

## Yenibahar (*Pimenta dioica* (L.) Merrill) Sulu Ekstraktı ile Gümüş Nanopartikülü Sentezi ve Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması

İrem AKYOL<sup>1</sup> , Merve DUMAN<sup>1</sup> , Neslihan DEMİR<sup>2\*</sup> 

<sup>1</sup>Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Çanakkale, Türkiye

<sup>2</sup>Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Çanakkale, Türkiye

\*Sorumlu Yazar: [neslihandemir@comu.edu.tr](mailto:neslihandemir@comu.edu.tr)

Geliş Tarihi: 21.03.2024 Düzeltme Geliş Tarihi: 09.04.2024 Kabul Tarihi: 18.07.2024

### ÖZ

Nanopartiküller fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler kullanılarak sentezlenebilmektedir. Nanopartikül sentezi için fiziksel ve kimyasal yöntemlerle ilgili yüksek enerji tüketimi, düşük verim, yüksek maliyetler ve çevresel tehlikeler gibi dezavantajlar, yeşil sentezin sunduğu avantajlarla çelişmektedir. Bu yaklaşım, nanopartiküllerin sentezi için uygun maliyetli, daha basit ve çevre dostu bir yöntem sağlayarak algleri, bitkileri, mikroorganizmaları kullanmaktadır. Bu çalışmada, *Pimenta dioica* su ekstraktı kullanılarak yeşil sentez yöntemi ile gümüş nanopartikül sentezlenmiş ve sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyonları Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM), Enerji Dağılım Spektroskopisi (EDS), UV Görünür Alan Spektroskopisi (UV-Vis) ve Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir. pBR322 plazmid DNA'sı kullanılarak agaroz jel elektroforezi yöntemi ile gümüş nanopartiküllerinin DNA ile etkileşimi incelenmiştir. DNA kırma aktivitesi sonuçlarına göre gümüş nanopartiküllerinin hem hidrolitik hem de oksidatif olarak kırıdığı tespit edilmiştir. Gümüş nanopartiküllerinin antioksidan aktivitesi, DPPH•, ABTS•• ve CUPRAC metotları kullanılarak belirlenmiştir. Antioksidan testlerinin sonuçları sentezlenen gümüş nanopartiküllerinin güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Pimenta dioica*, yeşil sentez, gümüş nanopartikül, biyolojik aktivite.

## Synthesis of Silver Nanoparticles with Aqueous Extract of *Pimenta dioica* (L.) Merrill and Investigation of Their Biological Activity

### ABSTRACT

Nanoparticles can be synthesized using physical, chemical, and biological methods. The disadvantages associated with physical and chemical nanoparticle synthesis, such as high energy consumption, low yield, high costs, and environmental hazards, contradict the advantages of green synthesis. This approach uses algae, plants, and microorganisms, providing a cost-effective, simpler, and environmentally friendly method for the synthesis of nanoparticles. In this study, silver nanoparticles were synthesized by the green synthesis method using *Pimenta dioica* aqueous extract. Characterization of the synthesized nanoparticles was carried out by Scanning Electron Microscopy (SEM), Energy Dispersive Spectroscopy (EDS), UV Visible Field Spectroscopy (UV-Vis), and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) methods. The interaction of silver nanoparticles with DNA was examined by agarose gel electrophoresis method using pBR322 plasmid DNA. DNA cleavage activity results showed that silver nanoparticles cleaved DNA both hydrolytically and oxidatively. The antioxidant activity of silver nanoparticles was determined using DPPH•, ABTS••, and CUPRAC methods. According to the results of antioxidant tests, it was determined that the synthesized silver nanoparticles have strong antioxidant activity.

**Key words:** *Pimenta dioica*, green synthesis, silver nanoparticles, biological activity.

## GİRİŞ

Nanoteknoloji 21. yüzyılın başlarında, bilim insanlarının nanometre ölçeğinde oluşturulan atomik ve moleküler toplulukların benzersiz özelliklerinden yararlanma çabalarıyla kritik bir araştırma sahası olarak ortaya çıkmıştır (McNeil 2005). Modern çağda biyoloji, birçok teknolojik gelişmeden faydalanmakta olsa da nanoteknoloji temel araştırmalar, ilaç geliştirme ve klinik tıp alanlarında, bu teknolojik gelişmelerden daha fazla etki yaratma potansiyeline sahiptir. Nanoteknoloji, nano ölçekte ve biyomoleküler düzeyde faaliyet göstererek çeşitli araçlar ve uygulamalar sunmaktadır.

Günümüzde çeşitli metalik nanomalzemeler bakır, çinko, titanyum, magnezyum, altın, aljinat ve gümüş gibi malzemeler kullanılarak üretilmektedir (Hasan 2015). Metal nanopartikül üretiminde, çeşitli kimyasal, fiziksel ve biyolojik sentetik yöntemler kullanılmıştır. Kimyasal sentez yöntemleri, bazı toksik kimyasalların yüzeyde emilmesi nedeniyle olumsuz etkilerle ilişkilendirilmiştir.

Çevre dostu alternatifler arasında mikroorganizmalar, enzimler, mantarlar, bitkiler veya bitki özleri kullanılarak gerçekleştirilen biyolojik sentez yöntemleri bulunmaktadır. Bu çevre dostu yaklaşımlar, nanopartikül sentezi için kimyasal ve fiziksel yöntemlere kıyasla çevresel etkileri azaltabilmektedir (Popescu ve ark., 2010; Li 2011). Özellikle gümüş nanopartiküllerin geniş uygulama alanlarına odaklanan bu biyolojik sentez yöntemleri, nanoteknolojinin ilerlemesine önemli katkılarda bulunmaktadır.

Bitkiler aracılığıyla üretilen metal nanopartiküllerin, diğer organizmalar tarafından üretilenlerle karşılaştırıldığında daha kararlı olduğu gösterilmiştir. Bitkiler, özellikle bitki özleri, metal iyonlarını mantar veya bakterilere göre daha hızlı bir şekilde indirgeyebilir. Ayrıca, iyi dağılmış metal nanopartiküllerin ölçek büyütme ve endüstriyel üretiminde kullanılması için, bitki özleri canlı bitkilerden veya bitki biyokütlesinden elde edilenlere kıyasla daha avantajlıdır ve bu, yeşil ve güvenli bir yöntem olarak kabul edilir. Bitki özleri kullanılarak yapılan çalışmalar, nano metallerin biyosentezi konusunda yeni ve hızlı, aynı zamanda toksik olmayan yöntemlerin kapılarını aralamıştır. Birçok araştırmacı, metal nanopartiküllerin bitki yaprağı ekstraktları ile biyosentezi ve bu nanopartiküllerin potansiyel uygulamaları üzerine araştırmalarını paylaşmıştır (Iravani 2011).

