

سنتز سبز و بهینه‌سازی نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم توسط عصاره آلوئه‌ورا جهت کاربردهای زیست‌پزشکی

سهیل نظری‌مقدم، شیدا لباف، مریم کرباسی و مهسا محمدزاده

دانشکده مهندسی مواد، دانشگاه صنعتی اصفهان، ۸۳۱۱۱-۸۴۱۵۶ ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۵/۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۷/۲۴)

<https://doi.org/10.47176/jame.43.4.1069>

چکیده: نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم به دلیل خواص زیست‌سازگاری، استحکام مکانیکی، خواص فتوکاتالیستی و مقرون‌به‌صرفه بودن برای کاربردهای زیستی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در این پژوهش، ابتدا سنتز سبز و بهینه‌سازی پارامترهای سنتز نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم به‌وسیله عصاره آلوئه‌ورا مورد بررسی قرار گرفت که پارامترهای سنتز شامل غلظت پیش‌ماده دی‌اکسیدتیتانیوم، حلال (آب دیونیزه) و عصاره آلوئه‌ورا می‌باشد. پس از انجام موفقیت‌آمیز سنتز نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم، به بررسی و مشخصه‌یابی آن‌ها توسط روش‌های مشخصه‌یابی پرداخته شد. بر روی نمونه‌های سنتز شده، پراش پرتو ایکس، طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ، طیف‌سنجی فرابنفش-مرئی، پتانسیل-زنا، میکروسکوپ الکترونی روبشی و در نهایت آزمون تجزیه و تحلیل پراکندگی انرژی پرتو ایکس انجام شد. نتایج نشان داد که نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم سنتز شده در فاز کریستالی آناناز تشکیل شده‌اند. همچنین طبق تصاویر میکروسکوپی الکترونی، اکثر نمونه‌های نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم سنتز شده، به شکل کروی و در اندازه 5 ± 31 نانومتر بودند. نتایج آزمون طیف‌سنجی فرابنفش-مرئی نشان داد تمامی نمونه‌ها در محدوده نور فرابنفش و مرئی جذب داشتند. پس از انجام آزمون‌های مشخصه‌یابی و بررسی نتایج آن، نمونه بهینه از نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم سنتز شده، انتخاب شد. در نهایت برای بررسی خواص زیستی نانوذرات بهینه دی‌اکسیدتیتانیوم، آزمون سمیت سلولی با استفاده از سلول‌های فیبروبلاست (L929) به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. نتایج نشان داد که نانوذرات بهینه دی‌اکسیدتیتانیوم، سمیت سلولی نداشته و برای کاربردهای زیستی مناسب است.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات، دی‌اکسیدتیتانیوم، زیست‌سازگاری، سنتز سبز، سمیت سلولی.

Green Synthesis and Optimization of Titanium Dioxide Nanoparticles Using Aloe Vera Extract for Biomedical Applications

S. NazariMoghaddam*, S. Labbf, M. Karbsi and M. Mohammadzadeh

Department of Materials Engineering, Isfahan University of Technology, Isfahan 84156-83111, Iran

ABSTRACT

Titanium dioxide nanoparticles have been attention due to their biocompatibility, mechanical strength, photocatalytic properties, and affordability. In this research, green synthesis and optimization of the synthesis parameters of titanium dioxide nanoparticles by means of aloe vera extract were investigated. The synthesis parameters include the concentration of titanium dioxide precursor, solvent (deionized water), and aloe vera extract. Upon synthesis of titanium dioxide nanoparticles, a range of techniques were employed to characterize the resultant structure. These tests include X-ray diffraction, fourier transform infrared spectroscopy, ultraviolet-visible spectroscopy, zeta potential, scanning electron microscope, and X-ray energy dispersive analysis. The results showed that the synthesized titanium dioxide nanoparticles were formed in the crystalline phase of anatase. Also, according to the SEM images, titanium dioxide nanoparticles were spherical in shape with the size range of 31 ± 5 nm. The results of the ultraviolet-visible spectroscopy showed that all samples were in the ultraviolet and visible light ranges. The optimal sample of synthesized titanium dioxide nanoparticles was selected after accomplishment of the characterization tests. Cytotoxicity test was performed on fibroblast cells (L929) for 24 hours to investigate the biological performance of the optimized titanium dioxide nanoparticles. The results revealed the non-cytotoxic nature of titanium dioxide nanoparticles, further confirming their potential for medical applications.

Keywords: Nanoparticles, Titanium dioxide, Biocompatibility, Green synthesis, Cytotoxicity.

۱- مقدمه

پیشرفت سریع در تحقیقات نانومواد^۱، روش‌های جدید تشخیصی و درمان بیماری‌ها را توسعه داده که در این راستا کاهش اندازه مواد منجر به افزایش نسبت سطح به حجم و در نتیجه افزایش فعالیت سطحی می‌شود. نانومواد به دلیل خواص منحصر به فرد خود در مقیاس اتمی یا مولکولی، در کاربردهایی از جمله اپتیک، الکترونیک، دستگاه‌های الکترونیک نوری و کاربردهای مختلف زیست پزشکی مانند افزایش قابلیت پرتودرمانی، تحویل ژن، تصویربرداری نوری و برچسب‌گذاری سامانه‌های بیولوژیکی، تحویل دارو و مهندسی بافت نقش مهمی را ایفا می‌کند (۱ و ۲).

اگرچه بیشتر رویکردهای نانوتکنولوژی در مرحله تحقیق یا توسعه هستند، اما برخی از آن‌ها به مرحله بالینی رسیده‌اند و در حال حاضر در بازار موجود هستند (۳). در این بین نانوذرات فلزی و اکسیدهای فلزی توجه بسیاری را به خود جلب کرده‌اند. این نانوذرات کاربردهای زیست پزشکی متنوعی دارند، یعنی استفاده از آن‌ها در تشخیص‌های بسیار حساس، تحویل

دارو و مواد ژنتیکی، فرسایش حرارتی و همچنین در افزایش اثر پرتودرمانی نیز مؤثر هستند (۴). این نانوذرات دارای نسبت سطح به حجم بالا، خواص نوری وسیع، سنتز آسان هستند و شیمی سطح و عملکرد آن‌ها نقش مهمی در زمینه بالینی و درمانی ایفا می‌کنند (۴). امروزه بسیاری از انواع این نانوذرات در حال آزمایش هستند که به نظر می‌رسد نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم^۲ توجه زیادی را به خود جلب کرده است که می‌توان به خواص شیمیایی و فیزیکی منحصر به فرد آن نسبت داد. از جمله خواص مطلوب نانوذرات TiO_2 می‌توان به زیست سازگاری، استحکام شکست، مساحت سطح، ثابت دی‌الکتریک، خاصیت فتوکاتالیستی قابل توجه و همچنین مقرون به صرفه بودن اشاره کرد (۵ و ۶). علاوه بر این، نانوذرات TiO_2 به طور گسترده در بسیاری از زمینه‌ها کاربرد دارند که شامل کاربرد در نانوپزشکی، ترکیبات ضدباکتری، در لوازم آرایشی، تصفیه فاضلاب، سلول‌های خورشیدی و مواد غذایی است (۶ و ۷). از جمله خواص بسیار مهم نانوذرات TiO_2 کاربرد در علم نانوپزشکی است که به دلیل جذب بالا در ناحیه نور فرابنفش و

