otpuštanje kontrolira transport tipa II, koji uključuje bubrenje polimera i relaksaciju polimernog matriksa, dok vrijednosti  $n$  između 0,43 i 0,85 pokazuju anomalnu kinetiku prijenosa tj. kombinaciju dva kontrolna mehanizma, difuzije i Tipa II transporta. Niže vrijednosti  $n$  od 0,43 za oba kationa i za sve mikročestice ukazuju da je mehanizam koji kontrolira otpuštanje klasična Fickova difuzija.

Dobivene vrijednosti  $k$  ukazale su na značajne razlike u brzini otpuštanja Zn i Ag između mikrosfera i mikrokapsula. Te se razlike mogu pripisati razlikama u strukturi mikrosfera i oblaganju mikrosfera polielektrolitnim slojem. Inkapsulacija srebrovih iona smanjila je gustoću umreženosti cinkovog alginata i posljedično povećala  $S_w$ . Rezultati su u skladu s FTIR analizom, koja je pokazala nešto slabije vodikove veze i elektrostatske interakcije u odnosu na mikrosfere ispunjene samo sa  $\text{Zn}^{2+}$ . Međutim, unatoč manje gustoće mreže gela, difuzija srebrovih iona kroz nabubrenu mikročesticu je sporija od cinkovih iona zbog većeg ionskog

radijusa. Rezultati su pokazali da promjena opsega umrežavanja nije utjecala na kontrolni mehanizam oslobađanja.

Sporije otpuštanje iz mikrokapsula može se pripisati prisutnosti sloja kitozana na površini. Uobičajeni način kontrole otpuštanja inkapsulirane aktivne tvari iz alginatnih mikročestica je oblaganje suprotno nabijenim biopolimerima, poput kitozana, koji predstavlja dodatnu barijeru otpuštanju (Lucinda-Silva i sur., 2010). Osim mehaničke barijere, ovisno o pH medija, kitozan može vezati metalne ione pomoću amino ( $-NH_2$ ) i u manjem opsegu preko hidroksilnih ( $-OH$ ) skupina. U kiselom mediju kitozan se ponaša kao kation zbog protoniranih amino skupina ( $-NH_3^+$ ), a pri neutralnim pH vrijednostima kitozan se ponaša kao anion te veže metalne katione (Guibal, E. 2004). Frakcija otpuštenih cinkovih iona iz mikrokapsula je znatno manja u usporedbi s mikrosferama. Značajno manja frakcija otpuštenih srebrovih iona posljedica je većeg afiniteta vezanja srebrovih iona na kitozan od cinkovih (Nie i sur. 2016). Razina toksičnosti i utjecaj cinkovih i srebrovih iona na biljke ovise o biljnoj vrsti, tipu tla, hidrauličkoj vodljivosti i dostupnosti esencijalnih hranjivih tvari u tlu. U preglednim radovima navedene su razine toksičnosti cinkovih iona (Kaur, H., i Garg, N. (2021) i srebrovih iona (Yan i Chen, 2019) za različite biljne vrste. Usporedba dobivenih rezultata s literaturnim podacima pokazala je da je koncentracija otpuštenih  $Zn^{2+}$  i  $Ag^+$  iz pripremljenih formulacija mikročestica u deioniziranu vodu ispod razine toksičnosti za biljke

Kontrolirano otpuštanje, odnosno uspješna isporuka aktivnih tvari na pravo mjesto i u pravo vrijeme, dostižna je i poželjna karakteristika svih sustava za dostavu aktivnih tvari. U ovom radu opisana je priprava i istražene su fizičko-kemijske karakteristike novih formulacija mikročestica simultano ispunjenih metalnim ionima antimikrobnih svojstava. Rezultati su pokazali da pripravljene formulacije mikročestica predstavljaju potencijalni pripravak za zaštitu i prihranu bilja u procesu ekološke proizvodnje.

