

Preparasi dan Karakterisasi Nanopartikel Kitosan-Naringenin dengan Variasi Rasio Massa Kitosan-Natrium Tripolifosfat (Preparation and Characterization of Naringenin-Chitosan Nanoparticles with Various Mass Ratio of Chitosan-Sodium Tripolyphosphat)

Helmi Nur Laili, Lina Winarti, Lusiana Oktora Ruma Kumala Sari
Fakultas Farmasi Universitas Jember
Jln. Kalimantan No.37 Jember 68121
e-mail korespondensi: helminurlaily@gmail.com

Abstract

Naringenin has a wide pharmacological activities. Low bioavailability of naringenin caused the under-developed utilization. Preparation of naringenin nanoparticles can improve the bioavailability. Chitosan as polymer for nanoparticles has ideal properties such as nontoxic, biocompatible, biodegradable. Sodium tripolyphosphat (NaTPP) used as a crosslinker to form nanoparticles by ionic gelation method. The aim of this research is to know the optimum formula of chitosan and NaTPP in naringenin-chitosan nanoparticles based on entrapment efficiency (EE) using factorial design. In this research, naringenin-chitosan nanoparticles were prepared with various mass ratio, 6:1, 10:1, 3:1, 5:1 and then EE each formulas measured by UV spectrophotometer. The optimum formula of naringenin-chitosan nanoparticles were characterized by PSA, TEM, and FTIR. The optimum formula (3:1) showed EE >42.12%. The concentration of chitosan and NaTPP to get final optimum formula were 0.06-0.0606777% for chitosan and 0.0970833-0.1% for NaTPP. The result of characterizations showed that size of naringenin-chitosan nanoparticles 13.2 ± 2.6 nm, PDI 0.443, zeta potensial 15.23 mV, complex chitosan-TPP formed. The results demonstrated naringenin nanoparticles have successfully prepared.

Keywords: naringenin, nanoparticle, chitosan, sodium tripolyphosphat

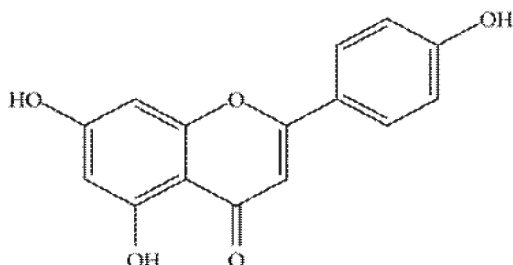
Abstrak

Naringenin memiliki aktivitas farmakologi yang luas. Bioavailabilitasnya yang rendah menyebabkan pemanfaatan naringenin kurang dikembangkan. Preparasi nanopartikel dapat meningkatkan bioavailabilitas naringenin. Kitosan sebagai polimer untuk nanopartikel memiliki sifat yang ideal seperti *nontoxic*, biokompatibel, biodegradabel. Natrium tripolifosfat (NaTPP) digunakan sebagai *crosslinker* untuk membentuk nanopartikel dengan metode gelasi ionik. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui formula optimum kitosan dan NaTPP dalam nanopartikel kitosan-naringenin berdasarkan *entrapment efisiensi* (EE) menggunakan desain faktorial. Dalam penelitian ini, nanopartikel kitosan-naringenin dipreparasi dengan berbagai rasio massa, 6:1, 10:1, 3:1, 5:1 dan kemudian diukur EE masing-masing formula dengan spektrofotometer UV. Formula optimum nanopartikel kitosan-naringenin yang terpilih dikarakterisasi dengan PSA, TEM, dan FTIR. Formula optimum terpilih (3:1) menunjukkan EE >40%. Konsentrasi kitosan dan NaTPP untuk mendapatkan formula optimum akhir adalah 0,06-0,0606777% untuk kitosan dan 0,0970833-0,1% untuk NaTPP. Hasil karakterisasi menunjukkan ukuran nanopartikel kitosan-naringenin $13,2 \pm 2,6$ nm, PDI 0,443, zeta potensial 15,23 mV, dan terbentuk kompleks kitosan-TPP. Hasil karakterisasi menunjukkan bahwa nanopartikel kitosan-naringenin berhasil dibuat.

