PİSTACİA VERA L. BİTKİSİ DIŞ KABUĞU SU EKSTRAKTI KULLANILARAK GÜMÜŞ NANO PARTİKÜLLERİN YEŞİL SENTEZİ VE ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTELERİNİN TAYİNİ

UBAK 2019 Yalova / Türkiye 14–17 Şubat

Fatma Çiftçi[1], Mahmure Üstün Özgür[1], Mine Aydın Kurç[2]

[1]Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü 34220 Istanbul, Türkiye

[2]Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tekirdağ,Türkiye

ftm.ciftci@outlook.com
mozgurme@hotmail.com
mineaydines@gmail.com

ÖZET

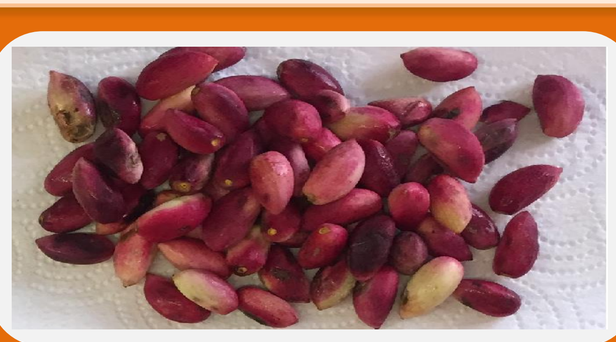
Bu çalışmada Pistacia Vera L. (Antep fıstığı) bitkisinin dış kabuk ekstresi(PVLDK) kullanılarak AgNP'lerin sentezi için çevre dostu bir yöntem sunulmaktadır. Biyosentez için belirlenen optimum koşullar; $AgNO_3$ çözeltisi konsantrasyonu: 10 mM, bitki ekstraktı hacmi: 0.5 mL ve reaksiyon süresi: 180 dk. Bu çalışmaya göre; PVLDK su ekstresinin 180 dk içerisinde 80 °C sıcaklıkta ve pH9 ortamında Ag iyonlarını AgNP'lere indirgediği reaksiyon sonucu gözlenen renk değişimiyle (açık kahverengiden koyu kahverengiye) izlendi. Sentezlenen AgNP'ler 416 nm'de verdikleri UV-Vis spektrum pikleri ile karakterize edildi ve uzun süre stabil kaldığı saptandı. AgNP'lerin karakterizasyonunu için TEM ve FT-IR analizleri yapıldı. FTIR ölçümleri, fenolik grupların AgNP'lerin sarılması ve stabilizasyonunda rol aldığını doğruladı ve TEM mikrografi AgNPler'in farklı şekillerde olduğunu gösterdi. Antibakteriyel çalışmalar sonucunda PVLDK su ekstraktında antimikrobiyal etki gözlenmemiş ve PVLDK su ekstraktı ile sentezlenen AgNP'lerin ise bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği saptanmıştır. Sonuçlar PVLDK ekstraktının antibakteriyel uygulamalar için iyi biyokaynak/biyomateryal olabileceğini göstermiştir. Bu çalışmada ayrıca PVLDK etanol ekstresinin antioksidan aktivitesi 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) yöntemi ile belirlenmiştir. BHT, BHA,Askorbik asit ve E vitamini gibi standartların antioksidan aktiviteleri ile karşılaştırıldığında sağlık açısından önemli bir antioksidan kaynağı olduğunu göstermiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Gümüş nanopartiküller, Pistacia Vera L. , Antep fıstığı, yeşil sentez, fenol grup, anti bakteriyel aktivite, antioksidan aktivite, DPPH

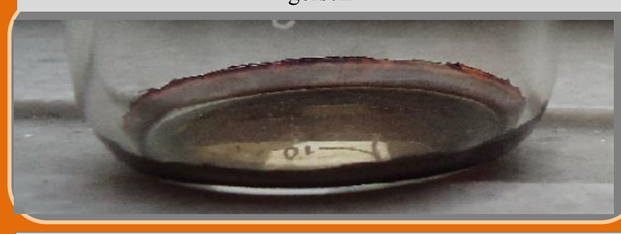
GİRİŞ

Yeşil kimya da denilen yeşil sentez yöntemi, metalik nanotaneciklerin sentezinde kullanılmaktadır. Metal nanopartiküllerin biyosentezinde bitki özütleri, maya, bakteri, mantar gibi maddeler indirgen olarak kullanılmaktadır. Yeşil sentez yöntemiyle metal nanopartikül sentezi, basit ve daha az toksik olması nedeniyle çevre dostu bir yöntemdir. Gümüş nanopartiküllerin (AgNP'ler) sentezi için birçok bitki, yeşil sentezde kullanılmıştır.

