بررسی فیتوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی، محتوای فنلی و بیوسنتز نانو ذرات نقره و طلا از عصاره‌های مختلف اندام‌های گیاه *Conocarpus erectus* L.

فاطمه گرجیان[۱]، رویا میرزاجانی[۱]، مریم کلاهی[۳*]

[۱]کارشناس‌ارشد، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[۲]دانشیار، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[۳]استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۶/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۵/۲۳

چکیده

آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی ترکیباتی هستند که محافظت بدن را در مقابل تخریب ناشی از استرس‌های اکسیداتیو به عهده‌دارند. هدف مطالعه حاضر، بررسی فیتوشیمیایی ترکیبات موجود در برگ و گل گیاه کنوکارپوس (*Conocarpus erectus* L.) و تعیین و مقایسه محتوای فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف آن می‌باشد. به‌این منظور در بهار ۱۳۹٤، نمونه‌های برگ و گل این گیاه از فضای سبز دانشگاه شهید چمران اهواز جمع‌آوری‌شده و پس از خشک‌کردن، به دو روش سوکسله و خیساندن، عصاره‌گیری شدند. به‌منظور شناسایی ترکیبات شیمیایی، از آزمون‌های فیتوشیمیایی و دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف نگار جرمی استفاده شد. در این بررسی، نوزده ترکیب شیمیایی با بالاترین درصد فراوانی در عصاره متانولی برگ با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی شناسایی شد که در میان اجزای شناسایی‌شده، برخی ترکیبات ازجمله استروئیدها در هردو عصاره استخراج شده به روش سوکسله و خیساندن یافت شد. در این مطالعه محتوای فنلی با استفاده از روش فولین–سیوکالتو مورد بررسی قرار گرفت عصاره گل استخراج شده به روش سوکسله بالاترین میزان ترکیبات فنلی را به خود اختصاص داد. به‌منظور بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی در عصاره برگ و گل نیز از روش DPPH استفاده شد. در میان عصاره‌های استخراج شده از گیاه کنوکارپوس، عصاره گل به‌دست‌آمده به روش سوکسله، دارای کمترین IC_{50} و درنتیجه بالاترین قدرت آنتی‌اکسیدانی بود .در ادامه با استفاده از این عصاره‌ها نانوذرات طلا و نقره سنتز شد و برای تعیین اندازه تقریبی آن‌ها از آنالیز اندازه ذره[1] استفاده گردید. این عصاره‌ها توانستند نانوذرات طلا با قطری در حدود ۷۰ نانومتر تولید کنند. در سنتز نانوذرات نقره، عصاره گل کنوکارپوس با سنتز ذراتی با قطر تقریبی ۷/۸ نانومتر موفق‌تر عمل کرد. وجود ترکیبات شیمیایی مختلف، محتوای فنلی بالا و فعالیت آنتی‌اکسیدانی مناسب در عصاره کنوکارپوس بیانگر پتانسیل عصاره این گیاه برای استفاده به‌عنوان یک منبع طبیعی آنتی‌اکسیدانی، در جهت ساخت نانوذرات و داروها می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، بیوسنتز نانو ذرات نقره، کنوکارپوس، محتوای فنلی.

*نویسنده مسئول: m.kolahi@scu.ac.ir

1.Nano Particle Size Analayzer

مقدمه

نتایج حاصل از مطالعات مختلف بیانگر نقش مؤثر رادیکال‌های آزاد در ایجاد بیش از صد نوع بیماری بوده که ازجمله‌ی آن‌ها می‌توان به انواع سرطان‌ها، آرتریت روماتوئید، التهاب، آلزایمر و همچنین فرایندهای پیری اشاره نمود (Brewer, 2011). گیاهان از گذشته‌های دور منبعی برای یافتن دارو و درمان بیماری‌ها بوده‌اند که با تولید داروهای صنعتی برای مدت‌ها به ورطه فراموشی سپرده‌شدند ولی امروزه به دلیل عوارض جانبی و هزینه‌ی بالا داروهای صنعتی، مجدداً نظر جستجوگرانه پژوهشگران متوجه این منبع سرشار و باارزش شده است (Bibak et al., 2012). آن‌ها با دارا بودن بسیاری ترکیبات از جمله ترکیبات فنلی دارای پتانسیل آنتی‌اکسیدانی هستند. اطلاعات دقیق علمی و شناخت ترکیب‌های شیمیایی یا درواقع متابولیت‌های ثانویه موجود در آن‌ها بسیار حائز اهمیت می‌باشد (Petrovska, 2012). آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که باعث مهار یا به تأخیر اندازی آسیب به یک مولکول هدف می‌گردند. این ترکیبات به دودسته‌ی عمده سنتزی و طبیعی تقسیم می‌شوند. امروزه در صنعت از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی برای به تأخیر انداختن اکسیداسیون چربی‌ها استفاده می‌شود، اما به دلیل اثرات بد تغذیه‌ای و سرطان‌زا بودن این ترکیبات و نیز تمایل مصرف کنندگان به استفاده از ترکیبات طبیعی، کاربرد آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی موردتوجه محققین قرارگرفته است. در همین زمینه تلاش‌های زیادی برای یافتن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از منابع گیاهی صورت گرفته است (Brewer, 2011).

از سوی دیگر در سال‌های اخیر استفاده از نانوذرات فلزی به‌ویژه نانوذرات طلا و نقره به‌عنوان عامل دارویی برای کاربردهای درمانی به‌طور چشمگیری افزایش پیداکرده است. امروزه از این نانوذرات در درمان بیماری‌های مختلف ازجمله سرطان، دیابت، پارکینسون، آلزایمر، ایدز، هپاتیت، بیماری‌های قلبی و عروقی، سل و .... استفاده می‌گردد. ازاین‌رو سنتز نانو ذرات طلا و نقره به‌عنوان یک روش کارآمد، باصرفه و دوستدار محیط‌زیست بسیار، مورد توجه محققان حوزه نانوپزشکی قرارگرفته است (Kuppusamy et al., 2016). در میان روش‌های موجود برای سنتز نانوذرات، روش‌های سبز دارای مزایای متعددی نسبت به روش‌های مرسوم هستند که از این بین می‌توان به سنتز آسان، تمیز و کارآمد، سازگاری با محیط‌زیست، صرفه‌جویی اقتصادی، سنتز در دما و فشار محیط بدون نیاز به لیگاند خارجی و یا واکنش‌گر پوشاننده و یا پایدارکننده (Capping or Stabilizing agent) اشاره کرد (Ahmed et al., 2016).

به همین دلیل در این روش سنتزی می‌توان از منابع زیستی مانند گیاهان، قارچ‌ها، جلبک‌ها، میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان عامل کاهنده، پوشاننده و پایدارکننده استفاده نمود (Nadaf et al., 2016).