Kata kunci: naringenin, nanopartikel, kitosan, natrium tripolifosfat

Pendahuluan

Naringenin (4', 5, 7-trihidroksiflavanon) merupakan flavonoid bentuk aglikon dari naringin (Gambar 1). Naringenin secara alami banyak ditemukan dalam buah jeruk dan tomat. Aktivitas biologis naringenin telah banyak diteliti dan dilaporkan antara lain sebagai antitumor [1], antiinflamasi [2], hepatoprotektor pada tikus yang diinduksi CCl_4 [3], antibakteri [4], dan antioksidan [5]. Naringenin sangat sukar larut dalam air namun larut dalam pelarut organik contohnya alkohol [6]. Kelarutannya yang buruk dalam air ini menyebabkan absorpsinya dalam tubuh sangat jelek dan berpengaruh pada bioavailabilitasnya yang rendah. Penelitian *in vivo* menunjukkan bioavailabilitas naringenin hanya 4 % ketika pemberian oral pada kelinci [7]. Hal ini menyebabkan naringenin membutuhkan strategi khusus dalam formulasinya.



Gambar 1. Struktur kimia naringenin

Beberapa dekade ini penelitian dan pengembangan nanoteknologi berkembang sangat pesat. Pengecilan ukuran partikel akan menyebabkan peningkatan luas permukaan sehingga menyebabkan kelarutannya meningkat. Meningkatnya kelarutan obat akan berakibat meningkat pula bioavailabilitas dan efikasinya. Keuntungan nanopartikel antara lain dapat menghantarkan senyawa obat dengan baik sampai ke unit-unit kecil dalam tubuh, meningkatkan efisiensi distribusi, serta obat tepat target, sehingga meningkatkan efek terapeutik dan mengurangi toksisitas [8].

Polimer pembawa nanopartikel (*nanocarrier*) dalam penelitian ini adalah kitosan karena bersifat biokompatibel, biodegradabel, dan tidak toksik [9]. Kitosan dapat digunakan untuk penghantaran obat secara mukoadesif karena rantai polimer yang bermuatan positif membentuk interaksi elektrostatik dengan mukosa yang bermuatan negatif. Selain itu, bisa meningkatkan penyerapan obat melalui rute

paracellular dengan membuka *tight junction* sel epitel [10].

Nanopartikel kitosan dipreparasi dengan metode gelasi ionik menggunakan natrium tripolifosfat sebagai *crosslinker*. Keuntungan dari metode ini antara lain preparasi yang sederhana dan ringan tanpa menggunakan pelarut organik yang berbahaya dan tanpa pemanasan yang dapat merusak bahan aktif, sehingga dapat digunakan untuk obat dengan kategori tidak stabil [11].

Nanopartikel hanya terbentuk pada rasio tertentu kitosan dan natrium tripolifosfat. Rasio massa kitosan dan natrium tripolifosfat dalam formulasi nanopartikel kitosan-insulin yang optimum adalah 10:1 [12], dalam formulasi nanopartikel kitosan-scorpion venom adalah 2:1 [11], dan dalam formulasi nanopartikel kitosan-bovin serum albumin adalah 4:1-6:1 [13]. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan formula nanopartikel kitosan-naringenin yang optimum berdasarkan variasi rasio massa kitosan dan natrium tripolifosfat. Pengaruh rasio massa kitosan dan natrium tripolifosfat terhadap *entrapment efficiency* diselidiki menggunakan desain faktorial 2^2 .

Formula nanopartikel kitosan-naringenin optimum kemudian dikarakterisasi meliputi pembentukan kompleks kitosan-TPP, ukuran partikel, distribusi ukuran partikel, zeta potensial, dan morfologi partikel. Dari keseluruhan penelitian ini diharapkan diperoleh nanopartikel kitosan-naringenin yang dapat digunakan sebagai strategi formulasi yang menjanjikan dalam upaya untuk meningkatkan bioavailabilitas dan efikasi naringenin.

Metode Penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan metode desain faktorial. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kitosan ($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_4$)_n bobot molekul rendah dengan derajat deasetilasi $\geq 75\%$ (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA), Naringenin (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA), Natrium Tripolifosfat (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA), tween 80 (PT. Bratachem), akuademineralisata (Otsuka), etanol 96%, asam asetat glasial.

