

Preparation and Evaluation of Physicochemical and Antimicrobial Properties of Biological Nanostructures Polyolactic Acid / Calcium Oxide by Hydrothermal Assisted Microwave Method

Mohammad Hasan Moshafi¹, Mehdi Ranjbar^{*2}, Zahra Zeinalizadeh Rafsanjani³, Fatemeh Mehrabi⁴

1. Professor of Pharmaceutics Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
2. Assistant professor of Pharmaceutics Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
3. Graduate of General Pharmacy, Student research committee, Kerman university of medical sciences, Kerman, Iran
4. Student of General Pharmacy, Student research committee, Kerman university of medical sciences, Kerman, Iran

doi [10.30699/ijmm.14.3.1](https://doi.org/10.30699/ijmm.14.3.1)



ABSTRACT

Background: Today, with the development of human life and the overwhelming fall of antibiotics and uncontrolled bacterial resistance, the need to find materials with antimicrobial effects is felt more than ever. Nanotechnology has created a new opportunity to investigate the antimicrobial effects of nanomaterials.

Materials & Methods: In this study, using hydrothermal and microwave auxiliary chemicals, polyolactic acid / calcium oxide nanostructures were prepared and the physicochemical and microbial properties of these nanostructures were evaluated. Bacterial strains were obtained from the Scientific and Industrial Research Organization of Iran, the collection center of industrial microorganisms.

Results: Physicochemical characterization of optimized polyolactic acid / calcium oxide nanostructures showed the antimicrobial effect of nanoparticles on 3 strains gram-positive bacteria *Micrococcus luteus* (PTCC 1110), *Bacillus subtilis* (PTCC 1023), *Staphylococcus aureus* (PTCC 1112) and 4 strains gram-negative bacteria *Escherichia coli* (PTCC 1330), *Klebsiella pneumonia* (PTCC 1053), *Serratia marcescens* (PTCC 1621), *Pseudomonas aeruginosa* (PTCC 1074). In this study, the observed MIC (minimum growth inhibition concentration) observed for both Gram-positive and Gram-negative bacteria ranged between $0.5 < MIC \leq 8$.

Conclusion: Antimicrobial effect of polyolactic acid / calcium oxide nanostructures was observed on all the mentioned bacteria except *E. coli*. It is recommended to conduct microbial and cellular studies on these nanomaterials.

Keywords: CaO/Polyolactic Acid Nanofibers, Gram Positive and Negative Bacteria, Antibacterial Properties

Received: 2020/03/29; Accepted: 2020/06/14; Published Online: 2020/06/18

Corresponding Information: Mehdi Ranjbar, Assistant professor of Pharmaceutics Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.
Email: Mehdi.Ranjbar@kmu.ac.ir



Copyright © 2020, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online



Moshafi M H, Ranjbar M, Zeinalizadeh Rafsanjani Z, Mehrabi F. Preparation and Evaluation of the Physicochemical and Antimicrobial Properties of Biological Nanostructures Polyolactic Acid / Calcium Oxide by Hydrothermal Assisted Microwave Method. Iran J Med Microbiol. 2020; 14 (3) :224-240

Download citation: [BibTeX](#) | [RIS](#) | [EndNote](#) | [Medlars](#) | [ProCite](#) | [Reference Manager](#) | [RefWorks](#)

Send citation to:  [Mendeley](#)  [Zotero](#)  [RefWorks](#)

Introduction

A biological system can shrink to an infinite size and still maintain its former performance and even add new applications in fact, there are many small cells that are known to be very active in spite of their small dimensions, producing

various materials and doing various tasks on their own. This philosophy is one of the starting points for inspiration in nanoscience (1-3). In the recent years, nanotechnology and nanotechnology have begun to make dramatic changes in

various sciences, especially medical sciences. It can be widely said that the science and engineering of nanotechnology is defined as the design, fabrication, characterization and application of materials and tools that are particles ranging from a few nanometers to hundreds of nanometers in size (4-6). The overall definition of nanoparticles refers to particles in the range of 1 to 100 nm (7). These particles are designed to exhibit new, specially controlled properties of their raw material in the usual size, which results from precise control over their fabrication process.

One of the most important issues in drug delivery systems and the science of pharmaceuticals is improving drug targeting for specific cells and reducing drug accumulation in cells, as high amounts are not necessary for a good function and might be toxic as well (8,9). This is often because the size of commonly used drug molecules is ten times larger than the size of a red blood cell and so the drug penetrates the cells far less than expected and as a result, we will have to increase the dosage or frequency of use to achieve our goals, which can lead to more toxicity and unintended side effects (10,11). Nowadays, by the use of nanomedicine, targeted drug delivery, reduced toxicity and consequently increased efficacy of antimicrobial drugs at lower concentrations have been achieved (10,13,14). On the other hand, in the treatment of infectious diseases, bacterial resistance to newer antibiotics has always been important, and bacterial resistance will lead to increased doses of antibiotics, increased medication to antimicrobial regimens, increased hospitalization and finally, the mortality rate of hospitalized patients will increase (15,16). Treatment of bacterial infections has been a matter of concern in the past until now (17,18). The use of nanotechnology by numerous approaches has so far been identified as one of the most important ways of overcoming bacterial resistance (19-21, 32). Among the things that can be described as a new generation of antibacterial compounds are nanoparticles containing biopolymers such as chitosan (22), nanoparticles containing metals such as Au (23), Ag (24), Mg (25), Cd (26), Bi and Cu (27). Multiple antimicrobial agents are drug bound to nanoparticles (15,16). The necessity of this research is to create nanostructures based on bio polymeric structure with calcium oxide nanoparticles as one of the cheapest nanoparticles for investigation of antimicrobial properties. Also, the use of chemical imaging and microwave radiation as environmentally friendly and cost-effective methods is one of the unique features of this research work. The aim of this study was to synthesize and optimize particle size of calcium oxide nanoparticles loaded with 1%, 0.5% and

0.25 wt% in poly lactic acid with 1%, 0.75% and 0.5 wt% percentage by chemical mimicry and using microwave waves and on 3 gram-positive bacteria evaluation of minimum growth inhibition concentration (MIC) in bacterial strains *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and 4 gram-negative bacteria *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Materials and Methods

Among the materials used in this study, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ as a source of calcium and poly lactic acid was purchased from Kimia Exir in Iran, an importer of German-Indian Merck products. The NaOH used in this study was purchased from Dr. Abidi's laboratory materials company. The distilled water used was provided by the Ab Ban company. To investigate the properties of nanostructures from X-ray machine of Kashan University with (Rigaku D-max C III X-ray) specifications. Scanning electron microscopy (LEO 1455VP) was also used at Razi Metallurgical Research center for imaging nanostructures. Nanoparticle tests were performed at Dr. Ranjbar's pharmaceutical nanomaterials and nanostructures laboratory as well as antibacterial tests at Dr. Moshafi's microbiology laboratory at Kerman university of medical sciences.

Synthesis of Cao/PLA nanocomposites

For preparation of PLA/CaO nanocomposites, the dry powder of the nanoparticles synthesized from the preceding steps were blended together as follows.

Sediments from calcium oxide weighing 0.25 grams and sediments from polyolactic acid weighing 0.5 grams, sediments from calcium oxide weighing 0.5 grams and sediments from polyolactic acid weighing 0.75 grams and sediments from calcium oxide weighing 1 g and sediments from polyolactic acid weighing 1 g were mixed and the synthesized nanocomposites were named A₁, A₂ and A₃, respectively. The precipitate mixture was refluxed with 10 ml of the 1: 2 ratios of dimethylformamide (DMF) and water for 30 min at 50 ° C with magnetic stirrer. The mixture was placed in a microwave oven at 300 W for 15 minutes with 1: 2 on-off cycles and the final precipitate was collected from the filter paper dry. Table 1 shows in vitro conditions for making calcium-containing polyelactic acid nanoparticles.

