

ไมโครพาร์ทิเคิลพ่นแห้งชนิดยึดเกาะเชื่อมจากเพกติกพอลิแซ็กคาไรด์ของเปลือกทุเรียน
เพื่อการนำส่งโปรตีนทางจมูก



นางสาวธัญมาศ นุตวิวัฒน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชอุตสาหกรรม ภาควิชาวิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



SPRAY - DRIED MUCOADHESIVE MICROPARTICLES FROM PECTIC
POLYSACCHARIDE OF DURIAN FRUIT-HULLS
FOR NASAL PROTEIN DELIVERY

Miss Thanyamas Nutithawat

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Industrial Pharmacy

Department of Pharmaceutics and Industrial Pharmacy

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University


Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University


522233

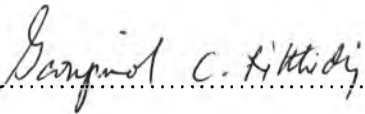
Thesis Title SPRAY - DRIED MUCOADHESIVE MICROPARTICLES
FROM PECTIC POLYSACCHARIDE OF DURIAN FRUIT-
HULLS FOR NASAL PROTEIN DELIVERY
By Ms. Thanyamas Nutithawat
Field of Study Industrial Pharmacy
Thesis Advisor Professor Garnpimol C. Ritthidej, Ph.D.


Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn
University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

.....Dean of the Faculty of
Pharmaceutical Sciences
(Associate Professor Pintip Pongpech, Ph.D)

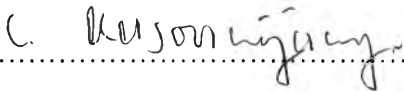
THESIS COMMITTEE

.....Chairman
(Associate Professor Poj Kulvanich, Ph.D)

.....Thesis Advisor
(Professor Garnpimol C. Ritthidej, Ph.D.)

.....Examiner
(Narueporn Sutanthavibul, Ph.D.)

.....Examiner
(Associate Professor Parkpoom Tengamnuay, Ph.D.)

.....External Examiner
(Chirasak Kusonwiriawong, Ph.D.)

วิทยุมาศ นุติวัฒน์ : ไมโครพาร์ทิเคิลพ่นแห้งชนิดยึดเกาะเชื่อมจากเพคติกพอลิแซ็กคาไรด์ของเปลือกทุเรียน
เพื่อการนำส่งโปรตีนทางจมูก (SPRAY - DRIED MUCOADHESIVE MICROPARTICLES FROM
PECTIC POLYSACCHARIDE OF DURIAN FRUIT-HULLS FOR NASAL PROTEIN DELIVERY) อ.
ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. ดร. กาญจน์พิมล ฤทธิเดช, 128 หน้า

วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อเตรียมไมโครพาร์ทิเคิลยึดเกาะเชื่อมเมือกของเพคติกพอลิแซ็กคาไรด์ (จากเปลือกทุเรียน, *Durio Zibethinus*) โดยใช้เทคนิคการพ่นแห้งสำหรับนำส่งโปรตีนทางจมูกเปรียบเทียบกับเพคตินที่มีขายในท้องตลาด น้ำหนักโมเลกุลของเพคติกพอลิแซ็กคาไรด์, ซิทรัสเพคติน ชนิดเมทรอกซิลขนาดสูงและต่ำ ที่มีขายในท้องตลาดได้แก่ 237,595, 246,198 และ 309,170 ตามลำดับ เครื่องพ่นแห้งขนาดเล็กใช้เพื่อเตรียมไมโครพาร์ทิเคิลโดยใช้แมนนิทอล, แลคโตส, มาลโตเดกซ์ทริน, คอลลอยคอลลิจีล้า และ/หรือ ฟลอยินไกลคอลลเป็นสารช่วยเพื่อให้ไมโครพาร์ทิเคิลมีลักษณะเป็นทรงกลม ปริมาณอนุภาคที่ผลิตได้อยู่ระหว่าง 28.87 – 55.60% ไมโครพาร์ทิเคิลเล็กขนาด 5 - 8 ไมครอนถูกผลิตขึ้นจากเพคติกพอลิแซ็กคาไรด์น้ำหนักโมเลกุลต่ำ ผงจากการพ่นแห้งมีความฟูและมีลักษณะเกือบเป็นทรงกลมผิวเรียบและจะยุบตัวลงเมื่ออุณหภูมิของการพ่นแห้งสูงหรืออัตราการเร็วการพ่นสารต่ำ เมื่อพิจารณาที่ความชื้น 75% ณ อุณหภูมิห้อง ปริมาณความชื้นในไมโครพาร์ทิเคิลจะเพิ่มขึ้น 12% ของน้ำหนักไมโครพาร์ทิเคิล ค่าการพองตัวและแรงการเกาะติดเชื่อมเมือกของไมโครพาร์ทิเคิลทดสอบโดยใช้การยึดเกาะในแผ่นเซลลูโลสอะซิเตรดที่ชุบด้วย 10% มิวซินมีค่า ระหว่าง 13-55 และ 4-14 นิวตัน ตามลำดับ การใส่โปรตีนบีเอสเอ เข้าไปในอนุภาคจะทำให้ขนาดอนุภาคลดลงในไมโครพาร์ทิเคิลที่เตรียมด้วยเพคตินทั้งเมทรอกซิลสูงและต่ำ แต่ไม่มีผลในอนุภาคที่เตรียมด้วยเพคติกพอลิแซ็กคาไรด์ อัตราส่วนระหว่างโปรตีนบีเอสเอและเพคตินมีผลเล็กน้อยต่อความเรียบของพื้นผิวไมโครพาร์ทิเคิล โดยอัตราส่วน 1:10 ดีกว่า 1:5 และ 1:3 ตามลำดับ ผลจากการฟอฟที่ไออาร์สามารถสรุปได้ว่าเพคติกพอลิแซ็กคาไรด์คือ เพคติน เมทรอกซิลสูง และเกิดสารประกอบคอมเพลกซ์ระหว่างโปรตีนบีเอสเอและเพคติน ผลจากการฟอซีดีพบว่าโปรตีนบีเอสเอมีโครงสร้างทุติยภูมิหลังกระบวนการพ่นแห้งแล้วไม่แตกต่างจากก่อนการพ่นแห้ง ความคงสภาพของโปรตีนที่ผ่านกระบวนการพ่นแห้งถูกยืนยันโดยใช้ เอสดีเอส เจล อีเลคโตรโฟลลซิส และพบว่าโปรตีนบีเอสเอยังคงสภาพที่อุณหภูมิของการพ่นแห้งที่ 120 องศาเซลเซียส ปริมาณโปรตีนที่ถูกกักเก็บในไมโครพาร์ทิเคิลที่ผลิตจากเพคตินทุกชนิดอยู่ระหว่าง 3.5-9.34% โปรตีนบีเอสเอที่ถูกปลดปล่อยจากไมโครพาร์ทิเคิลเพคตินเตรียมจากเพคตินน้ำหนักโมเลกุลต่ำมีค่าไม่เกินร้อยละ 60 ซึ่งอาจเกิดเนื่องมาจากน้ำหนักโมเลกุลที่สูงของเมทรอกซิลเลต เพคตินขนาดต่ำ ค่าความเป็นพิษที่ทดสอบโดยวิธีเอ็มทีที ของไมโครพาร์ทิเคิลที่เตรียมจากเพคติกพอลิแซ็กคาไรด์และแอสโรซิลมีค่าสูงกว่าเพคตินที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและน้ำหนักโมเลกุลต่ำ อย่างไรก็ตามค่าการมีชีวิตของเซลล์โดยใช้ ทริปแทนบลูเป็นตัวทดสอบหลังการทดสอบการซึมผ่านของไมโครพาร์ทิเคิลเพคตินทุกชนิดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญและไม่น้อยไปกว่าร้อยละ 75 ค่า TEER ของเซลล์เนื้อเยื่อจมูกชั้นเดียว (RPMI 2650) ที่ค่า 100-110 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ไม่เปลี่ยนแปลงหลังการทดสอบการซึมผ่าน จากผลการทดลองและจากรูปภาพของเซลล์ที่ย้อมสีด้วย เอฟไอทีซี พาลลอยดิน พบว่า ไมโครพาร์ทิเคิลเพคตินไม่เปิด ไรต์ จึงชั้น อย่างไรก็ตาม การซึมผ่านของโปรตีนบีเอสเอของไมโครพาร์ทิเคิลเพคตินทุกชนิดผ่านเซลล์เนื้อเยื่อจมูกชั้นเดียว (RPMI 2650) มีค่าอยู่ระหว่าง ร้อยละ 35-60 และเรียงลำดับเป็นเพคติก พอลิแซ็กคาไรด์ มากกว่าเมทรอกซิลเลต เพคตินขนาดสูง และมากกว่า เมทรอกซิลเลต เพคตินขนาดต่ำ

