Journal of Microbial World
Volume 16, No. 3, December 2023

Original Article

Synthesis of silver nanoparticles from Ephedra intermedia extract and evaluation of antibacterial and antioxidant properties

Mina Tetrontan[1], Seyed Mohammad Mahdi Hamdi[2], Maryam Ebrahimi Tajabadi[3]

[1]MSc, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. [2]Associate Professor, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. [3]Associate Professor, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Background &Objectives: Ephedra intermedia species from the Ephedraceae family is a shrubby plant and is considered among the primitive plants. The aim of this study is to synthesize silver nanoparticles from the extract of this species in order to investigate its antimicrobial and antioxidant effects.

Materials & Methods: First, methanolic extract was prepared and silver nanoparticles were synthesized using silver salt. A spectrophotometric device was used to verify silver nanoparticles and a scanning electron microscope was used to check its dimensions and shape. FTIR analysis was used to investigate the possible organic compounds involved in the synthesis of nanoparticles, and to determine the concentration of nanoparticles, the analysis was performed by AAS and the antioxidant properties were evaluated by the DPPH method. In order to evaluate the antimicrobial activity, MBC and MIC and disking method were used.

Results: The nanoparticles produced were spherical and in the range of 30-89 nm, and the most effective group of agents that played a role in its production were the hydroxyl group (O-H) and alkene compounds (C=C), and the concentration of biosynthetic nanoparticles was 2.25 mg/liter indicates a high concentration of synthesized nanowires. The results of MIC and MBC tests were the same and its concentration was 2000 µg/ml.

Conclusion: The results of this research showed that the biosynthetic nanoparticle obtained from Ephedra Intermedia is more effective in inhibiting the growth of bacteria than the commercial nanoparticle, so it can be used as an alternative in pharmaceutical, medical and disinfectant applications.

Keywords: Ephedra, silver nanoparticles, antimicrobial properties, plant extract, antioxidant properties.

Received: 20 May 2023 Revised: 6 September 2023 Accepted: 3 November 2023

Correspondence to: Seyed Mohammad Mahdi Hamdi
Tel: +98 2188890077
E-mail: m.hamdi@iauctb.ac.ir

Journal of Microbial World 2023, 16 (3): 207 - 218
DOI:10.30495/jmw.2023.1982229.2056

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

مجله دنیای میکروب‌ها
سال شانزدهم شماره سوم (پیاپی ٥٦) پاییز ١٤٠٢
صفحات ٢١٨ –٢٠٧

Original Article

سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره گونه *Ephedra intermedia* و بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی آن

مینا تترونتن[1]، سید محمدمهدی حمدی[2*]، مریم ابراهیمی تاج‌آبادی[3]

[1]کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. [2]دانشیار، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. [3]دانشیار، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: گونه *Ephedra intermedia* از خانواده *Ephedraceae*، گیاهی درختچه‌ای و جزو بازدانگان ابتدایی محسوب می‌شود. هدف از این مطالعه سنتز نانوذرات نقره از عصاره این گونه به‌منظور بررسی اثرات ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ابتدا عصاره متانولی تهیه شده و با استفاده از نمک نقره، نانوذره نقره سنتز گردید. برای تأیید نانوذرات نقره از دستگاه اسپکتروفتومتری و برای بررسی ابعاد و شکل آن از میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. جهت بررسی ترکیبات آلی احتمالی که در سنتز نانوذرات نقش دارند آنالیز FTIR و برای تعیین غلظت نانوذرات، آنالیز توسط AAS انجام شد و خواص آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH بررسی شد. به‌منظور ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی از MBC و MIC و روش دیسک‌گذاری استفاده گردید.

یافته‌ها: نانوذرات تولید شده به شکل کروی و در محدوده ٨٩-٣٠ نانومتر قرار داشتند و موثرترین گروه عاملی که در تولید آن نقش داشتند گروه هیدروکسیلی (O-H) و ترکیبات آلکنی (C=C) بودند و غلظت نانوذرات بیوسنتزی در ٢/٢٥ میلی‌گرم بر لیتر نشان از غلظت بالای نانو درات سنتز شده دارد. نتایج آزمون MIC و MBC یکسان بود و غلظت آن ٢٠٠٠ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده است.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که نانوذره بیوسنتزی حاصل از *Ephedra Intermedia* نسبت به نانوذره تجاری تاثیر بیشتری در مهار رشد باکتری‌ها دارد از این رو می‌تواند به‌عنوان یک جایگزین در کاربردهای دارویی، پزشکی و ضدعفونی کننده‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: *Ephedra* ، نانوذرات نقره، خواص ضدمیکروبی، عصاره گیاهی، خواص آنتی‌اکسیدان.

دریافت مقاله: ١٤٠٢/٢/٣٠ ویرایش مقاله: ١٤٠٢/٦/١٥ پذیرش مقاله: ١٤٠٢/٨/١٢

مقدمه

در میان نانوذرات، نانوذرات فلزی دارای اهمیت ویژه‌ای هستند و توسط روش‌های فیزیکی و شیمیایی سنتز می‌شوند. در سنتز شیمیایی نانوذرات فلزی، عوامل احیا کننده شیمیایی مانند سدیم بوروهیدرید و هیدرازین می‌توانند واکنش‌های احیا یون‌های فلزی را به نانوذرات فلزی احیا کنند (١) با این حال مواد مورد استفاده در این روش سمی و خطرناک هستند و نانوذرات تولید شده فاقد سازگاری زیستی بوده و از نظر فیزیولوژیکی برای تست‌های آزمایشگاهی مناسب نیستند (٢). جنس *Ephedra* از خانواده *Ephedraceae*، گیاهی درختچه‌ای

*) آدرس برای مکاتبه: گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرکزی، تهران، ایران.
تلفن: ٠٢١٨٨٨٩٠٠٧٧ پست الکترونیک: m.hamdi@iauctb.ac.ir