آلودگی هوا یک مشکل جدی در نواحی مسکونی و صنعتی در دنیا است. شهر اهواز به‌عنوان مرکز استان خوزستان و دومین شهر بزرگ ایران از لحاظ وسعت پس از تهران و پنجمین شهر پرجمعیت ایران می‌باشد. این شهر به دلیل منابع غنی نفت و گاز، صنایع پتروشیمی، صنایع بزرگ فلزی و غیرفلزی، برق و شرایط آب‌وهوای گرم و مرطوب و همچنین بروز پدیده‌ی گرد و غبار در اکثر روزهای سال دارای آلودگی هوا می‌باشد (Rafiei et al., 2009). در سال‌های اخیر به‌منظور کنترل این آلودگی‌ها و همچنین زیباسازی فضای شهری، اقدام به کاشت گسترده‌ی گیاه کنوکارپوس در تمامی مناطق اهواز و سایر نقاط استان خوزستان شده است.

Conocarpus erectus L. از خانواده‌ی Combretaceae، یک درختچه زینتی رایج در مناطق

نیمه گرمسیری و گرمسیری بارنگ پوسته معمولاً قهوه‌ای تیره و ترک بردارنده و کم انشعاب با ٤-۱/۵ متر ارتفاع و یا یک درخت همیشه سبز با ارتفاع بین ۲۰-۱۲ متر و گاهی حتی بیشتر می‌باشد (Bandeira, 2003). این گیاه بومی سواحل مرکزی و جنوبی فلوریدا، باهاما، بخش وسیعی از نواحی غربی هندوستان، مکزیک، اکوادور، جزایر گالاپاگوس، برزیل و مناطق گرمسیری غرب آفریقا می‌باشد (Bashir et al, 2015). معدود پژوهش‌های انجام شده بر روی این گیاه، به‌ویژه در کشورهای حوزه خلیج‌فارس بیانگر ویژگی‌های ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطان، اثرات حفاظتی و قابض بود (Abdel-Hameed et al., Bashir et al., 2015; Bandeira, 2003; 2013). همچنین در پژوهشی دیگر این گیاه به‌عنوان یکی از گونه‌های پوشش‌های حرا و رایج در طب عامیانه، در درمان کم‌خونی، زکام، ورم ملتحمه، دیابت، اسهال، تب، سوزاک، سردرد، خونریزی، ورم بیضه، بثورات جلدی شناخته‌شده است (Nascimento et al., 2016). در تحقیق دیگری نیز، ویژگی‌های دارویی ازجمله فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی و اثرات حفاظتی برای گیاه گزارش گردید (Lopez et al., 2000).

از جمله دلایل کاشت گسترده این گیاه می‌توان به همیشه سبز بودن آن و نیاز اندک به رسیدگی اشاره کرد. ازآنجاکه این گیاه بومی ایران نبوده و تنها در مناطق جنوبی کشور و به‌عنوان یک گیاه زینتی مورد استفاده قرارگرفته است، تاکنون مطالعات اندکی بر روی آن انجام شده است. با توجه به اینکه گستردگی کاشت این گیاه، بدون مطالعات جدی علمی، امری غیر کارشناسی تلقی می‌گردد، محققان بومی در سال‌های اخیر اقدام به مطالعه و پژوهش پیرامون این گیاه غیربومی نموده‌اند. هدف از انجام این مطالعه نیز بررسی فیتوشیمیایی ترکیبات موجود در این گیاه و شناسایی آن‌ها با استفاده از دستگاه کروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) و همچنین تعیین محتوای فنلی این گیاه بود. در ادامه نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های حاصل از برگ و گل گیاه با استفاده از روش DPPH سنجیده شد و در پایان تأثیر این عصاره‌ها در سنتز نانوذرات طلا و نقره آزموده شد.

روش‌کار: نمونه‌های برگ و گل موردمطالعه از گیاه *Conocarpus erectus* L. در بهار ۱۳۹٤، از فضای سبز دانشگاه شهید چمران اهواز در چند نوبت جمع‌آوری و پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، نمونه‌های سالم جداسازی شده و دو بار به‌وسیله‌ی آب مقطر شستشو داده شد. برگ‌های این گیاه به‌دور از تابش مستقیم خورشید و در سایه خشک گردید و توسط دستگاه آسیاب خانگی برقی به پودر تبدیل شد.

آزمون‌های فیتوشیمیایی: به‌منظور شناسایی کیفی متابولیت‌های ثانویه موجود در برگ و گل گیاه *Conocarpus erectus* L. آزمون‌های مختلفی بر مبنای روش‌های استاندارد، بر روی نمونه‌های پودر شده صورت گرفت. در این آزمون‌ها حضور پنج دسته مهم از متابولیت‌های ثانویه شامل فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، تانن‌ها، ساپونین‌ها و استروئیدها مورد بررسی قرار گرفت.

از جمله آزمایش‌های صورت گرفته می‌توان به آزمون پیو (Yusuf et al., 2014) و سدیم هیدروکسید (Zohra et al.,2012) برای فلاونوئیدها، استفاده از معرف مایر و واگنر (Khan et al., 2011; Zohra et al., 2012 ; Ugochukwu et al., 2013) برای آلکالوئیدها، واکنش محلول استات سرب (Zohra et al., 2012) و محلول آهن (III) کلرید (Yusuf et al., 2014) برای تانن‌ها، آزمون سولفوریک اسید (Yusuf et al., 2014) برای استروئیدها و آزمون تشکیل کف (Khan et al.,

2011; Yusuf et al., 2014) برای تائید حضور ساپونین‌ها اشاره کرد.

عصاره‌گیری از برگ و گل کنوکارپوس: به‌منظور عصاره‌گیری از برگ و گل کنوکارپوس از دو روش سوکسله و خیساندن استفاده گردید. در هردو روش پس از پایان عصاره‌گیری، حلال تحت خلأ و توسط دستگاه روتاری تبخیر گردید. عصاره‌های حاصل تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد. بازده عصاره‌گیری برای برگ و گل کنوکارپوس با استفاده از رابطه‌ی ۱ محاسبه گردید.

$$\text{بازده عصاره گیری} = \frac{\text{وزن خشک عصاره}}{\text{وزن خشک گیاه}} \times 100$$

رابطه ۱: محاسبه درصد بازده عصاره‌گیری

شناسایی ترکیبات استخراج شده در برگ گیاه کنوکارپوس

مشخصات دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنجی جرمی: برای شناسایی ترکیبات از دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) متصل به دتکتور طیف‌سنج جرمی (GC/MS) استفاده شد. دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل Agilent A7890 و دتکتور جرمی نوع Agilent-۵۹۷۵ بودند. ستون استفاده‌شده از نوع HP-MS5 و دارای ۳۰ متر طول و ۰/۲۵ میلی‌متر قطر داخلی بود. گاز هلیوم با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه به‌عنوان گاز حامل به‌کاربرده شد. یک میکرولیتر از عصاره‌ی متانولی برگ گیاه کنوکارپوس به همراه یک میلی‌لیتر متانول به دستگاه تزریق‌شده و برنامه‌ی دمایی به این‌گونه تنظیم شد. برای مدت ۱۰ دقیقه دمای آون در ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داشته شده و پس از آن با سرعت ۵ درجه بر دقیقه بر آن افزوده شد تا به دمای ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد رسید. دمای محفظه تزریق ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد.

