

Investigating the antibacterial and antioxidant effects of zinc oxide nanoparticles synthesized from *Arthrospira platensis* with the aim of using them in wound healing

Shabnam Akbari¹, Shiva Khalil-Moghaddam^{2*}, Maryam Ghobeh¹, Maryam Bikhof Torbati², Ashraf Sadat Shahvelayati³

1- Department of Cognitive Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Department of Biology, Yadegar-e-Imam Khomeini (RAH) Shahr-e- Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3- Department of Chemistry, Yadegar-e-Imam Khomeini (RAH) Shahr-e- Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Aim and Background: Wound care imposes a significant financial burden on the health system. One of the most important and effective factors in delaying wound healing is wound infection and high levels of reactive oxygen species (ROS). The present study examines the green synthesis of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) using the aqueous extract of *Arthrospira platensis*.

Materials and Methods: The synthesis of ZnO nanoparticles was investigated by UV-Vis and FTIR spectroscopy and finally tested for antibacterial activity by diffusion method in agar well and antioxidant activity by DPPH assay.

Results: The results of biological synthesis using the aqueous extract of *Arthrospira platensis* confirmed the uniform formation. Also, the formation of effective functional groups on ZnO nanoparticles, the average size of the formed nanoparticles and the stability of suspended particles were assessed by FTIR, UV-VIS, DLS, and ZETA Potential spectra. Synthesized nanoparticles showed good antibacterial activity against bacteria involved in wound infection, such as *E. coli* (PTCC1399) and *Pseudomonas aeruginosa* (PTCC1430). The maximum diameter of the halo of non-growth of *E. coli* and *P. aeruginosa* bacteria was estimated to be 32 and 34 mm, respectively, at a concentration of 40 mg/mL. Also, the antioxidant activity of the synthesized nanoparticles showed the highest DPPH free radical inhibition with a rate of 66.60 % at a concentration of 9.25 mg/mL.

Conclusion: Using such a simple and cost-effective biological method can be a suitable alternative model for synthesizing nanomaterials on a large scale, accelerating the wound-healing process.

Keywords: Zinc oxide, green synthesis, antioxidant, antibacterial, wound healing.

بررسی اثرهای ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی نانوذرات اکسید

روی سنتز شده از *Arthrosira platensis* با هدف ترمیم زخم

شبیم اکبری^۱، شیوا خلیل مقدم^{۲*}، مریم قبه^۱، مریم بی‌خوف تربتی^۲، اشرف سادات شاه ولایتی^۲

۱. گروه علوم شناختی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. گروه زیست‌شناسی، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهر ری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳. گروه شیمی، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهر ری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: مراقبت از زخم‌ها بار مالی قابل توجهی بر نظام سلامت جامعه تحمیل می‌نماید. از مهم‌ترین عوامل کلیدی و مؤثر تأخیر در بهبود زخم، عفونت زخم و سطوح بالای گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) می‌باشد. مطالعه حاضر به بررسی سنتز سبز نانوذرات اکسید روی (NPs ZnO) با استفاده از عصاره آبی *آرتروسپیرا پلاتنسیس* (*Arthrosira platensis*) می‌پردازد.

مواد و روش‌ها: سنتز نانوذرات ZnO با طیف‌سنجی UV-Vis و FTIR مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت برای فعالیت ضدباکتریایی به‌روش انتشار در چاهک آگار و فعالیت آنتی‌اکسیدانی با سنجش DPPH آزمایش گردید.

یافته‌ها: نتایج سنتز بیولوژیکی با استفاده از عصاره آبی *آرتروسپیرا پلاتنسیس*، شکل‌گیری یکنواخت و تشکیل گروه‌های عاملی مؤثر بر نانوذرات ZnO و اندازه متوسط نانوذرات تشکیل شده و پایداری ذرات معلق را توسط طیف‌های FTIR, UV-VIS, DLS, ZETA Potential تأیید کرد. نانوذرات سنتز شده، فعالیت ضدباکتریایی خوبی در برابر باکتری‌های مؤثر در عفونت زخم مانند *Escherichia coli* (PTCC1399) و *Pseudomonas aeruginosa* (PTCC1430) را از خود نشان دادند. حداکثر قطر هاله عدم‌رشد باکتری *E. coli* برابر با ۳۲ میلی‌متر در غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در غلظت مشابه برای باکتری *P. aeruginosa* برابر با ۳۴ میلی‌متر برآورد شد. همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوذرات سنتز شده، بیشترین مهار رادیکال آزاد DPPH با میزان ۶۶/۶۰ درصد در غلظت ۹/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر را نشان داد.

نتیجه‌گیری: استفاده از چنین روش بیولوژیکی ساده و مقرون‌به‌صرفه‌ای می‌تواند الگوی جایگزین مناسبی برای سنتز نانومواد در مقیاس بزرگ باشد، همچنین از نانوذرات سنتز شده به این روش می‌توان در تسریع روند بهبود زخم استفاده نمود.

واژگان کلیدی: نانوذرات اکسید روی، *آرتروسپیرا پلاتنسیس*، اثر آنتی‌اکسیدانی، اثر ضدباکتریایی.