روش سنتز سبز تولید کردند که در محدوده اندازه ۱۲۳-۷۵ نانومتر بود. در ادامه با ترکیب آن در ژل کیتوزان، یک نمونه برای ترمیم زخم‌های دیابتی ساختند که بر ترمیم زخم موش‌های دیابتی اثر مثبتی داشت. راجکوماری و همکاران (۱۵)، با استفاده از عصاره آبی برگ آلون‌باربادنسیس، نانوذرات TiO_2 را سنتز کردند که نانوذرات سنتز زیستی شده به صورت پراکنده، کروی شکل و در اندازه متوسط ۲۰ نانومتر بودند. هدف از تولید این نانوذرات، استفاده به عنوان عامل کنترل عفونت‌های باکتریایی بوده است. آراویند و همکاران (۱۶)، مقایسه‌ای بین نانوذرات TiO_2 سنتز سبز شده با نانوذراتی که به روش شیمیایی هیدروترمال سنتز شدند را انجام دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که نانوذرات TiO_2 که به روش سنتز سبز تولید شدند، نسبت به سنتز نانوذرات به روش شیمیایی، فعالیت‌های بیولوژیکی آن‌ها افزایش یافته است. آجمال و همکاران (۱۷)، سنتز سبز نانوذرات TiO_2 را با استفاده از عصاره متانولی از ضایعات پوست میوه‌های آلو، کیوی و هلو گزارش کردند. استفاده از مواد زائد کشاورزی مانند پوست میوه‌ها به سمت سنتز زیستی نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم مطمئناً یک رویکرد سازگار با محیط زیست بوده و مقرون به صرفه است. نتایج آزمون آنتی‌اکسیدان نشان داد که تمامی نمونه‌ها دارای خواص آنتی‌اکسیدانی مناسبی بوده‌اند و در بین نمونه‌ها، نانوذرات سنتز شده با عصاره پوست آلو بیش‌ترین مقدار از خواص آنتی‌اکسیدان را داشته است.

با توجه به این‌که کارهای پژوهشی گسترده‌ای در حوزه سنتز سبز انجام شده است، طبق مطالعات صورت گرفته تاکنون کار پژوهشی که به بهینه‌سازی مقدار و غلظت واکنشگرهای سنتز و تهیه ساختارهای نانو، به‌طور جامع نپرداخته است. در این مطالعه، تأثیر پارامترهای سنتز سبز بر مورفولوژی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم با استفاده از عصاره آلون‌ورا مورد بررسی قرار گرفته است. پس از انجام فرایند سنتز نانوذرات، با تحلیل و مقایسه پارامترهای مختلف مربوط به سنتز سبز، نتایج حاصل از آزمون‌های تشخیصی مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. این ارزیابی

خواص فتوکاتالیستی مناسبی که در فاز آاناتاز دارد، TiO_2 نه تنها می‌تواند به عنوان یک حساس‌کننده به نور^۳ برای تولید گونه‌های اکسیژن فعال^۴، سمیت سلولی را اعمال کند، بلکه به عنوان یک عامل نورگرمایی^۵ برای تبدیل انرژی لیزر به هایپرترمی^۶ نیز می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (۶، ۸ و ۹).

نانوذرات TiO_2 را به روش‌های مختلفی می‌توان سنتز کرد. از جمله این روش‌ها سل-ژل، هیدروترمال، سنتز سبز و غیره می‌باشد. یکی از پرکاربردترین روش‌ها، روش سل-ژل است که در این روش از هیدرولیز و به دنبال آن پلیمریزاسیون پیش‌سازهای تیتانیوم، سل یا سوسپانسیون کلوئیدی ساخته می‌شود، سل مایع با پلیمریزاسیون کامل و حذف حلال، به ژل تبدیل می‌شود (۱۰). در روش سنتز هیدروترمال، نانوذرات با حلال‌های فوق گرم در اتوکلاوهای فشار بالا ساخته می‌شوند. واکنش‌دهنده‌ها حلالیت و واکنش‌پذیری را در دما و فشار بالا افزایش می‌دهند و می‌توانند ذرات با بلورینگی بالا را تشکیل دهند (۱۱). با این حال روش‌های سل-ژل و هیدروترمال نیاز به صرف زمان و هزینه زیادی دارند و همه آن‌ها برای تکمیل پروسه سنتز به دمای بالا، فشار و عوامل شیمیایی مضر برای محیط زیست، نیاز دارند که تولید و کاربردهای زیستی و دارویی بالقوه آن‌ها را محدود می‌کند. از این نظر، سنتز سبز می‌تواند روشی برای غلبه بر چالش‌های مطرح شده باشد. فناوری‌های سنتز سبز ساده‌تر، پایدارتر و مقرون به صرفه‌تر برای سنتز نانوذرات در مقیاس بالا است. طیف وسیعی از عوامل کاهنده طبیعی شامل گیاهان و عصاره آن‌ها، پروتئین‌ها، آنزیم‌ها، باکتری‌ها در سنتز سبز نانوذرات TiO_2 دخیل هستند. عصاره‌های گیاهی به عنوان عوامل کاهنده و پایدارکننده عمل می‌کنند و از همان عوامل می‌توان برای ساخت انواع نانوذرات استفاده کرد. عصاره‌های گیاهی که در سنتز نانوذرات استفاده می‌شود می‌تواند از برگ، ریشه، میوه، دانه گیاهانی همچون اکلیپتا پروستراتا^۷، زردچوبه بلند^۸، پسیدیوم گوجاوا^۹، برگ حرا، آلون‌ورا باشند (۱۰، ۱۲ و ۱۳). در پژوهشی احمد و همکاران (۱۴)، با استفاده از عصاره برگ ریحان^{۱۰} نانوذرات TiO_2 را به



شکل ۱- تصاویری از عصاره آلوئه‌ورا.

از تکه‌های برگ آلوئه‌ورا به آن اضافه گردید که حدود ۲/۵ ساعت تحت دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار داشت. سپس عصاره به‌دست‌آمده با کاغذ صافی واتمن ۱- فیلتر شده و در یخچال نگهداری شد. در شکل (۱) تصویری از عصاره آلوئه‌ورا تولیدشده، نشان داده شده است.

۲-۳- سنتز نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم با عصاره آلوئه‌ورا

برای سنتز نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم، ابتدا در یک بشر ۱۵۰ میلی‌لیتری، مقدار ۶ میلی‌لیتر محلول تیتانیوم تترا ایزو پروپوکساید که با آب دیونیزه رقیق شده است (طبق جدول ۱ هر کدام از نمونه‌ها دارای غلظت مشخصی هستند)، ریخته شد که به مدت ۱۵ دقیقه روی همزن مغناطیسی (۳۰۰ دور در دقیقه، دمای محیط) هم زده شد. سپس طبق جدول (۱)، مقدار مشخصی از آب دیونیزه به‌عنوان حلال به محلول TTIP رقیق‌شده، افزوده شد و پس از آن از عصاره آلوئه‌ورا به‌صورت قطره‌ای به محلول اضافه شد که به مدت چهار ساعت هم زده شدند. سپس نمونه را در فالكون‌های ۱۵ ریخته و در سانتریفیوژ با دور ۵۰۰۰ بر دقیقه و به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. ذرات جمع‌شده در انتهای فالكون‌ها را در بوتله چینی ریخته و به مدت حدوداً ۱۹-۱۷ ساعت در آن گذاشته شد تا ذرات خشک شوند. درنهایت نمونه، در کوره به مدت چهار ساعت در دمای ۵۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا کلسینه شوند. روند سنتز سبز نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم، براساس مقاله خدر و همکاران (۱۹)، انجام شد. در شکل (۲)، تصاویری از نانوذرات سنتز شده

شامل بررسی شکل ساختاری، توزیع اندازه نانوذرات، میزان جذب نور و سایر خصوصیات می‌باشد. هدف از این بررسی‌ها، انتخاب نمونه‌ای با خواص بهینه است. درنهایت، خاصیت زیستی نانوذرات از طریق آزمون سمیت سلولی ارزیابی شده است.

۲- مواد و روش تحقیق

۲-۱- مواد و تجهیزات

تیتانیوم تترا ایزو پروپوکساید^{۱۱} با خلوص بیش از ۹۸ درصد، وزن مولکولی ۲۸۴/۲۵ گرم بر مول، برند TetraChem به‌عنوان پیش‌ماده برای سنتز نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم خریداری شد. برگ‌های تازه آلوئه‌ورا گلخانه‌ای جهت عصاره‌گیری خریداری شد. آب دیونیزه نیز به‌عنوان حلال پیش‌ماده دی‌اکسیدتیتانیوم و همچنین در مراحل مختلف سنتز استفاده شد.