شناسایی ترکیب‌های تشکیل‌دهنده: شناسایی طیف‌ها با استفاده از کتابخانه‌های مربوط به اطلاعات جرمی و پیشنهادهای کتابخانه‌ی رایانه‌ی خود دستگاه صورت پذیرفت. بدین ترتیب که ترکیبات با بالاترین درصد فراوانی و احتمال به‌عنوان اجزای موجود در عصاره گزارش گردید.

اندازه‌گیری محتوای کل ترکیبات فنلی: به‌منظور تعیین محتوای فنلی عصاره‌های مختلف کنوکارپوس از روش استاندارد فولین-سیوکالتو استفاده شد. برای رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف گالیک‌اسید[3] استفاده شد. به این منظور میزان کل ترکیبات فنلی موجود در عصاره برحسب معادل گالیک‌اسید و با استفاده از معادله به‌دست‌آمده از منحنی استاندارد محاسبه شد (Marinova et al., 2005). برای رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف گالیک‌اسید استفاده شد. به این منظور ابتدا به ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف آن مقدار ۲/۵ میلی‌لیتر محلول رقیق‌شده‌ی فولین-سیوکالتو اضافه شد. پس از ۵ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر محلول ۷/۵ درصد وزنی - حجمی سدیم کربنات به آن افزوده شد. سپس محلول حاصل به مدت ۹۰ دقیقه در دستگاه انکوباتور شیکردار و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌صورت ملایم هم زده شد. پس از آن جذب محلول مورد نظر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (فرابنفش-مرئی، PERKIN ELMER ساخت کشور آلمان) در طول موج ۷۶۵ نانومتر و در سه تکرار خوانده شد.

اندازه‌گیری خاصیت آنتی‌اکسیدانی: به‌منظور اندازه‌گیری خاصیت آنتی‌اکسیدانی هر عصاره از روش DPPH استفاده شد (Sharma et al., 2009). معمولاً جهت مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره‌ها از فاکتور IC50 استفاده می‌شود (غلظتی از عصاره که در

1. Gallic acid

آن ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد DPPH موجود در محیط واکنش مهار می‌شوند) و هرچه این مقدار کمتر باشد، نشان‌دهنده این است که عصاره موردنظر فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری دارد. برای محاسبه این پارامتر از رابطه ۲ استفاده می‌شود:

رابطه ۲: محاسبه میزان باقیمانده از رادیکال آزاد DPPH

$$activity\% = (1 - \frac{A_{Control} - A_{Sample}}{A_{Control}}) \times 100$$

سنتز نانو ذرات طلا و نقره با استفاده از عصاره متانولی برگ و گل کنوکارپوس: به‌منظور سنتز نانوذرات طلا از روش اسمیت و همکارانش استفاده شد (Mojab et al., 2003). در این روش حجم مشخصی از عصاره‌های مختلف برگ و گل کنوکارپوس به محلول به جوش آمده‌ی طلا افزوده شد و محلول حاصل به‌مدت ۵ دقیقه حرارت داده شد و سپس به‌مدت ۵ دقیقه بدون حرارت هم زده شد. تغییر رنگ محلول به بنفش نشان‌دهنده‌ی صحت سنتز نانو ذرات طلا می‌باشد. پس ازآن جذب محلول در طول‌موج ۵۲۵ نانومتر و با استفاده از اسپکتروفتومتر (فرابنفش-مرئی، PERKIN ELMER ساخت کشور آمریکا) خوانده شد (Smith et al., 2013). از سوی دیگر به‌منظور سنتز نانو ذرات نقره روش گجر و همکارانش (Gajjar et al., 2009) استفاده شد. در این روش مقادیر مورد نظر از عصاره‌های مختلف کنوکارپوس، به محلول نمک نقره افزوده شد و هم زدن محلول به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد ادامه یافت. تغییر رنگ محلول به زرد یا قرمز آجری می‌تواند بیانگر سنتز نانوذرات نقره باشد. سپس جذب محلول حاصل در طول‌موج ٤٢٠ نانومتر و با استفاده از اسپکتروفتومتر (فرابنفش- مرئی، PERKIN ELMER ساخت کشور آمریکا) قرائت شد. درنهایت برای تعیین اندازه‌ی تقریبی نانوذرات سنتزی، محلول‌های تهیه‌شده به‌وسیله Nano Particle Size Analayzer مورد سنجش قرار گرفت.

نتایج

نتایج سنجش‌های فیتوشیمیایی: عصاره‌ی متانولی برگ و گل گیاه کنوکارپوس با انجام آزمون‌های فیتوشیمیایی مختلف مورد سنجش قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی حضور متابولیت‌های ثانویه شامل فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، استروئیدها، ساپونین‌ها و تانن‌ها را در برگ و گل گیاه کنوکارپوس به اثبات رساندند (جدول ۱).

جدول ۱: نتایج حاصل از آزمون‌های فیتوشیمیایی انجام شده بر روی برگ و گل گیاه *Conocarpus erectus* L.

متابولیت ثانویه	آزمون فیتوشیمیایی	نتیجه	
		برگ	گل
فلاونوئید	آزمون Pew	+	+
	آزمون سدیم هیدروکسید	+	+
آلکالوئید	معرف مایر	+	+
	معرف واگنر	+	+
تانن	محلول استات سرب	+	+
	محلول آهن (III) کلرید	+	+
استروئید	استفاده از سولفوریک اسید	+	+
ساپونین	آزمون کف کنندگی	+	+

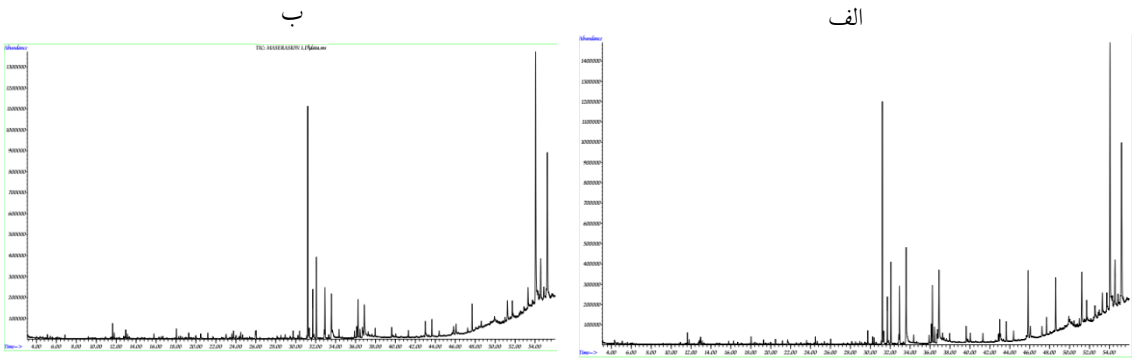
بازده عصاره‌گیری از برگ و گل کنوکارپوس: به‌منظور استخراج متابولیت‌های ثانویه‌ی موجود در برگ و گل کنوکارپوس از دو روش استخراج سوکسله و خیساندن استفاده شد و در پایان بازده هر روش محاسبه گردید (جدول ۲).