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

همیشه سبز و جزو بازدانگان ابتدایی محسوب می‌شود (۳). گونه‌های این جنس با توجه به وجود دو آلکالوئید افدرین و پزوافدرین درعصاره این گیاه، از آن در پزشکی به‌عنوان مسکن، تب بر و کنترل وزن بدن، استفاده می‌کنند (٤). از طرفی عصاره گونه‌های این جنس تقویت کننده قلب، ضد روماتیسم، ضد خستگی، پیشگیری از حالت تهوع و در درمان بیماری آسم از گذشته مورد استفاده می‌باشد (۵). از طرفی نقره دارای اثرات ضدمیکروبی است که با تغییر در سایز آن‌ها در سطوح نانو این ویژگی افزایش می‌یابد. ذرات نانو نقره، ذراتی به قطر ۱ الی ۱۰۰ نانومتر بوده و این مواد دارای اندازه و شکل متنوع مانند بلوری، کروی، سوزنی، میله‌ای و غیره می‌باشند و سایز نانوذرات مواد باعث ایجاد خواص فیزیکی و شیمیایی ویژه و متفاوتی از مواد حجیم و یا ذرات بزرگ تر می‌شود. مواد در مقیاس نانو مفیدتر و با صرفه‌تر از مواد بزرگ و حجیم هستند. نانوذرات دارای نسبت سطح به حجم بالاتری بوده که منجر به افزایش واکنش می‌شوند (٦و۷). در مقایسه با نانوذرات فلزی سنتز شده با استفاده از روش‌های فیزیکی و شیمیایی که موادی سمی، مضر و گران هستند، سنتز نانوذرات بااستفاده از مولکول‌های بیولوژیکی یا عصاره گیاهی اخیراً در مطالعات علمی در سطح دنیا شتاب گرفته است و تصور بر این است که این نانوذرات ایمن‌تر و سازگارتر با محیط زیست هستند (۸). در بسیاری از مطالعات مشخص شده که نانوذرات نقره با اختلال در انتقال پیام سلولی، باعث ایجاد اختلال در شبکه ارتباط سلولی می‌شوند. همچنین، نانوذرات نقره در آسیب به DNA و در افزایش بیان مولکول پروتینی کاسپاز ۳ و به راه انداختن مرگ برنامه ریزی شده سلولی (آپوپتوزیس) نقش دارند و بنابراین منجر به میانجی‌گری و تکثیر سیگنال‌های مرگ می‌شوند. این امر در درمان سرطان بسیار پراهمیت است و امروزه تحقیقاتی بر روی استفاده از نانوذرات نقره در درمان سرطان‌ها انجام گرفته است (۹). سنتز بیولوژیکی نانوذرات فلزی (به خصوص نانوذرات طلا و نقره) با استفاده از سنتز سبز گیاهان، به‌عنوان یک روش مناسب جایگزین شده با روش‌های فیزیکی و شیمیایی مورد توجه قرار گرفته است. سنتز نانوذرات فلزی با استفاده از عصاره گیاهان از لحاظ اقتصادی روشی مقرون به صرفه‌ای می‌باشد، بنابراین این روش را می‌توان به عنوان یک روش اقتصادی و ارزشمند برای تولید نانوذرات فلزی در مقیاس بزرگ به کار گرفت (۱۰). همچنین استفاده از عصاره گیاهان در بیوسنتز نسبت به سایر روش‌های بیوسنتزی مانند استفاده از میکروارگانیسم‌ها بسیار ساده تر می‌باشد و دیگر نیازی به کشت سلول و مراحلی از این قبیل نیست (۱۱). نتایج مطالعه‌ای نشان داد که سنتز سبز نانوذره نقره با استفاده از عصاره گونه *Lonicera nummulariifolia* و بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی بالا و ضد سرطانی آن علیه رده سلولی سرطان ریه تایید شد و می‌توان از آن به‌عنوان یک کاندید دارویی استفاده کرد (۱۲). در مطالعه‌ای که اخیرا انجام شد، سنتز سبز نانوذره نقره با استفاده از عصاره گونه *Asparagus khorasanensis* ، دارای اثرات ضدمیکروبی بالاست و می‌توان از آن به عنوان یک کاندید دارویی استفاده کرد (۱۷). همچنین در مطالعه‌ای که بر روی رده سلول سرطانی کبد، پستان و کلون انجام شد، مشخص شد که نانوذرات زیستی اثرات مهاری بیشتری نسبت به نانوذرات تجاری برروی سلول‌های سرطانی از خود نشان می‌دهند و اثرات مهاری نانوذرات زیستی و تجاری در رده‌ی سلولی سرطانی بیشتر از رده‌ی سلولی نرمال بوده و این پدیده به دلیل اثر مستقیم آن‌ها بر روی سامانه تنفسی سلول در میتوکندری بوده وبنابراین می‌توان از نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی به‌عنوان راهکاری مناسب در درمان سرطان استفاده نمود (١٤). در مطالعه‌ای بر روی *Mespilus* مشخص شد که نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره *Mespilus germanica* می‌تواند اثرات ضدمیکروبی داشته و به‌عنوان کاندید دارویی مطرح شود (۱۵). تشکیل نانوذرات نقره با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ٤۵۰ نانومتر تایید شد و شکل کروی ذرات و اندازه متوسط آن‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره تعیین شد (١٦). در مطالعه‌ای مشخص شد که عصاره گیاه *Scabiosa oliverii* به‌طور معنی‌داری خاصیت ضدالتهابی است و همچنین خاصیت ضدمیکروبی فعالی بر روی باکتری

