

# Elektrostatička ekstruzija kao disperziona tehnika za inkapsulaciju ćelija i biološki aktivnih supstanci

Ivana T. Kostić<sup>1</sup>, Bojana D. Isailović<sup>1</sup>, Verica B. Đorđević<sup>1</sup>, Steva M. Lević<sup>2</sup>, Viktor A. Nedović<sup>2</sup>, Branko M. Bugarski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univerzitet u Beogradu, Tehnološko–metalurški fakultet, Beograd, Srbija

<sup>2</sup>Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd, Srbija

## Izvod

Uprkos širokom spektru moguće primene mikroinkapsulacije u medicini, farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji, literaturni podaci o disperzionim tehnikama koje se koriste u te svrhe su vrlo oskudni. U ovom radu istaknut je značaj elektrostatičke ekstruzije za inkapsulaciju ćelija i bioaktivnih komponenti u hidrogel mikročestice. Elektrostatička ekstruzija je jednostavna, precizna, efikasna i ekonomski isplativa metoda, a optimizacijom nekoliko procesnih parametara moguće je dobiti uniformne čestice sa inkapsuliranim biološkim materijalom željenog prečnika (100–1000  $\mu\text{m}$ ). Budući napori u razvoju ove disperzione tehnike trebalo bi da budu usmereni ka uvećanju razmera procesa.

**Ključne reči:** disperzione tehnike; elektrostatička ekstruzija; imobilizacija ćelija; hidrogel mikročestice.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

Mikroinkapsulacija se može definisati kao proces koji uključuje potpuno obuhvatanje ćelija, enzima i biološki aktivnih supstanci unutar definisanih poroznih, polupropusnih materijala korišćenjem različitih tehnika, tako da nastaju čestice veličine 1–1000  $\mu\text{m}$  [1]. Inkapsulacijom ćelija se omogućava izvođenje kontinualnih procesa bez rizika da će doći do njihovog ispiranja i postiže efikasna zaštita ćelija od mehaničkih, torzionih i smicajnih sila, što je neophodno u procesima u kojima učestvuju vrlo osetljive ćelije sisara, insekata, biljaka. Inkapsulacijom biološki aktivnih supstanci, povećava se stabilnost i omogućava postizanje produženog i/ili kontrolisanog dejstva.

Već više od pola veka, mikroinkapsulacija ima veoma važnu ulogu u poljoprivredi, hemijskoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Tako je pokazano da se postupak inkapsulacije može koristiti za izvođenje različitih procesa u oblasti proizvodnje hrane i aditiva [2], fermentisanih pića [3–5], aminokiselina, organskih kiselina i drugih hemijskih supstanci [6], farmaceutskih proizvoda [7] koji treba da obezbede kontrolisano otpuštanje lekovitih supstanci [8] i zaštiti životne sredine [9]. Poslednjih decenija tehnologija inkapsulacije sve veći značaj dobija i u biomedici i oblasti inženjerstva tkiva i organa, npr. pankreasa [10,11], kože [12], hrskavice [13], srca [14], i krvnih sudova [15]. Za inkapsulaciju se može koristiti široki spektar materijala, ali najveću primenu u opisanim procesima imaju siste-

PREGLEDNI RAD

UDK 544.773.432:66

Hem. Ind. 66 (4) 505–517 (2012)

doi: 10.2298/HEMIND111209013K

mi hidrogel čestica sferičnog oblika, dobijeni od različitih prirodnih i/ili sintetičkih polimera [16].

U industriji kao što su prehrambena, hemijska, farmaceutska i industrija kozmetike, osnovni preduslov za uspešnu primenu inkapsulacije u proizvodnji je ekonomičnost procesa, ali za primenu u medicini i farmaceutsko-biotehničkim procesima kriterijumi su nešto stroži. Metodologija koja se koristi za proizvodnju mikrokapsula/mikročestica za primenu u biomedici i biotehničkim procesima pre svega mora imati mogućnost da proizvede homogene čestice sferičnog oblika, malih veličina i sa uskom raspodelom veličine, pod sterilnim uslovima. Prečnik čestica i sferičnost utiču na karakteristike prenosa mase kroz česticu [17], kao na primer u slučaju oslobađanja inkapsulirane supstance [18]. Prilikom inkapsulacije živih ćelija, kontrolisana veličina mikročestica je neophodna za uspostavljanje normalnog ćelijskog rasta i metabolizma [19]. Na primer, nedostatak nutrijenata, kao što je kiseonik, u unutrašnjosti mikročestice u kojoj su inkapsulirane ćelije, dovodi do pada ćelijske vijabilnosti [20,21]. Pored navedenih kriterijuma, tehnika za inkapsulaciju za primenu u medicini i farmaceutsko-biotehničkim procesima bi trebalo da obezbedi visoku efikasnost inkapsulacije i mogućnost procesuiranja različitih materijala za inkapsulaciju.

U poslednje dve decenije, značajno mesto u proizvodnji mikročestica sa inkapsuliranim materijalom zauzele su ekstruzione tehnike usled relativno jednostavnog pristupa proizvodnje mikročestica. Razvijene tehnike iz ove grupe obuhvataju metodu ukapavanja, metodu ukapavanja uz primenu sekundarnog toka vazduha [22,23], vibracionu metodu [24,25], metodu raspršivanja pomoću rotirajućeg ravnog diska [26], metodu pre-

Prepiska: B. Bugarski, Tehnološko–metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Karnegijeva 4, Beograd, Srbija.

E-pošta: [branko@tmf.bg.ac.rs](mailto:branko@tmf.bg.ac.rs)

Rad primljen: 9. decembar, 2011

Rad prihvaćen: 1. februar, 2012

secanja mlaza [27] i elektrostatičku ekstruziju [28-30]. Međutim, nijedna od razvijenih disperzionih tehnika za inkapsulaciju ne može u potpunosti da ispuni sve kriterijume. Pregled navedenih tehnika za inkapsulaciju prema kriterijumima koji su važni za širu primenu je prikazan u tabeli 1.

U ovom radu je posebno istaknuta elektrostatička ekstruzija, kao disperziona metoda koja se zasniva na primeni elektrostatičke sile. Devedesetih godina 20. veka, elektrostatička ekstruzija se među disperzionim ekstruzionim tehnikama izdvojila kao tehnika kojom se na relativno jednostavan način mogu proizvesti čestice mikronskih veličina, i koja predstavlja pogodan način za imobilizaciju biološkog materijala, uključujući žive ćelije, što je opisano od strane nekoliko autora [29,31,32]. Biće izložen kratak pregled rezultata ispitivanja mehanizma nastajanja čestica i uloge parametara u kontroli veličine čestica dobijenih tehnikom elektrostatičke ekstruzije. Pored toga, biće opisani primeri koji ilustruju mogućnosti primene ove disperzione tehnike.

### ELEKTROSTATIČKA EKSTRUZIJA

Devedesetih godina 20. veka učinjeni su prvi koraci u dobijanju mikročestica sa inkapsuliranim biokatalizatorom postupkom elektrostatičkog dispergovanja rastvora polimera, kada su veliki doprinosi u upoznavanju

naučne javnosti sa ovom inkapsulacionom metodom dali autori Kešavarc, Ponsel i Bugarski [29,31,32]. Elektrostatička ekstruzija je disperziona metoda koja se zasniva na primeni elektrostatičke sile koja deluje na površinu meniskusa rastvora polimera na vrhu igle/kapilare, usled čega dolazi do generisanja velikog broja kapljica, koje formiraju mikročestice u tzv. rastvoru za očvršćavanje. Osnovne delove jedne takve aparature (slika 1) sačinjavaju: pumpa (1) kojom se rastvor polimera ili suspenzija ćelija u rastvoru polimera može istiskivati različitim protocima iz rezervoara (2) kroz kapilaru ili iglu od nerđajućeg čelika (3), koja može biti različitog prečnika. Elektrostatički potencijal koji može biti konstantan ili pulsni, primenjuje se između kapilare (igle) i rastvora u kome se sakupljaju čestice (4), korišćenjem generatora visokog napona (5), a rastojanje između vrha kapilare (igle) i rastvora za sakupljanje čestica moguće je varirati.

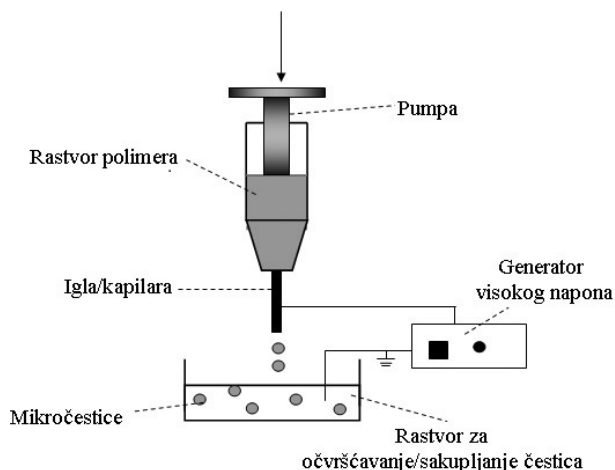
Glavna karakteristika ove metode je postepeno smanjenje prečnika kapljica sa povećanjem primenjenog elektrostatičkog potencijala  $U$ , do neke vrednosti kritičnog elektrostatičkog potencijala  $U_c$  (slika 2). Pri kritičnom elektrostatičkom potencijalu  $U_c$  dolazi do formiranja nestabilnog mlaza rastvora polimera, koji se fragmentiše u mnoštvo naelektrisanih kapljica koje se sakupljaju u rastvoru za očvršćavanje gde dolazi do formiranja čestica [30].