جدول ۲: بازده وزنی- وزنی عصاره‌گیری از برگ و گل *Conocarpus erectus* L. به دو روش سوکسله و خیساندن

انواع عصاره متانولی کنوکارپوس	وزن خشک عصاره (گرم)	بازده ٪
برگ – سوکسله	۲/۲٦۰	۱۸/۸۳۲
برگ – خیساندن	۱/۸۷۷	۱۸/۷۷۰
گل – سوکسله	۱/۲٤۲	۱۰/۳۵۰
گل – خیساندن	۱/۰۸٦	۱۰/۸٦۷

بررسی نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که روش‌های استخراجی سوکسله و خیساندن برای هر دو قسمت برگ و گل کنوکاپوس تقریباً مشابه عمل کرده و درصد بازده نزدیکی را نشان داده‌اند.

نتایج شناسایی ترکیبات استخراج شده از برگ کنوکاپوس به روش GC/MS: به‌منظور شناسایی ترکیبات موجود در برگ گیاه کنوکارپوس، عصاره‌ی استخراج شده با دو روش سوکسله و خیساندن به دستگاه GC/MS تزریق گردید. با استفاده از کتابخانه‌ی موجود در دستگاه، پیشنهادهایی برای ترکیبات موجود ارائه شد و ترکیبات با بالاترین درصد احتمال به‌عنوان مهم‌ترین ترکیبات شیمیایی موجود در این عصاره‌ها پیشنهاد گردید. جدول ۳ و ٤ به‌ترتیب دربردارنده‌ی ترکیبات احتمالی موجود در عصاره‌ی برگ کنوکارپوس استخراج شده به دو روش سوکسله و خیساندن می‌باشد. شکل ۱ نیز در بخش الف و ب به ترتیب کروماتوگرام GC/MS عصاره استخراج شده به روش سوکسله و خیساندن می‌باشد.



شکل ۱: کروماتوگرام حاصل از عصاره‌ی متانولی برگ کنوکارپوس استخراج شده: الف- به روش سوکسله، ب- به روش خیساندن

جدول ۳: ترکیبات موجود در عصاره متانولی برگ گیاه *Conocarpus erectus* L. با بالاترین درصد احتمال حضور، استخراج شده به روش سوکسله.

ردیف	نام ترکیب	فرمول شیمیایی	وزن مولکولی $g.mole^{-1}$	زمان بازداری min	درصد احتمال حضور در عصاره
۱	trans-phytol	$C_{20}H_{40}O$	۲۹٦/٥٤	۳۱/۲۰۹	۹۳
۲	Neophytadiene	$C_{20}H_{38}$	۲۷۸/٥۲٤	۳۱/۷۱۲	۹۳
۳	Methyl hexadecanoate	$C_{17}H_{34}O_2$	۲۷۰/٤٥۰	۳۲/۹۳۷	۹۹
٤	n-Hexadecanoic acid	$C_{16}H_{32}O_2$	۲٥٦/٤۳	۳۳/٥۹۳	۹۸
٥	Methyl Linolenate	$C_{19}H_{32}O_2$	۲۹۲/٤٥٦	۳٦/۲۳۹	۹٦
٦	9,12,15-Octadecatrien-1-ol	$C_{18}H_{32}O$	۲٦٤/٤٤٦	۳٦/۸۸۷	۹٤
۷	2-Palmitoylglycerol	$C_{19}H_{38}O_4$	۳۳۰/٥۰۲	٤۲/۹۹۲	۸۱
۸	Heptacosane	$C_{27}H_{56}$	۳۸۰/۷٤٥	٤٥/۸۳۷	۹۸
۹	Nonacosane	$C_{29}H_{60}$	٤۰۸/۸۰	٤۸/٦۰۲	۹٥
۱۰	Cyclooctacosane	$C_{28}H_{56}$	۳۹۲/۷٤٤	٥۱/۲۳٦	۹۹
۱۱	Vitamin E	$C_{29}H_{50}O_{32}$	۹۱۰	٥۱/۷۱۸	۹٦
۱۲	HexadecamethylOctasiloxane	$C_{16}H_{48}O_7Si_8$	٥۷۷/۲۳۳	٥۳/۲۹٦	۷۲
۱۳	gamma.-Sitosterol	$C_{29}H_{50}O$	٤۱٤/۷۰٦	٥٤/۰٦	۹۹
۱٤	alpha.-Amyrin	$C_{30}H_{50}O$	٤۲٦/۷۳	٥٥/۲۲۸	۹٥

با توجه به ساختارهای شیمیایی مشاهده شده به نظر می‌رسد بخش عمده‌ای از ترکیبات برگ کنوکارپوس از خانواده ترکیبات فنلی، استروئیدها و ترپن‌ها باشند. از جمله مهم‌ترین ترکیبات مشاهده شده در ساختار برگ کنوکارپوس می‌توان به ویتامین E و اسکوالن اشاره نمود. در بین اجزای شناسایی‌شده در عصاره سوکسله ترکیب گاما- سیتوسترول و آلفا- آمیرین به‌ترتیب با ۱۵/۳۸۳ و ۱۰/۹۵۱ درصد به‌ترتیب بیش‌ترین مقدار از کل ترکیبات عصاره را به خود اختصاص داده‌اند. این ترکیبات به‌ترتیب دارای ۹۹ و ۹۵ درصد احتمال حضور می‌باشند. همانند عصاره استخراج شده به روش سوکسله، ترکیبات خانواده فنل، استروئید و ترپن از مهم‌ترین ترکیباتی هستند که در عصاره استخراج شده به روش خیساندن حضور دارند.

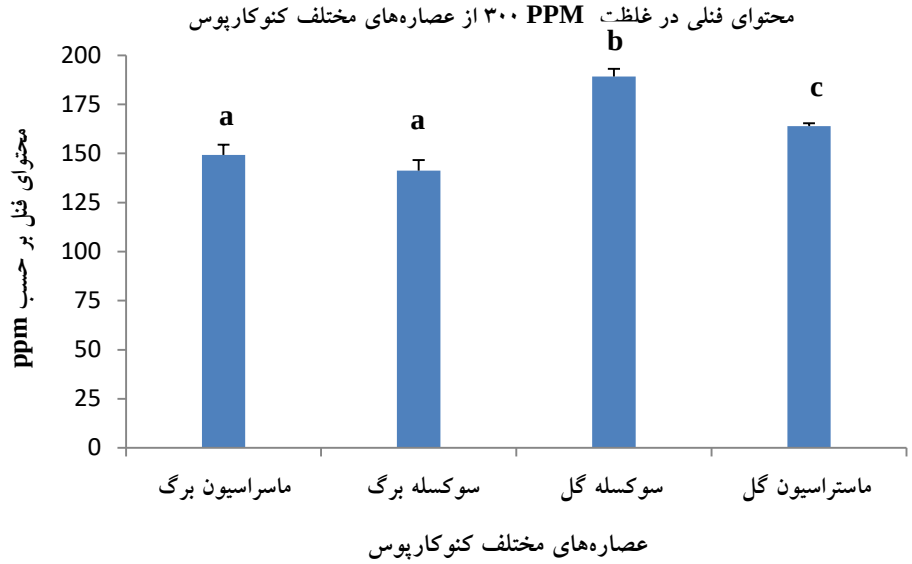
بسیاری از ترکیبات دو عصاره‌ی سوکسله و خیساندن مشابه یکدیگر هستند. در میان اجزا شناسایی‌شده عصاره استخراج شده به روش خیساندن، ترکیب استروئیدی (23S)-Ethylcholest-5-en-3-β-ol و همچنین آلفا- آمیرین با ۱۸/٦۸۹ و ۱۲/۰۲ درصد بیش‌ترین مقدار از کل ترکیبات عصاره را به خود اختصاص داده‌اند. این ترکیبات به‌ترتیب دارای ۹۹ و ۹۳ درصد احتمال حضور می‌باشند.