ภาควิชาวิทยาการเกษตรกรรมและเกษตรอุตสาหกรรม...ลายมือชื่อนิติศ.....ณัฐมน นุติวัฒน์
สาขาวิชา.....เกษตรอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่อ.....ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ปีการศึกษา.....2552.....

#5076567533 : MAJOR INDUSTRIAL PHARMACY

KEY WORD: PECTIC POLYSACCHARIDE / SPRAY-DRIED PROTEIN / NASAL DELIVERY

THANYAMAS NUTITHAWAT: SPRAY - DRIED MUCOADHESIVE MICROPARTICLES FROM PECTIC POLYSACCHARIDE OF DURIAN FRUIT-HULLS FOR NASAL PROTEIN DELIVERY. THESIS ADVISOR: PROF. GARNPIMOL C. RITTHIDEJ, Ph.D., 128 pp.

The purpose of this research was to prepare mucoadhesive microparticles of pectic polysaccharide (from durian rinds, *Durio Zibethinus*) by using spray drying technique for nasal protein delivery compared to commercial pectins. The molecular weight of pectic polysaccharide, commercial high and low methoxylated (HM, LM) citrus pectins 237,595, 246,198 and 309,170, respectively. A mini spray dryer was used to obtain these powder in formulation with mannitol, lactose, maltodextrin, colloidal silica and/or propylene glycol as filler and shaper. Production yields were between 28.87 – 55.60%. Small particle size of 5 - 8 μm was from low pectic polysaccharide concentration. All spray dried powders were bulky and almost spherical with smooth surface but collapsed at high inlet temperature and low feed rate. At 75% RH and room temperature, moisture content increased to about 12% of the powder weight. The swelling index and mucoadhesive force of powders when attached to the cellulose acetate membrane soaked with 10% mucin solution was 13 – 55 and 4 - 14 Newtons, respectively. BSA loading decreased the particle sizes of LM and HM pectin microparticles but had no effect on that of pectic polysaccharide. BSA:pectin ratio slightly affected the surface smoothness which was ranked 1:10 > 1:5 > 1:3. Data FTIR spectra could conclude that pectic polysaccharide was high methoxylated pectin and BSA-pectin complex formation was obtained. The results of CD spectra indicated that the secondary structure of BSA after spray drying process was not different from native BSA. The stability of spray dried protein was confirmed using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. The data indicated that BSA was conserved in spite of exposure to high temperature (120 °C) of spray dryer. Protein loadings of all types of pectin microparticles were between 3.5 – 9.34%. BSA released from spray dried LM pectin microparticle were not more than 60% probably due to high molecular weight. The cytotoxicity using MTT assay of microparticles with the formulation of pectic polysaccharide including Aerosil® was higher than HM and LM pectin. However, the cell viability using trypan blue after permeation experiment of all types of pectin microparticles was not significantly different and not less than 75%. TEER of nasal epithelial cell (RMPI2650) monolayer of 100-110 $\Omega\text{-cm}^2$ was not changed along the permeation experiment. These results and the photographs of cell staining FITC phalloidin indicated the pectins did not open the tight junction. Nevertheless, the BSA permeation from all types of pectin through nasal epithelial cell (RMPI2650) monolayer was ranged from 35 to 60% and ranked PP>HM>LM due the high molecular weight of LM pectin.

