سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آبی بذر زیره سبز(Cuminum cyminum L.) و ارزیابی فعالیت زیستی آن ها

رویا کرمیان*[۱]، جمال الدین کمال نژاد[۱]

۱) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۳/۳۰

چکیده

مقدمه: گزارش های فراوانی در مورد کاربرد گیاهان دارویی در طب سنتی و نیز کاربرد نانوذرات فلزی در حوزه های مختلف زیست پزشکی وجود دارد. هر چند سنتز نانوذرات فلزی با استفاده از عصاره های گیاهی و بررسی اثرات دارویی آن ها موضوعی نسبتاً جدید است. گیاه دارویی زیره سبز(Cuminum cyminum L.) دارای طیف وسیعی از متابولیت های ثانویه با قدرت احیاکنندگی بالا است که می توان از آن ها در یک مسیر سبز برای بیوسنتز نانوذرات نقره استفاده نمود. هدف از این تحقیق، آنالیز فیتوشیمیایی عصاره آبی بذر زیره سبز، بیوسنتز نانوذرات نقره با استفاده از این عصاره، دستیابی به شرایط بهینه جهت سنتز این نانوذرات و نیز ارزیابی فعالیت زیستی عصاره و نانوذرات نقره تولید شده است.

مواد و روش ها: محتوای فنل تام، فلاونوئید تام، قندهای احیاکننده، نشاسته و اسید آسکوربیک به ترتیب توسط معرف های فولین-سیوکالتو، کلرید آلومینیوم، اسید دی نیترو سالیسیلیک، آنترون و دی نیترو فنیل هیدرازین اندازه گیری شد. تائید احیاء یـــون های نقره توســـط روش های طیف سنجی مرئی-فرابنفش(UV-Visible)، پراش پرتو ایکس(XRD)، طیف سنجی تبدیل فوریه فرو سرخ(FTIR) و میکروسکوپی الکترونی نگاره(SEM) انجام شد. فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه ها به روش مهار رادیکال آزاد DPPH ارزیابی شد. هم چنین فعالیت ضدمیکروبی عصاره و نانوذرات تولید شده در برابر چهار سویه باکتری گرم مثبت و منفی به ترتیب شامل(Bacillus cereus (PTCC 1247، Staphylococcus aureus (ATCC 25923)، Escherichia coli (ATCC 35218) و Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853) به روش انتشار دیسک ارزیابی شد. فعالیت ضدقارچی نیز در برابر قارچ Fusarium oxysporum بررسی شد.

یافته های پژوهش: نتایج آنالیز فیتوشیمیایی نشان داد که عصاره آبی بذر زیره سبز غنی از ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی بوده و نیز واجد قندهای احیاکننده، نشاسته و اسید آسکوربیک است. میانگین اندازه نانوذرات تولید شده در آنالیزهای مختلف و در بهترین شرایط سنتز ۵ تا ۴۵ نانومتر تعیین شد. نمونه های مورد مطالعه واجد فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی بوده(IC_{50}: ۳۵/ ۱تا ۱/۶۷ میلی گرم بر میلی لیتر) و عصاره به همراه نانوذرات نقره اثرات هم افزایی در مهار رادیکال آزاد DPPH(IC_{50}: ۱/۳۵ تا میلی گرم بر میلی لیتر) نشان دادند. به علاوه این عصاره ها فـــعالیت ضدمیکروبی و ضدقارچی خوبی نیز در برابر برخی از باکتری ها و قارچ مورد مطالعه نشان دادند.

بحث و نتیجه گیری: ترکیبات ثانویه فراوان موجود در گیاه زیره سبز دارای توانایی احیاء و پایدار نمودن نانوذرات نقره می باشند. عصاره بذر و نانوذرات تولید شده توسط عصاره این گیاه، دارای فعالیت زیستی قابل توجهی بوده و در آینده می توان از آن ها به عنوان منابعی طبیعی جهت تولید مکمل های آنتی اکسیدانی غذایی یا دارویی استفاده نمود.

واژه های کلیدی: Cuminum cyminum L، فعالیت آنتی اکسیدانی، فعالیت ضدقارچی، فعالیت ضدمیکروبی، نانوذرات نقره

* نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

Email: karamian.roya@gmail.com

Copyright © 2018 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.5.128]

مقدمه

در سال های اخیر نانوذرات به دلیل کاربرد وسیع در حوزه های کاتالیز، فتونیک، اپتوالکترونیک، نشان گذاری بیولوژیکی، داروسازی، کنترل آلودگی های محیطی، سیستم های تحویل دارو و شیمی مواد بسیار مورد توجه قرار گرفته اند(۱). تکنیک های شیمیایی و فیزیکی که جهت سنتز نانوذرات به کار می روند، اغلب بسیار گران قیمت هستند و معمولاً وجود بقایای واکنشگرهای سمی و بعضاً سرطان زای حاصل از این تکنیک ها، منجر به عدم کاربرد زیستی نانوذرات حاصل می شود. بنا بر این توسعه روش های پاک، غیرسمی و مقرون به صرفه جهت سنتز نانوذرات با استفاده از گیاهان و میکروارگانیسم ها بسیار ارزشمند است. اگر چه موفقیت در استفاده از میکروارگانیسم هایی چون باکتری ها و دیاتومه ها کاملاً به آگاهی از رفتار این ارگانیسم ها بستگی داشته و به دلیل هزینه های بالا برای تهیه و نگهداری آن ها، کمتر مورد توجه هستند(۲). امروزه استفاده از گیاهان به عنوان منابع تجدیدپذیر و ارزان جهت سنتز سبز نانوذرات بسیار مورد توجه قرار گرفته اند. مزیت بهره گیری از عصاره و اسانس گیاهان در سنتز نانوذرات، حضور تنوع وسیعی از متابولیت های ثانویه(مانند پلی فنل ها، آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، کوئینون ها، تانن ها و....) در آن ها است که در عمل احیاء زیستی یون دخیل هستند(۲،۳). در حال حاضر از بسیاری از گیاهان اعم از تک لپه و دولپه به منظور تولید نانوذرات مختلف فلزی مورد استفاده قرار گرفته و کاربرد بسیاری دیگر از آن ها نیز در حال بررسی است(۴). در میان نانوذرات فلزی، نانوذرات نقره یکی از مهم ترین و پرکاربردترین نانوذرات هستند که به شکل گسترده در صنایع مختلف دارویی و بهداشتی-آرایشی مورد استفاده قرار می گیرند. این نانوذرات با اندازه مناسب و پایداری شیمیایی قابل توجه در شکل و اندازه ثابت در محلول ها باقی می مانند. یکی از دلایل کاربرد گسترده این نانوذرات، پتانسیل ضدمیکروبی، ضدقارچی و آنتی اکسیدانی آن ها است. پتانسیل ضدمیکروبی بالقوه نانوذرات نقره، کاربرد آن ها را به عنوان یک استراتژی مهم جهت غلبه بر مشکل جدی مقاومت به آنتی‌بیوتیک ها که سلامت بشر را تحدید می‌کنند، معرفی می نماید. اگر چه نانوذرات نقره برای عوامل بیماریزا مضرند، اما برای غذاها، بافت های زنده و در نهایت برای انسان تقریباً بی ضرر می باشند. زیرا خاصیت زیستی ذرات نقره به ویژگی های فیزیکی و شیمیایی آن ها به ویژه ابعاد آن ها بستگی دارد، به نحوی که با تبدیل ذرات به ابعاد کوچک در حد نانومتر، خاصیت ضدمیکروبی آن ها به شدت افزایش می یابد(۵). اگر چه سابقه تحقیق در مورد نانوذرات نقره و خواص آن ها طولانی است، اما پژوهش در زمینه تولید آن ها به کمک عصاره های گیاهی در پاسخ به نیاز روزافزون به تولید ترکیبات ایمن و سازگار با محیط زیست و سلامت انسان به سال های اخیر مربوط می شود.