Nanopartikel kitosan-naringenin dipreparasi dengan menggunakan metode gelasi ionik, yaitu kompleksasi polielektrolit antara kitosan yang bermuatan positif dengan TPP yang bermuatan negatif. Pertama-tama, sejumlah tertentu kitosan dilarutkan dalam larutan asam asetat 1% untuk

memperoleh konsentrasi 0,1% dan kemudian dilakukan pengenceran sebagian larutan tersebut sehingga diperoleh konsentrasi 0,06% (Tabel 1). Selanjutnya larutan naringenin 0,2% dalam etanol 96% ditambahkan ke dalam larutan kitosan dengan pengadukan magnetik pada suhu kamar.

Tabel 1. Susunan *level* faktor yang digunakan dalam desain faktorial

Faktor	Level Rendah (-1)	Level Tinggi (+1)
% Kitosan	0,06% b/v	0,1% b/v
% NaTPP	0,05% b/v	0,1% b/v

Larutan NaTPP dalam akuademineralisata dengan konsentrasi sesuai Tabel 1, diteteskan pada larutan kitosan-naringenin sesuai dengan rancangan formula menurut desain faktorial (Tabel 2) dengan kecepatan peneteskan 0,1 ml/30 detik dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* (IKA Labortechnik) kecepatan 1000 rpm selama 60 menit pada suhu kamar. Dari pencampuran ini terbentuk suspensi *opalescent* nanopartikel kitosan-naringenin.

Tabel 2. Rancangan formula sesuai dengan desain faktorial

Bahan	Vol	Formula			
		(1)	a	b	ab
Kitosan	30 ml	0,06%	0,1%	0,06%	0,1%
NaTPP	6 ml	0,05%	0,05%	0,1%	0,1%
Rasio massa Kitosan:NaTPP		6:1	10:1	3:1	5:1

Suspensi nanopartikel tersebut disentrifuse (Hermle Labortechnik GmbH, Germani) kecepatan 15.000 rpm, suhu 10° C selama 80 menit. Supernatan yang diperoleh digunakan untuk mengukur kadar naringenin bebas dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Genesis 10S) pada λ_{\max} 290 nm. Dari hasil pengukuran dapat diketahui persentase penyerapan obat (EE). Nilai EE diperoleh dari perbandingan kadar naringenin terjerap dan kadar naringenin awal.

Formula optimum terpilih ditentukan dengan menggunakan *software Design Expert 9.0.2 Trial version*. Konsentrasi kitosan (X_A) dan konsentrasi NaTPP (X_B) dipilih sebagai variabel

bebas (Tabel 1). EE naringenin (Y) dipilih sebagai respon atau variabel terikat.

Formula optimum terpilih kemudian dikarakterisasi meliputi ukuran partikel, distribusi ukuran, dan zeta potensial dengan menggunakan *Delsa™ Nano Submicron Particle size* (Beckam Coulter).

Kompleks kitosan-TPP dianalisis dengan FTIR menggunakan pelet KBr (Perkin-Elmer). Suspensi nanopartikel di *freeze dry* (Labconco) untuk mendapatkan serbuk beku kering nanopartikel. Pelet dibuat dengan menggerus homogen 1 mg serbuk beku kering hasil *freeze dry* dengan 50 mg Kbr, kemudian pelet di-*scan* pada daerah 4000 - 400 cm^{-1} .

Morfologi nanopartikel diperiksa dengan menggunakan *transmission electron microscopy* (TEM, JEM1400, JEOL). Droplet suspensi nanopartikel diteteskan pada grid tembaga, setelah meresap dan kering lalu *dicoating* dengan karbon, dimasukkan ke dalam *holder* dan sampel siap untuk dianalisis.

