سنتز نانوذرات تیتانیوم با استفاده از عصاره گیاه مرزه به روش فراصوت؛ اثرات ضد میکروبی بر ضد پاتوژن‌های غذازاد و سمیت سلولی بر سلول‌های نرمال و سرطانی

راضیه پرتوی[۱]، فتانه نارچین*[۲]، عاطفه عراقی[۳]

۱- استادیار، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.
۲- استادیار، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۳- استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.

دریافت مقاله: ۲۶ تیر ۱۴۰۰، بازنگری: ۷ شهریور ۱۴۰۰، پذیرش نهایی: ۱۵ شهریور ۱۴۰۰

چکیده

سنتز سبز نانوذرات مزایایی دارد که می‌توان به اجتناب از مواد شیمیایی خطرناک، پروسه تمیز، غیر سمی، دوستدار محیط زیست، آماده‌سازی آسان، به صرفه بودن و کنترل بر اندازه و شکل ذرات اشاره کرد. در این مطالعه ابتدا عصاره آبی گیاه مرزه ریشنگری تهیه شد و نانوذرات تیتانیوم به روش سبز و فراصوت تولید شد. سپس به منظور شناسایی نانوذرات از آنالیز UV، طیف سنجی تفکیک انرژی EDS و آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی و انتقالی استفاده گردید. سپس MIC و MBC نانوذرات بر ضد پاتوژن‌های *اشرشیاکلی* $O_{157}:H_7$ و *لیستریا منوسیتوژنز* و سمیت سلولی نانوذرات در رقت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ ، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر روی رده سلولی سرطانی کولون (HT-29) و سلول‌های نرمال (HEK-293) ارزیابی شد. محلول حاوی نانوذرات با جذب در ناحیه ۳۵۲ نانومتر نشان‌دهنده سنتز نانوذرات تیتانیوم توسط عصاره آبی گیاه مرزه بود. در محلول کلوئیدی نانوذرات، اشکال نانوذرات کروی مشاهده شد که از نظر اندازه از ۳۷/۴ تا ۴۹/۶ نانومتر بودند. نانوذرات در غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر موجب مهار رشد *لیستریا منوسیتوژنز* و *اشرشیاکلی* شد. نانوذرات تیتانیوم سنتز شده در این مطالعه اثرات سمی بر سلول‌های نرمال نداشت، در حالی که در غلظت ۱۸۳ میکروگرم در میلی‌لیتر مانع رشد حدود ۵۰ درصد سلول‌های سرطانی شد. نتایج این مطالعه، نگرانی‌ها بابت خطرات استفاده از نانوذرات تیتانیوم را کم کرده و زمینه را برای استفاده بیشتر این ماده در بسته‌بندی مواد غذایی به منظور افزایش مدت ماندگاری فراهم می‌کند.

کلمات کلیدی: *سمیت سلولی، سنتز سبز، ضد میکروبی، نانوذرات تیتانیوم، مرزه*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: fa.narchin@yahoo.com

مقدمه

اخیراً نگرانی‌ها در رابطه با بیماری‌های غذازاد افزایش یافته و این موضوع را به یک معضل بهداشت عمومی تبدیل کرده است. علیرغم تمام پیشرفت‌ها در تکنیک‌های بهداشت و سیستم‌های نظارتی و توسعه زنجیره سرد، آلودگی مواد غذایی با میکروارگانیسم‌های نامطلوب یک خطر بالقوه در حین فرآوری، ذخیره سازی و توزیع مواد غذایی می‌باشد (۱).

نانوذرات به دلیل داشتن ویژگی‌های ضد میکروبی، ضد قارچی، ضد سرطانی و نیز دارا بودن کاربردهایی در کشاورزی، غذا، درمان و مواد آرایشی توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. از نانوذرات در زمینه‌هایی مانند تصحیح ژن‌های معیوب (۲)، ممانعت از تکثیر ژنوم ویروسی (۳)، مرگ سلول سرطانی (۴) و ترمیم متابولیسم سلولی (۵) بهره گرفته می‌شود. نانوذرات با اندازه‌ها، مورفولوژی و اجزای سازنده و بار سطحی متفاوت، ویژگی‌های ضد میکروبی متفاوتی دارند که به توانایی آنها در تولید گونه‌های اکسیژن فعال و آزادسازی یون‌ها از نانوذرات بر می‌گردد (۶). این وقایع موجب آسیب اکسیداتیو به ساختار سلول می‌شود (۷). چندین روش سنتز نانوذرات مانند روش‌های احیای سونوکمیکال (۸)، نابودی حرارتی (۹)، احیای شیمیایی (۱۰) و روش‌هایی با استفاده از امواج مایکروویو (۱۱) شناخته شده است. معایب این روش‌ها شامل تولید کم محصول، استفاده از مواد شیمیایی سمی و تولید محصولات خطرناک می‌باشد. جوامع پیشرفته‌تر ترجیح می‌دهند که غذاهای بدون مواد سنتتیک افزوده مصرف کنند (۱۲). بنابراین محققان بر سنتز سبز نانوذرات تأکید کرده‌اند. سنتز سبز مزایایی دارد که می‌توان به اجتناب از مواد شیمیایی خطرناک، پروسه تمیز، غیر سمی، دوستدار محیط زیست، آماده‌سازی آسان، به صرفه بودن و کنترل بر اندازه و شکل ذرات اشاره کرد (۱۳). در سال‌های اخیر استفاده از عصاره گیاهان برای تهیه‌ی نانوذرات فلزی به‌عنوان یک جایگزین آسان و مناسب برای روش‌های شیمیایی و فیزیکی مطرح شده است. گیاهان زیادی وجود دارند که قابلیت ساخت نانوذرات و استفاده در چنین صنعت ارزشمند و گران‌بهایی را دارند، ولی هنوز ناشناخته باقی مانده‌اند. با استفاده از عصاره گیاهان، نانوذرات در یک واکنش یک مرحله‌ای و بدون نیاز به سورفاکتانت و سایر مواد تثبیت کننده و متابولیت‌های شیمیایی مؤثر تولید می‌شوند و نیز به محافظت از محیط زیست و کاهش خطر برای انسان، طبیعت، هوا و اکوسیستم کمک می‌کند (۱۴، ۱۵).

