



## Study of the antimicrobial effect of Amikacin encapsulated in Mesoporous Silica nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*

Somayeh Hosseini khomeirani<sup>1</sup>, Leila Ma'mani<sup>2</sup>, Khosro Issazade<sup>3</sup>

1. Department of Microbiology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran
2. Department of Nanotechnology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
3. Department of Microbiology, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran

### Article Information

#### Article history:

Received: 2016/06/13

Accepted: 2016/10/26

Available online: 2017/03/16

#### Article Subject:

Nanotechnology In Medicine

IJMM 2017; 11(1): 48-57

#### Corresponding author at:

Somayeh Hosseini khomeirani

Department of Microbiology,  
Rasht Branch, Islamic Azad  
University, Rasht, Iran

Tel: 0981344512198

#### Email:

s.hosseinikhomeiran@yahoo.com

### Abstract

**Background and Aim:** Amikacin, as an aminoglycoside antibiotic, is prescribed against a broad spectrum of bacteria. Limiting the use of this medicine includes the risk of microbial resistance, toxicity and short half-life in the body. One strategy to overcome the problem is the use of nanotechnology which can help to development of medicine delivery systems. This study was done in 2015 to assess the ability of mesoporous silica nanoparticles in improving the traditional formulation of amikacin.

**Materials and Methods:** SBA-15 was synthesized using hydrothermal method. The kinetics of medicine release from carriers, was investigated at 37 °C. The antimicrobial activity of formulations was conducted by disk diffusion method and broth dilution test on samples of bacteria.

**Results:** Nanoparticles SBA-15 with a hexagonal arrangement and pore diameter of 5 -100 nm, were able to encapsulation 47% of Amikacin. The kinetics of medicine release from the carrier at pH (5, 7.4 and 8.9) showed that in the first 24 hours, respectively, 10, 34.54 and 69% amikacin was released from the carriers. The rate of MIC of native amikacin and amikacin@SBA-15 of *S. aureus* were respectively, 1.66, 13.29 µg/mL and for *P. aeruginosa* were respectively 3.32, 26.59 µg/mL.

**Conclusions:** The results confirmed the stability of the encapsulated amikacin and high capacity SBA-15 to control the medicine release in the acidic environment of the stomach to the intestinal alkaline that made hopes to provide oral formulation of the medicine.

**KeyWords:** Amikacin, Antimicrobial effect, Mesoporous silica nanoparticles

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

### How to cite this article:

Hosseini khomeirani S, Ma'mani L, Issazade Kh. Study of the antimicrobial effect of Amikacin encapsulated in Mesoporous Silica nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and bacteria. Iran J Med Microbiol. 2017; 11 (1): 48-57

## مطالعه اثر ضد میکروبی آمیکاسین محصور شده در نانو ذرات مزومتخلخل سیلیکا در برابر باکتری و استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا

سمیه حسینی خمیرانی<sup>۱</sup>، لیلا مأمنی<sup>۲</sup>، خسرو عیسی زاده<sup>۳</sup>

۱. گروه میکروبی شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
۲. گروه نانو تکنولوژی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، کرج، ایران
۳. گروه میکروبی شناسی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

**زمینه و اهداف:** آمیکاسین یک آنتی بیوتیک آمینوگلیکوزیدی است که علیه طیف گسترده‌ای از باکتری‌ها تجویز می‌گردد. موارد محدودکننده استفاده از این دارو شامل: خطر مقاومت میکروبی نسبت به آن، سمیت و نیمه عمر کوتاه در بدن می‌باشد. یک استراتژی غلبه بر این مشکل استفاده از فناوری نانو است که می‌تواند به توسعه سیستم‌های دارورسانی کمک کند. این مطالعه در سال ۱۳۹۴ با هدف ارزیابی توانایی استفاده از نانوذرات مزومتخلخل سیلیکا در بهبود بخشیدن فرمولاسیون سنتی آمیکاسین انجام شد.

**مواد و روش کار:** SBA-15 با استفاده از روش هیدروترمال سنتز شد. سینتیک رهایش دارو از نانو حامل، در ۲۷ درجه سلسیوس بررسی شد. فعالیت ضد میکروبی فرمولاسیون‌ها بوسیله روش انتشار دیسک و آزمون رقت در برآش روی نمونه‌های باکتریایی انجام شد.

**یافته‌ها:** SBA-15 با آرایش شش ضلعی و قطر منافذ ۱۰۰-۵ نانومتر، قادر به محصورسازی ۴۷٪ آمیکاسین بود. سینتیک رهایش دارو در pH (۵، ۷/۴ و ۸/۹) نشان داد، در ۲۴ ساعت اول به ترتیب، ۱۰٪، ۳۴/۵۴٪ و ۶۹٪ آمیکاسین از نانو حامل منتشر شد. MIC آمیکاسین و آمیکاسین @ SBA-15 برای استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۱/۶۶، ۱۲/۲۹ و برای سودوموناس آئروژینوزا ۲/۲۲، ۲۶/۵۹ میکروگرم در میلی لیتر بود.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه حاکی از پایداری آمیکاسین پس از محصورسازی و ظرفیت بالای SBA-15 در کنترل رهایش دارو در محیط اسیدی معده تا قلیائی روده دارد که امیدواری‌هایی را در ارائه فرمولاسیون خوراکی این دارو ایجاد نموده است.

**کلمات کلیدی:** آمیکاسین، نانو ذرات مزوحفره سیلیکا، فعالیت ضد باکتریایی

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

تاریخچه مقاله  
دریافت: ۱۳۹۵/۰۳/۲۴  
پذیرش: ۱۳۹۵/۰۸/۰۵  
انتشار آنلاین: ۱۳۹۵/۱۲/۲۶  
موضوع:

نانوبیوتکنولوژی در پزشکی

IJMM 1396; 11(1): 48-57

نویسنده مسئول:

سمیه حسینی خمیرانی

گروه میکروبی شناسی، واحد رشت،  
دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

تلفن: ۰۹۸۱۳۴۴۵۱۲۱۹۸

پست الکترونیک:

s.hosseinikhmeiran@yahoo.com

### مقدمه

سیتوپلاسمی باکتریایی و برخی نقاط بدن انسان مانند سد خونی-مغزی، غشای ملتحمه چشم محدود است (۷-۳،۵).