Tabela 1. Poređenje disperzionih ekstruzionih tehnika prema mogućnostima da zadovolje kriterijume o 1) karakteristikama dobijenih čestica i 2) karakteristikama tehnika; ✓ – u skladu sa kriterijumima, ✗ – nije u skladu sa kriterijumima

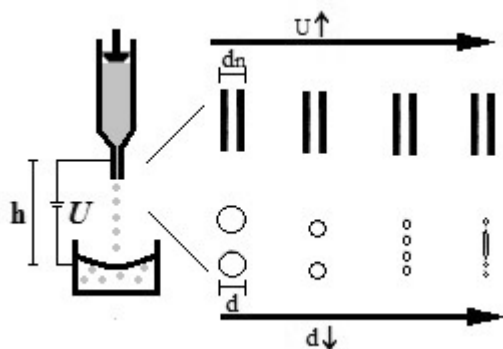
Table 1. Comparison of different dispersion techniques on their capabilities to meet the criteria outlined. The criteria are divided into 1) required characteristics of the produced microbeads and 2) required features of the technique

Kriterijum	Metoda ukapavanja	Elektrostatička ekstruzija	Metoda ukapavanja uz dejstvo sekundarnog toka vazduha	Vibraciona metoda	Metoda presecanja mlaza	Metoda raspršivanja pomoću rotirajućeg ravnog diska
Karakteristike dobijenih čestica						
Monodisperzne	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Sferičnog oblika	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Prečnik do 100 μm i manje	✗	✓	✗	✓	✗	✗
Odstupanje od prosečne veličine <±5%	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Karakteristike tehnike						
Relativno jednostavna aparatura i lako izvođenje <sup>a</sup>	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Visoka efikasnost <sup>b</sup>	✓	✓	✓	✓	✗	✗
Produktivnost >1 g/s	✗	✗	✗	✗	✓	✓
Sposobnost ekstruzije viskozih rastvora (> 3000 mPas na 25 °C)	✗	✗	✗	✗	✓	✓
Proizvodnja čestica širokog opsega veličina	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Izvođenje pod sterilnim uslovima	✓	✓	✓	✓	✓	✓

<sup>a</sup>Ne zahteva stručnjake za stalno podešavanje, opširno obučavanje i nadzor nad upravljanjem procesom; <sup>b</sup>bez velikog gubitka materijala koji se inkapsulira



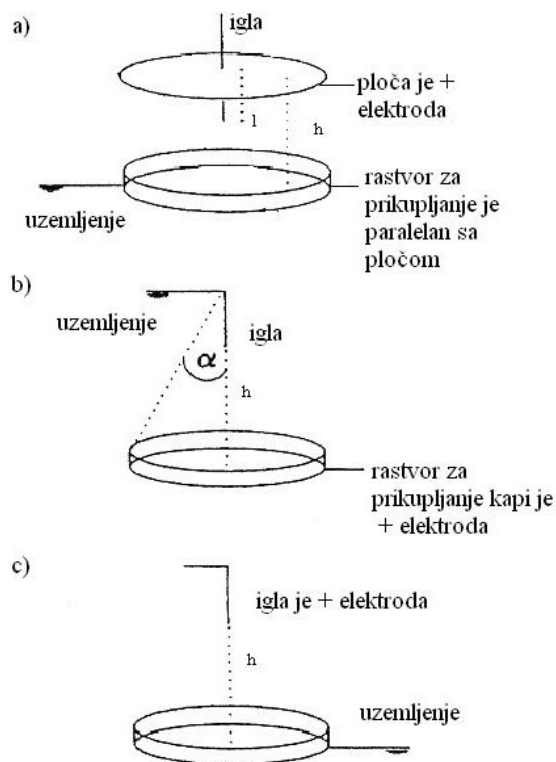
Slika 1. Šematski prikaz osnovnih delova aparature za izvođenje elektrostatičke ekstruzije.  
Figure 1. Schematic diagram of the experimental set-up for electrostatic extrusion.



Slika 2. Šematski prikaz smanjenja prečnika kapljica,  $d$ , sa povećanjem elektrostatičkog potencijala,  $U$ .  
Figure 2. Schematic illustration of the evolution of the pendant droplet formation and droplet size,  $d$ , as a function of the applied electrostatic potential,  $U$ .

U toku dosadašnjih istraživanja, opisane su tri različite geometrije sistema za elektrostatičku ekstruziju [29,33,34], prikazane na slici 3. Slika 3a predstavlja geometriju paralelnih ploča („plane parallel“), gde je pozitivno naelektrisanje primenjeno na ploču koja je postavljena paralelno sa posudom u kojoj se nalazi rastvor za očvršćavanje. Kroz sredinu ploče je postavljena igla. Posuda u kojoj se nalazi rastvor za očvršćavanje je uzemljena i istih je dimenzija kao i pozitivno naelektrisana ploča. Ovaj sistem proizvodi uniformno elektrostatičko polje u istom pravcu u kome deluje i gravitaciona sila. Slika 3b predstavlja geometriju u kojoj je pozitivno naelektrisan rastvor za očvršćavanje, a igla je povezana sa uzemljenjem, dok slika 3c predstavlja geometriju u kojoj je pozitivno naelektrisana igla („point plane“), a rastvor za očvršćavanje uzemljen. Suprotan polaritet elektroda, gde je igla negativno naelektrisana je primenjen samo u slučaju alginata [30], dok je za druge vrste materijala, prema dosadašnjim literaturnim podacima,

korišćena isključivo konfiguracija elektroda koja podrazumeva pozitivno naelektrisanu iglu [35,36].



Slika 3. Različite geometrije sistema za elektrostatičku ekstruziju: a) geometrija paralelnih ploča; b) rastvor za prikupljanje čestica je pozitivna elektroda, a igla uzemljena; c) igla je pozitivna elektroda, a rastvor za očvršćavanje je uzemljen ( $h$  – rastojanje između elektroda,  $l$  – rastojanje između vrha igle i pozitivne elektrode).

Figure 3. Different electrode geometry: a) „plane-parallel“ electrode system, b) collecting solution represent positively charged electrode, while needle is grounded, c) „point-plane“ electrode system.

Pokazalo se da su ponašanje opisanog sistema i mehanizam formiranja čestica veoma kompleksni. U prethodnim ispitivanjima [29,30,37–39] predloženi su različiti teorijski modeli i iako uvek nisu data adekvatna objašnjenja eksperimentalnih zapažanja, ipak je omogućeno bolje razumevanje uloge procesnih parametara.

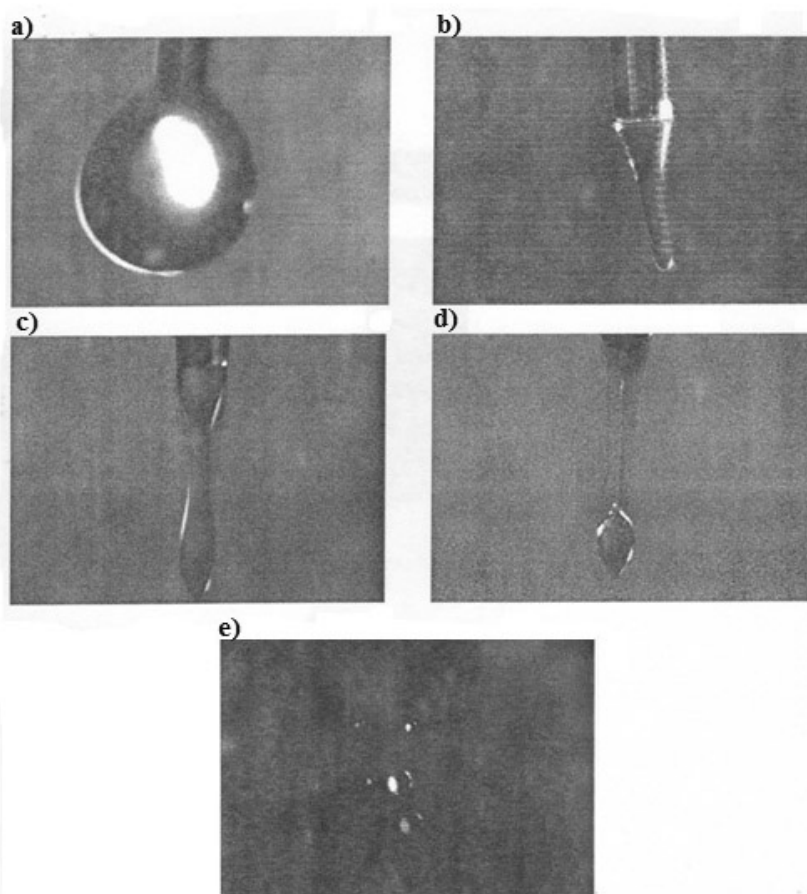
### Mehanizam formiranja kapljica elektrostatičkom ekstruzijom

Prvi koraci u razumevanju mehanizma koji leži u osnovi postupka elektrostatičke ekstruzije, datiraju sa početka 20. veka, kada je Zeleni [40] definisao kriterijum za prekid mlaza tečnosti koji ističe iz kapilare u elektrostatičkom polju. Vonegut i Nojbauer [41] koristeći princip minimuma energije, odredili su najverovatnije specifično naelektrisanje kapljice, usled binarne fisije. Problem fisije je dalje razmatran od strane Dojla i saradnika [42], Grigorojeva i Širjajeve [43] i Gomeza i Tanga [44]. Gomez i Tang [44] zapazili su da se pribli-

žavanjem Rejljevom limitu, kapljica deformiše i emituje niz od nekoliko manjih kapljica, čime se redukuje naelektrisanje glavne kapi bez značajnog smanjenja njene mase.