زیره سبز(Cuminum cyminum L.) متعلق به تیره چتریان است که از گیاهان دارویی مهم و اقتصادی ایران به شمار می رود و گسترش نسبتاً وسیعی در مناطق مختلف کشور دارد. این گیاه در مناطق مدیترانه ای و در جنوب غرب و مرکز آسیا می روید(۶). زیره سبز در استان های خراسان، یزد، کرمان، اصفهان و برخی نقاط دیگر ایران کشت می شود. بذر زیره سبز حاوی ۵ درصد اسانس و مقادیر فراونی از ترکیبات پلی فنلی مانند فلاونوئیدهای گلوکوزیدی و بسیاری از آمینواسیدهای آزاد است که بسیاری از خواص دارویی این گیاه به حضور آن ها مربوط می شود(۷). هدف از پژوهش حاضر ارزیابی فیتوشیمیایی(تعیین محتوای فنل و فلاونوئید کل، قندهای احیاکننده، نشاسته و اسید آسکوربیک) عصاره آبی بذر زیره سبز و بیوسنتز نانوذرات نقره با استفاده از این عصاره است. هم چنین فعالیت زیستی عصاره و نیز نانوذرات نقره تولید شده(فعالیت های آنتی اکسیدانی، ضدمیکروبی و ضدقارچی) مورد بررسی قرار گرفته‌است.

مواد و روش ها

تهیه بذر زیره سبز: بذر گیاه دارویی زیره سبز(Cuminum cyminum L.) بومی اصفهان از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید.

تهیه عصاره بذر: ابتدا ۵ گرم بذر زیره سبز در الکل ۷۰ درصد به مدت ۲ دقیقه غوطه ور شدند. سپس

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.5.128]

بذرها با هیپوکلریت سدیم ۳۰ درصد به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی و آن گاه با آب مقطر شسته شدند. جهت تهیه عصاره، بذرها در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه خیسانده شدند. عصاره استخراج شده از بذرها با استفاده از کاغذ واتمن شماره ۱ صاف و از آن برای تهیه نمونه استفاده شد.

تعیین محتوای فنل تام: به منظور تعیین محتوای فنل تام، ۰/۱۲۵ میلی لیتر عصاره بذر با ۰/۵ میلی لیتر آب مقطر مخلوط گردید. سپس ۰/۱۲۵ میلی لیتر معرف فولین-سیوکالتو به همراه ۱/۲۵ میلی لیتر کربنات سدیم ۷ درصد به آن اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید. مخلوط حاصل با آب مقطر به حجم ۳ میلی لیتر رسانده شد و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید. در نهایت جذب نمونه ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Perkin Elmer(مدل UV/Visible-Lambda 45، آمریکا) قرائت شد. محتوای فنل تام نمونه های مورد مطالعه در سه تکرار با استفاده از منحنی استاندارد اسید گالیک محاسبه و به صورت معادل میلی گرم اسیدگالیک(GAE) بر گرم وزن خشک بیان شد(۸).

تعیین محتوای فلاونوئید تام: به منظور تعیین محتوای فلاونوئید تام، ۰/۵ میلی لیتر عصاره با ۰/۵ میلی لیتر کلرید آلومینیوم ۲ درصد متانولی مخلوط گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس جذب نمونه ها در طول موج ۳۶۸ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Perkin Elmer(مدل UV/Visible-Lambda 45، آمریکا) قرائت شد. محتوای فلاونوئید تام نمونه ها در سه تکرار با استفاده از منحنی استاندارد کوئرستین محاسبه و به صورت معادل میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک بیان شد(۹).

سنجش محتوای نشاسته: به منظور تعیین محتوای نشاسته، ۵ گرم پودر بذر جهت خارج نمودن قندها با اتانول ۷۰ درصد چندین بار شسته شد، تا حدی که با معرف آنترون تغییر رنگی مشاهده نگردید. نمونه پس از شستشو با الکل خشک شده و در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر جوشانده شد، تا عصاره بدون قند به دست آید. سپس ۱ میلی لیتر از عصاره حاصل خشک شد و در اسید پرکلریک ۶۰ درصد حل شد. آن گاه به آن ۴ میلی لیتر معرف آنترون اضافه شد و در حمام آب جوش به مدت ۸ دقیقه نگهداری گردید. شدت رنگ سبز تیره ایجاد شده در طول موج ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Perkin Elmer (مدل UV/Visible-Lambda 45، آمریکا) اندازه گیری شد و مقدار نشاسته با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز محاسبه گردید(۱۰).

تعیین محتوای قند احیاکننده کل: به منظور سنجش محتوای قند احیاکننده کل، به ۱۰۰ میلی لیتر عصاره ۱ میلی لیتر آب مقطر و ۱ میلی لیتر معرف اسید دی نیتروسالیسیلیک اضافه شد و سپس مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. در نهایت میزان جذب نمونه ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Perkin Elmer(مدل UV/Visible-Lambda 45، آمریکا) قرائت شد. مقدار قند احیاکننده کل با استفاده از منحنی استاندارد مالتوز محاسبه گردید(۱۱).

سنجش محتوای اسید آسکوربیک: به منظور ارزیابی محتوای اسید آسکوربیک، ۲ میلی لیتر عصاره بذر در روتاری تا حد خشک شدن تبخیر شد. سپس به آن ۲ میلی لیتر اسید اگزالیک ۴ درصد اضافه و با برم مخلوط گردید. به مخلوط واکنش ۱ میلی لیتر معرف دی نیترو فنیل هیدرازین به همراه ۲ قطره تیواوره ۱۰ درصد اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد تا کریستال های نارنجی-قرمز رنگ تشکیل گردند. سپس کریستال های حاصل در ۷ میلی لیتر اسید سولفوریک ۸۰ درصد حل شدند. آن گاه جذب محلول در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Perkin Elmer (مدل UV/Visible-Lambda 45، آمریکا) قرائت گردید. مقدار اسید آسکوربیک با استفاده از منحنی استاندارد اسید آسکوربیک محاسبه شد(۱۲).

بیوسنتز نانوذرات نقره: به منظور سنتز نانوذرات نقره، ۲۵ میلی لیتر محلول نیترات نقره(مرک، آلمان) به ۵ میلی لیتر عصاره بذر اضافه شد و جهت انجام واکنش به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.5.128]

نگهداری گردید. به منظور دستیابی به شرایط بهینه جهت سنتز نانوذرات نقره، از غلظت های مختلف نیترات نقره(۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۳ میلی مولار)، غلظت های مختلف عصاره(۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی گرم بر میلی لیتر)، دماهای مختلف(۴، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ درجه سانتی گراد) و زمان صفر تا ۲۴۰ دقیقه و پس از ۲۴ ساعت استفاده شد.

آنالیز طیف سنجی مرئی-فرابنفش(UV-Visible): جهت اثبات وجود نانوذرات نقره، طیف جذبی نانوذرات سنتز شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Perkin Elmer(مدل UV/Visible-Lambda 45، آمریکا) تهیه شد. بدین منظور از عصاره تیمار شده در زمان های مختلف نمونه گیری انجام شد و بلافاصله قبل از خشک شدن نمونه، میزان جذب در محدوده طول موج ۴۲۰ تا۴۵۰ نانومتر قرائت شد. این محدوده طول موج مربوط به عنصر نقره است و بسته به اندازه و شکل این ذرات در طیف جذبی نوسان مشاهده می شود.

