



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**YEŞİL NANOTEKNOLOJİ İLE SENTEZLENEN SOY METAL
NANOPARÇACIK ESASLI ANTİOKSİDAN KAPASİTE ÖLÇÜM
YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ**

İlknur ÖZTÜRK

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Mustafa BENER**

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Programı

İSTANBUL-2021

Bu çalışma 02.07.2021 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından
Kimya Anabilim Dalı, Kimya Programı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ

Doç. Dr. Mustafa BENER
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi

Doç. Dr. Yavuz Selim AŐCI
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa’nın abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Lisansüstü Eğitim Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır

Bu tez, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2020-35030 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bilimsel ve akademik kimliğiyle örnek aldığım, yanında çalışmaktan onur duyduğum çok değerli hocam Prof. Dr. Reşat Apak’a destek ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Bu çalışma boyunca büyük bir özveri ile bana yardımcı olan, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, anlayışı ve güler yüzü ile her zaman yanımda olan danışman hocam Doç. Dr. Mustafa BENER’e en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımda yanımda olan sevgili hocam Dr.Öğr.Üyesi Nilay BEĞİÇ’e yardımlarından ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca yanımda olup desteklerini benden esirgemeyen sevgili aileme, bu süreçte verdiği destek ve gösterdiği hoşgöründen dolayı sevgili eşime ve hep yanımda olan canım oğluma yürekten teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca beni sürekli motive eden ve cesaretlendiren arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tezimle aynı adı taşıyan FYL-2020-35030 numaralı yüksek lisans tezi projesine maddi destek sağlayan İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi’ne teşekkür ederim.

Temmuz 2021

İlknur ÖZTÜRK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	xi
ÖZET	xiii
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. ANTİOKSİDANLAR	4
2.1.1 E Vitamini	6
2.1.2 Askorbik Asit (C vitamini).....	6
2.1.3. Antioksidan Enzimler	6
2.1.3.1. Süperoksit Dismutaz	7
2.1.3.2. Glutasyon Peroksidaz	7
2.1.3.3. Katalaz	7
2.1.4. Karotenoidler	7
2.1.5. Polifenoller	8
2.1.5.1. Flavonoidler	8
2.1.5.2. Fenolik Asitler	10
2.1.5.3. Fenolik Alkoller	10
2.1.5.4. Stilbenler.....	11
2.1.5.5. Lignanlar	11
2.2. KARAGENAN	11
2.3. NANOTEKNOLOJİ	12
2.3.1. Nanomateryallerin Sınıflandırılması	13
2.3.2. Soy Metal Nanoparçacıklar	14
2.3.3. Soy Metal Nanoparçacıklarda Yüzey Plazmon Rezonansı (SPR)	15
2.3.4. Gümüş Nanoparçacıklar	16
2.3.4.1. Gümüş Nanoparçacıkların Fizikokimyasal Özellikleri	16

2.3.4.2. Gümüş Nanoparçacıkların Optik Özellikleri.....	17
2.3.4.3. Gümüş Nanoparçacıkların Sentezi	17
2.3.4.4. Gümüş Nanoparçacıkların Karakterizasyonu	20
2.4. POLISAKKARİTLER İLE METALİK NANOPARÇACIKLARIN YEŞİL SENTEZİ.....	21
2.5. TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİN YÖNTEMLERİ.....	23
2.5.1. ORAC (Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi) Yöntemi.....	24
2.5.2. TRAP (Toplam Radikal Tutma Parametresi) Yöntemi- Krosin Beyazlatma (Krosin Ağartma Yöntemi) Yöntemi.....	25
2.5.3. Folin Ciocalteu Yöntemi	25
2.5.4. FRAP (Demir (III) İndirgeme Antioksidan Gücü) Yöntemi	25
2.5.5. DPPH Yöntemi.....	26
2.5.6. TEAC (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi)/ABTS Yöntemi	26
2.5.7. CUPRAC (Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi.....	27
2.5.8. Geliştirilen CAR-SNP Esaslı Antioksidan Kapasite Yöntemi	27
2.6. LİTERATÜRDE VAROLAN SOY METAL NANOPARÇACIK ESASLI ANTIOKSİDAN KAPASİTE TAYİNİ İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	29
3. MALZEME VE YÖNTEM	31
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR.....	31
3.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER	31
3.3. Çözeltilerin hazırlanması	31
3.3.1. CAR-SNP Esaslı Antioksidan Kapasite Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	31
3.3.2. CUPRAC Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	32
3.3.3. Polifenolik Bileşiklerin Çözeltilerinin Hazırlanması	32
3.3.4. Bitki Çayı İnfüzyonlarının Hazırlanması	32
3.4. UYGULANAN YÖNTEMLER.....	32
3.4.1. CAR-SNP Esaslı Antioksidan Kapasite Tayininde Kullanılan Yöntemler.....	32
3.4.1.1. SNP (Gümüş Nanoparçacık) Hazırlanması.....	32
3.4.1.2. Geliştirilen CAR-SNP Esaslı Antioksidan Kapasite Yöntemi	32
3.4.2. CUPRAC Yöntemi	33
3.4.3. Sentetik Antioksidan Karışım Çözeltilerinin TAC Ölçümü.....	33
3.4.4. Katkı Çalışması	34
3.4.5. İnterferans Çalışması	34
3.4.6. Karakterizasyon Analizleri	34
4.BULGULAR	35

4.1. CAR-SNP ESASLI ANTIÖKSİDAN KAPASİTE YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ	36
4.1.1. Optimum Deney Koşullarının Belirlenmesi	36
4.1.1.1. Gümüş Nanoparçacık Sentezinde $AgNO_3$ ve K-Karagenan Konsantrasyonunun Etkisi	36
4.1.1.2. CAR-SNP Yönteminde İnkübasyon Süresi ve pH'ın Belirlenmesi	37
4.1.2. Sentezlenen Gümüş Nanoparçacıkların Karakterizasyonu	38
4.1.2.1. Spektrofotometrik Karakterizasyonu	38
4.1.2.2. SEM Analizi ile Karakterizasyonu	39
4.1.2.3. FTIR Analizi ile Karakterizasyonu	40
4.1.2.4. XRD Analizi ile Karakterizasyonu	41
4.1.3. Troloks Bileşiğinin Geliştirilen Yöntem ile Kalibrasyonu	42
4.1.4. Antioksidan Bileşiklerin CAR-SNP Esaslı Antioksidan Kapasite Yöntemi ile Molar Absorptivite, Korelasyon Katsayıları, Doğru Denklemleri, Doğrusal Çalışma Aralıkları ve TEAC Katsayılarının Belirlenmesi	43
4.1.5. Sentetik Antioksidan Karışım Çözeltilerinin CAR-SNP Esaslı Antioksidan Kapasite Yöntemine Göre TAC Ölçümü	44
4.1.6. Yöntemin Kesinliğinin ve Geri Kazanımının Belirlenmesi	45
4.1.7. CAR-SNP Esaslı Antioksidan Kapasite Yöntemi ile Bazı Bitki Çayı İnfüzyonlarının Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi	45
4.1.8. İnterferans Çalışması	46
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	48
KAYNAKLAR	54

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Antioksidanların sınıflandırılması.	5
Şekil 2.2: E vitamininin kimyasal yapısı.	6
Şekil 2.3: C vitamininin kimyasal yapısı.	6
Şekil 2.4: β -karotenin yapısı.	8
Şekil 2.5: Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı.	9
Şekil 2.6: Flavonların kimyasal yapısı.	9
Şekil 2.7: Flavononların kimyasal yapısı.	10
Şekil 2.8: κ -karagenanın fiziksel görünümü.	12
Şekil 2.9: Karagenanın üç ana tipinin kimyasal yapısı.	12
Şekil 2.10: Nanomalzeme çeşitleri ve morfolojileri.	14
Şekil 2.11: İletim bandındaki elektronlar ile ışığın etkileşiminden kaynaklanan yüzey plazmon rezonansı.	16
Şekil 2.12: Yeşil sentezin avantajları.	20
Şekil 2.13: Bitki bazlı metal nanorçacık indirgeme mekanizmasının diyagramı.	23
Şekil 2.14: CUPRAC yönteminin kromojenik oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc reaktifinin antioksidanlarla ($Ar(OH)_n$) reaksiyonu sonucu Cu(I)-Nc renkli kelatının oluşumu.	27
Şekil 2.15: κ -karagenan kullanılarak yeşil sentez ile CAR-SNP'lerin oluşumu.	28
Şekil 2.16: CAR-SNP'lerin antioksidan ortamında genişlemesi.	29
Şekil 4.1: Ag iyonu konsantrasyonunun sentezlenen CAR-SNP'lerin plazmon absorbanşı üzerine etkisi.	36
Şekil 4.2: κ -karagenan konsantrasyonunun sentezlenen CAR-SNP'lerin plazmon absorbanşı üzerine etkisi.	37
Şekil 4.3: a) CAR-SNP oluşumunun reaksiyon kinetiği b) TR varlığında genişleyen CAR-SNP'lerin reaksiyon kinetiği.	37

Şekil 4.4: Antioksidan yokluğunda farklı pH'larda oluşan CAR-SNP'lerin UV-görünür bölge spektrumları.	38
Şekil 4.5: Sentezlenen CAR-SNP'lerin, troloks varlığında genişleyen CAR-SNP'lerin ve tek başına troloxun UV-görünür bölge spektrumları.....	39
Şekil 4.6: Sentezlenen CAR-SNP'lerin (a) antioksidan yokluğunda (b) antioksidan varlığında wet-STEM görüntüleri.	40
Şekil 4.7: a) κ -karagenana b) sentezlenen CAR-SNP'ye ait FTIR spektrumu.	41
Şekil 4.8: Sentezlenen CAR-SNP'ye ait XRD modeli.....	41
Şekil 4.9: Farklı TR konsantrasyonları varlığında (0- 10 μ M) oluşan CAR-SNP'lerin UV- görünür bölge spektrumları.	42
Şekil 4.10: Bazı bitki çayı infüzyonlarının CAR-SNP ve CUPRAC yöntemlerine göre belirlenen toplam antioksidan kapasiteleri.	46

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 4.1: Soy metal nanoparçacıkların çekirdeklenmesi ve büyümesi esasına dayalı farklı yöntemlerle elde edilen bazı antioksidan bileşiklerin LOD değerleri.	43
Tablo 4.2: Antioksidan bileşiklerin CAR-SNP esaslı antioksidan kapasite yöntemiyle elde edilen doğrusal denklemleri, korelasyon katsayıları, doğrusal çalışma aralıkları ve TEAC değerleri (CUPRAC yöntemiyle karşılaştırılarak)	44
Tablo 4.3: Sentetik antioksidan karışım çözeltilerinin CAR-SNP yöntemine göre μM troloks (TR) cinsinden teorik ve deneysel olarak ölçülen TAC değerlerinin karşılaştırılması (N=3).....	45
Tablo 4.4: Geliştirilen CAR-SNP yönteminin kesinliği ve geri kazanımı.	45
Tablo 4.5: Bazı bitki çayı infüzyonlarının CAR-SNP ve CUPRAC yöntemlerine göre belirlenen toplam antioksidan kapasiteleri.	46
Tablo 4.6: CAR-SNP esaslı AC yöntemi ile 4 μM TR'nin tayininde çeşitli bileşiklerin etkileri.....	47

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ |

Simgeler	Açıklama
ϵ	: molar absorplama katsayısı

Kısaltmalar	Açıklama
NP	: nanoparçacık
SNP	: gümüş nanoparçacık
CAR-SNP	: κ -karagenan kaplı gümüş nanoparçacık
Au-NP	: altın nanoparçacık
SPR	: yüzey plazmon rezonansı
LSPR	: lokalize yüzey plazmon rezonansı
AC	: antioksidan kapasite
TAC	: toplam antioksidan kapasite
CUPRAC	: bakır(II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi
Cu(II)-Nc	: bakır(II)-neokuproin
Cu(I)-Nc	: bakır(I)-neokuproin
TEAC	: troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi
GSH	: indirgenmiş glutatyon
GSSG	: yükseltgenmiş glutatyon
TR	: troloks
DPPH	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
H ₂ O ₂	: hidrojen peroksit
GSH-Px	: glutatyon peroksidaz
SOD	: süperoksit dismutaz

TEM	: transmisyon elektron mikroskopisi
DLS	: dinamik ışık saçılımı
SEM	: taramalı elektron mikroskopisi
FTIR	: fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi
XRD	: X-ışını kırınımı
ET	: elektron transferi
HAT	: hidrojen-atom transferi
QR	: kuersetin
CT	: kateşin
TP	: α -tokoferol
RA	: rosmarinik asit
EGCG	: epigallokateşin gallat
EC	: epikateşin
GA	: gallik asit
AA	: askorbik asit
LOD	: tespit limiti
LOQ	: tayin limiti
REC	: geri kazanım
RSD	: bağıl standart sapma
SD	: standart sapma

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YEŞİL NANOTEKNOLOJİ İLE SENTEZLENEN SOY METAL NANOPARÇACIK ESASLI ANTİOKSİDAN KAPASİTE ÖLÇÜM YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ

İlknur ÖZTÜRK

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Mustafa BENER

Sağlıklı bir yaşam sürdürmek için antioksidan yönünden zengin gıda tüketimi, sağlık risklerini azaltmanın kabul edilebilir bir yoldur. Bu nedenle bu antioksidanların gıdalardaki veya biyolojik matrislerdeki antioksidan kapasitesini belirlemek önemlidir ve bu yöndeki çalışmalar özellikle analitik kimya alanında artmaktadır. Nanoteknoloji ile üretilen metal nanoparçacıklar, biyomedikal ve fizikokimyasal alanlardaki geniş uygulama alanlarından dolayı ilgi odağı olmuştur. Nanoparçacıkların fiziksel ve kimyasal sentezlerinin genellikle pahalı ve potansiyel olarak çevreye zararlı olmasından dolayı, alternatif olarak daha ucuz ve çevreci bir yöntem olan biyolojik senteze yani yeşil nanoteknolojiye ihtiyaç duyulmuştur. Bu kapsamda bu tez çalışmasında; insan sağlığı açısından büyük öneme sahip antioksidanların tayini için, yeşil nanoteknolojiden yararlanılarak, soy metaller içinden özellikle çekirdekleme ve büyüme mekanizmasına dayalı tayin yöntemleri için uygun olan gümüş iyonları kullanılarak antioksidan kapasite tayin yöntemi geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Yeşil nanoteknoloji kapsamında, suda çözünebilen bir anyonik polisakkarit olan κ -karagenan kullanılarak Ag iyonları ile elektrostatik çekim kuvveti etkisiyle stabilize edilmiş gümüş çekirdekleri oluşturulmuştur. κ -karagenan, κ -karagenan kaplı gümüş nanoparçacıkların (CAR-SNP'lerin) yeşil biyosentezi için kullanılmıştır. κ -karagenan ile kaplanmış, negatif yüklü SNP'lerin yüzey fonksiyonel grupları, Ag⁺'nin antioksidanlarla kimyasal indirgenmesinden sonra ortaya çıkan net bir SPR pik yükselmesine neden olmaktadır.

Geliştirilen CAR-SNP metodu kullanılarak, artan antioksidan konsantrasyonlarının varlığında büyümüş SNP'lerin SPR absorbansındaki doğrusal artış ölçülerek antioksidan kapasite (AC) belirlenmiştir. CAR-SNP esaslı AC yöntemi, seçilmiş antioksidan bileşiklere, sentetik antioksidan karışımlarına ve çay infüzyonlarına uygulanmıştır. Geliştirilen yöntem geniş bir konsantrasyon aralığındaki antioksidan bileşiklere lineer bir cevap vermiştir. Çeşitli antioksidanların geliştirilen yöntem kullanılarak elde edilen troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) değerleri, CUPRAC yöntemiyle elde edilen değerlerle karşılaştırılmıştır. Okzalal, sitrat, meyve asitleri, amino asitler ve indirgeyici şekerler gibi gıdalarda yaygın olarak bulunun içerikler geliştirilen yöntemi interfere etmemiştir. Bu yöntem lineerlik, toplamsallık, tekrarlanabilirlik ve geri kazanım açısından valide edilmiştir. Geliştirilen yöntem güvenilir ve kararludur. CAR-SNP esaslı AC yöntemi, nanoparçacık sentezi ve uygulamasının yeşil kimya prensipleriyle uyumludur ve basit, hızlı, düşük maliyetli ve hassas AC tayinine olanak sağlar. |

Temmuz 2021, 76 sayfa.

Anahtar kelimeler: Karagenan, gümüş nanoparçacıklar, nanoparçacık oluşum-büyüme mekanizması, yeşil sentez, antioksidan kapasite tayini

SUMMARY

M.Sc. THESIS

**DEVELOPMENT OF ANTIOXIDANT CAPACITY
MEASUREMENT METHOD BASED ON NOBLE METAL
NANOPARTICLE SYNTHESIZED WITH GREEN
NANOTECHNOLOGY**

Ilknur OZTURK

Istanbul University-Cerrahpasa

Institute of Graduate Studies

Department of Chemistry

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Mustafa Bener

Antioxidant-rich food consumption to preserve a healthy life is an acceptable way to reduce health risks, so it is important to determine the antioxidant capacity of these antioxidants in foods or biological matrices, and studies in this direction increase especially in the field of analytical chemistry. Metal nanoparticles produced with nanotechnology have been the focus of attention due to their wide application in biomedical and physicochemical fields. Since the physical and chemical synthesis of nanoparticles are generally expensive and potentially harmful to the environment, an alternative, cheaper and environmentally friendly method, biological synthesis, namely green nanotechnology, was needed. In this regard, for the determination of antioxidants that are of great importance for human health, the aim of this thesis work is to develop an antioxidant capacity determination method by using green nanotechnology and using silver ions, which are suitable for determination methods based on formation-growth mechanism, among noble metals.

Within the scope of green nanotechnology, silver cores stabilized by the effect of electrostatic attraction force with Ag ions were formed by using κ -carrageenan, a water-soluble anionic polysaccharide. Surface functional groups of negatively charged SNPs capped with κ -carrageenan cause a net SPR peak increase that occurs after the chemical reduction of Ag^+ with antioxidants.

Antioxidant capacity (AC) was determined using the developed CAR-SNP method by measuring the linear increase in SPR absorbance of the enlarged SNPs in the presence of increasing antioxidant concentrations. The CAR-SNP based AC method was applied to selected antioxidant compounds, synthetic antioxidant mixtures, and tea infusions. The developed

method gave a linear response over a wide concentration range of antioxidant compounds. The trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) values of various antioxidants obtained using the developed method were compared with the values obtained by the CUPRAC method. Common food ingredients such as oxalate, citrate, fruit acids, amino acids and reducing sugars did not interfere with developed method. This method has been validated in terms of linearity, additivity, repeatability and recovery, demonstrating that the method is reliable and robust. The CAR-SNP based AC method is compatible with green chemistry principles of nanoparticle synthesis and application, and provides simple, rapid, low-cost, and sensitive AC determination. |

July 2021, 76 pages.

Keywords: Carrageenan, silver nanoparticles, formation-growth mechanism, green synthesis, antioxidant capacity determination |

GİRİŞ

Oksidatif stres, oksidanların lehine, antioksidan ve oksidan seviyeleri (serbest radikaller veya reaktif türler) arasındaki fizyolojik dengesizliğin bir sonucu olarak ortaya çıkan hücresel bir fenomen veya durumdur. Serbest radikallerin üretimi, vücudun doğal antioksidan savunma mekanizmalarının başa çıkabileceği seviyeyi aştığında, DNA, protein ve lipidler gibi temel biyomoleküllerin oksidasyonunu tetikleyen ve birden fazla hastalık durumuna yol açan hücresel bir oksidatif ortam oluşur [1]. Antioksidanlar, kolayca okside olabilen materyallerin oksidasyonunu büyük ölçüde geciktiren ya da engelleyen maddeler olarak tanımlanmaktadır. Serbest radikallerin oluşumu, dolaylı olarak antioksidanlar gibi sağlığa yararlı bileşikler tarafından kontrol edilebilir. Bu nedenle gıdalarda ve biyolojik sistemlerde doğal olarak bulunan birçok molekülün antioksidan kapasitesinin çalışılması önem kazanmıştır [2]. Antioksidan kapasitesini ölçmek için bugüne kadar çok sayıda metot geliştirilmiştir. Bu metotlarda genellikle, antioksidan aktivite ölçümleri reaksiyon kinetiği ile ilişkilendirilerek ölçülürken, antioksidan kapasite ölçümleri reaksiyon termodinamiği ile ölçülebilir. Bu metotlar; in vivo ve in vitro, enzimatik ve enzimatik olmayan veya doğrudan ve dolaylı olarak sınıflandırılabilir. Yaygın olarak kabul edilen sınıflandırma iki ana kategoriyi içerir: hidrojen-atom transferi (HAT) temelli ve elektron transferi (ET) temelli yöntemler [3]. CUPRAC, Folin-Ciocalteu, FRAP, ferrisiyanür yöntemleri ET temelli; ORAC yöntemi HAT temelli ve ABTS-persülfat/TEAC, DPPH yöntemleri ET/HAT temelli yöntemlerdir [4]. ET temelli spektrofotometrik yöntemlerde antioksidan kapasite, antioksidanlarla indirgendiğinde renk değiştiren reaktiflerin uygun dalga boylarında absorbanısı ölçülerek belirlenir. Son yıllarda bu yöntemlere ek olarak, nanoparçacık kromoforları oluşturmak için, antioksidanların kimyasal indirgemesine dayanan kolorimetrik nanoteknolojik total antioksidan kapasite tayin yöntemleri geliştirilmiştir [5].

Son yıllarda en önemli teknolojilerden biri haline gelen nanoteknoloji, elektronik, malzeme bilimi, biyoteknoloji, uzay mühendisliği gibi önemli bilimsel alanlarda öne çıkmıştır. Küçük boyutları ve özel yüzey alan karakteristikleriyle metal nanoparçacıklar, birçok farklı araştırma alanlarında kullanılmaktadır [5]. Günümüzde araştırmacılar, kataliz, kompozit benzeri polimer preparatları, hastalık teşhisi ve tedavisi, sensör teknolojisi gibi alanlarda yararlı olmaları nedeniyle metal nanoparçacıklar, nano yapılar ve nanomateryal sentezine odaklanmaktadır [6].

Nanomateriyaller, yeni antioksidan yöntemlerinin geliştirilmesinde önemli bir rol oynar ve geleneksel yöntemlere kıyasla gıda antioksidanlarının hızlı ve akıllı bir şekilde değerlendirilmesini sağlar. Soy metal nanoparçacıkların (NP'lerin) kullanımı, analitik kimyada nanomalzemelerin en güncel uygulamalarından biri olarak öne çıkmaktadır. Bu yöntemler, metal iyonlarını kolloidal dispersiyonlar şeklinde metal NP'lere indirgemeye dayanmaktadır.

