



Design and fabrication of low-cost microsystems for production of chitosan particles

Seref Akay^{1*}, Hasret Özdilek²

¹Alanya Alaaddin Keykubat University, Department of Genetics and Bioengineering, Antalya, 07450, Türkiye

²Gumushane University, Institute of Natural Sciences, Gumushane, 29100, Türkiye

Highlights:

- Simple and cheap microfabrication method for particle formation
- Optimization of particle formation in microfluidic system
- Antibiotic loading and bioactivity

Keywords:

- Antimicrobial
- Chitosan
- Drug delivery
- Microfabrication
- Microfluidic

Article Info:

Research Article

Received: 24.05.2023

Accepted: 26.11.2023

DOI:

10.17341/gazimmfd.1299367

Acknowledgement:

This study has been supported by Gümüşhane University, Scientific Research Projects Coordination Department. Project Number: 19.F5119.0101.

Correspondence:

Author: Seref Akay
e-mail: seref.akay@alanya.edu.tr
phone: +90 242 510 6120

Graphical/Tabular Abstract

This study offers a simple and cost-effective method to develop easy-to-use microfabrication technique to be used for producing and manipulating chitosan particles. The production process was optimized, and the produced particles were characterized and tested for antimicrobial activity, as depicted in Figure A.

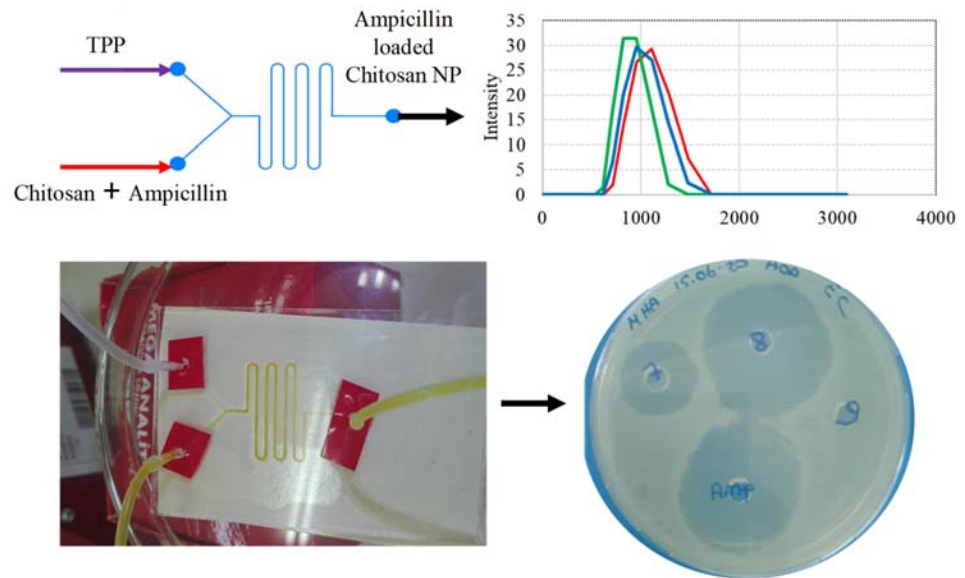


Figure A. Preparation of antibiotic loaded chitosan particle in microplatform

Purpose: This study aims to develop a simple and cheap method for fabricating microplatforms to produce polymer nanoparticles

Theory and Methods: Two different microfluidic systems have been designed and fabricated without the need for conventional microfabrication techniques. The first system was designed by combining an insulin syringe with narrow tubing. The second system was designed using web-based drawing tools and patterned on plexiglass with CNC engraving. Chitosan particle formation was successfully performed inside the fabricated devices with the option to manipulate production conditions to control the size of particles. Particles were characterized by DLS and SEM imaging. Particles have also been loaded with Ampicillin to investigate their antibacterial capability.

Results: The developed microsystems have been shown to be suitable for producing particles and successfully control the production parameters such as flow rate and flow rate ratio. Produced particles exhibited good characteristics such as size (in range of 39 to 771 nm). Ampicillin loaded particles have showed significant inhibition against Gram positive and Gram negative bacteria.

Conclusion: These results showed the proposed microfabrication method and designed microsystems can be used in entrapment of drugs molecules into polymeric nanoparticle without need of specialized laboratories and expertise. In this respect, it is estimated that this study will make an important contribution by removing some limitations in the microfabrication field for many researchers and lead to the development of new techniques.



Kitosan parçacıklarının üretimi için düşük maliyetli mikrosistemlerin tasarımı ve fabrikasyonu

Seref Akay^{1*}, Hasret Özdelek²

¹Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Antalya, 07450, Türkiye

²Gümüşhane Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gümüşhane, 29100, Türkiye

ÖNEÇIKANLAR

- Parçacık oluşumu için basit ve ucuz mikrofabrikasyon yöntemi
- Mikroakışkan sistemde parçacık oluşumunun optimizasyonu
- Antibiyotik yükleme ve biyoaktivite

Makale Bilgileri

Araştırma Makalesi

Geliş: 24.05.2023

Kabul: 26.11.2023

DOI:

10.17341/gazimmfd.1299367

Anahtar Kelimeler:

Antimikrobiyal,
kitosan,
ilaç salım,
mikroakışkan,
mikrofabrikasyon

ÖZ

Son araştırmalar, ilaçların yan etkilerini azaltırken kontrollü uygulanmasını sağlayan yöntemlere odaklanmıştır. Çapraz bağlı hidrojeller, nanotaşıyıcı olarak yaygın kullanıma sahiptir. İdeal parçacıkların üretiminde uygun yöntemlerin geliştirilmesi için birçok yaklaşım vardır. Mikroteknolojilerdeki ilerlemeler, kontrollü ilaç salım sistemlerini üretmek için çözüm olarak görülmüştür, ancak özel laboratuvarlar gerektirmesi nedeniyle sınırlı kalmaktadır. Bu çalışmada, antibiyotik yüklü kitosan parçacıklarının üretimi için basit bir yöntem önerilmiştir. Şırınga tabanlı akış odaklama sistemi (dış çapı 1 mm, iç çapı 120 µm) ve bilgisayarlı sayısal kontrol (CNC) yardımıyla tasarlanan 250 µm genişliğinde ve 100 µm derinliğinde mikrokanal olmak üzere iki farklı tasarım üretilmiştir. Parçacıkların üretimi için çapraz bağlayıcı ajan olarak Sodyum Trifosfat (TPP) kullanılmış ve konsantrasyon ve akış hızlarının parçacık oluşumuna etkileri incelenmiştir. Parçacıkların, şırınga tabanlı sistemde üretilebildiği, ancak homojen olmadığı görülmüştür. CNC mikrokanal ile üretilen parçacıkların 39 ila 771 nm arasında değişen boyutlarda olduğu SEM analizleri ile belirlenmiştir ve CNC mikrokanalın, düşük ve eşit akış hızlarında (25 µl/dk) daha başarılı olduğu görülmüştür. Kitosan akış hızının ve konsantrasyonunun yüksek olduğu koşullarda, parçacık boyutunun arttığı belirlenmiştir. CNC mikrokanal ile üretilen, Ampisilin yüklü parçacıkların Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler üzerinde inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar, mikrosistemlerin tasarımı için önerilen yaklaşımların özel laboratuvar ve uzmanlık gerektirmeksizin, ilaç taşıyıcılarının üretiminde kullanılabilirliğini göstermektedir.

Design and fabrication of low-cost microsystems for production of chitosan particles

HIGHLIGHTS

- Simple and cheap microfabrication method for particle formation
- Optimization of particle formation in microfluidic system
- Antibiotic loading and bioactivity

Article Info

Research Article

Received: 24.05.2023

Accepted: 26.11.2023

DOI:

10.17341/gazimmfd.1299367

Keywords:

Antimicrobial,
chitosan,
drug delivery,
microfluidic,
microfabrication

ABSTRACT

Recent research has focused on the methods for administration of medications in a controlled manner while minimizing side effects. Cross-linked hydrogels have wide application area as nanocarriers. There are many approaches for developing suitable methods to produce ideal particles. Advances in microtechnology have been considered as a solution to produce controlled drug delivery systems, however, it is limited due to the necessity for specialized laboratories. In this study, a simple method to produce antibiotic-loaded chitosan particles is proposed. Production was carried out with two different designs, a syringe-based flow focusing system (outer diameter of 1 mm, inner diameter of 120 µm) and microchannel with 250 µm width and 100 µm height fabricated with the computer numerical control (CNC). Sodium Triphosphate (TPP) was used as cross-linking agent for the production of particles and the effects of the concentration and flow rates on the particle formation was investigated. It has been observed that particles can be produced in a syringe-based system, but the resulting particles are not homogeneous. In the studies carried out with CNC microchannel, it was determined by SEM analysis that the obtained particles ranged in size from 39 to 771 nm, and it was seen that the CNC microchannel was more effective at low and equal flow rates (25 µl/min). It has been found that increasing the flow rate and concentration of chitosan increases the particle size. It was determined that Ampicillin loaded particles synthesized with the CNC microchannel exhibited high inhibition against Gram positive and Gram negative bacteria. These results show that the proposed approaches for the design of microsystems can be used in the formation of drug carriers without the need for specialized laboratories and expertise.