Department: Pharmaceutics and Industrial Pharmacy ..Student's signature: *Thanyamas N.*
 Field of study:.....Industrial Pharmacy.....Advisor's signature: *G.C. Ritthidej*
 Academic year: 2009

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude to my thesis advisor Professor Garnpimol C. Ritthidej, Ph.D. for the meaningful advices, invaluable guidance, and encouragement throughout my investigation. Her patience, kindness and understanding are also deeply appreciated.

I wish to express appreciation to Associated Professor Poj Kulwanich, Ph.D., Narueporn Sutanthavibul, Ph.D., Associate Professor Parkpoom Tengamnuay, Ph.D. and Chirasak Kusolwiriya Wong, Ph.D. to as members of the thesis committee for their valuable suggestion and comments.

The acknowledgement is given to all staffs of Faculty of Pharmaceutical sciences, Chulalongkorn University, especially the staff of the Department of Manufacturing Pharmacy, for their assistant support.

I am thankful to my lovely friends for their friendship and other people whose names have not been mentioned for their great help and support.

I wish to express appreciation for fully financial support of the research grant from Chulalongkorn University.

Ultimately, I would like to thank my father, my mother, my brother and my sister for their endless love, understanding, continuous support, care encouragement and cheerfulness which carried me through.

CONTENTS

	Pages
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	ix
LIST OF FIGURES.....	x
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xvi
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
II LITERATURE REVIEW.....	4
• Anatomy and physiology of nasal cavity.....	4
• Nasal drug delivery system.....	6
• Factors Influencing Nasal Drug Absorption.....	7
• Strategies to improve nasal absorption.....	8
• Permeability of the mucous membrane.....	8
• Mucoadhesive drug delivery.....	9
• Type of nasal dosage form and delivery system.....	13
• Delivery of pharmaceutical proteins.....	16
• Biopolymers.....	26
III EXPERIMENTAL.....	34
• MATERIALS.....	34
• METHODS.....	37
1. Molecular characterization of pectin powder.....	37
2. Preparation of spray dried pectic polysaccharide microparticles.....	37
3. Preparation of pectic polysaccharide BSA-loaded microparticles.....	38

	Pages
4. Characterization of pectic polysaccharide microparticles.....	39
5. Protein properties.....	42
6. <i>In vitro</i> study in cell culture.....	43
IV RESULTS AND DISCUSSION.....	46
1. Molecular weight of pectin powder.....	46
2. Preparation of spray dried pectic polysaccharide microparticles.....	48
3. Physical properties of spray dried pectic polysaccharide microparticles.....	48
4. Physical properties of BSA-loaded pectin microparticles.....	68
5. Chemical properties of BSA-loaded pectin microparticles....	80
6. Biopharmaceutical properties of BSA-loaded pectin microparticles.....	89
V CONCLUSIONS.....	96
REFERENCES.....	99
APPENDICES.....	109
APPENDIX A.....	110
APPENDIX B.....	114
APPENDIX C.....	123
APPENDIX D.....	124
VITA.....	128

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Formulation used to spray dry at the optimal condition.....	38
2	The molecular weight of three types of pectin using GPC.....	48
3	Effects of spray drying parameters on physical properties of pectic polysaccharide microparticles in the formulation of PP+MT+A+PG by using 0.2% PP.....	50
4	Effects of formulation on physical properties of spray dried pectic polysaccharide microparticles.....	55
5	Physical properties of BSA-loaded pectin microparticles.....	70
6	The percentage protein content on three types of pectin.....	83
7	Cell viability after permeation experiment of all types of pectin.....	95
1A	Calibration data of bovine serum albumin at 560 nm.....	110
2A	The percentage of recovery of bovine serum albumin.....	111
3A	Calibration data of bovine serum albumin at 560 nm in HBSS.....	112
4A	Calibration data of FD-4 at the excitation of 490 nm and emission of 515 nm.....	113