Pistascia Vera L. bitkisi (Antep fıstığı), 70 cins ve 500'den fazla türden oluşan Anacardiaceae familyasının bir üyesidir. Sağlıklı bir antep fıstığı, 10-11 m boyunda büyüyebilen ağaçlar da yetişir. Türkiye' de en çok Akdeniz VE Güneydoğu Anadolu Bölgeleri'nde görülmektedir. Romatizmal hastalıklar, ishal, hipertansiyon ve astım gibi çeşitli hastalıkların tedavisi için kullanılır. Antep fıstığı, zengin fenolik bileşikler içermektedir. En dış yüzeyindeki pembe kabuğu meyvesinden ayrılarak, atık olarak çıkarılmaktadır. Çalışmamız Pistascia Vera L. dış kabuk (PVLDK) su ekstresi kullanılarak AgNP'lerin sentezini ve bu nanopartiküllerin antibakteriyal özelliklerinin araştırılmasını içermektedir. Bu çalışmada ayrıca Pistascia Vera L. dış kabuğunun antioksidan ve antimikrobiyal etkileri de araştırıldı.



Şekil 1. Pistascia Vera L. bitkisinin tohum ve dış kabuğunun görseli



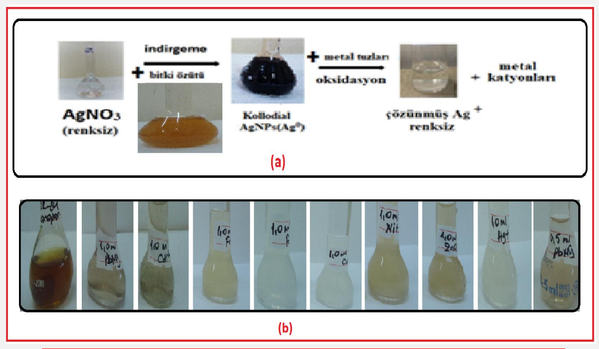
Şekil 2. PVLDK ile sentezlenen AgNP'lerin oluşturduğu gümüş aynası

MATERYAL ve METOD

Pistascia Vera L. (PVLDK) bitkisi Gaziantep-Birecik yöresinden Ağustos 2017 tarihinde temin edilmiş olup, pembe renkli dış kabuğu ayırılarak, deiyonize su ile yıkanarak kurutulup, küçük parçalar halinde kesildi (Şekil 1). Kurutulmuş olan materyal oda sıcaklığında, nemden uzak ve karanlık ortamda muhafaza edildi. 5 gram bitki örneği 100 ml distile suda oda koşullarında 3 saat boyunca manyetik karıştırıcıda bekletildi. Ekstrakt 5000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek, Whatman No:2 filtre kağıdından süzüldü ve AgNP sentezi için bir ay içinde kullanılmak üzere 4 °C'de karanlıkta saklandı. Etanol ekstraksiyonu için, 5'şer gram bitki örnekleri 150 ml etanol ile oda koşullarında 4 saat boyunca manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. Süzgeç kâğıdından süzüldü, elde edilen süzüntünün çözücüsü evaporatörde 40 ºC'de uçuruldu (Tawaha, 2007) Süzüntünün hacmi 50mL'ye tamamlanarak, analiz edilinceye kadar renkli şişelerde +4 ºC'de muhafaza edildi. Fenol içeriği ve antioksidan aktivite tayini için kullanıldı. AgNP'lerin verimli üretimi için reaksiyon, PVLDK ekstraktı ve 10mM AgN03'ün farklı hacim oranı kullanılarak izlendi. Reaksiyon, UV-Vis spektrumları alınarak farklı zaman aralıklarında 5 ila 180 dakika arasında takip edildi.