Table 1. In vitro conditions for the production of CaO/PLA nanoparticles

Sample	Nanoparticle	PLA (g)	CaO (g)	DMF: H ₂ O (ml)	pH	Temp (°C)
1	A ₁	0.5	0.25	20	8-9	50
2	A ₂	0.75	0.5	20	8-9	50
3	A ₃	1	1	20	8-9	50

Preparation of Half McFarland Solution

First, 0.5 mL of two hydrated barium chloride was prepared at a concentration of 1.175 wt.% in 1% sulfuric acid. The constant stirring turned out to be a one-stop suspension. The solution density was measured using optical absorption measurement in spectrophotometer with 1 cm optical path length equal to 1.5. The 5 ml solution was poured into coiled tubes the same size as the bacterial suspension tubes and kept in space. The solution was examined before each use for the presence of large particles with the naked eye and then stirred vigorously to create a uniform opacity. Suspension that is similar to the half-McFarland solution for opacity is 1.5×10^8 microorganisms.

Preparation of Muller Hinton agar and Muller Hinton broth culture medium

The 7.6 g of powder was mixed with 200 ml distilled water and then dissolved by heat and continued heating until the solution was clear. It was then removed by pipette, 18 ml of this medium, poured into large reflux tubes and sterilized by autoclaving at 121°C and a pressure of 15 pounds per square inch for 15 minutes. After sterilization, the medium was synthesized with two millimeters of the mixture and the molar Hinton broth medium prepared in various dilutions. It was then removed by pipette, 18 ml of this medium, poured into large reflux tubes and sterilized by autoclaving at 121°C and a pressure of 15 pounds per square inch for 15 minutes. After sterilization, the medium was synthesized with two millimeters of the mixture and the molar Hinton broth medium prepared in various dilutions. To prepare this medium, the culture was poured 1/2 g of the powder in 100 ml of distilled water and stirred until the powder was completely dissolved. Then, two millimeters of the prepared medium was poured into small flask tubes

and sterilized by autoclaving at 121°C for 15 minutes at a pressure of 15 pounds per square inch. Mulberry Hinton agar medium was sterilized in autoclave, poured into 18 ml large test tubes. The dilutions of the 2 ml sample were mixed with a well of melt medium and transferred to a plate. Thus, the final dilutions in the plates were 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 and 64 µg/mL. Positive and negative control plates were also prepared on the back of the plates before labeling clearly for the concentration of antimicrobial agent and the culture location of each microbe. Bacteria that were cultured 24 h in the remaining 7 tubes containing 2 mL of Müller Hinton broth were microbial suspensions similar to 0.5 McFarland's solution in opium. For this purpose, the loops were sterilized each time by the flame and after that the temperature was lowered to the point that it did not harm the living bacteria, the colonies were removed and dispersed well in a liquid fist medium.

Results

The X-ray diffraction pattern of a sample of calcium oxide-containing polylactic acid nanoparticles is shown in Figure 1. The peaks that determine and confirm the structure of the nanoparticles are clearly identified in the spectrum. Using the Debar Shear equation, the particle size can be calculated from the following equation:

$$D_c = K\lambda / \beta \cdot \cos\theta \quad \text{Equation 1}$$

Where θ is the X-ray diffraction angle, $K\lambda$ denotes the wavelength of the beam at a constant whose value is 0.9. And the number in d_c estimates the diameter of calcium-containing polyelectric acid crystalline nanostructures at about 150 nm.

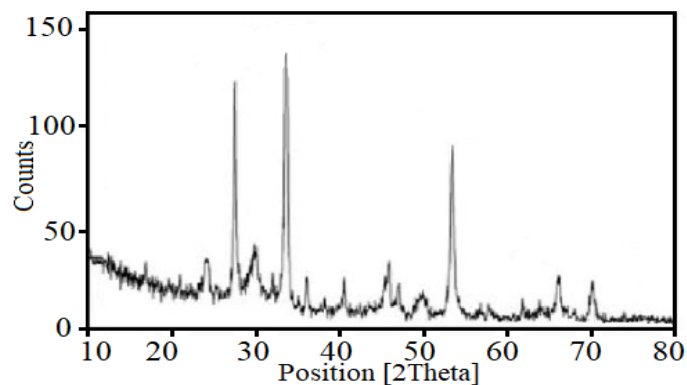


Figure 1. X-ray diffraction pattern of calcium-containing polylactic acid crystalline nanostructures

To study the exact size of nanostructures, dynamic light scattering (DLS) technique was used to accurately measure the size of the light scattering particles. The

nanoparticles prepared are shown in Figure 2, which confirms the approximate size of the nanoparticles in the range of 150 to 450 nm.

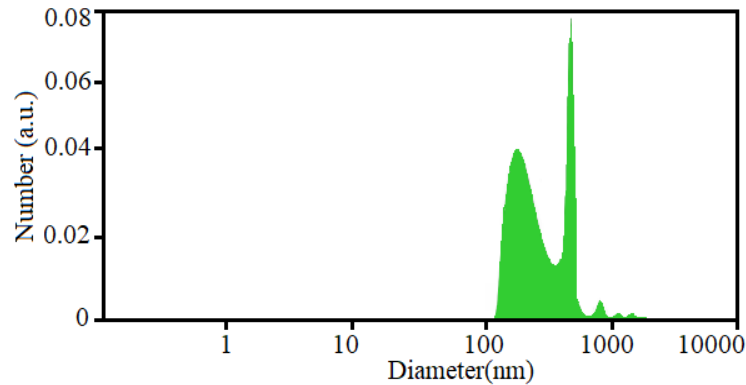


Figure 2. DLS diagram of CaO/PLA nanostructures

To investigate the surface structure and shape characteristics of nanostructures, imaging was performed using scanning electron microscopy. The

results of scanning electron microscopy images for samples A₁, A₂ and A₃ are shown in Figures 3a, 3b and 3c, respectively.

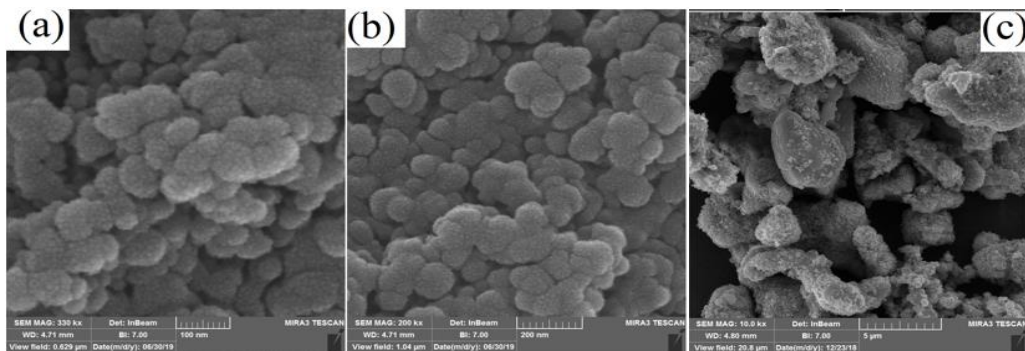


Figure 3. SEM images for A₁, A₂ and A₃ samples of CaO/PLA nanostructures

Infrared spectroscopy (FT-IR) was used to identify the functional groups and interconnections formed. The infrared spectrum of the nanocomposites is shown in Figure 4. The wavelengths appearing in the region of 3500 cm⁻¹ are related to the O-H group hydroxide bonds in the structure. C-C bonds appear at wavelengths of about 2920 cm⁻¹ and 2850 cm⁻¹. The C

= O bonds present in the polymer base structure of polylactic acid in the region of 1617 cm⁻¹ are shown in the FT-IR infrared spectrum. The presence of Ca-O metal bonds on the polylactic acid substrate in the area below 1000 cm⁻¹ is shown as weak peaks.

