



Skin Drug Release and Antifungal Activity of Econazole-containing Silica Nanoparticles

Maryam Montazeri¹, Saman Ahmad Nasrollahi², Alirez Fayzbakhsh³, Mehdi Razzaghi-Abyaneh⁴

¹Department of Chemistry, Central Tehran Branch, IAU, Tehran, Iran. ²Nanodermatology Unit, Center for Research & Training in Skin Diseases & Leprosy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ³Department of Chemistry, Central Tehran Branch, IAU, Tehran, Iran. ⁴Department of Mycology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Silica Nanoparticles (MCM41) are silica mesopores (MSNs), which have large pores and relatively low density. The purpose of this study was to load Econazole onto silica nanoparticles (MCM41-NH₂ and MCM41) And release of econazole in human skin (Ex-Vivo) then the antifungal effect of loaded econazole on silica nanoparticles was investigated.

Materials & Methods: In this study, MCM41 was prepared, then MCM41-NH₂ nanoparticles were provided by using amine cetyltrimethylammonium bromide and finally, the drug econazole was loaded on it. The morphology of the nanoparticles was determined by SEM and drug loading by FT-IR. Francescell and UV-Vis were used to measure the release. The release cream from the skin containing 1/1 drug and nanoparticles was prepared. Finally, the anti-fungal effect of ECO/MSNs was investigated in three ways. Francescell device was also used to check skin release.

Results: Silica nanoparticles were prepared about 300 nanometers Release of the drug into the skin showed that during the first 8 hours 80% release and then up to 24 hours of continuous drug release. Antifungal effect by disk diffusion method showed that ECO/MCM41 had a larger inhibitory effect and also minimal inhibition of fungal growth (MIC) 75 mg/ml. Antifungal tests showed that no fungus grew after 72 hours. the antifungal effect as well as ECO / MCM41 (MIC) was greater in methanol.

Conclusion: The antifungal effect of the newest agar method was not suitable for this drug. Therefore, as a suitable drug in the cream, a drug loaded with methanol is recommended.

Keywords: Econazole, targeted drug delivery, antifungal activity, silica nanoparticles.

Correspondence to: Ahmmad nasrollahi

Tel: +98 2188963804

E-mail: samannasrol@gmail.com

Journal of Microbial World 2020, 13(3): 264-276.

DOI:



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



رهایش دارو در پوست و اثرات ضدقارچی نانوذرات سیلیسی حاوی اکونازول

مریم منتظری^۱، سامان احمد نصر الهی^{۲*}، علیرضا فیض بخش^۳، مهدی رزاقی ایبانه^۴

^۱ گروه شیمی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. ^۲ بخش نانودرمانولوژی، مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های پوست و جذام، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. ^۳ گروه شیمی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. ^۴ بخش قارچ شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: نانوذرات سیلیکا (MCM41) از دسته مزوپورهای سیلیکا (MSNs) دارای منافذ بزرگ و چگالی نسبتاً پایین هستند. هدف از این پژوهش بارگذاری داروی اکونازول بر روی نانوذرات MCM41-NH₂ و MCM41 و بررسی رهایش اکونازول در پوست انسان (Ex-Vivo) و اثر ضدقارچی آن بود.

مواد و روش‌ها: در ابتدا MCM41 تهیه شد، سپس با آمین-ستیل-تری-متیل-آمونوم بروماید، نانوذرات MCM41-NH₂ ساخته شد و داروی اکونازول روی آن بارگذاری گردید. مورفولوژی نانوذرات با دستگاه SEM و بارگذاری دارو با دستگاه FT-IR تعیین و برای اندازه‌گیری رهایش از دستگاه فرنز سل و UV-Vis استفاده شد. اثر ضد قارچ ECO/MSNs با روشهای چاهک پلیت برای قارچ *آسپرژیلوس فیومگتس* و با استفاده از روش پورپلیت بر روی *کاندیدا آلبیکنس* بررسی شد. در بررسی رهایش پوستی کرم با نسبت ۱ به ۱ دارو/ نانوذرات تهیه و از دستگاه فرنز سل استفاده شد.

یافته‌ها: نانوذرات سیلیکا در ابعاد حدود ۳۰۰ نانومتر شد و رهاسازی دارو در پوست نشان داد، طی ۸ ساعت اول رهایش ۸۰٪ و پس از آن تا ۲۴ ساعت رهایش دارو به صورت پیوسته ادامه دارد. بررسی اثر ضد قارچ به روش چاهک پلیت نشان داد ECO/MCM41 دارای اثر هاله عدم رشد بزرگ تر و همچنین حداقل غلظت مهاری (MIC) ۷۵ mg/ml می‌باشد. اثرات ضدقارچی پس از ۷۲ ساعت تایید گردید. همچنین حداقل غلظت مهاری ECO/MCM41 در متانول بیشتر بود.

نتیجه‌گیری: به دلیل اثرات ضد قارچی نانوذرات سیلیسی حاوی اکونازول، استفاده از آن به عنوان داروی مناسب در کرم پیشنهاد می‌گردد.

واژگان کلیدی: اکونازول، دارورسانی هدفمند، فعالیت ضدقارچ، نانوذرات سیلیسی.

دریافت مقاله: اردیبهشت ماه ۹۹ پذیرش برای چاپ: شهریور ماه ۹۹

مقدمه

از شایع ترین قارچ‌های ساپروفیتیک موجود در هوا است. *آسپرژیلوس فومگاتوس* سال‌ها یک قارچ بیماری‌زا ضعیف در نظر گرفته می‌شد. با این حال، با افزایش تعداد بیماران با سیستم ایمنی ضعیف، افزایش چشمگیر *آسپرژیلوس* (*Aspergillus*) تهاجمی شدید و معمولاً کشنده، اکنون شایع ترین عفونت قالب در سراسر جهان است (۲). شیوع عفونت‌های قارچی در دو دهه گذشته نیاز به کشف داروهای

طراحی و ساخت سیستم‌های رهایش کنترل شده دارو جهت افزایش نفوذ پذیری داروها، تحول زیادی در درمان بیماری‌های قارچی ایجاد کرده‌اند (۱). *آسپرژیلوس فومگاتوس* (*Aspergillus fumigatus*) یک قارچ تک سلولی کُنیدی دار و

* آدرس برای مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی، مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های پوست و جذام، پست الکترونیک: samannasrol@gmail.com تلفن: ۰۲۱۸۹۶۳۸۰۴



