

Polymerization  
Quarterly, 2016  
Volume 6, Number 4  
Pages 4-19  
ISSN: 2252-0449

# Chitosan and Its Microparticles as Carriers in Drug Delivery Systems: An Overview

Seyyed Mojtaba Taghizadeh<sup>\*1</sup>, Mohsen Sadeghi<sup>2</sup>, Fariba Ganji<sup>2</sup>

1. Novel Drug Delivery Systems Department, Iran Polymer and Petrochemical Institute,  
P.O. Box: 14975/112, Tehran, Iran

2. Biomedical Engineering Department, Chemical Engineering Faculty, Tarbiat Modares  
University, P.O. Box: 14115-114, Tehran, Iran

Received: 21 October 2015, Accepted: 27 February 2016

## Abstract

The development of a new drug molecule is an expensive and time consuming effort. Improving the safety efficacy ratio of old drugs has been attempted by different methods focused on each individual drug therapy, dose specification and therapeutic drug monitoring. Controlled rate delivery, slow delivery and targeted delivery are other very promising methods which have been pursued intensively. Methods for increasing bioavailability, diminishing side-effects, promoting targeted delivery and treating conditions such as blood-brain barrier disorders, are the main topics in novel drug delivery explorations. Choosing a suitable polymer is one of the most important aspects in development of a drug delivery system. In the last three decades, avast number of biomedical applications have been reported for a chitin derivative, known as chitosan. In this overview the properties of this polymer, as a natural compound, which are the main criteria for its extensive application in different areas of biomedicine are described, specifically in relation to synthesis of chitosan microparticles applied in novel drug delivery.

## Key Words

chitosan properties,  
chitosan microparticles,  
drug delivery,  
spray drying,  
ionic gelation

(\*) To whom correspondence should be addressed.  
E-mail: s.m.taghizadeh@ippi.ac.ir

# مروری کوتاه بر کیتوسان و میکروذرات آن به عنوان حامل در سامانه‌های دارورسانی

سید مجتبی تقی‌زاده<sup>۱\*</sup>، محسن صادقی<sup>۲</sup>، فریبا گنجی<sup>۲</sup>

۱- تهران، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، گروه سامانه‌های نوین دارورسانی، صندوق پستی ۱۴۹۷۵-۱۱۲

۲- تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده مهندسی شیمی، گروه مهندسی زیست‌پزشکی، صندوق پستی ۱۴۱۱۵-۱۱۴

دریافت: ۱۳۹۴/۷/۲۹، پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۸

تهیه، تولید و توسعه هر مولکول دارویی بسیار پرهزینه و زمان‌بر است. ازاین‌رو، تلاش‌هایی به‌منظور افزایش ایمنی و اثربخشی داروهای رایج، با روش‌هایی مانند دارودرمانی شخص‌محور، تعیین غلظت و ردیابی داروها افزایش یافته است. از روش‌های بسیار کارآمد در این زمینه، انتقال هدفمند و کنترل سرعت رهایش داروهاست. علم دارورسانی به‌دنبال افزایش زیست‌دسترسی‌پذیری، کاهش عوارض جانبی، انتقال هدفمند داروها به محل‌های مدنظر و نیز گذر از سد برخی موانع، مانند موانع خونی-مغزی، است. در تهیه هر سامانه دارورسانی، انتخاب پلیمر از بخش‌های بسیار مهم و حیاتی به‌شمار می‌رود. طی سه دهه اخیر کاربردهای زیست‌پزشکی گسترده برای ترکیب کیتوسان از خانواده کیتین، گزارش شده است. در این مقاله، ویژگی‌های طبیعی‌بودن این پلیمر، به‌عنوان عامل اصلی کاربرد گسترده آن در زمینه‌های مختلف زیست‌پزشکی و روش‌های تهیه میکروذرات کیتوسان، بر پایه کاربردهای آن در دارورسانی نوین، بررسی می‌شود.

بسیار ش  
فصلنامه علمی- ترویجی  
سال ششم، شماره ۴  
صفحه ۱۹-۴، ۱۳۹۵  
ISSN: 2252-0449

## چکیده



سیدمجتبی تقی‌زاده



محسن صادقی



فریبا گنجی

## واژگان کلیدی

خواص کیتوسان،  
میکروذرات کیتوسان،  
دارورسانی،  
خشک کردن پاششی،  
ژل شدن یونی

## مقدمه

روش انتقال دارو اثر درخور توجهی بر بازده اثربخشی دارو و عوارض جانبی آن دارد. علم دارورسانی نوین از دیرباز با اهدافی مانند کاهش عوارض جانبی مصرف، افزایش زیست‌دسترسی پذیری و انتقال هدفمند داروها از سویی و گذر از سد برخی موانع، مانند موانع خونی-مغزی از سوی دیگر، به دنبال طراحی سامانه‌های دارورسانی کارآمد است. با وجود پیشرفت‌های شگرف در این زمینه در دهه‌های اخیر، سامانه دارورسانی (DDS) مفهوم جدیدی به‌شمار نمی‌آید. مردم چین و مصر باستان، حتی پیش از مطرح شدن واژه دارورسانی، در قالب پلیمرها و موم‌های دارای عوامل فعال دارویی از این مفهوم استفاده می‌کردند. از زمان انقلاب صنعتی در سال ۱۹۷۰، فناوری‌های متفاوتی در زمینه دارورسانی توسعه یافت. پس از آن، با پیشرفت سریع سامانه‌های نوین دارورسانی (NDDS)، راه‌کارهایی مانند استفاده از میکروذرات، نانوذرات، سامانه‌های تراپوستی، لیپوزوم‌ها و نانوذرات مغناطیسی و روش‌های متفاوت انتقال دارو به بیمار معرفی شدند [۱،۲].

سامانه‌های دارورسانی را می‌توان از جنبه‌های متفاوت، از جمله مسیر انتقال دارو، شکل ظاهری سامانه، نوع ماده دارویی موجود در سامانه و نیز بافت هدف دسته‌بندی کرد. DDS دارو را از مسیرهای متفاوت مانند خوراکی، تراپوستی و پوستی، ریوی و دهانی به بافت هدف می‌رساند. از نظر نوع عامل فعال، می‌توان دارورسانی را به انواع مختلف انتقال داروهای ضدالتهاب، ضدسرطان، پادتن‌ها، واکسن‌ها، پروتئین‌ها و پپتیدها و عوامل رشد دسته‌بندی کرد. در این میان، به‌کاربردن میکروذرات به‌عنوان حامل‌های دارویی در سامانه‌های مختلف، با برخورداری از مزایایی مانند امکان تهیه آسان‌تر، رهایش کنترل شده دارو و فراهم کردن دارورسانی هدفمند، عملکرد درمانی داروها را بهبود بخشیده است [۳،۴].

کیتین، پلی-β-(۱-۴)-N-استیل-D-گلوکوزامین، از مهم‌ترین پلی‌ساکاریدهای طبیعی است که اولین بار در سال ۱۸۸۴ شناخته شد. کیتین فراوان‌ترین زیست‌پلیمر طبیعی پس از سلولوز است که به‌وسیله بسیاری از موجودات زنده ساخته می‌شود [۵،۶]. ماهیت

طبیعی کیتین به‌شکل میکروالیاف بلوری است که اجزای ساختاری اسکلت خارجی بدن بندپایان و دیواره سلولی قارچ‌ها و مخمرها را تشکیل می‌دهد. پلیمر کیتوسان، نتیجه حذف گروه‌های استیل در کیتین است (شکل ۱) [۷].

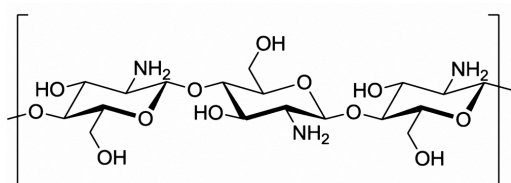
برخلاف اکثر پلی‌ساکاریدهای طبیعی مانند سلولوز، دکستران و آگاروز که ماهیت اسیدی دارند، کیتین و کیتوسان پلی‌ساکاریدهای بازی هستند. کیتین به‌شدت آبدوست بوده و در آب و بسیاری از حلال‌های آلی، به‌جز هگزافلوئوروایزوپروپانول و هگزافلوئورواستون، نامحلول است. این درحالی است که کیتوسان در اسیدهای رقیق، مانند استیک اسید و فرمیک اسید انحلال‌پذیر است. درصد نیتروژن موجود در کیتین بسته به درجه استیل‌زدایی، بین ۵٪ تا ۸٪ متغیر است، اما نیتروژن در کیتوسان اغلب به‌شکل آمین نوع اول وجود دارد [۵،۶،۸].

## ویژگی‌های کیتوسان

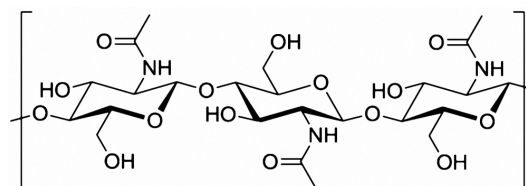
وزن مولکولی و درجه استیل‌دارشدن از ویژگی‌های اصلی کیتوسان هستند که بر سایر خواص آن اثر می‌گذارند. بسیاری از خواص کیتین و کیتوسان مانند انحلال‌پذیری، گرانیروی، زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری و خواص زیست‌شناختی مانند زیست‌چسبندگی و ویژگی‌های ضدباکتری، به این دو ویژگی بستگی دارد [۷].

## درجه استیل‌دارشدن

از پارامترهای مؤثر بر خواص کیتین، درجه استیل‌دارشدن آن است. این پارامتر در واحدهای ساختاری کیتین به‌شکل نسبت ۲-استامیدو-۲-دی‌اکسی-D-گلوکوپیرانوز به ۲-آمینو-۲-دی‌اکسی-D-گلوکوپیرانوز گزارش می‌شود. درجه استیل‌دارشدن، اثر درخور توجهی بر انحلال‌پذیری کیتین دارد و با استفاده از ابزارها و روش‌های مختلف تعیین می‌شود. کیتوسان به‌عنوان یکی از محصولات استیل‌زدایی شده و غیرسمی شناخته شده کیتین، در محلول‌های اسیدی آبی انحلال‌پذیر است [۹-۱۱]. بررسی‌های



(ب)



(الف)

شکل ۱- ساختارهای: (الف) کیتین و (ب) کیتوسان [۸].