Yenibahar (*Pimenta dioica* (L.) Merrill), Myrtaceae familyasına ait bir bitkidir. Bu bitki, tarçın, karanfil ve Hindistan cevizi karışımına benzeyen karakteristik bir aromaya ve lezete sahiptir, bu nedenle "yenibahar" adını almıştır. *P. dioica*, Jamaika biberi veya mersin biberi olarak da bilinmektedir ve doğal olarak Jamaika, Küba, Haiti, Brezilya, Orta Amerika, Batı Hint Adaları, Venezuela, Meksika, Honduras, Guatemala ve Grenada'da yetişmektedir. Geleneksel olarak *P. dioica* meyvelerinin sulu ekstraktı şişkinlik ve ishal için kullanılırken, toz haline getirilmiş meyvesi nevalji, romatizma ve nasır için kullanılmaktadır (Rao ve ark., 2012). Geleneksel olarak, yaprakların diş ağrısını ve eklem iltihabını hafiflettiği, öjenol içeriği nedeniyle anestetik ve antiseptik olarak kullanıldığı bilinmektedir (Rajalekshmy ve Manimekalai 2019).

*P. dioica* içinde bulunan yaygın bileşik sınıfları, fenoller, seskiterpen hidrokarbonları, monoterpen hidrokarbonları, monoterpenler, oksijenli esterler, steroidler ve yağ asitleri gibi çeşitli gruplardır (Wilson 2016). Çalışmalar, *P. dioica* ekstraktlarının antimikrobiyal (Zabka ve ark., 2009; Lorenzo-Leal ve ark., 2019), antioksidan (Padmakumari ve ark., 2011; Morsy ve Hammad 2018), antiviral (El Gizawy ve ark., 2021), antihipertansif (Suárez ve ark., 1997), antikanser ve anti-inflamatuar (Kim ve ark., 2003) özellikler sergilediğini göstermektedir (Zhang ve Lokeshwar 2012).

*P. dioica* yapraklarından izole edilen kuersitrin 2-(p-hidroksifenoksi)-6,8-dimetil-5,7-dihidroksikromon, 6,8-dimetil-5,7,40-trihidroksiflavon ve 7-metoksi-6-metil-3,5,40-trihidroksiflavon adlı bileşikler, östrojene duyarlı SEAP raportör gen analizinde test edilmiş ve 7-metoksi-6-metil-3,5,40-trihidroksiflavon'un anti-östrojenik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Doyle ve ark., 2018). *P. dioica* esansiyel yağında analjezik, lokal anestetik, anti-enflamatuar ve antibakteriyel etkiler gösteren bir dizi terapötik özelliğe sahip birçok baharatın vazgeçilmez bir bileşeni olarak bulunan öjenol (%85.33) başlıca bileşen olarak yer almaktadır. Onu sırasıyla  $\beta$ -karyofilen (%4.36) ve sineol (%4.19), linalol (0.83±0.11),  $\alpha$ -humulen (0.76±0.12) takip etmektedir (Dharmadasa ve ark., 2015).

*P. dioica* yaprak ekstraktı ile sentezlenen bakır oksit nanopartiküllerinin güçlü antibakteriyel ve antikanser aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Pillai ve ark., 2022a). Ayrıca Pillai ve ark. (2022b) başka bir çalışmada *P. dioica* yaprak ekstraktı ile biyosentezlenmiş demir oksit nanopartiküllerin apoptozu tetikleme aktivitesini araştırmışlar ve demir oksit nanopartiküllerin konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığını önemli ölçüde azaltarak antikanser etkisi olduğunu ortaya koymuşlardır. Başka bir çalışmada, Kharey ve ark. (2020) *P. dioica* yaprak ekstraktı kullanarak altın nanopartikülü sentezlemişler ve sitotoksikite sonuçları nanopartiküllerin hem normal hem de kanserli hücreler için biyoyumlu ve güvenli olduğunu göstermiştir.

Reaktif oksijen türleri (ROT), insan fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerinde büyük bir öneme sahiptir. ROT, protein fosforilasyonu, iyon kanalları ve transkripsiyon faktörlerinin redoks düzenlemesi gibi normal fizyolojik süreçlerde kritik roller oynar. Süperoksit anyonları ve hidrojen peroksit dahil olmak üzere tüm ROT,

eşleşmemiş değerlik elektronlarına veya kararsız bağlara sahip olma özelliğine sahiptir (Brieger ve ark., 2012). ROT, genellikle geri dönüşü olmayan fonksiyonel değişikliklere yol açabilen, proteinler, lipidler, karbonhidratlar ve nükleik asitlerle (DNA, RNA) kolayca reaksiyona girebilirler. Aerobik organizmalar, bütünlüğü antioksidan sistemlere sahiptir; bu sistemler, reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerini engellemede etkili olan hem enzimatik hem de enzimatik olmayan antioksidanları içerir. Enzimatik savunma, glutatyon peroksidazları, süperoksit dismutazları ve katalaz gibi enzimleri içeren bir sistem aracılığıyla, zararlı ROS konsantrasyonunu azaltır. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise C ve E vitaminleri,  $\beta$ -karoten, ürik asit ve glutatyon gibi düşük moleküler ağırlıklı bileşikler içerir (Ozougwu 2016). İnsanlar, serbest radikalleri nötralize etmek için etkileşimli ve sinerjik olarak işlev gören karmaşık bir antioksidan koruma sistemine sahiptir. Yapılan çalışmalardan elde edilen bilgiler, oksidatif stres ve ilişkili hastalıkların yönetiminde önemli olabilmektedir.

DNA, tüm organizmaların yaşamsal işlevlerini ve biyolojik faaliyetlerini yönlendiren genetik materyali taşıyan bir makromoleküldür. DNA'nın kırılma aktivitelerinin temel hedefleri, fosfodiester bağları, deoksiriboz şekerleri ve nükleobazları içermektedir. DNA kırma aktivitesi testi sonuçlarına göre, DNA'nın kırılması, sentezlenen nanoparçacıkların antimikrobiyal bir mekanizma olarak işlev görmesi olarak düşünülebilir. DNA iplik kırığı oluşumunun, gümüş nanopartiküllerinin (AgNP) boyutuna güçlü bir şekilde bağlı olan gümüş iyonu salınımı ile ilişkili olduğu ve daha küçük nanopartiküllerin, daha büyük partiküllerden daha fazla hasara neden olduğu bulunmuştur (Butler ve ark., 2015). Çalışmada kullanılan pBR322 plazmid DNA, *Escherichia coli* bakterisinden izole edilen bir vektördür ve genellikle test edilmek istenen örneklerin DNA ile etkileşimlerini incelemek amacıyla kullanılmaktadır. Antibiyotik rezistansa karşı yeni ürünler geliştirmede önemli bir ön işlem olarak kullanılabilir.