گیاه مرزه (Satureja) متعلق به خانواده Lamiaceae می‌باشد که در منطقه مدیترانه پراکنده می‌باشد. در ایران، ۱۴ گونه از این گیاه در شمال، شمال غرب و نواحی غربی کشور یافت می‌شود. Satureja rechingeri یک گونه جدید در ایران است که ارتباط آن با S. khuzistanica و S. edmondi و S. macrantha قبلاً گزارش شده است. روغن این گیاه خصوصیات درمانی زیادی دارد که به دلیل میزان بالای کارواکرول در آن می‌باشد (۱۶). این گیاه یک گونه نادر و بومی در ایران است. این گیاه چندساله، انبوه و معطر بوده که تا ۵۰ سانتی‌متر ارتفاع پیدا می‌کند و دارای گل‌های زرد رنگ می‌باشد. این گیاه دارای متابولیت‌های ثانویه مانند روغن‌های فرار، ترکیبات فنولیک، تانن‌ها، قندها و اسیدهای چرب می‌باشد. بخش‌های هوایی این گیاه به‌طور وسیع در غذاها و دمنوش‌ها به‌عنوان ماده طعم‌دهنده و نیز در درمان گرفتگی عضلات، دردهای عضلانی، تهوع، سوء هاضمه، اسهال و بیماری‌های عفونی کاربرد دارد (۱۷). کارواکرول به عنوان ترکیب اصلی موجود در عصاره مرزه می‌تواند

محل‌های اتصال را شلاته کند و یون‌های فلزی را احیا کند که موجب تولید ایمن نانوذرات نقره از طریق سنتز سبز می‌شود که می‌تواند به‌عنوان یک ماده ضد میکروب ایمن استفاده شود (۱۸). کواکبی و همکاران (۲۰۲۱) فیلم نانوذرات نقره را با استفاده از پلی وینیل الکل و عصاره مرزه به منظور بسته‌بندی مواد غذایی ساختند و تازگی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان بسته‌بندی شده با این فیلم را در مدت ۱۴ روز در دمای یخچالی بررسی کردند. این محققین نشان دادند که نانوذرات سنتز شده به روش اولتراسوند و فیتوکمیکال توانستند تعداد باکتری‌های مزوفیل را در فیله ماهی در روز ۷ به ترتیب در ۲/۱ و ۲ log cfu/g حفظ کنند (۱۸). شیری پور و همکاران (۲۰۲۰) سنتز سبز نانوذرات نقره را با استفاده از عصاره آبی گیاه مرزه انجام داده و نتایج تحقیق نشان داد که این نانوذرات می‌توانند به‌عنوان یک داروی ضد سرطان برای درمان سرطان معده مورد استفاده قرار گیرد (۱۵).

نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم کاربردهای وسیعی از جمله کاهش سمیت رنگ‌ها و داروها، تصفیه فاضلاب، تولید مثل کرم ابریشم، کاربردهایی در زمینه فضا، صنعت غذا و ... دارد (۱۹). نانوساختارهای تیتانیوم به‌عنوان سیستم‌های عرضه موضعی دارو در رابطه با داروهای استئوپروز، ضد سرطان و آنتی‌بیوتیک‌ها کاربرد دارد. علاوه بر این، این نانوذرات و مشتقات آن به‌عنوان مواد ضد میکروبی نوظهور بر ضد پاتوژن‌های انسانی کاربرد دارد (۲۰). انواع متنوعی از گیاهان و بخش‌های مختلف آنها به منظور تولید نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم مورد استفاده قرار گرفته است که از جمله این گیاهان می‌توان به ریشه‌های *آکانتوفیلوم لاکسیوسکولوم*، برگ‌های آلوئه ورا، پوست *آنونا اسکوآموسا*، گل *کالوتروپیس ژیگانتیا* و دانه نخود اشاره کرد (۲۱).

براساس دانش نویسندگان، تاکنون مطالعه ای در رابطه با سنتز نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم با استفاده از عصاره گیاه *S. rechingeri Jamzad* انجام نشده است. هدف از اجرای طرح حاضر ارزیابی اثرات ضد میکروبی نانوذرات تیتانیوم سنتز شده به روش سبز از عصاره مرزه بر ضد پاتوژن‌های غذازاد و نیز بررسی اثرات سمیت سلولی این ترکیبات به منظور استفاده در بسته‌بندی مواد غذایی و افزایش مدت ماندگاری غذا و دارو می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره مرزه: اندام‌های هوایی در مرحله گلدهی از گیاه مرزه ریشنگری (*Saturaja rechengri Jamzad*) از منطقه خرمان در استان لرستان جمع‌آوری گردید. پس از خشک کردن، گیاه در سایه به پودر تبدیل شد. برای تهیه عصاره آبی مقدار ۵ گرم از پودر گیاه توزین شد و پس از حل کردن در ۸۰ میلی‌لیتر آب دوبار یونیزه شده به مدت ۲۴ ساعت در محیط آزمایشگاه قرار داده شد. سپس به مدت ۴۵ دقیقه در حمام آب ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و با کاغذ صافی واتمن شماره دو صاف شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تهیه نانوذرات تیتانیوم: سنتز نانوذرات تیتانیوم با استفاده از اصول شیمی سبز انجام شد. در این روش نمک تیتانیوم (IV) اکسید (TiO_2) (مرک، آلمان) با غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار تهیه شد: مخلوط ۱ به ۴ از عصاره و محلول تیتانیوم (IV) اکسید مخلوط شد و برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در شرایط تابش فراصوت با شدت ۴۰Hz و بدون نور قرار داده شد. تغییر رنگ از زرد کم‌رنگ به قهوه‌ای نشان‌دهنده سنتز نانو ذرات تیتانیوم بود. رسوب حاصل از برهمکنش عصاره آبی گیاه و یون تیتانیوم، سه بار و با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه، سانتریفوژ گردید و در هر

مرحله با آب دیونیزه شستشو شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد خشک شد و برای شناسایی مورد استفاده قرار گرفت.

روش‌های شناسایی نانوذرات تیتانیوم

آنالیز UV: با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری (V-670, Spectrophotometer JASCO) در دامنه ۳۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر به دلیل جذب تیتانیوم در این محدوده، طیف‌های جذبی نمونه‌ها اندازه‌گیری شد (۱۴).

طیف سنجی تفکیک انرژی SDE: آنالیز تفکیک انرژی نیز برای تعیین ترکیب درصد نانو ذرات سنتز شده مورد استفاده قرار گرفت (۱۴).

آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی و انتقالی: از میکروسکوپ الکترونی روبشی و انتقال الکترونی (SEM-TEM) که راه‌هایی برای مشاهده مستقیم نانوذرات هستند، جهت بررسی اندازه و همچنین ریخت‌شناسی سطحی نانوذرات تیتانیوم استفاده شد. برای این منظور، یک لایه از رسوب بر روی شبکه فیلم کربن قرار داده شد و توسط میکروسکوپ الکترونی انتقالی (TEM) در دمای اتاق عکس‌برداری شد. علاوه بر این، برای تعیین شکل و اندازه نانوذرات، لایه نازکی از رسوب، بر روی ورق طلا قرار داده شد و تحت فشار خلأ (۸-۵ Torr) با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (XL30, Philips, Japan) عکس‌برداری شد (۱۴).

سویه‌های میکروبی و آماده‌سازی دوز تلقیح باکتری‌ها: کشت‌های لیوفیلیزه شده از باکتری‌های *اشریشیاکلی* $O_{157}:H_7$ و *لیستریا منوسیتوژنز* از گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد. کشت اولیه باکتری‌ها به لوله‌های حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط BHI براس تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. همین پروسه یک بار دیگر تکرار شد. یک لوپ از باکتری‌ها از کشت دوم در محیط BHI براس دیگری کشت داده شد و پس از گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت، سوسپانسیون باکتری به جذب نوری یک دهم در طول موج ۶۰۰ نانومتر رسانده شد. سپس آن کشت میکروبی را در محیط BHI آگار کشت داده و شمارش گردید (۲۲).

تعیین حداقل غلظت مهاری رشد و حداقل غلظت کشنده باکتری: برای تعیین MIC و MBC از روش میکرودایلوشن استفاده شد (۲۳). میکروپلیت‌های ۹۶ خانه استریل برای این منظور مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور حل شدن مواد از ۰/۰۵ درصد دی‌متیل سولفوکساید استفاده گردید. رقت‌سازی سریالی با استفاده از محیط BHI براس انجام شد. رقت‌سازی از ۵ تا ۰/۰۰۲ درصد انجام شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از رقت‌ها را به میکروپلیت‌ها اضافه کرده و ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری که به تعداد 1×10^5 cfu/ml رسیده است اضافه شد. به منظور بررسی صحت انجام کار چاهک‌های کنترل مثبت و کنترل منفی در نظر گرفته شد. پس از گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، کمترین غلظتی از ماده که بتواند موجب مهار رشد باکتری مذکور گردد به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد. کمترین غلظت کشنده باکتری براساس روش سلیکتاس و همکاران (۲۰۰۷) به‌دست آمد (۲۴). از تمام خانه‌هایی که مهار رشد از خود نشان داده بودند، ۱۰ میکرولیتر برداشته شد و در محیط BHI آگار پخش شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. کمترین غلظت ماده که هیچ باکتری در محیط کشت رشد نکرده باشد به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد.

بررسی سمیت سلولی (Microculture Tetrazolium Test): بررسی سمّیت سلولی نانوذرات تیتانیوم با روش MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl tetrazolium Bromide) انجام شد (۲۵). به‌طور خلاصه، تعداد ۵ هزار سلول در هر چاهک ۹۶ تایی پلیت سلولی اضافه شد و رقت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از نانو ذرات در زمان ۲۴ ساعت بر روی رده سلولی سرطانی کولون (HT-29) و سلول‌های نرمال (HEK-293) افزوده شد. رده‌های سلولی از انیستیتو پاستور ایران تهیه گردید. بعد از گذشت مدت زمان مورد نظر، محلول رویی محیط کشت دور ریخته شد و سلول‌ها با محلول رنگ MTT ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در PBS به مدت ۴ ساعت تحت شرایط دی‌اکسیدکربن ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از محلول‌سازی فرمازان با ۱۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکساید، جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه قرائت‌خوان الایزا (ELISA reader, Oraganon Teknika) خوانده شد. سپس رنگ MTTجداسازی شد و کریستال‌های فورمازان تولید شده باسلول‌های زنده در ایزوپروپانول حل شدند. در نهایت، میزان بقای سلول به‌کمک فرمول زیر محاسبه گردید:

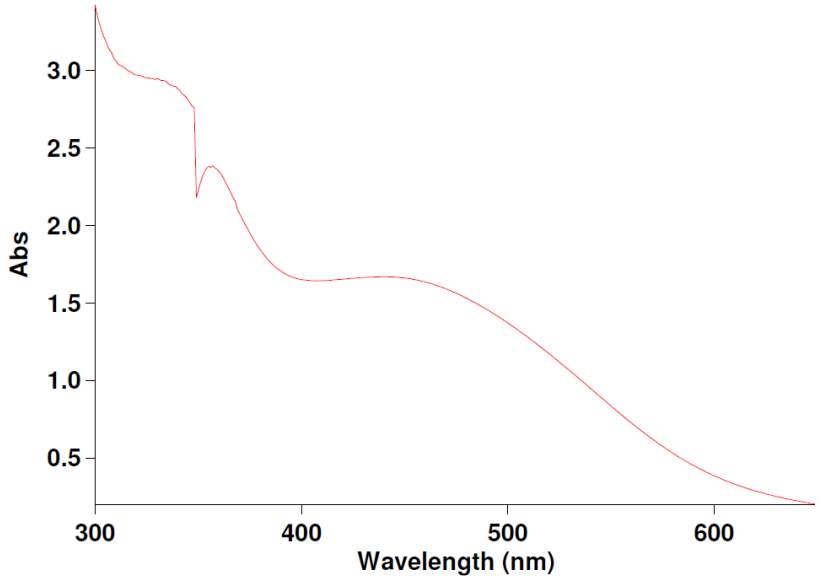
(جذب نوری سلول‌های کنترل/جذب نوری سلول‌های تیمار شده) = میزان بقای سلولی ×100

سپس میزان دوز ۵۰ درصد کشندگی (IC50) نیز محاسبه شد.

آنالیز آماری: IC_{50} با آنالیز رگرسیون با استفاده از نرم‌افزار Prism-6 (Graphpad software Inc, Ca, US) به‌دست آمد.