1. Giriş (Introduction)

Son yıllarda araştırmalar, ilacın biyoyararlanımını artırmak ve hedef bölgelere etkili ilaç dağıtımını gibi tedavi süreçlerini iyileştirmek için yeni ilaçlar ve stratejiler geliştirmeye odaklanmıştır. İlaçların düşük çözünürlük, düşük geçirgenlik, sistemik kanda hızlı metabolizasyonu ve vücuttan atılım gibi fizikokimyasal özellikleri, etkin tedavi için büyük problemlerdir. Ayrıca mevcut ilaçları etkisiz hale getiren direnç mekanizması ve fizyolojik engeller ile ilaç kullanımını sınırlayan stabilite ve raf ömrü gibi faktörler araştırmacıları alternatif yöntemler geliştirmeye teşvik etmektedir [1, 2].

İlaç salım sistemleri, çeşitli ilaç türlerinin taşınımı ve istenen düzeyde salımını sağlamanın etkili bir yoludur. Nanoparçacıklar, çözünmüş, hapsedilmiş veya yüzeye tutunmuş aktif bileşenleri kontrollü bir şekilde salan katı koloidal parçacıklardır. Aktif madde taşıyıcı sistem olarak nanoparçacıklar, kontrollü ilaç salımını, uzun dolaşım süresi, gelişmiş hedefleme yeteneği, gelişmiş hücresel alım ve düşük toksisite gibi birçok faydası ile diğer ilaç taşıyıcı sistemlerinden avantajlıdır. Geçtiğimiz birkaç on yıl boyunca, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), polimerik, lipozomal ve nanokristal gibi çeşitli formülasyonlar dahil olmak üzere 50'den fazla nanoparçacık bazlı ilaç salım sistemini onaylamıştır. Nanoparçacıkların in vivo performansı, boyut, yüzey yükü, morfoloji ve polidispersite gibi fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır ve bu parametrelerin kontrol edilmesi, etkili bir ilaç taşıyıcı geliştirmek için oldukça önemlidir [3, 4]. Bu sistemlerin üretimi için tekrarlanabilir ve kontrol edilebilir yöntemler geliştirilmesi ve ayrıca nanotaşıyıcıları üretmek için geniş aralıkta biyomalzemelerin keşfedilmesi, nanoparçacık tabanlı ilaç salım sistemlerinde ilerlemelere yol açmıştır [3, 5].

Bu nanotaşıyıcılar aktif veya pasif yollarla hedeflenen bölgelere iletebildiğinden, nanoparçacıkların boyutu çok önemlidir ve tedavinin gereksinimleri doğrultusunda tasarlanabilmektedir. Ayrıca, nanoparçacıkların bileşimi, bozunabilirlik ve işlevsellik gibi fizyolojik özellikleri, ilaç taşıyıcıları ve biyolojik sistem arasındaki etkileşimi ayarlamak için özelleştirilebilmektedir [6]. Yapısında çok miktarda su bulunduran hidrojel başta olmak üzere, polimerik nanoparçacıklar, nanotaşıyıcıların tasarımı ve üretimi için umut verici özelliklere sahiptirler. Hidrojeller, esas olarak terapötik ajanların verilmesi ve salınımı için geliştirilmiş olsa da doku mühendisliği uygulamalarında hücreleri barındırmak için bir yapı iskelesi olarak da kullanılmaktadır [7-9]. Hidrojellerin üretiminde çoğunlukla kimyasal veya iyonik çapraz bağlama yöntemleri kullanılmaktadır. Hidrojellerin özelliklerini belirlemek için çapraz bağlanma derecesi önemlidir. Yüksek derecede çapraz bağlanma, gözenek çapını azaltırken yapının elastikiyet katsayısını artırır. Taşınan ilacın salınımı bu şekilde kontrol edilebilmektedir. Hidrojellerin hücrelere bağlanabilen peptitler ve proteinler ile fonksiyonel hale getirilebilme özelliği, hidrojellerin çevre ile etkileşiminin ayarlanmasına da olanak sağlamaktadır [10].

Kitosan nanoparçacıklar biyoyumlu, toksik olmayan ve biyolojik olarak parçalanabilen bir biyomalzeme olarak farmasötik endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Pozitif yüke sahip nadir doğal polikationik polimerlerden biridir. Bu nedenle, benzer biyomalzemeler arasında kitosan, birçok ilaç salım uygulaması için büyük ilgi görmüştür. Yüksek kapsülleme verimliliği ve ayarlanabilir salım profilleri nedeniyle kitosan birçok biyometabolitin taşınması ve birçok biyolojik ortam için çok uygundur [11]. Kitosan nanoparçacıklar genel olarak ilgili polimer birimlerinin zıt yüklü bir molekülle elektrostatik etkileşimler yoluyla çapraz bağlandığı iyonik jelleşme yöntemiyle formüle edilir. Bu sentez yönteminin uygulanması nispeten basit olsa da parçacık boyutu ve homojenitesinin istenen şekilde olması için karıştırma süresi ve hızı

dahil, sentez parametrelerinin dikkatle ayarlanması gerekmektedir. Kitosan nanoparçacıklarının sentezi için negatif yüklü TPP ile kovalent olmayan etkileşime dayanan iyonik çapraz bağlama yöntemi kullanılmaktadır. Kitosan nanoparçacıklar üretiminde parçacık boyutu ve dağılımını kontrol etmenin bir yöntemi olarak kitosan:T PP oranının ayarlanması yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemde molekül içi ve moleküller arası çapraz bağlanma doğru bir şekilde kontrol edilmezse parçacıkların aşırı büyümesi gözlenebilmektedir [12]. Kitosan, polimerler ve metalik nanokompozitler dahil olmak üzere diğer malzemelerle harmanlanarak yara örtüsü, ilaç ve gen aktarımı için geliştirilen nano boyutlu taşıyıcılar ve enzimlerin immobilizasyonu gibi birçok biyomedikal uygulamada kullanılmaktadır [13].

