

Preparation of Hyaluronic acid-Aloevera Nanoparticles for Sustained Delivery of Doxycycline

Mojdeh Sadat Mirshafiei and Soheil Boddohi*

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

Received: 9 May 2018, accepted: 5 January 2019

ABSTRACT

Hypothesis: In this work, hyaluronic acid-aloevera (HA-AV) nanoparticles were prepared by nanoprecipitation method. Both HA and AV have shown great biocompatibility potential as antibacterial agents. Also chemical crosslinking of these two materials by esterification reaction could change stability and biodegradability. Doxycycline was selected as a drug model and encapsulated by HA-AV nanoparticles.

Methods: Aloevera powder was prepared from the plant leaf and characterized by FTIR and NMR. The synthesis of HA-AV was carried out through esterification reaction. Size and shape of nanoparticles were measured by dynamic light scattering (DLS) and scanning electron microscopy (SEM). Anti-bacterial test was obtained against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria and also minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were measured.

Findings: Average size of each particle before and after drug loading was about 118 nm and 171 nm, respectively. Doxycycline with an optimum concentration of 200 µg/mL was loaded, and drug loading content of 5.43% and drug loading efficiency of 40.14% were obtained. The sustained release profile showed 93.4% release during 16 days in PBS buffer solution. The results showed that the nanocarriers affected on both bacteria but the growth inhibitory loop was greater in *Staphylococcus aureus*. The cell viability test of nanocarriers was performed on NIH3T3 cell line by MTT assay method and nanoparticles containing 10 µg/mL of drug were selected as an appropriate concentration. Overall, this study has demonstrated that HA-AV nanocarriers can potentially be suitable for controlled release of doxycycline as a therapeutic agent for treatment of infectious diseases.

Keywords:

nanoparticles,
hyaluronic acid,
aloevera,
doxycycline,
sustained release

(*To whom correspondence should be addressed.

E-mail: s.boddohi@modares.ac.ir

Please cite this article using:

Sadat Mirshafiei M., Boddohi S., Preparation of Hyaluronic acid-Aloevera Nanoparticles for Sustained Delivery of Doxycycline, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **31**, 539-550, 2019.

تهیه نانوذرات هیالورونیک اسید-آلوئه‌ورا برای سامانه آهسته‌رهش داکسی‌سایکلین

مژده سادات میرشفیعی، سهیل بدوحی*

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

دریافت: ۱۳۹۷/۲/۱۹، پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۱۵

چکیده

فرضیه: در این پژوهش، نانوذرات هیالورونیک اسید-آلوئه‌ورا با روش نانوسوب‌دهی تهیه شدند. هردو ترکیب هیالورونیک اسید و آلوئه‌ورا زیست‌سازگاری بسیار خوبی دارند و قابلیت آن‌ها به‌عنوان عامل ضدباکتریایی نشان داده شد. همچنین، اتصال عرضی شیمیایی این دو ماده به‌وسیله واکنش استری شدن می‌تواند به تغییر پایداری و زیست‌تخریب‌پذیری نانوذرات حاصل منجر شود. داکسی‌سایکلین به‌عنوان داروی مدل انتخاب و به‌وسیله نانوذرات هیالورونیک اسید-آلوئه‌ورا کپسولی شد.

روش‌ها: پودر آلوئه‌ورا از برگ گیاه تهیه و با طیف‌سنجی‌های زیرقرمز تبدیل فوری و رزونانس مغناطیسی هسته شناسایی شد. هیالورونیک اسید و آلوئه‌ورا طی واکنش استری شدن سنتز شدند. اندازه و شکل نانوذرات با دستگاه پراکندگی نور دینامیکی و میکروسکوپ الکترونی پویشی بررسی شد. آزمون ضدباکتریایی سامانه روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* و نیز محاسبه حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی انجام شد.

یافته‌ها: متوسط اندازه هر ذره پیش و پس از بارگذاری دارو به ترتیب برابر ۱۱۸ و ۱۷۱ nm بود. داکسی‌سایکلین با غلظت بهینه ۲۰۰ µg/mL، مقدار داروی بارگذاری شده ۵/۴۳٪ و بازده بارگذاری دارو ۴۰/۱۴٪ برای ادامه مطالعات برون‌تنی انتخاب شد. مقدار رهایش دارو به مدت ۱۶ روز، ۹۳/۴٪ بود که بیانگر رهایش آهسته است. نتایج حاصل از آزمون ضدباکتریایی نشانگر اثر سامانه بر هر دو باکتری مثبت بود. اما با توجه به نتایج حلقه بازدارندگی رشد اثر آن بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر بود. زنده‌مانی سلولی روی رده سلولی NIH3T3 با استفاده از روش MTT انجام شد و نانوذرات دارای دارو با غلظت ۱۰ µg/mL به‌عنوان غلظت مناسب انتخاب شدند. مطالعه حاضر نشان داد، نانوحامل‌های هیالورونیک اسید-آلوئه‌ورا برای رهایش کنترل‌شده داروی داکسی‌سایکلین و نیز به‌عنوان عامل درمانی برای درمان بیماری‌های عفونی مناسب هستند.

واژه‌های کلیدی

نانوذرات،
هیالورونیک اسید،
آلوئه‌ورا،
داکسی‌سایکلین،
رهش آهسته

* مسئول مکاتبات، پیام‌نگار:

s.boddohi@modares.ac.ir

مقدمه

فناوری کنترل ره‌ایش دارو از چند دهه گذشته آغاز شده و به سرعت گسترش یافته است. تاکنون بسیاری از این سامانه‌ها مانند لیپوزوم‌ها، میسل‌ها، امولسیون‌ها، درخت‌سان‌ها، میکروذرات و نانوذرات نتایج خوبی در کنترل ره‌ایش دارو و هدف درمانی داشته‌اند. فرایند بارگذاری برای کنترل کردن ره‌ایش دارو با استفاده از سامانه‌های مختلف ارزیابی شده است. در طراحی و توسعه سامانه‌های دارورسانی، هدف دست‌یابی به سامانه‌ای با بارگذاری مناسب و خواص آزادسازی مطلوب به همراه نیمه‌عمر زیاد و سمیت کم است. امروزه سامانه‌های زیادی بر پایه نانوفناوری برای انتقال و هدف‌گیری وجود دارند که به خوبی توسعه یافته‌اند یا در حال توسعه هستند. هدف از به‌کارگیری نانوحامل‌های دارو، کاهش تخریب داروها، جلوگیری از اثرهای جانبی آن‌ها، افزایش دسترس‌پذیری به دارو و تجمع دارو در محل مدنظر است [۱].

روش‌های متعددی برای تولید نانوذرات وجود دارد که این امکان را فراهم می‌کند تا ساختار، ترکیب و خواص فیزیکی و شیمیایی آن‌ها بررسی شود. انتخاب نوع پلیمر و روش تولید آن به عواملی نظیر نوع دارو، زیست‌سازگاری پلیمر، نحوه تخریب نانوذرات در بدن، نیم‌رخ ره‌ایش دارو و نحوه عملکرد آن در بدن بستگی دارد. از میان این عوامل، نوع دارو و پلیمر اثر زیادی بر انتخاب روش تولید نانوذرات دارند [۲]. از میان پلیمرهای استفاده‌شده در سامانه‌های نوین دارورسانی، پلیمرهای طبیعی مانند هیالورونیک اسید و آلوئه‌ورا توجه بسیاری را به خود جلب کرده‌اند [۳،۴]. هیالورونیک اسید، پلی‌ساکاریدی خطی با وزن مولکولی زیاد است و در همه جای ماتریس برون‌سلولی وجود دارد. خواص شاخص این پلیمر زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری، ضدالتهابی، غیرایمنی و سمی‌نبودن و باکتریوستاتیک (مانعت از رشد باکتری) است که موجب می‌شود، برای کاربردهای زیست‌پزشکی جذاب باشد [۵].