Hasil Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui formula optimum kitosan dan NaTPP dalam nanopartikel kitosan-naringenin berdasarkan nilai EE yang dipreparasi menggunakan metode gelasi ionik. Variasi rasio massa kitosan dan NaTPP dirumuskan dengan menggunakan desain faktorial 2² (Tabel 2). Hasil pengukuran respon EE rata-rata keempat formula dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil pengujian EE tiap formula

Formula	Rasio massa kitosan:NaTPP	EE (%)*
(1)	6:1	40,61 ± 0,95 %
a	10:1	38,07 ± 1,27 %
b	3:1	41,26 ± 0,79 %
ab	5:1	39,63 ± 1,12 %

* Data disajikan dalam rerata ± SD (n=3)

Data EE keempat formula kemudian dianalisis dengan menggunakan *software Design Expert 9.0.2 Trial version* untuk mengetahui efek masing-masing faktor yaitu konsentrasi kitosan dan NaTPP serta interaksi antar faktor tersebut terhadap respon yang dihasilkan (Tabel 4).

Tabel 4. Nilai efek faktor

Respon	Efek X_A	Efek X_B	Efek $X_A X_B$
EE	-1,27	1,11	0,45

Final Equation in Term of Coded Factors:

$$EE = 39,92 - 1,07X_A + 0,53X_B + 0,25X_A X_B$$

Berdasarkan data nilai efek faktor konsentrasi kitosan, NaTPP, dan interaksi keduanya pada Tabel 4, konsentrasi kitosan memberikan efek negatif, sedangkan konsentrasi NaTPP memberikan efek positif. Artinya adalah semakin tinggi konsentrasi kitosan yang ditambahkan maka EE nanopartikel kitosan-naringenin akan menurun sedangkan semakin tinggi konsentrasi NaTPP yang ditambahkan maka EE nanopartikel kitosan-naringenin akan semakin meningkat. Interaksi antara kedua faktor ini memberikan efek positif yaitu dapat meningkatkan nilai EE. Berdasarkan nilai koefisien masing-masing faktor, konsentrasi kitosan memberikan efek yang paling besar dibandingkan efek konsentrasi NaTPP dan efek interaksi yang terjadi pada kedua faktor terhadap nilai respon EE.

Penentuan formula optimum juga didasarkan pada nilai *desirability* yang mendekati nilai satu dengan prediksi EE yang paling tinggi. Dari hasil optimasi dengan metode desain faktorial ini diperoleh 5 kombinasi konsentrasi kitosan dan NaTPP dengan rasio massa yang dapat menghasilkan nanopartikel kitosan-naringenin dengan nilai EE sesuai dengan yang diinginkan. Formula optimum terpilih berdasarkan hasil pengukuran EE sesuai dengan solusi satu, yaitu konsentrasi kitosan pada *level* rendah (0,06%), konsentrasi NaTPP pada *level* tinggi (0,1%) dan nilai *desirability* solusi satu merupakan nilai tertinggi dibandingkan solusi yang lain.

Hasil karakterisasi formula optimum terpilih (Fb), memiliki ukuran partikel $13,2 \pm 2,6$ nm, distribusi ukuran bersifat monodispers dengan PDI sebesar 0,443, spektra FTIR menunjukkan terbentuk kompleks kitosan-TPP (Gambar 2), dan morfologi partikel berifat relatif cukup sferis (Gambar 3), dan zeta potensial sebesar 15,23 mV.