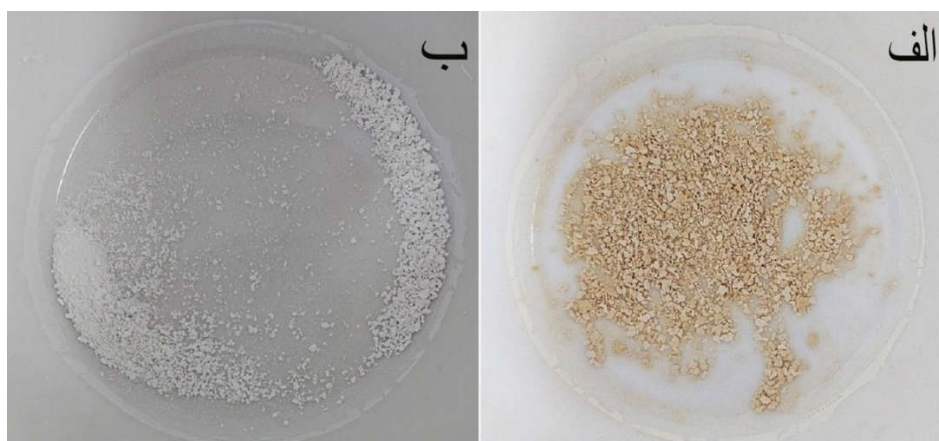
برای شناسایی و بررسی نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم سنتز شده از تجهیزات (Philips Xpert- MPD system, (Netherlands), (Tensor 27, Germany), (RAYLEIGH.), (UV-2601, China), (nanopartica sz-100v2, Netherlands) و (FEI Quanta 200 ESEM, USA) به‌ترتیب برای آزمون‌های پراش پرتو ایکس^{۱۲}، طیف‌سنجی تبدیل فوریه فرسرخ^{۱۳}، طیف‌سنجی فرابنفش-مرئی^{۱۴}، پتانسیل-زتا^{۱۵}، میکروسکوپ الکترونی روبشی^{۱۶} و تجزیه و تحلیل پراکندگی انرژی پرتو ایکس^{۱۷} استفاده شد.

۲-۲- عصاره‌گیری از برگ آلوئه‌ورا

برای انجام سنتز نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم به روش سنتز سبز از طریق عصاره آلوئه‌ورا، نیاز به عصاره‌گیری از برگ آلوئه‌ورا است. روش عصاره‌گیری با الگوبرداری از مقاله اکامبارام و همکاران (۱۸)، انجام شده است. به این منظور، ابتدا یک حمام آب در یک بشر ۶۰۰ میلی‌لیتری که داخل آن، یک بشر ۱۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه آماده شد که تحت دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در ادامه مقدار ۲۶ گرم

جدول ۱- مقادیر مختلف پارامترهای سنتز سبز دی‌اکسیدتیتانیوم

نمونه‌ها	(مولاریته) TTIP	آب دیونیزه (میلی لیتر)	عصاره آلوئه‌ورا (میلی لیتر)
۱	۶(۰.۱)	۲۰	۱۰
۲	۶(۰.۱)	۲۰	۴۰
۳	۶(۰.۱)	۱۰	۲۰
۴	۶(۰.۱)	۴۰	۲۰
۵	۶(۰.۰۸۳)	۱۰	۲۰
۶	۶(۰.۰۸۳)	۴۰	۲۰



شکل ۲- تصاویر یک نمونه از نانوذرات سنتز شده دی‌اکسیدتیتانیوم که قسمت الف، نانوذرات خشک شده از طریق آون که به رنگ زرد دیده می‌شوند. در قسمت ب، نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم سنتز شده را پس از کلسینه شدن در کوره که به رنگ سفید دیده می‌شوند، نشان داده است.

مورفولوژی (شکل و اندازه) نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم، تصاویری توسط دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی گرفته شد. بررسی عنصری نمونه با استفاده از تجزیه و تحلیل پراکندگی انرژی پرتو ایکس صورت گرفت. بار سطحی نانوذرات هم با استفاده از پتانسیل-زتا بررسی شد.

۲-۵- آزمون MTT Assay

برای بررسی میزان سمیت سلولی، آزمون MTT cytotoxicity test مطابق استاندارد ISO 10993-5:2009، انجام شد. نانوذرات TiO_2 ابتدا به وسیله نور UV استریل شدند و سپس با سه تکرار به همراه نمونه کنترل، مورد آزمون قرار گرفتند. برای انجام آزمون، ابتدا به میزان (5×10^4) نمونه سلولی فیروبللاست

نشان داده شده است. سنتز نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در پارامترهای مختلف که در جدول (۱) نشان داده شده است، انجام شد.

۲-۴- شناسایی نانوذرات

پراش پرتو ایکس با استفاده از پراش سنج اشعه ایکس با تابش $\text{CuK}\alpha$ ، طول موج ($\lambda=1.5405\text{\AA}$) در محدوده ($20^\circ \leq 2\theta \leq 80^\circ$) زاویه براگ انجام شد. اندازه‌گیری‌های طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ برای بررسی پیوندهای شیمیایی انجام شد. طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش در محدوده ۲۰۰-۷۰۰ نانومتر برای بررسی طیف جذب نانوذرات انجام شد. در این آزمون از آب دیونیزه به عنوان نمونه کنترل برای دستگاه استفاده شد. برای بررسی

در تصاویر ناخالصی‌های در اندازه بزرگ هم دیده می‌شود. در مجموع به نظر می‌رسد نمونه‌های (الف، ب) دارای شکل، ساختار و توزیع اندازه ذرات بسیار بهتری نسبت به نمونه‌های دیگر می‌باشند. این نمونه‌ها دارای مولاریته (۰/۱M) و مقدار حلال (آب دیونیزه) یکسان هستند و تنها تفاوت آن‌ها در مقدار عصاره افزوده‌شده در مراحل سنتز سبز است. این مورد نشان داد که مقدار حلال عامل کلیدی تری نسبت به مقدار عصاره در ایجاد ساختار مناسب و همگن نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم است. در حالی که در نمونه‌های (ج، د) با کاهش و افزایش مقدار حلال، نانوذرات سنتز شده دارای ساختار آگلومره هستند. در نمونه‌های (ه، و) با تغییر مقدار مولاریته پیش‌ماده دی‌اکسیدتیتانیوم (TTIP) به کل نانوذرات سنتز شده بسیار آگلومره نسبت به نمونه‌های (الف-د) هستند. البته در نمونه (و) با بالاتر بردن مقدار حلال نسبت به نمونه (ه)، به نظر می‌رسد که ساختار بسیار بهتر و منظم‌تری به دست آمده است.

باین‌حال، بر اساس نتایج این آزمون به نظر می‌رسد که روش سنتز سبز نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم از طریق عصاره آلوئه‌ورا در اکثر نمونه‌ها موفقیت‌آمیز بوده است و با تغییر مقادیر پارامترهای سنتز، بهترین شکل، ساختار و اندازه نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در نظر گرفته شد. در نهایت بر اساس نتایج نمونه (الف) که دارای ذرات کروی شکل و یکنواخت با اندازه ذرات $(5/89 \pm 31/18)$ بود و همچنین جذب خوبی در ناحیه نور فرابنفش و مرئی داشت (طبق شکل ۴)، به‌عنوان نمونه بهینه این آزمون انتخاب گردید.

آزمون UV-Vis جهت بررسی و مقایسه میزان جذب نور در نواحی مشخص نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم سنتز شده (هر شش نمونه طبق جدول ۱) انجام شد. نتایج این آزمون به‌صورت طیف در محدوده ۷۰۰-۲۰۰ نانومتر در شکل (۴) نشان داده شده است.

