

FAKULTETA ZA TEHNOLOGIJO POLIMEROV

Natalija DIMEC

**SINTEZA IN KARAKTERIZACIJA ALGINATNIH
HIDROGELOV: OPTIMIZACIJA
ZAMREŽEVANJA IN ŠTUDIJE NABREKANJA**

Diplomsko delo

Slovenj Gradec, junij 2025

FAKULTETA ZA TEHNOLOGIJO POLIMEROV

**SINTEZA IN KARAKTERIZACIJA ALGINATNIH
HIDROGELOV: OPTIMIZACIJA
ZAMREŽEVANJA IN ŠTUDIJE NABREKANJA**

Diplomsko delo

Študentka:	Natalija DIMEC
Študijski program:	Tehnologija polimerov
Mentorica:	izr. prof. dr. Irena PULKO
Somentorica:	doc. dr. Kaja KUPNIK

Slovenj Gradec, junij 2025

IZJAVA

Podpisana Natalija Dimec izjavljam, da:

- je bilo predloženo diplomsko delo opravljeno samostojno pod mentorstvom;
- predloženo diplomsko delo v celoti ali v delih ni bilo predloženo za pridobitev kakršnekoli izobrazbe na drugi fakulteti ali univerzi;
- soglašam z javno dostopnostjo diplomskega dela v knjižnici Fakultete za tehnologijo polimerov v Slovenj Gradcu. Na Fakulteto za tehnologijo polimerov neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve diplomskega dela v elektronski obliki, pravico reproduciranja ter pravico ponuditi diplomsko delo javnosti na svetovnem spletu preko repozitorija DiRROS.

Slovenj Gradec, _____

Podpis: _____

ZAHVALA

Na tem mestu bi se rada najprej iskreno zahvalila svoji somentorici, doc. dr. Kaji Kupnik za izjemno strokovno pomoč, razpoložljivost in potrpežljivost pri izdelavi diplomskega dela. Njena podpora in jasna usmeritev sta mi pomenili ogromno in brez nje delo ne bi bilo takšno, kot je.

Zahvaljujem se tudi mentorici, izr. prof. dr. Ireni Pulko za strokovno vodenje in nasvete skozi celoten proces pisanja.

Hvala tudi moji družini, ki me je vedno podpirala in verjela vame.

Zahvaljujem se še Luciji Kotnik, Tadeju Slatineku, Patriciji Skrivarnik in Marku Verčkovniku za pomoč in podporo pri eksperimentalnem delu.

Vsem, ki ste me na kakršen koli način spremljali in spodbujali na tej poti – iz srca hvala.

POVZETEK

Sinteza in karakterizacija alginatnih hidrogelov: optimizacija zamreževanja in študije nabrekanja

Hidrogeli so tridimenzionalna mreža hidrofilnih polimerov, ki lahko nabreknejo v vodi in zadržijo velike količine vode, hkrati pa ohranijo svojo strukturo zaradi kemijskega ali fizikalnega zamreženja polimernih verig. V diplomskem delu smo sintetizirali alginatne hidrogelne kroglice z metodo ionotropne gelacije, pri čemer smo uporabili 3 % raztopino natrijevega alginata in različne koncentracije raztopin kalcijevega klorida (0,25 % in 0,5 %) ter variirali čas zamreževanja. Ključni cilj raziskave je bil optimizirati postopke gelacije in preučiti vpliv teh parametrov na lastnosti hidrogelnih kroglic, kot so sposobnost nabrekanja, zadrževanja vode, učinkovitost rehidracije in stabilnost skozi več ciklov sušenja in ponovne hidracije. Rezultati so pokazali, da višja koncentracija kalcijevega klorida in krajši čas zamreževanja prispevata k večji učinkovitosti sušenja, boljši sposobnosti nabrekanja in večji stabilnosti kroglic v več ciklih. Sušenje kroglic s pomočjo liofilizacije je učinkovitejše v primerjavi s sušenjem na zraku, saj nastane porozna struktura, zaradi česar imajo kroglice večjo sposobnost absorpcije in rehidracije, vendar po večkratnem nabrekanju nastanejo mikrostrukturne spremembe, ki zmanjšajo sposobnost zadrževanja vode v kasnejših ciklih. Vzorec zamrežen z 0,5 % raztopino kalcijevega klorida in 15 minutnim zamreževanjem je izkazal najvišje vrednosti nabrekanja in rehidracije ter stabilnost skozi več ciklov.

Ključne besede:

Hidrogel, ionotropna gelacija, nabrekanje, natrijev alginat, kalcijev klorid.

SUMMARY

Synthesis and characterization of alginate hydrogels: optimization of crosslinking and swelling studies

Hydrogels are three-dimensional networks of hydrophilic polymers that can swell in water and retain large amounts of it while maintaining their structure due to chemical or physical crosslinking of polymer chains. In this thesis, we synthesized alginate hydrogel beads using the ionotropic gelation method, utilizing a 3 % sodium alginate solution and varying concentrations of calcium chloride solutions (0,25 % and 0,5 %) and crosslinking times. The main goal of the research was to optimize the gelation process and investigate the impact of these parameters on the properties of the hydrogel beads, such as swelling ability, water retention, rehydration efficiency, and stability over multiple drying and rehydration cycles. The results showed that higher calcium chloride concentrations and shorter crosslinking times contribute to more efficient drying, better swelling ability, and greater stability of the beads over multiple cycles. Freeze-drying was more effective than air drying, as it creates a porous structure, resulting in greater absorption and rehydration capacity. However, after repeated swelling cycles, microstructural changes occur, reducing the water retention capacity in subsequent cycles. The sample crosslinked with 0,5 % calcium chloride solution and 15 minutes of crosslinking time resulted the highest swelling and rehydration values, as well as stability across multiple cycles.

Keywords:

Hydrogel, ionotropic gelation, swelling, sodium alginate, calcium chloride.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	Opis področja dela	1
1.2	Cilji, hipoteze ter omejitve diplomskega dela	1
1.3	Raziskovalne metode	2
2	TEORETIČNI DEL	3
2.1	Hidrogeli	3
2.1.1	Opredelevanje in lastnosti hidrogelov	3
2.1.2	Razvrstitev hidrogelov	4
2.1.3	Področja uporabe hidrogelov	4
2.2	Mehanizmi zamreževanja hidrogelov	5
2.2.1	Fizikalno zamreževanje	5
	Ionotropna gelacija	5
2.2.2	Kemijsko zamreževanje	6
2.3	Polimeri za pripravo hidrogelov	7
2.3.1	Polimeri/biopolimeri za pripravo hidrogelov	7
2.3.2	Natrijev alginat	7
2.4	Termogravimetrična analiza (TGA)	8
2.5	Infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo in oslabljenim popolnim odbojem (FTIR)	9
2.6	Optični mikroskop	10
3	EKSPERIMENTALNI DEL	11
3.1	Materiali	11
3.1.1	Kemikalije	11
3.1.2	Kemijski inventar	11
3.2	Sinteza alginatnih hidrogelnih kroglic	11
3.3	Metode sušenja hidrogelnih kroglic	12
3.3.1	Sušenje na zraku	13
3.3.2	Liofilizacija	13
3.4	Študije nabrekanja in ciklične uporabe	14
3.4.1	Izračun parametrov nabrekanja	14
3.5	Metode karakterizacije	16
3.5.1	Termogravimetrična analiza (TGA)	16
3.5.2	Infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo in oslabljenim popolnim odbojem (FTIR)	16
3.5.3	Optični mikroskop	17
4	REZULTATI IN DISKUSIJA	18
4.1	Optimizacija sinteze alginatnih hidrogelov	18
4.1.1	Vpliv metode sušenja na morfologijo	18
4.2	Vsebnost vode v alginatnih kroglicah	19
4.3	Kinetika sušenja alginatnih kroglic	20

4.4	Kinetika nabrekanja alginatnih kroglic	21
4.5	Učinkovitost rehidracije	23
4.6	Ciklično nabrekanje in dolgoročna stabilnost alginatnih kroglic	24
4.7	Karakterizacija	28
4.7.1	Termogravimetrična analiza (TGA)	28
4.7.2	Infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo in oslavljenim popolnim odbojem (FTIR)	29
4.7.3	Optični mikroskop	30
5	SKLEP	32
	SEZNAM LITERATURE IN VIROV	34
	SEZNAM SLIK	36
	SEZNAM TABEL	38
	SEZNAM UPORABLJENIH SIMBOLOV	39
	SEZNAM UPORABLJENIH KRATIC	40
	PRILOGE	41
	Priloga 1: TGA krivulje analiziranih liofiliziranih kroglic z 0,25 % in 0,5 % raztopino CaCl ₂ in z različnim časom zamreženja	41
	Priloga 2: FTIR meritve posameznih vzorcev	43

1 UVOD

1.1 Opis področja dela

Hidrogeli so tridimenzionalna mreža hidrofilnih polimerov, ki lahko v vodi nabreknejo in zadržijo velike količine vode, hkrati pa ohranijo svojo strukturno celovitost. Zaradi kemijskega ali fizikalnega zamreženja polimernih verig hidrogel v vodi ne razpade, ampak nabrekne. Po definiciji mora voda predstavljati vsaj 10 % skupne teže (ali prostornine), da je material opredeljen kot hidrogel. Hidrogeli so priljubljeni zaradi svoje biokompatibilnosti, elastičnosti in sposobnosti nadzorovanega sproščanja snovi. V sklopu diplomskega dela smo pripravili hidrogel, sintetizirane s 3 % raztopino natrijevega alginata zamrežene z 0,25 % ter 0,5 % raztopino kalcijevega klorida. Hidrogele smo pripravili v obliki kroglic z metodo ionotropne gelacije, pri kateri pride do zamreženja polimerov s pomočjo ionskih interakcij, pri sintezi smo variirali tudi čas zamreževanja. Raziskali smo lastnosti alginatnih hidrogelov, njihovo stabilnost, ter sposobnost absorpcije (nabrekanja) in zadrževanja vode. Sintetizirane alginatne kroglice smo karakterizirali s TGA in FTIR metodo in preučili pod optičnim mikroskopom.

1.2 Cilji, hipoteze ter omejitve diplomskega dela

Glavni cilj diplomskega dela je sinteza stabilnih alginatnih hidrogelov v obliki kroglic in optimizacija koncentracije raztopine kalcijevega klorida, ki omogoča zamreženje hidrogela ter časa zamreževanja. Raziskava obsega tudi preučevanje kinetike absorpcije in zadrževanja vode za namene večkratne uporabe sintetiziranih alginatnih kroglic za različne aplikacije ter njihovo karakterizacijo.

V sklopu diplomske naloge predpostavljamo sledeče hipoteze:

- hipoteza 1: koncentracija zamreževala, kalcijevega klorida, bo vplivala na stopnjo zamreženja sintetiziranih kroglic ter na njihovo sposobnost absorpcije (nabrekanja) in zadrževanja vode;
- hipoteza 2: čas zamreževanja bo vplival na stopnjo zamreženja sintetiziranih kroglic ter na njihovo sposobnost absorpcije (nabrekanja) in zadrževanja vode;
- hipoteza 3: kombinacija visoke koncentracije zamreževala in daljšega časa zamreženja bosta zmanjšali sposobnost nabrekanja hidrogelnih kroglic.

Pri izvedbi diplomskega dela smo pričakovali določene omejitve. Glavno omejitev je predstavljala neusklajenost podatkov v obstoječi literaturi. Različne raziskave navajajo različne optimalne koncentracije natrijevega alginata in kalcijevega klorida, njihovi rezultati karakterizacije pa v številnih primerih niso skladni. To nam je otežilo določanje optimalnih parametrov za pripravo hidrogelnih kroglic, saj je bilo težko presoditi, kateri viri predstavljajo najbolj zanesljivo izhodišče za naše raziskovalno delo.

1.3 Raziskovalne metode

Tekom priprave diplomskega dela smo:

- zbirali, pregledali in analizirali literaturo s področja hidrogelov iz natrijevega alginata ter njihovih absorpcijskih lastnosti;
- pripravili hidrogele s 3 % raztopino natrijevega alginata, ki smo jih zamrežili z različnimi koncentracijami raztopin kalcijevega klorida ter pri tem variirali čas zamreževanja za optimizacijo postopka gelacije;
- dobljene hidrogele sušili na zraku in v liofilizatorju, s čimer smo določili vsebnost vode v alginatnih kroglicah in spremljali njihovo sposobnost zadrževanja vode skozi čas;
- proučili vpliv različnih metod sušenja na morfologijo in strukturo alginatnih kroglic;
- spremljali kinetiko absorpcije (nabrekanja) in zadrževanja vode različno sušenih alginatnih kroglic;
- kroglice večkrat sušili in nabrekli, s čimer smo ocenili njihovo zmožnost večkratne uporabe;
- izvedli termično in kemijsko karakterizacijo s TGA in FTIR metodama;
- opazovali morfološke značilnosti kroglic pod optičnim mikroskopom.

2 TEORETIČNI DEL

2.1 Hidrogeli

2.1.1 Opredelitev in lastnosti hidrogelov

Hidrogeli so tridimenzionalne mreže hidrofilnih polimerov, ki lahko absorbirajo in zadržijo velike količine vode, ob tem pa ohranijo svojo strukturno integriteto. Stabilnost jim omogoča kemično ali fizikalno zamreženje polimernih verig. Po definiciji material opredelimo za hidrogel, kadar voda predstavlja najmanj 10 % njegove skupne mase ali prostornine [1].

Hidrogeli imajo tudi stopnjo fleksibilnosti, ki je podobna naravnemu tkivu zaradi visoke vsebnosti vode. Hidrofilnost mreže je posledica prisotnosti hidrofilnih skupin, kot so amino (-NH₂), karboksilna (-COOH), hidroksilna (-OH), amidna (-CONH₂), imidna (-CONH) in sulfonska (-SO₃H) skupina [1].

Hidrogeli lahko spreminjajo prostornino ali prehajajo iz gela v raztopino ob fizikalni ali kemični spremembi. Fizikalne spremembe vključujejo temperaturo, električna in magnetna polja, sestavo topila, intenzivnost svetlobe in tlak, medtem ko kemične ali biokemične spremembe vključujejo pH, ione in specifične kemične sestavine. Vendar pa so v večini primerov takšne prehodne spremembe reverzibilne, zato so se hidrogeli sposobni vrniti v prvotno stanje takoj po odstranitvi zunanjih vplivov. Odziv hidrogela na zunanje dražljaje je odvisen od narave monomera, razvejanosti in stopnje zamreženosti [1].

Hidrogeli izkazujejo visoko stopnjo nabrekanja, sposobni so nabrekniti v bioloških okoljih in zadržati velike količine vode. Prepletenost med verigami v strukturi preprečuje raztapljanje in ohranja dimenzije mreže. Nabrekanje je zelo odvisno od koncentracije zamreževal, časa zamreževanja ter zunanjih dejavnikov, kot so temperatura, pH, koncentracija ionov itd., ki lahko vplivajo na zrušitev ali prehod hidrogelov v drugo fazo [2].

Običajno so hidrogeli v popolnoma nabreklem stanju skoraj viskoelastični, mehki in gumijasti. Nabrekanje hidrogelov poteka v treh korakih:

- difuzija vode v hidrogelno mrežo (voda, ki vstopi, se imenuje primarna vezana voda),
- sprostitvev polimernih verig (sekundarna vezana voda),
- sledi širitev hidrogelne mreže (dodatna voda, ki vstopi in se imenuje prosta voda).

Glede na teorijo Flory–Reihner je nabrekanje funkcija elastične narave polimernih verig in njihove združljivosti z molekulami vode [3].

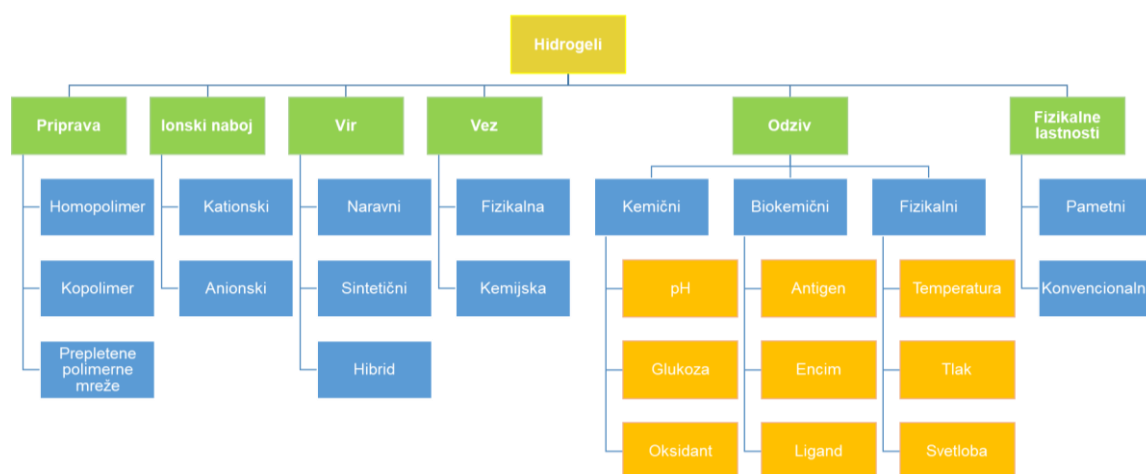
Kemijsko zamreženi hidrogeli imajo boljše mehanske lastnosti in daljšo stabilnost, v primerjavi s fizikalno zamreženimi hidrogeli, vendar lahko uporaba toksičnih kemijskih

reagentov negativno vpliva na biokompatibilnost. Močnejšo zamreženost lahko dosežemo s povečanjem stopnje navzkrižnega zamreženja, vendar je posledica višje stopnje nizka elastičnost in večja krhkost, zato je ključno, da ohranimo ravnotežje med mehansko trdnostjo in elastičnostjo [2, 3].

2.1.2 Razvrstitev hidrogelov

Hidrogeli so večinoma sestavljeni iz biopolimerov in/ali polielektrolitov. Glede na definicije tipov hidrogelov jih lahko delimo na tiste, ki so sestavljeni iz naravnih polimerov in tiste, ki so sestavljeni iz sintetičnih polimerov. Glede na ionske naboje na vezanih skupinah so lahko hidrogeli kationski, anionski ali nevtralni. Vrsta vezi je prav tako lahko merilo za razvrstitev [1].