## 5. Zaključak

1. Utvrđeno je da su glavne molekulske interakcije između konstituenata mikročestica su vodikove veze i elektrostatske interakcije.
2. Sloj kitozana na površini mikrokapsula uzrokuje veći stupanj bubrenja u odnosu na mikrosfere.
3. Kontrolni mehanizam otpuštanja  $Zn^{2+}$  i  $Ag^+$  iona iz mikročestica je difuzija kroz matriks mikročestice.
4. Kinetika otpuštanja ovisi o tipu mikročestica. Mikrokapsule sporije otpuštaju  $Zn^{2+}$  i  $Ag^+$  katione od mikrosfera što je važno za mogućnost kontrole brzine otpuštanja.
5. Rezultati fizičko-kemijske karakterizacije su pokazali da nove formulacije mikročestica imaju potencijal za zaštitu i prihranu bilja.

## 6. Popis literature

1. Anand, R., & Bhagat, M. (2019). Silver nanoparticles (AgNPs): as nanopesticides and nanofertilizers. *MOJ Biology and Medicine*, 4(1), 19-20.
2. Agulhon, P., Markova, V., Robitzer, M., Quignard, F., & Mineva, T. (2012). *Structure of Alginate Gels: Interaction of Diuronate Units with Divalent Cations from Density Functional Calculations. Biomacromolecules*, 13(6), 1899–1907. doi:10.1021/bm300420z).
3. Blandino, A., Macias, M., & Cantero, D. (1999). Formation of calcium alginate gel capsules: Influence of sodium alginate and CaCl<sub>2</sub> concentration on gelation kinetics.
4. Cabot, C., Martos, S., Llugany, M., Gallego, B., Tolrà, R., & Poschenrieder, C. (2019). A Role for Zinc in Plant Defense Against Pathogens and Herbivores. *Frontiers in Plant Science*
5. Campañone, L., Bruno, E., & Martino, M. (2014). Effect of microwave treatment on metal-alginate beads. *Journal of Food Engineering*, 135, 26–30.
6. Ching, S. H., Bansal, N., & Bhandari, B. (2015). Alginate gel particles—A review of production techniques and physical properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(6), 1133–1152.
7. Fernandes Queiroz, M., Melo, K., Sabry, D., Sasaki, G., & Rocha, H. (2014). Does the Use of Chitosan Contribute to Oxalate Kidney Stone Formation? *Marine Drugs*, 13(1), 141–158. doi:10.3390/md13010141.
8. Gan, Y., Bai, S., Hu, S., Zhao, X., & Li, Y. (2016). *Reaction mechanism of thermally-induced electric conduction of poly(vinyl alcohol)–silver nitrate hybrid films. RSC Advances*, 6(61), 56728–56737. doi:10.1039/c6ra08994

9. Gallo M., Corbo M. R. 2010. Microencapsulation as a new approach to protect active compounds in food. U: Application of alternative food – preservation technologies to enhance food safety and stability. Bentham Science Publisher. 188-195
10. Guibal, E. (2004). *Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review. Separation and Purification Technology, 38(1), 43–74.* doi:10.1016/j.seppur.2003.10.004).
11. Gupta, N., Upadhyaya, C.P., Singh, A., Abd-Elsalam, K.A., & Prasad, R. (2018). Applications of Silver Nanoparticles in Plant Protection. In K. Abd-Elsalam & R. Prasad (Eds.), *Nanobiotechnology Applications in Plant Protection. Nanotechnology in the Life Sciences.* Springer, Cham.
12. Grant, G.T., Morris, E.R., Rees, D.A., Smith, P.J.C., & Thom, D. (1973). Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Letters, 32, 195–198.*
13. 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.*
14. Jin, L., & Bai, R. (2002). *Mechanisms of Lead Adsorption on Chitosan/PVA Hydrogel Beads. Langmuir, 18(25), 9765–9770.* doi:10.1021/la025917l).
15. Jurić S., Tanuwidjaja I., Fuka M.M., Kahlina-Vlahoviček K., Marijan M., Boras A., Kolić Udiković N., Vinceković M. (2021). Encapsulation of two fermentation agents, *Lactobacillus sakei* and calcium ions in microspheres. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 197(), 111387.* doi:10.1016/j.colsurfb.2020.111387
16. Jurić, S., Šegota, S., & Vinceković, M. (2019a). Influence of surface morphology and structure of alginate microparticles on the bioactive agents release behavior. *Carbohydrate Polymers, 218, 234-242.* <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.096>