Devedesetih godina 20. veka, sa pojavom prvih istraživanja u vezi sa elektrostatičkom ekstruzijom zasnovana je klasifikacija režima isticanja rastvora polimera, na osnovu vizuelnih zapažanja geometrijskog oblika meniskusa tečnosti i promena ponašanja struje tečnosti iz mlaza u kapljice. Mehanizam formiranja kapljica elektrostatičkom ekstruzijom je opisan od strane Bugarskog i saradnika, Ponselea i saradnika, Sia i Vanga, Al Hajrija i saradnika, Amsdena i Gusena [29,30,45–47]. Kako je većina navedenih autora u eksperimentalnim ispitivanjima koristila alginat kao nosač za inkapsulaciju, tako će i mehanizam formiranja kapljica elektrostatičkom ekstruzijom biti opisan upravo u slučaju primene ovog polimera.

U odsustvu elektrostatičkog polja (slika 4a), samo pod dejstvom gravitacione sile, alginatna kap koja se formira na vrhu igle raste sve do momenta kada njena težina postaje veća od ukupne vertikalne komponente površinskog napona. Tog momenta, kap prečnika  $d_0$  se otkida i pada u rastvor za očvršćavanje. Primenom elektrostatičkog polja, dolazi do promene oblika meniskusa na vrhu igle koji prelazi iz oblika sfere u oblik razvučene obrnute kupe (slika 4b), poznate kao Tejlorova kupa (Taylor cone) [48,49]. Kada naelektrisanje akumulirano na vrhu kupe nadmaši silu površinskog napona, formira se suženje u obliku „vlakna“ (odnosno „vrata“) (slike 4c i 4d) [29]. Mehanizam formiranja kapi viskoznog rastvora polimera pod dejstvom elektrostatičkog polja, kao što je rastvor alginata, razlikuje se od mehanizma nastajanja kapi tečnosti koja ima nekoliko puta manju viskoznost (kao što je voda) pod dejstvom elektrostatičkog polja iste jačine, upravo u fenomenu izdu-



Slika 4. Mehanizam formiranja kapljica na vrhu igle pri ekstruziji rastvora alginata koncentracije 1,5 mas.%, a) bez primene elektrostatičkog polja, b), c), d) pri primeni elektrostatičkog potencijala od 4 do 5 kV, rastojanje između elektroda 2,5 cm, prečnik igle 0,64 mm, protok polimera 36 ml/h; b) formiranje meniskusa u obliku obrnute kupe; c) formiranje vlakna polimera; d) dodatno izduživanje vlakna polimera; e) otkidanje kapljica (slika preuzeta iz [29] uz dozvolu John Wiley & Sons, Inc. Copyright ©1994 American Institute of Chemical Engineers).

Figure 4. Electrostatic droplet formation at the needle tip with 1.5% (w/w) sodium alginate: without applied potential a) and at applied potentials between 4 and 5kV, electrode distance 2.5 cm, needle diameter 0.64 mm, flow rate 36 ml/h; b) formation of inverted cone-like meniscus; c) neck formation; d) stretching of the liquid filament; e) brake up of the liquid filament (this material is reproduced with permission of John Wiley & Sons, Inc. from [29]. Copyright ©1994 American Institute of Chemical Engineers).

živanja tečnosti u obliku „vlakna“. Na primer, za rastvor alginata koncentracije 1,5 mas.% izduženje „vlakna“ pre otkidanja iznosi do 1 mm (pri elektrostatičkom potencijalu 4–5 kV, rastojanju između elektroda 2,5 cm, prečniku igle 0,64 mm, protoku polimera 36 ml/h) [29]. Što je viskoznost rastvora veća, to je veće izduženje „vlakna“ tečnosti. „Vlakno“ tečnosti se sve više izdužuje i istanjuje. Na mestu najvećeg suženja „vlakna“ (<100 μm u prečniku) dolazi do otkidanja polimera i generisanja većeg broja manjih kapljica (slika 4e). Dok se glavni deo „vlakna“ tečnosti brzo formira u novu kap, izduženi deo se razbija u veliki broj manjih kapi. U jačem elektrostatičkom polju, opisano „vlakno“ tečnosti se više izdužuje u odnosu na „vlakno“ tečnosti u slabijem elektrostatičkom polju stvarajući na taj način dodatni „oblak“ finih kapljica, što je posebno izraženo kod viskoznih rastvora. Merenjem veličine dobijenih kapljica uočeno je da raspodela veličine kapi nije uvek unimodalna i da često nastaje bimodalna ili multimodalna raspodela veličina [29,37], što je posledica samog procesa formiranja kapi iz meniskusa tečnosti. Ovo jasno ukazuje na značaj podešavanja procesnih parametara za svaki pojedinačni sistem nosač–materijal za inkapsulaciju, primenom postupka elektrostatičke ekstruzije.

Prosečna veličina kapljica dobijenih elektrostatičkom ekstruzijom je određivana teorijskim analizama, koje su našle potvrdu u eksperimentalnim rezultatima. Teorijski modeli predstavljeni jednačinama za određivanje veličine kapljica su predloženi od strane više autora [38,50,51]. Većina teorija koje su razvili ovi autori, sa manjim ili većim razlikama, tumačenje zasniva na kinetičkom odnosu karakterističnog vremena formiranja kapljice i karakterističnog vremena adsorpcije površinski aktivnih molekula korišćenog polimera na površini kapljice. Poncelet i saradnici [50] odredili su kritični potencijal  $U_c$  na vrhu igle elektrostatičkog ekstrudera (jednačina (1)), pri kome počinje da se formira nestabilni mlaz rastvora polimera i počinju da se stvaraju mikroskopske naelektrisane kapljice:

$$U_c = \sqrt{\frac{d_c \sigma_1}{k \varepsilon_0}} \quad (1)$$

gde je  $d_c$  unutrašnji prečnik igle,  $\sigma_1$  površinski napon rastvora polimera,  $\varepsilon_0$  dieletrična konstanta vazduha, a  $k$  parametar čija vrednost zavisi od odnosa karakterističnog vremena adsorpcije makromolekulske površinski aktivne komponente (polimera) na površini kapi i vremena formiranja kapi. Pokazano je da kritični potencijal,  $U_c$ , zavisi od brojnih parametara uključujući unutrašnji prečnik igle, rastojanje između elektroda, površinski napon rastvora polimera, kao i njegovu viskoznost i protok, koeficijent difuzije površinski aktivnih molekula, polaritet primenjenog elektrostatičkog potencijala i geometriju ekstruzionog uređaja [50]. Zavis-

nost prečnika kapljice od električnog napona može se prikazati jednačinom [50]:

$$d = d_0 \sqrt[3]{1 - \left( \frac{U^2}{U_c^2} \right)} \quad (2)$$

gde je  $d_0$  prečnik kapljice u odsustvu elektrostatičkog polja ( $U = 0$ ). Eksperimentalni rezultati mnogih autora, pokazuju dobro slaganje upravo sa ovim teorijskim modelom [33,37,38].

#### Uticaj procesnih parametara na veličinu čestica

Danas je poznato da veličina i druge karakteristike mikročestica dobijenih elektrostatičkom ekstruzijom predstavljaju kompleksnu funkciju nekoliko procesnih parametara, kao i karakteristika samog ekstruzionog uređaja i rastvora polimera. Bugarski i saradnici [29] među prvima su izvršili opsežno ispitivanje specifičnog uticaja svakog pojedinačnog parametra na veličinu čestica, kao i efikasnost inkapsulacije, s ciljem optimizacije metode elektrostatičke ekstruzije za dobijanje uniformnih čestica željene veličine sa imobilisanim materijalom. Treba istaći da je do danas najviše znanja i iskustva o uticaju procesnih parametara i primeni elektrostatičke ekstruzije stečeno primenom alginata kao matriksa za inkapsulaciju [29,30,37,38].

Izuzev elektrostatičkog potencijala, koji predstavlja glavnu karakteristiku postupka elektrostatičke ekstruzije, kako je već objašnjeno, još tri parametra mogu se izdvojiti kao parametri koji značajno utiču na veličinu dobijene čestice, a to su protok rastvora polimera koji se koristi za inkapsulaciju, prečnik igle (kapilare) i tip geometrije ekstruzionog uređaja.