Literatürde, *P. dioica* ile gümüş nanopartikülü sentezlenerek biyolojik aktivitelerinin araştırılması konusunda eksiklik görülmüştür. Bu çalışmada, yeşil sentez yöntemiyle *P. dioica* meyve ekstraktı kullanılarak gümüş nanopartikülü sentezlenmesi ve biyolojik aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

### *Pimenta dioica* Sulu Ekstrakt Eldesi

Ticari olarak satın alınan 5 gram *P. dioica* 100 mL distile suda 60 °C'de 1 saat ekstrakte edildi. Oda sıcaklığına gelen ekstrakt Whatmann No. 1 filtre kağıdından geçirildi.

### Gümüş Nanopartiküllerinin Sentezi

Elde edilen ekstrakt 1mM AgNO<sub>3</sub> çözeltisine (1:90) damla damla eklendi ve 24 saat yapay ışık altında karışmaya bırakıldı. Oluşan çözelti 8000 rpm'de 1 saat santrifüjlendi ve süpernatant kısmı atıldı. Elde edilen pelet 14000 rpm'de 15 dakika distile su ile 3 tekrarlı olarak yıkandı. Yıkama işlemi sonucunda elde edilen pelet 60 °C'de kurumaya bırakıldı.

### Gümüş Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

Sentezlenen nanopartiküllerin şekil, boyut ve morfolojik incelemeleri için Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) (Quanta FEG 250, FEI, ABD) analizi kullanıldı. Nanopartiküllerin element kompozisyonu, Enerji Dağılımı Spektroskopisi (EDS) (EDAX, ABD) analizi kullanılarak belirlendi. Ayrıca, nanopartiküller 250-900 nm dalga boyu aralığında UV Görünür Alan Spektroskopisi (UV-Vis) (T80+UV/VIS Spektrometre, PG Instruments, İngiltere) analizi ile de karakterize edildi. *P. dioica* sulu ekstraktı ve sentezlenen gümüş nanopartiküllerin FT-IR analizleri örneklerin KBr ile pelet formuna getirilerek, 4000-400 cm<sup>-1</sup> aralığında, 16 tarama sayısı ve 1 cm<sup>-1</sup> tarama çözünürlüğünde (Perkin Elmer BX II FT Spektrometre, ABD) analiz edildi.

### Gümüş Nanopartiküllerinin Biyolojik Aktiviteleri

#### DNA Kırma Aktivitesi

Ekstrakt ve AgNP'nin DNA kırma aktiviteleri agaroz jel elektroforezi yöntemiyle hidrolitik (oksitleyici ajan yokluğunda) ve oksidatif (oksitleyici ajan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında) olarak araştırıldı. Ekstrakt ve AgNP 50, 100, 200, 400 ve 800  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> konsantrasyonlarında hazırlandı ve Tris-HCl tamponu (10 mM, pH:7.4) ile işleme tabii tutuldu; ardından pBR322 plazmid DNA'ya eklenerek 37 °C'de 3 saat boyunca inkübe edildi. Hazırlanan örnekler 6X DNA loading dye ile karıştırılarak 1X TAE (40 mM Tris- 20 mM Asetik Asit- 1 mM EDTA, pH:8.0) tamponuyla hazırlanan %0.8'lik agaroz jele yüklendi. Örnekler, 60 V'da 1 saat elektroforez edildi. Ardından elde edilen bantlar (DNR Bio-Imaging System, İsrail) UV ışığı altında görüntülendi.

## Antioksidan Aktivitesi

### 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) Serbest Radikal Giderme Aktivitesi

Ekstrakt ve sentezlenen gümüş nanopartiküllerinin DPPH serbest radikal giderme aktivitesi Blois (1958) tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek 96 kuyucuklu F tabanlı mikroparka ile araştırıldı. Ekstrakt ve AgNP için hazırlanan konsantrasyonlar (10, 20, 40, 60, 80 ve 100 µg mL<sup>-1</sup>) metanolde çözdürülen 1M DPPH radikaliyle (1:3) karıştırıldı ve 30 dakika karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) standart olarak kullanıldı. Inkübasyon sonrasında 517 nm’de absorbans değerleri alındı. Elde edilen sonuçlar % DPPH serbest radikal giderme inhibisyonu Denklem 1’e göre hesaplandı.

$$\% \text{ Inhibisyon} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

(Denklem 1)

A<sub>0</sub>: kontrolün absorbansı, A<sub>1</sub>: örnek içeren absorbans

### 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS<sup>•+</sup>) Katyon Radikal Giderme Aktivitesi

2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) katyon radikali giderme aktivitesi Re ve ark. (1999) tarafından geliştirilen yöntem kullanılarak araştırıldı. Ekstrakt ve AgNP konsantrasyonları (10, 20, 40, 60, 80 ve 100 µg mL<sup>-1</sup>), ABTS reaktifi (2.45 mM potasyum persülfat ve 7 mM ABTS<sup>•+</sup>) ile 1:14 oranında karıştırıldı ve 6 dakika inkübasyona bırakıldı. BHT standart olarak kullanıldı. Inkübasyon sonrasında 734 nm’de absorbans değerleri mikroparka okuyucuda (INNO Microplate reader, Kore) alındı. Elde edilen sonuçlar % ABTS<sup>•+</sup> katyon radikal giderme inhibisyonu Denklem 1’e göre hesaplandı.

### Kuprik İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC)

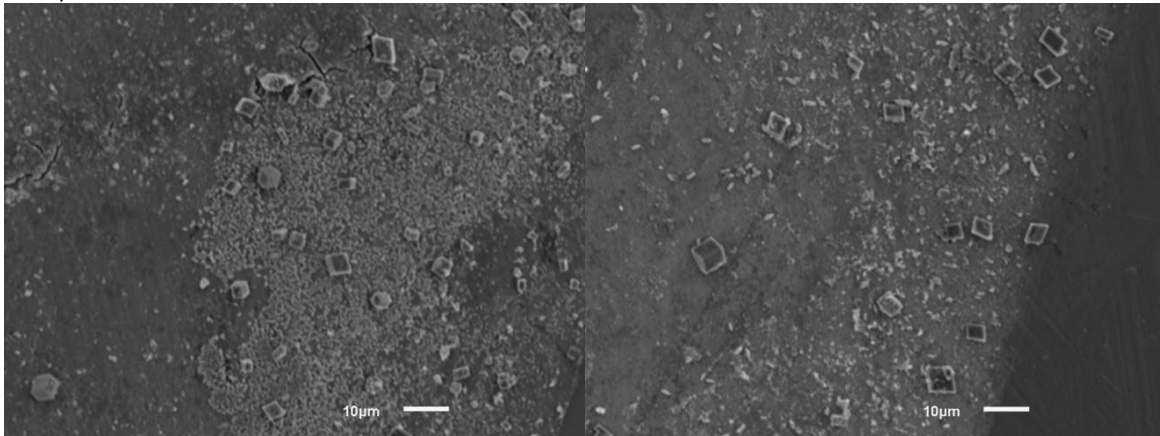
Kuprik iyonu indirgeyici antioksidan kapasitesi Apak ve ark. (2004) tarafından belirtilen yöntemle göre 96 kuyucuklu F tabanlı mikroparka ile belirlendi. 1 M amonyum asetat, 7.5 mM neokuproin ve 10 mM bakır klorür (1:1:1) kuyucuklara eklendi ve 37 °C’de 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Ekstrakt ve AgNP konsantrasyonları (10, 20, 40, 60, 80 ve 100 µg mL<sup>-1</sup>) karışıma (2:1) eklendi ve 30 dakika inkübasyona bırakıldı. BHT standart olarak kullanıldı. Inkübasyon sonrasında 450 nm’de absorbans değerleri alındı.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