Hidrogele glede na odziv ločimo na fizikalne, kemične ali biokemične. Fizikalni hidrogeli lahko preidejo iz tekočine v gel kot odziv na spremembo okoljskih pogojev, kot so temperatura, koncentracijo ionov, pH ali drugi pogoji, kot je mešanje dveh komponent. Kemični hidrogeli so zamreženi s kovalentno vezjo, kar omogoči mehansko integriteto in odpornost proti razgradnji v primerjavi z drugimi šibkejšimi materiali. V biokemijskih hidrogelih v procesu geliranja sodelujejo biološki dejavniki, kot so encimi ali aminokisljine [1]. Slika 1 prikazuje pregledno shemo razvrstitve hidrogelov.



Slika 1: Shema razvrstitve hidrogelov [1]

2.1.3 Področja uporabe hidrogelov

Zaradi svojih edinstvenih lastnosti se hidrogeli uporabljajo na številnih področjih, vključno z medicino, kozmetiko, farmacijo, embalažno ter okoljsko industrijo in kmetijstvom oziroma agroindustrijo. V medicini se uporabljajo kot obloge za rane, nosilci za nadzorovano sproščanje zdravil ter služijo kot substrati za rast celic v tkivnem inženiringu. V kozmetiki se uporabljajo v vlažilnih kremah ter maskah za obraz, kjer delujejo predvsem kot nosilci aktivnih sestavin. Uporabljajo se tudi v plenica, vložkih

ter inkontinenčnih pripomočkov. V okoljski industriji se uporabljajo za filtriranje vode in zraka, saj lahko adsorbirajo različna onesnaževala, medtem ko v kmetijstvu ter agroindustriji služijo predvsem za zadrževanje vlage v tleh in povečanje učinkovitosti rabe vode v sušnih predelih. Med drugim hidrogeli predstavljajo sestavni del različnih "pametnih" materialov, ki reagirajo na zunanje dražljaje (kot so spremembe temperature, pH ali ionske koncentracije), kar omogoča uporabo v različnih senzorjih in napravah. Zaradi svoje sposobnosti zadrževanja vlage se uporabljajo tudi za pakiranje, zlasti v primeru hrane in farmacevtskih izdelkov, saj omogočajo dobro absorpcijo vlage iz okolja in služijo kot indikatorji svežine [1, 4].

2.2 Mehanizmi zamreževanja hidrogelov

2.2.1 Fizikalno zamreževanje

Med fizikalnimi metodami tvorbe hidrogelov izstopa ionsko zamreženje, proces, pri katerem se hidrofilni polimeri povežejo s pomočjo multivalentnih ionov, kar vodi do nastanka tridimenzionalne mrežne strukture in stabilnega gela. Ionsko zamreženje se lahko odvija tudi preko vodikovih vezi, npr. med poliakrilno oz. polimetakrilno kislino in polietilen glikolom. Amfifilni blok in graft kopolimeri, kot so PLGA-PEG ali hidrofobizirani polisaharidi, tvorijo hidrogelske strukture z združevanjem hidrofobnih segmentov v vodi. Pri kristaliničnem zamreženju nastajajo hidrogeli bodisi s kontrolirano kristalizacijo, kot pri polivinil alkoholu, ali s tvorbo stereokompleksov med homopolimeroma PLLA in PDLA. Posebno skupino predstavljajo hidrogeli, ki temeljijo na proteinskih interakcijah, kot so gensko kodirani elastinu podobni polimeri ali sistemi zasnovani na antigen–protitelo vezavah, kjer se gostota mrežne strukture spreminja glede na prisotnost antigena [5].

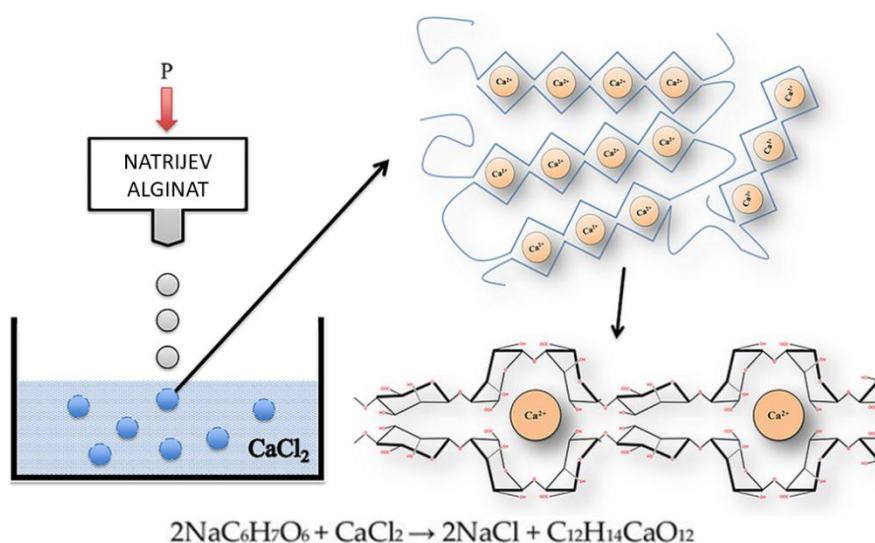
Ionotropna gelacija

Ionotropna gelacija predstavlja proces, pri katerem polielektroliti, kot so polisaharidi, vstopajo v interakcijo z nasprotno nabitimi ioni, običajno kationi, kar povzroči prehod iz solnega v gelirano stanje. Posledično nastanejo strukturirani materiali, kot so filmi, kroglice, hidrogeli ali nanodelci. Obstaja več tehnik za pripravo takšnih hidrogelov, pri čemer številne temeljijo na oblikovanju kroglastih ali ovalnih kroglic, sestavljenih iz učinkovine in polimernega nosilca. Velikost in oblika nastalih kapljic sta odvisni od različnih dejavnikov, kot so viskoznost začetne zmesi, površinska napetost, tokovni režim (laminarni ali turbulentni tok), pa tudi koncentracija in molekulska masa uporabljenega polimera [6].

Ionotropna gelacija temelji na interakciji med nasprotno nabitimi molekulami, pri čemer pozitivno nabiti ioni, kot so npr. kalcijevi ioni (Ca^{2+}), reagirajo z negativno nabitimi skupinami polimerov, kot je npr. natrijev alginat. Najpogosteje uporabljena metoda je zunanje (eksterno) geliranje, kjer se raztopina polisaharida (npr. alginata) kapljično dozira v ionsko raztopino (npr. raztopino kalcijevega klorida, CaCl_2). Kalcijevi ioni iz

zunanje raztopine difundirajo v notranjost kapljic in sprožijo hiter sol–gel prehod, pri čemer na površini hitro nastane gel, znotraj pa postopoma nastaja heterogena mreža, ki je v obliki »egg-box« modela. Alginat je sestavljen iz guluronskih (G-bloki) in manuronskih (M-bloki) enot, G-bloki imajo afiniteto do Ca^{2+} ionov, ti ioni se vežejo med verige alginata, tako da ustvarijo tridimenzionalno mrežo, strukturno podobno modelu jajčne škatle [6]. Na sliki 2 lahko vidimo kako izgleda »egg-box« model.

Ionotropna gelacija alginata poteka zelo hitro in je odvisna od številnih eksperimentalnih dejavnikov (koncentracija polimera, koncentracija zamreževala, čas zamreževanja, temperatura med procesom gelacije, pH raztopine, vrsta zamreževalnega iona itd.), kar otežuje, da bi sintetizirali hidrogel z želenimi lastnostmi brez številnih ponovitev eksperimentov [7].



Slika 2: Shematski prikaz »egg-box« modela [8]

Poznamo še notranje (in situ) geliranje, ki vključuje vnos netopne kalcijeve soli (npr. kalcijevega karbonata, CaCO_3) v polimerno raztopino, ki se nato vnese v kislno kopel in pa obratno (inverzno) geliranje, ki poteka tako, da se zamreževalna raztopina dodaja v polimerno raztopino. Ta metoda se pogosto uporablja pri emulzijah za pripravo mehkih mikrokapsul z oljno vsebino [6].

2.2.2 Kemijsko zamreževanje

Kemijsko zamreževanje hidrogelov lahko poteka na različne načine, pri čemer je najpogostejši kemični pristop, kjer se med funkcionalnimi skupinami hidrofilnih polimerov ($-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$) tvorijo kovalentne vezi. Takšne vezi nastajajo z reakcijami, kot so adicije, kondenzacije ali reakcije z aldehidi (npr. glutaralhidom). Alternativno se lahko hidrogeli tvorijo tudi s pomočjo visokoenergijskega sevanja (gama ali elektronski žarki) ali z radikalsko polimerizacijo vinilnih monomerov. Posebno zanimiv je tudi encimski pristop, pri katerem encim transglutaminaza katalizira

zamreženje PEG-polimerov, kar omogoča sintezo hidrogelov z visoko biokompatibilnostjo [5].

2.3 Polimeri za pripravo hidrogelov

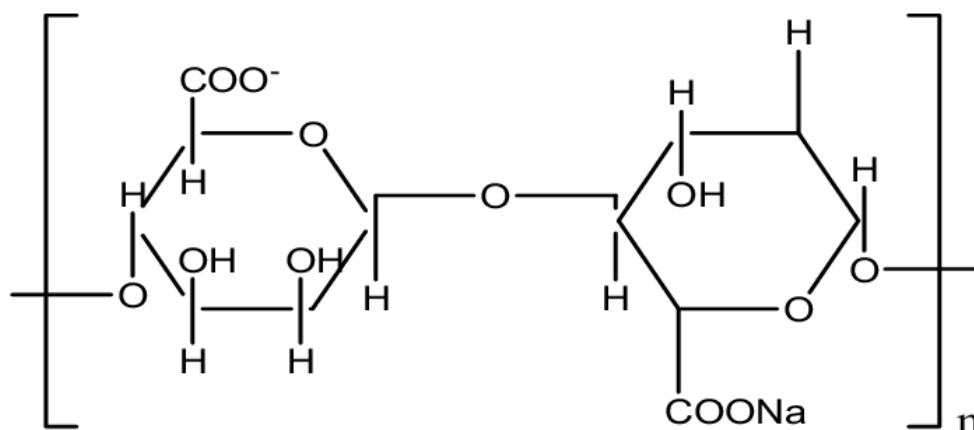
2.3.1 Polimeri/biopolimeri za pripravo hidrogelov

Za pripravo hidrogelov se uporabljajo različni polimeri, med katerimi so najpogostejši: poli(2-hidroksietil metakrilat), 2-hidroksietil metakrilat, metakrilna kislina, polietilen glikol metakrilat, karboksimetil celuloza, polivinilpirilidon, kopolimer akrilamida in akrilne kisline, poli(N-izopropil akrilamid), heparin itd. Ti polimeri se uporabljajo za sintezo hidrogelov, ki so široko uporabni v medicinskih in biotehničnih aplikacijah [1].

Za pripravo hidrogelov se pogosto uporabljajo tudi različni biopolimeri naravnega izvora, kot so celuloza, hitozan, kolagen, alginat, hialuronska kislina, škrob, guar gumi, agaroza in dekstran. Ti polimeri so cenjeni zaradi svoje biokompatibilnosti, biodegradabilnosti ter sposobnosti zadrževanja vode in tvorbe tridimenzionalnih mrež. Pridobivajo se iz rastlinskih ali živalskih virov, nekateri pa tudi z mikrobnno fermentacijo. Njihove kemijske lastnosti omogočajo različne načine zamreženja, kar vpliva na mehanske lastnosti, poroznost in zmogljivost sproščanja učinkovin iz hidrogelov [9].

2.3.2 Natrijev alginat

Natrijev alginat je naravni anionski polimer, sestavljen je iz β -D-manuronske (M-bloki) in α -L-guluronske (G-bloki) kisline, ki sta razporejeni v različnih kombinacijah, kot so bloki, bogati bodisi z M ali G enotami, ali bloki izmeničnih G in M enot. Slika 3 prikazuje kemijsko strukturo natrijevega alginata.



Slika 3: Kemijska struktura natrijevega alginata [10]

Je naravni linearni polisaharid, pridobljen z ekstrakcijo iz rjavih morskih alg (*Fucus*, *Laminaria*, *Macrosystis*). Postopek ekstrakcije vključuje obdelavo morskih alg z raztopino natrijevega karbonata, čemur sledi postopek čiščenja, ki rezultira praškasto

ali granulirano obliko sestavine. V prisotnosti dvovalentnih Ca^{2+} kationov guluronske kisline se na sosednjih verigah tvorijo ionske prečne vezi, kar vodi v nastanek alginatnega hidrogela. Razmerje med enotama M in G določa fizikalno-kemijske lastnosti hidrogelov [11, 12]. Zaradi svoje sposobnosti, da tvori gele v prisotnosti kalcijevih ionov, je pomembna komponenta v tehnikah molekularne gastronomije, kot je sferifikacija oz. postopek želiranja, ki omogoča, da poljubno tekočino obdamo z gelom [13, 14].

Zaradi netoksičnosti, biokompatibilnosti in biorazgradljivosti se alginatni hidrogeli uporabljajo za številne aplikacije [15, 16]:

- v biomedicini za sproščanje zdravil in proteinov, obloge za rane, opornice za rast celic in morfogeneza organoidov, 3D-tiskanje za regeneracijo tkiv,
- v fleksibilni elektroniki,
- v okoljskih tehnologijah,
- v prehrabeni industriji, kot zgoščevalec, želirni agent, emulgator, stabilizator in izboljševalec teksture.

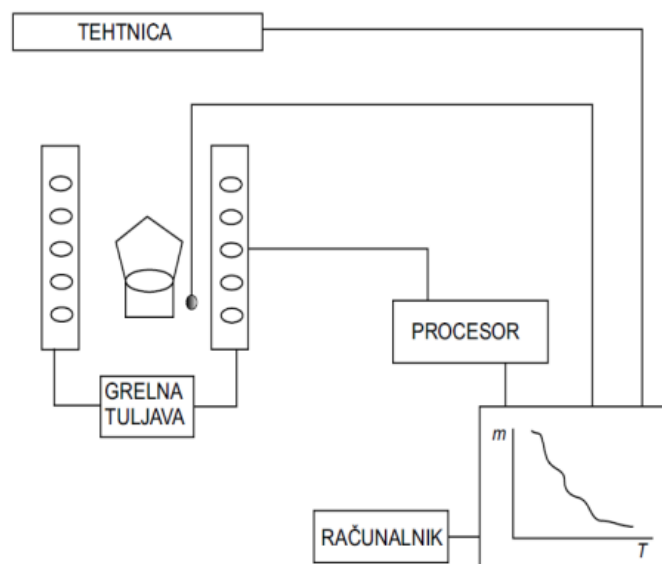
2.4 Termogravimetrična analiza (TGA)

Termogravimetrična analiza (TGA) je analizna tehnika, pri kateri se ob segrevanju materiala njegova teža povečuje ali zmanjšuje. Z uporabo termogravimetrične analize se ugotavlja spremembo mase in hitrost spremembe mase vzorca, kot funkcija temperature (segrevanje ali ohlajanje), časa in atmosfere (dušik, zrak, kisik ipd.). Najpogosteje se uporablja za preučevanje sestave kompleksnih materialov in napovedovanje njihove termične stabilnosti preko kontinuiranega spremljanja mase vzorca tekom kontrolirane spremembe temperature in/ali atmosfere (tako sestave, kot tudi tlaka) [17, 18].

Ti instrumenti lahko kvantificirajo izgubo vode, izgubo topila, izgubo plastifikatorja, dekarboksilacijo, pirolizo, oksidacijo, razgradnjo, odstotek mase polnila, količino kovinskega katalitičnega ostanka na ogljikovih nanocevkah ter odstotek mase pepela. Vse te kvantificirane aplikacije se običajno izvajajo med segrevanjem [18].

Aparat sestavlja pečica z merilno celico, ki jo prepihujemo z izbranim inertnim ali oksidativnim plinom, in izredno natančna tehtnica. Kvantitativno določamo izgubo vlage, topila, mehčala, nezreagiranih monomerov, razgradnjo polimerov, njihovo pirolizo ali oksidacijo ter določamo delež anorganskih polnil [19].

Slika 4 prikazuje shematski prikaz delovanja TGA aparature.



Slika 4: Shematski prikaz delovanja TGA aparature [19]

2.5 Infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo in oslabljenim popolnim odbojem (FTIR)

Fourierjeva transformacijska infrardeča spektroskopija, znana tudi kot FTIR analiza ali FTIR spektroskopija, je analitska tehnika, ki se uporablja za prepoznavanje organskih, polimernih in v nekaterih primerih tudi anorganskih snovi. Pri tej metodi se uporablja infrardeča svetloba za skeniranje testnih vzorcev in opazovanje njihovih kemijskih lastnosti [20].

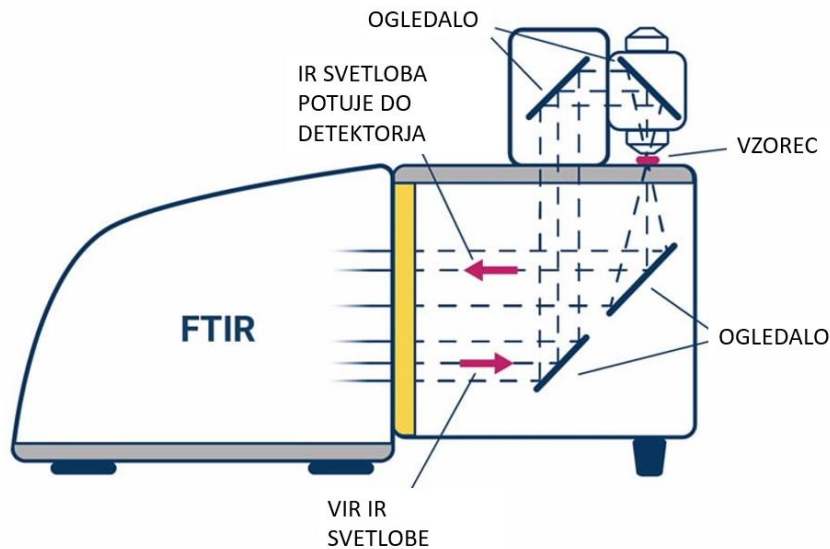
Infrardeče sevanje poteka v območju približno od 10.000 do 100 cm^{-1} skozi vzorec, pri čemer se del sevanja absorbira, del pa prehaja skozi vzorec. Absorbirano sevanje molekule vzorca pretvorijo v rotacijsko in/ali vibracijsko energijo. Signal, ki ga zazna detektor, se prikaže kot spekter, običajno v območju od 4000 cm^{-1} do 400 cm^{-1} , in predstavlja molekularni spektralni odtis vzorca. Vsaka molekula oziroma kemijska struktura ustvari edinstven spektralni odtis, zato je FTIR analiza izjemno uporabno orodje za kemijsko identifikacijo [20].