اشریشیاکلی و ضدمیکروبی متوسطی بر *استافیلوکوکوس اورئوس* دارد (۱۷). نتایج حاصل ازیک پژوهش نشان می‌دهد که نانوذرات نقره سنتز شده واجد عصاره *Asparagus khorasanensis* نسبت به نانوذرات نقره تجاری دارای اثرات بیولوژیکی معنادارتری می‌باشند و بنابراین این نانوذرات می‌توانند به‌عنوان کاندید دارویی مورد توجه قرار گیرند (۱۳). *DPPH* نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره گونه *Lonicera nummularifolia* در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر دارای اثر آنتی‌اکسیدانی به میزان بالایی بود. نتایج تست ضدمیکروبی نشان داد که اثرات ضدمیکروبی نانوذرات نقره بر روی باکتری‌های گرم منفی بیشتر است و با توجه به اثرات ضدمیکروبی و ضدسرطانی نانوذرات نقره سنتز شده می‌توان از آن به‌عنوان یک کاندید دارویی استفاده کرد (۱۲). سنتز سبز نانوذرات نقره در گونه *Parkia speciosa*، فعالیت‌های ضدمیکروبی (*اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس ائروژینوزا و باسیلوس سوبتیلیس*) و آنتی‌اکسیدانی روش مهار رادیکال (DPPH) قابل توجهی را نشان دادند (۱۸). همچنین نانوذرات اکسید نقره و پروبیوتیک ،اثر آنتی باکتریال برای کاهش عملکرد پمپ افلاکس MexXY-OprM در باکتری *سودوموناس آیروژینوزا* دارد (۱۹). هدف از این مطالعه سنتز نانوذرات نقره (AgNo3) از عصاره گونه *Ephedra intermedia* به‌منظور بررسی اثرات ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

الف) جمع‌آوری نمونه: ابتدا جمعیت‌هایی از گونه *Ephedra intermedia* در استان سمنان (جاده ایوانکی به سمت آبسرد کیلومتر ۱۵ سمت راست جاده) جمع‌آوری و سپس به کمک فلور ایران (۲۰) توسط استاد راهنما شناسایی شد و سپس نمونه‌ها در دمای محیط و سایه خشک شدند.

ب) تهیه عصاره: برای این منظور از روش سوکسله استفاده شد که پس از خشک شدن کامل گیاه، قسمت‌های ساقه سبز گیاه از قسمت ضخیم و ریشه‌ای جدا و توسط آسیاب برقی کاملا پودر شدند. برای تهیه عصاره الکلی ۵۰ میلی‌لیتر اتانول و ٤٥٠ میلی‌لیتر متانول داخل فلاسک سوکسله ریخته و سپس ٤٠ گرم از پودر گیاه در کارتوش مدل F 5800 با اندازه ۳۳× ۸۰ میلی‌متر ریخته و داخل محفظه سوکسله قرار داده شد و درجه دستگاه روی ۲ تنظیم وفرآیند عصاره‌گیری به روش سوکسله انجام شد. به منظورجداسازی حلال از عصاره با استفاده از کاغذ صافی، عصاره فیلتر و صاف شد، عصاره به‌دست آمده توسط دستگاه روتاری تحت خلا و در دمای کمتر از ۲۳ درجه سلسیوس تغلیظ شد (۲۱و۲۲).

ج) سنتز نانوذرات: مقدار ۰/۰۱۷ گرم از نیترات‌نقره ساخت شرکت مرک آلمان، در۱۰۰ سی‌سی آب دیونیزه حل و برای چند دقیقه روی شیکر گذاشته شد سپس ۱ سی‌سی از عصاره تهیه شده با ۹ سی‌سی از محلول نیترات‌نقره مخلوط و به مدت ٤ ساعت روی شیکر قرار داده شد و بعد از فیلتر کردن جذب محلول با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر *Uv-Vis* (Specphotometr USA, Agilent, Cary 300) در محدوده ۷۰۰–٤۰۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت (۲۳).

د) اندازه‌گیری ابعاد و شکل نانوذرات: تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (*SEM*) و مطالعه نقطه به نقطه، جهت بررسی اندازه و مورفولوژی نانو ذرات پس از پوشش‌دهی با طلا در ولتاژ زیر ۳۰ کیلو ولت و تحت فشار خلا با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مورد مطالعه قرار گرفت . نانوذرات در مقداری آب حل شده و سوسپانسیون حاصل روی گرید طلا مورد تصویربرداری قرار گرفت. به‌این منظور از دستگاه لایه نشانی طلا استفاده شد (٢٤).

ه) بررسی ترکیبات آلی احتمالی دخیل در سنتز نانوذرات: نمونه بیوسنتزی به این روش تهیه شد که بعد از ریختن نمونه در لوله فالکون به مدت ۱۵ دقیقه و دمای ۱۸ درجه سلسیوس و دور ۱۳۰۰۰ در سانتریفوژ قرارداده شد. سپس مایع رویی سر ریز شده و روی رسوب مانده در ته ظرف آب مقطر ریخته و مجددا سانتریفیوژ انجام شد. این کار دوبار دیگر هم تکرار شد و در مرحله آخر مقدار رسوب مانده در ته و جدار لوله را با استفاده از یک همزن شیشه‌ای در ته لوله جمع‌آوری کرده و داخل یک شیشه ساعت استریل ریخته و در زیر هود قرار داده

شد تا خشک شود. سپس مقدار ۰/۰۱ گرم از آن با ۰/۰۱ گرم از ماده پتاسیم برماید، داخل یک هاون چینی مخصوص، مخلوط و در دستگاه قرار گرفت و جذب نمونه *(FTIR)* پرس دستی پرس و به شکل قرص کوچکی درآمد سپس داخل محفظه مخصوص در دستگاه انجام شد (۲۵و۲۶).

و) تعیین غلظت نانوذرات: با استفاده از نمک‌نقره و آب دیونیزه محلول‌های استاندارد با غلظت‌هایی به‌ترتیب ppm۰/۰۲، ppm۰/۰۵، ppm۰/۰۱ و ppm ۱ تهیه و سپس غلظت‌های تهیه شده توسط دستگاه Atomic Absorption Assay محاسبه گردید.

ز) تعیین خاصیت آنتی‌اکسیدانی: غلظت‌هایی معادل ۶۰۰-۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، از پودر رسوبی عصاره گیاه *افدرا اینترمدیا* تهیه و به نسبت ۱به ۳ با DPPH یک هزارم مولار (۰/۰۰۱) تهیه گردید سپس به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شد و بعد جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد (۲۷).