### Gümüş Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

#### Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

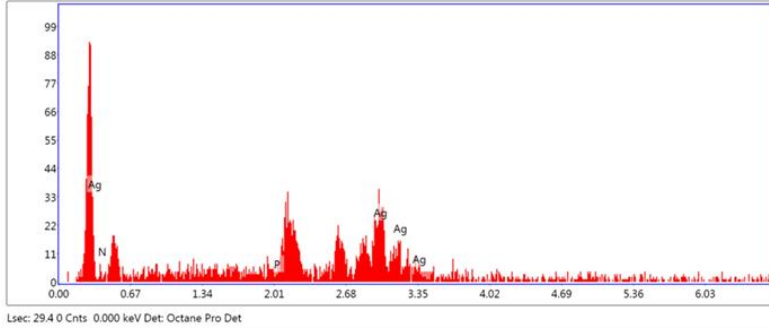
SEM analizi sonuçları sentezlenen nanopartiküllerin kübik şekilde ve ortalama 10 nm boyuta sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 1). Benzer bir sonuç Poinern ve ark. (2013) tarafından *Eucalyptus macrocarpa* sulu ekstraktı ile sentezlenen gümüş nanopartiküllerinde de görülmüştür. *Sesbania grandiflora* yaprak ekstraktı ile sentezlenen gümüş nanopartiküllerinin de kübik yapıda olduğu tespit edilmiştir (Ghaffari-Moghaddam ve ark., 2014).



Şekil 1. AgNP’lerin SEM görüntüsü.

**Enerji Dağılım Spektroskopisi (EDS) Analizi**

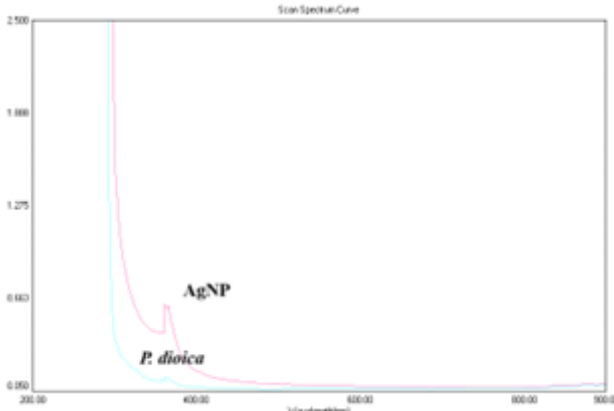
EDS analizindeki gümüş (Ag) pikleri gümüş nanopartiküllerinin başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermiştir (Şekil 2). Azot (N) ve fosfor (P) piklerinin ekstraktan kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 2. AgNP'lerin EDS spektrumu.

**UV-Görünür Alan Spektroskopisi (UV-Vis) Analizi**

Sentezlenen gümüş nanopartiküller ve *P. dioica* su ekstraktı, UV-Vis spektrofotometre analizi ile 200-900 nm dalga boyu aralığında incelenmiştir. UV-Vis spektrumunda 387 nm'de bir pik gözlenmiştir (Şekil 3). Bu pik, gümüş nanopartikülün sentezlendiğini göstermektedir. Banerjee ve Narendhirakannan (2011) *P. dioica* ile aynı familyadan olan *Syzygium cumini* tohum ekstraktı kullanarak gümüş nanopartikül sentezlemişler ve UV-Vis spektrumunda 450 nm'de pik verdiği görülmüştür.

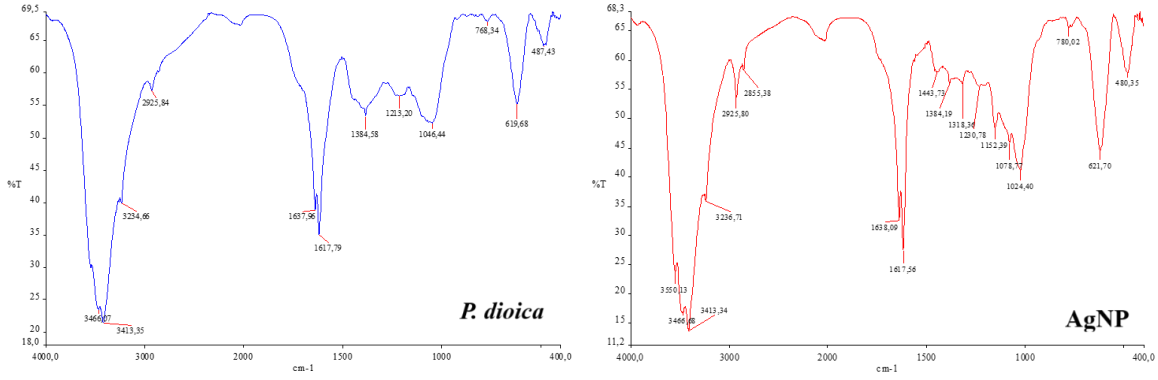


Şekil 3. *P. dioica* ve AgNP'nin UV-Vis spektrumları.

*P. dioica* yaprağından üretilen gümüş nanopartiküllerin ve farklı çözücülerle elde edilen yaprak ekstraktının sitma, filaryal ve dang vektörlerinin larvalarına karşı biyo-etkinliği incelenmiştir. AgNP'ler 422 nm'de belirgin bir UV-Vis piki göstermiş ve bu da AgNP'lerin sentezini kanıtlamıştır. AgNP'lerin Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM), ortalama 20-40 nm boyutunda üçgen ve küresel bir şekle sahip olduğu belirlenmiştir (Kumar ve ark., 2022).

**Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) Analizi**

*P. dioica* meyvelerinin sulu ekstraktının çözücüsü uçurulduktan sonra kalan numunenin fonksiyonel grupları Fourier transform infrared (FT-IR) spektroskopisi ile 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  de araştırılmıştır. Spektrumda 3466-3413-3234  $\text{cm}^{-1}$ 'de geniş-kuvvetli pikler numunedeki alkol ve karboksilik asit gruplarını ifade etmektedir. Jarquín-Enríquez ve ark. (2021) yaptıkları çalışmada *P. dioica* ekstraktının %68.06 öjenol ve %9.37 metil öjenol içerdiğini bulmuşlardır; buna bağlı olarak bu bölgede çok şiddetli OH pikleri gözlenmiştir. 2925  $\text{cm}^{-1}$  de gözlenen pikler numunedeki alifatik C-H titreşimlerine; 1637  $\text{cm}^{-1}$ 'deki keskin şiddetli pik karboksilik asit COO gruplarına, 1617  $\text{cm}^{-1}$ 'deki pikte C=C; 1384  $\text{cm}^{-1}$ 'deki orta şiddetli pik ise C-O titreşimlerine aittir. Spektrumda 1213-1046  $\text{cm}^{-1}$  de gözlenen pikler eterik C-O-C titreşimlerini göstermektedir. *P. dioica* meyveleri ile sentezlenen gümüş nanopartiküllerinin FT-IR spektrumunda, OH ve COOH titreşimleri 3550-3446-3413-3236  $\text{cm}^{-1}$  de gözlenmektedir. Alifatik C-H titreşimleri ise 2925-2855  $\text{cm}^{-1}$  de bulunmuştur. Spektrumda COO ve C=C titreşimleri sırasıyla 1638  $\text{cm}^{-1}$  ve 1617  $\text{cm}^{-1}$  de gözlenmiştir. C-O ve C-O-C titreşimleri 1384 ve 1230-1152-1078-1024  $\text{cm}^{-1}$  de bulunmuştur (Şekil 4).

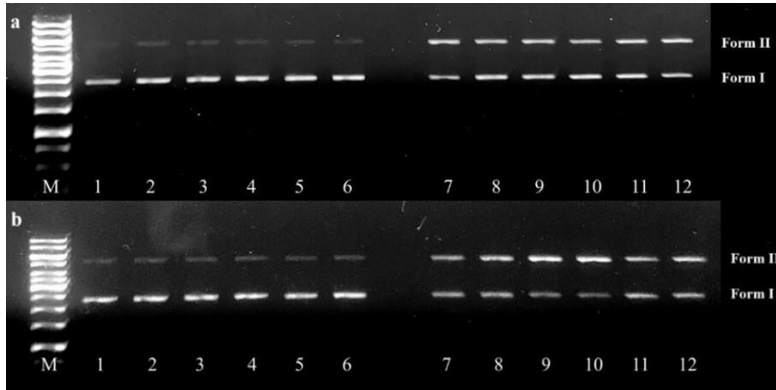
Şekil 4. *P. dioica* ve AgNP'nin FT-IR analizi spektrumları.

## Gümüş Nanopartiküllerinin Biyolojik Aktiviteleri

### DNA Kırma Aktivitesi

Süpersarmal DNA (Form I) dış bir etkiye maruz kaldığında, ipliklerden biri veya ikisi kırılabilir. Tek bir zincirde kırılma gerçekleştiğinde, jel üzerinde iki bant oluşur (Form I ve Form II). DNA'nın her iki zinciri de kırıldığında, jel üzerinde üç bant gözlenir (Form I, Form II ve Form III). Form II, en yavaş hareket eden yapıdır, Form I ise en uzun mesafeyi kat eden yapıdır. Form III ise yapısı gereği bu iki form arasında yer almaktadır.

Ekstrakt ve sentezlenen AgNP'lerin DNA kırma aktiviteleri oksitleyici ajan yokluğunda ve varlığında incelenmiştir. *P. dioica* ekstraktının hem hidrolitik hem de oksidatif olarak DNA'yı kırıdığı gözlemlendi (Şekil 5a). Sentezlenen AgNP'nin de hem hidrolitik hem de oksidatif olarak DNA'yı konsantrasyona bağlı olarak artarak kırıdığı tespit edildi (Şekil 5b).

Şekil 5. a) *P. dioica* ekstaktının DNA kırma aktivitesi. b) AgNP'lerin DNA kırma aktivitesi.

M: Marker, 1-6. Hidrolitik: 1. DNA kontrol, 2. DNA + 6.25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 3. DNA + 12.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 4. DNA + 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 5. DNA + 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 6. DNA + 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

M: Marker, 7-12. Oksidatif: 1. DNA +  $\text{H}_2\text{O}_2$  kontrol, 2. DNA + 6.25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  +  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 3. DNA + 12.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  +  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 4. DNA + 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  +  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 5. DNA + 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  +  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 6. DNA + 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  +  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Önceki çalışmalarda, gümüş nanopartiküllerin (AgNP'ler) boyutuyla güçlü bir şekilde ilişkilendirilen gümüş iyonu salınımının, DNA kırığı oluşumunu muhtemelen etkilediği ve daha küçük NP'lerin daha büyük partiküllerden daha fazla hasara neden olduğu bulunmuştur (Mousavi-Khattat ve ark 2018). *Rosa canina* meyve ekstraktı kullanarak gümüş nanopartikülü sentezleyen Gulbagca ve ark. (2019) AgNP'lerin 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  konsantrasyonda kimyasal nükleazlar olarak hareket ederek DNA'nın Form I'ini Form III'e kırıdığını göstermişlerdir.

Begum ve ark. (2021) *Ficus carica* yaprak özütü kullanarak gümüş nanopartikülü sentezlemişler ve bu gümüş nanopartiküllerinin etkili hücrel membran geçirgenliği nedeniyle, *S. aureus*'un DNA'sını kırıdığı ve bu durumun etkili bir antimikrobiyal etkiye yol açtığı, ayrıca ilacın çıkış akışını azalttığını bulmuşlardır.

### Antioksidan Aktivitesi

Sentezlenen AgNP ve *P. dioica* sulu ekstraktının antioksidan aktiviteleri DPPH serbest radikal giderme, ABTS katyon radikali giderme ve kuprik iyonu indirgeyici antioksidan kapasitesi (CUPRAC) ile belirlenmiştir. DPPH

radikali giderme sonuçları incelendiğinde sentezlenen AgNP'nin konsantrasyona bağlı olarak artış gösterdiği ve 3.28  $\mu\text{g mL}^{-1}$  IC<sub>50</sub> değeri ile BHT'nin 2.62  $\mu\text{g mL}^{-1}$  IC<sub>50</sub> değerine yakın olduğu görülmüştür. ABTS katyon radikali giderme aktivitesinin de konsantrasyona bağlı artış göstermiş ve BHT'nin IC<sub>50</sub> değeri olan 2.62  $\mu\text{g mL}^{-1}$  'ye yaklaştığı (5.97  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) belirlenmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. *P. dioica*, AgNP ve BHT'nin % DPPH ve % ABTS inhibisyon aktiviteleri.