Gümüş nanoparçacıklar (SNP), fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler olmak üzere üç farklı yaklaşımla sentezlenebilir. Gümüş nanoparçacıkların sentezi için kullanılan kimyasal yöntemler kimyasal indirgeme, elektrokimyasal teknikler, ışınlama destekli kimyasal yöntemler ve piroliz olarak alt bölümlere ayrılabilir. Çözelti içindeki gümüş nanoparçacıkların sentezi genellikle üç ana bileşen içerir: metal öncüleri, indirgeyici ajanlar ve dengeleyici/kaplama ajanları. Yaygın olarak kullanılan indirgeyici ajanlar arasında borohidrit, sodyum sitrat, askorbik asit, alkol ve hidrazin bileşikler bulunur [7]. Kimyasal yöntemlerin avantajı; düşük maliyet ve yüksek verim, dezavantajı ise toksik ve tehlikeli kimyasalların kullanılmasıdır [5].

Fiziksel yöntemlerde gümüş nanoparçacıklar, genellikle atmosfer basıncında bir tüp fırını kullanılarak gerçekleştirilebilen buharlaşma–yoğuşma ile sentezlenir. Bu şekilde gümüş nanoparçacık üretmenin birçok dezavantajları vardır. Tüp fırını büyük bir yer kapladığı için, kaynak materyallerinin çevresindeki ısıyı yükseltmek için fazla enerji harcanır ve termal stabilite elde etmek için çok zaman gerekir. Tehlikeli kimyasalların kullanılmaması, yöntemin avantajıdır [8]. Bahsettiğimiz klasik sentez yöntemlerin dezavantajlar içermesi, yüksek maliyetli olması ve toksik madde kullanımı gerektirmesi; bilim insanlarını ucuz, biyomedikal ve farmakolojik uygulamalara uyumlu olma gibi avantajlar içeren çevre dostu bir nanoparçacık sentezi yaklaşımına yönlendirmiştir. Yeşil sentez (biyolojik metot) günümüzde sıkça kullanılan bir yöntem haline gelmiştir [9]. Yeşil sentezde maya, mantar, bakteri ve bitki özütleri gibi biyolojik sistemler kullanılır [10]. Bitki özütleri içindeki fotokimyasallar, soy metal iyonlarını mikroorganizmalardan daha kısa inkübasyon süresinde indirgerler. Ayrıca bitki özütleri, metal parçacık sentezinde hem indirgeyici hem stabilizatör görevi gördükleri için, zararlı kimyasalları ve ekstra maliyeti elimine etmiş olurlar [5]. Mikroorganizmalarla yapılan sentezlerde, bitki bazlı yapılara kıyasla daha sınırlı sayıda boyut ve şekil elde edilir [11].

Karagenan, çeşitli kırmızı deniz yosunu türlerinden (Rhodophyceae) türetilen, yenilenebilir ve geri dönüştürülebilir bir biyopolimerdir [12]. Biyouyumluluk, geri dönüşebilirlik ve toksik

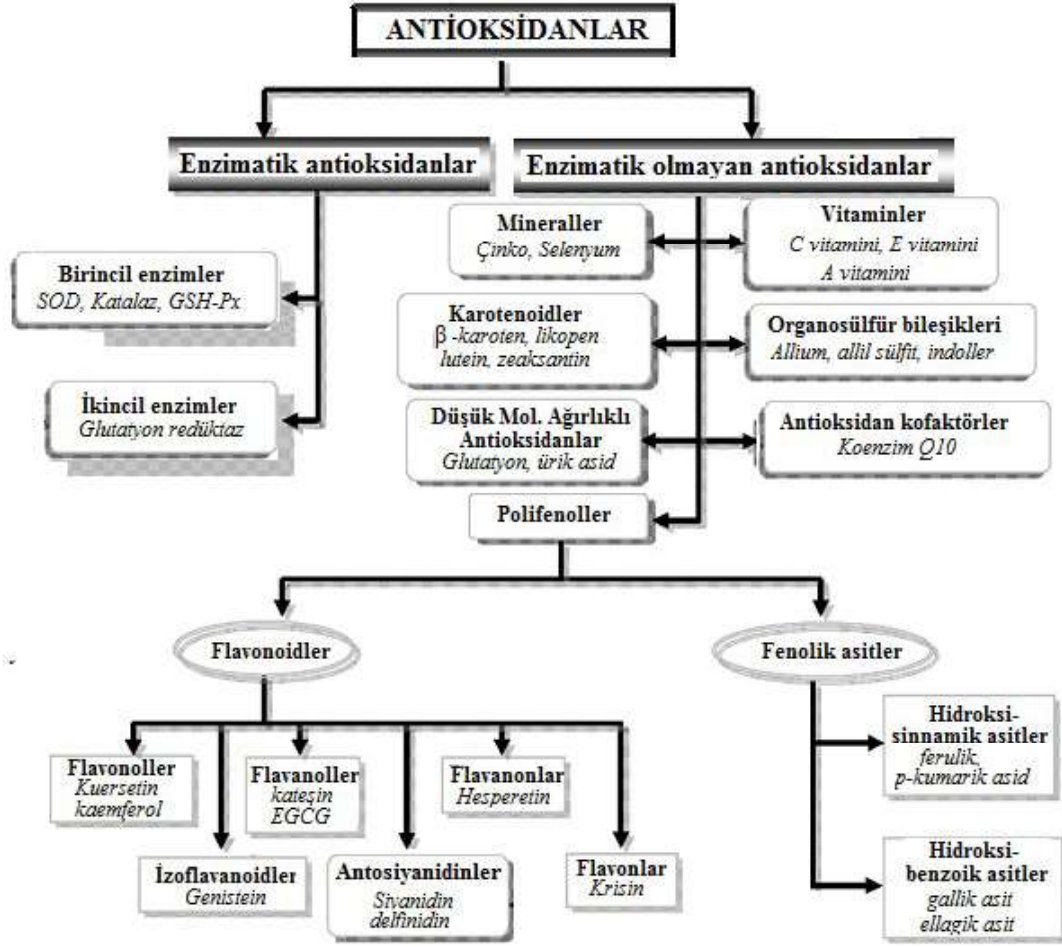
olmaması özellikleri dolayısıyla, gıda endüstrisinde genellikle kıvam artırıcı, jelleştirici ve stabilizatör olarak kullanılır [13]. Bu özelliklerinden dolayı ilaç ve kozmetik sanayinde de kullanılmaktadır. Karagenan, suda çözünebilir anyonik bir polisakkarittir ve molekül zincirinde yüksek sayıda hidroksil ve sülfat grubu barındırır [14]. Farklı sülfonasyon derecelerine sahip D-galactose ve 3,6-anhidrogallactose birimleri bulundurur. Sülfat gruplarının varlığından dolayı belirgin bir biçimde negatif yüklüdür. Sülfat esterlerinin sayısına ve konumuna bağlı olarak farklı karagenan türleri (κ -karagenan, i-karagenan, λ -karagenan, vb.) vardır [12].

Bu tez çalışmasında κ -karragenan polisakkariti kullanılarak oda sıcaklığında yeşil biyosentez ile sentezlenen, κ -karragenan kaplı gümüş nanoparçacık (CAR-SNP) esaslı antioksidan kapasite (AC) tayini yöntemi geliştirilmiştir. Çekirdek-kabuk oluşumu ve büyüme esasına dayalı bu yöntemde, nanoparçacıklar antioksidanlarla reaksiyona girdikten sonra kontrollü büyüme mekanizmasını kullanmaktadır. Bu yaklaşımın, diğer benzer ET bazlı yöntemlere göre AC tayini için daha yüksek hassasiyet sağladığı kanıtlanmıştır. Antioksidan ilavesi üzerine CAR-SNP'lerin genişlemesine bağlı absorban değişikliği 420 nm'de kaydedilmiştir. SPR bant yoğunluğunda doğrusal değişiklik, antioksidan miktarına bağlı olarak çekirdeklenmeden (yani yeni çekirdek oluşumu) çok SNP'lerin büyümesine bağlı olarak elde edilmiştir. Literatürdeki mevcut çalışmalardan farklı olarak, tek dağılımlı SNP çekirdekleri elde etmek için doğal bir polisakkarit olarak κ -karagenan kullanılmıştır. κ -karagenan, kontrollü bir indirgeme ve stabilizasyon ajanı olduğu kadar bir kaplama yardımcısıdır. κ -karagenanın sülfat grupları ile pozitif yüklü gümüş çekirdekler arasındaki elektrostatik etkileşimin bir sonucu olarak, orijinal NP'ler κ -karagenan ile kaplanmıştır. CAR-SNP'lerin negatif yükü, yüzey fonksiyonel gruplarının bağlanma kabiliyetiyle birleştiğinde, daha fazla Ag iyonu ve fenolik antioksidan çekerek, AC ölçümünde daha yüksek hassasiyete yol açan yeni SNP'ler ile kontrollü büyümeyi mümkün kılmaktadır. Kontrollü boyutlara sahip CAR-SNP'lerin üretimi ve büyümesi, κ -karagenan ile başlayan ve antioksidanların eklenmesinden sonra devam eden iki aşamalı bir Ag^+ indirgeme prosedürü ile gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, yeni, çevre dostu, basit, hızlı ve düşük maliyetli bir AC ölçüm yöntemi geliştirilmiştir. |

2. GENEL KISIMLAR

2.1. ANTİOKSİDANLAR

Antioksidanlar, serbest radikallerle güvenli bir şekilde etkileşime girebilen ve hayati moleküller hasar görmeden zincir reaksiyonunu sonlandırabilen bileşikler veya sistemlerdir [16]. Antioksidanlar ve oksidanlar (serbest radikaller veya reaktif oksijen türler) arasında fizyolojik dengesizliğin, oksidanlar lehine oluşmasıyla oksidatif stres oluşur. Oksidatif stres ile birlikte DNA, protein ve lipidler gibi temel biyomoleküllerin oksidasyonu tetiklenir ve hastalık koşullarına yol açan oksidatif bir ortam yaratılmış olur. Bu nedenle serbest radikaller, antioksidanlar ve hastalıklar arasındaki etkileşim, sağlığın korunması açısından önemlidir [1]. Antioksidan sistemler, enzimatik olmayan antioksidanlar olarak bilinen albumin, glutatyon, askorbik asit, α -tokoferol, β -karoten, ürik asit, bilirubin, flavonoidler ve birçok polifenolik bileşik ile süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, askorbat peroksidaz ve katalaz gibi enzimleri içerirler [4].



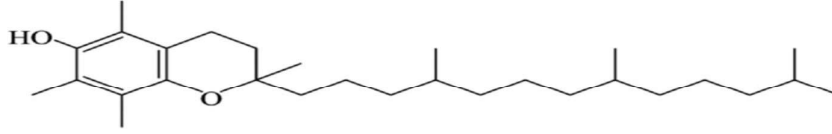
Şekil 2.1: Antioksidanların sınıflandırılması.

Antioksidanlar, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek açısından çeşitli mekanizmalar kullanırlar:

- Peroksidasyonu başlatan türleri sönmeye uğratmak (süpürmek)
- Metal iyonlarını reaktif türler üretmeyecek veya peroksitleri parçalayamayacak şekilde kelatlamak
- $O_2^{\cdot-}$ 'yi söndürerek peroksit oluşumunu engellemek
- Oto-oksidatif zincir reaksiyonunu kırmak
- Lokalize O_2 konsantrasyonunu azaltmak [16]

2.1.1 E Vitamini

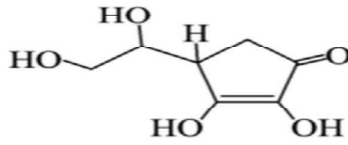
E vitamini yağda çözünen bir antioksidandır ve genellikle lipid peroksidasyonunun en önemli inhibitörü olduğu düşünülmektedir [17]. E vitamini, zincir kırma antioksidan aktivitesi sergileyen dört tokoferol ve dört tokotrienolden oluşur. Tokoferol grubu bileşenler antioksidan aktiviteyi sergilerler. α -, β -, γ - ve δ - tokoferoller antioksidan aktivite için gerekli olan hidroksil grupları içerirler. Antioksidan özellik α -tokoferolde en fazladır [4].



Şekil 2.2: E vitamininin kimyasal yapısı.

2.1.2 Askorbik Asit (C vitamini)

Askorbik asit, en yaygın hidrofilik antioksidanlardan biridir. Hidroksil ve alkoksil radikallerini, süperoksit radikal anyonunu, singlet oksijeni, hidrojen peroksiti ve reaktif oksijen türlerini süpürür [16]. Askorbik asit, lipofilik radikallerin doğrudan bir temizleyicisi olmamasına rağmen, lipid peroksit radikallerinin giderilmesinde tokoferol ile kombinasyon halinde sinerjik bir etkiye sahiptir [18].



Şekil 2.3: C vitamininin kimyasal yapısı.

2.1.3. Antioksidan Enzimler

Hücrelerde serbest radikallerin veya reaktif türlerin oluşumunu bastırmak veya önlemek için hareket eden antioksidanlardır. Serbest radikallere dönüşme potansiyeli olan herhangi bir molekülü veya diğer radikallerin üretimini indüklemek için herhangi bir serbest radikale

dönüşme potansiyeli olan herhangi bir molekülü nötralize etmede çok hızlıdır. Başlıcaları; süperoksitdismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidazdır [1].

2.1.3.1. Süperoksit Dismutaz

Süperoksit dismutaz (SOD), hücredeki ilk detoksifikasyon enzimi ve en güçlü antioksidandır. Hücreleri korumada etkili önemli bir endojen antioksidan enzimdir. İki süperoksit anyon molekülünün, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) parçalanmasını katalize eder. Dolayısıyla potansiyel olarak zararlı süperoksit anyonunu daha az tehlikeli hale getirir [1].



2.1.3.2. Glutatyon Peroksidaz

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), hidrojen peroksiti suya parçalayan, peroksitin detoksifikasyonundan sorumlu bir hücre içi enzimdir [1]. Peroksitlerin indirgenmesini katalizleyen glutatyon peroksidaz enzimi hücredeki indirgenmiş glutatyonu (GSH) yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) dönüştürmektedir. Glutatyon peroksidaz glutatyonu hidrojen donör olarak kullanarak hidrojen peroksiti elimine etmektedir [4].



2.1.3.3. Katalaz

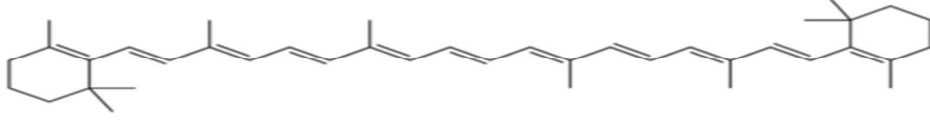
Katalaz, hemen hemen tüm aerobik organizmalarda bulunan peroksizomal bir enzimdir. Katalaz peroksit için spesifiktir ve organik peroksitleri ayrıştırmaz. Peroksitin su ve oksijene bozunmasını katalize eder [19]. Dolayısıyla, toksik hidrojen peroksiti hücrelerden uzaklaştırmada önemli bir rol oynar [4].



2.1.4. Karotenoidler

Karotenoidler, doğada yaygın olarak bulunan yağda çözünen bitki pigmentleridir. Karotenoidler, kimyasal yapılarına göre karotenler ve ksantofiller olarak sınıflandırılabilir. α -, β -karoten ve likopen karoten örnekleridir. Lutein, zeaksantin, astaksantin ve kantaksantin ksantofil örnekleridir. 700'den fazla karotenoid vardır, bunlardan 40'ı meyve ve sebzelerden

insan diyetine girer. İnsan dokularında bulunan başlıca karotenoidler α - ve β -karotenler, likopen, β -kriptoksantin, lutein ve zeaksantindir. Karotenler ve ksantofiller, tokoferoller gibi, singlet oksijen söndürücü ve serbest radikal (reaktif oksijen türleri) süpürücüdürler [20].



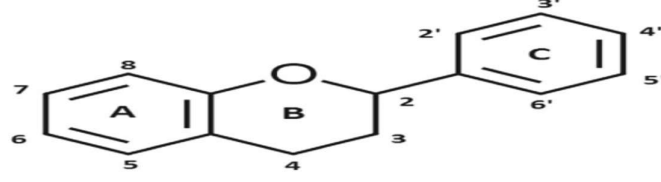
Şekil 2.4: β -karotenin yapısı.

2.1.5. Polifenoller

Doğal polifenolik bileşikler bitkilerde, meyvelerde, sebzelerde, yağda, kırmızı şarapta ve çayda bulunur [21]. Fenolikler, basit, düşük moleküler ağırlıklı, tek aromatik halka bileşiklerden büyük kompleks tanenlere ve türetilmiş polifenollere kadar uzanır. Polifenollerin ana grupları flavonoidler, fenolik asitler, fenolik alkoller, stilbenler ve lignanlardır [16]. Doğal polifenolik bileşikler, serbest radikal türlerini söndürerek ve/veya endojen antioksidan kapasitesini arttırarak antioksidan etkilerini gösterirler [21]. Polifenol molekülleri serbest radikalleri hidrojen atomu transferine ve tek elektron transferi mekanizmalarına göre inaktive eder [16].

2.1.5.1. Flavonoidler

Bu bileşiklerin sınıflandırması, A, B veya C halkasındaki hidroksil gruplarının sayısına, pozisyonuna ve sonuncusunun konjugasyon ve oksidasyon derecesine dayanır. Flavonoidlerin alt sınıfları flavonlar, izoflavonlar, flavanoller, flavonoller, flavanonlar ve antosiyaninlerdir [22]. Birçoğu bitki pigmentleri olan flavonoidler doğada bol miktarda bulunur. Flavonoidlerin genel yapısı bir C₁₅ (C₆–C₃–C₆) iskeleti içerir. Flavonoidler, esas olarak (i) hidroksilasyon, (ii) O-metilasyon, (iii) C-metilasyon, (iv) izoprenilasyon veya (v) metilendioksi ikamesi ile gösterilen birkaç alt grupta sınıflandırılabilir [16].



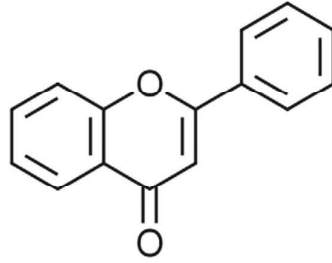
Şekil 2.5: Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı.

Flavonoller

Flavonoller, C halkasında alkol grubunun yer alması ile tanımlanır. Başlıca diyet flavonolleri kuersetin, mirisetin, rutin, izorhamnetin ve kaempferol'dür [16].

Flavonlar

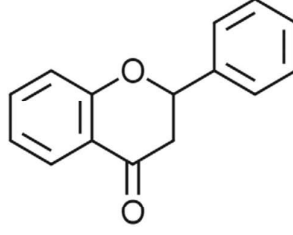
Kimyasal olarak, flavonlar 3-hidroksi grubundan yoksundur. Flavonların büyük kısmı iki flavanonun sentezinden oluşur. Flavonlar bitkilerin her yerinde, yerin üstünde ve altında, bitkisel ve generatif organlarda bulunur: gövde, yapraklar, tomurcuklar, ağaç kabuğu, öz odun, dikenler, kökler, rizomlar, çiçekler, meyveler, tohumlar [16].



Şekil 2.6: Flavonların kimyasal yapısı.

Flavanonlar

Flavanonlar özellikle narenciye ve kuru eriklerde bol miktarda bulunur. Naringenin, ağırlıklı olarak portakal ve greyfurt gibi narenciye meyvelerinde bulunan bir flavanondur [16].



Şekil 2.7: Flavononların kimyasal yapısı.

Flavanoller

Flavanoller, ısı, gıda maddeleri, yüksek pH koşulları ve çözünmüş oksijen veya diğer reaktif oksijen türlerinin varlığı ile çeşitli bozunma reaksiyonlarına karşı savunmasızdır [16].

Antosiyaninler

Doğadaki en büyük pigment grubu olan antosiyaninler, bazı meyve ve çiçeklerde renkten sorumlu pigment gruplarından biridir [16].

İzoflavonlar

İzoflavonlar, fitoöstrojen ailesine ait bir grup oksijen heterosiklik bileşiktir. En yaygın izoflavonlar daidzein, genistein ve glisiteindir [16].

2.1.5.2. Fenolik Asitler

“Fenolik asitler ” terimi genellikle bir karboksilik asit grubuna sahip olan fenolik bileşikleri tanımlar. Fenolik veya fenol karboksilik asitler, bitki fenolik bileşiklerinin ana sınıflarından biridir. Birçok bitki bazlı gıdalarda bulunurlar. Tipik olarak, amidler, esterler veya glikozitler gibi bağlı formda ve nadiren serbest formda bulunurlar. Fenolik asitler esas olarak iki alt gruba ayrılır: hidroksibenzoik ve hidroksisinamik asit [23].

2.1.5.3. Fenolik Alkoller

Fenolik alkoller; 2-feniletanol, hidroksitirosol, tirosol ve etanol-glukodazdır. Tirosol ve hidroksitirosol, zeytinde ve zeytinyağında bulunan iki önemli o-difenoldür [16].

2.1.5.4. Stilbenler

Stilbenler, bir etan köprüsü ile birbirine bağlanmış iki aromatik halka gösteren fenolik bileşiklerdir ve stilbenlerin veya diğer stilbenlerin oligomerleri olarak monomerik ve oligomerik formda bulunurlar. Önemli bir stilben olan Resveratrol, Botrytis enfeksiyonu ve diğer mantar saldırılarına yanıt olarak üzüm tarafından üretilir [16].

2.1.5.5. Lignanlar

Lignan, bitkilerde enzimatik dehidrojenatif polimerizasyon yoluyla monolignollerden oluşan doğal bir çapraz bağlı polifenoldür [22]. Lignanlar, keten tohumu ve diğer tohumlarda, köklerde, yapraklarda, meyvelerde ve bitkilerin odunsu kısımlarında bulunurlar [16].

2.2. KARAGENAN

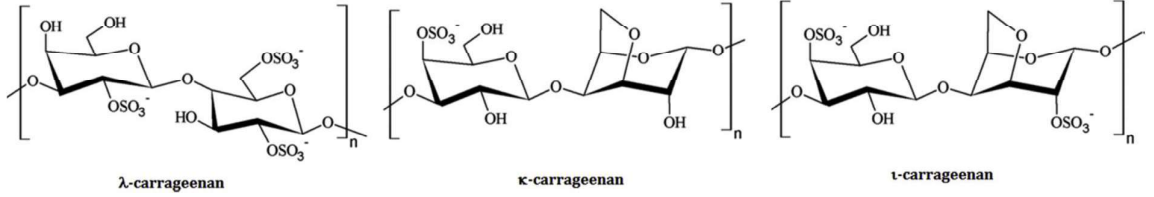
Karagenan, bazı kırmızı deniz yosunu türlerinin ekstraksiyonu ile elde edilen yüksek molekül ağırlıklı sülfatlı polisakkarit ailesinin genel adıdır [24]. Deniz yosunu algler, hücre duvarında, depolarında yüksek miktarda polisakkarite ve mikopolisakkarite sahiptir. Algal polisakkaritler, diğer organizmalarda bulunmayan bazı kimyasal bileşimleri fazla miktarda barındırmaları sebebiyle dikkat çekmektedir. Bu polisakkaritler, karagenan gibi kırmızı, aljinat gibi kahverengi, ulvan gibi yeşil deniz yosunlarından oluşan geniş bir yelpazeye sahiptir [15]. Rhodophyceae sınıfının kırmızı deniz yosunlarından elde edilen karagenan, %15-40 ester sülfat içeriğine sahip ve ortalama moleküler ağırlığı 100-1000 kda'nın arasında olan bir sülfat poligalaktandır. Bunlar esas olarak 3 bağlantılı- β -d-galaktopiranoz ve 4 bağlantılı- β -d-galaktopiranoz birimlerinde dönüşümlü olarak bağlanmış D-galaktoz kalıntılarından oluşur ve serbest hidroksil gruplarında meydana gelen ikame derecesine göre sınıflandırılır. İkamelemler genellikle ya ester sülfat ilavesi ya da 4 bağlantılı kalıntı üzerinde 3, 6-anhidrit varlığıdır. Disakkarit tekrarlama ünitesindeki sülfat grupları, sınıflandırmayı üç ana karagenan tipinden birine belirler: lambda (λ), kappa (κ) ve iota (i). Yukarıda açıklanan belirli karagenan türlerine ek olarak, bazı hibrit türler de vardır. κ -karagenan %25-30 ester sülfat grubuyla birlikte %28-35 3,6-anhidro-galaktoz (3,6-AG) grubu, i -karagenan %28-30 ester sülfat grubuyla %25-30 3,6-anhidro-galaktoz (3,6-AG) grubu içerir. Bu grupların varlığı karagenana güçlü jelleşme

özelliği vermektedir. λ -karagenan ise %32-39 ester sülfat grubuna sahiptir, (3,6-AG) grubu içermez [25].