سطحی است، سطح ویژه بالای این مواد منجر به جذب بیشتر مولکول‌های فعال بیولوژیکی می‌شود (۲۰). پوست یک ساختار منحصر به فرد است، که از لایه‌ها و قسمت‌های مختلفی تشکیل شده است و به عنوان خارجی ترین لایه بدن، به راحتی قابل دسترس می‌باشد. دارو رسانی از طریق پوست نسبت به سایر روش‌ها مزیت‌های بیشتری دارد، از جمله امکان استفاده از غلظت بالای دارو بر روی پوست، کاهش استفاده سیستماتیک از دارو و به دنبال آن کاهش عوارض جانبی، امکان حضور طولانی مدت دارو بر سطح و کاهش دفعات مصرف برای داروها با نیمه عمر کوتاه، آسان و بدون درد بودن و افزایش همراهی بیمار است (۲۱). بنابراین انتقال دارو از طریق پوست یک روش بسیار خوب نسبت به روش‌های مرسوم خوراکی و تزریقی است. تاکنون داروهای ضدقارچ با فرمولاسیون‌های متفاوتی به منظور درمان ارائه شده‌اند که در بسیاری از موارد به دلیل عدم پاسخ مناسب به درمان به صورت مزمن و گاهی عودشونده مشاهده شده‌اند (۲۲). همچنین مصرف طولانی مدت داروهای ضدقارچی موجب بروز عوارض جانبی گردیده است (۲۳). در سال‌های اخیر مطالعات زیادی در مورد بارگذاری داروهای مختلف بر روی نانوذرات سیلیکا صورت گرفته است (۲۴). امبروگی (Ambrogi) و همکاران در تحقیقاتشان از سامانه دارورسانی MCM41 جهت فرمولاسیون یک پودر ضدقارچ اکونازول استفاده کردند (۲۵). در تحقیق اخیرمان سامانه هدفمند MCM41 را جهت فرمولاسیون یک کرم ضدقارچ اکونازول بر روی قارچ *کاندیدا آلبیکانس* مورد بررسی قرار دادیم (۲۶). هدف از تحقیق حاضر، بارگذاری داروی اکونازول (Econazole) بر روی نانوذرات سیلیکا و مقایسه ره‌ایش اکونازول از MCM41 و MCM41-NH₂ در پوست است. در این تحقیق ابتدا نانوذرات تهیه و سپس دارو بارگذاری شد. سپس دارو به نسبت یک به یک در کرم پایه قرار داده شد و ره‌ایش آن در پوست با داروی آزاد مقایسه و بررسی شد. سپس اثر ضد قارچ این ترکیبات با سه روش، روش یک چاهک پلیت علیه *آسپریژیلوس فیومگتس* در محیط کشت مولر هیتتون (Mueller Hinton agar)، روش

جدید را افزایش می‌دهد (۳). چنانچه به هر علتی میزبان دچار نقص در سیستم ایمنی شود، این عفونت قارچی رشد می‌کند و باعث ایجاد بیماری‌های مختلف قارچی در افراد مبتلا به بیماری‌های حاد ریوی، سرطان می‌شود (۴). مدیریت درمانی برای *آسپریژیلوس مهاجم*، به شروع درمان به موقع آن وابسته است، همچنین انتخاب داروی مؤثر ضد قارچی و عدم مقاومت قارچ به آن بسیار با اهمیت است. تشخیص *آسپریژیلوس* تهاجمی بسیار سخت بوده، لذا در این بیماران درمان بایستی سریع آغاز شده و تا زمان بهبودی کامل آن ادامه یابد (۵). *کاندیدا آلبیکانس* (*Candida albicans*) نیز یک مخمر ضد قارچ تک سلولی و فاقد رشته است (۶) در چند دهه اخیر عفونت‌های قارچی توسط این ارگانیسم افزایش یافته است (۷). عفونت‌های *کاندیدا آلبیکانس* در میان افراد دریافت‌کننده پیوند اعضا (۸) و همچنین در عفونت‌های کاندیدیایی واژینالی مربوط به دستگاه تناسلی بانوان نیز گزارش شده است (۹ و ۱۰). تاکنون نانوذرات بسیاری در سامانه‌های ره‌ایش دارو مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. از این میان می‌توان به نانوذرات، اتوزوم (Ethosomes) (۹)، نانوزوم (Nanosome) (۱۰)، لیپوزوم (Liposome) (۱۱)، ترانسفروزوم (Transfersome) (۱۲)، نانوذرات بر پایه لیپید (Solid Lipid Nanoparticles = SLN)، نانوذرات با حامل (Nanostructured Lipid Carriers = NLC) (۱۳ و ۱۴) و ... اشاره کرد. مواد مزوپور سیلیکا (MSNs) به تازگی توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند (۱۵). با توجه به سازگاری و فرمولاسیون آسان، این نانوذرات با داروها به صورت گسترده به عنوان حامل دارو استفاده می‌شوند (۱۶). نانوذرات سیلیس به دلیل بالا بودن مساحت سطح و واکنش پذیری، و ثبات ساختاری و کانال‌های منظم در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱۷). نسبت سطح به حجم این ذرات بالا است و اندازه کوچکی دارند، این ویژگی اجازه می‌دهد لیگاندهای چند گانه به سطح آنها متصل شوند (۱۸). با توجه به حجم حفرات و تخلخل بالا در مواد مزوپور، مواد بیولوژیکی با اندازه‌های مختلف می‌توانند در این حفره‌ها استقرار یابند (۱۹). با توجه به اینکه جذب مولکول‌ها در مواد مزوپور یک پدیده جذب

(TEOS) اضافه شد. پس از انجام واکنش‌های لازم به مدت ۲ ساعت در دمای 80°C مخلوط به دست آمده صاف و فیلترگردید و چند مرتبه با اتانول و آب مقطر شستشو داده شد. در نهایت رسوب سفید رنگ پس از صاف کردن و شستشو دادن به مدت ۵ ساعت در دمای 50°C تکلیس شد (۱۵).
(ج) روش اصلاح سطح MCM41 با گروه آمین: به منظور اصلاح سطح MCM41 با گروه آمین، ابتدا به ۵۰ میلی‌گرم از نانوذرات سیلیکای کلسینه شده، $4/6$ میلی‌لیتر اتانول اضافه شد. سپس $0/2$ میلی‌لیتر آب مقطر و سپس $0/1$ میلی‌لیتر اسید استیک اضافه گردید، در نهایت $0/1$ میلی‌لیتر ای-دی-اس (N-(2-Aminoethyl)-3-Amino Propnaoyltri-Methoxysilane =EDS) اضافه شده و مخلوط به مدت ۱ ساعت روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. سپس مخلوط حاصل را صاف کرده و با اتانول و آب مقطر شستشو داده شد (۹).

(د) تهیه کرم: برای تهیه کرم ابتدا فاز چربی شامل گلیسرین مونو استارات (GMS)، بوتیل دی هیدروسیل تولوئن (BHT)، اسپرماتیک (spermaceti) و ستیل الکل تا دمای 75°C حرارت داده می‌شود؛ بطور هم زمان فاز مایع شامل پلی-سوربات ۸۰ پلی سوربات ۶۰، سوربیک اسید و پتاسیم سوربات را در بشری دیگر تا دمای 75°C حرارت داده شد و سپس به فاز چربی اضافه کرده و توسط همزن برقی با دور 600 rpm هم زده شد تا دمای فرمول به 25°C رسیده و کرم نهایی تشکیل شود.

(ه) فعال کردن قارچ از نمونه استاندارد اسپرژیلوس فیومگتس: در این مطالعه قارچ اسپرژیلوس فیومگتس (PTCC5004) از بخش قارچ شناسی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. اثر ضد قارچ ECO/MSNs بر علیه اسپرژیلوس فیومگتس با استفاده از روش انتشار دیسک بر روی مولر هیتون آگار انجام شد. این قارچ بر روی شیب آگار دکستروز سابورود حاوی کلرامفنیکل در دمای 28°C به مدت ۷ روز کشت داده شد. اسپورهای قارچی پس از افزودن نمکی نرمال حاوی $1/1$ درصد توئین ۸۰ توسط میله شیشه‌ای استریل تهیه شد. ظرف پتری با اسپورهای قارچی تلقیح شد (۲).