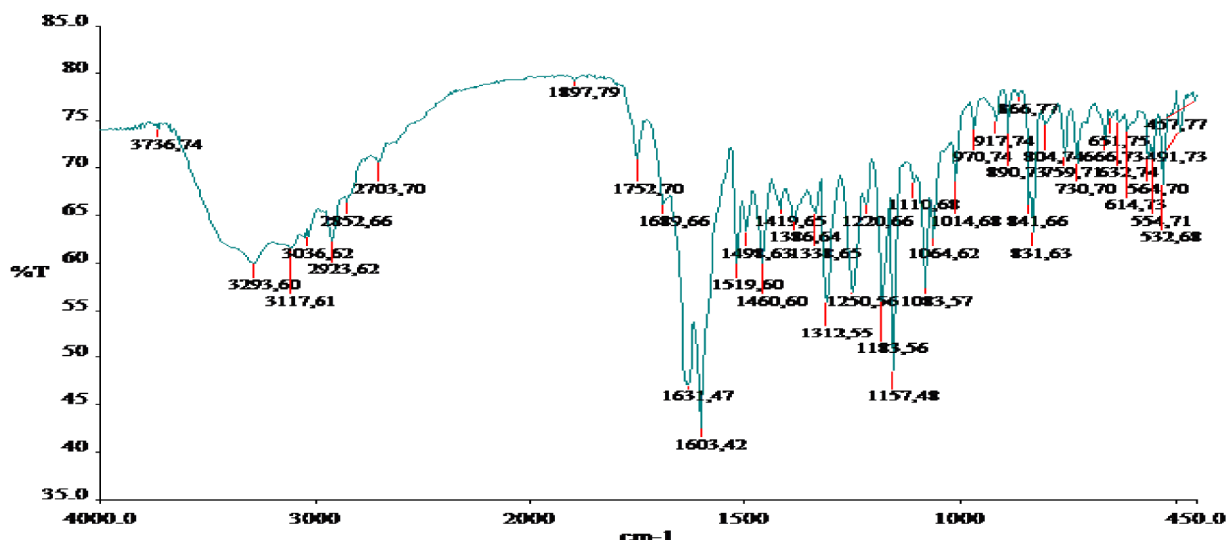
Pembahasan

Berdasarkan rasio massa keempat formula, rasio massa kitosan dan NaTPP pada formula optimum terpilih yaitu Fb adalah 3:1. Fb memiliki massa NaTPP tertinggi dalam sistem nanopartikel. Meningkatnya konsentrasi/massa

NaTPP yang ditambahkan dalam sistem nanopartikel menyebabkan jumlah gugus negatif ion fosfat ($P_3O_{10}^{5-}$) yang terionisasi juga semakin banyak. Hal ini akan mengakibatkan interaksi taut silang yang terjadi antara gugus negatif ion fosfat dengan gugus positif amin kitosan (NH_3^+) semakin meningkat dalam membentuk kompleks nanopartikel kitosan-TPP [14]. Semakin banyak kompleks nanopartikel kitosan-TPP yang terbentuk maka semakin besar kemampuan nanopartikel dalam menyerap bahan obat. Hal ini akan menyebabkan meningkatnya nilai EE [15]. Pada rasio ini jumlah kitosan lebih melimpah dibandingkan dengan jumlah NaTPP, sehingga jika konsentrasi/massa kitosan ditingkatkan maka gugus amin kitosan (NH_3^+) akan semakin melimpah namun tidak diimbangi dengan gugus ion fosfat ($P_3O_{10}^{5-}$) yang tersedia dalam sistem. Hal ini menyebabkan interaksi taut silang yang terjadi menurun. Jika kedua faktor, yaitu konsentrasi/massa kitosan dan NaTPP sama-sama ditingkatkan, maka interaksi yang terjadi akan meningkat, karena jumlah gugus amin kitosan dan gugus ion fosfat yang tersedia dalam sistem meningkat.

Nanopartikel adalah struktur koloid yang memiliki ukuran antara 10-1000 nm [9]. Ukuran partikel merupakan karakteristik paling penting dalam sistem nanopartikel karena dapat menentukan distribusi *in vivo*, toksisitas, pelepasan obat, dan kemampuan untuk *targetting* dari sistem nanopartikel. Ukuran partikel yang diperoleh adalah $13,2 \pm 2,6$ nm. Hasil ini menunjukkan bahwa ukuran formula tersebut sudah memenuhi rentang nanopartikel yang dipersyaratkan. Selain ukuran, distribusi ukuran juga dapat mempengaruhi penghantaran obat, pelepasan obat, dan stabilitas nanopartikel [16] ditunjukkan dengan nilai indeks polidispersitas (PDI). PDI bernilai 0,01 sampai 0,5-0,7 untuk partikel monodispers, sedangkan indeks $>0,7$ menyatakan sistem nanopartikel dengan distribusi ukuran partikel yang sangat luas [17]. PDI Fb adalah 0,443. Nilai ini memenuhi persyaratan untuk dapat dikatakan bahwa formula optimum terpilih dalam penelitian ini memiliki distribusi ukuran partikel yang seragam (monodispers).