Tüm karagenan fraksiyonları suda çözünür, organik çözücüler, yağ veya yağlarda çözünmez. Bununla birlikte, suda çözünürlüğü esas olarak sülfat gruplarının seviyelerine (çok hidrofilik) ve bunların ilişkili katyonlarına bağlıdır. Karagenanlarda bulunan ana iyonize katyonlar sodyum, potasyum, kalsiyum ve magnezyumdur, ancak diğer iyonlar da daha düşük frekansta ortaya çıkabilir. Karagenanlar, kalınlaşma, jelleşme ve stabilizatör gibi yeteneklerinden dolayı gıda sektöründe yaygın olarak kullanılırlar. Karagenanlar ayrıca ilaç, kozmetik, baskı ve tekstil formülasyonları gibi çeşitli gıda dışı ürünlerde de kullanılır [26].



Şekil 2.8: κ -karagenanın fiziksel görünümü.



Şekil 2.9: Karagenanın üç ana tipinin kimyasal yapısı.

2.3. NANOTEKNOLOJİ

Nanoteknoloji, farklı sentez stratejileri, parçacık yapısı ve boyut modifikasyonu kullanarak 1 ila 100 nm arasında değişen nano boyutlu parçacıkların hazırlanmasını ele alan bir bilimdir. Moleküler biyoloji, fizik, organik ve inorganik kimya, tıp ve malzeme bilimi gibi farklı alanlarda nanoparçacıkların kullanımı günümüzde beklenmedik bir şekilde artmaktadır. Parçacık boyutunun nano boyuta düşürülmesi, daha büyük dökme malzeme parçacıkları

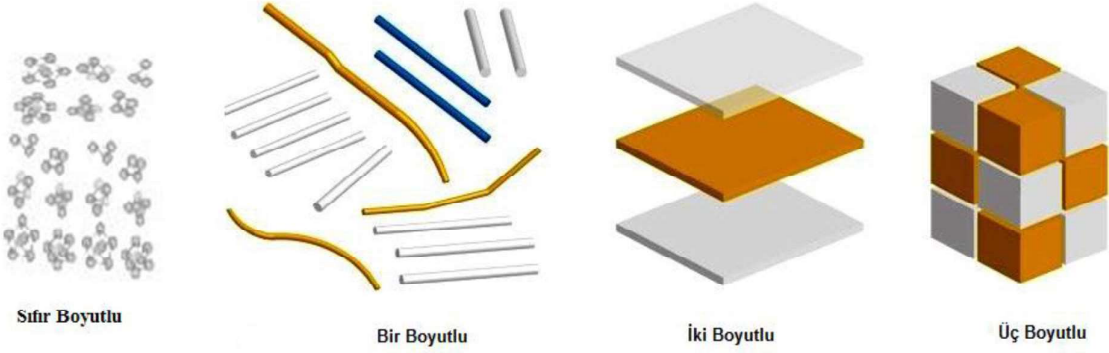
tarafından gösterilmeyen parçacık boyutu dağılımı ve morfoloji gibi kendine özgü ve geliştirilmiş özellikler gösterir [6]. Nanoparçacıklar, dökme malzemelerin aksine üstün fiziksel, mekanik, kimyasal ve optik özellikler sergilerler [27]. Nanoparçacığın yüzey-hacim oranı, büyük parçacıklara veya atomlara kıyasla %35-45 kat daha yüksektir. Nanoparçacığın spesifik yüzey alanının bu eşsiz dışsal özelliği, yüksek değeri için katkıda bulunan bir faktördür ve aynı zamanda boyuta bağlı olan güçlü yüzey reaktivitesi gibi farklı içsel özellikleri de etkiler. Genel olarak, nanoparçacıkların bu özel özellikleri, çok işlevli özelliklerinden sorumludur ve enerji, ilaç ve beslenme gibi çeşitli alanlarda uygulanmalarına yönelik ilgiyi arttırmıştır [6]. Nano ölçekli malzeme ve cihazlar, ilaç verme, doku mühendisliği ve aşı geliştirme gibi biyomedikal ve farmasötik uygulamalarda kullanılmıştır. Nanoparçacıklar, ultra küçük boyutları, geniş yüzey-hacim oranları ve yüzey modifikasyonlarına uygunlukları nedeniyle geleneksel tedavi seçeneklerine umut verici alternatifler olarak kabul edilmektedir [1].

2.3.1. Nanomateriyallerin Sınıflandırılması

İlk olarak, nanomalzemeler kökenlerine göre ayırt edilebilir: doğal veya antropojenik. Bu son kategori, oluşumlarının kasıtlı olup olmadığına bağlı olarak tesadüfi ve mühendislik nanomalzemelere ayrılabilir. Doğal ve tesadüfi bir kökene sahip olan nanoparçacıklar genellikle ultra ince parçacıklar olarak adlandırılır. İnorganik nanomalzemelerin doğal kaynakları, örneğin patlayan volkanlar, deniz dalgalarını kırma, orman yangınları, kum fırtınaları ve toprakları içerir [28].

Nanomalzemelerin ikinci bir kategorizasyonu, boyutlarına dayanmaktadır. Nanomateriyaller boyutlarına göre şöyle sınıflandırılırlar: 0D (nanoparçacıklar ve kuantum dotlar), 1D (nanotüpler, nanofiberler ve nanorodlar), 2D (ince filmler, yüzeysel quantum kuyuları) ve 3D (nanokompozitler, kütleli nanokristal filmler) [29].

Nanomalzemelerin bir başka olası sınıflandırması, bileşenlerin kimyasal doğasına dayanmaktadır. Metal ve metal alaşımlı nanomalzemelerin bazı örnekleri; tıbbi teşhis, antibakteriyel, iletken ve optik uygulamalarda kullanılan gümüş; katalizör, elektrik ve termal iletken, sinterleme ve yağlayıcı katkı maddesi ve antibakteriyel ajan olarak kullanılan bakır; ilaç dağıtımı, tıbbi test, kanser tespiti, elektronik, ısı dağılımı, özel alaşımlar ve yakıt hücreleri için kullanılan altındır [28].



Şekil 2.10: Nanomalzeme çeşitleri ve morfolojileri.

2.3.2. Soy Metal Nanoparçacıklar

Nanomalzemeler genellikle makro ölçekli muadillerine kıyasla benzersiz ve önemli ölçüde değiştirilmiş fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler sergilerler [6]. Metalik nanoparçacıklar veya metal nanoparçacıklar, son birkaç yılda nanoparçacıklar alanında yeni bir terminoloji olarak ortaya çıkmıştır. Sağlık için kullanımı uygun olan altın, gümüş ve platin gibi soy metaller, nanoparçacıkların sentezi için kullanılır ve metalik nanoparçacıklar olarak adlandırılır. Kataliz, elektronik, optik, çevre ve biyoteknoloji gibi uygulamalar için soy metal nanoparçacıkların sentezi sürekli ilgi alanıdır [30]. Altın, fiziksel, kimyasal ve optik özelliklerinden dolayı oldukça tercih edilmektedir. Altın nanoparçacıklar, sentez kolaylığı ve birleştirme özellikleri nedeniyle günümüzde çeşitli biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır [31]. Gümüş nanoparçacıkların kimyasal stabilitesi ve katalitik etkisi, antibakteriyel, antiviral, antikanser, antifungal ve antiinflamatuvar aktiviteler için diğer metalik nanoparçacıklara göre bir avantaja sahiptir. Gümüş, uzun zamandır tıbbi ve endüstriyel bir süreçte bulunan mikroplar üzerinde önleyici bir etkiye sahip olarak kabul edilmektedir. Tıpta gümüş ve gümüş nanoparçacıklar, yanık ve açık yaralara karşı enfeksiyonu önlemek için merhem olarak kullanılır [32]. Ayrıca kateterler, protezler veya cerrahi maskeler gibi tıbbi cihazları kaplamak için kullanılırlar. Tekstil endüstrisinde, *S. aureus* gibi patojenik bakterilerle enfeksiyonu önleyen veya en aza indiren steril hastane kıyafetleri yapımında antimikrobiyal özelliklere sahip toksik olmayan nanoparçacıklar kullanılmaktadır. Ayrıca antimikrobiyal nanoboyaların üretiminde de kullanılırlar [10]. Platin nanoparçacıklar gibi diğer metal nanoparçacıklar da sağlık açısından yararlı etkileri açısından değerlendirilmiştir ve biyomedikal

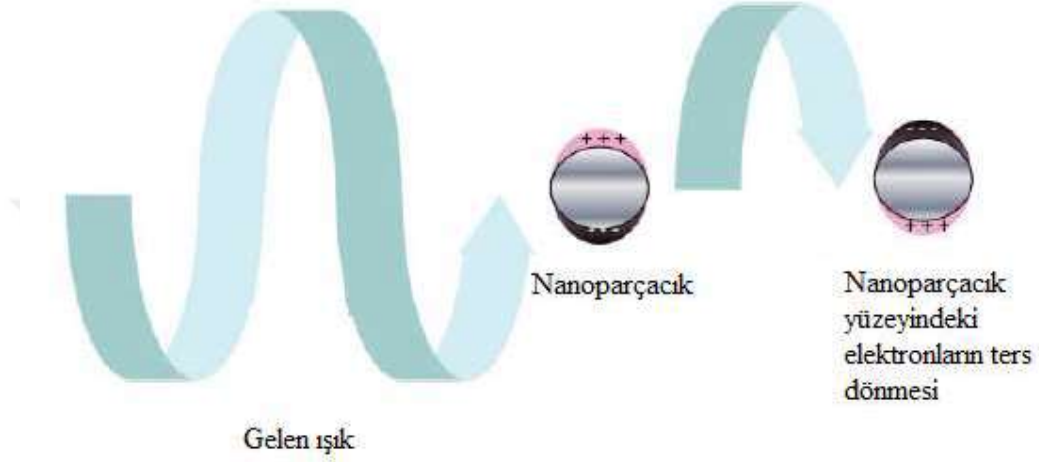
uygulamalarda saf formda veya tek olarak veya diğer metal nanoparçacıklar ile kombinasyon halinde alaşımlı metalde başarıyla kullanılmıştır. Biyomedikal ve ilgili disiplinlerde metal nanoparçacıkların kullanımı dünya çapında sürekli artmaktadır [6].

Metalik nanoparçacıklar, metal tuzunun sıfır değerlikli metal atomlarına indirgenmesiyle oluşur. Metalik nanoparçacık çapı; metal-metal bağlarının gücü, çözücünün doğası, sentez koşulları, metal tuzları ile indirgeme ajanı arasındaki redoks potansiyeli, kullanılan stabilize edici ajan türü, sıcaklık vb. gibi çeşitli faktörlerden etkilenir [33]. Metalik nanoparçacıkların hazırlanması ve stabilizasyonu için elektrokimyasal değişiklikler, kimyasal indirgeme ve fotokimyasal indirgeme gibi farklı fiziksel ve kimyasal yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmalar, metal nanoparçacıkların boyutunun, morfolojisinin, stabilitesinin ve özelliklerinin (kimyasal ve fiziksel), deneysel koşullardan, metal iyonlarının indirgeyici ajanlarla etkileşim kinetiğinden ve stabilize edici ajanın metal nanoparçacıklar ile adsorpsiyon işlemlerinden güçlü bir şekilde etkilendiğini göstermiştir. Bu nedenle, boyut, morfoloji, stabilite ve özelliklerin kontrol edildiği bir sentez yönteminin tasarımı önemli bir ilgi alanı haline gelmiştir [30]. Fizikokimyasal özellikleri ve nanoparçacıkların birçok uygulaması nedeniyle, bilim topluluğu nanoparçacıkların üretilmesi için uygun sentetik teknikler geliştirmek için yoğun çaba sarf etmiştir. Bununla birlikte, metal nanoparçacıkların sentezi için çeşitli fizyokimyasal yaklaşımlar, ağır metallerin neden olduğu çevre kirliliği nedeniyle sınırlıdır. Böylelikle, toksik olmama, üretimde tekrar üretilebilirlik, kolay ölçeklendirme ve iyi tanımlanmış morfoloji avantajlarına sahip olan nanoparçacıkların biyolojik yollarla sentezlenmesi, nanoparçacık üretiminde yeni bir trend haline gelmiştir. Özellikle, mikroorganizmalar ve bitkilerin, nanoparçacıkları sentezlemek için önemli potansiyele sahip yeni kaynaklar olduğu gösterilmiştir. Bugüne kadar, metal nanoparçacıkların sentezi için bakteriler, mantarlar ve mayaların yanı sıra bitkiler de dahil olmak üzere çeşitli mikroorganizmalar araştırılmıştır [34].

2.3.3. Soy Metal Nanoparçacıklarda Yüzey Plazmon Rezonansı (SPR)

Nanoparçacık boyutundan daha büyük bir dalgaboyunda ışığa geldiğinde rezonans olayı meydana gelir. Yüzey plazmon osilasyonu ile birlikte rezonanstaki ışık metaldeki serbest elektronların osilasyonuna neden olur. Rezonans olayı, absorpsiyon ve saçılma spektroskopisiyle belirlenir. Bu olay yüzeyde meydana geldiği için yüzey plazmon rezonansı olarak (SPR) ifade edilir [4]. Partikül boyutuna, kimyasal çevreye, yüzeydeki adsorbe edilen

türlere ve dielektrik sabitine bağlıdır [30]. Kimyasal olarak bağlı moleküller, yüzey plazmon absorpsiyon maksimumunda bir kaymaya neden olan yüzeydeki elektron yoğunluğunda meydana gelen değişimin gözlenmesiyle tayin edilebilir [4]. Bu ise soy metal nanoparçacıkları, farklı analitler için seçicilik ve belirleme basitliği sağlayan ideal analitik problemler yapar [5].



Şekil 2.11: İletim bandındaki elektronlar ile ışığın etkileşiminden kaynaklanan yüzey plazmon rezonansı.

2.3.4. Gümüş Nanoparçacıklar

Eşsiz optik, elektronik ve antibakteriyel özelliklere sahip SNP'ler, biyoalgılama, fotonik, elektronik ve antimikrobiyal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. SNP'lerin dikkat çekici derecede güçlü geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivitesi, tekstil ürünleri, gıda saklama kapları, antiseptik spreylere, kateterler ve bandajlar dahil olmak üzere SNP ürünlerinin geliştirilmesi için önemli bir yoldur. SNP'lerin biyosidal aktivitesi, boyutlarına, şekillerine ve yüzey kaplamalarına bağlıdır. Bu nedenle, insanlarda fizyolojik uygulama için iyi kontrol edilmiş morfolojik ve fizikokimyasal özelliklere sahip SNP'lerin geliştirilmesi biyomedikal uygulamalarını genişletmek için gereklidir [7].

2.3.4.1. Gümüş Nanoparçacıkların Fizikokimyasal Özellikleri

SNP'lerin boyut, şekil, yüzey kimyası, kaplama, aglomerasyon ve ayrılma hızı gibi fizikokimyasal özellikleri, biyolojik etkileşimlerin ve hücre sitotoksitesinin belirlenmesinde önemli faktörlerdir. Daha küçük SNP'lerin, daha geniş yüzey alanlarından dolayı potansiyel

olarak daha yüksek toksisite ile ilişkili olduğu, ancak SNP'lerin şeklinin sitotoksik tayin için eşit derecede önemli olduğu bildirilmiştir. Ek olarak, tümü SNP yüzey kaplamalarından etkilenen yüzey yükleri, farklı bağlanma ve agregasyon varyasyonlarının, hücreler ile etkileşimleri dikte etme ve hücre sitotoksitesine yanıt verme üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Soy metal nanoparçacıkların özellikleri, nanoparçacıkların boyut, şekil, yüzey yükü ve kaplamasındaki, aglomerasyonundaki ve yerel ortamındaki değişiklikler yoluyla değiştirilebilir [35].

2.3.4.2. Gümüş Nanoparçacıkların Optik Özellikleri

Gümüş nano yapıların olağanüstü optik özellikleri, ışıkla benzersiz etkileşimlerinden kaynaklanır ve bu, serbest iletim bandı elektronlarının veya lokalize yüzey plazmon rezonansının (LSPR) kolektif uyumlu salınımına neden olur. Serbest elektronların salınımı, ya güçlü bir görünür ışık saçılımı ile ışınımsal bozulma ya da foton enerjisinin termal enerjiye dönüştürülmesine neden olan radyatif olmayan bozulma ile sonuçlanır. Bu iki bozunma mekanizması, biyodiyagnostik ve görüntüleme (her ikisi de radyatif SPR bozunmasından yararlanır) ve terapötik (radyatif olmayan SPR bozunmasını kullanan) uygulamalarda kolaylıkla kullanılmıştır [7].

SNP'ler, LSPR'nin farklı optik özelliklerini sergiler ve ışığın güçlü bir görünür saçılmasıyla veya termal enerjiye dönüştürülen foton enerjisiyle radyasyonsuz bozunmayla sonuçlanan ışınımsal bozulma ile sonuçlanır. İlk bozunmanın mekanizması, teşhis ve görüntüleme uygulamalarında kullanılırken, son bozunmanın mekanizması terapötiklere uygulanmaktadır. LSPR, boyut, şekil ve yerel dielektrik ortam dahil olmak üzere SNP'lerin çeşitli fizikokimyasal özelliklerine duyarlıdır; bu nedenle, yerel ortamdaki değişikliklerin araştırılmasına, LSPR'deki plazmon tepe noktalarının mutlak kaymalarını ölçerek yaklaşılabılır [35].

2.3.4.3. Gümüş Nanoparçacıkların Sentezi

Nanoparçacık sentez yöntemleri büyük ölçüde iki ana gruba ayrılabilir: Aşağıdan yukarıya sentez ve yukarıdan aşağıya sentez. Bu ana gruplar ayrıca reaksiyon koşullarına, işlemlerine ve benimsenen protokollere göre üç alt gruba (biyolojik, fiziksel ve kimyasal yöntemler) ayrılabilir [33].

Aşağıdan yukarıya sentezde, atomlar ve moleküller, biriktirme veya reaksiyon parametreleri kontrol edilerek gerekli şekil ve boyutta nanoparçacıklar veya nanomateriyal oluşturmak için bir araya getirilir. Yukarıdan aşağıya sentezde, atomlar ve moleküller, istenen nanoparçacıkları elde etmek için dökme malzemeden çıkarılır. Yukarıdan aşağıya sentezin temel dezavantajı, hız ve tekrarlanabilirliğe göre tahmin edilir. Yüzey kusurları oluşturur, kirlenmeye neden olur ve ayrıca iç gerilimi ortaya çıkarmaktan sorumludur. Bununla birlikte, aşağıdan yukarıya sentez, nanomalzemeleri daha az kusur ve daha homojen bir bileşimle üretme avantajına sahiptir. Ayrıca aşağıdan yukarıya sentez ince filmler oluşturabilir ve yapı çok basittir. Sentez sırasında malzeme israfı yapmadığı için yukarıdan aşağıya göre daha ekonomiktir [36]. Aşağıdan yukarıya sentezin tüm örnekleri temelde buharlaşma-yoğunlaştırma, piroliz, lazer ablasyon öğütme, fiziksel buhar biriktirme ve diğer türden ayrıştırma teknikleri gibi fiziksel yöntemleri temsil eder. Yukarıdan aşağıya sentez sistemi, nanoparçacıkları indirgeme ve sedimentasyon mekanizmaları yardımıyla kimyasal veya biyolojik olarak sentezlemek için küçük maddelerin birleştirilmesini içerir [33].

Fiziksel sentez yöntemleriyle karşılaştırıldığında, gümüş nanoparçacıkların kimyasal sentez yöntemlerinin, üretim veriminde bir avantajı vardır [35]. Gümüş nanoyapıların sentezine yönelik kimyasal yöntemler, kimyasal indirgeme, elektrokimyasal teknikler, ışınlama destekli kimyasal yöntemler ve piroliz olarak alt gruplara ayrılabilir [7]. SNP sentezinin en yaygın metodolojisi, gümüş öncüllerin, indirgeyicilerin ve stabilize edici/kaplama ajanlarının SNP'lerin büyümesini düzenlemenin üç ana unsuru olarak yürütüldüğü kimyasal indirgemedir. Gümüş nitrat, gümüş asetat, gümüş perklorat ve gümüş sitrat sıklıkla kullanılan gümüş öncüleridir, düşük maliyet ve kimyasal stabilite özellikleri nedeniyle gümüş nitrat en sık kullanılanıdır. Kimyasal indirgeme yoluyla SNP üretim süreçlerinde; sodyum borohidrat, trisodyumsitrat ve alkol, karbonhidrat, aldehit gibi farklı organik indirgeyiciler kullanılmaktadır. Nanoparçacıkları bir süspansiyonda stabilize etmek ve nanoparçacıkların sedimentasyon, aglomerasyon veya yüzey özelliği kaybını önlemek için stabilize edici ajanların kullanılması önemlidir. Bu amaçla SNP'leri sulu bir fazda askıya almak için yüzey aktif maddeler, ligandlar ve fonksiyonel gruplar içeren polimerler dahil olmak üzere birçok stabilizatör ve kaplama ajanı uygulanabilir [35].

