

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NANOCERİA KATALİZÖRÜ İLE ÜRETİLEN REAKTİF TÜRLERİN
SÜPÜRÜLME ETKİNLİĞİNİN ÖLÇÜMÜ İÇİN YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Gözde Mediha KAMER

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

HAZİRAN 2019

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NANOCERİA KATALİZÖRÜ İLE ÜRETİLEN REAKTİF TÜRLERİN
SÜPÜRÜLME ETKİNLİĞİNİN ÖLÇÜMÜ İÇİN YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

**Gözde Mediha KAMER
(509122017)**

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Birsen DEMİRATA ÖZTÜRK

HAZİRAN 2019

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 509120217 numaralı Doktora Öğrencisi Gözde Mediha KAMER, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “NANOCERİA KATALİZÖRÜ İLE ÜRETİLEN REAKTİF TÜRLERİN SÜPÜRÜLME ETKİNLİĞİNİN ÖLÇÜMÜ İÇİN YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Birsen Demirata ÖZTÜRK**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. İkbâl KOYUNCU**
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Doç. Dr. Gülçin YILMAZ
İstanbul Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Dilek ÖZYURT
İstanbul Teknik Üniversitesi

Teslim Tarihi : 17.05.2019
Savunma Tarihi : 17.06.2019





Aileme ve Eşime,



ÖNSÖZ

Doktora süreci, hayatımın şu ana kadar ki, tartışmasız en zorlu ve yoğun duygularını yaşadığım uzun bir yolculuktu. Ruhen, kişisel ve profesyonel anlamda geliştiğim, deneyim kazandığım ve sabretmeyi tekrardan öğrendiğim, bu kadar uzun olmasını ise hiç beklemediğim yedi yıl... Kariyer ve bilimsel araştırmanın iç içe geçtiği, kimi zaman başarıya olan inancımı yitirdiğim ve kendimi sorguladığım, iniş ve çıkışlarla dolu, yorucu bir deneyimdi. Bu yolculukta bana eşlik eden, elimden tutup destek olan insanların varlığı ise edindiğim tüm akademik kazanımlardan çok daha kıymetliydi.

Bana bilimsel düşünmeyi ve sabretmeyi öğreten, pes etmek üzereyken cesaret veren, her zaman pozitif eleştiri yapan ve yol gösteren tez danışmanım sayın hocam Prof. Dr. Birsen DEMİRATA ÖZTÜRK'e bu yolculukta verdiği tüm emekleri için teşekkürü bir borç bilirim. Bir öğretmen olarak, kendisinin sadece bilimsel bakış açısını değil öğrencileri ile kurduğu ilişkilerini de örnek almayı ve yetiştireceğim insanlara onun kadar sabırlı ve anlayışlı olmayı ümit ediyorum.

Kısıtlı zamanı ve yoğun programında dahi beni yalnız bırakmayıp desteğini esirgemeyen, hep yapabileceğime inanan ve İTÜ'de geçirdiğim süre zarfında kendimi evimde hissetmemi sağlayan sevgili hocam Doç. Dr. Dilek ÖZYURT'a da bu süreçteki tüm katkıları için minnettarım.

Benimle laboratuvarında emek harcayan ve koşturan sevgili Reva BAYRAKTAR'a, bu çalışma ile aynı adı taşıyan 1322 numaralı doktora tez projesine destek veren İTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na sürece olan katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Ve sevgili ailem..Hayatım boyunca kalbimin sesini dinlemem için destek veren, aldığım kararların arkasında olan, bu yolda benimle birlikte sevinip üzülen ama hep koşulsuz destekleyen ailem olmadan gerçekleşemeyecek bir deneyimdi doktora çalışması.

Geriye baktığımda hiçbir anımdan pişman olmadığım, yıllar içinde farklı bir insan olmamı sağlayan bu süreç sonlanırken, yaptığımız çalışmanın benzer daha pek çok çalışmaya ilham vermesini temenni ederim.

Mayıs 2019

Gözde Mediha KAMER
Yüksek Kimyager



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR.....	xiii
SEMBOLLER	xv
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xvii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xix
ÖZET.....	xxi
SUMMARY	xxv
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Tezin Amacı	4
2. GENEL BİLGİ	7
2.1 Oksidatif Stress Ve Reaktif Oksijen Türleri.....	7
2.2 Fenton Reaksiyonu	9
2.2.1 Fenton reaksiyonuna etki eden faktörler	13
2.2.1.1 pH değeri.....	13
2.2.1.2 Demir(II) iyonlarının konsantrasyonu.....	13
2.2.1.3 Hidrojen peroksit konsantrasyonu.....	14
2.2.1.4 Reaksiyon sıcaklığı	14
2.2.2 Modifiye fenton süreçleri.....	14
2.2.2.1 Nano-sıfır değerlikli demir kullanılan süreçler	17
2.2.2.2 Demir içermeyen fenton süreçleri	18
2.3 Seryum.....	19
2.3.1 Nano-boyut etkileri	23
2.3.2 Sentez	24
2.3.2.1 Nanopartikül sentezinde yeşil yöntemler	25
2.3.3 Nanoceria'nın antioksidan aktivitesi.....	29
2.4 Karakterizasyon.....	30
2.4.1 Partikül boyutunun belirlenmesinde kullanılan yöntemler	30
2.4.1.1 Dinamik ışık kırınımı (DLS).....	30
2.4.1.2 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)	31
2.4.1.3 Geçirimli elektron mikroskobu (TEM)	31
2.4.1.4 Atomik kuvvet mikroskobu (AFS).....	31
2.4.1.5 Tek partikül-indüktif olarak eşleştirilmiş-kütle spektrometrisi (SP-ICP-MS)	32
2.4.2 Yüzey yükü belirleme yöntemleri	32
2.4.3 Yüzeyin hidrofobik yapısının belirlenmesi için kullanılan yöntemler.....	32
2.4.4 Hedef ilaca cevap yöntemleri.....	32
2.5 Reaktif Oksijen Türlerini Süpürücü Bileşikler.....	33
2.6 Antioksidan Kapasitesinin Ölçümü İçin Kullanılan Yöntemler.....	37
2.6.1 Reaktif türleri süpürücü kimyasal yöntemler	37

2.6.1.1 Oksijen radikali absorbands kapasitesi (ORAC).....	38
2.6.1.2 Kemilüminesans	39
2.6.1.3 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal süpürme yöntemi (DPPH).....	39
2.6.1.4 Troloks ekivalenti antioksidan kapasitesi (TEAC)	40
2.6.2 Redox potansiyeline dayanan yöntemler.....	40
2.6.2.1 Cupric indirgeyici antioksidan kapasitesi (CUPRAC).....	41
2.6.2.2 Toplam fenolik içeriği yöntemi.....	43
2.6.3 Diğer yöntemler.....	45
2.7 Reaktif Oksijen Türlerini Tanımlamada Kullanılan Spektrometrik Problar	46
3. MALZEME VE YÖNTEM	49
3.1 Kullanılan Cihazlar.....	49
3.2 Kimyasallar, Standartlar Ve Örnek Hazırlama.....	49
3.2.1 Nanoceria sentezi ve Zahter analizinde kullanılan kimyasallar	49
3.2.1.1 Klasik yöntem ile nanoceria partiküllerinin sentezi	50
3.2.1.2 Nişasta ile Nanoceria Partiküllerinin Sentezi.....	50
3.2.1.3 Zahter ortamında nanoceria partiküllerinin sentezi.....	51
3.2.1.4 Zahterin klasik folin-ciocalteu yöntemi ile analizi.....	51
3.2.1.5 Zahterin modifiye folin-ciocalteu yöntemi ile analizi.....	52
3.2.1.6 Zahterin toplam antioksidan içeriğinin CERAC yöntemi ile incelenmesi.....	52
3.2.1.7 Zahterin Alüminyum klorür testi ile incelenmesi	52
3.2.2 3. Nanoceria ortamında üretilen reaktif türlerin DMPD probu ve CUPRAC yöntemi ile incelenmesi için kullanılan kimyasallar	53
3.2.2.1 DMPD probu ile geliştirilen yöntem için örnek hazırlama	53
3.2.2.2 DMPD probu ile geliştirilen yöntemin optimizasyonu	54
3.2.2.3 Nanoceria ile katalizlenen reaktif türlerin DMPD probu ile % süpürülme değerlerinin incelenmesi.....	55
3.2.2.4 Nanoceria ile katalizlenen reaktif türlerin CUPRAC yöntemi ile % süpürülme değerlerinin incelenmesi.....	55
3.2.2.5 Nanoceria ile katalizlenen reaktif türlerin % süpürülme değerlerinin incelenmesi amacı ile CUPRAC ve DMPD yöntemlerinin karşılaştırılması ..	56
4. SONUÇLAR	59
4.1 Sentezlenen Nanoceria Partiküllerinin Karakterizasyonu	59
4.1.1 Amonyak, nişasta ve zahter ortamında sentezlenen nanoceria Partiküllerinin Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ile karakterizasyonu ...	59
4.1.1.1 Amonyak kullanılarak sentezlenen partiküllerin SEM sonuçları.....	59
4.1.1.2 Nişasta kullanılarak sentezlenen partiküllerin SEM sonuçları.....	60
4.1.1.3 Zahter kullanılarak sentezlenen partiküllerin SEM sonuçları	60
4.2 Zahter Bitkisinin Fenol, Flavonoid ve Toplam Antioksidan Miktarı Bakımından İncelenmesi	61
4.2.1 Zahterin klasik Folin-Ciocalteu yöntemi ile incelenmesi	61
4.2.2 Zahterin klasik folin-ciocalteu yöntemi ile incelenmesi	61
4.2.3 Zahterin modifiye Folin-Ciocalteu yöntemi ile incelenmesi.....	62
4.2.4 Zahterin toplam antioksidan kapasitesinin CERAC yöntemi ile incelenmesi.....	63
4.2.5 Zahterin Alüminyum klorür yöntemi ile incelenmesi	64
4.3 Nanoceria İle Katalizlenen Reaktif Türlerin Doğası	66
4.3.1 Nanoceria ile katalizlenen reaktif türlerin DMPD probu kullanılarak kolorimetrik tayini, yöntemin optimizasyonu ve % süpürme çalışması	66

4.3.2 Nanoceria ile katalizlenen reaktif türlerin süpürülmesi sonrası kalan antioksidan miktarının CUPRAC metodu ile ölçülmesi	71
4.3.3 Nanoceria ile katalizlenen reaktif türlerin % süpürülme değerlerinin incelenmesi amacı ile CUPRAC ve DMPD yöntemlerinin karşılaştırılması.....	75
5. GENEL SONUÇ VE DEĞERLENDİRMELER.....	79
KAYNAKLAR.....	81
ÖZGEÇMİŞ.....	101





KISALTMALAR

AFS	: Atomik Kuvvet Mikroskobu
AOP	: İleri Oksidasyon Süreçleri
ATP	: Adenozin trifosfat
ABTS	: 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)
BHA	: Bütilli Hidroksianisol
BTA	: Bütilli Hidroksitoluen
C₁₆TAB	: Setiltrimetil amonyum bromür
CERAC	: Serik İndirgeyici Antioksidan Gücü
CeONP	: Seryum oksit nanopartikülleri
CHROMAC	: Krom İndirgeyici Antioksidan Gücü
CUPRAC	: Kuprik İndirgeyici Antioksidan Gücü
DLS	: Dinamik Işık Kırınımı
DMPD	: N,N-dimetil-p-fenildiamin Dihidroklörür
DTPA	: Dietilentriamin pentasetat
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil-hidrat yöntemi
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
EPR	: Elektro Manyetik Rezonans
ET	: Elektron Transferine dayanan yöntemler
FCR	: Folin Cicalteu Toplam Fenol İçeriği
FRAP	: Ferrik İyonu İndirgeyici Antioksidan Gücü
GA	: Gallik asit
GT	: Gum taragacanth
HAT	: Hidrojen Atomu Transferi
HPLC	: Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
MEMTEK	: Ulusal Membran Teknolojileri Araştırma merkezi
Nanoceria	: Seryum oksit nanopartikülleri
NBT	: Nitroblue tetrazolyum
ORAC	: Oksijen Radikali Absorpsiyon Kapasitesi
OSC	: Oksijen Taşıma Kapasitesi
PXRD	: X ışını toz kırınım yöntemi

PCS	: Foton korelasyon spektroskopisi
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
SP-ICP-MS	: Tek Partikül İndüktif Olarak Eşleştirilmiş Kütle Spektrometrisi
SOD	: Süperoksit Dismütaz
STM	: Taramalı Tünelleme Mikroskobu
TAC	: Toplam Antioksidan Kapasitesi
TBARS	: Tiyoarbitürik asit reaktif türleri
TBHQ	: Tert-bütillidroksikinon
TEAC	: Troloks Ekvivalenti Antioksidan Kapasitesi
TEM	: Geçirimli Elektron Mikroskobu
TRAP	: Toplam Radikal Hapsetme Antioksidan Parametresi
UV	: Mor ötesi
XOD	: Ksantin Oksidaz
XRD	: X-Ray kırınımı

SEMBOLLER

A_0	: İlk Absorbans değeri
A	: Son Absorbans değeri
C	: Molar konsantrasyon
ΔG°	: Gibbs serbest enerjisi





ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Reaktif oksijen türlerinin sınıflandırılması.....	8
Çizelge 2.2 : Sınıflarına göre antioksidanlar ve görevleri.	35
Çizelge 2.3 : Kaynaklarına göre baharatlar ve şifalı bitkiler.	36
Çizelge 2.4 : T. vulgaris ve T. spicata toplam fenolik içerik ve antioksidan aktivetelerinin gama radyasyona bağlı olarak değişimi [49].	45
Çizelge 4.1 : Gallik asit standartları ve zahter infüzyonlarının 750 nm’de absorbans değerleri ve fenolik içerikleri.	62
Çizelge 4.2 : Gallik asit standartları ve zahter infüzyonlarının 665 nm’de absorbans değerleri ve hesaplanan fenolik içerikleri.	63
Çizelge 4.3 : Gallik asit standartları ve zahter infüzyonlarının 320 nm’de absorbans değerleri ve antioksidan kapasitesi.	64
Çizelge 4.4 : Kateşin standartları ve zahter infüzyonlarının 510 nm’de absorbans değerleri ve flavonoid içerikleri.	65
Çizelge 4.5 : Zahter infüzyonunun antioksidan ve fenolik içeriklerinin karşılaştırılması.	65
Çizelge 4.6 : Reaktif türlerin seçili antioksidan çözeltileri ortamında DMPD metodu ile süpürülme aktiviteleri ($A_0 = 1.895 (\pm 0.007)$; Tüm antioksidan konsantrasyonları 2.0×10^{-5} mol/L olarak kullanılmıştır).	71
Çizelge 4.7 : Reaktif türlerin seçilen bitki infüzyonları ile süpürülme aktivitelerinin DMPD metodu ile ölçülmesi. RS ($A_0=1.8953 (\pm 0.007)$).	71
Çizelge 4.8 : CUPRAC metodunda kullanılan antioksidanların Absorbans vs molar konsantrasyon cinsinden lineer korelasyon denklemleri	72
Çizelge 4.9 : Seçilen antioksidanların CUPRAC metodu ile ölçülen yüzde süpürme kapasiteleri (Tüm antioksidan konsantrasyonları 2.44×10^{-5} mol/L olarak alınmıştır).	77
Çizelge 4.10 : Çeşitli bitki infüzyonlarının CUPRAC metodu ile ölçülen yüzde süpürme kapasiteleri.	77



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 : DMPD ve hidroksil radikalleri arasındaki temsili reaksiyon [59].	5
Şekil 1.2 : CUPRAC reaksiyonu [3].	6
Şekil 2.1 : Oksijenden tek elektron transferli reaksiyon zinciri ile su oluşumu [71].	8
Şekil 2.2 : Barb ve arkadaşları tarafından önerilen Fenton sürecinde serbest radikal üretim mekanizması [88,89].	9
Şekil 2.3 : Haber-Weiss reaksiyonu döngüsü [88, 93-95].	11
Şekil 2.4 : Klasik Fenton ve metal merkezli Fenton reaksiyonlarındaki temel ve ara basamaklar [88, 93-95].	11
Şekil 2.5 : Organik substrat yokluğunda Fenton reaksiyonu için olası mekanizmalar [88, 93-95].	12
Şekil 2.6 : Radikal içermeyen olası Fenton mekanizmaları [88, 93-95].	12
Şekil 2.7 : Sadece ceria üzerinden hidrojen peroksitin aktivasyon mekanizması ile hidroksil radikali üretimi [166].	20
Şekil 2.8 : Sülfürik asit ile muamele edilmiş ceria üzerinden hidrojen peroksitin aktivasyon mekanizması ile hidroksil radikali üretimi [166].	21
Şekil 2.9 : Yüklenmiş Ceria'nın Kristal görüntüsü. (Sağ küpte yüklenmemiş CeO ₂ gösterilirken, soldaki küpte lantanit serisinden trivalent iyonların yer değiştirmesi ile yüklenmiş CeO ₂ görüntüsü yer almaktadır) [168].	21
Şekil 2.10 : Ceria üzerinde oksijen boşluklarının oluşumu. Bir oksijen atomu arkasında iki elektron bırakarak örgü pozisyonunu terketmekte ve Ce (+4) ve Ce(+3) formları arasında geçiş sağlayarak iki seryum atomu üzerinde lokalize olmaktadır [173].	22
Şekil 2.11 : CUPRAC reaksiyonu ile bis(neocupraïne) bakır(I) şelat katyonu kromofor maddesinin oluşması [237].	42
Şekil 2.12 : Teraftlat probu ve süpürücü madde ortamında hidroksil radikalleri için verilen yarışmalı reaksiyonun şematik gösterimi [57].	43
Şekil 3.1 : Nanoceria partiküllerinin sentez aşamaları.	50
Şekil 4.1 : A: 30°C, B: 50°C, C: 80°C'de kurutulan CeONP nanopartiküllerinin SEM görüntüsü.	59
Şekil 4.2 : Nişasta çözeltisi ortamında sentezlenen nanoceria SEM görüntüsü (x200,000 büyütme).	60
Şekil 4.3 : Zahter ekstraktı kullanılarak sentezlenen nanoceria SEM görüntüsü (x400,000 büyütme).	61
Şekil 4.4 : 750 nm'de gallik asit standartlarının absorbansa karşı molar konsantrasyon grafiği.	62
Şekil 4.5 : 665 nm'de gallik asit standartlarının absorbansa karşı molar konsantrasyon grafiği.	63
Şekil 4.6 : Gallik asidin 320 nm'deki absorbansa karşı molar konsantrasyonu grafiği.	64
Şekil 4.7 : Katesinin 510 nm'deki absorbansa karşı molar konsantrasyonu grafiği.	65
Şekil 4.8 : DMPD çözeltisi ile reaktif türlerin süpürülmesi.	67