۱- مقدمه

سالانه مراقبت از زخم‌ها هزینه زیادی را بر نظام سلامت جامعه تحمیل می‌نماید. هزینه جهانی برای مراقبت از زخم‌ها سالانه حدود ۲/۸ میلیارد دلار تخمین زده شده است. بنابراین تحقیق و پژوهش به‌منظور تسریع بهبود زخم و کاهش هزینه‌های ناشی از آن، از اولویت‌های وزارت بهداشت است (۱). از عوامل سلولی تأخیر در بهبود زخم،

می‌توان عفونت و التهاب زخم، سطوح بالای گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)، کاهش تکثیر فیبروبلاست‌ها و کاهش تولید کلاژن را نام برد (۲). تکثیر باکتری در زخم‌ها و عفونت آن، یکی از عوامل مؤثر در تأخیر بهبود زخم است (۳). باکتری /شریشیائکلی یکی از عوامل اصلی عفونت در زخم‌ها است. در سال‌های اخیر بروز مقاومت روبه‌افزایش این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، ضمن ایجاد اختلال در روند ترمیم زخم، موجب افزایش مدت بستری شدن و بالا رفتن هزینه درمان نیز شده است (۴). یکی دیگر از شایع‌ترین گونه‌های باکتریایی مشاهده‌شده در زخم‌های مزمن، پاتوژن فرصت طلب *سودوموناس آئروژینوزا* است. این گونه باکتریایی هوازی یک پاتوژن رایج در عفونت‌های بیمارستانی، به‌ویژه در زخم‌های مزمن و سوختگی است. بیماران دچار نقص ایمنی و مبتلایان به بیماری‌های همراه

نویسنده مسئول:

گروه زیست‌شناسی، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهر ری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

پست الکترونیکی:

shiva.moghaddam@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۱/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۳۰

مانند بیماری‌های عروقی و دیابت به‌ویژه در معرض ابتلا به عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا هستند (۵).

تولید رادیکال‌های آزاد طی سوخت‌وسازهای سلولی موجود زنده، امری طبیعی است و سیستم‌های بیولوژیک با استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، جانداران زنده را در مقابل اثرهای بالقوه زیان‌بار رادیکال‌های آزاد محافظت می‌نمایند. در افراد سالم، بین میزان تولید رادیکال‌های آزاد و دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن، تعادل مناسبی وجود دارد. بروز اختلال در تعادل رادیکال‌های آزاد و آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی سبب ایجاد استرس اکسیداتیو شده و این مسئله تضعیف سیستم آنتی‌اکسیدانی و افزایش تولید رادیکال‌های آزاد را در پی دارد. استرس اکسیداتیو ایجاد شده منجر به آسیب سلولی و وضعیت پیش‌التهابی می‌شود (۱، ۶). تولید بیش از حد گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن (ROS) منجر به اختلال عملکرد پروتئین، بهم‌گش غیرطبیعی سلولی، آسیب دی‌اکسی ریبونوکلیئیک اسید (DNA)، ریبونوکلیئیک اسید (RNA) و چندین بیماری مانند تصلب شرایین، بیماری‌های عصبی، سرطان، دیابت ملیتوس و تأخیر در بهبود زخم می‌شود (۷). بنابه‌دلایل بیان‌شده، آنتی‌اکسیدان‌ها با هدف غلبه بر اکسیداسیون مولکولی، بازگرداندن سطح فیزیولوژیکی طبیعی ROS و کمک به ترمیم زخم پیشنهاد شده‌اند (۸).

نانوتکنولوژی سبز با استفاده از اصول شیمی سبز در تهیه و سنتز نانومواد با حداقل مواد سمی، کاربرد دارد (۹). سنتز سبز به‌دلیل سازگاری با محیط‌زیست و مقرون‌به‌صرفه بودن، بر روش‌های شیمیایی و فیزیکی ترجیح داده می‌شود (۱۰). سنتز سبز نانوذرات را می‌توان با استفاده از موجودات بیولوژیکی مختلف مانند گیاهان، سیانوباکتری‌ها، اکتینومیسیت‌ها (پرتوقارچ‌ها)، باکتری‌ها، ماکرو جلبک‌ها و قارچ‌ها انجام داد (۱۱).

سیانوباکتری‌ها، گروهی از سلول‌های پروکاریوتی ساختاری هستند که دارای فتوسنتز وابسته به دی‌اکسیدکربن می‌باشند و به‌دلیل محتوای بالای مواد فعال زیستی، منبع خوبی برای سنتز خارج‌سلولی و درون‌سلولی نانوذرات هستند (۱۲). رنگدانه فیکوسیانیین به‌دلیل ساختار خاص خود، به آرتروسپیرا خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌بخشد. علاوه بر فیکوسیانیین، آرتروسپیرا حاوی کلروفیل، کاروتنوئید، ترکیبات فنولیک، پلی‌ساکارید، اسید چرب و ویتامین است که به ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن کمک می‌کند؛ بنابراین در روند ترمیم زخم نیز مفید خواهد بود (۱۳).

همچنین نانوذرات اکسیدهای فلزی به‌واسطه خواص منحصربه‌فرد، دارای کاربرد گسترده در صنایع مختلف می‌باشند. از خصوصیات این ترکیب‌ها خاصیت ضد میکروبی آن‌هاست که در فرایند بهبود زخم تأثیرگذار است. در میان نانوذرات فلزی، اکسید روی به‌واسطه فعالیت‌های ضدباکتریایی و ضدالتهابی دارای کاربرد مؤثر در ترمیم زخم می‌باشد (۱۴).

اکسید روی (ZnO)، یک اکسید فلزی با خواص ضد عفونی‌کنندگی، تعدیل‌کننده سیستم ایمنی و تقویت‌کننده رشد بافت است. ZnO به‌دلیل خواص زیست‌سازگاری مناسب و فعالیت‌های ضد میکروبی، مورد تأیید FDA ایالات متحده است و به‌طور گسترده به‌عنوان یکی از اجزای اصلی در محصولات محافظت از پوست و مراقبت از زخم استفاده می‌شود. ZnO با ویژگی خشک نگه‌داشتن زخم، از بین بردن میکروب‌ها، آزادسازی یون‌های Zn^{2+} و کمک به تکثیر فیبروبلاست‌ها در بهبود زخم و بازسازی پوست نقش مؤثری دارد (۱۵).