METAL TUZ ETKİSİ

PVLDK su ekstresi ile elde edilen AgNP'lerin metal iyonları varlığında sensör olarak kullanılmalarının araştırılmasına ait yapılan çalışmaya ait görsel Şekil 3'te verilmiştir. Hazırlanan AgNP'ler, 410 nm'de yüzey plazmon rezonans piki verirler ve koyu kahverengi bir renge sahiptir. Karışımdaki metal iyonlarının varlığı, AgNP'lerin Ag(I) iyonlarına oksidasyonuna bağlı olarak renginin açılmasına ve reaksiyon sonunda renksiz hale dönüşmesine neden oldu. AgNP'lerin çalışılan tüm metal iyonlarına duyarlı olduğu görüldü. Geliştirilen yöntem AgNP'lerin bu metallerin birarada niteliksel ve niceliksel analizi için düşük maliyetli sensör olarak kullanılabileceği konusunda ümit verici bir yöntem olabilir.(Şekil 3)



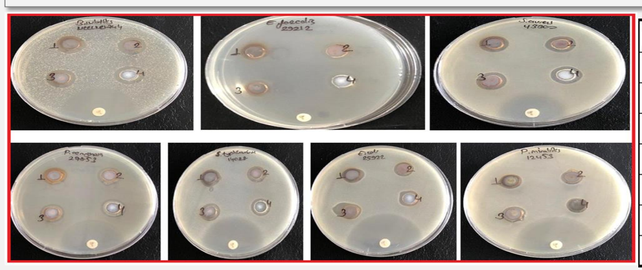
Şekil 3. **(a)** PVLDK ekstresi İle oluşan AgNP kolloidal çözeltileriyle metal iyonlarının tayinine ait şematik gösterim.
(b) PVLDK ekstresi İle oluşan AgNP kolloidal çözeltileriyle metal iyonlarının tayini deneyine ait çözeltilerin görselleri

DENEYSEL ÇALIŞMA

Bitki ekstraktından 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 1.0, 1.5, 2.0 ve 5.0 mL alınıp 10 mL'lik balon jojelere aktarıldı. 10 mM $AgNO_3$ ile hacimlerine tamamlanan çözeltilere manyetik karıştırıcıda 250 rpm hızda 5 saat karıştırma işlemi uygulandı ve her yarım saatte bir spektrofotometrede absorpsiyon spektrumları alındı. Tüm konsantrasyonların spektrum pikleri 436 nm'de gözlendi. Gümüş nanopartikül sentezine pH, sıcaklık ve süre etkisi, üç ayrı sıcaklık ve farklı pH aralıklarında deneyler tekrarlanarak saptandı. AgNP çözeltisi 0.1 N HCl ve 0.1 N NaOH ile istenilen pH(2-12) değerlerine ayarlandı. Sonuçlara göre ayrı ayrı pH9 ve pH10 değerleri için 40, 60, 80°C sıcaklık değerlerinde manyetik karıştıcıda 2 saat süre ile reaksiyonlar izlendi ve belirli süre aralıklarında alınan numunelerin , spektrofotometrede 400-800 nm dalga boyu aralığında absorpsiyon spektrumları kaydedildi. 180. dakikaya ait alınan absorpsiyon spektrumları ve absorbans değerleri Şekil 4 'de verilmiştir. PVLDK su ekstresinden elde edilen AgNP 'lerin varlığını belirten gümüş aynası görsel olarak Şekil 2' de gösterilmiştir. Ayrıca AgNP kolloidal çözetileriyle metal iyonlarının analizi için, optimum koşullarda taze hazırlanmış PVLDK AgNP çözeltisinden 0.5mL alınıp, üç ayrı cam 5mL'lik jojelere aktarıldı. Üzerlerine 1000 ppm konsantrasyonlarda hazırlanan metal tuzu çözeltilerinden (Cd^{+2}, Co^{+1}, Fe^{+2}, Fe^{+3}, Hg^{+1}, Ni^{+2}, Pb^{+2}, Zn^{+2},Cu^{+2}) sırasıyla 1.0 mL, 0.5 mL ve 0.25 mL eklendi ve distile su ile hacimlerine tamamlandı. Çözeltiler oda sıcaklığında 250 rpm hızda 1 saat inkübe edildikten sonra, UV-Vis spektrofotometre'sinde absorpsiyon spektrumları kaydedildi. Standartların ve numunelerin deneyleri, analitik performanslarını optimize etmek için aynı koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Aynı anda fotoğraflar dijital kamera ile çekilmiştir (Şekil 3). (M. Fırdaus Vd. 2017)