هیالورونیک اسید چند عملکرد زیستی مهم از قبیل تنظیم چسبندگی سلولی و تحریک سلولی، مدیریت تمایز سلولی و تکثیر از راه برهم‌کنش‌های ویژه و غیرویژه را انجام می‌دهد [۶]. همچنین ویژگی‌هایی مانند، خواص بسیار مطلوب فیزیکی، شیمیایی و زیستی، پایداری در جریان خون، تمایل ویژه برای سلول‌های مختلف سرطانی به بیان بیش از حد گیرنده‌های هیالورونیک اسید، قابلیت ره‌ایش دارو در سلول‌های هدف با افزایش اثر درمانی، تمرکز روی هیالورونیک اسید را به‌عنوان حامل دارو بیشتر کرده است [۷]. افزون بر این، برخی از گروه‌های عاملی هیالورونیک اسید مانند هیدروکسیل، کربوکسیل و N-استیل برای اصلاحات شیمیایی مناسب هستند. بنابراین،

هیالورونیک اسید و مشتقات آن به‌عنوان حامل‌های دارویی به ره‌ایش آهسته، جذب پوستی و بهبود دارورسانی هدفمند کمک می‌کنند [۸]. مشتقات بسیاری از هیالورونیک اسید به‌عنوان حامل دارو برای دارورسانی تهیه شدند. هیالورونیک اسید با اتصالات عرضی شیمیایی و فیزیکی به حالت ژل و میکرو و نانوذرات برای تحویل پروتئین‌های مختلف، داروها، پپتید یا ژن توسعه یافته است [۸]. در پژوهشی Zhou و همکاران [۹] هیالورونیک اسید و پلی‌اتیلن ایمین سنتز شده را برای ژن‌رسانی به‌وسیله اکسایش هیالورونیک اسید تهیه کردند. این سامانه باعث افزایش جذب سلولی و کاهش سمیت سلولی شد. در پژوهش دیگری اتصال هیالورونیک اسید به پلی‌اتیلن ایمین در دگزامتازون باعث کاهش سمیت و افزایش بازده جذب سلولی در سلول‌های توموری B16-F10 شد. همچنین، این ترکیب فعالیت ضدالتهابی و مهار رشد توموری واضحی را نشان داد [۱۰]. افزون بر این، هیالورونیک اسید که به‌طور طبیعی در ریه یافت می‌شود، الاستین ریه را که خواص مخاطی دارد، از التهاب محافظت می‌کند. بر همین اساس Gratieri و همکاران [۱۱] در پژوهشی از نانوذرات هیالورونیک اسید به‌عنوان حاملی برای افزایش زمان ماندگاری دارو در جذب ریوی استفاده کردند. Cai و همکاران [۱۲] سامانه جدیدی را بر پایه هیالورونیک اسید و سیس‌پلاتین برای افزایش غلظت سیس‌پلاتین طراحی کردند که اتصال هیالورونیک اسید به سیس‌پلاتین باعث کاهش چشمگیر عوارض جانبی و سمیت سیستمیک شد.

همچنین، آلوئه‌ورا دارای پیشینه طولانی به‌عنوان گیاه دارویی با کاربردهای درمانی متنوع است. برخی از فعالیت‌های زیستی این گیاه را می‌توان به پلی‌ساکاریدهای موجود در ژل برگ آن نسبت داد. اگرچه بیش از ۷۵ ماده فعال از ژل داخلی آن شناسایی شده‌اند، اما اثرهای درمانی هر جزء به تنهایی مشخص نشده است. با توجه به خواص ضدباکتری آلوئه‌ورا، افزودن این ماده می‌تواند موجب افزایش خاصیت ضدباکتری بهتر سامانه در کنار ازدیاد زنده‌مانی سلولی شود. همچنین به دلیل خاصیت ژل‌شوندگی آلوئه‌ورا، این ماده می‌تواند باعث ایجاد تورم در سامانه و در نتیجه کنترل و ره‌ایش آهسته دارو شود [۱۳]. تفاوت در نوع گیاه با توجه به موقعیت جغرافیایی و نیز تفاوت در روش‌های استخراج ژل و فنون آماده‌سازی نمونه، موجب اختلاف در نتایج به‌دست آمده شده است. کاربردهای دارویی جالبی مانند افزایش فعالیت‌های جذب روده‌ای و اثرهای بهبود نفوذ پوستی ژل آلوئه‌ورا به‌تازگی مشاهده شده است [۱۴].

با توجه به مطالعات انجام‌شده و اهمیت دو پلیمر هیالورونیک اسید و آلوئه‌ورا و نیز زیست‌سازگاری زیاد آن‌ها، در این پژوهش نانوذرات هیالورونیک اسید- آلوئه‌ورا برای ساخت سامانه جدید دارورسانی

روش‌ها

آماده‌سازی پودر آلئوئورا

بخش سبزرنگ برگ آلئوئورا جدا و ژل آن خارج شد. سپس، دو مرتبه با آب یون‌زدوده شسته و به مدت ۳۳ h با خشک‌کن انجمادی خشک شد. پودر سفید حاصل درون ظرف دربسته در دمای ۴°C نگه‌داری شد.

نحوه اتصال هیالورونیک اسید و آلئوئورا

اتصال هیالورونیک اسید-آلئوئورا از واکنش استری شدن میان گروه کربوکسیل هیالورونیک اسید و گروه هیدروکسیل آلئوئورا به دست می‌آید. این واکنش با عامل اتصال EDC و کاتالیزگر DMAP انجام شد [۱۵]. هیالورونیک اسید به همراه EDC و DMAP (با نسبت HA:EDC:DMAP برابر ۱:۳:۰/۳) در ۵۰ mL بافر استیک اسید (pH برابر ۵) حل شد. این مخلوط به مدت ۳ h تحت گاز نیتروژن به منظور فعال کردن گروه کربوکسیلیک اسید هیالورونیک اسید همزده شد. سپس، محلول آلئوئورا با حل کردن پودر در آب یون‌زدوده با غلظت ۰/۱٪ w/v تهیه، به محلول قبل اضافه و به مدت ۲۴ h در دمای معمولی همزده شد. پس از آن به مدت سه روز تحت دیالیز قرار گرفت. سپس، با استفاده از خشک‌کن انجمادی خشک شد.

تهیه نانوذرات هیالورونیک اسید-آلئوئورا

نانوذرات هیالورونیک اسید-آلئوئورا با روش نانورسوب‌دهی تشکیل شد [۱۶]. ابتدا محلول ۰/۱٪ w/v از Tween 80 در آب یون‌زدوده تهیه شد. سپس، محلول هیالورونیک اسید-آلئوئورا با غلظت ۱ mg/mL در حلال اتانول ۵۰٪ با نسبت ۱ به ۱ قطره قطره به محلول Tween 80 با دور همزن ۱۰۰۰ rpm افزوده و به مدت ۲۴ h همزده شد. در نهایت، محلول به مدت ۲۴ h تحت دیالیز قرار گرفت.

بارگذاری دارو و تعیین غلظت بهینه بارگذاری

برای افزایش بازده بارگذاری دارو، بارگذاری هم‌زمان با تشکیل نانوذرات انجام شد. بدین منظور هنگام تهیه نانوذرات، دارو با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ µg/mL در آب تهیه شد. محلول‌های دارو و هیالورونیک اسید-آلئوئورا به‌طور هم‌زمان و با سرعت یکسان به محلول فعال‌کننده سطح اضافه شدند. سپس، به مدت ۲۴ h با سرعت ۱۰۰۰ rpm همزده شد. محلول حاصل به مدت ۲۴ h دیالیز شد. آب یون‌زدوده بیرون کیسه دیالیز در زمان‌های ۱، ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴ h تعویض شد و مقدار جذب داروی مصرف‌نشده با طیف‌نورسنج در طول موج ۲۷۵ nm اندازه‌گیری

تهیه شدند. هدف و نوآوری پژوهش حاضر در تهیه نانوذرات هیالورونیک اسید-آلئوئورا با روش نانورسوب‌دهی و استفاده از داروی داکسیسایکلین به‌عنوان داروی نمونه بود. اتصال عرضی هیالورونیک اسید-آلئوئورا با واکنش استری شدن و کپسولی کردن دارو در نانوذره و رهایش دارو از این سامانه در محیط بافری انجام شد. همچنین، خواص ضدباکتری و سمیت سلولی این سامانه بررسی شد. بنابراین، تهیه نانوذرات زیست‌سازگار هیالورونیک اسید-آلئوئورا برای اولین بار با قابلیت رهایش آهسته و نیز بررسی رفتار رهایش و ویژگی‌های ساختار مزبور از جمله نوآوری‌های این مطالعه به‌شمار می‌آید.