FTIR spektroskopija je uveljavljena tehnika za nadzor kakovosti pri ocenjevanju industrijsko proizvedenih materialov in pogosto predstavlja prvi korak v postopku analize materiala. Sprememba značilnega vzorca absorpcijskih pasov jasno kaže na spremembo v sestavi materiala ali na prisotnost nečistoč [20].

FTIR analiza se uporablja za [20]:

- identifikacijo in karakterizacijo neznanih materialov,
- prepoznavanje nečistoč na materialu ali v njem,
- za odkrivanje oksidacije, razgradnje ali nepopolnoma zamreženih monomerov pri raziskavah vzrokov za napake.

Slika 5 prikazuje princip delovanja Fourierjeve transformacijske infrardeče spektroskopije.



Slika 5: Shematski prikaz delovanja FTIR spektroskopije [21]

2.6 Optični mikroskop

Optični mikroskopi so mikroskopi, ki običajno uporabljajo vidno svetlobo in sistem leč za povečavo slike majhnih vzorcev. Industrijski mikroskopi vključujejo mnogo kompleksnih modelov, ki si prizadevajo izboljšati ločljivost in kontrast slike vzorca. Slike z optičnim mikroskopom je mogoče zajeti z običajnimi svetlobno občutljivimi kamerami za generiranje mikroskopskih posnetkov [22].

Svetlobna mikroskopija je osnovna metoda za preiskavo površine materialov. Iz preiskane površine materialov in mikrostrukture lahko sklepamo o mehanskih lastnostih materialov itd. Z računalniško obdelavo slike lahko dodatno identificiramo in analiziramo napake, nečistoče ter vrsto mehanske in toplotne obdelave [23].

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 Materiali

3.1.1 Kemikalije

Za sintezo smo uporabili natrijev alginat (Sigma Aldrich), kalcijev klorid (CaCl_2) z molsko maso 110,99 g/mol (Supelco) in destilirano vodo.

3.1.2 Kemijski inventar

V okviru diplomske naloge smo uporabili sledeč kemijski inventar:

- 250 mL steklena čaša,
- 100 mL merilni valj,
- žlička,
- analizna tehtnica (Radwag, min 10 mg, max 220 g),
- grelec z magnetnim mešalom (Joanlab, Hotplate Stirrer),
- magnetno mešalo (Yellowline, Yellow MAG MS 7),
- steklena palčka,
- kapalka,
- steklene petrijevke.

3.2 Sinteza alginatnih hidrogelnih kroglic

Za namen raziskave so bili pripravljene štiri vzorci hidrogelov iz natrijevega alginata in kalcijevega klorida (CaCl_2), ki so se razlikovali glede na koncentracijo raztopine CaCl_2 ter čas zamreževanja. Vsi vzorci so bili pripravljene z 3 % (w/v) raztopino natrijevega alginata. Tabela 1 prikazuje oznake posameznih vzorcev skupaj z ustreznimi pogoji sinteze.

Tabela 1: Pogoji sinteze vzorcev hidrogelov

Oznaka vzorca	Koncentracija natrijevega alginata (%)	Koncentracija CaCl_2 (%)	Čas zamreževanja
A3C0,25 1h	3	0,25	1 h
A3C0,5 15 min	3	0,5	15 min
A3C0,5 30 min	3	0,5	30 min
A3C0,5 1 h	3	0,5	1 h

Za sintezo hidrogelov smo izhajali iz metode povzete v literaturi [15]. Najprej smo sintetizirali kroglice s 3 % raztopino natrijevega alginata in s koncentracijami 1,5 %, 3 % in 5 % raztopin CaCl_2 ter pustili, da so se zamreževale 24 ur. Zaradi previsokih koncentracij CaCl_2 in predolgega časa zamreženja, kroglice po sušenju niso nabrekale. Zato smo zmanjšali koncentracije raztopine CaCl_2 in variirali čas zamreženja.

Pripravili smo 3 % raztopino natrijevega alginata in 0,25 % ter 0,5 % raztopino CaCl_2 . Maso posameznih kemikalij smo izračunali po enačbi 1:

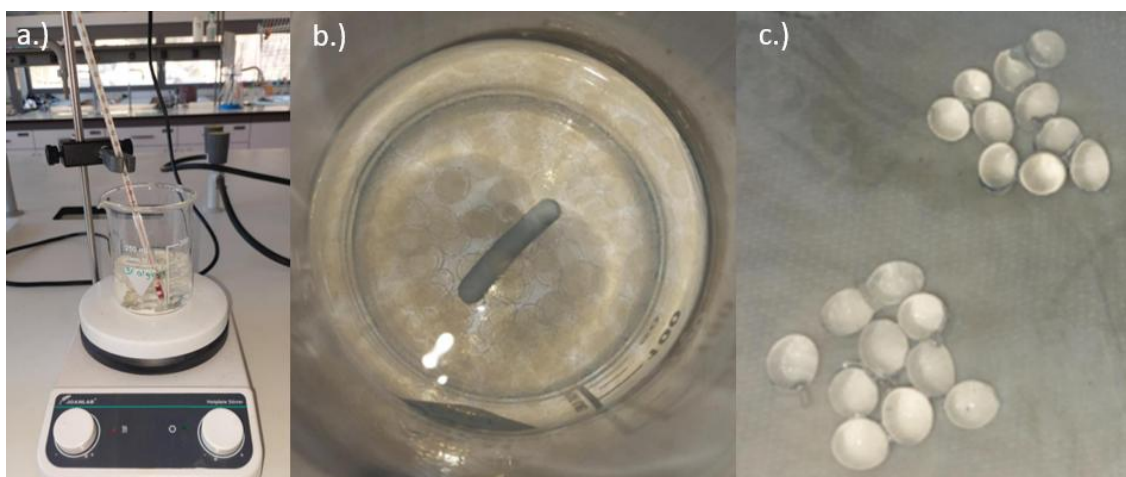
$$m = \frac{c \times V}{100} \quad (1),$$

pri čemer je:

- m - masa (g),
- c - koncentracija raztopine (% w/v),
- V - volumen (mL).

V čašo smo na analitski tehtnici zatehtali 3 g natrijevega alginata in s pomočjo merilnega valja dodali 97 mL destilirane vode. Natrijev alginat smo raztopili pri 70 °C ob stalnem mešanju z magnetnim mešalom (pripravljeno aparaturo prikazuje slika 6). Za pripravo 0,25 % raztopine CaCl_2 , smo zatehtali 0,25 g CaCl_2 in ga raztopili v 99,75 mL destilirane vode. Analogno smo za pripravo 0,5 % raztopine zatehtali 0,5 g CaCl_2 in ga raztopili v 99,5 mL destilirane vode.

Hidrogelne alginatne kroglice smo pripravili z metodo ionotropne gelacije s kapanjem raztopine natrijevega alginata s kapalko z višine približno 3 cm v raztopino CaCl_2 , pri čemer smo slednjo neprekinjeno mešali z magnetnim mešalom. Nastale kroglice (slika 6) smo pustili zamreževati 15 minut, 30 minut in 1 uro. Po zamreževanju smo kroglice sprali z destilirano vodo do nevtralnega pH in jih do nadaljnje uporabe hranili v destilirani vodi v petrijevkah. Sintetizirane alginatne kroglice so prikazane na sliki 6.



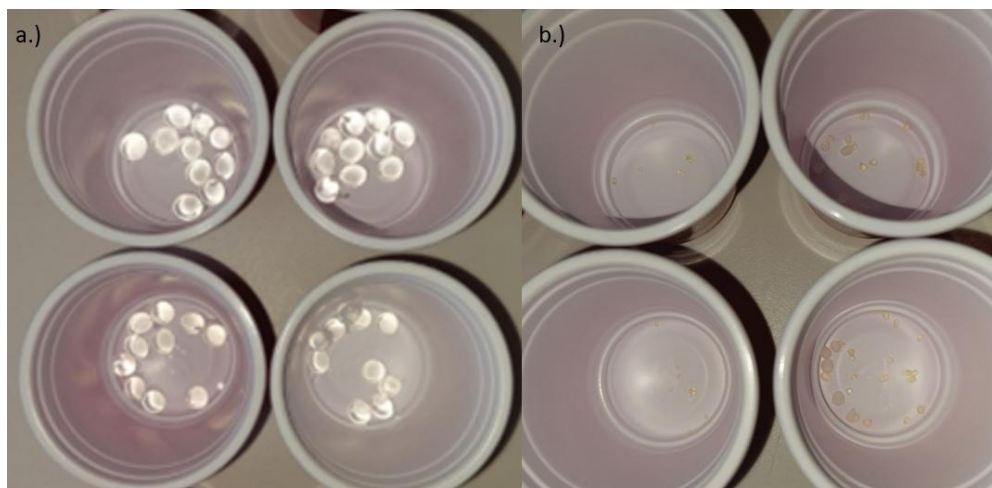
Slika 6: a.) Priprava 3 % raztopine natrijevega alginata, b.) zamreževanje alginatnih kroglic v raztopini CaCl_2 in c.) sintetizirane hidrogelne alginatne kroglice

3.3 Metode sušenja hidrogelnih kroglic

Sintetizirane kroglice smo sušili na zraku in v liofilizatorju, sušili smo v dveh paralelkah po 10 kroglic na vzorec. Vsi rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh paralelnih meritev.

3.3.1 Sušenje na zraku

Kroglice smo pred sušenjem stehtali na analitski tehtnici in jih sušili na sobni temperaturi. Njihovo maso smo spremljali v določenih časovnih intervalih: po 2, 4, 24, 48, 72 urah ter po enem tednu. Slika 7 prikazuje kroglice pred in po sušenju.



Slika 7: Alginatne kroglice a.) pred in b.) po sušenju na zraku

3.3.2 Liofilizacija

Lončke s sintetiziranimi alginatnimi kroglicami smo stehtali, pokrili s parafilmom in ga prepikali z iglo, da smo omogočili sublimacijo vode. Alginatne kroglice smo nato zamrznili v zamrzovalniku za 24 ur. Po zamrznitvi smo jih prenesli v liofilizator (Christ Alpha 1-4), kjer so se liofilizirale 8 ur. Po liofilizaciji smo vzorce ponovno stehtali in iz razlike mas izračunali odstotek izgube vode. Slika 8 prikazuje liofilizirane kroglice.



Slika 8: Liofilizirane kroglice

Enačba 2 za določitev odstotka izgube vode pri sušenju:

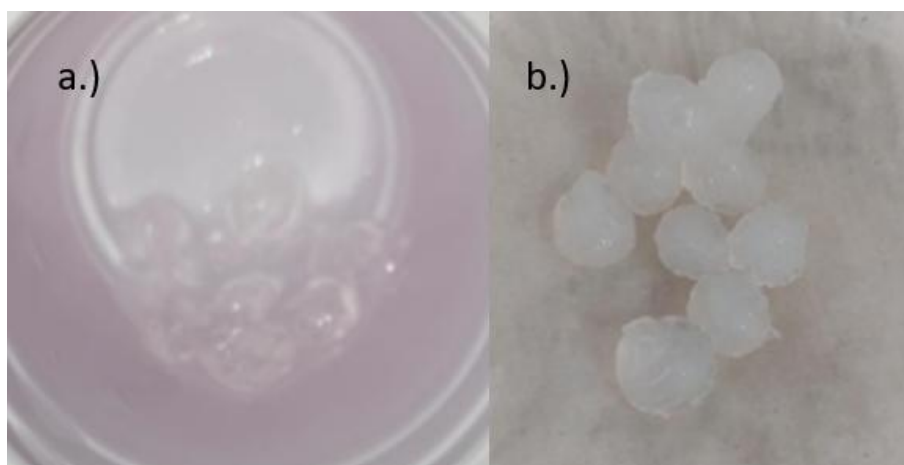
$$Izguba\ vode = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100 \quad (2),$$

pri čemer je:

- *izguba vode* - zmanjšanje mase vode (%),
- m_1 - masa začetna (g),
- m_2 - masa končna (g).

3.4 Študije nabrekanja in ciklične uporabe

Po sušenju na zraku in v liofilizatorju, smo kroglice nabrekli v destilirani vodi pri sobni temperaturi. Mase kroglic smo v dveh paralelkah spremljali po 2, 4, 24, 48 in 72 urah ter po enem tednu. Ob vsaki časovni točki smo kroglice previdno odstranili iz vode, jih osušili na filtrirnem papirju, stehali in vrnili v vodo. Ker so kroglice pokazale ustrezno sposobnost nabrekanja, smo ponovili cikel sušenja in nabrekanja, pri čemer smo uporabili enak postopek sušenja kot v prvem ciklu – vzorce, prvotno sušene na zraku, smo ponovno sušili na zraku, liofilizirane vzorce pa ponovno liofilizirali. Slika 9 prikazuje kroglice, sušene na zraku, med drugim ciklom nabrekanja in liofilizirane kroglice v istem obdobju. Tretji cikel sušenja in nabrekanja smo izvedli samo za vzorec A3C0,5 15 min (kroglice, zamrežene 15 minut v 0,5 % raztopini CaCl₂).



Slika 9: Drugi cikel nabrekanja alginatnih kroglic a.) sušenih na zraku in b.) sušenih v liofilizatorju

3.4.1 Izračun parametrov nabrekanja

Za ovrednotenje lastnosti nabrekanja alginatnih kroglic smo uporabili različne kvantitativne parametre, ki opisujejo njihovo sposobnost absorpcije in zadrževanja vode ter stabilnost pri večkratni uporabi. Izračunane parametre smo določili na podlagi merjenih mas kroglic v različnih fazah procesa nabrekanja in sušenja.

Enačba 3 za izračun stopnje nabrekanja (*angl.* Swelling rate):

$$SR = \frac{m_n - m_s}{m_s} \quad (3),$$

pri čemer je:

- SR - stopnja nabrekanja,
- m_n - masa nabrekle kroglice (g),
- m_s - masa suhe kroglice (g).

Enačba 4 za izračun sposobnosti zadrževanja vode (*angl.* Water retention capacity):

$$WRC = \frac{m_t}{m_z} \times 100 \quad (4),$$

pri čemer je:

- WRC - sposobnost zadrževanja vode (%),
- m_t - masa suhe po času (g),
- m_z - masa začetne, pred sušenjem (g).

Enačba 5 za izračun učinkovitosti rehidracije (*angl.* Rehydration efficiency):

$$RE = \frac{m_n}{m_z} \times 100 \quad (5),$$

pri čemer je:

- RE - učinkovitost rehidracije (%),
- m_n - masa nabrekle kroglice (g),
- m_z - masa začetne, pred sušenjem (g).

Enačba 6 za izračun indeksa stabilnosti za večkratno uporabo (*angl.* Reusability stability index):

$$RSI = \frac{SR_n}{SR_1} \times 100 \quad (6),$$

pri čemer je:

- RSI - indeks stabilnosti za večkratno uporabo,
- SR_n - stopnja nabrekanja v n ciklu,
- SR_1 - stopnja nabrekanja v prvem ciklu.

Enačba 7 za izračun zmanjšanja sposobnosti nabrekanja po n ciklih (*angl.* Swelling capacity reduction):

$$SCR = \frac{SR_1 - SR_n}{SR_1} \times 100 \quad (7),$$

pri čemer je:

- SCR - zmanjšanje sposobnosti nabrekanja po n ciklih (%),
- SR_n - stopnja nabrekanja v n ciklu,

- SR_1 - stopnja nabrekanja v prvem ciklu.

3.5 Metode karakterizacije

3.5.1 Termogravimetrična analiza (TGA)

Termogravimetrično analizo smo izvedli na napravi Mettler Toledo TGA/DSC 3+ (slika 10). Vzorec smo natehtali v aluminijast lonček in ga segrevali v temperaturnem območju od 25 do 550 °C s hitrostjo segrevanja 10 °C/min, v dušikovi atmosferi s pretokom plina 20 mL/min, nato pa še 10 minut pri 550 °C v kisikovi atmosferi s pretokom plina 20 mL/min.

Z metodo TGA smo določili temperaturo degradacije in delež razpada hidrogela.

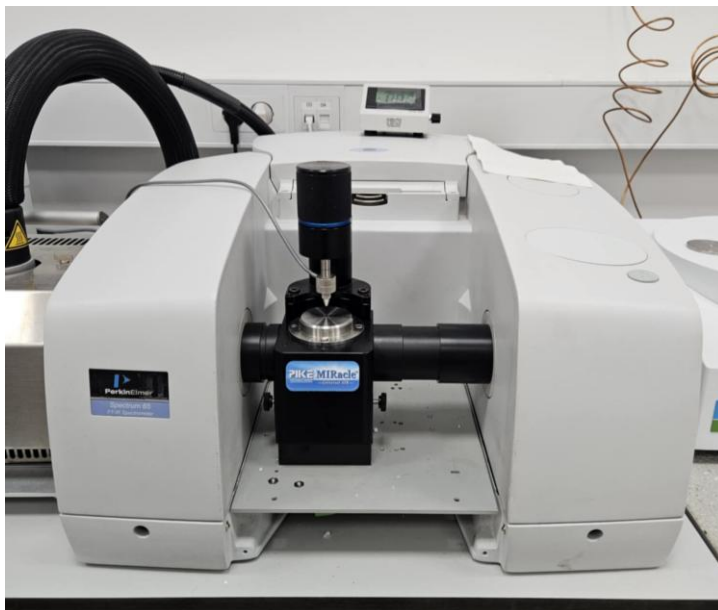


Slika 10: Termogravimetrični analizator

3.5.2 Infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo in oslabljenim popolnim odbojem (FTIR)

Vzorci smo analizirali z uporabo infrardečega spektrometra Perkin Elmer Spectrum 65 FT-IR Spectrometer (slika 11), s tehniko oslabljene popolne odbojnosti (ATR). Za vsak vzorec smo posneli 10 meritev od 4000 cm^{-1} do 600 cm^{-1} , z resolucijo 4 cm^{-1} .