جدول ۱- روش‌های مختلف تعیین درجه استیل‌دارشدن کیتوسان [۱۲].

| روش                            | فنون تجزیه                                                                                                                                                                                                            |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| مستقیم<br>(تعیین گروه N-استیل) | هیدرولیکی، دورنگ‌نمایی دورانی (circular dichroism)، طیف‌بینی (IR، NMR، UV) و رنگ‌نگاری ژل‌تراوایی (GPC)                                                                                                               |
| غیرمستقیم<br>(تعیین گروه آمین) | تیتراژ با اسید و باز، تیتراژ کلوئیدی، تیتراژ با روش دگررنگی (metachromatic)، اکسایش با پریدات (مرحله‌ای)، تجزیه سالیسیل آلدهید باقی‌مانده، واکنش با ۲،۴-دی‌نیتروفلوروئوروبنزن، جذب سطحی رنگینه و جذب سطحی پیکریک اسید |
| براساس ترکیب‌بندی کلی          | تجزیه عنصری، رنگ‌نگاری گازی و تفکافت                                                                                                                                                                                  |

مقایسه‌ای میان روش‌های مختلف اندازه‌گیری درجه استیل‌دارشدن کیتوسان نشان می‌دهد، این درجه کاملاً به نوع روش تجزیه به کار رفته بستگی دارد. بنابراین، هنگام گزارش درجه استیل‌دارشدن کیتوسان، بیان نام روش تجزیه به کار رفته ضروری به نظر می‌رسد [۱۲]. جدول ۱، روش‌های مختلف تعیین درجه استیل‌دار شدن را بر اساس تعیین گروه N-استیل، گروه آمین و ترکیب‌بندی کلی نشان می‌دهد [۱۲].

گروه‌های استیل در طول زنجیر اصلی کیتوسان و وزن مولکولی آن وابسته است [۱۶]. بررسی نقش پروتئین‌زدایی (deproteinization) کیتوسان در مجاورت استیک اسید و هیدروکلریک اسید در انحلال‌پذیری آن نشان داد، درجه یونی‌شدن به pH و pK اسید [۱۷، ۱۸] و به غلظت یونی محلول بستگی دارد. انحلال مستقیم گونه استات و کلروهیدرات کیتوسان در آب سبب ایجاد محلول اسیدی با  $pK_0 = 6 \pm 0.1$  می‌شود. به همین دلیل، کیتوسان در pH کمتر از ۶ انحلال‌پذیر است [۱۸]. انحلال‌پذیری کیتوسان معمولاً با حل کردن آن در استیک اسید (۱٪) یا ۰/۱ M سنجیده می‌شود. اما در حقیقت، مقدار استیک اسید لازم به مقدار کیتوسان حل شده بستگی دارد. بدین معنی که غلظت پروتون لازم برای انحلال کیتوسان باید حداقل با غلظت گروه عاملی آمین متصل به کیتوسان موجود در محلول برابر باشد [۱۷]. بنابراین، انحلال‌پذیری را می‌توان پارامتری برشمرد که کنترل آن دشوار است، زیرا به عوامل زیادی مانند درجه استیل‌دار شدن، ماهیت اسید استفاده شده، توزیع گروه‌های استیل در طول زنجیر کیتوسان و شرایط خشک‌کردن پلی‌ساکارید وابسته است [۱۹]. همچنین، شکل پلیمری انحلال‌پذیر در آب نیز برای کیتوسان، در مجاورت گلیسرول-۲-فسفات، به دست آمده است. محلول نهایی در pH حدود ۷ و دمای محیط پایدار است. اما این محلول با افزایش دما تا ۴۰°C ژل می‌شود [۱۹].

#### زیست‌تخریب‌پذیری

از جنبه‌های مهم استفاده از پلیمرها در سامانه‌های دارورسانی، سرنوشت سوخت‌وسازی یا زیست‌تخریب‌پذیری آن‌ها در بدن است. در شرایطی که پلیمر آبدوستی مانند کیتوسان در بدن جذب عمومی می‌شود، لازم است از وزن مولکولی مناسب برای دفع کلیوی نیز برخوردار باشد. اگر پلیمر از اندازه مناسب بزرگ‌تر باشد، باید

پارامتر مهم دیگری که در کیتوسان باید مدنظر قرار گیرد، وزن مولکولی پلیمر و توزیع آن است. توزیع وزن مولکولی کیتوسان با استفاده از روش رنگ‌نگاری مایع کارآمد (HPLC) [۱۳] و وزن مولکولی متوسط کیتین و کیتوسان با روش پراکنش نور محاسبه شده است. گرانیوی‌سنجی نیز از روش‌های ساده و سریع برای تعیین وزن مولکولی کیتوسان است که در آن ویژگی‌های حلال به کار رفته برای حل کردن کیتوسان از عوامل اثرگذار به‌شمار می‌رود. معادله (۱) که معادله Mark-Houwink نامیده می‌شود، رابطه میان وزن مولکولی کیتوسان و گرانیوی ذاتی محلول را نشان می‌دهد [۸، ۱۴]:

$$\eta = KM^\alpha \quad (1)$$

در این معادله،  $\eta$  گرانیوی ذاتی برحسب mL/g و M وزن مولکولی کیتوسان است [۱۵]. ضرایب ثابت K و  $\alpha$  نیز با توجه به نوع حلال کیتوسان تعیین می‌شوند [۶].

#### انحلال‌پذیری

انحلال‌پذیری کیتوسان افزون بر درجه استیل‌دار شدن، به توزیع

در نتیجه رهایش دارو از آن، بسیار مورد توجه است [۳۲]. میکروذرات کیتوسان با ویژگی‌های مناسبی چون بار مثبت سطحی، تهیه آسان، زیست‌چسبندگی، افزایش زمان اقامت دارو در محل جذب و افزایش نفوذپذیری دارو، کاربرد گسترده‌ای به‌عنوان حامل دارو در سامانه‌های دارورسانی دارند [۵۸].

### میکروذرات کیتوسان

دارورسانی از راه تزریق، به‌ویژه تزریق درون وریدی، از راه‌های دستیابی آسان به گردش خون با جذب و انتقال سریع دارو به محل اثر است. اما این ویژگی معمولاً با کاهش سریع سطح دارو در گردش خون عمومی همراه است. اغلب، به‌منظور اثربخشی بیشتر درمان، بهتر است سطح دارو در بازه غلظتی مؤثر آن، در طول دوره درمان حفظ شود [۳۳]. بنابراین، تلاش شده است سامانه‌ها در روش تزریقی، تأمین‌کننده رهایش کنترل شده دارو باشند. ماتریس حامل دارو در این سامانه‌ها باید زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر باشد. همچنین لازم است، سامانه از قابلیت رهایش کنترل شده دارو برای مدت زمان طولانی در گردش خون عمومی، ساخت آسان و جهت‌گیری حامل‌های دارویی با سازوکار هدفمندسازی فعال یا غیرفعال به محل مدنظر در بدن، برخوردار باشد. بنابراین، کیتوسان می‌تواند انتخاب مناسبی برای این حامل‌های شبکه‌ای به‌شمار رود [۳۴].

میکروذرات کیتوسان اغلب پودری‌شکل، بسیار سبک و دارای اندازه ذرات بین  $1-1000 \mu m$  هستند. سامانه‌های مبتنی بر میکروذرات کیتوسان کاربردهای وسیعی در مهندسی زیست‌پزشکی و دارویی دارند [۳،۳۴].

این میکروذرات معمولاً ساختاری نامتخلخل دارند و دارویی به‌دام افتاده در آن‌ها با سازوکار نفوذ آزاد می‌شود. بنابراین، سرعت تورم از نقش مهمی در رهایش دارو برخوردار است [۳۵]. تا کنون، میکروذرات کیتوسان برای انتقال عوامل فعال مختلف، مانند داروها، پروتئین‌ها و پادژن‌ها به‌کار رفته‌اند [۳۶-۳۸] و کاربرد آن‌ها را در سامانه‌های دارورسانی می‌توان از جنبه‌های گوناگون بررسی کرد. در ادامه تلاش شده است، کاربرد میکروذرات کیتوسان در دارورسانی، با کمک دسته‌بندی آن‌ها بر مبنای روش‌های تهیه پرکاربرد، در قالب پژوهش‌هایی بیان شود که تاکنون انجام یافته است. شکل ۲ و جدول ۲ به‌ترتیب روش‌های پرکاربرد تهیه میکروذرات کیتوسان را به‌منظور استفاده در دارورسانی و نمونه‌ای از کاربردهای میکروذرات کیتوسان را در دارورسانی بر اساس روش تهیه نشان می‌دهند.

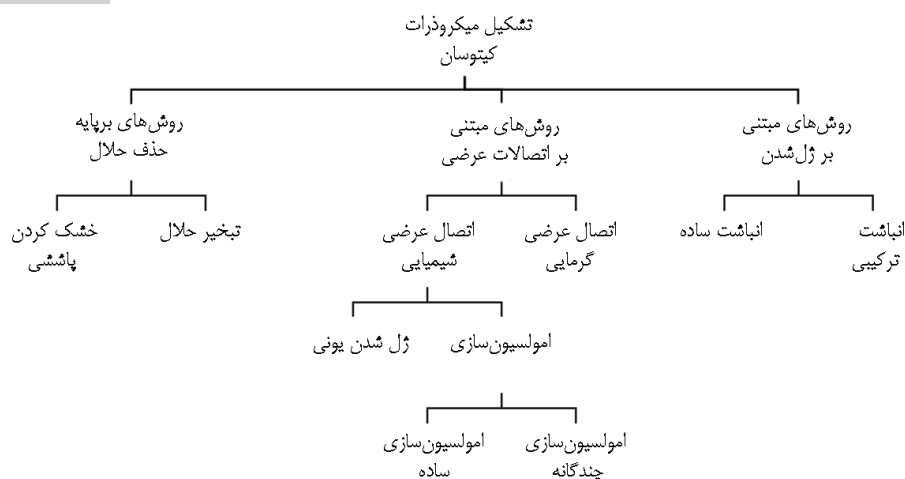
در بدن تخریب شود. زیست‌تخریب‌پذیری (شیمیایی یا آنزیمی)، پلیمر را به اندازه‌های کوچک‌تری تبدیل می‌کند تا دفع کلیوی آن را امکان‌پذیر سازد. از نمونه‌های زیست‌تخریب‌پذیری شیمیایی در بدن، تخریب اسیدی پلیمر در معده است. اگر چه سازوکارهای دیگری مانند تخریب رادیکال آزاد و تخریب اکسایشی-کاهشی نیز گزارش شده است، اما به‌نظر نمی‌رسد، این سازوکارها بر بدن اثرگذار باشند. تخریب کیتوسان در بدن به‌وسیله آنزیم‌هایی اتفاق می‌افتد که اتصال‌های گلوکوزامین و گروه‌های استیل را آبکافت می‌کنند [۲۰،۲۱]. تخریب کیتوسان رابطه مستقیمی با درجه استیل‌دارشدن و رابطه عکس با وزن مولکولی کیتوسان دارد. با افزایش درجه استیل‌دارشدن و کاهش طول زنجیر کیتوسان، سرعت تخریب آن نیز در بدن افزایش می‌یابد [۱۱،۲۲].