تجربی

مواد

در پژوهش حاضر، از هیالورونیک اسید با وزن مولکولی ۵ MDa ساخت شرکت Fluka، ۴-دی‌متیل‌آمینوپیریدین (DMAP) و محلول MTT ساخت شرکت Sigma، ۱-اتیل-۳-(۳-دی‌متیل‌آمینوپروپیل کربودی‌ماید) (EDC)، Tween 80 و پودر کشت میکروبی براث و پودر آگار مولر-هینتون ساخت شرکت Merck، محیط کشت DMEM ساخت شرکت Dacell، محیط کشت RPMI، سرم جنین گاوی و تریپسین ساخت شرکت Bio-Idea استفاده شد. همچنین، از دی‌متیل سولفوکسید بدون آب محصول شرکت سیناکلون، داکسیسایکلین مونوهیدرات ساخت شرکت داروسازی ایران دارو، برگ آلئوئورا با وزن مولکولی ۶ MDa تهیه‌شده از گلخانه اراک و سلول‌های فیروبلاست (NIH3T3) تهیه‌شده از دانشگاه تهران استفاده شد.

دستگاه‌ها

در این پژوهش، خشک‌کن انجمادی ALPHA 1-2 LD plus ساخت شرکت Crist برای خشک کردن پلیمر، طیف‌نورسنج CARY 50 ساخت شرکت Varian برای تعیین غلظت دارو، طیف‌سنج زیرقرمز تبدیل فوریه ساخت شرکت Perkin Elmer برای تعیین گروه‌های عاملی، دستگاه پراکندگی نور دینامیکی ساخت شرکت Malvern برای بررسی توزیع و متوسط اندازه نانوذرات، طیف‌سنج رزونانس مغناطیسی هسته ساخت شرکت Bruker برای تعیین ساختار آلئوئورا، میکروسکوپ الکترونی پویشی (FE-SEM) مدل MIRA3 ساخت شرکت Tescan برای بررسی شکل‌شناسی نانوذرات و ELISA Reader Awareness ساخت شرکت Technology INK برای مطالعه مقدار جذب نمونه‌ها به‌کار گرفته شد.

اندازه‌گیری کمترین غلظت بازدارندگی رشد و کمترین غلظت کشندگی باکتری

برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) دارو، ۸۰ μL محیط کشت میکروبی برات در ظروف چاهکی ۹۶ تایی ریخته و ۸۰ μL دارو (از غلظت ۱ mg/mL تا ۲۰ mg/mL) اضافه شد. سپس، ۱۰ μL باکتری با کدورت ۰/۵ مک‌فارلند (معادل $10^8 \times 1/5$) اضافه شد. پس از آن در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ h گرمادهی و برای بررسی کدورت، جذب آن در ۶۰۰ nm با سه مرتبه تکرار خوانده شد.

مطالعات سلولی

ارزیابی زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از روش MTT

در مرحله اول برای به دست آوردن غلظت مؤثر داروی داکسی‌سایکلین، چهار غلظت ۱، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ $\mu\text{g/mL}$ انتخاب شد. همچنین، نانوذرات دارای دارو با غلظت‌های زیاد تهیه شدند. بدین منظور تعداد ۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک کشت داده شد. سپس، محلول‌های دارو و نانوذرات دارای دارو با چهار غلظت انتخابی به درون چاهک‌ها ریخته شدند. چاهک‌های کنترل و نانوذرات بدون دارو در دو غلظت پیشنهادی ۵۰ و ۱۰۰ $\mu\text{g/mL}$ به عنوان غلظت‌های حد بالا و حد پایین انتخاب شدند. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد. نمونه‌ها پس از ۱، ۳ و ۵ روز بررسی شدند. برای هر مجموعه از نمونه‌ها پس از اتمام گرمادهی، محیط کشت رویی دور ریخته شد و به هر چاهک، مخلوط محیط کشت و محلول MTT با غلظت ۰/۵ mg/mL به نسبت ۱:۵ (MTT:Medium) اضافه شده و به مدت ۲ h درون گرم‌خانه CO_2 با ۳۷°C قرار داده شدند. پس از افزودن DMSO به چاهک‌ها و حل کردن رسوب، جذب نوری محلول به دست آمده با دستگاه ELISA در ۵۷۰ nm اندازه‌گیری شد [۱۹،۲۰].

نتایج و بحث

شکل ۱، طیف $^1\text{H NMR}$ را نشان می‌دهد که برای ارزیابی کیفیت پودر ژل آلئوئورا خشک‌شده و تأیید وجود آسمانان (از اجزای اصلی آلئوئورا) انجام شد. پیک‌های مربوط به گلوکوز، مالئیک اسید و آسمانان، سه پلی‌ساکارید مهم تشکیل‌دهنده ژل آلئوئورا به وضوح در این طیف وجود دارد. همچنین، وجود برخی از اسیدهای آلی را نیز می‌توان از طیف $^1\text{H NMR}$ استنباط کرد. پیک‌ها در ناحیه ۴/۵ و ۵ ppm مربوط به گلوکوز و پیک ۴/۸ ppm مربوط به مالئیک اسید است، همچنین،

با استفاده از منحنی استاندارد و اندازه‌گیری جذب نمونه‌ها، غلظت مدنظر در نمونه‌ها به دست آمد. با توجه به مقدار داروی اولیه بارگذاری شده، مقدار کل داروی بارگذاری شده در نانوذرات محاسبه شد. با استفاده از داده‌های به دست آمده و به کمک معادله‌های (۱) و (۲) مقدار ظرفیت داروی بارگذاری شده (LC%) و بازده بارگذاری (LE%) را می‌توان محاسبه کرد [۱۷]:

$$\text{LC}\% = \frac{\text{مقدار داروی آزاد-مقدار کل دارو}}{\text{وزن نانوذرات}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{LE}\% = \frac{\text{مقدار داروی آزاد-مقدار کل دارو}}{\text{مقدار کل دارو}} \times 100 \quad (2)$$

اندازه‌گیری مقدار آزادسازی دارو در شرایط شبیه‌سازی شده بدن

برای اندازه‌گیری شدت رهائش دارو از روش دیالیز استفاده شد. بدین منظور، مقدار مشخصی از محلول نانوذرات هیالورونیک اسید-آلئوئورا دارای دارو درون کیسه دیالیز ریخته شد. کیسه مزبور در حجم مشخصی از بافر نمک فسفات با pH برابر ۷/۴ غوطه‌ور شد. ظرف شیشه‌ای دارای این مجموعه درون حمام آب گرم لرزان با دمای ۳۷°C و سرعت ۱۰۰ rpm قرار گرفت. در فواصل زمانی معین ۲۰٪ از محیط اطراف کیسه برداشته شده و مقدار جذب آن در طول موج ۲۷۵ nm اندازه‌گیری شد. با استفاده از منحنی جذب استاندارد، غلظت دارو و در نتیجه مقدار داروی آزادشده در محلول بافر به دست آمد. بدین ترتیب، درصد رهائش تجمعی دارو با استفاده از معادله‌های (۳) و (۴) محاسبه و با توجه به مقادیر داروی آزادشده در فاصله‌های زمانی مختلف رسم شد [۱۸]. در این معادله، V_s حجم نمونه خارج‌شده، V_t حجم کل محیط رهائش، C_t غلظت در زمان t، C_{t-1} غلظت در زمان پیش از t و M_t مقدار داروی بارگذاری شده است.

$$\text{درصد رهائش تجمعی} = \frac{M_t}{M_t} \times 100 \quad (3)$$

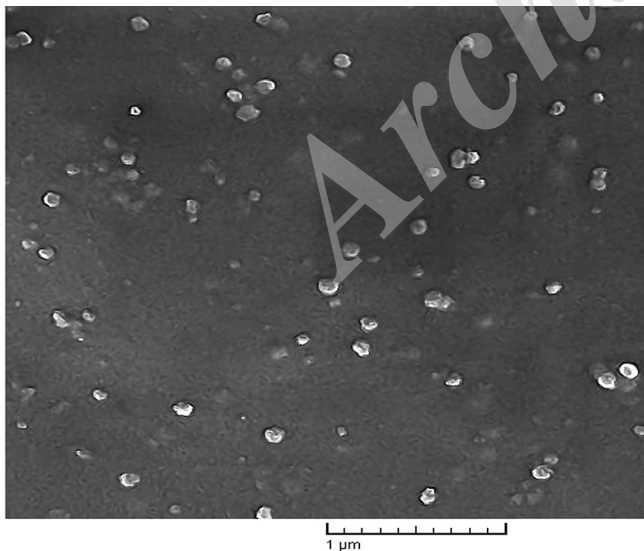
$$M_t = C_t V_t + \sum C_{t-1} V_s \quad (4)$$