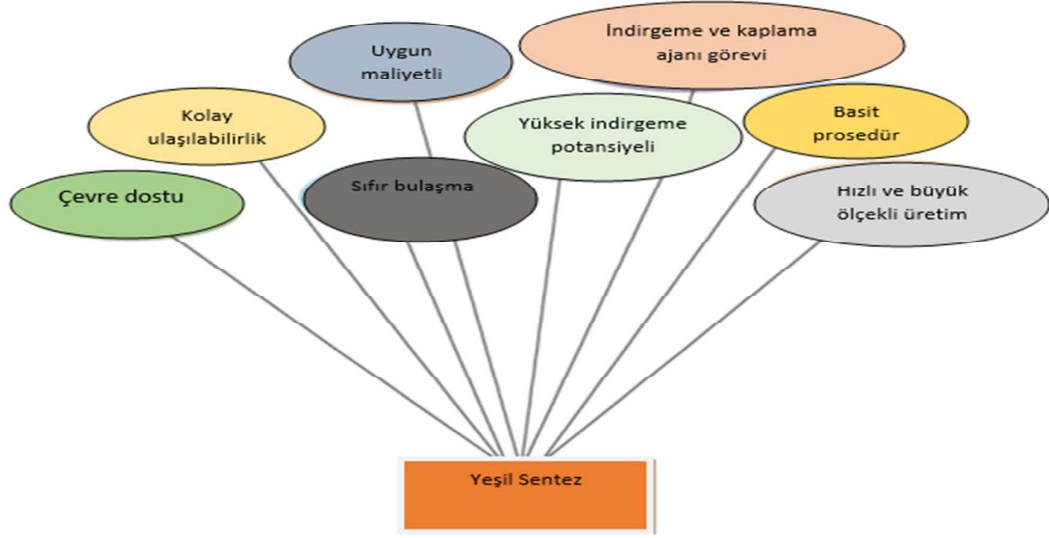
Fiziksel yöntemler toksik kimyasallar içermez ve genellikle hızlı işlem sürelerine sahiptir. Bu tür yöntemler arasında fiziksel buhar yoğunlaşması, ark deşarjı, enerjili bilyeli öğütme yöntemi ve doğru akım (DC) magnetron püskürtme yer alır. Fiziksel yöntemlerin bir başka avantajı,

oluşturulan SNP'lerin dar bir boyut dağılımına sahip olmasıdır; ancak, büyük bir dezavantajı, yüksek enerji tüketimleridir [7].

Bu yöntemlerin ve işlemlerin çoğu, indirgeyiciler, stabilizatörler ve inorganik çözücüler gibi tehlikeli kimyasalların kullanımını kapsar veya yüksek enerji kullanımı, inert gaz yoğunlaşmasının kullanımı gibi özel gerekliliklere sahiptir. Birçok çalışma, bu yöntemlerin inhalasyon, dermal veya sindirim yoluyla nanomalzemelere potansiyel maruziyete yol açabileceğini ve bu nedenle bu yöntemlerin ekonomik olarak uygulanabilir veya çevre dostu olmasını önlediğini bulmuştur. Bu nedenle, nanoparçacık ve nanomateryal sentezi için daha iyi, ekonomik olarak uygulanabilir ve çevre dostu bir işleme ihtiyaç duyulmaktadır. Nanoparçacıkların ve nanomalzemelerin sentezinde yeşil sentez ilkelerinin uygulanması (biyolojik sentez), tehlikeli etkileri en aza indirmenin ve nanoparçacık ve nanomateryal üretiminin güvenliğini ve sürdürülebilirliğini en üst düzeye çıkarmanın bir yolu olarak önerilmiştir [37].

Nanoparçacıkların biyolojik sentezinin, hızlı ve çevre dostu üretim metodolojileri ve sentezlenmiş nanoparçacıkların uygun maliyetli ve biyoyumlu doğası dahil olmak üzere çeşitli avantajları vardır. Ek olarak, bitki ve mikroorganizma bileşenlerinin kendileri kaplama ve stabilize edici ajanlar olarak hareket ettikleri için daha fazla stabilize edici ajan gerektirmez. Dahası, biyolojik nanoparçacıkların yüzeyleri, karmaşık biyolojik sınırlarla temas ettiklerinde biyomolekülleri aşamalı ve seçici olarak adsorbe ederek biyolojik sistemlerle etkileşime giren bir korona oluşturur. Bu korona katmanları, çıplak biyolojik nanoparçacıklar üzerinde ek etkinlik sağlar. Böylelikle biyolojik nanoparçacıklar, bitkiler ve mikroorganizmalar gibi biyolojik kaynaklardan sentezlenen nanoparçacıkların yüzeyine biyolojik olarak aktif bileşenlerin bağlanması nedeniyle daha etkilidir. Özellikle şifalı bitkilerde, sentezlenen nanoparçacıklara bağlanmak için farmakolojik aktiviteye sahip, nanoparçacıkların etkinliğini artırarak ek fayda sağlayan bol miktarda metabolit bulunmaktadır. Nanoparçacıkların biyolojik sentezinin ek avantajı, bazı fonksiyonel grupların onları biyolojik olarak aktif hale getirmek için nanoparçacık yüzeyine eklenmesi de dahil olmak üzere gerekli adımların sayısını azaltabilmesidir; bu, fizikokimyasal sentezde gerekli ek bir adımdır [34]. Aynı zamanda biyolojik sentez, ortam sıcaklığı ve basıncı, minimum enerji tüketimi ve çok düşük veya sıfır tehlikeli madde tüketimi gerektirir. Ayrıca büyük ölçekli nanoparçacık sentezi için kolayca ölçeklendirilebilirler [38].

Son zamanlarda, araştırmacılar SNP'lerin biyolojik sentezine büyük dikkat çekmektedirler; çünkü sentetik süreçte kullanılan biyomoleküller veya biyolojik mikroorganizmalar geleneksel indirgeyici ve stabilize edici ajanların yerini alabilmektedir [35]. Biyolojik sentezde, toksik indirgeme ajanları ve stabilizatörlerin yerini, bakteriler, mantarlar, mayalar ve bitkiler dahil olmak üzere canlı organizmalar tarafından üretilen toksik olmayan moleküller (proteinler, karbonhidratlar, antioksidanlar, vb.) alır. Olası biyolojik sentez mekanizmaları arasında enzimatik (örneğin NADPH redüktaz) ve enzimatik olmayan indirgeme bulunur. Genel olarak, bitki özleri kullanılarak AgNP sentezi en çok kullanılan çevre dostu üretim yöntemidir [7].



Şekil 2.12: Yeşil sentezin avantajları.

2.3.4.4. Gümüş Nanoparçacıkların Karakterizasyonu

Nanoparçacıkların kimyasal, biyokimyasal ve fiziksel bileşenleri, performansları, uygulamaları ve canlı sistemlerle etkileşimleri açısından son derece önemlidir. Öte yandan, nanomalzemelerin yapı, yüzey enerjisi, yüzey bileşimi, yüzey yükü ve morfoloji gibi temel özellikleri, nanomalzemelerin in vivo davranışlarının daha iyi anlaşılması için iyi bir şekilde incelenmesi kadar önemlidir. Bu nedenle, nanoparçacıkların özelliklerinin sınıflandırılması ve belirlenmesi için yaygın olarak bir dizi karmaşık analitik teknik uygulanır. Sık kullanılan mikroskopi ve spektroskopi tekniklerinden bazıları, UV-Görünür Spektroskopi (UV-VIS), Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR), Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM),

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM), Enerji Dağılım Spektroskopisi (EDS), Dinamik Işık Saçılımı (DLS), X-Işınları Difraktometresi (XRD) ve Raman Spektroskopisidir [33].

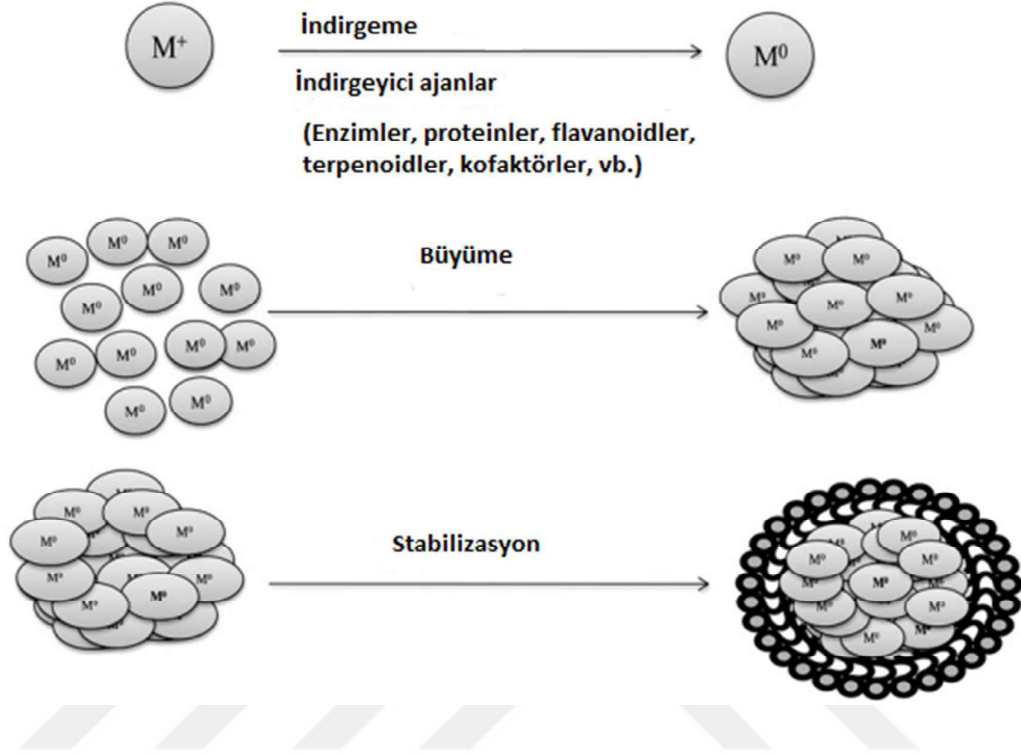
NP'lerin boyutu, şekli ve dağılımı SEM kullanılarak değerlendirilebilir. Ancak, SEM analizi için numunelerin değerlendirmeden önce kurutulması gerekir. Bu kurutma işlemi, numunelerin özelliklerini değiştirerek numunenin gerçek temsilcisi olmayan hatalı verilere neden olabilir. Bu bağlamda, TEM'in boyut ve sulu çözelti dağılımı gibi NP'lerin özelliklerini karakterize ettiği düşünülebilir. Dinamik ışık saçılımı (DLS), sulu bir ortamda partikül boyutunu ve dağılımını tanımlamak için kullanılabilecek başka bir tekniktir. DLS, parçacıklara odaklanan bir ışık kaynağı olarak kırmızı bir lazer kullanır. Işık kaynağının parçacıklar tarafından saçılması, bir dedektör tarafından toplanan ışık yoğunluğunda bir değişikliğe neden olur ve sinyallere dönüştürülür. NP'lerin optik özellikleri UV görünür spektroskopi kullanılarak değerlendirilebilir. UV spektroskopi tekniğinde, parçacıklar boyutlarını belirlemek için 190-700 nm aralığında elektromanyetik dalgalara tepki verirler. Dahası, UV görünür spektroskopisi kullanılarak, pH ve çözelti konsantrasyonunun NP'nin stabilitesi ve zaman içindeki olası agregasyon üzerindeki etkisi değerlendirilebilir. NP'lerin kimyasal ve fonksiyonel grupları, Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) kullanılarak tanımlanabilir. FTIR, NP'ler hakkında bilgi sağlar ve polisakkarit ile metalik NP'ler arasındaki bağlanma ve konjugasyonu gösterir. NP'lerin kristal yapısı, X-ışını kırınımı (XRD) kullanılarak belirlenebilir. XRD yoğunluğunun analizi, NP'lerin yapısı, yönü, şekli ve dağılımı hakkında bilgi verir [39].

2.4. POLİSAKKARİTLER İLE METALİK NANOPARÇACIKLARIN YEŞİL SENTEZİ

Polisakkaritler kullanılarak metalik NP'lerin yeşil sentezi, biyo-nanoteknolojide önemli bir araştırma alanı haline gelmiştir. Nanomalzemelerin belirli manyetik, optoelektronik ve fizyokimyasal özelliklere sahip polisakkarit bazlı metalik NP'ler kullanılarak sentezi ve bunların biyomedikal ve biyokimyasal bilimlerdeki uygulamaları yeşil kimyada giderek daha önemli bir alan olmuştur. Polisakkaritler, glikozidik bağlarla birbirine bağlanmış tekrarlanan sakkarit birimlerinden oluşan zincir polimerlerdir. Polisakkaritler genellikle proteinlerden daha karardır ve bu polimerik karbonhidrat biyomoleküllerinde normalde geri dönüşü olmayan bir denatürasyon meydana gelmez, bu da onları malzeme biliminde avantajlı kılar. Ek olarak,

polisakkaritlerin izolasyonu ve geri kazanımı genellikle uygun maliyetlidir. Polisakkaritler, moleküler ağırlık, zincir yapısı ve yapısal konformasyon, kiralite seviyesi, hidroksil gruplarının sayısı, çözünürlük özellikleri vb. gibi bir dizi parametreye bağlı olarak değişir. Karbonhidratların fizikokimyasal özelliklerindeki bu varyasyon, nanokompozitlerin ve nanomalzemelerin fabrikasyon uygulamaları için biyolojik ve moleküler avantajlar sunar. NP'lerin stabilizasyonu ve indirgenmesi, metalik NP'lerin sentez sürecinde polisakkaritlerin ana rolüdür. Mikroalgler, makroalgler, mikro deniz yosunları veya bakteri bazlı polisakkaritler gibi çeşitli polisakkaritler, metalik NP'lerin üretiminde stabilize edici ve indirgeyici ajanlar olarak kullanılır. Tüm farklı metalik NP türleri arasında, altın nanoparçacıklar (AuNP'ler) ve gümüş nanoparçacıklar (SNP'ler) biyolojik uyumlulukları, şekilleri, boyutları, düşük toksisiteleri, antimikrobiyal özellikleri ve yüksek stabiliteleri nedeniyle geniş bir uygulama yelpazesine sahip oldukları için en yaygın kullanılanlardır [39]. Gümüş nanoparçacıkların en çok tercih edilmesinin sebeplerinden bir diğeri de; sıfır değerlikli gümüşün antibakteriyel özellikleri ve gümüş (I) tuzlarının sıfır değerlikli gümüş oluşturmak için kolay indirgenmesi ile ilgilidir [11].

SNP'lerin yeşil sentezi, çözücü ortamının, indirgeme maddesinin ve toksik olmayan stabilize edici bileşik/malzemenin seçimini içerir, bu malzeme aynı zamanda kaplama maddesi olarak da adlandırılır ve nanoparçacıkların kümelenmesini önler. Yeşil sentez tekniğini kullanarak gümüş nanoparçacıkların geliştirilmesi, tüm nanoparçacık sentez dünyasında devrim yaratmıştır. Bu teknik; kolayca erişilebilen, kullanımı güvenli, geniş metabolit yelpazesi bulunan ve atık ve enerji maliyetlerini en aza indiren geniş bitki rezervleri nedeniyle günümüzde popülerdir [10].



Şekil 2.13: Bitki bazlı metal nanorçacık indirgeme mekanizmasının diyagramı.

2.5. TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİN YÖNTEMLERİ

Son yıllarda, reaktif oksijen ve azot türleri (ROS/RNS) üretimi ve antioksidan savunma arasındaki dengesizlik olarak tanımlanan oksidatif stresin, farklı patofizyolojik koşullarda çok önemli bir rol oynadığı öne sürülmüştür. Oksidatif stres, ROS/RNS üretimindeki bir artıştan veya antioksidan ağdaki bir azalmadan kaynaklanan, endojen antioksidanların biyolojik hedefler üzerindeki oksidatif hasara karşı koyamamasıyla karakterize edilir. Bu bağlamda, zengin bir antioksidan diyet alımının, kardiyovasküler hastalıklar gibi bazı patolojiler geliştirme riski ile ters ilişkili olduğu öne sürülmüştür. Bu nedenle, insanlar tarafından sıklıkla veya potansiyel olarak tüketilen doğal ürünlerin antioksidan kapasitesini belirleme konusuna dikkatler çevrilmiştir. Doğal ürünlerin antioksidan kapasitesini belirlemek için farklı in vitro kimyasal bazlı analiz yöntemleri geliştirilmiştir [40].

İlgili reaksiyonlara bağlı olarak, bu testler kabaca iki tipte sınıflandırılabilir: Hidrojen atom transfer (HAT) reaksiyonlarına dayalı testler ve elektron transferine (ET) dayalı testler. HAT

bazlı analizlerin çoğu, antioksidan ve substratın azo bileşiklerinin ayrışması yoluyla termal olarak üretilen peroksil radikalleri için rekabet ettiği rekabetçi bir reaksiyon şeması uygular. Bu analizler, indüklenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein otoksidasyonunun inhibisyonunu, oksijen radikal absorbans kapasitesini (ORAC), toplam radikal yakalama antioksidan parametresini (TRAP) ve krosin ağartma analizlerini içerir. ET bazlı analizler, indirgendiğinde renk değiştiren bir oksidanın indirgenmesindeki bir antioksidanın kapasitesini ölçer. ET bazlı yöntemler; Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile toplam fenolik içerik tayini yöntemi, TEAC (troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi)/ABTS yöntemi, demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan gücü (FRAP) yöntemi, Cu(II)-Nc kompleksini oksidan olarak kullanan bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) yöntemi ve difenil-1-pikrilhidrazil radikali (DPPH) süpürmesine dayanan yöntemleri içerir [41].

2.5.1. ORAC (Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi) Yöntemi

ORAC testi, peroksil radikalının neden olduğu oksidasyonun inhibisyonunu izleyerek antioksidanların radikal zincir kırma kabiliyetini ölçer. Peroksil radikalleri, fizyolojik koşullar altında gıdalarda ve biyolojik sistemlerde lipidoksidasyonunda bulunan baskın serbest radikallerdir. Bu nedenle, ORAC değerleri, bazıları tarafından, antioksidan etkililiği için bir referans olarak biyolojik açıdan anlamlı kabul edilir. Bu analizde, bir üretici reaksiyon tarafından üretilen peroksil radikali bir floresan prob ile reaksiyona girerek bir florometre ile kaydedilen floresan kaybına neden olur. Peroksil radikal üretici olarak genellikle AAPH gibi azo bileşikleri kullanılır. Antioksidanların yokluğunda veya varlığında bir dizi floresan bozunma eğrisi oluşturulabilir ve bozunma eğrileri altındaki kalan alan (antioksidan içermeyen boş bir çalışmaya kıyasla antioksidanların varlığında alan kazancı) antioksidanların peroksil radikal temizleme kapasitesinin bir göstergesi olarak hesaplanabilir. Standart bir antioksidan, genellikle troloks, referans olarak kullanılır ve test edilen antioksidanların ORAC değerleri, troloks eşdeğerleri olarak rapor edilir [42].

ORAC yöntemi, insan biyolojisinde en yaygın serbest radikal olan peroksil radikalini kullandığından in vivo koşullarla ilgilidir. ORAC testi, antioksidanların neden olduğu serbest radikal etkisinin hem inhibisyon süresini hem de inhibisyon derecesini dikkate alır. ORAC yönteminin diğer avantajları şunları içerir: (1) Yüksek verim için otomatik hale getirilmiştir; (2) Plazma, doku, yiyecekler vb. dahil çok sayıda numune matrisi için uyarlanabilir; ve (3)

ekstraksiyon prosedüründe perklorik asit, amonyum sülfat veya aseton kullanarak protein olmayan antioksidanları analiz edebilir [41].

2.5.2. TRAP (Toplam Radikal Tutma Parametresi) Yöntemi- Krosin Beyazlatma (Krosin Ağartma Yöntemi) Yöntemi

ORAC'a benzer şekilde, TRAP ve krosin ağartma, peroksil radikal oluşturunca olarak bir azo bileşiğinden (ör. AAPH veya ABAP), bir moleküler floresandan (ör. R-fikoeritrin veya diklorofloresin diasetat) veya UV-vis probundan (krosin) ve bir antioksidandan oluşur. Her ikisi de antioksidan aktivitesinin ölçülmesi için floresans veya absorpsiyon azalmasının kinetik eğrilerini toplar ve sonuçları trolox eşdeğerleri olarak ifade ederler. Bununla birlikte, bu analiz yöntemlerinin tümünde, antioksidan özütlerde doğal olarak var olan pigmentler ve floroforların emilim ve floresan okumalarına girişim yapabilmesinden ötürü bir dezavantaj vardır [42].

2.5.3. Folin Ciocalteu Yöntemi

Folin-Ciocalteu, çeşitli ekstraktlarda toplam fenolik bileşiklerin miktarını belirlemek için tanınmış, yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Hidroksillenmiş aromatik halkalara sahip organik bileşiklerin analizine izin veren kolorimetrik bir yöntemdir. Yöntem hassastır ve fenolik bileşik içeriğinin ölçülmesine izin verir [43]. Folin-Ciocalteu yöntemi, alkali koşullar altında fenolik bileşikler tarafından Folin-Ciocalteu reaktifinin indirgenmesine dayanır. Folin-Ciocalteu reaktifinin (fosfomolibdik-fosfotungstik asit) tam kimyasal yapısı açıkça tanımlanmamıştır, ancak 765 nm'de maksimum absorpsiyon ile mavi renkli bir kromofor verecek şekilde indirgenir. Komplekslerdeki molibden merkezi genel olarak indirgeme bölgesi olarak kabul edilir, burada Mo^{6+} , fenolik antioksidan tarafından bir elektron kabul ederek Mo^{5+} 'e indirgenir. Gallik asit, yaygın olarak kullanılan referans standardıdır ve toplam fenolik içerik (TPC)'in sonuçları genellikle gallik asit eşdeğerleri olarak ifade edilir. Bununla birlikte, TPC sonuçları bazen kateşin, kafeik asit, klorojenik asit veya ferulik asit eşdeğerleri olarak da ifade edilir [42].

2.5.4. FRAP (Demir (III) İndirgeme Antioksidan Gücü) Yöntemi

Başlangıçta insan plazmasının antioksidan olarak yeteneğini değerlendirmek için geliştirilen FRAP testi, demir(III)-tripiridiltiazin kompleksinin (Fe^{III} -TPTZ) antioksidanlarla

reaksiyonunu kullanır. Yöntemin temeli, indirgenmiş metal formulu TPTZ kompleksinin 593 nm'de maksimum yoğunlukta karakteristik görünür absorpsiyon bantları sunmasıdır [41].

FRAP testi, asidik ortamda antioksidanlar tarafından demir(III)-TPTZ kompleksinin yoğun mavi renkli demir(II)-TPTZ kompleksine indirgenmesini ölçer. Antioksidan aktivite 593 nm'de absorbans artışı olarak belirlenir ve sonuçlar mikromolar Fe(II) eşdeğeri olarak veya bir antioksidan standardına göre ifade edilir. Diğer ET tabanlı yöntemlerin aksine, FRAP testi, demir çözünürlüğünü korumak ve daha da önemlisi elektron transferini sağlamak için asidik pH koşullarında (pH 3.6) gerçekleştirilir. Bu, redoks potansiyelini artıracak ve baskın reaksiyon mekanizmasında bir kaymaya neden olacaktır [42].