دوم پورپلیت در محیط کشت مولر هیتون علیه کاندیدا آلبیکنس و روش سوم چاهک گذاری علیه کاندیدا آلبیکنس توسط محیط کشت نوترینت آگار (Nutrient Agar) بررسی و آزمون تعیین حداقل غلظت مهاری (Minimum Inhibitory Concentration=MIC) نانوذرات ECO/MCM41, ECO/MCM41-NH₂ مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

(الف) میکرواورگانیسم‌های مورد بررسی در این تحقیق از گونه اسپرژیلوس فیومگتس (*Aspergillus fumigatus*) و کاندیدا آلبیکنس انتخاب گردید. نمونه اسپرژیلوس فیومگتس (PTCC5004) و نمونه کاندیدا آلبیکنس (ATCC10231) استفاده شده از انستیتو پاستور ایران، پوست شکم انسان: جراحی شده از جراحی کوچک کردن شکم از بیمارستان پارسیان، مواد شیمیایی: ستیل‌تری‌متیل‌آمونوم‌پرومید (CTAB) (۹۸ درصد)، سدیم هیدروکسید-تترااتیل اورتوسیلیکات (Tetraethyl Orthosilicate=TEOS) (۹۹ درصد)، ای-دی-اس N-(2-Aminoethyl)-3-Amino Propnaoyltri-Methoxysilane =EDS اتانول بدون آب (۹۹/۹۹ درصد)، استون، سدیم هیدروکسید از شرکت مرک (Merck)، اکونازول نیترات از شرکت سیگما-آلدریج (Sigma-Aldrich) خریداری شد. دستگاه‌ها: برای مشخص کردن گروه‌های عاملی از دستگاه FT-IR مدل Jasco FTIR-410 از کشور ژاپن استفاده شد. به منظور بررسی مورفولوژی نانوذرات ECO/MCM41-NH₂ و ECO/MCM41 از دستگاه SEM مدل SIGMA VP-500 ساخت کشور هلند استفاده گردید. برای اندازه ذرات از دستگاه DLS; Malvern Nano Z5-ZEN 3600, ساخت کشور انگلستان استفاده گردید.

(ب) روش تهیه: MCM41 به منظور تهیه نانوذرات سیلیسی، در ابتدا ۲۵۰ میکروگرم سود ۲ مولار به ۴۸ میلی‌لیتر آب اضافه شد. سپس مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم ستیل‌تری‌متیل‌آمونوم‌پرومید (CTAB) اضافه گردید و به دمای 80°C رسانیده شد. پس از ثابت شدن دما، در 80°C یک میلی‌لیتر تترا اتیل اورتوسیلیکا

فعال کردن قارچ از نمونه استاندارد کاندیدا آلبیکنس. در این بررسی از سوش استاندارد کاندیدا آلبیکنس ATCC10231 استفاده شد. آمپول‌های لیفیل شده حاوی سویه‌های قارچی روی محیط کشت تلقیح گردید. سپس پلیت‌های حاوی میکروارگانیسم در دمای $27-30^{\circ}\text{C}$ انکوبه شد و بعد از ۲۴ ساعت از کلنی‌های رشد یافته بر روی محیط سوسپانسیون قارچ با غلظت نیم مک فارلند تهیه شد (۷).

و) روش چاهک‌گذاری: ابتدا بر روی محیط کشت، چاهک‌هایی توسط پیت پاستور حفر شد، سپس با آنس استریل قسمت‌های پانچ شده از داخل محیط کشت خارج گردید و سوپانسیون قارچی بر روی محیط انکوبه شد. آنگاه توسط سمپلر، میزان ۵۰ میکرولیتر از دارو را وارد چاهک نموده، سپس پلیت‌ها در انکوباتور $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد (۲۷).

ز) روش پورپلیت: رقت‌های تهیه شده از دارو را در دیش‌ها ریخته سپس بر روی آنها محیط کشت مولر هیتون 45°C اضافه گردید. سپس پلیت‌ها را به صورت هشت لاتین به آرامی تکان داده تا دارو در محیط پخش و یکنواخت شود، سپس به کمک سوپ یا آنس استریل در کنار شعله و در زیر هود گونه کاندیدا آلبیکنس کشت داده شد (۲۸).

یافته‌ها

در شکل ۱، تصویر FT-IR برای MCM41, MCM-41-NH-2, را نشان می‌دهد. نوار جذبی پهن در ناحیه 2800 تا 3700 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی گروه‌های OH سینالول و نیز نوار جذبی در 802 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات خمشی گروه‌های سینالولی می‌باشد. نوار جذبی 1644 cm^{-1} مربوط به جذب آب توسط سیلیکا و نوار جذبی پهن در 1192 cm^{-1} مربوط به گروه‌های Si-O-Si مربوط به ارتعاشات حلقه‌های سیلیکا می‌باشد. ارتعاشات کششی متقارن Si-O-Si در 809 cm^{-1} و جذب مربوط به ارتعاشات کششی نامتقارن Si-O-Si در 1085 cm^{-1} دیده شد. نوار جذبی مشاهده شده در 1635 cm^{-1} مربوط به گروه H-O-H آب است. نوار جذبی در 3421 cm^{-1} مربوط به گروه سیلانول می‌باشد (شکل ۱). در طیف B نمونه آمین دار، باند جذبی در 1591 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات خمشی گروه N-H در NH_2 می‌باشد. در طیف C مطابق جدول ۱، نوارهای جذبی داروی اکونازول نشان داده شده‌اند (شکل ۱). در طیف D، بارگذاری ECO بر روی نانوذرات MCM41 موجب حذف قله 3744 cm^{-1} شد و شدت طیف $3500-2150$ cm^{-1} افزایش یافت.

بررسی از سوش استاندارد کاندیدا آلبیکنس ATCC10231 استفاده شد. آمپول‌های لیفیل شده حاوی سویه‌های قارچی روی محیط کشت تلقیح گردید. سپس پلیت‌های حاوی میکروارگانیسم در دمای $27-30^{\circ}\text{C}$ انکوبه شد و بعد از ۲۴ ساعت از کلنی‌های رشد یافته بر روی محیط سوسپانسیون قارچ با غلظت نیم مک فارلند تهیه شد (۷).

و) روش چاهک‌گذاری: ابتدا بر روی محیط کشت، چاهک‌هایی توسط پیت پاستور حفر شد، سپس با آنس استریل قسمت‌های پانچ شده از داخل محیط کشت خارج گردید و سوپانسیون قارچی بر روی محیط انکوبه شد. آنگاه توسط سمپلر، میزان ۵۰ میکرولیتر از دارو را وارد چاهک نموده، سپس پلیت‌ها در انکوباتور $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد (۲۷).

ز) روش پورپلیت: رقت‌های تهیه شده از دارو را در دیش‌ها ریخته سپس بر روی آنها محیط کشت مولر هیتون 45°C اضافه گردید. سپس پلیت‌ها را به صورت هشت لاتین به آرامی تکان داده تا دارو در محیط پخش و یکنواخت شود، سپس به کمک سوپ یا آنس استریل در کنار شعله و در زیر هود گونه کاندیدا آلبیکنس کشت داده شد (۲۸).