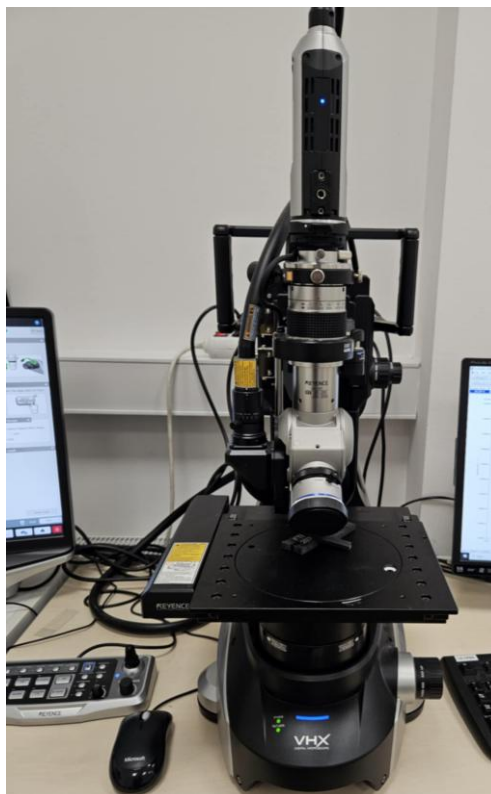
Z ATR FT-IR metodo smo določili približno kemijsko sestavo vzorcev in preverili morebitno vsebnost nečistoč.



Slika 11: ATR-FTIR spektrometer

3.5.3 Optični mikroskop

Vzorci smo analizirali z optičnim mikroskopom Keyence VHX (slika 12), ki omogoča digitalno slikanje z do 2000-kratno povečavo. Za podrobno preučitev vzorcev smo uporabili 20, 30 in 50-kratno povečavo.



Slika 12: Optični mikroskop

4 REZULTATI IN DISKUSIJA

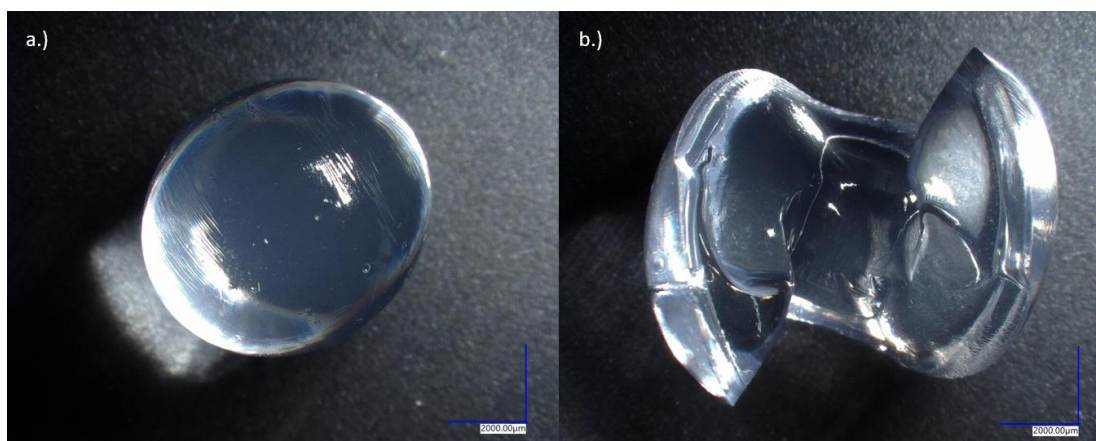
Spremljali smo sposobnost zadrževanja vode, stopnjo nabrekanja, učinkovitost rehidracije v dveh ciklih sušenja in nabrekanja. Vzorec A3C0,5 (15 min) smo sušili in nabrekli v treh ciklih zaradi najboljših rezultatov nabrekanja.

4.1 Optimizacija sinteze alginatnih hidrogelov

Koncentracija raztopine CaCl_2 in čas zamreževanja pomembno vplivata na sintezo alginatnih kroglic. Višja koncentracija CaCl_2 omogoča močnejšo zamreženost, medtem ko nižja koncentracija povzroči šibkejšo zamreženost in končno strukturo. Kroglice, ki so se zamreževale 15 minut in 30 minut v 0,25 % raztopini CaCl_2 , so razpadle nekaj minut po sintezi, zato smo jih izključili iz nadaljnje raziskave. Slika 13 prikazuje počene alginatne kroglice, na sliki 14 je pod 20-kratno mikroskopsko povečavo vidna primerjava med nepoškodovano sintetizirano alginatno kroglico in počeno alginatno kroglico.



Slika 13: Počene alginatne kroglice



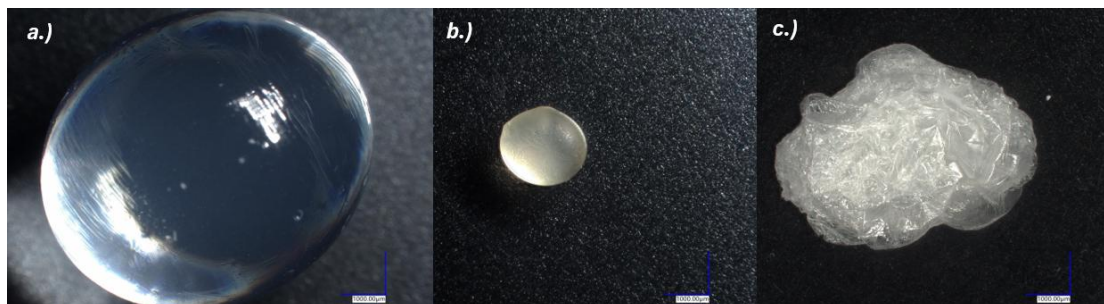
Slika 14: Primerjava med a.) nepoškodovano in b.) počeno alginatno kroglico pod mikroskopom pri 20-kratni povečavi

4.1.1 Vpliv metode sušenja na morfologijo

Metoda sušenja pomembno vpliva na končne lastnosti alginatnih kroglic.

Sušenje na zraku predstavlja enostavnejši in cenovno ugodnejši postopek, vendar je časovno dolgotrajnejši, pri čemer v kroglicah ostane še določen odstotek vlage. Tako sušene kroglice imajo gladko površino z manjšo poroznostjo, saj postopno izhlapevanje vode povzroči stiskanje polimerne mreže in zapiranje por. Posledično kroglice izgledajo bolj »zbite« oziroma kompaktne, vendar so veliko bolj čvrste in manj krhke kakor liofilizirane.

Liofilizacija, nasprotno, ohranja prvotno strukturo kroglic, poveča njihovo poroznost in omogoča boljšo stabilnost ter hitrejšo rehidracijo. Med procesom sublimacije voda izhlapi neposredno iz trdnega (alginatne kroglice so predhodno zamrznjene) v plinasto stanje, kar preprečuje kolaps gelske strukture. Liofilizirane alginatne kroglice imajo večji volumen, nižjo maso in krhko strukturo v primerjavi z alginatnimi kroglicami sušenimi na zraku. Njihova porozna struktura je rezultat sublimacije, ki ohranja originalno mrežasto strukturo polimera. Slika 15 prikazuje alginatno kroglico pred postopkom sušenja, kroglico posušeno na zraku in liofilizirano kroglico, opazovane pod optičnim mikroskopom pri 30-kratni povečavi.



Slika 15: Primerjava alginatnih kroglic v treh različnih stanjih – a.) sveža kroglica pred sušenjem, b.) kroglica posušena na zraku in c.) liofilizirana kroglica – pod optičnim mikroskopom pri 30-kratni povečavi

4.2 Vsebnost vode v alginatnih kroglicah

S postopkom liofilizacije smo določili odstotek izgube vode v alginatnih kroglicah in ugotovili, da kroglice vsebujejo 98–99 % vode, kot prikazuje tabela 2. Primerjava rezultatov kaže, da kroglice sušene v liofilizatorju dosegajo višji odstotek izgube vode kot kroglice sušene na zraku, kar pomeni da smo s postopkom liofilizacije dosegli večjo stopnjo sušenja. Vzorec A3C0,5 (1 h) je v drugem ciklu sušenja izkazoval manjšo izgubo vode, le 88,53 % v primerjavi z drugimi vzorci. To lahko pripišemo gostejši in močnejši zamreženosti strukture teh kroglic, zaradi česar je vzorec v prvem ciklu nabrekanja absorbiral manj vode kot ostali vzorci, posledično je zato tudi odstotek izgube vode v drugem ciklu sušenja manjši.

Tabela 2: Odstotek izgube vode alginatnih kroglic med procesom liofilizacije

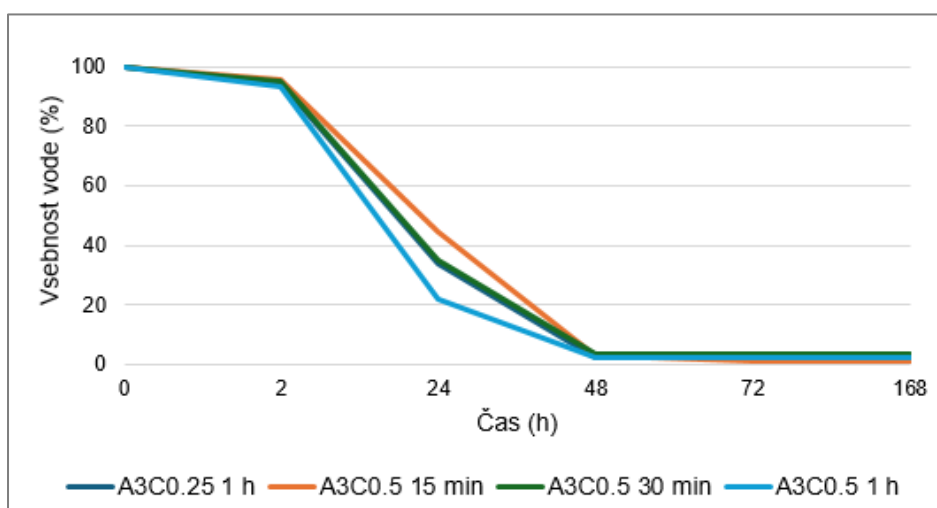
Vzorec	Čas zamreževanja	Izguba vode (%) - 1. cikel sušenja	Izguba vode (%) - 2. cikel sušenja
A3C0,25	1 ura	98,2	98,5
A3C0,5	15 minut	99,8	99,9
	30 minut	99,6	99,6
	1 ura	98,0	88,5

4.3 Kinetika sušenja alginatnih kroglic

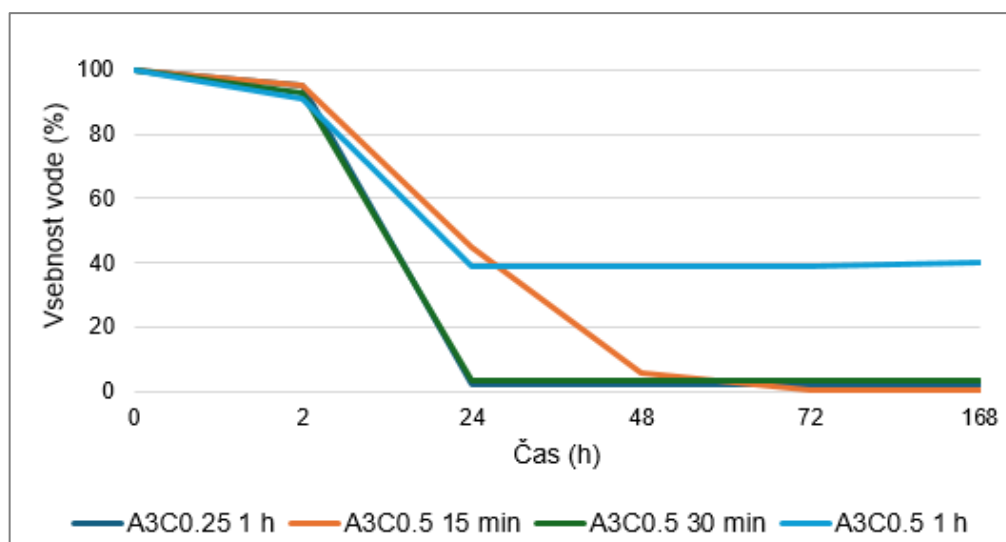
Spremljali smo sposobnost zadrževanja vode alginatnih kroglic med sušenjem na zraku. Kot prikazujeta sliki 16 in 17, poteka sušenje kroglic v več fazah. V prvih dveh urah je izguba vode minimalna, zgolj 4–7 %. Do največje izgube vode, 96–99 %, pride med 2. in 48. uro sušenja. Od 48. ure dalje se izguba vode upočasni in znaša le še 1–3 %.

Rezultati kažejo, da višja kot je koncentracija CaCl_2 in krajši kot je čas zamreženja, učinkovitejše je sušenje. Najbolj učinkovito se je sušil vzorec, ki se je zamreževal 15 minut v 0,5 % raztopini CaCl_2 , pri katerem je odstotek izgube vode dosegel 99,6 %. Pri vzorcih z daljšim časom zamreževanja opažamo hitrejšo začetno izgubo vode, vendar ti vzorci na koncu sušenja zadržijo nekoliko več vlage, kar je razvidno iz grafa na sliki 17.

V drugem ciklu sušenja je proces sušenja potekal bistveno hitreje. Razlog je v tem, da po prvem sušenju in nato ponovnem nabrekanju hidrogel pogosto ni več tako kompakten kot na začetku. Pri ponovni hidraciji sušenega hidrogela lahko pride do nastanka mikrostruktur, razpok ali širših kanalov znotraj materiala, ki v drugem ciklu sušenja olajšajo pot vodi pri izhlapevanju, kar pospeši celoten proces sušenja.



Slika 16: Kinetika zadrževanja vode alginatnih kroglic med prvim ciklom sušenja na zraku



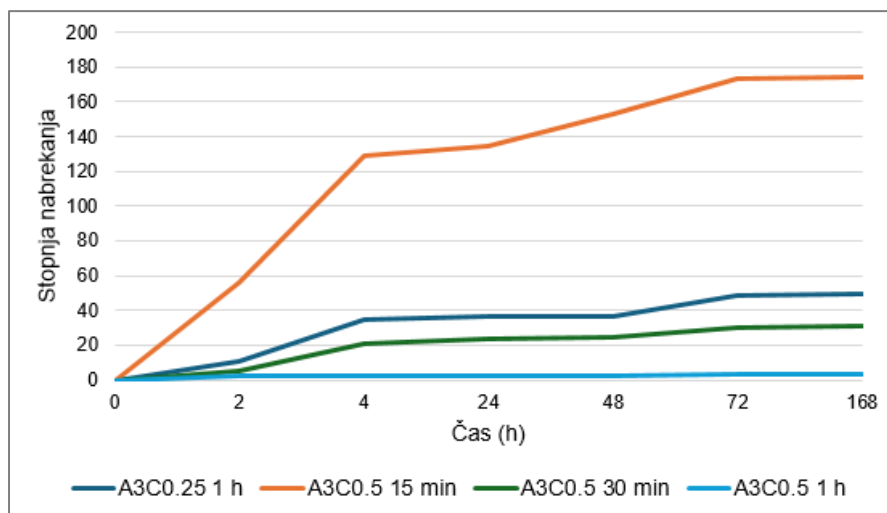
Slika 17: Kinetika zadrževanja vode alginatnih kroglic med drugim ciklom sušenja na zraku

4.4 Kinetika nabrekanja alginatnih kroglic

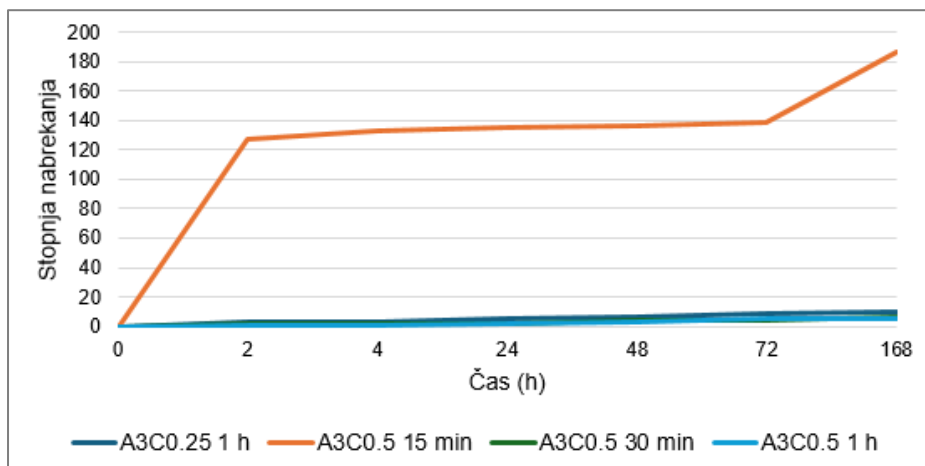
Stopnja nabrekanja predstavlja količino vode, ki jo lahko posušen hidrogel absorbira glede na svojo začetno suho maso. Iz grafov, prikazanih na slikah 18, 19, 20 in 21 je razvidno, da na stopnjo nabrekanja pomembno vplivajo metoda sušenja, čas zamreževanja in število ciklov nabrekanja.

Liofilizirani vzorci dosegajo višje stopnje nabrekanja v primerjavi z vzorci sušenimi na zraku. Izstopa vzorec A3C0,5 (15 min), ki je že v prvem ciklu nabrekanja dosegel stopnjo višjo od 1000. Rezultati kažejo, da krajši kot je čas zamreženja, višja je stopnja nabrekanja. Z vsakim nadaljnjim ciklom nabrekanja se stopnja nabrekanja postopoma zmanjšuje.

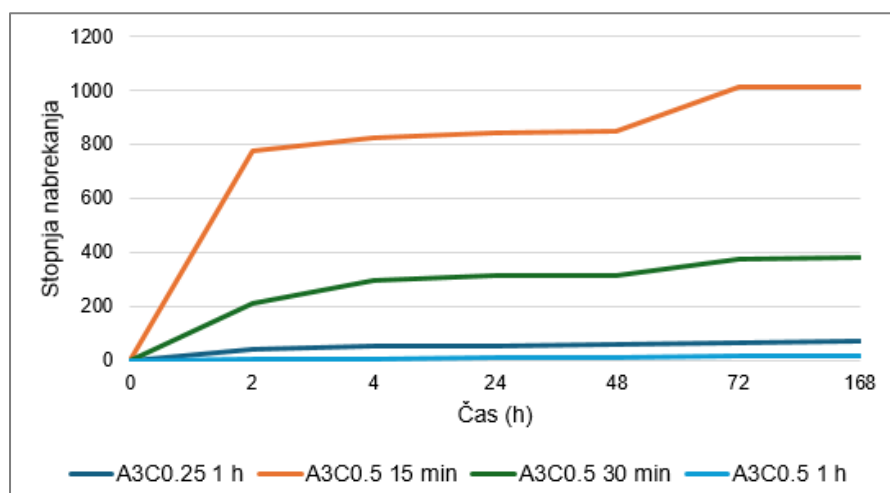
Kot najuspešnejši se je izkazal vzorec, ki se je zamreževal 15 minut v 0,5 % raztopini CaCl_2 , kar lahko pripišemo predvsem njegovi porozni strukturi, ki omogoča učinkovito absorpcijo vode. Med vzorci opazamo razliko v absorpcijski sposobnosti glede na koncentracijo CaCl_2 , kjer višja koncentracija (0,5 %) pri daljšem času zamreževanja (1 h) ustvari močnejšo zamreženo strukturo, ki omejuje nabrekanje.