مهارکننده‌های سنتز دیواره سلولی مانند پنی سیلین‌ها نفوذ و عملکرد آمینوگلیکوزیدها را افزایش می‌دهند به همین علت تجویز ترکیبی آن‌ها یک راه حل پیشنهادی جهت جلوگیری و یا به تأخیر انداختن مقاومت آنتی‌بیوتیکی هریک از داروها می‌باشد (۳). پیدایش روزافزون سویه‌های مقاوم به هرکدام از داروها احتمال خطر کاهش اثرگذاری و ایجاد سویه مقاوم به

آمیکاسین یک آنتی بیوتیک نیمه سنتتیک از رده D خانواده آمینوگلیکوزیدها می‌باشد که از استیل‌اسیون کانامایسین A به همراه نمک سولفات به دست می‌آید (۱). این آنتی‌بیوتیک جهت درمان عفونت‌های مختلف ناشی از باکتری‌های گرم منفی و برخی گرم مثبت‌ها تجویز می‌گردد (۱،۲).

آمینوگلیکوزیدها به علت داشتن ساختار شیمیایی قطبی، قابلیت حل شدن در محلول‌های ارگانیک را ندارند و به همین جهت عبور و نفوذ این داروها از غشاهای حاوی چربی مانند غشاء

داروی دیگر را در پی خواهد داشت. ساختار آمیکاسین در محیط‌های با pH اسیدی و محیط‌های با اسمولاریته بالا غیرفعال خواهد شد، لذا قابلیت تجویز دارو به فرم خوراکی به علت اثر تخریبی محیط اسیدی معده تضعیف می‌گردد. درحالی‌که اثر ضد باکتریایی آن‌ها در pH قلیایی مانند محیط رود باریک افزایش می‌یابد (۴،۱۳). تزریق این آنتی بیوتیک در درمان عفونت‌ها به علت افت و خیز سریع غلظت سرمی آن موجب افزایش تعداد دفعات در فواصل زمانی کوتاه می‌شود (۷-۵). از سوی دیگر مصرف طولانی‌مدت آن منجر به عوارض جانبی سیستمیک از جمله سمیت شنوایی، کلیوی، اعصاب مرکزی و واکنش‌های حساسیت خونی می‌گردد (۱۲-۸). این مسائل سبب ایجاد انگیزه‌ای در اعمال تغییرات مناسب در راستای بهینه نمودن فرمولاسیون فرآورده‌های دارویی گردیده است. با توجه به رویکرد جدیدی که نسبت به استفاده از سیستم‌های حامل دارویی به‌ویژه نانو حامل‌ها ایجاد شده است، به‌کارگیری این سیستم‌ها جهت تحویل کنترل‌شده آنتی بیوتیک‌ها به بافت هدف طی درمان، موجب بهبود کارایی و کاهش عوارض جانبی ناشی از مصرف دارو و همچنین ممانعت از ایجاد مقاومت دارویی خواهد شد. از جمله نانو حامل‌های دارورسان برای اصلاح و بهبود فرمولاسیون داروی آمیکاسین می‌توان به لیپوزوم‌ها، نانو ذرات لیپیدی جامد، سیلیکات‌ها و آلومینوسیلیکات اشاره نمود (۲۰-۱۴). سامانه‌هایی مثل نانو ذرات لیپیدی جامد و لیپوزوم‌ها به دلیل هزینه بالا، کارایی کم در محصورسازی داروها و مولکول‌های زیستی و همچنین استفاده از حلال‌های سمی، نیازمند جایگزینی با سامانه‌هایی بودند که هزینه اندک داشته و قادر به بهبود در فرمولاسیون داروهای هیدروفوب، پپتیدها و پروتئین‌ها باشند و از طرفی به تغییر در ساختار دارو و فعالیت آن در حین بارگیری نیاز نداشته نباشد. سامانه‌های دارورسانی متخلخل سیلیکایی با تأمین این ویژگی‌ها و کارایی بالای ۹۵٪ نسبت به سامانه‌های سنتی، توانمندی‌های خود را اثبات کردند (۲۱).

نانو ذرات مزوحفره سیلیکایی، حامل‌های جدیدی در سامانه‌های نوین دارورسانی هستند و به‌عنوان حامل چندین داروی مختلف به‌کاررفته‌اند تا عوارض جانبی سیستمیک ناشی از مصرف دارو را از طریق تحویل هدفمند تا حد امکان کاهش دهند (۲۲،۲۸). مطالعات بر روی این حامل‌ها نشان داده است که نسبت بالای سطح به حجم، قابلیت تنظیم حرارت و پایداری در مقابل تغییرات حرارتی، تنش‌های مکانیکی، pH و هیدرولیز،

کپسوله کردن مناسب و عدم ترشح دارو به بیرون تا رسیدن به محل هدف، داشتن ظرفیت بالا برای ایجاد تغییرات بر سطح آن‌ها مانند عامل دار کردن و یا به کار بردن تکنولوژی جدید استفاده از درپوش بر سطح آن‌ها، امیدواری‌هایی را در زمینه‌های تحویل مؤثر و هدفمند دارو نسبت به سایر نانو ذرات، به‌ویژه نانو ذرات پلیمری و لیپیدی ایجاد می‌کند (۲۳،۲۴،۲۷). بررسی‌ها حاکی از آن است که قابلیت تنظیم ذرات از محدوده ۵۰ تا ۳۰۰ نانومتر منجر به تسهیل فرآیند اندوسیتوز و جلوگیری از سمیت سلولی آن‌ها شده است. نتایج مطالعات سلولی نشان می‌دهد که حتی اگر هیچ گیرنده‌ای بر سطح سلول وجود نداشته باشد هم، جذب نانو ذرات مزوحفره سیلیکا از طریق مسیر اندوسیتوز پوشیده از کلاترین و از طریق پینوسیتوز اتفاق می‌افتد (۲۳،۲۴).

پژوهش حاضر باهدف بررسی پتانسیل نانو ذرات سیلیکایی مزوحفره (مطالعه موردی SBA-15) در محصورسازی و رهایش کنترل‌شده آمیکاسین و مقایسه فعالیت ضد میکروبی نانوفرمولاسیون جدید دارو نسبت به فرم رایج بالینی آن بر علیه دو باکتری سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط برون تنی، سعی در ارائه نانو حاملی مناسب در بهینه‌سازی فرمولاسیون دارو داشته است.