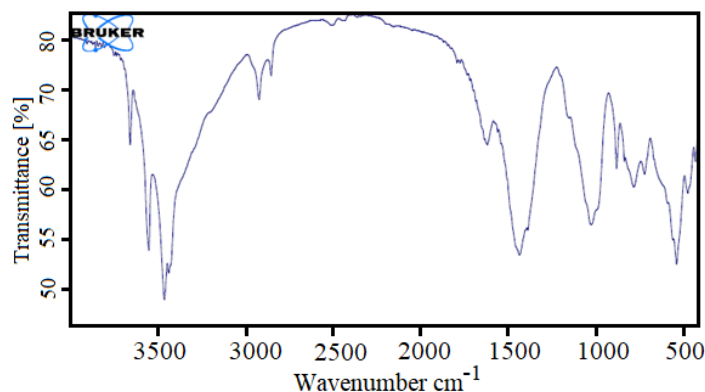


Figure 4. FT-IR spectrum of CaO/PLA nanostructures related to A₁

MIC method was used to investigate the antimicrobial effects of the synthesized compounds. In the MIC results tables, the positive sign indicates growth and the negative sign indicates bacterial growth. Table 2 shows the antimicrobial effects of A₁ nanoparticles using the MIC method. Also, positive control of the culture medium without microbial

inoculation and negative control of the culture medium without microbial inoculation were simultaneously included in all experiments. Figure 5 shows the comparison of the minimum growth inhibitory concentration in all three nanocomposites.

Table 2. Results of standard bacterial growth at 8 different concentrations of A₁ nanoparticles

Concentration Bacteria	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0.5 µg/ml
<i>E.coli</i>	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>S. marcescens</i>	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>M. luteus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
Control +	+	+	+	+	+	+	+	+
Control -	-	-	-	-	-	-	-	-

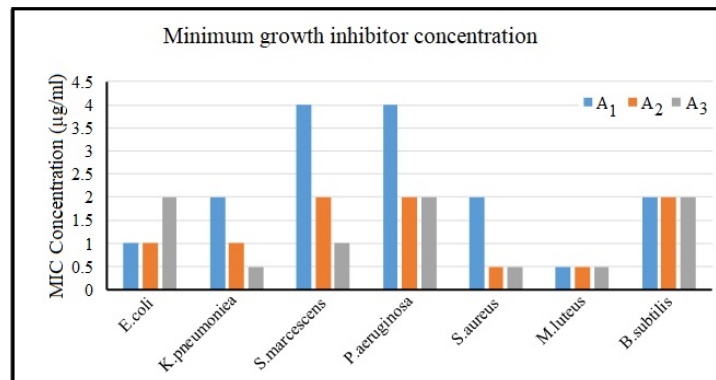


Figure 5. Comparison of growth inhibitory concentration in all three nanocomposites

Discussion

In recent years, the study on the antimicrobial properties of metal oxide has shown promising results. In this study, the optimum nanostructures were selected by particle size and morphology by structural optimization and phase determination. As can be seen in the light diffraction graph of the CaO/PLA crystal nanostructures, the peak has become ring-shaped, confirming the existence of a normal and uniform particle size distribution, which is in clear agreement with the SEM images. The best morphology and uniformity of particle size in A₁ nanostructures can also be observed through scanning electron microscopy. And this sample is selected as the optimal sample. Investigation of

infrared spectroscopic spectra also shows the loading of calcium oxide nanoparticles in polymeric structures. In line with these studies, it has been observed that biopolymeric polymeric nanostructures containing calcium oxide made by chemical and microwave and hydrothermal synthesis have synergistic effects on *Escherichia coli* strains, *Lactobacillus plantarum*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus aureus*. And they have good antimicrobial properties. Ciprofloxacin as a modern antibiotic is effective against most gram-positive and gram-negative microorganisms and is a good positive test for this test. *Pseudomonas aeruginosa* 0.5 µg/mL ≤ MIC < 1µg/mL, *Streptococcus pyogenes* 0.5 µg/mL IC MIC < 1µg/mL, *Serratia* and *Klebsiella* 0.25 MIC ≤, *Staphylococcus epidermidis* 1 µg/mL ≤ MIC <2 µg/mL,

Luteus is $8 \mu\text{g/mL}$ $< \text{MIC} \leq 16 \mu\text{g/mL}$, bacillus $\text{MIC} > 64 \mu\text{g/mL}$, which has fewer positive effects on gram-positive bacteria than the results obtained in this study. In 2014, a study on the antimicrobial properties of Copaiba oil showed that pyrrolidone and polylactic acid increased the amount of oil released from the polymer substrate and compared to our work, the results of this article on bacterial strains have received a weaker antibacterial response (28). In 2007, it was observed that a composite made of pectin polymer and polylactic acid produced a heterogeneous biphasic structure that could be observed by electron microscopy and was able to inhibit the growth of *Lactobacillus plantarum* and concluded that it can be suitable for the packaging industry (29). In addition, another study in 2018 found that the combination of cinnamon, silver nanoparticles, cobalt and antimicrobial agents such as ciprofloxacin increased the antimicrobial effects, therefore, the applications of this polymer in wound healing and drug release can be of more interest (30). Previously used in a study of polycrystalline acid / silicon / calcium carbonate membrane composite containing mercapto groups (PSC-SH) to investigate the antibacterial and stimulating properties of osteoblast activity. This compound owes its properties mainly to the mercapto group, but this study has also shown that polylactic acid polymer can be a significant substrate for material release (31). In the present study, we tried to compare the microbial effects by combining different concentrations of calcium oxide metal nanoparticles in the polymeric lactic acid as a substrate. As the MIC results show, all concentrations had inhibitory effects on the 7 bacterial strains. However, this inhibition did not follow a fixed pattern.

In one study, three different concentrations of calcium oxide nanoparticles were synthesized by microwave and combined with three different concentrations of polymer nanostructures using aqueous solvent-aqueous (hydrothermal) method with specific ratios. Structural and morphological

identification were performed with SEM and XRD analysis. All of the synthesized nanoparticles were nanometer sized, but differed in dispersion and surface properties and the particle size distribution followed the normal distribution. The nanoparticle diameter measurements were confirmed by dynamic scattering of light by electron microscopy images. At all concentrations, inhibitory effects of growth on the tested bacteria were observed. There was no difference in the effect of nanocomposite on gram positive and negative bacteria in the tests. For Gram-positive *Bacillus subtilis* bacteria the MIC range remained constant with increasing percentage of calcium oxide and observed no effect of increasing antimicrobial concentration. Also, for gram-negative bacteria *Escherichia coli*, the antimicrobial effect decreased with increasing percentage of calcium oxide. It seems that this compound can be studied for wound healing formulations.

Conclusion

Bio-lactic acid / calcium oxide nanostructures with nanoscale sizes are highly capable of destroying nosocomial microbes and can be used as a highly effective synthetic antibiotic in the pharmaceutical industry.

Acknowledgment

We would like to thank Kerman University of Medical Sciences, Pharmaceutics Research Center as well as the Student Research Committee of Kerman University for their contribution to this research project.

Conflict of Interest

Authors declared no conflict of interests.



تهیه و ارزیابی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و ضد میکروبی نانوساختارهای زیستی پلی لاکتیک اسید/کلسیم اکساید به روش کمکی هیدروترمال و مایکروویو

محمد حسن مصحفی^۱، مهدی رنجبر^{۲*}، زهرا زینلی زاده رفسنجانی^۳، فاطمه مهرابی^۴

۱. پروفیسور، عضو هیات علمی مرکز تحقیقات فارماسیوتیکس، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
۲. استادیار، عضو هیات علمی مرکز تحقیقات فارماسیوتیکس، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
۳. فارغ التحصیل داروسازی عمومی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
۴. دانشجوی داروسازی عمومی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: امروزه همگام با توسعه زندگی بشر و افتاده ی بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها و مقاومت کنترل نشده باکتریایی نیاز به یافتن مواد با تاثیرات ضد میکروبی بیش از هر زمانی احساس می‌شود. تکنولوژی نانو فرصت جدید برای بررسی تاثیرات ضد میکروبی مواد در ابعاد نانو ایجاد کرده است.

مواد و روش کار: در این مطالعه با استفاده از روش شیمیایی کمکی هیدروترمال و مایکروویو نانوساختارهای پلی لاکتیک اسید/کلسیم اکساید تهیه و خصوصیات فیزیکوشیمیایی و میکروبی این نانوساختارها مورد ارزیابی قرار گرفت. سوبه‌های باکتریایی از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی تهیه شد.