Povećanje protoka dovodi do povećanja veličine dobijenih alginatnih čestica, tako što se povećava količina površinski aktivnih molekula koji se kreću ka površini kapljice, samim tim i površinski napon [30]. Smanjenje prečnika igle (kapilare) vodi formiranju manjih čestica (slika 5), s tim da smanjenje prosečnog prečnika finalne čestice na taj način, zavisi i od karakteristika materijala koji se inkapsulira (npr. prosečni prečnik ćelija, molarna masa proteina i sl.) i pada pritiska kroz iglu [47].

Promenom koncentracije rastvora alginata, menja se viskoznost rastvora, pa kako je prethodno opisano promenom mehanizma formiranja kapljica rastvora polimera različite viskoznosti, menja se i prečnik finalno dobijenih čestica (slika 5).

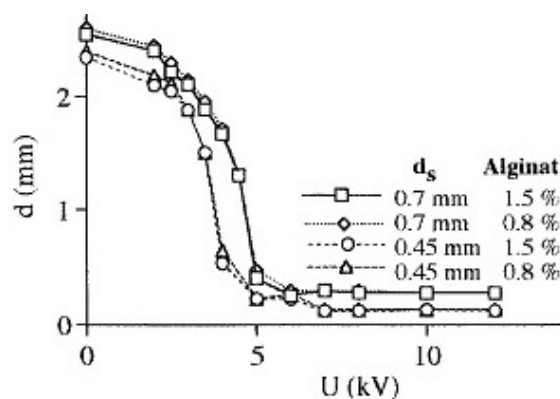
Važno je istaći da i geometrija ekstruzionog uređaja, pored toga što direktno utiče na veličinu čestice, menja uticaj gore navedenih parametara na veličinu formirane čestice [29,31]. Tako je pokazano [29,38] da kod sistema gde elektrode predstavljaju paralelene ploče („plane-parallel“ sistem), pri konstantnoj vrednosti elektrostatičkog potencijala, smanjenje rastojanja između elektroda dovodi do značajnog smanjenja prečnika čes-

tica, za razliku od sistema kod koga je naelektrisanje jedne elektrode skoncentrisano u tački (vrh igle), a naelektrisanje druge elektrode površinski raspoređeno („point-plane“ sistem), gde se takav efekat ne primećuje. Razlike u ponašanju ekstruzionih uređaja različite geometrije elektroda, najverovatnije potiču od različitog načina akumulacije naelektrisanja na kapljici rastvora alginata. Kod „point-plane“ rasporeda elektroda, površinsko naelektrisanje kapljice je pod snažnim uticajem elektrode direktno povezane sa iglom, pa će električno naelektrisanje na vrhu kupe koju obrazuje rastvor alginata brzo dostići Rejljev limit naelektrisanja, kada dolazi do otkidanja kapljice sa vrha igle [52]. Kod „plane-parallel“ sistema elektroda, ukupno naelektrisanje kapljice je manje nego u prethodnom slučaju i daleko manje od vrednosti Rejljevog limita, pa je otkidanje kapi rastvora alginata, najvećim delom kontrolisano ravnotežom spoljašnjih sila. Smanjenje rastojanja između elektroda kod sistema elektroda paralelnih ploča, dovodi do proporcionalnog povećanja elektrostatičke sile, i tako posledično uzrokuje smanjenje prečnika kapljice. Kao primer za ilustraciju, mogu se navesti rezultati Bugarskog i saradnika [29]: pri primeni igle prečnika 0,64 mm, koncentraciji rastvora alginata od 1,5 mas.% i elektrostatičkom potencijalu od 10 kV, smanjenje rastojanja sa 4,8 na 2,5 cm je dovelo do smanjenja srednjeg prečnika alginatnih čestica sa 1500  $\mu\text{m}$  na 350  $\mu\text{m}$ . Takođe, treba istaći da je od strane iste grupe autora primećeno da u gore opisanom sistemu, povećanje električnog potencijala iznad 12 kV i dalje smanjenje rastojanja između elektroda, ne dovodi do formiranja manjih čestica. Verovatno objašnjenje te pojave je električno pražnjenje (tzv. „corona“ efekat) između elektroda, praćeno varničanjem, kao rezultat jonizacije vazduha u prostoru između elektroda [29].

Proces dobijanja čestica iz formiranih kapi obuhvata i njihovo očvršćavanje u rastvoru za geliranje, što dodatno povećava broj faktora koji mogu uticati na finalne karakteristike i veličinu nastalih čestica. Tako je jedan deo istraživanja o dobijanju alginatnih čestica elektrostatičkom ekstruzijom, još od samog početka korišćenja ove metode, bio usmeren i na ispitivanje uticaja koncentracije i sastava rastvora alginata, kao i koncentracije dvovalentnih katjona neophodnih za geliranje, na fizičko-hemijske karakteristike čestica.

Alginati, prirodni linearni polisaharidi, spadaju u grupu heterogenih polimera. Njihovu strukturu čine nerazgranati binarni kopolimeri,  $\beta$ -D-manuronska (M blokovi) i  $\alpha$ -L-guluronska kiselina (G blokovi), koji su međusobno povezani 1,4-glikozidnim vezama. Monomerne jedinice su raspoređene u obliku niza sekvenci, koje sadrže međusobno povezane ostatke samo guluronske ili samo manuronske kiseline (homopolimerni GG i MM segmenti), a koji se povremeno ukrštaju sa oblastima mešovite strukture (heteropolimerni MG segmenti).

Kako vodeni rastvor alginata formira hidrogel interakcijama dvovalentnog jona, kao što je jon kalcijuma, sa jonskim kiselim grupama G blokova, nastali kalcijum-alginat hidrogel je fizički umrežen sistem i njegova mehanička svojstva zavise od udela i dužine G blokova u korišćenom alginatu [53,54]. Situacija postaje još komplikovanija prisustvom ćelija koje se inkapsuliraju, jer one mogu uticati kako na karakteristike rastvora alginata, tako i na sam ekstruzioni proces, na primer, menjajući mikrohidrodinamiku unutar kapilare usled elektrohemijskih i fizičkih interakcija. Jedan od važnih podataka jeste minimalna količina dvovalentnih katjona neophodna za umrežavanje polimera, posebno pri inkapsulaciji izuzetno osetljivih ćelija sisara koja može da zahteva minimalno izlaganje gelirajućem rastvoru, kao što je kalcijum-hlorid. Zbog toga su sprovedena opsežna istraživanja na temu geliranja alginata u prisustvu ograničene količine dvovalentnih katjona. Pokazalo se da prisustvo ćelija usporava umrežavanje i utiče na čvrstinu dobijenih čestica kalcijum-alginata postupkom elektrostatičke ekstruzije [55]. Zbog toga se u procesu proizvodnje čestica praktikuje njihovo zadržavanje u rastvoru za geliranje od 30 min do nekoliko časova.



Slika 5. Dijagram prečnika čestice  $d$  (mm) u funkciji elektrostatičkog potencijala  $U$  (kV), gde je prikazan uticaj prečnika igle,  $d_s$ , i koncentracije rastvora alginata (protok 36 ml/h, rastojanje između elektroda 2,5 cm (slika preuzeta iz [30] uz dozvolu John Wiley & Sons, Inc. Copyright © 1999 American Institute of Chemical Engineers).

Figure 5. Diagram of droplet diameter  $d$  (mm) in function of electric potential  $U$  (kV), where the effect of needle diameter  $d_s$  and alginate concentration is shown (flow rate 36 ml/h, electrode distance 2.5 cm) (this material is reproduced with permission of John Wiley & Sons, Inc. from [30]. Copyright © 1999 American Institute of Chemical Engineers).

## PRIMENA ELEKTROSTATIČKE EKSTRUZIJE

Eksperimenti na polju inkapsulacije primenom tehnike elektrostatičke ekstruzije započeti su devedesetih godina 20. veka. Ova disperziona tehnika je do sada korišćena u laboratorijskim ispitivanjima u oblasti farmacije, prehrambene tehnologije, biotehnologije i biomedicine. Jedna od prednosti ove tehnike jeste mogućnost

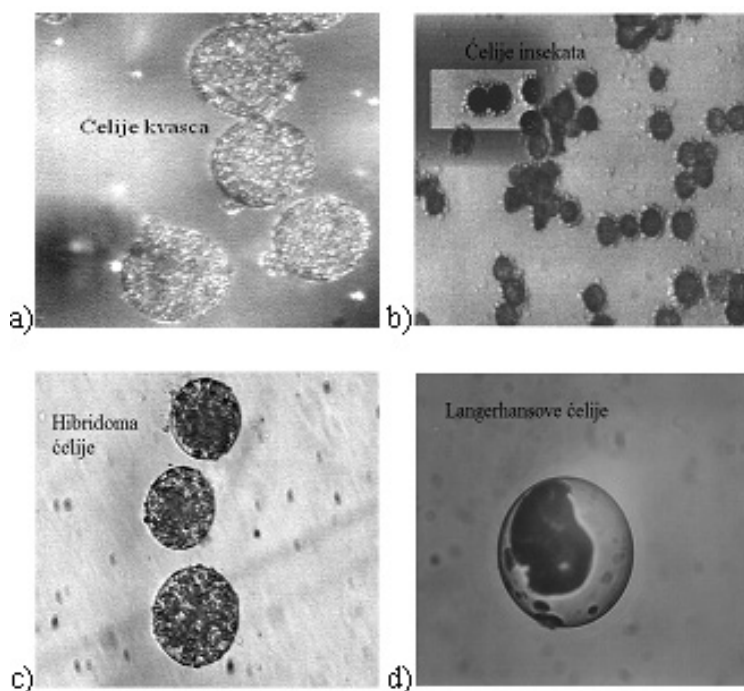
inkapsulacije termolabilnih materija, jer ne zahteva primenu visokih temperatura (kao neke druge metode poput sprej-sušenja) i izvodi se pod blagim uslovima bez upotrebe organskih rastvarača koji bi mogli da inhibiraju aktivnost ćelija i biološki aktivnih supstanci.