ح) آزمون حساسیت ضدمیکروبی: از سه نمونه باکتریایی *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923)، *اشریشیاکلی* (ATCC ۲۵۹۲۲) و *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 27853) به‌منظور ارزیابی حساسیت ضدمیکروبی استفاده شد. سوسپانسیونی بر اساس استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند تهیه و بر روی پلیت‌های حاوی محیط مولر هینتون آگار با استفاده از یک سوآپ استریل، به‌صورت چمنی کشت داده شد. سپس غلظت ۲ میلی‌گرم از عصاره خالص، نانوذره تجاری و نانوذره سنتزی تهیه شد. دیسک‌های آغشته به هر کدام از غلظت‌های تهیه شده و دیسک آنتی‌بیوتیکی *Ciprofloxacin* بر روی سطح پلیت قرار داده شدند و هاله عدم رشد بعد از ۴۸ ساعت اندازه‌گیری شد.

ط) مقایسه اثر ضدباکتریایی نانوذره بیوسنتزی و نانوذره تجاری: سویه‌های باکتریایی از کشت تازه *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923)، *اشریشیا کلی* (ATCC ۲۵۹۲۲) و *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 27853) کدورتی معادل ۰/۵ مک‌فارلند ($۵/۱\times۱۰^{۸}$cfu/ml) تهیه شد. سپس در ۸ لوله آزمایش سترون شده و شماره‌گذاری شده مقدار ۳ سی‌سی محیط مولرهینتون براث ریخته و ۲ میلی‌گرم از پودر نانوذره بیوسنتزی به لوله شماره ۱ اضافه شد. سپس با سمپلر ۱سی‌سی از لوله شماره یک به لوله شماره ۲ انتقال داده شد و این کار تا لوله شماره ٦ تکرار شد و در آخر به منظور یکسان شدن غلظت ۱ سی سی از لوله شماره ٦ دور ریخته شد (به‌منظور یکسان شدن غلظت). سپس مقدار ۱۰ لاندا از هر کدام از سوسپانسیون‌های میکروبی تهیه شده در لوله‌های شماره‌گذاری شده ریخته شد. لوله‌های۷ و ۸ هم به‌عنوان کنترل منفی و مثبت انتخاب شد و در آخر نمونه‌ها به‌منظور رشد در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲٤ساعت نگهداری شد. برای نانوذره تجاری هم همین روال تکرار شد (۲۹).

برای تعیین حداقل غلظت کشنده باکتری‌ها (MBC) به کمک یک آنس استریل شده، از لوله فاقد کدورت به‌اندازه مرطوب شدن انتهای آنس برداشته و در محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرماگذاری شد.

از سه نمونه باکتریایی سوسپانسیونی بر اساس استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند تهیه و بر روی پلیت‌های حاوی محیط مولر هینتون آگار با استفاده از یک سوآپ استریل، بصورت چمنی کشت داده شد. سپس غلظت ۲ میلی‌گرم از عصاره خالص، نانوذره تجاری و نانوذره سنتزی تهیه شد. دیسک‌های آغشته به هر کدام از غلظت‌های تهیه شده و دیسک آنتی‌بیوتیکی بر روی سطح پلیت قرار داده شدند و هاله عدم رشد بعد از ٤٨ ساعت اندازه‌گیری شد (۲۹). ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی از طریق مهار رادیکال آزاد DPPH توسط نمونه‌های آزمایشی با تغییر در میزان جذب نور مورد بررسی قرار گرفت. جذب محلول به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در محدوده ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری و درصد به دام انداختن رادیکال DPPH اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها

الف) سنتز و طیف سنجی ماوراءبنفش-مرئی نانوذرات: روش

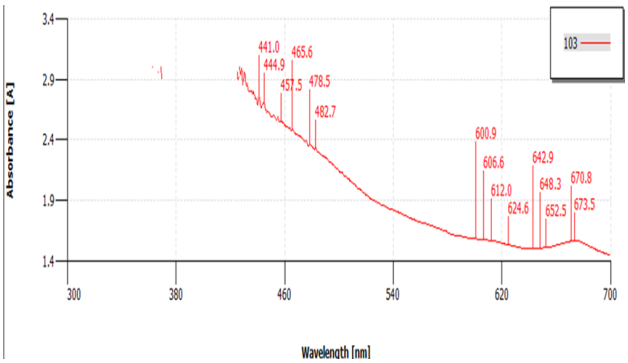
سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از احیای یون‌های نقره به وسیله عصاره *Ephedra intermedia* انجام شد. اولین نشانه تولید نانوذرات نقره تغییر رنگ محلول است. رنگ قهوه‌ای تیره حاصل بعد از ٤ ساعت نشان از تولید نانوذرات نقره در محلول است. نتایج حاصل از طیف‌سنجی ماورای بنفش–مرئی و پیک جذبی حداکثر در منحنی به‌دست آمده از عصاره پس از سنتز نانو ذرات نقرهدر محدوده ٤٠٠ الی ٤٥٠ نانومتر نشان از سنتز نانوذرات نقره داشت (نمودار ۱).

ب) نتایج تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM: اندازه و ریخت‌شناسی نانوذرات نقره زیستی از طریق میکروگراف میکروسکوپ الکترونی SEM، با ولتاژ زیر ۳۰ کیلوولت و با بزرگ‌نمایی‌های مختلف، تحت فشار خلا مورد ارزیابی قرار گرفت. همان‌طور که در شکل روبرو مشخص است، اندازه نانوذرات کروی و بین ۸۹–۳۰ نانومتر متغیر است (شکل ۱).