آنالیز پراش پرتو ایکس(XRD): از آنالیز پراش پرتو X به منظور بررسی وجود نانوذرات سنتز شده توسط عصاره بذر استفاده شد. در حقیقت این روش تشکیل مرحله ای نانوذرات احیا شده زیستی را مورد بررسی قرار می دهد. بررسی وجود ساختار کریستالی نانوذرات سنتز شده با در نظر گرفتن منبع پرتوی Ka لامپ مسی با طول موج پرتو X در $\lambda=1.54\ A^0$ و محدوده زاویه براگ($30^\circ\leq2\theta\leq80^\circ$) توسط دستگاه پراش پرتو X مدل APD 2000(ایتالیا) انجام شد.

آنالیز طیف سنجی تبدیل فوریه فرو سرخ: جهت آنالیز طیف سنجی مادون قرمز، به ۲۵ میلی لیتر محلول نیترات نقره ۱ میلی مولار(مرک، آلمان)، ۵ میلی لیتر عصاره بذر اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. بعد از اتمام واکنش، نمونه به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و سپس محلول رویی جدا شد. این عمل جهت اطمینان سه بار تکرار شد. پس از سانتریفوژ، نمونه خشک شد و پودر به دست آمده جهت آنالیز با دستگاه Perkin Elmer FT-IR(مدل GX، آمریکا) مورد استفاده قرار گرفت. فرآیندی مشابه برای عصاره انجام شد.

آنالیز میکروسکپی الکترونی نگاره(SEM): به منظور تعیین اندازه و مورفولوژی نانوذرات تولید شده با استفاده از میکروسکوپی الکترونی، مخلوط واکنش سه بار به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس چند قطره از رسوب حاصل بر روی یک قطعه فویل آلومینیومی در دمای اتاق خشک گردید و پس از خشک شدن، توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره Philips SEM machine (مدل CMC-300 KV-، هلند) عکس برداری صورت گرفت.

ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی: فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH در نمونه های مورد مطالعه شامل عصاره(۵ میلی لیتر پودر گیاه+۵۰ میلی لیتر آب مقطر)، عصاره+نانوذره(۵ میلی لیتر عصاره+۲۵ میلی لیتر نیترات نقره پس از انجام واکنش در ۲۰ درجه سانتی-گراد) و نانوذره با غلظت های مختلف ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی گرم در میلی لیتر از عصاره تهیه شد. ۲/۵ میلی لیتر از این عصاره با ۱ میلی لیتر محلول متانولی DPPH با غلظت ۳×۱۰^{-۴} مولار مخلوط شد و پس از آن که به شدت به هم زده شد، به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری گردید. جذب مخلوط واکنش در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Perkin Elmer(مدل45 UV/Visible-Lambda، آمریکا) اندازه‌گیری شد. از اسید آسکوربیک به عنوان کنترل استفاده شد(۱۳).

ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی: فعالیت ضدمیکروبی نمونه ها(عصاره، عصاره+نانوذره و نانوذرات) در برابر چهار سویه باکتری گرم مثبت و منفی شامل Bacillus cereus (PTCC 1247)، Staphylococcus aureus (ATCC 25923)، Escherichia coli (ATCC 35218) و Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853) به روش انتشار دیسک ارزیابی شد. بدین منظور، ابتدا از همه سویه های باکتریایی، سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند($۱/۵\times۱۰^{۸}$ cfu/ml) تهیه شد. سپس با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون تهیه

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.5.128]

شده، بر روی سطح محیط مولر هینتون آگار کشت یکنواخت انجام شد(۱۴). پس از آن، دیسک های بلانک استریل(پادتن طب، ایران) در غلظت های مختلف ۱، ۰/۱ و ۰/۰۱ میلی گرم در میلی لیتر نمونه ها غوطه ور شدند. در نهایت، دیسک های تهیه شده با فاصله معین از یکدیگر و از لبه درون پلیت ها قرار داده شدند. پلیت ها به مدت۲۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری و سپس قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک های حاوی عصاره اندازه گیری شد. قطر هاله ۶ میلی متری به عنوان مقاوم در نظر گرفته شد. هم چنین، از دیسک حاوی آب مقطر به عنوان شاهد منفی و از آنتی بیوتیک های جنتامایسین، پنی سیلین و استرپتومایسین به عنوان شاهد مثبت استفاده‌شد.

ارزیابی فعالیت ضدقارچی: فعالیت ضدقارچی عصاره و نانوذرات سنتز شده در برابر Fusarium oxysporum در محیط PDA(Potatoes Dextrose Agar) مطالعه شد. نمونه ها در دو غلظت ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پی پی ام تهیه و به محیط کشت اضافه شدند. پس از ۷ روز رشد میسلیوم قارچ در پلیت کنترل(r) و حاوی نمونه ها(R) اندازه گیری شد. از فرمول زیر جهت محاسبه فعالیت ضدقارچی استفاده شد:

درصد فعالیت ضدقارچی = $R-r/R\times100$

تحلیل آماری داده ها: داده های حاصل از هر آزمایش با استفاده از نرم افزارهای Excel و SAS تجزیه و تحلیل شد و مقایسه میانگین ها به روش دانکن در سطح $P<0.05$ انجام شد. نتایج حاصل از این بررسی به صورت میانگین±انحراف معیار(Mean±SD) بیان گردید. نمونه ها در سه تکرار بررسی شدند.

یافته های پژوهش

نتایج حاصل از آنالیز فیتوشیمیایی نشان داد که عصاره آبی بذر زیره سبز(۵ گرم در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر) دارای محتوای بالای فنل(۱/۶±۹۳۵ میلی گرم بر گرم وزن خشک)، فلاونوئید(۲/۵±۲۱۳ میلی گرم بر گرم وزن خشک) و نیز واجد مقادیر ۰/۰۲۴ میلی گرم بر گرم وزن خشک نشاسته، ۰/۰۰۵ میلی گرم بر گرم وزن خشک قند احیاکننده و ۰/۰۹۵ میلی گرم بر گرم وزن خشک اسید آسکوربیک می باشد(جدول شماره ۱).

بیوسنتز نانوذرات نقره و بهینه سازی شرایط سنتز: احیاء زیستی یون Ag^+ به Ag^0 توسط عصاره بذر انجام شد. در اثر احیاء یون های نقره و تولید نانوذرات، رنگ نمونه ها از زرد کم رنگ به قهوه ای تبدیل شد که نشانه تولید سوسپانسیون کلوئیدی نانوذرات نقره است(شکل شماره ۱-A). تجربیات جهت یافتن غلظت بهینه از میان غلظت های مختلف عصاره(۰/۲ تا ۱ میلی گرم بر میلی لیتر) جهت سنتز نانوذرات نشان داد که افزایش غلظت عصاره، موجب افزایش سنتز نانوذرات می گردد. هم چنین افزایش غلظت نیترات نقره نیز باعث افزایش تولید نانوذرات می شود. بررسی اثر دماهای مختلف در بازه زمانی صفر تا ۲۴۰ دقیقه نیز نشان داد که دمای ۲۰ درجه سانتی گراد، دمای بهینه جهت سنتز این نانوذرات است(شکل شماره ۲).

آنالیز طیف سنجی مرئی-فرابنفش(UV/Visible): طیف مرئی-فرابنفش مخلوط واکنش(شامل نیترات نقره ۱ میلی مولار+عصاره در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد) در ۴۵۰ نانومتر در شکل شماره ۱-A ارائه شده است. نتایج حاصل نشان داد که افزایش غلظت عصاره، باعث افزایش جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر شده و در نهایت موجب افزایش سنتز نانوذرات می گردد(شکل شماره ۲-A). هم چنین با افزایش غلظت نیترات نقره(۰/۵ تا ۳ میلی مولار) در زمان های مختلف(صفر تا ۲۴۰ دقیقه)، تولید نانوذرات افزایش می یابد(شکل شماره ۲-B). به علاوه نتایج حاکی از آن بود که دمای ۲۰ درجه سانتی گراد، دمای بهینه جهت سنتز این نانوذرات بوده و افزایش دما راندمان سنتز را کاهش داد. در دمای ۴ درجه سانتی گراد نیز میزان واکنش پائین بود(شکل شماره ۲-B).