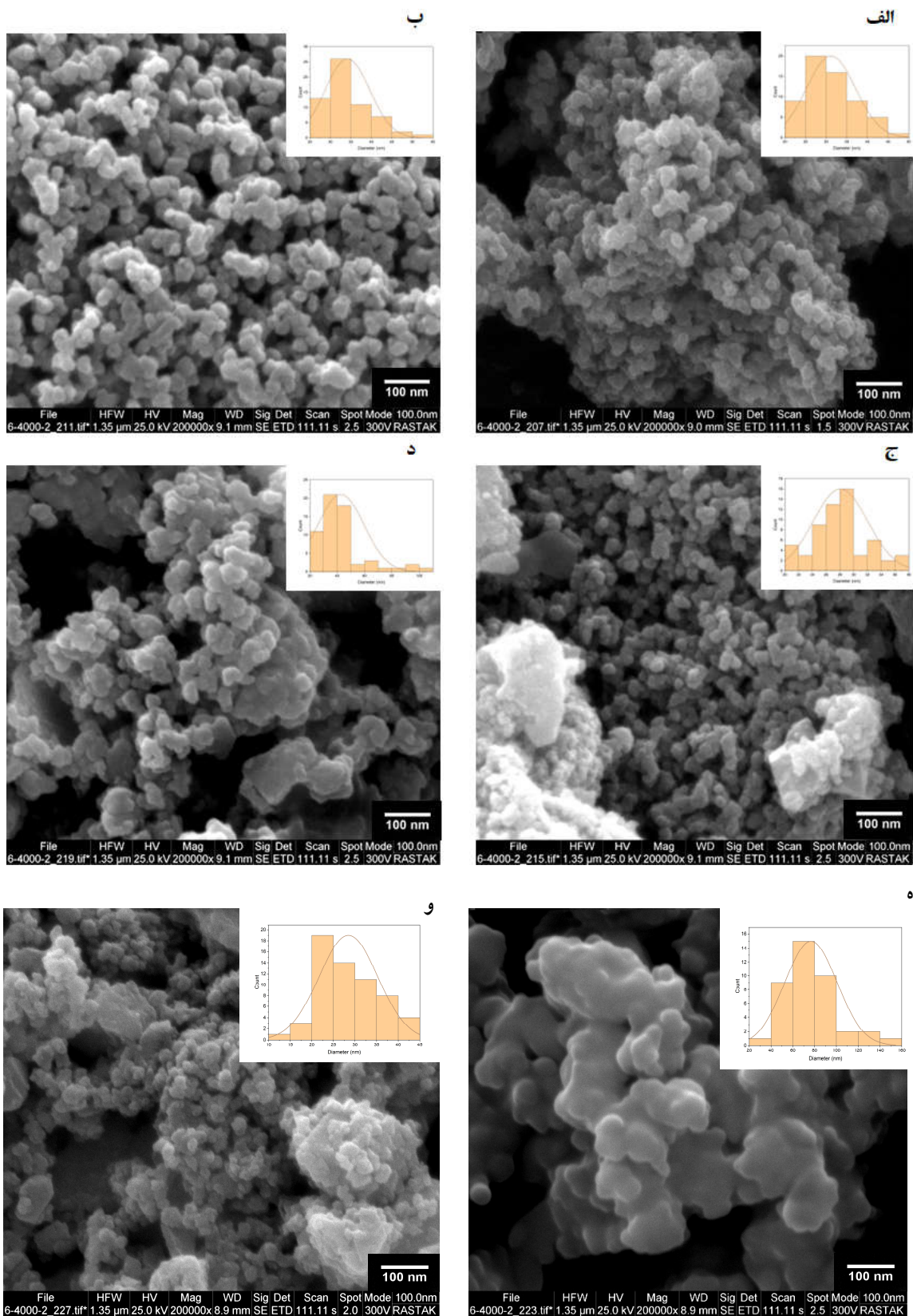
تمامی نمونه‌ها در محدوده نور UV جذب قوی داشتند. در حالی که در تمامی آن‌ها جذب در ناحیه مرئی حتی مقدار جذب کم نیز دیده می‌شود که نشان از حل مشکلات استفاده از

(L929) با محیط کشت DMEM^{۱۸} (همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی^{۱۹}، یک درصد پنی‌سیلین و استروپتومایسین) درون چاهک‌های ظرف کشت با سه تکرار ریخته شد و نانوذرات با سه تکرار در چاهک‌ها قرار داده شدند. سپس در مدت‌زمان یک شبانه‌روز در انکوباتور حاوی پنج درصد گاز دی‌اکسیدکربن و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا سلول‌ها به‌وسیله آن‌ها تیمار شوند. پس از گذشت مدت‌زمان مذکور، به میزان ۱۰۰ میکرولیتر رنگ MTT با غلظت پنج میکروگرم بر میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شد. پس از گذشت سه ساعت رنگ MTT چاهک‌ها خارج شد و حلال دی‌متیل سولفوکساید^{۲۰} به تمامی چاهک‌ها اضافه گردید تا بلورهای بنفش‌رنگ تشکیل شده، به‌صورت کامل حل شوند. در پایان مقدار رنگ حل‌شده در حلال DMSO با استفاده از دستگاه الیزا محاسبه شد. چاهک‌هایی که دارای سلول زنده هستند چگالی نوری^{۲۱} بالاتری نسبت به چاهک‌های با سلول مرده از خود نشان می‌دهند؛ بنابراین با درصدگیری از تقسیم چگالی نوری چاهک‌های نمونه مورد آزمون بر چاهک‌های نمونه کنترل میزان زندمانی سلول محاسبه می‌گردد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- شناسایی نانوذرات TiO₂

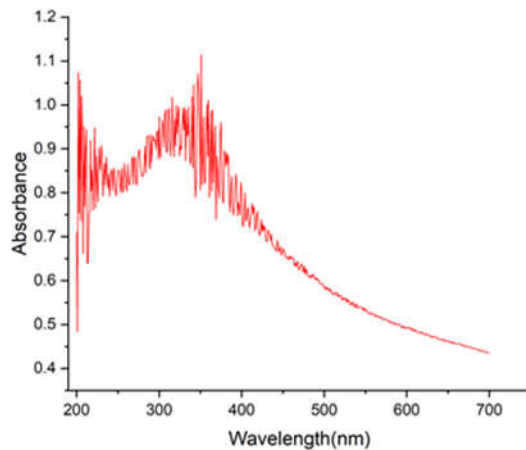
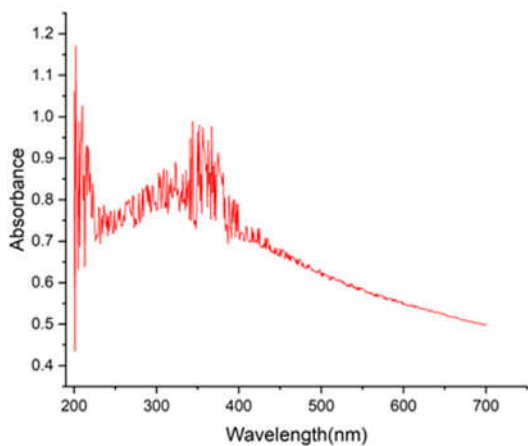
شکل (۳)، تصاویر و نمودارهای توزیع ذرات نمونه‌های (۱) تا (۶) نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم که توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی گرفته شده است را نشان داده است. تقریباً در تمامی تصاویر، کروی بودن نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم دیده می‌شود. توزیع اندازه ذرات در نمونه‌های (الف-و) به‌ترتیب در اندازه‌های 5 ± 31 نانومتر، 5 ± 34 نانومتر، 3 ± 28 نانومتر، 16 ± 42 نانومتر، 23 ± 76 نانومتر و 6 ± 28 نانومتر است. شکل نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم با پژوهش احمد و همکاران (۲۲) که نانوذرات را به روش سل-ژل تولید کردند، مطابقت داشت، با این تفاوت که اندازه نانوذرات آن‌ها بالاتر از ۱۰۰ نانومتر بود. با این‌که نمونه‌های (ج، و) کم‌ترین میزان اندازه ذرات را دارند، اما



شکل ۳- تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی از نمونه‌های نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم به همراه نمودارهای توزیع اندازه ذرات آن‌ها نشان داده شده است. تصاویر الف تا و به ترتیب مربوط به نمونه‌های ۱ تا ۶ نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم سنتز شده، طبق جدول (۱)، می‌باشد.