مطالعات میکروبی

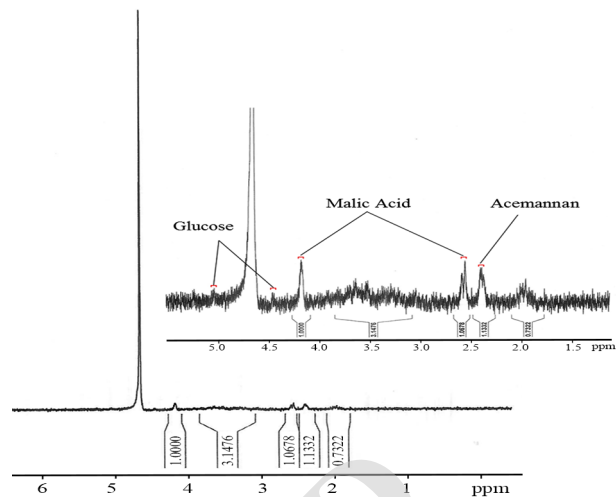
در این مطالعه، از دو باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (*S. aureus*) به عنوان باکتری گرم مثبت و نیز اشرشیا کلی (*E. coli*) به عنوان باکتری گرم منفی استفاده شد. ابتدا، محلول ۳۴ g/L آگار مولر هینتون در آب مقطر تهیه و سترون شد. سپس، این محلول در بشقابک‌ها ریخته و کشت خطی داده شد. محلول‌های دارویی به مقدار یکسان در چاهک‌های ایجادشده در آگار ریخته شد. سپس، در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ h با دو مرتبه تکرار گرمادهی شد.

پیوند OH است که وجود واحدهای مونوساکارید در مناطق شاخه‌ای مانند واحدهای گلوکان و گالاکتوز را تأیید می‌کند. پیک 903 cm^{-1} نشانگر حلقه پایروئید است که وجود مانوز و ارونیک اسید را تأیید می‌کند [۲۱]. پیک 641 cm^{-1} مربوط به ارتعاش خمشی پیوند C-H نشانگر وجود ترکیبات پلیمری در ژل و وجود پیک‌های قوی در محدوده 3207 و 1050 cm^{-1} به وجود گروه‌های هیدروکسیل اشاره دارد و نشانگر پلی‌ساکاریدهای زیست‌فعال مثل آسمانان و پکتین هستند [۲۲]. در شکل ۲ (b)، طیف FTIR هیالورونیک اسید دیده می‌شود. پیک‌های مهم در این طیف در ناحیه $1800-1200\text{ cm}^{-1}$ ظاهر شدند. پیک‌های 1618 ، 1411 ، و 1310 cm^{-1} به ترتیب مربوط به آمیدهای نوع اول، دوم و سوم هستند [۲۳].

در طیف آلوئه‌ورا، نواری جذبی در محدوده 1730 cm^{-1} دیده می‌شود که مربوط به ارتعاش کششی پیوند $\text{C}=\text{O}$ در گروه کربوکسیلیک است. پس از انجام واکنش استری شدن، در طیف هیالورونیک اسید-آلوئه‌ورا نوار جذبی جدیدی در 1727 cm^{-1} ظاهر شد. این نوار مربوط به ارتعاش کششی پیوند $\text{C}=\text{O}$ در گروه استر است که تأییدکننده انجام واکنش استری شدن و تهیه پلیمر ترکیبی هیالورونیک اسید-آلوئه‌ورا است [۲۴، ۲۵]. همچنین، وجود آمید در طیف هیالورونیک اسید-آلوئه‌ورا در محدوده 1600 cm^{-1} نشانگر وجود هیالورونیک اسید در ساختار پلیمر تهیه شده است. با توجه به این دو نوار شاخص می‌توان نتیجه گرفت، آلوئه‌ورا با موفقیت به هیالورونیک اسید متصل شده است.



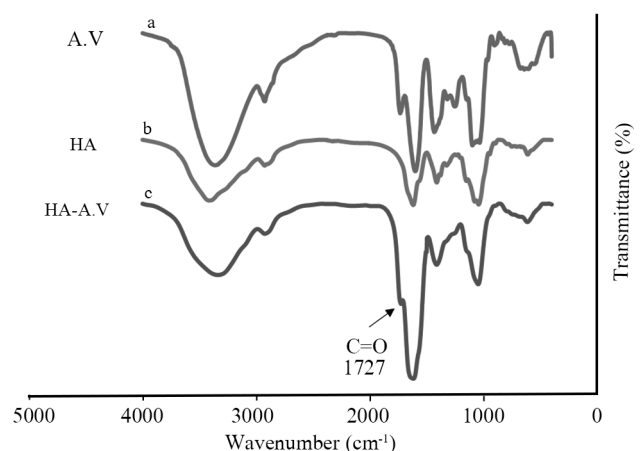
شکل ۳- تصاویر میکروسکوپ الکترونی پوششی نانوذرات HA-A.V
Fig. 3. Scanning electron microscopy images of HA-A.V nanoparticles.



شکل ۱- طیف ^1H NMR هسته آلوئه‌ورا.

Fig. 1. ^1H NMR spectrum of aloe vera.

پلی‌ساکاریدهای استیل‌دار شده آسمانان تولید پیک مشخصی در 2 ppm تا $2/26\text{ ppm}$ می‌کند که می‌تواند وجود آلوئه‌ورا را تأیید کند [۲۰]. طیف سنجی زیرقرمز تبدیل فوریه برای بررسی ساختار پلیمر تهیه شده و تأیید اولیه واکنش استری شدن انجام شد. در شکل ۲ (a)، طیف FTIR آلوئه‌ورا نشان داده شده است. پیک‌های 2925 cm^{-1} نشانگر ارتعاش کششی متقارن و نامتقارن پیوند C-H گروه‌های CH ، CH_2 ، آلیفاتیک، پیک 1732 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی پیوند $\text{C}=\text{O}$ نشانگر فعالیت زیستی ترکیبات آلوئه‌ورا، 1097 cm^{-1} مربوط به پیوند $\text{CO}-$ نشانگر وجود گالاکتوز و 1033 cm^{-1} مربوط به ارتعاش خمشی



شکل ۲- طیف FTIR: (a) آلوئه‌ورا، (b) هیالورونیک اسید و (c) هیالورونیک اسید-آلوئه‌ورا.

Fig. 2. FTIR spectra of: (a) aloe vera, (b) hyaluronic acid, and (c) hyaluronic acid-aloe vera.

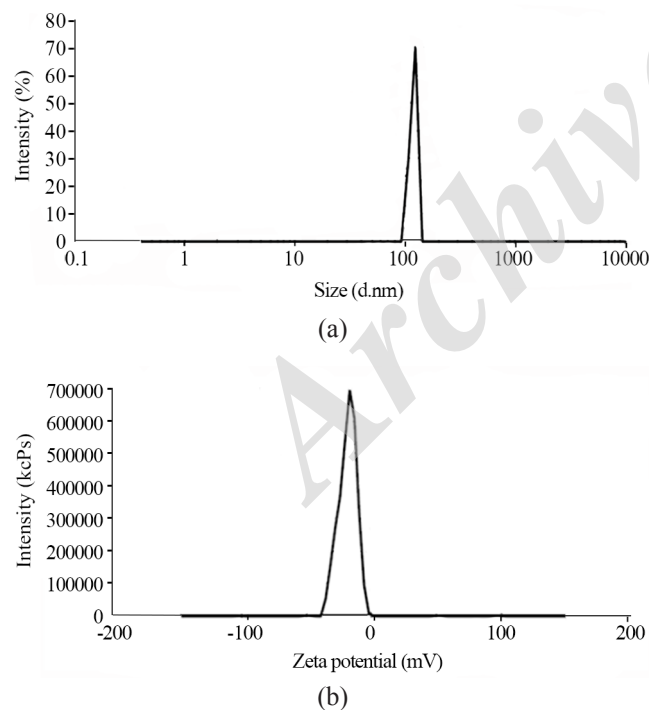
جدول ۲- توزیع اندازه و پتانسیل زتای نانوذرات بارگذاری شده با دارو.
Table 2. Size distribution and Zeta potential of drug loaded nanoparticles

Zeta potential (mV)	Polydispersity index, PDI	Average particle size (nm)
-23.2	0.283	171

افزایش می‌یابد، محدودیت حل‌شوندگی دارو در سامانه موجب هدررفت مقدار زیادی دارو می‌شود و بازده بارگذاری کاهش می‌یابد. بنابراین، باید غلظت بهینه دارو انتخاب شود تا در عین داشتن مقدار بارگذاری مناسب، بازده بارگذاری نیز در حد مطلوب باشد. با توجه به نمودار نشان داده‌شده می‌توان غلظت بهینه دارو را برای سامانه انتخاب کرد. بنابراین، غلظت $200 \mu\text{g/mL}$ ($LC\% = 5/43 \pm 0/05$) و $LE\% = 40/14 \pm 0/21$ به‌عنوان غلظت بهینه انتخاب شد.