#### مواد و روش‌ها

آمیکاسین دی سولفات از شرکت سیگما-آلدریج (آلمان) خریداری شد. استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC1113) و سودوموناس آئروژینوزا (PTCC1558) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردیدند. دیگر مواد مصرفی نیز با درجه خلوص بالا از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

#### تهیه نانو ذرات مزوحفره سیلیکایی SBA-15

نانو ذرات مزوحفره سیلیکایی SBA-15 طبق روش ارائه‌شده در گزارش‌های قبلی با اندکی تغییرات جزئی تهیه شد (۲۹). ابتدا مقدار مشخصی از تترااتیل ارتوسیلیکات (Tetraethyl orthosilicate) به محلول کاپلیمر پلارونیک (Pluronic P123) که با افزودن هیدروکلریک اسید، pH حدود ۴ تنظیم شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس کاملاً یکنواخت گردید و اجازه داده شد تا به مدت ۲۴ ساعت در همان دما باقی بماند. در ادامه مخلوط به‌دست‌آمده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. در مرحله بعد نانو ذرات به‌دست‌آمده توسط خلأ صاف‌شده و کاملاً توسط

SBA-15 به آن اضافه گردید و سوسپانسیون حاصل به مدت ۲۰ دقیقه توسط حمام اولتراسونیک (DIY-چین) پراکنده گردید. سپس به مدت ۴۸ ساعت تحت هم زدن مداوم در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شد. پس از طی این مدت محتویات بالن در ۶۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ و رسوب حاصل جدا شد و در دمای اتاق خشک گردید. غلظت آمیکاسین باقی مانده در محلول پس از سانتریفیوژ، با استفاده از اسپکتروسکوپی UV-Vis در طول موج ۵۶۵ نانومتر خوانده شد و با مقایسه با نمودار کالیبراسیون غلظت داروی اتصال نیافته به دست آمد و در نهایت مقدار بهره محصورسازی آمیکاسین در نانو حامل SBA-15 با استفاده از معادله زیر تعیین شد.

$$\text{بهره محصورسازی (\%)} = \frac{\text{مقدار آمیکاسین بارگذاری شده} - \text{کل آمیکاسین به کار رفته}}{\text{مقدار کل آمیکاسین به کار رفته}} \times 100$$

با یک سوآب کتان استریل، بر روی محیط گسترش داده شد. چاهک‌های به قطر ۶ میلی‌متر در محیط آگار ایجاد شد. هر چاهک برای بررسی یک نوع فرمولاسیون گزینش شد. به هر کدام از چاهک‌ها ۵۰ میکرولیتر از فرمولاسیون‌های دارو شامل؛ فرم آزاد آمیکاسین (۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، فرمولاسیون آمیکاسین @ مزوحفره سیلیکا SBA-15 (۸۵۱/۰۶۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با در نظر گرفتن نسبت تغذیه‌ای ۴۷٪ آمیکاسین پس از محصورسازی، معادل ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آمیکاسین آزاد است) و نانو ذرات مزوحفره سیلیکا فاقد آنتی بیوتیک (۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تزریق شد. پلیت‌ها ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند و مقایسه هاله عدم رشد باکتری ناشی از فعالیت فرمولاسیون‌های دارو برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد باکتری (MIC) برای آمیکاسین در فرم آزاد و فرمولاسیون جدید دارو از روش تهیه رقت در برات (ماکرودیالوژن) در محیط کشت مولر هینتون برات استفاده شد. غلظت‌های متنوع فرمولاسیون‌های دارو طوری انتخاب شدند که محدوده غلظتی مؤثر برای باکتری‌های مورد سنجش در برداشته باشند. سری رقت‌ها برای هر کدام از فرم‌های آزاد آمیکاسین و آمیکاسین @ SBA-15 شامل ۱،۳۱/۰۶۳، ۴،۲۵/۵۳، ۱۰،۶/۲۱۲، ۳۸،۷۶/۱۰۶، ۵۳/۱۹، ۲۶/۵۹، ۱۳/۲۹، ۶/۶۴، ۳/۳۲، ۱/۶۶، ۰/۸۳، ۰/۴۱ و ۰/۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر

آب دیونیزه، دی اتیل اتر و استون (از هر کدام ۱۰ میلی‌لیتر) به‌طور جداگانه و سریع شستشو و در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس خشک شدند. سپس به مدت ۶ ساعت در دمای ۵۵۰ درجه سلسیوس کلسینه گردید. بدین ترتیب در این دما سورفاکتانت به‌کاررفته حذف شده و نانو ذرات مزوحفره SBA-15 حاصل شد.

در این مرحله پودر بسیار نرم نانو ذرات مزوحفره سیلیکایی SBA-15 جهت تأیید ساختار توسط تکنیک‌های XRD، TEM، FTIR در جای خشک نگهداری شد.

### بارگذاری آمیکاسین در SBA-15

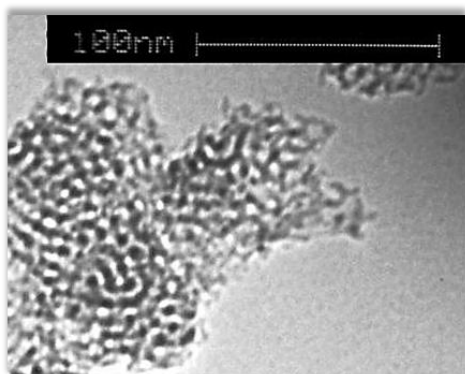
محلول آمیکاسین دی سولفات با غلظت ۳ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر آب دی یونیزه تهیه شد. ۲۰ میلی‌گرم پودر نانوذره

### بررسی سینتیک رهایش دارو از نانو حامل

برای مطالعه رهایش آمیکاسین از نانوپارتیکل‌ها، مقدار مشخصی از پودر خشک آمیکاسین محصور در نانو حامل‌ها را به کیسه دیالیز منتقل نموده و سپس در داخل ۱۰ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات سالین (PBS) با (pH برابر ۵، ۷/۴ و ۸/۹) قرار داده شدند. نمونه‌ها در دستگاه شیکر-انکوباتور (ویژن، کره جنوبی) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، قرار داده شد و در فواصل زمانی معین از محلول نمونه برداری شده و با همان حجم از بافر تازه جایگزین شد. غلظت دارو در نمونه‌ها با استفاده از اسپکتروسکوپی UV-Vis (مدل SQ2800-یونیکو، آمریکا) در طول موج ۵۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