آنالیز پراش پرتو ایکس(XRD): طیف XRD مربوط به نمونه ها نشان دهنده حضور کریستال های نانوذرات نقره سنتز شده به کمک عصاره بذر است. بر اساس نمودار شماره الگو XRD و اندیس میلر در سطوح ۱۱۱، ۲۰۰، ۲۲۰ و ۳۱۱ که به ترتیب مربوط به زوایای °۳۸/۱۲۳، °۴۴/۲۱۱، °۶۶/۳۲۱ و °۷۹/۰۱۲ می باشند، وجود نانوکریستال های نقره اثبات گردید که در میان آن ها قله مربوط به زاویه °۳۸/۱۲ از اهمیت بیشتری برخوردارست(شکل شماره ۱-B). بر اساس

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.5.128]

طیف XRD حاصل و فرمول زیر(دبای-شرر)، اندازه نانوذرات تشکیل شده معادل ۱۵ تا ۴۵ نانومتر تعیین شد.

$$D = 0.9\,\lambda / \beta \cos \Theta$$
$$\lambda = 0.154\ nm$$

که در آن β = پهنای قله ها در نصف ارتفاع ماکزیمم، λ = طول موج اشعه X برابر با ۱/۵۴ نانومتر، θ = زاویه بین پرتو تابش و بازتابش و D = اندازه ذرات بلوری می باشد.

آنالیز طیف سنجی فرو سرخ تبدیل فوریه(FTIR): طیف فوریه فرو سرخ عصاره بذر قبل و پس از واکنش در شکل شماره ۱-B ارائه شده‌است. آنالیز FTIR عصاره قبل از واکنش یک قله تقریباً بزرگ را در نزدیکی $۳۳۰۰\ CM^{-1}$($۳۳۸۰\ CM^{-1}$) نشان داد. این قله به شکل ضعیف تر در عصاره پس از واکنش احیاء زیستی نیز مشاهده شد. هم چنین در آنالیز FTIR یک قله بزرگ نیز بین نقاط $۱۰۰۰\ CM^{-1}$ تا $۲۰۰۰\ CM^{-1}$ ($۱۴۴۷CM^{-1}$، $۱۶۸۳/۳\ CM^{-1}$ و $۱۷۲۳/۶۸\ CM^{-1}$) مشاهده شد.

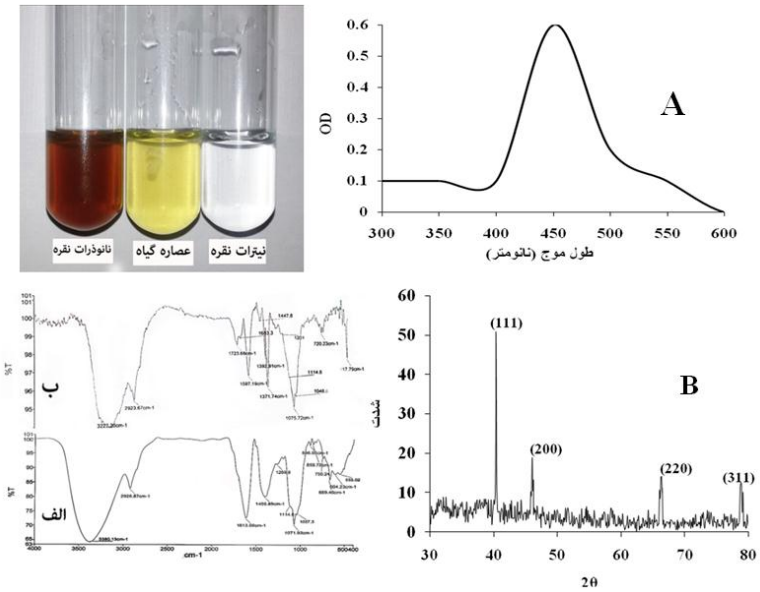
آنالیز میکروسکوپ الکترونی نگاره(SEM): تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره مربوط به نانوذرات نقره سنتز شده نشان داد که این ذرات واجد اشکال کروی هستند و اندازه ای در حدود ۵ تا ۹ نانومتر دارند(شکل شماره ۳).

ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی: نتایج حاصل از بررسی میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره، عصاره+نانوذره و نانوذره مورد مطالعه به روش مهار رادیکال آزاد DPPH در جدول شماره ۱ ارائه شده است. هر سه نمونه مورد مطالعه فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی نشان دادند. هر چند تفاوت میان مقادیر IC_{50} آن ها معنی دار نبود. در این مطالعه اسید آسکوربیک فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری نسبت به سایر نمونه ها نشان داد. به علاوه نتایج نشان داد که پتانسیل آنتی اکسیدانی نمونه ها با افزایش غلظت افزایش می یابد.

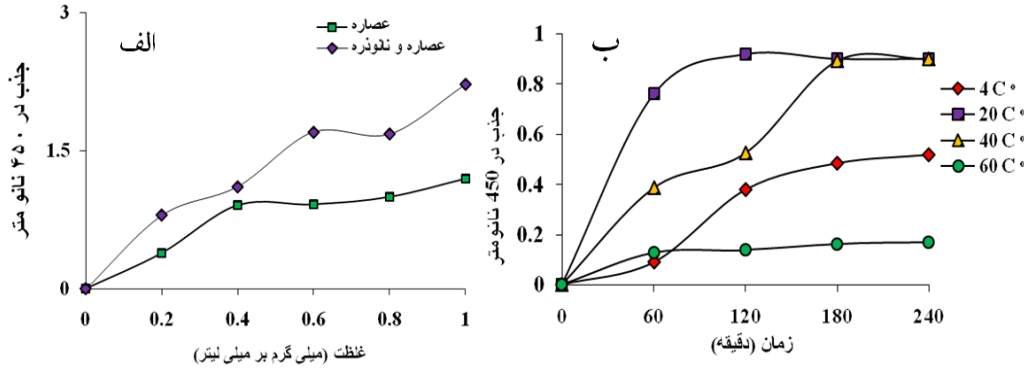
ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی و ضدقارچی: نتایج حاصل از بررسی فعالیت ضدمیکروبی نمونه ها در جدول شماره ۲ ارائه شده است. نتایج نشان داد که نمونه ها در برابر اکثر باکتری های مورد مطالعه در این پژوهش دارای فعالیت مهارکنندگی رشد بوده و این فعالیت با افزایش غلظت ماده موثره در نمونه ها، افزایش یافته است. نانوذرات نقره دارای فعالیت ضدمیکروبی بیشتری در برابر باکتری های گرم منفی می باشند، حال آن که باکتری های گرم مثبت نسبت به نانوذرات نقره مقاومت نشان داده و S.aureus مقاوم تر بود(جدول شماره ۲). به علاوه نتایج حاصل نشان داد که نمونه های مورد مطالعه دارای فعالیت ضد-قارچی خوبی بوده و نانوذرات نقره به همراه عصاره بذر، اثر هم افزایی در فعالیت ضدقارچی نشان دادند(جدول شماره ۳). هر چند این تفاوت معنی دار نبود.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.5.128]