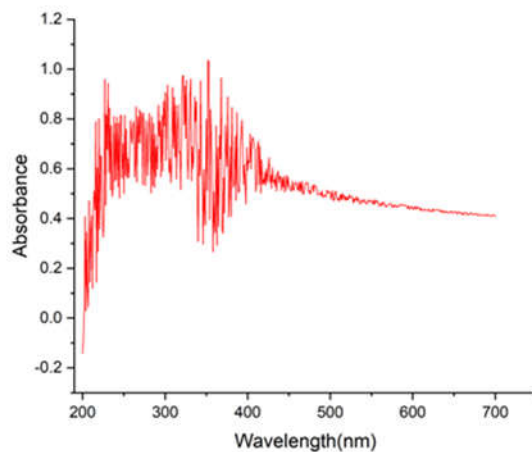
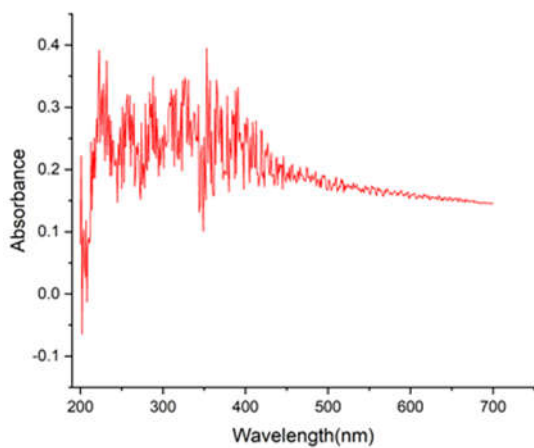
الف

ب



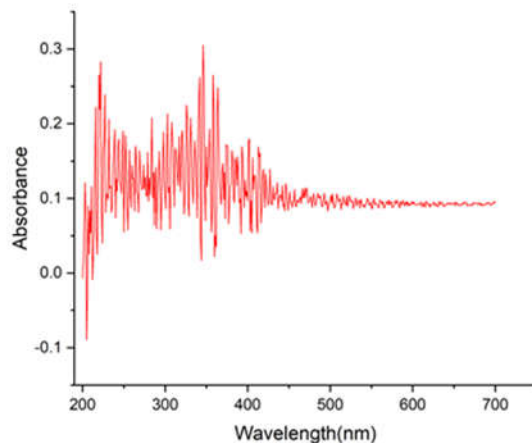
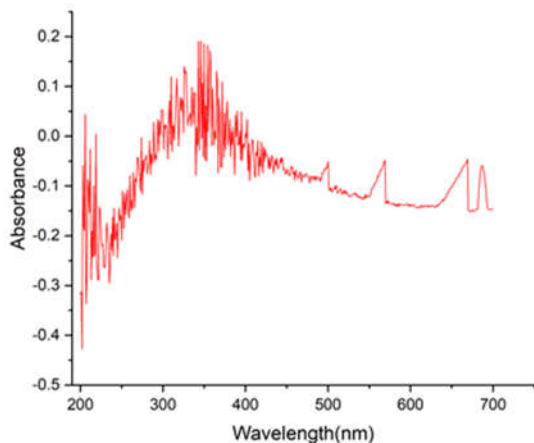
ج

د

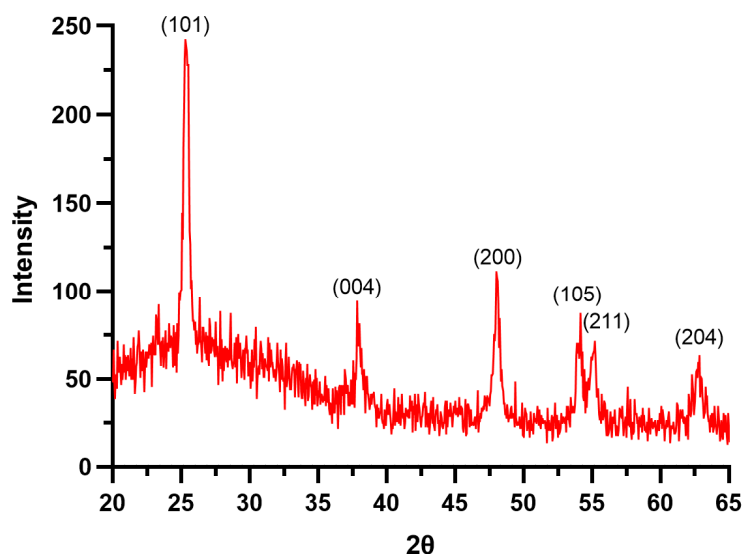


ه

و



شکل ۴- طیف‌های UV-Vis نمونه‌های نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم سنتز شده: تصاویر نمودارهای الف تا و به ترتیب مربوط به نمونه‌های ۱ تا ۶ نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم سنتز شده، طبق جدول (۱)، می‌باشد.



شکل ۵- نمودار پراش پرتو ایکس نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم.

تصویر مشخص است، پیک‌های $25/3^\circ$ ، $37/8^\circ$ ، 48° ، $54/1^\circ$ ، $55/1^\circ$ و $62/9^\circ$ که دارای صفحات (101)، (004)، (200)، (105)، (211) و (204) می‌باشد، نشان‌دهنده وجود دی‌اکسید تیتانیوم در فاز آناز با ساختار کریستالی تراگونال در نمونه است. نتایج پیک‌های XRD به دست آمده با نتایج XRD نانوذرات TiO_2 با پژوهش خدر و همکاران (۱۹) مطابقت داشت.

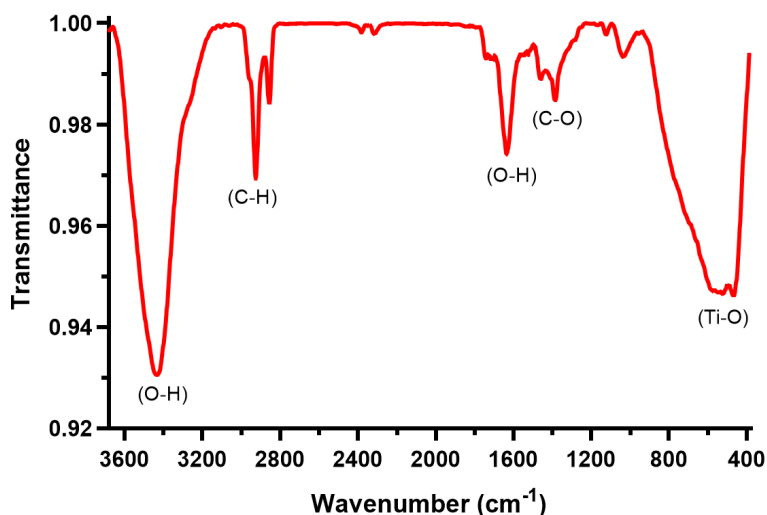
شکل (۶)، طیف آزمون FTIR نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم را نشان می‌دهد. همان‌طور که در تصویر نشان داده است، محدوده طیف از 3700 cm^{-1} - 400 cm^{-1} می‌باشد. پیک‌های محدوده 472 و 559 ، نشانگر حضور گروه‌های Ti-O می‌باشند که پیک‌های دی‌اکسید تیتانیوم را شامل می‌شود. پیک‌های 1629 cm^{-1} و 3432 cm^{-1} گروه‌های O-H، پیک 2927 cm^{-1} گروه‌های C-H و پیک 1380 cm^{-1} پیوند C-O را نشان می‌دهند. نتایج حاصل این آزمون با نتایج گروه‌های پروین و همکاران (۲۱) و احمد و همکاران (۲۲) مطابقت داشت.