Birçok biyomedikal uygulama için, üretilen nanoparçacıkların fizikokimyasal özelliklerini ihtiyaç duyulan şekilde belirlemek için güvenilir bir yöntem geliştirmek önemlidir. Nano-çökeltme ve monomerlerin kendi kendine birleşmesi gibi geleneksel yaklaşımlar, deneysel parametreler üzerinde daha az kontrole sahiptir. Bu nedenle geniş boyut dağılımına sahip ve partiden partiyeye fizikokimyasal özelliklerin değişiklik gösterdiği nanoparçacıklar üretilmektedir. Geleneksel yöntemlere alternatif bir yaklaşım, mikroakışkan aygıtlar kullanılarak sentez sürecinin minyatürize edilmesidir. Mikrokanalların kullanımına dayanan bu yöntemler mikro ölçekli boyutlar ve karıştırma, akış parametrelerinin hassas kontrolü, parçacık boyutunun ayarlanabilirliği ve tekrarlanabilirlik gibi üstünlükleri nedeniyle geleneksel yöntemlerdeki sınırlamaları ortadan kaldırmaktadır [4]. Hassas kontrol ve hızlı karıştırma gibi üstünlükler vadeden mikroakışkan teknolojileri, örnek ihtiyacının ve atık miktarlarının az olması nedeniyle de nanoparçacıkların üretim sürecinde büyük ilgi görmüştür [14]. Yapılan değerlendirmelerde, mikroakışkanların kullanımının, partikül üretimi üzerindeki yüksek kontrol nedeniyle daha küçük boyutlu ve daha dar dağılımlı, daha homojen nanoparçacıkların üretilmediği sonucuna varılmıştır [15, 16]. Mikroakışkan sistemleri, mühendislik, fizik, kimya ve biyolojinin temel ilkelerini birleştiren teknolojik bir alandır. Bu alanın araştırma odağı, küçük hacimli sıvıların mikro ölçekli sistemlerde işlenmesidir ve multidisipliner doğası nedeniyle ilgi giderek artmaktadır. Mikrosistemlerin küçük geometrisi, laminar akış rejimi ve gelişmiş kütle ve ısı transferi gibi spesifik hidrodinamik özelliklerin geliştirilmesine olanak tanımaktadır. Bu nedenle, hasta başı testler, izolasyon, biyo-algılama ve biyometabolitlerin analizi gibi birçok kimyasal ve biyolojik uygulama için farklı mikroakışkan aygıt geliştirilmiştir. Şu anda, COVID-19'a karşı pazarlanan Pfizer/BioNTech ve Moderna aşılı mikroakışkan tabanlı nanoparçacık metodolojileri kullanılarak formüle edilmektedir [14]. Bu örnek, mikroakışkan sistemlerinin büyük ölçekli kullanımı ve ticarileşme potansiyeline de ışık tutmaktadır. Temel mikroakışkan sistemleri, mikrometre boyutundaki kanallarda sürekli akış rejimlerine dayanır. Çapraz akış ve akış odaklı cihazlar gibi çok sayıda geleneksel mikro platform, nanoparçacık sentezi için tasarlanmış ve test edilmiştir. Polimerik nanoparçacıkların sentezi için en yaygın kullanılan mikroakışkan cihaz, mikroakışkan odaklama cihazıdır [14]. Hassas kontrollü koşullar altında parçacıkların toplu ve sürekli sentezi, mikro platformlar aracılığıyla gerçekleştirilebilir. Kanal geometrileri ve akış hızları gibi birçok parametre veya elektrik, manyetik, akustik veya piezoelektrik kuvvetler gibi dış uyarılar, üretim sürecine dahil edilebilmekte veya değiştirilerek etkileri incelenebilmektedir [3, 17-20]. Mikroakışkan sistemlerin avantajları, biyolojik parçacıklar ve ilişkili ortamlar üzerinde hassas kontrol ve işleme yetenekleri nedeniyle çeşitli alanlarda kanıtlanmış olmasına rağmen, nispeten karmaşık üretim süreçleri birçok laboratuvar ve araştırmacı için sınırlayıcı olabilmektedir [21]. Başlangıçta mikro elektronik sistemlerin üretimi için geliştirilen mikrocihaz üretim teknikleri, kullanım alanı ve ilginin artmasıyla beraber, üretim

süreçleri ve malzemeleri çeşitlendirilmiştir [22]. Mikroakışkan cihazlar başlangıçta silikon veya camdan yapılmış ve mikro işleme teknikleri kullanılarak üretilmiştir. Malzeme işleme teknikleri (ıslak/kuru aşındırma, fotolitografi, elektron ışın litografisi vb.) bir yüzey üzerinde istenilen desenin oluşturulmasında kullanılmaktadır. Ancak bu teknikler pahalı üretim ekipmanlarının kullanılmasını gerektirir ve bu da yüksek maliyetlere yol açmaktadır. Polimerler gibi malzemelerin kullanıma sunulmasıyla birlikte, basit ve yaygın olarak kullanılan bir teknik, malzeme olarak polidimetilsiloksan (PDMS) kullanılan yumuşak litografi tekniği öne çıkmıştır [5]. Ancak bu teknik, maske tasarımı, substrat hazırlama, fotorezist geliştirme, UV ile muamele vb. karmaşık ve zaman alıcı adımlar içermektedir. Bu adımların çoğu, özel ekipman kullanılarak temiz odalarda gerçekleştirilmelidir [23]. Bu özel ekipman ve temiz oda altyapıları ise sınırlı sayıda laboratuvarlarda bulunmaktadır. Son zamanlarda alternatif bir teknik olarak üç boyutlu (3B) baskı ile, karmaşık mikroakışkan yapıların hızlı bir şekilde üretilmesine karşın çözünürlük sınırlamaları ve müteakip yumuşak litografi adımlarına duyulan ihtiyaç, bu alandaki ilerlemeyi hala engellemektedir [18]. Bu nedenle, basit mikrofabrikasyon tekniklerinin geliştirilmesi için hala büyük boşluklar ve gereksinimler bulunmaktadır [24].

Bu çalışmanın temel amacı, ilaç taşıyıcı kitosan parçacıkların üretimi için bir mikroaygıt tasarlamak ve bu mikroaygıtın üretimi için bütün laboratuvarlarda uygulanabilecek, uzmanlık gerektirmeyen, ucuz ve basit bir yöntem geliştirmektir. Bu amaçla, biyoyararlanımları düşük ilaç moleküllerinin parçacıklar içinde enkapsülasyonunu optimize etmek ve en uygun boyut dağılımına sahip kitosan parçacıkları üretmek için geleneksel mikrofabrikasyon tekniklerinin dezavantajlarını ortadan kaldıran etkili bir yöntem önerilmiştir.

2. Deneysel Metot (Experimental Method)

2.1. Mikrofabrikasyon (Microfabrication)

Parçacıkların sentezi için 2 farklı mikroaygıt tasarlanmış ve üretilmiştir. Kitosan parçacık sentezi için akış odaklama ilkesine dayalı bir *Kendin Yap (Do it Yourself -DIY)* mikrosistemi tasarlanmıştır. Temel olarak pleksiğlas levhada matkap yardımı ile 1 mm'lik kanal açılmış ve standart 31G künt insülin şırınga iğnesi (iç çapı 120 µm, dış çap 250 µm, uzunluk 12 mm) yatay olarak takılmıştır. Bağlantı silikon yapıştırıcı kullanılarak kapatılmış ve deneyler sırasında herhangi bir sızıntı gözlenmemiştir. Şırınga pompası ile mikroaygıt sistemini bağlamak ve çözeltilerin kararlı akışlarını sağlamak için ve silikon hortumlar kullanılmıştır.

Y şeklinde 2 giriş ve 1 çıkıştan oluşan bir mikrokanal tasarımına sahip ikinci mikroaygıt, tezgâh üstü lazer destekli CNC cihazı (Creativity 3D CP-01) ile ve mikrodesele doğrudan bir pleksiğlas yüzey üzerine kazılarak üretilmiştir. Mikrodesele, çeşitli mikroakışkan çipleri tasarlamak için birçok hazır mikro yapı içeren web tabanlı bir tasarım aracı (*3DµF*, <https://3duf.org/>) kullanılarak tasarlanmıştır [25]. *3DµF* tamamen *JavaScript*'te oluşturulmuş ve tarayıcı içinde çalışabilen bir araçtır. Bu durum, karmaşık bilgisayar destekli çizim (CAD) tabanlı tasarımlara kıyasla tasarım adımını çok kolaylaştırmaktadır. Bu araç, istenen mikroakışkan modeli tasarlamak ve oluşturmak için etkileşimli bir tuval içeren, kullanımı çok kolay bir arayüz sağlamaktadır. Böylece *3DµF* üzerinde 2 giriş portu, 1 çıkış portu ve 250 µm genişliğinde ve 100 µm derinliğinde uzun bir mikrokanal içeren mikroakışkan deseni tasarlanmıştır. Daha sonra oluşturulan dosyalar, *.svg* dosyası olarak kaydedilmiş ve web tabanlı bir dönüştürücü (<http://jscut.org/jscut.html>) kullanılarak *.gcode* dosyasına dönüştürülmüştür. Bu dönüştürme ile kazanılmak istenen mikrodesele derinliği ve genişliği, CNC ucunun çapı ve hareket hızı seçilerek, dosya, CNC cihazının doğrudan okuyabileceği çalıştırılabileceği bir forma dönüştürülmüştür. Bu dosya daha sonra CNC cihazına yüklenmiş ve 50x25x5 mm boyutlarında pleksiğlas plaka üzerine kazıma yapılarak mikrokanal oluşturulmuştur. Pleksiğlas üzerinde oluşturulan açık mikrokanal yüzeyi daha sonra giriş ve çıkış delikleri olan başka bir pleksiğlas plakaya çift taraflı bant ile yapıştırılarak kapalı kanal mikroaygıt elde edilmiştir.

2.2. Kitosan parçacıkların sentezi (Synthesis of chitosan particles)

Kitosan parçacıklarının hazırlanması için kitosan polimerlerinin iyonik jelleşmesine dayalı yöntem kullanılmıştır. Kısaca, kitosan, %1 (hacimce) asit asetik solüsyonunda ve TPP saf su içerisinde çözüldürülmüştür. Sentez koşullarını optimize etmek için polimer derişimi, çapraz bağlayıcı ajan derişimi, akış hızları ve akış hızları oranı gibi değişkenler test edilmiştir. Üretilen parçacıklar, santrifuj (14000 rpm, 30 dakika) yoluyla ortamdan ayrılmış ve sonraki çalışmalar için saf su içinde süspansiyon edilmiştir. Parçacıkların üretimi için uygulanan deney koşulları Tablo 1 ve Tablo 2'de özetlenmiştir.