Poncele, Bugarski i saradnici su među prvima testirali elektrostatičku ekstruziju kao tehniku za inkapsulaciju, primenivši je na ćelijama insekata (SF-9) [29,31,56]. Pokazano je da ne dolazi do smanjenja broja ćelija i gubitka njihove vijabilnosti. Ubrzo se elektrostatička ekstruzija pokazala kao uspešna metoda i u imobilizaciji drugih vrsta ćelija (slika 6). Langerhansova ostrvca pankreasa inkapsulirana su u alginat-poli-L-ornitin (PLO) mikrokapsule i pri tome su zadržala funkciju fiziološkog odgovora na insulin, kao i integritet površinskih antigena [10]. Isti sistem za inkapsulaciju elektrostatičkom ekstruzijom primenjen je i kod hibridoma ćelija, koje su gajenjem u bioreaktoru sintetisale IgG antitela u koncentraciji od 700  $\mu\text{g/ml}$  [57]. Zadovoljavajuća vijabilnost i koncentracija ćelija nakon 30 dana kultivacije postignuta je i u slučaju mišijih matičnih ćelija koštane srži koje su inkapsulirane u čestice alginata tehnikom elektrostatičke ekstruzije [28,58]. Ista metoda je dala dobra rezultate pri imobilizaciji ćelija pivskog kvasca [59–61]. Tako dobijeni biokatalizatori omogućili su razvoj kontinualnih sistema u proizvodnji fermentacionih

pića [62]. Imobilizacijom ćelija *Sacharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* u kalcijum-alginatne čestice postupkom elektrostatičke ekstruzije u cilju proizvodnje bioetanola, dobijena je veća gustina ćelija nakon prvog fermentacionog ciklusa u poređenju sa ćelijama imobilisanim u poli(vinil alkohol) (PVA) čestice manualnom ekstruzijom, kao i bolji prinos bioetanola [63].

Levinska i saradnici [64] primenili su elektrostatički ekstruder sa pulsним naponom za mikroinkapsulaciju hepatocita u čestice kalcijum-alginata, u cilju imunoizolacije ćelija pri transplantaciji. Prečnici dobijenih čestica bili su u opsegu 440–830  $\mu\text{m}$ , a podešavanjem procesnih parametara, dobijene čestice bile su skoro monodisperzne (<10% SD) i bez produkcije satelitskih čestica, dok je vijabilnost ćelija iznosila preko 90%. Takođe su, Si i Vang [45] imobilisali hepatocite G2 u čestice kalcijum-alginata primenom metode elektrostatičke ekstruzije. Dobijene čestice bile su uniformne veličine u opsegu 200–340  $\mu\text{m}$ , u zavisnosti od primenjenog električnog potencijala i protoka.

Pored alginata, i drugi materijali za imobilizaciju pokazali su se kao pogodni za primenu metode elektrostatičke ekstruzije. Džou i saradnici [36] primenom elektrostatičke ekstruzije pri fiziološkoj temperaturi i pufrovanim uslovima inkapsulirali su hepatocite koacervacijom kompleksa polielektrolita između katjonskog me-



Slika 6. Mikrofotografije različitih tipova ćelija imobilisanih primenom elektrostatičke ekstruzije. a) Ćelije kvasca u alginatnim česticama, b) ćelije insekata u alginat-PLL mikrokapsulama, c) hibridoma ćelije u alginat-PLO mikrokapsulama i d) Langerhasovo ostrvce pankreasa u alginat-PLO mikrokapsuli (this material is reproduced with kind permission of Springer Science+Business Media B.V. from [28], Fig. 10, ©Kluwer Academic Publisher).

Figure 6. Different cell types immobilised using electrostatic droplet generation. a) Yeast cells in alginate microbeads, b) insect cells in alginate-poly-L-lysine microcapsules, c) hybridoma cells in alginate-poly-L-ornithine microcapsules and d) Langerhans islet in alginate-poly-L-ornithine microcapsule (this material is reproduced with kind permission of Springer Science+Business Media B.V. from [28], Fig. 10, ©Kluwer Academic Publisher).

tilovanog kolagena i anjonskog terpolimera hidroksietil metakrilata, metil metakrilata i metakrilne kiseline (HEMA–MMA–MAA). Vijabilnost i biološke funkcije sinteze uree i citohrom P450 monoooksigenazne aktivnosti inkapsuliranih hepatocita nisu su razlikovale od hepatocita inkapsuliranih drugim metodama [36].

Raznovrsnost potencijalne primene elektrostatičke ekstruzije, nedavno je potvrđena i u oblasti inženjerstva tkiva hrskavice. Stojkowska i saradnici [65] imobilizacijom hondrocita teleta u alginatne mikročestice (~800 μm) elektrostatičkom ekstruzijom (igla prečnika 0,57 mm, napon 6 kV, protok 14 ml/h, finalna koncentracija alginata 1,5 mas.%) u biorektoru sa biomimetskim uslovima, tokom dve nedelje kultivacije pokazali su proliferaciju hondrocita i produkciju ekstracelularnog matriksa.

Metoda elektrostatičke ekstruzije je korišćena i za imobilizaciju enzima. Knežević i saradnici [66] pokazali su da se ovom metodom obezbeđuje kontrolisana proizvodnja alginatnih čestica u koje je imobilisana lipaza iz *Candida rugosa*, prečnika oko 650 μm, sa zanemarljivim gubitkom enzima. Takve čestice zadržale su visok nivo aktivnosti lipaze, što je potvrđeno u industrijskom reaktoru za hidrolizu palminog ulja u lecitin/izooktan medijumu u toku tri ciklusa. Elektrostatička ekstruzija bi

svoje mesto mogla da pronade i u oblasti industrije hrane, u kojoj se intenzivno vrši inkapsulacija sastojaka kao što su arome, boje, soli, zaslađivači, vitamini, antioksidansi. Tako su Belščak-Cvitanović i saradnici [67] primenili tehniku elektrostatičke ekstruzije za imobilizaciju polifenolnih ekstrakata različitih lekovitih biljaka, kao što su majčina dušica (*Thymus serpyllum* L.), kopriva (*Urtica dioica* L.), glog (*Crataegus laevigata*), list maline (*Rubus idaeus* L.), list masline (*Olea europea* L.) i hajdučka trava (*Achillea millefolium* L.). Ovi ekstrakti su inkapsulisani u alginat-hitozan kopolimerne mikročestice, čime je ostvaren značajan stepen inkapsulacije polifenola i pre svega očuvana njihova antioksidativna aktivnost. Takođe, očuvanost hemijske stabilnosti i antioksidativne aktivnosti potvrđena je pri inkapsulaciji vodenog ekstrakta majčine dušice (*Thymus serpyllum* L.) u alginat-inulin i alginat-saharoza mikročestice dobijene elektrostatičkom ekstruzijom [68]. Nedavno je pokazana i uspešna inkapsulacija lokalnog anestetika lidokaina u hidrogel čestice od umreženog poli(N-izopropilakrilamida) i kalcijum-alginata tehnikom elektrostatičke ekstruzije [69]. Poređenje najvažnijih rezultata inkapsulacije elektrostatičkom ekstruzijom iz literature dato je u tabeli 2.

Tabela 2. Poređenje rezultata inkapsulacije primenom tehnike elektrostatičke ekstruzije (n.p. – nedostupan podatak)  
Table 2. Encapsulation by means of electrostatic extrusion – comparison of results