### کیتوسان و دارورسانی

فناوری رهایش کنترل‌شده دارو در دهه ۱۹۸۰ ظهور کرد. دستیابی به رهایش تکرارپذیر و پیش‌بینی‌شونده هر عامل در محیط خاص و در مدت طولانی، اثر درخور توجهی بر دارورسانی کنترل شده و تأمین درمان دارویی مناسب با پاسخ بهینه، کمینه عوارض جانبی و اثربخشی بلندمدت دارد. اشکال دارویی با رهایش کنترل شده در کنار افزایش ایمنی، اثربخشی و اطمینان‌پذیری درمان، موجب کاهش تناوب در دارودرمانی می‌شوند [۴].

طی سه دهه اخیر، کاربردهای پزشکی گسترده برای کیتین و ترکیبات این خانواده گزارش شده است، اما انحلال‌پذیری اندک کیتین از محدودیت‌های کاربرد آن به‌شمار می‌رود.

کیتوسان با برخورداری از ویژگی‌های مناسب گفته شده، از پرکاربردترین ترکیبات خانواده کیتین در زمینه دارورسانی و انتقال عوامل رشد است. تاکنون صدها نمونه از کاربردهای کیتوسان در سامانه‌های دارورسانی گزارش شده است که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به نانوذرات [۲۳،۲۴]، میکروذرات [۲۵] و هیدروژل‌ها [۲۶-۲۹] اشاره کرد. نانوذرات کیتوسان با ویژگی‌های مناسبی مانند بار مثبت سطحی، قابلیت انحلال در محیط‌های آبی، زیست‌چسبندگی، افزایش زمان اقامت دارو در محل جذب و افزایش نفوذپذیری دارو به‌عنوان حامل دارو در سامانه‌های دارورسانی کاربرد گسترده‌ای دارند. از آن جمله می‌توان به انتقال داروهای دارای وزن مولکولی کم، مانند داروهای ضدسرطان یا انتقال واکسن‌ها و درشت‌مولکول‌های پروتئینی و DNA اشاره کرد [۳۰،۳۱]. استفاده از سامانه‌های دارورسانی بر پایه میکروذرات به‌دلیل امکان‌پذیربودن کنترل ساختار فرمولبندی و



شکل ۲- روش‌های کاربرد تهیه میکروذرات کیتوسان.

## روش‌های برپایه حذف حلال

عامل اتصال‌دهنده عرضی، به وسیله روش‌های تبخیر حلال از امولسیون جداسازی می‌شوند. این محلول را بدون به کار بردن عامل اتصال‌دهنده عرضی، می‌توان با روش‌های مختلف به قطره‌های ریز

در این روش‌ها، محلول کیتوسان با استفاده از حلال مناسب تهیه می‌شود. میکروذرات کیتوسان، پس از تهیه با استفاده از

جدول ۲- نمونه‌ای از کاربرد میکروذرات کیتوسان در دارورسانی بر اساس روش‌های تهیه.

| روش تهیه                     | عامل فعال دارویی                 | اندازه ذرات (μm) | مرجع |
|------------------------------|----------------------------------|------------------|------|
| روش‌های برپایه حذف حلال      | خشک کردن پاششی                   | ۱۰-۲             | ۳۹   |
|                              |                                  | ۱-۲              | ۴۰   |
|                              |                                  | ۱-۲۰             | ۴۱   |
| تبخیر حلال                   | تبخیر حلال                       | ۲-۹              | ۴۲   |
|                              |                                  | ۱-۵              | ۲۵   |
|                              |                                  | ۱۹-۲۹            | ۴۳   |
| ایجاد اتصالات عرضی           | اتصال عرضی گرمایی                | ۸۰-۱۶۰           | ۴۴   |
|                              | اتصال عرضی شیمیایی (ژل شدن یونی) | ۸۰-۳۱۵           | ۴۵   |
|                              |                                  | ۱۰۰              | ۴۶   |
| روش‌های برپایه امولسیون سازی | امولسیون سازی ساده               | ۲۰۰۰-۴۰۰۰        | ۴۷   |
|                              |                                  | ۱۱۹۴-۱۵۹۸        | ۴۸   |
|                              |                                  | ۰/۳-۳            | ۴۹   |
| امولسیون سازی ترکیبی         | امولسیون سازی ترکیبی             | ۳-۷              | ۵۰   |
|                              |                                  | ۵-۱۲             | ۵۱   |
|                              |                                  | ۴۲               | ۵۲   |
| توده شدن                     | توده شدن                         | ۲۲-۲۵            | ۵۳   |
|                              |                                  | ۴-۲۳۰            | ۵۴   |
|                              |                                  | ۵۲۵              | ۵۵   |
| توده شدن                     | توده شدن                         | ۰/۲-۰/۹          | ۵۶   |
|                              |                                  | ۱۰-۸۰۰           | ۵۷   |
|                              |                                  | ۱۰-۴۵            | ۵۸   |
|                              |                                  | -                | ۵۹   |
| توده شدن                     | توده شدن                         | -                | ۶۰   |
|                              |                                  | -                | -    |

سپس خشک کردن آن‌ها، از اثر عوامل فرایندی مانند دما، قطر نازل و سرعت جریان هوا بر اندازه میکروذرات نهایی می‌توان چشم‌پوشی کرد. اما، افزایش مقدار عامل اتصال‌دهنده عرضی موجب کاهش متوسط اندازه و بار سطحی این ذرات می‌شود. از نظر شکل‌شناسی و مقدار داروی بارگذاری شده می‌توان گفت، چین‌خوردگی‌های سطحی میکروذرات نهایی بهبود چشم‌گیر نمی‌یابد، اما مقدار بارگذاری دارو کاهش نشان می‌دهد [۳۹،۶۲].

### اثر غلظت کیتوسان و دارو

افزایش غلظت کیتوسان موجب تشکیل میکروذراتی با متوسط اندازه بیشتر می‌شود. همچنین، با افزایش غلظت پلیمر کیتوسان و در نتیجه افزایش گرانیوی محلول، چین‌خوردگی‌های سطحی میکروذرات زیاد می‌شود و یکنواختی اندازه آن‌ها کاهش می‌یابد. افزایش غلظت دارو در محلول اولیه نیز موجب زیاده‌شدن گرانیوی محلول و در نتیجه افزایش چین‌خوردگی‌های سطحی ذرات می‌شود [۲۵،۳۹،۶۱]. همچنین، با افزایش وزن مولکولی کیتوسان متوسط اندازه میکروذرات تشکیل شده افزایش یافته و بار سطحی میکروذرات اندکی کاهش می‌یابد [۳۹].

### اثر عوامل فرایندی

از عوامل مؤثر دیگر بر مشخصه‌های میکروذرات کیتوسان می‌توان به قطر نازل، سرعت گردش هوای سیکلون، سرعت ورود هوا به خشک‌کن، دمای ورودی و خروجی هوای خشک‌کن و سرعت تزریق خوراک اشاره کرد. در حالت کلی، کمینه اندازه و بیشینه بار سطحی میکروذرات در بیشینه سرعت گردش هوای سیکلون، کمینه سرعت تزریق خوراک و کمینه اندازه قطر نازل به‌دست می‌آید [۳۹،۶۱].

برای تهیه میکروذرات کیتوسان بدون استفاده از عوامل اتصال‌دهنده عرضی، ابتدا کیتوسان با غلظتی مشخص در محلول آبی استیک اسید حل می‌شود. محلول به‌دست آمده به دستگاه تزریق می‌شود. محلول با شدت جریان مشخص به‌وسیله پمپ در دستگاه خشک‌کن پاششی و در جریانی از هوای داغ پاشیده می‌شود. قطره‌های بسیار ریز تشکیل شده در جریان هوای داغ حلال خود را از دست داده و میکروذرات نهایی را ایجاد می‌کنند. در نهایت، ذرات با استفاده از جداکننده سیکلونی از هوای مرطوب جدا می‌شوند [۶۳].

در حالت استفاده از عوامل اتصال‌دهنده عرضی، ابتدا میکروذرات کیتوسان با افزودن این عوامل به محلول کیتوسان تهیه می‌شوند.

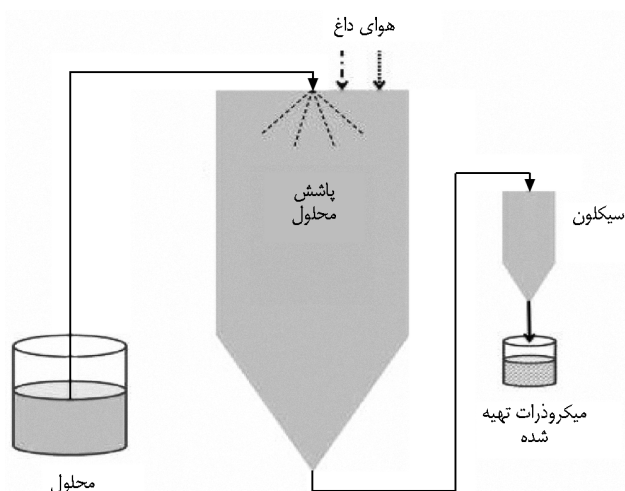
تبدیل کرد. میکروذرات کیتوسان به‌وسیله جداسازی حلال موجود در قطره‌ها با روش‌های تبخیر حلال به‌دست می‌آید.

### خشک کردن پاششی

خشک کردن پاششی در حالت کلی روشی ارزان، ساده، تکرارپذیر، سریع و دارای امکان افزایش مقیاس آسان است. از محدودیت‌های این روش می‌توان به ویژگی‌های حلال اشاره کرد که باید از اشتعال‌پذیری کم و فراریت زیاد برخوردار باشد. بخش‌های مختلف خشک‌کن پاششی در شکل ۳ آمده است. خوراک دستگاه می‌تواند محلول، تعلیق یا امولسیون باشد. مراحل اصلی خشک کردن پاششی شامل افشاندن خوراک به‌وسیله گاز (به‌طور معمول هوا) در دما و فشار زیاد، تبخیر حلال، خشک کردن ذرات و جداسازی نمونه از هوای مرطوب است. دمای ورودی و خروجی معمولاً به‌ترتیب حدود  $150-220^{\circ}\text{C}$  و  $50-80^{\circ}\text{C}$  است. در ویژگی‌های میکروذرات تهیه شده نهایی عوامل گوناگونی مانند وزن مولکولی، گرانیوی، نوع و غلظت خوراک و عوامل اتصال‌دهنده عرضی از یک سو و عوامل فرایندی از جمله دمای ورودی و خروجی، قطر نازل، سرعت و فشار هوای ورودی، سرعت چرخش هوای سیکلون و سرعت تزریق خوراک از سوی دیگر مؤثرند. در ادامه، به‌طور خلاصه به بررسی اثر این عوامل پرداخته می‌شود [۳۹،۶۱].