همان‌طور که در شکل (۷) مشخص است با انجام آزمون پتانسیل-زتا، میزان بار سطحی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم سنتز شده به روش سنتز سبز، اندازه‌گیری شد. نتیجه این آزمون

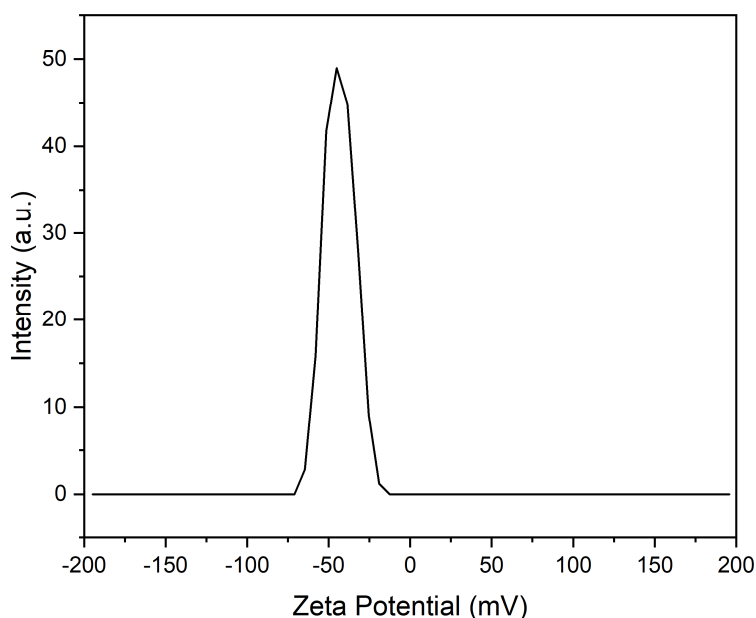
نور UV و استفاده از نور مرئی به جای آن در موارد آزمایش‌های زیستی است (۲۰). نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم سنتز شده می‌تواند به عنوان یک عامل فتوکالیست در روش‌های درمانی نوین مبتنی بر تابش نور نیز مورد استفاده قرار گیرند، زیرا همان‌طور که گفته شد، دارای جذب مناسبی در ناحیه نور مرئی می‌باشند که مشکلات زیستی نور UV را ندارد (۲ و ۱۲). وجود یک پیک جذب تیز در محدوده $380-400$ نانومتر، تشکیل نانوذرات TiO_2 را تأیید می‌کند (۱۶). در مجموع به نظر می‌رسد که نمونه (الف)، جذب بهتری در ناحیه نورهای UV و مرئی دارد. پس می‌توان از آن به عنوان نمونه بهینه این آزمون نام برد.

بر اساس نتایج تصاویر SEM، نمودار توزیع اندازه ذرات و آزمون UV-Vis می‌توان نمونه (الف) را به عنوان نمونه بهینه این پژوهش در نظر گرفت. به این منظور تمامی آزمون‌های مورد نیاز دیگر، تنها بر نمونه بهینه انجام شد.

تجزیه و تحلیل XRD، برای تأیید ماهیت کریستالی و اندازه ذرات نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم سنتز شده انجام شد. شکل (۵)، نمودار پراش پرتو ایکس نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم که به روش سنتز سبز تولید شدند را نشان می‌دهد. همان‌طور که در



شکل ۶- طیف FTIR نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم.

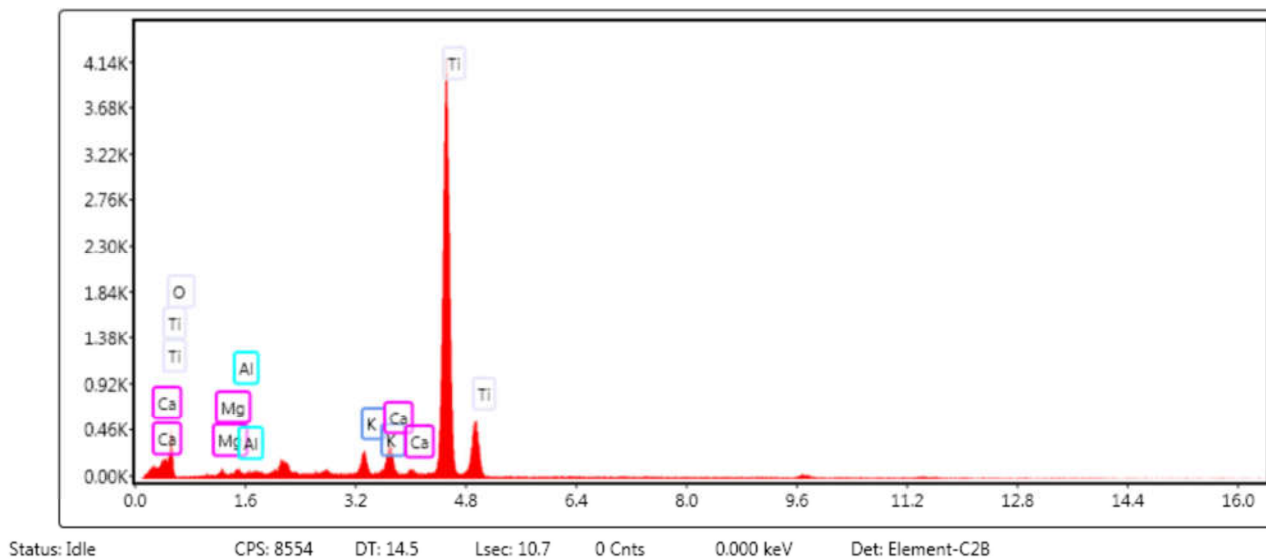


شکل ۷- نمودار آزمون پتانسیل-زتا نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم برای اندازه‌گیری بار سطحی.

نانوذرات TiO_2 خارج از محدوده ± 30 میلی‌ولت است، پایداری این نانوذرات را نشان می‌دهد که تمایلی به آگلومره شدن ندارند (۲۴).

آزمون EDS، آزمون آنالیز عنصری است که بر روی نمونه ۱، به‌عنوان نمونه بهینه، انجام شد که در شکل (۸) عناصر موجود در نمونه را نشان داد. سپس پیک‌ها شناسایی شدند و در جدول (۲) عناصر موجود در نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم

نشان داد بار سطحی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم سنتز شده، دارای مقدار منفی (۴۳/۶-) می‌باشد که می‌تواند به دلیل استفاده از روش سنتز سبز (گیاه آلوئه‌ورا) برای تولید آن باشد، زیرا با اضافه کردن عصاره آلوئه‌ورا به محلول پیش ماده TTIP و آب دیونیزه، pH محلول افزایش یافت که می‌تواند سبب ایجاد بار سطحی منفی در نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم سنتز شده شود (۲۳). همچنین از آنجایی که بار سطحی به‌دست آمده برای



شکل ۸- نمودار آنالیز عنصری (EDS) نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم.

می‌رسد که طبق این نتایج، نانوذرات تولیدشده از خلوص مناسبی برخوردار هستند.