جدول ٤: ترکیبات موجود در عصاره متانولی برگ گیاه *Conocarpus erectus* L. با بالاترین درصد احتمال حضور، استخراج شده به روش خیساندن.

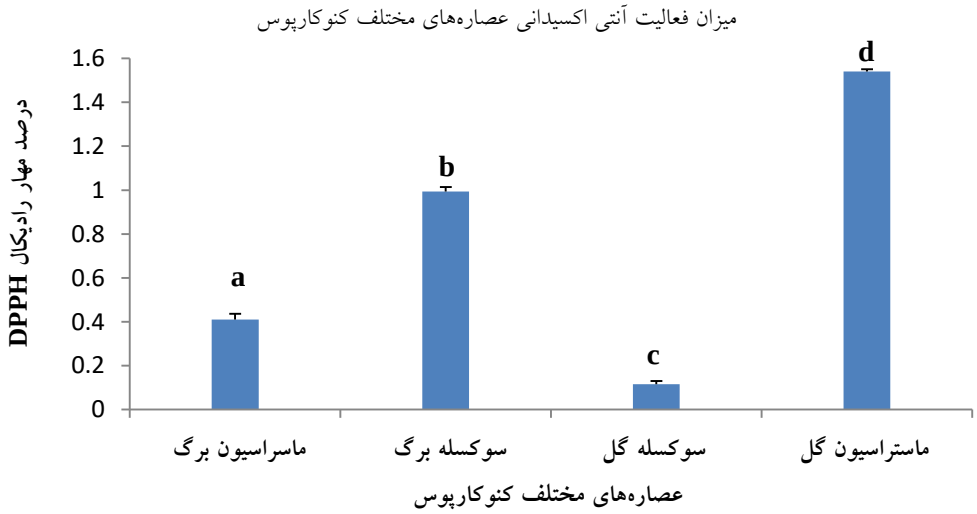
ردیف	نام ترکیب	فرمول شیمیایی	وزن مولکولی ($g.mole^{-1}$)	زمان بازداری	درصد احتمال حضور در عصاره
١	3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecene	$C_{20}H_{40}$	٢٨٠/٥٣١	٣١/٢١١	٩٣
٢	Neophytadiene	$C_{20}H_{38}$	٢٧٨/٥٢٤	٣١/٧١٤	٩٣
٣	trans-phytol	$C_{20}H_{40}O_2$	٢٩٦/٥٣٩	٣٢/٠٧٢	٧٢
٤	Methyl hexadecanoate	$C_{17}H_{34}O_2$	٢٧٠/٤٥٠	٣٢/٩٣٨	٩٩
٥	n-Hexadecanoic acid	$C_{16}H_{32}O_2$	٢٥٦/٤٣	٣٣/٥٨٥	٩٩
٦	Methyl Linolenate	$C_{19}H_{32}O_2$	٢٩٢/٤٥٦	٣٦/٢٤١	٩٨
٧	9,12,15-Octadecatrien-1-ol	$C_{18}H_{32}O$	٢٦٤/٤٤٦	٣٦/٨٨٧	٩٩
٨	Squalene	$C_{30}H_{50}$	٤١٠/٧٣	٤٧/٦٩٣	٩٥
٩	n-Tetracosanol-1	$C_{24}H_{50}O$	٣٥٤/٦٥	٥١/٢٣٧	٩١
١٠	(23S)-Ethylcholest-5-en-3-β-ol	$C_{29}H_{50}O$	٣٨٦/٦٦٤	٥٤/٠٦٢	٩٩
١١	1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13-tetradecamethyl eptasiloxane,	$C_{14}H_{44}O_6Si_7$	٥٠٥/٠٩٤	٥٤/٨٧٩	٦٢
١٢	alpha-Amyrin	$C_{30}H_{50}O$	٤٢٦/٧٣	٥٥/٢٢٧	٩٢

نتایج اندازه‌گیری محتوای کل فنلی عصاره‌ی برگ و گل کنوکارپوس: یافته‌های حاصل از بررسی محتوای کل فنلی با استفاده از روش استاندارد گالیک‌اسید نشان داد که بیشترین مقدار ترکیبات فنلی به‌دست‌آمده مربوط به عصاره گل گیاه کنوکارپوس بود. در بررسی محتوای فنلی عصاره به‌دست‌آمده از گل این گیاه مشخص شد که عصاره حاصل از روش سوکسله با اختلاف معنی‌داری نسبت به روش خیساندن دارای محتوای فنلی بیشتری بود. این در حالی است که محتوای فنلی به‌دست‌آمده از عصاره برگ گیاه کنوکارپوس با استفاده از دو روش سوکسله و خیساندن از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری نداشتند (p<٠/٠٥) (شکل ٢).

نتایج بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی برگ و گل کنوکارپوس به روش DPPH: بررسی IC_{50} به‌دست‌آمده از عصاره‌ها نشان داد که عصاره استخراج شده از گل کنوکارپوس به روش سوکسله با اختلاف معنی‌داری نسبت به عصاره‌های دیگر داری کمترین IC_{50} می‌باشد. همچنین عصاره گل به‌دست‌آمده به روش خیساندن با اختلاف معنی‌داری نسبت به عصاره‌های دیگر بیشترین IC_{50} را دارا بود (p<٠/٠٥) (شکل ٣).



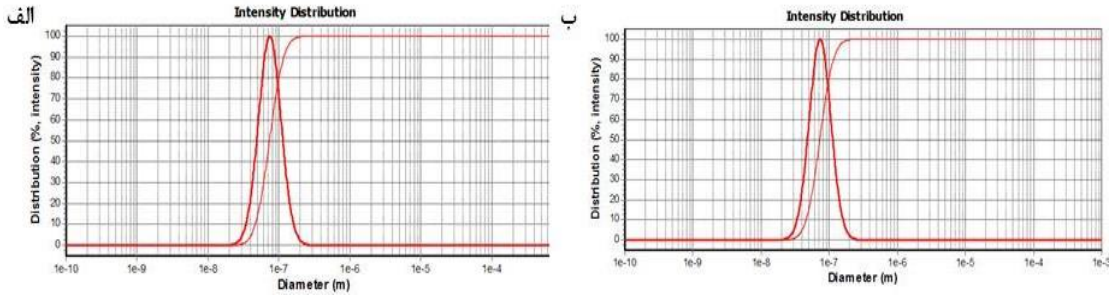
شکل ۲: محتوای کل فنلی در عصاره متانولی برگ و گل کنوکارپوس