	Konsantrasyonlar ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	DPPH (% inhibisyon)	IC <sub>50</sub> değeri ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	ABTS (% inhibisyon)	IC <sub>50</sub> değeri ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
<i>P. dioica</i>	10	7.83±0.18	9.44	7.45±1.79	17.96
	20	10.47±0.14		9.14±1.21	
	40	16.21±0.14		10.78±2.00	
	60	24.63±0.14		12.62±1.31	
	80	27.86±0.11		16.04±0.27	
	100	31.38±0.11		20.94±0.36	
AgNP	10	28.50±2.78	3.28	11.93±0.28	5.97
	20	40.85±4.20		26.76±1.86	
	40	48.83±2.91		34.48±1.16	
	60	57.25±0.14		39.95±0.28	
	80	64.61±0.14		43.41±1.53	
	100	70.70± 0.14		46.55±1.99	
BHT	10	32.39±0.88	2.62	32.39±0.88	2.62
	20	44.25±0.78		44.25±0.78	
	40	53.23±0.91		53.23±0.91	
	60	64.88±0.74		64.88±0.74	
	80	75.36±0.12		75.36±0.12	
	100	85.39± 0.12		85.39± 0.12	

*P. dioica* baharat tozu, antioksidan özellikleri bakımından DPPH ve ABTS testleri ile araştırılmış ve test sonuçları sırasıyla 95.8±2.5 ve 76.1±1.9  $\mu\text{g mL}^{-1}$  IC<sub>50</sub> değerlerini vermiştir (Loizzo ve ark. 2016). Başka bir çalışmada Sánchez-Zarate ve ark. (2020), *P. dioica* ekstraktlarının radikal giderme özelliğini belirgin bir şekilde etkileyen ekstraksiyon çözücüsünü göstermişler ve en yüksek DPPH aktivitesine aseton ekstraktı (52.26± 11.74  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); ABTS aktivitesine ise etanol ekstraktının (123.79 ± 16.36  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) sahip olduğunu belirlemişlerdir.

*P. dioica* yapraklarından elde edilen bir bileşik olan pedunculagin, yapay radikaller DPPH, ROO•, OH• gibi fizyolojik radikallere karşı kuvvetli bir antioksidan etkinlik sergilemiş ve NO üretimini etkili bir şekilde engellemiştir (Marzouk ve ark., 2007). Son yıllarda yapılan bir çalışmada su, metanol, aseton ve etil asetat ekstraksiyonu ile antioksidan aktiviteleri incelenen *P. dioica* yapraklarının DPPH radikal süpürme aktivitesi IC<sub>50</sub> değeri 1.05 ile 3.021  $\mu\text{g mL}^{-1}$  arasında değişiklik gösterirken, en yüksek IC<sub>50</sub> değeri metanolik ekstraktan elde edilmiştir (Resha Haneefa ve ark., 2022). Ayrıca, *P. dioica* yaprak etanol, dietil eter ve sulu ekstraktlarının antioksidan içeriği değerlendirilmiş ve ekstraktların antioksidan aktiviteleri, %92.4 kapasite ile etanolde en yüksek seviyede bulunurken, sulu ekstrakt %81.3 oranında inhibisyon göstermiştir (Murali ve ark., 2021).

Yenibahar yapraklarının alkol ekstresinin indirgeme gücü, potasyum ferrisiyanür indirgeme yöntemi ile ölçülerek askorbik asit ile kıyaslanmıştır. Alkol ekstresinin 6 mg'ı, 0.865 indirgeme gücü göstermiştir ki bu miktar, 2 mg askorbik aside eşdeğerdir. Yenibahar yaprağı ekstresi, DPPH radikal süpürme aktivitesinde kademe kademe artış sergilemiştir. Bu aktivite, sentetik antioksidan BHT (IC<sub>50</sub> = 11  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) ile eşit seviyede olan 70  $\mu\text{g mL}^{-1}$  IC<sub>50</sub> değerini göstermiştir (Nayak ve ark., 2008).

*P. dioica* ile aynı familyadan olan *Psidium guajava* özütlerinden elde edilen gümüş nanopartikülleri morfolojik stabilite sergilemiş ve karşılaştırıldığında, bu nanopartiküller orta düzeyde (%68.1) antioksidan aktivite göstermiştir (Bar ve ark., 2021). Başka bir çalışmada yine *P. dioica* ile aynı familyadan olan *Callistemon lanceolatus* yaprakları kullanılarak sentezlenen gümüş oksit nanopartiküllerinin sulu süspansiyonu, doza bağlı DPPH radikal süpürme aktivitesi göstererek IC<sub>50</sub> değeri 62.12  $\mu\text{g mL}^{-1}$  olarak ortaya konmuştur (Ravichandran ve ark. (2016). *P. dioica* uçucu yağının, kitosan ve kitosan/k-karragenan mikroküreleri içinde enkapsülasyonunun antioksidan aktiviteleri inceleyen Dima ve ark. (2014) *P. dioica* uçucu yağı için IC<sub>50</sub> değeri (2.36±0.18  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), kitosan ve *P. dioica* uçucu yağı karışımı için IC<sub>50</sub> değeri (1.87±0.13  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), BHT için IC<sub>50</sub> değeri (4.47±0.11  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) ve askorbik asit için IC<sub>50</sub> değeri (4.20±0.17  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) belirlenmiştir.

Kuprik iyonu indirgeyici antioksidan kapasitesi sonuçları incelendiğinde *P. dioica* ve AgNP'nin aktivitelerinde konsantrasyona bağlı artış görülmüştür. AgNP'nin *P. dioica*'ya kıyasla daha yüksek CUPRAC aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 2).

Çizelge 2. *P. dioica*, AgNP ve BHT'nin CUPRAC aktiviteleri.

	Konsantrasyonlar ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )					
	10	20	40	60	80	100
<i>P. dioica</i>	0.075±0.0015	0.086±0.0021	0.098±0.0056	0.107±0.0015	0.114±0.0032	0.126±0.0025
AgNP	0.131±0.30	0.233±0.57	0.332±0.80	0.371±0.99	0.413±1.18	0.471±1.35
BHT	0.30±1.82	0.57±1.85	0.80±1.44	0.99±1.07	1.18±2.01	1.35±1.78

İçlerinde *P. dioica*'nın da bulunduğu otuz dokuz baharatın toplam antioksidan kapasiteleri, DPPH, ABTS ve CUPRAC deneyleri kullanılarak araştırmıştır. Araştırılan baharatların ABTS süpürme aktiviteleri (askorbik asit eşdeğerine (AAE) göre), acı biberden ( $1.42 \text{ mg AAE g}^{-1}$ ) karanfile ( $112.94 \text{ mg AAE g}^{-1}$ ) kadar değişmektedir ve bu, yaklaşık 79 katlık bir farklılık göstermektedir. Yenibahar ( $38.89 \text{ mg AAE g}^{-1}$ ) da güçlü ABTS süpürme kapasitesi sergilemiştir. CUPRAC deneyi sonuçlarına göre (Troloks eşdeğerine (TE) göre), en yüksek değerler karanfil için ( $54.47 \text{ mg TE g}^{-1}$ ) ve tarçın için ( $53.65 \text{ mg TE g}^{-1}$ ) elde edilmiştir, bunu ise yenibahar ( $26.97 \text{ mg TE g}^{-1}$ ) takip etmiştir (Assefa ve ark., 2018).