2.3. Kitosan parçacıkların karakterizasyonu (Characterization of chitosan particles)

Boyut Dağılımı analizi; parçacıkların boyut dağılımını belirlemek için Dinamik Işık Saçılımı (DLS, Malvern Zetasizer Nano ZSP) analizi yapılmıştır. Dispersan olarak saf su kullanılmıştır.

Tablo 1. DIY mikroaygıtında parçacık üretimi için deneysel koşullar (Experimental conditions for particle synthesis in DIY microsystem)

Örnek	Dağıtılan faz	Sürekli Faz	Dağıtılan faz akış hızı (µL/min)	Sürekli faz akış hızı (µL/min)	Akış hızları oranı
D1	%0,5 TPP	%0,25 kitosan	20	200	1:10
D2	%0,5 TPP	%0,25 kitosan	40	200	1:5
D3	%0,5 kitosan	%0,5 TPP	50	200	4:1

Tablo 2. CNC ile tasarlanan mikrokanal sisteminde parçacık üretimi için deneysel koşullar (Experimental conditions for nanoparticle synthesis in CNC patterned microsystem)

Örnek	Kitosan konsantrasyonu %	TPP konsantrasyonu %	Kitosan akış hızı µL/min	TPP akış hızı µL/min	Akış hızı oranı
C1	0,1	0,1	25	25	1:1
C2	0,1	0,1	20	40	1:2
C3	0,1	0,1	40	20	2:1
C4	0,1	0,1	50	50	1:1
C5	0,05	0,1	25	25	1:1
C6	0,05	0,1	20	40	1:2
C7	0,05	0,1	40	20	2:1
C8	0,05	0,1	50	50	1:1
C9	0,5	0,5	25	50	1:2
C10	0,5	0,5	50	50	1:1

Taramalı Elektron Mikroskopu Analizi; parçacıkları yüzey ve yapısal özellikler açısından incelemek için taramalı elektron mikroskopu (SEM, Zeiss Sigma 300) kullanılarak morfolojileri ve parçacık boyutu gözlemlenmiştir.

2.4. İlaç yükleme ve salım çalışmaları (Drug loading release studies)

Uygun koşullar altında üretilen kitosan parçacıklar model molekül olarak Kurkumin ile yüklenmiştir. Yükleme için Kurkumin, Etanol: PBS;1:1 çözeltisinde çözündürülmüş ve parçacık oluşumundan önce polimer çözeltisi ile karıştırılmıştır. Nihai konsantrasyonu 1 mg/ml olarak ayarlanmıştır. Parçacıkların sentezi, CNC ile üretilen mikroaygıtta Kurkumin-kitosan karışımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Üretilen Kurkumin yüklü parçacıklar santrifüj ile ayrılmış ve üst fazdaki serbest Kurkumin miktarı spektrofotometrik olarak (425 nm) belirlenerek yükleme verimi hesaplanmıştır.

Yükleme verimi (%) aşağıdaki gibi hesaplanmıştır (Eş. 1).

$$\text{Yükleme Verimi (\%)} = \frac{\text{Toplam Kurkumin} - \text{Serbest Kurkumin}}{\text{Toplam Kurkumin}} * 100 \quad (1)$$

Yükleme verimi ve salım kinetiğinin belirlenmesinde ve Kurkumin miktarının hesaplanması için standart kalibrasyon eğrisi hazırlanmış ve kullanılmıştır. Parçacıkların salım profilini belirlemek için Etanol:PBS (1:1) çözeltisinde karıştırılarak süspansiyon haline getirilen Kurkumin yüklü kitosan parçacıkları belirli zaman aralıklarında numuneler alınarak santrifüj edilmiş ve süpernatanttaki Kurkumin miktarı ölçülmüştür.

2.5. Kitosan parçacıkların antimikrobiyal aktivitesi (Antimicrobial activity of chitosan particles)

Antibiyotik yüklü kitosan parçacıklar, 80 mg Ampisilin'in, %0,5 kitosan ve %1 Tween 20 içeren 10 ml polimer çözeltisi ile karıştırılması ve CNC ile tasarlanmış mikroaygıtta üretilmesi ile hazırlanmıştır. Üretim, takiben parçacıklar ortamdaki ayrılmış ve oda sıcaklığında kurutmaya bırakılmıştır. Kurutulmuş numuneler 1 mg/ml parçacık derişiminde olacak şekilde saf su ile süspanse edilmiştir ve antimikrobiyal aktivite çalışmalarında kullanılmıştır. Hazırlanan parçacıklar, Gram negatif (*Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli*) ve Gram pozitif (*Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus*) bakterilere karşı antimikrobiyal etkinliklerini belirlemek üzere test edilmiştir. Bu amaçla agar difüzyon yöntemi uygulanmıştır. Petri kaplarındaki agar tabakası üzerinde 6 mm çapında kuyucuklar oluşturulmuş ve kuyucuklara test edilecek 80 µL Ampisilin yüklü kitosan parçacık içeren numune eklenmiştir (0,2-1 mg/ml). 37°C'de 24 saatlik inkübasyonu takiben petriyer gözlemlenmiştir. Kontrol olarak Ampisilin (50 mg/mL) ve parçacıklardan elde edilen süpernatant kullanılmıştır.

3. Sonuçlar ve Tartışmalar (Results and Discussions)

3.1. Parçacıkların sentezi ve optimizasyonu (Synthesis and optimization of particles)

Kitosan parçacıkların kitosan ve TPP arasındaki etkileşime dayanan iyonik jelleşmesi Şekil 1'de gösterilen DIY şırınga bazlı akış odaklama mikroaygıtı (üstte) ve CNC ile tasarlanan mikroakışkan cihazda (altta) gerçekleştirilmiştir. Parçacıkların oluşumu, TPP ve kitosan konsantrasyonunu ve her iki fazın akış hızlarını kontrol ederek optimize edilmiştir.

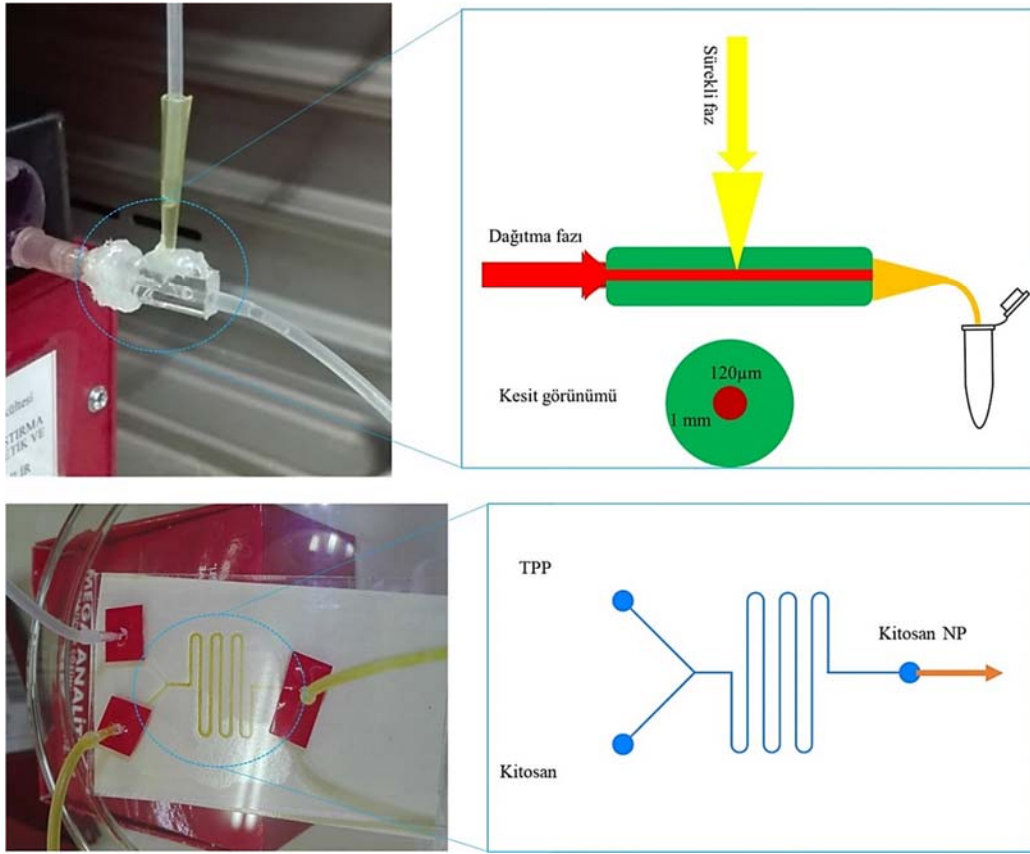
Yapılan denemeler sonunda boyut dağılım analizleri yapılmış ve elde edilen parçacıkların boyut dağılımları Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Elde edilen kitosan parçacıkların DLS ile belirlenen ortalama boyutları (Average particle size of produced chitosan particles)