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	The anatomy of nasal cavity.....	5
2	Cell types of the nasal epithelium showing ciliated cell.....	5
3	Transportaion of substrates pass through mucous membrane.....	9
4	Powder bi-dose system.....	16
5	Protein structure.....	18
6	Chemical structure of dextran.....	27
7	Chemical structure of alginate.....	28
8	Chemical structure of chitosan.....	29
9	Chemical structure of pectin.....	30
10	Schematic presentation of isolation of water soluble polysaccharides from <i>Durio zibethinus</i> Murr Rinds.....	33
11	The relationship between pectic polysaccharide concentration and particle size of spray dried pectic polysaccharide powder.....	49
12	The effects of inlet temperature , and aspirator rate on particle size at feed rate of 3 ml/min.....	51
13	The effects of inlet temperature , and aspirator rate on particle size at feed rate of 5 ml/min.....	51
14	The effects of inlet temperature , aspirator rate and feed rate on production yields.....	52

Figure	Page
15 The relation between amount of Aerosil [®] flowability, moisture content and yield of pectic polysaccharide microparticles in the formulation of PL and various amount of Aerosil [®]	58
16 The relation between amount of Aerosil [®] and mucoadhesive force, swelling index , moisture adsorption of pectic polysaccharide microparticles in the formulation of PL and various amount of Aerosil [®]	59
17 The effect of formulation parameters on the percentage of moisture adsorption at the formulation of PL, PLA0.1, PLA0.12, PLA0.15, PLA0.2.....	61
18 The effect of formulation parameters on the percentage of moisture adsorption at the formulation of PM, PLA0.12, HM-PLA0.12, HM-PLA0.12, P+MT+A+PG.....	62
19 SEM photographs of pectic polysaccharide with maltodextrin, aerosil and propylene glycol microparticles exhibiting overall view.....	63
20 SEM photographs of pectic polysaccharide with maltodextrin, aerosil and propylene glycol microparticles exhibiting high enlargement.....	64
21 SEM photographs of spray dried microparticles from the preparing condition containing inlet temperature of 120 °C, 90% aspirator and feed rate of 5 ml/min with magnification of 3500.....	66

Figure		Page
22	SEM photographs of spray dried microparticles from the preparing condition containing inlet temperature of 120 °C, 90% aspirator and feed rate of 5 ml/min with magnification of 5000.....	67
23	Particle size and moisture adsorption of BSA loaded pectin microparticles.....	71
24	Mucoadhesive force and swelling index of BSA loaded pectin microparticles.....	72
25	SEM photographs of various BSA:pectic polysaccharide weight ratio compared to blank with magnification of 3500.....	74
26	SEM photographs of various BSA:pectic polysaccharide weight ratio compared to blank with magnification of 5000.....	75
27	SEM photographs of various BSA:HM pectin weight ratio compared to blank with magnification of 3500.....	76
28	SEM photographs of various BSA:HM pectin weight ratio compared to blank with magnify of 5000.....	77
29	SEM photographs of various BSA:LM pectin weight ratio compared to blank with magnification of 3500.....	78
30	SEM photographs of various BSA:LM pectin weight ratio compared to blank with magnification of 5000.....	79
31	FT-IR Spectra of pectin, unprocessed BSA and BSA loaded pectin microparticles.....	82
32	Release profiles of BSA from microparticles.....	85

Figure	Page
33 CD spectra of BSA-loaded pectin microparticles from three types of pectin at BSA : polymer ratio of 1:3, 1:5 and 1:10.....	87
34 SDS-PAGE bands.....	88
35 Percentage of nasal cell viability, co-incubated with BSA loaded pectin microparticles as a function of microparticle loading.....	90
36 Actin staining of the nasal cell monolayers after permeation experiments with microparticle formulation (400x).....	92
37 The permeation profiles of pectin microspheres at BSA:pectin ratio of 1:3 and FD-4 through nasal cell monolayer.....	93
38 Effect of microspheres on the TEER of nasal cell monolayers.....	94
1A Standard calibration curve of bovine serum albumin at 560 nm.....	110
2A Standard calibration curve of bovine serum albumin in HBSS at 560 nm.....	112
3A Standard calibration curve of FD-4 concentration at the excitation of 490 nm and emission of 515 nm.....	113
1B TGA scan of microparticle in the formulation of PP+MT+PG+A.....	114
2B TGA scan of microparticle in the formulation of PM.....	114
3B TGA scan of microparticle in the formulation of PL.....	115
4B TGA scan of microparticle in the formulation of PLA0.1.....	115
5B TGA scan of microparticle in the formulation of PLA0.15.....	116
6B TGA scan of microparticle in the formulation of PLA0.2.....	116
7B TGA scan of microparticle in the formulation of PLA0.12.....	117