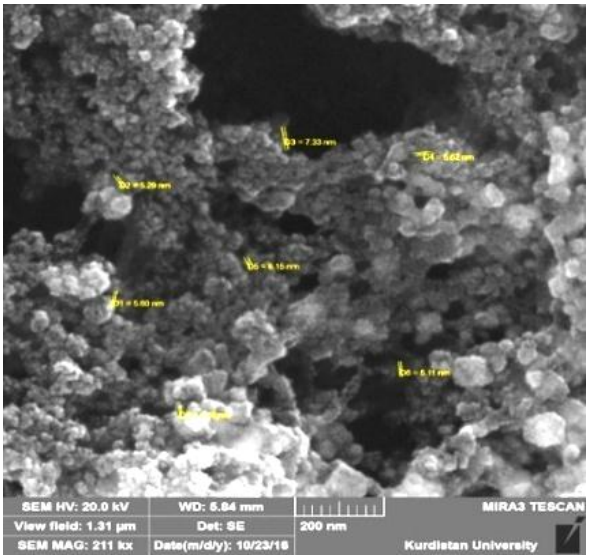
شکل شماره ۱-A: طیف UV/Visible مخلوط واکنش(نیترات نقره ۱ میلی مولار و عصاره در غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر) از زرد به قهوه ای در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد. B: تصویر پراش X-ray مربوط به نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره بذر و طیف مادون قرمز(FTIR) عصاره الف: قبل از واکنش، ب: پس از واکنش



شکل شماره ۲-الف: تغییرات طیف UV/Visible مخلوط واکنش شامل غلظت های مختلف عصاره و نیترات نقره ۱ میلی مولار در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد، ب: تغییرات طیف UV/Visible مخلوط واکنش شامل نیترات نقره ۱ میلی مولار و عصاره در غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر در دماهای مختلف.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.5.128]



شکل شماره ۳. تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره بذر

جدول شماره ۱. محتوای فیتوشیمیایی عصاره آبی بذر زیره و فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH توسط نمونه های مورد مطالعه

نمونه	محتوای فیتوشیمیایی(میلی گرم بر گرم وزن خشک)					DPPH
عصاره بذر	فنل تام	فلاونوئید تام	نشاسته	قند احیاکننده کل	اسید آسکوربیک	IC_{50}
	۰/۰۱۶ ± ۰/۹۳۵	۰/۰۲۵ ± ۰/۲۱۳	۰/۰۰۳ ± ۰/۰۲۴	۰/۰۰ ± ۰/۰۰۵	۰/۰۰۳ ± ۰/۰۹۵	۲۹/۷۴
عصاره + نانوذره	–	–	–	–	–	۳۳/۶۰
نانوذره	–	–	–	–	–	۳۴/۴۰
اسید آسکوربیک	–	–	–	–	–	۸۰/۵۴

مقادیر، میانگین ۳ تکرار SD± است.

جدول شماره ۲. فعالیت ضدمیکروبی نمونه های مورد مطالعه به روش انتشار دیسک

نمونه	هاله ممانعت(میلی متر)				
	(میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	S. aureus (+)	B. cereus (+)	E. coli (-)	P. aeruginosa (-)
عصاره	۱	۰/۴۲ ± ۹	^{a}۰/۱۳ ± ۸	۰/۳۳ ± ۹	^{a}۰/۱۶ ± ۸
	۰/۱	Na	^{ab}۰/۲۴ ± ۷	Na	^{a}۰/۲۲ ± ۷
	۰/۰۱	Na	^{b}۰/۰۰ ± ۷	Na	Na
عصاره + نانوذره	۱	Na	۰/۵۵ ± ۷	^{a}۰/۱۱ ± ۱۲	^{a}۰/۵۶ ± ۱۵
	۰/۱	Na	Na	^{b}۰/۰۰ ± ۸	^{b}۰/۶۱ ± ۱۴
	۰/۰۱	Na	Na	Na	^{c}۰/۳۳ ± ۱۰
نانوذره	۱	Na	Na	^{a}۰/۵۱ ± ۱۴	^{a}۰/۲۲ ± ۱۵
	۰/۱	Na	Na	^{b}۰/۱۱ ± ۹	^{b}۰/۱۸ ± ۱۳
	۰/۰۱	Na	Na	^{b}۰/۲۰ ± ۸	^{c}۰/۴۳ ± ۱۰
آنتی‌بیوتیک	جنتامایسین	۰/۳۶ ± ۲۵	۰/۴۴ ± ۲۸	۰/۲۶ ± ۱۲	۰/۳۳ ± ۱۳
	پنی‌سیلین	Na	Na	Na	Na
	استرپتومایسین	۰/۱۲ ± ۱۷	۰/۱۷ ± ۳۲	۰/۱۰ ± ۱۴	۰/۵۶ ± ۱۱

مقادیر، میانگین 3 تکرار SD ± است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح $P<0.05$ است. Na: غیرفعال در برابر باکتری مورد مطالعه.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.5.128]

جدول شماره ۳. فعالیت ضدقارچی نمونه های مورد مطالعه در برابر F. oxysporum

نمونه	فعالیت ضدقارچی (%)	
	غلظت(ppm)	F. oxysporum
عصاره	۵۰۰	[a]۱/۱۳ ± ۵۶
	۱۰۰۰	[b]۲/۲۶ ± ۶۲
عصاره + نانوذره	۵۰۰	[a]۱/۰۹ ± ۷۸
	۱۰۰۰	[a]۳/۴۵ ± ۸۳
نانوذره	۵۰۰	[a]۱/۰۹ ± ۷۲
	۱۰۰۰	[a]۳/۴۵ ± ۸۳
نیترات نقره	۵۰۰	[a]۰/۹۱ ± ۳۵
	۱۰۰۰	[b]۲/۳۳ ± ۴۱
آب مقطر	-	Na

مقادیر، میانگین 3 تکرار SD ± است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح $P<0.05$ است. Na: غیرفعال در برابر قارچ مورد مطالعه.

بحث و نتیجه گیری

گیاه دارویی زیره سبز محتوی مقادیر فراوانی از متابولیت ثانویه مانند فنل ها، فلاونوئیدها و ترپنوئیدها است که می توانند به عنوان عوامل احیاکننده زیستی در کنار متابولیت های اولیه نظیر قندها و اسید آسکوربیک جهت تولید نانوذرات عمل کنند. هم چنین حضور مقادیر قابل توجه نشاسته با زمان تخریب نسبتاً طولانی در محلول واکنش به پایداری نانوذرات سنتز شده کمک نموده‌است.

بیوسنتز نانوذرات نقره و بهینه سازی شرایط سنتز: احیاء زیستی یون های نقره با تغییر رنگ محلول واکنشی از زرد به قهوه ای مشخص شد و تشدید این رنگ نیز بیوسنتز بیشتر نانوذرات را نشان داد، زیرا خواص نوری نانوذرات بسته به شکل و اندازه آن ها متغیر است. با افزایش غلظت یون نقره، جذب مشاهده شده نیز افزایش یافت. زیرا با افزایش مقدار یون فلزی، یون های بیشتری احیاء شده و در نتیجه نانوذرات بیشتری تولید خواهد شد. هم چنین مطالعات حاکی از آن است که دما تاثیر به سزایی در میزان جذب و اندازه نانوذرات سنتز شده دارد. با افزایش دمای محیط واکنش، مقدار جذب افزایش یافته، اما اندازه نانوذرات کاهش خواهد یافت(۱۵). افزایش دما، احتمال و سرعت برخورد مولکول های احیا کننده و تثبیت کننده یون های فلزی را افزایش می دهد، به نحوی که پس از احیاء و تثبیت، مجالی برای اتصال نانوذرات سنتز شده به یکدیگر و تولید نانوذرات با اندازه بزرگ تر وجود نخواهد داشت(۱۶). اما کاهش در میزان جذب به دلیل افزایش بیش از حد دما می تواند به دلیل تجزیه و تخریب ترکیبات احیاء کننده و پایدارکننده موجود در عصاره گیاه باشد(۱۷). زمان نیز در سنتز و پایدار بودن نانوذرات موثر است، زیرا اگر فرآیند سنتز کامل نشده باشد، با گذشت زمان تولید نانوذرات بیشتر خواهد شد. به علاوه زمان، مهم ترین عامل در اثبات پایداری نانوذرات سنتز شده است، زیرا اگر با گذشت زمان در میزان جذب نانوذرات نقره افزایشی مشاهده نشود، حاکی از آن است که نانوذرات حاصل با گذشت زمان کاملاً پایدار هستند(۱۸).