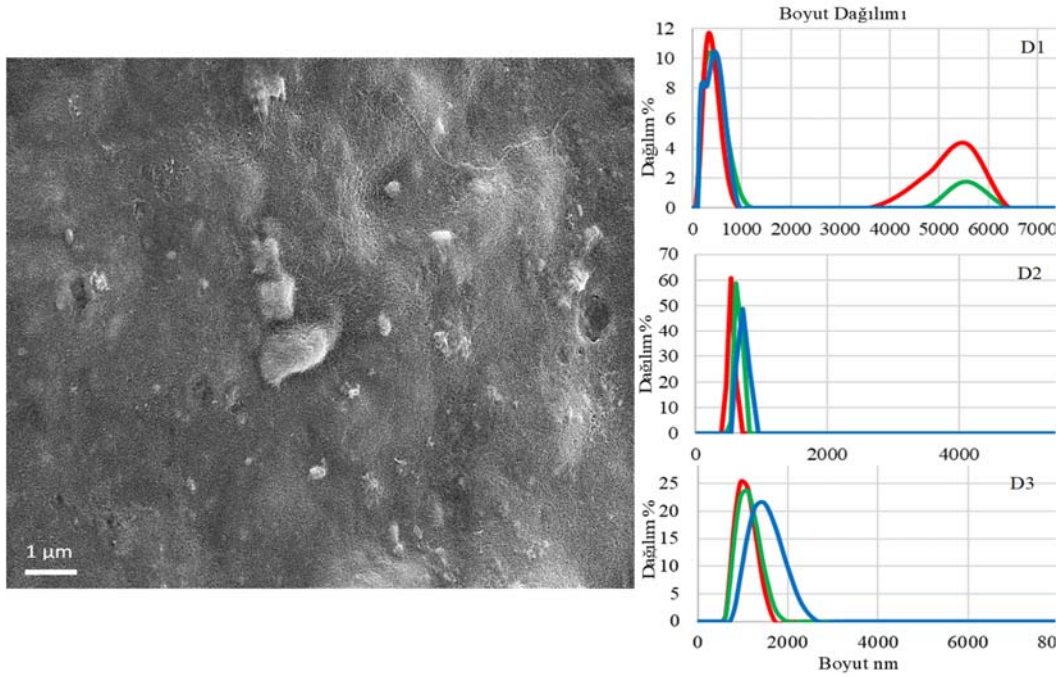
	Örnek	Ortalama boyut (nm)
DIY mikroaygıt	D1	387,4 ± 19,63
	D2	2936 ± 429,5
	D3	1716 ± 212,3
CNC ile tasarlanan mikroakışkan	C1	351,2 ± 10,87
	C2	558,3 ± 32,84
	C3	2749 ± 107
	C4	472,3 ± 38,98
	C5	1004 ± 83,93
	C6	8675 ± 3620
	C7	422 ± 11,96
	C8	5264 ± 316
	C9	610,4 ± 19,62
	C10	5859 ± 1191

DIY mikroaygıtta, 1 mm çaplı girişten sürekli faz akışı sağlanırken, dağılmış faz, iç çapı 120 µm olan şırınga iğnesi yardımıyla verilmiştir. Sürekli faz olarak %0,25 kitosan, dağılmış faz olarak %0,5 TPP'nin kullanıldığı deneylerde (Tablo 1; D1 ve D2), akış hızları oranı, dağılmış fazın akış hızını sabit; sürekli fazın akış hızını artırarak test edilmiştir. Sürekli fazın daha düşük akış hızında (20 µl/min), ortalama parçacık boyutunun yaklaşık 387,4 ± 19,63 nm olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, boyut dağılımı parçacıkların homojen olmadığını göstermiştir (Şekil 2, D1). Sürekli fazın daha yüksek akış hızı (40 µl/min) ile gerçekleştirildiği deneyde, parçacık boyutlarının önemli ölçüde arttığı (2936 ± 429,5 nm), ancak elde edilen parçacıkların boyutlarını oldukça homojen olduğu belirlenmiştir (Şekil 2, D2). Sürekli faz ve dağılmış faz yer değiştirildiğinde ve dağıtılan fazın akış hızı 50 µl/min olarak ayarlandığında (Şekil 2, D3), homojen, ancak daha büyük (1716 ± 212,3 nm) parçacıkların oluştuğu gözlemlenmiştir. Sonuçlar, kitosan parçacık üretimi için DIY akış odaklama mikroaygıtının kullanmanın mümkün olduğunu, ancak parçacık boyutunu kontrol etmenin veya manipüle etmenin çok zor olduğunu göstermiştir.

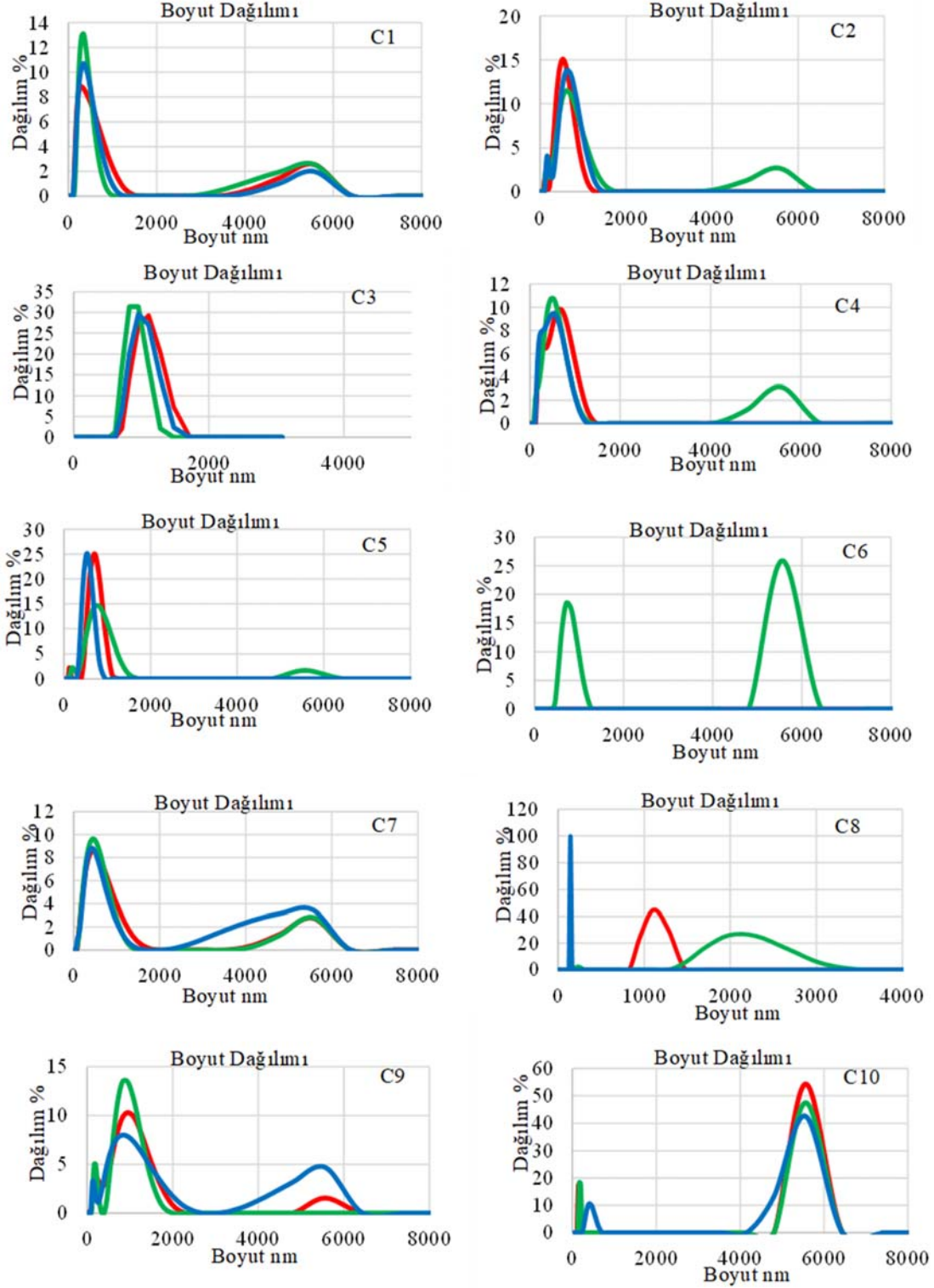
CNC ile tasarlanan mikroakışkan cihaz ile yapılan ilk grup deneyler (Tablo 2; C1, C2, C3, C4), kitosan ve TPP konsantrasyonları %0,1'de sabit tutularak ve akış hızları değiştirilerek gerçekleştirilmiştir. Boyut dağılımı göz önüne alındığında, her iki çözeltinin akış hızları eşit olduğunda en küçük parçacıkların (sırasıyla C1 ve C4, 351,2 ± 10,87 ve 472,3 ± 38,98 nm) elde edildiği gözlemlenmiştir. Aksine, kitosan akış hızının artırılmasının, parçacık boyutunu büyük ölçüde artırdığı, daha yüksek TPP akış hızı ile hafifçe arttığı tespit edilmiştir. Kitosan akış hızının daha yüksek olduğu durumlarda daha büyük boyuta sahip parçacıkların oluştuğu belirlenmiştir. İkinci grup deneyler, TPP konsantrasyonu %0,1'de sabit tutulurken kitosan konsantrasyonu %0,05'e düşürülerek gerçekleştirilmiş ve farklı akış hızı oranları uygulanmıştır (Tablo 2; C5, C6, C7, C8). En küçük boyuta sahip parçacıklar (C7, 422 ± 11,96 nm), TPP çözeltisinin daha düşük akış hızında uygulandığında elde edilmiştir. Diğer tüm koşullar için, özellikle TPP akış hızının daha yüksek olduğu koşullarda üretilen parçacıkların, nano ölçekte olmadığı gözlemlenmiştir. Üretilen tüm parçacıkların boyut dağılımı grafikleri Şekil 3'te verilmektedir. Üçüncü grup deneyler (Tablo 2; C9, C10), yüksek konsantrasyonda kitosan (%0,5) ve TPP'nin (%0,5) parçacık büyüklüğü üzerindeki etkilerini belirlemek için yapılmıştır. Bu denemelerde de akış hızlarının 50 µl/min ve eşit olduğu koşullarda çok büyük parçacıkların oluştuğu, kitosan akış hızının (25 µl/min) TPP akış hızından (50 µl/min) daha düşük olduğu durumlarda parçacık boyutunun küçüldüğü belirlenmiştir. Bu bulgular, TPP konsantrasyonunun azaltılmasıyla daha büyük parçacıkların oluşacağını gösteren raporla tutarlıdır [26].