Figure	Page
8B TGA scan of microparticle in the BSA:PP pectin ratio of 1:3.....	117
9B TGA scan of microparticle in the BSA:PP pectin ratio of 1:5.....	118
10B TGA scan of microparticle in the BSA:PP pectin ratio of 1:10.....	118
11B TGA scan of microparticle in the blank HM pectin.....	119
12B TGA scan of microparticle in the BSA:HM pectin ratio of 1:3.....	119
13B TGA scan of microparticle in the BSA:HM pectin ratio of 1:5.....	120
14B TGA scan of microparticle in the BSA/HM pectin ratio of 1:10.....	120
15B TGA scan of microparticle in the blank LM pectin.....	121
16B TGA scan of microparticle in the BSA/LM pectin ratio of 1:3.....	121
17B TGA scan of microparticle in the BSA/LM pectin ratio of 1:5.....	122
18B TGA scan of microparticle in the BSA/LM pectin ratio of 1:10.....	122
1D Particle size and size distribution of blank PP-LA0.12.....	123
2D Particle size and size distribution of BSA:PP ratio 1:10.....	123
3D Particle size and size distribution of BSA:PP ratio 1:5.....	123
4D Particle size and size distribution of BSA:PP ratio 1:3.....	124
5D Particle size and size distribution of blank HM-PLA0.12.....	124
6D Particle size and size distribution of BSA:HM ratio 1:10.....	124
7D Particle size and size distribution of BSA:HM ratio 1:5.....	125
8D Particle size and size distribution of BSA:HM ratio 1:3.....	125
9D Particle size and size distribution of blank LM-PLA0.12.....	125
10D Particle size and size distribution of BSA:HM ratio 1:10.....	126
11D Particle size and size distribution of BSA:HM ratio 1:5.....	126

Figure		Page
12D	Particle size and size distribution of BSA:HM ratio 1:3.....	126

LIST OF ABBREVIATIONS

GPC	=	gel permeation chromatography
° C	=	degree Celsius
CV	=	coefficient variation
e.g.	=	<i>exempli gratia</i> , 'for example'
et al.	=	<i>et alii</i> , 'and others'
FDA	=	Food and Drug Administration
g	=	gram
hrs	=	hours
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	milliliter
mm	=	millimeter
mm ²	=	square millimeter
m ³	=	cubic meter
mol	=	mole
M.W.	=	molecular weight
N	=	newton
nm	=	nanometer
pH	=	the negative logarithm of the hydrogen ion concentration
Ph. Eur	=	European Pharmacopoeia
r ²	=	correlation of determination
RH	=	relative humidity

SD	=	standard deviation
sec	=	second
µg	=	microgram
µl	=	microliter
µm	=	micrometer
w/v	=	weight by volume
HM	=	high methoxylated pectin
LM	=	low methoxylated pectin
PP	=	pectic polysaccharide
L	=	Lactose
M	=	mannitol
MT	=	maltodextrin
A	=	Aerosil®
PG	=	propylene glycol
BSA	=	fetal bovine serum
TGA	=	thermogravimetric analyzer
SI	=	swelling index
TPA	=	texture profile analysis
FT-IR	=	Fourier transform infrared spectroscopy
BCA	=	bicinchoninic acid
SDS-PAGE	=	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
FITC	=	fluorescein isothiocyanate
CD	=	circular dichroism

MTT	=	3-(4,5-dimethylthazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
DMSO	=	dimethyl sulfoxide
TEER	=	transepithelial electrical resistance
FD-4	=	fluorescein isothiocyanate labeled dextran molecular weight 4000
HBSS	=	Hank's balance salt solution
PBS	=	phosphate buffer saline solution
Å	=	Angstrom
Da	=	Dalton
KDa	=	Kilo Dalton
SEM	=	scanning electron microscope
SLS	=	sodium lauryl sulfate