Karakteristik sifat muatan permukaan nanopartikel perlu diketahui untuk menunjukkan kestabilan suatu sistem koloid yang ditunjukkan dengan nilai zeta potensial. Secara umum, nanopartikel dengan zeta potensial (+/-) 30 mV



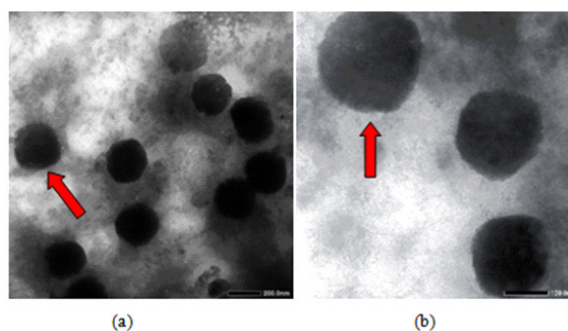
Gambar 2. Spektra FTIR nanopartikel kitosan-naringenin dengan pelet KBr

sudah menunjukkan suspensi yang stabil [16]. Hasil pengukuran zeta potensial Fb adalah 15,23 mV. Nilai ini memprediksikan bahwa sistem koloid nanopartikel kitosan-naringenin cenderung kurang stabil karena memiliki nilai zeta potensial yang cukup rendah/jauh dari nilai (+/-) 30 mV.

Hasil spektra FTIR nanopartikel kitosan-naringenin Fb dengan rasio massa 3:1 pada Gambar 2 menunjukkan terjadinya penurunan dan pergeseran puncak pada bilangan gelombang 3400 cm^{-1} menjadi $2703\text{--}3293\text{ cm}^{-1}$. Puncak tersebut menjadi lebih lebar daripada sebelumnya yang mengindikasikan terjadi peningkatan ikatan hidrogen [18]. Pada spektra nanopartikel kitosan-naringenin, puncak 1655 cm^{-1} dari ikatan N-H mengalami pergeseran ke 1631 cm^{-1} dan muncul puncak baru pada bilangan gelombang 1603 cm^{-1} . Pergeseran dan munculnya puncak baru tersebut menandakan bahwa telah terjadi interaksi taut silang antara ion amonium kitosan dan ion fosfat dari TPP dalam nanopartikel [18,19]. Pita serapan baru juga muncul di bilangan gelombang 1157 cm^{-1} yang menunjukkan pita serapan gugus P=O dari NaTPP.

Pengujian morfologi nanopartikel kitosan-naringenin pada penelitian ini menghasilkan nanopartikel dengan bentuk yang relatif cukup sferis (Gambar 3). Bentuk dan kondisi permukaan nanopartikel penting untuk diketahui karena dapat digunakan untuk mengetahui sifat pelepasan obat Nanopartikel dengan bentuk

sferis memiliki *uptake* yang lebih besar dibandingkan bentuk batang [20].



Gambar 3. Hasil pengamatan morfologi nanopartikel kitosan-naringenin (panah merah) menggunakan TEM dengan perbesaran 15.000x (a) dan 40.000x (b).

Simpulan dan Saran

Nanopartikel kitosan-naringenin dipreparasi dengan metode gelasi ionik menggunakan desain faktorial sebagai metode optimasi. Rasio massa kitosan dan NaTPP untuk menghasilkan EE optimum adalah 3:1.

Berdasarkan keseluruhan hasil karakterisasi, nanopartikel kitosan-naringenin berhasil dibuat namun bersifat kurang stabil jika disimpan dalam bentuk likuid. Strategi formulasi nanopartikel flavonoid dengan polimer kitosan dapat menjadi alternatif yang menjanjikan dalam upaya untuk meningkatkan bioavailabilitas dan

efikasinya. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk mengetahui bioavailabilitas dan bentuk sediaan yang sesuai dari nanopartikel kitosan-naringenin.