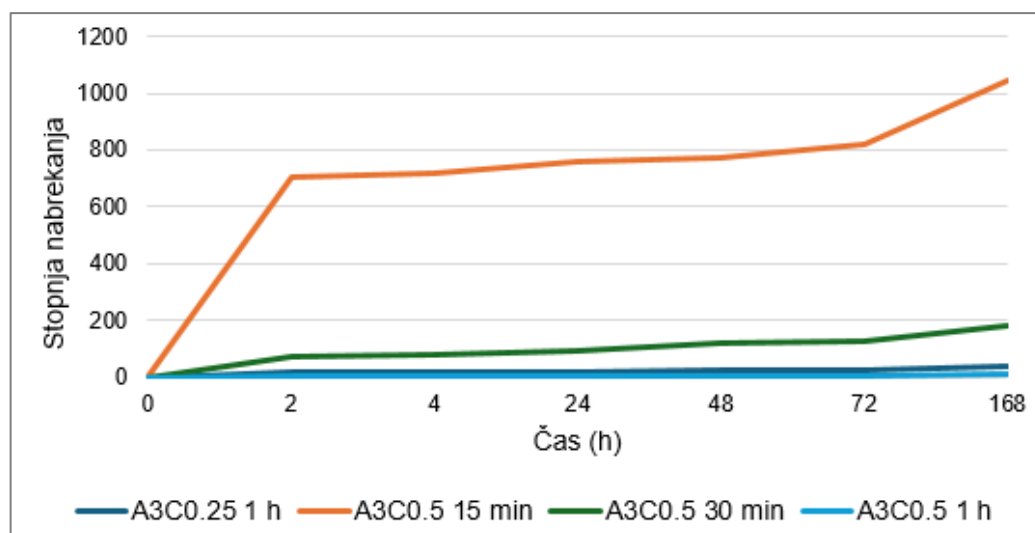
Slika 18: Kinetika nabrekanja alginatnih kroglic sušenih na zraku v prvem ciklu



Slika 19: Kinetika nabrekanja alginatnih kroglic sušenih na zraku v drugem ciklu



Slika 20: Kinetika nabrekanja liofiliziranih alginatnih kroglic v prvem ciklu



Slika 21: Kinetika nabrekanja liofiliziranih alginatnih kroglic v drugem ciklu

4.5 Učinkovitost rehidracije

Učinkovitost rehidracije nam pove, koliko mase vzorec povrne po rehidraciji v primerjavi s svojo začetno maso v hidriranem stanju pred prvim sušenjem. Glede na rezultate, predstavljene v tabelah 3 in 4, je razvidno, da liofilizirani vzorci dosegajo višjo učinkovitost rehidracije v primerjavi z vzorci sušenimi na zraku.

Ponovno posebej izstopa vzorec A3C0,5 (15 min), ki kaže izjemno sposobnost rehidracije, kar 195 % pri kroglicah sušenih na zraku in 174 % pri liofiliziranih kroglicah. Te vrednosti, ki presegajo 100 %, nakazujejo, da je vzorec po rehidraciji sposoben absorbirati še več vode, kot jo je vseboval pred prvim sušenjem. Pri večini vzorcev opažamo nižjo učinkovitost rehidracije v drugem ciklu, z izjemo vzorca A3C0.5 (15 min), ki ohranja 99 % učinkovitost tudi v drugem ciklu nabrekanja.

Tabela 3: Učinkovitost rehidracije (%) alginatnih kroglic sušenih na zraku

Vzorec	Čas zamreževanja	Učinkovitost rehidracije (%) - 1. cikel nabrekanja	Učinkovitost rehidracije (%) - 2. cikel nabrekanja
A3C0,25	1 ura	101,2	23,8
A3C0,5	15 minut	194,7	78,0
	30 minut	101,2	24,4
	1 ura	9,3	253,0

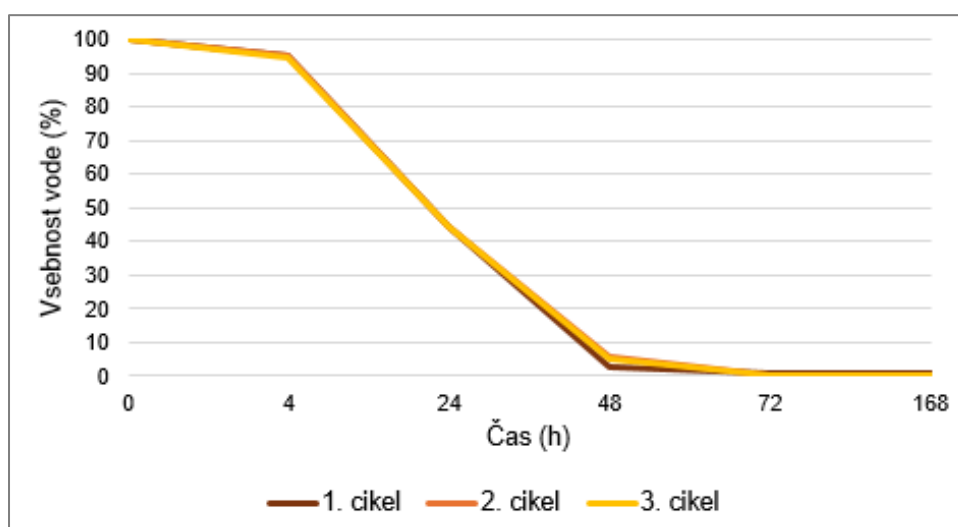
Tabela 4: Učinkovitost rehidracije (%) alginantih kroglic sušenih v liofilizatorju

Vzorec	Čas zamreževanja	Učinkovitost rehidracije (%) - 1. cikel nabrekanja	Učinkovitost rehidracije (%) - 2. cikel nabrekanja
A3C0,25	1 ura	126,3	58,9
A3C0,5	15 minut	174,1	99,2
	30 minut	151,4	68,0
	1 ura	27,6	156,0

Rezultati potrjujejo, da učinkovitost rehidracije korelira s strukturnimi lastnostmi vzorcev. Višje vrednosti dosegajo vzorci z bolj porozno strukturo in manj gosto zamreženi vzorci, kar omogoča učinkovitejši vstop vode v strukturo hidrogela. Koncentracija CaCl_2 in čas zamreževanja tako predstavljata ključna parametra, ki definirata končno sposobnost rehidracije alginatnih kroglic.

4.6 Ciklično nabrekanje in dolgoročna stabilnost alginatnih kroglic

Za oceno dolgoročne uporabnosti alginatnih kroglic smo vzorec A3C0,5 (15 min), ki je izkazal najboljše rezultate nabrekanja, izpostavili trem zaporednim ciklom sušenja in rehidracije. Na sliki 22 prikazani rezultati sposobnosti zadrževanja vode v treh ciklih sušenja na zraku kažejo konsistentno obnašanje kroglic med vsemi tremi cikli. Krivulje, ki predstavljajo prvi, drugi in tretji cikel, se skoraj popolnoma prekrivajo, kar dokazuje, da kroglice v vsakem ciklu izgubljajo vodo z enako hitrostjo. V prvih 4 urah je izguba vode počasna, med 4. in 48. uro pa se vsebnost vode zmanjša za več kot 90 %. Po 48 urah se proces sušenja upočasni, pri čemer kroglice v vseh treh ciklih zadržijo le minimalno količino vode.



Slika 22: Kinetika zadrževanja vode alginatnih kroglic A3C0,5 (15 min) v vseh treh ciklih sušenja na zraku

Tabela 5 prikazuje izgubo vode liofiliziranih kroglic v vseh treh ciklih sušenja v liofilizatorju. Glede na vrednosti vidimo, da je postopek liofilizacije izredno učinkovit pri odstranjevanju vode. Z vsakim nadaljnjim ciklom pride do rahlega povečanja deleža izgubljene vode, kar lahko kaže na izboljšano izhlapevanje zaradi že delno spremenjene strukture.

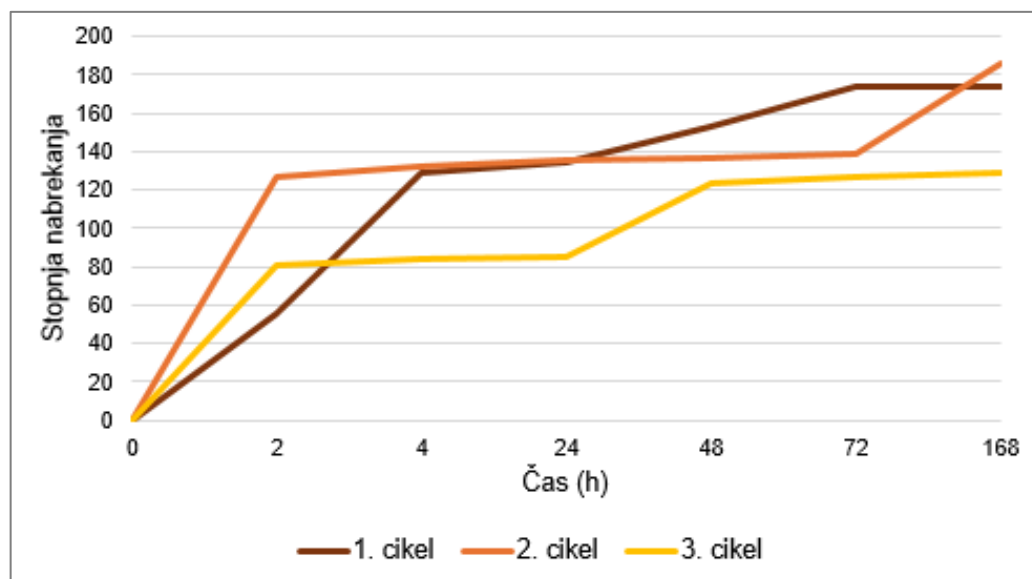
Tabela 5: Odstotek izgube vode alginatnih kroglic A3C0,5 (15 min) v vseh treh ciklih sušenja s procesom liofilizacije

Vzorec	Čas zamreževanja	Izguba vode (%) - 1. cikel sušenja	Izguba vode (%) - 2. cikel sušenja	Izguba vode (%) - 3. cikel sušenja
A3C0,5	15 minut	99,8	99,9	99,9

Primerjava med metodama sušenja razkriva pomembne razlike v njunem vplivu na strukturo kroglic. Liofilizacija poteka pri nizkih temperaturah in pod vakuumom, kar omogoča odstranjevanje vode v obliki sublimacije. Zaradi tega ostane struktura kroglic bolj porozna, kar omogoča višjo stopnjo ponovnega nabrekanja in večjo sposobnost zadrževanja vode. Nasprotno, sušenje na zraku pri sobni temperaturi povzroča postopno izhlapevanje vode, kar lahko povzroči zapiranje por ali deformacije v strukturi, s tem pa slabšanja sposobnosti absorpcije in zadrževanja vode v naslednjih ciklih.

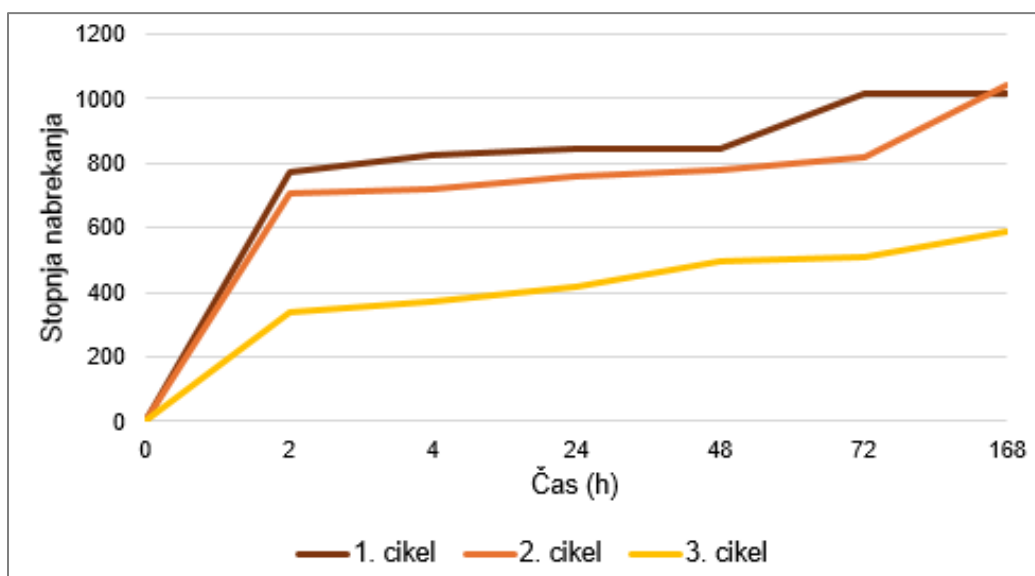
Iz rezultatov stopnje nabrekanja alginatnih kroglic A3C0,5 (15 min) v treh zaporednih ciklih (sliki 23 in 24) je razvidno, da tako na zraku sušene kot liofilizirane kroglice ohranjata sposobnost absorpcije vode, vendar z različno učinkovitostjo in obstojnostjo skozi cikle.

Na zraku sušene kroglice so dosegle relativno visoko stopnjo nabrekanja (slika 23) v prvih dveh ciklih, pri čemer je bila najhitrejša rast opazna v prvih dveh urah. V drugem ciklu je bil porast celo nekoliko izrazitejši kot v prvem, kar bi lahko pripisali lažji dostopnosti hidrofilnih mest po prvem ciklu sušenja. V tretjem ciklu pa je bila stopnja nabrekanja izrazito nižja, kar kaže na zmanjšano sposobnost absorpcije in zadrževanja vode. To je verjetno posledica strukturnih sprememb v materialu, kot so zaprtje por ali razpad mrežne strukture, kar zmanjšuje možnost nadaljnjega vpivanja vode.



Slika 23: Stopnja nabrekanja kroglic sušenih na zraku v vseh treh ciklih

Liofilizirane kroglice so v prvem ciklu dosegle bistveno višjo stopnjo nabrekanja (slika 24), več kot 1000, v primerjavi s kroglicami sušenimi na zraku. Njihova sposobnost nabrekanja je ostala višja tudi v drugem in tretjem ciklu, čeprav je opazen postopen upad učinkovitosti – najverjetneje zaradi mikrostrukturnih poškodb (npr. lom por, zmanjšanje kapilarne aktivnosti).



Slika 24: Stopnja nabrekanja liofiliziranih kroglic v vseh treh ciklih

Tabela 6 prikazuje primerjavo učinkovitosti rehidracije optimiziranega vzorca alginatnih kroglic A3C0,5 (15 min), sušenih z dvema različnima metodama, skozi tri zaporedne cikle rehidracije. Rezultati razkrivajo pomembne razlike v dolgoročni stabilnosti in funkcionalnosti materiala glede na uporabljeno metodo sušenja.

Tabela 6: Učinkovitost rehidracije (%) alginatnih kroglic A3C0,5 (15 min) sušenih v liofilizatorju in na zraku v treh zaporednih ciklih

Vzorec	Učinkovitost rehidracije (%) – 1. cikel	Učinkovitost rehidracije (%) – 2. cikel	Učinkovitost rehidracije (%) – 3. cikel
Kroglice sušene na zraku	194,7	78,0	55,6
Liofilizirane kroglice	174,1	99,2	48,1

Na zraku sušene kroglice so v prvem ciklu dosegle izjemno visoko učinkovitost rehidracije (194,72 %), saj so absorbirale skoraj dvakrat toliko vode, kot je znašala njihova začetna masa. To nakazuje, da je struktura kroglic po prvem sušenju ohranila optimalno poroznost in dostopnost hidrofilnih mest. Vendar se že v drugem ciklu učinkovitost rehidracije drastično zmanjša za več kot 60 % (na 78,01 %), v tretjem ciklu pa vrednost pade na 55,63 %, kar predstavlja le približno 28,6 % prvotne absorpcijske sposobnosti. Tovrsten padec učinkovitosti nakazuje, da kroglice sušene na zraku strukturno ne prenesejo večkratnih ciklov sušenja in rehidracije.

Liofilizirane kroglice so v prvem ciklu dosegle nekoliko nižjo učinkovitost rehidracije (176,06 %) v primerjavi s kroglicami sušenimi na zraku, vendar so izkazale bistveno večjo strukturno stabilnost v naslednjih ciklih. V drugem ciklu so ohranile izjemno visoko učinkovitost rehidracije (99,23 %), kar predstavlja ohranjanje 57 % prvotne sposobnosti - bistveno bolje kot kroglice sušene na zraku. V tretjem ciklu se učinkovitost rehidracije sicer zniža na 48,12 %, vendar je padec med drugim in tretjim ciklom (51,5 %) manj izrazit kot pri kroglicah sušenih na zraku (71,4 %).

Indeks stabilnosti, izračunan kot razmerje med učinkovitostjo rehidracije v zaporednih ciklih, predstavlja pomemben parameter za oceno dolgoročne uporabnosti hidrogelnih materialov. Ta vrednost nam omogoča kvantitativno oceno, kako dobro material ohranja svojo funkcionalnost skozi zaporedne cikle uporabe:

- RSI > 1: Označuje izboljšanje sposobnosti rehidracije v naslednjem ciklu, kar kaže na ugodne strukturne spremembe v materialu.
- RSI = 1: Pomeni popolno ohranjanje začetne sposobnosti rehidracije, kar predstavlja idealno stabilnost.
- RSI < 1: Kaže na poslabšanje sposobnosti rehidracije, pri čemer nižja vrednost pomeni večji padec funkcionalnosti.