2.5.5. DPPH Yöntemi

1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), bir tür kararlı organik radikaldır. DPPH yöntemi, dünya çapında radikal süpürme kapasitesinin (RSC) nicelendirilmesinde kullanılmaktadır. DPPH alkol çözeltisi, 517 nm'de bir absorpsiyon piki ile koyu mor renktedir ve bu, reaktif sistemdeki radikal süpürücülerin varlığıyla ve DPPH'deki azotun tek elektronu eşleştğinde kaybolur. Reaktif hız ve radikal süpürücü yeteneği, DPPH'nin süpürülme hızına ve pik değerine bağlıdır [44]. DPPH, kararlı bir kromojen radikaldır. Ticari olarak mevcuttur ve testten önce oluşturulması gerekmez. Reaksiyona, 517 nm'de ölçülen DPPH'nin renk değişikliği eşlik eder ve renk giderimi, antioksidan etkinliğinin bir göstergesi olarak işlev görür. DPPH süpürme yönteminin antioksidan aktivitesi genellikle EC₅₀ olarak rapor edilir ve bu, ilk DPPH konsantrasyonunu %50 azaltmak için gerekli antioksidanın konsantrasyonu olarak tanımlanır [42].

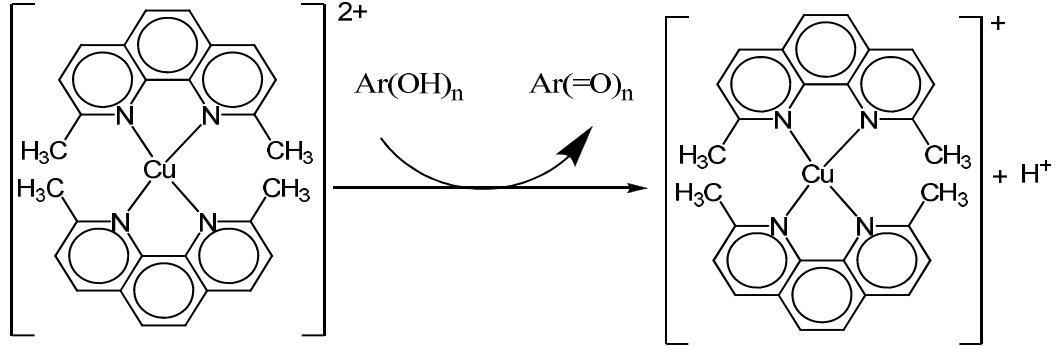
2.5.6. TEAC (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi)/ABTS Yöntemi

Bu yöntem; 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) (ABTS) kromojen radikal katyonunun absorbansının hidrojen verici antioksidanlar tarafından inhibe edilmesine dayanan bir metottur. Absorbanstaki azalmadan yararlanılarak toplam antioksidan kapasitesi troloks (E vitamini analogu) cinsinden verilmektedir [4].

ABTS^{•+}, ABTS'nin K₂S₂O₈, MnO₂ veya peroksil radikalleri gibi oksidanlar tarafından oksidasyonundan üretilir. ABTS^{•+} alkollü ortamda olduğu gibi sulu ortamda da çözünür ve 734 nm'de absorpsiyonu kullanılır [40].

2.5.7. CUPRAC (Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi

CUPRAC yöntemi ilk olarak bir spektrofotometrik TAC yöntemi olarak geliştirilmiş ve kapsamı bazı modifikasyonlarla genişletilmiştir. Seçilen kromojenik redoks reaktifi kolayca erişilebilir, stabil, seçicidir ve biyolojik olarak önemli tüm antioksidan türlerine (örn. askorbik asit, α -tokoferol, β -karoten, indirgenmiş GSH, ürik asit ve bilirubin) ve kimyasal türü veya hidrofiliği ne olursa olsun tüm gıda antioksidanlarına (flavonoidler, basit fenolik hidroksisinnamik asitler, vb.) yanıt verebilir. CUPRAC yöntemi için kullanılan kromojenik redoks reaktifi bakır(II)-neokuproin kelatıdır [3]. Uygun konumlanmış fenolik hidroksiller, CUPRAC redoks reaksiyonu ile tekabül eden kinon yapılarına dönüşür ve bu redoks reaksiyonu sonucunda oluşan Cu(I)-Nc kelatı, 450 nm’de maksimum absorbans verir. Bu yöntem; Cu(II) klorür çözeltisi, neokuproin (Nc) çözeltisi ve amonyum asetat (pH=7 tamponu) çözeltilerinin karıştırılmasından sonra, üzerine tayin edilecek herhangi bir antioksidan çözeltisi (direkt veya asit hidrolizi sonunda) ilave edilmesi ve bunu takip eden 30 dakika sonunda içerisinde antioksidan bulunmayan referansa karşı 450 nm’de absorbans değerlerinin ölçülmesinden ibarettir [4].



Şekil 2.14: CUPRAC yönteminin kromojenik oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc reaktifinin antioksidanlarla (Ar(OH)_n) reaksiyonu sonucu Cu(I)-Nc renkli kelatının oluşumu.

2.5.8. Geliştirilen CAR-SNP Esaslı Antioksidan Kapasite Yöntemi

Yeşil sentez kapsamında bir anyonik polisakkarit olan κ -karagenan kullanılarak; gümüş iyonları ile κ -karagenan arasında oluşan elektrostatik çekim kuvveti etkisiyle stabilize edilmiş gümüş çekirdekleri varlığında, antioksidanlarla Ag iyonlarının indirgenmesi esasına dayalı bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntem, CAR-SNP esaslı antioksidan kapasite yöntemi olarak

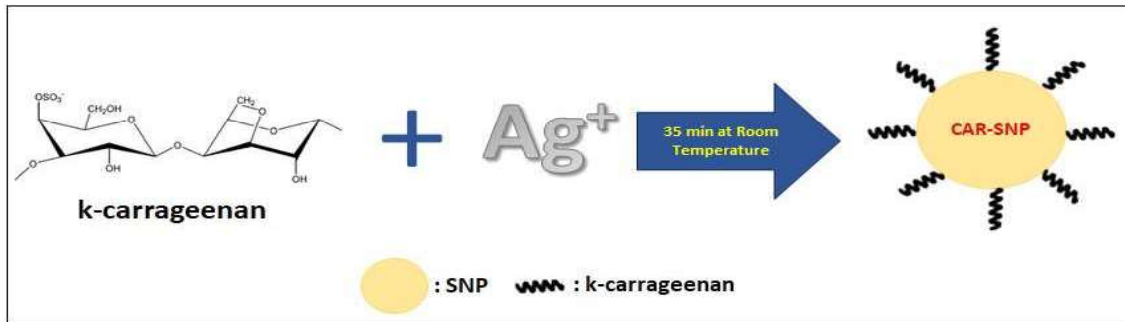
adlandırılmıştır. Geliştirilen yöntemde monodispers çekirdek halindeki gümüş nanoparçacıklar, Ag⁺ iyonlarının κ-karagenan ile biyolojik olarak indirgenmesi sonucu hazırlanır. Bu prosesin ikinci aşamasında, ikincil indirgeyici ajan olarak kullanılan polifenoller Ag⁺ iyonlarının gümüş çekirdeklerine (Ag⁰) indirgenmesi ve çekirdek-kabuk halindeki SNP'lerin büyümesi için ortama ilave edilir. Son olarak meydana gelen çekirdek-kabuk halindeki SNP'ler karakteristik SPR absorpsiyonu sergilemektedir.

CAR-SNP esaslı AC yönteminin ilk aşamasında gümüş nitrat (AgNO₃) κ-karagenan ile indirgenerek küçük boyutlu, küresel CAR-SNP'ler (ortalama çap = 20 nm) sentezlenir.

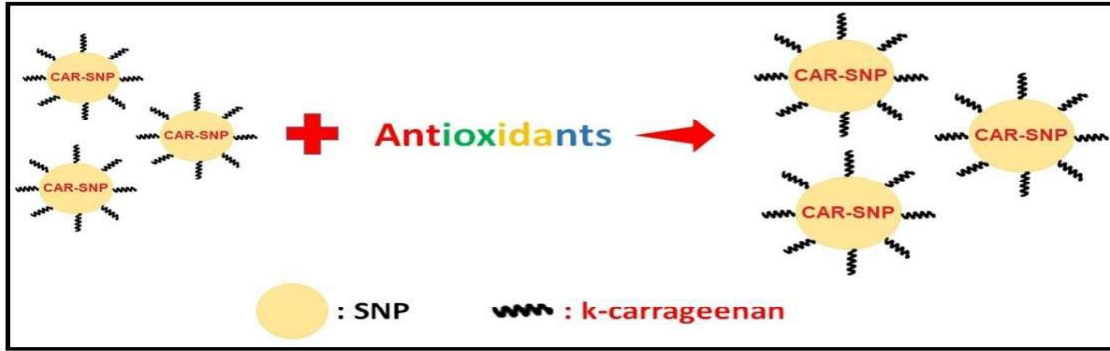
İkinci aşamada, sentezlenen CAR-SNP'lere polifenolik bileşiğin ilave edilmesiyle, Ag⁺ iyonları 420 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon gösteren kuvvetli renkli CAR-SNP'lere (çekirdek-kabuk oluşumu) indirgenirken, polifenollerin reaktif Ar-OH grupları ilgili bileşiğin kinonlarına yükseltgenir (Standart potansiyel, E°, fizyolojik açıdan önemli antioksidanlar için: 0.2-0.6 V, E°_{Ag(I)/Ag} = 0.8 V).



Antioksidan kapasite tayini için geliştirilen gümüş nanoparçacık esaslı CAR-SNP yönteminin esası, κ-karagenan ile sentezlenen gümüş nanoparçacıkların polifenolik bileşik ortamında büyümesine ve büyüyen nanoparçacıkların (çekirdek-kabuk oluşumu) plazmon absorbansının 420 nm dalga boyunda ölçümüne dayanmaktadır. Bu şekilde polifenol ortamında büyümüş gümüş nanoparçacıkların optik özellikleri, ilgili polifenolik bileşiklerin antioksidan (indirgeyici) kapasitesiyle doğru orantılıdır.



Şekil 2.15: κ-karagenan kullanılarak yeşil sentez ile CAR-SNP'lerin oluşumu.



Şekil 2.16: CAR-SNP'lerin antioksidan ortamında genişlemesi.

2.6. LİTERATÜRDE VAROLAN SOY METAL NANOPARÇACIK ESASLI ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİNİ İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

Nezhad ve diğ. [45], sitrat ile stabilize edilmiş Ag çekirdekleri varlığında gümüş iyonlarının askorbik asit ile indirgenmesine bağlı olarak askorbik asit (AA) tayini için kolorimetrik bir yöntem önermişlerdir. Askorbik asit, trisodyum sitrat ve Ag çekirdekleri varlığında Ag (I)'i üçgen SNP'lere indirgemıştır. Gümüş nanoparçacıkların plazmon absorbansı askorbik asidin spektrofotometrik olarak kantitatif tayinine imkan vermiştir. Szydłowska-Czerniak ve diğ. [46], gümüş iyonları ile antioksidanlar arasındaki elektron transfer reaksiyonuna dayalı olarak pH 8.4 tampon ortamında SNP'lerin oluştuğu bir tayin yöntemi önermişlerdir. Bu yöntem, standart antioksidan olarak sinapik asit, gallik asit, kafeik asit, askorbik asit ve kuersetin kullanılarak doğrulanmıştır. Yöntem, kolza tohumu ve ürünlerinin ekstraktları için FRAP, DPPH ve FC yöntemleri ile iyi bir şekilde ilişkilendirilmiştir. Nezhad ve diğ. [47], hidrokinon, kateşol ve pirogallol gibi belirli fenolik bileşikler belirlemek için AuNP oluşumuna dayalı bir optik tespit yöntemi geliştirmiştir. Bu çalışmada, stabilize edici bir ajan (setiltrimetilamonyum klorür, CTAC) varlığında sulu çözelti içindeki HAuCl_4 , herhangi bir AuNP çekirdeği eklenmeden fenolik bileşikler aracılığıyla AuNP'lere indirgenmiştir. Fenoliklerin eklenmesinden önce, AuCl_4 ve CTAC içeren çözelti, 330 nm'de karakteristik bir absorbans bandına sahiptir. Reaksiyon ortamına fenolik bileşikler eklendiğinde, bu bant kaybolur, AuNP'lerin karakteristik plazmon absorbansı 568 nm'de gözlenir ve test edilen fenoliklerin dolaylı kolorimetrik tespiti sağlanır. Bu yöntemle sulu numunelerdeki fenolik bileşikler ve farmasötik formülasyonlar başarıyla analiz edilmiştir. Della Pelle ve diğ. [48], Folin-Ciocalteu (FC) yöntemine alternatif olarak organik çözücü-sulu ortamda AuNP oluşumuna dayanan basit bir yöntem geliştirmiştir.

Bu yöntem, numune ekstraksiyonu gerektirmez ve bir organik çözücü olarak dimetil sülfoksit (DMSO) kullanımını içerir. Organik bir ortamda yeni bir AuNP sentezi türü içeren bu yöntem, geleneksel FC yöntemiyle yüksek oranda ilişkilendirilmiştir. Yağ bakımından zengin numunelerde fenolik içeriğin hızlı tespiti için kullanılabilir.



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

Absorbans ölçümleri ve UV-vis spektrumları için Varian CARY Bio 100 UV-vis spektrofotometresi (Mulgrave, Victoria, Avustralya) kullanılmıştır. Hazırlanan nanoparçacıkların karakterizasyonunu gösterecek wet-STEM görüntüleri için FEI Model Quanta 450 FEG marka taramalı elektron mikroskobu (2 °C'ye soğutma sıcaklığında, vakumda) kullanılmıştır. Nanoparçacıkların Fourier Dönüşümü Kızılötesi spektrumları (FTIR), Agilent Carry 630 FTIR-ATR (Agilent Technologies, Rowville, Avustralya) spektrometresi kullanılarak kaydedilmiştir. XRD analizi için Rigaku R-Axis Rapid-S X-Ray Tek Kristal Difraktometre Cihazı, silindirik dedektör (cylindiral IP) kullanılmıştır. Ayrıca, çözelti hazırlama ve inkübasyon işlemlerinde analitik terazi, girdap karıştırıcı, su banyosu, etüv vb. temel laboratuvar ekipmanlarından yararlanılmıştır.

3.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Neokuproin (2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline) (Nc), κ -karagenan, (-)epikateşin (EC), (-)epigallokateşin gallat (EGCG), (+)kateşin (CT), gallik asit (GA), α -tokoferol (TP), kuersetin (QR), L-askorbik asit (AA), rosmarinik asit (RA), and troloks (TR), and etanol: Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya); bakır (II) klorür dihidrat, gümüş nitrat (AgNO_3), amonyum asetat (NH_4Ac): Merck (Darmstadt, Almanya). Bitki çayı örnekleri yerel pazardan temin edilmiştir.

3.3. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

3.3.1. CAR-SNP Esaslı Antioksidan Kapasite Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

AgNO_3 stok çözeltisi, 0.1 M olacak şekilde gümüş nitrattan 1.6987 g tartım alınıp destile su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Karagenan çözeltisi, %0.1'lik (w/v) olacak şekilde κ -karagenandan tartım alınıp, kaynatılmış destile suda çözüldü. Sonrasında oda sıcaklığına kadar soğutulup 100 mL'ye tamamlandı.

3.3.2. CUPRAC Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Cu(II) klorür çözeltisi, 1.0×10^{-2} M olacak şekilde bakır(II) klorür dihidrat'tan ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.4262 g tartım alınıp su ile 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Amonyum asetat (NH_4Ac) tamponu, 1 M ($\text{pH}=7.0$) olacak şekilde NH_4Ac 'dan 19.27 g tartım alınıp su ile 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) (Nc) çözeltisi, 7.5×10^{-3} M olacak şekilde 0.039 g tartım alınıp mutlak etil alkolle çözülüp 25 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

3.3.3. Polifenolik Bileşiklerin Çözeltilerinin Hazırlanması

Tüm standart antioksidan bileşik çözeltileri istenilen çalışma konsantrasyonunda (1.0×10^{-3} M, 1.0×10^{-4} M) etil alkolde günlük olarak hazırlandı. Askorbik asit çözeltisi 1.0×10^{-3} M konsantrasyonda olacak şekilde destile suda günlük olarak hazırlandı.

3.3.4. Bitki Çayı İnfüzyonlarının Hazırlanması

Bitki çay poşetleri kaynamış suya ilk 2 dakika boyunca batırılıp çıkarıldı. Sonraki 3 dakika boyunca ise demlemeye bırakıldı (toplam demlenme süresi 5 dakika). Poşet çaylar demlenmeye bırakıldığı kaynamış sudan çıkarıldı ve çözeltiler oda sıcaklığına soğutulduktan sonra 100 mL'ye seyreltildi. Sonrasında analiz öncesinde $0.45 \mu\text{m}$ -gözenek çaplı polyester filtreden (GF/PET-45/25) geçirildi.

3.4. UYGULANAN YÖNTEMLER

3.4.1. CAR-SNP Esaslı Antioksidan Kapasite Tayininde Kullanılan Yöntemler

3.4.1.1. *SNP (Gümüş Nanoparçacık) Hazırlanması*

Gümüş nanoparçacıklar, Ag^+ 'nın κ -karagenan kullanılarak biyolojik indirgeme yöntemiyle indirgenmesiyle hazırlandı. Hazırlanan 0.1 M gümüş nitrat çözeltisi ile %0.1 karagenan çözeltisi (3:1) oranında karıştırıldı ve 35 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Açık sarı renkli κ -karagenan kaplı gümüş nanoparçacık (CAR-SNP) elde edildi.

3.4.1.2. *Geliştirilen CAR-SNP Esaslı Antioksidan Kapasite Yöntemi*

Geliştirilen yöntemde, bir deney tüpü içerisine sırasıyla 4.0 mL CAR-SNP çözeltisi, x mL standart antioksidan çözeltisi veya gerçek örnek çözeltisi ve $(1.0-x)$ mL H_2O ilave edilip iyice

çalkalandı. Reaksiyon karışımları oda sıcaklığında 10 dakikalık inkübasyonda bekletildi. İnkübasyon sırasında, antioksidanların varlığında Ag^{+} 'nin indirgenmesi, soluk sarıdan koyu sarıya bir renk değişikliğine sebep olarak, çekirdek-kabuk yapısının oluşumunu göstermiştir. Referans çözeltinin absorbansına göre (A_0), örnek çözeltisinde antioksidan varlığında antioksidan konsantrasyonuna bağlı olarak artış gözlemlendi. Absorbanstaki bu artış (ΔA), 10 dakika sonunda 420 nm dalga boyunda referans çözeltiye karşı okundu. ΔA ve antioksidan konsantrasyonu (C) arasında kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrilerinin eğimleri, test edilen her antioksidanın molar absorptiviteğini (ϵ) temsil eder.

$$4.0 \text{ mL CAR-SNP çözeltisi} + x \text{ mL antioksidan} + (1.0-x) \text{ mL H}_2\text{O} \quad (3.1)$$

3.4.2. CUPRAC Yöntemi

Bir deney tüpü içerisine 10 mM bakır(II) çözeltisi, 7.5×10^{-3} M neokuproin çözeltisi ve 1 M amonyum asetat tamponundan sırasıyla 1'er mL eklendi. Üzerine (x) mL örnek çözeltisi ve $(1.1-x)$ mL H_2O ilave edilip iyice çalkalandı. Toplam hacim 4.1 mL olacak şekilde çözeltiler hazırlandıktan sonra tüpler oda koşullarında ağzı kapalı olarak 30 dakika boyunca bekletildi. Bu süre sonunda içinde örnek bulunmayan referans çözeltiye karşı, oluşan $Cu(I)$ -Nc kelatinin renginin karakteristik dalga boyu olan 450 nm'de absorbans değerleri ölçüldü.

$$1 \text{ mL Cu(II)} + 1 \text{ mL Nc} + 1 \text{ mL tampon} + x \text{ mL örnek} + (1.1-x) \text{ mL H}_2\text{O} \quad (3.2)$$

3.4.3. Sentetik Antioksidan Karışım Çözeltilerinin TAC Ölçümü

Antioksidan bileşiklerin her birinin etanollü çözeltileri hazırlanıp farklı kombinasyonlarda üçlü sentetik karışımlar hazırlandı. Bu sentetik karışımların beklenen ve deneysel ölçülen antioksidan kapasiteleri CAR-SNP esaslı geliştirilen yöntem uygulanarak μM troloks eşdeğeri cinsinden hesaplandı.

$$TAC_{Beklenen} = TEAC_1 \cdot C_1 + TEAC_2 \cdot C_2 + TEAC_3 \cdot C_3 \quad (3.3)$$

(TEAC: troloks eşdeğeri antioksidan kapasite; C: konsantrasyon)

$$TAC_{Deneysel} = \frac{\text{Absorbans (toplam)} \pm \text{kayım}}{\epsilon_{TR}} \times 10^6 \quad (3.4)$$

3.4.4. Katkı Çalışması

Yeşil çay infüzyonuna kuersetin, gallik asit, kateşin standart çözeltilerinin katkısı yapıldı. Bir tüpe 50 µL yeşil çay infüzyonu ve 100 µL 0.1 mM QR, 100 µL 0.1 mM GA veya 200 µL 0.1 mM CAT çözeltisi ilave edildi. Katkı yapılan çözeltilere ayrı ayrı geliştirilen yöntem uygulandı. Yöntemin kesinliği ve geri kazanımı değerlendirildi.

3.4.5. İnterferans Çalışması

Gıda örneklerinde yaygın olarak bulunan türlerin interfere edici etkileri incelendi. CAR-SNP esaslı antioksidan kapasite yöntemi uygulanarak 4.0 µM antioksidan tayininde 10-1000 kat (mol/mol olarak) aralığında interfere edici tür varlığında çalışıldı.

3.4.6. Karakterizasyon Analizleri

Sentezlenen CAR-SNP'lerin karakterizasyonu amacıyla wet-STEM analizi çözelti oranında hazırlanan örneklerle, FTIR ve XRD analizleri liyofilizatör ile kurutulmuş örnekler kullanılarak yapılmıştır.