در مطالعه حاضر با استفاده از جلبک آرتروسپیرا پلاتنسیس و با استفاده از اصول شیمی سبز، نانوذرات اکسید روی سنتز شد. پس از تأیید سنتز نانوذرة اکسید روی، با استفاده از تکنیک‌های UV-VIS و FTIR، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی نانوذرات سنتز شده، به‌روش‌های تعیین‌هاله عدم‌رشد و DPPH بررسی گردید.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه مواد مصرفی

در این پژوهش زینک‌استات‌دی‌هیدرات، ۱۰۱ دی‌فنیل-۲ پیکریل هیدرازیل (DPPH)، محیط‌کشت مولر هینتون آگار از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. دو سویه باکتری *E. coli* (PTCC1399) و *Pseudomonas aeruginosa* (PTCC1430) از بانک میکروبی انستیتو پاستور تهران تهیه گردید.

۲-۲- تهیه جلبک و عصاره آبی (آرتروسپیرا پلاتنسیس)

ریزجلبک آرتروسپیرا پلاتنسیس از شرکت ریزجلبک پرشین ایران به‌صورت پودر لیوفیلیزه تهیه شد. به ۲۰ گرم پودر ریزجلبک آرتروسپیرا، ۵۰۰ میلی‌لیتر آب استریل دیونیزه اضافه شد. به کمک پروب هموژنایزر با توان ۲۰۰w به مدت ۳۳۰ ثانیه اولتراسوند شد. سپس، به مدت یک شبانه روز در دمای اتاق بر روی شیکر با دور rpm ۱۸۰ قرار داده شد. سپس، مخلوط با دور rpm ۵۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه

سانتریفیوژ گردید و مایع رویی به‌عنوان عصاره آبی از طریق کاغذ صافی واتمن شماره ۱ فیلتر شد و سپس عصاره به‌دست‌آمده درون ظرف‌های پهن و شیشه‌ای در دمای محیط تغلیظ شد و تا زمان استفاده در یخچال (۴ درجه سلسیوس) نگهداری گردید (۱۶).

۲-۳- سنتز سبز نانوذره اکسید روی

در شرایط آزمایشگاهی ابتدا در یک ارلن، ۲ گرم زینک سولفات در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه بر روی هیتر استیرر با اختلاط شدید به‌مدت نیم ساعت بدون حرارت حل شد. ۴ میلی‌لیتر عصاره آبی آرتروسپیلا پلاتنسیس (حاوی $2/2 \pm 28$ mg/mL) به نمونه افزوده شد و اختلاط به‌مدت ۳۰ دقیقه ادامه یافت. سپس ۳ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۳ مولار (قطره‌قطره) تحت اختلاط شدید اضافه شد و اختلاط به‌مدت ۱۲۰ دقیقه ادامه یافت. کدورت در نمونه در pH برابر با ۹ دیده شد و به‌مدت ۳ ساعت اختلاط در دمای محیط ادامه یافت. سانتریفیوژ نمونه در دور ۱۰۰۰g به‌مدت ۵ دقیقه و در دمای ۲۰ درجه سلسیوس صورت گرفت. سوپرناتانت نمونه جدا گردید و رسوب حاصل با ۱۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه شسته و مجدد سانتریفیوژ تکرار شد. در مرحله آخر مایع رویی دور ریخته شد و رسوب در دمای محیط به‌مدت ۴۸ ساعت خشک شد (۱۷، ۱۸).

۲-۴- بررسی خصوصیات نانوذرات اکسید روی

جهت مشاهده پایداری و پراکندگی نانوذرات در محیط واکنش دستگاه اسپکتروفتومتر (Vis-UV) در محدوده ۲۰۰-۸۰۰ نانومتر موردبررسی قرار گرفت. همچنین برای تعیین خواص ساختاری و گروه‌های عاملی، طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) استفاده شد. برای تعیین اندازه متوسط نانوذرات پراکنده شده در آب دیونیزه، از تکنیک DLS در دمای ۲۵ درجه سلسیوس استفاده شد. پایداری ذرات معلق تا حد زیادی تحت‌تأثیر پتانسیل زتای آن‌ها (P-ζ) است.

۲-۵- ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوذرات اکسید روی به‌روش DPPH (۱،۱-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)

تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوذرات اکسید روی به‌روش مهار رادیکال آزاد DPPH مورد استفاده قرار گرفت. فرایند عملکرد به‌این‌گونه است که الکترون جفت‌نشده روی اتم نیتروژن در DPPH زمانی حذف می‌شود که یک الکترون را از یک آنتی‌اکسیدان به‌شکل اتم هیدروژن دریافت کند. جابه‌جایی الکترون اضافی در کل مولکول در