ح) آزمون تعیین MIC نانوذرات ECO/MCM41, MCM41-NH2 به منظور بررسی اثرات ضد قارچ نانو ذرات سیلیکا جهت حد اقل مهارکنندگی از رشد قارچ (MIC) از روش میکرودیالوشن برات با استفاده از پلیت ۹۶ خانه استفاده شد. ابتدا در داخل چاهک‌ها محیط RPMI ریخته شد. سپس در اولین چاهک میزان ۲۰۰ میکرولیتر از بالاترین غلظت نانوپارتیکل اضافه شد. برای رقت‌سازی از چاهک اول ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک بعدی ریخته شد و این روند برای چاهک‌های بعدی انجام شد، همه غلظت‌ها مطابق با دستور العمل ساخته شد. کنترل مثبت و کنترل منفی نیز قرار داده شد (۲۹).

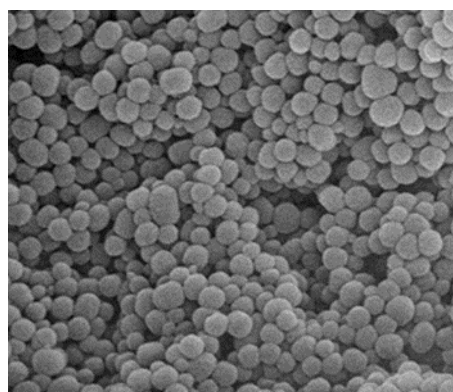
ط) بررسی آزادسازی دارو از فرمولاسیون‌ها: متداول‌ترین روش جهت ارزیابی ره‌ایش دارو از پوست انسان (به روش Ex-vivo). با استفاده از دستگاه فرنزسل (Franz)

مورفولوژی MCM41 قبل و بعد از کلسینه شدن و عامل دار شدن یکسان بود. بررسی تصاویر بیانگر تغییر ریخت شناسی سطح MCM41 بعد از بارگذاری دارو می باشد و نشان دهنده کاهش میانگین اندازه ذرات است (شکل ۳). اندازه ذرات مطابق با (جدول ۲) جهت MCM41, MCM41-NH₂, ECO/ MCM41, ECO/MCM41-NH₂ نشان داده شده است. بارگذاری دارو در ECO/MCM41 برابر ۲۹/۵۷ و در نانوذرات MCM41-NH₂/ECO برابر ۳۸/۶۵ می باشد. بررسی رهاسازی داروی اکونازول از نانوذرات MCM41 و MCM41-NH₂ از پوست: مطالعه رفتار رهاسازی دارو در نانوذرات سیلیکا با اندازه گیری رهائش پوستی اکونازول از ECO/MCM41-NH₂ و ECO/MCM41 و مقایسه با داروی آزاد صورت پذیرفت. مزوپورسیلیکون دارای خواص بسیار مهمی به نفع رهاسازی کنترل شده دارو می باشد به طوری که اندازه کوچک از منافذ، دارو را محبوس کرده و در نتیجه فعل و انفعالات سطحی ملکول و دارو و دیواره منافذ افزایش می یابد. کرم با فرمولاسیون ECO/MCM41-NH₂ و ECO/MCM41 با نسبت یک به یک نانو و دارو تهیه شد. کرم نهایی در طول مدت مطالعه هیچگونه ناپایداری فیزیکی و شیمیایی از خود

طیف مخلوط فیزیکی MCM41 و ECO هم نشان داده شده است. پیک 1326 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی گروه های C-N (C-N stretching) می باشد که درطیف ظاهر شده و نشان دهنده این است که جذب سطحی صورت گرفته است (شکل ۱). در طیف E، نوار جذبی 1326 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی گروه های C-N و 1589 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی گروه C=C می باشد، پیک 1593 cm^{-1} مربوط به ارتعاش خمش نامتقارن NH₂ نشان دهنده جذب سطحی اکونازول بر MCM41-NH₂ است (شکل ۱). به منظور بررسی مورفولوژی نانوذرات ECO/MCM41-NH₂ و ECO/MCM41 از دستگاه FESEM استفاده گردید. مورفولوژی نانو ذرات MCM41 در (شکل ۲) نشان داده شده است. MCM41 که از تعداد زیادی ساختارکروی تشکیل شده است،

جدول ۱: ناحیه های جذب داروی اکونازول در دستگاه FT-IR.

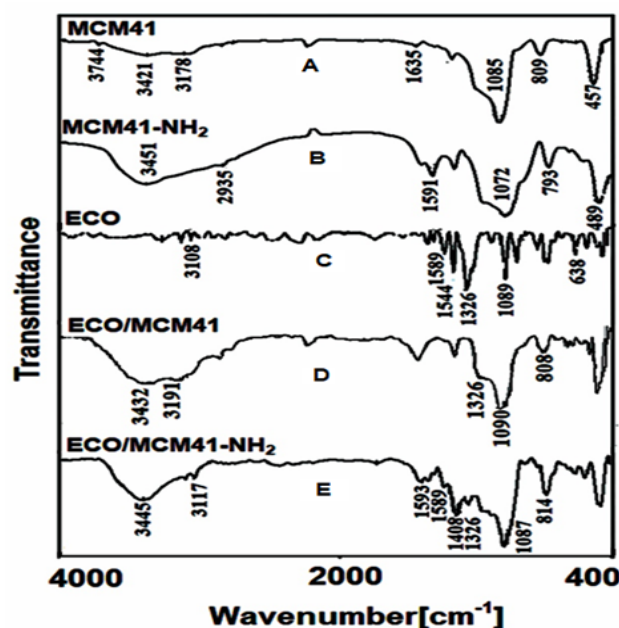
ردیف	پیک اکونازول (cm^{-1})	گروه های عاملی
۱	۳۱۰۸	C-H stretching for aromatic
۲	۱۵۸۹	C=C stretching for aromatic
۳	۱۵۴۴	NO ₂
۴	۱۳۲۶	C-N stretching
۵	۱۰۸۹	C-O stretching
۶	۶۳۸	C-Cl stretching



شکل ۲: تصویر FESEM مربوط به MCM41

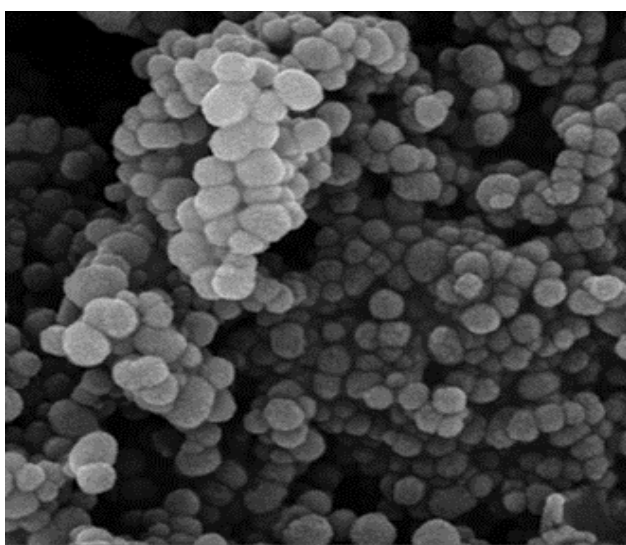
جدول ۲: اندازه ذرات.