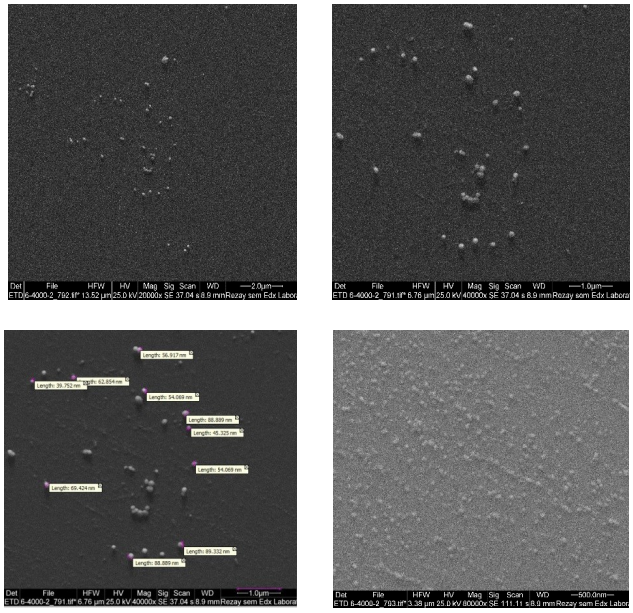
ج) مادون قرمز (FTIR) نتایج FTIR: بر اساس نتایج به‌دست آمده در این روش وجود پیک‌های مختلف نشان دهنده پیوندهای مختلف ترکیبات گیاهی بر روی سطح نانوذرات نقره می‌باشد. باند جذبی در ۰/۳٤٤٤ cm در طیف‌سنجی عصاره خالص شارپ‌تر بوده است و باند جذبی در ناحیه cm 1631مربوط به ترکیبات آلکنی (C=C) است که ممکن است بر اثر واکنش با عصاره گیاهی ایجاد شده باشد (نمودار ۲).

د) نتایج تعیین غلظت نانوذرات نقره بیوسنتز شده، توسط دستگاه جذب اتمی: غلظت نانوذرات نقره بیوسنتزی در ۲/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر نشان از غلظت بالای نانوذرات سنتز شده دارد. نتایج در جدول ۱ آورده شده که شماره ٦ در جدول نمونه و شماره‌های ۱ تا ۵ غلظت‌های استاندارد هستند.

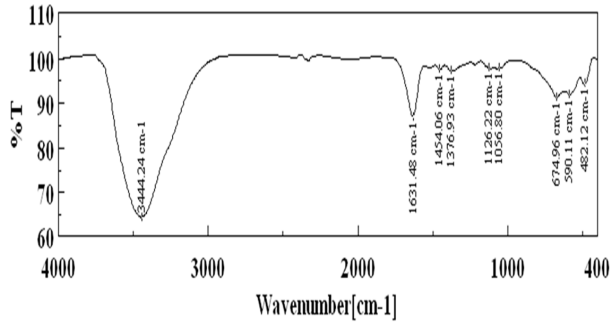
ه) نتایج بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی گونه Ephedra intermedia: ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی از طریق مهار رادیکال آزاد DPPH توسط نمونه‌های آزمایشی با تغییر در میزان جذب نور مورد بررسی قرار گرفت. جذب محلول بوسیله دستگاه اسپکتوفتومتر در محدوده ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری و درصد به دام انداختن رادیکال DPPH اندازه‌گیری شد که حاکی از درصد بالای میزان آنتی اکسیدان در این گونه



نمودار ۱: طیف سنجی VIS -UV برای نانوذرات نیترات نقره سنتزی. واجد یک پیک شاخص ٤٠٠–٤٥٠ نانومتر نشان دهنده سنتز احتمالی نانوذرات نیترات نقره می‌باشد.



شکل ۱: مرفولوژی و سایز نانو ذره نقره بیوسنتز شده، توسط تصاویر میکروسکوپ الکترونی SEM.



نمودار۲: طیف سنجی FTIR نانوذرات نقره سنتز شده. وجود پیک‌های مختلف نشان دهنده پیوندهای مختلف ترکیبات گیاهی بر روی سطح نانوذرات نقره می‌باشد.

گیاهی است. درصد به دام اندازی طبق فرمول زیر محاسبه شد که نتایج به‌دست آمده نشان از خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالای گیاه دارد.

$$\left[\frac{A_B - A_S}{A_B}\right] \times 100$$

AB =جذب شاهد، AS=جذب نمونه یا استاندارد. میزان IC۵۰ غلظتی از جسم است که موجب پاکسازی ۵۰ درصد رادیکال‌ها می‌شودکه شرح نتایج در جدول ۲ آمده است.

جدول ۱: نتایج جذب اتمی.

	Sample Id	Absorbance (mg/l)
۱	blk	۰/۳۳٤٦
۲	۰/۰۲ ppm	۰/۰۱۷٤
۳	۰/۰۱ ppm	۰/۰۵۱۸
٤	۰/۵ ppm	۰/۰۸۵۸
۵	۱ ppm	۰/۱٦٤۷
٦	——	۲/۲۵

جدول ۲: نتایج بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی گونه *Ephedra intermedia*.

نمونه	حجم نمونه (میکرولیتر)	Abs	درصد بازدارندگی	IC50
۱	۱۰۰	۰/۱٦۵	٤۹/۵	۱۵۹/٤۹
۲	۲۰۰	۰/۰۷	٦۲/۷	–
۳	۳۰۰	۰/۰۷٤	٦۲/۱	–
٤	٤۰۰	۰/۷۸	٦۰/۳	–
۵	۵۰۰	۰/۰۱۲۵	۷۰/٦	–
٦	٦۰۰	۰/۱۰۱	۷/۱	–

و) نتایج بررسی خاصیت ضد باکتریایی به روش انتشار دیسک: میزان هاله عدم رشد باکتری‌ها برحسب میلی‌متر به‌روش دیسک‌گذاری تعیین گردید. طبق نتایج به‌دست آمده قطر هاله عدم رشد *اشریشیاکلی* در برابر نانو ذرات نقره ۹ میلی‌متر بوده است و نسبت به انتی بیوتیک *Ciprofloxacin* مقاوم بوده است و در *استافیلوکوکوس اورئوس* هاله عدم رشد نسبت به نانوذرات نقره ۸ میلی‌متر و نسبت به آنتی‌بیوتیک *Ciprofloxacin* ۳۰ میلی‌متر و در *سودوموناس ائروژینوزا* هاله عدم رشد نسبت به نانوذرات نقره ۵ میلی‌متر و نسبت به آنتی‌بیوتیک *Ciprofloxacin* ۳٦ میلی‌متر بوده است، در بین باکتری‌های مورد آزمایش *اشریشیاکلی* حساسیت بیشتری نسبت به نانوذره نقره بیوسنتزی نشان داد.