DPPH به آن خاصیت یک رادیکال آزاد پایدار را می‌دهد. این خاصیت از دایمر شدن مولکول‌ها جلوگیری می‌کند، که در بیشتر رادیکال‌های آزاد این ویژگی دیده می‌شود. این جابه‌جایی مسئول ایجاد رنگ بنفش است که در طول موج حدود ۵۱۷ نانومتر جذب می‌شود. هنگامی که محلول DPPH با هر ماده‌ای که می‌تواند یک اتم هیدروژن اهدا کند ترکیب شود، یک فرم کاهش‌یافته تولید می‌شود و این ترکیب با گرفتن یک الکترون از ترکیب آنتی‌اکسیدان، از رنگ بنفش به رنگ زرد تغییر رنگ می‌دهد. پایه و اساس این روش بدین صورت است که رادیکال DPPH به‌عنوان پذیرنده الکترون از یک محلول اهداکننده مانند آنتی‌اکسیدان‌ها عمل می‌کند. در این حالت رنگ بنفش محیط به رنگ زرد تبدیل می‌شود (۱۹). هرچه بر غلظت ماده آنتی‌اکسیدان افزوده شود رنگ بنفش بیشتر به رنگ زرد میل می‌کند. در این روش، ۵۰ میکرولیتر نمونه در غلظت‌های مختلف با ۱۵۰ میکرولیتر محلول DPPH در یک صفحه ۹۶ چاهکی در طول فرایند آزمایش مخلوط شدند. پس از مخلوط کردن محتویات میکروپلیت در تریکی به‌مدت ۴۵ دقیقه، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. با استفاده از معادله خط به‌دست‌آمده از منحنی درصد بازداري رادیکال آزاد، مقدار IC₅₀ به‌دست آمد. IC₅₀ غلظت موردنیاز برای مهار ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد موجود در محیط می‌باشد (۲۰). درصد بازدارندگی در هر غلظت با فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{Inhibition ratio (DPPH scavenging effect) (\%)} = \frac{[(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100}{\text{سه تکرار برای همه نمونه‌ها، شاهد و بلانک انجام شد و میانگین جذب تکرارها در فرمول وارد شد.}}$$

۲-۶- ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات اکسید روی به‌روش انتشار در چاهک آگار

اثرهای ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی بر باکتری *E. coli* و *P. aeruginosa* با کمک روش انتشار در چاهک آگار بررسی شد. بدین منظور ابتدا سویه‌های میکروبی در محیط کشت مولر هینتون آگار به‌مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد و سپس سوسپانسیون باکتریایی با غلظت برابر با کدورت نیم‌مک فارلند تهیه شد. سپس به‌روش انتشار در چاهک آگار، چاهک‌هایی بر سطح محیط کشت مولر هینتون آگار ایجاد شد. سوسپانسیون میکروبی معادل نیم‌مک فارلند روی سطح محیط کشت به‌صورت متراکم پخش شد. ۶۰ میکرولیتر از نانوذرات سنتز شده با غلظت‌های ۲۰، ۱۰، ۵ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر درون چاهک‌ها ریخته شد.

عدد موج 1635 cm^{-1} مطابق با باند طیف جذبی نشان‌دهنده پیوند C-H می‌باشد و طیف جذب شده در 3411 cm^{-1} مربوط به ارتعاش‌های کششی گروه‌های O-H می‌باشد. طبق مطالعه‌های انجام‌شده، منطقه جذب $400-600\text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاش‌های کششی Zn-O است (۲۳). در شکل ۲ نیز پیک‌های جذبی $448, 516$ و 602 cm^{-1} تشکیل ZnO را تأیید می‌کنند.

از تکنیک DLS برای تعیین اندازه ذرات در یک محلول بر اساس حرکت براونی استفاده شد. اندازه ذرات به دست‌آمده از این روش به دلیل ساختار سطحی، غلظت یون و نوع یون‌های موجود در محیط می‌تواند بزرگتر از ذرات فاز جامد باشد (۲۴). هیستوگرام DLS نانوذرات اکسید روی تهیه‌شده در (نمودار ۳) نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، اندازه متوسط نانوذرات اکسید روی 110 nm نانومتر می‌باشد. در این بررسی، کوچکترین اندازه متوسط نانوذرات اکسید روی ($33/44\text{ nm}$ نانومتر) مشاهده شد. باین‌حال، محلول حاوی نانوذرات نسبتاً پراکنده با PDI برابر با 0.480 بود.

از تکنیک تعیین پتانسیل زتا (Z-P) برای تخمین بار سطحی نانوذرات که در تعیین پایداری آن‌ها نیز مفید است، استفاده گردید (۲۵). بار سطحی NPs-ZnO تجزیه و تحلیل Z-P تعیین و در شکل ۴ آورده شد. ZnO-NP ها میانگین Z-P -3.21 میلی‌ولت را نشان دادند و پایداری نسبی آن‌ها تأیید گردید.

در نهایت پتری‌دیش‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای 37°C درجه سلسیوس قرار داده شد و پس از ۲۴ ساعت قطر هاله عدم‌رشد در اطراف چاهک‌ها با خط‌کش برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد (۲۱).

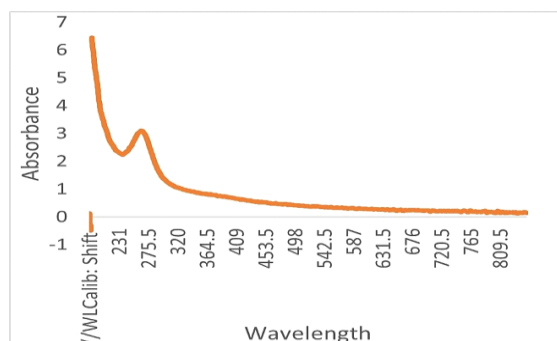
۳- تحلیل آماری

فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی برای هر نمونه با سه تکرار انجام شد. نتایج به دست آمده به عنوان میانگین $\pm$ انحراف معیار (SD) ارائه شده است. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism نسخه ۹.۲.۰ انجام گرفت.