نتایج

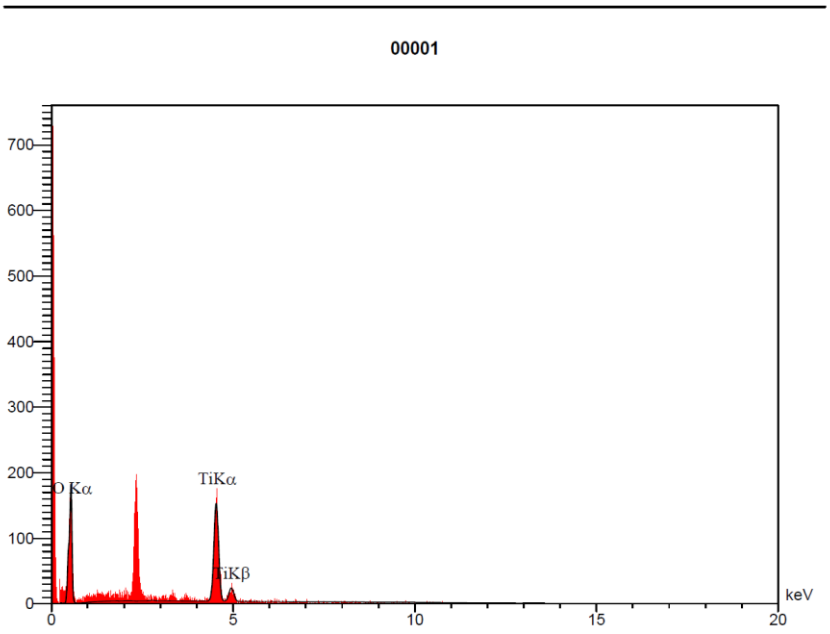
آنالیز UV: به منظور اندازه‌گیری جذب تیتانیوم از دستگاه اسپکتروفتومتری استفاده شد. در شرایط فراصوت تغییر رنگ نمونه مشاهده گردید که این تغییر رنگ در شرایط استرینگ بسیار سریع و واضح بود. محلول حاوی نانوذرات سنتز شده با جذب در ناحیه ۳۵۲ نانومتر نشان از سنتز نانوذرات تیتانیوم توسط عصاره آبی گیاه مرزه بود (شکل ۱).



شکل ۱- طیف جذب UV برای نانوذرات تیتانیوم سنتز شده با روش فراصوت

طیف سنجی تفکیک انرژی SDE: طیف SDE برای نمونه حاوی نانوذرات تیتانیوم انجام

گرفت و حضور عناصری مانند تیتانیوم و اکسیژن را نشان داد که فلز تیتانیوم دارای ۳۳/۳ درصد تولید بود (شکل ۲).



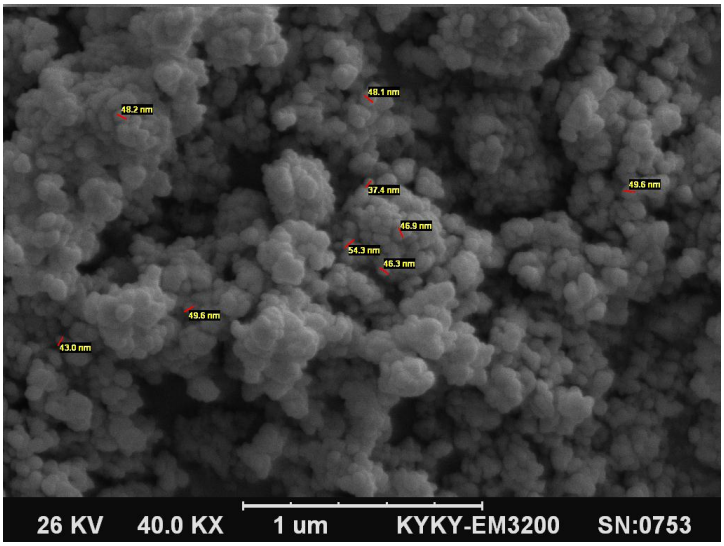
Quantitative Results

Elt	Line	Int	Error	K	Kr	W%	A%	ZAF	Formula	Ox%	Cat#
O	Ka	40.8	7.3249	0.3717	0.1682	66.70	85.71	0.2520		0.00	0.00
Ti	Ka	77.1	1.0364	0.6283	0.2842	33.30	14.29	0.8532		0.00	0.00
				1.0000	0.4524	100.00	100.00			0.00	0.00

شکل ۲- طیف EDS به منظور تعیین ترکیب درصد فلز تیتانیوم

آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی و انتقالی: بررسی ساختار و مورفولوژی نانوذرات و همچنین اندازه و ریخت‌شناسی سطحی آنها، توسط دستگاه میکروسکوپ MET و MES انجام شد. در محلول کلویدی نانوذرات سنتز شده با تکنیک فراصوت، اشکال نانوذرات کروی مشاهده شد که از نظر اندازه ذرات در این روش از ۳۷/۴ تا ۴۹/۶ و به طور میانگین ۴۳/۵ می‌باشد (شکل ۳). به‌علاوه، تصاویر MET شکل و اندازه نانو ذرات را تأیید می‌کند (شکل ۴).

اثر ضد میکروبی نانوذرات: نانوذرات تیتانیوم سنتز شده به روش فراصوت دارای اثرات ضد میکروبی بسیار قوی بر ضد پاتوژن‌های *اشریشیاکلی* $O_{157}:H_7$ و *لیستریا منوسیتوژنز* می‌باشند که در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود، نانوذره تیتانیوم سنتز شده به روش فراصوت در کمترین غلظت مورد بررسی (۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) توانست موجب مهار رشد *لیستریا منوسیتوژنز* و *اشریشیاکلی* شود.