Şekil 4.9 : Yarışmalı reaksiyon ortamında hidroksil radikallerinin süpürülmesinin temsili gösterimi.....	67
Şekil 4.10 : Hidrojen peroksit konsantrasyonu optimizasyon grafiği.....	68
Şekil 4.11 : DMPD konsantrasyonu optimizasyon grafiği.	68
Şekil 4.12 : Nanoceria konsantrasyonu optimizasyon grafiği.	68
Şekil 4.13 : Sıcaklık optimizasyonu grafiği.....	69
Şekil 4.14 : Süre optimizasyonu grafiği.....	69
Şekil 4.15 : pH değeri optimizasyonu grafiği.....	69
Şekil 4.16 : a) 0.05 mL 40 mM H ₂ O ₂ çözeltisi ve b) 0.05 mL 40 mM H ₂ O ₂ çözeltisine pH 7 asetat tampon içerisinde hazırlanmış 804 U mL ⁻¹ katalaz enziminden 0.150 mL katıldıktan sonra bu çözeltiler tampon çözelti ile 1.1 mL'ye tamamlanmış ve üzerine 3 mL CUPRAC reaktifi eklenmiştir.....	72
Şekil 4.17 : (a) 0,05 mL 20 mM H ₂ O ₂ çözeltisi (b) 0,05 mL 20 mM H ₂ O ₂ çözeltisi + 500 ppm 0,4 mL nanoceria çözeltisi (c) 500 pmm 0,4 mL nanoceria ve (d) 0,05 mL 20 mM H ₂ O ₂ çözeltisi + 0,4 mL nanoceria çözeltisi (500 ppm) + 0,150 mL 804 U mL ⁻¹ katalaz enzimi. Bu çözeltiler tampon çözelti ile 1,1 mL'ye tamamlanmış ve üstlerine 3 mL cuprac reaktifi eklenmiştir.....	73
Şekil 4.18 : (a) 0,05 mL 20 mM H ₂ O ₂ + 0,5 mL 1x10 ⁻⁴ M kafeik asit (b) 0,05 mL 20 mM H ₂ O ₂ (c) 0,5 mL 1x10 ⁻⁴ M kafeik asit (d) 0,5 mL 1x10 ⁻⁴ M kafeik asit + 0,4 mL 500 ppm nanoceria (e) 0,5 mL 1x10 ⁻⁴ M kafeik asit +0,5 mL 804 U mL ⁻¹ katalaz (f) 0,05 mL 20 mM H ₂ O ₂ + 0,5 mL 804 U mL ⁻¹ katalaz + 0,5 mL 1x10 ⁻⁴ M kafeik asit. Bütün çözeltiler tampon ile 1,1 mL'ye tamamlandıktan sonra 3 mL CUPRAC reaktifi eklenmiştir.	74
Şekil 4.19 : • 0,2 mL 1x10 ⁻³ M Kuarsetin-3 mL CUPRAC reaktifi (toplam hacim 4,1 mL); • 0,2 mL 1x10 ⁻³ M Kuarsetin+0,5 mL NC+0,1 mL H ₂ O ₂ +0,3 mL Katalaz+3 mL CUPRAC reaktifi (toplam hacim 4,1 mL).	74
Şekil 4.20 : (1) 0,05 mL 20 mM H ₂ O ₂ (2) 0,5 mL 5x10 ⁻⁴ M kafeik asit+0,05 mL 20 mM H ₂ O ₂ (3) 0,5 mL 5x10 ⁻⁴ M kafeik asit + 0,4 mL 500 ppm nanoceria + 0,05 mL 20 mM H ₂ O ₂ + 0,150 mL 804 U mL ⁻¹ katalaz (4) 0,05 mL 20 mM H ₂ O ₂ +0,150 mL 804 U mL ⁻¹ katalaz (5) 0,5 mL 5x10 ⁻⁴ M kafeik asit (6) Referans. Çözeltiler tampon ile 1,1 mL'ye tamamlandıktan sonra 3 mL CUPRAC reaktifi eklenmiştir.	75
Şekil 4.21 : (a) 0,5 mL 5x10 ⁻⁴ M kafeik asit (b) 0,5 mL 5x10 ⁻⁴ M kafeik asit + 0,4 mL 500 ppm nanoceria + 0,05 mL 20 mM H ₂ O ₂ + 0,150 mL 804 U mL ⁻¹ katalaz. Çözeltiler tampon ile 1,1 mL'ye tamamlandıktan sonra 3 mL CUPRAC reaktifi eklenmiştir.	76
Şekil 4.22 : (a) 0,5 mL yeşil çay çözeltisi (b) 0,5 mL yeşil çay çözeltisi + 0,4 mL 500 ppm nanoceria + 0,05 mL 20 mM H ₂ O ₂ + 0,150 mL 804 U mL ⁻¹ katalaz. Çözeltiler tampon ile 1,1 mL'ye tamamlandıktan sonra 3 mL CUPRAC reaktifi eklenmiştir.	76

NANOCERIA KATALİZÖRÜ İLE ÜRETİLEN REAKTİF TÜRLERİN SÜPÜRÜLME ETKİNLİĞİNİN ÖLÇÜMÜ İÇİN YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

ÖZET

Oksijen molekülündeki eşleşmemiş elektronlar aynı spin ve farklı orbitallerdeyken minimum enerjiye sahiptir. Ancak oksijene elektron veren yapılardaki zıt spinli bir elektron çifti, moleküler oksijenin reaksiyona girme eğilimini sınırlar. Gerekli elektron ve enerji takviye edilirse spin sınırlaması kalkar ve ardışık indirgenme sonucu eşleşmemiş elektronlar yüksek enerjili “reaktif oksijen türleri” (ROS) adı verilen ve “oksidatif strese” sebep olan formlara dönüşürler. ROS hücrede oksijenli solunum sırasında veya in vitro çalışmalarda metal iyonlarının katalizör etkisi ile oluşmaktadır. Serbest radikaller de bu türlerin bir sınıfıdır. Günümüzde kanser gibi hastalıkları anlamak açısından serbest radikal mekanizmasının incelenmesi önemlidir. Bu radikaller en basit şekilde demir(II) iyonlarının demir(III) iyonlarına yükseltgendiği Haber Weiss mekanizması da denilen Fenton reaksiyonunda üretilirler.

Fenton kimyası, günümüzde organik kirleticilerden pestisitlere, endüstriyel ürünlerin yükseltgenmesi için yaygın olarak kullanılan, basit ve kolay ulaşılabilen reaktiflere sahip, ancak reaksiyon pH değerinin asidik olması sebebi ile biyolojik sistemlerde sınırlı uygulaması olan bir mekanizma dizisidir. Son yıllarda fenton benzeri mekanizmalar heterojen reaksiyon ortamlarında tercih edilerek fenton mekanizmasının dezavantajları giderilmeye çalışılmıştır. Bu tezin amacı fenton benzeri reaksiyon ortamında üretilen reaktif türlerin konsantrasyonlarındaki değişmeyi bir prob ve süpürücü madde varlığında spektrofotometrik olarak izlemektir. Bunu sağlamak amacıyla da tez dört bölümden oluşmaktadır.

Birinci bölümde reaktif türlerin üretiminde bir heterojen katalizör görevi görecektir olan nano boyutta seryum oksit (nanoceria) partikülleri, Türkiye’ye özgü bir bitki türü olan zahter infüzyonu içerisinde yeşil sentez prensipleri takip edilerek sentezlenmiştir. CeONP üretimi Seryum(III) aşamasından başlamaktadır. Literatürde Seryum(III)’ten yola çıkılarak üretilen nanopartiküllerin üretim şartlarına, tane boyutuna ve pH’a bağlı olarak Ce^{3+}/Ce^{4+} oranlarının değiştiği karma valens bir oksit oluşturduğu rapor edilmekte olup çoğunda “Cerium oxide nanoparticles-nanoceria-CeONP” genel ifadesi yer almaktadır. Bazı literatürlerde ise partiküllerin yapısının $xCeO_2.yCe_2O_3$ şeklinde verildiği görülmüştür. Çalışmamızda üretilen partiküllerin “mix valence-oxide” olduğu düşünülmektedir. CeONP üretimi için kullanılan çöktürme yönteminde; 4,5 μM $Ce(NO_3)_3$ çözeltisi ve 10,0 g/ 100 mL zahter infüzyonundan oluşan karışıma çöktürücü madde olarak 1 M sodyum karbonat çözeltisi 80°C’de damla damla, pH 9 değerine ulaşılan kadar eklenmiştir. 4-6 saat arası sabit sıcaklıkta karıştırılan süspansiyon aseton:su karışımı ile üç kez yıkanmıştır. CeONP sentezinde pH değerinin 9 olması nanopartikül çekirdeklenmesi

ve oluşumu için önemliyken, zahter infüzyonunda bulunan flavonoidler ve fenolik bileşikler bazik ortamda seryum'un indirgenmesini kolaylaştırıp ortamdaki diğer büyük moleküller ile birlikte kümelenmesini önlemektedir. Çöktürme yöntemi ile sentezlenen nanoceria hava ortamında kurutulmuş ve ince partiküller elde edilene kadar mekanik olarak agat havanda öğütülmüştür. Ayrıca zahter infüzyonunda üretilen nanopartiküllerin boyut ve renk olarak karşılaştırması literatürde yer alan nişasta ve amonyak yöntemleri uygulanarak yapılmıştır. Bu iki yöntemin bizim geliştirdiğimiz Zahterle sentez yönteminden en büyük farkı, çöktürme ajanı olarak saf amonyak çözeltisinin kullanılmasıdır. Nişasta yönteminde amonyak dışında ortama stabilizatör olarak nişasta çözeltisi eklenirken klasik sentez yönteminde herhangi bir stabilizatör eklenmesine ihtiyaç duyulmamaktadır. Taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile yapılan karakterizasyon çalışmalarında, Zahter infüzyonu ortamında sentezlenen CeONP'nin ortalama 30 nm partikül büyüklüğüne sahip olduğu bulunurken, bu değer klasik amonyak yönteminde 30-60 nm, nişasta yönteminde ise 51 nm'ye ulaşmıştır.

Tezin ikinci kısmında nanoboyutta seryum partiküllerinin üretilmesini sağlayan zahter infüzyonu toplam fenolik, flavonoid ve antioksidan içerikleri bakımından incelenmiştir. Toplam fenolik içeriğin belirlenmesi için literatürde yaygın olarak kullanılan klasik toplam fenol içeriği yöntemi (TPC) ve klasik yöntemdeki çözücü ortamının değiştirilmesi ile geliştirilen modifiye Folin-Cicoalteu antioksidan kapasitesi (FC) yöntemi kullanılmıştır. Toplam antioksidan içeriği seryum(IV) temelli antioksidan kapasitesi yöntemi (CERAC) ile, toplam flavonoid içeriği ise alüminyum klorür testi ile belirlenmiştir. Tüm değerler Alüminyum klorür testi hariç gallik asit eşdeğeri olarak hesaplanırken, alüminyum klorür testi kateşin eşdeğeri olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre Zahter infüzyonunun fenolik içeriği TPC yöntemi ile 0,107 M, modifiye FC ile 0,0814 M, CERAC yöntemi ile toplam antioksidan kapasitesi 0,1057 M ve flavonoid içeriği 0,0178 M olarak hesaplanmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinde antioksidan tayini yöntemlerinde gerçekleşebilen sinerjistik ve antagonistik etkiler göz önüne alınarak sonuçların aynı bitki için birbirinden farklı olabileceği düşünülmüştür. TPC yönteminde elde edilen sonucun CERAC yönteminden biraz yüksek olması fenolik yöntemlerde yaygın olarak görülebilen girişimlere ve reaktifin yan reaksiyonuna bağlı bulunmuştur. TPC yöntemi dışındaki diğer üç yöntemin birbirleri ile anlamlı sonuç verdiği gözlenmiştir.

Tezin üçüncü kısmında, sentezlenen nanoceria partikülleri kullanılarak reaktif türlerin üretimi DMPD ortamında incelenmiştir. Geliştirilen kolorimetrik yöntem fenton benzeri ortamda nanoceria ve hidrojen peroksit aktivitesi ile üretilen reaktif türlerin, 515 nm'de kırmızı-mor renkli DMPD katyonunun absorbansına bağlı olarak indirekt şekilde ölçülmesini sağlamaktadır. Ortama eklenen süpürücü maddenin, ortamda bulunan DMPD çözeltisi ile reaktif türler için yarışmalı bir reaksiyon verdiği ve sonuçta DMPD katyonunun absorbansında bir azalmaya yol açtığı bulunmuştur. Süpürücü maddenin antioksidan gücü de 515 nm'deki ilk ve son ölçülen absorbans değerleri arasındaki farka bağlı olarak yüzde cinsinden ifade edilmiştir. Reaktif türlerin üretimi için optimizasyon çalışması yapılmış ve hidrojen peroksit ve DMPD konsantrasyonlarının, sıcaklık, zaman ve pH'ın reaksiyona etkisi incelenmiştir. Sonuçta en uygun reaksiyon ortamının 2,14 mM hidrojen peroksit, $1,14 \times 10^{-4}$ M DMPD, 228 ppm nanoceria konsantrasyonu kullanılarak pH 7'de, oda sıcaklığında 30 dakikalık bekleme süresi ile gerçekleştiği bulunmuştur. Heterojen fenton-benzeri reaksiyon ortamının dezavantajlarından biri ortamda kalan

nanopartiküllerin UV spektrofotometre ile ölçümlerde girişim yapmasıdır. Bu sebepten çözeltilerin reaksiyondan sonra santrifüj veya süzme yapılması ihtiyacı doğmaktadır. Bu dezavantajın giderilmesi için yöntemin uygulama kolaylığı açısından her çalışma öncesi reaktif türlerin “taze” stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok çözelti için 0,2 g nanoceria ile 1 M hidrojen peroksit çözeltisinin karıştırılıp ortama hidrojen peroksitin fazlasının giderilmesi amacıyla 804 U/mL katalaz çözeltisi eklenmiştir. Taze olarak hazırlanan stok radikal çözeltisinin 0,9 mL’si her bir deneme için kullanılmıştır. Geliştirilen DMPD metodu ile hem standart antioksidan çözeltilerinin hem de bitki infüzyonlarının yüzde süpürülme aktiviteleri belirlenmiştir. Bu değer antioksidan maddeler için azalan sırayla kuersetin, gallik asit, kafeik asit, rutin, ferulik asit, kateşin ve trolox şeklinde bulunurken, bitki infüzyonları için; kuşburnu, hibiskus, kekik, yeşil çay, nane, adaçayı, ıhlamur ve ispanyol kekiği olarak bulunmuştur.

Tezin dördüncü bölümünde geliştirilen DMPD metodunun karşılaştırılması amacıyla daha önce üretilen çözeltiye CUPRAC metodu uygulanmıştır. Bu metod 450 nm’de neokuprain reaktifinin absorbans değerinin süpürücü madde ortamında azalmasına dayanmaktadır. Bu amaçla daha önce bahsi geçen stok çözeltisi ortamından alınan 0,9 mL radikal çözeltisi 5×10^{-4} M antioksidan çözeltisi ile karıştırılmış ve ardından bu karışıma CUPRAC metodu uygulanmıştır. 450 nm’de absorbans farkına dayanarak hem aynı sentetik antioksidan çözeltileri hem de bitki infüzyonları için yüzde süpürme aktiviteleri ölçülmüştür. Bu değer antioksidan maddeler için azalan sırayla Kuersetin, kafeik asit, rutin, gallik asit, ferulik asit, kateşin, trolox olarak bulunurken, bitki infüzyonları için; kekik, yeşil çay, nane, ispanyol kekiği, adaçayı, kuşburnu, hibiscus ve ıhlamur olarak bulunmuştur.

DMPD yönteminde kuşburnu çayının daha yüksek absorbans vermesi çayın kendi pembe rengi ile ilişkilendirilmiştir. Genel olarak sonuçlar birbiri ile orantı olsa da CUPRAC metodunda antioksidan maddenin fazlasının ortama eklenmesi zorunluluğu ile beraber yöntem zamana bağlıdır ve ancak 30 dakikalık inkübasyon süresi sonunda sağlıklı sonuçlar alınabilir. Geliştirilen DMPD yönteminde ise antioksidan çözeltisinin fazlası aranmaz ve yöntem zamandan bağımsız olarak oda sıcaklığında hızlı ve kolay sonuç vermektedir. Ayrıca karşılaştırma için elde edilen sonuçlar DMPD metodunda zaman açısından yöntemde esneklik sağlanabildiğini göstermektedir. Sistem ayrıca oda sıcaklığında ve pH 7 değerinde çalıştığı için biyolojik ROS incelemeleri için de uygun koşullar sağlamaktadır. Ancak DMPD katyonunun reaktif yapısı sebebi ile yöntem, her çalışmadan önce yeni çözelti hazırlanmasını gerektirmektedir.

Sonuç olarak Nanoceria partiküllerinin katalizör olarak kullanılması ile ortam pH’ından bağımsız olarak, heterojen bir sistem ile hidrojen peroksitten reaktif türlerin üretilmesi sağlanmıştır. Üretilen reaktif türler antioksidan maddelerin süpürme yüzdelерinin tayini için DMPD probu ile reaksiyona sokularak zamandan bağımsız bir yöntem geliştirilmiş ve bu yöntem hem standart antioksidan çözeltilerine hem de çay infüzyonlarına uygulanmıştır. Böylece antioksidan kapasitesinin hızlı, kolay ve ucuz bir şekilde tayini için yöntem geliştirilerek tez çalışması tamamlanmıştır.



DEVELOPMENT OF A NOVEL METHOD TO MEASURE THE SCAVENGING ACTIVITY OF REACTIVE SPECIES PRODUCED USING NANOCERIA AS A CATALYST

SUMMARY

The reactivity of molecular oxygen is limited when another structure that donates electrons to oxygen has a reverse spin electron pair. Spin limitation is removed if the necessary electron and energy are supplied from the reacting substance to the oxygen. Thus uncoupled electrons in oxygen turn into highly energetic forms generally called as reactive oxygen species (ROS) due to consecutive reductions. ROS are one of the main reasons of the oxidative stress in biological systems. ROS are produced with the catalytic affect of metal ions during cellular respiration in cells or in vitro studies. Free radicals are a class of ROS and it is important to investigate the free radical mechanism to understand certain diseases such as cancer. These radicals are generally produced with the redox reaction of iron(II) to iron(III) that is usually called as fenton or Haber-Weiss mechanism.