Daftar Pustaka

- [1] Kanno S, Tomizawa A, Hiura A, Osanai A, Shouji A, Ujibe A, Ohtake AT, Kimura K, Ishikawa M. Inhibitory Effect of Naringenin on Tumor Growth in Human Cancer Cell Line and Sarcoma S-180-Implanted Mice. *Biol. Pharm. Bull.* 2005; 28 (3): 527-530.
- [2] Lee DW, Shirley SA, Lockey RF, Mohapatra SS. Thiolated Chitosan Nanoparticles Enhance Antiinflammatory Effects of Intranasally Delivered Theophylline. *BioMed Central.* 2006; 7: 1-10.
- [3] Yen FL, Wu TH, Lin LT, Cham TM, Lin CC. Naringenin-Loaded Nanoparticles Improve the Physicochemical Properties and the Hepatoprotective Effects of Naringenin in Orally-Administered Rats with CCl₄-Induced Acute Liver Failure. *Pharm Res.* 2008; 26 (4): 893-902.
- [4] Andrade *et al.* Antioxidant and antibacterial activity of extracts, fractions and isolated substances from the flowers of *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don. *Br. J. Pharm Sci.* 2010; 46 (4): 715-721.
- [5] Yamauchi K, Mitsunaga T, Batubara I. Isolation, Identification and Tyrosinase Inhibitory Activities of the Extractives from *Allamanda cathartica*. *Natural Resources.* 2011; 2: 167-172.
- [6] Wilcox LJ, Borradaile NM, Huff MW. Antiatherogenic Properties of Naringenin, a Citrus Flavonoid. *Cardiovasc Drug Rev.* 1999; 17 (2): 160-178.
- [7] Hsiu SL, Huang TY, Hou YC, Chin DH, Lee Chao PD. Comparison of Metabolic Pharmacokinetics of Naringin and Naringenin in Rabbits. *Life Sciences.* 2002; 70 (13): 1481-1489.
- [8] Rawat M, Singh D, Saraf S, Saraf S. Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs. *Bio. Pharm. Bull.* 2006; 29 (9): 1790-1798.
- [9] Tiyafoonchai Waree. Chitosan Nanoparticles: A Promising System for Drug Delivery. *Naresuan University Journal.* 2003; 11 (3): 51-66.
- [10] Ludwig A. The Use of Mucoadhesive Polymers in Ocular Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv Rev.* 2005; 57: 1595-1639.
- [11] Dounighi MN, Eskandari R, Avadi MR, Zolfagharian H, Sadeghi MM, Rezayat M. Preparation and In Vitro Characterization of Chitosan Nanoparticles Containing *Mesobuthus eupeus* Scorpion Venom as an Antigen Delivery System. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 2012; 18 (1): 44-52.
- [12] Mardiyati E, Muttaqien S, Setyawati D, Rosidah I, Sriningsih. Preparasi dan aplikasi nanopartikel kitosan sebagai sistem penghantaran insulin secara oral. *Prosiding inSINas.* 2012: 25-30.
- [13] Zhang H, Oh M, Allen C, Kumacheva E. Monodisperse Chitosan Nanoparticles for Mucosal Drug Delivery. *Biomacromol.* 2004; 5: 2461-2468.
- [14] Ko JA, Park HJ, Hwang SJ, Park JB, Lee JS. Preparation and Characterization of Chitosan Microparticles Intended for Controlled Drug Delivery. *Int J Pharm.* 2002; 249 (1-2): 165-174.
- [15] Elzoghby AO, Helmy MW, Samy WM, Elgindy NA. Novel Ionically Crosslinked Casein Nanoparticles for Flutamide Delivery: Formulation, Characterization, and in Vivo Pharmacokinetics. *Int J Nanomedicine.* 2013; 8: 1721-1732.
- [16] Mohanraj VJ, Chen Y. Nanoparticles-A review. *J Pharmaceut Res.* 2006; 5 (1): 561-573.
- [17] Nidhin M, Indumathy R, Sreeram KJ, Nair m BU. Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles of Narrow Size Distribution on Polysaccharide Templates. *Bull. Mater. Sci.* 2008; 31 (1): 93-96.
- [18] Wu Y, Yang W, Wang C, Hu J, Shoukuan F. Chitosan Nanoparticles as a Novel Delivery System for Ammonium Glycyrrhizinate. *Int J Pharm.* 2005; 295 (1-2): 235-245.
- [19] Bhumkar DR, Pokharkar VB. Studies on Effect of pH on Cross-linking of Chitosan With Sodium Tripolyphosphate: A Technical Note. *AAPS PharmSciTech.* 2006; 7 (2): Article 50.
- [20] Chithrani BD, Chan WC. Elucidating The Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes. *Nano Lett.* 2007; 7 (6): 1542-1550.