

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

رویا کریمیان^{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. تأیید احیاء یون های نقره توسط 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 ضد میکروبی عصاره و نانوذرات تولید شده در برابر چهار سویه باکتری گرم مثبت و منفی به ترتیب شامل *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 (IC₅₀: ۱/۳۵ تا ۱/۶۷ میلی گرم بر میلی لیتر) و عصاره به همراه نانوذرات نقره اثرات هم افزایی در مهار رادیکال آزاد DPPH (IC₅₀: ۱/۳۵ تا ۱ میلی گرم بر میلی لیتر) نشان دادند. به علاوه این عصاره ها فعالیت ضد میکروبی 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 ضد میکروبی، 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.

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 (۳، ۲). 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 ماند. یکی از دلایل کاربرد گسترده این نانوذرات، پتانسیل ضد میکروبی، ضدقارچی و آنتی اکسیدانی آن ها است. پتانسیل ضد میکروبی بالقوه نانوذرات نقره، کاربرد آن ها را به عنوان یک استراتژی مهم جهت غلبه بر مشکل جدی مقاومت به

آنتی بیوتیک ها که سلامت بشر را تحدید می کنند، 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 ضد میکروبی 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 فراوانی 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، ضد میکروبی و ضدقارچی) مورد بررسی قرار گرفته است.

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

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 فیل 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).

بیوستنژ 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

آمریکا) مورد استفاده قرار گرفت. فرآیندی مشابه برای عصاره انجام شد.

آنالیز میکروسکوپی 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 3×10^{-4} 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 (مدل UV/Visible-Lambda 45، آمریکا) اندازه گیری شد. از اسید آسکوربیک به عنوان کنترل استفاده شد (۱۳).

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی: فعالیت ضد میکروبی نمونه ها (عصاره، عصاره + نانوذره و نانوذرات) در برابر چهار سویه باکتری گرم مثبت و منفی شامل Bacillus Staphylococcus aureus, cereus (PTCC 1247) Escherichia coli (ATCC 25923)، Pseudomonas aeruginosa (ATCC 35218 و 27853) به روش انتشار دیسک ارزیابی شد. بدین منظور، ابتدا از همه سویه های باکتریایی، سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند ($1/5 \times 10^8$ cfu/ml) تهیه شد. سپس با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون تهیه

نگهداری گردید. به منظور دستیابی به شرایط بهینه جهت سنتر 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-فرا بنفش (UV-Visible): جهت اثبات وجود نانوذرات نقره، طیف جذبی نانوذرات سنتر 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 تا ۴۵۰ 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 سنتر 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 سنتر شده با در نظر گرفتن منبع پرتوی Ka لامپ مسی با طول موج پرتو X در $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$ و محدوده زاویه براگ ($30^\circ \leq 2\theta \leq 80^\circ$) 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،

شده، بر روی سطح محیط مولر هیتون 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 مدت ۲۲ 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 استفاده شد.

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 میسلیم قارچ در پلیت کنترل (r) و حاوی نمونه ها (R) اندازه گیری شد. از فرمول زیر جهت محاسبه فعالیت ضدقارچی استفاده شد:

$$\text{درصد فعالیت ضدقارچی} = R-r/R \times 100$$

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 $\pm$ انحراف معیار (Mean $\pm$ 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 ($935 \pm 1/6$ میلی گرم بر گرم وزن خشک)، فلاونوئید ($213 \pm 2/5$ 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 ۱-۱). 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 ۱-۱ 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 ۲-۱). 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 ۲-۲). 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 ۲-۲).

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 $38/123^\circ$ ، $44/211^\circ$ ، $66/321^\circ$ و $79/013^\circ$ می باشند، وجود نانوکریستال های نقره اثبات گردید که در میان آن ها قله مربوط به زاویه $38/12^\circ$ از اهمیت بیشتری برخوردار است (شکل شماره ۱-۲). بر اساس

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

$$D = 0.9 \lambda / \beta \cos \theta$$

$$\lambda = 0.154 \text{ nm}$$

که در آن β = پهنای قله ها در نصف ارتفاع ماکزیمم، λ = طول موج اشعه X برابر با ۰/۱۵۴ نانومتر، θ = زاویه بین پرتو تابش و بازتابش و D = اندازه ذرات بلوری می باشد.