ز) نتایج تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) میکروب‌ها به روش ماکرو دایلوشن: در بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی رشد نمونه‌های نانوذرات سنتزی برای هر سه باکتری مورد ازمایش *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودو موناس ائروژینوزا* ۲۰۰۰ µg/ml بوده است و نانوذرات نقره تجاری اثر ضد مهارکنندگی رشد نسبت به باکتری‌های مورد آزمایش نداشتند، کمترین غلظتی که در حضور آن کدورتی مشاهده نشده به‌عنوان حداقل غلظت مهار کنندگی MIC در نظر گرفته شده است.

ح) نتایج تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) سلول‌های میکروبی: پس از تعیین میزان MIC ،از لوله‌های فاقد کدورت در محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد و نتایج پس از گذشت ۲٤ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. کمترین غلظتی که باعث مرگ ۹۹/۹ ٪ از باکتری‌های تلقیح شده گردید به‌عنوان حداقل غلظت کشنده در نظر گرفته شد. نتایج نشان دادند که MIC برابر با MBC و ۲۰۰۰ µg/ml بود.

بحث

در پژوهش Reddy و همکاران، سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره *Ephedra intermedia* و خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی نانوذرات سنتز شده مورد بررسی قرار گرفت. تغییر رنگ ایجاد شده از زرد کمرنگ به قهوه‌ای تیره در اثر برهمکنش محلول نمک نقره با عصاره با نتایج حاصل با مطالعات ما مشابه بود (۳۷) و اولین نشانه از تولید نانوذرات نقره محسوب می‌شود و نقره در حالت توده‌ای

دارای پیک جذبی در طول موج ۳۱۶ طول نانومتر است و این در حالی است که پیک تشکیل شده نانو ذره نقره موج ۴۰۰ تا ۴۵۰ نانومتر، نشان دهنده تشکیل نانو ذره نقره و مربوط به رزونانس پلاسمون سطحی ذرات نقره می‌باشد که به القای الکترون آزاد در نانو ذرات نسبت داده می‌شود (۳۷). در این پژوهش، نانوذرات نقره در طول موج ۴۳۰ با نتایج حاصل از پژوهش سایر محققین همخوانی داشت (۲۹). نتایج به‌دست آمده نشان داد که گونه *E. intermedia* دارای خاصیت ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی بالایی است و می‌توان آن را جایگزین برخی از ترکیبات شیمیایی کرد. در سال‌های اخیر به دلیل شیوع عفونت‌های ناشی از باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، تحقیقات بسیاری برای ساخت و تولید ترکیبات ضدمیکروبی جدید انجام شده است. به همین دلیل یکی از زمینه‌های پژوهشی که امروزه بدان بسیار توجه می‌شود، نانوتکنولوژی و نانوبیوتکنولوژی است. سنتز ذرات با ابعاد نانومتری با ویژگی‌های ضد میکروبی که با عنوان نانوآنتی‌بیوتیک شناخته می‌شوند، در توسعه محصولات دارویی جدید بسیار با اهمیت هستند (۵). امروزه کاربرد نانوذرات فلزی در بیوتکنولوژی، تحقیقات زیست دارویی، علوم داروشناسی و مهندسی به‌صورت تصاعدی رو به رشد است. تولید زیستی نانوذرات فلزی باعث فراهم آمدن گستره وسیعی از روش‌های ارزان‌قیمت و نیز بی‌خطر برای محیط زیست شده است (۸). اخیرا در مطالعه‌ای بر روی رده سلول سرطانی کبد، پستان و کلون انجام شد و مشخص شد که نانوذرات زیستی اثرات مهاری بیشتری نسبت به نانوذرات تجاری برروی سلو لهای سرطانی از خود نشان می‌دهند و از طرفی اثرات مهاری نانوذرات زیستی و تجاری در رده‌ی سلولی سرطانی بیشتر از رده‌ی سلولی نرمال بوده است که این پدیده به دلیل اثر مستقیم آن‌ها بر روی سامانه تنفسی سلول در میتوکندری می‌باشد. بنابراین از نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی می‌توان از آن به‌عنوان راهکاری مناسب در درمان سرطان استفاده نمود (۲۸). مزیت عمده استفاده از عصاره گیاهان برای سنتز نانوذرات نقره در این است که به راحتی در دسترس، امن و در اکثر موارد غیرسمی بوده و همچنین به علت دارا بودن عوامل کاهنده متنوع، سریع‌تر از میکروب‌ها در سنتز یون‌های نقره عمل می‌کنند. گیاهان به‌علت سازگاری با محیط می‌توانند به طور گسترده مورد استفاده قرار گیرند، بدون اینکه آسیب‌های زیست محیطی داشته باشند (۳۰). اصلی‌ترین نکته در تمامی مطالعات و مطالعه ما این نکته حائز اهمیت است که روش سنتز سبز برای سنتز نانوذره نقره یک روش راحت و مقرون به صرفه بوده و اختلاف در سایز نانوذره مربوط به نوع گونه گیاهی است به‌طوری که مطالعات نشان می‌دهد گونه‌های مختلف گیاهی باعث سنتز نانوذرات با اندازه‌های مختلف می‌شود. همچنین یکی از اختلافات این مطالعات با مطالعه ما میزان غلظت مهارکنندگی نانوذرات علیه باکتری‌ها می‌باشد که می‌تواند به دلیل نوع میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی مورد مطالعه و باکتری‌های آن باشد (۳۱). نانوذرات نقره رنگ زرد مایل به قهوه‌ای را نشان می‌دهند. ظاهر شدن رنگ قهوه‌ای مایل به زرد در واکنش ظروف حاکی از تشکیل نانوذرات نقره می‌باشد که با مطالعات ما همخوانی دارد. خاصیت ضدمیکروبی *Ephedra sarcocarpa* با استفاده از عصاره متانولی با روش غربالگری در برابر باکتری‌های گرم منفی، مثبت و قارچ بررسی گردید. بیشترین بازدارندگی رشد در عصاره باکتری‌های گرم منفی *Pesudomonas aeroginosa* و حداقل غلظت مهارکنندگی ماده ضدمیکروبی MIC در غلظت ۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره دیده شد که با مطالعات ما همخوانی دارد (۳۲). از طرفی فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی این گونه توسط روستائیان و همکاران با استفاده از روش DPPH مورد مطالعه قرار گرفته و مشخص شد که این گونه دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا و همبستگی مثبت و معنا داری بین ترکیبات فنولیک و خاصیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه وجود دارد که با نتایج ما همخوانی دارد (۳۳). در مطالعه‌ای با استفاده از عصاره برگ Chenopodium murale اقدام به سنتز نانوذرات نقره با اندازه ۳۰ تا ۵۰ نانومتر نمودند. آن‌ها گزارش کردند که نانوذرات تهیه شده به این روش دارای خاصیت ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانتی قوی بود. اندازه میانگین نانوذرات در این بررسی ۳۰ تا ۵۰