### بررسی اثر ضد باکتریایی

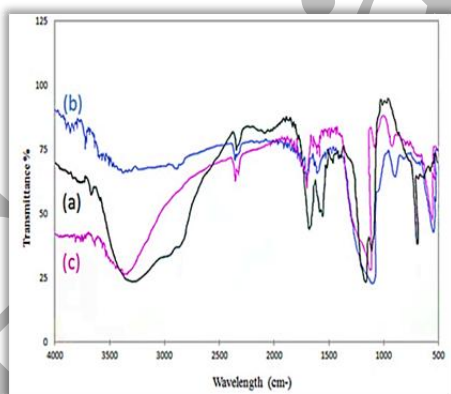
در این مطالعه، از کشت ۲۴ ساعته سویه استاندارد باکتری سودوموناس آئروژینوزا (PTCC1558) و استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC1113) در سرم فیزیولوژی استریل سوسپانسیونی معادل با کدورت ۰/۵ مک فارلند تهیه شدند. در این شرایط تعداد باکتری‌ها حدود  $10^8 \times 1/5$  CFU/mL بودند. سنجش حساسیت میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا با استفاده از روش نفوذ انتشاری طبق دستورالعمل (CLSI) (Clinical and laboratory standards institute) انجام گرفت (۳۰). ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی، بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار چکانیده شد و



شکل ۱: الگوی میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) ساختار شش‌وجهی نانو ذرات مزو متخلخل SBA-15

آنالیز FT-IR به منظور شناسایی گروه‌های آلی قرار گرفته روی سطح مزوحفره انجام شد. جذب مادون قرمز مواد نانو حفره‌های SBA-15 مطابق نمودار ۲ نمایان شده است.

پیک قوی در ناحیه‌های  $1100\text{ cm}^{-1}$  و  $814\text{ cm}^{-1}$  مربوط به کشش نامتقارن و متقارن Si-O-Si می‌باشد. باند ناحیه  $576\text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش خمشی Si-O می‌باشد. باند ظاهر شده در ناحیه  $3500\text{ cm}^{-1}$  مربوط به باندهای کششی گروه‌های O-H مربوط به سیلانول آزاد است که در هر دو گروه مواد نانو متخلخل سیلیکایی دیده شد. پیک‌های ظاهر شده در طیف آمیکاسین @ مزوحفره سیلیکا SBA-15 کاملاً با پیک‌های آمیکاسین خالص قابل مقایسه و تأییدکننده بارگذاری دارو در نانو حامل‌ها بود.

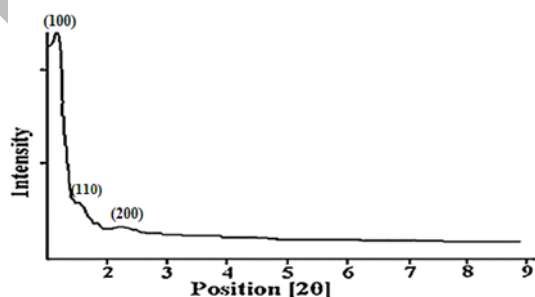


نمودار ۲: الگوی FTIR مربوط به (a) آمیکاسین، (b) SBA-15 و (c) آمیکاسین @ مزوحفره سیلیکا

بود. از رقت‌های سریالی به لوله‌ها اضافه گردید، سپس به همه لوله‌ها ۱ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هینتون براث حاوی تقریباً  $10^8 \times 1/5$  CFU/mL تعداد باکتری، تلقیح شد. در این آزمایش کنترل مثبت (رشد): لوله حاوی محیط کشت و باکتری و کنترل منفی: محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک فاقد باکتری بود. هر کدام از آزمایش‌های به‌منظور تأیید ۳ بار تکرار شد. تمامی نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، گرمخانه گذاری شدند. آخرین لوله‌ای که در آن هیچ‌گونه کدورتی مشاهده نشد، به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

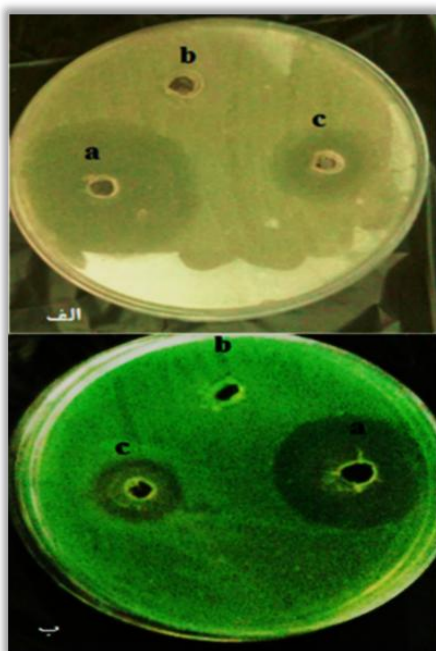
الگوی پراش اشعه X نانو ذرات SBA-15 در زوایای پایین (۰-۹) انجام شد. با توجه به نمودار ۱، بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از پراش اشعه ایکس (XRD) این ترکیب دارای سه بازتاب براگ، شامل یک پیک با شدت بالا (۱۰۰) و دو پراش با شدت کمتر از صفحه‌های کریستالی (۱۱۰) و (۲۰۰) بود. مشاهده سه پیک مذکور بیانگر ساختار مزوحفره ای دوبعدی- شش‌وجهی SBA-15 است که مشخصه‌ای از تأیید سنتز برای این نوع از مواد مزوساختار می‌باشد (۳۳، ۳۴).