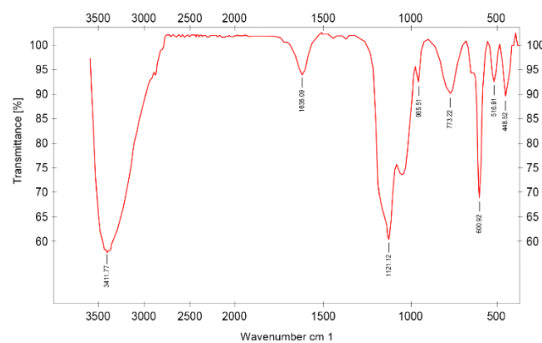
۴- نتایج

۴-۱- خصوصیات نانوذرات اکسید روی

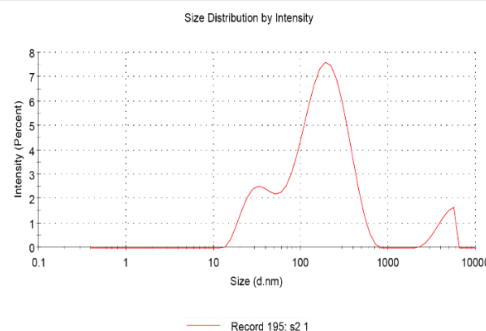
ماکزیمم پیک جذبی نانوذرات اکسید روی در طول موج‌های 200 تا 500 nm نانومتر است (۲۲). همان‌طور که در نمودار ۱ نشان داده شده است، ماکزیمم پیک جذبی حاصل در طول موج 278 nm نانومتر نشان‌دهنده باند جذب تشدید پلاسمون سطحی برای نانوذرات اکسید روی است. در تحلیل طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوری (FTIR)، اطلاعات مربوط به گروه‌های عاملی موجود در نمونه موردبررسی قرار گرفت. هر باند با گروه‌های عاملی خاصی ارتباط داشت که با توجه به نمودار ۲، طیف جذب‌شده در 1121 cm^{-1} کشش C-O را نشان می‌دهد.



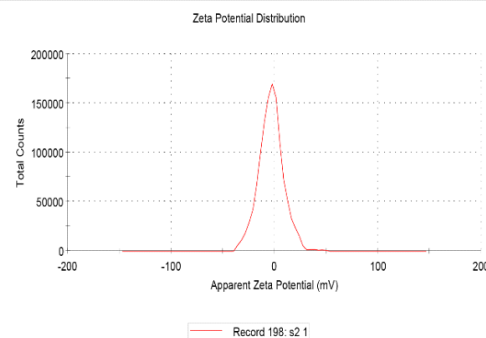
نمودار ۱ - آنالیز Vis-Uv نانوذرات اکسید روی سنتز شده.



نمودار ۲- آنالیز FTIR نانوذرات اکسید روی سنتز شده به روش سبز.



نمودار ۳- آنالیز DLS نانوذرات اکسید روی سنتز شده به روش سبز.

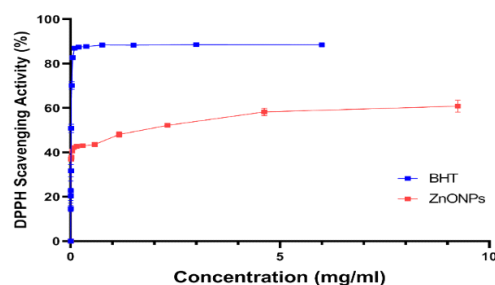


نمودار ۴- تجزیه و تحلیل پتانسیل زتای نانوذرات اکسید روی سنتز شده به روش سبز.

۲-۴ ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی نانوذرات اکسید روی

در این پژوهش اثر نانوذرات اکسید روی سنتز شده به روش سبز با استفاده از تکنیک مهار رادیکال‌های آزاد DPPH مورد ارزیابی قرار گرفت و با BHT به عنوان استاندارد مقایسه شد. در پژوهش حاضر نتایج نشان دادند که خاصیت آنتی اکسیدانی نانوذرات سنتز شده وابسته به غلظت است و

همان‌طور که در نمودار ۵ نشان داده شده است، نانوذرات اکسید روی فعالیت آنتی اکسیدانی خوبی از خود نشان دادند، به گونه‌ای که بیشترین مهار رادیکال آزاد DPPH به میزان ۶۶/۶۰ درصد در غلظت ۹/۲۵ mg/ml حاصل شد و IC_{۵۰} نانوذرات اکسید روی سنتز شده به همراه BHT به عنوان کنترل مثبت شیمیایی در جدول ۱ نمایش داده شده است.



نمودار ۵- فعالیت آنتی اکسیدانی نانوذرات اکسید روی سنتز شده به روش سبز و BHT.

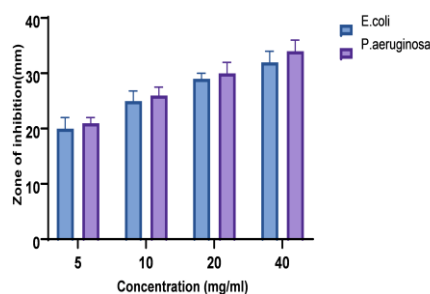
جدول ۱- میزان IC₅₀ نانوذرات اکسید روی سنتز شده به روش سبز و BHT به عنوان کنترل.

ترکیبات	IC ₅₀ Value (mg/mL)
ZnONPs	± mg/mL013/0 ۱/۷۸۰۳۵
BHT	± mg/mL002/0 ۰/۰۱۳۵۹۲

مطابق با شکل ۶ هاله عدم رشد باکتری *E. coli* در غلظت‌های ۵ تا ۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر به ترتیب برابر با ۲۰، ۲۵، ۲۹ و ۳۲ میلی متر بود و هاله عدم رشد برای باکتری *P. aeruginosa* به ترتیب برابر با ۲۱، ۲۴، ۳۰ و ۳۴ میلی متر گزارش گردید. نتایج شکل ۶ نشان دهنده خاصیت ضد میکروبی قوی و مطلوب نانوذره اکسید روی سنتز شده به روش سنتز سبز می باشد.