آنالیز طیف سنجی مرئی-فرابنفش(UV/Visible): در اثر احیاء یون های نقره و تولید نانوذرات، رنگ نمونه ها از زرد کم رنگ به قهوه ای تغییر نمود که با منابع موجود هم خوانی داشت. این تغییر رنگ نشان دهنده تولید سوسپانسیون کلوئیدی(هیدروسل) نانوذرات نقره بود. خواص نوری نانوذرات فلزی یکی از ویژگی هایی است که با شکل و اندازه آن ها تغییر می کند. تشدید رزونانس سطحی پلاسمون مسئول خواص نوری منحصر به فرد نانوذرات فلزی است که تحت تاثیر عواملی چون اندازه، شکل، فاصله آن ها از یکدیگر و نیز ضریب شکست محیط پیرامونی تغییر می کند(۱۹). با توجه به این که نانوذرات نقره در محدوده ۴۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر جذب دارند، شکل شماره ۱ نشان می دهد که باند جذب تشدید پلاسمون سطحی در ۴۵۰ نانومتر برای نانوذرات نقره سنتز شده در این پژوهش نیز رخ داده است.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.5.128]

آنالیز پراش پرتو ایکس(XRD): در طیف پراش پرتو ایکس حضور قله های تیز در نواحی °۳۸/۱۲۳، °۴۴/۲۱۱، °۶۶/۳۲۱ و °۷۹/۰۱۲ حاکی از موفقیت در سنتز نانوذرات نقره است. آنالیز ساختاری نشان می دهد که نانوذرات نقره دارای ساختار بلوری با شاخص های میلر ۱۱۱، ۲۰۰، ۲۲۰ و ۳۱۱ می باشند. وجود قله های تیز در الگوها نشان دهنده درجه بالایی از بلورینگی نانوذرات است. قله ۱۱۱ از سایر قله ها شدیدتر است و در نتیجه صفحات بلوری نانوذرات نقره بیشتر در این جهت تشکیل شده اند. میانگین اندازه ذرات بلوری سنتز شده با محاسبه فرمول دبای-شرر ۱۵ تا ۴۵ نانومتر برآورد شد.

آنالیز طیف سنجی فرو سرخ تبدیل فوریه(FTIR): جهت شناسایی گروه های فعال و گروه های عاملی احیاکننده یون های نقره از تکنیک طیف سنجی تبدیل فوریه فروسرخ استفاده شد. نتایج حاصل این آنالیز بر روی عصاره بذر قبل و پس از واکنش با نیترات نقره نشان داده شده است. مقایسه این دو طیف پتانسیل زیستی عصاره بذر زیره سبز را در احیاء یون های نقره نشان می دهد. طیف عصاره قبل از واکنش یک قله تقریباً بزرگ را در نزدیکی CM^{-1} ۳۳۰۰(CM^{-1} ۳۳۸۰) نشان داد که تائیدکننده حضور گروه هیدروکسیل به عنوان یکی از عوامل فعال پایدارکننده نانوذرات نقره است که در ترکیبات الکلی و فنلی عصاره حضور دارد. هرچند این قله به شکلی ضعیف تر در عصاره پس از واکنش احیاء زیستی نیز مشاهده شد که نشان می دهد پلی اول ها احتمالاً تنها ترکیبات مسئول احیاء زیستی یون های نقره به نانوذرات آن نمی باشند. پس از واکنش با نیترات نقره، مقداری جا به جایی در محل و ارتفاع قله ها در طیف فوریه عصاره بـذر ایـــجاد شده است. این جا به جایی در محل قله های CM^{-1} ۳۳۹۷ و CM^{-1} ۲۹۳۹ مربوط به شکسته شدن پیوندهای هیدروژنی و ایفای نقش مستقیم هیدروژن در کاهش بار و احیاء یون های نقره می باشد. جا به جایی در محل قله ها از CM^{-1} ۱۶۰۵ به CM^{-1} ۱۶۰۸ بیانگر قوی تر شدن گروه های مربوطه و جـــا به جـــایی از CM^{-1} ۱۴۱۳ به CM^{-1} ۱۳۸۹ نشان دهنده شکسته شدن پیوندهای مربوطه و آزاد شدن کربن و ازت و ایفای نقش آن ها در سنتز نانوذرات نقره است. اگر چه مکانیسم قطعی تشکیل نانوذرات طی سنتز سبز، هنوز مشخص نیست، اما به نظر می رسد ترپنوئیدها، قندها، فنل ها و ترکیبات دیگر موجود در عصاره های گیاهی می توانند در سنتز نانوذرات فلزی مورد استفاده قرار گیرند(۲۰). جـــذب در نـــــقاط CM^{-1} ۱۴۴۷، CM^{-1} ۱۶۸۳/۳ و CM^{-1} ۱۷۲۳/۶۸ در آنالیز FTIR با کشش گروه های C-O-H و C=O ترکیبات موجود در عصاره، ارتعاشات کششی گروه الکیل و اتصال C-C به یک حلقه بنزنی مطابقت دارد. این تطابق حاکی از حضور عامل CHO است که می‌تواند عامل اصلی احیاکننده Ag^{+} به Ag^{0} باشد که پس از واکنش به عامل CO تبدیل شده است.

آنالیز میکروسکوپ الکترونی نگاره(SEM): شکل نـانوذرات نقـره سنتز شده در این پژوهش کروی بوده و اندازه آن ها حدود ۵ تا ۹ نـانومتر بود. در غلظت های کم نیترات نقره به دلیل هسته زایی کندتر ذرات، نانوذرات بزرگ تری به وجود می آیند. در غلظت های بالا به دلیل هسته زایی سریع تر و در نتیجه افزایش تعداد هسته ها در محلول واکنش، نانوذرات نهایی ریزتر می شوند. اندازه و شکل نانوذرات نقش مهمی در بسیاری از کاربردهای دارویی آن ها دارند(۲۱). در این پژوهش اندازه نانوذرات سنتز شده بین ۵ تا ۴۵ نانومتر و شکل آن ها کروی بود. اگر چه شکل آن ها بسیار شبیه به نانوذرات نقره سنتز شده توسط گیاهان دیگر است، اما اندازه آن ها در این پژوهش کوچک تر از اندازه ۷۱ تا ۱۱۰ نانومـــتری اشاره شده در برخی گزارش ها است(۲۲).

ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی: استرس اکسیداتیو ناشی از عدم تعادل در تولید رادیکال های آزاد در واکنش های متابولیسمی است که منجر به آسیب به لیپیدها، پروتئین ها و اسیدهای نوکلئـــیک ســـلول می گردد. این آسیب ها ممکن است به دلیل پایین بودن سطح آنتی اکسیدان ها و یا افزایش بیش از حد تولید رادیکال هـــای آزاد در بدن باشـــد که با بروز بیماری های مزمنی چون دیابت و سرطان در ارتباط است(۲۳). از این رو تولید آنتی اکسیدان های سنتزی و طبیعی جهت جلوگیری از استرس اکسیداتیو و اثرات

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.5.128]

مخرب آن ضروری است و در این راستا تولید نانوذرات با توان آنتی اکسیدانی مناسب به روش سبز حائز اهمیت خواهد بود. در روش های مختلف ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی، فعالیت بیشتر، با مقادیر IC_{50} کمتر گزارش می شود. هر سه نمونه مورد مطالعه در این پژوهش فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی در حذف رادیکال های آزاد DPPH نشان دادند، اما فعالیت آن ها از اسید آسکوربیک کمتر بود. به علاوه این فعالیت با افزایش غلظت افزایش یافت که با نتایج مطالعات دیگر توافق داشت. DPPH یک رادیکال آزاد است و با دریافت یک الکترون یا رادیکال هیدروژن به یک مولکول پایدار تبدیل می شود. کاهش جذب در ۵۱۷ نانومتر و تغییر رنگ محلول از بنفش به زرد حاکی از آن است که نانوذرات نقره تولید شده دارای توانایی انتقال هیدروژن به اکسیدان ها را داشته و واجد خاصیت آنتی اکسیدانی هستند. هم چنین نتایج برخی مطالعات نشان داده است که نانوذرات ترکیب شده با عصاره های مختلف گیاهی دارای اثرات آنتیا کسیدانی مشابه و یا نزدیک به آنتی اکسیدان های استاندارد هستند(۲۴). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره بذر زیره سبز دارای اثرات آنتی اکسیدانی مناسبی بوده و از آن می توان در درمان بسیاری از بیماری های ناشی از استرس اکسیداتیو استفاده نمود.

ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی و ضدقارچی: از دیرباز تاکنون نقره به علت خواص ضدباکتریایی خود شهرت یافته است. در واقع نانوذرات نقره به علت رهایش یون نقره چنین خاصیتی را علیه باکتری های هـــوازی و بی هوازی از خود نشان می دهند. اتصال این ذرات به پروتئین های حاوی گوگرد در سطح غشاء باکتری ها، امکان ورود و تغییر در مورفولوژی و نیز زنجیره تنفسی باکتری را فراهم نموده و در نهایت با تاثیر بر روی فرآیند مرگ سلولی منجر به مرگ عامـــل بیـــگانه می شود(۲۵). اصلی ترین ویژگـی نانوذرات نقـره خاصیـت ضدباکتریایـی ایـن ذرات است و از این ویژگی در پانسمان زخم، پماد زخم های پوستی، ضدعفونی کننده ها و پوشش های ابزار پزشکی استفاده می شود. این ذرات طول مدت فرآیند ترمیم زخم را به علت کاهش فعالیت متالوپروتئازها و افزایش آپوپتوز نوتروفیل ها کوتاه نموده و سبب طبیعی تر شدن ظاهر اسکار می شوند. به علاوه در جهت گیری بهتر کلاژن و افزایش استحکام مکانیکی بافت موثر خواهند بود. بررسی پانسمان های زخمی نشان داده اســت که به کار گیری نقره جهت کاربردهای مشابه سمیت ایجاد نمی کند و بر سلول های انسانی اثرات سوء ندارد. هم چنین بررسی های اخیر نشان داده است که استفاده از نانوذرات نقره در پمادهای پوستی سبب نفوذ نقره به بستر زخم، جذب توسط سلول های اپیدرمی حاشیه زخم، تجمع در بقایای زخم و در نهایت انتقال به سیستم گردش خون محیطی می شود که به فرآیند ترمیم زخم و جلوگیری از عفونت کمک می نماید(۲۶). در این پژوهش فعالیت ضدمیکروبی عصاره آبی بذر زیره سبز و نیز نانوذرات نقره تهیه شده از آن، بر روی چهار سویه باکتری و یک سویه قارچ ارزیابی شد. نتایج نشان داد که نانوذرات در غلظت های به کار رفته، اثرات ضدمیکروبی قوی تری نسبت به خود عصاره داشتند و این فعالیت هم در عصاره و هم در محلول نانوذرات، وابسته به غلظت بود. نانوذرات نقره دارای فعالیت ضدمیکروبی بیشتری در برابر باکتری های گرم منفی می باشند، حال آن که باکتری های گرم مثبت نسبت به نانوذرات نقــره مـــقاومت نـــشان داده و S. aureus، مقاوم تر بود. باکتری های B. cereus، S. aureus و E. coli به عنوان عوامل آلوده کننده مواد غذایی شناخته شده اند(۲۷). در پژوهش هایی دیگر در زمینه فعالیت ضدمیکروبی نانوذرات نقره در برابر باکتری های مختـــلف مانند B. cereus، S. aureus P. aeruginosa و E. coli مشخص گردیده است که فعالیت نانوذرات وابسته به غلظت بوده و اثر آن ها بر روی باکتری های گرم منفی نسبت به باکتری های گرم مثبت چشمگیرتر اســـت(۲۸). تفاوت پاسخ باکتری های گرم مثبت و گرم منفی به نانوذرات نقره، به تفاوت موجود در ساختار دیواره سلولی آن ها مربوط می شود. باکتری های گرم منفی دیواره سلـــولی نازک تری داشته و وجود لایه لیپوپلی ساکاریدی منفی بار در سطح بیرونی آن ها برهم‌کنش میان سلول باکتری و نانوذرات نقره را که واجد بار مثبت ضعیفی

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.5.128]

هستند، تسهیل می نماید(۲۹). به طور کلی مکانیسم فعالیت ضدمیکروبی نقره در شکل یون و نانوذره، به توانایی عبور آن ها از غشاء سلول و چگونگی اثر بر روی اجزاء سلولی مانند DNA، پروتئین ها و اجزاء دیگر سلول مربوط می شود که در نهایت منجر به اختلال در مکانیسم همانندسازی و فعالیت پروتئین ها و آنزیم های باکتری می گردد(۳۰). قارچ F. Oxysporum قارچی خاکزی است و از طریق ریشه وارد گیاه می شود. این قارچ پس از ورود به آوندهای آبکش گیاه، باعث مسدود کردن آوندها و ممانعت از نقل و انتقال مواد و در نهایت مرگ گیاه می شود. این قارچ مشکلی جدی برای بسیاری از محصولات کشاورزی با ارزش اقتصادی است(۳۰). نتایج حاصل نشان داد که نمونه های مورد مطالعه دارای فعالیت ضدقارچی خوبی بوده و نانوذرات نقره به همراه عصاره بذر، اثر هم افزایی نشان دادند(جدول شماره ۴). هر چند تفاوت معنی داری میان فعالیت ضدقارچی نانوذرات نقره و نانوذرات نقره+عصاره مشاهده نشد.

در مجموع نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره بذر زیره سبز دارای توانایی مناسبی جهت تولید نانوذرات نقره است. عصاره و نانوذرات تولید شده دارای پتانسیل زیستی درخور توجهی هستند و در صورت انجام مطالعات تکمیلی و بررسی اثرات جانبی و نیز بهینه سازی شرایط می توان از آن ها در صنایع غذایی، داروسازی و کشاورزی و در آینده نزدیک به عنوان مکمل های آنتی‌اکسیدانی طبیعی با اثربخشی بیشتر استفاده نمود.

سپاسگزاری

نتایج این پژوهش بخشی از رساله دکتری آقای جمال الدین کمال نژاد است که با حمایت مالی دانشگاه بوعلی سینا انجام شده است.