بررسی مقدار آزادسازی دارو در شرایط شبیه‌سازی شده بدن

آزادسازی داروی داکسی‌سایکلین از نانوسامانه هیالورونیک اسید -



شکل ۴- نتایج پراکندگی نور دینامیکی: (a) اندازه متوسط نانوذرات و (b) پتانسیل زتا.

Fig. 4. Dynamic light scattering results: (a) average size of nanoparticles and (b) Zeta potential

شکل‌شناسی نانوذرات تهیه‌شده به روش نانوسوب‌دهی

شکل‌شناسی سطح نانوذرات تهیه‌شده با استفاده از میکروسکوپی الکترونی پوشی بررسی شد. در تصاویر FE-SEM با بزرگ‌نمایی 40 kX در شکل ۳ مشاهده می‌شود، تمام نانوذرات هیالورونیک اسید-آلوئه‌ورا، ساختار کروی، سطح صاف و یکنواخت دارند. همچنین، میانگین اندازه نانوذرات با استفاده از نرم‌افزار Image J تعیین شد و ذرات دارای میانگین قطر 120 nm بودند.

بررسی اندازه و بار سطحی ذرات پیش و پس از بارگذاری دارو

برای بررسی اندازه و بار سطحی ذرات از آزمون پراکندگی نور دینامیکی کمک گرفته شد. اندازه و بار سطحی نانوذرات هیالورونیک اسید- آلوئه‌ورا پیش و پس از بارگذاری دارو با سه مرتبه تکرار به ترتیب در جدول‌های ۱ و ۲ و نیز نتایج حاصل در شکل‌های ۴ و ۵ آمده است. همان‌طور که دیده می‌شود، اندازه متوسط ذرات با سه مرتبه تکرار 118 nm است و در نتیجه برای کاربردهای بالینی و نفوذ به درون عروق خونی مطلوب هستند [۲۶]. بار سطحی نیز همان‌طور که انتظار می‌رفت، با توجه به منفی بودن بار هیالورونیک اسید و خنثی بودن آلوئه‌ورا منفی است. اندازه ذرات پس از بارگذاری دارو با توجه به کپسولی شدن دارو و افزایش جذب سطحی آن بیشتر شدند. اما، همچنان دارای اندازه‌ای مناسب برای کاربردهای دارورسانی ($200 > \text{nm}$) بودند [۲۷]. همچنین با توجه به منفی بودن بار دارو، بار منفی تشدید شد که نشانگر پایداری بیشتر ذرات است.

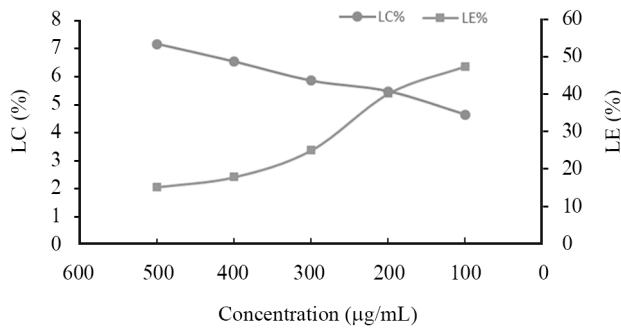
بررسی بارگذاری دارو در نانوذرات

برای تهیه نانوذرات بارگذاری‌شده، دارو با غلظت‌های 100 ، 200 ، 300 ، 400 و $500 \mu\text{g/mL}$ تهیه شد. نتایج بازده بارگذاری دارو ($LE\%$) و مقدار ظرفیت داروی بارگذاری‌شده ($LC\%$) در شکل ۶ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت دارو، مقدار ظرفیت داروی بارگذاری‌شده افزایش یافته و رو به بهبود است، اما روند بازده بارگذاری دارو معکوس و کاهشی است. نمودار تغییرات $LE\%$ روند کاهشی را نشان داد، زیرا با افزایش غلظت دارو با وجود اینکه مقدار داروی بارگذاری‌شده در سامانه

جدول ۱- توزیع اندازه و پتانسیل زتای نانوذرات.

Table 1. Size distribution and Zeta potential of nanoparticles.

Zeta potential (mV)	Polydispersity index, PDI	Average particle size (nm)
-18.8	0.268	118



شکل ۶- ظرفیت بارگذاری داکسی‌سایکلین (LC) و بازده بازگذاری (LE) نانوذرات HA-A.V در دارو.

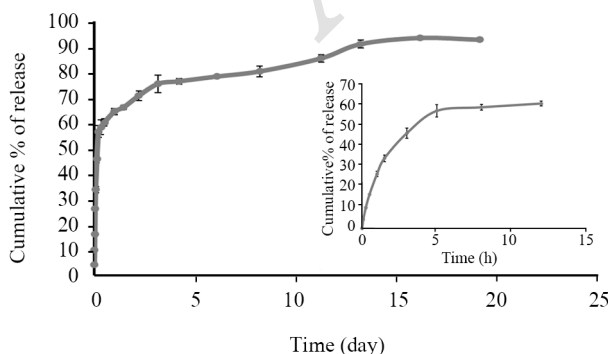
Fig. 6. Doxycycline loading capacity (LC) and loading efficiency (LE) of HA-A.V nanoparticles in drug.

مدل تجربی Korsmeyer و Peppas و $(M_t/M_\infty = Kt^n)$ برازش شد. در این مدل M_t/M_∞ کسری از داروست که در زمان t رهایش یافته، K ثابت سرعت نفوذ و n شاخص توانی سازوکار انتقال داروست. از آنجا که n در سامانه 0.2862 و R^2 در این سامانه 0.8312 است، بیانگر رفتار رهایش نفوذ شبه‌فیک با رویکرد آهسته‌تر است.

مطالعات میکروبی

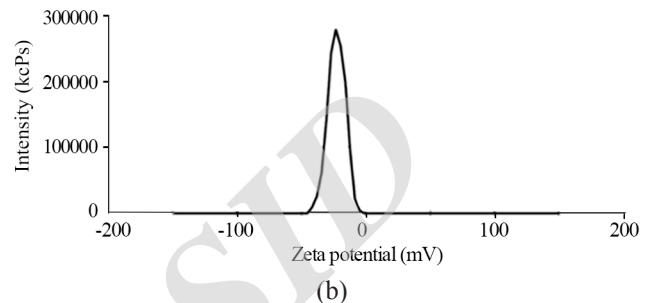
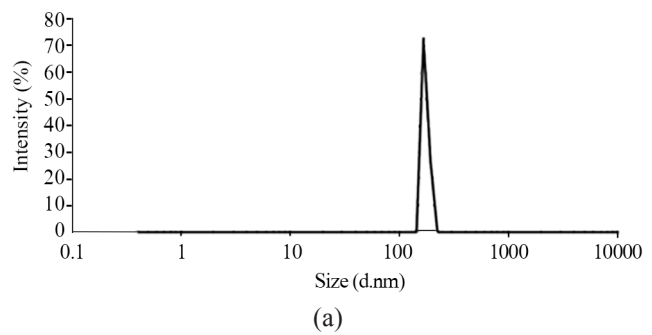
بررسی حلقه بازدارندگی رشد

شکل ۸ حلقه بازدارندگی رشد برای نانوذره هیالورونیک اسید-آلئوئورا را با دارو و بدون آن نشان می‌دهد. میانگین قطر حلقه بازدارندگی رشد برای نانوذرات بدون دارو $3/46$ cm و دارای دارو 4 cm برای باکتری *S. aureus* و میانگین قطر حلقه بازدارندگی رشد برای نانوذرات بدون دارو $2/49$ cm و دارای دارو $2/8$ cm برای باکتری *E. coli* بود. همان‌طور که انتظار می‌رفت، با اتصال هیالورونیک اسید و آلئوئورا، خواص پادزیستی و در نتیجه قطر حلقه بازدارندگی رشد افزایش داشته



شکل ۷- نیم‌رخ رهایش برون‌تنی داکسی‌سایکلین از نانوذرات.

