

ПОЛУЧЕНИЕ АЛЬГИНАТНЫХ МИКРОСФЕР РАЗЛИЧНОГО РАЗМЕРА ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО ПОЛЯ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОРАСПЫЛЕНИЯ

**С.В. Нарожный, И.Ф. Коваленко, Д.А. Мангасаров,
М.И. Щетинский, О.А. Нардид**

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,
ул. Переяславская, 23, Харьков, 61016, Украина;*

e-mail: stas.narozhnyi@gmail.com

Поступила в редакцию 31 января 2018 г.

Принята 23 марта 2018 г.

Актуальность. Микросферы, полученные из полимеров, как природного, так и синтетического происхождения, нашли применение в химико-фармацевтической отрасли, пищевой промышленности и в сельском хозяйстве. Несмотря на это в настоящее время активно развиваются различные методы их получения. Основными требованиями, предъявляемыми к способу получения микросфер, является: низкая себестоимость, однородность получаемого продукта, мягкие условия получения. Одним из перспективных методов получения микросфер, который соответствует заявленным требованиям, является метод электрораспыления. В настоящее время проведено большое количество исследований, связанных с изучением влияния неоднородного электрического поля на размеры микросфер из полимерных материалов, в то же время практически отсутствуют работы, посвященные изучению влияния однородного электрического поля на их размеры.

Цель работы. Целью данного исследования являлось изучение влияния однородности электростатического поля, на размер микросфер из альгината натрия, полученных методом электрораспыления.

Материалы и методы. Микросферы альгината натрия получали методом электрораспыления, при условии однородности электростатического поля, образованного между контактами установки. В работе использовали альгинат натрия низкой вязкости ($15 \cdot 10^{-3}$ – $25 \cdot 10^{-3}$ Па·с). В качестве источника двухвалентных катионов Ca^{2+} использовали водный 2% раствор CaCl_2 . Размер микросфер оценивали на конфокальном микроскопе AxioObserver Z1 (Carl Zeiss, Германия).

Результаты. В ходе проведенного исследования были выявлены основные параметры экспериментальной установки, влияющие на размер получаемых микросфер. К ним относятся величина напряжения, приложенного к пластинам, задающим форму поля, расстояние между пластинами и скорость подачи полимера. К наиболее значимым параметрам можно отнести величину приложенного напряжения, так как именно изменение этой величины приводило к наибольшему изменению размера альгинатных микросфер.

Выводы. При использовании однородного электростатического поля можно получить микросферы альгината натрия диаметром от 900 ± 5 мкм до 2071 ± 15 мкм с сохранением сферической формы частиц.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: альгинат натрия; микросферы; метод электрораспыления; метод получения микросфер.

PRODUCTION OF ALGINATE MICROSPHERES OF VARIOUS SIZES UNDER THE INFLUENCE OF AN ELECTROSTATIC FIELD WITH THE HELP OF ELECTROSPRAY METHOD

S.V. Narozhnyi, I.F. Kovalenko, D.A. Mangasarov, M.I. Schetinsky, O.A. Nardid

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine,
23, Pereyaslavskaya str., Kharkiv, 61016, Ukraine*

Background: Microspheres obtained from polymers, both natural and synthetic origin, have found application in chemical-pharmaceutical, food industries and in agriculture. Despite this, various methods of obtaining them are actively developing. The main requirements for the preparation of microspheres are low cost, homogeneity of the end product, mild conditions of their obtaining. One of the promising

methods to produce the microspheres, which meets the stated requirements, is the electrospray method. At the present time, a large number of studies have been carried out to study the effect of an inhomogeneous electric field on the dimensions of microspheres from polymeric materials, while at the same time there are practically no published reports devoted to the investigation of the influence of a homogeneous electric field on their dimensions.

Objectives: The purpose of this study was the investigation of the influence of the electrostatic field uniformity on the size of the sodium alginate microspheres obtained by means of electrospray.

Materials and methods: The sodium alginate microspheres were prepared by the electrospray method, on the condition of homogeneity of electrostatic field formed between the contacts of the device. Sodium alginate of low viscosity ($15 \cdot 10^{-3}$ – $25 \cdot 10^{-3}$ Pa·s) was used in the work. As a gel solution, a 2% solution of CaCl_2 was used. The sizes of the microspheres were evaluated with a confocal microscope AxioObserver Z1 (Carl Zeiss, Germany).

Results: During the study, there were revealed the main parameters of the experimental setup, which affected the sizes of the obtained microspheres. These include the magnitude of the voltage applied to the plates determining the shape of the field, the distance between the plates, and the rate of the polymer supplying. The most important parameters comprise the magnitude of the applied voltage since it was the change in this value that led to the largest change in the sizes of the alginate microspheres.

Conclusions: Upon using the uniform electrostatic field it is possible to obtain the sodium alginate microspheres with a diameter from $900 \pm 5 \mu\text{m}$ to $2071 \pm 15 \mu\text{m}$, on the condition of maintaining the spherical shape of the particles.

KEY WORDS: sodium alginate; microspheres; electrospray method; method of obtaining microspheres.