17. Kaur, H., i Garg, N. (2021). *Zinc toxicity in plants: a review. Planta*, 253(6). doi:10.1007/s00425-021-03642-z)
18. Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13(1), 3–13.
19. Kuzmanović, M., Božanić, D. K., Milivojević, D., Mitić Čulafić, D., Stanković, S., Ballesteros, C., & Gonzalez-Benito, J. (2017). Sodium-alginate biopolymer as a template for the synthesis of nontoxic red emitting Mn<sup>2+</sup>-doped CdS nanoparticles. *RSC Advances*, 7, 53422-53432.
20. Kudasova, D., Mutaliyeva, B., Vlahoviček-Kahlina, K., Jurić, S., Marijan, M., Khalus, S.V., Prosyaniuk, A.V., Šegota, S., Španić, N., & Vinceković, M. (2021). Encapsulation of Synthesized Plant Growth Regulator Based on Copper(II) Complex in Chitosan/Alginate Microcapsules. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 2663.
21. Korsmeyer, R. W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P., & Peppas, N. A. (1983). Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 15, 25–35.
22. Kaur, H., & Garg, N. (2021). Zinc toxicity in plants: A review. *Planta*, 253(6). doi:10.1007/s00425-021-03642-z.
23. Kumari, D., & John, S. (2018). Safety and occupational health hazards of agricultural workers handling pesticides: A case study. In *Advances in Health and Environment Safety* (pp. 75–82). Springer, Singapore.
24. Lawrie, G.; Keen, I.; Drew, B.; Chandler-Temple, A.; Rintoul, L.; Fredericks, P.; Grøndahl, L. Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. *Biomacromolecules* **2007**, 8, 2533–2541.
25. Lee, O. S.; Ha, B.J.; Parka, S.N.; Lee, Y.S. Studies on the pH-dependent swelling properties and morphologies of chitosan/calcium/Alginate complexed beads.

*Macromol. Chem. Phys.* **1997**, *198*, 2971–2976.

26. Li, L., Wang, L., Li, J., Jiang, S., Wang, Y., Zhang, X., Ding, J., Yu, T., & Mao, S. (2014). Insights into the mechanisms of chitosan–anionic polymers-based matrix tablets for extended drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, *476*, 253–265.
27. Li, L. H., Deng, J. C., Deng, H. R., Liu, Z. L., & Xin, L. (2010). Synthesis and characterization of chitosan/ZnO nanoparticles composite membranes. *Carbohydrate Research*, *345*, 994–998.; Anandhavelu, S., & Thambidurai, S. (2011). *Preparation of chitosan–zinc oxide complex during chitin deacetylation. Carbohydrate Polymers*, *83(4)*, 1565–1569. doi:10.1016/j.carbpol.2010.10.006 ). (Dong, Z. F.; Du, Y. M.; Fan, L. H.; Wen, Y.; Liu, H.; Wang, X. H. *J. Funct. Polym.* 2004, *17*, 61–66. doi:10.1016/j.carres.2009.09.001.
28. Li, X.Y., Jin, L.J., McAllister, T.A., Stanford, K., Xu, J.Y., Lu, Y.N., Zhen, Y.H., Sun, Y.X., & Xu, Y.P. (2007). Chitosan-alginate microcapsules for oral delivery of egg yolk immunoglobulin (IgY). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 2911–2917.
29. Li, P., Dai, Y. N., Zhang, J. P., Wang, A. Q., & Wei, Q. (2008). Chitosan-alginate nanoparticles as a novel drug delivery system for nifedipine. *International Journal of Biomedical Science*, *4(3)*, 221–228.
30. Lin, S., Huang, R., Cheng, Y., Liu, J., Lau, B. L. T., & Wiesner, M. R. (2013). *Water Res.* *47(12)*, 3959.
31. Lucinda-Silva, R.M., Salgado, H.R.N., & Evangelista, R.C. (2010). Alginate–chitosan systems: In vitro controlled release of triamcinolone and in vivo gastrointestinal transit. *Carbohydrate Polymers*, *81*, 260–268.
32. Lengert, E., Yashchenok, A. M., Atkin, V., Lapanje, A., Gorin, D. A., Sukhorukov, G. B., & Parakhonskiy, B. V. (2016). Hollow silver alginate microspheres for drug delivery and surface enhanced Raman scattering detection. *RSC Advances*, *6(24)*,