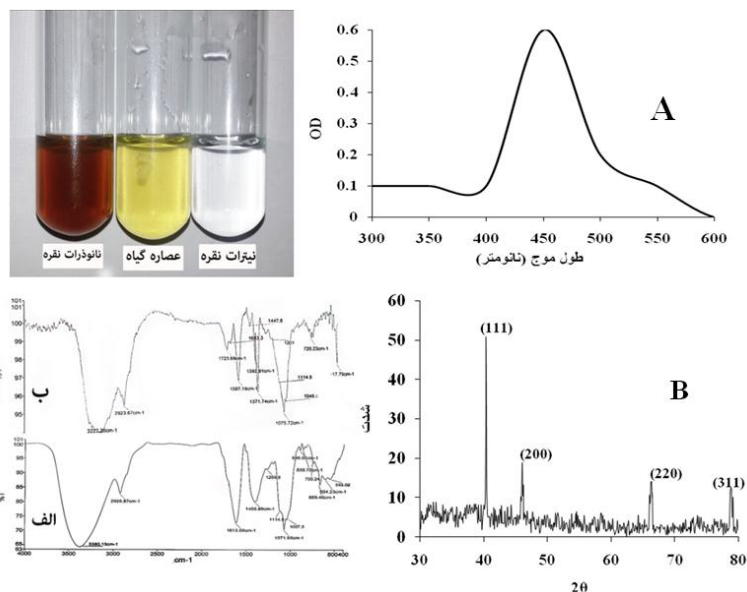
آنالیز طیف سنجی فرو سرخ تبدیل فوریه (FTIR): طیف فوریه فرو سرخ عصاره بذر قبل و پس از واکنش در شکل شماره ۱-B ارائه شده است. آنالیز FTIR عصاره قبل از واکنش یک قله تقریباً بزرگ را در نزدیکی 3300 CM^{-1} (3380 CM^{-1}) نشان داد. این قله به شکل ضعیف تر در عصاره پس از واکنش احیاء زیستی نیز مشاهده شد. هم چنین در آنالیز FTIR یک قله بزرگ نیز بین نقاط 1000 CM^{-1} تا 2000 CM^{-1} (1447 CM^{-1} ، $1683/3 \text{ CM}^{-1}$ و $1723/68 \text{ CM}^{-1}$) 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).

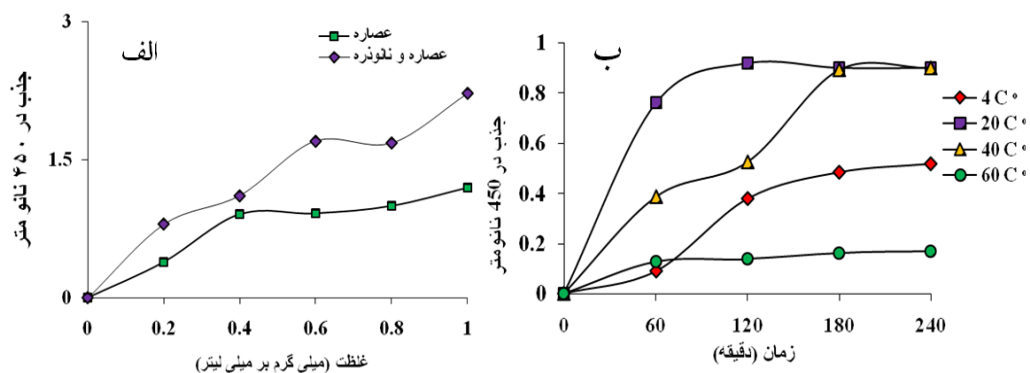
ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی: نتایج حاصل از بررسی میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره،

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.

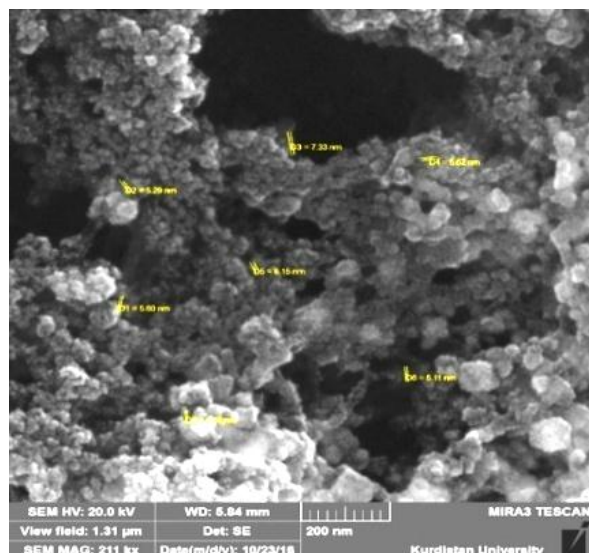
ارزیابی فعالیت ضد میکروبی و ضد قارچی: نتایج حاصل از بررسی فعالیت ضد میکروبی نمونه ها در جدول شماره ۲ ارائه شده است. نتایج نشان داد که نمونه ها در برابر اکثر باکتری های مورد مطالعه در این پژوهش دارای فعالیت مهارکنندگی رشد بوده و این فعالیت با افزایش غلظت ماده موثره در نمونه ها، افزایش یافته است. نانوذرات نقره دارای فعالیت ضد میکروبی 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 ضد قارچی نشان دادند (جدول شماره ۳). هر چند این تفاوت معنی دار نبود.



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.