ОТРИМАННЯ АЛЬГІНАТНИХ МІКРОСФЕР РІЗНОГО РОЗМІРУ ПІД ВПЛИВОМ ЕЛЕКТРОСТАТИЧНОГО ПОЛЯ МЕТОДОМ ЕЛЕКТРОРОЗПИЛЮВАННЯ

С.В. Нарожный, И.Ф. Коваленко, Д.О. Мангасаров, М.И. Щетинський, О.А. Нардид

*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,
вул. Переяславська, 23, Харків, 61016, Україна*

Актуальність. Мікросфери, отримані з полімерів, як природного, так і синтетичного походження, знайшли застосування у хіміко-фармацевтичній галузі, харчовій промисловості та у сільському господарстві. Незважаючи на це в даний час активно розвиваються різні методи їх отримання. Основними вимогами, що пред'являються до способу отримання мікросфер, є: низька собівартість, гомогенність одержуваного продукту, м'які умови отримання. Одним з перспективних методів отримання мікросфер, який відповідає заявленим вимогам, є метод електророзпилювання. Нині проведено велику кількість досліджень, пов'язаних з вивченням впливу неоднорідного електричного поля на розмір мікросфер з полімерних матеріалів, в той же час практично відсутні роботи, присвячені вивченню впливу однорідного електричного поля на їх розміри.

Мета роботи. Метою даного дослідження було вивчення впливу однорідності електростатичного поля на розмір мікросфер альгінату натрію, отриманих методом електророзпилювання.

Матеріали та методи. Мікросфери альгінату натрію отримували методом електророзпилювання за умови однорідності електростатичного поля, утвореного між контактами експериментальної установки. У роботі використовували альгінат натрію низькою в'язкості ($15 \cdot 10^{-3}$ – $25 \cdot 10^{-3}$ Па·с). Як гелюючий розчин був використаний розчин CaCl_2 2% концентрації. Розмір мікросфер оцінювали на конфокальному мікроскопі AxioObserver Z1 (CarlZeiss, Німеччина).

Результати. В ході проведеного дослідження були виявлені основні параметри експериментальної установки, що впливають на розмір отримуваних мікросфер. До них відносяться: величина прикладеної напруги до пластин, що задають форму поля, відстань між пластинами і швидкість подачі полімеру. До найбільш значимих параметрів можна віднести величину прикладеної напруги, так як саме зміна цієї величини викликала найбільшу зміну розміру альгінатних мікросфер.

Висновки. При використанні однорідного електростатичного поля можливо отримати мікросфери альгінату натрію діаметром від $900 \pm 5 \mu\text{m}$ до $2071 \pm 15 \mu\text{m}$ за умови збереження сферичної форми частинок.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: альгінат натрію; мікросфери; метод електророзпилювання; метод отримання мікросфер.

На сьогоднішній день розроблено множество методов получения микро- и наночастиц на основе полимеров животного [1-7] и растительного [8-9] происхождения. Одним из таких методов является метод электрораспыления, или формирование микросфер под воздействием электростатического потенциала [10-11].

Основными достоинствами данного метода, по сравнению с остальными, является возможность получения однородных по размеру микросфер в широком диапазоне – от 50 мкм до 1 мм [8].

За счет варьирования таких параметров, как концентрация полимера, скорость его подачи, величина приложенного напряжения можно регулировать размеры получаемых микросфер. Помимо этого в данном методе не используются токсические растворители или вещества, способные повредить биологические объекты.

Благодаря перечисленным выше достоинствам данный метод получил широкое распространение в пищевой промышленности [12], биотехнологии [13], медицине [14] и фармакологии [15].

Одним из полимеров, которые применяют для создания микро- и наноносителей является альгинат натрия [8, 16]. Он представляет собой линейный отрицательно-заряженный полисахарид, состоящий из последовательных или чередующихся GG/GM/MM-блоков 1-4-связанных остатков β -D-маннуровой (M) и α -L-гулуровой (G) кислот [17]. Альгинат натрия получают из бурых водорослей (*Phaeophyceae*), включая *Laminaria hyperborea*, *Laminari adigitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum*, *Macrocystis pyrifera* [18] и бактерий рода *Azotobacter* и *Pseudomonas* [19]. Альгинат натрия может образовывать связи с двухвалентными катионами Ca^{2+} , Br^{2+} или Sr^{2+} , формируя при этом пористый гидрогель за счет образования поперечных связей GG/GM-блоков (GG-GG; GM-GG; GM-GM) между собой [20]. Подобный тип сформированных структур в литературе получил название «egg-box model» [21].

Также альгинат натрия является биосовместимым, нетоксичным полимером природного происхождения с низкой стоимостью производства [22]. Благодаря чему микросферы, полученные из этого полимера, нашли свое применение в области биосепарации, клеточной и молекулярной биологии, иммунологии, энзимологии и диагностике. Они успешно применяются в качестве биореакторов [23], матриц для инкапсуляции различных типов клеток [24], для направленной доставки лекарств с контролируемым высвобождением [25].