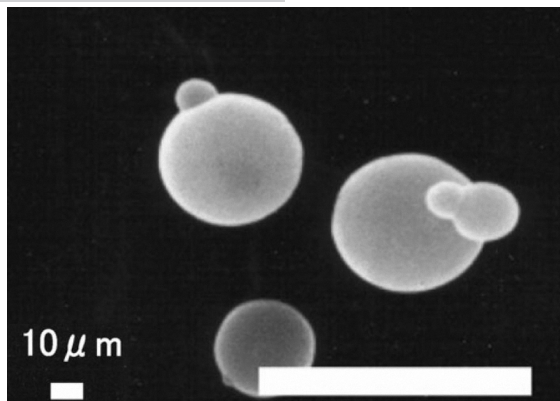
### اثر عوامل اتصال‌دهنده عرضی

در تهیه میکروذرات کیتوسان می‌توان از عوامل اتصال‌دهنده عرضی، به‌منظور تشکیل میکروذرات در محلول اولیه با روش ژل شدن یونی و تزریق تعلیق به‌دست آمده به دستگاه خشک‌کن پاششی، استفاده کرد. در این حالت، به‌دلیل تشکیل اولیه میکروذرات کیتوسان و



شکل ۳- دستگاه خشک‌کن پاششی و اجزای آن [۶۱].



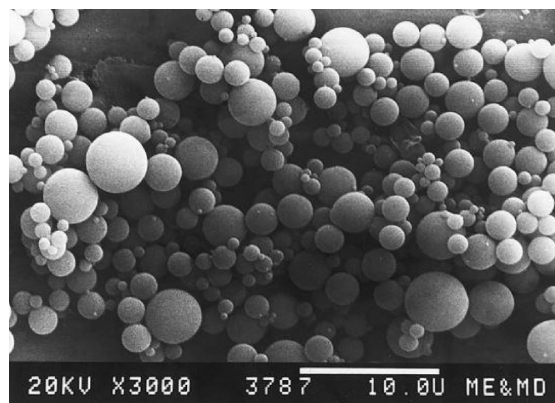


شکل ۵- تصویر SEM گزارش شده توسط Takahashi و همکاران [۴۱].

تشکیل شده در ذرات کاهش یافت. همچنین، بررسی برهم‌کنش میان دارو و کیتوسان با استفاده از طیف‌سنجی FTIR و بررسی رهایش دارو از ماتریس میکروذرات کیتوسان نشان داد، رهایش دارو از سامانه تهیه شده در مقایسه با بلورهای دارویی بین ۵ تا ۹ برابر آهسته‌تر شد. بنابراین، میکروذرات تهیه شده سامانه مناسبی را برای رهایش آهسته دارو فراهم کردند [۴۱].

در سال ۲۰۰۹، Alhalaweh و همکاران میکروذرات کیتوسان دارای داروی ضد میگرن زولمیتریپتان (zolmitriptan) را با روش خشک‌کردن پاششی، به منظور تزریق از راه بینی تهیه کردند. اثر نوع، وزن مولکولی و غلظت کیتوسان در محلول اولیه بر مشخصه‌های میکروذرات نهایی بررسی شد. دارو، از نظر شیمیایی در میکروذرات پایدار و دارای درصد بارگذاری ۱۰۵٪-۹۳ بود. میکروذرات تهیه شده کروی شکل و دارای اندازه‌ای مناسب بودند. رهایش دارو از سامانه تهیه شده تا حدود ۶۰ min ادامه داشت. از نتایج این پژوهش می‌توان به افزایش زمان رهایش دارو با افزایش درصد کیتوسان موجود در میکروذره اشاره کرد [۴۲].

در سال ۲۰۱۵، صادقی و همکاران میکروذرات کیتوسان دارای داروی ریواسیتیگمین (rivastigmine) را برای استفاده به عنوان حامل دارو در سامانه تراپوستی، با روش خشک‌کردن پاششی تهیه کردند. آن‌ها با پراکنده کردن میکروذرات در چسب آکریلی، سامانه تراپوستی نهایی را به دست آوردند. نتایج SEM نشان داد، میکروذرات در چسب آکریلی، شکل ظاهری خود را حفظ کرده‌اند (شکل ۶) و افزایش درصد میکروذرات سبب کاهش خواص چسبندگی شده است. همچنین، مقایسه رهایش تراپوستی سامانه دارای میکروذرات و سامانه دارای داروی آزاد ریواسیتیگمین (شکل ۷) نشان داد، میکروذرات کیتوسان پراکنده شده در چسب، با عمل کردن به عنوان حامل دارو، از تشکیل بلورهای دارویی در



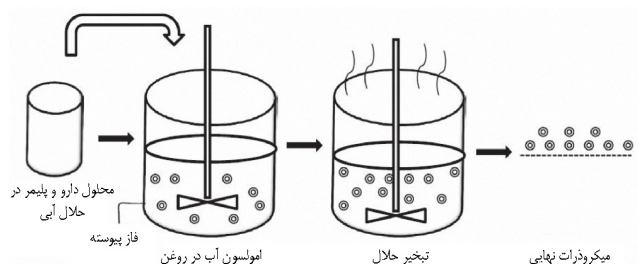
شکل ۴- تصویر SEM گزارش شده توسط Hi از میکروذرات تهیه شده [۳۹].

سپس، تعلیق دارای این میکروذرات به منظور جداسازی و خشک‌کردن میکروذرات نهایی، به دستگاه تزریق می‌شود [۳۴]. تا کنون، از میکروذرات کیتوسان با استفاده از روش خشک‌کردن پاششی، به منظور دارورسانی به نقاط مختلف بدن استفاده شده است [۶۴-۶۶] که در ادامه به عنوان نمونه به برخی از آن‌ها اشاره می‌شود. در سال ۱۹۹۹، He و همکاران به تهیه میکروذرات کیتوسان با استفاده از دستگاه خشک‌کن پاششی اقدام کردند. میکروذرات تهیه شده از سطحی صاف و کروی و اندازه بین ۲ μm تا ۱۰ μm و بار سطحی مثبت برخوردار بودند (شکل ۴). این گروه، روشی جدید را برای بارگذاری داروهای سایمتیدین (cimetidine)، فاموتیدین (famotidine) و نیزاتیدین (nizatidine) گزارش کردند که در آن تعلیق ترکیبی از کیتوسان به دستگاه خشک‌کن پاششی تزریق شد. سرعت رهایش دارو از میکروذرات در این روش، در مقایسه با روش رایج تزریق تعلیق واحد به دستگاه، کاهش درخور توجهی یافت [۳۹].

در پژوهش دیگری در سال ۲۰۰۳، کیتوسان دارای وزن مولکولی متوسط و زیاد همراه با هیدروکسی پروپیل متیل سلولوز (HPMC)، در نسبت‌های مختلف داروی کربامازپین (carbamazepine) به پلیمر، به دستگاه تزریق شد. مشاهده شد، بازده به دام افتادن دارو در میکروذرات و منحنی رهایش دارو کاملاً به ترکیب پلیمرها و نسبت دارو به پلیمر وابسته است [۴۰].

در سال ۲۰۰۵، Takahashi و همکاران میکروذرات کیتوسان دارای داروی استامینوفن را با روش خشک‌کردن پاششی تهیه کردند. بررسی شکل‌سناسی و اندازه میکروذرات نشان داد، آن‌ها از شکل کروی و سطح صاف برخوردار بودند (شکل ۵). بررسی امکان تشکیل بلورهای دارویی در میکروذرات نیز نشان داد، با کاهش نسبت دارو به پلیمر در محلول اولیه، مقدار بلورهای دارویی





شکل ۸- نمایی از روش تبخیر حلال [۶۸].

ترکیبی از هر دو پلیمر اقدام به تهیه میکروذرات کردند. در نهایت، سامانه میکروذرات تهیه شده از کیتوسان و ترکیبی از کیتوسان و هیالورونان، زیست‌دسترس‌پذیری داروی جنتامایسین را به ترتیب تا ۳۱٪ و ۴۳٪ افزایش دادند. بررسی‌های برون‌تنی و مطالعات انجام شده روی قورباغه نشان داد، همه سامانه‌ها مخاط‌چسب بوده‌اند. همچنین، این سامانه‌ها در مقایسه با حالت تزریق محلول دارای دارو از راه بینی، رهایش بلندمدت‌تری را برای داروی جنتامایسین نشان دادند [۴۳].

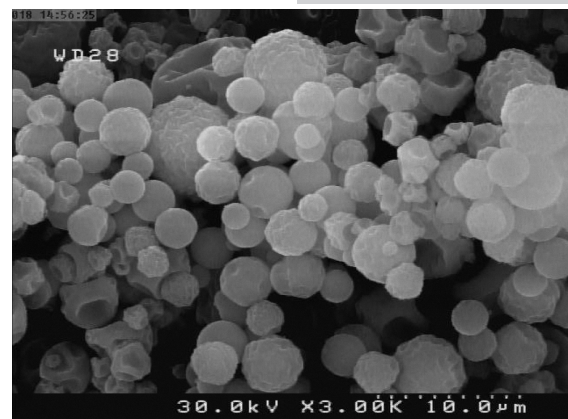
Bogataj و همکاران در سال ۲۰۰۰، میکروذرات کیتوسان دارای داروی پپمیدیک اسید (pipemidic acid) را با روش تبخیر حلال تهیه کردند. بدین منظور، آن‌ها محلول دارو را در استون در محلول کیتوسان پراکنده کردند. سپس، مخلوط را در پارافین مایع به حالت تعلیق درآوردند. در این پژوهش، به منظور جلوگیری از به هم چسبیدن میکروذرات، از منیزیم استفاده شد. نتایج نشانگر کاهش متوسط اندازه میکروذرات با افزایش مقدار منیزیم بود [۴۴]. در سال ۲۰۰۳ میکروذرات کیتوسان هیدروکلرید دارای پپمیدیک اسید، با استفاده از این روش و با حلال‌های استون و پارافین تهیه و خواص آن‌ها با میکروذرات داروی تنها مقایسه شد. نتیجه آن‌که، مقدار ماده ضدباکتری پپمیدیک اسید در میکروذرات بزرگ‌تر، به دلیل تجمع ذرات نامحلول این ماده در قطره‌های بزرگ‌تر، افزایش یافته بود. افزون بر این، رهایش پپمیدیک اسید در میکروذرات کیتوسان سریع‌تر بود [۴۵].

### ایجاد اتصالات عرضی

تهیه میکروذرات کیتوسان با استفاده از ایجاد اتصالات عرضی میان مولکول‌های پلیمر را می‌توان به دو دسته کلی اتصالات عرضی گرمایی و شیمیایی دسته‌بندی کرد.