یافته‌ها: خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوساختارهای پلی لاکتیک اسید/کلسیم اکساید بهینه‌شده نشان داد که اثر ضد میکروبی نانوذرات بر روی ۳ سوبه باکتری گرم مثبت میکروکوکوس لوتنوس (PTCC 1110)، باسیلوس ساب‌تیلیس (PTCC 1023)، استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1112) و ۴ سوبه باکتری گرم منفی اشریشیا کولی (PTCC 1330)، کلبسیلا پنومونیه (PTCC 1053)، سریشیا مارسنس (PTCC 1621)، سودوموناس آئروژینوزا (PTCC 1074) مشاهده شد. در این مطالعه، MIC (بررسی حداقل غلظت مهار رشد) مشاهده شده برای هر دو گروه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بین محدوده $0.15 < MIC \leq 8$ قرار می‌گیرد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهند اثر ضد میکروبی نانوساختارهای پلی لاکتیک اسید/کلسیم اکساید بر روی تمامی باکتری‌های ذکر شده به غیر از باکتری اشریشیا کولی مشاهده شد. پیشنهاد می‌گردد مطالعات میکروبی و همچنین سلولی بر روی این نانومواد انجام شود.

کلید واژه‌ها: نانوکامپوزیت‌های Poly(lactic acid)/CaO، باکتری‌های گرم مثبت و منفی، خاصیت ضد میکروبی

کپی‌رایت © مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۱۰

پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۲۵

انتشار آنلاین: ۱۳۹۹/۰۳/۲۹

موضوع:

نانو بیوتکنولوژی در پزشکی

نویسنده مسئول:

مهدی رنجبر، استادیار، عضو هیات علمی مرکز تحقیقات فارماسیوتیکس، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
ایمیل: Mehdi.Ranjbar@kmu.ac.ir

مقدمه

گرفتن در علم نانو محسوب می‌شود (۱-۳). در سال اخیر نانوتکنولوژی و نانومهندسی شروع به ایجاد تغییرات چشمگیری در علوم مختلف علی‌الخصوص علوم پزشکی کرده است. به صورت گسترده می‌توان گفت که علم و مهندسی طراحی، ساخت، تعیین ویژگی و کاربرد مواد و ابزاری که به‌عنوان ذراتی با ابعادی از چند نانومتر تا تا صدها نانومتر اندازه دارند نانوتکنولوژی تعریف می‌شود

یک سیستم بیولوژیکی می‌تواند به اندازه بی‌نهایت کوچک شود و همچنان کارایی پیشین خود را حفظ کند و حتی کاربردهای جدیدی نیز به آن اضافه گردد. در واقع سلول‌های بسیار کوچک زیادی وجود دارند که با وجود داشتن ابعاد بسیار ریز کاملاً فعال شناخته می‌شوند، مواد مختلفی تولید می‌کنند و کارهای گوناگونی را به‌تنهایی انجام می‌دهند، این فلسفه یکی از نقاط آغازین برای الهام

نانو ذرات اکسید کلسیم به عنوان یکی از ارزانه ترین نانوذرات به منظور بررسی خواص ضد میکروبی است. همچنین استفاده از روش شیمیایی مایسلایسیون و تاب شده امواج ماکروویو به عنوان روش های دوستدار محیط زیست و مقرون به صرفه از جمله ویژگی های منحصر به فرد این کار تحقیقاتی است. هدف از انجام این تحقیق، سنتز و بهینه سازی اندازه ذره های نانوذرات اکسید کلسیم بارگذاری شده با غلظت های ۰.۱٪، ۰.۵٪ و ۰.۲۵٪ وزنی در پلی لاکتیک اسید با درصد های وزنی ۰.۱٪، ۰.۷۵٪ و ۰.۵٪ به روش شیمیایی مایسلایسیون و استفاده از امواج ماکروویو و بررسی حداقل غلظت مهار رشد (در صورت وجود چنین خاصیتی) در سویه های باکتریایی *Serratia marcescens*, *staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Klebsiella pneumoniae* است.

روش پژوهش

از جمله مواد مورد استفاده در این تحقیق شامل $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ به عنوان منبع کلسیم و ماده پلی لاکتیک اسید از شرکت کیمیا اکسیر در ایران که وارد کننده محصولات مرک آلمان-هند است خریداری شد. NaOH مصرف شده در این تحقیق از شرکت مواد آزمایشگاهی دکتر عبیدی خریداری شد. آب مقطر استفاده شده از شرکت آب مقطرگیری آب بان تهیه شد. به منظور بررسی خواص نانوساختارها از دستگاه اشعه ایکس دانشگاه کاشان با مشخصات (Rigaku D-max C III X-ray) استفاده شد. همچنین از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی با مشخصات (LEO 1455VP) در مرکز تحقیقات متالورژی رازی برای تصویر برداری نانوساختارها استفاده شد. تست های ساخت نانوذرات در آزمایشگاه نانومواد دارویی و نانوساختارها دکتر رنجبر و همچنین تست های آنتی باکتریال در آزمایشگاه میکروبیولوژی دکتر مصحفی در دانشگاه علوم پزشکی کرمان انجام شد.

روش سنتز نانوکامپوزیت پلی لاکتیک اسید حاوی کلسیم اکساید

برای ساخت نانوکامپوزیت PLA/CaO، پودر خشک نانوذرات سنتز شده از مراحل قبل را به ترتیب زیر با هم مخلوط شدند.

رسوبات حاصل از کلسیم اکساید با وزن ۰/۲۵ گرم و رسوبات حاصل از پلی لاکتیک اسید با وزن ۰/۵ گرم، رسوبات حاصل از کلسیم اکساید با وزن ۰/۵ گرم و رسوبات حاصل از پلی لاکتیک اسید با وزن ۰/۷۵ گرم و رسوبات حاصل از کلسیم اکساید با وزن ۱ گرم و رسوبات حاصل از پلی لاکتیک اسید با وزن ۱ گرم را با هم

(۶-۴). در تعریف کلی نانو ذرات به ذرات محدوده ۱ تا ۱۰۰ نانومتر نانوذرات گفته می شود (۷). این ذرات طراحی می شوند که خواص جدید به خصوص و کنترل شده ای را از ماده اولیه خود در سایز معمول به نمایش بگذارند که این خواص در نتیجه کنترل دقیق بر فرایند ساخت آنها به دست می آید. یکی از موارد بسیار مهم در سیستم های دارورسانی و علم فارماسیوتیکس همواره بهبود هدف گذاری دارورسانی برای سلول های خاص و کاهش تجمع دارو در سلول های بیست که نه تنها به آن هیچگونه نیازی ندارند بلکه حتی وجود دارو در آن سلول ها می تواند اثرات سمی برای آن سلول به همراه داشته باشد (۸، ۹). این امر غالباً به این دلیل اتفاق می افتد که اندازه مولکول های دارویی که به صورت معمول مورد استفاده قرار می گیرند، ده برابر بزرگتر از اندازه سلولی مثل گلبول قرمز است و به این ترتیب نفوذ دارو به سلول ها خیلی کمتر از آنچه مورد انتظار است انجام می شود و در نتیجه برای رسیدن به اهداف مد نظر ناچار به افزایش دوز مصرفی و یا دفعات مصرفی خواهیم بود که این خود موجب سمیت بیشتر و ایجاد عوارض ناخواسته می شود (۱۰، ۱۱).

امروزه به وسیله آنچه که به کمک استفاده از علم نانوپزشکی، میکروبی شناسی و درمان در دسترس داریم تلاش می شود که دارورسانی هدفمند (۱۲)، کاهش سمیت و در نتیجه افزایش کارایی داروهای ضد میکروبی در غلظت های هر چه کمتر محقق شود (۱۰، ۱۳، ۱۴). از طرف دیگر در امر درمان بیماری های عفونی مقاومت باکتریال نسبت به آنتی بیوتیک های جدیدتر همواره موضوع حائز اهمیتی بوده و خواهد بود چرا که مقاومت باکتریال منجر به افزایش دوز آنتی بیوتیک های مصرفی، افزایش دارو به رژیم های درمانی ضد میکروبی، افزایش مدت بستری شدن در بیمارستان و در نهایت افزایش مرگ و میر بیماران بستر در بخش عفونی خواهد شد (۱۵، ۱۶). از گذشته تا کنون درمان عفونت های باکتریایی به عنوان موضوعاتی نگران کننده به حساب می آمده اند (۱۷، ۱۸).