Целью данного исследования являлось изучение влияния однородности электростатического поля на размер микросфер из альгината натрия, получаемых методом электрораспыления.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для экспериментального исследования влияния однородности электростатического поля на размер микросфер полимера, получаемых методом электрораспыления, была изготовлена описанная ниже установка. Экспериментальная установка состоит из следующих основных систем (рис. 1): системы дозирования полимера, системы приема микросфер, системы формирования высокого напряжения и системы распыления полимера.

Система дозирования полимера представляет собой шприцевой насос, состоящий из камеры нагнетания (в качестве которой используется одноразовые инъекционные шприцы различного объема: от 1 мл до 20 мл); шагового двигателя Mitsumi M49SP-1 (Япония) и узла винтовой передачи толкающего усилия к поршню шприца.

Система дозирования обеспечивает равномерную подачу полимера с фиксированной скоростью в диапазоне от 0,1 мл/ч до 150 мл/ч.

Система приема микросфер включает в себя емкость с гелирующим раствором и магнитную мешалку.

Система формирования высокого напряжения собрана из источника высокого напряжения, регулируемого блока питания Б5-44 (Украина) и вольтметра универсального В7-16А (Украина).

Источник высокого напряжения обеспечивает на выходе постоянное напряжение от 4 до 12 кВ и представляет собой блокинг-генератор, в схеме которого (рис. 2) использован специально изготовленный высоковольтный трансформатор на ферритовом сердечнике.

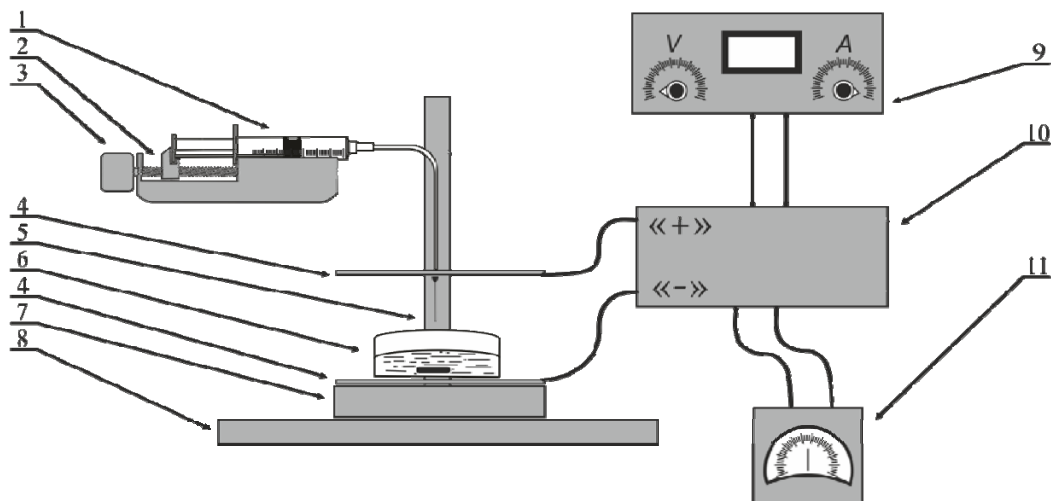


Рис. 1. Блок схема установки. 1 – камера нагнетания шприцевого насоса; 2 – винтовая передача; 3 – шаговый двигатель Mitsumi M49SP-1 (Япония); 4 – металлические пластины; 5 – капиллярная металлическая трубка ($d_{\text{внутр.}}=260$ мкм); 6 – емкость с гелирующим раствором; 7 – магнитная мешалка; 8 – диэлектрическая стойка; 9 – регулируемый блок питания Б5-44 (Украина); 10 – источник высокого напряжения; 11 – вольтметр универсальный В7-16А (Украина).

Нужная величина высокого напряжения устанавливается путем изменения напряжения на выходе регулируемого блока питания Б5-44 (Украина), в пределах от 2 до 12 В. Максимальный выходной ток блока питания выставляется 1 А.

Для измерения выходного напряжения используется вольтметр универсальный В7-16А (Украина). Контроль выходного напряжения осуществляется путем измерения напряжения на дополнительной обмотке высоковольтного трансформатора, после чего измеренное значение напряжения умножается на поправочный коэффициент, зависящий от отношения количества витков высоковольтной обмотки к количеству витков дополнительной обмотки (400) для получения значения напряжения на выходе источника высокого напряжения.

Это позволяет контролировать выходное напряжение без использования киловольтметра.

Система распыления состоит из двух горизонтальных металлических пластин, на которые подается высокое напряжение; капиллярной металлической трубки ($d_{\text{внутр.}}=260$ мкм), подающей поступающий из системы дозирования раствор в зону распыления, и специальной диэлектрической стойки (рис. 3, а), на которой закреплены обе пластины: нижняя — неподвижно, а верхняя укреплена на платформе, перемещаемой по вертикали подъемным механизмом, позволяющим регулировать расстояние между пластинами с высокой точностью.

Платформа для крепления одной из металлических пластин оснащена зажимом типа «луер-лок», что позволяет использовать стандартные иглы от одноразовых инъекционных шприцов.

Форма электростатического поля задается при помощи двух металлических пластин, расположенных параллельно друг относительно друга (рис. 3, б). Линейные размеры и форму пластин подбирали так, чтобы на практике можно было получить однородное электрическое поле в рабочей области.