Şekil 1. DIY şırınga bazlı akış odaklama mikroaygıtı (üstte) ve CNC ile tasarlanan mikroakışkan cihaz (altta) üzerinde parçacık oluşumu (Particle formation on the DIY syringe-based flow focusing microsystem (top) and CNC patterned microfluidic device (bottom))

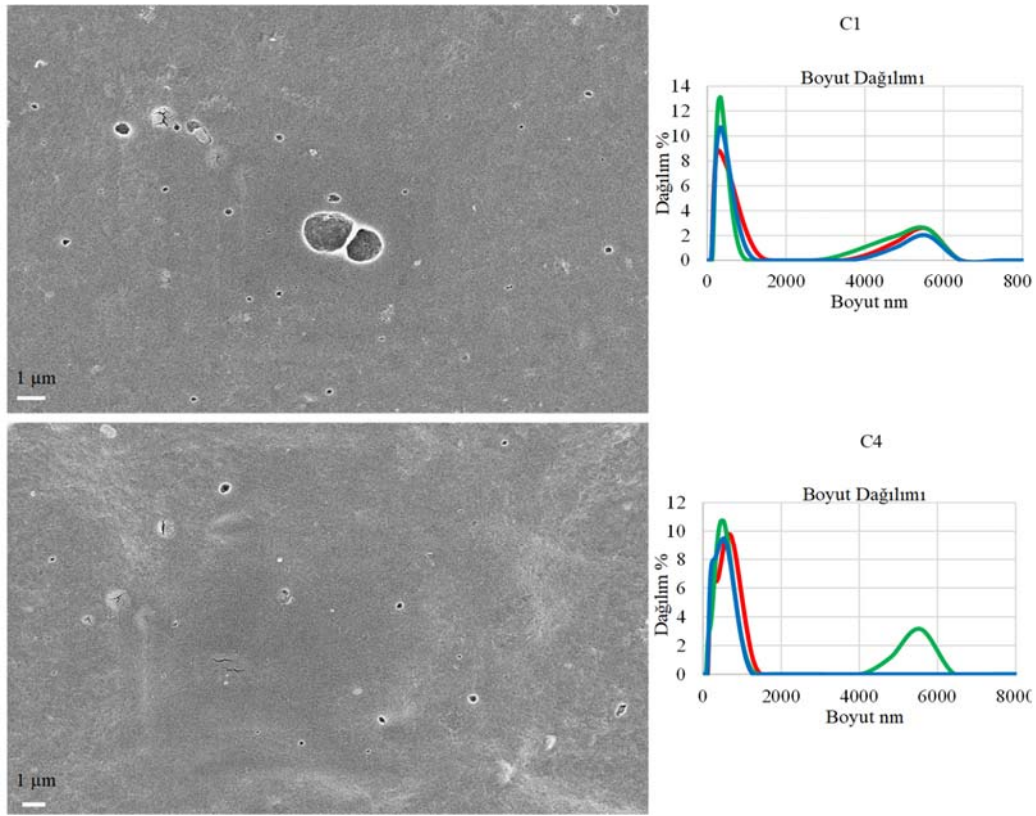


Şekil 2. DIY mikrosistemi ile üretilen parçacıkların (D1, %0,1 kitosan - %0,1 TPP) SEM görüntüsü (solda) ve Boyut dağılımı (sağda) (SEM image (D1, %0.1 chitosan - %0.1 TPP left) and size distribution (right) of particles produced by DIY microsystem)

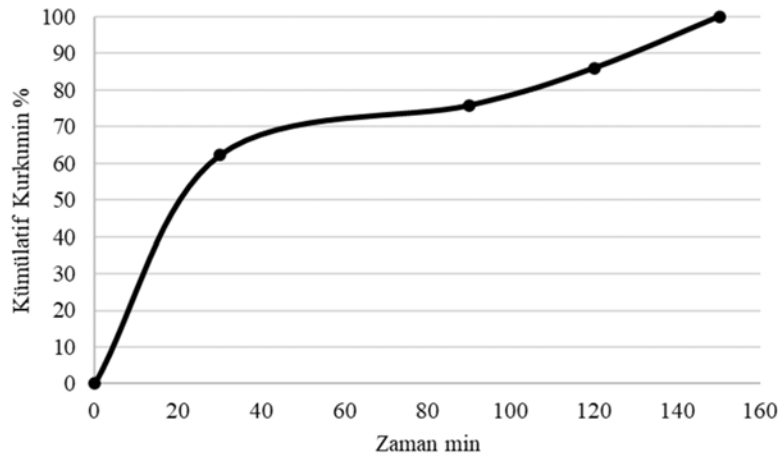


Şekil 3. CNC ile tasarlanan mikrosistem ile üretilen parçacıkların boyut dağılımı analizi. Örneklere ait sentez koşulları Tablo 2’de verilmiştir.

(Size distribution analysis of particles produced by CNC patterned microsystem. Synthesis conditions are given in Table 2).