استفاده از نانوتکنولوژی به وسیله رویکردهای متعددی که تا به حال مشخص شده اند یکی از روش های بسیار مهم غلبه بر مقاومت باکتریایی است (۱۹-۲۱). از جمله مواردی که می توان به عنوان نسل جدید ترکیبات آنتی باکتریال نام برد به صورت خلاصه شامل نانوذرات حاوی پلیمرهای زیستی مثل کیتوزان (۲۲)، نانوذرات حاوی فلزاتی مانند طلا (۲۳)، نقره (۲۴)، منیزیم (۲۵)، کادمیوم (۲۶)، بیسموت و مس (۲۷)، عوامل چندگانه ضد میکروبی دارویی متصل شده به نانوذرات هستند (۱۵، ۱۶). ضرورت این تحقیق ایجاد نانوساختارهایی که در پایه پلیمرزیستی پلی لاکتیک اسید به همراه

سیکل‌های روشن-خاموش ۱:۲ قرارگرفت و رسوب نهایی از روی کاغذ صافی به صورت خشک شده جمع‌آوری شد. جدول ۱ شرایط آزمایشگاهی برای ساخت نانوذرات پلی لاکتیک اسید حاوی کلسیم را نشان می‌دهد.

مخلوط شد و نانوکامپوزیت‌های سنتز شده را به ترتیب A1، A2 و A3 نام‌گذاری شدند. مخلوط رسوبات با ۱۰ میلی‌لیتر از مخلوط دی‌متیل‌فرمامید و آب با نسبت ۱:۲ در مدت زمان ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سلسیوس با کمک همزن مغناطیسی رفلکس شد و مخلوط در مایکروویو با توان ۳۰۰ وات و مدت زمان ۱۵ دقیقه با

جدول ۱. شرایط آزمایشگاهی برای ساخت نانوذرات پلی لاکتیک اسید حاوی کلسیم

شماره آزمایش	نام نانوذره	وزن PLA (گرم)	وزن CaO (گرم)	حجم دی‌متیل‌فرمامید و آب (میلی‌لیتر)	pH	دما (درجه سلسیوس)
۱	A ₁	۰/۵	۰/۲۵	۲۰	۸-۹	۵۰
۲	A ₂	۰/۷۵	۰/۵	۲۰	۸-۹	۵۰
۳	A ₃	۱	۱	۲۰	۸-۹	۵۰

شد و توسط اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و در فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد. محیط کشت مولر هینتون آگار تهیه شده در اتوکلاو استریل گردید، در لوله‌های آزمایش بزرگ به حجم ۱۸ میلی‌لیتر ریخته شدند. رقت‌های تهیه‌شده از نمونه مورد نظر به میزان ۲ میلی‌لیتر را با یک لوله محیط کشت مذاب به خوبی مخلوط کرده و به پلیت منتقل شدند. به این ترتیب رقت‌های نهایی در پلیت‌ها ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲ و ۶۴ میکروگرم در میلی‌لیتر شد. همچنین پلیت‌های کنترل منفی و مثبت نیز تهیه شد. پشت درب پلیت‌ها از قبل از نظر غلظت ماده ضد میکروبی و محل کشت هر میکروب به صورت واضح علامت‌گذاری شده بود. از باکتری‌هایی که ۲۴ ساعت قبل کشت داده شده بودند در ۷ لوله مایع باقی‌مانده که حاوی ۲ میلی‌لیتر از محیط کشت مولر هینتون برات بودند سوسپانسیون میکروبی ساخته شد که از نظر کدروت مشابه محلول ۰/۵ مک‌فارلند بودند. برای این کار لوپ مخصوص در هر بار توسط شعله آتش استریل شد و پس از آن که دمایش به حدی پایین آمد، که به باکتری‌های زنده آسیبی وارد نکند کلونی‌های مورد نظر برداشته شدند و در محیط کشت مایع به خوبی پراکنده شدند.

یافته‌ها

الگوی پراش اشعه ایکس نمونه نانوذرات تهیه شده از پلی لاکتیک اسید حاوی کلسیم اکساید در شکل ۱ مشاهده می‌شود. پیک‌های تعیین‌کننده و تأییدکننده ساختار نانو ذرات به وضوح در طیف مشخص شده است. با استفاده از معادله دباي شرر می‌توان اندازه ذرات را از طریق معادله زیر حساب کرد:

$$D_c = K\lambda/\beta \cdot \cos\theta \quad \text{معادله ۱}$$

روش تهیه محلول نیم مک فارلند

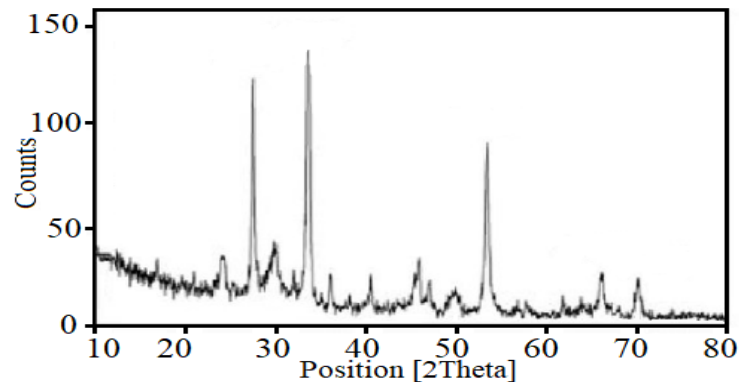
۰/۵ میلی‌لیتر از باریم کلراید دو هیدراته با غلظت ۱/۱۷۵ درصد وزنی حجمی در اسید سولفوریک ۱٪ تهیه شد. و با هم زدن مداوم به خوبی به سوسپانسیون یک دستی تبدیل شد. چگالی محلول حاصل با استفاده از اندازه‌گیری نوری جذب در اسپکتروفتومتر با طول مسیر نوری ۱ سانتی‌متر اندازه‌گیری شد و برابر ۱/۵ بود. محلول به میزان ۵ میلی‌لیتر در لوله‌های در پیچ‌دار هم اندازه با لوله‌های سوسپانسیون باکتری ریخته شد و در فضای نگهداری شد. محلول پیش از هر بار استفاده از نظر وجود ذرات درشت با چشم غیر مسلح بررسی شد و پس از آن به شدت هم زده شد تا کدورت یکنواختی ایجاد شود. در سوسپانسیونی که از نظر کدروت مانند محلول نیم مک‌فارلند باشد $10^8 \times 1/5$ میکروارگانیزم وجود دارد.

روش تهیه محیط کشت مولر هینتون آگار و مولر هینتون برات

مقدار ۷/۶ گرم از پودر محیط کشت مذکور با ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد و سپس توسط حرارت حل شد و حرارت دادن تا زمان شفاف شدن محلول ادامه یافت. سپس توسط پیپت، ۱۸ میلی‌لیتر از این محیط را برداشته و داخل لوله‌های سریپیچ‌دار بزرگ ریخته و توسط اتوکلاو در درجه حرارت ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد. بعد از استریل کردن، این محیط را با دو میلی‌لیتر از مخلوط ترکیب سنتز شده و محیط مولر هینتون برات که در رقت‌های مختلف تهیه شده مخلوط شد. برای تهیه این محیط کشت ۲/۱ گرم از پودر را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته شد و به هم زده شد تا که کاملاً پودر حل شود. سپس دو میلی‌لیتر از محیط آماده شده در لوله‌های سریپیچ دار کوچک ریخته

به دست آمده در D_c قطر نانوساختارهای کریستالی پلی لاکتیک اسید حاوی کلسیم را حدود ۱۵۰ نانومتر تخمین می‌زند.