شکل ۳: مقادیر IC_{50} عصاره‌های متانولی برگ و گل کنوکارپوس

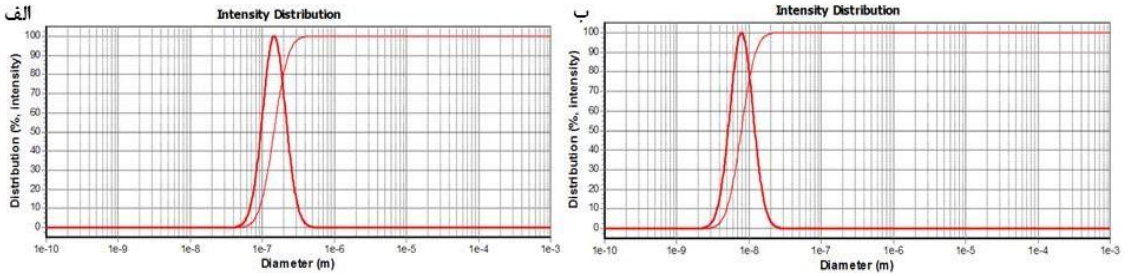
مقایسه مقدار IC_{50} به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که گیاه کنوکارپوس دارای پتانسیل آنتی‌اکسیدانی قابل ملاحظه‌ای می‌باشد و قادر است در غلظت‌های بسیار پایین رادیکال‌های آزاد DPPH را مهار کند.

نتایج بررسی سنتز نانوذرات طلا با استفاده از عصاره‌ی برگ و گل کنوکارپوس: پس از تأیید سنتز نانوذرات طلا و خواندن مقادیر جذب، به‌منظور تعیین اندازه‌ی تقریبی نانوذرات سنتزی، محلول‌های تهیه شده به‌وسیله Nano Particle Size Analayzer مورد سنجش قرار گرفت. این بررسی‌ها نشان داد که نانوذرات طلای سنتز شده با استفاده از عصاره برگ و گل کنوکارپوس با احتمال ۵۰٪ به‌ترتیب دارای قطری معادل ۷٤/٤ و ۷۲/۹ نانومتر بودند (شکل ٤).



شکل ٤. آنالیز سایز ذره نانوذرات طلا سنتز شده با استفاده از عصاره متانولی: الف- برگ، ب- گل کنوکارپوس.

نتایج حاصل از بررسی سنتز نانو ذرات نقره با استفاده از عصاره برگ و گل کنوکارپوس: به‌منظور تعیین اندازه تقریبی نانوذرات سنتزی، محلول‌های تهیه‌شده به‌وسیله‌ی Nano Particle Size Analayzer مورد سنجش قرار گرفت. این بررسی‌ها نشان داد نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره‌ی برگ و گل کنوکارپوس با احتمال ۵۰ درصد به‌ترتیب دارای قطری معادل ١٤٦ و ۷/۸ نانومتر بودند. شکل ٦ نتایج به‌دست‌آمده از این بررسی را نشان می‌دهد.



شکل ۵: آنالیز سایز ذره نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره متانولی: الف- برگ، ب- گل کنوکارپوس.

بحث

با توجه به مشکلات زیست‌محیطی جدی در استان‌های جنوبی ازجمله استان خوزستان و اهمیت وجود پوشش‌های گیاهی سازگار با محیط‌زیست منطقه، در سال‌های اخیر اقدام به کاشت گسترده گیاه کنوکارپوس شد که متأسفانه این کار بدون بررسی‌های دقیق علمی صورت گرفت. بمنظور شناخت بیشتر ترکیبات کنوکارپوس، این پژوهش باهدف بررسی فیتوشیمیایی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان ترکیبات فنلی عصاره هیدروالکلی برگ و گل گیاه کنوکارپوس انجام شد و در ادامه نیز توان عصاره گیاه در سنتز نانوذرات طلا و نقره آزموده شد. یافته‌های این مطالعه بیانگر آن است که عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه کنوکارپوس حاوی ترکیباتی از خانواده فلاونوئید، تانن، آلکالوئید، استروئید و ساپونین می‌باشد. محتوای فنلی اندازه‌گیری شده برای برگ و گل کنوکارپوس در سطح متوسط و نسبتاً خوبی قرار داشت. در این بین مشخص شد که عصاره گل حاصل از روش سوکسله با اختلاف معنی‌داری نسبت به روش خیساندن دارای محتوای فنلی بیشتری است. با توجه به محتوای مناسب فنلی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی برای عصاره‌ها قابل پیش‌بینی بود. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که عصاره‌های حاصل از برگ و گل کنوکارپوس دارای IC_{50} بسیار پایین و درنتیجه فعالیت

آنتی‌اکسیدانی بسیاری بالایی می‌باشند (شکل ۳). امکان سنتز نانوذرات طلا و نقره با استفاده از این عصاره‌ها می‌تواند در مباحث شیمی سبز موردتوجه قرار گیرد. این عصاره‌ها با توجه به فعالیت آنتی‌اکسیدانی مناسب خود توانستند نانوذرات طلا و نقره سنتز کنند. بهینه‌سازی شرایط سنتز ازجمله زمان، دما و حجم عصاره‌ی مورداستفاده می‌تواند به تولید نانوذرات بهتر و با اندازه‌ی کوچک‌تر منجر شود (Mojab et al., 2003). همان‌طور که نتایج این پژوهش در تعیین محتوای فنلی و سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان داد، در مقایسه‌ی بین عصاره‌های برگ و گل کنوکارپوس که به دو روش سوکسله و خیساندن استخراج شده بودند، روش سوکسله دارای بیشترین توان آنتی‌اکسیدانی بود. روش سوکسله علاوه بر ساده و آسان بودن عصاره‌گیری، به دلیل تماس مداوم حلال تازه با پودر گیاهی و استفاده از دمای بالا، منجر به افزایش حلالیت ترکیبات کم محلول در دمای پایین شده است. درنتیجه میزان ترکیبات فنلی استخراج شده با این روش، بیشتر از روش خیساندن است. اصولاً روش خیساندن بهتر است زمانی به کار گرفته که گیاه مورد عصاره‌گیری دارای ترکیبات قابل‌استخراج کمتری باشد (Azwanida et al., 2015). محتوای فنلی عصاره‌ی برگ گیاه کنوکارپوس در دو روش سوکسله و خیساندن اختلاف معنی‌داری نداشت. با توجه به میزان کمتر ترکیبات فنلی موجود در برک گیاه کنوکارپوس، روش خیساندن نیز با همان کارایی روش سوکسله عمل می‌کند و همان‌طور که ذکر شد اختلاف معنی‌داری بین میزان محتوای فنلی حاصل از دو روش مشاهده نشد (شکل ۲).