Materijal koji se inkapsulira	Matriks za inkapsulaciju	Rastvor za pri-kupljanje/očvršćavanje	Prečnik igle mm	Elek. potencijal/rastojanje između elektroda	Protok ml/h	Veličina čestica/vijabilnost	Autor
Ćelije insekta <i>Spodoptera frugiperde</i> , 3,5×10 <sup>6</sup> ćelija/ml	Natrijum-alginat (2 mas.%)	Kalcijum-hlorid (1,5 mas.%)	0,41	9 kV/2 cm	2–16	500–1000 μm (vijabilnost ćelija 97% pri 10 kV)	[31]
Ćelije insekta (SF-9), 4×10 <sup>5</sup> ćelija/ml	Natrijum-alginat (1,5 mas.%)	Kalcijum-hlorid (1,5 mas.%)	0,41	6–8 kV/2,5 cm	36	n.p./vijabilnost ćelija 93% pri 8 kV	[29]
Langerhans ostrvca pankreasa, 400 ostrvaca/ml	Natrijum-alginat (1,2 mas.%)	Kalcijum-hlorid (1,5%)+ poli-L-ornitin	0,41	n.p./2,5 cm	36	150–200 μm/n.p.	[10]
Goveđi serumski albumin	Kopolimer etilena i vinil acetata (EVA)	Ledeno kupatilo (–70 °C)	1,19 i 0,58	3 ili 4 kV/4 cm	30	530–930 μm	[47]
Lipaza iz <i>Candida rugosa</i>	Natrijum- alginat (2 mas.%)	Kalcijum-hlorid (180 mM)	0,8	4,9 kV/n.p.	25,2	~650 μm	[66]
Ćelije pivskog kvasca <i>Saccharomyces uvarum</i> , 2×10 <sup>7</sup> ćelija/ml	Natrijum- alginat (2 mas.%) i poli(vinil alkohol) (PVA) (10 mas.%) (1:1 i 1:9)	Kalcijum-hlorid (2 mas.%) + maslinovo ulje na – 20 °C	0,64	7 kV/2,5 cm	25,2	806–970 μm/n.p.	[61]
Hepatociti, 5×10 <sup>6</sup> ćelija/ml	Metilovani kolagen	Rastvor terpolimera (HEMA–MMA–MAA) 5 mas.% u fosfatnom puferu	0,2	7,5 kV/3,7 cm	45	250–500 μm/vijabilnost ćelija > 87%	[36]
Hepatociti HepG2,C3A 2×10 <sup>6</sup> , 4×10 <sup>6</sup> ćelija/ml	Natrijum- alginat (1,5%)+NaCl (0,9%)	Kalcijum-hlorid (1,67%)+NaCl (0,9%)+HEPES	0,56	8 ili 11 kV (pulsni napon),30–60 Hz, 5 ms/2–3 cm	13,8–66	440–380 μm/n.p.	[64]



Tabela 2. Nastavak  
Table 2. Continued

Materijal koji se inkapsulira	Matriksa za inkapsulaciju	Rastvor za prikupljanje/očvršćavanje	Prečnik igle mm	Elek. potencijal/rastojanje između elektroda	Protok ml/h	Veličina čestica/vijabilnost	Autor
Hepatociti HepG2, $5 \times 10^6$ ćelija/ml	Natrijum-alginat (2%)	Kalcijum-hlorid (1,5%)	0,3	a) 12 kV/4 cm (+ igla–Petri šolja) b) 4–12 kV (igla), 10 kV prstenasta elektroda 10 mm iznad vrha igle	a) 0,2 ili 30; b) 30	210–340 $\mu\text{m}$ /n.p.	[45]
Ćelije pivskog kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> $4 \times 10^7$ ćelija/ml	Natrijum- alginat (1,5 mas.%)	Kalcijum-hlorid (1,5%)	0,64	7,5 kV/2,5 cm	13,9	100–200 $\mu\text{m}$ /n.p.	[55]
Hondrociti, $33 \times 10^6$ ćelija/ml	Natrijum- alginat (1,5 i 2 mas.%)	Kalcijum-hlorid (1,5%)	0,57	6 kV/n.p.	14	~800 $\mu\text{m}$ /n.p.	[65]
Vodeni ekstrakt majčine dušice ( <i>Thymus serpyllum</i> L.)	Natrijum- alginat (1,5 mas.%) + saharoza (20 mas.%) ili inulin (5 mas.%)	Kalcijum-hlorid (1,5%)	0,64	6,5 kV/ n.p.	25,2	~700 $\mu\text{m}$	[68]
Vodeni ekstrakti različitih biljaka ( <i>Urtica dioica</i> L., <i>Crategeus laevigata</i> , <i>Rubusidaeus</i> L., <i>Oleauropea</i> L., <i>Achillea millefolium</i> L., <i>Glechoma hederacea</i> L.)	Natrijum- alginat (1,5 % mas.%)	Kalcijum-hlorid (2 mas.%) + hitozan (0,5 mas.%) u ekstraktu sa 2 mas.% askorbinske kiseline	0,57	7,3 kV/ 3cm	25,2	780–1785 $\mu\text{m}$ u zavisnosti od vrste ekstrakta	[67]

Kako je od samog početka primene elektrostatička ekstruzija davala dobre rezultate, vrlo rano započeti su i eksperimenti s ciljem razvoja uređaja koji bi se koristio u industrijskim uslovima proizvodnje. Tako su Bugarski i saradnici [29], Bradenberger i Vidmer [52] i Poncele i saradnici [30] opisali uređaje sa više mlaznica („multi-nozzle“ sistem) za elektrostatičku ekstruziju, koji su takođe pokazali dobre rezultate u smislu moguće kontrole procesnih parametara na veličinu i raspodelu veličina dobijenih čestica. Međutim, time i dalje nije postignut nivo produktivnosti koji bi zadovoljavao industrijske potrebe. Poređenjem različitih metoda za proizvodnju alginatnih čestica prosečne veličine  $800 \pm 100 \mu\text{m}$ , u jednom „round-robin“ eksperimentu [70], predloženo je da je nivo produkcije pri primeni postupka elektrostatičke ekstruzije sa jednom mlaznicom 20–40 puta manji od produktivnosti vibracione tehnologije, i najmanje 250 puta manji od produktivnosti ekstruzije sa presecanjem mlaza.

Kao jedno od glavnih ograničenja šire primene tehnike elektrostatičke ekstruzije navodi se nemogućnost procesuiranja rastvora alginata visoke koncentracije (3 i 4 mas.%) za dobijanje mehanički čvrstih alginatnih čestica sa inkapsuliranim materijalom, koje bi imale potencijalnu primenu u bioreaktorima sa izraženim silama smicanja. Pojedini autori [70,71], podešavanjem operativnih parametara (izuzetno tanka igla 0,15 mm, protok 1 ml/h, rastojanje između elektroda preko 20 cm) opi-

sali su dobijanje sfernih uniformnih čestica i sa viskoznim rastvorima alginata (koncentracije 3 i 4 mas.%). Međutim, kako je čitav proces pod navedenim uslovima zahtevao vreme od tri sata za procesuiranje samo 1 g 4 mas.% rastvora alginata [70], može se zaključiti da zasigurno jedan od nedostataka ove tehnike jeste nemogućnost ekstruzije viskoznih rastvora polimera ( $>3000 \text{ mPa s}$  na  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

Iako postoje dokazi o elektrohemijским reakcijama tokom procesa elektrostatičke ekstruzije [72], većina autora opisuje da materijal koji se imobilise (bilo da se radi o hemijskoj supstanci, biološkom materijalu ili živim ćelijama) ostaje nepromenjen pri primeni elektrostatičkog potencijala [29,59,64] ili jednostavno zane- maruju ovaj efekat. Dalja sistematska ispitivanja trebalo bi da daju detaljnije podatke o eventualnim elektrohemijским reakcijama pri primeni elektrostatičke ekstruzije, što bi bilo od izuzetnog značaja za sofisticirane postupke inkapsulacije u oblasti biotehnologije i biomedicine.

## ZAKLJUČAK

Ovaj kratki pregled, ukazuje da elektrostatička ekstruzija predstavlja metodu koja omogućava proizvodnju sferičnih mikročestica hidrogela, poput alginata, sa imobilisanim biološkim materijalom približno uniformne veličine. Konkretno, elektrostatičkom ekstruzijom

moгу se na jednostavan naćin, podešavanjem procesnih parametara, dobiti ćestice velićine 100–1000  $\mu\text{m}$ . Oprema koja se koristi za elektrostatićku ekstruziju nije skupa, proces se odvija pri atmosferskom pritisku i sobnoj temperaturi, a moųe se izvoditi pod sterilnim uslovima. Elektrostatićka ekstruzija je naroćito obećavajuća metoda u farmaceutskoj i kozmetićkoj industriji, kao i oblasti biotehnologije, u kojima su postupci koji se odvijaju na niskim temperaturama neophodni za oćuvanje stabilnosti materijala koji se imobiliziraju, a koji su uglavnom termolabilni (bilo da se radi o biološkom materijalu ili hemijskim supstancama).

Dosadašnja istraųivanja su pokazala da je elektrostatićka ekstruzija jednostavna i precizna metoda, nema visoku cenu koštavanja, niti veliku potrošnju energije, a obezbeđuje proizvode jedinstvenih svojstava i produųene stabilnosti.

Budući napori u razvoju tehnike elektrostatićke ekstruzije trebalo bi da budu usmereni ka uvećanju razmera proizvodnje. To znaći, da bi na osnovu dosadašnjih saznanja o elektrostatićkoj ekstruziji trebalo razviti takvu aparaturu koja bi omogućila strogo kontrolisanu proizvodnju mikroćestica sa inkapsuliranim biološkim materijalom, takvu da moųe da zadovolji potrebe komercijalne upotrebe i u najzahtevnijim oblastima biotehnologije i biomedicine.

#### Zahvalnica

Ovaj rad je rezultat projekta III 46010 finansiranog od strane Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije.