نمونه	Size (nm)
MCM41	۳۲۰
MCM41-NH ₂	۳۶۳
ECO/MCM41	۳۷۳
ECO/MCM41-NH ₂	۳۷۴

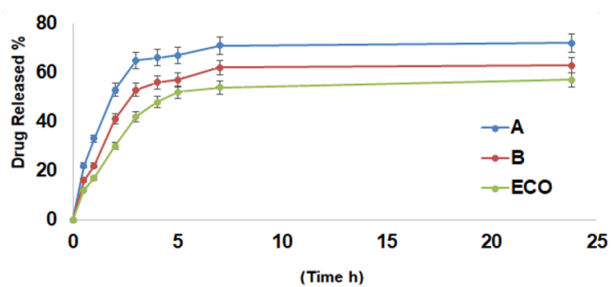


شکل ۱: تصویر FT-IR مربوط به (E) MCM41 (A), MCM41-NH₂ (B), ECO (C), ECO/MCM41 (D), ECO/MCM41-NH₂

محیط نوترینت آگار کمتر از داروی اکونازول خالص بوده است، که این مسأله بیانگر این است که محیط کشت نوترینت آگار نسبت به مولر هیتون محیط مناسبی برای بررسی فعالیت‌های داروهای ضدقارچی نانوذرات سیلیکا نمی‌باشد. بررسی اثر ضدقارچ اکونازول لود شده بر روی نانوذرات $MCM41$ و $MCM41-NH_2$ به روش پور پلیت: اثر ضدقارچ



شکل ۳: تصویر FESEM مربوط به ECO/MCM41.



شکل ۴: نمودار بررسی ره‌اسازی اکونازول و مقایسه آن با نانوذرات (C) ECO/MCM41-NH₂ (D) و ECO/MCM41 (C) و ECO/MCM41-NH₂ (B) و ECO/MCM41 (A) از پوست.

جدول ۳: قطر هاله عدم رشد اکونازول با نانوذرات $MCM41$ و $MCM41-NH_2$ به روش چاهک پلیت.

ECO Conc. 1.2 mg/ml	نمونه
۵۴ mm	ECO/MCM41(A)
۴۰ mm	ECO/MCM41-NH ₂ (B)
۳۰ mm	ECO (Negative Control)
۴۸ mm	ECO/MCM41 (C)
۲۲ mm	ECO/MCM41-NH ₂ (D)
۵۴ mm	ECO (Negative Control)
۱۲ mm	(Positive Control)

نشان نداد و کلیه خصوصیات آن شامل بو، رنگ، یکنواختی، اسیدیته و دانسیته آن ثابت بود. کرم حاوی نانو ذرات در فواصل زمانی مشخص مورد مطالعه ره‌ایش قرار گرفت. نتایج نشان داد، میان گروه‌های سیلانول و اکونازول یک جاذبه الکترو استاتیکی وجود دارد و برهمکنش از نوع پیوند هیدروژنی است، در نتیجه سرعت ره‌ایش دارو در ابتدا کم می‌باشد و ره‌اسازی کم در نتیجه دافعه الکترواستاتیکی میان بار مثبت نانوذرات و دارو است. ره‌اسازی دارو نشان می‌دهد درصد ره‌اسازی اکونازول از نانوذرات $MCM41$ و $MCM-41-NH_2$ افزایش یافته است و ره‌ایش دارو در ۸ ساعت اول اتفاق می‌افتد، که در نتیجه دافعه الکترو استاتیکی قوی میان بار منفی گروه‌های سینالولی دیپروتنه شده و ملکول‌های دارو ایجاد می‌شود که به دلیل میزان زیاد گروه‌های سینالولی دیپروتنه شده این دافعه بسیار قوی تر از جاذبه الکترو استاتیکی میان نانو ذره و بار منفی دارو می‌باشد. سپس به دلیل اینکه مولکول‌های دارو آزاد شده ممکن است در بین خلل و فرج موجود در نانوذرات سیلیکا به دام افتاده باشند ره‌اسازی دارو به صورت پیوسته تا ۲۴ ساعت نیز مشاهده می‌شود. نتایج بررسی در نمودار (شکل ۴) گزارش شد. بررسی اثر ضدقارچ اکونازول با نانوذرات $MCM41$ و $MCM41-NH_2$ به روش چاهک پلیت: در این پژوهش، فعالیت ضدقارچ نانوذرات سیلیکا-اکونازول علیه قارچ *آسپیرژیلوس فیومگتس* در محیط مولر هیتون آگار در دو حلال اتانول و متانول، $ECO/MCM41-NH_2$ (B) و $ECO/MCM41$ (A)، حلال متانول، $ECO/MCM41-NH_2$ (D) و $ECO/MCM41$ (C) در حلال اتانول بررسی شد (شکل ۵). نتایج مطابق با (جدول ۳) به دست آمده است.

بررسی اثر ضدقارچ اکونازول با نانوذرات $MCM41$ و $MCM41-NH_2$ به روش چاهک پلیت در محیط نوترینت آگار: برای بررسی اثر ضدقارچ غلظت $1/2$ mg/ml از اکونازول از $ECO/MCM41-NH_2$ و $ECO/MCM41$ در این آزمایش، از روش چاهک پلیت برای بررسی قطر هاله عدم رشد استفاده شد که نتایج مطابق (جدول ۴) به دست آمد. قطر هاله عدم رشد در

فرمولاسیون داروی ECO/MCM41-NH₂ در حلال‌های اتانول و متانول مهار رشد مشاهده نگردید. نتایج بررسی اثرات ضدقارچ نانوذرات سیلیکا، بر روی قارچ *کاندیدا آلبیکنس* حداقل مهارکنندگی از رشد قارچ (MIC) به روش میکرودیالوشن قرارداد شده است. حداقل مهارکنندگی از رشد قارچ در فرمولاسیون ECO/MCM41(A) برابر ۳۰۰ μg/ml و برای فرمولاسیون ECO/MCM41 (C) و برابر ۷۵ μg/ml و در داروی خالص در حلال اتانول ۷۵ μg/ml است. در فرمولاسیون داروی ECO/MCM41-NH₂ در حلال‌های اتانول و متانول مهار رشد مشاهده نگردید.

بحث

میزان حلالیت اکونازول در آب کم است و اثرات ضد قارچی آن را محدود می‌کند. همچنین برای کارایی بیشتر و درمان به کمک داروهای ضد قارچ، نفوذ آنها از طریق لایه های پوستی بستگی دارد. فیروز (Firooz) و همکاران در سال ۲۰۱۵ راهبرد های فرمولاسیون برای انتقال اکونازول از طریق سایت های پوستی مورد هدف را بررسی نمودند (۲۵). یکی از ویژگی های نانوذرات توانایی آنها در احاطه کردن داروها می باشد، این ویژگی می تواند در معرض قرارگرفتن سیستماتیک داروها را کاهش دهد و غلظت مؤثر دارو را برای هدف ارسال کند (۳۰). کانو (Canu) و همکاران در سال ۲۰۰۶ یک ژل حاوی اکونازول و نانوذرات SLN تهیه نمودند و ره‌ایش دارو از پوست به روش *Ex-vivo* را با استفاده از نسبت های مختلف دارو و SLN مورد بررسی قرار دادند و مناسب بودن SLN فرموله شده برای اکونازول به منظور ره‌ایش پوستی دارو را پیشنهاد کردند (۳۱). در این تحقیق ره‌ایش پوستی اکونازول با استفاده از کرمی حاوی نسبت یک به یک از نانوذرات سیلیکا و داروی خالص مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد ره‌ایش پوستی کرم حاوی اکونازول/نانوذرات سیلیکا بیشتر از اکونازول خالص است. تحقیقات امبروگی (Ambrogi) و همکاران بر روی پودر حاوی نانوذرات سیلیکا و داروی اکونازول نشان داد، ره‌ایش اکونازول/ نانوذرات سیلیکا بیشتر از داروی خالص می باشد