نانومتر گزارش شده که با مطالعه ما تا حدودی اختلاف داشت که یکی ازدلایل این اختلاف می‌تواند نوع عصاره استفاده شده باشد. مطالعات نشان می‌دهد ارتباط سایز نانوذره سنتزشده و عصاره گیاهان مختلف می‌تواند اختلاف معنی‌داری داشته باشد و به این ترتیب گیاهانی که میزان فلاونوئید بیشتری دارند میتوانند نانوذرات با اندازه‌های کوچکتر را تولید کنند (۲۱). همچنین در یک پژوهش مشخص شد که عصاره گونه‌های Malva Silvestans و Lowsonia ine mis دارای اثر ضدمیکروبی مناسبی هستند اما اثر آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی ندارند (۳۸).

نتیجه‌گیری

باتوجه به عوارض آنتی‌بیوتیک‌ها و از طرفی تولید و نگهداری خیلی ارزانتر و ساده تر نانوذرات نقره از داروهای رایج، می‌تواند جایگزین مناسبی برای آن‌ها باشد. روش استفاده شده در این پژوهش برای سنتز نانوذرات نقره از عصاره گیاه *افدرا* به‌عنوان یکی از منابع زیست محیطی بی خطر را می‌توان از مزایای این روش نام برد. از آنجا که نانوذرات نقره با غلظت پایین در محیط بدن غیرسمی هستند، گزینه خوبی برای جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌ها به شمار می‌آیند. این مواد در غلظت‌های کمتر نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها از رشد باکتری جلوگیری کرده و عوارض جانبی خیلی کمتری دارند (۳۵). در نتایج آزمون‌های ضدباکتریایی مشخص گردید که *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آیروژینوزا*، از حساسیت برابر برخوردار بوده و نتایج MIC آن‌ها برابر با MBC است. غلظت MIC نانوذرات نقره حاصله از عصاره این گیاه ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر را نشان داد که نانوذرات بیوسنتزی دارای اثرات مهاری بیشتری نسبت به نانوذره تجاری بود (۳۶). نانوذرات نقره به‌دست آمده با استفاده از عصاره این گیاه دارای اثرات مهاری بهتر و بیشتری نسبت به نانوذره نقره تجاری بر روی باکترهای گرم منفی و مثبت هستند.

ملاحظات اخلاقی

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

تقدیر و تشکر

از مسئولین آزمایشگاه‌های زیست‌شناسی دانشگاه آزاد واحد تهران مرکز بخاطر حمایت‌های مادی و معنوی در اجرای این کار پژوهشی تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. Mody VV, Siwale R, Singh A, Mody HR. Introduction to metallic nanoparticles. J Pharm Bioallied Sci. 2010; 2:282-9.
2. Karunakaran S, Ramanujam S, Gurunathan B. Green synthesized iron and iron-based nanoparticle in environmental and biomedical application: - a review. IET Nanobiotechnol 2018; 12:1003-1008.
3. Ghahreman, A. Plant Systematics: Cormophytes of Iran.Tehran University Press.1993; 2: 842p.
4. Hikino H, Konno C, Takata H, Tamada M. Anti-inflammatory principle of Ephedra Herbs. Chem Pharm Bull. 1980; 28: 2900- 2904.
5. El-Batal A, Amin M, Shehata MM, Hallol MM. Synthesis of silver nanoparticles by Bacillus stearothermophilus using gamma radiation and their antimicrobial activity. World Appl Sci J. 2013; 2:1-10
6. Christina Graf, Dirk L. J. Vossen, Arnout Imhof, and Alfons van Blaaderen, A General Method to Coat Colloidal Particles with Silica. 2003;19 6693-6700.
7. Ahmad, A., Mukherjee, P., Senapati, S., Mandal, D., Khan, M. I., Kumar, R., et al. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus Fusarium oxysporum. Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces. 2003; 28:313-318
8. Gudikandula K and Charya Maringanti S. Synthesis of silver nanoparticles by chemical and biological methods and their antimicrobial properties J. Exp. Nanosci. 2016; 11: 714–21.
9. Rahman Gul, Syed Umer Jan, Syed Faridullah, Samiullah Sherani, and Nusrat Jahan. Preliminary Phytochemical Screening, Quantitative Analysis of Alkaloids, and Antioxidant Activity of Crude Plant Extracts fromEphedra intermedia Indigenous to Balochistan. 2017:1- 7
10. Dhand V., Soumya L., Bharadwaj S., Chakra S., Bhatt D., Sreedhar B... a Green synthesis of silver nanoparticles using Coffea arabica seed extract and its antibacterial activity. 2016; 58:36 -43.
11. Vijayaraghavan, K., Yun, Y.S. Bacterial biosorbents and biosorption. Biotechnology Advances. 2008; 26: 266-291.
12. Rezaie H., Hamdi S.M.M., Mirzaie A... a Green synthesis of silver nanoparticles using the extract of Lonicera nummulariifolia and investigating its antioxidant, antimicrobial and anticancer effects against lung cancer cell line A549. J Babol Univ Med Sci. 2019; 21: 207-14.
13. Rajabi R., Hamdi S.M.M., Mirzaie A. .Comparative study of antibacterial, cytotoxic and apoptotic effects of synthesized silver nanoparticles using Asparagus khorasanesis extract and commercial silver. J Neyshabur Univ Med Sci. 2019; 7:89-103.