20447–20452. doi:10.1039/c6ra02019d.

33. Makarova, A.O.; Derkach, S.R.; Khair, T.; Kazantseva, M.A.; Zuev, Y.F.; Zueva, O.S. Ion-Induced Polysaccharide Gelation: Peculiarities of Alginate Egg-Box Association with Different Divalent Cations. *Polymers* 2023, 15, 1243. <https://doi.org/10.3390/polym15051243>
34. Mokale, V., Jitendra, N., Yogesh, S., & Gokul, K. (2014). Chitosan reinforced alginate controlled release beads of losartan potassium: design, formulation and in vitro evaluation. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 44, 243–252.
35. Mahesha, H.S., Vinay, J.U., Ravikumar, M.R., Visweswarashastry, S., Keerthi, M.C., Halli, H.M., Shokralla, S., El-Abedin, T.K.Z., Mahmoud, E.A., Elansary, H.O. (2021). Colloidal Silver Hydrogen Peroxide: New Generation Molecule for Management of Phytopathogens
36. Montalvo, D., Degryse, F., da Silva, R. C., Baird, R., & McLaughlin, M. J. (2016). Agronomic Effectiveness of Zinc Sources as Micronutrient Fertilizer. In *Advances in Agronomy* (pp. 215–267). doi:10.1016/bs.agron.2016.05.004.
37. Nie, J., Wang, Z., & Hu, Q. (2016). *Chitosan Hydrogel Structure Modulated by Metal Ions. Scientific Reports*, 6(1). doi:10.1038/srep36005); Janarthanan, G., & Noh, I. (2020). *Recent trends in metal ion based hydrogel biomaterials for tissue engineering and other biomedical applications. Journal of Materials Science & Technology*. doi:10.1016/j.jmst.2020.02.052.
38. Özkara, A., Akyıl, D., & Konuk, M. (2016). Pesticides, environmental pollution, and health. Environmental health risk-hazardous factors to living Species. IntechOpen.
39. Oh, J. K., Lee, D. I., & Park, J. M. (2009). *Biopolymer-based microgels/nanogels for drug delivery applications. Progress in Polymer Science*, 34(12), 1261–1282. doi:10.1016/j.progpolymsci.2009.08.001