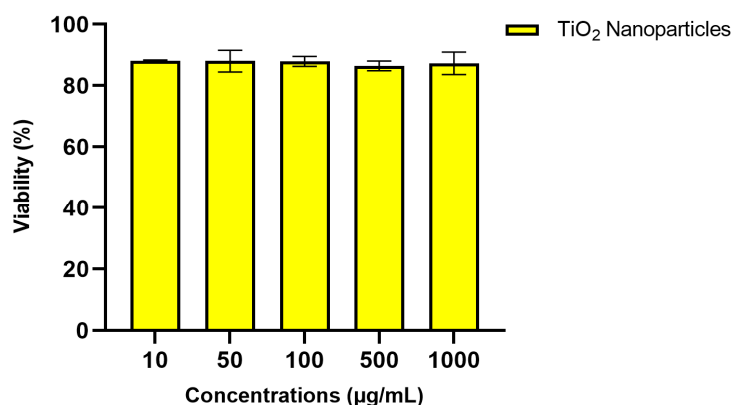
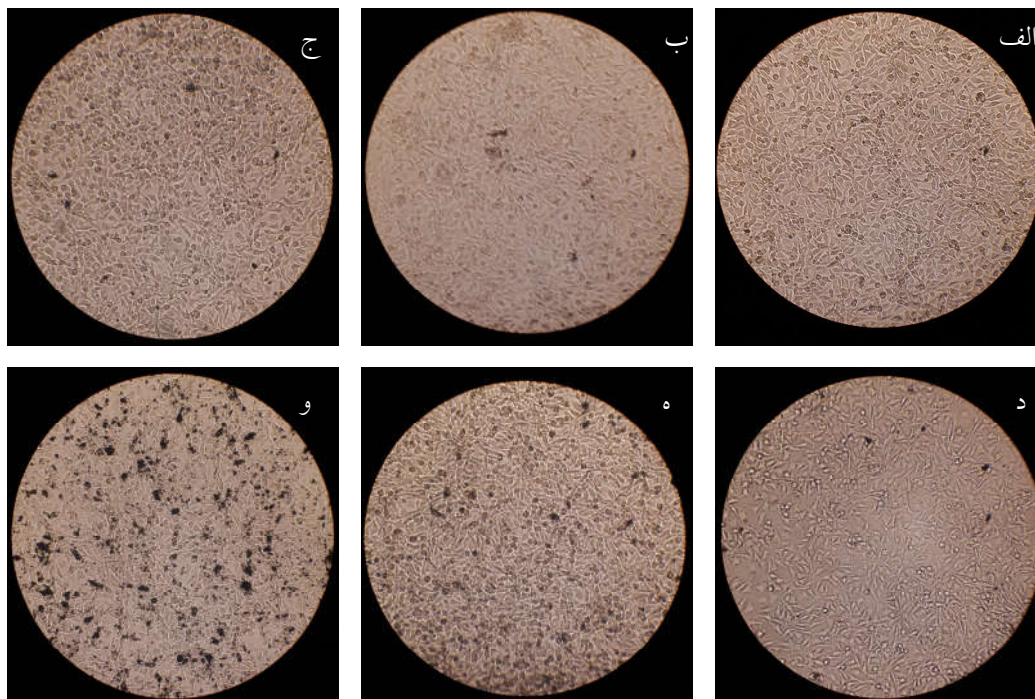
۲-۳- ارزیابی عملکرد زیستی نانوذرات TiO_2

در این پژوهش برای بررسی این‌که نمونه بهینه از نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم سنتز شده، قابلیت کاربردی زیستی دارد، آزمون سمیت سلولی (MTT Assay) انجام شد. این آزمون بر سلول‌های فیروبلاست (L929) انجام شد که نتایج آن در شکل (۹) نشان داده شده است. در بخش (الف)، سلول‌ها به‌عنوان نمونه کنترل و از بخش (ب-و) سلول‌ها در برابر نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم در پنج غلظت، به‌ترتیب از غلظت (۱۰-۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۲۴ ساعت قرار داشتند. برای بررسی این‌که نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم دارای سمیت سلولی هستند، باید میزان زنده‌مانی سلول پس از ۲۴ ساعت بالاتر از ۷۰ درصد باشد (۲۶). همان‌طور که در نمودار نتایج هم مشخص است، از آنجایی‌که در تمامی غلظت‌ها، بالاتر از ۸۵ درصد است، پس می‌توان نتیجه گرفت که نانوذرات بهینه دی‌اکسیدتیتانیوم، دارای سمیت سلولی نبوده و برای کاربردهای زیستی مناسب است. در پژوهش‌های دیگر راماسامی و همکاران (۲۷) و مداح و همکاران (۲۸)، میزان سمیت سلولی نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم

جدول ۲- نمایش درصدهای عناصر با آنالیز عنصری

عناصر	درصد وزنی	درصد اتمی
اکسیژن	۳۰/۷۹	۵۶/۳۹
تیتانیوم	۶۲/۷۷	۳۸/۴
منیزیم	۰/۶۸	۰/۸۲
پتاسیم	۲/۰۸	۱/۵۶
آلومینیوم	۰/۴۱	۰/۴۴
کلسیم	۳/۲۸	۲/۴

سنتز شده نشان داده شده است. با بررسی جدول (۲) به‌نظر می‌رسد که بیش از ۹۳ درصد نمونه را گروه‌های O و Ti تشکیل می‌دهند که به‌ترتیب دارای درصد وزنی ۶۲/۷۷ و ۳۰/۷۹، همچنین دارای درصد اتمی ۵۶/۳۹ و ۳۸/۴ هستند. در مقایسه با دیگر پژوهش‌ها در این زمینه، احمد و همکاران (۲۲)، نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیومی تولید کردند که به‌ترتیب دارای ۴۴/۳۵ و ۴۱/۶۵ درصد وزنی (در مجموع ۸۶ درصد) از گروه‌های O و Ti بودند. همچنین در پژوهشی دیگر، اسما و همکاران (۲۵)، نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم را که به‌ترتیب دارای درصد وزنی ۷۰/۳۳ و ۲۱/۷۷ (در مجموع ۹۲/۱ درصد) از گروه‌های O و Ti بودند را تولید کردند. در نهایت به‌نظر



شکل ۹- تصاویر و نمودار نتایج آزمون سمیت سلولی نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم را نشان داده است. در تصاویر، بخش (الف) مربوط به نمونه کنترل و بخش‌های (ب-و) نشان‌دهنده نمونه نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم در برابر سلول‌های فیروبلاست در پنج غلظت است.

۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش، پس از بهینه‌سازی پارامترهای سنتز سبز نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم توسط عصاره آلوئه‌ورا و انتخاب نمونه بهینه برای بررسی عدم سمیت سلولی آن و تأیید بر داشتن خواص لازم جهت کاربردهای زیستی، انجام شد. نتایج آزمون پراش پرتو ایکس، نشان از تشکیل فاز کریستالی آنتاز در نمونه‌های نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم سنتز شده را نشان داد.

را بررسی کردند که در بیش‌ترین غلظت آزمایش‌شده (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌گرم) زیر ۳۰ درصد است. در نتایج به‌دست‌آمده این آزمون در مقایسه با نتایج پژوهش‌های دیگر، به نظر می‌رسد که میزان سمیت نانوذرات بهینه دی‌اکسیدتیتانیوم در این پژوهش، بسیار کمتر بوده و برای کاربردهای زیستی مناسب است.

سلولی نداشته و برای کاربردهای زیستی مناسب می‌باشند.

تشکر و سپاسگزاری

تأمین‌کننده اعتبار پژوهشی این مقاله دانشگاه صنعتی اصفهان بوده، در همین راستا از کمک‌های این دانشگاه تقدیر و تشکر می‌شود.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اذعان دارند هیچ نوع تضاد منافی با شخص، شرکت یا سازمانی برای این پژوهش ندارند.

نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم بهینه، دارای ساختار کروی و در اندازه 5 ± 31 نانومتر بود. طبق نتایج آزمون طیف‌سنجی UV-Vis نانوذرات بهینه دارای جذب مناسبی در محدوده نور فرابنفش و مرئی است. بار سطحی نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم توسط آزمون پتانسیل-زتا اندازه‌گیری شد که نشان داد بار سطحی آن $(-43/6)$ بوده است. آزمون آنالیز عنصری (EDS) علاوه بر تأیید تشکیل نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم، نشان داد که این نانوذرات از درصد خلوص حدود بالای ۹۳ درصد را شامل می‌شوند. در پایان با بررسی میزان سمیت سلولی نانوذرات بهینه دی‌اکسیدتیتانیوم توسط آزمون (MTT-Assay)، مشخص شد که این نانوذرات سمیت

واژه‌نامه

1. nanomaterial
2. titanium dioxide (TiO₂)
3. photosensitivity
4. reactive oxygen species (ROS)
5. photothermal agent
6. hyperthermia
7. *Eclipta prostrata*
8. *Curcuma longa*
9. *Psidium guajava*
10. *Ocimum sanctum*
11. titanium tetraisopropoxide (TTIP)
12. X-ray diffraction (XRD)
13. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)
14. ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis)
15. zeta potential
16. scanning electron microscope (SEM)
17. energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS)
18. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
19. fetal bovine serum (FBS)
20. dimethyl sulfoxide (DMSO)
21. optical density (OD)