### اتصال عرضی گرمایی

در سال ۱۹۹۶، Orienti و همکاران میکروذرات کیتوسان دارای ایندومتاسین (indomethacin) را با روش اتصال عرضی گرمایی و

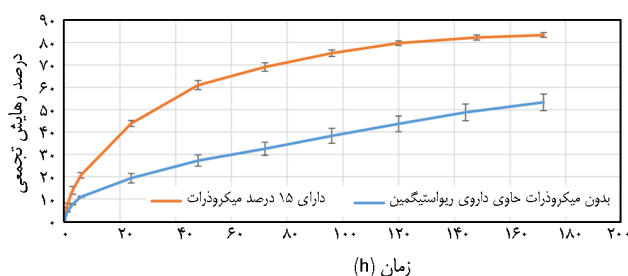


شکل ۶- تصویر SEM گزارش شده توسط صادقی و همکاران [۲۵].

چسب و کاهش بیش از اندازه سرعت رهایش دارو از سامانه جلوگیری به عمل آورده‌اند. سامانه دارای میکروذرات، دارو را طی ۶ روز و با سرعتی آهسته آزاد کرده است [۲۵].

### روش تبخیر حلال

این روش مبتنی بر تشکیل امولسیون، بین محلول پلیمری و فاز آبی یا غیرآبی پایای مخلوط‌نشدنی است. حلال موجود در فاز پراکنده امولسیون با استفاده از روش‌های مختلف، مانند کاهش فشار یا افزایش دما تبخیر شده و میکروذرات تهیه شده را با استفاده از مرکزگریزی از فاز پیوسته جدا می‌کند (شکل ۸). در سال ۱۹۹۱، Li و همکاران روشی را با نام خشک در روغن (dry-in-oil) معرفی کردند. در این روش، محلول کیتوسان در استیک اسید به طور مستقیم در روغن پراکنده می‌شود. سپس، با افزایش دما و کاهش فشار مخلوط، حلال آن تبخیر و میکروذرات تشکیل می‌شود [۶۷]. در بررسی دیگری، Lim و همکاران در سال ۲۰۰۰، میکروذرات دارای داروی ضدباکتری جنتامایسین (gentamicin) را با هدف دارورسانی از راه بینی تهیه کردند. بدین منظور، آن‌ها با روش تبخیر حلال و استفاده از پلیمرهای کیتوسان، هیالورونان (hyaluronan) و



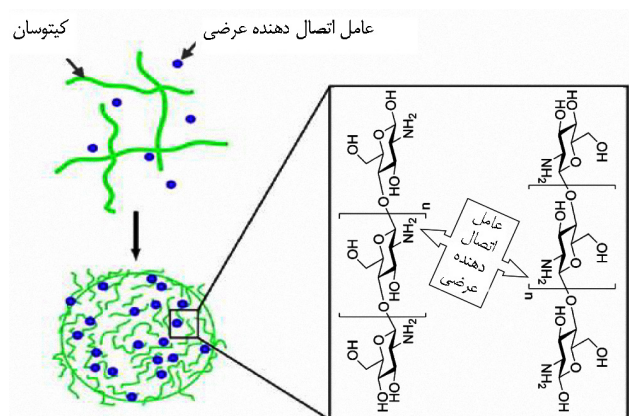
شکل ۷- نمودار رهایش تراپوستی سامانه‌های دارای ۱۵٪ میکروذره و بدون میکروذره دارای ۵/۱٪ داروی ریواس‌تینگمین [۲۵].

ذرات تشکیل شده با شیوه‌های مختلف از محلول جدا شده و پس از شست‌وشو، خشک می‌شوند [۳۱، ۳۴، ۶۹]. شکل ۹ فرایند تشکیل میکروذرات کیتوسان را به روش ژل شدن یونی و شکل ۱۰ ساختار کیتوسان، نمک تری‌پلی فسفات (TPP) و میکروذرات نهایی را در ابعاد مولکولی نشان می‌دهد.

تاکنون پژوهش‌های زیادی در زمینه تهیه میکروذرات کیتوسان دارای عوامل فعال با روش ژل شدن یونی انجام گرفته است [۷۲-۷۱]. به عنوان نمونه، در سال ۲۰۰۲ ذرات پلیمری آلژینات-کیتوسان با روش ژل شدن یونی تهیه شد. رهائش داروی سدیم دیکلوفناک (sodium diclofenac) از این میکروذرات در pHهای اسیدی انجام نشد. اما در pHهای بازی و نزدیک به خنثی، رهائش دارو در مدت زمان کوتاه (چند دقیقه) کامل شد. در این پژوهش، نسبت دو پلیمر به کار رفته و غلظت کاتیون‌های محیط رهائش، به عنوان کنترل کننده سرعت رهائش دارو گزارش شدند [۴۷].

در سال ۲۰۱۰، Rao و همکاران میکروذرات کیتوسان دارای داروی اسکلوپناک (aceclofenac) را با روش ژل شدن یونی و استفاده از نمک TPP تهیه کردند. درصد بارگذاری دارو بین ۶۲٪ تا ۹۳٪ متغیر بوده و به پارامترهای عملیاتی مانند غلظت نمک و pH آن وابسته بود. قطر ذرات نیز بین ۱۱۹۴  $\mu\text{m}$  تا ۱۵۶۸  $\mu\text{m}$  گزارش شد. رهائش دارو از میکروذرات در بافر فسفات (pH=۷/۴) نیز با رهائش انفجاری جزئی (slight burst) همراه بود و از معادله هیگچی (Higuchi) پیروی می‌کرد [۴۸].

در سال ۲۰۱۳، Wassmer و همکاران میکروذرات کیتوسان دارای پروتئین‌های سرم آلبومین گاوی (BSA) را با روش ژل شدن یونی، به منظور انتقال به شبکه چشم در شرایط درون‌تنی و برون‌تنی تهیه کردند. همان‌طور که انتظار می‌رفت، در شرایط برون‌تنی رهائش پروتئین با افزایش مقدار کپسولی شدن افزایش یافت [۴۹].



شکل ۱۰- فرایند ژل شدن یونی در بعد میکروسکوپی [۷۰، ۸].

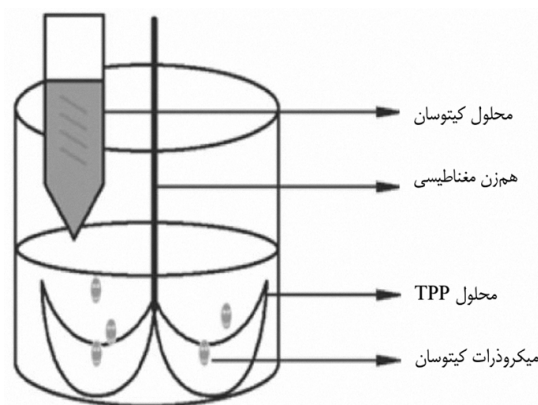
استفاده از سیتریک اسید تهیه کردند. آن‌ها محلول کیتوسان را با غلظت‌های مختلف در نسبت ثابت کیتوسان به سیتریک اسید، آماده کردند. پس از سرد کردن این محلول در دمای  $0^{\circ}\text{C}$  و افزودن آن به روغن ذرت، ایجاد اتصال عرضی گرمایی در  $120^{\circ}\text{C}$  اتفاق افتاد [۴۶].

## اتصال عرضی شیمیایی

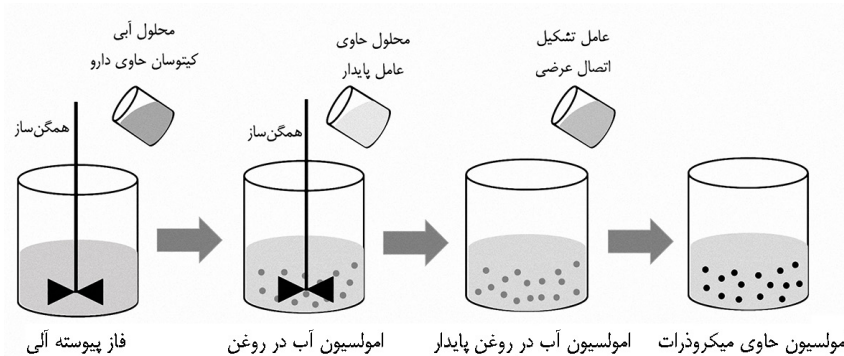
ایجاد اتصال عرضی میان رشته‌های پلیمری کیتوسان، به منظور تشکیل میکروذرات کیتوسان، هم در یک فاز (روش ژل شدن یونی) و هم در محلول‌های دوفازی (روش تعلیق) انجام پذیر است. رایج‌ترین مواد استفاده شده برای این کار، آنیون‌های چندظرفیتی، مانند پلی فسفات‌ها، سولفات‌ها و نیز گلو تارآلدئید (glutaraldehyde) و فرمالدهید هستند [۳].

## ژل شدن یونی

در سال ۱۹۹۷، Calvo روش ژل شدن یونی را معرفی کرد که به عنوان یکی از رایج‌ترین روش‌های تهیه میکروذرات کیتوسان شناخته می‌شود. از آنجاکه کیتوسان دارای گروه‌های عاملی آمینی است، در محیط اسیدی با دریافت یون هیدروژن، به حالت کاتیونی در آب حل می‌شود. بنابراین، وجود آنیون چندظرفیتی در محیط، بر اساس جاذبه الکتروستاتیکی میان بارهای مثبت و منفی، تشکیل هیدروژل را به وسیله این پلیمر امکان پذیر می‌سازد. این روش بر مبنای اتصال عرضی شیمیایی میان رشته‌های کیتوسان با آنیون‌های چندظرفیتی است. در روش ژل شدن یونی محلول کیتوسان به شکل قطره قطره به محلول آبی نمک آنیونی چندظرفیتی افزوده می‌شود که با سرعت مشخصی در حال هم خوردن است.



شکل ۹- نمایی از فرایند تشکیل میکروذرات به روش ژل شدن یونی [۶۹].



شکل ۱۱- نمای کلی مراحل تشکیل میکروذرات کیتوسان با روش امولسیون سازی [۳۴].

## روش های بر پایه امولسیون سازی

### امولسیون سازی ساده

در این روش، میکروذرات بر مبنای گروه های عاملی فعال موجود در زنجیر کیتوسان تهیه می شوند (شکل ۱۱). بدین منظور، محلول آبی دارای کیتوسان در فاز غیرآبی پیوسته پراکنده می شود تا امولسیون آب در روغن به دست آید. محلول دارای عامل پایدارکننده برای پایدارسازی امولسیون اضافه می شود. سپس، محلول دارای عامل ایجادکننده اتصال عرضی یا ژل کننده، به امولسیون افزوده می شود تا میکروذرات تشکیل شوند. در مرحله بعد، جداسازی و خشک کردن انجام می شود [۳]. در این روش، کنترل اندازه میکروذرات نهایی امکان پذیر است و به عواملی مانند نوع و غلظت عامل اتصال دهنده عرضی، سرعت همزن و اندازه قطره ها بستگی دارد. از چالش های این روش، جداسازی مواد واکنش نکرده است. گلو تارآلدئید و سولفوریک اسید از عوامل اتصال دهنده عرضی رایج در این روش هستند [۳۴].