Fig. 7. In vitro release profile of doxycycline loaded nanoparticles.

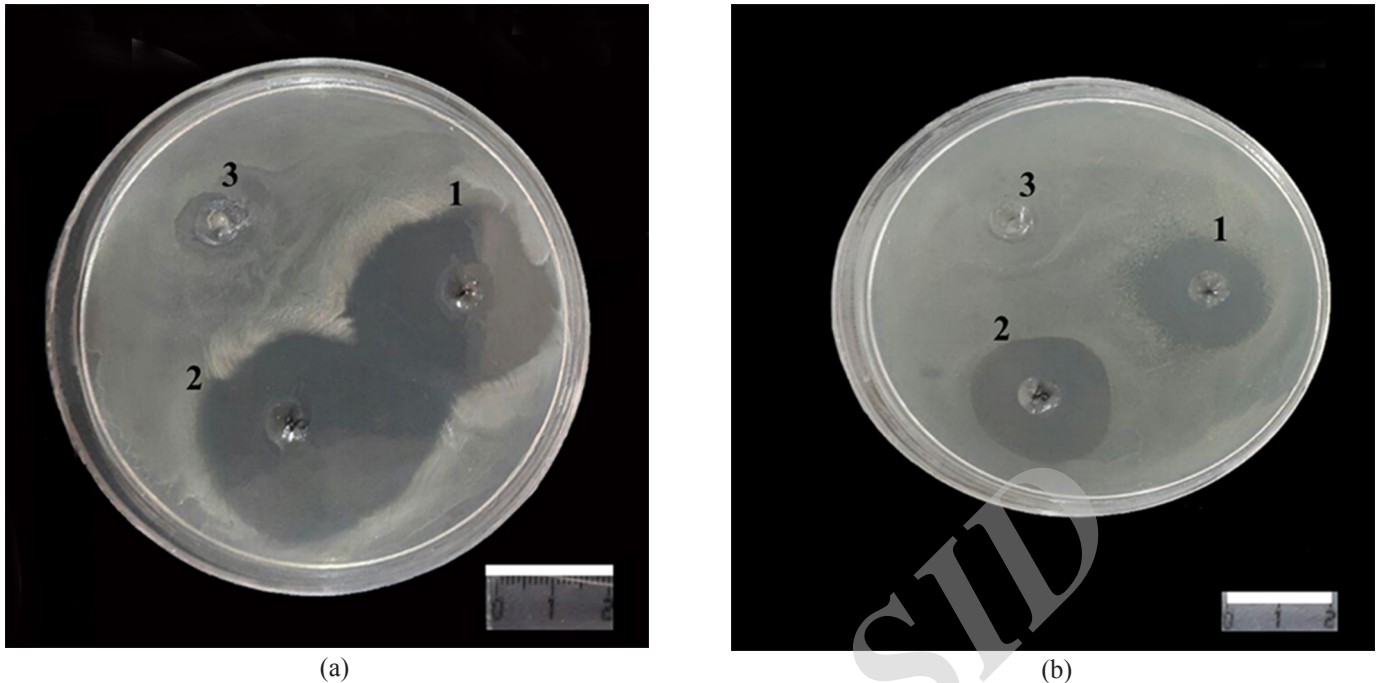


شکل ۵ - نتایج پراکندگی نور دینامیکی: (الف) اندازه متوسط نانوذرات HA.A.V بارگذاری شده با دارو، (ب) پتانسیل زتای نانوذرات بارگذاری شده با دارو.

Fig. 5. Dynamic light scattering results: (a) average size of drug loaded HA-A.V nanoparticles, (b) Zeta potential of drug loaded nanoparticles.

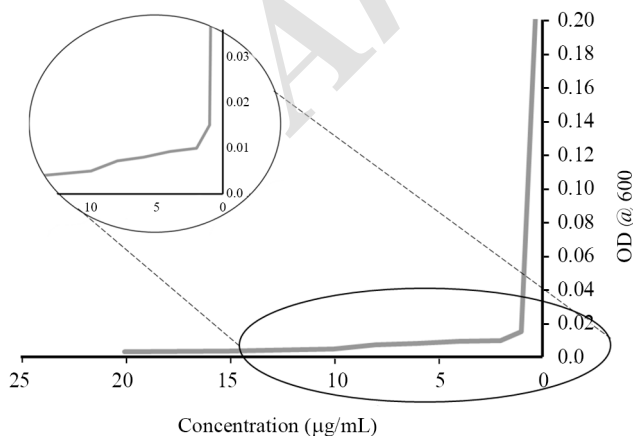
آلئوئورا در pH برابر $7/4$ (pH فیزیولوژی بدن) بررسی شد (سه مرتبه تکرار) که نتایج آن در شکل ۷ نشان داده شده است. با گذشت زمان، سرعت آزادسازی دارو کندتر می‌شود و این موضوع تا آزادشدن درصد زیادی از داروی بارگذاری شده ادامه می‌یابد.

همان‌طور که مشاهده می‌شود، طی 12 h اولیه رهایش انفجاری داکسی‌سایکلین برابر 60% بوده و در نهایت مقدار رهایش پس از گذشت 16 روز به $93/4\%$ افزایش یافت. رهایش دارو از نانوذرات شامل سه مرحله است. رهایش اولیه یا انفجاری دارو که می‌تواند ناشی از نفوذ داکسی‌سایکلین جذب‌شده در لایه‌های سطحی نانوذرات باشد. رهایش آهسته و پایدار داکسی‌سایکلین پس از رهایش انفجاری که اساساً ناشی از نفوذ آهسته مولکول‌های دارو در ماتریس پلیمری نانوذرات است. در نهایت، رهایش بسیار آهسته و ثابت دارو در مرحله بعدی که می‌تواند ناشی از نفوذ یا فروپاشی ماتریس پلیمری باشد و باعث رهایش داروی کپسولی شده در نانوذرات می‌شود [۱۸]. برای تعیین سازوکار رهایش دارو از سامانه تهیه‌شده با مدل‌های رهایش مختلف مقایسه انجام شد. مقادیر تجربی داروی آزادشده با



شکل ۸- فعالیت ضدباکتری نانوذرات HA-A.V در برابر: (a) *S. aureus* (1) بدون دارو، (2) با دارو و (3) کنترل. Fig. 8. Antibacterial activity of HA-A.V nanoparticles against: (a) *S. aureus*, (b) *E. coli* (1) without drug, (2) with drug, and (3) control.

فعالیت کشندگی باکتری در این غلظت است. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد، غلظت بیشتر دارو باعث مرگ باکتری‌ها به طور کامل می‌شود. همچنین، کمتر بودن مقدار MIC و MBC برای باکتری *S. aureus* نشانگر اثر بیشتر داروی داکسی‌سایکلین بر ممانعت از رشد و کشندگی این باکتری نسبت به باکتری *E. coli* است. در این پژوهش، سامانه نانوذرات دارای دارو باعث از بین رفتن حدود ۹۹٪ باکتری‌ها نیز شده است.



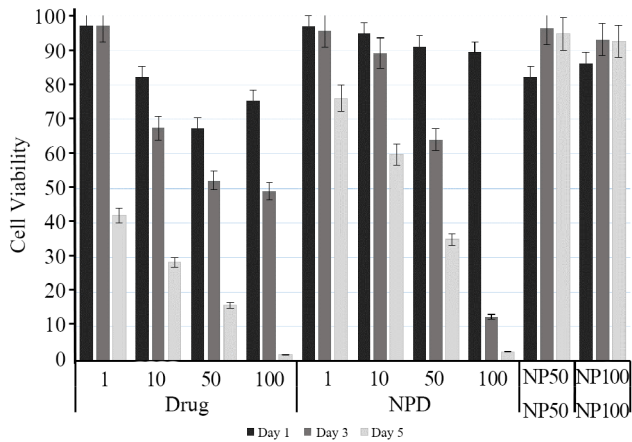
شکل ۹- قابلیت ضدباکتری در برابر *S. aureus*.