همچنین در بررسی کروماتوگرام های عصاره‌ی برگ کنوکارپوس، نوزده ترکیب شیمیایی با بالاترین درصد فراوانی شناسایی شد که در میان اجزا شناسایی‌شده برخی ترکیبات ازجمله استروئیدها در هر دو عصاره‌ی استخراج شده با روش‌های سوکسله و خیساندن حضور داشتند. از سوی دیگر بررسی‌های کمی و کیفی وجود مقادیر بالایی از ترکیبات فنلی را تأیید کرد. در مطالعه ایوب و همکاران (Ayoub et al., 2010)، گلیکوزید جدید تری متوکسی الاژیک و دوازده ترکیب فنلی شناخته‌شده از برگ کنوکارپوس جدا شدند. ترکیب جدید، همراه با چهارترکیب شناخته‌شده‌ی جداشده از گیاه، خود اثر مهاری قوی در برابر حمله گونه‌های اکسیژن فعال اسید سالیسیلیک به‌صورت وابسته به دوز با استفاده از روش سنجش گزانتین/هیپوگزانتین اکسیداز نشان دادند (Ayoub et al., 2010).

در مطالعه‌ای دیگر سیزده ترکیب فنلی تأییدشده توسط روش‌های FTESI-MS و NMR از عصاره آبی الکل برگ این گیاه جداسازی شدند. بر اساس اصول سنجش‌های آنتی‌اکسیدانی، عصاره برگ گیاه کنوکارپوس حاوی ترکیبات جدید با خاصیت آنتی‌اکسیدانی همراه با گلوکورونید، کوئرستین، میرستین، دی‌متوکسی‌میرستین، گلوکوپیرانوئید و گالیک‌اسید می‌باشد (Adonizio et al, 2008; Abdel-Hameed et al., 2014) آنالیز HPLC عصاره برگ، ساقه، گل و میوه کنوکارپوس بیانگر حضور گالیک‌اسید، اتیل استات،n-بوتانول، کاتکین، آپیژنین، روئتین و کوئرستین بود (Abdel-Hameed et al., 2013). این نتایج با داده‌های سنجش کمی میزان فنل و تشخیص انواع ترکیبات فنلی در نتایج GC-mass همخوانی دارد.

کار تحقیقاتی قبلی نشان داده که عصاره متانول میوه کنوکارپوس دارای فعالیت آنتی‌اکسیدان، ضد باکتری و ضد سرطان است. در مطالعات بیشتر از این گیاه عصاره متانولی میوه با استفاده از کروماتوگرافی در ستون ژل سیلیس و سپس به‌کارگیری تکنیک‌های کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا -ماوراءبنفش و

یونیزاسیون تجزیه و تحلیل شد و ترکیبات الاژیک اسید، ایزومر کاستالاژین/ وسکالاژین به‌عنوان اجزاء اصلی با بسیاری از انواع تانن‌های پایدار در آب شناسایی گردیدند. حضور گالیک‌اسید کائمفارول ۳-O-β-d-glucopyranoside و quercetin ۳--O-β-d-glucopyranoside مطابق با زمان ماند (tR) و طیف توده، با توجه به استانداردها مشخص شدند (Abdel-Adonizio et al., 2008; Hameed et al., 2014). مطالعات عصاره متانول و هگزان برگ کنوکارپوس، حضور تری ترپن‌ها را در عصاره هگزان و عدم وجود ساپونین را در عصاره متانولی نشان داد (Bandeira, 2003)

در مطالعه‌ای که به‌عنوان اولین گزارش فیتوشیمیایی مفصل در شناسایی فیتوشیمی میوه کنوکارپوس در نظر گرفته می‌شود ایزومرهای فلاونوئیدی در عصاره گیاه شناسایی شدند. در این مطالعه خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها رابطه مستقیمی با مقدار کل ترکیبات فنلی داشت (Adonizio et al., 2008). این نتایج با یافته‌های تحقیق حاضر همخوانی دارند و توان آنتی‌اکسیدانی بالا در این گیاه می‌تواند مربوط به وجود ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی باشد. اثر حفاظتی عصاره کنوکارپوس بر آسیب مزمن کبدی ناشی از CCl_4 در موش موردمطالعه قرار گرفت و مشخص شد که عصاره به طرز معنی‌داری تخریب سلول‌های کبدی آسیب‌دیده را کاهش داد. بررسی عصاره آبی کنوکارپوس حضور فلاونوئیدها، تانن و ساپونین و عدم وجود آلکالوئیدها، کومارین‌ها و ترپن‌ها را نشان داد (Abdel-Hameed et al., 2013). این نتایج مشابه با آزمون‌های فیتوشیمیایی در این پژوهش می‌باشد. مطالعه دیگری بر روی عصاره متانولی و هگزانی گیاه کنوکارپوس حضورتری ترپن‌ها را در عصاره هگزان و عدم وجود ساپونین، در عصاره متانولی را نشان داد (Bandeira, 2003) که با یافته‌های این تحقیق همخوانی دارند. مطالعات دیگر بر عصاره برگ کنوکارپوس بیانگر ویژگی‌های ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدان، ضد سرطان، اثرات حفاظتی و قابض بود (Abdel-Hameed et al., 2013; Bandeira, 2003).

در سال ۲۰۱۵ بشیر و همکارانش (Bashir et al., 2015) با استفاده از عصاره‌ی متانولی برگ، گل، ساقه و میوه‌ی کنوکارپوس توانستند فعالیت آنتی‌اکسیدانی، محافظت کبدی و ضد سرطانی بالایی را گزارش کنند. تمامی این خواص به دلیل حضور ترکیبات مختلف ازجمله ترکیبات فنلی در گیاه می‌باشد. وجود ترکیبات تانن نیز منجر به بروز خواص ضد میکروبی خوبی از سوی این گیاه گردید (Gajjar et al., 2009).

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۶ مشخص شد که مولکول‌های فعال زیستی این گیاه شامل فلاونوئیدها، تانن و ساپونین می‌باشند. بر اساس LD50 محاسبه‌شده برای موش‌ها، عصاره آبی در رده ۵ ترکیبات، یعنی کم سمیت حاد طبقه‌بندی شد (Nascimento et al., 2016). مطالعات برگ کنوکارپوس خواص ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطان، اثرات حفاظتی را قابض نشان داد (Bandeira, 2003، Abdel Hameed et al., 2013, 2014، Shohayeb et al., 2013). ویژگی‌های دارویی از جمله فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی و اثرات حفاظتی گیاه مربوط به فیتوکمیکال‌ها موجود مانند فلاونوئیدها و ساپونین‌ها می‌باشد (Lopez et al., 2000).