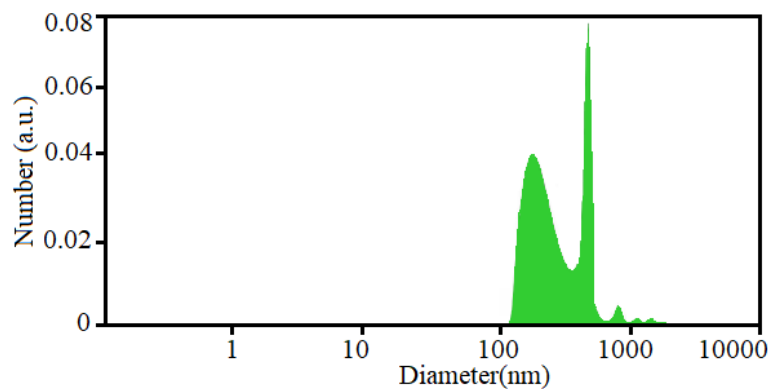
که در آن θ زاویه تفرق پراش اشعه ایکس، $K\lambda$ حاصل ضرب طول موج اشعه در ثابت دستگاه که مقدار آن برابر با 0.9 است، و عدد



شکل ۱. الگوی پراش اشعه ایکس نانوساختارهای کریستالی پلی لاکتیک اسید حاوی کلسیم

می‌آید. نتیجه بررسی اندازه ذره‌ای تفرق دینامیک نور نمونه نانوذره تهیه شده، در شکل ۲ نشان داده شده است، که اندازه تقریبی نانوذرات را در محدوده ۱۵۰ تا ۴۵۰ نانومتر تأیید می‌کند.

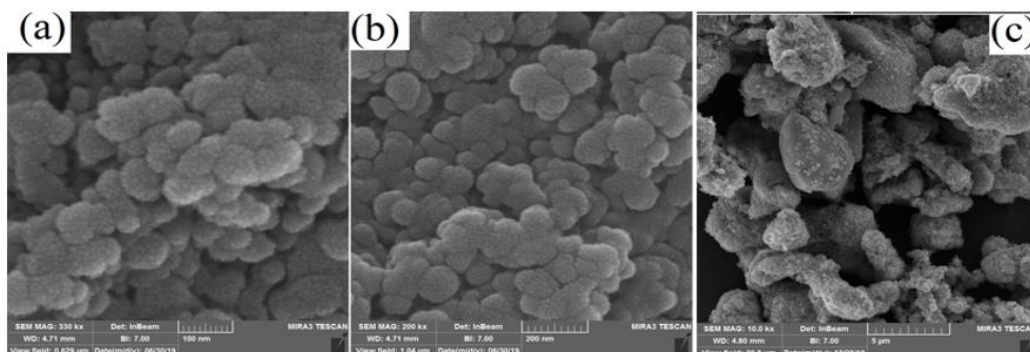
به منظور بررسی اندازه دقیق نانوساختارها از دیگرام اندازه ذره‌ای تفرق دینامیک نور (DLS) استفاده می‌شود. در این آنالیز با استفاده از برهمکنش نور با ذره، اندازه ذرات به صورت دقیق به دست



شکل ۲. دیگرام اندازه ذره‌ای تفرق دینامیک نور نانوساختارهای کریستالی پلی لاکتیک اسید حاوی کلسیم

حاصل از تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی برای نمونه‌های A_1 ، A_2 و A_3 به ترتیب در شکل ۳ الف، ب و ج آورده شده است.

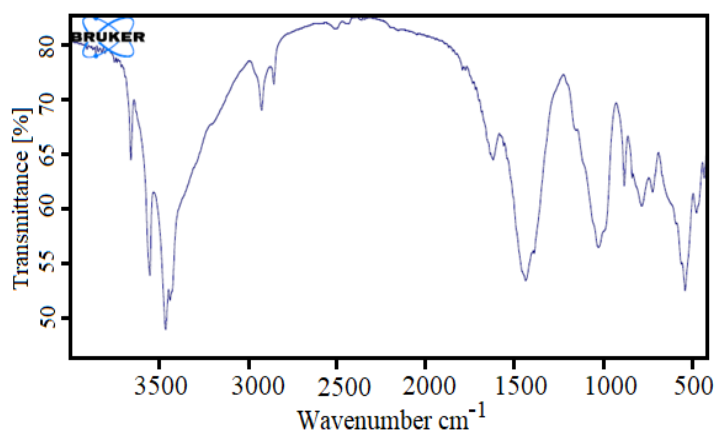
به منظور بررسی ساختار سطحی و ویژگی‌های شکلی نانوساختارها تصویربرداری با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی انجام شد. نتایج



شکل ۳. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی برای نمونه‌های A_1 ، A_2 و A_3 نانوساختارهای کریستالی پلی لاکتیک اسید حاوی کلسیم بترتیب الف، ب و ج

پیوندهای C=O موجود در ساختار پایه پلیمری پلی لاکتیک اسید در ناحیه 1617 cm^{-1} در طیف اسپکتروسکوپی مادون قرمز FT-IR نمایش داده شده‌اند. وجود پیوندهای فلزی Ca-O روی بستر پلی لاکتیک اسید در ناحیه زیر 1000 cm^{-1} به صورت پیک‌های ضعیفی نمایان می‌شود.

به منظور شناسایی گروه‌های عاملی و پیوندهای تشکیل شده بین ساختاری از اسپکتروسکوپی مادون قرمز (FT-IR) استفاده شد. طیف مادون قرمز نانوکامپوزیت‌ها در شکل ۴ دیده می‌شود. طول موج‌های ظاهر شده در ناحیه 3500 cm^{-1} مربوط به پیوندهای هیدروکسیدی گروه O-H در ساختار است. پیوندهای C-C در طول موج حدود 2920 cm^{-1} و 2850 cm^{-1} ظاهر می‌شوند.



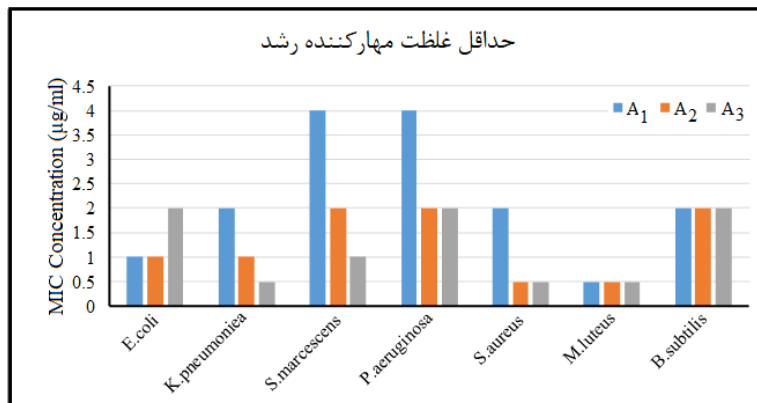
شکل ۴. اسپکتروسکوپی مادون قرمز نانوساختارهای کریستالی پلی لاکتیک اسید حاوی کلسیم مربوط به نمونه

محیط کشت فاقد نمونه که تلقیح میکروب روی آن انجام شده و منظور از کنترل منفی، محیط کشت فاقد نمونه و تلقیح میکروب است که به صورت همزمان در تمامی آزمایش‌ها گذاشته شدند. شکل ۵ مقایسه حداقل غلظت مهاری رشد در هر سه نانوکامپوزیت را نشان می‌دهد.