نانوذرات سیلیکا با فرمولاسیون ECO/MCM41-NH₂ و ECO/MCM 41 و مقایسه با داروی آزاد در فواصل زمانی مشخص صورت پذیرفت. نتایج به دست آمده، بعد از ۷۲ ساعت نشان داد که هیچ قارچی در پلیت‌ها رشد نکرده است، این امر نشان‌دهنده این است که در نمونه‌های A، B و C قارچ رشد نمی‌کند و فرمولاسیون‌های ECO/MCM41-NH₂ و ECO/MCM 41 اثر ضد قارچ دارند. *آزمون تعیین MIC نانوذرات ECO/MCM41, ECO/MCM41-NH₂* نتایج بررسی اثرات ضد قارچ نانوذرات سیلیکا، بر روی قارچ *آسپرژیلوس فیومگتس* و وس حداقل مهارکنندگی از رشد قارچ (MIC) به روش میکرودیالوشن ارائه شده است. حداقل مهارکنندگی از رشد قارچ در داروی ECO/MCM41(A) برابر ۱۵۰ μg/ml و برای داروی ECO/MCM41 (C) برابر ۳۷/۵ μg/ml است و برای



شکل ۵: قطر هاله عدم رشد اکونازول با نانوذرات MCM41 و MCM41-NH₂ به روش چاهک پلیت.

جدول ۴: قطر هاله عدم رشد اکونازول با نانوذرات MCM41 و MCM41-NH₂ به روش چاهک پلیت در محیط کشت نوترینت آگار.

ECO Conc. 1. 2 mg/ml	نمونه
۱۵ mm	ECO/MCM41 (A)
۱۶ mm	ECO/MCM41-NH ₂ (B)
۲۰ mm	ECO (Negative Control)
۰	(Positive Control)

بررسی MCM41, MCM-41-NH₂, ECO, ECO/MCM41, (۲۵) هم‌چنین امبروگی (Ambrogi) و همکاران در سال ۲۰۱۰ (۲۵) فعالیت ضدقارچی نانوذرات سیلیکا را بر علیه قارچ *کاندیدا آلبیکنس* در محیط مولر هیتتون آگار گزارش کردند و نشان دادند که نانوذرات سیلیکا در ساختار غشای قارچ اثرات ضدقارچی اعمال می‌کند. رسوب و رشد کریستال‌ها و تغییر ابعاد کریستالی، همگی از نشانه‌های معمول تغییر پایداری فیزیکی هستند. ذخیره‌سازی و حمل و نقل فرآورده‌های دارویی ممکن است سبب رسوب و انباشتگی و رشد کریستال‌های داروها گردد (۳۲ و ۳۳). کانو (Canu) و همکاران-۲۰۰۶ گزارشی مبنی بر اینکه اندازه متوسط ژل نانوذرات-ECN ثابت بوده و در مدت ۳۰ روز تغییر نکرده است (۱۳ و ۳۱). ساننا (Sanna) و همکاران ۲۰۰۷ توضیح دادند که نانوذرات ECN-SLN در حین افزودن به هیدروژل‌ها، ته نشین نشدند (۱۳). در بررسی نتایج پایداری کرم تهیه شده ویژگی‌های فیزیکی مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد پس از ۱۲ ماه کرم دوفاز نشده است و تغییر در خصوصیات کرم تهیه شده صورت نگرفت. به دلیل حجم بالای اطلاعات این مقاله داده‌های مربوط به پایداری نشان داده نشده است. سیلیکون دی‌اکسید (SiO₂)، به عنوان سیلیکا شناخته می‌شود، اکسید سیلیس با فرمول شیمیایی SiO₂، شایع‌ترین عنصر موجود در طبیعت است. نانوذرات سیلیکا‌های متخلخل (MSN) با مشخصه‌های مزوپور (Mesoporous) به طور گسترده‌ای برای انتقال بارهای فعال براساس جذب فیزیکی یا شیمیایی استفاده می‌شوند و به صورت توخالی به عنوان ساختار سیلیکا مزوپور ساخته شده‌اند. اندازه، مورفولوژی، اندازه منافذ و ساختار MSNs می‌تواند طراحی شده و در فرایند سنتز کنترل شود (۱، ۳۴-۳۷) سیلیس مزوپور توخالی است، فضای توخالی و پوسته مزوپور دارای مناطق خاص باچگالی کم است، که به عنوان سیستم‌های تحویل داروهای نسل جدید با ظرفیت بارگذاری فوق‌العاده بالا طراحی شده است (۳۶). در این مطالعه با هدف ایجاد اثرات ضدقارچی، داروی اکونازول بر روی نانوذرات سیلیکا بارگذاری شد. به منظور بررسی بارگذاری داروی اکونازول از دستگاه FT-IR برای

بررسی MCM41, MCM-41-NH₂, ECO, ECO/MCM41, (۲۵) هم‌چنین امبروگی (Ambrogi) و همکاران در سال ۲۰۱۰ (۲۵) فعالیت ضدقارچی نانوذرات سیلیکا را بر علیه قارچ *کاندیدا آلبیکنس* در محیط مولر هیتتون آگار گزارش کردند و نشان دادند که نانوذرات سیلیکا در ساختار غشای قارچ اثرات ضدقارچی اعمال می‌کند. رسوب و رشد کریستال‌ها و تغییر ابعاد کریستالی، همگی از نشانه‌های معمول تغییر پایداری فیزیکی هستند. ذخیره‌سازی و حمل و نقل فرآورده‌های دارویی ممکن است سبب رسوب و انباشتگی و رشد کریستال‌های داروها گردد (۳۲ و ۳۳). کانو (Canu) و همکاران-۲۰۰۶ گزارشی مبنی بر اینکه اندازه متوسط ژل نانوذرات-ECN ثابت بوده و در مدت ۳۰ روز تغییر نکرده است (۱۳ و ۳۱). ساننا (Sanna) و همکاران ۲۰۰۷ توضیح دادند که نانوذرات ECN-SLN در حین افزودن به هیدروژل‌ها، ته نشین نشدند (۱۳). در بررسی نتایج پایداری کرم تهیه شده ویژگی‌های فیزیکی مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد پس از ۱۲ ماه کرم دوفاز نشده است و تغییر در خصوصیات کرم تهیه شده صورت نگرفت. به دلیل حجم بالای اطلاعات این مقاله داده‌های مربوط به پایداری نشان داده نشده است. سیلیکون دی‌اکسید (SiO₂)، به عنوان سیلیکا شناخته می‌شود، اکسید سیلیس با فرمول شیمیایی SiO₂، شایع‌ترین عنصر موجود در طبیعت است. نانوذرات سیلیکا‌های متخلخل (MSN) با مشخصه‌های مزوپور (Mesoporous) به طور گسترده‌ای برای انتقال بارهای فعال براساس جذب فیزیکی یا شیمیایی استفاده می‌شوند و به صورت توخالی به عنوان ساختار سیلیکا مزوپور ساخته شده‌اند. اندازه، مورفولوژی، اندازه منافذ و ساختار MSNs می‌تواند طراحی شده و در فرایند سنتز کنترل شود (۱، ۳۴-۳۷) سیلیس مزوپور توخالی است، فضای توخالی و پوسته مزوپور دارای مناطق خاص باچگالی کم است، که به عنوان سیستم‌های تحویل داروهای نسل جدید با ظرفیت بارگذاری فوق‌العاده بالا طراحی شده است (۳۶). در این مطالعه با هدف ایجاد اثرات ضدقارچی، داروی اکونازول بر روی نانوذرات سیلیکا بارگذاری شد. به منظور بررسی بارگذاری داروی اکونازول از دستگاه FT-IR برای