۳-۴- ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات اکسید روی به روش انتشار در چاهک آگار

روش انتشار در چاهک آگار یکی از روش‌های متداول در بررسی فعالیت ضد میکروبی ترکیبات می باشد (۲۶). در این پژوهش اثر ضدباکتریایی نانوذرات سنتز شده به روش سبز با تکنیک بررسی هاله عدم رشد به روش چاهک بررسی شد و قطر هاله عدم رشد باکتری در نمودار ۶ درج گردید.



نمودار ۶- فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات اکسید روی سنتز شده به روش سبز با روش انتشار در چاهک آگار.

FTIR ثبت شده برای نانوذرات اکسید روی تأیید سنتز نانوذرات با مشاهده پیک جذبی در 1^{-}cm^{-1} ۴۴۸، ۵۱۶، ۶۰۲ را نشان داد که این قله‌ها، حضور فیتوکمیکال‌های مختلف را نشان می‌دهند. فنولیک‌ها، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، تانن‌ها، اسیدهای آلی موجود در *آرتروسپیرا پلاتنسیس* از طریق اتم‌های اهداکننده اکسیژن با یون‌های روی برهم‌کنش می‌کنند و روی سطح فلزات جذب می‌شوند، که با کاهش شدت پیک نوارهای مشاهده شده در نانوذرات اکسید روی نمایش داده می‌شوند (۳۰). همچنین مشخص شد که این مولکول‌ها بر خواصی از نانوذرات اکسید روی که به ساختارهای سطحی بستگی دارد تأثیر می‌گذارند (۳۱). در مورد نانوذرات سنتز شده با استفاده از عصاره آبی جلبک *آرتروسپیرا پلاتنسیس*، کوچکترین اندازه ذرات ۳۳/۴۴ نانومتر مشاهده شد. طبق تجزیه و تحلیل پتانسیل وقتی این نانوذرات در محیط آبی پراکنده شده‌اند دارای پایداری مطلوبی هستند. از کاربردهای مستقیم درمانی نانوذرات اکسید روی می‌توان به فعالیت‌های ضدباکتریایی و ضد التهابی آن اشاره کرد (۳۲). در مطالعات پیشین فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات اکسید روی سنتز شده از عصاره آبی

۵- بحث

طبیعت خنثی، کمتر سمی و پایدار عصاره‌های بیولوژیکی همراه با تکنیک‌های تولید ساده و کارآمد، آن‌ها را به گزینه‌ای مناسب در سنتز نانوذرات تبدیل می‌کند. نانوذرات اندازه کوچکتر و در نتیجه نسبت سطح به حجم بزرگ‌تری دارا می‌باشند. این ویژگی باعث می‌شود نانوذرات از نظر شیمیایی واکنش‌پذیرتر شوند (۲۷). در میان نانوذرات فلزی، اکسید روی سنتز شده از عصاره‌های مختلف گیاهی به روش بیولوژیکی، دارای کاربردهای زیست‌پزشکی مختلف است (۲۸). در پژوهش حاضر از عصاره آبی جلبک *آرتروسپیرا پلاتنسیس* در سنتز سبز نانوذرات اکسید روی استفاده شد. مطالعات نشان داده، سنتز نانوذرات اکسید روی توسط جلبک‌ها، به واسطه تولید متابولیت‌هایی که یون‌های روی را کاهش می‌دهند امکان‌پذیر است (۲۹). نتایج تست FTIR، UV-VIS، DLS و ZETA Potential سنتز نانوذرات اکسید روی را تأیید کرد. طیف UV-vis نانوذرات سنتز شده حداکثر جذب را در طول موج ۲۷۸ نانومتر نشان داد که تأییدی بر سنتز نانوذرات اکسید روی از عصاره آبی جلبک *آرتروسپیرا پلاتنسیس* می‌باشد. طیف

و اهداکننده هیدروژن و حذف‌کننده‌های تک‌اکسیژن عمل می‌کنند که پتانسیل آنتی‌اکسیدانی تمام گیاهان دارویی را تشکیل می‌دهد (۳۹). در مطالعه حاضر مشاهده IC₅₀ در غلظت ۱/۷۸۰۷۳۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تأییدی بر فعالیت مطلوب نانوذرات اکسید روی سنتز شده به‌واسطه سنتز سبز و تأثیر مثبت ترکیبات فنلی و فیتوکمیکال‌های عصاره جلبک *آرتروسپیرا پلاتنسیس* در کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشد.

۶- نتیجه‌گیری

در پژوهش اخیر نتایج نشان داد، نانوذرات اکسید روی سنتز شده به‌روش بیولوژیکی و به‌واسطه جلبک *آرتروسپیرا پلاتنسیس* دارای اثر آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجه و فعالیت ضد میکروبی مطلوبی هستند که می‌توانند تأثیر مثبتی در روند بهبود زخم گذاشته و همچنین هزینه‌های درمان را نیز کاهش دهند.

۷- ملاحظات اخلاقی

ندارد.

۸- تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مسئولین محترم آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران به‌منظور حمایت‌های اجرایی کمال تشکر و امتنان را دارند.

۹- تعارض منافع

ندارد.