برای بررسی اثرات ضد میکروبی ترکیبات سنتز شده از روش MIC استفاده شد. در جداول نتایج MIC، علامت مثبت نشان‌دهنده رشد و علامت منفی نشان‌دهنده عدم رشد باکتری است. جدول ۲ اثرات ضد میکروبی مربوط به نانوذرات A₁ با استفاده از روش MIC را نشان می‌دهد. همچنین منظور از کنترل مثبت،

جدول ۲. نتایج حاصل رشد باکتری‌های استاندارد در ۸ غلظت مختلف از نانوذرات A₁

Concentration	Bacteria							
	64 $\mu\text{g/mL}$	32 $\mu\text{g/mL}$	16 $\mu\text{g/mL}$	8 $\mu\text{g/mL}$	4 $\mu\text{g/mL}$	2 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	0.5 $\mu\text{g/mL}$
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>S. marcescens</i>	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>M. luteus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
Control +	+	+	+	+	+	+	+	+
Control -	-	-	-	-	-	-	-	-



شکل ۵. مقایسه حداقل غلظت مهاری رشد در هر سه نانوکامپوزیت

بحث

در سال‌های اخیر مطالعه بر روی خواص ضد میکروبی اکسیدات فلزی نتایج امید بخشی نشان داده است. در این مطالعه ابتدا با بهینه‌سازی ساختاری و تعیین فاز، نانوساختارهای بهینه از طریق اندازه ذره‌ای و مورفولوژی انتخاب شدند. همانطور که در نمودار تفرق دینامیک نور نانوساختارهای کریستالی پلی‌لاکتیک اسید حاوی کلسیم مشاهده می‌شود، پیک به صورت زنگوله‌ای درآمد است که این امر وجود توزیع نرمال و یکنواخت اندازه ذره‌ای را تایید می‌کند و این امر در تطابق آشکار با تصاویر میکروسکوپی الکترونی به دست آمده است. همچنین از طریق تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی بهترین مورفولوژی و یکنواختی اندازه ذره‌ای در نانوساختارهای A₁ مشاهده می‌شود. و این نمونه بعنوان نمونه بهینه مورد انتخاب قرار می‌گیرد. بررسی طیف‌های اسپکتروسکوپی مادون قرمز نیز بیانگر بارگذاری نانوذرات کلسیم اکسید در ساختارهای پلیمری است. در راستای این مطالعات مشاهده شده است که نانوساختارهای پلیمری زیستی پلی‌لاکتیک اسید حاوی کلسیم اکساید ساخته شده به روش سنتز شیمیایی و میکروبی و هیدروترمال دارای اثر هم افزایی بر روی سوبه‌های باکتری‌های *اشریشیا کولی*، *لاکتوباسیلوس پلانتروم*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *سودوموناس آئروژینوزا* داشته و خواص ضد میکروبی خوبی را از خود نشان می‌دهند.

سیپروفلوکساسین، آنتی‌بیوتیک روتین امروزی است که بر روی اکثر میکرو ارگانسیم‌های گرم مثبت و گرم منفی موثر بوده و شاهد مثبت مناسبی برای این آزمایش است که نتایج آن بروی باکتری‌های مختلف بدین صورت است، *اشریشیا کلی* $2 \mu\text{g/mL} < \text{MIC} \leq 1 \mu\text{g/mL}$ *سودوموناس آئروژینوزا* $1 \mu\text{g/mL} < \text{MIC} \leq 1 \mu\text{g/mL}$ *استرپتوکوکوس پایوژنز* $0.5 \mu\text{g/mL} < \text{MIC} \leq 1 \mu\text{g/mL}$

$0.5 \mu\text{g/mL}$ ، *سراشیا و کلبسیلا* $0.25 \mu\text{g/mL} < \text{MIC}$ ، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* $2 \mu\text{g/mL} < \text{MIC} \leq 1 \mu\text{g/mL}$ ، *میکروکوکوس لوتئوس* $16 \mu\text{g/mL} < \text{MIC} \leq 8 \mu\text{g/mL}$ ، *باسیلوس* $64 \mu\text{g/mL} < \text{MIC}$ است که نسبت به نتایج بدست آمده در این تحقیق دارای تاثیرات کمتری بر باکتری‌های گرم مثبت است. در سال ۲۰۱۴ مطالعه‌ای که بر روی خواص ضد میکروبی روغن *Copaiba* انجام شد نشان داد که پیرولیدون و پلی‌لاکتیک اسید مقدار انتشار روغن از بستر پلیمر را بیشتر می‌کند (۲۸). در سال ۲۰۰۷ مشاهده شد که که کامپوزیت ساخته شده با پلیمر پکتین و پلی‌لاکتیک اسید یک ساختار دو فازی ناهمگن ایجاد کرد که با میکروسکوپ الکترونی قابل مشاهده بود و توانایی مهار رشد باکتری *Lactobacillus plantarum* را داشت و نتیجه گرفته شد که این کامپوزیت با داشتن پتانسیل ضد میکروبی برای صنایع بسته‌بندی می‌تواند مناسب باشد و در مقایسه با کار ما نتایج این مقاله بروی سوبه‌های باکتری به صورت ضعیف‌تر پاسخ آنتی‌باکتریایی دریافت کرده است (۲۹). علاوه بر اینها در مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۸ مشاهده شد که ترکیب پلی‌لاکتیک اسید با عصاره دارچین، نانوذرات نقره، کبات و آنتی‌بیوتیک‌هایی مثل سیپرو فلوکساسین سبب افزایش اثرات آنتی‌میکروبیال شده است. به این سبب کاربردهای این پلیمر در ترمیم زخم و آزادسازی دارو می‌تواند بیشتر مورد توجه قرار بگیرد (۳۰). پیش از این در مطالعه‌ای از کامپوزیت غشای پلی‌لاکتیک اسید/سیلیکون/کلسیم کربنات حاوی گروه‌های مرکاپتو (PSC-SH) به منظور بررسی خواص آنتی باکتریال و تحریک‌کننده فعالیت استئو بلاست‌ها استفاده شده است. البته که این ترکیب خواص خود را عمدتاً مدیون گروه مرکاپتو است اما این مطالعه نیز نشان داده است که پلیمر پلی‌لاکتیک اسید به عنوان بستر مناسبی برای آزادسازی مواد می‌تواند قابل توجه قرار بگیرد (۳۱).

در مطالعه حاضر نیز با ترکیب کردن غلظت‌های مختلف از نانوذرات فلزی کلسیم اکسید در بستر پلیمری پلی‌لاکتیک اسید

پیدا کرده است. به نظر می‌رسد این ترکیب می‌تواند برای فرمولاسیون‌های ترمیم زخم مورد مطالعه قرار بگیرد.

نتیجه‌گیری

نانوساختارهای زیستی پلی لاکتیک اسید/کلسیم اکساید با اندازه‌های نانومقیاس قابلیت بسیار بالایی در از بین بردن میکروب‌های بیمارستانی دارند و می‌توانند به‌عنوان یک آنتی‌بیوتیک سنتزی با کارایی بالا در صنعت داروسازی مورد استفاده قرار بگیرند.

سپاسگزاری

بدینوسیله، از مرکز تحقیقات فارماسیوتیکس دانشگاه علوم پزشکی کرمان و همچنین کمیته تحقیقات دانشجویی این دانشگاه به دلیل همکاری لازم که در انجام این پروژه تحقیقاتی داشتند کمال تشکر را داریم.

تعارض در منافع

این مقاله پژوهشی مستقل است که بدون حمایت مالی سازمانی انجام شده است. در انجام مطالعه حاضر، نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافی نداشته‌اند.