40. Prasad, R. (2014). Synthesis of silver nanoparticles in photosynthetic plants. *Journal of Nanoparticles*, 963961. <https://doi.org/10.1155/2014/963961>
41. Peretiatko, Claudia, Hupalo, Ediane, Campos, José, & Budziak-Parabocz, Cristiane. (2018). Efficiency of Zinc and Calcium Ion Crosslinking in Alginate-coated Nitrogen Fertilizer. *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry*, 10(3). <https://doi.org/10.17807/orbital.v10i3.1103>.
42. Rogachev, A. A., Yarmolenko, M. A., Rogachou, A. V., Tapalski, D. V., Liu, X., & Gorbachev, D. L. (2013). Morphology and structure of antibacterial nanocomposite organic–polymer and metal–polymer coatings deposited from active gas phase. *RSC Advances*, 3(28), 11226. doi:10.1039/c3ra23284k.
43. Roger, S., Talbot, D., & Bee, A. (2006). Preparation and effect of Ca<sup>2+</sup> on water solubility, particle release and swelling properties of magnetic alginate films. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 305, 221–227.
44. Roy, A., Bajapi, J., & Bajapi, A. K. (2009). Development of calcium alginate-gelatin based microspheres for controlled release of endosulfan as a model pesticide. *Indian Journal of Chemical Technology*, 16, 388-395.
45. Roy, A., Bajapi, J., & Bajapi, A. K. (2009). Development of calcium alginate-gelatin based microspheres for controlled release of endosulfan as a model pesticide. *Indian Journal of Chemical Technology*, 16, 388-395.
46. Sabater I Serra, R., et al. (2020). Bio-Nanocomposite Hydrogel Based on Zinc Alginate/Graphene Oxide: Morphology, Structural Conformation, Thermal Behavior/Degradation, and Dielectric Properties. *Polymers*, 12(3), 702. doi:10.3390/polym12030702.
47. Simó, G., Fernández-Fernández, E., Vila-Crespo, J., Ruipérez, V., & Rodríguez-Nogales, J. M. (2017). Research progress in coating techniques of alginate gel polymer for cell encapsulation. *Carbohydrate Polymers*, 170, 1–14. doi:10.1016/j.carbpol.2017.04.013.

48. Sriamornsak P. Investigation of pectin as a carrier for oral delivery of proteins using calcium pectinate gel beads. *Int J Pharm.* 1998; 169: 213–220. [doi:10.1016/S0378-5173(98)00129-X], Gal A, Nussinovitch A. Hydrocolloid carriers with filler inclusion for diltiazem hydrochloride release. *J Pharm Sci.* 2007; 96: 168–178. [doi:10.1002/jps.20775].
49. Saha, J., & Podder, J. (2012). Crystallization Of Zinc Sulphate Single Crystals And Its Structural, Thermal And Optical Characterization. *Journal of Bangladesh Academy of Sciences*, 35(2). doi:10.3329/jbas.v35i2.9426.
50. Sankalia, M. G., Mashru, R. C., Sankalia, J. M., & Sutariya, V. B. (2007). Reversed chitosan-alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: Optimization and physicochemical characterization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 65, 215-232.
51. Sartori, C., Finch, D. S., & Ralph, B. (1997). Determination of the cation content of alginate thin films by FT IR Spectroscopy. *Polymer*, 38, 43–51.
52. Siepmann J, Siepmann F. (2012.) Modeling of diffusion controlled drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 161, 351–362.
53. Silva, R.M., Silva, G.A., Coutinho, O.P., Mano, J.F., & Reis, R.L. (2004). Preparation and characterisation in simulated body conditions of glutaraldehyde crosslinked chitosan membranes. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 15, 1105–1112.
54. Straccia, M. C., d’Ayala, G. G., Romano, I., and Laurienzo, P., Novel zinc alginate hydrogels prepared by internal setting method with intrinsic antibacterial activity, *Carbohydrate Polymers* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.010>.
55. Taha, O. M., Nasser, W., Ardakani, A., & Alkhatib, H. S. (2008). Sodium lauryl sulfate impedes drug release from zinc-crosslinked alginate beads: Switching from