مراجع

1. Samhitha SS, Raghavendra G, Quezada C, Bindu PH. Green synthesized TiO₂ nanoparticles for anticancer applications: Mini review. *Mater Today*. 2022;54: 765-70. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.11.073>
2. Shah Z, Nazir S, Mazhar K, Abbasi R, Samokhvalov IM. PEGylated doped-and undoped-TiO₂ nanoparticles for photodynamic Therapy of cancers. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019;27:173-83. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.05.019>
3. Borgheti-Cardoso LN, Viegas JSR, Silvestrini AVP, Caron AL, Praca FG, Kravicz M, Bentley MVLB. Nanotechnology approaches in the current therapy of skin cancer. *Adv Drug Deliv Rev*. 2020;153:109-36. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.02.005>
4. Gour V, Agrawal P, Pandey V, Kanwar IL, Haider T, Tiwari R, Soni V. Nanoparticles and skin cancer. In: *Nano drug delivery strategies for the treatment of cancers*. Amsterdam: Elsevier; 2021. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819793-6.00011-4>
5. Ziental D, Czarczynska-Goslinska B, Mlynarczyk DT, Glowacka-Sobotta A, Stanisz B, Goslinski T, Sobotta L. Titanium dioxide nanoparticles: prospects and applications in medicine. *Nanomater*. 2020; 10(2):387. <https://doi.org/10.3390/nano10020387>
6. Shi J, Li J, Wang Y, Zhang CY. TiO₂-based nanosystem for cancer therapy and antimicrobial treatment: A review. *Chem Eng J*. 2022;431:133714. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.133714>
7. Chaudhari A, Kumar A, Kumar S, Kushwaha S. Synthesis of TiO₂ nanoparticles by green approach: Application as photoanode for dye-sensitized solar cells. *Mater Res Bull*. 2024;179:112909. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2024.112909>
8. Huilan Z, Juan W, Wen Z, Dong H, Aiping Z. TiO₂/SiO₂-NHOC-FA Nanocomposite as a Photosensitizer with Targeting Ability for Photocatalytic Killing MCF-7 Cells in Vitro and its Mechanism Exploration. *J Photochem Photobiol*. 2021;97(2):398-407. <https://doi.org/10.1111/php.13336>
9. Yu F, Wang C, Li Y, Ma H, Wang R, Liu Y, et al.

- Enhanced solar photothermal catalysis over solution plasma activated TiO₂. *Adv Sci*. 2020;7(16):2000204. <https://doi.org/10.1002/advs.202000204>
10. Ahmed RM, Hasan I. A review on properties and applications of TiO₂ and associated nanocomposite materials. *Mater Today* 2023;81:1073-8. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.04.381>
 11. Gan YX, Jayatissa AH, Yu Z, Chen X, Li M. Hydrothermal synthesis of nanomaterials. *J Nanomater*. 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8917013>
 12. Verma V, Al-Dossari M, Singh J, Rawat M, Kordy MG, Shaban M. A review on green synthesis of TiO₂ NPs: photocatalysis and antimicrobial applications. *Polym*. 2022;14(7):1444. <https://doi.org/10.3390/polym14071444>
 13. Baamer DF, Helmy ET, Mostafa MMM, Pan JH. Synthesis of TiO₂ nanoparticles using different routes with enhanced photocatalytic and antibacterial properties. *Ceram Int*. 2024;50(9):15780-9. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2024.02.058>
 14. Ahmad MZ, Alasiri AS, Ahmad J, Alqahtani AA, Abdullah MM, Abdel-Wahab BA, et al. Green synthesis of titanium dioxide nanoparticles using *Ocimum sanctum* leaf extract: In vitro characterization and its healing efficacy in diabetic wounds. *Mol*. 2022;27(22):7712. <https://doi.org/10.3390/molecules27227712>
 15. Rajkumari J, Magdalane CM, Siddhardha B, Madhavan J, Ramalingam G, Al-Dhabi NA, et al. Synthesis of titanium oxide nanoparticles using *Aloe barbadensis* mill and evaluation of its antibiofilm potential against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J of Photoch and Photob B: Bio*. 2019;201:111667. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111667>
 16. Aravind M, Amalanathan M, Mary MSM. Synthesis of TiO₂ nanoparticles by chemical and green synthesis methods and their multifaceted properties. *SN Appl Sci*. 2021;3:1-10. <https://doi.org/10.1007/s42452-021-04281-5>
 17. Ajmal N, Saraswat K, Bakht MA, Riadi Y, Ahsan MJ, Noushad M. Cost-effective and eco-friendly synthesis of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles using fruit's peel agro-waste extracts: characterization, in vitro antibacterial, antioxidant activities. *Green Chem Lett Rev*. 2019;12(3):244-54. <https://doi.org/10.1080/17518253.2019.1629641>
 18. Ekambaram R, Saravanan S, Selvam N, Dharmalingam S. Statistical optimization of novel acemannan polysaccharides assisted TiO₂ nanorods based nanofibers for skin cancer application. *Carbohydr Polym Technol Appl*. 2021;2:100048. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100048>
 19. Khadar A, Behara DK, Kumar MK. Synthesis and characterization of controlled size TiO₂ nanoparticles via green route using *Aloe vera* extract. *Int J Sci Res*. 2016;5(1):1913-6.
 20. Rao KG, Ashok C, Rao KV, Chakra C, Tambur P. Green synthesis of TiO₂ nanoparticles using *Aloe vera* extract. *Int J Adv Res Phys Sci*. 2015;2(1A):28-34.
 21. Praveen P, Viruthagiri G, Mugundan S, Shanmugam N. Structural, optical and morphological analyses of pristine titanium di-oxide nanoparticles—Synthesized via sol–gel route. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2014;117:622-9. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.09.037>
 22. Ahmad MM, Mushtaq S, Al Qahtani HS, Sedky A, Alam MW. Investigation of TiO₂ nanoparticles synthesized by sol-gel method for effectual photodegradation, oxidation and reduction reaction. *Cryst*. 2021;11(12):1456. <https://doi.org/10.3390/cryst11121456>
 23. Berg JM, Romoser A, Banerjee N, Zebda R, Sayes CM. The relationship between pH and zeta potential of ~ 30 nm metal oxide nanoparticle suspensions relevant to in vitro toxicological evaluations. *Nanotoxicology*. 2009;3(4):276-83. <https://doi.org/10.3109/17435390903276941>
 24. Mohamed AL, Hassabo AG. Core-shell titanium@silica nanoparticles impregnating in poly (itaconic acid)/poly (N-isopropylacrylamide) microgel for multifunctional cellulosic fabrics. *J Polym Res*. 2022;29(2):68. <https://doi.org/10.1007/s10965-022-02921>
 25. Alturki AM, Ayad R. Synthesis and characterization of titanium dioxide nanoparticles with a dosimetry study of their ability to enhance radiation therapy using a low energy X-ray source. *Ind J Sci Technol*. 2019;12. <https://doi.org/10.17485/ijst/2019/v12i9/140977>
 26. International Organization for Standardization. Biological evaluation of medical devices—Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. Geneva: ISO; 2009.
 27. Ramasamy K, Dhavamani S, Natesan G, Sengodan K, Sengottayan S-N, Tiwari M, et al. A potential role of green engineered TiO₂ nanocatalyst towards enhanced photocatalytic and biomedical applications. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2021;28:41207-23. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13530-4>
 28. Maddah A, Danesh H, Ghasemi P, Ziamajidi N, Salehzadeh M, Abbasalipourkabir R. The Effect of Titanium Dioxide (TiO₂) Nanoparticles on Oxidative Stress Status in the HCT116 Human Colon Cancer Cell Line. *BioNanoScience*. 2023;13(2):600-8. <https://doi.org/10.1007/s12668-023-01103-3>