ANTİOKSİDAN VE ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİK

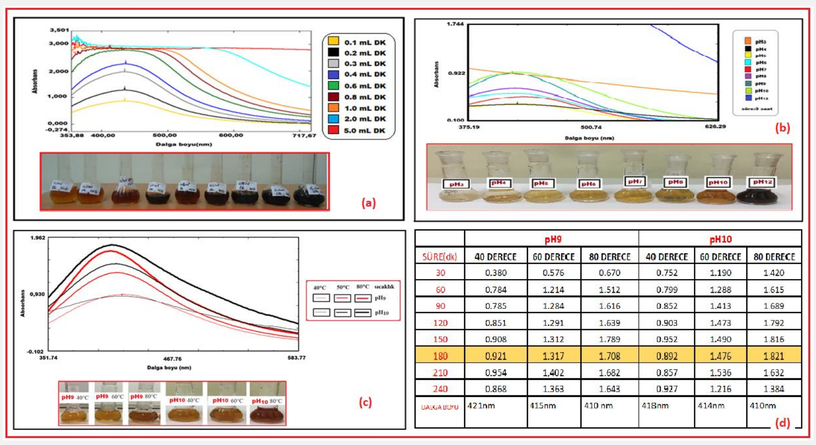
PVLDK su ekstresinden elde edilen ve AgNP' lerin antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon yöntemi modifiye edilerek çalışılmıştır.(Bauer AW.vd 1966) Antimikrobiyal aktivitelerin belirlenmesi için; gram pozitif bakterilerden Enterococcus faecalis (ATCC 29212), Staphylococcus aureus (ATCC 43300), Bacillus subtilis (NRRL NRS-744) ve gram negatif bakterilerden ise Escherichia coli (ATCC 25922), Proteus mirabilis (ATCC 12453), Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853) ve Salmonella typhimurium (ATCC 14028) standart suşları kullanılmıştır (Şekil 7). Ayrıca, PVLDK etanol ekstresinin antioksidan aktivitesi 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) yöntemi kullanılarak belirlendi. İyi bir indirgeme gücü aktivitesine sahip olduğu Toplam İndirgeme Gücü deneyi ile gözlemlendi. PVLDK etanol ekstraktının BHT, BHA, Askorbik asit ve E vitamini gibi standartların antioksidan aktivitesine oldukça yakın değerlere sahip olduğu gözlenmiş olup, doğal bir antioksidan madde olarak büyük bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir.



Mikroorganizma	3	4	CIP
B. subtilis	15	15	35
E. faecalis	13	12	17
S. aureus	14	14	20
P. aeruginosa	15	15	27
E. coli	13	13	25
S. typhimurium	14	13	25
P. mirabilis	12	11	27

Şekil 7 **PVLDK ekstresi İle oluşan AgNP (3) ve 10mM AgNO3 (4) çözeltisinin mikroorganizmalara karşı oluşturduğu inhibisyon zonlarına (mm). ait görsel**