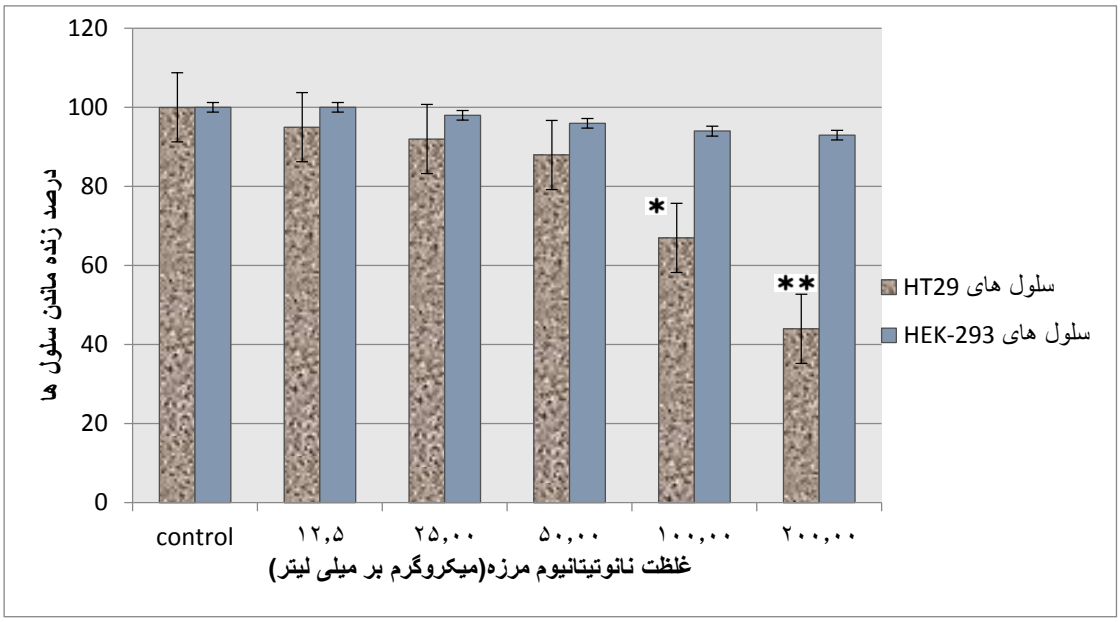
شکل ۳- تصویر میکروسکوپ روبشی SEM از نانوذرات تیتانیوم سنتز شده با روش فراصوت

شکل ۴- تصویر میکروسکوپ انتقالی TEM از نانوذرات تیتانیوم سنتز شده با روش فراصوت

جدول ۱- بررسی اثرات ضد میکروبی نانوذرات تیتانیوم سنتز شده با روش فراصوت

روش تهیه نانوذره	*لیستریا منوسیتوژنز*		*اشریشیاکلی* $O_{157}:H_7$	
	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
فراصوت	۲۰	۲۰	۲۰	۶۰

سمیت سلولی نانوذرات: میزان سمیت نانوتیتانیوم مرزه فراصوت بر روی رده سلولی سلول‌های نرمال (HEK-293) و سرطانی کولون (HT29)با روش MTT مورد ارزیابی قرارگرفت. شکل ۵ میزان بقای سلول‌های نرمال (HEK-293) و سلول‌های سرطانی کولون (HT-29) را در مواجه با غلظت‌های مختلف نانوتیتانیوم مرزه فراصوت نشان می‌دهد. مقدار IC_{50} برای رده سلولی HT29 ، حدود ۱۸۳ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد.



شکل ۵- درصد زنده ماندن سلول‌های HEK-293 و HT-29 در اثر تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذره تیتانیوم مرزه فراصوت پس از ۲۴ ساعت در مقایسه با کنترل

* ($P<0.05$) معنی‌داری نسبت به گروه کنترل

** ($P<0.01$) معنی‌داری نسبت به گروه کنترل

بحث و نتیجه‌گیری

فناوری نانو امروزه شاهد پیشرفت‌های چشمگیری در زمینه ساخت نانومواد و استفاده از روش‌ها و مواد جدید بوده است. با توسعه مواد و روش‌های جدید، نگرانی از آلودگی محیط زیست توسط نانوذرات تولید شده از روش‌های شیمیایی و تولید محصولات جانبی خطرناک دوچندان شده است. روش‌های زیستی بی‌خطر را می‌توان به‌عنوان جایگزینی برای روش‌های شیمیایی مرسوم در تهیه نانوذرات در نظر گرفت (۲۶، ۲۷). این مطالعه، به سنتز نانوذرات تیتانیوم از عصاره گیاه مرزه، با تکنیک فراصوت پرداخته است که یک روش اقتصادی و دوست‌دار محیط زیست می‌باشد. فرایند سنتز نانوذرات تیتانیوم با تکنیک فراصوت، دارای بازده بالایی است که از مزایای این روش می‌باشد. بنابراین استفاده از پتانسیل عظیم طبیعت می‌تواند در سنتز نانو ذرات، بدون آسیب رساندن به محیط زیست بکار گرفته شود. اندازه نانوذرات یک فاکتور مهم و تأثیرگذار بر روی مکانیسم‌های سلولی مانند جذب، پراکندگی سلولی، فرایند متابولیسمی و ترشحی است (۲۸). فاکتورهای وابسته دیگر در رابطه با اثرات جانبی نانوذرات بر عملکرد سلولی، شکل یا مورفولوژی است. بر اساس مطالعات مشخص شده است که شکل نانوذرات در میزان

جذب تأثیر زیادی دارد. به‌عنوان مثال نانوذرات کروی از نانوذرات طنابی و مکعبی جذب بالاتری دارند (۲۹). شاهین لفته و همکاران در سال ۲۰۲۰ به سنتز نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید با استفاده از گیاه حرا و فعالیت ضد باکتری آن پرداختند و نشان دادند باکتری‌های گرم منفی در برابر نانوذرات سنتز شده با استفاده از عصاره گیاه حرا، مقاومت بیشتری از خود نشان می‌دهد (۳۰).

نانوذره تیتانیوم سنتز شده به روش فراصوت در کمترین غلظت مورد بررسی (۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) توانست موجب مهار رشد *لیستریا منوسیتوژنز* و *اشریشیاکلی* شود. تاکور و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم سنتز شده با استفاده از عصاره برگ *Azadirachta indica* بر ضد پاتوژن‌هایی مانند *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *سالمونلا تیفی* و *کلبسیلا پنومونیه* اثرات ضد میکروبی نشان دادند. این ذرات کمترین MIC را بر ضد *اشریشیاکلی* و *سالمونلا تیفی* نشان دادند (۱۰/۴۲ میکروگرم در میلی‌لیتر)، درحالی که کمترین MBC را برضد *کلبسیلا پنومونیه* (۸۳/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از خود نشان داد (۳۱).