Referance

- Bhushan B. Introduction to nanotechnology. Springer handbook of nanotechnology: Springer; 2010. p. 1-13. [DOI:10.1007/978-3-642-02525-9_1]
- Golabiazar R, Othman KI, Khalid KM, Maruf DH, Aulla SM. Green Synthesis, Characterization, and Investigation Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Using Pistacia atlantica Leaf Extract. Bionanoscience. 2019;9(2):323-33. [DOI:10.1007/s12668-019-0606-z]
- Allahverdiyev AM, Abamor ES, Bagirova M, Rafailovich MJFm. Antimicrobial effects of TiO₂ and Ag₂O nanoparticles against drug-resistant bacteria and leishmania parasites. Future Microbiol. 2018; 4 (4):113-123.
- Khanipour A, Bahmani Z, Oromiehie A, Motalebi AJ. Effect of packaging with nano-composite clay/LDPE film on the quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillet at refrigerated storage. IRAN J FISH SCI. 2020;19(2):698-714.
- Cao F, Ju E, Zhang Y, Wang Z, Liu C, Li W, et al. An efficient and benign antimicrobial depot based on silver-infused MoS₂. ACS Nano. 2017;11(5):4651-9. [DOI:10.1021/acsnano.7b00343] [PMID]
- Shi L-E, Li Z-H, Zheng W, Zhao Y-F, Jin Y-F. Synthesis, antibacterial activity, antibacterial mechanism and food applications of ZnO nanoparticles: a review. Food additives & contaminants. Part A. 2014;31(2):173-86. [DOI:10.1080/19440049.2013.865147] [PMID]
- Naito M, Yokoyama T, Hosokawa K, Nogi K. Nanoparticle technology handbook: Elsevier; 2018.
- Heidari AJMJOC. Vibrational biospectroscopic studies on anti-cancer nanopharmaceuticals (Part II). Nanomed. 2018;20(1):74-117.
- Yousefshahi H, Aminsobhani M, Shokri M, Shahbazi RJEjotm. Anti-bacterial properties of calcium hydroxide in combination with silver, copper, zinc oxide or magnesium oxide. Eur J Transl Myol. 2018;28 (4): 22-28. [DOI:10.4081/ejtm.2018.7545] [PMID] [PMCID]
- Silva GA. Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. Surg Neurol. 2004;61(3):216-20. [DOI:10.1016/j.surneu.2003.09.036] [PMID]

11. Raghupathi KR, Koodali RT, Manna ACJL. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. *Langmuir*. 2011;27(7):4020-8. [[DOI:10.1021/la104825u](https://doi.org/10.1021/la104825u)] [[PMID](#)]
12. Honary S, Zahir FJTJoPR. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review. *AJOL*. 2013;12(2):265-73. [[DOI:10.4314/tjpr.v12i2.20](https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.20)]
13. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharm Res*. 2016;33(10):2373-87. [[DOI:10.1007/s11095-016-1958-5](https://doi.org/10.1007/s11095-016-1958-5)] [[PMID](#)]
14. Bobo D, Robinson KJ, Islam J, Thurecht KJ, Corrie SRJPr. Nanoparticle-based medicines: a review of FDA-approved materials and clinical trials to date. *Pharm Res*. 2015;34(9): 71-89.
15. Pelgrift RY, Friedman AJ. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(13):1803-15. [[DOI:10.1016/j.addr.2013.07.011](https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.011)] [[PMID](#)]
16. Pelgrift RY, Friedman AJ. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. 2013;65(13-14):1803-15. [[DOI:10.1016/j.addr.2013.07.011](https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.011)] [[PMID](#)]
17. Shorr AFJ. Review of studies of the impact on Gram-negative bacterial resistance on outcomes in the intensive care unit. *Crit Care Med*. 2009;37(4):1463-9. [[DOI:10.1097/CCM.0b013e31819ced02](https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31819ced02)] [[PMID](#)]
18. Zaidi S, Misba L, Khan AUJNN, Biology, Medicine. Nano-therapeutics: a revolution in infection control in post antibiotic era. *Nanomedicine*. 2017;13(7):2281-301. [[DOI:10.1016/j.nano.2017.06.015](https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.06.015)] [[PMID](#)]
19. ALrawashdeh IN, Qaralleh H, Al-limoun MO, Khleifat KMJapa. Antibacterial Activity of Asteriscus graveolens Methanolic Extract: Synergistic Effect with Fungal Mediated Nanoparticles against Some Enteric Bacterial Human Pathogens. *J. basic appl. Res biomed*. 2019;5(2): 89-98.
20. Basavalingaiah K, Harishkumar S, Nagaraju GJF. Uniform deposition of silver dots on sheet like BiVO₄ nanomaterials for efficient visible light active photocatalyst towards methylene blue degradation. *FlatChem*. 2020;19 (4):113-142. [[DOI:10.1016/j.flatc.2019.100142](https://doi.org/10.1016/j.flatc.2019.100142)]
21. Lam SJ, Wong EH, Boyer C, Qiao GGJ. Antimicrobial polymeric nanoparticles. *Progress in Poly. Sci*. 2018;76:40-64. [[DOI:10.1016/j.progpolymsci.2017.07.007](https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2017.07.007)]
22. Rahman PM, Mujeeb VA, Muraleedharan K, Thomas SKJAJoC. Chitosan/nano ZnO composite films: enhanced mechanical, antimicrobial and dielectric properties. *Arab. J. Chem*. 2018;11(1):120-7. [[DOI:10.1016/j.arabjc.2016.09.008](https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.09.008)]
23. Zheng K, Setyawati MI, Leong DT, Xie J. Antimicrobial gold nanoclusters. *ACS Nano*. 2017;11(7):6904-10. [[DOI:10.1021/acs.nano.7b02035](https://doi.org/10.1021/acs.nano.7b02035)] [[PMID](#)]
24. Shahriary M, Veisi H, Hekmati M, Hemmati SJMS, C E. In situ green synthesis of Ag nanoparticles on herbal tea extract (*Stachys lavandulifolia*)-modified magnetic iron oxide nanoparticles as antibacterial agent and their 4-nitrophenol catalytic reduction activity. *Mater. Sci. Eng. C*. 2018;90:57-66. [[DOI:10.1016/j.msec.2018.04.044](https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.04.044)] [[PMID](#)]
25. Vergheese M, Vishal SKJ. Green synthesis of magnesium oxide nanoparticles using *Trigonella foenum-graecum* leaf extract and its antibacterial activity. *Int. J. Pharmacogn. Phytochem*. 2018;7:1193-200.
26. Abd Elsalam SS, Taha RH, Tawfeik AM, El-Monem A, Mohamed O, Mahmoud HAJTEJoHM. Antimicrobial activity of bio and chemical synthesized cadmium sulfide nanoparticles. *Egypt. J. Hosp. Med*. 2018;70(9):1494-507. [[DOI:10.12816/0044675](https://doi.org/10.12816/0044675)]
27. Lv Q, Zhang B, Xing X, Zhao Y, Cai R, Wang W. Biosynthesis of copper nanoparticles using *Shewanella loihica* PV-4 with antibacterial activity: Novel approach and mechanisms investigation. *J Hazard Mater*. 2018;347:141-9. [[DOI:10.1016/j.jhazmat.2017.12.070](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.12.070)] [[PMID](#)]
28. Bonan RF, Bonan PR, Sampaio FC, Albuquerque AJ. In vitro antimicrobial activity of solution blow spun poly (lactic acid)/polyvinylpyrrolidone nanofibers loaded with Copaiba (*Copaifera* sp.) oil. *Mat. Sci. Eng. Matt*. 2015;48:372-7. [[DOI:10.1016/j.msec.2014.12.021](https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.12.021)] [[PMID](#)]
29. Liu L, Finkenstadt V, Liu CK, Jin T, Fishman M, Hicks KJJoAPS. Preparation of poly (lactic acid) and pectin composite films intended for applications in antimicrobial packaging. *J. Appl. Polym. Sci*. 2007;106(2):801-10. [[DOI:10.1002/app.26590](https://doi.org/10.1002/app.26590)]
30. Scaffaro R, Lopresti F, Marino A, Nostro A. Antimicrobial additives for poly (lactic acid) materials and their applications: current state and perspectives. *Biotech*. 2018;102(18):7739-56. [[DOI:10.1007/s00253-018-9220-1](https://doi.org/10.1007/s00253-018-9220-1)] [[PMID](#)]
31. Tokuda S, Obata A, Kasuga T. Preparation of poly(lactic acid)/siloxane/calcium carbonate composite membranes with antibacterial activity. *Acta Biomaterialia*. 2009;5(4):1163-8 [[DOI:10.1016/j.actbio.2008.10.005](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.10.005)] [[PMID](#)]
32. Niakan S, Niakan M, Hesaraki S, Nejadmoghaddam MR, Moradi M, Hanafiabdar M, et al. Comparison of the Antibacterial Effects of Nanosilver With 18 Antibiotics on Multidrug Resistance Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Jundishapur J Microbiol*. 2013;6(5):e8341. [[Article](#)] [[DOI:10.5812/jjm.8341](https://doi.org/10.5812/jjm.8341)]