نتایج حاصل از چاهک پلیت را تأیید می‌کند. حداقل مهارکنندگی از رشد قارچ بر روی قارچ *کاندیدا آلبیکنس* در ECO/MCM41(C) بیشتر از ECO/MCM41-NH₂(D) برابر است، که نشان‌دهنده این است ECO/MCM41(A) دارای قدرت مهارکنندگی بیشتر است. نتایج به دست آمده از حداقل مهارکنندگی از رشد قارچ (MIC)، نتایج حاصل از چاهک پلیت را تأیید می‌کند.

نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر سیستم رسانش نانوذرات سیلیکا به عنوان سیستم ضدقارچی جدید مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که، سیلیکا می‌تواند همانند یک منبع ذخیره عمل نمایند و با ره‌ایش دارو در سطح پوست و نفوذ در لایه‌های بیرونی پوست یک سیستم آزادسازی کنترل شده بوجود آورد. بنابراین انتقال دارو از طریق پوست یک روش بسیار خوب نسبت به روش‌های مرسوم خوراکی و تزریقی است. ره‌ایش سیلیکا در پوست تحت تاثیر محتویات چربی و زنجیره‌های الکلی چرب در فرمولاسیون چربی ذرات نانو می‌باشد. اکونازول بارگذاری شده بر روی ECO/MCM41-NH₂ ره‌ایش بیشتر از ECO/MCM41 دارد. حداقل مهارکنندگی از رشد قارچ بر روی قارچ *کاندیدا آلبیکنس* و قارچ *آسپرژیلوس فیومگتس* نشان داد که داروی بارگذاری شده روی نانوذرات MCM41 دارای قدرت مهارکنندگی است و داروی بارگذاری شده بر روی نانوذرات آمین دار قدرت مهارکنندگی برای این دارو را ندارد. همچنین محیط کشت نوترینت آگار نسبت به مولر هیتون محیط مناسبی برای فعالیت‌های ضدقارچی نمی‌باشد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

فرمولاسیون‌های ECO/MCM41-NH₂ و ECO/MCM41 اثر ضد قارچ دارند. در تحقیقات امبروگی (Ambrogi) و همکاران بر روی پودر حاوی نانوذرات سیلیکا و داروی اکونازول نشان داده شد، اکونازول/انوذرات سیلیکا اثر ضد قارچ بیشتر نسبت به داروی اکونازول در محصولات تجاری دارد (۲۵). *آسپرژیلوس (Aspergillus)* شایع‌ترین عفونت تهاجمی قارچی و مسئول مرگ و میر بالا هستند. مقاومت ضد قارچی *آسپرژیلوس فومگاتوس* در برابر آزول در حال حاضر مورد توجه قرار گرفته است (۴۰). رابطه بین MIC و حداقل غلظت استرول ۱۴- α دمتیل‌سیکلوپروپان-۱۳- β هاری به عنوان یک عامل در ارزیابی فعالیت‌های آزول‌ها در برابر گونه‌های مختلف قارچی توسط شموکاوا (Shimokawa) و همکاران بررسی شد (۴۱). مکانیسم زمینه‌ای استرول‌های ۱۴-متیل در حال حاضر ناشناخته است. یک احتمال این است که به دلیل تأثیر گروه ۱۴-متیل بر عملکرد یک یا چند پروتئین غشایی با استرول‌های غشایی ارتباط برقرار می‌کنند. مطالعات قبلی انجام شده بر روی *کاندیدا آلبیکنس* افزایش حساسیت به مواد شیمیایی مختلف ضد قارچی را نشان می‌دهند: این مشاهدات این احتمال را به وجود می‌آورد، که ترکیب آزول و ضد قارچ به صورت هم‌افزا عمل می‌کند (۴۱). حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) داروی اکونازول SMS/Fax در برابر سویه‌های *کاندیدا آلبیکنس* با استفاده از روش میکروداپلوشن توسط دویی (Dubey) و همکاران انجام شد (۲۹). منطقه مهار دارو/نانوذرات در برابر *کاندیدا آلبیکنس* نشان داد، غلظت‌های متفاوت دارو/نانوذرات نقش مهمی در فعالیت‌های ضد قارچی دارد یعنی با افزایش غلظت حداکثر منطقه مهار به دست می‌آید (۲۹). در این مطالعه با هدف بررسی حداقل مهارکنندگی از رشد قارچ بر روی قارچ، سویه‌های مربوطه از قارچ *آسپرژیلوس فیومگتس* و قارچ *کاندیدا آلبیکنس* تهیه شد. حداقل مهارکنندگی از رشد قارچ بر روی قارچ *آسپرژیلوس فیومگتس* در ECO/MCM41(A) بیشتر از ECO/MCM41-NH₂(B) بوده است، که نشان‌دهنده این است. ECO/MCM41(A) دارای قدرت مهارکنندگی بیشتر است. نتایج به دست آمده از حداقل مهارکنندگی از رشد قارچ (MIC)

نویسندگان این مقاله از تمامی پرسنل آزمایشگاه همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند. دانشگاه آزاد تهران مرکزی، مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های پوست و جذام، دانشگاه علوم پزشکی تهران و همچنین انستیتو پاستور ایران به دلیل **تعارض در منافع** وجود ندارد.

References

1. Slowing II, Vivero-Escoto JL, Trewyn BG, Lin VS-Y. Mesoporous silica nanoparticles: structural design and applications. *Journal of Materials Chemistry*. 2010;20(37):7924-37.
2. Alanio A, Sitterlé E, Liance M, Farrugia C, Foulet F, Botterel F, et al. Low prevalence of resistance to azoles in *Aspergillus fumigatus* in a French cohort of patients treated for haematological malignancies. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011;66(2):371-4.
3. Park H-G, Lee I-S, Chun Y-J, Yun C-H, Johnston JB, de Montellano PRO, et al. Heterologous expression and characterization of the sterol 14 α -demethylase CYP51F1 from *Candida albicans*. 2011;509(1):9-15.
4. Latgé J-P. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends in microbiology*. 2001;9(8):382-9.
5. Nierman WC, Pain A, Anderson MJ, Wortman JR, Kim HS, Arroyo J, et al. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature*. 2005;438(7071):1151.
6. Hornby JM, Nickerson KW. Enhanced production of farnesol by *Candida albicans* treated with four azoles. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004;48(6):2305-7.
7. Sudbery PEJNRM. Growth of *Candida albicans* hyphae. 2011;9(10):737.
8. Dai T, de Arce VJB, Tegos GP, Hamblin MR. Blue dye and red light, a dynamic combination for prophylaxis and treatment of cutaneous *Candida albicans* infections in mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(12):5710-7.
9. Verma P, Pathak K. Nanosized ethanolic vesicles loaded with econazole nitrate for the treatment of deep fungal infections through topical gel formulation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2012;8(4):489-96.
10. Hardia A, Jamindar D, Mahajan A, Hardia A. FORMULATION AND IN VITRO AND SKIN PERMEABILITY EVALUATION OF DEXAMETHASONE LOADED NIOSOMAL GEL. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development Vol*. 2017;5(2):1-09.
11. Weinstein JN, Ralston E, Leserman LD, Klausner RD, Dragsten P, Henkart P, et al. Self-quenching of carboxyfluorescein fluorescence: uses in studying liposome stability and liposome-cell interaction. *Liposome Technology Volume III: Targeted Drug Delivery and Biological Interaction*: CRC Press; 2018. p. 183-204.
12. Ahmed TA. Preparation of transfersomes encapsulating sildenafil aimed for transdermal drug delivery: Plackett–Burman design and characterization. *Journal of liposome research*. 2015;25(1):1-10.
13. Sanna V, Gavini E, Cossu M, Rassu G, Giunchedi P. Solid lipid nanoparticles (SLN) as carriers for the topical delivery of econazole nitrate: in-vitro characterization, ex-vivo and in-vivo studies. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 2007;59(8):1057-64.