سانتوش کومار و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم سنتز شده با استفاده از عصاره *Psidium guajava* بیشترین ناحیه مهار رشد را بر ضد *استافیلوکوکوس اورئوس* (۲۵ میلی‌متر) و اشریشیاکلی (۲۳ میلی‌متر) نشان داد (۳۲). ایزا و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که نانوذرات تیتانیوم سنتز شده به روش سبز با استفاده از عصاره دانه لوپین اثرات ضد میکروبی قوی بر ضد انتروکوکوس و *اشریشیاکلی* نشان داد (۳۳). کمترین MIC نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم سنتز شده با استفاده از عصاره بره موم بر ضد *سالمونلا انتریتیدیس* (۸ میکروگرم در میلی‌لیتر) و بیشترین MIC بر ضد *سودوموناس وولگاریس* (۱۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر) نشان داده شد (۳۴). حسنیان و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی حساسیت زیادی نسبت به نانوذرات سنتز شده به روش سبز در غلظت‌های ۲۵ تا ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر داشتند. این محققین گزارش کردند که نانوذرات مس می‌تواند جایگزین خوبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها باشد به‌طوری که اثر نانوذرات مس از آنتی‌بیوتیک یفیپیم نیز بیشتر بود و اثر ضد میکروبی وسیع‌الطیفی داشت (۳۵). جایارامبو و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که نانوذرات مس سنتز شده به روش سبز اثرات ضد میکروبی عالی بر ضد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان دادند (۳۶). نانوذرات نقره سنتز شده به روش سبز از عصاره برگ بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) در تمام غلظت‌های مورد مطالعه اثر مهاری بر ضد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* از خود نشان دادند. فعالیت فتوکاتالیتیک فیلم‌های نانوکامپوزیت بر پایه نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم موجب کاهش بیان ژن‌ها/پروتئین‌های مخصوص تنظیم، سیگنال‌دهی، عملکرد رشد با اثرات انتخابی بر هموستاز یون‌ها، تنفس غیر وابسته به کوآنزیم‌ها و ساختار دیواره سلولی می‌شود (۳۷). نانوذرات تیتانیوم توانایی تجزیه غشای بیرونی باکتری‌ها را از طریق گونه‌های اکسیژن فعال به ویژه رادیکال‌های هیدروکسیل دارند که موجب پراکسیداسیون فسفولیپیدها و در نهایت مرگ سلول می‌شود. همچنین این نانوذرات به دلیل تعامل بار منفی موجود در سطح خود با بار مثبت در سطح دیواره باکتری‌ها اثرات ضد میکروبی را اعمال می‌کنند (۳۸).

نانوذرات تیتانیوم سنتز شده در این مطالعه اثرات سمی بر سلول‌های نرمال ندارند. نانوذرات تیتانیوم سنتز شده در این مطالعه حتی در بالاترین

غلظت مورد مطالعه که غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده سمیت غیر معناداری بر روی سلول‌های نرمال غیرسرطانی جنینی کلیه (HEK-293) داشتند که با مطالعه الشبیب و همکاران در سال ۲۰۲۰ که نانوتیتانیوم سنتز شده با استفاده از عصاره ریشه گیاه بوزیدان (*Withania somnifera*) را با سلول‌های نرمال جنینی کلیه (HEK-293) مواجه کردند که تا دوز ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بدون سمیت بود، هم راستا می‌باشد. همچنین مقدار IC_{50} را بر روی سلول‌های HepG2 را ۸۳/۳ میکروگرم در میلی‌لیتر برآورد کردند (۲۱). در مطالعه حاضر نانوذرات تیتانیوم در غلظت ۱۸۳ میکروگرم در میلی‌لیتر مانع رشد حدود ۵۰ درصد سلول‌های سرطانی کولون (HT-29) شد، این در حالی است که آمانولا و همکاران در سال ۲۰۱۹ نانوتیتانیوم سبز با استفاده از عصاره پوست پرتقال را سنتز کردند که مقدار IC_{50} برای رده سلول سرطانی A549 ، حدود ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد و اثرات نانوتیتانیوم سنتز شده بر روی رده نرمال بررسی نشد (۳۹). نارایانان و همکاران در سال ۲۰۲۱ نشان دادند که نانوتیتانیوم سنتز شده توسط عصاره گونه‌ای از نعناع (*Coleus aromatic*) بر روی رده سلولی سرطانی (HeLa) در دوز ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، حدود ۹۳ درصد مهار رشد داشته است (۴۰). ماتا و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره آبی برگ گیاه *Abution indicum* بر ضد سلول‌های سرطانی اثرات سمیت وابسته به دوز دارد (۴۱). در مطالعه‌ای مشابه، نارچین و همکاران (۲۰۱۸) نانوذرات نقره را با استفاده از عصاره گیاه مرزه به دو روش نور و فراصوت تولید کردند و نشان دادند که در روش فراصوت اندازه ذرات کوچک‌تر بوده و توزیع بهتری دارند. این نانوذرات بیشترین اثر سمی را در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر سلول‌های سرطانی کلون (HT-29) داشتند و کمترین سمیت را برای سلول‌های سالم (HEK-293) در شرایط مشابه نشان دادند (۱۴).

نانوذرات فلزی سنتز شده به روش سبز به‌عنوان آفت‌کش‌های نانو، قارچ‌کش‌های نانو، سنسورهای زیستی نانو و کودهای نانو در کشاورزی کاربرد دارند. این نانوذرات به افزایش میزان و کیفیت محصولات کشاورزی کمک کرده و موجب کاهش آلودگی‌های شیمیایی شده و از محصولات کشاورزی در برابر فشارهای محیطی محافظت می‌کنند (۴۲). با استفاده از نانوذرات به‌عنوان حمل‌کننده، می‌توان چربی‌ها، طعم‌دهنده‌ها، مواد ضد میکروبی، مواد آنتی اکسیدانی و ویتامین‌ها را انکپسوله کرد. این نانوذرات موجب بهبود خصوصیات مکانیکی و مقاومت به گرما در مواد بسته‌بندی مواد غذایی می‌شوند که به دلیل انتشار مناسب رطوبت، بخار آب و گازها موجب افزایش مدت ماندگاری مواد غذایی می‌شوند (۴۳).

نانوتیتانیوم سنتز شده به روش سبز با استفاده از عصاره مرزه اثر سمی روی سلول‌های نرمال نداشت ضمن این که مانع رشد سلول‌های سرطانی کولون شد و در پایین‌ترین غلظت مورد استفاده مانع رشد باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *لیستریا منوسیتوژنز* شده است. بدین ترتیب نگرانی‌ها بابت خطر این ترکیب را کم کرده و زمینه را برای استفاده بیشتر این ماده فراهم می‌کند. با توجه به معضلات مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میکروارگانیسم‌ها پیشنهاد می‌شود از این نانوذرات در بسته‌بندی مواد غذایی به منظور افزایش مدت ماندگاری استفاده گردد.