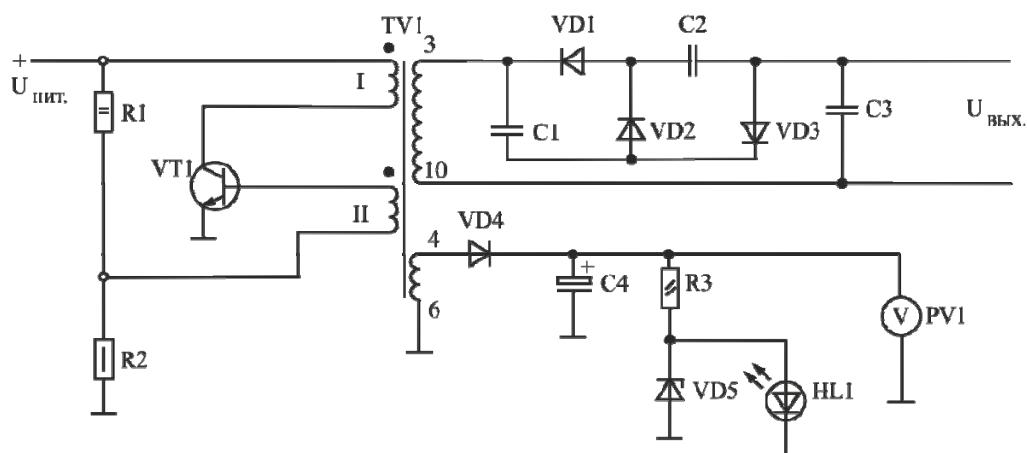


Рис. 2. Электрическая схема источника высокого напряжения.

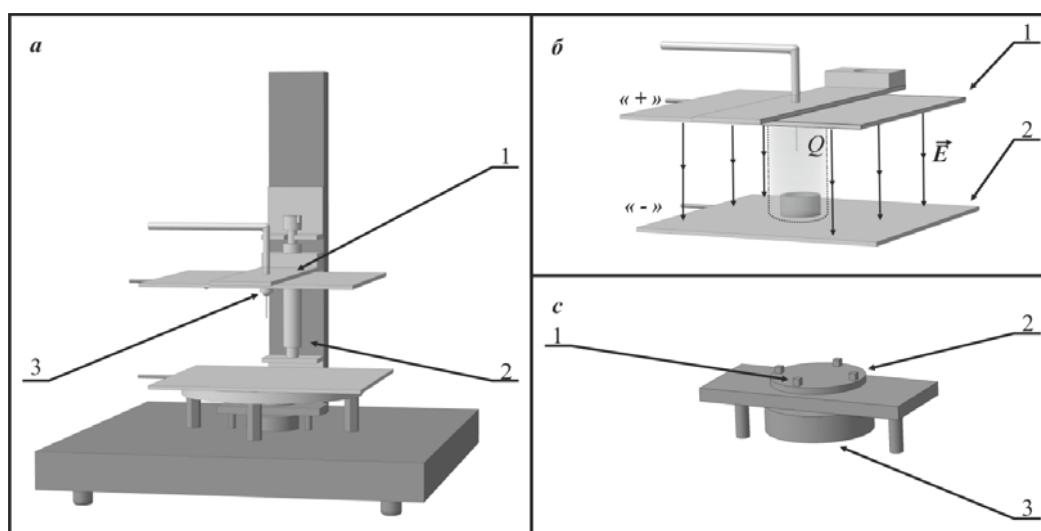


Рис. 3. Диэлектрическая стойка:

- а – 3D модель стойки: 1 – платформа для крепления металлической пластины и иглы; 2 – подъёмный механизм; 3 – зажим типа «луер-лок».
- б – силовые линии поля, образованного между двумя металлическими пластинами: 1,2 – верхняя и нижняя металлические пластины, задающие форму поля.
- с – магнитная мешалка: 1 – неодимовые магниты; 2 – насадка на вал шагового двигателя; 3 – шаговый двигатель Mitsumi M49SP-1 (Япония).

Исходя из наших расчетов, с достаточной степенью приближения мы можем считать электрическое поле, образованное в сегменте Q , однородным. Тем самым исключить влияние краевых эффектов поля, образованных на краях формозадающих пластин.

Все части установки служат для оптимизации процесса получения полимерных микрофер. Применение данной установки минимизирует влияние оператора на процесс получения микрофер и обеспечивает получение воспроизводимого и точного результата, а также позволяет получать микроферы различного диаметра. При этом процесс получения микрофер может быть реализован в стерильных условиях.

В качестве полимера в работе использовали альгинат натрия низкой вязкости ($15 \cdot 10^{-3} - 25 \cdot 10^{-3} \text{ Па} \cdot \text{с}$) производства Sigma-Aldrich (Великобритания). Для сополимеризации блоков альгината натрия использовался водный раствор CaCl_2 2%

концентрации [20]. Микрокапсулы находились в растворе CaCl_2 в течение 1-го часа, после чего проводились микроскопические исследования.

Оценку формы и распределения микросфер из альгината натрия по размеру проводили при помощи конфокального микроскопа AxioObserver Z1 (Carl Zeiss, Германия). Обработку полученных изображений проводили в программе Zeiss LSM Image Examiner версии 4.2.0.121.