Fenton chemistry explains a series of chain reactions that is used for the oxidation of organic pollutants, pesticides and industrial products. The method is commonly used for its easy and stable reagents but it has limited applications in biological systems due to the acidic working pH range. Recently, fenton like heterogenous mechanisms are used to eliminate the disadvantages of the original reaction. Although magnetite and magnetite based composite structures are the most popular materials in the heterogeneous synthesis, these mechanisms have their drawback such as the need of filtration or centrifuge. Different nanomaterials and composites are used to mimic the fenton behaviour of iron oxide particles. Nanoceria is one of those materials that can act like a fenton reagent since it's the only lanthanide that has two oxidation states. More over unlike iron, cerium's redox reaction between its cerium(III) and cerium(IV) forms can work in various pH ranges. The production of these particles starts with the Ce(III) stage. In literature it has been reported that the produced nanoparticles are actually a form of mix valence oxide where Ce(III) and Ce(IV) ratio is changing depending on the conditions of synthesis, particle size and pH. Therefore the terms "cerium oxide nanoparticles-nanoceria-CeONP" are used frequently to explain them. It has been further explained in some sources that the structure can even have $x\text{CeO}_2.y\text{Ce}_2\text{O}_3$ formula to represent its oxygen buffer behaviour. The easy redox reaction between its oxidation states allows cerium to act like an ideal fenton reagent.

The aim of this work is the colorimetric detection of reactive species that are produced in a fenton-like system using nanoceria as the catalyst. For that purpose the thesis consists of four main sections. In the first section, nano sized CeO_2 (nanoceria) particles are produced in the infusion of Zahter, a type of thyme that is specific to south east of Turkey and Middle East. Co-precipitation method is applied to a

mixture of 10.0 g/ 100 mL of zahter infusion and 4.5 μM of $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$. 1 M sodium carbonate solution is added dropwise to the suspension at 80°C and at pH 9. The mixture is then mixed for 4-6 hours at constant temperature and washed using acetone/water solution three times. The pH value of 9 at this point is important for the nucleation and formation of nanoparticles in Zahter infusion. It has been found that the flavonoids and phenolic compounds, together with other large molecules in these herbal solutions, helps the reduction of metals and prevent the aggregation of particles. Synthesized particles were then dried in air and mechanically grinded using agate mortar. For size comparison purposes starch and ammonia synthesis were also performed. The main difference between the Zahter mediated reaction and starch is the use of ammonia in the latter to obtain a basic medium. In the classical synthesis the use of ammonia mediates the production of nanoparticles without the further addition of a stabilizing agent. Characterization of the particles was made using scanning electron microscope (SEM) and results showed that nanoparticles produced in zahter infusion has an average of 30 nm particle size whereas in ammonia synthesis the average value is between 30-60 nm and in starch the value is 51 nm.

The phenolic, flavonoid and antioxidant content of Zahter infusion are investigated respectively using the following methods; classical total phenolic content (TPC), modified Folin-Cicalteu method, Cerium(IV) based antioxidant capacity method (CERAC) and aluminium assay. Other than the aluminium assay all calculations were made as the gallic acid equivalent. Aluminium assay is expressed as the catechin equivalent. Results showed that zahter's phenolic content is 0.107 M and 0.0814 M respectively in TPC and modified Folin-Cicalteu methods. Total antioxidant capacity is 0.1057M and the flavonoid content is 0.0178 M. It is known that different results can be obtained for the same tea in phenolic methods due to the synergistic and antagonistic affects. The reason for the higher molar concentration in TPC than CERAC is perhaps because of the interference and side reactions of phenolic methods with antioxidants. Other than TPC the results obtained with other methods are meaningful and correlated to each other.

In the third section of the work, synthesized nanoparticles were used to produce reactive species in the presence of DMPD as the prob substance. A heterogeneous nanoceria and hydrogen peroxide, fenton-like medium is used to produce reactive species and these species are expected to react with DMPD to produce the colored DMPD cation. A colorimetric method is then devised according to the difference of the absorbance value of red-violet DMPD cation at 515 nm. Percent scavenging activity of synthetic antioxidants and herbal infusions is investigated using a competing reaction between these substances and the DMPD probe. In the presence of a scavenging substance, reactive species are quenched therefore a decrease in the concentration of the DMPD^+ cation is observed. The optimization of the method was made according to the suspension, hydrogen peroxide and DMPD concentration, temperature, time and pH value. The optimum reaction mixture was found to have 2.14 mM hydrogen peroxide, 1.14×10^{-4} M DMPD, 228 ppm nanoceria at pH 7 and room temperature. But the reaction time can be flexible since the system is reaching a similar (almost constant) absorbance value at any time interval after 15 minutes.

A disadvantage of the heterogeneous Fenton like reactions is the interference of the particles in the UV spectrophotometer. To avoid such limitations centrifuge or filtration of the system is advised once the reaction is completed. A stock reactive species solution is prepared to eliminate this disadvantage. A reactive species stock

solution is prepared by mixing 0.2 g of nanoceria, 1 M hydrogen peroxide and 804 U/mL catalase at room temperature. 0.9 mL of this fresh daily-prepared stock solution is used for every trial. As a result % scavenging activity of standard antioxidant solutions and tea infusions was calculated according to the changes and difference in 515 nm. The decreasing order in the percent scavenging activity of antioxidant solutions in DMPD method was; quercetin, gallic acid, caffeic acid, rutin, ferrulic acid, catechin and trolox. The decreasing order for the tea infusions was rosehip, hibiscus, thyme, green tea, mint, sage tea, linden and Spanish thyme.

Cupric ion reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay was applied to the same solution in order to compare the accuracy of DMDP method and the production of reactive species using nanoceria. CUPRAC method depends on the decrease in absorbance of neocupraine reagent at 450 nm in the presence of scavenging substances. For that purpose a 0.9 mL of a radical sample is mixed with 5×10^{-4} M antioxidant solution. % scavenging activity is calculated according to the absorbance decrease of this reaction medium. The decreasing order in the percent scavenging activity of antioxidant solutions in CUPRAC method was; quercetin, caffeic acid, rutin, gallic acid, ferrulic acid, catechin and trolox. Same order for the tea infusions was thyme, green tea, mint, Spanish thyme, sage tea, rosehip tea and linden.

The highest value obtained in the DMPD method for the rosehip tea is related to its original pink color. It has been found that generally the results obtained are consistent in both methods. Moreover the need to add an excess amount of antioxidant substance in the CUPRAC assay and the time dependence of the assay should be emphasized. The results obtained in CUPRAC assay are reliable only after 30 minutes of incubation time. The devised DMPD method on the other hand does not require any excess of scavenging substances or an incubation period. Results show that there is no difference in the absorbance change between 0-30 minutes. DMPD method also works at room temperature and at pH 7 value, which makes the application in biological systems reliable. The only drawback of the method is the reactivity of the DMPD reagent and the need to prepare daily, fresh solutions before each trial.

As a result, % scavenging activity of synthetic and herbal samples are investigated in an easy and fast nanoceria/hydrogen peroxide fenton-like system that is independent from pH. Produced reactive species were reacted with DMPD probe to develop a method that is independent from reaction time and this method is applied to standard antioxidant solutions and tea infusions. Thus, the research is completed with the development of a fast, easy and cheap method for the determination of antioxidant capacity.



1. GİRİŞ

Oksijen elektron taşıyıcı görevi ile ATP mekanizmasında önemli bir role sahiptir. Transfer edilen elektronlar eşlenmediklerinde yüksek enerjili reaktif oksijen türleri adı verilen ve oksidatif strese sebep olan formlara dönüşürler. Hidroksil, süperoksit ve peroksil radikalleri hücrelerin oksidatif zararından sorumlu olan reaktif oksijen türleri olarak sınıflandırılmaktadır. Dolayısı ile serbest radikal mekanizmasını incelemek kanser gibi çeşitli hastalıkları anlamak açısından da önem taşır [1,2]. Son yıllarda antioksidan maddelerin serbest radikalleri biyolojik sistemlerde süpürdüğü ve zararsız hale getirdiğine dair yapılan pek çok çalışma bulunmaktadır. Dolayısı ile yiyecek ve içeceklerdeki antioksidan kapasitesinin belirlenmesi insan sağlığı açısından da önemlidir [3,4].

Hidroksil radikalleri en yüksek indirgenme potansiyeline sahip olan reaktif oksijen türüdür. Flor elementinden sonra tüm türler içinde ikinci en yüksek potansiyele sahiptir ve ozondan 10^{12} kez daha hızlı reaksiyon verir [5-7]. Eşitlik 1.1’de gösterilen ve klasik Fenton reaksiyonu olarak adlandırılan süreçte hidrojen peroksit ve demir(II) iyonu arasındaki reaksiyon ile hidroksil radikalleri üretilmektedir [8].

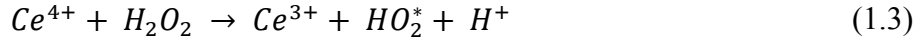
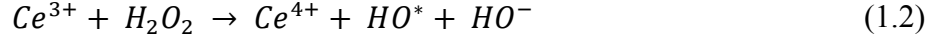


Bu mekanizma en basit şekli ile hidrojen peroksit varlığında demir(II)’nin demir(III) iyonuna yükseltgenmesine bağlıdır ve yaygın olarak ileri oksidasyon süreçlerini (AOP) inceleyen çalışmalarda hidroksil radikali üretiminde kullanılsa da, literatürde fenton süreçlerini açıklamak için önerilen pek çok farklı mekanizma bulunmaktadır. Önerilen mekanizmalarda zincirleme fenton reaksiyonları sonucu hidroksil, süperoksit, ferril (FeO^{2+}) ve reaktif demir oksit türevlerinin üretildiği gözlenmiştir [9]. Dolayısı ile bu zincirleme reaksiyonlara en genel ismi ile Haber Weiss mekanizması adı verilmektedir. Reaksiyon oda sıcaklığında ve atmosferik basınçta gerçekleştiği, kullanılan çözeltilerin elde edilmesi, saklanması ve korunması bakımından kolay olduğu için avantajlıdır. Yöntemin dezavantajı çalışma pH değerinin asidik olması (yaklaşık pH 3.0) ve yüksek pH değerlerinde demir(III)

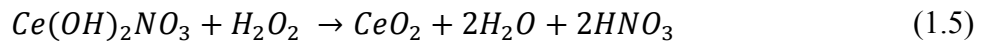
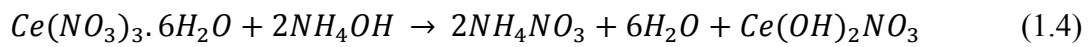
hidroksit çökeltisinin oluşmasıdır. Ayrıca pH değerindeki bu durum reaksiyonun biyolojik sistemlerde çalışmasını ve taklit edilebilmesini de engellemektedir [9-13].

Son zamanlarda, nano boyutta demir kompozitleri, özellikle nano boyutta katı magnetit kullanımı çözelti ortamında gerçekleşen fenton reaksiyonunun dezavantajlarını bertaraf etmek için demir(II) iyonlarının yerini almaya başlamıştır. Nanopartikül süspansiyonlarının kullanımının avantajları olsa da, partiküllerin çökmesi ve filtrasyon ihtiyacı heterojen yöntemlerin zaaflarını oluşturmaktadır [14-17].

Seryum +3 ve +4 olarak iki yükseltgenme basamağına sahip tek lantanit'tir. Yüksek absorpsiyon kapasitesine ve iyi optik özellikler sergiler. Seryum oksit ve nanoceria partikülleri seryum(III) ve seryum(IV) arasındaki kolay gerçekleşen redoks reaksiyonu sebebi ile radikal süpürme yöntemleri içinde kullanılmaktadır. İki yükseltgenme basamağı arasındaki bu hızlı değişim seryum'un yüksek oksijen taşıma kapasitesi ve daha iyi katalitik performans göstermesini sağlamaktadır [18]. Her ne kadar makro boyutta ve çözelti fazındaki seryum ROS üretiminde geçmişte çokça kullanılsa da, nano boyutta seryum geniş yüzey alanı ve aktif bölgeleri sayesinde daha iyi bir katalizör görevi göstermektedir [19-21]. Bu aktif bölgeler gelişigüzel oranlarda oksijen boşluklarına sahiptir. Bu sebepten de nanoceria formülü CeO_{2-x} şeklinde gösterilebileceği gibi, CeONP üretimi Seryum(III) aşamasından başladığından literatürde Seryum(III)'ten yola çıkılarak üretilen nanopartiküllerin üretim şartlarına, tane boyutuna ve pH'a bağlı olarak Ce^{3+}/Ce^{4+} oranlarının değiştiği karma valens bir oksit oluşturduğu rapor edilmektedir. Ve çoğunda genel olarak "Cerium oxide nanoparticles-nanoceria-CeONP" ile ifadesi yer alır [22]. Bazı literatürlerde ise partiküllerin yapısının $xCeO_2.yCe_2O_3$ şeklinde verildiği görülmüştür [23]. Çalışmamızda üretilen partiküllerin "mix valence-oxide" olduğu düşünülmektedir. Katı seryum, redoks reaksiyonlarını bu aktif bölgelerde oksijen adsorbe ederek ve difüzleyerek katalize etmektedir [24,25]. Yüksek enerji-çözünürlüklü X-Ray spektroskopisi sonuçları bu hipotezi desteklemekte ve nanoceria yüzeyinde hem seryum(III) hem de seryum(IV) bölgeleri olduğunu kanıtlamaktadır [26,27]. Literatürde yer alan çalışmalar nanoceria'nın katalitik uygulamalar için oldukça popüler olduğunu göstermektedir [28, 29]. Heckert ve arkadaşları tarafından önerilen ve eşitlik 1.2 ve 1.3 ile ifade edilen mekanizmada seryum(III) bölgelerinden reaktif türlerin oluşumu görülmektedir [28, 30].



Chen ve arkadaşlarının CeONP ve H₂O₂ sistemi üzerine yaptığı araştırmalar yüzey modifikasyonu yapılmadan Ce³⁺ ve H₂O₂ arasındaki reaksiyonun nötral pH değerinde dahi kararlı kalan kahverengi peroksit benzeri türler oluşturduğunu göstermiştir [28, 31-32]. Ayrıca CeONP doğrudan hidroksil radikali üretiminde başarısız olsa da asidik görev gören sülfat gruplarının yüzeye bağlanması ile Ce³⁺ iyonlarının elektron transferine ve sonrasında peroksitlerin homolitik yıkımına yol açtığı anlaşılmıştır [28, 33]. Yani basit bir yüzey modifikasyonu ile CeONP/H₂O₂ karışımından rahatlıkla reaktif türler üretilmektedir. Böylece nanoceria oksijen ve hidrojen transferini dinamik yapısı ve yüzey grupları sayesinde aynı anda gerçekleştiren, redoks süreci için uygun bir materyaldir [33]. Demir bileşiklerinin aksine seryum'un geniş bir pH çalışma aralığı da bulunmaktadır. Seryum(III) iyonlarının nanopartikül yüzeyinde gelişigüzel bulunduğu ve nanopartikül atomları üzerinde delokalize olmuş elektronların kazanıldığı veya kaybedildiği önerilmektedir [19]. Nanoceria üretimi için ortamda kullanılan yükseltgeyici ajanlara bağlı olarak yeşil olan ve olmayan pek çok yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemlerden en yaygını çöktürme, hidrotermal, solvotermal ve mikroemülsiyon yöntemleridir [34-42]. İsimleri farklı olsa da bu yöntemlerin hepsi Ce(III) ve Ce(IV)'ün bazik bir ortamda daha az çözünen tuzunu oluşturacak şekilde yükseltgenmesine bağlı çalışır. Seryum(IV) oksit LaMer/Dinegar mekanizmasına göre bu yöntemlerde üç aşamada oluşmaktadır. Birinci aşamada çözelti seryum iyonları bakımından aşırı doymuş hale gelir, ikinci ve üçüncü aşamalarda ise kısa bir çekirdekleşme sürecini aşırı doymuş partiküllerin indirgenmiş olanlara çöküşü takip eder [22, 43]. Partikül büyüklüğü konsantrasyon ve stabilizatörün bağlayıcı gücüne bağlıdır. En yaygın stabilizatörler amonyak, organik alkoller ve polimerlerdir. Eşitlik 1.4 ve 1.5'de amonyak ortamında nanoceria oluşum mekanizması önerilmektedir [43].



Yeşil olmayan yöntemler pahalı enstrümanlara gerek duyduğu gibi çevreye zararlı toksik ürünler de oluşturmaktadır. Böylece nanopartikül boyutu ve şeklini kontrol eden güvenli ve çevre dostu alternatif yöntemlere ihtiyaç vardır [44]. Son yıllarda bitki özütleri bazik indirgeyici ajanlara karşın nanopartikül üretiminde hızlı, kolay ve ucuz oldukları için tercih edilmektedirler. Ayrıca bitkiler yapılarındaki alkaloidler, terpenoidler, fenoller, flavonoidler, taninler, antosiyaninler, izoflavonoidler, flavanollar gibi nanopartikül sentezinde kullanılabilen geniş bir molekül yelpazesine sahiptir. Reaksiyondaki proteinlerin, organik ligandların ve polisakkaritlerin nanopartiküllerin kararlılığına da etki ettiği ayrıca bulunmuştur [44-47]. Bu yeşil yöntemlerde genelde nanopartikül sentezi için çöktürme yöntemi kullanılmakta ve partikül büyüklüğü ortam sıcaklığının ve pH değerinin kontrolü ile ayarlanmaktadır.

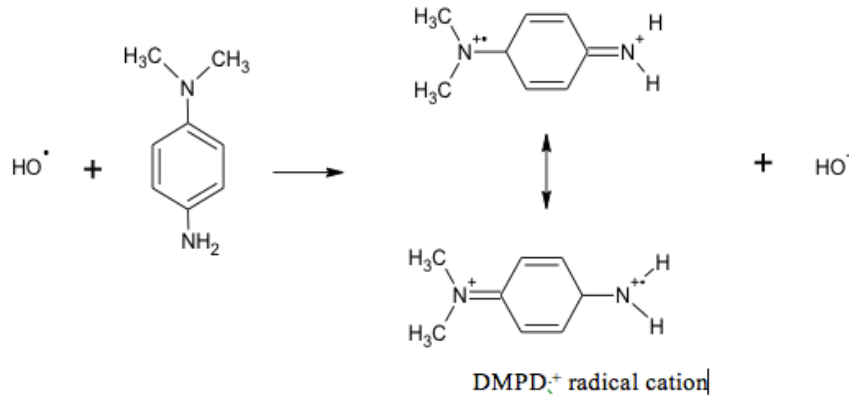
1.1 Tezin Amacı

Bu Tezin amacı, nanoceria yüzeyindeki seryum(III) ve seryum(IV) bölgeleri üzerinde, hidrojen peroksitin katalizi ile reaktif türler üretmek ve kolorimetrik bir yöntem ile antioksidan maddelerin bu türleri süpürme etkinliklerini izlemektir. Bu amaçla tez çalışması dört ana kısımdan oluşmaktadır. Birinci ve ikinci kısmında sırasıyla nanoceria partikülleri zahter infüzyonu ortamında sodyum karbonat ile çöktürülerek üretilmiş, zahterin nanopartikül sentezinde görev alan flavonoid ve fenolik içerikleri araştırılmış ve oluşan partiküllerin karakterizasyonu taramalı elektron mikroskopu ile incelenmiştir. Güney ve güney doğu Türkiye ve orta doğu'ya özgü bir bitki türü olan *thymbria spicata* L. (Zahter) antioksidan ve fenolik içeriği bakımından zengin bir bitki türüdür. Daha önce de bahsedildiği gibi bitki yapısındaki antioksidan maddeler nanopartikül sentezinde gerek redoks reaksiyonlarına yardımcı gerekse ortamda stabilizatör olarak görev almaktadırlar. Zahterin de literatürde yapılan birkaç çalışmada antioksidan özelliğinin yüksek olduğu belirtilmiştir [48,49]. Bu çalışmada da Zahter bitkisinin toplam fenolik içeriği klasik ve modifiye Folin- Cicalteu yöntemleri uygulanarak bulunmuştur [50,51]. Modifiye CERAC yöntemi toplam antioksidan kapasitesinin ve Alüminyum yöntemi de toplam flavonoid miktarının belirlenmesi için kullanılmıştır [52-53]. Yapılan analizler de zahter ekstraktının fenolik ve antioksidan içerikleri gallik asit eşdeğeri, flavonoid içeriği ise kateşin eşdeğeri cinsinden ifade edilmiştir.