Tabela 7 prikazuje indeks stabilnosti optimiziranega vzorca alginatnih kroglic A3C0,5 (15 min) v posameznih zaporednih ciklih. Liofilizirane kroglice izkazujejo višjo stabilnost v prehodu iz prvega v drugi cikel (indeks 1,0), kar pomeni skoraj popolno ohranjanje funkcionalnosti. Nasprotno, kroglice sušene na zraku v tem obdobju dosežejo indeks 1,1, kar nakazuje nenavadno povečanje učinkovitosti, verjetno zaradi preureditve strukture po prvem ciklu, ki začasno olajša dostop vode do hidrofilnih mest. V prehodu iz drugega v tretji cikel obe vrsti kroglic izkazujeta upad funkcionalnosti (indeks < 1), kar nakazuje postopno degradacijo strukture. Pri kroglicah sušenih na zraku ta indeks znaša 0,7, pri liofiliziranih pa 0,6, kar kaže na nekoliko hitrejši upad funkcionalnosti liofiliziranih kroglic v zadnjem ciklu, čeprav so te v predhodnih ciklih izkazovale boljšo stabilnost.

Tabela 7: Indeks stabilnosti alginatnih kroglic A3C0,5 (15 min) sušenih v liofilizatorju in na zraku v treh zaporednih ciklih

Vzorec	Indeks stabilnosti – 1/2. cikel	Indeks stabilnosti – 2/3. cikel
Kroglice sušene na zraku	1,1	0,7
Liofilizirane kroglice	1,0	0,6

Zmanjšanje sposobnosti nabrekanja v odstotkih prikazuje relativno spremembo v absorpcijski sposobnosti materiala med zaporednimi cikli. Negativna vrednost označuje izboljšanje absorpcijske sposobnosti, pozitivna vrednost pa njeno zmanjšanje. Kot je razvidno iz tabele 8, obe vrsti kroglic v prehodu iz prvega v drugi cikel izkazujeta izboljšanje sposobnosti nabrekanja (negativne vrednosti), kar je skladno z vrednostmi indeksa stabilnosti nad 1. Pri prehodu iz drugega v tretji cikel pa alginatne kroglice rezultirajo znatno poslabšanje absorpcijske sposobnosti, pri čemer liofilizirane kroglice izkazujejo izrazitejši upad (42,0 %) v primerjavi s kroglicami sušenimi na zraku (25,7 %).

Tabela 8: Zmanjšanje sposobnosti nabrekanja (%) alginatnih kroglic A3C0,5 (15 min) sušenih v liofilizatorju in na zraku v treh zaporednih ciklih

Vzorec	Zmanjšanje sposobnosti nabrekanja (%) – 1/2. cikel	Zmanjšanje sposobnosti nabrekanja (%) – 2/3. cikel
Kroglice sušene na zraku	-7,0	25,7
Liofilizirane kroglice	-2,7	42,0

Na podlagi predstavljenih rezultatov lahko zaključimo, da obe vrsti kroglic izkazujeta odlične lastnosti v prvih dveh ciklih uporabe, kar omogoča njihovo učinkovito implementacijo v aplikacijah, kjer je predvidena omejena večkratna uporaba. Liofilizacija se je izkazala kot posebej primerna metoda za pripravo alginatnih kroglic, ki zahtevajo visoko začetno absorpcijsko sposobnost in stabilnost skozi prvi in drugi cikel uporabe.

4.7 Karakterizacija

4.7.1 Termogravimetrična analiza (TGA)

S TGA smo vzorcem določili temperaturo degradacije in delež razpada v %. Analizirali smo le liofilizirane kroglice. V prilogi 1 so prikazane TGA krivulje analiziranih liofiliziranih kroglic z 0,25 % in 0,5 % raztopino CaCl₂ in z različnim časom zamreženja. Za celovitejši pregled in primerjavo med vzorci so v tabeli 9 zbrani ključni parametri termičnega razpada – temperature degradacije in pripadajoči deleži razpada za vsak analiziran vzorec.

Rezultati iz tabele 9 kažejo, da je pri vzorcu A3C0,25 (1 h) prišlo do le treh razpadov, dva sta potekala v dušikovi atmosferi, dokončno pa je razpadel v kisikovi atmosferi, medtem ko je pri vzorcih A3C0,5 prišlo do štirih razpadov, trije so potekali v dušikovi atmosferi, zadnji pa v kisikovi atmosferi. Do najmanjšega razpada je prišlo pri vzorcu A3C0,5 (15 min). Rezultati potrjujejo, da višja koncentracija CaCl₂ izboljša toplotno stabilnost vzorcev. Vzorec A3C0,5 (15 min) izkazuje najvišjo temperaturo degradacije pri drugem razpadu (249,85 °C) in prav tako najvišjo temperaturo pri tretjem razpadu (452,79 °C), kar kaže na učinkovito ionsko zamreženje strukture. Rezultati v drugi fazi razpada kažejo, da se z daljšim časom zamreževanja temperature degradacije znižujejo. Vzorec A3C0,5 (15 min) ima v kisikovi atmosferi najmanjši delež razpada, 6,62 %, kar pomeni, da je od ostalih vzorcev najbolj stabilen v oksidativnem okolju.

Tabela 9: Parametri termične razgradnje alginatnih kroglic določeni s TGA metodo

Vzorec	Čas zamreževanja	Razpad v dušikovi atmosferi						Razpad v kisikovi atmosferi		Celoten razpad (%)
		T _{d1} (°C)	Razpad ₁ (%)	T _{d2} (°C)	Razpad ₂ (%)	T _{d3} (°C)	Razpad ₃ (%)	T _{d4} (°C)	Razpad ₄ (%)	
A3C0,25	1 ura	45,4	16,1	245,7	49,2	/	/	550	20,8	86,0

Vzorec	Čas zamreževanja	Razpad v dušikovi atmosferi						Razpad v kisikovi atmosferi		Celoten razpad (%)
		T_{d1} (°C)	Razpad ₁ (%)	T_{d2} (°C)	Razpad ₂ (%)	T_{d3} (°C)	Razpad ₃ (%)	T_{d4} (°C)	Razpad ₄ (%)	
A3C0,5	15 minut	48,2	17,9	249,9	38,9	452,8	9,0	550	6,6	72,3
	30 minut	49,4	15,3	185,4	3,1	245,7	47,3	550	20,7	86,5
	1 ura	49,0	13,0	192,7	3,5	245,4	48,0	550	20,2	84,7

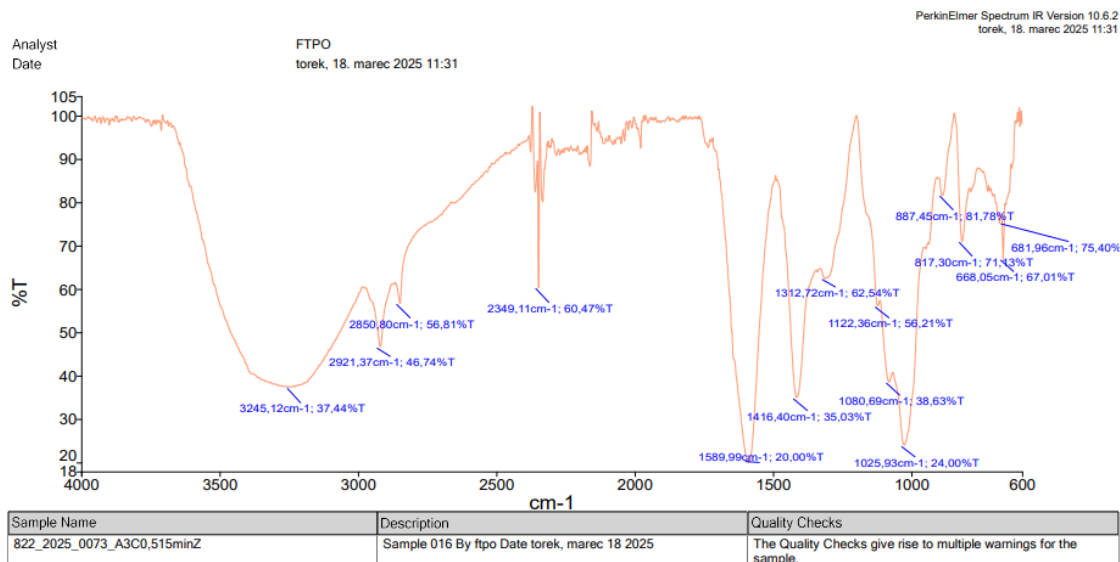
4.7.2 Infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo in oslabljenim popolnim odbojem (FTIR)

Za karakterizacijo kemijske sestave in strukture pripravljenih alginatnih kroglic smo uporabili ATR-FTIR analizo. V tabeli 10 so predstavljeni rezultati spektroskopske analize vzorca A3C0,5 (15 min), pridobljeni iz FTIR spektra prikazanega na sliki 25. Rezultati ATR-FTIR analiz drugih vzorcev, se bistveno ne razlikujejo, saj so vse kroglice sintetizirane z natrijevim alginatom, kalcijevim kloridom in destilirano vodo, ostale FTIR meritve so podane v prilogi 2. FTIR spekter alginatnih kroglic kaže značilne absorpcijske vrhove hidroksilnih (OH) skupin med 3245 in 1313 cm^{-1} , kar potrjuje prisotnost polisaharidne strukture alginata. Prisotnost karbonilnih in karboksilatnih skupin (C=O in CO) v območju med 1122 in 1026 cm^{-1} kaže na možnost tvorbe ionskih mostov z ioni Ca^{2+} , ki omogočajo zamreževanje. Tudi vrh pri 2349 cm^{-1} (O=C=O) lahko nakazuje prisotnost ogljikovega dioksida ali karbonatnih ostankov. CH in C=C absorpcije potrjujejo organske komponente, ki so lahko posledica osnovne strukture alginata ali ostankov po procesu sušenja. FTIR spektri, pridobljeni v našem raziskovalnem delu, se dobro ujemajo s podatki iz literature [24]. Kar potrjuje pravilno identifikacijo vzorcev ter ustreznost izbrane metode analize. Ujemanje spektralnih pasov kaže na prisotnost enakih funkcionalnih skupin oziroma kemijskih vezi kot pri referenčnih snoveh.

Tabela 10: Seznam karakterističnih absorpcijskih vrhov v FTIR spektru alginatnih kroglic

Številka traku	Valovno število (cm^{-1})	Kemijska vez
1	3245,1	OH
2	2921,4	CH
3	2850,8	CH
4	2349,1	O=C=O
5	1590,0	C=C
6	1416,4	OH
7	1312,7	OH
8	1122,4	CO
9	1080,7	CO
10	1025,9	CO-O-CO
11	887,5	C=C

Številka traku	Valovno število (cm ⁻¹)	Kemijska vez
12	817,3	CH
13	668,1	C=C
14	682,0	CH



Slika 25: ATR-FTIR spekter alginatne kroglice A3C0,5 (15 min) sušene na zraku s karakterističnimi absorpcijskimi vrhovi funkcionalnih skupin

4.7.3 Optični mikroskop

Za vizualno karakterizacijo morfoloških lastnosti alginatnih kroglic in oceno strukturnih sprememb med cikli sušenja in rehidracije smo izvedli mikroskopsko analizo pri 20, 30 in 50-kratni povečavi. Preučevane so bile kroglice v različnih stanjih: sveže pripravljene alginatne kroglice, kroglice sušene na zraku, liofilizirane kroglice ter kroglice po tretjem ciklu rehidracije za obe metodi sušenja.

Meritve premerov, predstavljene v tabeli 11, nudijo kvantitativno oceno strukturnih sprememb, ki se pojavijo med procesi sušenja in rehidracije. Sveže pripravljene kroglice so imele največji premer (7821,63 μm), kar predstavlja njihovo začetno hidrirano stanje. Pri sušenju na zraku pride do izrazitega zmanjšanja premera (1966,31 μm), kar predstavlja le 25,1 % prvotne velikosti. Liofilizirane kroglice so ohranile bistveno večji premer (5943,93 μm), kar predstavlja 76,0 % prvotnega premera, kar potrjuje, da liofilizacija bolje ohranja prvotno strukturo materiala.

Po treh ciklih sušenja in rehidracije sta obe vrsti kroglic izkazali trajno zmanjšanje premera v primerjavi s prvotnim stanjem. Kroglice sušene na zraku so po tretjem ciklu dosegle premer 6166,03 μm (78,8 % prvotne velikosti), medtem ko so liofilizirane kroglice dosegle premer 6612,69 μm (84,5 % prvotne velikosti). Ta razlika dodatno potrjuje, da liofilizacija omogoča boljše ohranjanje strukturne integritete tudi po večkratnih ciklih uporabe.

Rezultati mikroskopske analize potrjujejo predhodne ugotovitve drugih analiz - kroglice sušene na zraku doživijo obsežnejši razpad strukture in trajno izgubijo večji del prostornine, tako med sušenjem kot tudi po rehidraciji. Nasprotno, liofilizirane kroglice ohranijo večji del svoje strukture, kar se odraža v večjem premeru po sušenju in boljši sposobnosti rehidracije tudi v tretjem ciklu uporabe.

Tabela 11: Premeri alginatnih kroglic v različnih stanjih hidratacije

Vzorec	Premer (mm)
Kroglica v prvotnem stanju	7,8
Suha kroglica	2,0
Liofilizirana kroglica	5,9
Nabrekla kroglica sušena na zraku – 3. cikel	6,2
Nabrekla liofilizirana kroglica - 3. cikel	6,6

5 SKLEP

V diplomskem delu smo uspešno sintetizirali alginatne hidrogelne kroglice z metodo ionotropne gelacije z uporabo 3 % raztopine natrijevega alginata in dveh različnih koncentracij CaCl_2 (0,25 % in 0,5 %). Preučili smo vpliv časa zamreževanja in koncentracije zamreževala na sposobnost nabrekanja, zadrževanja vode, učinkovitost rehidracije in stabilnost hidrogelnih kroglic skozi več ciklov sušenja in ponovne hidracije.

Na osnovi sistematične eksperimentalne študije smo uspešno določili optimalno koncentracijo CaCl_2 in čas zamreževanja. Na podlagi eksperimentalnih rezultatov lahko potrdimo vse zastavljene hipoteze. Ugotovili smo, da višja koncentracija CaCl_2 in krajši čas zamreževanja prispevata k učinkovitejšemu sušenju ter večji sposobnosti nabrekanja in zadrževanja vode. Vzorec A3C0,5 (15 min) se je izkazal kot najučinkovitejši, saj je dosegel najvišjo stopnjo nabrekanja (več kot 1000 %), odlično učinkovitost rehidracije (do 195 % po sušenju na zraku) ter stabilnost v več ciklih.

Metoda sušenja ima ključen vpliv na nabrekanje kroglic. Z liofilizacijo ohranimo porozno strukturo kroglic, kar omogoča večjo sposobnost absorpcije in rehidracije skozi več ciklov. Vendar pri tej metodi postopoma prihaja do mikrostrukturnih sprememb, ki vplivajo na zmanjšanje sposobnosti zadrževanja vode. Po zaporednih ciklih sušenja se kroglice hitreje sušijo zaradi razpok, ki nastanejo med nabrekanjem. Sušenje v liofilizatorju je učinkovitejše, saj odstrani več vode kot sušenje na zraku. Razpoke v strukturi kroglic najbolj vplivajo na zmanjšanje stopnje nabrekanja v tretjem ciklu. Kljub temu so liofilizirane kroglice v tretjem ciklu še vedno ohranile dobro rehidracijo, medtem ko so kroglice, sušene na zraku, v tretjem ciklu izkazale znatno slabšo strukturno stabilnost. Zato je liofilizacija priporočena tehnika sušenja alginantih kroglic v aplikacijah, ki zahtevajo visoko začetno absorpcijsko sposobnost in stabilnost skozi prvi in drugi cikel uporabe.

Z uporabo TGA analize smo ugotovili, da ima vzorec A3C0,5 (15 min) najmanjši delež razpada (6,62 %) v oksidativnem okolju, kar kaže, da je najbolj stabilen v kisikovi atmosferi. Na podlagi rezultatov smo ugotovili, da višja koncentracija CaCl_2 pripomore k boljši toplotni stabilnosti.

Z raziskavo smo potrdili, da je mogoče sintetizirati stabilne in večkrat uporabne hidrogelne kroglice iz natrijevega alginata, pri čemer ima ključno vlogo natančno uravnavanje pogojev zamreževanja. Da bi izboljšali stabilizacijo hidrogelnih kroglic in preprečili njihovo razpadanje v več ciklih, bi lahko uporabili naravne polimerne stabilizatorje, kot so hitozan, pektin ali modificiran škrob, ki bi okrepili strukturo in izboljšali njihovo odpornost na mehanske poškodbe med sušenjem in rehidriranjem. Raziskane alginatne kroglice kažejo velik potencial za industrijsko uporabo, zlasti kot sistemi za nadzorovano sproščanje hranilnih ali aktivnih snovi v biomedicini, kmetijstvu in drugih panogah. Njihova sposobnost absorpcije in postopnega sproščanja ponuja inovativne rešitve za farmacevtsko industrijo, trajnostno kmetijstvo in okoljske

aplikacije. Takšni materiali predstavljajo pomemben korak k razvoju pametnih dostavnih sistemov z optimizirano učinkovitostjo in zmanjšanim okoljskim odtisom.