Fig. 9. The antibacterial potency against *S. aureus*.

است. برای سامانه دارای دارو با توجه به خواص پادزیستی سامانه و دارو، حلقه بازدارنده رشد افزایش یافته است. همچنین، با مقایسه نتایج حاصل از دو باکتری *S. aureus* و *E. coli* می‌توان نتیجه گرفت، اثر سامانه نانوذره دارای دارو روی *S. aureus* بیشتر است.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی باکتری دارو

در شکل‌های ۹ و ۱۰ نتایج حداقل غلظت بازدارندگی رشد باکتری (MIC) و حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC) نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل ۹ مشخص است، مقدار جذب باکتری متناسب با غلظت دارو کاهش یافته است. در غلظت $1 \mu\text{g/mL}$ اولین شکستگی مربوط به حداقل غلظت بازدارندگی رشد باکتری است که با چشم غیرمسلح نیز تیرگی در این غلظت در نمونه‌ها دیده نمی‌شود. با افزایش غلظت از $8 \mu\text{g/mL}$ شیب منحنی به طور ناگهانی کاهش یافته که نشانگر شروع فعالیت کشندگی باکتری است. بنابراین، غلظت $8 \mu\text{g/mL}$ حداقل غلظت کشندگی باکتری *S. aureus* است. در شکل ۱۰ نیز مقدار جذب باکتری *E. coli* متناسب با غلظت کاهش یافته است. غلظت $4 \mu\text{g/mL}$ براساس تیرگی ظاهری و نیز با توجه به شروع کاهش جذب، حداقل غلظت بازدارندگی است. در غلظت $10 \mu\text{g/mL}$ از دارو، شیب منحنی به طور ناگهانی کاهش یافته که نشانگر شروع

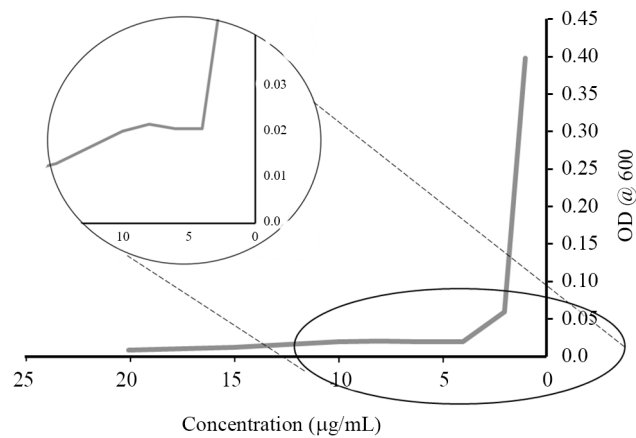


شکل ۱۱- نتایج آزمون MTT: دارو در غلظت‌های ۱، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ µg/mL و نانوذرات بارگذاری شده با غلظت‌های ۱، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ µg/mL، نانوذرات NP50 با غلظت ۵۰ µg/mL و نانوذرات NP100 با غلظت ۱۰۰ µg/mL.

Fig. 11. MTT assay results: Drug in 1,10,50,100 µg/mL concentrations, NP50 nanoparticle in 50 µg/mL concentration, and NP100 nanoparticle in 100 µg/mL concentration.

ترتیب به ۲۸/۵۳، ۱۶/۰۳ و ۱/۷٪ در روز پنجم رسیده است. کاهش زنده‌مانی نشانگر سمیت شایان توجه در غلظت‌های زیاد داروست. در گروه‌های نانوذرات دارای دارو در روز اول با توجه به مقدار زیاد رهایش انفجاری در ۱۲ h اولیه، سمیت شایان توجهی دیده نمی‌شود. تا روز سوم، روند افزایشی زنده‌مانی وجود دارد که می‌تواند ناشی از غلبه سرعت رشد به سرعت مرگ باشد. اما در روزهای بعدی با افزایش غلظت، قابلیت زنده‌مانی سلول‌ها با روند وابسته به غلظت، کاهش می‌یابد. در حداقل غلظت نانوذرات دارای دارو (۱ µg/mL) در روز پنجم درصد زنده‌مانی سلولی حدود ۷۶٪ است که این مقدار با افزایش غلظت در این روز در غلظت‌های ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ µg/mL به ترتیب ۵۹/۶۶٪، ۳۵/۱۴ و ۲/۶۶٪ و به‌طور معناداری ($P_{value} < 0.05$) کاهش یافته است.

از آنجا که رهایش از نانوحامل، رهایش آهسته و کترلی است، با مقایسه نمودارهای نانوذرات دارای دارو در غلظت‌های مختلف در سه بازه زمانی ۱، ۳ و ۵ روز مشخص می‌شود، با گذشت زمان مقدار داروی بیشتری از نانوذرات در محیط آزاد می‌شود که به مرور مقدار زنده‌مانی را کاهش می‌دهد. پس می‌توان انتظار داشت، پس از تزریق نانوذرات به سامانه گردش خون، رهایش انفجاری رخ ندهد که به



شکل ۱۰- قابلیت ضدباکتری در برابر *E. coli*.
Fig. 9. The antibacterial potency against *E. coli*.

مطالعات سلولی

بررسی زنده‌مانی سلولی با آزمون MTT

برای بررسی اثر رهایش داکسیسایکلین بر تکثیر و زنده‌مانی سلول‌ها و نیز تأیید سمی نبودن سامانه تهیه‌شده، از آزمون MTT استفاده شد. بدین منظور، سلول‌های فیبروبلاست (NIH3T3) به مدت ۲۴ h کشت داده شده و سپس محلول‌های دارو و نانوذرات با غلظت مشخص به آن اضافه شدند. این آزمون در روزهای ۱، ۳ و ۵ پس از افزودن محلول دارو و نانوذرات انجام گرفت. نتایج حاصل از این آزمون در شکل ۱۱ نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل نیز مشخص است، نانوذرات بدون دارو با دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ µg/mL در مقایسه با گروه کنترل، سمیت شایان توجهی ایجاد نمی‌کنند. همچنین، درصد زنده‌مانی سلول‌ها برای این دو غلظت از نانوذرات بدون دارو در روز پنجم به ترتیب ۹۴/۸ و ۹۲/۶٪ است که تفاوت معناداری ($P_{value} < 0.05$) ندارند. نتایج سمی نبودن نانوذرات تأییدکننده زیست‌سازگاری زیاد پلیمر هیالورونیک اسید-آلئوئورا به‌عنوان یکی از ویژگی‌های مطلوب این سامانه است. نتایج حاصل از روز اول نشانگر مقدار زنده‌مانی تقریباً یکسان در همه گروه‌هاست که می‌تواند ناشی از یکسان و مناسب بودن تعداد سلول کشت داده‌شده در این روز باشد. در گروه‌های دارو با غلظت‌های مختلف، از روز اول تا روز سوم روند افزایشی در زنده‌مانی دیده می‌شود که نشان‌دهنده، روند رشد سلولی ادامه داشته است. سپس از روز سوم به بعد روند رشد سلولی قطع شده و سلول‌ها دچار مرگ از پیش تعیین شده شده‌اند. در واقع، سرعت مرگ سلولی بر رشد سلولی غلبه کرده است. در حداقل غلظت دارو (۱ µg/mL) مقدار زنده‌مانی حدود ۴۲٪ بوده که این مقدار با افزایش غلظت دارو به ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ µg/mL به

حامل دارو تهیه شد. نتایج نشان داد، اندازه ذرات پیش و پس از بارگذاری دارو به ترتیب ۱۱۸ و ۱۷۱ nm است. غلظت $200 \mu\text{g/mL}$ از دارو با مقدار ظرفیت داروی بارگذاری شده $5/43\%$ و بازده بارگذاری $40/14\%$ به‌عنوان غلظت بهینه به‌دست آمد. رهایش دارو در pH برابر $7/4$ ، $93/4\%$ از داروی بارگذاری‌شده را به‌مدت ۱۶ روز با سازوکار رهایش شبه‌فیککی آزاد کرد که نشانگر رهایش آهسته از این سامانه بود. سامانه نانوذره تهیه‌شده دارای خاصیت ضدباکتری روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بود که این خاصیت با توجه به بررسی حلقه بازدارندگی رشد روی باکتری گرم مثبت (*S. aureus*) بیشتر بود. همچنین، بارگذاری دارو در این سامانه این خاصیت را تشدید کرد. سمی‌نبودن سلولی قابل قبول نانوذرات با روش MTT تأیید شد و غلظت $10 \mu\text{g/mL}$ از نانوذرات دارای دارو به‌عنوان غلظت مناسب انتخاب شد. بنابراین، نانوذرات هیالورونیک اسید-آلوئه‌ورای تهیه‌شده به‌عنوان حامل مناسب با خاصیت ضدباکتری و نداشتن سمیت سلولی می‌تواند برای کاربردهای دارورسانی در درمان عفونت‌ها استفاده شوند.