نمودار ۱: الگوی پراش اشعه X نانو ذرات SBA-15

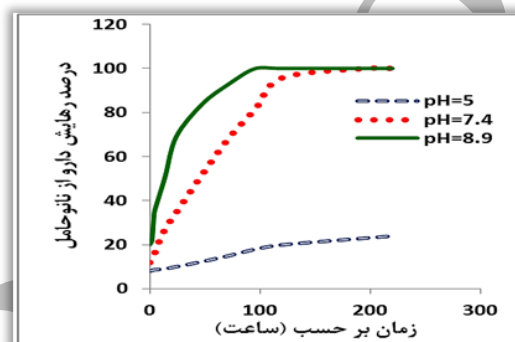
الگوی ریخت‌شناسی نانو ذرات به‌دست‌آمده توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) مورد شناسایی و تعیین ساختار گرفت. با توجه به شکل ۱، نانو ذرات SBA-15 از نظر شکل ظاهری ساختاری شش‌وجهی و در ابعاد زیر ۱۰۰ نانومتر بودند.





شکل ۱: ناحیه مهار رشد (الف) / استافیلوکوکوس اورئوس (ب) و (PTCC1113) و (ب) سودوموناس آئروژینوزا (PTCC1558) توسط . (a) آمیکاسین به فرم آزاد (b). نانو ذرات فاقد آنتی بیوتیک. و (c) آمیکاسین @ مزوحفره سیلیکا SBA-15

نتایج حاصل از تعیین کارایی محصورسازی نشان داد میزان آمیکاسین بارگذاری شده در داخل نانو ذرات مزوحفره سیلیکا SBA-15 برابر ۴۷ درصد در مقایسه با میزان اولیه آمیکاسین به کاررفته در هنگام محصورسازی است. با توجه به نمودار ۳، درصد رهایش تدریجی دارو از آمیکاسین @ مزوحفره سیلیکا SBA-15 در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در محلول بافر فسفات سالین pH شبیه سازی شده، (۵ = معده)، (۷/۴ = خون) و (۸/۹ = روده باریک)، مشاهده گردید که در ۲۴ ساعت نخست به ترتیب ۱۰، ۲۴/۵۴ و ۶۹٪ رهایش یافته است.



نمودار ۳: رهایش آمیکاسین از نانو حامل SBA-15 در محلول بافر فسفات سالین با pH: ۵، ۷/۴، ۸/۹، در بازه زمانی ۲۲۰ ساعت و دمای ۳۷ درجه سلسیوس

### بحث

کپسوله کردن آمیکاسین در حامل‌های دارویی می‌تواند یک‌راه حل پیشنهادی جهت حفظ سطح سرمی دارو، افزایش قابلیت تحمل بیمار نسبت به دوز دریافتی دارو و کاهش عوارض جانبی ناشی از مصرف دارو بر روی بافت‌های مناطق مختلف بدن گردد. در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی برای بارگذاری این دارو در حامل‌های مختلف جهت بهینه‌سازی فرمولاسیون آن صورت گرفته است.

در پژوهش حاضر با به کارگیری نانو حامل مزوحفره سیلیکا نوع SBA-1 در محصورسازی آنتی بیوتیک آمیکاسین، سعی در بهبود فرمولاسیون سنتی دارو و کاهش موارد محدودکننده استفاده از آن طریق کپسوله کردن دارو و رهایش هدفمند آن شد.

در مطالعه ما میزان محصورسازی آنتی بیوتیک آمیکاسین در نانو ذرات مزو متخلخل سیلیکا (SBA-15) ۴۷٪ در مقایسه با میزان اولیه آمیکاسین بکار رفته در هنگام محصورسازی بود.

با توجه به شکل ۱ نتایج حاصل از بررسی قطر هاله عدم رشد آمیکاسین در فرم آزاد و آمیکاسین @ مزوحفره سیلیکا SBA-15 نشان داد که فرم آزاد دارو در مقایسه با فرم نانویی آن اثر ضد میکروبی بیشتری در برابر سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس داشت. همچنین در بررسی اثر ضد میکروبی نانو ذرات مزوحفره سیلیکا SBA-15 فاقد آنتی بیوتیک بر روی رشد باکتری مشخص شد که این نانو ذرات به تنهایی هیچ فعالیت ضد باکتریایی در برابر باکتری‌های فوق ندارند. نتایج حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد بوسیله محلول آزاد آمیکاسین و آمیکاسین @ مزوحفره سیلیکا SBA-15 بر علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۱/۶۶ و ۱۳/۲۹ میکروگرم در میلی لیتر و برای سودوموناس آئروژینوزا برابر ۳/۳۲ و ۲۶/۵۹ میکروگرم در هر میلی لیتر بود.

رادیکال‌های آزاد و تخریب لیپید و ماده فعال دارویی افزایش یابد (۳۱،۳۲).

یکی از مشکلاتی که در تجویز خوراکی آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی مانند آمیکاسین وجود دارد، ناپایداری ساختار دارو نسبت به شرایط اسیدی معده می‌باشد درحالی‌که فعالیت ضد میکروبی آنتی‌بیوتیک تحت شرایط قلیائی افزایش می‌یابد (۷-۵). با توجه به نتایج سینتیک رهایش دارو در این مطالعه، کپسوله نمودن آمیکاسین در نانو حامل SBA-15 می‌تواند راه حلی پیشنهادی جهت حفاظت ساختار دارو از شرایط اسیدی محیط معده، عبور از آن و رهایش دارو در محیط روده باریک باشد.

با توجه به نتایج حاصل از میزان رهایش آمیکاسین از سطح آمیکاسین @ مزوحفره سیلیکا SBA-15 در ۲۴ ساعت نخست در pH های ۵، ۷/۴، ۸/۹ به ترتیب برابر با ۱۰٪، ۳۴/۵۴٪ و ۶۹٪ به دست آمد. میزان رهایش دارو در شبیه‌سازی pH قلیایی روده باریک نسبت به شرایط اسیدی معده به‌شدت افزایش نشان داده است. کندترین رهایش مربوط به pH برابر ۵ (محیط معده) و سریع‌ترین رهایش در pH برابر ۸/۹ (محیط روده باریک) مشاهده شد.

بنابراین می‌توان از این نانو ذرات به‌عنوان نانو حاملی هوشمند با رهایش pH کنترل که توانایی حفاظت از ساختار داروی آمیکاسین جهت عبور دارو از شرایط اسیدی معده و انتقال و جذب آن در روده به‌منظور درمان عفونت‌ها استفاده نمود. علاوه بر این، ساختار مزوحفره هیچ تغییری پس از انتشار این دارو نمی‌کند که این نشان می‌دهد که ساختارهای مزوحفره برای بارگیری و آزادسازی داروها با ثبات هستند.