4. BULGULAR

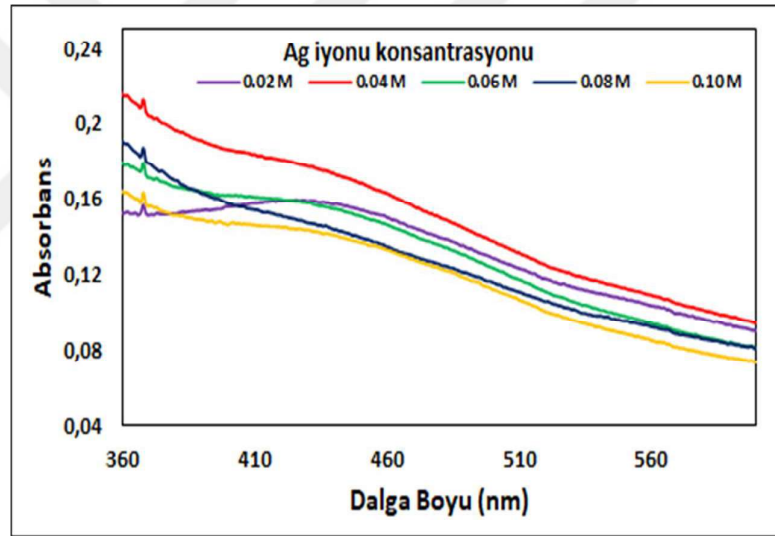


4.1. CAR-SNP ESASLI ANTİOKSİDAN KAPASİTE YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ

4.1.1. Optimum Deney Koşullarının Belirlenmesi

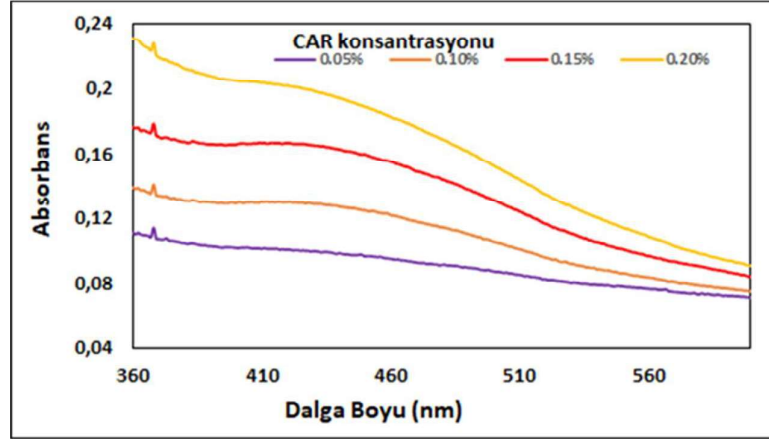
4.1.1.1. Gümüş Nanoparçacık Sentezinde $AgNO_3$ ve κ -Karagenan Konsantrasyonunun Etkisi

Sentezlenen CAR-SNP'nin plazmon absorbansı üzerindeki gümüş nitrat konsantrasyonunun etkisi incelenmiştir. 0.02 - 0.1 M $AgNO_3$ konsantrasyonu aralığında çalışılmıştır (κ -karagenan konsantrasyonu hacim olarak 3:1 oranında %0.1 stok çözeltisinden alındı). Elde edilen spektrumlar Şekil 4.1'de görülmektedir.



Şekil 4.1: Ag iyonu konsantrasyonunun sentezlenen CAR-SNP'lerin plazmon absorbansı üzerine etkisi.

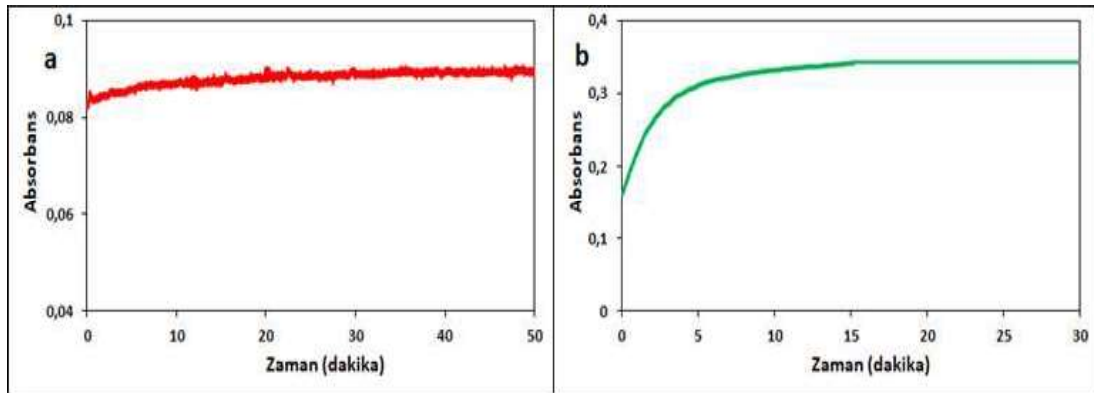
CAR-SNP'lerin hazırlanmasında farklı κ -karagenan konsantrasyonlarının etkisi incelenmiştir. Hazırlanan 0.1 M $AgNO_3$ üzerine 3:1 oranında %0.05 - 0.20 aralığında karagenan çözeltileri ilave edilmiştir. Elde edilen spektrumlar Şekil 4.2'de görülmektedir.



Şekil 4.2: κ -karagenan konsantrasyonunun sentezlenen CAR-SNP'lerin plazmon absorbansı üzerine etkisi.

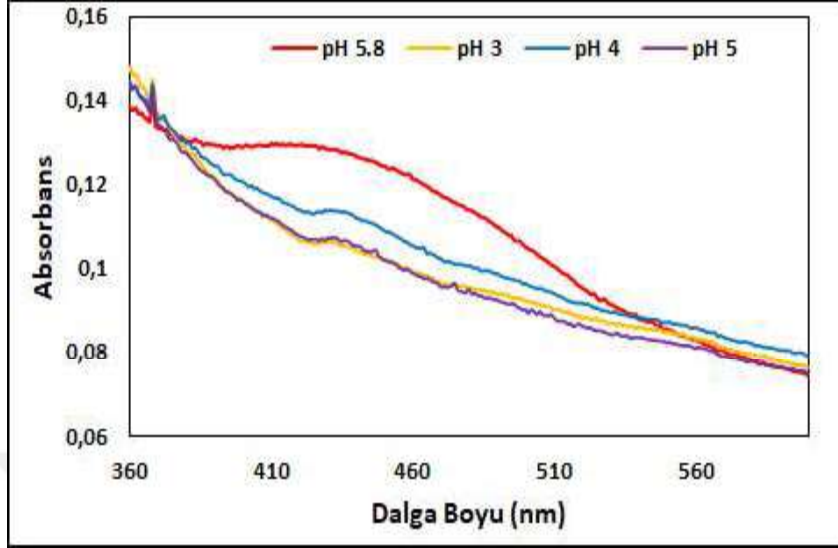
4.1.1.2. CAR-SNP Yönteminde İnkübasyon Süresi ve pH'ın Belirlenmesi

Şekil 4.3, geliştirilen yöntemin iki adımı olarak CAR-SNP oluşumunun ve CAR-SNP'lerin büyümesinin (antioksidanları temsil eden Troloks (TR) varlığında) reaksiyon kinetiğini göstermektedir.



Şekil 4.3: a) CAR-SNP oluşumunun reaksiyon kinetiği b) TR varlığında genişleyen CAR-SNP'lerin reaksiyon kinetiği.

pH'nın κ -karagenan ile oluşturulan CAR-SNP'ler üzerindeki etkisi (antioksidan yokluğunda), önerilen yöntemin deney koşullarında 3.0-5.8 aralığında incelenmiştir. Elde edilen spektrumlar Şekil 4.4'de görülmektedir.

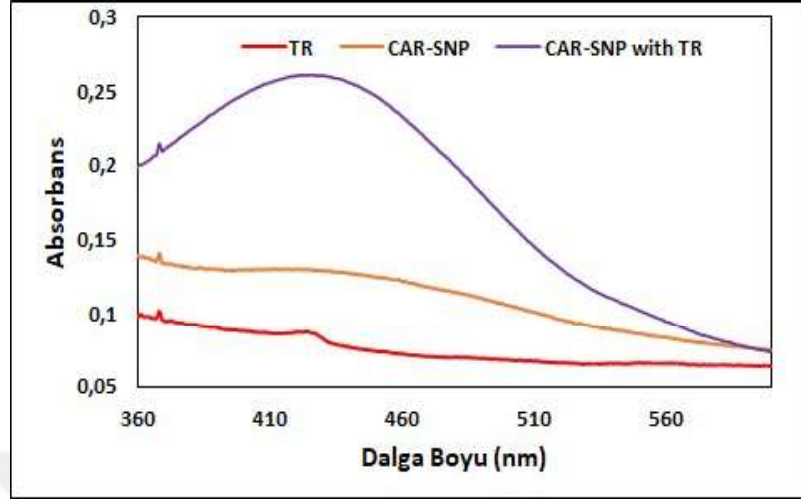


Şekil 4.4: Antioksidan yokluğunda farklı pH'larda oluşan CAR-SNP'lerin UV-görünür bölge spektrumları.

4.1.2. Sentezlenen Gümüş Nanoparçacıkların Karakterizasyonu

4.1.2.1. Spektrofotometrik Karakterizasyonu

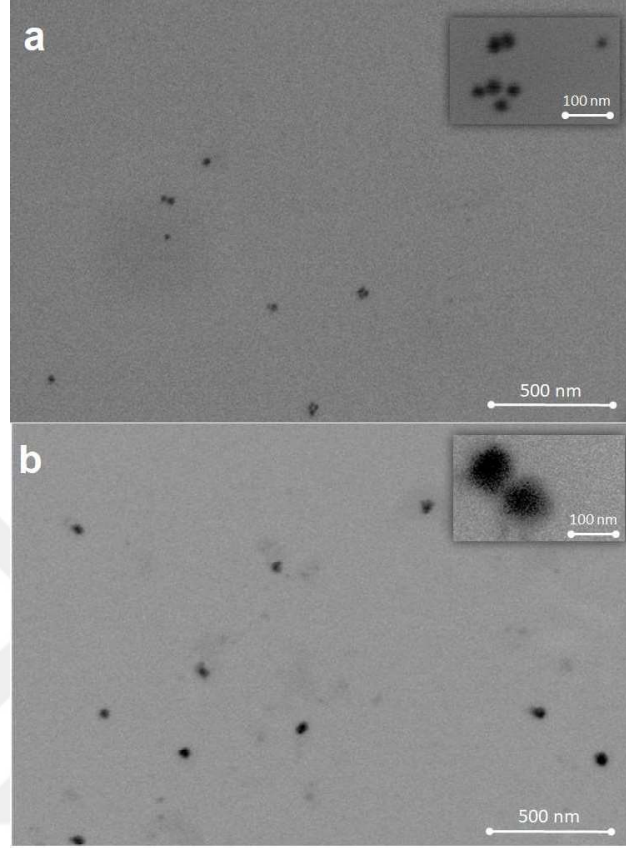
0.1 M gümüş nitrat çözeltisi ve %0.1'lik karagenan ile sentezlenen CAR-SNP'lerin görünür bölge spektrumu verilmiştir. Sentezlenen CAR-SNP'lerin, Troloks varlığında genişleyen CAR-SNP'lerin ve tek başına Troloksun absorpsiyon spektrumları verilmiştir. 420 nm'de CAR-SNP'lerin SPR'sinden kaynaklanan mevcut absorpsiyon bandına ek olarak karakteristik keskin bir bant gelişimi, TR'nin varlığında büyümüş SNP'lerin göstergesidir. İlgili dalga boyunda TR'nin kayda değer bir absorpsiyon bandı yoktur.



Şekil 4.5: Sentezlenen CAR-SNP'lerin, troloks varlığında genişleyen CAR-SNP'lerin ve tek başına troloxun UV-görünür bölge spektrumları.

4.1.2.2. SEM Analizi ile Karakterizasyonu

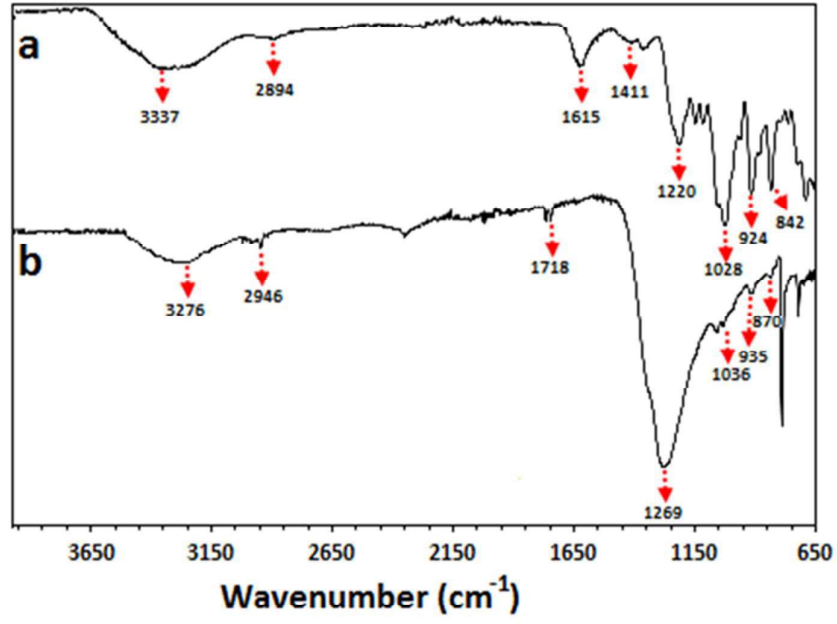
κ -karagenan kullanılarak sentezlenen CAR-SNP'lerin wet-STEM görüntüleri Şekil 4.6a'da sunulmuştur. Ayrıca, antioksidanları temsil eden TR varlığında büyütülmüş CAR-SNP'lerin wet-STEM görüntüleri Şekil 4.6b'de sunulmuştur.



Şekil 4.6: Sentezlenen CAR-SNP'lerin (a) antioksidan yokluğunda (b) antioksidan varlığında wet-STEM görüntüleri.

4.1.2.3. FTIR Analizi ile Karakterizasyonu

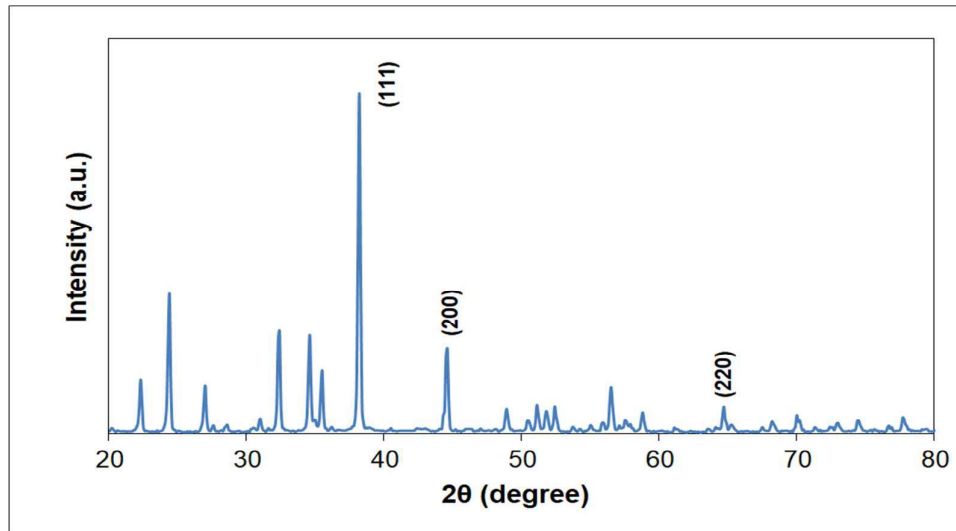
κ -karagenan'ın ve kurutulmuş CAR-SNP'lerin FTIR spektrumları Şekil 4.7'de gösterilmektedir.



Şekil 4.7: a) κ -karagenana b) sentezlenen CAR-SNP'ye ait FTIR spektrumu.

4.1.2.4. XRD Analizi ile Karakterizasyonu

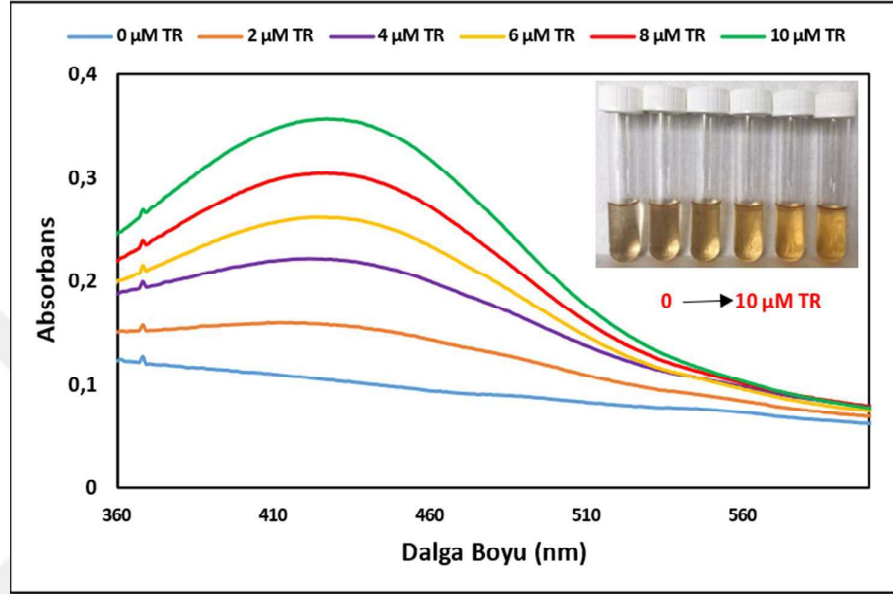
Sentezlenen CAR-SNP'lerin X ışını kırınımı (XRD) modeli Şekil 4.8'de gösterilmektedir.



Şekil 4.8: Sentezlenen CAR-SNP'ye ait XRD modeli.

4.1.3. Troloks Bileşiminin Geliştirilen Yöntem ile Kalibrasyonu

Artan TR konsantrasyonları ile CAR-SNP'lerin UV-görünür bölge spektrumları Şekil 4.9'da gösterilmektedir.



Şekil 4.9: Farklı TR konsantrasyonları varlığında (0- 10 µM) oluşan CAR-SNP'lerin UV- görünür bölge spektrumları.

Soy metal nanoparçacıkların çekirdeklenmesi ve büyümesi esasına dayalı farklı yöntemlerle elde edilen bazı antioksidan bileşiklerin LOD değerleri Tablo 4.1'de karşılaştırılmıştır.

Tablo 4.1: Soy metal nanoparçacıkların çekirdeklenmesi ve büyümesi esasına dayalı farklı yöntemlerle elde edilen bazı antioksidan bileşiklerin LOD değerleri.

Metodlar	LOD	Referanslar
CAR-SNP esaslı metod	0.023 $\mu\text{M} \rightarrow \text{TR}$	Bu çalışma
	0.009 $\mu\text{M} \rightarrow \text{GA}$	
	0.022 $\mu\text{M} \rightarrow \text{AA}$	
	0.007 $\mu\text{M} \rightarrow \text{QR}$	
	0.014 $\mu\text{M} \rightarrow \text{CT}$	
GSPN-AC	0.31 $\mu\text{M} \rightarrow \text{TR}$	[5]
SNPAC	0.23 $\mu\text{M} \rightarrow \text{TR}$	[56]
SNP esaslı metod	20 $\mu\text{M} \rightarrow \text{GA}$	[57]
	20 $\mu\text{M} \rightarrow \text{AA}$	
	0.4 $\mu\text{M} \rightarrow \text{QR}$	
SNP esaslı metod	0.054 $\mu\text{M} \rightarrow \text{AA}$	[58]
PVA-SNP esaslı metod	22.1 $\mu\text{M} \rightarrow \text{GA}$	[59]
AuNPs esaslı metod	35 mg/L $\rightarrow \text{GA}$	[60]
RhNPs esaslı metod	39 $\mu\text{M} \rightarrow \text{CT}$	[61]
	49 $\mu\text{M} \rightarrow \text{GA}$	

4.1.4. Antioksidan Bileşiklerin CAR-SNP Esaslı Antioksidan Kapasite Yöntemi ile Molar Absorptivite, Korelasyon Katsayıları, Doğru Denklemleri, Doğrusal Çalışma Aralıkları ve TEAC Katsayılarının Belirlenmesi

Geliştirilen CAR-SNP esaslı AC yöntemi ile dokuz farklı antioksidanın kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir. Kalibrasyon denklemleri, korelasyon katsayıları, doğrusal çalışma aralıkları ve TEAC katsayıları Tablo 4.2'de sunulmuştur.

- CAR-SNP esaslı antioksidan kapasite yöntemine göre;

$$A_{420} = 2.51 \times 10^4 C_{\text{TR}} - 0.005, r = 0.9999$$

$$\epsilon_{\text{TR}} = 2.51 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

- CUPRAC yöntemine göre;

$$A_{450} = 1.67 \times 10^4 C_{\text{TR}} - 3.72 \times 10^{-3}, r = 0.9997$$

$$\epsilon_{\text{TR}} = 1.67 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

Geliştirilen yöntem CUPRAC yöntemine göre antioksidanların TEAC katsayısı, ilgili antioksidanların molar absorptivite değerlerinin troloksun molar absorptivite değerine oranlanması ile bulunmuştur.

Tablo 4.2: Antioksidan bileşiklerin CAR-SNP esaslı antioksidan kapasite yöntemiyle elde edilen doğrusal denklemleri, korelasyon katsayıları, doğrusal çalışma aralıkları ve TEAC değerleri (CUPRAC yöntemiyle karşılaştırılarak)

Antioksidanlar	Doğrusal denklem ve Korelasyon katsayıları (<i>r</i>)	Doğrusal Çalışma aralığı (μM)	TEAC _{CAR-SNP}	TEAC _{CUPRAC} [*]
Troloks	$\Delta A = 2.51 \times 10^4 C - 0.005$ (<i>r</i> =0.9999)	2.19 – 79.88	1.00	1.00
Askorbik asit	$\Delta A = 2.60 \times 10^4 C - 0.01$ (<i>r</i> =0.9954)	2.31 – 77.31	1.04	0.96
Kuersetin	$\Delta A = 8.07 \times 10^4 C - 0.01$ (<i>r</i> = 0.9987)	0.74 – 24.91	3.22	4.38
Rosmarinik asit	$\Delta A = 7.96 \times 10^4 C - 0.005$ (<i>r</i> =0.9995)	0.69 – 25.19	3.17	5.30
Kateşin	$\Delta A = 4.22 \times 10^4 C - 0.004$ (<i>r</i> =0.9984)	1.28 – 47.49	1.68	3.09
(-)epikateşin	$\Delta A = 4.75 \times 10^4 C - 0.002$ (<i>r</i> =0.9986)	1.09 – 42.15	1.90	2.77
(-)epigallokateşin gallat	$\Delta A = 9.20 \times 10^4 C - 0.002$ (<i>r</i> =0.9997)	0.56 – 21.76	3.67	4.88
Gallik asit	$\Delta A = 6.55 \times 10^4 C - 0.001$ (<i>r</i> =0.9966)	0.77 – 30.54	2.61	2.62
α-tokoferol	$\Delta A = 1.38 \times 10^4 C - 0.005$ (<i>r</i> =0.9939)	3.98 – 145.29	0.55	1.10

* Veriler kaynak 55’ dan ve 69’ ten alınmıştır.

4.1.5. Sentetik Antioksidan Karışım Çözeltilerinin CAR-SNP Esaslı Antioksidan Kapasite Yöntemine Göre TAC Ölçümü

Konsantrasyonları 1 μM olan antioksidan bileşiklerden üçlü sentetik karışımlar oluşturulup geliştirilen yönteme göre μM troloks (TR) cinsinden teorik ve deneysel antioksidan kapasiteleri 3.3 ve 3.4 denklemleri kullanılarak hesaplanmış ve değerler birbiriyle karşılaştırılmıştır (Tablo 4.3).

Tablo 4.3: Sentetik antioksidan karışım çözeltilerinin CAR-SNP yöntemine göre μM troloks (TR) cinsinden teorik ve deneysel olarak ölçülen TAC değerlerinin karşılaştırılması (N=3).