سپاسگزاری

این طرح تحقیقاتی با استفاده از اعتبارات ویژه پژوهشی (گرنت) دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل انجام گردیده است.

References

1- **Silveira SMD, Júnior AC, Scheuermann GN, Secchi FL, Vieira CRW.** Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from selected herbs cultivated in the South of Brazil against food spoilage and foodborne pathogens. *Cienc Rural*. 2012; 42: 1300-1306.

2- Chavez A, Scheiman J, Vora S, Pruitt BW, Tuttle M, Iyer E, *et al.* Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nat Methods*. 2015; 12(4): 326-328.

3- Griffin J, Singh AK, Senapati D, Lee E, Gaylor K, Jones-Boone J, *et al.* Sequence-specific HCV RNA quantification using the size-dependent nonlinear optical properties of gold nanoparticles. *Small*. 2009; 5(7): 839-845.

4- Han Y, Li S, Cao X, Yuan L, Wang Y, Yin Y, *et al.* Different inhibitory effect and mechanism of hydroxyapatite nanoparticles on normal cells and cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Sci. Rep*. 2014; 4: 7134.

5- Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ, Hofmann MC. *In vitro* cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol. Sci*. 2005; 88(2): 412-419.

6- Xiong L, Tong ZH, Chen JJ, Li LL, Yu HQ. Morphology-dependent antimicrobial activity of Cu/CuxO nanoparticles. *Ecotoxicol*. 2015; 24: 2067-2072.

7- Gunawan C, Teoh WY, Marquis CP, Amal R. Cytotoxic origin of copper (II) oxide nanoparticles: comparative studies with micron-sized particles, leachate, and metal salts. *ACS Nano*. 2011; 5: 7214-7225.

8- Zia R, Riaz M, Farooq N, Qamar A, Anjum S. Antibacterial activity of Ag and Cu nanoparticles synthesized by chemical reduction method: a comparative analysis. *Mater. Res. Express*. 2018; 5: 075012.

9- Harne S, Sharma A, Dhaygude M, Joglekar S, Kodam K, Hudlikar M. Novel route for rapid biosynthesis of copper nanoparticles using aqueous extract of *Calotropis procera* L. latex and their cytotoxicity on tumor cells. *Colloids Surf*. 2012; 95: 284-288.

10- Giannousi K, Avramidis I, Samara CD. Synthesis, characterization and evaluation of copper based nanoparticles as agrochemicals against *Phytophthora infestans*. *RSC Adv*. 2013; 43: 21743–21752.

11- Mahavinod Angrasan JKV, Subbaiya R. Biosynthesis of copper nanoparticles by *Vitis vinifera* leaf aqueous extract and its antibacterial activity. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 2014; 3: 768-774.

12- Celikel N, Kavas G. Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. *Czech J. Food Sci.* 2008; 26: 174–181.

13- Salvadori MR, Ando RA, Nascimento CAO, Corea B. Bioremediation from wastewater and extracellular synthesis of copper nanoparticles by the fungus *Trichoderma koningiopsis*. *J. Env. Sci. Health*. 2014; 49: 1286–1295.

14- Narchin F, Larijani K, Rustaiyan A, Ebrahimi SN, Tafvizi F. Phytochemical synthesis of silver nanoparticles by two techniques using *Saturaja rechengri* Jamzad extract: identifying and comparing *in vitro* anti-proliferative activities. *Adv. Pharm. Bull.* 2018; 8(2): 235-244.

15- Shiripoure R, Ketab G, Tafvizi F, Khodarahmi P. Biosynthesis and chemical characterization of silver nanoparticles using *Satureja rechingeri* Jamzad and their apoptotic effects on AGS gastric cancer cells. *J. Clust. Sci.* 2020; 32: 1389-1399.

16- Alizadeh, A. Essential oil composition, phenolic content, antioxidant, and antimicrobial activity of cultivated *Satureja rechingeri* Jamzad at different phenological stage. Z. *Naturforsch*. 2015; 70(3-4) c: 51–58.

17- Sefidkon F, Abbasi K, Jamzad Z, Ahmadi S. The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of *Satureja rechingeri* Jamzad. *Food Chem*. 2007; 100: 1054–1058.

18- Kavakebi E, Anvar AA, Ahari H, Motalebi AA. Green biosynthesized *Satureja rechingeri* Jamzad-Ag/poly vinyl alcohol film: quality improvement of *Oncorhynchus mykiss* fillet during refrigerated storage. *Food Sci. Technol. Campinas*. 2021; 41(1): 267-278.

19- Waghmode MS, Gunjal AB, Mulla JA, Patil NN, Nawani NN. Studies on the titanium dioxide nanoparticles: biosynthesis, applications and remediation. *SN. Appl. Sci*. 2019; 1: 310.

20- Jafari S, Mahyad B, Hashemzadeh H, Janfaza S, Gholikhani T, Tayebi L. Biomedical applications of TiO2 nanostructures: Recent advances. *Int. J. Nanomedicine*. 2020; 15: 3447–3470.

21- Al-Shabib NA, Husain FM, Qais FA, Ahmad N, Khan A, Alyousef AA, *et al.* Phyto-

mediated synthesis of porous titanium dioxide nanoparticles from *Withania somnifera* root extract: broad-spectrum attenuation of biofilm and cytotoxic properties against HepG2 cell lines. *Front. Microbiol*. 2020; 11: 1680.

22- Partovi R, Talebi F, Boluki Z, Sharifzadeh A. Evaluation of antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* essential oil alone and in combination with *Origanum majorana* and *Caryophyllus aromaticus* essential oils against some foodborne bacteria. *Int J Enteric Pathog*. 2019; 7(2): 60-67.

23- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-M07-A06, 10.ed, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.

24- Celiktas OY, Hames Kocabas EE, Bedir E, Vardar Sukan F, Ozek T, Baser KHC. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem*. 2007; 100: 553-559.

25- Violet Mary J, Pragathiswaran C, Anusuya N. Photocatalytic, degradation, sensing of Pb^{2+} using titanium nanoparticles synthesized via plant extract of Cissusquadrangularis: *In vitro* analysis of microbial and anti-cancer activities. *J. Mol. Struct*. 2021; 1236: 130144.