References

1. Bansal P, Duhan JS, Gahlawat SK. Biogenesis of nanoparticles. Afr J Biotechnol 2014;13:2778-85. doi: org/10.5897/AJB2014.13458.
2. Kavitha KS, Syed Baker R, Rakshith D, Kavitha HU, Yashwantha Rao HC, Harini BP, et al. Plants as green source towards synthesis of nanoparticles. Int Res J Biol Sci 2013;2:66-76. doi: org/10.1016/j.jsps.2014.11.013.
3. Rai M, Yadav A. Plants as potential synthesiser of precious metal nanoparticles progress and prospects. IET Nanobiotechnol 2013;7:117-24. doi: 10.1049/iet-nbt.2012.0031.
4. Roy N, Barik A. Green synthesis of silver nanoparticles from the unexploited weed resources. Inter J Nanotechnol 2010;4:95-101.
5. Pantidos N, Horsfall LH. Biological synthesis of metallic nanoparticles by bacteria, fungi and plants. Nanomed Nanotechnol 2014;5:1-10. doi: org/10.4172/2157-7439.1000233.
6. Pourseyedi S. Assessment of germination and cytology of three Iranian caraway genus Bunium Carum and Cuminum. MSc Thesis Tehran Uni. 1994; P. 15.
7. Ghassemidehkordi N, Sajjadi SE, Ghannadi A, Amanzadeh Y, Azadbakht M, Asghari GR. Iranian herbal pharmacopoeia drug administration of iran. Pharmaceut Narc Affa Min Health o Iran. 2002; P. 46.
8. Wolfe K, Wu X, Liu RH. Antioxidant activity of apple peels. J Agric Food Chem 2003;51:609-14. doi:10.1021/jf020782a.
9. Luximonramma A, Bahorun T, Soobrattee MA, Aruoma OI. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of Cassia fistula. J Agric Food Chem 2002;50:5042-7. doi: 10.1021/jf0201172.
10. Thayumanavan B, Sadasivam S. Physicochemical basis for the preferential uses of certain rice varieties. Plant Foods Hum Nutr 1984;34:253-7.
11. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem 1959;3:426-8.
12. Sadasivam S, Manickam A. Biochemical Methods. 3rd ed. New Delhi, India: New Age International 2008;P.345.
13. Mensor L, Menezes FS, Leitao GG, Reis AS, Santos TS, Coube CS. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. Phytother Res 2001;15:127-30.
14. Awoyinka O, Balogun IO, Ogunnowo AA. Phytochemical screening and in vitro

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.5.128]

bioactivity of Cnidoscolus aconitifolius. J Med Plants Res 2007;1:63-5.
15. Rai A, Singh A, Ahmad A, Sastry M. Role of halide ions and temperature on the morphology of biologically synthesized gold nano triangles. Langmuir 2006;2:736-41. doi: 10.1021/la052055q.
16. Kaviya S, Santhanalakshmi J, Viswanathan B. Green synthesis of silver nanoparticles using Polyalthia longifolia leaf extract along with D-sorbitol study of antibacterial activity. J Nanotechnol 2010;2011:1-5. doi.org/10.1155/2011/152970.
17. Basiri SH. [Investigation of the effect of temperature and air velocity in the dryer on the amount and quality of essential oil of Thymus]. Inter Sci Food Technol J 2011;4:73-82. (Persian)
18. Praveenkumar K, Paul W, Chandra P SH. Green synthesis of gold nanoparticles with Zingiber officinale extracts characterization and blood compatibility. Proce Biochem 2011;46:2007-13. doi: org/10.1016/j.procbio.2011.07.011
19. Willets K, Vanduyne A. Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. Ann Rev Phys Chem 2007;58:267-97. doi: 10.1146/annurev.physchem.58.032806.104607
20. Song JV, Eunyeong L. Biological synthesis of platinum nanoparticles using Diopyros kaki leaf extract. Bioproc Bio Eng 2010;33:159-64. doi: 10.1007/s00449-009-0373-2.
21. Gnanadesigan M, Anand M, Ravikumar S, Maruthupandy M, Syedali M, Vijayakumar M, et al. Antibacterial potential of biosynthesised silver nanoparticles using Avicennia marina mangrove plant. Appl Nanosci 2012; 2:143-7.
22. Bankar A, Joshi B, Ravikumar A, Zinjarde S. Banana peel extract mediated novel route for the synthesis of silver nanoparticles colloids and surfaces. Physicochem Eng Asp 2010; 368:58-63. doi: 10.1016/j.matlet.2010.06.021
23. Khan SR. Is oxidative stress, a link between nephrolithiasis and obesity, hypertension, diabetes, chronic kidney disease metabolic syndrome? Urol Res 2012; 40:95-112. doi: 10.1007/s00240-011-0448-9
24. Goodarzi V, Zamani H, Bajuli L, Moradshahi A. Evaluation of antioxidant potential and reduction capacity of some plant extracts in silver nanoparticle synthesis. Mol Cell Biol Res Commun 2014; 3:165-74.
25.Ahmadi F, Abolghasemi S, Parhizgari N, Moradpour F. Effect of silver nanoparticles on common bacteria in hospital surfaces. Jund J Microbiol2013;6:209-14. doi: 10.5812/jjm.4585.
26.Walmsley G, McArdel A, Tevlin R, Momeni A, Atashroo D, Hu M, et al. Nanotechnology in bone tissue engineering. Nanomed Nanotechnol Biol Med 2015;11:1253-63. doi: 10.1016/j.nano.2015.02.013.
27. Burt S. Essential oils their antibacterial properties and potential applications in foods a review. Int J Food Microbiol 2004;94:223-53. doi: org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.
28. Guzman M, Dille J, Godet S. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria. Nanomed 2012;8:37-45. doi: org/10.1016/j.nano.2011.05.007.
29. Russell AD, Hugo WB. Antimicrobial activity and action of silver. Prog Med Chem 1994;31:351-70.
30. Agrios GN. Plant Pathology. 3th ed. Academic Inc New York Publication.1988; P. 803.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.5.128]

Green Synthesis of Silver Nanoparticles using Aqueous Seed Extract of Cuminum cyminum L. and Evaluation of their Biological Activities

Karamian R[1], Kamalnejade J[1]*

(Received: February 6, 2017 Accepted: June 20, 2017)

Abstract

Introduction: There are many reports on the application of medicinal plants in traditional medicine, as well as numerous applications of metallic nanoparticles in different biomedical fields. Plant extract mediated green synthesis of nanoparticles and investigations on their therapeutic effects are new concepts. The medicinal plant of Cuminum cyminum L. includes a wide range of secondary metabolites with a high reducing power, which can be used for green biosynthesis of silver nanoparticles. The main aims of this study were phytochemical analysis of seed aqueous extract of Cuminum cyminum, biosynthesis of silver nanoparticles using this extract, the achievement of optimization condition for the synthesis of silver nanoparticles, and assessment of biological activaties of both the extract and the synthesized nanoparticles.

Materials & Methods: Total phenol and flavonoid, reducing sugar, starch, and ascorbic acid contents were measured by Folin-Ciocalteo, aluminum chloride, dinitrosalicylic acid, anthrone, and dinitrophenyl hydrazine reagents, respectively. The Ag^+ ions reduction and characterization of silver nanoparticles were assessed by UV-Visible spectrophotometry, X-ray diffraction, Fourier transform infrared spectroscopy, and scanning electron microscopy. Antioxidant activity of the samples was screened by DPPH free radical scavenging. Antibacterial activity of the samples was also evaluated against four gram-positive and -negative bacteria namely, Bacillus cereus (PTCC 1247), Staphylococcus aureus (ATCC 25923), Escherichia coli (ATCC 35218), and Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853) by disc diffusion method. In addition, antifungal activity was assessed against Fusarium oxysporum.

Findings: The indings indicated that the seed extract contained the high amounts of total phenolic and flavonoidic compositions, as well as sugar, starch, and ascorbic acid. Different analyses showed that the mean size of the synthesized nanoparticles was 5-45 nm in the optimal condition. The samples had proper antioxidant potential (IC_{50}=1.35-1.67 mg/ml) and the extract in combination with silver nanoparticles represented synergistic effect in DPPH free radical scavenging (IC_{50}=1.35 mg/ml). In addition, the investiogated samples had a good antibacterial activity against some of tested bacteria and also antifungal activity against Fusarium oxysporum.

Discussion & Conclusions: It seems that the secondary metabolites of Cuminum cyminum have good potential for the reduction and stabilization of the synthesized Ag nanoparticles. Both the seed extract and synthesized nanoparticles using this extract have considerable biological activities and may be used in antioxidant nutrient production or medicinal supplements in future.

Keywords: Antibacterial activity, Antifungal activity, Antioxidant activity, Cuminum cyminum L., Silver nanoparticles

1. Dept of Biology, Faculty of Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
** Corresponding author Email: karamian.roya@gmail.com*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-24]

[DOI: 10.29252/sjimu.26.5.128]