Результаты приведены как среднее значение \pm стандартная ошибка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Было установлено, что размер и форма получаемых альгинатных носителей зависят от нескольких параметров, таких как: расстояние между пластинами, задающими электростатическое поле – h ; диаметр капиллярной металлической трубки; величина напряжения U и как следствие, напряжённость электростатического поля E , создаваемого между контактами; скорость подачи полимера V , а также его концентрация. В данной работе была проведена серия экспериментов для определения влияния каждого из параметров на размер и форму получаемых микросфер. Для этого последовательно изменяли только один из исследуемых параметров, в то время как остальные оставались неизменными.

При свободном падении капля альгината в емкость с гелирующим раствором формируются крупные сферы, диаметр которых достигает 2199 ± 7 мкм (рис. 4, 5.). Приложение незначительного напряжения приводит к облегчению отрыва каплей альгината от кончика иглы и позволяет уменьшить их размер до 2015 ± 18 мкм. При этом не наблюдалось формирования конуса распыления, а только увеличивалась частота отрыва каплей от кончика иглы. Данный эффект вызван изменением величины коэффициента поверхностного натяжения альгината натрия под воздействием электрического напряжения [10].

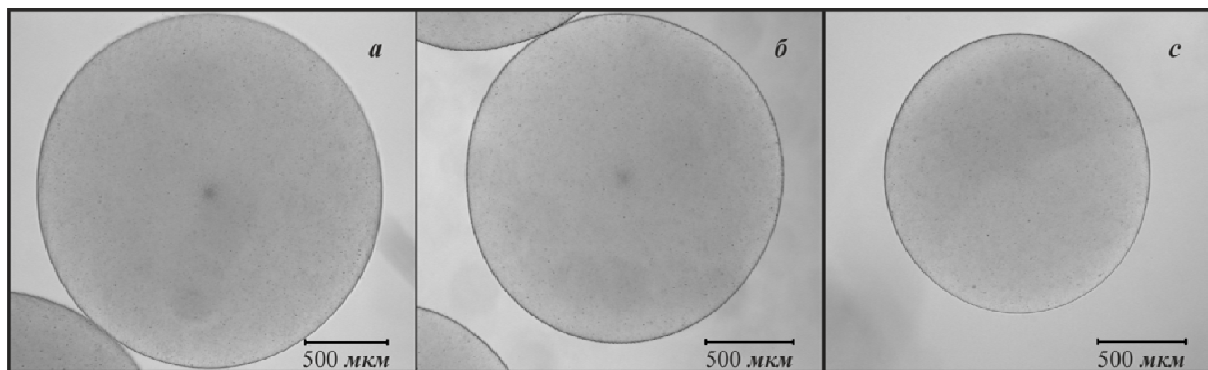


Рис. 4. Фотографии микросфер из альгината натрия.

Параметры установки: $h=30$ мм; $V=10$ мл/ч; $C_{\text{алг.}}=2\%$. $a - U=2,25$ кВ; $b - U=4,24$ кВ; $c - U=6,33$ кВ.

Последующее увеличение напряжения, подаваемого на металлические пластины (рис. 3 б), не привело к формированию конуса распыления, а только вызвало уменьшение размера микросфер. Это косвенно подтверждает наше предположение об однородности поля в рабочей области Q (рис. 3 б).

В ходе эксперимента наблюдалась прямая корреляция между величиной приложенного напряжения и размером микросфер.

Как видно из приведённых графиков, снижение концентрации альгината натрия на 0,2% практически не влияет на размер получаемых микросфер. Что свидетельствует о том, что небольшие колебания концентрации практически не приводят к изменению размера получаемых микросфер.

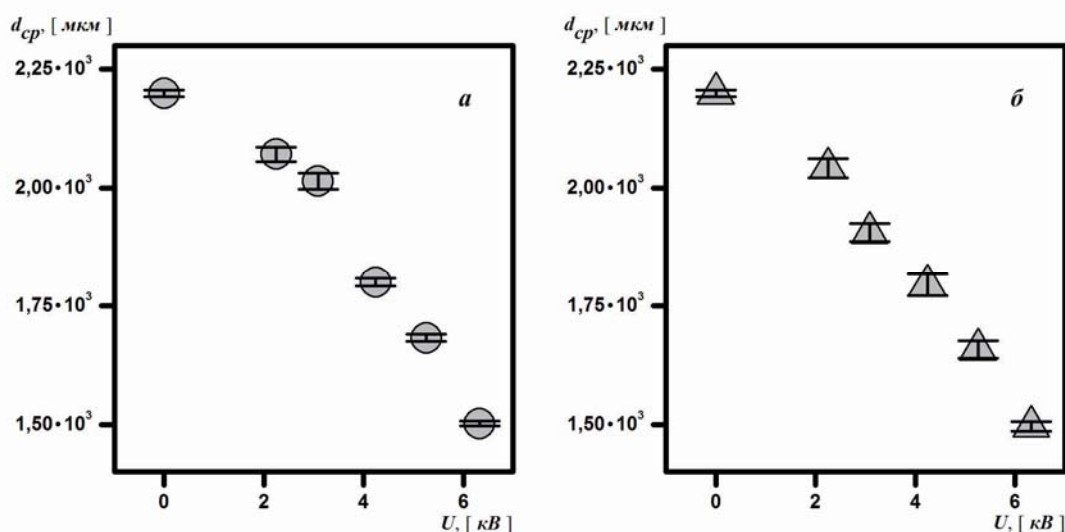


Рис. 5. Влияние приложенного напряжения на размер микросфер из альгината натрия. Параметры установки: $h=30$ мм; $V=10$ мл/ч. *a* – концентрация альгината натрия – 1,8%; *б* – концентрация альгината натрия – 2 %.