امولسیون سازی از پرکاربردترین روش ها برای تهیه میکروذرات کیتوسان به شمار می رود و در بسیاری از مقالات برای تهیه این میکروذرات دارای عوامل فعال به آن اشاره شده است. به عنوان نمونه در سال ۲۰۰۹، Wilson و همکاران میکروذرات مغناطیسی کیتوسان دارای داروی تاکرین (tacrine) را با استفاده از این روش تهیه کرده اند. بدین منظور، محلول آبی کیتوسان دربردارنده دارو و میکروذرات مغناطیسی آن با قطر حدود  $1 \mu m$  در فاز روغنی پراکنده شده و میکروذرات کیتوسان، با استفاده از عامل اتصال دهنده عرضی گلو تارآلدئید تهیه شدند. بررسی درون تنی نشان داد، میکروذرات مغناطیسی کیتوسان غلظت تاکرین موجود در مغز را در مقایسه با تزریق دارو به مقدار درخور توجهی افزایش داد. این میکروذرات برای بهبود علائم شناخت بیماری آلزایمر مفید گزارش شده اند [۵۰].

در سال ۲۰۱۲، Martins و همکاران میکروذرات کیتوسان دارای هپارین را با روش امولسیون سازی و پیوندزنی عرضی تهیه کردند. امولسیون آب در روغن با پراکنده سازی محلول کیتوسان در بنزیل الکل تهیه شد. میکروذرات با افزودن محلول TPP به این امولسیون تهیه شدند. میکروذرات تهیه شده پس از جداسازی، در محلول دارای هپارین (heparin) پراکنده شده و بارگذاری هپارین انجام شد. بررسی ها نشان داد، شکل ظاهری میکروذرات به نسبت کیتوسان به TPP بستگی دارد. بررسی رهائش هپارین در آب مقطر و سیال معده نیز نشان داد، منحنی رهائش هپارین را به راحتی می توان با تغییر نسبت کیتوسان به TPP تغییر داد [۵۱].

در سال ۲۰۱۳، Pichayakorn و همکار، میکروذرات کیتوسان دارای داروی مترونیدازول (metronidazole) را برای درمان عفونت های لتهای تهیه کردند. آن ها محلول کیتوسان دارای دارو را آماده کرده و با پراکنده کردن آن در روغن سویا، امولسیون تهیه کردند. در این پژوهش، برای ایجاد اتصال عرضی از گلو تارآلدئید استفاده شد. میکروذرات تهیه شده در فیلم و هیدروژل مخاط چسبی پراکنده شدند. منحنی رهائش دارو از سامانه نهایی در مقایسه با حالتی که پودر دارو در هیدروژل یا فیلم پراکنده شود بسیار طولانی تر بود و پس از آن رهائش دارو از هیدروژل ها طولانی تر از فیلم دربردارنده میکروذرات بود [۵۲].

### امولسیون سازی چندگانه

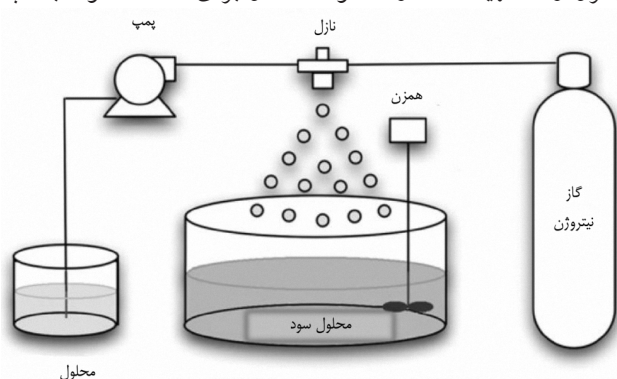
در بسیاری از داروهای آب گریز، امولسیون سازی به شکل متفاوت و با عنوان امولسیون سازی چندگانه (multiple emulsion method) انجام می شود. این داروها به راحتی در محلول کیتوسان پراکنده می شوند. برای تهیه میکروذرات دارای این داروها، ابتدا امولسیون اولیه تهیه می شود که دارای داروی آب گریز در کیتوسان است.

## انباشت

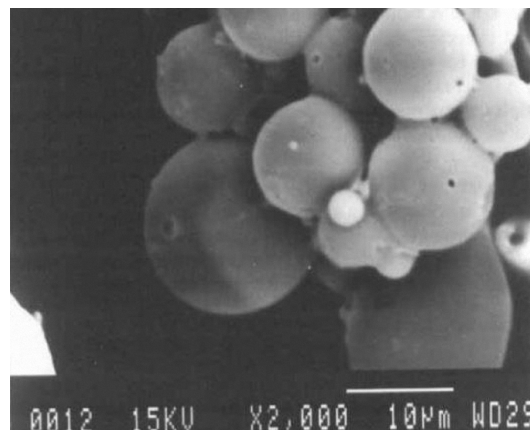
روش انباشت (coacervation) به عنوان روش جداسازی فازی نیز شناخته می‌شود، زیرا شبکه پلیمری کاملاً هسته تشکیل شده را احاطه می‌کند. بدین منظور، ابتدا پلیمر کیتوسان در حلال مناسبی حل می‌شود. سپس، در اثر افزودن محلول دوم (محلول بازی) پلیمر حل شده به شکل نامحلول درآمده و در نهایت ته‌نشین می‌شود و بدین ترتیب میکروذرات ایجاد می‌شوند. از مزیت‌های روش انباشت می‌توان به استفاده نکردن از حلال‌های سمی و آلی اشاره کرد. تاکنون از این روش برای بارگذاری انواع داروها، پروتئین‌ها و DNA استفاده شده است [۳۸،۵۶،۵۷].

تشکیل میکروژل‌های کیتوسان در این روش به شکل‌های مختلف انجام پذیر است. در سال ۱۹۹۶، Berthold و همکاران میکروذرات کیتوسان دارای داروی پردنیزولون سدیم فسفات (prednisolone sodium phosphate) را با روش انباشت و استفاده از سدیم سولفات، به عنوان ته‌نشین‌کننده کیتوسان، با سه وزن مولکولی مختلف تهیه کردند. افزودن سدیم سولفات به محلول کیتوسان سبب کاهش انحلال‌پذیری کیتوسان و ته‌نشین شدن آن شد. مقدار سدیم سولفات به کار رفته در تهیه میکروذرات با وزن مولکولی کیتوسان متناسب بود. بررسی نتایج بارگذاری و رهایش برون‌تنی دارو به ترتیب با استفاده از روش‌های جذب‌سنجی و کیسه نشان داد، درصد بارگذاری دارو ۳۰٪ و رهایش آن به نسبت دارو به پلیمر در میکروذرات وابسته است [۵۶].

در سال ۲۰۱۱، Vasconcellos و همکاران روش جدیدی را بر پایه انباشت برای تهیه میکروذرات کیتوسان دارای پاپین (papain) بررسی کردند. در این روش، آن‌ها محلول کیتوسان را با استفاده از فشار گاز نیتروژن خنثی، در ظرف دارای NaOH افشانده (شکل ۱۳). میکروذرات تهیه شده از محلول جدا و برای حذف سود، با آب



شکل ۱۳- نمایی از روش انباشت که Vasconcellos و همکاران برای تهیه میکروذرات کیتوسان دارای پاپین استفاده کرده‌اند [۵۷].



شکل ۱۲- تصویر SEM از میکروذرات کیتوسان تهیه شده با روش امولسیون‌سازی چندگانه [۵۳].

سپس، امولسیون روغن در آب، در فاز خارجی پراکنده و امولسیون دوگانه روغن در آب در روغن تهیه می‌شود. میکروذرات کیتوسان با افزودن عامل اتصال‌دهنده عرضی مانند گلو تارآلدئید به امولسیون دوگانه تشکیل می‌شوند. این ترکیبات را می‌توان با روش‌های مختلف، مانند تبخیر حلال، جداسازی کرد. در سال ۱۹۹۶، میکروذرات کیتوسان تهیه شده با روش امولسیون‌سازی چندگانه، به منظور بارگذاری داروی آب‌گریز کتوپروفن (ketoprofen) تهیه شدند که از بازده و ویژگی‌های شکل‌شناسی مناسبی برخوردار بودند (شکل ۱۲) [۵۳].

در بررسی دیگری در سال ۲۰۰۲، میکروذرات کیتوسان به منظور بارگذاری داروی سدیم دیکلوفناک، با روش‌های امولسیون‌سازی، ایجاد اتصال عرضی گرمایی و افزودن عوامل اتصال‌دهنده عرضی گلو تارآلدئید و سولفوریک اسید، تهیه شدند. میکروذرات به دست آمده از شکلی کروی و صاف با اندازه بین ۴ µm تا ۲۳۰ µm برخوردار بودند. درصد بارگذاری دارو در آن‌ها، در اتصال عرضی با گلو تارآلدئید، سولفوریک اسید و اتصال عرضی گرمایی به ترتیب ۲۳-۲۹٪، ۲۸-۳۰٪ و ۱۵-۲۳٪ گزارش شد. بررسی رهایش برون‌تنی میکروذرات تهیه شده در محلول بافر با pH=۷/۴ نشان داد، آهسته‌ترین رهایش به میکروذرات تهیه شده با عامل اتصال‌دهنده عرضی گلو تارآلدئید و سریع‌ترین رهایش به میکروذرات تهیه شده با روش اتصال عرضی گرمایی تعلق دارد [۵۴].

در سال ۲۰۰۳، میکروکپسول‌های پلی‌آکریل آمین-کیتوسان با روش امولسیون‌سازی، به منظور بارگذاری داروی ضدالتهاب ایندومتاسین (indomethacin) تهیه شدند. در این بررسی از عامل اتصال‌دهنده گلو تارآلدئید استفاده و مشاهده شد، رهایش این دارو به درجه اتصال عرضی و مقدار داروی بارگذاری شده بستگی دارد [۵۵].