نتیجه‌گیری نهایی

با توجه به نتایج حاصل از بررسی طیف‌های GC/MS به نظر می‌رسد عملکرد آنتی‌اکسیدانی مناسب عصاره متانولی برگ کنوکارپوس، ناشی از حضور گروه‌های فنلی متعدد و ترکیبات آنتی‌اکسیدان

دیگر نظیر ویتامین E و اسکوالن می‌باشد. شناسایی ترکیبات شیمیایی مختلف ازجمله استروئیدها، ترپن‌ها و ترکیبات فنلی در گیاه حائز اهمیت است. حدود بیست ترکیب شیمیایی با بالاترین درصد فراوانی عصاره متانولی برگ شناسایی شدند. محتوای فنلی بالا و فعالیت آنتی‌اکسیدانی مناسب در عصاره کنوکارپوس بیانگر پتانسیل عصاره این گیاه به‌ویژه بخش گل برای استفاده به‌عنوان یک منبع طبیعی آنتی‌اکسیدانی در جهت ساخت نانوذرات و داروها می‌باشد. با توجه به فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای عصاره خام متانولی، این گیاه می‌تواند به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان مؤثر طبیعی در مطالعات آینده استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

نگارندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به لحاظ تأمین هزینه‌های این پژوهش (پژوهانه‌های شماره ۳۱٤۰۰ و شماره ۳۱۵۸۰) در قالب پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1. Abdel-Hameed, E.S.S., Bazaid, S.A. and Sabra, A.N.A. 2013. Protective Effect of *Conocarpus erectus* extracts on CCl_4-Induced chronic liver injury in Mice. Global Journal Pharmacology, 7(1): 52-60.
2. Abdel-Hameed, E.S.S., Bazaid, S.A. and Shohayeb, M.M. 2014. RP-HPLC-UV-ESI-MS phytochemical analysis of fruits of *Conocarpus erectus* L. Chemical Papers, 68(10): 1358-1367.
3. Adonizio, A. Kong, K.F. and Mathee, K. 2008. Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* by South Florida plant extracts. Antimicrobial agents and chemotherapy, 52(1):198–203.
4. Ahmed, S., Ahmad, M.,Swami, B.L. and Ikram, S. 2016. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. Journal of advanced research, 7(1): 17-28.
5. Ayoub, N.A. 2010. trimethoxyellagic acid glucuronide from *Conocarpus erectus* leaves: isolation, characterization and assay of antioxidant capacity. [Research Support, Non-U S Gov't]. Pharmaceutical biology, 48(3): 328-332.
6. Azwanida, N.N. 2015. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. Medicinal and Aromatic Plants,4: 196.
7. Bandeira, A.R.G. 2003. Estudo Fitoqúimico e aAtividade. Biológica de *Conocarpus erectus* L. (MangueBotão). Recife (PE): Universidade Federal de Pernambuco, 86 p.
8. Bashir, M., Uzair, M. and Bashir Ahmad, C.H. 2015. A review of phytochemical and biological studies on Conocarpus erectus (Combretaceae). Pakistan Journal of Pharmaceutical Research, 1(1): 1-8.
9. Bibak, B. Khakshor, A. Kamali, H. Ahmadzadeh Ghavidel, R. and Aminimoghadamfaruj, N. 2012 Evaluation of Antibacterial Properties, Phytochemical Contents and Antioxidant Capacities of leaf and stem barks of *Uvaria grandiflora* Roxb. Journal of North Khorasan University of Medical Sciences, 4(1):113-118.
10. Brewer, M.S. 2011. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. Comprehensive reviews in food science and food safety, 10(4): 221-247.
11. Gajjar, P., Pettee, B., Britt, D.W., Huang, W. Johnson, W.P. and Anderson, A.J. 2009. Antimicrobial activities of commercial nanoparticles against an environmental soil microbe, *Pseudomonas putida* KT2440. Journal of Biological Engineering, 3(9): 1754-1611.
12. Khan, A.M., Qureshi, R.A., Ullah, F., Gilani, S.A., Nosheen, A., Sahreen, S., Laghari, M.K., Laghari, M.Y., Hussain, I. and Murad, W. 2011. Phytochemical analysis of selected medicinal plants of

Margalla Hills and surroundings. Journal of Medicinal Plants Research, 5(25): 6055-6060.
13. Kuppusamy, P., Yusoff, M.M., Maniam, G.P. and Govindan, N. 2016. Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant derivatives and their new avenues in pharmacological applications An updated report. Saudi Pharmaceutical Journal, 24(4): 473-484.
14. Lopes, R.M., Oliveira, T.T., Nagem, T.J. and Pinto, A.S. 2000. Flavonóides: farmacologia de flavonoides no control ehiperlipidê micoemanimais experimentais. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, 3: 18-22.
15. Marinova, D., Ribarova, F. and Atanassova, M. 2005. Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables.Journal of Chemical Technology and Metallurgy, 403 : 255-260.
16. Mojab, F., Kamalinejad, M., Ghaderi, N. and Vahidipour, H.R. 2003. Phytochemical screening of some species of Iranian plants. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 2(2): 77-82.
17. Nadaf, N.Y. and Kanase, S.S. 2016. Biosynthesis of gold nanoparticles by *Bacillus marisflavi* and its potential in catalytic dye degradation. Arabian Journal of Chemistry, 4:1-9.
18. Nascimento, D.K., Souza, I.A., Oliveira, A.M., Barbosa, M.O., Santana, M.A., Pereira, D.F., Lira, E.C. and Vieira, J.R. 2016. Phytochemical screening and acute toxicity of aqueous extract of leaves of *Conocarpus erectus* Linnaeus in Swiss Albino Mice. Anais da Academia Brasileira de Ciencias, 88 (3): 1431-7.
19. Petrovska, B.B. 2012. Historical review of medicinal plants' usage. Pharmacognosy, 6(11): 1-5.
20. Rafiei, M., Gadgil, A.S., Ghole, V.S., Gore, S.D., Jaafarzadeh, N., Mirkazemi, R. 2009. Assessment of air pollution and its effects on the health status of the workers in beam rolling mills factory (Iran National Steel Industrial Group) fromAhvaz-Iran. Indian journal of occupational and environmental medicine, 13(1): 20-22.
21. Sharma, R.K., Chatterji, S., RaiD, K., Mehta, S., Rai, P.K., Singh, R.K., Watal, G. and Sharma, B. 2009. Antioxidant activities and phenolic contents of the aqueous extracts of some Indian medicinal plants. Journal of Medicinal Plants Research, 3(11) :944-948.
22. Shohayeb, M.M, Abdel-Hameed, E.S.S. and Bazaid, S.A. 2013. Antimicrobial activity of tannins and extracts of different parts of *Conocarpus erectus* L. International Journal of Pharma and Bio Sciences, 3(2): 544-553.
23. Smith, C.A., Simpson, C.A., Kim, G., Carter, C.J. and Feldheim, D.L. 2013. Gastrointestinal bioavailability of 2.0 nm diameter gold nanoparticles. [Research Support, Non-U S Gov't]. American Chemical Society Nano, 7(5): 3991-3996.
24. Ugochukwu, S.C., Uche, A. and Ifeanyi, O. 2013. Preliminary phytochemical screening of different solvent extracts of stem bark and roots of *Dennetia tripetala* G. Baker. Asian Journal of Plant Science and Research, 3(3): 10-13.
25. Yusuf, A.Z., Zakir, A., Shemau, Z., Abdullahi, M. and Halima,S.A. 2014. Phytochemical analysis of the methanol leaves extract of *Paullinia pinnatalinn*. Journal of pharmacognosy and phytotherapy, 6(2):10-6.
26. Zohra, S.F., Meriem, B., Samira, S. and Muneer, M.A. 2012. Phytochemical screening and identification of some compoundsfrom Mallow. Journal of Natural Product and Plant Resources, 2 (4):512-516.