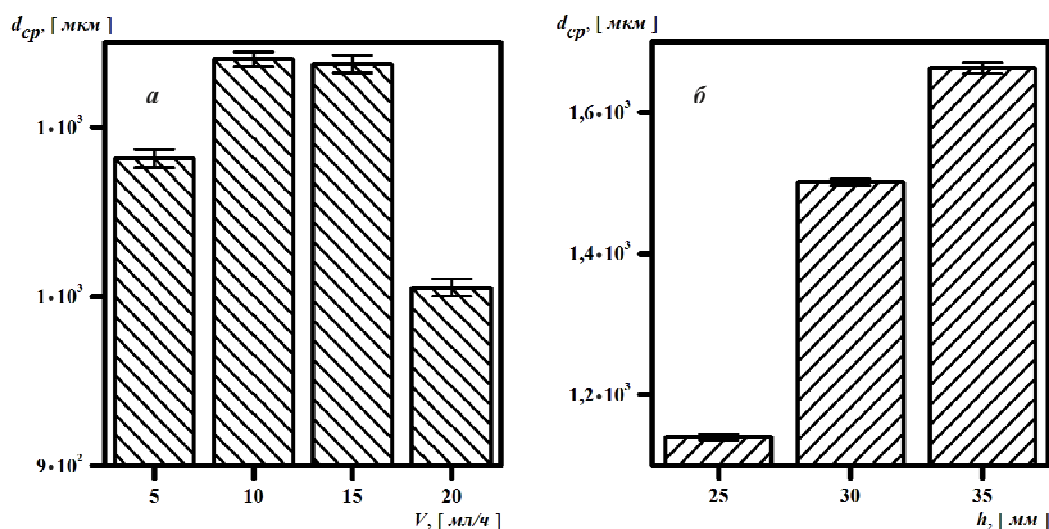


Рис. 6. Влияние параметров установки на размер микросфер. Параметры установки: *a* – $U=6,33$ кВ, $h=25$ мм; *б* – $U=6,33$ кВ, $V=10$ мл/ч.

Еще одним из важных параметров, влияющих на размер образованных микросфер, является расстояние между пластинами, задающими форму электростатического поля. Как видно из (рис. 6 б), при увеличении расстояния на 5 мм между пластинами наблюдается и увеличение диаметра микросфер из альгината натрия на 10%, в то же время уменьшение расстояния на 5 мм приводит к противоположному эффекту, уменьшая диаметр микросфер на 24%.

При этом как увеличение, так и уменьшение расстояния между пластинами не приводит к формированию конуса распыления, а только лишь к изменению частоты отрывания капли альгината натрия от кончика иглы.

Также одним из регулируемых параметров, влияющих на размер микросфер, является скорость подачи полимера (рис. 6 а). Как видно из приведенных результатов, уменьшение скорости подачи альгината натрия до 5 мл/ч приводило к уменьшению диаметра сфер на 5%, при этом увеличение скорости подачи до 20 мл/ч приводило к

более значительному снижению размера микросфер (на 11%), в то же время увеличение скорости подачи до 15 мл/ч практически не отразилось на их геометрии.

ВЫВОДЫ

Была разработана, собрана и протестирована установка для получения полимерных микросфер методом электрораспыления.

Было исследовано влияние однородности электростатического поля на размер микросфер из альгината натрия, получаемых методом электрораспыления. К основным параметрам, влияющим на их размер, относятся величина приложенного напряжения к пластинам, задающим форму поля, расстояние между пластинами и скорость подачи полимера. Изменяя эти параметры, можно получить микросферы альгината натрия диаметром от 900 ± 5 мкм до 2071 ± 15 мкм.


БЛАГОДАРНОСТЬ


Работа выполнена соответственно научному направлению работы отдела криобиофизики ИПКиК НАН Украины по теме: «Влияние криоконсервирования плаценты и ее водно-солевых экстрактов на антиоксидантное и противовоспалительное действие экстрактов» (№ государственной регистрации – 0116U003491).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ


Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.