#### LITERATURA

- [1] M. Whelehan, I.W. Marison, Microencapsulation using Vibrating Technology, *J. Microencapsulation* **28** (2011) 669–688.
- [2] C. Lacroix, F. Grattepanche, Y. Doleyres, D. Bergmaier, in: V. Nedović, R. Willaert (Eds.), *Applications in Cell Immobilisation Biotechnology*, Springer, Dordrecht, 2005, pp. 295–320.
- [3] V. Nedović, R. Willaert, I. Leskošek-Ćukalović, B. Obradović, B. Bugarski, in: V. Nedović, R. Willaert (Eds.), *Applications in Cell Immobilisation Biotechnology*, Springer, Dordrecht, 2005, pp. 259–273.
- [4] A. Durieux, X. Nicolay, J.P. Simon, in: V. Nedović, R. Willaert (Eds.), *Applications in Cell Immobilisation Biotechnology*, Springer, Dordrecht, 2005, pp. 275–283.
- [5] C. Divies, R. Cachon, in: V. Nedović, R. Willaert (Eds.), *Applications in Cell Immobilisation Biotechnology*, Springer, Dordrecht, 2005, pp. 285–295.
- [6] A. Margaritis, P.M. Kilonzo, in: V. Nedović, R. Willaert (Eds.), *Applications in Cell Immobilisation Biotechnology*, Springer, Dordrecht, 2005, pp. 375–405.
- [7] T. Keshavartz, in: V. Nedović, R. Willaert (Eds.), *Applications in Cell Immobilisation Biotechnology*, Springer, Dordrecht, 2005, pp. 407–422.
- [8] J. Tu, S. Bolla, J. Barr, J. Miedema, X. Li, B. Jasti, Alginate microparticles prepared by spray-coagulation method: Preparation, drug loading and release characterization, *Int. J. Pharm.* **303** (2005) 171–181.
- [9] H. Uemoto, in: V. Nedović, R. Willaert (Eds.), *Applications in Cell Immobilisation Biotechnology*, Springer, Dordrecht, 2005, pp. 481–494.
- [10] B. Bugarski, L. Sajc, M. Plavsic, M.F.A Goosen, G. Jovanović, in: K. Funatsu, Y. Shirai, T. Matsushita (Eds.), *Animal cell technology: basic & applied aspects*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht; 1997, pp. 479–486.
- [11] C. Nastruzzi, G. Luca, G. Basta, R. Calafiore, in: V. Nedović, R. Willaert (Eds.), *Applications in Cell Immobilisation Biotechnology*, Springer, Dordrecht, 2005, pp. 17–35.
- [12] B. Zavan, R. Cortivo, P. Brun, C. Tonello, in: V. Nedović, R. Willaert (Eds.), *Applications in Cell Immobilisation Biotechnology*, Springer, Dordrecht, 2005, pp. 55–69.
- [13] M. Obradović, M. Radišić, G. Vunjak-Novaković, in: V. Nedović, R. Willaert (Eds.), *Applications in Cell Immobilisation Biotechnology*, Springer, Dordrecht, 2005, pp. 99–129.
- [14] K.S. Masters, B. K. Mann, in: V. Nedović, R. Willaert (Eds.), *Applications in Cell Immobilisation Biotechnology*, Springer, Dordrecht, 2005, pp. 135–153.
- [15] L. Germain, K. Laflamme, F. A. Auger, in: V. Nedović, R. Willaert (Eds.), *Applications in Cell Immobilisation Biotechnology*, Springer, Dordrecht, 2005, pp. 85–99.
- [16] P.B. Malafaya, G.A. Silva, R.L. Reis, Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications, *Adv. Drug Delivery Rev.* **59** (2007) 207–233.
- [17] D. Lewinska, S. Rosinski, D. Hunkeler, D. Poncelet, A. Werynski, Mass transfer coefficient in characterization of gel beads and microcapsules, *J. Membr. Sci.* **209** (2002) 533–540.
- [18] R. Bocanegra, J.L. Sampedro, A. Ganan-Calvo, M. Marquez, Monodisperse structured multi-vesicle microencapsulation using flow-focusing and controlled disturbance, *J. Microencapsulation* **22** (2005) 745–759.
- [19] K.K. Papas, R.C.Jr Long, A. Sambanis, I. Constantinidis, Development of a bioartificial pancreas: II. Effects of oxygen on long-term entrapped beta TC3 cell cultures, *Biotechnol. Bioeng.* **66** (1999) 231–237.
- [20] C. K. Colton, Implantable biohybrid artificial organs, *Cell Transplant.* **4** (1995) 415–436.
- [21] P. De Vos, B. J. De Haan, J. Pater, R. Van Schilfgaarde, Association between capsule diameter and adequacy of encapsulation, and survival of microencapsulated rat islet allografts, *Transplantation* **62** (1996) 893–899.
- [22] A.V. Anilkumar, I. Lacik, T.G. Wang, A novel reactor for making uniform capsules, *Biotechnol. Bioeng.* **75** (2001) 581–589.
- [23] M. Bućko, A. Vikartovska, I. Lacik, G. Kollarikova, P. Gemeiner, V. Patoprsty, M. Brygin, Immobilization of a whole-cell epoxide-hydrolyzing biocatalyst in sodium alginate-cellulose sulfate-poly(methylene-co-guanidine) capsules using a controlled encapsulation process, *Enzyme Microb. Technol.* **36** (2005) 118–126.

- [24] C. Heinzen, A. Berger, I. Marison, in: V. Nedovic, R. Willaert (Eds.), *Fundamentals of cell immobilisation biotechnology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2004, pp. 257–275.
- [25] C. Heinzen, I. Marison, A. Berger, U. von Stockar, Use of vibration technology for jet break-up for encapsulation of cells, microbes and liquids in monodisperse microcapsules, *Landbauforsch. Voelkenrode SH* **241** (2002) 19–25.
- [26] J.C. Ogbonna, in: V. Nedovic & R. Willaert (Eds.), *Fundamentals of cell immobilisation biotechnology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2004, pp. 327–341.
- [27] U. Prusse, K.D. Vorlop, in: V. Nedovic and R. Willaert (Eds.), *Fundamentals of cell immobilisation biotechnology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2004, pp. 295–309.
- [28] B.M. Bugarski, B. Obradovic, V.A. Nedovic, D. Poncelet, in: V. Nedovic, R.G. Willaert (Eds.), *Fundamentals of Cell Immobilisation Biotechnology*, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, 2004, pp. 277–294.
- [29] B. Bugarski, Q. Li, M.F.A. Goosen, D. Poncelet, R.J. Neufeld, G. Vunjak, Electrostatic droplet generation: mechanism of polymer droplet formation, *AIChE J.* **40** (1994) 1026–1032.
- [30] D. Poncelet, R.J. Neufeld, M.F.A. Goosen, B. Burgarski, V. Babak, Formation of microgel beads by electric dispersion of polymer solutions, *AIChE J.* **45** (1999) 2018–2023.
- [31] D. Poncelet, B. Bugarski, B.G. Amsdem, J. Zhu, R.J. Neufeld, M.F.A. Goosen, A parallel plate electrostatic droplet generator: parameters affecting microbead size, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42** (1994) 251–255.
- [32] T. Keshavarz, G. Ramsden, P. Phillips, P. Mussenden, C. Bucke, Application of electric field for production of immobilized biocatalysts, *Biotechnol. Tech.* **6** (1992) 445–450.
- [33] V. Nedovic, B. Obradovic, D. Poncelet, M.F.A. Goosen, I. Leskosek-Cukalovic, B. Bugarski, Cell immobilisation by electrostatic droplet generation, *Landbauforsch. Voelkenrode SH* **241** (2002) 11–17.
- [34] M.F.A. Goosen, in: R.G. Willaert, G.V. Baron, L. De Backer (Eds.), *Immobilized living cell systems: Modelling and Experimental Methods*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 1996, pp. 295–322.
- [35] M.G. Žuža, B.M. Obradović, Z.D. Knežević-Jugović, Hydrolysis of Penicillin G by Penicillin G Acylase Immobilized on Chitosan Microbeads in Different Reactor Systems, *Chem. Eng. Technol.* **34** (2011) 1706–1714.
- [36] Y. Zhou, T. Sun, M. Chan, J. Zhang, Z. Han, X. Wang, Y. Tohe, J. P. Chen, H. Yu, Scalable encapsulation of hepatocytes by electrostatic spraying, *J. Biotechnol.* **117** (2005) 99–109.
- [37] D. Lewinska, S. Rosinski, A. Werynski, Influence of process conditions during impulsed electrostatic droplet formation on size distribution of hydrogel beads, *Artif. Cells, Blood Substitutes, Biotechnol.* **32** (2004) 41–53.
- [38] J. Zhang, X. Li, D. Zhang, Z. Xiu, Theoretical and experimental investigations on the size of alginate microspheres prepared by dropping and spraying, *J. Microencapsulation* **24** (2007) 303–322.
- [39] T.I. Klock, J.E. Melvik, Controlling the size of alginate gel beads by use of a high electrostatic potential, *J. Microencapsulation* **19** (2002) 415–424.
- [40] J. Zeleny, Instability of electrified liquid surface, *Phys. Rev.* **10** (1917) 1–6.
- [41] B. Vonnegut, R.L. Neubauer, Production of monodisperse liquid particles by electrostatic atomization, *J. Colloid Sci.* **7** (1952) 616–622.
- [42] A. Doyle, D.R. Moffett, B. Vonnegut, Behavior of evaporating electrically charged droplets, *J. Colloid Sci.* **19** (1964) 136–143.
- [43] A.I. Grigor'ev, S.O. Shir'aeva, Mechanism of electrostatic polydispersion of liquids, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **23** (1990) 1361–1370.
- [44] A. Gomez, K. Tang, Charge and fission of droplets in electrostatic sprays, *Phys. Fluids* **6** (1994) 404–414.
- [45] J. Xie, Ch-H. Wang, Electro spray in the dripping mode for cell microencapsulation, *J. Colloid Interface Sci.* **312** (2007) 247–255.
- [46] H.A. Al-Hajry, S.A. Al-Maskry, L.M. Al-Kharousi, O. El-Mardi, W.H. Shayya, M.F.A. Goosen, Electrostatic Encapsulation and Growth of Plant Cell Cultures in Alginate, *Biotechnol. Prog.* **15** (1999) 768–774.
- [47] B. Amsden, M. Goosen, An examination of factors affecting the size, distribution and release characteristics of polymer microbeads made using electrostatics, *J. Controlled Release* **43** (1997) 183–196.
- [48] G. Taylor, Disintegration of water drops in an electric field, *Proc. R. Soc. London, Ser. A* **280** (1964) 383–397.
- [49] G. Taylor, Electrically driven jets, *Proc. R. Soc. London, Ser. A* **313** (1969) 453–475.
- [50] D. Poncelet, V.G. Babak, R.J. Neufeld, M.F.A. Goosen, B. Burgarski, Theory of electrostatic dispersion of polymer solutions in the production of microgel beads containing biocatalyst, *Adv. Colloid Interface Sci.* **79** (1999) 213–228.
- [51] A.M. Ganan-Calvo, The surface charge in electro spraying: Its nature and its universal scaling laws, *J. Aerosol Sci.* **30** (1999) 863–872.
- [52] H. Brandenberger, F. Widmer, A new multinozzle encapsulation/immobilisation system to produce uniform beads of alginate, *J. Biotechnol.* **63** (1998) 73–80.
- [53] A. Martinsen, G. Skjak-Braek, O. Smidsrod, Alginate as immobilization material; I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads, *Biotechnol. Bioeng.* **33** (1989) 79–89.
- [54] W.R. Gombotz, S.F. Wee, Protein release from alginate matrices, *Adv. Drug Delivery Rev.* **31** (1998) 267–285.
- [55] V. Manojlovic, J. Djonlagic, B. Obradovic, V. Nedovic, B. Bugarski, Immobilization of cells by electrostatic droplet generation: a model system for potential application in medicine, *Int. J. Nanomed.* **1** (2006) 163–171.
- [56] B. Bugarski, J. Smith, J. Wu, M.F.A. Goosen, Methods for animal cell immobilization using electrostatic droplet generation, *Biotechnol. Tech.* **7** (1993) 677–682.
- [57] B. Bugarski, G. Vunjak, M.F. A. Goosen, in: W.M. Kuhreiter, R.P. Lanza, W.L. Chick, (Eds.), *Cell encapsulation technology and therapeutics*, Birkhauser-Springer Verlag, 1999, pp. 395–416.