Bazık ortamda çöktürme sentez yöntemi sodyum karbonat kullanılarak seryum(III) iyonlarının seryum(IV) iyonlarına yükseltgenmesi ile yapılmıştır. Reaksiyon ortamının pH değeri 9.0'a ve sıcaklığı 80°C'ye ayarlanmıştır. Sentezlenen partiküller aseton:su karışımı kullanılarak yıkanmış ve 200 °C'de hava ortamında kurutulmuştur. Sentezlenen partiküllerin renginin zahter'in baskın rengi olan kahv rengini aldığı gözlemlenmiştir. Zahter ile sentezlenen partiküllerin karakterizasyonu ise taramalı elektron mikroskopu ile yapılmış ve tez çalışmasının birinci kısmı tamamlanmıştır.

Tezin üçüncü kısmında nanoceria'nın katalitik aktivitesi, fenton benzeri bir reaksiyonla kolorimetrik bir yöntem geliştirilerek incelenmiştir. Bu amaçla öncelikle nanoceria ve hidrojen peroksit ortamında oluşan reaktif türler ile reaksiyona girecek olan prob maddenin seçimine dikkat edilmiştir. Oluşan maddenin reaktif türler ile reaksiyona girdikten sonra kromofor bir yapı oluşturması ve UV spektroskopi ile tayinin mümkün olması istenmiştir. Bu amaçla literatürde kolorimetrik çalışmalar için halihazırda kullanılan salisilat tuzları, benzoik asit, rodamin B, metilen mavisi ve sodium 2-hidroksitereftalat gibi çeşitli prob maddeler bulunmaktadır [54-58]. Dimetil-p-fenilendiamin (DMPD) antioksidan kapasitesi tayin çalışmalarında bilinen bir prob ve dekolorizasyon ajanıdır. Bu bileşiğin radikal katyonu reaktif oksijen türleri varlığında 515 nm'de şiddetli bir kırmızı-mor renk almaktadır [57].

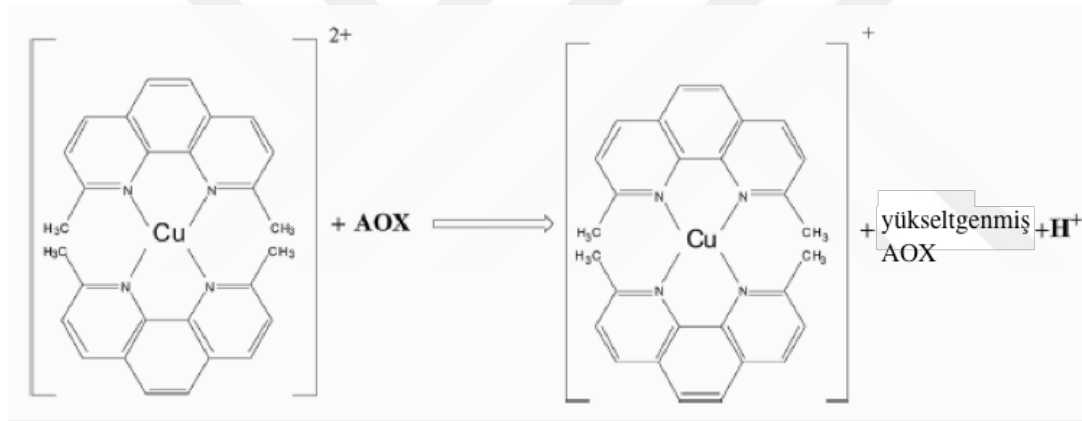
Tez çalışmasında da nanoceria katalizörü ortamında hidrojen peroksitten sentezlenen reaktif türler ve serbest radikallerin DMPD ajanı varlığında renkli bir katyon oluşturması beklenmiştir. Bu türlerden biri olan hidroksil radikallerinin renkli katyonu oluşturduğu reaksiyon temsili olarak şekil 1.1'deki mekanizmaya göre anlatılmıştır [59-60].



Şekil 1.1 : DMPD ve hidroksil radikalleri arasındaki temsili reaksiyon [59].

Dolayısı ile yöntemin kolorimetrik tayini de 515 nm’de kırmızı-mor DMPD^+ kationunun ölçümüne bağlıdır. DMPD prob maddesi kullanılarak nanoceria partiküllerinin katalitik aktivitesinin izlenmesi amacı ile ortamın optimizasyonu da ayrıca her bir kullanılan reaktifin konsantrasyonu, reaksiyon pH değeri, sıcaklık ve zaman parametreleri incelenerek gerçekleştirilmiştir. Yöntemin optimizasyonu sonrası ise aynı reaksiyon karışımına süpürücü sentetik maddeler ve doğal çay infüzyonları eklenerek, her bir süpürücü maddenin yüzde süpürme aktivitesi hesaplanmıştır.

Tez çalışmasının dördüncü kısmında yöntemin güvenilirliği açısından elde edilen sonuçların karşılaştırılabilmesi amacıyla nanoceria’nın katalitik görevi CUPRAC yöntemi uygulanarak incelenmiştir. CUPRAC yöntemi şekil 1.2’de belirtilen şekilde bakır(II) neokupraininin redoks reaksiyonuna bağlı olarak bir çözeltinin antioksidan kapasitesini ölçmek amacı ile kullanılmaktadır [3].



Şekil 1.2 : CUPRAC reaksiyonu [3].

Sonuçta sarı-turuncu renkteki Cu(I)-NC şelatı oluşmakta ve kolorimetrik tayini 450 nm’de yapılabilir. CUPRAC yönteminde ortamdaki serbest radikaller ve prob madde varlığında iki yarışan reaksiyon oluşmaktadır. Bu reaksiyonlar sebebi ile 450 nm’deki CUPRAC absorpsiyonu azalmakta ve daha az Cu(I)-NC şelatı oluşmaktadır. CUPRAC yönteminde, DMPD yönteminde farklı olarak ortama süpürücü maddenin fazlası eklenmekte ve reaksiyon süresi minimum 30 dakika olarak tutulmaktadır. DMPD yönteminde olduğu gibi hem sentetik maddelerin hem doğal çay infüzyonlarının yüzde süpürücü aktiviteleri hesaplanmıştır. Dört kısımda incelenen tez çalışması elde edilen yüzde süpürücü aktivite değerlerinin her iki metod kullanılarak karşılaştırılması ile sonuçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİ

2.1 Oksidatif Stress Ve Reaktif Oksijen Türleri

Oksijen elektron taşıyıcı görevi ile ATP mekanizmasında önemli bir role sahiptir. Oksijen molekülündeki eşleşmemiş elektronlar aynı spin ve farklı orbitallerdeyken minimum enerjiye sahiptir ve oksijen yapısına benzer moleküller ile reaksiyona girmesi mümkündür. Ancak oksijene elektron veren yapılardaki zıt spinli bir çift elektronun varlığı moleküler oksijenin reaksiyona girme eğilimini sınırlar. Bu duruma da spin sınırlaması adı verilir. Gerekli elektron ve enerji takviye edilirse spin sınırlaması kalkar ve ardışık indirgenme sonucu eşleşmemiş elektronlara sahip yüksek enerjili “reaktif oksijen türleri” (ROS) adı verilen ve “oksidatif strese” sebep olan formlara dönüşürler [61, 62]. ROS organizmada, miktokondri içerisinde oksijenli solunum esnasında NADPH gibi katalizörlerin kullanımı ile üretilebileceği gibi, metaller tarafından katalizlenen (fenton reaksiyonu benzeri) serbest radikal reaksiyonlarında da oluşabilmektedir [63, 64]. Oksidatif stress Zukowski ve arkadaşları tarafından “kronik olarak artan konsantrasyonlarda, reaktif oksijen türlerinin hücre metabolizmasını bozması ve hücrenin zarar uğraması” şeklinde tanımlanmıştır [63, 65]. Reaktif oksijen türlerinin bir çeşidini oluşturan serbest radikaller;

- homoliz ile kovalent bağların yıkımı,
- bir atomun veya molekülün tek elektron yükseltgenmesi/ indirgenmesi,
- radyasyon ve ultrasonik reaksiyonlar vasıtası ile oluşmaktadır.

Bu süreçte iki radikal iyonu eşleşmemiş elektronlarını paylaşır ise radikal olmayan bir moleküle dönüşüp sönümlenmektedir [63, 66].

Reaktif oksijen türleri, serbest radikaller olarak adlandırılan hidroksil radikali $\bullet\text{OH}$, superoksit anyonu O_2^- , hidroperoksil radikali ve singlet oksijen’den oluşmaktadır. Çizelge 2.1’de reaktif oksijen türlerinin sınıflandırılması detaylı olarak belirtilmiştir.

Çizelge 2.1 : Reaktif oksijen türlerinin sınıflandırılması.

Serbest radikaller	Radikal olmayan bileşikler
Atmosferik oksijen, $\bullet O_2^-$	Hidrojen peroksit, H_2O_2
Süperoksit anyonu, O_2^-	Organik peroksitler, ROOH
Hidroksil radikali, $\bullet OH$	Singlet oksijen $^1O_2$
Peroksil radikali ROO^-	

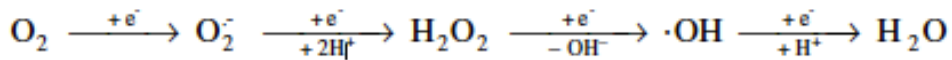
Bu türler, hücrede oksijenin ardışık indirgenmesi ile oluşurken, öncelikle süperoksit anyon radikali eşitlik 2.1’de gösterildiği şekilde ortamdaki oksidaz benzeri enzimlerin yardımı ile üretilir. Ardından eşitlik 2.2’de gösterildiği gibi süperoksit dismutaz ile hidrojen peroksit'e dönüştürülür [67, 68].



Radikal olmayan bir reaktif oksijen türü olan hidrojen peroksit ise metal iyonlarının varlığında hidroksil radikaline dönüşebildiği gibi tek başına hücre membranından geçme kapasitesine de sahiptir [63, 66]. Eşitlik 2.3’de görüleceği üzere hidrojen peroksit'e elektron katılması ile hidroksil radikali oluşur [69]. Çok reaktif olmalarından ötürü hidroksil radikalleri DNA zararına sebep olan birincil reaktif oksijen türüdür [70]. Hidroksil radikallerinin oluşmasını önlemek için hidrojen peroksitin ortamdaki uzaklaştırılması önemlidir ve bu görev hücrede katalaz ve peroksidaz enzimleri ile gerçekleştirilir [69].



Naqui ve arkadaşları tek elektron transferine dayanan bir zincir reaksiyon ile reaktif oksijen türleri oluşumunu şekil 2.1’de gösterildiği şekliyle tanımlamışlardır [71].



Şekil 2.1 : Oksijenden tek elektron transferli reaksiyon zinciri ile su oluşumu [71].

Pek çok çalışma reaktif oksijen türlerinin endojen ve eksojen kaynaklara bağlı olarak, tümör gelişiminde önemli bir rol oynadığını, daha ileri aşamalarda genetik

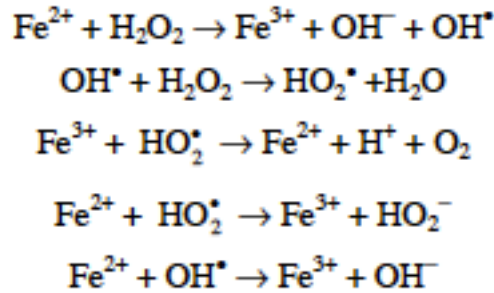
mutasyona yol açabildiğini ve kanserle doğrudan ilişkiye sahip olduğunu göstermiştir. [72]. Bu süreçte mitokondri, nötrofiller ve makrofajlar endojen kaynakları oluştururken, hava kirleticiler, nanopartiküller, ağır metaller, pestisidler ve UVB radyasyon eksojen kaynakları oluşturmaktadır. Dolayısı ile hücrelerin oksidatif zararından sorumlu olan serbest radikal mekanizmasını anlamak kanser gibi çeşitli hastalıkları anlamak açısından da önem taşımaktadır [2].

2.2 Fenton Reaksiyonu

H.J.H. Fenton, demir(II) iyonları varlığında organik substratların hidrojen peroksit ile yükseltgenebileceğini ilk gözleyen ve “fenton kimyasını” başlatan bilim insanıdır. Günümüzde bir fenton reaktifi yaygın olarak demir(II) ve hidrojen peroksit karışımını içermektedir. Bu karışım organik kirleticiler ile aromatik aminler, boya çeşitleri, pestisitler, sürfaktanlar ve patlayıcılar gibi endüstriyel kirleticilerin, yükseltgenmesi amacıyla kullanılmaktadır [74-85].

Genel olarak fenton reaksiyonu radikal üreten ve üretmeyen yollar olarak iki şekilde açıklanır. Radikal üreten yolunda başlıca, hidroksil radikallerinin üretildiği düşünülürken, radikal üretilmeyen yolda ferril iyonlarının (FeO^{2+}) oluşumundan bahsedilir [86]. Ancak yöntemin etkinliği ve verimi ortamdaki hidrojen peroksit konsantrasyonu, $\text{Fe}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ oranı, pH ve sıcaklığa bağlıdır [74].

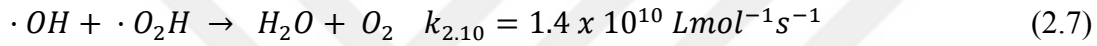
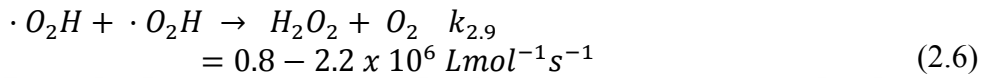
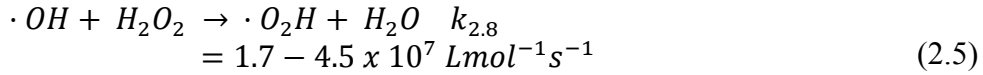
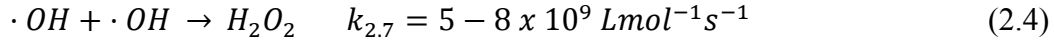
Radikal teorisi ortaya ilk kez 1931 yılında, Haber ve Willstatter tarafından atılmıştır [87]. Serbest radikal mekanizması ise aşağıda yer alan reaksiyonları içerecek şekilde Barb ve arkadaşları tarafından şekil 2.2’deki haliyle önerilmiştir [88,89].



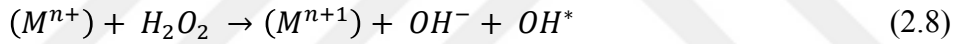
Şekil 2.2 : Barb ve arkadaşları tarafından önerilen Fenton sürecinde serbest radikal üretim mekanizması [88,89].

Mekanizmanın ilk basamağı literatürde yaygın olarak Fenton reaksiyonu olarak ifade edilir ve hız sabiti 40-80 L/mols’dır [6]. Reaksiyonda hidrojen peroksit sürekli olarak tüketilirken demir iyonlarının katalizör gibi davrandıkları anlaşılmıştır. Ortamda

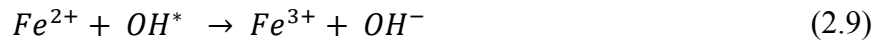
oluşan hidroperoksil radikallerinin ($\text{HO}_2\bullet$) hidroksil radikallerinden daha az hassas olduğu bilinmektedir. Bu önerilen mekanizma haricinde radikal-radikal ve hidrojen peroksit-radikal reaksiyonlarını açıklayan süreç eşitlik 2.4 ve 2.7 arasındaki mekanizma ile gösterilmiştir [6].



Benzer bir mekanizmanın daha sonra farklı metal katyonlarını içerecek şekilde eşitlik 2.8'e göre de gerçekleşebileceği önerilmiştir [73, 90].

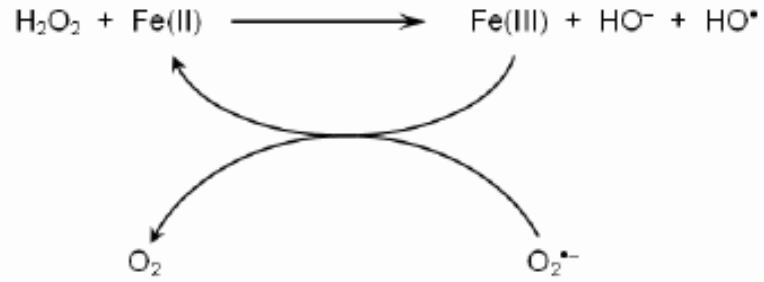


Radikal mekanizmasına daha sonraları Bray ve Gorin, ortamda ferril iyonlarının bulunma ihtimalini göz önüne almadığı için itiraz etmiş [73, 34], Kremer ise ortamdaki demir türlerinin Fe^{2+} ve Fe^{3+} haricinde, eşitlik 2.9 ve 2.10'de gösterildiği şekilde FeOH^{+3} da üretebileceğini savunmuştur [88].