Şekil 4. CNC ile tasarlanan mikrosistemde incelenen seçilmiş formülasyonların (C1 ve C4) SEM görüntüleri ve boyut dağılımı (SEM image and size distribution of selected formulation studied in CNC patterned microsystem)



Şekil 5. Kurkumin yüklü kitosan parçacıklarının salım profili (Release profile of Curcumin loaded chitosan particles)

Daha yüksek konsantrasyonda, TPP ve kitosan etkileşiminin, dolayısıyla çapraz bağlamanın hızlı olması ve bunun da daha büyük parçacık oluşumuna neden olması da mümkündür. Soheili vd. [27] TPP konsantrasyonunu artırarak, TPP iyonlarının kitosan ile artan etkileşiminin bir sonucu olarak daha büyük parçacıkların oluştuğuna dair benzer bulgular bildirmiş ve ayrıca parçacık boyutunu kontrol etmek için akış hızı oranının önemine dikkat çekmişlerdir. Üretilen parçacıkların yapısal özelliklerini belirlemek için SEM görüntüleri alınmıştır. SEM karakterizasyonları için elde edilen bütün parçacıklar değil, DLS analizlerinde en küçük boyuta sahip parçacıklar (sırasıyla C1 ve C4, $351,2 \pm 10,87$ ve $472,3 \pm 38,98$ nm) örnekler analiz için

seçilmiştir. Buna göre, SEM görüntülerinde (Şekil 4) farklı boyutlarda (39 nm ila 771 nm arasında) parçacıklar gözlenmiştir, bu da DLS analizlerine kıyasla çok daha küçük boyutlardaki parçacıkların oluştuğunu göstermiştir. DLS ve SEM boyut analizi arasındaki fark, DLS için numune hazırlama sırasında numunelerin aglomerasyonuyla ilişkili olabilir. Kitosan partiküllerinin sahip olduğu fonksiyonel gruplar nedeniyle yapışkan doğası, sulu çözeltilerde partiküllerin topaklaşması gözlenebilmektedir. Bu nedenle sulu ortamlarda uzun süreli depolanması, partiküllerin kullanımını kısıtlayan stabilite sorunlarına yol açabilmektedir [28]. DLS analizlerinde örneklerin tekrar süspansiyon haline getirilmesi ve analizlerin ıslak olarak yapılması

parçacıkların özellikle uzun bekleme süreleri söz konusu olduğunda agregre olma riski artmaktadır. SEM görüntülerinde parçacıkların neredeyse homojen olduğu belirlenmiş, ancak aglomerasyon nedeniyle bazı daha büyük yapıların oluştuğu da gözlemlenmiş ve bu da parçacıkların hem boyutunu hem de homojenliğini değiştirmiştir. Ayrıca parçacıkların küresel formlara sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Çeşitli 3B baskı ve yumuşak litografi teknikleriyle imal edilmiş mikroakışkan platformlar kullanılarak hidrojel nanoparçacıkların üretimi hakkında birçok çalışma bildirilmiştir [8, 17, 26–29]. Pittermannova vd. [30], yağ ve aljinat çözeltileri kullanılarak, farklı konsantrasyonlar, akış hızları ve hacim oranları altında mikrodamlacık bazlı bir mikrosistemde ortalama çapı 10,5 - 0,5 µm olan mikroparçacıklar üretmişlerdir. Aşık vd. [26], TPP konsantrasyonundaki ve akış hızındaki bir azalmanın nispeten nanoparçacık boyutu üzerinde olumlu bir etkisi olduğunu gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte, daha düşük bir akış hızının kalış süresini ve aşırı jelleşmeyi artıracak ve bunun da mikrokanal içinde tıkanmalara veya kümeleneyle neden olabileceğini bildirmiştir. Hemen hemen tüm çalışmalarda araştırmacılar benzer sonuçlar gözlemlemişler ve konsantrasyon, akış hızı ve akış hızı oranını manipüle etmenin önemine işaret etmektedirler. Ancak, bu çalışmalar maliyeti yüksek ve tüm laboratuvarlarda bulunmayan karmaşık mikrofabrikasyon teknikleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Mevcut çalışma, bu tür mikro platformların tasarımı ve üretimi için alternatif, erişilebilir ve uygun maliyetli bir yöntem önermektedir. Mevcut çalışmada elde edilen sonuçlar, CNC ile tasarlanan mikroplatformun çeşitli parametreler ve koşullar altında kitosan parçacıkları üretmek için kullanılabilirliğini ortaya koymuştur.

3.2. İlaç yükleme ve salım çalışmaları (Drug loading release studies)

Parçacıkların sentezi, CNC ile üretilen mikroaygıtta Kurkumin-kitosan karışımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneysel koşullar olarak en küçük parçacıkların elde edildiği, kitosan ve TPP konsantrasyonlarının %0,1 olduğu deney koşulları (C1) seçilmiştir. Kitosan parçacıkların yükleme verimi %99,6 olarak belirlenmiştir. Bu bulgu, benzer çalışmalara kıyasla çok daha yüksek kapsülleme verimliliğine işaret etmektedir [29, 31, 32]. Kitosan parçacıkların Kurkumin ilaç salım grafiği Şekil 5'te gösterilmiştir. Görüldüğü gibi, çoğunlukla benzer nanot taşıyıcılarda bulunan ilk patlama salımını (initial burst release) takiben, zaman içinde kararlı bir salım profili gözlenmiştir [8, 33].

3.3. Kitosan parçacıkların antimikrobiyal aktivitesi (Antimicrobial activity of chitosan particles)

Üretilen parçacıkların antimikrobiyal aktiviteleri, iki Gram negatif (*E. coli* ve *P. aeruginosa*) ve iki Gram pozitif (*B. Subtilis* ve *S. aureus*) bakterilerine karşı test edilmiştir. Ampisilin yüklü kitosan parçacıkların her iki bakteri grubuna karşı önemli inhibisyon bölgeleri geliştirdiği gözlemlenmiştir. İnhibisyon bölgelerinin çapı Tablo 4'te sunulmuştur. Kontrol olarak kullanılan süpernatant daha büyük inhibisyon bölgeleri göstermiştir. Bu bulgu, Ampisilin'in kitosan parçacıklarına yüklenmesinin beklenenden daha düşük olabileceğini ve süpernatant fazda hala yüklenmemiş antibiyotik bulunduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, yüklü parçacıklar tarafından oluşturulan inhibisyon bölgeleri karşılaştırılabilir olduğu ve üretilen parçacıkların daha düşük kargo ile bile iyi çalıştığını göstermektedir. Bu bulgular diğer çalışmalarla da tutarlıdır [34, 35]. Öte yandan, sonuçlar göz önüne alındığında, biyoaktif maddenin parçacıklara başarıyla yüklendiği ve antibiyotik saf su ile 3 kez santrifüj edilmesine ve 3 gün boyunca oda sıcaklığında kurutulmasına rağmen parçacıklar tarafından tutulduğu ve korunduğu sonucuna varılabilir.

Tablo 4 Ampisilin yüklenmiş kitosan parçacıkların inhibisyon çapları (Inhibition diameters of ampicillin-loaded chitosan particles)

Örnek	İnhibisyon çapı (mm)			
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Kitosan NP	19	13	21	21
Süpernatant	29	23	36	35

4. Sonuçlar (Conclusions)

Son zamanlarda, polimerik hidrojel nanoparçacıkların üretimi için mikroakışkan tabanlı platformlar ilgi odağı olmuştur. Mikroakışkan sistemler tarafından sunulan; kanal geometrisi ve en boy oranı, uygun nanoparçacıkların oluşumu için birçok parametreyi manipüle etme fırsatı sağlar. Bununla birlikte, mikroakışkan sistemlerin imalatındaki karmaşıklıklar ve yüksek maliyetler, bu sistemlerin çeşitli uygulamalarda yaygın olarak kullanılmasının önündeki en büyük engellerdir. Bu çalışmada, kitosan parçacıkların üretimi için basit, ucuz ve etkili bir mikrosistem tasarlanmıştır. Parçacık oluşumu, tasarlanan mikro platformlardaki akış hızı, akış hızı oranları ve konsantrasyonlar değiştirilerek gerçekleştirilmiştir. Parametrelerin parçacıkları oluşturmak için başarılı bir şekilde değiştirilebileceği ve üretilen parçacıkların beklenen boyut dağılımına sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, parçacıklar, antibakteriyel etkinliklerini araştırmak için Ampisilin ile yüklenmiş ve test edilmiştir. Sonuçlar, üretilen parçacıkların antibiyotikleri başarıyla taşıyabildiğini ve bakteriyel üremeyi durdurduğunu göstermiştir. Bu çalışma kapsamında geliştirilen yöntem, hidrojel parçacıkların birçok alandan araştırmacılar tarafından, özel laboratuvarlara ve bütçelere ihtiyaç duymadan, daha az uzmanlıkla üretilmesi için uygulanabilecek bir yöntemdir. Bu bakımdan bu çalışmanın birçok araştırmacının önündeki bazı engelleri kaldıracağı ve yeni tekniklerin geliştirilmesine yol açacağı öngörülmektedir.

Teşekkür (Acknowledgement)

Bu çalışma Gümüşhane Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Dairesi Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 19.F5119.0101.