Authors' ORCID ID

S.V. Narozhnyi  <https://orcid.org/0000-0001-9690-0203>

I.F. Kovalenko  <https://orcid.org/0000-0002-7063-6712>

D.A. Mangasarov  <https://orcid.org/0000-0001-7891-9023>

M.I. Schetinsky  <https://orcid.org/0000-0002-9279-2695>

O.A. Nardid  <https://orcid.org/0000-0002-9439-0606>

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chemtob C., Assimacopoulos T., Chaumeil J.C. Preparation and characteristics of gelatin microspheres // *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1988. Vol. 14(10). P. 1359–1374.
2. Jeyanthi R., Rao K. P. Preparation of gelatin microspheres of bleomycin // *Int. J. Pharm.* 1987. Vol. 35(1-2). P. 177–179.
3. Tran T. H., Ramasamy T., Poudel B. K., Marasini N. et al. Preparation and characterization of spray-dried gelatin microspheres encapsulating ganciclovir // *Macromol. res.* 2014. Vol. 22(2). P. 124–130.
4. Sun R., Shi J., Guo Y., Chen L. Studies on the particlesize control of gelatin microspheres // *Frontiers of Chemistry in China.* 2009. Vol. 4(2), P. 222–228.
5. Katti D., Krishnamurti N. Preparation of albumin microspheres by an improved process // *J. Microencapsul.* 1999. Vol. 16(2). P. 232–242.
6. Kramer P. A. Albumin microspheres as vehicles for achieving specificity in drug delivery // *J. Pharm. Sci.* 1974. Vol. 63. P. 1646–1647.
7. Stenekes R. J., Franssen O., van Bommel E. M., Crommelin D. J. et al. The preparation of dextran microspheres in an all-aqueous system: effect of the formulation parameters on particle characteristics // *Pharm. Res.* 1998. Vol. 15(4). P.557–561.
8. Paques J. P., van der Linden E., van Rijn C. J., Sagis L. M. Preparation methods of alginate nanoparticles // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2014. Vol. 209. P. 163–171.
9. Prusse U., Bilancetti L., Bučko M. et al. Comparison of different technologies for alginate beads production // *Chemical Papers.* 2008. Vol. 62(4). P. 364–374.
10. Poncelet D., Neufeld R. J., Goosen M. F. A., Burgarski B. et al. Formation of microgel beads by electric dispersion of polymer solutions // *AIChE J.* 1999. Vol. 45(9). P. 2018–2023.
11. Bugarski B., Li Q., Goosen M. F. A., Poncelet D. et al. Electrostatic droplet generation: mechanism of polymer droplet formation // *AIChE J.* 1994. Vol. (40). P. 1026–1032.
12. Manojlovic V., Rajic N., Djonlagic J., Obradovic B. et al. Application of electrostatic extrusion - flavour encapsulation and controlled release // *Sensors (Basel).* 2008. Vol. 8(3). P. 1488–1496.

13. Keshavarz T., Ramsden G., Phillips P., Mussenden P. et al. Application of electric field for production of immobilized biocatalysts // *Biotechnol. Tech.* 1992. Vol. 6. P. 445–450.
14. Manojlovic V., Djonlagic J., Obradovic B., Nedovic V. et al. Immobilization of cells by electrostatic droplet generation: a model system for potential application in medicine // *Int. J. Nanomedicine.* 2006. Vol. 1(2). P. 163–172.
15. Singh M. N., Hemant K. S., Ram M., Shivakumar H. G. Microencapsulation: a promising technique for controlled drug delivery // *Res. Pharm. Sci.* 2010. Vol. 5(2). P. 65–77.
16. Zhang J., Li X., Zhang D., Xiu D. Theoretical and experimental investigations on the size of alginate microspheres prepared by dropping and spraying // *J. Microencapsul.* 2007. Vol. 24(4). P. 303–322.
17. Lee K. Y., Mooney D. J. Alginate: properties and biomedical applications // *Prog. Polym. Sci.* 2012. Vol. 37(1) P. 106–126.
18. Smidsrod O., Skjak-Bræk G. Alginate as immobilization matrix for cells // *Trend Biotechnol.* 1990. Vol. 8(3). P. 71–78.
19. Remminghorst U., Rehm B. H. A. Bacterial alginates: from biosynthesis to applications // *Biotechnol. Lett.* 2006. Vol. 28(21). P. 1701–1712.
20. Mørch Å. A., Donati I., Strand B. L., Skja G. Effect of Ca^{2+} , Ba^{2+} , and Sr^{2+} on alginate microbeads // *Biomacromolecules.* 2006. Vol. 7(5). P. 1471–1480.
21. Li L., Fang Y., Vreeker R., Appelqvist I., Mendes E. Reexamining the egg-box model in calcium - alginate gels with X-ray diffraction // *Biomacromolecules.* 2007. Vol. 8(2). P. 464–468.
22. Sachan K. N., Pushkar S., Jha A., Bhattcharya A. Sodium alginate: the wonder polymer for controlled drug delivery // *J. Pharm. Res.* 2009. Vol. 2(8). P. 1191–1199.
23. David B., Barbe L., Barthès-Biesel D., Legallais C. Mechanical properties of alginate beads hosting hepatocytes in a fluidized bed bioreactor // *Int. J. Artif. Organs.* 2006. Vol. 29(8). P. 756–763.
24. Strand B. L., Morsch Y. A., Skjak-Bræk G. Alginate as immobilization matrix for cells // *Minerva Biotechnologica.* 2000. Vol. 12(4). P. 223–233.
25. Arshady R. Biodegradable microcapsular drug delivery system // *J. Bioactive Compatible Polym.* 1990. Vol. 5. P. 316–342.