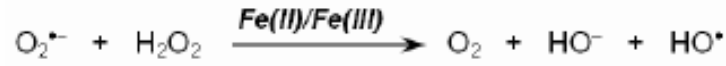


Dolayısı ile Fenton mekanizması demirin birden fazla yükseltgenme basamağı bulunduğu, bir veya iki elektron transferi içeren zincir reaksiyonlarla Barb ve arkadaşlarının önerdiği mekanizmadan çok daha karmaşık bir şekilde ilerlemektedir [91,92]. Başka çalışmalarda ise demir ve hidrojen peroksitin doğrudan bağlanarak bir metalperokso kompleksi oluşturduktan sonra hidroksil radikaline veya Fe(IV)O 'ya dönüştüğü önerilmiştir [91]. Dolayısıyla Şekil 2.3 ve şekil 2.6 arasında da görüleceği üzere radikal içeren ve içermeyen dört farklı döngü literatürde bulunmaktadır [88, 93-95].

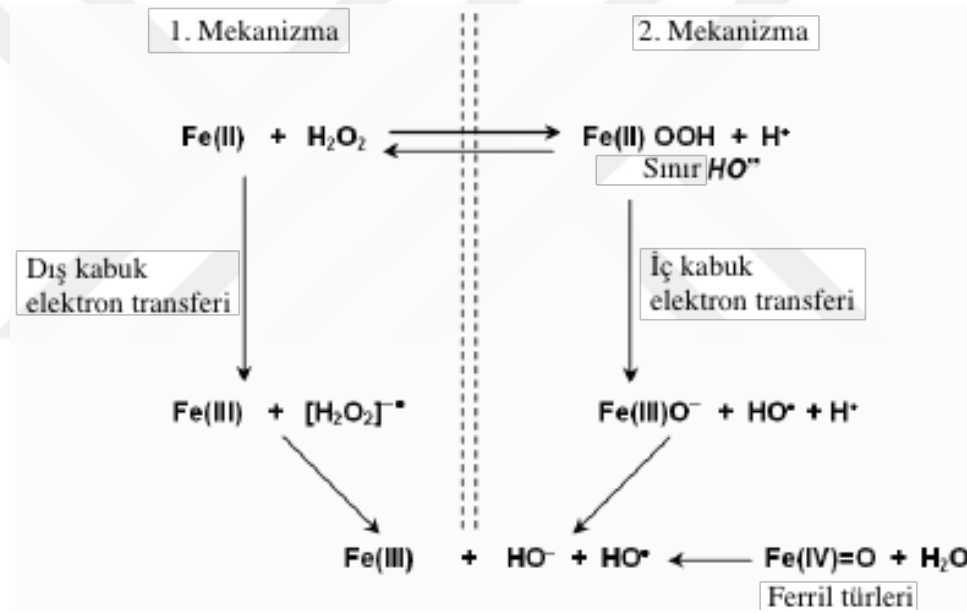
Haber-Weiss reaksiyonu (süperoksit temelli Fenton reaksiyonu)



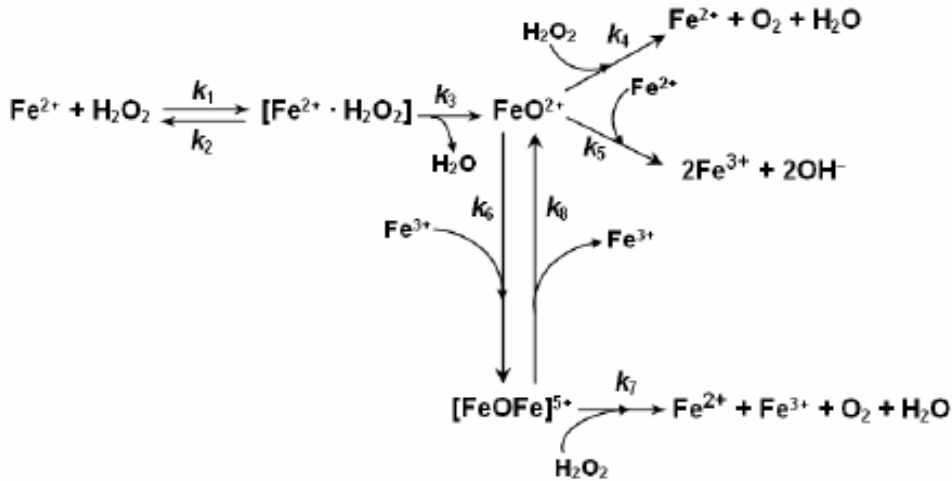
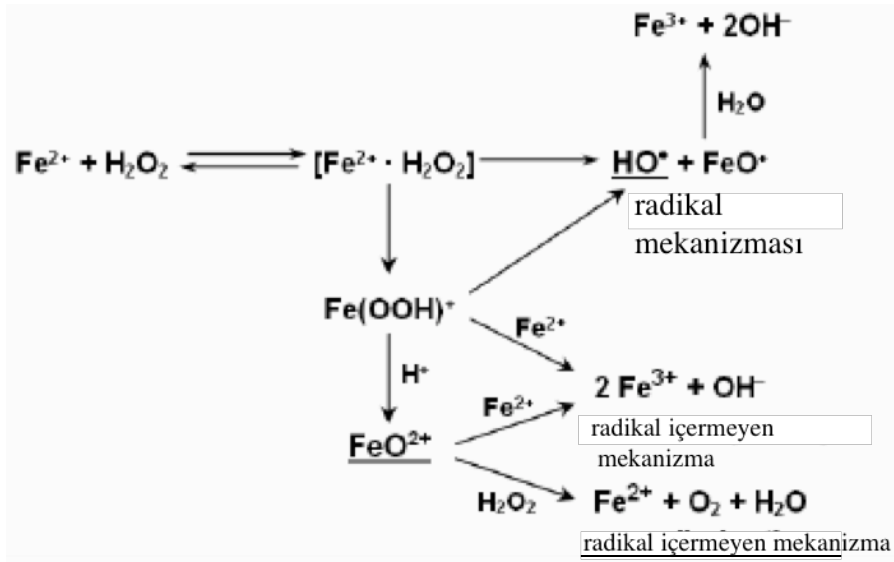
Haber-Weiss net reaksiyonu



Şekil 2.3 : Haber-Weiss reaksiyonu döngüsü [88, 93-95].



Şekil 2.4 : Klasik Fenton ve metal merkezli Fenton reaksiyonlarındaki temel ve ara basamaklar [88, 93-95].



Büyük yükseltgenme basamağına sahip metal iyonlarının bağımsız kaynaklar tarafından oluşturulması zor olduğundan, Fenton kimyasının içinde yer aldıklarını düşünmek pek mümkün değildir. Yani Ferril türlerinin (FeO^{2+}) reaksiyonda yer aldığı düşüncesi hidroksil radikallerinden farklı reaktiviteye sahip diğer türlerin de ortamda bulunabileceği gerçeğinden türetilmiştir [96].

Biyolojik sistemlerde Fenton reaksiyonlarının, yaşlanma ve çeşitli kanser türlerinin oluşmasında, hücresel yağların ve aminoasitlerin yükseltgenmesinde anahtar rol oynadığı yaygın olarak belirtilmektedir [90,91]. Dolayısı ile Fenton reaksiyonunun birden fazla şekilde gerçekleştiğini kabul etmek ve ortamın koşullarına göre hidroksil

radikali veya ferril iyonlarından birinin diğerine göre daha dominant olduğu yorumunu yapmak daha doğru olacaktır [78].

2.2.1 Fenton reaksiyonuna etki eden faktörler

Fenton reaksiyonu saklanması kolay olan ve kolay elde edilebilen güvenli kimyasallara sahip olup oda sıcaklığında ve atmosferik basınçta gerçekleştirilebilmektedir [6, 97]. Ancak literatürde bu mekanizmaya dair iki önemli sorun belirtilmiştir. Bunlardan birincisi demir iyonlarının sürekli olarak azalarak katı atığa dönüşmesi diğeri ise hidrojen peroksitin bozunması ve ortamdaki radikalleri sönmlemesidir. Bu sebepten Fenton reaksiyonuna etki eden faktörler dört başlık altında incelenmiştir [6].

2.2.1.1 pH değeri

Fenton mekanizması çok kuvvetli bir şekilde ortam pH'ına bağlı ilerler. Hedef substrattan bağımsız olarak reaksiyonun pH değeri 3 olarak ayarlanmalıdır [98-101]. Daha yüksek pH değerlerinde demir hidroksit ve demir ortohidroksitler çökeceği ve ortamdaki serbest demir iyonları azalacağı için üretilen hidroksil radikali miktarında da düşüş yaşanacaktır [102]. Bunun dışında yüksek pH değerlerinde hidrojen peroksitin bozunması, çok düşük pH değerlerinde ise $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ kompleksi oluşumu sebebiyle daha yavaş bir reaksiyon gerçekleşecektir [103]. Ayrıca hidrojen peroksitten, kararlı oksonyum iyonu $[\text{H}_3\text{O}_2]^+$ oluşacak ve reaksiyonu yavaşlatacaktır [102,103]. Bunların dışında ortamda kullanılan asetat/asetik asit tampon çözeltisinin fosfat/fosforik asit tampon çözeltisine göre, kararlı Fe^{3+} komplekslerini oluşturduğu ve yükseltgenme etkinliğini arttırdığı bulunmuştur [103].

2.2.1.2 Demir(II) iyonlarının konsantrasyonu

Demir(II) iyonlarının ortamdaki miktarı arttıkça oluşan hidroksil radikali miktarının arttığını söylemek doğru olmakla beraber, demir(II) iyonlarının belli bir konsantrasyonun üzerinde olması oluşan ürünün miktarındaki artışı marjinal düzeylere getirdiği çeşitli çalışmalarda görülmüştür [6]. Ancak buna rağmen ortamdaki demir(II) iyonu konsantrasyonunun reaksiyona etkisinin laboratuvar çalışmaları ile daha iyi incelenmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

2.2.1.3 Hidrojen peroksit konsantrasyonu

Demir(II) iyonlarında olduğu gibi hidrojen peroksit konsantrasyonunun artması da hidroksil radikali üretimini doğrudan etkilemektedir [6]. Ancak uygulamaya bağlı olarak ortamdaki hidrojen peroksitin yan reaksiyon verebileceği ve organizmalar için zararlı olduğu göz önüne alınarak bu oran dikkatlice seçilmelidir [104]. Yine çok yüksek miktarlarda hidrojen peroksit kullanıldığında ortamda üretilen hidroksil radikallerinin sönmülenebileceği de unutulmamalıdır [6].

2.2.1.4 Reaksiyon sıcaklığı

Organik kirleticiler ile yapılan çalışmalarda Lin ve Lo ortam sıcaklığının normal oda koşulları ile 30°C arasında olmasının uygun olduğunu bulmuştur. Rivas ve arkadaşları ise sıcaklığın 10 ila 40°C arasında değişmesinin reaksiyon etkinliği bakımından herhangi bir değişiklik yapmadığını belirtmişlerdir [98, 105]. Dolayısı ile uygulanacak yöntemin amacına göre sıcaklığın labortuvar çalışmaları ile belirlenmesi daha sağlıklıdır.

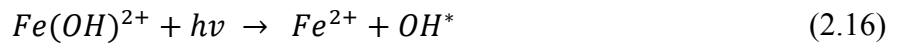
2.2.2 Modifiye fenton süreçleri

Organik maddelerin bozunması için uygulanan ve sulu ortamda Fenton mekanizmasını içeren beş farklı yöntem bulunmaktadır.

Sono fenton süreçlerinde 20 kHz frekanstan daha yüksek frekansa sahip ses ortamdaki radikal miktarının artırılması için kullanılmaktadır. Bu amaçla yapılan ve suyun pirolizi ile başlatılan örnek bir çalışmada oluşan hidroksil radikallerinin mekanizması eşitlik 2.11 ve 2.15 arasında gösterilmiştir [106].



Elektro-fenton süreçlerinde ise galvanik bir anot üzerinde fenton reaksiyonu gerçekleşecek şekilde serbest radikaller üretilir [107-111]. Ancak bu yöntemler düşük hızda hidrojen peroksit ürettiği için dezavantajlıdır çünkü oksijenin suda çözünürlüğü az olduğu gibi yöntemin etkinliği de düşük pH değerlerinde azdır [112]. Klasik Fenton sürecine dışarıdan mor ötesi (UV) ışığın eklenmesi ile ortamda serbest radikallerin üretilmesi sürecine foto-fenton süreçleri adı verilmiştir. Foto-fenton süreçlerinde oluşan demir(III) iyonları foto-indirgenme yolu ile devamlı olarak demir(II) iyonlarına dönüşüp bir döngü oluşturduğu için reaksiyon eşitlik 2.16'da gösterildiği şekliyle sürekli devam eder [113-116].



UV radyasyonun olduğu ortamda hidrojen peroksitin doğrudan hidroksil radikali ürettiği bilinmektedir. Ortamda ayrıca demir(II) iyonları olduğu zaman radyasyonun daha iyi emildiği ve hidrojen peroksitten doğrudan oluşan hidroksil radikali miktarının ise önemsiz kaldığı görülmüştür [117,118]. Foto-fenton sürecinin de klasik fenton reaksiyonu gibi pH değeri 3 civarında daha etkili olduğu ayrıca bulunmuştur [119].

Hem ultrason dalgaları hem de UV radyasyonun kullanıldığı sono-foto-fenton süreçlerinde serbest radikal miktarlarında önemli ölçüde artış görülmüştür. Foto-fenton sürecinde olduğu gibi sono-foto-fenton sürecinde de demir(II) iyonları döngü içerisinde sürekli üretildiğinden reaksiyonun durması mümkün değildir [120].

Suyun geri kazanımında ileri yükseltgenme yöntemlerinin sono-kimyasal yöntemler ile birleşmesi, ortaya daha yüksek verimde sonuç veren sono-elektro-fenton gibi hibrit yöntemler çıkarmıştır [121-123]. Literatürde daha önce yapılan çalışmalar, bu tip bir fenton sürecinde organik atıkların bozunmasını incelemek amacıyla elektrot akış hücreleri ve ultrasonik bir jeneratöre bağlı cam reaktörler kullanmıştır [124-125]. Sono elektro fenton yönteminde bozunacak organik maddenin kimyasal yapısının yöntemi doğrudan etkilediği görülmüştür.

Bir başka hibrit yöntem olan foto-elektro-fenton yönteminde ise UV ışığın kullanıldığı elektrokimyasal süreçlerin, hidroksil radikali üretimini çok büyük ölçüde arttırdığı bulunmuştur [126-127]. Ortamdaki asit çözeltisinin doğrudan fotolizi hidrojen peroksiti homolitik olarak hidroksil radikallerine dönüştürmektedir. Demir(III) iyonlarının demir(II) iyonlarına foto-indirgenmesi ve ortamda oluşan foto

kompleks maddeler organik maddelerin bozunmasında foto-elektro-fenton süreçlerini daha verimli kılmaktadır [6].

Genel anlamda klasik veya modifiye Fenton reaksiyonunun ileri oksidasyon süreçlerinde sağladığı avantajlar şu şekilde sıralanabilir;

- Reaksiyonun oda sıcaklığı ve basıncında yürümesi komplike ekipman ve reaktör kullanımını ortadan kaldırmaktadır [28].
- Reaksiyon basit yapısı sebebi ile tek başına veya hibrit sistemlerde uygulanabilir [128, 129] .
- Tüm ileri oksidasyon süreçleri (AOP) içinde demir ve hidrojen peroksitin hidroksil radikali üreten reaksiyonu diğer tüm AOP süreçlerine göre en hızlı gerçekleşir [130].
- Ucuz ve kolay bulunan kimyasalları içermesi sebebi ile kolay ulaşılabilir [28].

Katalizör olarak demir kullanımının avantajları da şu şekildedir;

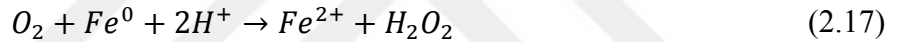
- Demir toplam kütle bakımından yer kabuğunda en çok bulunan metaldir.
- Çevreye uyumlu ve toksik olarak düşük düzeydedir.
- Demir(II) ve demir(III) türleri hızlı reaksiyon verir.
- Demir kolay bulunur ve ucuzdur.

Daha önce de belirttiğimiz gibi Fenton reaksiyonu radikal üretimi sayesinde literatürde popüler olan ve organik atıkların giderilmesinden antioksidan kapasitesinin tayinine kadar pek çok farklı yöntemde kullanılan bir reaksiyondur. Organik bileşiklerin ve atık suların temizlenmesinde daha önceki yıllarda klasik fenton yöntemi ile beraber yukarıda belirtilen sono ve elektro fenton yöntemleri de yaygın olarak kullanılmış ve oluşan hidroksil radikallerinin organik bileşikler ile reaksiyon vermesi sonucu atık sulardaki kirleticilerin giderilmesi sağlanmıştır. Klasik fenton yöntemi ile giderilen organik bileşikler arasında fenol [6], kateçol [131] ve klorobenzen [132] bulunmaktadır. Bunlara ek olarak sono-fenton yöntemi ile rhodamin B maddesi %51 oranında bir başarı ile 0.018 M demir çözeltisi kullanılarak giderilmiştir [133]. Gerçek atık su örneklerinin ise %92 başarı ile 30 dakika içerisinde elektro-fenton yöntemi kullanılarak giderildiği görülmüştür [134].

2.2.2.1 Nano-sıfır değerlikli demir kullanılan süreçler

Sulu çözeltilerde kullanılan fenton süreçlerinin bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Öncelikle ortamdaki demir(II) iyonu konsantrasyonu minimum 50-80 ppm arasında olmalıdır. Endüstriyel boyutta yüksek miktarda çözeltiye homojen AOP süreçleri uygulandığında aynı şekilde yüksek miktarda katı atık oluşmaktadır [135]. Oluşan katı atık özellikle foto-fenton yönteminde UV ışığın geçişini zorlaştırmaktadır [130, 136]. Klasik çözelti ortamında pH değeri 3 ve 4 arasında olmalıdır [137] ve pH değeri 4'ün üzerinde olduğunda demir hidroksit çökeleği oluşmaktadır [138]. Katalizörün geri kazanımı zordur [139]. Ayrıca endüstriyel boyutta düşünüldüğünde, kullanılan çözeltinin asidik pH değerinin nötral koşullara getirilmesi oldukça pahalıdır [140].

Bu olumsuz koşulların giderilmesi için sıfır değerlikli katı demir nanopartikülleri kullanılmaktadır [135]. Bu tip kimyasal reaksiyonlara fenton-benzeri reaksiyonlar adı verilir. Katı nanopartikül kullanılarak yapılan fenton-benzeri reaksiyonlar eşitlik 2.17 üzerinden gösterilmektedir.



Literatürde bahsi geçen demir katmanlı killer, mezopor materyaller, demir içeren zeolitler, demir oksit nanopartikülleri ve demir mineralleri bu amaçla kullanılmıştır [141-145].