UV-VİS SPEKTRUM ANALİZİ

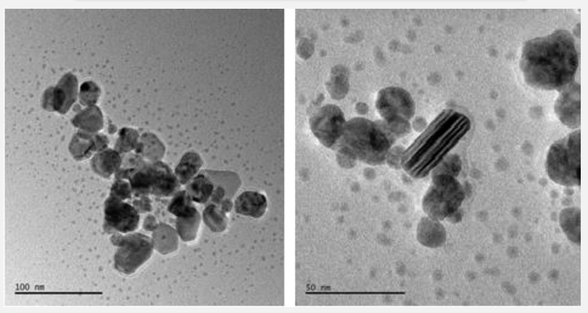


	pH9			pH10		
SÜRE(dk)	40 DERECE	60 DERECE	80 DERECE	40 DERECE	60 DERECE	80 DERECE
30	0.380	0.576	0.670	0.752	1.190	1.420
60	0.784	1.214	1.512	0.799	1.288	1.615
90	0.785	1.284	1.616	0.852	1.413	1.689
120	0.851	1.291	1.639	0.903	1.473	1.792
150	0.908	1.312	1.789	0.952	1.490	1.816
180	0.921	1.317	1.708	0.892	1.476	1.821
210	0.954	1.402	1.682	0.857	1.536	1.632
240	0.868	1.368	1.648	0.927	1.216	1.384
DALGA BOYU	421nm	415nm	410 nm	418nm	414nm	410nm

(d)

Şekil 4. **(a)** Farklı Konsantrasyonlarda (0.1 - 5.0 mL) PVLDK ekstresi ile hazırlanan AgNP çözeltilerine ait absorbsiyon spektrumları ve çözeltilerin görselleri **(b)** PVLDK ekstresi ile farklı pH değerlerinde sentezlenen AgNP çözeltilerine ait absorpsiyon spektrumları ve çözeltilerin görselleri
(c) PVLDK ekstresi ile pH_9 ve PH_6 ortamında hazırlanan AgNP çözeltilerinin – sıcaklık ve pH Değerlerine bağlı olarak alınan absorpsiyon spektrumları ve çözeltilere ait görseller (süre: 180dk) **(d)** PVLDK ekstresi ile pH_9 ve pH_{10} aralığında hazırlanan AgNP çözeltilerinin süre - sıcaklığa bağlı absorbans değerleri değişimi

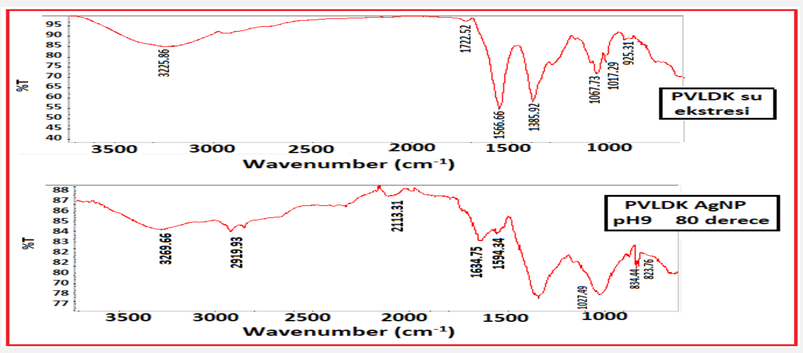
TEM (TRANSMİSYON ELEKTRON MİKROSKOBU) ANALİZİ



Şekil 6. **PVLDK AgNP'lerinin Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) Görüntüsü**

Nanopartiküllerin boyut ve morfolojik özelliklerini incelemek için transmisyon elektron mikroskobu (TEM) analizi yapılmıştır. Şekil 6, gümüş nanopartiküllerin TEM görüntüsünü göstermektedir. Sentezlenen naopartiküllerin belirli bir morfolojik şekilleri olmadığı (rod, tel, yuvarlak, köşeli gibi) ve değişik boyutlarda ve partiküllerin agrega halde olduğu görülmüştür.
Boyutlarının 100 nm'den daha küçük olduğu saptanmıştır.