برگ گیاه *آلوئه‌ورا* به‌روش انتشار در چاهک آگار علیه باکتری *E. coli* در غلظت‌های ۱۰ تا ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر سنجیده شد و بیشترین قطر هاله عدم‌رشد باکتری در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برابر با ۱۱/۶۵ میلی‌متر گزارش گردید (۳۳). نتایج سنجش اثر ضدباکتریایی نانوذرات سنتز شده به‌روش سبز نشان داد که حداکثر قطر هاله عدم‌رشد باکتری *E. coli* برابر با ۳۲ میلی‌متر در غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در غلظت مشابه برای باکتری *P. aeruginosa* برابر با ۳۴ میلی‌متر برآورد شد. نانوذرات اکسید روی سنتز شده در مطالعه‌های مختلف دارای مکانیسم‌های متفاوت در عمل ضد میکروبی می‌باشند (۳۴). وجود مواد آروگانیک در عصاره آبی جلبک *آرتروسپیرا پلاتنسیس* اثر کاهش‌دهنده زیستی و همچنین کمک به بهبود خاصیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی را نشان داد که این اثر مطلوب برای کاربردهای زیست‌پزشکی اعم از روند بهبود زخم مفید می‌باشد (۳۵). استرس اکسیداتیو به‌دلیل مقادیر زیاد ROS تولید شده در زخم، توسط محققان به اثبات رسیده است و تجویز خوراکی یا موضعی مواد آنتی‌اکسیدانی می‌تواند با تعدیل ROS در بهبود زخم مؤثر باشند (۳۶). در مطالعه‌های پیشین فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوذرات اکسید روی سنتز شده با عصاره آبی برگ گیاه *lancea Buchanania* به‌روش DPPH سنجیده شد و طبق نتایج IC₅₀ نانوذرات اکسید روی سنتز شده به‌روش بیولوژیکی در غلظت mg/mL ۸/۰۲۵ گزارش گردید (۳۷). در مطالعه‌ای دیگر نانوذرات اکسید روی با استفاده از عصاره آبی ساقه گیاه *Ruta graveolens* سنتز شد و نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌روش DPPH بر نانوذره سنتز شده، IC₅₀ برابر با mg/mL ۹/۲۴ را نشان داد (۳۸). نتایج سنجش اثر آنتی‌اکسیدانی نانوذرات اکسید روی سنتز شده در پژوهش حاضر به‌روش DPPH حاکی از آن است که با افزایش غلظت، درصد مهار افزایش می‌یابد. طبق مطالعه‌های گذشته، عصاره‌های گیاهی با مقادیر فنل بالا و پتانسیل واکنش‌های اکسیداسیون کاهش حاصل از آن‌ها، به‌عنوان عوامل کاهنده

۱۱-منابع

1. Comino-Sanz IM, López-Franco MD, Castro B, Pancorbo-Hidalgo PL. The role of antioxidants on wound healing: A review of the current evidence. *J. Clin. Med.* 2021;10(16):3558.
2. Mathew-Steiner SS, Roy S, Sen CK. Collagen in wound healing. *Bioeng.* 2021;8(5):63.
3. Abbasabadi OR, Farahpour MR, Tabatabaei ZG. Accelerative effect of nanohydrogels based on chitosan/ZnO incorporated with citral to heal the infected full-thickness wounds; an experimental study. *Int. J. Biol. Macromol.* 2022;217:42-54.
4. Saeed MA, Haque A, Ali A, Mohsin M, Bashir S, Tariq A, et al. A profile of drug resistance genes and integrons in *E. coli* causing surgical wound infections in the Faisalabad region of Pakistan. *J. Antibiot.* 2009;62(6):319-23.
5. Raizman R, Little W, Smith AC. Rapid diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* in wounds with point-of-care fluorescence imaging. *DX.* 2021;11(2):280.
6. Dunnill C, Patton T, Brennan J, Barrett J, Dryden M, Cooke J, et al. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *Int. Wound J.* 2017;14(1):89-96.
7. Bhatia KK, Puri S, Ahluwalia A. Efficacy and Safety of Spirulina in Biomedical Field: Evidence Based Critical Appraisal. *Int. J. Plant Res.* 2014:104.
8. Khorsandi K, Hosseinzadeh R, Esfahani H, Zandsalimi K, Shahidi FK, Abrahamse H. Accelerating skin regeneration and wound healing by controlled ROS from photodynamic treatment. *Inflamm. Regen.* 2022;42(1):1-20.
9. Ahmad S, Munir S, Zeb N, Ullah A, Khan B, Ali J, et al. Green nanotechnology: A review on green synthesis of silver nanoparticles—An ecofriendly approach. *Int J Nanomedicine.* 2019:5087-107.
10. Mohamed AA, Abu-Elghait M, Ahmed NE, Salem SS. Eco-friendly mycogenic synthesis of ZnO and CuO nanoparticles for in vitro antibacterial, antibiofilm, and antifungal applications. *Biol. Trace Elem. Res.* 2021;199:2788-99.
11. Salem SS, Fouda A. Green synthesis of metallic nanoparticles and their prospective biotechnological applications: an overview. *Biol. Trace Elem. Res.* 2021;199:344-70.
12. Husain S, Afreen S, Yasin D, Afzal B, Fatma T. Cyanobacteria as a bioreactor for synthesis of silver nanoparticles—an effect of different reaction conditions on the size of nanoparticles and their dye decolorization ability. *J. Microbiol. Methods.* 2019;162:77-82.
13. Asif N, Fatima S, Aziz MN, Zaki A, Fatma T. Biofabrication and characterization of cyanobacteria derived ZnO NPs for their bioactivity comparison with commercial chemically synthesized nanoparticles. *bioorg chem.* 2021;113:104999.
14. Qi K, Cheng B, Yu J, Ho W. Review on the improvement of the photocatalytic and antibacterial activities of ZnO. *J. Alloys Compd.* 2017;727:792-820.
15. Chen J, Jing Q, Xu Y, Lin Y, Mai Y, Chen L, et al. Functionalized zinc oxide microparticles for improving the antimicrobial effects of skin-care products and wound-care medicines. *Biomater. Adv.* 2022;135:212728.
16. Salehzadeh A, Naeemi AS, Khaknezhad L, Moradi-Shoeili Z, Shandiz SAS. Fe₃O₄/Ag nanocomposite biosynthesised using *Spirulina platensis* extract and its enhanced anticancer efficiency. *IET nanobiotechnology.* 2019;13(7):766-70.
17. Djearmane S, Lim YM, Wong LS, Lee PF. Cytotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on cyanobacterium *Spirulina (Arthrospira) platensis*. *PeerJ.* 2018;6:e4682.
18. Serrà A, Pip P, Gómez E, Philippe L. Efficient magnetic hybrid ZnO-based photocatalysts for visible-light-driven removal of toxic cyanobacteria blooms and cyanotoxins. *Appl. Catal. B: Environ.* 2020;268:118745.
19. Fadilah NIM, Phang SJ, Kamaruzaman N, Salleh A, Zawani M, Sanyal A, et al. Antioxidant biomaterials in cutaneous wound healing and tissue regeneration: A critical review. *Antioxid.* 2023;12(4):787.
20. Saqa NA, Khalil-Moghaddam S, Shahvelayati AS. DABCO-based ionic liquid-promoted synthesis of indeno-benzofurans derivatives: Investigation of antioxidant and antidiabetic activities. *Heterocycl. Commun.* 2022;28(1):164-73.
21. Manyasree D, Kiranmayi P, Venkata RK. Characterization and antibacterial activity of ZnO nanoparticles synthesized by co-precipitation method. *Int J App Pharm.* 2018;10(6):224-8.