## SONUÇ ve ÖNERİLER

Yeşil sentez, nanopartikül üretiminde çevre dostu, ekonomik ve fizibilite açısından avantajlı olması nedeniyle, nano tıp, kataliz tıbbı, nano optoelektronik gibi geniş uygulama alanlarında büyük ilgi çekmektedir. Bu alan, bilim dünyasında hızla gelişen ve her geçen gün daha parlak bir geleceğe işaret eden yeni bir araştırma sahasıdır. Aromatik bir bitki olan *P. dioica*, güçlü antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser gibi birçok biyolojik aktivitelere sahiptir. Yeşil sentez, karboksilik asitler, alkol, fenol, esterler, eterler, aldehitler, alkanlar ve proteinler gibi aktif bileşenlerin modifikasyonu ile farklı morfolojik özelliklere sahip nanopartiküller oluşturabilir. Yapılan bu çalışmada, *P. dioica* ile sentezlenen gümüş nanopartiküllerinin antioksidan aktiviteleri DPPH, ABTS ve CUPRAC testleri ile incelendiğinde *P. dioica* sulu ekstraktına kıyasla güçlü artış görülmüştür. Bu nanopartiküllerin biyolojik aktiviteleri üzerine bakteri suşları, hücre hatları ve hayvan modelleri üzerinde yapılan araştırmalar devam edecektir. Bu çalışmalar, sentezlenen nanopartiküllerin farmakolojik aktivitelerindeki farklılıkları anlamaya ve potansiyel biyomedikal uygulamalarını değerlendirmeye yardımcı olabileceğine sahiptir. *P. dioica* ile sentezlenen gümüş nanopartiküllerin biyolojik sistemlerle etkileşimleri üzerine yapılacak araştırmalar, nanoteknoloji tabanlı çözümlerin geliştirilmesi ve ilaç tasarımında yeni fırsatların keşfi için önemli bir temel oluşturabilir.

**Teşekkür:** Bu çalışmanın karakterizasyon analizlerine katkılarından dolayı Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (MERLAB)'a ve Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Kimya Bölümünden Prof. Dr. Mustafa YILDIZ'a teşekkür ederiz.

**Çıkar Çatışması Beyanı:** Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

**Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti:** Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

## YAZAR ORCID NUMARALARI

İrem AKYOL  <http://orcid.org/0000-0005-7295-1555>

Merve DUMAN  <http://orcid.org/0000-0002-1178-5806>

Neslihan DEMİR  <http://orcid.org/0000-0002-2347-8344>



## KAYNAKLAR

- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E. 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (26), 7970-7981.
- Assefa, A. D., Keum, Y. S., Saini, R. K. 2018. A comprehensive study of polyphenols contents and antioxidant potential of 39 widely used spices and food condiments. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12, 1548-1555.
- Banerjee, J. ve Narendhirakannan, R. T. 2011. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Syzygium cumini* (L.) seed extract and evaluation of their in vitro antioxidant activities. *Dig J Nanomater Biostruct*, 6 (3), 961-968.
- Bar, F. M. A., Habib, M. M. A., El-Senduny, F. F., Badria, F. A. 2021. Cytotoxic activity of silver nanoparticles prepared from *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) and *Lawsonia inermis* L. (Lythraceae) extracts. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 20 (9), 1791-1799.
- Begum, M. Y., Alhamhoom, Y., Roy, A. 2021. Study of antimicrobial and DNA cleavage property of biocompatible silver nanoparticles prepared by using *Ficus carica* L. *Materials Research Innovations*, 25 (3), 147-154.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181 (4617), 1199-1200.
- Brieger, K., Schiavone, S., Miller Jr, F. J., Krause, K. H. 2012. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Medical Weekly*, 142 (3334), w13659-w13659.
- Butler, K. S., Peeler, D. J., Casey, B. J., Dair, B. J., Elespuru, R. K. 2015. Silver nanoparticles: correlating nanoparticle size and cellular uptake with genotoxicity. *Mutagenesis*, 30 (4), 577-591.
- Dharmadasa, R. M., Abeysinghe, D. C., Dissanayake, D. M. N., Abeywardhane, K. W., Fernando, N. S. 2015. Leaf essential oil composition, antioxidant activity, total phenolic content and total flavonoid content of *Pimenta dioica* (L.) Merr (Myrtaceae): A superior quality spice grown in Sri Lanka. *Universal Journal of Agricultural Research*, 3 (2), 49-52.
- Dima, C., Cotârlet, M., Alexe, P., Dima, S. 2014. Microencapsulation of essential oil of pimento [*Pimenta dioica* (L) Merr.] by chitosan/k-carrageenan complex coacervation method. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 22, 203-211.
- Doyle, B. J., Lawal, T. O., Locklear, T. D., Hernandez, L., Perez, A. L., Patel, U., Mahady, G. B. 2018. Isolation and identification of three new chromones from the leaves of *Pimenta dioica* with cytotoxic, oestrogenic, and anti-oestrogenic effects. *Pharmaceutical Biology*, 56 (1), 235-244.
- El Gizawy, H. A., Boshra, S. A., Mostafa, A., Mahmoud, S. H., Ismail, M. I., Alsouk, A. A., Al-Karmalawy, A. A. 2021. *Pimenta dioica* (L.) Merr. bioactive constituents exert anti-SARS-CoV-2 and anti-inflammatory activities: molecular docking and dynamics, in vitro, and in vivo studies. *Molecules*, 26 (19), 5844.
- Ghaffari-Moghaddam, M., Hadi-Dabanlou, R., Khajeh, M., Rakhshanipour, M., Shamel, K. 2014. Green synthesis of silver nanoparticles using plant extracts. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 31, 548-557.
- Gulbagca, F., Ozdemir, S., Gulcan, M., Sen, F. 2019. Synthesis and characterization of *Rosa canina*-mediated biogenic silver nanoparticles for anti-oxidant, antibacterial, antifungal, and DNA cleavage activities. *Heliyon*, 5 (12).
- Hasan, S. 2015. A review on nanoparticles: their synthesis and types. *Res. J. Recent Sci*, 2277, 2502.
- Iravani, S. 2011. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, 13 (10), 2638-2650.
- Jarquín-Enríquez, L., Ibarra-Torres, P., Jiménez-Islas, H., Flores-Martínez, N. L. 2021. *Pimenta dioica*: a review on its composition, phytochemistry, and applications in food technology. *International Food Research Journal*, 28 (5).
- Kharey, P., Dutta, S. B., Gorey, A., Manikandan, M., Kumari, A., Vasudevan, S., Gupta, S. 2020. *Pimenta dioica* mediated biosynthesis of gold nanoparticles and evaluation of its potential for theranostic applications. *Chemistry Select*, 5 (26), 7901-7908.
- Kim, S. S., Oh, O. J., Min, H. Y., Park, E. J., Kim, Y., Park, H. J., Lee, S. K. 2003. Eugenol suppresses cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage RAW264. 7 cells. *Life Sciences*, 73 (3), 337-348.
- Kumar, D., Kumar, P., Vikram, K., Singh, H. 2022. Fabrication and characterization of noble crystalline silver nanoparticles from *Pimenta dioica* leave extract and analysis of chemical constituents for larvicidal applications. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29 (2), 1134-1146.
- Li, X., Xu, H., Chen, Z. S., Chen, G. 2011. Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications. *Journal of Nanomaterials*, 2011, 1-16.
- Loizzo, M. R., Sicari, V., Tenuta, M. C., Leporini, M. R., Falco, T., Pellicanò, T. M., Tundis, R. 2016. Phytochemicals content, antioxidant and hypoglycaemic activities of commercial nutmeg mace (*Myristica fragrans* L.) and pimento (*Pimenta dioica* (L.) Merr.). *International Journal of Food Science & Technology*, 51 (9), 2057-2063.