14. Gratieri T, Krawczyk-Santos AP, da Rocha PB, Gelfuso GM, Marreto RN, Taveira SF. SLN-and NLC-encapsulating antifungal agents: skin drug delivery and their unexplored potential for treating onychomycosis. *Current pharmaceutical design*. 2017;23(43):6684-95.
15. Vallet-Regi M, Ramila A, Del Real R, Pérez-Pariente J. A new property of MCM-41: drug delivery system. *Chemistry of Materials*. 2001;13(2):308-11.
16. Shah RM, Eldridge DS, Palombo EA, Harding IHJEJoP, Biopharmaceutics. Microwave-assisted microemulsion technique for production of miconazole nitrate-and econazole nitrate-loaded solid lipid nanoparticles. 2017;117:141-50.
17. Manzano M, Aina V, Arean C, Balas F, Cauda V, Colilla M, et al. Studies on MCM-41 mesoporous silica for drug delivery: effect of particle morphology and amine functionalization. *Chemical Engineering Journal*. 2008;137(1):30-7.
18. Brezoiu A-M, Deaconu M, Nicu I, Vasile E, Mitran R-A, Matei C, et al. Heteroatom modified MCM-41-silica carriers for Lomefloxacin delivery systems. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2019;275:214-22.
19. Horcajada P, Ramila A, Perez-Pariente J, Vallet-Regi M. Influence of pore size of MCM-41 matrices on drug delivery rate. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2004;68(1):105-9.
20. Vallet-Regi M, Balas F, Arcos D. Mesoporous materials for drug delivery. *Angewandte Chemie International Edition*. 2007;46(40):7548-58.
21. Prausnitz MR, Mitragotri S, Langer R. Current status and future potential of transdermal drug delivery. *Nature reviews Drug discovery*. 2004;3(2):115.
22. Gu W, Yu Q, Yu C, Sun S. In vivo activity of fluconazole/tetracycline combinations in *Galleria mellonella* with resistant *Candida albicans* infection. *Journal of global antimicrobial resistance*. 2018;13:74-80.
23. Naglik JR, Rodgers CA, Shirlaw PJ, Dobbie JL, Fernandes-Naglik LL, Greenspan D, et al. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. *The Journal of infectious diseases*. 2003;188(3):469-79.
24. Firooz A, Nafisi S, Maibach HIJJoP. Novel drug delivery strategies for improving econazole antifungal action. 2015;495(1):599-607.
25. Ambroggi V, Perioli L, Pagano C, Marmottini F, Moretti M, Mizzi F, et al. Econazole nitrate-loaded MCM-41 for an antifungal topical powder formulation. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2010;99(11):4738-45.
26. Montazeri M, Razzaghi-Abyaneh M, Nasrollahi S, Maibach H, Nafisi S. Enhanced topical econazole antifungal efficacy by amine-functionalized silica nanoparticles. *Bulletin of Materials Science*. 2020;43(1):13.
27. Barry A, Pfaller M, Rennie R, Fuchs P, Brown S. Precision and accuracy of fluconazole susceptibility testing by broth microdilution, Etest, and disk diffusion methods. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002;46(6):1781-4.
28. Arjomandzadegan M, Emami N, Habibi G, Farazi AA, Kahbazi M, Sarmadian H, et al. Antimycobacterial activity assessment of three ethnobotanical plants against *Mycobacterium Tuberculosis*: An In Vitro study. *International journal of mycobacteriology*. 2016;5(5):108.

29. Dubey A, Sharma A, Verma S. Ferulic acid surface modified silica polymer nanocomposites (SMS/FA) for antioxidant and antifungal activities. *Materials Today: Proceedings*. 2020.
30. Kamaly N, Xiao Z, Valencia PM, Radovic-Moreno AF, Farokhzad OC. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chemical Society Reviews*. 2012;41(7):2971-3010.
31. Canu G, Sanna VA, Gavini E, Cossu M, Rassu G, Giunchedi P. Ex vivo cutaneous penetration of econazole nitrate from SLN incorporated in hydrophilic gels. 2006.
32. Wang Y, Zheng Y, Zhang L, Wang Q, Zhang D. Stability of nanosuspensions in drug delivery. *Journal of controlled release*. 2013;172(3):1126-41.
33. Wu L, Zhang J, Watanabe W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Advanced drug delivery reviews*. 2011;63(6):456-69.
34. Garcia-Bennett AE. Synthesis, toxicology and potential of ordered mesoporous materials in nanomedicine. *Nanomedicine*. 2011;6(5):867-77.
35. Hoffmann F, Cornelius M, Morell J, Fröba M. Periodic mesoporous organosilicas (PMOs): past, present, and future. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2006;6(2):265-88.
36. Tang F, Li L, Chen D. Mesoporous silica nanoparticles: synthesis, biocompatibility and drug delivery. *Advanced Materials*. 2012;24(12):1504-34.
37. Wan Y, Zhao D. On the controllable soft-templating approach to mesoporous silicates. *Chemical reviews*. 2007;107(7):2821-60.
38. Berlier G, Gastaldi L, Sapino S, Miletto I, Bottinelli E, Chirio D, et al. MCM-41 as a useful vector for rutin topical formulations: synthesis, characterization and testing. *International journal of pharmaceutics*. 2013;457(1):177-86.
39. Laghaei M, Sadeghi M, Ghalei B, Dinari M. The effect of various types of post-synthetic modifications on the structure and properties of MCM-41 mesoporous silica. *Progress in Organic Coatings*. 2016;90:163-70.
40. Szalewski DA, Hinrichs VS, Zinniel DK, Barletta RG. The pathogenicity of *Aspergillus fumigatus*, drug resistance, and nanoparticle delivery. *Canadian journal of microbiology*. 2018;64(7):439-53.
41. Shimokawa O, Niimi M, Kikuchi K, Saito M, Kajiwara H, Yoshida S-i. Relationship between MIC and minimum sterol 14 α -demethylation-inhibitory concentration as a factor in evaluating activities of azoles against various fungal species. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(11):5547-9.