Fenton sürecinde magnetit, karakteristik özellikleri sebebiyle son yıllarda yoğun ilgi görmektedir. Doğada en yüksek oranda bulunan mineral olan magnetit, yapısındaki demir(II) sebebiyle serbest radikallerin üretimini arttırmaktadır [146]. Katalitik aktivite yapısındaki oktahedral katyonların miktarına bağlıdır. Dolayısı ile magnetit yapısındaki oktahedral bölgeler bu minerali fenton süreci için ideal bir katalizör yapar. Bunun dışında magnetit kristallerinin manyetik alan ile kolayca ortamdaki temizlenmesi, demirin farklı metaller ile desteklenmesi sayesinde fiziko kimyasal özelliklerinin değiştirilerek aktif bölge sayısındaki artış, magnetitin yüksek elektron hareketi ve diğer demir oksitlerine göre sulu ortamda daha fazla dağılılabiliyor olması, Fenton süreçlerinde magnetit kullanımının avantajlarıdır [147-149].

Nanopartikül üzerindeki demir(II) miktarının artması magnetitin fenton sürecindeki etkinliğini de arttırmaktadır [150].

Magnetit içeren sistemlerin en büyük iki avantajı filtreler ve filtrasyon sistemleri üzerinden yürüyebilmeleri ve özellikle su atık sistemlerinde mobil üniteler vasıtası

ile kolaylıkla uygulanabilmeleridir [151]. Bu partiküllerin üretimi literatürde çoğunlukla çöktürme metodu kullanılarak yapılmaktadır [28]. Demir nanopartiküllerinin kullanılması yüksek yüzey alanı ve katı üzerindeki aktif bölgelerin varlığından dolayı ortamdaki serbest radikallerin miktarını artırır. Ancak nanopartiküllerin kümelenme yoluyla reaksiyonu sınırlaması ve sürekli filtrasyon ihtiyacı, yöntemin istenmeyen taraflarındandır [15-17]. Yine de bu tip katalizörlerin kullanımı, yeni bir katalizör sınıfı doğurmaları ve sağladıkları avantajlar bakımından endüstriyel uygulamaları kolaylaştırdıkları için önemlidir [130].

Bu amaçla kullanılan oksit türleri içerisinde magnetit, götit, magemit ve hematit heterojen sistemlerde en çok kullanılanlardır [130]. Yapılan çalışmalarda magnetit, kirleticilerin giderilmesi açısından incelenmek için altı farklı şekilde kullanılmıştır. Hidrojen peroksit ve magnetit bakımından zengin kum, tek başına hidrojen peroksit, Fe^{2+} ve hidrojen peroksit homojen sistemi, magnetit ve sodyum persülfat, Fe^{2+} ve sodyum persülfat ve tek başına sodyum persülfat kirleticilerin giderilmesinde kullanılmış ve elde edilen sonuçlarda magnetit içeren denemelerin her zaman %80 üzeri başarı gösterdiği bulunmuştur [130, 140]. Katı magnetit ile yapılan çalışmalarda metil kırmızısı [152] ve metilen mavisinin [153] giderilmesi %90 başarı ile gerçekleştirilmiştir. Demir oksit kristallerinin hazırlanmasında ise çok yüksek oranda, geleneksel bazik ortamda çöktürme yöntemi kullanılmıştır [130]. Magnetit ile renk gideriminin incelenmesi açısından en çok kullanılan organik madde ise metilen mavisi olmuştur [6]. Heckert ve arkadaşları tarafından seryum(III) klorür çözeltisi fenton benzeri reaksiyon üretimi amacı ile çözelti ortamında kullanılmış ve radikal üretimi 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) yöntemi ile test edilmiştir [30].

2.2.2.2 Demir içermeyen fenton süreçleri

İleri oksidasyon süreçlerinde demir'in homojen ve heterojen reaksiyon ortamlarında kullanılması daha önce de bahsettiğimiz dezavantajları ortaya çıkardığından, katalizör olarak yeni maddelerin kullanılması ihtiyacı doğmuştur. Ancak kullanılacak olan yeni katalizörün ideal bir redoks ajanı olabilmesi için birden fazla yükseltgenme basamağına sahip olması şarttır [28, 154]. Ayrıca kullanılacak metalin yükseltgenme basamaklarının geniş bir pH aralığında çökelti oluşturmaması istenir. Dikkat edilmesi gereken bir diğer husus da ortamda oluşabilecek olası bir metal-ligand kompleksidir. Literatürde yer alan AOP süreçlerinde demir haricinde alüminyum,

seryum, krom, kobalt, bakır, mangan, rutenyum ve polioksometalatlar reaktif türlerin üretimi amacıyla kullanılmıştır [28].

2.3 Seryum

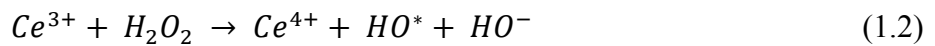
Seryum Dünya'nın kabuğunda 66.5 ppm konsantrasyonu ile lantanit ailesi içindeki en yaygın elementtir [23]. Yaygın bulunması sebebiyle de kataliz içeren reaksiyonlarda ve süreçlerde kullanılan önemli bir materyal haline gelmiştir. Kullanıldığı uygulamalardan bazıları; toksik araç gazlarının giderilmesi [155, 156], oksijen sensörleri [157], yakıt hücreleri [158-160], elektrokromik ince tabaka filmleri [161, 162], biyoteknoloji, çevre kimyası ve tıp olarak sıralanabilir [163, 164].

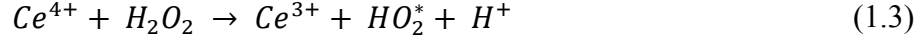
Seryum ayrıca $4f^2 6s^2$ ile biten elektron konfigürasyonu sayesinde çözelti formunda +3 ve +4 değerliklerini alarak, hidrojen peroksiti Fenton benzeri bir reaksiyonda aktive edebilen tek lantanittir [28]. Ce^{4+} iyonu 97 pm çapa sahipken, Ce^{3+} iyonunun çapı 114 pm'dir. Bunun da ötesinde CeO_2 örgü yapısındaki oksijen dianyonunun beklenmeyen bir şekilde Ce^{3+} katyonundan daha büyük bir çapı (135 pm) bulunmaktadır [19].

Ce^{3+} iyonu bazik çözeltilerde, O_2 molekülü tarafından kolayca yükseltgenen güçlü bir indirgen madde iken, Ce^{4+} iyonu asidik koşullarda kuvvetli bir yükseltgen olarak görev yapmaktadır. Ce^{4+}/Ce^{3+} 'ün standart elektrot potansiyeli 1.72 V'dur ve uygun redoks koşullarında iki iyon birbirine kolayca dönüşebilmektedir [28]. İki iyonun 4f orbitalindeki sadece bir elektron ile birbirine dönüşmesi sıvılarda eşitlik 2.18 ile gösterilen Nernst eşitliği ile ifade edilir [19].

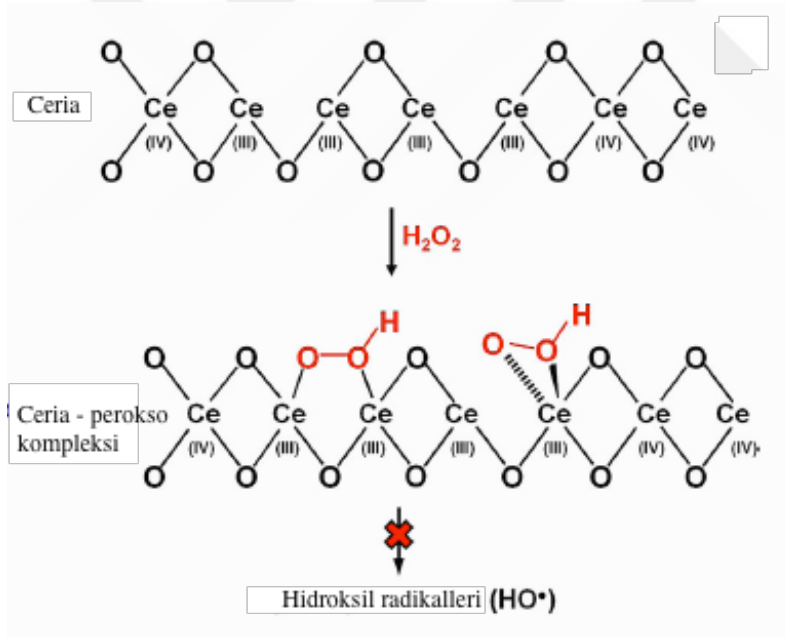
$$Ce^{4+} + 1e^- \rightarrow Ce^{3+} \quad E = 1.44 - 0.059 \log [Ce^{3+}]/[Ce^{4+}] \quad (2.18)$$

Yüzeydeki oksijen boşlukları sebebi ile seryum oksit katalitik uygulamalar için oldukça popüler bir seryum türüdür. Özellikle yüzeyindeki seryum(III) bölgelerinin ve seryum(III) ile seryum(IV) arasındaki geçişlerin katalitik aktivite de rol oynadığı bilinmektedir [28]. Organik kirleticilerin yükseltgenmesinde, fenton benzeri bir reaksiyon ile seryum oksitin heterojen bir katalizör görevi görebileceğini daha önce de bahsedildiği gibi ilk kez Heckert ve arkadaşları eşitlik 1.2 ve 1.3 ile ifade edilen mekanizmayla önermişlerdir [28, 30].

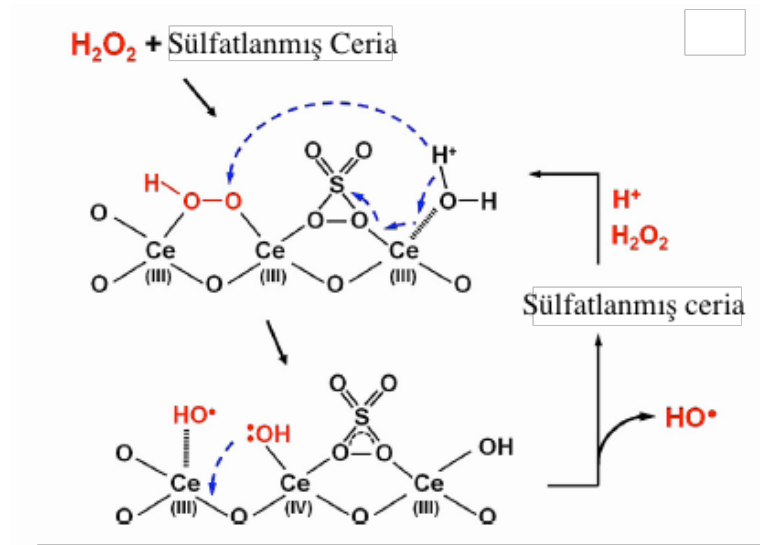




Chen ve arkadaşlarının CeO₂ ve H₂O₂ sistemi üzerine yaptığı araştırmalar, seryum oksitin serbest radikal üretimindeki başarısının, oksitin yüzey özelliklerine bağlı olduğunu; ve yüzeyde modifikasyon yapılmadan Ce³⁺ ve H₂O₂ arasındaki reaksiyonun, nötral pH değerinde dahi kararlı, kahverengi peroksit benzeri türler oluşturduğunu bulmuştur [165,32]. Dolayısı ile CeO₂ doğrudan hidroksil radikali üretiminde başarısız olsa da, asidik görev gören sülfat gruplarının yüzeye tutunmasıyla, yani yüzey modifikasyonu ile, Ce³⁺ iyonlarının elektron transferini ve ardından peroksitlerin homolitik yıkımını gerçekleştirmektedir [32]. Şekil 2.7 ve 2.8 sülfat grupları ve yüzey modifikasyonu ile seryumdan hidroksil radikali üretimi için olası mekanizmaları açıklamaktadır. Ancak seryum, akut olarak toksik bir madde olduğu için nano boyutta partiküllerinin çevre ve insan sağlığına olan etkilerinin iyi incelenmesi gerekmektedir [166].

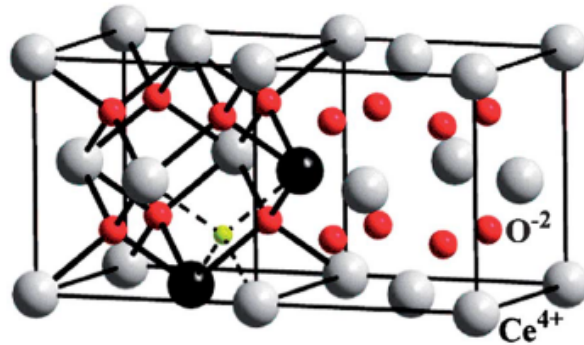


Şekil 2.7 : Sadece ceria üzerinden hidrojen peroksitin aktivasyon mekanizması ile hidroksil radikali üretimi [166].



Şekil 2.8 : Sülfürik asit ile muamele edilmiş ceria üzerinden hidrojen peroksitin aktivasyon mekanizması ile hidroksil radikali üretimi [166].

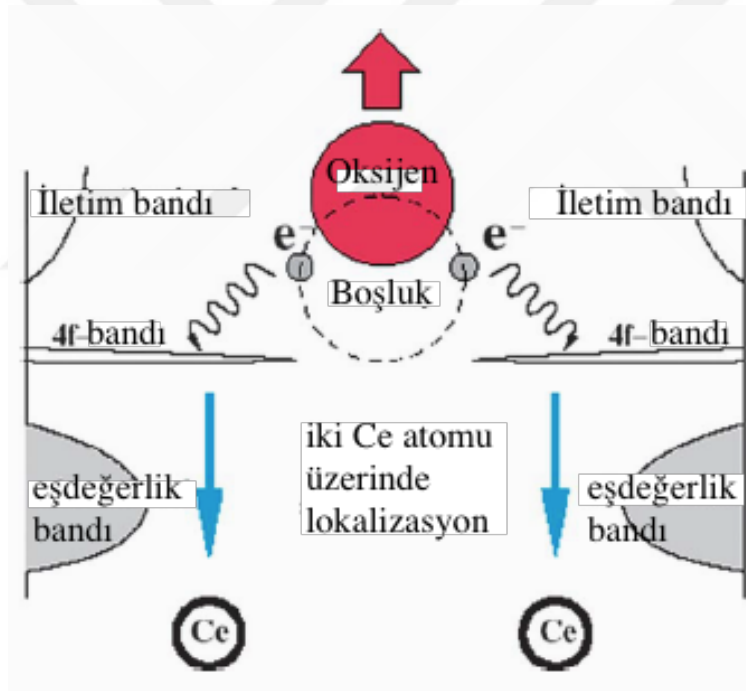
CeO_2 oda sıcaklığından erime noktasına kadar florit Kristal yapısında kristalleşir ve katyonları yüzey merkezli kübik hücre şeklini (fcc) alırken, anyonları oktahedral bölgeler oluşturur [23]. Şekil 2.9’de de görüleceği üzere her bir seryum katyonu 8 oksijen anyonu ile çevrenirken, her bir oksijen anyonu dört seryum katyonu ile çevrenmiştir. Sentez koşullarına bağlı olarak kristal yapıda bir veya daha fazla hücre birimi olabilmektedir [167]. CeO_2 ’nin açık sarı renginin $Ce(IV)$ - $O(II)$ yük transferine bağlı olarak oluştuğu önerilmekte, stokiyometrik olmayan oranda $CeO_{2-\delta}$ ($0 < \delta < 0.5$) ‘nin mavi ve neredeyse siyaha dönüştüğü görülmektedir [168].



Şekil 2.9 : Yüklenmiş Ceria’nın Kristal görüntüsü. (Sağ küpte yüklenmemiş CeO_2 gösterilirken, soldaki küpte lantanit serisinden trivalent iyonların yer değiştirmesi ile yüklenmiş CeO_2 görüntüsü yer almaktadır) [168].

Yüzeydeki oksijen boşluklarının tanımı, normalde boşlukların stokiyometrik konsantrasyonu şeklinde yapılsa da, katı yapılarda oksijen iyonlarının taşınması açısından mobil boşluk konsantrasyonu göz önüne alınmalıdır [169]. Yüzeydeki bu boşluklar ceria’nın katalitik özelliklerinde büyük önem taşırlar. Bu durum ceria’nın

doğrudan oksijen taşıma kapasitesi (OSC) ile ilgilidir. Çünkü seryum'un yükseltgenme basamakları arasındaki geçişin kolaylığı bu kapasiteye bağlıdır. Bu durum 4f ve 5d orbitalleri arasındaki enerjinin farkının az oluşu ve aralarındaki elektron yoğunluğu dağılımının düşük bir enerji bariyerine sahip olması ile açıklanmaktadır [170]. Ceria yüzeyindeki oksijen miktarı azaldıkça oksijen boşluklarının da azaldığı bilinmektedir. Oksijen miktarındaki bu azalma elektrikçe nötral yapıyı korumak için Ce^{3+} iyonlarında artışa yol açmaktadır [171, 172]. Bu sayede seryum oksitleri örgü yapısından oksijen veya elektron kaybederek/kazanarak yükseltgenme basamaklarını değiştirmek yoluyla başarılı bir oksijen tamponu olarak çalışabilmektedir. Örgü yapısı da ortamın sıcaklığı, oksijenin kısmi basıncı, diğer iyonlar ile doyurulması, elektrik alanı ve yüzey stresine bağlı olarak değişmektedir. Şekil 2.10 ceria yüzeyinde oksijen boşluklarının oluşmasını açıklamaktadır [173-176].



Şekil 2.10 : Ceria üzerinde oksijen boşluklarının oluşumu. Bir oksijen atomu arkasında iki elektron bırakarak örgü pozisyonunu terketmekte ve Ce (+4) ve Ce(+3) formları arasında geçiş sağlayarak iki seryum atomu üzerinde lokalize olmaktadır [173].

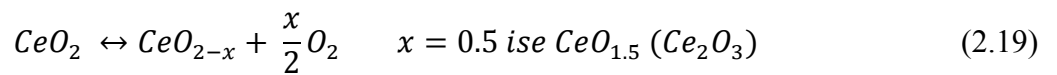
Teoriye göre oluşan boşluklar oksijence zengin ortamda hemen iyileştirilmekte ve bu durum ceria yapısına katalitik süreç boyunca dengede bir oksijen ortamı sağlamaktadır [177]. Bir oksijen atomu ortamdan ayrıldığında geriye iki indirgenmiş Ce^{3+} türü bırakırken, elektronlar önceden boş olan 4f bandını doldurup $O_{2p}-Ce_{5d}$

band boşluğunda yüksek oranda lokalize olmaktadır [177]. Ceria materyallerinde oksijen transferi (boşluk doldurması) mekanizması ile gerçekleşmektedir [178].