- enteric coating release into biphasic profiles. *International Journal of Pharmaceutics*, 350, 291–300. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.09.010>.
56. Teixeira da Silva P., Martins Fries L.L., Ragagnin de Menezes C., Tasch Holkem A., Schwan C.I., Wigmann E.F., De Olivera Bastos J., De Bona da Silva C. (2014). Microencapsulation: concept, mechanism, methods and some applications in food technology. *Ciencia Rural*. [doi.org/10.1590/0103-8478cr20130971](https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20130971)
57. Vinceković, M., Jalšenjak, N., Topolovec-Pintarić, S., Đermić, E., Bujan, M., & Jurić, S. (2016). Encapsulation of Biological and Chemical Agents for Plant Nutrition and Protection: Chitosan/Alginate Microcapsules Loaded with Copper Cations and *Trichoderma viride*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(43), 8073–8083. [doi:10.1021/acs.jafc.6b02879](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02879).
58. Vinceković, M., Topolovec Pintarić, S., Jurić, S., Viskiće, M., Jalšenjak, N., Bujan, M., Đermić, E., Žutić, I., & Fabek, S. (2017). Release of *Trichoderma viride* Spores from Microcapsules Simultaneously Loaded with Chemical and Biological Agents. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 82(4), 395-401.
59. Vinceković M, Jurić S, Đermić E, Topolovec-Pintarić S. 2015. Kinetics and mechanisms of chemical and biological agents release from biopolymeric microcapsules. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **65**, 9608–9617.
60. Zhang, Y, Yang, X, Zhao, J, Gao. Investigation on ionic cross-linking of alginate by monovalent cations to fabricate alginate gel for biomedical application. *Reactive and Functional Polymers*. 183 (2023) 105484. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2022.105484>
61. Zhang, L.; Guo, J.; Peng, X.; Jin, Y. Preparation and release behavior of carboxymethylated chitosan/alginate microspheres encapsulating bovine serum

albumin. *J. App. Polymer Sci.* **2004**, 92 878–882.

62. Yan, A. Chen, Z. Impacts of Silver Nanoparticles on Plants: A Focus on the Phytotoxicity and Underlying Mechanism. *Int. J. Mol. Sci.* (2019), 20, 1003; doi:10.3390/ijms20051003.
63. Wei D, Sun W, Qian W, Ye Y, Ma X. The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity. *Carbohydr Res.* (2009) Nov 23;344(17):2375-82. doi: 10.1016/j.carres.2009.09.001.
64. Xue, W. M., Yu, W. T., Liu, X. D., He, X., Wang, W. X., & Ma, J. (2004). Chemical method of breaking the cell-loaded sodium alginate/chitosan microcapsules. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 25, 1342–1346.

## 7. Prilog

### 7.1 Popis kratica

ALG/Zn	mikrosfera cinkovog alginata
ALG/(Zn+Ag))	mikrosfera cinkovog alginata i srebra
CS/(ALG/Zn)	mikrokapsula cinkovog alginata sa kitozanom
CS/(ALG/(Zn+Ag))	mikrokapsula cinkovog alginata i srebra sa kitozanom
FTIR	Fourierova transformacija infracrvene spektroskopije
OM	svjetlosna mikroskopija
EDS	energijski disperzivna rendgenska spektroskopija
$\mu\text{m}$	mikrometar
EE	učinkovitost mikroinkapsulacije
LC	kapacitet inkapsulacije
$S_w$	stupanj bubrenja

## **Životopis**

Ana Krčelić, rođena je 30.06.1996. godine u Zagrebu. Završila je Osnovnu školu Sveta Nedjelja a potom je školske godine 2011./2012. upisala usmjerenje kemijski tehničar u Prirodoslovnoj školi Vladimira Preloga u Zagrebu. Srednjoškolsko obrazovanje završila je školske godine 2014./2015. a potom je akademske godine 2016/2017. upisala Veleučilište u Karlovcu. Završila je preddiplomski studij Prehrambene tehnologije, a potom je akademske godine 2020./2021. upisala diplomski studij na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Trenutno je studentica druge godine diplomskog studija Agroekologije, usmjerenja Mikrobne biotehnologije u poljoprivredi. Tijekom preddiplomskog studija, stručnu praksu obavila je u poduzeću Ireks Aroma d.o.o, a stručnu praksu za vrijeme trajanja diplomskog studija u poduzeću Genera d. d.