SEZNAM LITERATURE IN VIROV

- [1] M. Bahram, N. Mohseni, M. Moghtader, M. Bahram, N. Mohseni, M. Moghtader, An Introduction to Hydrogels and Some Recent Applications, *Emerg. Concepts Anal. Appl. Hydrogels.* (2016). <https://doi.org/10.5772/64301>.
- [2] H. Chamkouri, A Review of Hydrogels, Their Properties and Applications in Medicine, *Am. J. Biomed. Sci. Res.* 11 (2021) 485–493. <https://doi.org/10.34297/AJBSR.2021.11.001682>.
- [3] S. Bashir, M. Hina, J. Iqbal, A.H. Rajpar, M.A. Mujtaba, N.A. Alghamdi, S. Wageh, K. Ramesh, S. Ramesh, *Fundamental Concepts of Hydrogels: Synthesis, Properties, and Their Applications*, *Polymers (Basel)*. 12 (2020) 2702. <https://doi.org/10.3390/POLYM12112702>.
- [4] Top 10 Applications of Hydrogels in Biomedical Field | Biopharma PEG, (2022). <https://www.biochempeg.com/article/244.html> (accessed January 23, 2025).
- [5] M.F. Akhtar, M. Hanif, N.M. Ranjha, Methods of synthesis of hydrogels ... A review, *Saudi Pharm. J. SPJ.* 24 (2015) 554. <https://doi.org/10.1016/J.JSPS.2015.03.022>.
- [6] P. Gadziński, A. Froelich, B. Jadach, M. Wojtyłko, A. Tatarek, A. Białek, J. Krysztofiak, M. Gackowski, F. Otto, T. Osmałek, Ionotropic Gelation and Chemical Crosslinking as Methods for Fabrication of Modified-Release Gellan Gum-Based Drug Delivery Systems, *Pharmaceutics*. 15 (2022) 108. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS15010108>.
- [7] A. Doderò, L. Pianella, S. Vicini, M. Alloisio, M. Ottonelli, M. Castellano, Alginate-based hydrogels prepared via ionic gelation: An experimental design approach to predict the crosslinking degree, *Eur. Polym. J.* 118 (2019) 586–594. <https://doi.org/10.1016/J.EURPOLYMJ.2019.06.028>.
- [8] Gelation process of alginate. Alginate dropped from an air droplet ... | Download Scientific Diagram, (2014). https://www.researchgate.net/figure/Gelation-process-of-alginate-Alginate-dropped-from-an-air-droplet-generator-into-a-CaCl2_fig4_264826259 (accessed April 4, 2025).
- [9] L. Zhao, Y. Zhou, J. Zhang, H. Liang, X. Chen, H. Tan, Natural Polymer-Based Hydrogels: From Polymer to Biomedical Applications, *Pharmaceutics*. 15 (2023) 2514. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS15102514>.
- [10] Chemical structure of the sodium alginate molecule. | Download Scientific Diagram, (2007). https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-the-sodium-alginate-molecule_fig2_228632739 (accessed January 27, 2025).
- [11] E. M. Ahmed, Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review, *J. Adv. Res.* 6 (2015) 105–121. <https://doi.org/10.1016/J.JARE.2013.07.006>.
- [12] C. Ouwerx, N. Velings, M.M. Mestdagh, M.A.V. Axelos, Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations, *Polym. Gels Networks*. 6 (1998) 393–408. [https://doi.org/10.1016/S0966-7822\(98\)00035-5](https://doi.org/10.1016/S0966-7822(98)00035-5).
- [13] Natrijev alginat (Sodium Alginate) - Futunatura.si, (2025). <https://www.futunatura.si/natrijev-alginat> (accessed January 27, 2025).

-
- [14] Kaj je natrijev alginat? - Sodobni gastronomski recepti, (2023). <https://recipes.specialingredientseurope.com/sl/kaj-je-natrijev-alginat/> (accessed April 4, 2025).
- [15] H. Malektaj, A.D. Drozdov, J. deClaville Christiansen, Swelling of Homogeneous Alginate Gels with Multi-Stimuli Sensitivity, *Int. J. Mol. Sci.* 24 (2023) 5064. <https://doi.org/10.3390/IJMS24065064/S1>.
- [16] Unlocking the Potential of Sodium Alginate in Hydrogel Production, (2020). <https://www.elflow.com/microfluidic-reviews/sodium-alginate-and-applications-a-review/> (accessed April 4, 2025).
- [17] Labtim - Termogravimetrična analiza TGA, (2025). <https://labtim.si/termicna-analiza/termogravimetricka-analiza-tga/> (accessed March 31, 2025).
- [18] P. Inc, Thermogravimetric Analysis (TGA) TGA 8000 TGA 4000 STA 6000 / STA 8000 The Thermogravimetric Instrument Family, (2025).
- [19] Žigon Majda, Hausberger Andreas, Preizkušanje in karakterizacija polimernih materialov in zagotavljanje kakovosti: Termične in termomehanske analize - 3. sklop predavanj, *Fak. Za Tehnol. Polim.* (2023).
- [20] FTIR Analysis | RTI Laboratories, (2025). <https://rtilab.com/techniques/ftir-analysis/> (accessed April 4, 2025).
- [21] Transmission FTIR Mode, FTIR Sampling Techniques | Agilent, (2025). <https://www.agilent.com/en/product/molecular-spectroscopy/ftir-spectroscopy/transmission-ftir-mode> (accessed April 4, 2025).
- [22] Optični mikroskop s kamero (Novex Holland, B series), (2025). <https://www.ftpo.eu/Raziskovalna-dejavnost/Raziskovalna-oprema/optični-mikroskop-s-kamero-novex-holland-b-series> (accessed March 31, 2025).
- [23] Optična mikroskopija, (2025). <https://www.fs.um.si/univerzitetni-center-za-elektronsko-mikroskopijo/opticna-mikroskopija/> (accessed April 4, 2025).
- [24] I.M. Savić Gajić, I.M. Savić, Z. Svirčev, Preparation and Characterization of Alginate Hydrogels with High Water-Retaining Capacity, *Polym.* 2023, Vol. 15, Page 2592. 15 (2023) 2592. <https://doi.org/10.3390/POLYM15122592>.

SEZNAM SLIK

Slika 1: Shema razvrstitve hidrogelov [1]	4
Slika 2: Shematski prikaz »egg-box« modela [8]	6
Slika 3: Kemijska struktura natrijevega alginata [10]	7
Slika 4: Shematski prikaz delovanja TGA aparature [19]	9
Slika 5: Shematski prikaz delovanja FTIR spektroskopije [21]	10
Slika 6: a.) Priprava 3 % raztopine natrijevega alginata, b.) zamreževanje alginatnih kroglic v raztopini CaCl ₂ in c.) sintetizirane hidrogelne alginatne kroglice	12
Slika 7: Alginatne kroglice a.) pred in b.) po sušenju na zraku	13
Slika 8: Liofilizirane kroglice	13
Slika 9: Drugi cikel nabrekanja alginatnih kroglic a.) sušenih na zraku in b.) sušenih v liofilizatorju	14
Slika 10: Termogravimetrični analizator	16
Slika 11: ATR-FTIR spektrometer	17
Slika 12: Optični mikroskop	17
Slika 13: Počene alginatne kroglice	18
Slika 14: Primerjava med a.) nepoškodovano in b.) počeno alginatno kroglico pod mikroskopom pri 20-kratni povečavi	18
Slika 15: Primerjava alginatnih kroglic v treh različnih stanjih – a.) sveža kroglica pred sušenjem, b.) kroglica posušena na zraku in c.) liofilizirana kroglica – pod optičnim mikroskopom pri 30-kratni povečavi	19
Slika 16: Kinetika zadrževanja vode alginatnih kroglic med prvim ciklom sušenja na zraku	20
Slika 17: Kinetika zadrževanja vode alginatnih kroglic med drugim ciklom sušenja na zraku	21
Slika 18: Kinetika nabrekanja alginatnih kroglic sušenih na zraku v prvem ciklu	22
Slika 19: Kinetika nabrekanja alginatnih kroglic sušenih na zraku v drugem ciklu	22
Slika 20: Kinetika nabrekanja liofiliziranih alginatnih kroglic v prvem ciklu	22
Slika 21: Kinetika nabrekanja liofiliziranih alginatnih kroglic v drugem ciklu	23
Slika 22: Kinetika zadrževanja vode alginatnih kroglic A3C0,5 (15 min) v vseh treh ciklih sušenja na zraku	24
Slika 23: Stopnja nabrekanja kroglic sušenih na zraku v vseh treh ciklih	25
Slika 24: Stopnja nabrekanja liofiliziranih kroglic v vseh treh ciklih	26

Slika 25: ATR-FTIR spekter alginatne kroglice A3C0,5 (15 min) sušene na zraku s karakterističnimi absorpcijskimi vrhovi funkcionalnih skupin	30
Slika 26: TGA krivulja liofiliziranih alginatnih kroglic A3C0,25 (1 h) s prikazom temperaturnih območij in stopenj razgradnje v odvisnosti od temperature	41
Slika 27: TGA krivulja liofiliziranih alginatnih kroglic A3C0,25 (15 min) s prikazom temperaturnih območij in stopenj razgradnje v odvisnosti od temperature	41
Slika 28: TGA krivulja liofiliziranih alginatnih kroglic A3C0,5 (30 min) s prikazom temperaturnih območij in stopenj razgradnje v odvisnosti od temperature	42
Slika 29: TGA krivulja liofiliziranih alginatnih kroglic A3C0,5 (1 h) s prikazom temperaturnih območij in stopenj razgradnje v odvisnosti od temperature	42
Slika 30: FTIR meritev za kroglico posušeno na zraku, ki se je zamreževala 1 uro v 0,25 % raztopini CaCl ₂	43
Slika 31: FTIR meritev za kroglico posušeno v liofilizatorju, ki se je zamreževala 1 uro v 0,25 % raztopini CaCl ₂	43
Slika 32: FTIR meritev za kroglico posušeno v liofilizatorju, ki se je zamreževala 15 minut v 0,5 % raztopini CaCl ₂	44
Slika 33: FTIR meritev za kroglico posušeno na zraku, ki se je zamreževala 30 minut v 0,5 % raztopini CaCl ₂	44
Slika 34: FTIR meritev za kroglico posušeno v liofilizatorju, ki se je zamreževala 30 minut v 0,5 % raztopini CaCl ₂	45
Slika 35: FTIR meritev za kroglico posušeno na zraku, ki se je zamreževala 1 uro v 0,5 % raztopini CaCl ₂	45
Slika 36: FTIR meritev za kroglico posušeno v liofilizatorju, ki se je zamreževala 1 uro v 0,5 % raztopini CaCl ₂	46

SEZNAM TABEL

Tabela 1: Pogoji sinteze vzorcev hidrogelov	11
Tabela 2: Odstotek izgube vode alginatnih kroglic med procesom liofilizacije	20
Tabela 3: Učinkovitost rehidracije (%) alginatnih kroglic sušenih na zraku	23
Tabela 4: Učinkovitost rehidracije (%) alginantih kroglic sušenih v liofilizatorju	23
Tabela 5: Odstotek izgube vode alginatnih kroglic A3C0,5 (15 min) v vseh treh ciklih sušenja s procesom liofilizacije	24
Tabela 6: Učinkovitost rehidracije (%) alginatnih kroglic A3C0,5 (15 min) sušenih v liofilizatorju in na zraku v treh zaporednih ciklih	26
Tabela 7: Indeks stabilnosti alginatnih kroglic A3C0,5 (15 min) sušenih v liofilizatorju in na zraku v treh zaporednih ciklih	27
Tabela 8: Zmanjšanje sposobnosti nabrekanja (%) alginatnih kroglic A3C0,5 (15 min) sušenih v liofilizatorju in na zraku v treh zaporednih ciklih	28
Tabela 9: Parametri termične razgradnje alginatnih kroglic določeni s TGA metodo	28
Tabela 10: Seznam karakterističnih absorpcijskih vrhov v FTIR spektru alginatnih kroglic	29
Tabela 11: Premeri alginatnih kroglic v različnih stanjih hidratacije	31

SEZNAM UPORABLJENIH SIMBOLOV

m - masa (g)

c - koncentracija raztopine (% w/v)

V - volumen (mL)

T_d - temperatura degradacije (°C)

SEZNAM UPORABLJENIH KRATIC

FTIR - Infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo in oslabljenim popolnim odbojem

ATR - tehnika oslabljene popolne odbojnosti

TGA - termogravimetrična analiza

PLGA - polilaktično-ko-glikolična kislina

PEG - polietilen glikol

PLLA - polilaktična kislina

PDLA - polid-laktična kislina

CaCl₂ - kalcijev klorid

CaCO₃ - kalcijev karbonat

RH - relativna vlažnost

SR - stopnja nabrekanja (*angl.* Swelling rate)

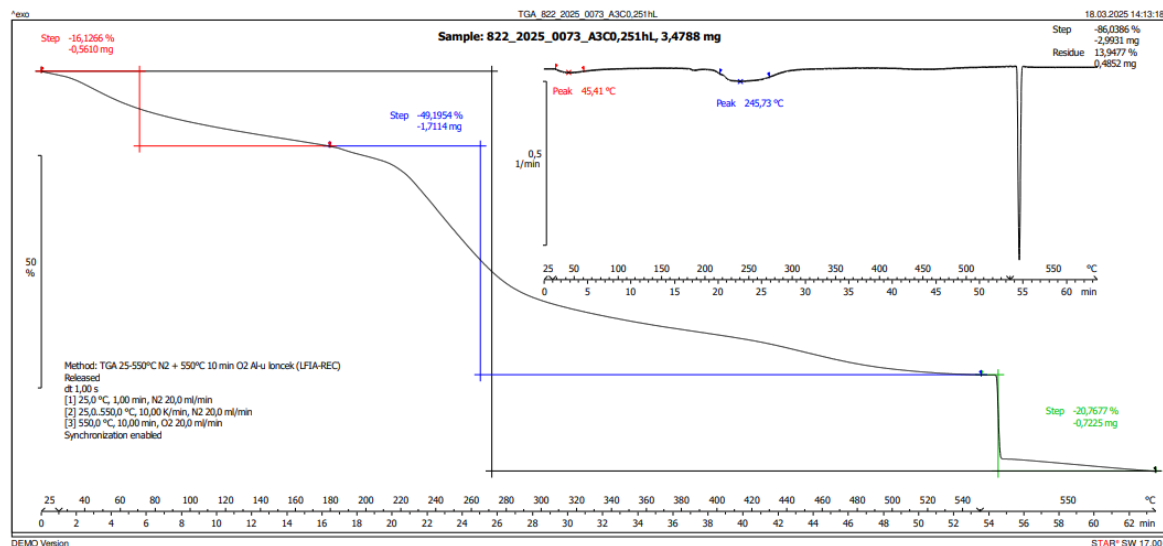
WRC - sposobnost zadrževanja vode (*angl.* Water retention capacity)

RE - učinkovitost rehidracije (*angl.* Rehydration efficiency)

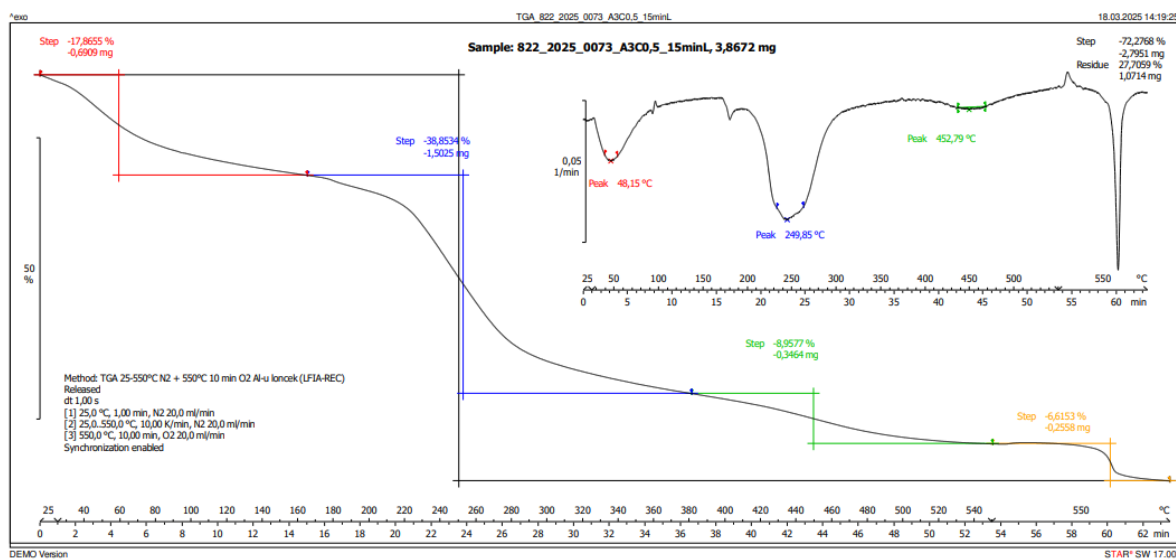
RSI - indeks stabilnosti za večkratno uporabo (*angl.* Reusability stability index)

SCR - zmanjšanje sposobnosti nabrekanja po n ciklih (*angl.* Swelling capacity reduction)

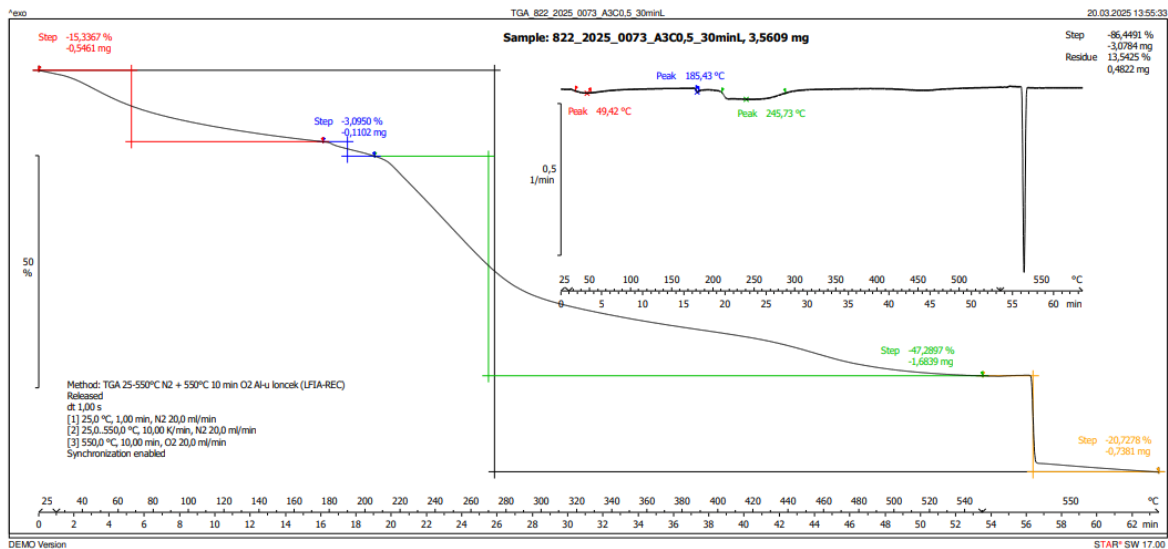
PRILOGE

Priloga 1: TGA krivulje analiziranih liofiliziranih kroglic z 0,25 % in 0,5 % raztopino CaCl₂ in z različnim časom zamreženja