Taramalı tünelleme mikroskobu (STM) ve yoğunluk fonksiyonel teorisi'nin birleşmesi ile CeO₂ yüzeyindeki oksijen boşluklarının oda sıcaklığında hareketsiz iken daha yüksek sıcaklarda lineer kümeler oluşturduğu bulunmuştur [179]. Bu kümelerin Ce³⁺ iyonlarını gaz fazındaki kimyasallara maruz bıraktığı ve bu iyonların geniş birlikler oluşturduğu görülürken, bu kümelerin hemen yanındaki Ce⁴⁺ iyonlarının değişmeden kaldıkları bulunmuştur [29]. Böylece oluşan yüzeyaltı oksijen kümelerinin yüzeyde lineer oksijen boşlukları oluşturmaları açısından katalitik özelliklere büyük oranda etki ettiği anlaşılmıştır [177].

2.3.1 Nano-boyut etkileri

CeO₂ partiküllerinin boyutu küçüldükçe oksijen boşluklarında artış olduğu ve yüzey/hacim oranı büyük olan nanopartikül formunda kendine has özelliklere sahip olduğu bilinmektedir [180]. Dolayısı ile ceria'nın boyutundaki değişiklik partiküllerin reaktif özelliğine doğrudan yansımaktadır. Nano boyutta ceria'nın sadece reaktif özelliği değil elektrik iletkenliği, Raman modunda genişleme ve kayma, boyuta bağlı örgü relaksasyonu, basınca bağlı faz geçişi ve ultraviyole bölgede maviye kayma gibi özellikleri de değişmektedir [23]. İndirgenmiş haldeki seryum iyonlarının yüzdesi partikül boyutu küçüldükçe artmaktadır ve Seal ve arkadaşları tarafından partikül boyutu 30 nm'den 3 nm'ye düştüğünde Ce³⁺ konsantrasyonunun %17'den %44'e çıktığı bulunmuştur [180]. Oksijen taşıma kapasitesi (OSC) başlangıç maddesinin gramı başına salınan mikromol cinsinden oksijen miktarı olarak tanımlanmaktadır. Gaz fazındaki moleküler CeO₂ için bu miktar eşitlik 2.19 ile gösterilen denge ile açıklanmış ve 1452.47 mikromol O₂/g olarak bulunmuştur. [23].



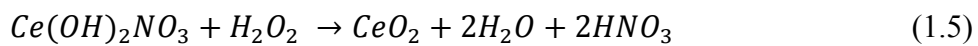
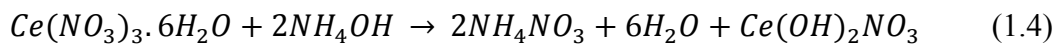
Ancak yaygın olarak kullanılan ceria gaz fazında olmadığı, mikro veya nano boyutta olduğu için bu teorik olarak hesaplanan OSC'nin sadece bir kısmına sahip olduğu düşünülmelidir. 2.19 eşitliğinin denge halinde verilmesi oksijen transferi ve katalitik özellikler bakımından önemlidir. Bu sayede yapı oksijen tamponu olarak tanımlanmıştır [23].

Diğer nanopartiküllerin aksine nanoceria partikül boyutu küçüldükçe genişleyen örgü yapısı ile azalan oksijen salınımına sahiptir. Ayrıca mikro formuna göre örgü yapısındaki genişleme partikül boyutu küçüldükçe artmaktadır. Hailstone ve arkadaşları 11.8 nm çapındaki partiküllerde genişlemenin %1.1 iken, 1.1 nm çapındaki partiküllerde %6.8 olduğunu bulmuşlardır [167]. Yine aynı ekip tarafından yaklaşık 2-3 nm çapa sahip partiküllerin en yüksek OSC değerine sahip olacağı öngörülmüştür. Dolayısı ile ceria reaktivitesinin bu boyutta pik vereceği söylenebilir [23].

2.3.2 Sentez

Nanoceria sentez yöntemleri düşük ve yüksek sıcaklık yöntemleri olarak ikiye ayrılabilir. En yaygın kullanılan düşük sıcaklık yöntemleri; hidroliz, çöktürme, sol-gel, hidrotermal veya solvotermal, mikroemülsiyon metotları, sonokimyasal sentez ve elektrokimyasal sentezdir [23, 19]. Termal bozunma, yanma sentezi, alev sentezi ve gaz yoğunlaştırma ise yüksek sıcaklık yöntemlerini oluşturmaktadır [19].

Düşük sıcaklık yöntemleri Ce^{3+} iyonlarını bir yükseltgen madde varlığında çözünmeyen Ce^{4+} iyonlarına dönüştürmeye dayanır. Bu süreç klasik LaMer-Dinegar mekanizmasını takip eder [181]. Bu mekanizmada aşırı doymuş Ce^{3+} çözeltisi ani bir çekirdekleşmeyi takiben aşırı doymuş ortamın çökmesi ile nano boyutta partikülleri oluşturur. Tekrar çekirdekleşme olmazsa partiküllerin boyut frekans dağılımı aynı olmakta ve ortamdaki son partikül boyutu konsantrasyon ve adsorblanan stabilizatörün bağlayıcı gücüne bağlı olarak değişmektedir. Çünkü stabilizatörler deneysel koşullarda termodinamik olarak kararlı toplam molar yüzey alanını kontrol eden ajanlardır [167]. Bu anlamda en çok kullanılan stabilizatörler organik alkoller, polimerler ve karboksilatlardır [182]. Eşitlik 1.4 ve 1.5 'de seryum tuzu ve amonyak ortamında nanoceria üretimi gösterilmiştir.



Yüksek sıcaklıklarda gerçekleşen nanoceria sentezleri ise seryum üreten öncül maddelere ihtiyaç duyar ve 1000°C'den 2500°C'ye uzanan çok yüksek yanma sıcaklıklarında gerçekleşir [167]. Kalsinasyon endüstriyel ölçekte ceria üretimi için kullanılabilen, henüz oksit haline dönüşmemiş ceria'nın yüksek sıcaklıkta muamele

edilmesini içeren bir yöntemdir [167]. Yüksek sıcaklık yöntemleri partikül boyutunun kontrolü için gaz fazı sıcaklığı ve hız kontrolü gibi parametreleri kullanmaktadır [19].

Nanoceria'nın katalitik özelliklerini etkileyen faktörler kristal yapısı, boyut dağılımı, köşe, kenar ve yüzeylerin reaksiyona ne kadar açık olduğudur. Sentez süresince başlangıç morfolojisi belirlenirken farklı morfolojiler de kristal yüzeyinin oluşumu esnasında kontrol edilebilir [19]. Reaksiyon ortamında nanopartikül yüzeyine tutunan organik asitler ve bazlar, organik ligandlar, herbisitler, pestisitler, sürfaktanlar ve proteinler gibi ortamda dinamik denge oluşturan pek çok madde bulunabilir. Bu maddeler adsorpsiyon fazı boyunca nanopartikül yüzeyindeki aktif bölgeleri bloke edeceği gibi kovalent bağlar vasıtası ile yüzeye bağlanıp ek bir kaplayıcı madde görevi de görebilirler. Kaplayıcı maddeler yüzeyle reaksiyon vermeyip sadece ortamdaki büyük maddelerin yüzeye tutunmasını da engelleyebilirler [19]. Dolayısı ile nanoceria ortamdaki maddelere bağlı olarak kümelenme yapabilir, sonuçta oksijen ve suyun partiküller ile olan aktivitesi doğrudan yüzey kimyasına bağlıdır [19]. Nanoceria partiküllerinin boyutunun sentez süresince kontrolü çekirdeklerin kristalleşmesi ile başlar ve sıcaklık oluşan çekirdeklerin termodinamik kararlılığı için önemli bir faktördür [19]. Yüzeye organik tutunma ajanlarının eklenmesi de büyüme hızının kontrolü için kullanılabilir ve nanoçubuklar gibi anizotropik şekillerin oluşmasını sağlayabilir. İstenilen büyüklük sağlandığında da nanopartiküllerin reaksiyon ortamından ayrılması, kristallerin tekrar çökmesini önlemek bakımından önemlidir [19]. Literatürdeki sentez süreçlerinde organik asitler Ce^{3+} tuzlarının kompleks oluşturma yoluyla çözünürlüklerini arttırmak, karboksilik asitler ise kristal büyümesini kontrol etmek için kullanılmışlardır [19]. Sentez sırasında Ce^{3+} iyonunun pH 11'e kadar sulu ortamda çözündüğü, Ce^{4+} iyonunun ise pH 4'den düşük değerlerde çözündüğü unutulmamalıdır. Bu sebepten Ce^{3+} iyonları ile başlayan süreç, bir yükseltgen vasıtası ile çözünmeyen Ce^{4+} iyonuna döner. Bu anlamda seryum(III)'ün farklı tuzları, örneğin $CeCl_3$ dahi, ortamda fazlasıyla oksijen bulunduğu sürece CeO_2 oluşumunu sağlayabilir [19].

2.3.2.1 Nanopartikül sentezinde yeşil yöntemler

Nanopartikül üretiminde kullanılan ve yukarıda bahsettiğimiz klasik yöntemlerin bazı dezavantajları mevcuttur. Öncelikle bu yöntemlerde her zaman ortamda yüksek enerji, basınç ve sıcaklığın oluşturulması gerekmektedir. Ayrıca kullanılan

kimyasallar ve çözücü maddeler sadece çevreye ve biyolojik sistemlere zararlı olmakla kalmayıp, reaksiyon sonucunda da zararlı yan ürünler üretebilmektedir [45]. Bunların dışında bu kimyasalların kararlılığı ve canlı sistemlerdeki etkileri göz önüne alınarak, daha güvenli alternatif yöntemlerin biyomedikal alanlarda kullanımına olan ihtiyaç artmıştır [183, 184]. Nanopartiküllerin biyolojik olarak sentezinde bitki ekstraktaları, bakteriler, mantarlar, aktinomisitler ve algılar literatürde kullanılmıştır. Ancak mikrop temelli yöntemlerin, ortamdaki kirlenme, bulaşma ve ortam koşullarının sağlanmasındaki zorluklar gibi bazı dezavantajları vardır [49, 184]. Ayrıca bu yöntemler bitki ekstraktlarının kullanıldığı yöntemlere göre pahalı oldukları kadar, hem mikroorganizma ortamının hem de nanopartikül sentezinin birkaç günü bulması bakımından da zaman alıcıdır. Sonuçta biyolojik sistemler ile uyumlu nanopartikül sentezinde bitki ekstraktları öne çıkmakta ve bu güne kadar 200 farklı bitki çeşidi ile sentez gerçekleştirilmiş bulunmaktadır [49].

Bitki ekstraktlarının nanopartikül sentezinde kullanılması kolay erişilebilir olmalı ve sentez sırasında yeterli miktarda indirgeme ajanı içerdiklerinden avantajlıdır. Bu süreçte tüm bitkiden elde edilen özütte bulunan indirgeme ajanı miktarı bitkinin bir kısmından elde edilenden tabiki de daha fazla olacaktır. Bugüne kadar kullanılan özütler çoğunlukla sulu ortamda hazırlanmıştır ve fiziksel/kimyasal olan diğer ortamların aksine biyolojik ortamlar herhangi bir özel koşul gerektirmemektedir. Daha da önemlisi bitki özütleri mikrobiyal ortamlara göre çok daha yüksek oranda indirgeme potansiyeline sahiptir [184] ve bitki özütlerinden çıkan atık maddeler çevreye zararlı değildir. Bitkide bulunan fitokimyasallar sadece partiküllerin indirgenmesini sağlamaz ayrıca bu partiküllerin kararlı olmalarını da sağlar, böylece hem tekrarlanabilir bir metot geliştirilmiş hem de çevre dostu ve kararlı ürünler elde edilmiş olur [185, 186]. Bitki özütleri kolay elde edilebildikleri ve yapılarındaki; alkaloid, terpenoid, flavonoid, fenol, tanin ve kinin molekülleri gibi çok geniş yelpazede biyomolekül içerdiklerinden nanopartikül sentezinde oldukça popülerdir [186].

Özetle, bitki özütüne dayalı nanopartikül sentez yöntemleri yeşil kimya yöntemlerinin gerektirdiği tüm koşulları yerine getiren, ucuz, doğa dostu ve terapötik kullanıma uygun yöntemlerdir. Bu yöntemlerde çözücü ortam olarak çoğunlukla su kullanılsa da literatürde aseton, etil asetat, petrolyum eteri, etanol ve metanol kullanan çalışmalar da mevcuttur [45].

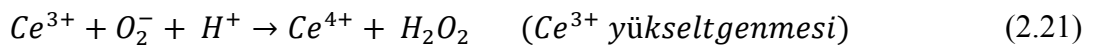
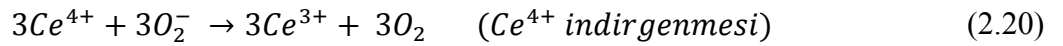
Nanoceria sentezi amacıyla literatürde en çok kullanılan yöntemler genel olarak sulu ortamda gerçekleşen sentezler ve mikroemülsiyon yöntemleri olarak ikiye ayrılabilir. Bu kısımda sulu ortamda gerçekleşen sentez yöntemleri hakkında bilgi verilecektir. Sulu sentez yöntemlerinde çoğunlukla co-precipitation olarak adlandırılan bazik ortamda çöktürme yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde kullanılan seryum tuzları, Ce^{3+} veya Ce^{4+} nitrat, klorür, sülfat, karbonat, asetat ve karboksilatlar olurken çöktürücü madde olarak amonyum hidroksit, amonyum nitrat, üre, sodium hidroksit, potasyum hidroksit, hidrazin, heksametilentaamin, okzalik asit, sitrik asit ve propiyonik asit gibi kimyasallar yaygın olarak tercih edilmiştir. Özellikle katyonik kuaterner amonyum sürfaktanları da ortama partikül büyüklüğünün kontrolü için eklenmektedir [187]. Özellikle setiltrimetilamonyum bromürün ($C_{16}TAB$) sürfaktan olarak kullanıldığı bir çalışmada seryum partiküllerinin $50 \text{ m}^2/\text{g}$ 'dan $300 \text{ m}^2/\text{g}$ 'a yükseldiği bulunmuştur [188]. Seryum klorür ve %25'lik amonyum çözeltisi kullanılan çöktürme reaksiyonlarına ayrıca $C_{16}TAB$ eklenmesiyle partiküllerin 1-8 nm arasında sabitlenmesini sağlayarak kümelenmeyi azaltacağı bulunmuştur [189]. $C_{16}TAB$ dışında aynı maddenin klorür bileşiği ve di-n-dodesiltrimetilamonyum bromür'de partikül büyüklüğünün sabitlenmesi amacı ile reaksiyon ortamında kullanılmış ve sonuçta sırasıyla 215 ve $184 \text{ m}^2/\text{g}$ yüzey alanına sahip, boyutları 5-10 nm arasında değişen seryum nanopartikülleri sentezlenmiştir [190, 191]. Sujana ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada ise klasik amonyak sentezinde ortama Tween 80 sürfaktan maddesinin eklenmesi ve kalsinasyon işleminden sonra en küçüğü 3 nm olan ancak farklı büyüklükler gösteren seryum partikülleri üretilmiştir [192]. Sağladıkları partikül büyüklükleri ve yüzey alanları sebebi ile bahsi geçen sürfaktanların nanopartikül sentezinde sağladıkları kolaylıklar yadsınamaz ise de, çevreye zararlı oldukları ve daha önce ki kısımlarda da ayrıca belirtilen sebeplerden sentez işleminde partikül büyüklüğünün kontrolü için son yıllarda bitki özütleri ve bitkisel kaynaklar yaygın olarak kimyasal sürfaktanların yerini almaya başlamıştır. Sankar ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ayuverdik tıp'ta yaygın olarak kullanılan ve daha önce gümüş ve altın nanopartiküllerinin sentezinde de denenmiş olan centella asiatica bitkisinin infüzyonu, sulu ortamda seryum amonyum nitrat çözeltisine eklenmiş ve ortamdan santrifüj yardımı ile bağlanmamış fitokimyasallar ayrılmıştır. Dinamik ışık kırınımı yöntemi ile yapılan karakterizasyon sonucu partiküllerin 1-100 nm arasında yayılan bir büyüklüğü sahip olduğu ancak en yaygın partikül büyüklüğünün 19.01 nm olduğu

görülmüştür [44]. Ayrıca *centella asiatica* bitkisinin toplam fenolik ve flavonoid içerikleri gallik asit ve kuersetin ekivalenti bakımından sırasıyla 4.5 ve 2.1 mg olarak bulunmuştur [44]. Farklı bir çalışmada seryum nitrat çözeltisi nişasta çözeltisi ile 60°C’de karıştırılmış ve 1M amonyak çözeltisi çökmeyi sağlamak amacıyla ortama eklenmiştir. Nişasta ile yapılan bu çalışmada hidroliz sonucu açığa çıkan α -glukoz yapılarının $Ce(OH)_4$ oluşumunu sağladığı öne sürülmüştür. X ışını toz kırınım yöntemi ile yapılan karakterizasyon en yaygın partikül büyüklüğünün 25 nm’ye yakın olduğunu gösterirken ortamda 10 nm’den daha küçük partiküllerin varlığı da görülmüştür. Geçişli elektron mikroskobu sonuçları ise yaygın büyüklüğünün 5.8 nm civarında olduğunu belirtmektedir [193]. *Gloria superba* L. yaprak infüzyonunun seryum klorür çözeltisi ile sulu ortamda 80°C’de 4-6 saat arası karıştırılması ile oluşturulan seryum nanopartiküllerinin 400°C’de kalsinasyonu ardından X-Ray difraksiyonu analizleri yapılmış ve ortalama kristal boyutu 24 nm olarak belirlenmiştir. TEM analizleri ise küresel yapıdaki partiküllerin yaklaşık 5 nm civarında olduğunu tesbit etmiştir [47]. Darroudi ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada ise İran ve Türkiye’ye özgü bir bitki türü olan *Astragalus gummifer*’den elde edilen doğal bir asidik polisakkarit türeviden olan Gum taragacanth (GT) seryum nanopartiküllerinin sentezinde kullanılmıştır. Sulu ortamda karıştırılan GT ve seryum nitrat çözeltileri amonyak yardımı ile çöktürülmüş ve 80°C’de 12 saat karıştırmanın ardından yapılan kalsinasyon ile sentezlenen nanopartiküllerin analizi X ışını toz kırınım yöntemi (PXRD) ile yapılmış, partikül boyutunun 10 nm civarından olduğu belirlenmiştir [194]. Termofilik bir mantar türü olan *Humicola* sp. Mantarı da gümüş ve altın da olduğu gibi seryum nanopartiküllerinin sentezi için denenmiştir. pH 9 değeri ve 50°C’de büyütülen mantar kültürü 96 saatlik inkübasyon sonrası ıslak misel oluşumu için sodyum karbonat, glukoz, maya ve pepton ile karıştırıldıktan sonra ortama seryum nitrat eklenmiştir. Karanlıkta bekletilen karışımın farklı zaman dilimlerinde karakterizasyonu TEM ve XRD ile yapılmış ve küresel şekle sahip partiküllerin büyüklüğü ortalama 16 nm olarak bulunmuştur [195]. Zhai ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada doğal polimer türü olan chitosan ile kaplı seryum nanopartiküllerinin HRTEM ile yapılan analizlerinde partikül büyüklüğünün 5 nm’ye kadar inebildiği ICP ile yapılan çalışma sonucunda da ortamda bulunan glukoz birimlerinin seryum nanopartikül sentezini etkilemediği anlaşılmıştır [196]. Darroudi ve arkadaşları tarafından zengin karbohidrat, amin ve hidroksil içeriği sebebi ile bal ile yapılan seryum nanopartikülleri sentezinde seryum nitrat ve bal sulu

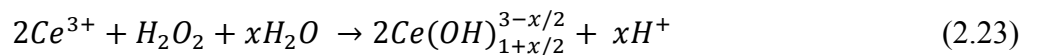
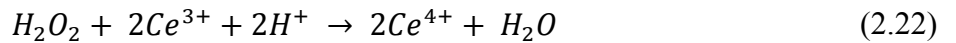
karışımı 60°C’de 6 saat bekletildikten sonra oluşan partiküllere kalsinasyon uygulanmış ve PXRD sonuçları kristal büyüklüğünün 50nm altında olduğunu göstermiştir [194]. Seryum nanopartiküllerinin antioksidan özelliklerinin incelenmesi amacı ile yapılan çalışmalarda sulu ortamda çöktürme ile sentezlenen partiküllerin büyüklüğü 3 ila 20 nm arasında ortam koşullarına bağlı olarak değişmektedir [197]. 3-5 nm arasında doğrudan sulu ortamda sentezlenen seryum nanopartiküllerinin Ce^{3+}/Ce^{4+} oranı arttıkça SOD aktivitesinin de arttığı bulunmuştur [197].