به نسبت کیتوسان به صمغ عربی ۰/۲۵ اشاره کرد [۵۹]. همچنین در سال ۲۰۱۴، Lacerda و همکاران میکروذرات حساس به pH کیتوسان-سدیم آلژینات دارای داروی سل ریغامپیسین (rifampicin) را با روش توده‌شدن ترکیبی تهیه کردند. این میکروذرات با افزودن تدریجی محلول سدیم آلژینات به محلول کیتوسان تهیه شدند. بررسی‌ها نشان داد، این سامانه برای رهایش کنترل شده دارو بسیار کارآمد است، به نحوی که در pH=۶/۸، سرعت رهایش به شدت افزایش یافت. رهایش دارو از این سامانه با سازوکار نفوذ، تورم و تخریب انجام شد [۶۰].

### نتیجه گیری

کیتوسان، زیست‌پلیمر فراوانی است که به واسطه ویژگی‌هایی مانند زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری، بار مثبت سطحی و نیز قابلیت تشکیل الیاف، نانوذرات، میکروذرات و هیدروژل از کاربردهای بسیاری در مهندسی پزشکی، به‌ویژه دارورسانی نوین، برخوردار است. در این میان، میکروذرات کیتوسان، با قابلیت تهیه آسان و سریع و روش‌های تهیه متنوع و سازگار با انواع عوامل فعال، به‌دفعات به‌عنوان حامل انواع داروها و درشت‌مولکول‌هایی مانند DNA و پروتئین‌ها به‌کار رفته است. پژوهش‌ها نشان داده‌اند، میکروذرات کیتوسان افزون بر انتقال هدفمند عوامل فعال، از مزایای دیگری از جمله عبور از موانع مشخص در بدن و رهایش کنترل شده و تأخیری برخوردارند. این مزایا ظرفیت زیاد این میکروذرات در زمینه دارورسانی را ثابت می‌کنند، تا آنجا که با وجود قدمت پژوهش‌ها در زمینه دارورسانی بر پایه میکروذرات کیتوسان، به‌کارگیری روش‌های نوین و ترکیبی برای تهیه یا اصلاح آن‌ها، می‌توان همچنان شاهد تداوم پژوهش‌ها در این زمینه بود.

### مراجع

- Reddy P.D. and Swarnalatha D., Recent Advances in Novel Drug Delivery Systems, *Int. J. Pharm. Tech. Res.*, **2**, 2025-2027, 2010.
- Mainardes R.M. and Silva L.P., Drug Delivery Systems: Past, Present, and Future, *Curr. Drug Targets.*, **5**, 449-455, 2004.
- Sinha V.R., Singla A.K., Wadhawan S., Kaushik R., Kumria R., Bansal K., and Dhawan S., Chitosan Microspheres as a Potential Carrier for Drugs, *Int. J. Pharm.*, **274**, 1-33, 2004.
- Nikander K., Drug Delivery Systems, *J. Aerosol. Med.*, **7**, 19-24, 1994.

یون‌زدوده شست‌وشو داده شدند. در مرحله بعد، اتصال عرضی میکروذرات با عامل گلو‌تارآلدئید یا TPP انجام شد. سپس، میکروذرات در محلول دارای پاپین به مدت ۱۲ h غوطه‌ور شدند تا جذب آن انجام شود. نتایج نشان داد، میکروذرات نهایی برای سامانه‌های رهایش کنترل شده پاپین بسیار مناسب هستند [۵۷]. افزون بر این، از روش بهبودیافته انباشت یا انباشت ترکیبی (complex coacervation) نیز می‌توان برای تهیه میکروذرات کیتوسان استفاده کرد. سدیم آلژینات، سدیم کربوکسی‌متیل سلولوز و سدیم پلی‌آکرلیک اسید از جمله پلیمرهایی هستند که می‌توان برای تهیه میکروذرات با این روش از آن‌ها استفاده کرد. این میکروذرات بر اساس جاذبه بارهای ناهمنام میان پلیمرها تشکیل می‌شوند [۳، ۳۴].

در سال ۲۰۱۰، Dhanasingh و همکار با استفاده از روش انباشته شدن و به‌کارگیری عامل اتصال‌دهنده عرضی گلو‌تارآلدئید، میکروذرات کیتوسان و پروتئین کازئین (casein) دارای آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکول (chloramphenicol) را تهیه کردند. مطالعه تورم و رهایش دارو در pH‌های مختلف نشان داد، تورم و رهایش در pH=۴ بیش از ۱۰ و در این pH بیش از ۷ است. همچنین افزایش درصد پروتئین کازئین سبب کاهش تورم شد [۵۸].

در سال ۲۰۱۴، Butsrean و همکار، میکروذرات کیتوسان و صمغ عربی را با روش انباشته شدن ترکیبی تهیه کردند. همچنین، آن‌ها ترکیبی از تری‌گلیسریدهای تجاری موجود (Miglyol 812) را به‌عنوان داروی مدل چربی‌دوست استفاده کردند. آن‌ها برای تهیه میکروذرات، ابتدا محلول دارای تری‌گلیسرید را به مخلوط صمغ عربی پراکنده شده در آب یون‌زدوده افزودند. پس از هم‌زدن با هم‌گن‌ساز، امولسیون روغن در آب به‌دست آمد. سپس، محلول کیتوسان در استیک اسید قطره‌قطره به امولسیون افزوده شد. در نهایت، محلول دارای نمک TPP اضافه شد تا بین رشته‌های کیتوسانی که پوسته میکروذرات را تشکیل داده‌اند، اتصال عرضی ایجاد شود. از شرایط بهینه به‌دست آمده در این میکروذرات می‌توان

5. Anitha A., Sowmya S., Kumar P.T.S., Deepthi S., Chennazhi K.P., Ehrlich H., Tsurkan M., and Jayakumar R., Chitin and Chitosan in Selected Biomedical Applications, *Prog. Polym. Sci.*, **39**, 1644-1667, 2014.
6. Rinaudo M., Chitin and Chitosan: Properties and Applications, *Prog. Polym. Sci.*, **31**, 603-632, 2006.
7. Pillai C.K.S., Paul W., and Sharma C.P., Chitin and Chitosan Polymers: Chemistry, Solubility and Fiber Formation, *Prog. Polym. Sci.*, **34**, 641-678, 2009.
8. Ravi Kumar M.N.V., A Review of Chitin and Chitosan Applications, *React. Funct. Polym.*, **46**, 1-27, 2000.
9. Raymond L., Morin F.G., and Marchessault R.H., Degree of Deacetylation of Chitosan Using Conductometric Titration and Solid-State NMR, *Carbohydr. Res.*, **246**, 331-336, 1993.
10. Zając A., Hanuza J., Wandas M., and Dymińska L., Determination of N-acetylation Degree in Chitosan Using Raman Spectroscopy, *Spectrochim. Acta, Part A*, **134**, 114-120, 2015.
11. Bagheri-Khoulenjani S., Taghizadeh S.M., and Mirzadeh H., An Investigation on The Short-Term Biodegradability of Chitosan with Various Molecular Weights and Degrees of Deacetylation, *Carbohydr. Polym.*, **78**, 773-778, 2009.
12. Taghizadeh S.M., Takroosta M., Davoodi G., and Yousefi M., Preparation of Chitosan with Different Degree of Deacetylation and Comparison of Its Different Characterization Methods, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **17**, 291-297, 2004.
13. Wu A.C., Bough W.A., Conrad E.C., and Alden K.E. (Jr.), Determination of Molecular-Weight Distribution of Chitosan by High-Performance Liquid Chromatography, *J. Chromatogr.*, **128**, 87-99, 1976.
14. Taghizadeh S.M. and Davari G., Preparation, Characterization, and Swelling Behavior of N-Acetylated and Deacetylated Chitosans, *Carbohydr. Polym.*, **64**, 9-15, 2006.
15. Kumar M.N. and Kumar N., Polymeric Controlled Drug-Delivery Systems: Perspective Issues and Opportunities, *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, **27**, 1-30, 2001.
16. Tokura S., Nishi N., and Noguchi J., Studies on Chitin. III. Preparation of Chitin Fibers, *Polym. J.*, **11**, 781-786, 1979.
17. Rinaudo M., Pavlov G., and Desbrières J., Influence of Acetic Acid Concentration on the Solubilization of Chitosan, *Polymer*, **40**, 7029-7032, 1999.
18. Rinaudo M., Pavlov G. and Desbrières J., Solubilization of Chitosan in Strong Acid Medium, *Int. J. Polym. Anal. Charact.*, **5**, 267-276, 1999.
19. Cho J., Heuzy M.C., Bégin A., and Carreau P.J., Physical Gelation of Chitosan in the Presence of  $\beta$ -Glycerophosphate: The Effect of Temperature, *Biomacromolecules*, **6**, 3267-3275, 2005.
20. Zoldners J., Kiseleva T., and Kaiminsh I., Influence of Ascorbic Acid on The Stability of Chitosan Solutions, *Carbohydr. Polym.*, **60**, 215-218, 2005.
21. Hsu S.C., Don T.M., and Chiu W.Y., Free Radical Degradation of Chitosan with Potassium Persulfate, *Polym. Degrad. Stabil.*, **75**, 73-83, 2002.
22. Yang Y.M., Hu W., Wang X.D., and Gu X.S., The Controlling Biodegradation of Chitosan Fibers by N-Acetylation In Vitro and In Vivo, *J. Mater. Sci. Mater. M.*, **18**, 2117-2121, 2007.
23. Taghizadeh S.M. and Javan R.S., Dynamic Parameters in Preparing Chitosan Nanoparticles with Incorporation Method Using Novel Drug Delivery Systems, *Iran. J. Polym. Sci. Technol (Persian)*, **23**, 103-110, 2010.
24. Sadeghi M., Ganji F., and Taghizadeh S.M., Preparation and Optimization of Labeled Chitosan Nanoparticles and Evaluation of Their Release from Transdermal Drug Delivery System, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **28**, 333-344, 2015.
25. Sadeghi M., Ganji F., Taghizadeh S.M., and Daraei B., Preparation and Characterization of Rivastigmine Transdermal Patch Based on Chitosan Microparticles, *Iran. J. Pharm. Res.*, **15**, 283-294, 2016.
26. Khodaverdi E., Ganji F., Tafaghodi M., and Sadoogh M., Effects of Formulation Properties on Sol-Gel Behavior of Chitosan/Glycerolphosphate Hydrogel, *Iran. Polym. J.*, **22**, 785-790, 2013.
27. Ganji F. and Abdekhodaie M.J., The Effects of Reaction Conditions on Block Copolymerization of Chitosan and Poly(Ethylene Glycol), *Carbohydr. Polym.*, **81**, 799-804, 2010.
28. Ganji F. and Abdekhodaie M.J., Synthesis and Characterization of a New Thermosensitive Chitosan-PEG Diblock Copolymer, *Carbohydr. Polym.*, **74**, 435-441, 2008.
29. Ghasemi Tahrir F., Ganji F., Mani A.R., and Khodaverdi E., In Vitro and In Vivo Evaluation of Thermosensitive Chitosan Hydrogel for Sustained Release of Insulin, *Drug Deliv.*, **23**, 1038-1046, 2016.
30. Jayakumar R., Menon D., Manzoor K., Nair S.V., and Tamura