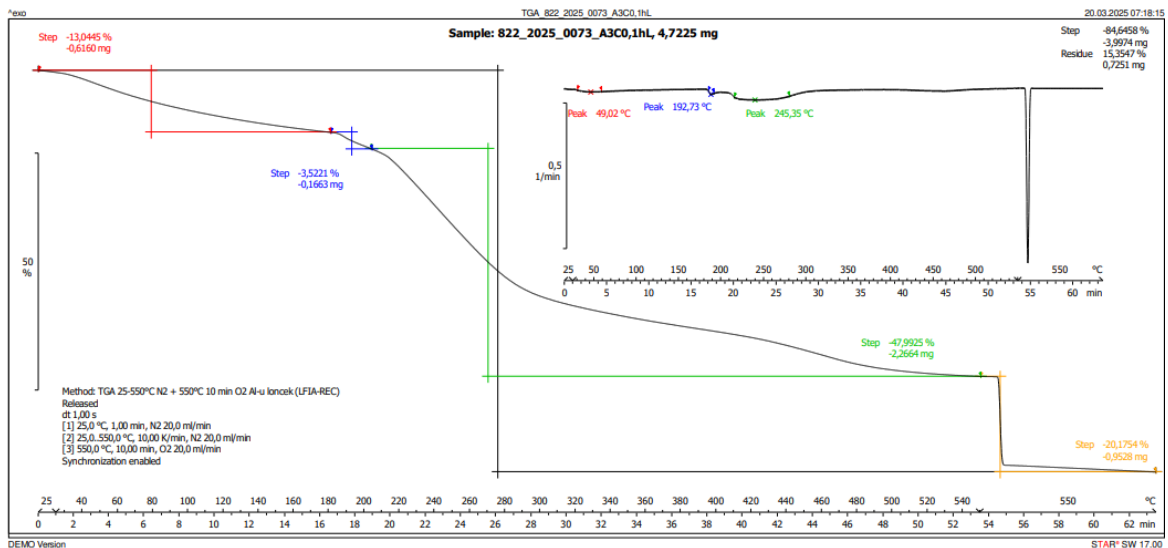
Slika 26: TGA krivulja liofiliziranih alginatnih kroglic A3C0,25 (1 h) s prikazom temperaturnih območij in stopenj razgradnje v odvisnosti od temperature



Slika 27: TGA krivulja liofiliziranih alginatnih kroglic A3C0,5 (15 min) s prikazom temperaturnih območij in stopenj razgradnje v odvisnosti od temperature

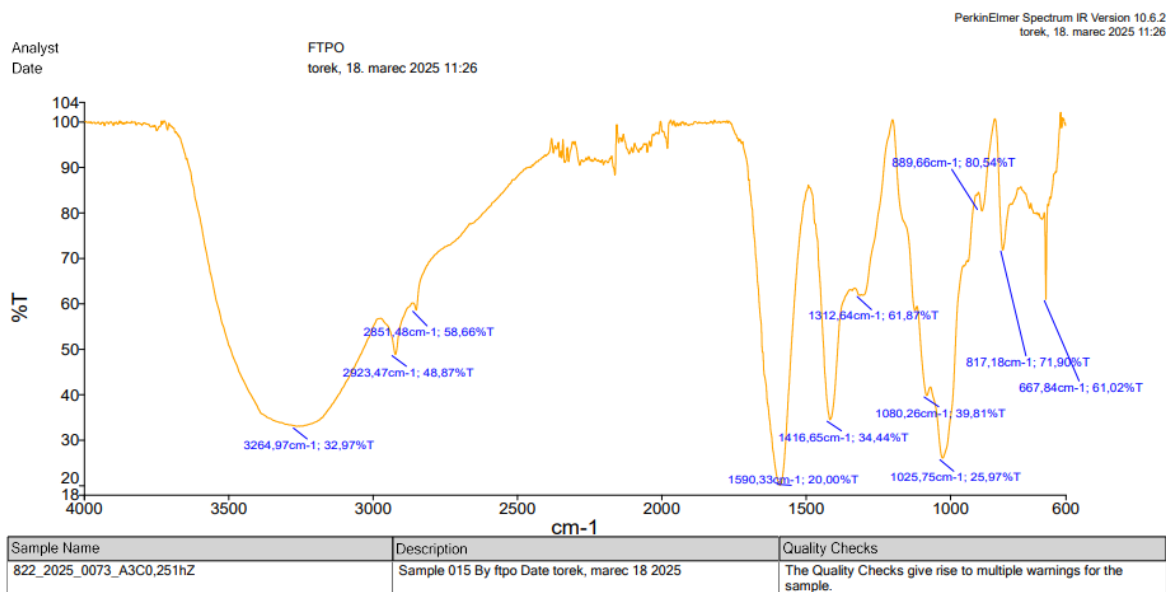


Slika 28: TGA krivulja liofiliziranih alginatnih kroglic A3C0,5 (30 min) s prikazom temperaturnih območij in stopenj razgradnje v odvisnosti od temperature

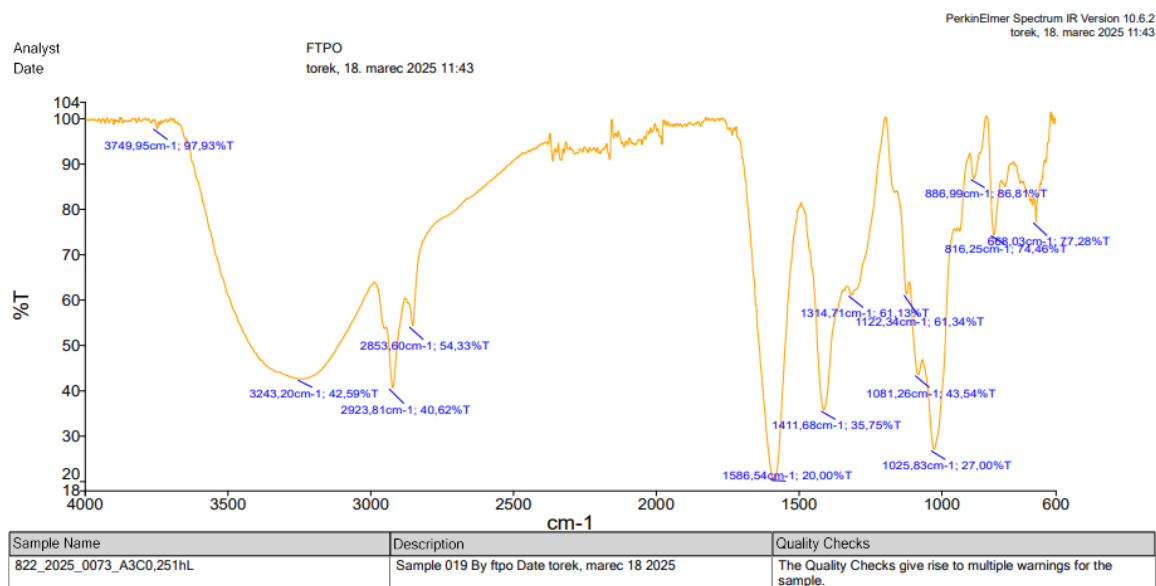


Slika 29: TGA krivulja liofiliziranih alginatnih kroglic A3C0,5 (1 h) s prikazom temperaturnih območij in stopenj razgradnje v odvisnosti od temperature

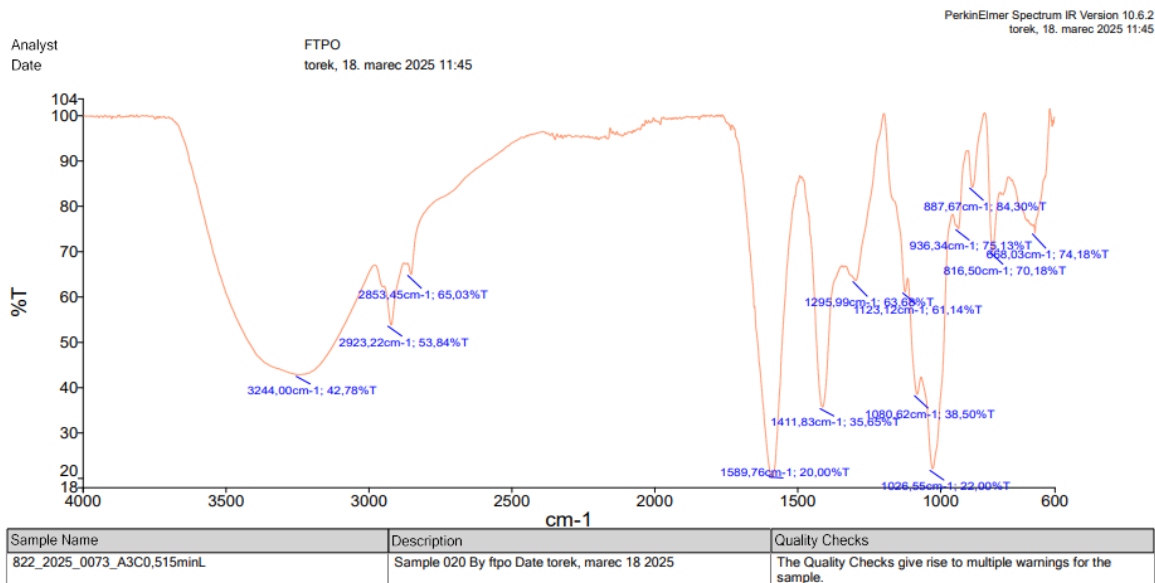
Priloga 2: FTIR meritve posameznih vzorcev



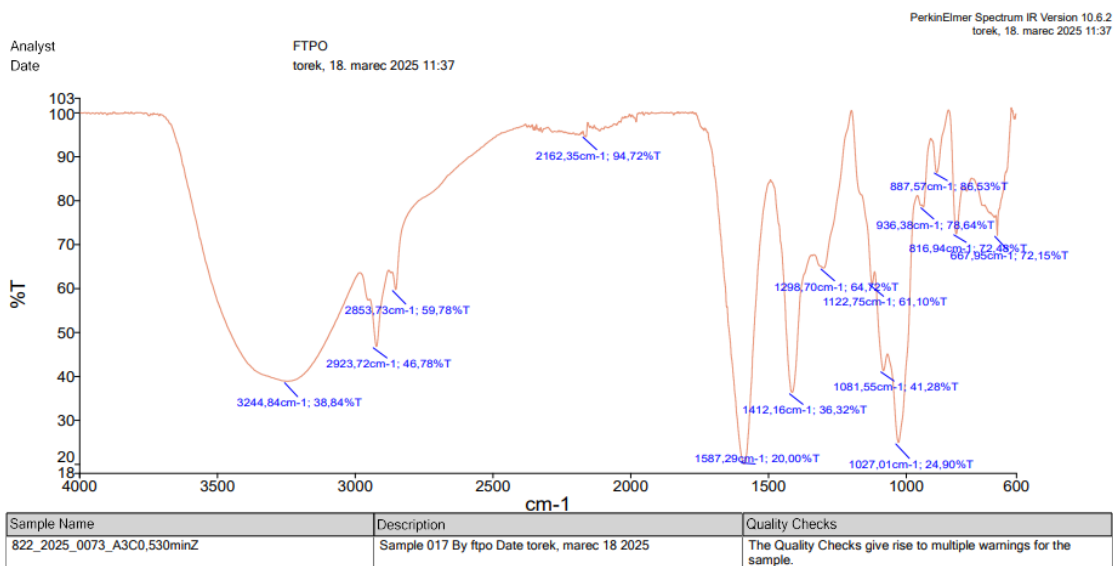
Slika 30: FTIR meritev za kroglico posušeno na zraku, ki se je zamreževala 1 uro v 0,25 % raztopini CaCl₂



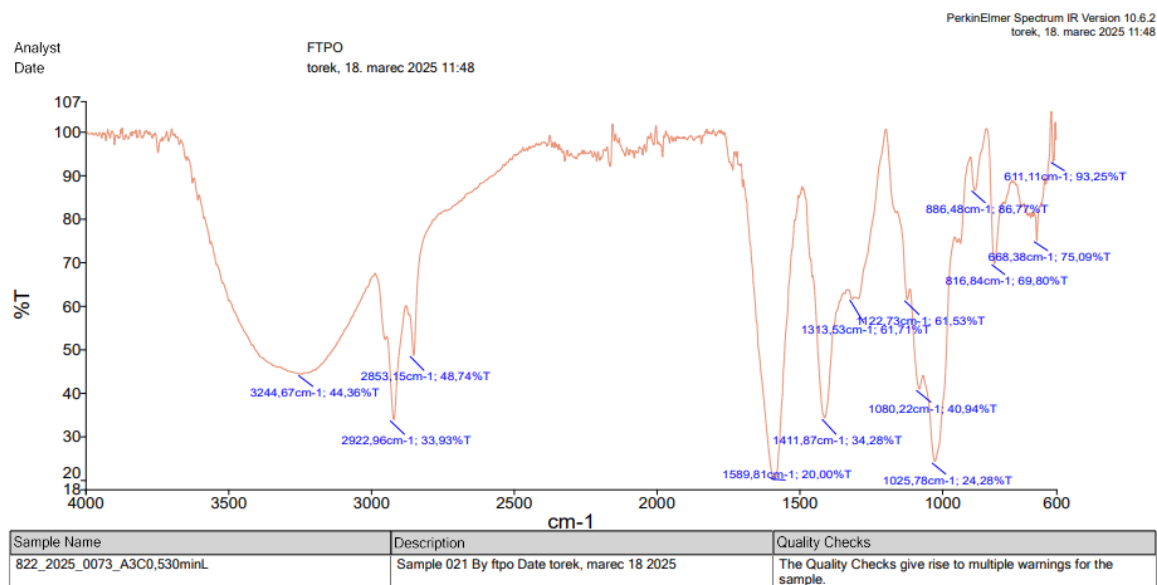
Slika 31: FTIR meritev za kroglico posušeno v liofilizatorju, ki se je zamreževala 1 uro v 0,25 % raztopini CaCl₂



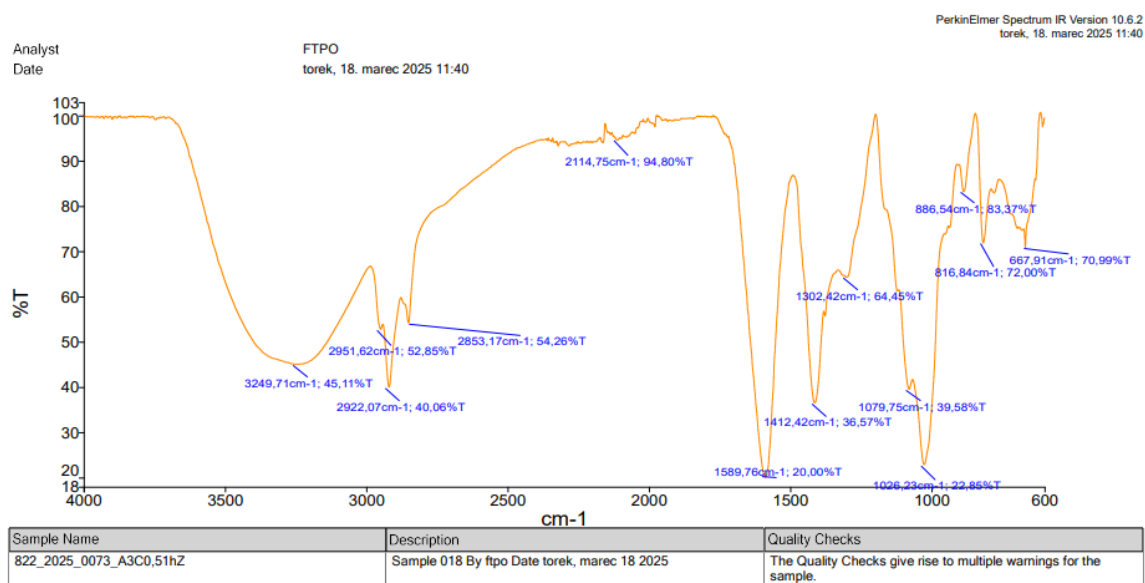
Slika 32: FTIR meritev za kroglico posušeno v liofilizatorju, ki se je zamreževala 15 minut v 0,5 % raztopini CaCl₂



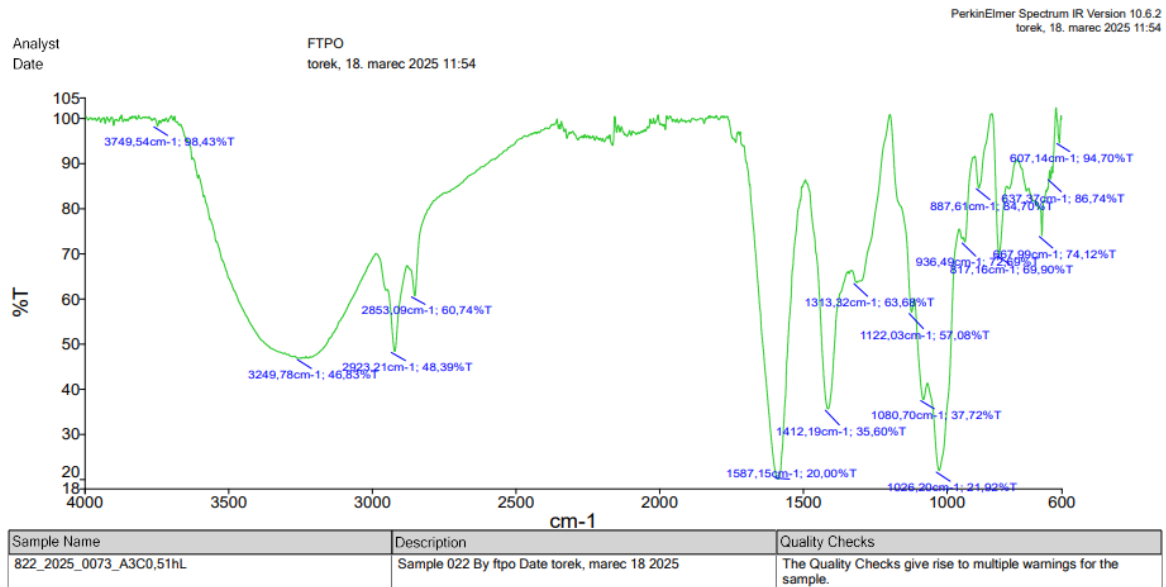
Slika 33: FTIR meritev za kroglico posušeno na zraku, ki se je zamreževala 30 minut v 0,5 % raztopini CaCl₂



Slika 34: FTIR meritev za kroglico posušeno v liofilizatorju, ki se je zamreževala 30 minut v 0,5 % raztopini CaCl_2



Slika 35: FTIR meritev za kroglico posušeno na zraku, ki se je zamreževala 1 uro v 0,5 % raztopini CaCl_2



Slika 36: FTIR meritev za kroglico posušeno v liofilizatorju, ki se je zamreževala 1 uro v 0,5 % raztopini CaCl₂