REFERENCES

1. Chemtob, C., Assimacopoulos, T., & Chaumeil, J. C. (1988). Preparation and characteristics of gelatin microspheres. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 14(10), 1359-1374.
2. Jeyanthi, R., & Rao, K. P. (1987). Preparation of gelatin microspheres of bleomycin. *International Journal of Pharmaceutics*, 35(1-2), 177-179.
3. Tran, T. H., Ramasamy, T., Poudel, B. K., Marasini, N., Moon, D. K., Choi, H. J., & ... Kim, J. O. (2014). Preparation and characterization of spray-dried gelatin microspheres encapsulating ganciclovir. *Macromolecular research*, 22(2), 124-130.
4. Sun, R., Shi, J., Guo, Y., & Chen, L. (2009). Studies on the particle size control of gelatin microspheres. *Frontiers of Chemistry in China*, 4(2), 222-228.
5. Katti, D., & Krishnamurti, N. (1999). Preparation of albumin microspheres by an improved process. *Journal of Microencapsul*, 16(2), 232-242.
6. Kramer, P. A. (1974). Albumin microspheres as vehicles for achieving specificity in drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 63, 1646-1647.
7. Stenekes, R. J., Franssen, O., van Bommel, E. M., Crommelin, D. J., & Hennink, W. E. (1998). The preparation of dextran microspheres in an all-aqueous system: effect of the formulation parameters on particle characteristics. *Pharmaceutical Research*, 15(4), 557-561.
8. Paques, J. P., van der Linden, E., van Rijn, C. J., & Sagis, L. M. (2014). Preparation methods of alginate nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 209, 163-171.
9. Prusse, U., Bilancetti, L., Bučko, M., Bugarski, B., Bukowski, J., Gemeiner, P., & ... Vorlop, KD. (2008). Comparison of different technologies for alginate beads production. *Chemical Papers*, 62(4), 364-374.
10. Poncelet, D., Neufeld, R. J., Goosen, M. F. A., Burgarski, B., & Babak, V. (1999). Formation of microgel beads by electric dispersion of polymer solutions. *AIChE Journal*, 45(9), 2018-2023.
11. Bugarski, B., Li, Q., Goosen, M. F. A., Poncelet, D., Neufeld, R. J., & Vunjak, G. (1994). Electrostatic droplet generation: mechanism of polymer droplet formation. *AIChE Journal*, (40), 1026–1032.
12. Manojlovic, V., Rajic, N., Djonlagic, J., Obradovic, B., Nedovic, V., & Bugarski, B. (2008). Application of electrostatic extrusion - flavour encapsulation and controlled release. *Sensors (Basel)*, 8(3), 1488-1496.
13. Keshavarz, T., Ramsden, G., Phillips, P., Mussenden, P., & Bucke, C. (1992). Application of electric field for production of immobilized biocatalysts. *Biotechnology Techniques*, 6, 445–450.

14. Manojlovic, V., Djonlagic, J., Obradovic, B., Nedovic, V., & Bugarski, B. (2006). Immobilization of cells by electrostatic droplet generation: a model system for potential application in medicine. *International Journal of nanomedicine*, 1(2), 163-172.
15. Singh, M. N., Hemant, K. S., Ram, M., & Shivakumar, H. G. (2010). Microencapsulation: a promising technique for controlled drug delivery. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 5(2), 65-77.
16. Zhang, J., Li, X., Zhang, D., & Xiu, D. (2007). Theoretical and experimental investigations on the size of alginate microspheres prepared by dropping and spraying. *Journal of Microencapsul*, 24(4), 303-322.
17. Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37(1), 106-126.
18. Smidsrod, O., & Skjak-Bræk, G. (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*, 8(3), 71-78.
19. Remminghorst, U., & Rehm, B. H. A. (2006). Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. *Biotechnology Letters*, 28(21), 1701-1712.
20. Mørch, Å. A., Donati, I., Strand, B. L., & Skja, G. (2006). Effect of Ca²⁺, Ba²⁺ and Sr²⁺ on alginate microbeads. *Biomacromolecules*, 7(5), 1471-1480.
21. Li, L., Fang, Y., Vreeker, R., Appelqvist, I., & Mendes, E. (2007). Reexamining the egg-box model in calcium - alginate gels with X-ray diffraction. *Biomacromolecules*, 8(2), 464-468.
22. Sachan, K. N., Pushkar, S., Jha, A., & Bhattcharya, A. (2009). Sodium alginate: the wonder polymer for controlled drug delivery. *Journal of Pharmacy Research*, 2(8), 1191-1199.
23. David, B., Barbe, L., Barthès-Biesel, D., & Legallais, C. (2006). Mechanical properties of alginate beads hosting hepatocytes in a fluidized bed bioreactor. *The International journal of Artificial Organs*, 29(8), 756-763.
24. Strand, B. L., Morsch, Y. A., & Skjak-Braek, G. (2000). Alginate as immobilization matrix for cells. *Minerva Biotechnologica*, 12(4), 223-233.
25. Arshady R. (1990). Biodegradable microcapsular drug delivery system. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 5, 316-342.