در بررسی‌های گذشته در رابطه با رهایش آمیکاسین از نانو حامل‌های مختلف، رهاسازی آمیکاسین از لیپوزوم‌ها در حضور پلاسما طبیعی انسان تحت شرایط آزمایشگاهی طی ۲۴ ساعت در pH=۷/۴ حدود ۲/۵٪ بود (۱۵). در مطالعه حاضر میزان رهایش دارو از SBA-15 در سیال بافر فسفات سالین با pH=۷/۴ طی ۲۴ ساعت نخست، در حدود ۳۴/۵۴٪ ثبت شد.

در مقایسه سرعت رهایش آمیکاسین از نانو حامل SLNs، در pH=۷/۴ و دمای ۲۵ درجه سلسیوس طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب در حدود ۱۲٪، ۲۵٪ و ۳۳٪ را نشان داد (۱۷،۱۸). در صورتی‌که طی مطالعه ما میزان رهایش آمیکاسین از

نانو حامل لیپوزوم طی بررسی Mugabe و همکارانش، قادر به محصور نمودن  $1/17 \pm 29/27\%$  آمیکاسین در خود نسبت به مقدار اولیه داروی بکار گرفته در هنگام محصورسازی بودند (۱۴).

در مطالعه Mirzaee و همکارانش، میزان محصورسازی آمیکاسین در نانو حامل لیپوزوم در مقایسه با کل داروی بکار رفته در هنگام محصورسازی  $1/14 \pm 24/36\%$  به دست آمد (۱۵).

میزان کارایی محصورسازی آمیکاسین توسط نانو ذرات لیپیدی جامد (Solid lipid nanoparticles (SLNs)، طی مطالعه Ghaffari و همکارانش  $4 \pm 87\%$  برآورد شد (۱۷،۱۸).

طی مطالعه Berger و همکارانش، میزان بارگیری آمیکاسین هیدرات در نانو حامل سیلیکات به میزان  $39/5\%$  و میزان آن در نانو حامل عامل دار شده با آلومینیوم (آلومینوسیلیکات)  $23\%$  نسبت به میزان اولیه دارو در هنگام بارگذاری بود (۲۰).

مقایسه قابلیت نانو حامل‌های لیپوزوم، نانو ذرات لیپیدی جامد و مزوحفره سیلیکات و آلومینوسیلیکات با نانو ذرات SBA-15 مطالعه ما در محصورسازی آمیکاسین، حاکی از آن است که نانو حامل SBA-15 نسبت به لیپوزوم و نانو ذرات مزوحفره سیلیکات و آلومینوسیلیکات توانایی بیشتری در کپسوله کردن دارو داشتند (۲۰-۱۴).

نانو ذرات SBA-15 به علت داشتن ساختاری متخلخل، نسبت سطح به حجم بیشتری در مقایسه با نانو حامل‌های لیپوزوم دارند، در نتیجه قابلیت محصور نمودن مقادیر بیشتری از آنتی‌بیوتیک آمیکاسین را نسبت به آن‌ها دارند. برقراری پیوندهای هیدروژنی بین گروه سیلانول در حفرات نانو ذرات SBA-15 با گروه‌های آمین آزاد موجود در ساختار آنتی‌بیوتیک آمیکاسین موجب اتصال و محصورسازی دارو در کانال‌های شش‌وجهی نانو حامل گردیده است. علاوه بر این، سامانه‌هایی با ماهیت آب‌گریزی مثل لیپوزوم تا و نانو ذرات لیپیدی جامد به علت داشتن خصوصیتی مشابه با فسفولیپیدهای غشای سلولی در اتصال به آن‌ها بسیار کارآمد می‌باشند، اما هزینه بالا به هنگام ساخت، استفاده از حلال‌های سمی و تغییر ساختار شبکه بلوری لیپید در طول نگهداری نانو ذرات، پدیده تشکیل ژل و استفاده از روش هم‌وزن‌نایز داغ و به‌کارگیری از فراصوت که روش‌های رایج در تهیه لیپوزوم‌ها و نانو ذرات لیپیدی جامد هستند، امکان تولید

موجب اثر باکتریایی کمتر نانو فرمولاسیون آمیکاسین در مقایسه با داروی خالص شده است.

مشابه نتایج مطالعه حاضر در بررسی فعالیت ضد میکروبی آمیکاسین لیپوزومی نسبت به فرم خالص آنتی بیوتیک بر علیه سودوموناس آئروژینوزا (ATCC 27853)، اشیریشیاکلی (ATCC 25922)، انتروکوکوس فکالیس (ATCC 29212) و استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 29213) نیز مشاهده شد که آمیکاسین لیپوزومی در برابر همه باکتری MIC کمتری در مقایسه با آمیکاسین خالص داشته است (۱۵).

مطالعه Ghaffari و همکارانش بر روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا (ATCC9027)، میزان MIC و MBC آمیکاسین محصور در SLNs برای هر دو فرم قبل و بعد از لئوفیلزاسیون، ۱۶ و ۸ میکروگرم/ میلی لیتر در مقابل ۸ و ۴ میکروگرم/ میلی لیتر بود. آمیکاسین آزاد بود. در واقع به علت رهائش تدریجی دارو، نانوفرمولاسیون آمیکاسین اثر ضد میکروبی کمتری را نسبت به فرم خالص دارو نشان داد که با نتایج بررسی فعالیت ضد میکروبی فرمولاسیون دارویی مطالعه حاضر همخوانی داشته است (۱۷، ۱۸).