Sentetik karışım	İçerik	TAC _{teorik} (μM TR-eşdeğeri)	TAC _{deneysel} (μM TR-eşdeğeri)
1	GA QR TP	5.41	5.76 $\pm$ 0.66
2	CT EC AA	4.52	4.77 $\pm$ 0.30
3	RA EGCG CT	8.52	7.87 $\pm$ 0.04

4.1.6. Yöntemin Kesinliğinin ve Geri Kazanımının Belirlenmesi

Geliştirilen yöntemin kesinliğinin ve geri kazanımının belirlenebilmesi için seyreltilmiş bir yeşil çay infüzyonuna standart ekleme yöntemi kullanılarak, kuersetin, gallik asit, kateşin standart çözeltilerinin katkısı yapılmıştır. Bir tüpe 50 μL yeşil çay infüzyonu ve 100 μL 0.1 mM QR, 100 μL 0.1 mM GA veya 200 μL 0.1 mM CAT çözeltisi ilave edilmiştir. Katkı yapılan çözeltilere ayrı ayrı CAR-SNP esaslı antioksidan kapasite yöntemi uygulanmıştır. Değerler tablo 4.4'te gösterilmiştir.

Tablo 4.4: Geliştirilen CAR-SNP yönteminin kesinliği ve geri kazanımı.

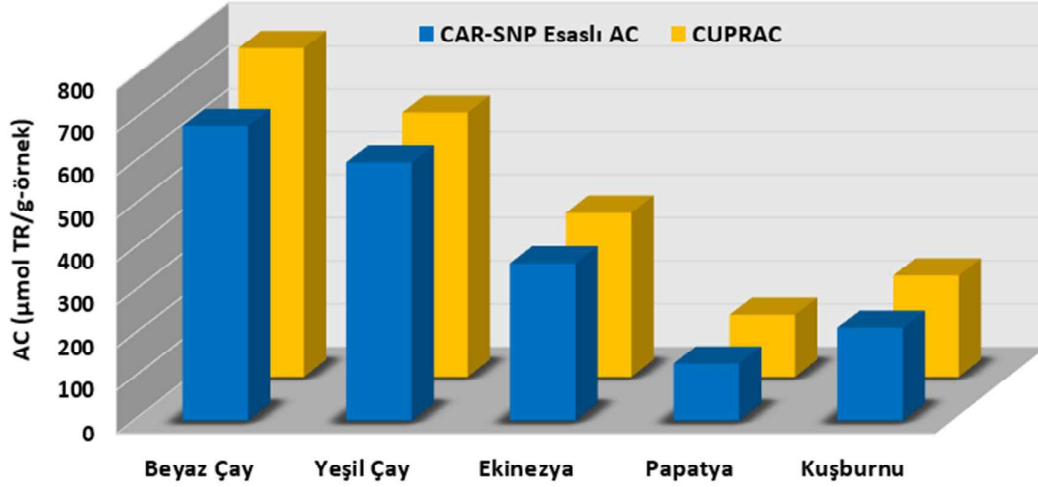
Yeşil çay infüzyonuna eklenen antioksidan	Eklenen kons. (μM)	Ortalama (μM)	SD	RSD (%)	REC (%)
QR	2.00	1.89	0.02	1.06	94.5
GA	2.00	2.19	0.06	2.74	109.5
CT	2.00	2.03	0.09	4.43	101.5

4.1.7. CAR-SNP Esaslı Antioksidan Kapasite Yöntemi ile Bazı Bitki Çayı İnfüzyonlarının Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi

Geliştirilen yöntem kuşburnu, beyaz çay, yeşil çay, papatya çayı ve ekinezya çayı gibi çay infüzyonlarına uygulanmıştır. Bitki çayı infüzyonlarının toplam antioksidan kapasiteleri geliştirilen yöntem ve referans yöntem olan CUPRAC yöntemi uygulanarak belirlenmiştir. Bu çay infüzyonlarının TAC_{CAR-SNP} ve TAC_{CUPRAC} değerleri Troloks eşdeğeri (μmol TR/g-örnek) olarak verilmiştir. Sonuçlar karşılaştırılmıştır ve tablo 4.5'te gösterilmiştir.

Tablo 4.5: Bazı bitki çayı infüzyonlarının CAR-SNP ve CUPRAC yöntemlerine göre belirlenen toplam antioksidan kapasiteleri.

Çay infüzyonları	CAR-SNP yöntemi ($\mu\text{mol TR} / \text{g-örnek}$)	CUPRAC yöntemi ($\mu\text{mol TR} / \text{g-örnek}$)
Beyaz Çay	684 ± 21	765 ± 19
Yeşil Çay	599 ± 18	615 ± 16
Ekinezya	365 ± 12	381 ± 11
Papatya	132 ± 3	145 ± 5
Kuşburnu	215 ± 7	236 ± 9



Şekil 4.10: Bazı bitki çayı infüzyonlarının CAR-SNP ve CUPRAC yöntemlerine göre belirlenen toplam antioksidan kapasiteleri.

4.1.8. İnterferans Çalışması

Gıda örneklerinde yaygın olarak bulunan türlerin olası interfere edici etkileri incelenmiştir. CAR-SNP esaslı AC yöntemi, temsili antioksidan bileşik olarak $4.0 \mu\text{M TR}$ 'nin tayininde 10-1000 kat (mol/mol olarak) interfere edici tür varlığında çalışılmıştır. Sonuçlar Tablo 4.6'da özetlenmiştir.

Tablo 4.6: CAR-SNP esaslı AC yöntemi ile 4 µM TR'nin tayininde çeşitli bileşiklerin etkileri.

İnterferans	İnterferans/TR mol oranı	CAR-SNP esaslı AC yönteminde interferans etkisi
Sitrat	>10	+
Okzalat	>10	+
Fumarik asit	>10	+
Alanin	1000	–
Glisin	1000	–
Serin	1000	–
Galaktoz	1000	–
Fruktoz	1000	–
Glukoz	1000	–
Malik asit	1000	–

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Soy metal NP'ler, farklı fizikokimyasal ve çevreci yaklaşımlarla sentezlenebilir. Au ve Ag gibi soy metal NP'ler, görünür bölgedeki benzersiz SPR bantları sayesinde yüksek molar absorpsiyon katsayıları elde etme gibi üstün özellikler sergilerler. SPR frekansı, ortamın boyutu, bileşimi, dielektrik özellikleri ve parçacıklar arasındaki mesafe ile ilgilidir [49]. Bu yöntemlerin genel tespit mekanizmaları, farklı spektral varyasyonlara yol açan NP'lerin toplanması, ayrılması, büyümesi veya oluşumuna dayanır. Antioksidan kapasite ölçümü için NP'lerin çekirdek merkezli büyüme ve genişleme mekanizması çeşitli protokollerde kullanılmıştır. Ag (I)'in indirgeme potansiyeli Au (III) 'ünkinden daha düşüktür, bu da SNP tabanlı bir yöntemi, Au nanoparçacık tabanlı analoglarından daha seçici hale getirir. Ek olarak, bir gümüş kolloidin altından daha güçlü ve daha keskin plazmon rezonansına sahip olmasına izin veren Mie rezonansı, herhangi bir bant arası geçişten farklı enerjilerde meydana gelir, bu da SNP'lerin kullanımını analitik duyarlılık açısından avantajlı kılar [50].

Toksisitelerine rağmen, alkali metal borohidritler ve amino boran kompleksleri gibi güçlü kimyasal indirgeme ajanları, küçük NP'ler oluşturma yeteneklerinden dolayı tercih edilmektedir. Bitki özleri, lateks, polisakkaritler, şekerler, bakteriler ve mantar gibi doğal malzemeler soy metal NP'lerin hazırlanmasında toksik olmayan alternatif yeşil indirgeyici maddeler olarak kullanılmaktadır. Ancak yeşil yöntemler kullanılarak nanoparçacık sentezinin bazı zorlukları vardır. Bitki özleri gibi biyokimyasal indirgeyiciler, kimyasal indirgeyici ajanlardan daha zayıftır ve parçacıkları çok daha yavaş çekirdekleştirme ve çoğul dağılımlı NP'ler üretme eğilimindedirler [51]. Bu nedenle, homojen dağılımda soy metal nanoparçacıkları hazırlamak için uygun zaman periyotları, pH, sıcaklık, inkübasyon süresi ve indirgeyici konsantrasyonları gibi reaksiyon koşullarının iyileştirilmesiyle kontrol edilebilir.

Bu çalışmada, SNP'lerin κ -karagenan ile yeşil sentezi ile oluşan κ -karagenan kaplı SNP'lerin sağladığı yüksek hassasiyetin kullanılmasıyla düşük maliyetli, çevre dostu, hızlı, basit ve hassas bir AC yöntemi geliştirilmiştir. Yöntemde çekirdeklenme-büyüme mekanizması esas alınmıştır. Geliştirilen yöntemin ilk adımı, orta büyüklükteki tek tip küresel CAR-SNP'lerin yeşil sentezidir. Yeşil sentez ile ortalama çapı yaklaşık 20 nm olan CAR-SNP'ler elde edilmiştir. SNP'lerin yeşil sentezinde indirgeyici ve stabilize edici bir ajan olarak κ -karagenan kullanımına ek olarak, κ -karagenanın sülfat grupları ile pozitif yüklü gümüş çekirdekler arasındaki elektrostatik etkileşim, çekirdeklerin κ -karragenan ile kaplanmasını sağlamıştır. Geliştirilen

yöntemde ikinci adım, sentezlenmiş küresel CAR-SNP'lerin kümelenme olmaksızın test edilen antioksidanlarla büyümesidir. Ag^+ iyonları 420 nm'de maksimum plazmon absorpsiyonu sergileyerek CAR-SNP'lere indirgenirken, polifenollerin reaktif aromatik hidroksil gruplarının (Ar-OH) karşılık gelen kinonlara oksitlenmesi beklenir. Ag (I), antioksidanlar için Au (III) 'e göre daha seçici bir oksidandır, çünkü Ag (I, 0) redoks çifti için standart indirgeme potansiyeli (E^0) 0.8 V iken, fizyolojik olarak önemli antioksidanlar için E^0 0.2-0.6 V aralığında yer almaktadır.

CAR-SNP'lerin sentezinde Ag^+ konsantrasyonu, κ -karagenan konsantrasyonu, pH ve inkübasyon süresi gibi parametreler optimize edilmiştir. CAR-SNP sentezinde $AgNO_3$ konsantrasyonunun etkisinin incelendiği çalışmada, 0.02 - 0.1 M $AgNO_3$ konsantrasyonu aralığında çalışılmıştır. Bu noktada, minimum çapta κ -karagenan kaplı Ag çekirdek nanoparçacıklarının oluşması gereklidir; çünkü antioksidanlar varlığında CAR-SNP'lerin büyümesi ölçülecektir. Şekil 4.1 incelendiğinde, sentez için hem çekirdeklerin oluştuğu hem de minimum absorbansın elde edildiği 0.1 M Ag^+ konsantrasyonu uygun bulunmuştur. CAR-SNP'lerin hazırlanmasında farklı κ -karagenan konsantrasyonlarının etkisi incelenmiştir. Hazırlanan 0.1 M $AgNO_3$ üzerine 3:1 oranında %0.05 - 0.20 aralığında karagenan çözeltileri ilave edilmiştir. Bu noktada, aynı şekilde minimum çapta κ -karagenan kaplı Ag çekirdek nanoparçacıklarının oluşması gereklidir; çünkü antioksidanlar varlığında CAR-SNP'lerin büyümesi ölçülecektir. Şekil 4.2 incelendiğinde, sentez için hem çekirdeklerin oluştuğu hem de minimum absorbansın elde edildiği %0.1 κ -karagenan konsantrasyonu uygun bulunmuştur. Şekil 4.3, geliştirilen yöntemin iki adımı olarak CAR-SNP oluşumunun ve CAR-SNP'lerin büyümesinin (antioksidanları temsil eden Troloks (TR) varlığında) reaksiyon kinetiğini göstermektedir. Açık sarı CAR-SNP'lerin oluşumu için 35 dakikalık bir süre yeterli olmuştur (Şekil 4.3a). CAR-SNP'lerin absorbansının TR ilavesinden sonra arttığı görülmüştür (Şekil 4.3b). Çekirdek-kabuk nanoparçacıklar için, gelen ışıkla etkileşime hakim olan en dış katmandır ve CAR-SNP'lerin dış katman kalınlaşmasına karşılık gelen SPR absorpsiyonundaki artış, antioksidan konsantrasyonundaki artışın doğrusal bir fonksiyonudur. Sentezlenen CAR-SNP'lere antioksidan ilavesinin bir sonucu olarak, sabit bir absorbans artışı elde etmek için 10 dakikalık bir inkübasyon süresinin yeterli olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3b). pH'nın κ -karagenan ile oluşturulan CAR-SNP'ler üzerindeki etkisi (antioksidan yokluğunda), önerilen yöntemin deney koşullarında 3.0-5.8 aralığında incelenmiştir. Şekil 4.4'ten görülebileceği gibi, pH 3-5 aralığında oluşan CAR-SNP'ler oldukça benzer absorpsiyon spektrumları göstermiştir

ve tamamlanmış bir çekirdek oluşumu gözlenmemiştir. Maksimum absorpsiyon 420 nm'de pH 5.8'de görülmüştür ve bu CAR-SNP'lerin oluşumunu göstermektedir. Gümüş nanoparçacıkların yaklaşık 400 nm'de maksimum absorpsiyona sahip olduğu bilinmektedir [52]. Diğer yandan, pH 6'dan sonra Ag iyonları Ag_2O 'ya istenmeyen oksidasyonun bir sonucu olarak çökmüştür. Sonuç olarak, CAR-SNP'lerin oluşumunun tam olarak gerçekleştiği pH 5.8 optimum çalışma pH'sı olarak seçilmiştir.

Sentezlenen gümüş nanoparçacıkların karakterizasyonu amacıyla wet-STEM, FTIR ve XRD analizleri yapılmıştır. κ -karagenan kullanılarak sentezlenen CAR-SNP'lerin wet-STEM görüntüleri analizine göre, CAR-SNP'ler küresel, tek dağılımlı ve homojendir ve sentezlenen CAR-SNP'lerin ortalama boyutu 20 nm'dir (Şekil 4.6a). Antioksidanları temsil eden TR varlığında büyütülmüş CAR-SNP'lerin wet-STEM görüntüleri Şekil 4.6b'de sunulmuştur. CAR-SNP'lerin antioksidanların varlığında büyüdüğü görülmektedir ve TR varlığında ortalama CAR-SNP boyutu 35 nm ölçülmüştür. Küçük nanoparçacıkların başlangıçta tek dağılımlı olması, antioksidan ilavesi üzerine kontrollü büyümeyi içeren hassas AC tayini için bir ön koşuldur. Bu parçacıklar tek dağılımlı olmasaydı, çeşitli boyutlu nanoparçacıklar özgün bir analitik dalga boyunun seçimini mümkün kılamazdı, çünkü SPR bantları maksimum absorbansta değişimler gösterecekti.

κ -karagenan'ın ve kurutulmuş CAR-SNP'lerin FTIR spektrumları Şekil 4.7'de gösterilmektedir. Şekil 4.7a'da, 3337 cm^{-1} 'de gözlemlenen absorpsiyon, hidroksil (-OH) gerilmesinin karakteristiğidir. Katmanlar arasında gerilen C-H, 2894 cm^{-1} 'de görülen absorpsiyona neden olmaktadır. 1615 cm^{-1} 'deki absorpsiyon bandı polimer bağlı suya, 1411 cm^{-1} 'deki bant, sülfat asimetrik gerilmesine ve 1220 cm^{-1} 'deki bant, κ -karagenan sülfatlarının S=O grubu'nun simetrik gerilmesine atfedilebilir [53]. Ayrıca, 1028 cm^{-1} 'deki absorpsiyon, glikozidik bağlantıya, 924 cm^{-1} 'deki absorpsiyon 3,6-anhidro-D galaktoza ve 842 cm^{-1} 'deki galaktozun C-4'ü üzerindeki CO-S eksenel sekonder sülfata atfedilmiştir [54, 55]. Bununla birlikte, Şekil 4.7b, $-CH_2OH$ gruplarına Ag^+ 'nın oksidatif saldırısından sonra C=O grubu oluşumuna bağlı olarak 1718 cm^{-1} 'de yeni ortaya çıkan bir pik göstermektedir [56]. Bu pik, κ -karagenandaki karbonhidrat radikallerinin oksidasyonu ile oluşan karbonil grubuna bağlıdır [53, 57]. κ -karragenan ile karşılaştırıldığında, CAR-SNP'ler 3276 cm^{-1} 'de dar bir pik noktası göstermiştir, bu da κ -karragenanın O-H fonksiyonel gruplarının CAR-SNP'leri sentezlemekten sorumlu olduğunu gösterir [58, 59]. 1269 cm^{-1} 'de ortaya çıkan CAR-SNP'lerin güçlü pik noktası, CAR-sülfat gruplarının SNP'ler ile etkileşiminin göstergesidir. CAR-SNP'lerin sülfat,

karbonil ve hidroksil grupları negatif yüklerine katkıda bulunarak [56], pratikte AC ölçümü için sensörler olarak kullanılabilen kararlı nanoparçacıklar sağlar. Bu yüzey fonksiyonel grupları, iyon-dipol ve dipol-dipol etkileşimleriyle Ag iyonlarını ve fenolik antioksidanları [60] bir araya getirme kabiliyetine sahiptir, böylece mevcut nanoparçacıkların genişlemesini kolaylaştırarak SPR absorpsiyonunun artmasına neden olur.

Sentezlenen CAR-SNP'lerin XRD modeli Şekil 4.8'de gösterilmektedir. 2θ'de 38.2°, 44.6° ve 64.7° civarında gözlenen tepe noktaları, sırasıyla (111), (200) ve (220) fcc gümüşün kristalografik düzlemlerine karşılık gelir. 20°-30° arasında görülen kırınım pikleri, indirgemeden sonra nanoparçacık yüzeylerinde kalan κ-karagenanın yarı kristal yapısına bağlanabilir [61].

Artan TR konsantrasyonları ile CAR-SNP'lerin UV-görünür bölge spektrumları Şekil 4.9'da gösterilmiştir. 420 nm SPR dalga boyundaki simetrik spektrumlar, antioksidanların varlığında büyümeye uğrayan CAR-SNP'lerin monodispersitesini ve stabilizasyonunu göstermektedir. TR konsantrasyonu ile CAR-SNP'lerin plazmon bandına karşılık gelen absorbansta doğrusal bir artış vardır. TR için elde edilen doğrusal çalışma aralığı 2.19 - 79.88 µM olarak bulunmuştur ve mükemmele yakın bir doğrusallık elde edilmiştir ($r = 0.9999$). Geliştirilen CAR-SNP esaslı AC yöntemi kullanılarak TR için elde edilen kalibrasyon grafiğinin doğrusal denklemi $\Delta A_{420} = 2.51 \times 10^{-4} - 0.005$ 'tir. Denklemden, ΔA_{420} ve C, sırasıyla referans çözeltiye karşı absorbanstaki artış ve molar konsantrasyonu sembolize eder. Kalibrasyon grafiğinin eğimi, geliştirilen yöntemle göre TR'nin molar absorptivitesini (ϵ) $2.51 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ olarak tespit edilmiştir. Tespit ve tayin limitleri (LOD ve LOQ) sırasıyla 0.023 ve 0.077 µM olarak bulunmuştur. Bu değerler, mikromolar aralıkta yer alan antioksidan bileşikler için geleneksel ET bazlı deneyler ile elde edilen LOD'lerden en az bir büyüklük sırası daha düşüktür.

Soy metal nanoparçacıkların çekirdeklenmesi ve büyümesi esasına dayalı farklı yöntemlerle elde edilen bazı antioksidan bileşiklerin LOD değerleri Tablo 4.1'de karşılaştırılmıştır. Beğic ve ark. tarafından geliştirilen GSNP-AC (Yeşil gümüş Nanoparçacık Bazlı Antioksidan Kapasite) yönteminde [5], keçi boynuzu ekstresi ile oluşturulan gümüş çekirdeklerinin antioksidanlar varlığında büyüdüğü bildirilmiş ve 434 nm'de SPR absorpsiyon bandındaki artış ölçülmüştür. Özyürek ve ark. tarafından geliştirilen oluşum-büyüme mekanizmasına dayanan SNPAC (Gümüş Nanoparçacık Antioksidan Kapasite) yönteminde [62], Ag (I) iyonları trisodyum sitrat ve gümüş çekirdekleri varlığında polifenoller ile küresel SNP'lere indirgenmiş ve SPR absorpsiyon bandındaki artış 423 nm'de ölçülmüştür. Benzer bir çalışmada

Szydłowska-Czerniak ve ark. [46], gümüş iyonları ve antioksidanlar arasındaki ET reaksiyonuna dayalı olarak pH 8.4 tamponunda SNP oluşumunun ölçümüne dayanan bir AC belirleme yöntemi bildirmiştir. Başka bir çalışmada, Rostami ve ark. [63] askorbik asidin basit ve hassas tespiti için çekirdek aracılı SNP'lerin büyümesine dayanan bir yöntem bildirmiştir. Teerasong ve ark. [64], PVA-SNP'leri (polivinil alkol) gömülü gümüş nanoparçacıklar kullanarak çekirdek aracılı nanoparçacık büyümesine dayalı bir kolorimetrik sensör geliştirmiştir. PVA-SNP'ler, Ag(I) iyonlarının gallik asit ile indirgenmesini katalize etmiştir. Ag(0), PVA-SNP'lerin yüzeyinde biriken Ag(I) iyonlarının indirgenmesiyle oluşmuş ve partikül boyutunda bir artışa neden olmuştur. Başka bir çalışmada Della Pelle ve ark. [48], Folin-Ciocalteu yöntemine daha basit bir alternatif olarak gıda matriksinde endojen polifenollerle yönlendirilen organik çözücü sulu ortamda AuNP oluşumuna dayanan bir yöntem bildirmiştir. Bu yöntem, bir organik çözücü olarak dimetil sülfoksit kullanımını içerir ve numune ekstraksiyonu gerekmez. Gatselou ve ark. [65], polifenollerle etkileşim üzerine boyut ve spesifik renk değişiklikleri gösteren sitrat kaplı rodyum nanoparçacıklar (RhNP'ler) kullanarak çay örneklerinin toplam fenolik içeriğini ve kateşin içeriğini ölçmüşlerdir. Tablo 1, bu yöntemdeki LOD değerlerinin diğer benzer literatür yöntemlerinden çok daha düşük (ve dolayısıyla duyarlılığın daha yüksek) olduğunu göstermektedir.