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

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

مقادیر، میانگین ۳ تکرار ±SD است.

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

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

مقادیر، میانگین ۳ تکرار ±SD است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح P<0.05 است. Na: غیرفعال در برابر باکتری مورد مطالعه.

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

نمونه	فعالیت ضدقارچی (%)	
	غلظت (ppm)	<i>F. oxysporum</i>
عصاره	۵۰۰	$56 \pm 1/13^a$
	۱۰۰۰	$62 \pm 2/26^b$
عصاره + نانوذره	۵۰۰	$78 \pm 1/09^a$
	۱۰۰۰	$83 \pm 3/45^a$
نانوذره	۵۰۰	$72 \pm 1/09^a$
	۱۰۰۰	$83 \pm 3/45^a$
نیترات نقره	۵۰۰	$35 \pm 0/91^a$
	۱۰۰۰	$41 \pm 2/33^b$
آب مقطر	-	Na

مقادیر، میانگین ۳ تکرار $\pm$ 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 نموده است.

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 پایداری 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-فرا بنفش (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 کلئیدی (هیدروسول) 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.

آنالیز پراش پرتو ایکس (XRD): در طیف پراش پرتو ایکس حضور قله های تیز در نواحی $38/123^\circ$ ، $44/211^\circ$ ، $66/321^\circ$ و $79/012^\circ$ حاکی از موفقیت در سنتز نانوذرات نقره است. آنالیز ساختاری نشان می دهد که نانوذرات نقره دارای ساختار بلوری با شاخص های 111 ، 200 ، 220 و 311 می باشند. وجود قله های تیز در الگوها نشان دهنده درجه بالایی از بلورینگی نانوذرات است. قله 111 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 15 تا 45 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 3300 CM^{-1} (3380 CM^{-1}) نشان داد که تأییدکننده 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 بذر ایجاد شده است. این جا به جایی در محل قله های 3397 CM^{-1} و 2939 CM^{-1} 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 1605 CM^{-1} به 1608 CM^{-1} بیانگر قوی تر شدن گروه های مربوطه و جا به جایی از 1413 CM^{-1} به 1389 CM^{-1} 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). جذب در نقاط 1447 CM^{-1} و $1683/31 \text{ CM}^{-1}$ در آنالیز FTIR با کشش گروه های C=O و C-O-H 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 می تواند عامل اصلی احیاکننده Ag^+ به Ag^0 باشد که پس از واکنش به عامل CO تبدیل شده است.

آنالیز میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM): شکل نانوذرات نقره سنتز شده در این پژوهش کروی بوده و اندازه آن ها حدود 5 تا 9 نانومتر 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 5 تا 45 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 71 تا 110 نانومتری 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 نوکلئیک سلول می گردد. این آسیب ها ممکن است به دلیل پایین بودن سطح آنتی اکسیدان ها و یا افزایش بیش از حد تولید رادیکال های آزاد در بدن باشد 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

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 آنتی اکسیدانی 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 ضد میکروبی و ضد قارچی: از دیرباز تاکنون نقره به علت خواص ضد باکتریایی خود شهرت یافته است. در واقع نانوذرات نقره به علت رهایش یون نقره چنین خاصیتی را علیه باکتری های هوازی 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 عامل بیگانه می شود (۲۵). اصلی ترین ویژگی نانوذرات نقره خاصیت ضد باکتریایی این ذرات است و از این ویژگی در پانسمان زخم، پماد زخم های پوستی، ضد عفونی کننده ها و پوشش های ابزار پزشکی استفاده می شود. این ذرات طول مدت فرآیند ترمیم زخم را به

علت کاهش فعالیت متالوپروتئین ها 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 است 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 ضد میکروبی 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 ضد میکروبی 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 ضد میکروبی 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. باکتری های *S. B. cereus* و *E. coli* به عنوان عوامل آلوده کننده مواد غذایی شناخته شده اند (۲۷). در پژوهش هایی دیگر در زمینه فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره در برابر باکتری های مختلف مانند *S. aureus*، *B. cereus* و *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 است (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 سلولی نازک تری داشته و وجود لایه لیپوپلی ساکاریدی منفی بار در سطح بیرونی آن ها برهم کنش میان سلول باکتری و نانوذرات نقره را که واجد بار مثبت ضعیفی

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 آنتی اکسیدانی 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.

هستند، تسهیل می نماید (۲۹). به طور کلی مکانیسم فعالیت ضد میکروبی 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

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

- bioactivity of *Cnidioscolus 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.58.032806.104 607
 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 Microbiol* 2013;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.

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

Karamian R^{1*}, Kamalnejade J¹

(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 activities 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-Ciocalteu, 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 findings 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 (IC₅₀=1.35-1.67 mg/ml) and the extract in combination with silver nanoparticles represented synergistic effect in DPPH free radical scavenging (IC₅₀=1.35 mg/ml). In addition, the investigated 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