Kaynaklar (References)

1. Khadka P., Ro J., Kim H., Kim I., Kim J.T., Kim H., Cho J.M. Yu G., Lee J., Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability, *Asian J. Pharm. Sci.*, 9, 304–316, 2014.
2. Kalepu S., Nekkanti V., Insoluble drug delivery strategies: Review of recent advances and business prospects, *Acta Pharm. Sin. B.*, 5, 442–453, 2015.
3. Zhang L., Chen Q., Ma Y., Sun J., Microfluidic Methods for Fabrication and Engineering of Nanoparticle Drug Delivery Systems, *ACS Appl. Bio Mater.*, 3, 107, 2020.
4. Agha, A., Waheed, W., Stiharu, I., Nerguizian, V., Destgeer, G., Abu-Nada, E., Alazzam, A., A review on microfluidic-assisted nanoparticle synthesis, and their applications using multiscale simulation methods. *Discover Nano*, 18 (1), 18, 2023.
5. Gimondi, S., Ferreira, H., Reis, R. L., Neves, N. M., Microfluidic Devices: A Tool for Nanoparticle Synthesis and Performance Evaluation. *ACS Nano*, 17 (15), 14205–14228, 2023.
6. Kumar K., Chawla R., Nanocarriers-mediated therapeutics as a promising approach for treatment and diagnosis of lung cancer, *J. Drug Delivery Sci. Technol.*, 65, 102677, 2021.
7. Marquis M., Davy J., Cathala B., Fang A., Renard D., Microfluidics assisted generation of innovative polysaccharide hydrogel microparticles. *Carbohydr. Polym.*, 116, 189, 2015.
8. Bazban-Shotorbani S., Dashtimoghdam E., Karkhaneh A., Hasani-Sadrabadi M.M., Jacob K.I., Microfluidic Directed Synthesis of Alginate Nanogels with Tunable Pore Size for Efficient Protein Delivery, *Langmuir*, 32, 4996, 2016.

9. Kim S., Oh J., Cha C., Enhancing the biocompatibility of microfluidics-assisted fabrication of cell-laden microgels with channel geometry, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 147, 1, 2016.
10. Liu A.L., García A.J., Methods for Generating Hydrogel Particles for Protein Delivery, *Ann. Biomed. Eng.*, 44, 1946–1958, 2016.
11. Porras-Gómez M., Vega-Baudrit J., Núñez-Corrales S., Ampicillin-Loaded Chitosan Nanoparticles for In Vitro Antimicrobial Screening on *Escherichia coli*. In: *Chitin-Chitosan - Myriad Functionalities in Science and Technology*, Ed.: Dongre, R.S, InTech, Londra, UK, 245-259, 2018.
12. van Bavel, N., Issler, T., Pang, L., Anikovskiy, M., Prenner, E. J., A Simple Method for Synthesis of Chitosan Nanoparticles with Ionic Gelation and Homogenization. *Molecules*, 28 (11), 4328, 2023.
13. Kravanja G., Primožič M., Knez Ž., Leitgeb M., Chitosan-based (Nano)materials for Novel Biomedical Applications. *Molecules*, 24, 2019.
14. Zhang, H., Yang, J., Sun, R., Han, S., Yang, Z., Teng, L., Microfluidics for nano-drug delivery systems: From fundamentals to industrialization. *Acta Pharm. Sin. B.*, 13 (8), 3277–3299, 2023
15. Zamani, M. H., Khatibi, A., Tavana, B., Zahedi, P., Aghamohammadi, S., Characterization of drug-loaded alginate-chitosan polyelectrolyte nanoparticles synthesized by microfluidics. *J. Polym. Res.*, 30 (2), 1–11, 2023.
16. Khayati, M., Manjili, H. K., Soleimani, M., Hosseinzadeh, S., Akrami, M., Haririan, I., Tafti, S. H. A., Microfluidic synthesis of zoledronic acid loaded chitosan nanoparticles used for osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Int. J. Biol. Macromol.*, 234, 123056, 2023.
17. Pessoa A.C.S.N., Sipoli C.C., De La Torre L.G., Effects of diffusion and mixing pattern on microfluidic-assisted synthesis of chitosan/ATP nanoparticles, *Lab Chip*, 17, 2281–93, 2017.
18. Özdilek H., Mikrosistemlerde aljinat ve kitosan mikropartikül üretimi ve karakterizasyonu (Yüksek Lisans tezi), Gümüşhane Üniversitesi, Fen Bilim. Enstitüsü, Gümüşhane, 2020.
19. Kazan A., Hu X., Stahl A., Frerichs H., Smirnova I., Yesil-Celiktas O., An enzyme immobilized microreactor for continuous-flow biocatalysis of ginsenoside Rb1, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 96 (12), 3349-3357, 2021.
20. Ghelich P., Salehi Z., Mohajerzede S., Jafarkhani M., Experimental and numerical study on a novel microfluidic method to fabricate curcumin loaded calcium alginate microfibrils, *Can. J. Chem. Eng.*, 96 (11):2342–51, 2018.
21. Zhang Y., Zhao Q., Yuan D., Liu H., Yun G., Lu H., Li M., Guo J., Li W., Tang S.Y., Modular off-chip emulsion generator enabled by a revolving needle, *Lab Chip*, 20, 4592-4599, 2020.
22. Brás E.J.S., Chu V., Aires-Barros M.R., Conde J.P., Fernandes P., A microfluidic platform for physical entrapment of yeast cells with continuous production of invertase, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 92 (2), 334–41, 2017.
23. Hossain M.M., Rahman T., Low Cost Micro Milling Machine for Prototyping Plastic Microfluidic Devices, *Proceedings*, 2:707,1-4 2018.
24. Balakrishnan H.K., Badar F., Doeven E.H., Novak J.I., Merenda A., Dumée L.F., Loy J., Guijt R.M., 3D Printing: An Alternative Microfabrication Approach with Unprecedented Opportunities in Design, *Anal. Chem.*, 93, 350–366, 2021.
25. Sanka R., Lippai J., Samarasekera D., Nemsick S., Densmore D., 3DµF - Interactive Design Environment for Continuous Flow Microfluidic Devices, *Sci. Rep.*, 9 (1), 1–10, 2019.
26. Aşık M.D., Kaplan M., Çetin B., Sağlam N., Synthesis of iron oxide core chitosan nanoparticles in a 3D printed microfluidic device, *J. Nanopart. Res.*, 23 (3), 1-11, 2021.
27. Soheili S., Mandegar E., Moradikhah F., Doosti-Telgerd M., Javar H.A., Experimental and numerical studies on microfluidic preparation and engineering of chitosan nanoparticles, *J. Drug Delivery Sci. Technol.*, 61, 102268, 2021.
28. Gokce, Y., Cengiz, B., Yildiz, N., Calimli, A., Aktas, Z., Ultrasonication of chitosan nanoparticle suspension: Influence on particle size. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.*, 462, 75–81, 2014
29. Escareño N., Hassan N., Kogan M.J., Juárez J., Topete A., Daneri-Navarro A., Microfluidics-assisted conjugation of chitosan-coated polymeric nanoparticles with antibodies: Significance in drug release, uptake, and cytotoxicity in breast cancer cells, *J. Colloid Interface Sci.*, 591, 440-50, 2021.
30. Pittermannová A., Pittermannová P., Ruberová Z., Ruberová R., Zdražil A.Z., Bremond N., Bibette J., Stěpánek F., Stěp S., Stěpánek S., Microfluidic fabrication of composite hydrogel microparticles in the size range of blood cells, *RSC Adv.*, 6, 103532-40, 2016.
31. Nagarajan E., Shanmugasundaram P., Ravichandiran V., Vijayalakshmi A., Senthilnathan B., Masilamani K., Development and evaluation of chitosan based polymeric nanoparticles of an antiulcer drug Lansoprazole, *J. Appl. Pharm. Sci.*, 5 (4), 20–5, 2015.
32. Bramosanti M., Chronopoulou L., Grillo F., Valletta A., Palocci C., Microfluidic-assisted nanoprecipitation of antiviral-loaded polymeric nanoparticles, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.*, 5, 532, 369–76, 2017.
33. Alqahtani F.Y., Aleanizy F.S., Tahir E. E., Alquadeib B.T., Alsarra I.A., Alanazi J.S., Abdelhady H.G., Preparation, characterization, and antibacterial activity of diclofenac-loaded chitosan nanoparticles, *Saudi. Pharm. J.*, 1, 27 (1), 82–7, 2019.
34. Ma Z., Kim D., Adesogan A.T., Ko S., Galvao K., Jeong K.C., Chitosan Microparticles Exert Broad-Spectrum Antimicrobial Activity against Antibiotic-Resistant Micro-organisms without Increasing Resistance, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 8, 10700-9, 2016.
35. Sobhani Z., Samani S.M., Montaseri H., Khezri E., Nanoparticles of chitosan loaded ciprofloxacin: Fabrication and antimicrobial activity, *Adv. Pharm. Bull.*, 7, 427-32, 2017.