22. Mohammadian M, Es'haghi Z, Hooshmand S. Green and chemical synthesis of zinc oxide nanoparticles and size evaluation by UV-vis spectroscopy. *J Nanomed Res.* 2018;7(1).
23. Aydin Acar C, Gencer MA, Pehlivanoglu S, Yesilot S, Donmez S. Green and eco-friendly biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using *Calendula officinalis* flower extract: Wound healing potential and antioxidant activity. *Int. Wound J.* 2023.
24. Panneerselvam A, Rajadurai V, Anguraj BL. Removal of nickel from aqueous solution using synthesized IL/ZnO NPs. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2020;27(24):29791-803.
25. Naser DK, Abbas AK, Aadim KA. Zeta potential of Ag, Cu, ZnO, CdO and Sn nanoparticles prepared by pulse laser ablation in liquid environment. *Iraqi J. Sci.* 2020;2570-81.
26. Abdollahzadeh E, Nematollahi A, Hosseini H. Composition of antimicrobial edible films and methods for assessing their antimicrobial activity: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 2021;110:291-303.
27. Mihăescu G. ZnO nanoparticles-modified dressings to inhibit wound pathogens. *Mater.* 2021;14:3084.
28. Kalpana V, Devi Rajeswari V. A review on green synthesis, biomedical applications, and toxicity studies of ZnO NPs. *Bioinorg. Chem.* 2018;2018.
29. Ebrahimi A, Farahpour MR, Amjadi S, Mohammadi M, Hamishehkar H. Nanoliposomal peptides derived from *Spirulina platensis* protein accelerate full-thickness wound healing. *Int. J. Pharm* 2023;630:122457.
30. Bhumi G, Savithramma N. Biological synthesis of zinc oxide nanoparticles from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Leaf extract and validation for antibacterial activity. *Int J Drug Dev Res.* 2014;6(1):208-14.
31. Santhoshkumar J, Kumar SV, Rajeshkumar S. Synthesis of zinc oxide nanoparticles using plant leaf extract against urinary tract infection pathogen. *Resource-Efficient Technologies.* 2017;3(4):459-65.
32. de Moura FBR, Ferreira BA, Muniz EH, Justino AB, Silva AG, de Azambuja Ribeiro RIM, et al. Antioxidant, anti-inflammatory, and wound healing effects of topical silver-doped zinc oxide and silver oxide nanocomposites. *Int. J. Pharm.* 2022;617:121620.
33. Sharma S, Kumar K, Thakur N, Chauhan S, Chauhan M. The effect of shape and size of ZnO nanoparticles on their antimicrobial and photocatalytic activities: a green approach. *Bull. Mater. Sci.* 2020;43:1-10.
34. Elumalai K, Velmurugan S. Green synthesis, characterization and antimicrobial activities of zinc oxide nanoparticles from the leaf extract of *Azadirachta indica* (L.). *Appl. Surf. Sci.* 2015;345:329-36.
35. Hameed H, Waheed A, Sharif MS, Saleem M, Afreen A, Tariq M, et al. Green synthesis of zinc oxide (ZnO) nanoparticles from green algae and their assessment in various biological applications. *Micromachines.* 2023;14(5):928.
36. Deng L, Du C, Song P, Chen T, Rui S, Armstrong DG et al. The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic wound healing. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2021;2021.
37. Suresh D, Nethravathi P, Kumar MP, Naika HR, Nagabhushana H, Sharma S. Chironji mediated facile green synthesis of ZnO nanoparticles and their photoluminescence, photodegradative, antimicrobial and antioxidant activities. *Mater. Sci. Semicond. Process.* 2015;40:759-65.
38. Lingaraju K, Raja Naika H, Manjunath K, Basavaraj R, Nagabhushana H, Nagaraju G, et al. Biogenic synthesis of zinc oxide nanoparticles using *Ruta graveolens* (L.) and their antibacterial and antioxidant activities. *Appl. Nanosci.* 2016;6:703-10.
39. Sharma A, Nagraik R, Sharma S, Sharma G, Pandey S, Azizov S, et al. Green synthesis of ZnO nanoparticles using *Ficus palmata*: Antioxidant, antibacterial and antidiabetic studies. *Results Chem.* 2022;4:100509.