14. Sarania Devi J., Valentin Bhimba B., Ratnam K. Invitro anticancer activity of silver nanoparticles synthesizes using the extract of Gelidiella Sp. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2012; 4, Suppl 4: 710-715.
15. Froohi F., Mirzaee A., Hamdi S. M. M., NoorBazargan H., Hedayati M., Dollatabadi A., Rezaee H., Bishak F. Antibacterial, antibiofilm, and anti quorum sensing activities of photosynthesized silver nanoparticles fabricated from *Mespilus germanica* extract again multidrug resistance of *Klebsiella pneumonia* clinical strains. Journal of Basic Microbiology. 2020:1-19.
16. Karimi J. and Mohsenzadeh S. Plant synthesis of silver nanoparticles by Achillea wilhelmsii Pharmaceutical plant. Razi Journal of Medical Sciences. 2013; 20(111): 64-69.
17. Alipoor Birgani A, Sartipnia N, Hamdi SMM, Naghizadeh M1, Arasteh J. Antimicrobial Activity of *Scabiosa Olivieri* Extract and Its Effect on TNF-α and IL-1 Expression in Human Peripheral Blood Cells (PBMCs). Journal of Fasa University of Medical Sciences. 2020; 9: 1749-1757.
18. Ravichandran V., Vasanthi S., alien Saleh SA., Tripathy M., Paliwa N. Green synthesis, characterization, antibacterial, antioxidant and photocatalytic activity of Parkia speciosa leaves extract mediated silver nanoparticles. Results in Physics. 2019;15.
19. Oumaima AL-Hilli, Farahnaz Molavi, Maryam Tehranipoor . Synergistic effect of silver oxide nanoparticles and probiotic Lactobacillus plantarum on gene expression of MexX component of pump efflux system in drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. Journal of Microbial World Volume 14, No. 3, December 2021
20. Assadi M... Ephedraceae in Flora of Iran. The research institute of Forests and Rangelands. 2001; 22;29-56
21. Hawthorne S, B. Grabanski C, Martin S, J. Miller D. Comparisons of Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction and subcritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity, and effects on the sample matrix. J Chromatography A. 2000; 892:421–33.
22. Luque de Castro MD, GarcõÂa-Ayuso LE. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. Analytica Chimica Acta. 1998; 369:1-10.
23. Jacob SJ, Finub JS, Narayanan A. Synthesis of silver nanoparticles using Piper longum leaf extracts and its cytotoxic activity against Hep-2 cell line. Colloids and surfaces B, Biointerfaces. 2012; 91:212-14.
24. Shankar SS, Rai A, Ahmad A, Sastry M. Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au Core-Ag shell nanoparticles using Neem (Azadirachta indica) leaf broth. J Colloid Interface Sci. 2004; 275:496-502.

25. Nanda, A. and Saravanan, M. "Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE." Nanomedicine. 2009; 5: 452–456.

26. Pavia, D.L., Lampman, G.M., and Kriz, G.S. Introduction to Spectroscopy: A Guide for students in organic chemistry college publishing. 3rd edition. 2001; 579 pp.

27. Mahmoudi M, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Hafezi S, Nabavi SM, Eslami Sh. Antiinflammatory and antioxidant activities of gum mastic. European Review for Medical and Pharmacological Sciences 2010; 14:765-769.

28. Li, W.R., Xie, X.B., Shi, Q.S., Duan, S.S., Ou-Yang, Y.S., and Chen, Y.B. Antibacterial effect of silver nanoparticles on Staphylococcus aureus. Biometals. 2011; 24:135-141.

29. Tran QH, Le AT. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications, and perspectives. Adv Nat Sci: Nanosci Nanotechnol. 2013;4(3).

30. Ahmad N, Sharma S, Alam MK, et al. Rapid synthesis of silver nanoparticles using the dried medicinal plant of basil. Colloids Surf B Biointerfaces. 2010; 81:81-6.

31. Wong K. Y., 'Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine", 2012; 86: 935–940.

32. Savithramma N., Linga Rao M., Rukmini K. and Suvarnalatha devi P. 2011. Antimicrobial activity of Silver Nanoparticles synthesized by using Medicinal Plants. International Journal of ChemTech Research. 2011; 3:1394-1402.

33. Rustaiyan, A., Javidnia, K., Farjam., Aboee-Mehrizi, F., And Ezzatzadeh, E. Antimicrobial and Antioxidant Activity of the Ephedra Sarcocarpa Growing in Iran. Journal of Medicinal Plants Research. 2011; 5: 4251-4255.

34. Zahra Hojjati Bonab, Elhameh Nik khah . Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Methanolic Extract from Malva silvestans and Lowsonia inermis on intestinal bactria . Journal of Microbial World Volume 3, No. 3, Sep. 2010

35. Afifeh M. Antibacterial activity of silver, gold, and platin nanoparticles. The 3rd National Conference of Agricultural Biotechnology of Iran.

36. A.F. Abd E, Tahany M. Green synthesis of silver nanoparticle using Eucalyptus globulus leaf extract and its antibacterial activity. Journal of Applied Sciences Research. 2013; 9: 6437-40.

37. Reddy NJ, Nagoor Vagoor Vali D, Ranimand Rani Ss. Evaluation of antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects of green synthesized silver nanoparticles by piper longum fruit mater. Sci Eng C Mater Biol. 2014; 1:115-122.