Geliştirilen CAR-SNP esaslı AC yöntemi kullanılarak, standart antioksidan bileşiklerin TEAC değerleri bulunmuş ve CUPRAC yöntemi ile bulunanlarla karşılaştırılmıştır (Tablo 4.2). CUPRAC ve CAR-SNP esaslı AC yöntemleriyle elde edilen TEAC değerleri arasında sıralama korelasyon katsayısı (Spearman's Rho) 0.8362 ($P = 0.009682$) ve iki yöntem arasındaki ilişki $P < 0.01$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur. Moleküldeki hidroksil gruplarının sayısı ve konumu, bir bileşiğin AC'sine ve ayrıca molekülün konjugasyon derecesine önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır [66]. Benzer konjugasyon seviyelerine sahip flavonoidler, kabaca toplam hidroksil gruplarının sayısı ve bunların AC'si ile orantılıdır. B-halkasındaki o-dihidroksi yapısı antioksidan gücüne katkıda bulunur [67]. Tablo 4.2 incelendiğinde QR, RA, EGCG ve GA için elde edilen yüksek TEAC değerleri öne çıkmaktadır. EGCG'nin yapısında sekiz hidroksi grubu ve QR, RA ve GA'da beş hidroksil grubu vardır. Ayrıca A ve C halkalarındaki 5-hidroksi-4-keto grubu, iki halka sistemini birbirine bağlayan 2,3 çift bağ ve B halkasının yapısında 3', 4'-dihidroksi gruplarının varlığı, QR'nin yüksek AC değerinde önemli bir rol oynar. Çay kateşinlerinin (EGCG > EC > CT) antioksidan kapasiteleri arasında geliştirilen yöntemle göre sıralama da literatür bulguları ile tutarlıdır [5, 66]. QR ve CT'nin hidroksil gruplarının sayısı ve

konumu aynı olmasına rağmen, QR'nin TEAC katsayısı, literatür verileriyle tutarlı olarak yaklaşık iki kat daha yüksektir [66]. Bu, CT'nin C halkasındaki konjugasyon kaybından kaynaklanır. RA yapısındaki C = C bağı, dört fenolik hidroksil grubu, bir alkoksi grubu ve bir ester parçası içeren alternatif çift bağların iyi birleştirilmiş simetrik yapısı ile yüksek AC sergilemiştir. [68].

Standart antioksidan bileşiklerin üçlü kombinasyonlarından oluşan sentetik karışımlar hazırlanmış ve antioksidan kapasiteleri, geliştirilen yöntem kullanılarak belirlenmiştir. Sentetik karışımlar için teorik olarak bulunan kapasite değerleri ile deneysel olarak bulunan kapasite ($\mu\text{M TR}$) değerlerinin birbiri ile uyumlu sonuçlar verdiği ve sapmanın yalnızca $\pm \%7.6$ olduğu gözlenmiştir. Deneysel ve teorik antioksidan kapasiteleri $\%95$ güven seviyesinde tutarlıdır ($F_{\text{exp}} = 0.003$, $F_{\text{crit (tablo)}} = 18.513$, $F_{\text{exp}} < F_{\text{crit (tablo)}}$, $P = 0.05$). İki yönlü ANOVA testi, belirli bir örneklem için popülasyon ortalamaları arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir. Beer kanunundan kimyasal bir sapma olmadığı görülmüştür. Bu, antioksidan kapasitenin kesin ve doğru bir şekilde tahmin edilmesi ve farklı örneklerin antioksidan kapasitelerinin güvenilir bir şekilde değerlendirilmesi için çok önemlidir.

Yeşil çay infüzyonuna yapılan standart antioksidan bileşik katkıları (kuersetin, gallik asit ve kateşin) ve bu çözeltilerin geliştirilen yöntem ile yapılan tayinleri ışığında yöntemin kesinliği ve geri kazanımı belirlenmiştir. Yöntemin kesinliğinin bir göstergesi olan bağıl standart sapma (%RSD) en yüksek değer olarak $\%4.43$ olarak bulunmuştur. Ayrıca önerilen yöntemin doğruluğunu temsil eden geri kazanım değerleri (REC) $\%94.5$ ile $\%109.5$ arasında bulunmuştur.

Geliştirilen yöntem bitki çayı infüzyonlarına uygulanmıştır. Bitki çayı infüzyonlarının toplam antioksidan kapasiteleri geliştirilen yöntem ve referans yöntem olan CUPRAC yöntemi uygulanarak belirlenmiştir. Bu çay infüzyonlarının $\text{TAC}_{\text{CAR-SNP}}$ ve $\text{TAC}_{\text{CUPRAC}}$ değerleri Troloks eşdeğeri ($\mu\text{mol TR /g-örnek}$) olarak verilmiştir. Geliştirilen CAR-SNP esaslı AC yöntemi ve karşılaştırma yöntemi olarak seçilen CUPRAC yöntemi ile elde edilen toplam antioksidan kapasite değerleri birbirlerine oldukça uyumlu bulunmuştur. Bitki çayları arasında TAC sıralaması, her iki yöntemle de beyaz çay > yeşil çay > ekinezya > kuşburnu > papatya olarak bulunmuştur. Her iki yöntemle elde edilen sonuçlar $\%95$ güven düzeyinde birbiriyle tutarlıdır ($P = 0.05$, $F_{\text{exp}} = 5.14$, $F_{\text{crit (tablo)}} = 7.71$, $F_{\text{exp}} < F_{\text{crit (tablo)}}$).

Gıda örneklerinde yaygın olarak bulunan türlerin olası interfere edici etkileri incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 4.6'da özetlenmiştir. Basit amino asitler (alanin, glisin ve serin) ve şekerler (galaktoz, fruktoz ve glikoz), CAR-SNP esaslı AC yönteminde herhangi bir etkileşim göstermemiştir. Fumarik asit, oksalat ve sitrat bileşenlerinin yöntemi etkilediği görülmüştür ve bu nedenle bu tür bileşenlerin tayin öncesi örnek ortamından uzaklaştırılmaları gerekmektedir.

Sonuç olarak tez çalışmasında, antioksidan etkiye sahip örneklerde AC'yi belirlemek için CAR-SNP'nin oluşum-büyüme mekanizmasına dayalı bir yöntem geliştirilmiştir. κ -karagenan SNP'lerin yeşil sentezinde indirgeyici ve stabilize edici bir ajan olarak kullanılmasına ek olarak, κ -karagenan sülfat grupları ile pozitif yüklü gümüş çekirdekler arasındaki elektrostatik etkileşim, çekirdeklerin κ -karagenan ile kaplanmasını sağlamıştır. CAR-SNP'lerin sentezi için önerilen yöntem, düşük maliyetli, basit ve çevre dostudur. CAR-SNP'lerin antioksidanların varlığında büyümesi, 420 nm'de plazmon absorpsiyonundaki artışı ölçerek karmaşık numunelerde AC belirlemesine yol açmıştır. Önerilen CAR-SNP bazlı AC yöntemi kullanılarak, standart antioksidan bileşiklerin TEAC değerleri, sentetik karışımların ve bazı bitki çayları infüzyonlarının AC değerleri belirlenmiş ve CUPRAC yöntemi ile bulunanlarla karşılaştırılmıştır. Her iki yöntemin de %95 güven düzeyinde birbiriyle uyumlu olduğu bulunmuştur. Önerilen yöntem, nanoparçacık çözeltisi hazırlama dahil olmak üzere yaklaşık 45 dakika gibi antioksidan analizi için kısa bir süre gerektirmektedir. Ayrıca nanoparçacıkların hazırlanması için özel araçlara (ısıtıcı, ultrasonik sonikatör, UV ışınlaması vb.) ihtiyaç duyulmamaktadır. Sonuç olarak, CAR-SNP esaslı AC yöntemi, elektron transfer mekanizmasına dayalı diğer benzer nanoparçacık oluşumu/büyümesi yöntemlerine göre oldukça düşük LOD değerleri ile mükemmel hassasiyet göstermiştir. Ayrıca önerilen yöntemin benzer diğer alternatif yöntemlerine göre pratik, hızlı, uygun maliyetli ve yeşil olması gibi avantajları da vardır.

KAYNAKLAR

- [1]. Ighodaro, O. M. and Akinloye, O.A., 2017, First line defense antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid, *Alexandria Journal of Medicine*, 54 (4), 287-293.
- [2]. Okan, O. T., Varlıbaş, H., Öz, M. ve Deniz, İ., 2013, Antioksidan analiz yöntemleri ve Doğu Karadeniz bölgesinde antioksidan kaynağı olarak kullanabilecek odun dışı bazı bitkisel ürünler, *Orman Fakültesi Dergisi*, 13 (1), 48-59.
- [3]. Özyürek, M., Güçlü, K. and Apak, R., 2011, The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement, *Trends in Analytical Chemistry*, 30 (4), 652-664.
- [4]. Güngör, N., 2014, *Antioksidanlara duyarlı soy metal nanoparçacık esaslı yeni sensörler geliştirilmesi*, Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi.
- [5]. Beğic, N., Bener, M. and Apak, R., 2021, Development of a green synthesized silver nanoparticle-based antioxidant capacity method using carob extract, *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 1-14.
- [6]. Jamkhande, P.G., Ghule, N.W., Bamer, A.H. and Kalaskar, M.G., 2019, Metal nanoparticle synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 53.
- [7]. Wei, L., Lu, J., Xu, H., Patel, A., Shen, Z.-S. and Chen, G., 2014, Silver nanoparticles: synthesis, properties and therapeutic applications, *Drug Discovery Today*, 20 (5), 595-601.
- [8]. Abou El-Nour, K.M.M., Eftaiha, A., Al-Warthan, A. and Ammar, R.A.A., 2010, Synthesis and applications of silver nanoparticles, *Arabian Journal of Chemistry*, 3 (3), 135-140.
- [9]. Şahin, M., 2019, Antioksidan gümüş nanoparçacıkların sentezlenmesi, karakterizasyonu ve kataliz uygulamaları, *International Journal of Advances in Engineering and Pure Sciences*, 31, 75-83.
- [10]. Roy, N., Gaur, A., Jain, A., Bhattacharya, S. and Rani, V., 2013, Green synthesis of silver nanoparticles: An approach to overcome toxicity, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36 (3), 807-812.
- [11]. O.V., Dias, H.V.R., Kharisov, B.I., Perez, B.O. and Perez, V.M.J., 2013, The greener synthesis of nanoparticles, *Trends in Biotechnology*, 31 (4), 240-248.
- [12]. Bener, M., Şen, F.B., Kaşgöz, A. ve Apak, R., 2018, Carrageenan-based colorimetric sensor for total antioxidant capacity measurement, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 273, 439-447.

- [13]. Zhu, M., Li, X., Ge, L., Zi, Y., Qi, M., Li, Y., Li, D. and Mu, C., 2020, Green synthesis of k-carrageenan@Ag submicron-particles with high aqueous stability, robust antibacterial activity and low cytotoxicity, *Material Science & Engineering C*, 106.
- [14]. Wang, Y., Dong, X., Zhao, L., Xue, Y., Zhao, X., Li, Q. and Xia, Y., 2020, Facile and green fabrication of carrageenan-silver nanoparticles for colorimetric determination of Cu^{2+} and S^{2-} , *Nanomaterials*, 10 (1), 83.
- [15]. Karayel, M., 2020, *Yeşil ve ölçeklenebilir bir yöntem kullanılarak karragenan kaplı gümüş nanoparçacıkların sentezi ve karakterizasyonu*, Yüksek lisans tezi, Kırıkkale Üniversitesi.
- [16]. Oroian, M. and Escriche, I., 2015, Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis, *Food Research International*, 74, 10-36.
- [17]. Yoshihara, D., Fujiwara, N. and Suzuki K., 2010, Antioxidants: Benefits and risks for long-term health, *Maturitas*, 67 (2), 103-107.
- [18]. Pisoschi, A.M. and Pop, A., 2015, The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress : A review, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55-74.
- [19]. Vives-Bauza, C., Starkov, A. and Garcia-Arumi, E., 2007, *Measurements of the antioxidant enzyme activities of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase*, Methods in cell biology, Chapter 19, Elsevier, 80, 379-393.
- [20]. Ribeiro, D., Freitas, M., Silva, A.M.S., Carvalho, F. and Fernandes, E., 2018, Antioxidant and pro-oxidant activities of carotenoids and their oxidation products, *Food and Chemical Toxicology*. 120, 681-699.
- [21]. Choi, D.Y., Lee, Y.J., Hong, J.T. and Lee, H.J., 2012, Antioxidant properties of natural polyphenols and their therapeutic potentials for Alzheimer's disease, *Brain Research Bulletin*, 87 (2-3), 144-153.
- [22]. Kirschweng, B., Tatraaljai, D., Földes, E. and Pukanszky, B., 2017, Natural antioxidants as stabilizers for polymers, *Polymer Degradation and Stability*, 145, 25-40.
- [23]. Kumar, N. and Goel, N., 2019, Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications, *Biotechnology Reports*, 24.
- [24]. L., Ni, R., Shao, Y. and Mao, S., 2014, Carrageenan and its applications in drug delivery, *Carbohydrate Polymers*, 103, 1-11.
- [25]. Sedayu, B.B., Cran, M.J. and Bigger, S.W., 2019, A review of property enhancement techniques for carrageenan-based films and coatings, *Carbohydrate Polymers*, 216, 287-302.
- [26]. Campo, V.L., Kawano, D.F., Silva Jr, D.B. and Carvalho, I., 2009, Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis- A review, *Carbohydrate Polymers*, 77 (2), 167-180.

[27]. Dinparvar, S., Bagirova, M., Allahverdiyev, A.M., Abamor, E.S., Safarov, T., Aydoğdu, M. and Aktas, D., 2020, A nanotechnology-based new approach in the Treatment breast cancer: Biosynthesized silver nanoparticles using Cuminum cyminum L. seed extract, *Photochemistry and Photobiology*. 208.

[28]. Dolez, P.I., 2015, *Nanomaterials, Definitions, Classifications and Applications*, Nanoengineering, Global Approaches to health and Safety Issues, Chapter 1.1, Elsevier, 3-40.

[29]. Çağlayan, M.G., 2014, *Aminoglikozidlerin altın ve gümüş naoparçacıklar kullanılarak spektroskopik tayinleri*, Doktora tezi, Ankara Üniversitesi.

[30]. Sharma, V.K., Yngard, R.A. and Lin, Y., 2009, Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities, *Advances in Colloid and Interface Science*, 145 (1-2), 83-96.

[31]. Kumari, Y., Kaur, G., Kumar, R., Kumar Singh, S., Gulati, M., Khursheed, R., Clarisse, A., Gowthamarajan, K., Mahalingam, R., Ghosh, D., Avasthi, A., Kumar, R., Kumar Yadav, A., Kapoor, B., Kumar Singh, P., Dua, K. and Porwal, O., 2019, Gold nanoparticles: New routes across old boundaries, *Advances in Colloid and Interface Science*, 274.

[32]. Beyene, H.D., Werkneh, A.A. and Bezabh, H.K., 2017, Synthesis paradigm and applications of silver nanoparticles (AgNPs), a review, *Sustainable Materials and Technologies*, 13, 18-23.

[33]. Jahan, I., 2019, *Green synthesis of metal nanoparticles, their chemical and biochemical characterizations*, PhD thesis, Yıldız Technical University.

[34]. Singh, P., Kim, Y-J., Zhang, D. and Yang, D.C., 2016, Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms, *Trends in Biotechnology*, 34 (7), 588-599.

[35]. Zhang, Z. and Lin, P-C., 2018, *Noble metal nanoparticles: Synthesis and biomedical implementations*, Emerging Applications of Nanoparticles and Architecture Nanostructures, Chapter 7, Elsevier, 177-233.

[36]. Kumar, P., Mahajan, P., Kaur, R. and Gautam, S., 2020, Nanotechnology and its challenges in the food sector: a review, *Materials Today Chemistry*, 17.

[37]. Noah, N., 2019, *Green synthesis: Characterization and application of silver and gold nanoparticles*, Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles, Chapter 6, Elsevier, 111-135.

[38]. Nogueira, L.F.B., Guideli, E.J., Jafari, S.M., and Ramos, A.P., 2020, *Green synthesis of metal nanoparticles by plant extracts and biopolymers*, Handbook of Food Nanotechnology, Chapter 7, 257-278.

[39]. Shavandi, A., Saeedi, P., Ali, M.A. and Jalalvandi E., 2019, *Green synthesis of polysaccharide- based inorganic nanoparticles and biomedical aspects*, Functional Polysaccharides for Biomedical Applications, Chapter 8, Woodhead Publishing, 267-304.

[40]. Lopez-Alarcon, C. and Denicola, A., 2013, Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays, *Analytica Chimica Acta*, 763, 1-10.

[41]. Prior, R.L., 2015, Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits, *Journal of Functional Foods*, 18, 797-810.

[42]. Shahidi, F. and Zhong, Y., 2015, Measurement of antioxidant activity, *Journal of Functional Foods*, 18, 757-781.

[43]. Vazquez, C.V., Rojas, M.G.V., Ramirez, C.A., Chavez-Servin, J.L., Garcia-Gasca, T, Ferriz Martinez, R.A., Garcia, O.P., Rosado, J.L., Lopez-Sabater, C.M., Castellote, A.I., Montemayor, H.M.A., Torre Carbot, K., 2015, Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an extraction technique for quantification using the Folin-Ciocalteu method, *Food Chemistry*, 176, 480-486.

[44]. Deng, J., Cheng, W. and Yang, G., 2011, A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay, *Food Chemistry*, 125 (4), 1430-1435.

[45]. Nezhad, M. R. H., Karimi, M. A. and Shahheydari, F., 2010, A sensitive colorimetric detection of ascorbic acid in pharmaceutical products based on formation of anisotropic silver nanoparticles, *Scientia Iranica*, 17, 148-153.

[46]. Szydlowska-Czerniak, A., Tulodziecka, A. and Szlyk, E., 2012, A silver nanoparticle-based method for determination of antioxidant capacity of rapeseed and its products, *Analyst*, 137, 3750-3759.

[47]. Nezhad, M. R. H., Alimohammadi, M., Tashkhourian, J. and Razavian, S. M., 2008, Optical detection of phenolic compounds based on the surface plasmon resonance band of Au nanoparticles, *Spectrochimica Acta, Part A*, 71, 199-203.

[48]. Della Pelle, F., Gonzalez, M. C., Sergi, M., Del Carlo, M., Compagnone, D. and Escarpa, A., 2015, Gold nanoparticles-based extraction-free colorimetric assay in organic media: an optical index for determination of total polyphenols in fat-rich samples, *Analytical Chemistry*, 87 (13), 6905-6911.

[49]. Apak, R., Demirci Çekiç, S., Üzer, A., Çapanoğlu, E., Çelik, S.E., Bener, M., Can, Z. and Durmazel, S., 2020, Colorimetric sensors and probes for characterizing antioxidant and energetic substances, *Analytical Methods*, 12, 5266-5321.

[50]. Jiang, Z. J., and Liu, C. Y., 2003, Seed-mediated growth technique for the preparation of a silver nanoshell on a silica sphere, *The Journal of Physical Chemistry B*, 107 (45), 12411-12415.

[51]. Bhattarai, B., Zaker, Y., and Bigioni, T. P., 2018, Green synthesis of gold and silver nanoparticles: Challenges and opportunities, *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 12, 91-100.

- [52]. Siegel, J., Kvítek, O., Ulbrich, P., Kolská, Z., Slepíčka, P., and Švorčík, V., 2012, Progressive approach for metal nanoparticle synthesis, *Materials Letters*, 89, 47-50.
- [53]. Elsupikhe, R. F., Shameli, K., Ahmad, M.B., Ibrahim, N. A., and Zainudin, N., 2015, Green sonochemical synthesis of silver nanoparticles at varying concentration of κ -carrageenan, *Nanoscale Research Letters*, 10 (302).
- [54]. Pereira, L., Amado, A. M., Critchley, A. T., Van de Velde, F. and Ribeiro-Claro, P. J., 2009, Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman), *Food Hydrocolloids*, 23 (7), 1903-1909.
- [55]. Pourjavadi, A., Harzandi, A. M., and Hosseinzadeh, H., 2004, Modified carrageenan synthesis of a novel polysaccharide based superabsorbent hydrogel via graft copolymerization of acrylic acid onto kappa-carrageenan in air, *European Polymer Journal*, 40 (7), 1363-1370.
- [56]. Goel, A., Meher, M. K., Gupta, P., Gulati, K., Pruthi, V., and Poluri, K. M., 2019, Microwave assisted κ -carrageenan capped silver nanocomposites for eradication of Bacterial biofilms, *Carbohydrate Polymers*, 206, 854-862.
- [57]. Abad, L.V., Kudo, H., Saiki, S., Nagasawa, N., Tamada, M., Katsumura, Y., Aranilla, C.T., Relleve, L.S., and De La Rosa, A. M., 2009, Radiation degradation studies of Carrageenans, *Carbohydrate Polymers*, 78 (1), 100-106.
- [58]. Roy, S., Shankar, S., and Rhim, J. W, 2019, Melanin-mediated synthesis of silver nanoparticle and its use for the preparation of carrageenan-based antibacterial films, *Food Hydrocolloids*, 88, 237-246.
- [59]. Zepon, K. M., Marques, M. S., da Silva Paula, M. M., Morisso, F. D. P., and Kanis, L. A., 2018, Facile, green and scalable method to produce carrageenan-based hydrogel containing in situ synthesized AgNPs for application as wound dressing, *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 51-58.
- [60]. Pandey, S., Do, J. Y., Kim, J., and Kang, M., 2020, Fast and highly efficient catalytic degradation of dyes using κ -carrageenan stabilized silver nanoparticles nanocatalyst., *Carbohydrate Polymers*, 230.
- [61]. Liew, J.W.Y., Loh, K.S., Ahmad, A., Lim, K.L. and WanDaud, W.R., 2017, Synthesis and characterization of modified κ -carrageenan for enhanced proton conductivity as polymer electrolyte membrane, *PlosOne*, 12 (9).
- [62]. Özyürek, M., Güngör, N., Baki, S., Güçlü, K., and Apak, R., 2012, Development of a silver nanoparticle-based method for the antioxidant capacity measurement of polyphenols, *Analytical Chemistry*, 84 (18), 8052-8059.
- [63]. Rostami, S., Mehdinia, A., and Jabbari, A., 2017, Seed-mediated grown silver nanoparticles as a colorimetric sensor for detection of ascorbic acid, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 180, 204-210.

[64]. Teerasong, S., Jinnarak, A., Chaneam, S., Wilairat, P., and Nacapricha, D., 2017, Poly (vinyl alcohol) capped silver nanoparticles for antioxidant assay based on seed-mediated nanoparticle growth, *Talanta*, 170, 193-198.

[65]. Gatselou, V., Christodouleas, D. C., Kouloumpis, A., Gournis, D., and Giokas, D. L., 2016, Determination of phenolic compounds using spectral and color transitions of rhodium nanoparticles., *Analytica Chimica Acta*, 932, 80-87.

[66]. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., and Paganga, G., 1996, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology and Medicine*, 20 (7), 933-956.

[67]. Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., and Glover, W., 1999 Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits, *Food Chemistry*, 66 (4), 401-436.

[68]. Taguchi, R., Hatayama, K., Takahashi, T., Hayashi, T., Sato, Y., Sato, D., Ohta, K., Nakano, H., Seki, C., Endo, Y., Tokuraku, K., and Uwai, K., 2017, Structure–activity relations of rosmarinic acid derivatives for the amyloid β aggregation inhibition and antioxidant properties, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 138, 1066-1075.

[69]. Arun, G., Eyini, M., and Gunasekaran, P., 2014, Green synthesis of silver nanoparticles using the mushroom fungus *Schizophyllum commune* and its biomedical applications, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 19 (6), 1083-1090.