- [58] D. Bugarski, B. Obradovic, M. Petakov, G. Jovčić, N. Stojanović, B. Bugarski, Alginate microbeads as potential support for cultivation of bone marrow stromal cells, *Mater. Sci. Forum* **494** (2005) 525–530.
- [59] V. Nedovic, B. Obradovic, I. Leskosek-Cukalovic, O. Trifunovic, R. Pesic, B. Bugarski, Electrostatic generation of alginate microbeads loaded with brewing yeast, *Process Biochem.* **37** (2001) 17–22.
- [60] I. Pajic-Lijakovic, M. Plavsic, V. Nedovic, B. Bugarski, Investigation of Ca-alginate hydrogel rheological behaviour in conjunction with immobilized yeast cell growth dynamics, *J. Microencapsulation* **24** (2007) 420–429.
- [61] D. Bezbradica, G. Matić, B.M. Obradović, V.A. Nedović, I. Leskošek-Čukalović, B.M. Bugarski, Immobilization of brewing yeast in PVA/alginate micro beads using electrostatic droplet generation, *Hem. Ind.* **58** (2004) 118–120.
- [62] P. Verbelen, V.A. Nedovic, V. Manojlovic, F. Delvaux, I. Leskosek-Cukalovic, B. Bugarski, R. Willaert, in: N.J. Zuidam, V.A. Nedovic (Eds), *Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing*, Springer Dordrecht New York Heidelberg London, 2010, pp. 303–327.
- [63] M. Rakin, L. Mojovic, S. Nikolic, M. Vukasinovic, V. Nedovic, Bioethanol production by immobilized *Sacharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* cells, *Afr. J. Biotechnol.* **8** (2009) 464–471.
- [64] D. Lewinska, J. Bukowski, A. Kinasiewicz, A. Werynski, Electrostatic microencapsulation of hepatocytes using an impulsed voltage droplet generator, XXXIII Congress of ESAO, Umea, Sweden, 2006.
- [65] J. Stojkowska, B. Bugarski, B. Obradovic, Evaluation of alginate hydrogels under in vivo-like bioreactor conditions for cartilage tissue engineering, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **21** (2010) 2869–2879.
- [66] Z. Knežević, S. Bobić, B. Obradović, L. Mojović, B. Bugarski: Alginate-immobilized lipase by electrostatic extrusion for the purpose of palm oil hydrolysis in lecithin/isooctane system, *Process Biochem.* **38** (2002) 313–318.
- [67] A. Belščak-Cvitanović, R. Stojanović, V. Manojlović, D. Komes, I.J. Cindrić, V. Nedović, B. Bugarski, Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate–chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion, *Food Res. Int.* **44** (2011) 1094–1101.
- [68] R. Stojanovic, A. Belscak-Cvitanovic, V. Manojlovic, D. Komes, V. Nedovic, B. Bugarski, Encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) aqueous extract in calcium alginate beads, *J. Sci. Food Agric.* **92** (2012) 685–696.
- [69] S. Petrušić, Macro and micro forms of thermosensitive hydrogels intended for controlled drug release applications, Bi-nationally supervised doctoral thesis, Lille University of science and technology (France) and University of Belgrade, 2011.
- [70] U. Prüsse, L. Bilancetti, M. Bučko, B. Bugarski, J. Bukowski, P. Gemeiner, D. Lewinska, V. Manojlovic, B. Massart, C. Nastruzzi, V. Nedovic, D. Poncelet, S. Siebenhaar, L. Tobler, Comparison of different technologies for alginate beads production, *Chem. Pap.* **62** (2008) 364–374.
- [71] V. Nedović, V. Manojlović, U. Pruesse, B. Bugarski, J. Đonlagić, K. Vorlop, Optimization of the electrostatic droplet generation process for controlled microbead production – single nozzle system, *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* **12** (2006) 53–57.
- [72] G.J. Van Berkel, V. Kertesz, Using the electrochemistry of the electrospray ion source, *Anal. Chem.* **79** (2007) 5510–5520.

## SUMMARY

### ELECTROSTATIC EXTRUSION AS A DISPERSION TECHNIQUE FOR ENCAPSULATION OF CELLS AND BIOACTIVE COMPOUNDS

Ivana T. Kostić<sup>1</sup>, Bojana D. Isailović<sup>1</sup>, Verica B. Đorđević<sup>1</sup>, Steva M. Lević<sup>2</sup>, Viktor A. Nedović<sup>2</sup>, Branko M. Bugarski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*University of Belgrade, Faculty of Technology and Metallurgy, Belgrade, Serbia*

<sup>2</sup>*University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Belgrade, Serbia*

(Review paper)

Significant development of cells and bioactive compound encapsulation technologies is taking place due to an exceptional possibility of their application in various scientific disciplines, including biomedicine, pharmacy, cosmetology, food and agricultural sciences, beverage production, industrial waste treatment. Despite the broad application of microencapsulation, the literature reviews on dispersion techniques for microcapsule/microbead production, their advantages, restrictions and drawbacks are scarce. The purpose of this paper is to assess the possibilities of electrostatic extrusion for encapsulation of biological material, including living cells in hydrogel microbeads. The paper presents an overview of the mechanisms of droplet formation and controlling experimental parameters for producing microbeads by means of electrostatic extrusion. Electrostatic droplet formation utilizes a special type of physical process taking advantage of electrostatic effects occurring in flowing conductive liquids after introduction of an electric field. When an electrostatic field is applied to the metal needle and an electric charge is induced in the liquid flowing out of the needle, the size of droplet detaching from the needle tip decreases as a function of applied electrostatic field. It has been shown that few parameters affect microbead size: applied voltage, electrode geometry, needle size, polarity arrangement and polymer concentration. The electrostatic droplet formation is one of the most precise methods, which enables one to produce spherical and uniform particles ranging from 100 up to 1000  $\mu\text{m}$ . Most of the authors report that the encapsulated compounds (drugs, enzymes and living cells) remain unaltered after electrostatic extrusion. This technique seems to be particularly promising in biotechnology, pharmaceutical and cosmetics industries, where a low-temperature process, preserving heat-sensitive material is a prerequisite. Future efforts in developing of electrostatic extrusion should be directed towards adequately scaling-up for commercial purpose.

*Keywords:* Dispersion techniques • Electrostatic extrusion • Cell and bioactive compound encapsulation technology • Alginate • Microbeads