26- Shankar SS, Rai A, Ankamwar B, Singh A, Ahmad A, Sastry M. Biological synthesis of triangular gold nanoprisms. *Nat Mater*. 2004; 3: 482–488.

27- Mukherjee P, Ahmad A, Mandal D, Senapati S, Sainkar SR, Khan MI, *et al.* Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in the mycelial matrix: a novel biological approach to nanoparticle synthesis. *Nano Lett.* 2001; 1: 515–519.

28- Li Y, Chen DH, Yan J, Chen Y, Mittelstaedt RA, Zhang Y, *et al.* Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and *in vitro* micronucleus assay. *Mutat. Res.* 2012; 14(2): 4-10.

29- Singh N, Manshian B, Jenkins GJ, Griffiths SM, Williams PM, Maffeis TG, *et al.* Nano genotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*. 2009; 30(23): 3891-3914.

30- Shahin Lefteh M, Sourinejad I, Ghasemi Z. Biosynthesis of titanium dioxide nanoparticles from the Mangrove (*Avicennia marina*) and investigation of its antibacterial activity. *J Mazandaran Univ Med Sci.* 2020; 30(186): 15-27.

31- Thakur BK, Kumar A, Kumar D. Green synthesis of titanium dioxide nanoparticles using *Azadirachta indica* leaf extract and evaluation of their antibacterial activity. *South African J Botany*. 2019; 124: 223–227.

32- Santhoshkumar T, Rahuman AA, Jayaseelan C, Rajakumar G, Marimuthu S, Kirthi AV, *et al.* Green synthesis of titanium dioxide nanoparticles using *Psidium guajava* extract and its antibacterial and antioxidant properties. *Asian Pac.J. Trop. Med.* 2014; 7(12): 968-976.

33- Eisa NE, Almansour S, Alnaim IA, Ali AM, Algrafy E, Ortashi KM, *et al.* Eco-synthesis and characterization of titanium nanoparticles: Testing its cytotoxicity and antibacterial effects. *Green Process Synth*. 2020; 9: 462–468.

34- Subhapriya S, Gomathipriya P. Green synthesis of titanium dioxide (TiO2) nanoparticles by *Trigonella foenum-graecum* extract and its antimicrobial properties. *Microb. Pathog*. 2018; 116: 215–220.

35- Hassanien R, Husein DZ, Al-Hakkani MF. Biosynthesis of copper nanoparticles using aqueous Tilia extract: antimicrobial and anticancer activities. *Heliyon.* 2018; 4(12): e01077.

36- Jayarambabu N, Akshaykranth A, Venkatappa Rao T, Venkateswara Rao K, Rakesh Kumar R. Green synthesis of Cu nanoparticles using *Curcuma longa* extract and their application in antimicrobial activity. *Mater Lett.* 2020; 259(15): 126813.

37- Hamed MT, Bakr BA, Shahin YH, Elwakil BH, Abu-Serie MM, Aljohani FS, *et al.* Novel synthesis of titanium oxide nanoparticles: Biological activity and acute toxicity study. *Bioinorg Chem Appl*. 2021; 2021: 8171786.

38- Kubacka A, Diez MS, Rojo D, Bargiela R, Ciordia S, Zapico I, *et al.* Understanding the antimicrobial mechanism of TiO2-based nanocomposite films in a pathogenic bacterium. *Sci Rep.* 2014; 4(1): 4134

39- Mobeen Amanulla A, Sundara R. Green synthesis of TiO2 nanoparticles using orange peel extract for antibacterial, cytotoxicity and humidity sensor applications. *Mater Today Proc.* 2019; 8: 323–331.

40- Narayanana M, Vigneshwarib P, Natarajanb D, Kandasamyc S, Alsehlid M, Elfasakhanyd A, *et al.* Synthesis and characterization of

TiO2 NPs by aqueous leaf extract of *Coleus aromaticus* and assess their antibacterial, larvicidal, and anticancer potential. *Environ Res*. 2021; 200: 111335

41- Mata R, Nakkala JR, Sadras SR. Biogenic silver nanoparticles from *Abution indicum*: Their antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects *in vitro*. *Colloids Surf B.* 2015; 128: 276-86.

42- Bahrulolum H, Nooraei S, Javanshir N, Tarrahimofrad H, Mirbagheri VS, Easton AJ, *et al*. Green synthesis of metal nanoparticles using microorganisms and their application in the agri-food sector. *J Nanobiotechnol*. 2021; 86: 19.

43- Prakash J, Vignesh K, Anusuya T, Kalaivani T, Ramachandran C, Sudha Rani R, *et al*. Application of nanoparticles in food preservation and food processing. *J Food Hyg Saf*. 2019; 34: 317-324.

Extraction of titanium nanoparticles of *Saturaja rechengri* Jamzad using ultrasound techniques; the antimicrobial effect against food-borne pathogens and its cytotoxicity against normal and cancer cell lines

Razieh Partovi[1], Fataneh Narchin[*2], Atefeh Araghi[3]

1- Associate Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.
2- Associate Professor, Department of Chemistry, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3- Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.

Receive: July 17, 2021; Revise: August 29, 2021; Accept: September 6, 2021

Summary

Green synthesis of nanoparticles has some advantages including avoidance of harmful chemicals, clean process, being eco-friendly, easy preparation, being economical and control on size and shape of particles. In this study, water extract of *Saturaja rechengri* Jamzad was prepared and titanium nanoparticles were produced using green and ultrasound techniques. Then, in order to characterize the nanoparticles, UV analysis, energy dispersive x-ray spectroscopy and TEM and SEM analysis were performed. MIC and MBC of nanoparticles against *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* and cytotoxicity in 12.5, 25, 50, 100 and 200 mg/ml on HT-29 and HEK-293 cell lines were also determined. Nanoparticles had absorption at 352 nm which showed synthesis of titanium nanoparticles using *Saturaja rechengri* Jamzad extract. Spherical shape of nanoparticles was detected in colloidal solution with 37.4 to 49.6 nm. Titanium nanoparticles could stop the growth of *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* at 20 µg/ml. The nanoparticles did not reveal any cytotoxic effect on the normal cells, while they stopped the growth of 50% of cancer cells at 183 µg/ml. The results of this study decreased the anxiety of using titanium nanoparticles and increased the potential of using this nanoparticle in food packaging to finally extend shelf life of food.

Key words: *Cytotoxicity, Green synthesis, Antimicrobial effect, Titanium nanoparticles, Saturaja rechengri Jamzad*