FT-IR SPEKTROSKOPİSİ ANALİZİ



Şekil 5. **PVLDK su ekstresi ve AgNP'lerinin FTIR spektrumları**

SONUÇ

PVLDK AgNP'leri 400-450 nm aralığında yüzey plazmon rezonansı (SPR) tepe noktaları gösterdiler. Reaksiyon karışımının rengi ve SPR tepe noktalarının yoğunluğunun çözeltinin pH'ına bağlı olduğu gözlemlendi .(açık kahverengiden koyu kahverengiye). UV-Vis spektrumları AgNP'lerin pH9 ve pH10 değerleri için kararlı olduğunu göstermektedir (Şekil 4 (b),(c),(d)). PVLDK su ekstresindeki ve AgNP'lerdeki ana fonksiyonel grupları tespit etmek için alınan FT-IR spektrumları Şekil 5' de gösterilmiştir. PVLDK-su ekstresinde 3225 cm^{-1},1722 cm^{-1}, 1555 cm^{-1}, 1386 cm^{-1} ,1067 cm^{-1} , 1017 cm^{-1} ve 925 cm^{-1} ' de görülen bantlar, AgNP'lere ait FT-IR spektrumunda 3269 cm^{-1},2919 cm^{-1}, 2113 cm^{-1}, 1634 cm^{-1}, 1549 cm^{-1},1027 cm^{-1} ve 834 cm^{-1}' de görülmektedir. PVLDK-su ekstresinin ve AgNP'lerin FT-IR spektrumunda sırasıyla 3225, 3269 cm^{-1}'de görülen geniş bandlar polifenoliklerin ve alkollerin hidroksil fonksiyonel grubuna karşılık gelir. 3266 cm^{-1}'deki yoğun geniş-OH gerilme bandı, Ag^{+1} in Ag^{0} ' a indirgenmesinden sorumlu olabilecek fenolik bileşiklerde hidroksil fonksiyonel grubunun (-OH, –COOH) bulunduğunu doğrular. AgNP' durumunda, azalmış bant yoğunluğu (-OH gerilme bandı) ve küçük bir kayma indirgeme işlemi sırasında -OH gruplarının tüketimini göstermektedir. AgNP'lere ait spektrumda nanopartikülleri saran ve kararlı olmasını sağlayan maddelerin varlığını gösteren 3269 cm^{-1}, 1634 cm^{-1}, ve 1027 cm^{-1}'de absorpsiyon pikleri gözlendi. 3269 cm^{-1} de görülen pik fenolik veya amid N-H gruplarına, 1634 cm-1'de görülen pik O-H gerilme bandı olup ,bitki ekstraktında bulunan glikozit veya diğer (C-O-C) gruplarına ait 1032 cm^{-1}'de gözlenen son önemli pikdir. Flavonoidler, triterpenoidler gibi farklı kimyasal sınıflarda bulunan C-O, N-H ve C-N gibi ana fonksiyonel gruplar, (bitki ekstraktında bulunan polifenoller, proteinler ve pigmentler) Ag^{+1} 'in AgNP'lere biyolojik olarak azaltılmasından sorumludur.

TARTIŞMA

Metalik nanoparçacıklar sentezlemek için bitki özlerinin kullanımı ucuz olup kolayca ölçeklendirilir ve çevre dostudur. Gümüş nanopartiküller, antimikrobiyal, elektronik, katalitik ve çeşitli biyomedikal uygulamalar gibi çeşitli uygulamalar için en çekici nano malzemelerden biridir. Bu çalışmada, DK-su ekstraktını kullanarak Ag-NP'lerin sentezi için çevre dostu yeşil nanoteknolojik bir yöntem geliştirildi. Pistascia Vera L. Dış kabukları gibi yeşil kaynakları kullanan Ag-NP'lerin biyosentezi kimyasal senteze iyi bir alternatiftir, çünkü yeşil sentez kirletici değildir, toksik kimyasalları kullanmaz ve çevrecidir.

KAYNAKLAR

- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disc Method. Am J Clin Pathol. 1966;45(4):493-6.
- Firdaus M. ve arkadaşları 2017-Green synthesis of silver nanoparticles using Carica Papaya fruit extract under sunlight irradiation and their colorimetric detection of mercury ions *J. Phys.: Conf. Ser.* **817** 012029
- Kumar V, Yadav SK. (2009) :Plant-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications. J Chem Technol Biotechnol 84:151–7.
- Oyaızu M., (1986): "Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine." Japan Journal of Nutrition, 44, 307-315. 211.
- Tawaha K., Alalı Q., Gharaıbeh M., Mohammad M., El-elımat T.,(2007). Antioxidant activity and total phenolic of selected Jordanian plant species, Food Chemistry, 104, 1372-1378