ایجاد سمیت زیاد در سلول‌ها منجر شود. با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان دریافت، اثر سمیت داروی آزادشده از سامانه نانوذره بر سلول‌ها بسیار کمتر از اثر سمیت داروی خالص بر سلول‌هاست. همچنین، اثر سمیت ایجادشده از نانوذرات دارای دارو بیانگر آن است که فعالیت پادزیستی داروی موجود در نانوذرات حفظ شده است. همچنین، نانوذرات دارای دارو با غلظت $10 \mu\text{g/mL}$ با توجه به اثرگذاری دارو و سمیت قابل قبول به‌عنوان غلظت مناسب انتخاب شد. در نتیجه می‌توان گفت، بارگذاری داکسی‌سایکلین در این سامانه موجب اثربخشی دارو، حفظ خاصیت پادزیستی و کاهش سمیت سلولی آن شده است.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، هیالورونیک اسید-آلوئه‌ورا با پیوند استری به‌هم متصل شدند و با استفاده از روش نانوسوب‌دهی سامانه جدید

مراجع

- Couvreux P., Nanoparticles in Drug Delivery: Past, Present and Future, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **65**, 21-23, 2013.
- Chang J.N., Recent Advances in Ophthalmic Drug Delivery, *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems*, Elsevier, 165-192, 2010.
- Bajpai A.K., Shukla S.K., Bhanu S., and Kankane S., Responsive Polymers in Controlled Drug Delivery, *Prog. Polym. Sci.*, **33**, 1088-1118, 2008.
- Singh S., Sharma P.K., Kumar N., and Dudhe R., Biological Activities of Aloe vera, *Int. J. Pharm. Technol.*, **2**, 259-280, 2010.
- Ardizzoni A., Neglia R.G., Baschieri M.C., Cermelli C., Caratozzolo M., Righi E., Palmieri B., and Blasi E., Influence of Hyaluronic acid on Bacterial and Fungal Species, Including Clinically Relevant Opportunistic Pathogens, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **22**, 2329-2338, 2011.
- Pedrosa S.S. and Gama M., Hyaluronic acid and Its Application in Nanomedicine, *Carbohydrates Applications in Medicine*, Gil M.H. (Ed.), 55-89, 2014.
- Misra S., Hascall V.C., Atanelishvili I., Moreno Rodriguez R., Markwald R.R., and Ghatak S., Utilization of Glycosaminoglycans/Proteoglycans as Carriers for Targeted Therapy Delivery, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **2015**, 2015.
- Huang G. and Huang, H., Application of Hyaluronic acid as Carriers in Drug Delivery, *Drug Deliv.*, **25**, 766-772, 2018.
- Yao J., Fan Y., Du R., Zhou J., Lu Y., Wang W., Ren J., and Sun X., Amphoteric Hyaluronic acid Derivative for Targeting Gene Delivery, *Biomaterials*, **31**, 9357-9365, 2010.
- Fan X., Zhao X., Qu X., and Fang J., pH Sensitive Polymeric Complex of Cisplatin with Hyaluronic acid Exhibits Tumor-Targeted Delivery and Improved In Vivo Antitumor Effect, *Int. J. Pharm.*, **496**, 644-653, 2015.
- Gratieri T., Gelfuso G.M., Rocha E.M., Sarmiento V.H., de Freitas O., and Lopez R.F.V., A Poloxamer/Chitosan In Situ Forming Gel with Prolonged Retention Time for Ocular Delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **75**, 186-193, 2010.
- Liu E., Zhou Y., Liu Z., Li J., Zhang D., Chen J., and Cai Z., Cisplatin Loaded Hyaluronic Acid Modified TiO_2 Nanoparticles for Neoadjuvant Chemotherapy of Ovarian Cancer, *J. Nanomater.*, **2015**, DOI: org/10.1155/2015/390358.

13. Hamman J., Composition and Applications of Aloe vera Leaf Gel, *Molecules*, **13**, 1599-1616, 2008.
14. Ahlawat K.S. and Khatkar B.S., Processing, Food Applications and Safety of Aloe vera Products: A Review, *J. Food Sci. Technol.*, **48**, 525-533, 2011.
15. Heinze T., Liebert T., and Koschella A., *Esterification of Polysaccharides*, Springer Science and Business Media, 2006.
16. Alshamsan A., Nanoprecipitation is More Efficient than Emulsion Solvent Evaporation Method to Encapsulate Cucurbitacin I in PLGA Nanoparticles, *Saudi Pharm. J.*, **22**, 219-222, 2014.
17. Raval J.P., Naik D.R., Amin K.A., and Patel P.S., Controlled-Release and Antibacterial Studies of Doxycycline-Loaded Poly(ϵ -caprolactone) Microspheres, *J. Saudi Chem. Soc.*, **18**, 566-573, 2014.
18. Misra R., Acharya S., Dilnawaz F., and Sahoo S.K., Sustained Antibacterial Activity of Doxycycline-Loaded Poly(D,L-lactide-co-glycolide) and Poly(ϵ -caprolactone) Nanoparticles, *Nanomedicine*, **4**, 519-530, 2009.
19. Gasque K.C.D.S., Al-Ahij L.P., Oliveira R.C., and Magalhães A.C., Cell Density and Solvent are Critical Parameters Affecting Formazan Evaluation in MTT Assay, *Braz. Arch. Biol. Technol.*, **57**, 381-385, 2014.
20. Krokida M., Giannoukos K., Agalioiti M., Mandala I., and Pappa A., Quality Characteristics of Dried Aloe, *European Drying Conference*, 26-28, 2011.
21. Nejatizadeh-Barandozi F. and Enferadi S.T., FT-IR Study of the Polysaccharides Isolated from the Skin Juice, Gel Juice, and Flower of Aloe vera Tissues Affected by Fertilizer Treatment, *Org. Med. Chem. Lett.*, **2**, 33, 2012.
22. Lim Z.X. and Cheong K.Y., Effects of Drying Temperature and Ethanol Concentration on Bipolar Switching Characteristics of Natural Aloe vera-based Memory Devices, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **17**, 26833-26853, 2015.
23. Domingues R.M., Silva M., Gershovich P., Betta S., Babo P., Caridade S.G., Mano J.F., Motta A., Reis R.L., and Gomes M.E., Development of Injectable Hyaluronic acid/Cellulose Nanocrystals Bionanocomposite Hydrogels for Tissue Engineering Applications, *Bioconjugate Chem.*, **26**, 1571-1581, 2015.
24. Heinze T., Liebert T.F., Pfeiffer K.S., and Hussain, M.A., Unconventional Cellulose Esters: Synthesis, Characterization and Structure-Property Relations, *Cellulose*, **10**, 283-296, 2003.
25. Hussain M.A., Shahwar D., Hassan M.N., Tahir M.N., Iqbal M.S., and Sher M., An Efficient Esterification of Pullulan Using Carboxylic acid Anhydrides Activated with Iodine, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **75**, 133-143, 2010.
26. Cuenca A.G., Jiang H., Hochwald S.N., Delano M., Cance W.G., and Grobmyer S.R., Emerging Implications of Nanotechnology on Cancer Diagnostics and Therapeutics, *Cancer*, **107**, 459-466, 2006.
27. Misra R. and Sahoo S.K., Antibacterial Activity of Doxycycline-Loaded Nanoparticles, *Methods Enzymol.*, **509**, 61-85, 2012.