- Lorenzo-Leal, A. C., Palou, E., López-Malo, A. 2019. Evaluation of the efficiency of allspice, thyme and rosemary essential oils on two foodborne pathogens in in-vitro and on alfalfa seeds, and their effect on sensory characteristics of the sprouts. *International Journal of Food Microbiology*, 295, 19-24.
- Marzouk, M. S., Moharram, F. A., Mohamed, M. A., Gamal-Eldeen, A. M., Aboutabl, E. A. 2007. Anticancer and antioxidant tannins from *Pimenta dioica* leaves. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 62 (7-8), 526-536.
- McNeil, S. E. 2005. Nanotechnology for the biologist. *Journal of Leukocyte Biology*, 78 (3), 585-594.
- Morsy, N. F., Hammad, K. S. 2018. Volatile constituents, radical scavenging and cytotoxic activities of Mexican allspice (*Pimenta dioica* L. Merrill) berries essential oil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21 (4), 859-868.
- Mousavi-Khattat, M., Keyhanfar, M., Razmjou, A. 2018. A comparative study of stability, antioxidant, DNA cleavage and antibacterial activities of green and chemically synthesized silver nanoparticles. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 46 (sup3), 1022-1031.
- Murali, V. S., Devi, V. M., Parvathy, P., Murugan, M. 2021. Phytochemical screening, FTIR spectral analysis, antioxidant and antibacterial activity of leaf extract of *Pimenta dioica* Linn. *Materials Today: Proceedings*, 45, 2166-2170.
- Nayak, Y., Abhilash, D., Vijaynarayana, K., Fernandes, J. 2008. Antioxidant and hepatoprotective activity of *Pimenta dioica* leaves extract. *Journal of Cell and Tissue Research*, 8 (3), 1571.
- Ozougwu, J. C. 2016. The role of reactive oxygen species and antioxidants in oxidative stress. *International Journal of Research*, 1 (8), 1-8.
- Padmakumari, K. P., Sasidharan, I., Sreekumar, M. M. 2011. Composition and antioxidant activity of essential oil of pimento (*Pimenta dioica* (L) Merr.) from Jamaica. *Natural Product Research*, 25 (2), 152-160.
- Pillai, R. R., Sreelekshmi, P. B., Meera, A. P. 2022a. Enhanced biological performance of green synthesized copper oxide nanoparticles using *Pimenta dioica* leaf extract. *Materials Today: Proceedings*, 50, 163-172.
- Pillai, R. R., Sreelekshmi, P. B., Meera, A. P., Thomas, S. 2022b. Biosynthesized iron oxide nanoparticles: cytotoxic evaluation against human colorectal cancer cell lines. *Materials Today: Proceedings*, 50, 187-195.
- Poinern, G. E. J., Chapman, P., Shah, M., Fawcett, D. 2013. Green biosynthesis of silver nanocubes using the leaf extracts from *Eucalyptus macrocarpa*. *Nano Bulletin*, 2 (1).
- Popescu, M., Velea, A., Lőrinczi, A. 2010. Biogenic production of nanoparticles. *Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures (DJNB)*, 5 (4).
- Rajalekshmy, V. S., Manimekalai, V. 2019. Comparative phytochemical analysis of the leaves of two Myrtaceae members-*Pimenta dioica* (L.) Merril and *Syzygium aromaticum* (L.) Merril and Perry. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8 (3), 3043-3045.
- Rao, P. S., Navinchandra, S., Jayaveera, K. N. 2012. An important spice, *Pimenta dioica* (Linn.) Merrill: A review. *International Current Pharmaceutical Journal*, 1 (8), 221-225.
- Ravichandran, S., Paluri, V., Kumar, G., Loganathan, K., Kokati Venkata, B. R. 2016. A novel approach for the biosynthesis of silver oxide nanoparticles using aqueous leaf extract of *Callistemon lanceolatus* (Myrtaceae) and their therapeutic potential. *Journal of Experimental Nanoscience*, 11 (6), 445-458.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26 (9-10), 1231-1237.
- Resha Haneefa, K., Nafila, P. P., Servin Wesley, P., Akhila, P. K. 2022. Phytochemical Analysis of Leaf Extracts of *Pimenta dioica* (L.) and their in vitro Antioxidant and Cytotoxic Activity. *Research Journal of Biotechnology*, 17, 8.
- Sánchez-Zarate, A., Hernández-Gallegos, M. A., Carrera-Lanestosa, A., López-Martínez, S., Chay-Canul, A. J., Esparza-Rivera, J. R., Velázquez-Martínez, J. R. 2020. Antioxidant and antibacterial activity of aqueous, ethanolic, and acetonetic extracts of *Pimenta dioica* L. leaves. *International Food Research Journal*, 27 (5).
- Suárez, A., Ulate, G., Ciccio, J. 1997. Cardiovascular effects of ethanolic and aqueous extracts of *Pimenta dioica* in Sprague-Dawley rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 55 (2), 107-111.
- Wilson, L. 2016. Spices and flavoring crops: fruits and seeds.
- Zabka, M., Pavela, R., Slezakova, L. 2009. Antifungal effect of *Pimenta dioica* essential oil against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi. *Industrial Crops and Products*, 30 (2), 250-253.
- Zhang, L., L Lokeshwar, B. 2012. Medicinal properties of the Jamaican pepper plant *Pimenta dioica* and Allspice. *Current Drug Targets*, 13 (14), 1900-1906.