در این پروژه نانو ذرات مزوحفره سیلیکایی SBA-15، تهیه شده و داروی آمیکاسین درون حفرات آن بارگذاری شد. در گام بعدی ساختار نانو ذرات قبل و بعد از بارگذاری دارو به طور کامل تعیین ساختار شده و میزان بارگذاری برابر با ۴۷٪ تعیین شد. نتایج این مطالعه حاکی از پایداری دارو و عملکرد فارماکوکینتیکی مؤثر آن پس از محصورسازی در نانو ذرات SBA-15 می باشد. از سوی دیگر ظرفیت بالای SBA-15 در کنترل رهائش آنتی بیوتیک آمیکاسین در محیط اسیدی معده ها قلیایی روده امیدواری هایی را در ارائه فرمولاسیون خوراکی این دارو ایجاد نموده است. در حقیقت در اثر برهمکنش بین سطح و داخل نانوحفرات و آمیکاسین، شاهد رهائش تدریجی آمیکاسین از سطح نانو حامل هستیم و همچنین به دلیل اینکه برهمکنش از نوع پیوند هیدروژنی است با تغییر pH میزان رهائش قابل تنظیم و کنترل می باشد از سوی دیگر می توان با عامل دار نمودن این نانو حامل ها درصد محصورسازی دارو را افزایش داد. به طور کلی می توان نتیجه گیری نمود که نانو حامل مزوحفره سیلیکایی با توجه به زیست سازگار بودن و ویژگی های منحصر به فرد فیزیکوشیمیایی به عنوان یک نانو حامل مؤثر در بارگذاری و رهائش تدریجی آمیکاسین عمل نماید. امید است که با مطالعات بیشتر، سیستم دارورسانی مبتنی بر نانو حامل مزومتخلخل

نانو حامل SBA-15 در pH=۷/۴ در دمای ۳۷ درجه سلسیوس طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۳۴/۵۴٪، ۵۲/۱۳٪ و ۶۸/۵۴٪ بود. در pH=۵، به ترتیب ۱۰٪، ۱۲/۳۶٪، ۱۵٪ و در pH=۸/۹ عبارتند از ۶۹٪، ۸۴٪ و ۹۳٪ ثبت گردید.

در مطالعه Berger و همکارانش، میزان رهائش دارو فقط در pH برابر ۷/۴ بررسی شد که نتایج نشان داد، میزان رهائش در ۲۴ ساعت نخست به ترتیب ۷۴٪ و ۶۹٪ برای نانو حامل حفره ای ساده و عامل دار شده با آلومینیوم بوده است (۲۸).

مقالات قبلی بررسی پروفایل رهائش دارو از نانو حامل ها را صرفاً در pH برابر ۷/۴ انجام دادند، در حالی که در بررسی های انجام شده توسط تیم تحقیقاتی ما رهائش دارو از نانو حامل SBA-15 در pH های ۵، ۷/۴، ۸/۹ انجام شد. دمای انتخابی بررسی رهائش دارو در مطالعه حاضر، (۳۷ درجه سلسیوس) دمای شبیه سازی شده بدن انسان بوده است.

در بررسی فعالیت ضد میکروبی آنتی بیوتیک خالص و آمیکاسین @ مزوحفره سیلیکا SBA-15 بر علیه دو باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۱/۶۶ و ۱۳/۲۹ میکروگرم در میلی لیتر و برای سودوموناس آئروژینوزا برابر ۳/۳۲ و ۲۶/۵۹ میکروگرم در هر میلی لیتر بود. با توجه به رهائش ۳۴/۵۴ درصدی دارو در ۳۷ درجه سلسیوس طی ۲۴ ساعت گرما گذاری، برای استافیلوکوکوس اورئوس میزان داروی رهائش یافته در رقت ۱۳/۲۹ معادل ۲/۱۵ میکروگرم بر میلی لیتر آمیکاسین بود و برای سودوموناس آئروژینوزا برابر ۴/۳۱ میکروگرم بر میلی لیتر آمیکاسین منتشر شده است. نتایج مقایسه فعالیت ضد میکروبی محلول آمیکاسین خالص و آمیکاسین @ مزوحفره سیلیکا SBA-15 بر علیه هر دو باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا، کاهش اثر ضد میکروبی آمیکاسین را در نانو حامل مزوحفره سیلیکا SBA-15 نسبت به آمیکاسین خالص نشان داد.

با توجه به نتایج به دست آمده می توان دریافت که داروی آمیکاسین رهائش یافته از نانو حامل SBA-15، همان پایداری و خاصیت درمانی داروی آمیکاسین خالص و کپسوله نشده را حفظ کرده است؛ اما چون رهائش دارو از نانو حامل به صورت تدریجی بوده است. بنابراین در بازه زمانی ۲۴ ساعت، کل دارو (۱۰۰٪) در معرض باکتری قرار نگرفته بلکه در این زمان حدود ۳۴/۵۴٪ دارو از نانو حامل آزاد و در تعامل با باکتری قرار گرفته است. همین امر



میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت به منظور فراهم کردن شرایط لازم برای انجام تحقیق ابراز می‌نمایند.

### تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سیلیکا، جایگزین فرمولاسیون‌های سنتی آمیکاسین جهت بهبود کارایی و کاهش عوارض ناشی از مصرف بالای آن گردد. بررسی‌های تکمیلی این نانوفرمولاسیون در گروه تحقیقاتی ما در حال انجام می‌باشد.

### تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران و آزمایشگاه تحقیقاتی

### References

1. Goodman & Gilman's: Chapter 54: Aminoglycosides. In: Laurence L. Brunton, Bruce A. Chabner, Björn C. Knollmann, editors. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 12e. New York: McGraw-Hill; 2011.p1507-1517.
2. Yonova D, Vazellov E, Papazov V, Trendafilov I, Simeonov A. Amikacin-treatment of an urinary tract infection in a hemodialysis patient-what may be eventually missed?. Hippokratia. 2006;10(1):39-40.
3. Bliziotis IA, Samonis G, Vardakas KZ, Chrysanthopoulou S, Falagas ME. Effect of aminoglycoside and  $\beta$ -lactam combination therapy versus  $\beta$ -lactam monotherapy on the emergence of antimicrobial resistance: a meta-analysis of randomized, controlled trials. Clinical infectious diseases. 2005;41(2):149-58.
4. Hinz A, Lee S, Jacoby K, Manoil C. Membrane proteases and aminoglycoside antibiotic resistance. Journal of bacteriology. 2011;193(18):4790-7.
5. Losa C, Calvo P, Castro E, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Improvement of ocular penetration of amikacin sulphate by association to poly (butylcyanoacrylate) nanoparticles. Journal of pharmacy and pharmacology. 1991;43(8):548-52.
6. Barrera V, Sinues B, Martinez P, Buatas A, Pinero A. Penetration of amikacin into the anterior chamber of the human eye. Journal francais d'ophtalmologie. 1983;7(8-9):539-43.
7. Krasemann C, Mester U, Stein HJ. Experimental studies on topic application of amikacin to the eye (author's transl). Arzneimittel-Forschung. 1977;28(9):1602-4.
8. Gonzalez 3rd LS, Spencer JP. Aminoglycosides: a practical review. American family physician. 1998; 58(8):1811-20.
9. Pagkalis S, Mantadakis E, Mavros MN, Ammari C, Falagas ME. Pharmacological considerations for the proper clinical use of aminoglycosides. Drugs. 2011;71(17):2277-94.
10. Boyer A, Gruson D, Bouchet S, Clouzeau B, Hoang-Nam B, Vargas F, Gilles H, Molimard M, Rogues AM, Moore N. Aminoglycosides in septic shock. Drug safety. 2013; 36(4):217-30.
11. Croes S, Koop AH, van Gils SA, Neef C. Efficacy, nephrotoxicity and ototoxicity of aminoglycosides, mathematically modelled for modelling-supported therapeutic drug monitoring. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2012; 45(1):90-100.
12. Huth ME, Ricci AJ, Cheng AG. Mechanisms of aminoglycoside ototoxicity and targets of hair cell protection. International journal of otolaryngology. 2011;2011.
13. Bodem CR, Lampton LM, Miller DP, Tarka EF, Everett ED. Endobronchial pH: Relevance to Aminoglycoside Activity in Gram-Negative Bacillary Pneumonia 1, 2. American Review of Respiratory Disease. 1983;127(1):39-41.
14. Mugabe C, Azghani AO, Omri A. Preparation and characterization of dehydration-rehydration vesicles loaded with aminoglycoside and macrolide antibiotics. International journal of pharmaceutics. 2006; 307(2):244-50.
15. Mirzaee M, Owlia P, Mehrabi MR. Comparison of the bactericidal activity of amikacin in free and liposomal formulation against gram-negative and gram-positive bacteria. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products. 2009; 4(1):1-7.
16. Lee JH, Cheng KT, Malinin V, Li Z, Yao Z, Lee SJ, Gould CM, Olivier KN, Chen C, Perkins WR, Paik CH. 99mTc-labeled therapeutic inhaled amikacin loaded liposomes. Journal of liposome research. 2013; 23(4):336-42.
17. Ghaffari S, Varshosaz J, Saadat A, Atyabi F. Stability and antimicrobial effect of amikacin-loaded solid lipid nanoparticles. International journal of nanomedicine. 2011; 6:35.
18. Varshosaz J, Ghaffari S, Khoshayand MR, Atyabi F, Dehkordi AJ, Kobarfard F. Optimization of freeze-drying condition of amikacin solid lipid nanoparticles

- using D-optimal experimental design. *Pharmaceutical development and technology*. 2012; 17(2):187-94.
19. Varshosaz J, Ghaffari S, Mirshojaei SF, Jafarian A, Atyabi F, Kobarfard F, Azarmi S. Biodistribution of amikacin solid lipid nanoparticles after pulmonary delivery. *BioMed research international*. 2013; Article ID 136859.
  20. Berger D, Bajenaru L, Nastase S, Mitran RA, Munteanu C, Matei C. Influence of structural, textural and surface properties of mesostructured silica and aluminosilicate carriers on aminoglycoside uptake and in vitro delivery. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2015; 206:150-60.
  21. Adibkia K, Barzegar-Jalali M, Javadzadeh Y, Bayrami R, Mohammadi G. A review on the porous adsorbents in drug delivery systems. *Pharmaceutical Sciences*. 2012; 18(2):103-18.
  22. Kaukonen AM, Laitinen L, Salonen J, Tuura J, Heikkilä T, Linnell T, Hirvonen J, Lehto VP. Enhanced in vitro permeation of furosemide loaded into thermally carbonized mesoporous silicon (TCPSi) microparticles. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*. 2007; 66(3):348-56.
  23. Slowing II, Trewyn BG, Giri S, Lin VY. Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery and biosensing applications. *Advanced Functional Materials*. 2007; 17(8):1225-36.
  24. Slowing II, Vivero-Escoto JL, Wu CW, Lin VS. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Advanced drug delivery reviews*. 2008; 60(11):1278-88.
  25. Park SY, Pendleton P. Mesoporous silica SBA-15 for natural antimicrobial delivery. *Powder technology*. 2012; 223:77-82.
  26. Mohseni M, Gilani K, Mortazavi SA. Preparation and characterization of rifampin loaded mesoporous silica nanoparticles as a potential system for pulmonary drug delivery. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2015; 14(1):27-34.
  27. Nastase S, Bajenaru L, Matei C, Mitran RA, Berger D. Ordered mesoporous silica and aluminosilicate-type matrix for amikacin delivery systems. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2013; 182:32-9.
  28. Berger D, Nastase S, Mitran RA, Petrescu M, Vasile E, Matei C, Negreanu-Pirjol T. Mesostructured silica and aluminosilicate carriers for oxytetracycline delivery systems. *International journal of pharmaceuticals*. 2016; 510(2):524-31.
  29. Khatibi A, Ma'mani L, Khodarahmi R, Shafiee A, Maghami P, Ahmad F, Sheibani N, Moosavi-Movahedi AA. Enhancement of thermal reversibility and stability of human carbonic anhydrase II by mesoporous nanoparticles. *International journal of biological macromolecules*. 2015; 75:67-72.
  30. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2006. Performances standard for antimicrobial susceptibility testing; 16<sup>th</sup>. Informational supplement. M100-S16. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
  31. Sailaja AK, Amareshwar P, Chakravarty P. Formulation of solid lipid nanoparticles and their applications. *Current Pharma Res*. 2011; 1(2):97-203.
  32. Ekambaram P, Sathali AA, Priyanka K. Solid lipid nanoparticles: a review. *Scientific reviews and chemical communications*. 2012; 2(1): 80-102
  33. Zhao D, Feng J, Huo Q, Melosh N, Fredrickson GH, Chmelka BF, Stucky GD. Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores. *science*. 1998; 279(5350):548-52.
  34. Zhao D, Yang P, Melosh N, Feng J, Chmelka BF, Stucky GD. Continuous mesoporous silica films with highly ordered large pore structures. *Advanced Materials*. 1998; 10(16):1380-5.