- H., Biomedical Applications of Chitin and Chitosan Based Nanomaterials-A Short Review, *Carbohydr. Polym.*, **82**, 227-232, 2010.
31. Grenha A., Chitosan Nanoparticles: A Survey of Preparation Methods, *J. Drug. Target.*, **20**, 291-300, 2012.
  32. Nair R., Reddy B.H., Kumar A., Kumar C.K., and Jayraj K., Application of Chitosan Microspheres as Drug Carriers: A Review, *Pharm. Sci. Res.*, **1**, 1-12, 2009.
  33. Yun Y.H., Lee B.K., and Park K., Controlled Drug Delivery: Historical Perspective for The Next Generation, *J. Control. Release.*, 2015, doi: 10.1016/j.jconrel.2015.10.005.
  34. Mitra A. and Dey B., Chitosan Microspheres in Novel Drug Delivery Systems, *Indian. J. Pharm. Sci.*, **73**, 355-366, 2011.
  35. Denkbass E.B., Odabasi M., Kiliçay E., and Özdemir N., Human Serum Albumin (HSA) Adsorption with Chitosan Microspheres, *J. Appl. Polym. Sci.*, **86**, 3035-3039, 2002.
  36. Sun Y., Liu Y., Liu W., Lu C., and Wang L., Chitosan Microparticles Ionically Cross-Linked with Poly( $\Gamma$ -Glutamic Acid) as Antimicrobial Peptides and Nitric Oxide Delivery Systems, *Biochem. Eng. J.*, **95**, 78-85, 2015.
  37. Coppi G. and Iannuccelli V., Alginate/Chitosan Microparticles for Tamoxifen Delivery to the Lymphatic System, *Int. J. Pharm.*, **367**, 127-132, 2009.
  38. Guliyeva U., Oner F., Ozsoy S., and Hazirolu R., Chitosan Microparticles Containing Plasmid DNA as Potential Oral Gene Delivery System, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **62**, 17-25, 2006.
  39. He P., Davis S.S., and Illum L., Chitosan Microspheres Prepared by Spray Drying, *Int. J. Pharm.*, **187**, 53-65, 1999.
  40. Filipovic-Grcic J., Perissutti B., Moneghini M., Voinovich D., Martinac A., and Jalsenjak I., Spray-Dried Carbamazepine-Loaded Chitosan and HPMC Microspheres: Preparation and Characterisation, *J. Pharm. Pharmacol.*, **55**, 921-931, 2003.
  41. Takahashi H., Chen R., Okamoto H., and Danjo K., Acetaminophen Particle Design Using Chitosan and a Spray-Drying Technique, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **53**, 37-41, 2005.
  42. Alhalaweh A., Andersson S., and Velaga S.P., Preparation of Zolmitriptan-Chitosan Microparticles by Spray Drying for Nasal Delivery, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **38**, 206-214, 2009.
  43. Lim S.T., Martin G.P., Berry D.J., and Brown M.B., Preparation and Evaluation of The In Vitro Drug Release Properties and Mucoadhesion of Novel Microspheres of Hyaluronic Acid and Chitosan, *J. Control. Release*, **66**, 281-292, 2000.
  44. Bogataj M., Mrhar A., Grabnar I., Rajtman Z., Bukovec P., Srcic S., and Urleb U., The Influence of Magnesium Stearate on The Characteristics of Mucoadhesive Microspheres, *J. Microencapsul.*, **17**, 499-508, 2000.
  45. Kriznar B., Mateovic T., Bogataj M., and Mrhar A., The Influence of Chitosan on In Vitro Properties of Eudragit RS Microspheres, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **51**, 359-364, 2003.
  46. Orienti I., Aiedeh K., Gianasi E., Bertasi V., and Zecchi V., Indomethacin Loaded Chitosan Microspheres. Correlation Between The Erosion Process and Release Kinetics, *J. Microencapsul.*, **13**, 463-472, 1996.
  47. Gonzalez-Rodriguez M.L., Holgado M.A., Sanchez-Lafuente C., Rabasco A.M., and Fini A., Alginate/Chitosan Particulate Systems for Sodium Diclofenac Release, *Int. J. Pharm.*, **232**, 225-234, 2002.
  48. Rao N.R., Kulkarni U., Deshmukh A., and Suresh D., Preparation and Characterization of Ionotropic Cross-Linked Chitosan Microparticles for Controlled Release of Aceclofenac, *Int. J. Pharm. Sci. Drug. Res.*, **2**, 107-111, 2010.
  49. Wassmer S., Rafat M., Fong W.G., Baker A.N., and Tsilfidis C., Chitosan Microparticles for Delivery of Proteins to The Retina, *Acta Biomater.*, **9**, 7855-7864, 2013.
  50. Wilson B., Brain Targeting PBCA Nanoparticles and The Blood-Brain Barrier, *Nanomedicine (Lond)*, **4**, 499-502, 2009.
  51. Martins A.F., de Oliveira D.M., Pereira A.G., Rubira A.F., and Muniz E.C., Chitosan/TPP Microparticles Obtained by Microemulsion Method Applied in Controlled Release of Heparin, *Int. J. Biol. Macromol.*, **5**, 1127-1133, 2012.
  52. Pichayakorn W. and Boonme P., Evaluation of Cross-Linked Chitosan Microparticles Containing Metronidazole for Periodontitis Treatment, *Mater. Sci. Eng. C: Mater.*, **33**, 1197-1202, 2013.
  53. Pavanetto F., Perugini P., Conti B., Modena T., and Genta I., Evaluation of Process Parameters Involved in Chitosan Microsphere Preparation by The O/W/O Multiple Emulsion Method, *J. Microencapsul.*, **13**, 679-688, 1996.
  54. Kumbar S.G., Kulkarni A.R., and Aminabhavi M., Cross-linked Chitosan Microspheres for Encapsulation of Diclofenac Sodium: Effect of Crosslinking Agent, *J. Microencapsul.*, **19**, 173-180, 2002.
  55. Kumbar S.G., Soppimath K.S., and Aminabhavi T.M., Synthesis and Characterization of Polyacrylamide-Grafted Chitosan Hydrogel Microspheres for The Controlled Release of Indo-

- methacin, *J. Appl. Polym. Sci.*, **87**, 1525-1536, 2003.
56. Berthold A., Cremer K., and Kreuter J., Preparation and Characterization of Chitosan Microspheres as Drug Carrier for Prednisolone Sodium Phosphate as Model for Anti-Inflammatory Drugs, *J. Control. Release*, **39**, 17-25, 1996.
57. Vasconcellos F.C., Goulart G.A.S., and Beppu M.M., Production and Characterization of Chitosan Microparticles Containing Papain for Controlled Release Applications, *Powder: Technol.*, **205**, 65-70, 2011.
58. Dhanasingh S. and Nallaperumal S.K., Chitosan/Casein Microparticles: Preparation, Characterization and Drug Release Studies, *Int. J. Res. Eng. Appl. Sci.*, **6**, 234-238, 2010.
59. Butstraen C. and Salaün F., Preparation of Microcapsules by Complex Coacervation of Gum Arabic and Chitosan, *Carbohydr. Polym.*, **99**, 608-616, 2014.
60. Lacerda L., Parize A.L., Fávere V., Laranjeira M.C.M., and Stulzer H.K., Development and Evaluation of Ph-Sensitive Sodium Alginate/Chitosan Microparticles Containing The Antituberculosis Drug Rifampicin, *Mater. Sci. Eng. C: Mater.*, **39**, 161-167, 2014.
61. Estevinho B.N., Rocha F., Santos L., and Alves A., Microencapsulation with Chitosan by Spray Drying for Industry Applications – A Review, *Trends Food Sci. Tech.*, **31**, 138-155, 2013.
62. Maquet V. and Gautier S., Preparation of Chitosan Microparticles by Spray Drying, <http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/polymer-science/chitosan.html>, Available in 10/19/2016.
63. Agnihotri S.A., Mallikarjuna N.N., and Aminabhavi T.M., Recent Advances on Chitosan-Based Micro- and Nanoparticles in Drug Delivery, *J. Control. Release.*, **100**, 5-28, 2004.
64. Taranejoo S., Janmaleki M., Rafienia M., Kamali M., and Mansouri M., Chitosan Microparticles Loaded with Exotoxin A Subunit Antigen for Intranasal Vaccination Against Pseudomonas Aeruginosa: An In Vitro Study, *Carbohydr. Polym.*, **83**, 1854-1861, 2011.
65. Mesquita P.C., Oliveira A.R., Pedrosa M.F.F., de Oliveira A.G., and da Silva-Júnior A.A., Physicochemical Aspects Involved in Methotrexate Release Kinetics from Biodegradable Spray-Dried Chitosan Microparticles, *J. Phys. Chem. Solids*, **81**, 27-33, 2015.
66. Cerchiara T., Abruzzo A., Parolin C., Vitali B., Bigucci F., Gallucci M.C., Nicoletta F.P., and Luppi B., Microparticles Based on Chitosan/Carboxymethylcellulose Polyelectrolyte Complexes for Colon Delivery of Vancomycin, *Carbohydr. Polym.*, **143**, 124-130, 2016.
67. Li Y.P., Machida T.Y., Sannan T., and Nagai T., Preparation of Chitosan Microspheres Containing Fluorouracil Using The 'Dry-In-Oil' Method and Its Release Characteristics, *STP. Pharma. Sci.*, **1**, 363-368, 1991.
68. Suresh P., Kurrey A., and Singh M., Hollow Microspheres as a Drug Carrier: An Overview of Fabrication Andin Vivocharacterization Techniques, *Chron. Young Sci.*, **5**, 1-10, 2014.
69. Liu C., Tan Y., Liu C., Chen X., and Yu L., Preparations, Characterizations and Applications of Chitosan-Based Nanoparticles, *J. Ocean Univ. China*, **6**, 237-243, 2007.
70. Chavez de Paz L.E., Resin A., Howard K.A., Sutherland D.S., and Wejse P.L., Antimicrobial Effect of Chitosan Nanoparticles on Streptococcus Mutans Biofilms, *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 3892-3895, 2011.
71. Wassmer S., Rafat M., Fong W.G., Baker A.N., and Tsilfidis C., Chitosan Microparticles for Delivery of Proteins to The Retina, *Acta Biomater.*, **9**, 7855-7864, 2013.
72. Kumar S.S., Saha A.k., Kavitha K., and Basu S.K., Preparation and Characterization of Indomethacin Loaded Ionically Cross-Linked Microspheres Using Chitosan, *Der Pharmacia Lettre (Scholar Research Library)*, **4**, 33-41, 2012.