2.3.3 Nanoceria’nın antioksidan aktivitesi

Terapötik ajan olarak nanoceria’nın iki türlü işlevi bulunmaktadır. Ya süperoksit dismutaz (SOD) rolü görüp süperoksitleri yükseltger veya hidrojen peroksit katalizörü olarak peroksitleri yok eder [43]. Dolayısı ile nanoceria yükseltgenen veya indirgenen kimyasal türe bağlı olarak antioksidan veya pro-oksidan görevleri görebilmektedir. Bu görevleri açıklayan iki farklı görüş bulunur. Birincisi iyonik mekanizmadır ve bu mekanizmada Ce^{3+}/Ce^{4+} iyonlarının süperoksitleri nötralize ederken peroksitleri de yok ettiği görüşü savunulmaktadır. Bu mekanizmada Ce^{3+}/Ce^{4+} oranı arttıkça nanoceria SOD benzeri, oran azaldıkça katalaz benzeri görev almaktadır. Bu mekanizma için sırasıyla 2.20 ve 2.23 arasındaki eşitlikler belirtilmiştir [19].



Eşitlik 2.22 nanoceria’nın katalaz görevini açıklarken, eşitlik 2.23 genel olarak reaksiyon basamaklarındaki değişimi özetlemektedir [19].



Tüm bu eşitlikler aslında seryum iyonlarının ortamda serbest halde bulunmadığını, örgü yapısı içinde reaktif atomik bölgeler halinde olduğunu göstermektedir [43]. Reaksiyon termodinamik olarak çok az endotermik olduğundan oda koşullarında rahatlıkla ilerletilebilmektedir. Reaksiyonun standart Gibbs serbest enerjisi (ΔG^0) 42

kJ/mol veya 10.0 kcal/mol'dür [43]. İkinci görüşte ise iki reaksiyonun oksijen boşlukları arasındaki yük geçişi ile oksijen boşluğu popülasyonunun kontrolü sonrası sürecin ilerlediği düşünülmektedir [43].

2.4 Karakterizasyon

Nanopartiküllerin ortalama çapı, boyut ve yük dağılımı uygulamadaki fiziksel kararlılıklarının bir göstergesi olduğundan partikül karakterizasyonu önemlidir. Karakterizasyonda elektron mikroskobu uygulamaları morfoloji, şekil ve dolayısı ile partiküllerin toksikliği hakkında bilgi verirken, yüzey yük dağılımları polimer içinde ve test ortamındaki dağılım kolaylıklarının bir göstergesidir [198]. Genel olarak kristal yapısının belirlenmesinde X-Ray kırınımı (XRD) teknikleri kullanılırken, nanopartikül boyutu ve şekli geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile, hidrodinamik boyutu ise dinamik ışık kırınımı (DLS) ile belirlenmektedir [43]. Bu bölümde karakterizasyon yöntemleri; Partikül boyutu, yüzey yükü, Yüzey hidrofobisitesi ve Hedef ilaca cevap olarak adlandırılan dört farklı özelliğin anlaşılması üzerinden incelenecektir [198].

2.4.1 Partikül boyutunun belirlenmesinde kullanılan yöntemler

Partikül boyutunun belirlenmesi kullanım amacına bağlı olarak çok büyük önem taşımaktadır. Özellikle nanopartikül yüzeyine tutunan moleküllerin ve kompleks yapıların kolayca hücreye ve reaksiyon ortamına verilmesi için küçük partikül boyutu gereklidir. Küçük partikül boyutu kaplama ajanlarının tutunmasını ve tutunan ajan miktarını arttırdığı gibi, partiküllerin kümelenerek çökmesine de sebep olmaktadır. Dolayısı ile optimum partikül büyüklüğünün kullanım amacına göre tesbit edilmesi gerekir [198]. Bu amaçla da aşağıdaki yöntemler kullanılmaktadır;

2.4.1.1 Dinamik ışık kırınımı (DLS)

Foton korelasyon spektroskopisi (PCS) veya Dinamik Işık kırınımı (DLS) yöntemi nano veya mikro boyutlardaki kolloidal süspansiyon ortamında, brown hareketlerine dayanarak nanopartiküllerin boyutlarının tesbitinde kullanılır. Yöntemde yüzeye tutulan bir monokromatik ışık ile brown hareketi yapan partiküller Doppler kaymasına sebep olur ve gelen ışığın dalga boyunda bir değişim gözlenir. Bu sayede

süspansiyon ortamındaki partiküllerin boyut dağılımı, hareketi ve difüzyon katsayısı ölçülebilir [198].

2.4.1.2 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Doğrudan görüntüleme ve morfolojik analiz imkanı sağlayan bu yöntem pek çok avantajı beraberinde getirir de, partikül dağılımı ve ortlaması bakımından sınırlı bilgi verir. Analiz edilecek örnek öncelikle bir toz haline getirilmeli ve iletken bir metal (çoğunlukla altın) ile kaplanarak örnek haznesine yerleştirilmelidir. Örnek yüzeyi elektronlar ile taranır ve görüntü örnek tarafından salınan ikincil elektronların dedektöre dönüşü ile sağlanır. Dolayısı ile örneğin yüzeyi malzemenin yapısına göre elektronlar tarafından zarara uğrayabilir. Bu yöntem ile elde edilen bilgi DLS uygulamaları ile karşılaştırılabilecek ölçekte olsa da, yöntem pahalı ve zaman alıcıdır. Çoğunlukla da boyut dağılımı için ek özelliklere ve programlara gereksinim duyar [198].

2.4.1.3 Geçirimli elektron mikroskobu (TEM)

SEM ile benzer bir sonuç verse de daha pahalı ve zaman alıcı bir yöntemdir. Örneğin bir film üzerine kaplanması ve elektron geçişi için çok ince olması, nanopartiküllerin cihazın vakum ortamına dayanabilmesi ve kullanım kolaylığı açısından çeşitli kimyasallar veya plastik kullanılarak yüzeye sabitlenmesi gereklidir. Yöntemin uygulanması sırasında nanopartiküllerin yüzey morfolojisi ve karakteristiği yollanan elektronların çok ince olan örneğin içinden geçerek örnekle etkileşimi sonucu elde edilir [198].

2.4.1.4 Atomik kuvvet mikroskobu (AFS)

Çok yüksek çözünürlüklü partikül boyutu elde etmek için AFS yönteminde mikron altı ve atomik ölçekte prob bir uç kullanılır. Bu uç temaslı ve temassız iki farklı mod kullanarak örnek yüzeyi ile etkileşime geçer ve topografik bir harita oluşturur [198]. Temaslı modda prob, uç yüzeyin üzerine dokunarak işlemi gerçekleştirirken temassız mod da uç, iletken yüzeyinde gezinerek topografik haritayı çıkarır. AFM iletken olmayan ve biyolojik/polimer yapıya sahip nanomalzemelerin karakterizasyonu için uygundur [198]. AFM hem en gerçek yüzey görüntüsünü vermesi hem de boyut ve boyut dağılımı bakımından ileri bir matematiksel işleme gerek duymadan en doğru ortalamayı sağladığı için çok avantajlı bir yöntemdir [198].

2.4.1.5 Tek partikül-indüktif olarak eşleştirilmiş-kütle spektrometrisi (SP-ICP-MS)

Bu yöntem temelde ICP-MS gibi element bazlı atomik spektrometri yöntemiyle partikül sayımına dayanan yöntemleri birleştirmektedir. Yöntemin güçlü yanı birden fazla analitik bilgiyi toplu olarak verebilmesidir [199]. SP-ICP-MS uygulamaları temelde her bir partikülün kayıt altına alınmasını içerir [200, 201]. SP-ICP-MS bu amaçla quadropole cihazlar ile birleştirilmiştir ve yöntemin bilgiyi toplama frekansı, uygulanan okuma aralığı, geçişler ve bilginin saklanmasıyla bağlıdır. Geçmişte alıkonma zamanları milisaniyeler mertebesinde olan cihazlar geliştirilmiş olsa da son yıllarda bu aralık mikrosaniyeler düzeyine çekilmiş ve daha hızlı tarama yapan dört kutuplu enstrümanlar üretilmiştir. Daha da ötesi bu yeni cihazlar yerleşme zamanını da ortadan kaldırmıştır [201].

ICP-MS'den farklı olarak SP-ICP-MS sadece elementel bileşim ve elementin kütle konsantrasyonu hakkında değil, aşağıdaki hususlarda da bilgi sahibi olunmasını sağlamaktadır [202].

2.4.2 Yüzey yükü belirleme yöntemleri

Biyolojik çevre ve biyoaktif bileşikler ile elektrostatik etkileşimlerin indirekt bir ölçüsü olan kolloidal kararlılık zeta potansiyel ile belirlenir. Bu potansiyel Helmholtz alanı ile yüzey arasındaki potansiyel farkının bir ölçümüdür ve nanopartiküllerin saklanma kararlılığı hakkında bilgi vermektedir. Negatif veya pozitif değerlerde yüksek zeta potansiyel ölçümü nanopartiküllerinin kümelenmesinin engellenmesi açısından istenen bir durumdur. Zeta potansiyel değeri yüzeyin hidrofobik yapısı ve kaplama maddesi hakkında da bilgi vermektedir [198].

2.4.3 Yüzeyin hidrofobik yapısının belirlenmesi için kullanılan yöntemler

Bu amaçla hidrofobik etkileşim kromatografisi, iki fazlı bölünme, prob üzerine adsorpsiyon, temas açısı ölçümü gibi yöntemler kullanılmaktadır. Özellikle nanopartikül yüzeyine tutunan grupların tayini için son yıllarda kullanılan X-Ray foton korelasyon spektroskopisi sofistike bir yöntemdir [198].

2.4.4 Hedef ilaca cevap yöntemleri

Nanoteknoloji tıp ve biyokimya alanlarında, hapsedilen ilaçların hedef bölgeler ile etkileşime girmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun içinde nanopartikül ile

hapsedilen ilacın birbirinden kolaylıkla ayrılabilir olması gerekmektedir. Nanopartiküle ilaç yüklemesi mg polimer kütlesi başına karşılık gelen mol veya mg cinsinden ilaç olarak tanımlanmaktadır. Tayin için de UV spektroskopisi, yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC), ultrafiltrasyon ve jel filtrasyonu gibi klasik analiz yöntemleri kullanılmaktadır [198].

2.5 Reaktif Oksijen Türlerini Süpürücü Bileşikler

Antioksidanlar vücutta çok düşük konsantrasyonlarda bulunan ve oksidatif süreçleri geciktirip kontrol eden veya bu süreçlerin oluşmasını engelleyen maddelerdir [203]. Antioksidan kelimesi de oksijen tüketiminin engellenmesi anlamından türetilmiştir [204]. İlk kez 19. Yy'da kullanılmaya başlanan antioksidan maddeler, yağların yükseltgenmesini önlemek için endüstriyel süreçlere eklenen yapılar olmaktan uzaklaşıp yiyeceklerin besin değerinin düşmesini önlemek için kullanılan besin katkı maddelerine dönüşmüşlerdir [204, 205]. Yağların bu özelliği yiyeceklerin kötü bir koku ve tat almasını önlemek dışında zararlı bileşiklerin üretilmesine de sebep olmaktadır. Besin maddesinde esansiyel yağların ve vitaminlerin azalmasıyla renk ve görüntüde bozulmayı takiben besin kalitesinde de düşüş gözlenmektedir [206].

Günümüzde antioksidanların yağların reaksiyonlarını önlemek dışında insan vücudundaki yükseltgenme süreçlerine katılarak, oksidatif stres sonucu oluşan diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, felç gibi hastalıkları önleyebildiği bilinmektedir. Bu nedenle yiyeceklerin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi için farklı yöntemler geliştirilmiştir [204].

Bu maddeler endojen (vücutta sentezlenmiş) veya eksojen (dışarıdan alınıp, tüketilen) olarak sınıflandırılıp işleyiş mekanizmalarına göre zincir kırıcı veya önleyici antioksidanlar olarak ikiye ayrılırlar. Önleyici antioksidanlar zincir reaksiyonun başlama hızını azaltırlarken, katalaz gibi enzimler, -ROOH ile reaksiyon veren peroksidazlar, metal iyonu şelatlaştırıcıları ve dietilentriamin pentasetat (DTPA) bu tip antioksidanları oluştururlar. Bu antioksidanlar serbest radikallerin oluşmasını ve onların biyolojik sistemlerle olan etkileşimlerini de önlerler [207, 208]. Zincir kırıcı antioksidanlar ise zincir reaksiyonun oluşumuna girişim yaparak etki eder. Hücre içi antioksidanlar düşük moleküler ağırlığa sahip olan ve kimyasal karakterlerine bağlı olarak hücre içinde farklı bölgelerde bulunan yapılardır. Hidrofilik zincir kırıcılar mitokondri, sitosolik ve çekirdek bölgelerinde bulunurken,

hidrofobik zincir kırıcılar hücre membranında lipidlerin oksidasyonunu engellemektedirler [207].

Antioksidanlar doğal kaynaklarda bulunabileceği gibi yapay olarak da sentezlenebilirler. Bitkiler yapılarındaki fenol/polifenol ve tokoferoller gibi maddeleri sebebiyle doğal antioksidan kaynaklarıdır. Özellikle baharatlar, şifalı otlar, meyveler, sebzeler, tohumlar, çaylar ve yağların yüksek antioksidan kapasitesine sahip olduğu bilinmektedir [220]. Sentetik antioksidanlar, yiyecekleri koruyucu amaçla paketlenmiş gıdalarda yaygın olarak kullanılsa da, son yıllarda tüketicilerin tamamen doğal ve temiz içerikli ürünlere olan taleplerindeki artıştan ötürü, bu yapay moleküller gözden düşmüştür [209]. Genel olarak antioksidanlar; vitaminler, karotenoidler, flavonoidler, fenolik asitler, fenolik alkoller, stilbenler, lignanlar, taninler, sulfur içeren antioksidanlar ve neofom bileşikler olarak farklı gruplarda sınıflandırılırlar [204].

Tokoferoller ilk bulunan antioksidan maddeler olarak zincir kırıcı aktiviteleri ile yağların yükseltgenmesini engellemek için kullanılmışlardır [204]. Doğal tokoferol kaynakları fındık türleri, bitki yağları, baharatlar ve şifalı bitkilerdir [204].

Askorbik asit insan sağlığı için en önemli bulunan antioksidan maddedir ve diğer düşük ağırlıklı antioksidanların aksine, radikal zincirini bozarak toksik ve radikal olmayan ürünlerin oluşmasını sağlar [210]. Ancak çabuk bozulduğu için kararlılığının korunması çeşitli hapsedme yöntemleri ile geliştirilmiştir [211].

İlk antioksidan çalışmaları tokoferoller, askorbik asit ve karotenoidler üzerine odaklanmış ancak daha sonraları fenolik bileşiklerin bu türlerden çok daha kuvvetli antioksidan aktiviteye sahip oldukları keşfedilmiştir. Fenolik bileşikler 6 sınıfa ayrılırlar; flavonoidler, fenolik asitler, fenolik alkoller, taninler, stilbenler, lignanlar. Bu maddelerin yapısındaki aromatik halkanın eşleşmemiş elektronu delokalize ederek kararlı hale dönüştürdüğü düşünülmektedir [212].

Antioksidan maddelerin etkinliği yapısal özellikler, konsantrasyon, sıcaklık, sübstratlar ve sistemin fiziksel hali gibi bazı koşullara bağlıdır. Prooksidanlar ve sinerjistler de bu koşullar arasında sayılabilir [203]. Antioksidanların kimyasal yapısı onların serbest radikallere ve ROS türlerine olan reaktivitelerine etki eder ve reaksiyon kinetiği bu maddelerin uzun veya kısa vadede yükseltgenmeye karşı korunmaları için önemli bir rol oynar [203]. Fenolik maddelerin hidrojen verici ve indirgeyici görev alarak, flavonoidlerin ise serbest radikalleri süpürmeleri ve metal

kompleksleri oluşturarak antioksidan görevlerini yaptığı bulunmuştur [206]. Çizelge 2.2’de antioksidan sınıflarının görevlerine göre dağılımları belirtilmiştir [206].

Çizelge 2.2 : Sınıflarına göre antioksidanlar ve görevleri.

Antioksidan sınıfı	Örnekler	Görevi
Serbest radikal süpürücüler	BHA (bütilli hidroksianisol) BTH (bütilli hidroksitoluen) TBHQ (tert-bütilhidroksikinin) Propil gallat Tokoferoller Baharat ve şifalı bitki özütleri	Hidrojen atomu vererek serbest radikalleri bloke ederler
Oksijen süpürücüler	Askorbik asit Eritorbik asit Askorbatlar Sülfidler, bisülfidler Askorbik palmitat	Oksijen ile reaksiyona girerler
Şelatlaştırma ajanları	Sitrik asit EDTA fosfatlar	Metal iyonlarını şelatlaştırıp yükseltgenme reaksiyonlarını katalizlerler

Bu moleküllerin, yapılarına eklenen hidroksil gruplu sübstitüentler ile antioksidan aktivitelerinin farklılaştığı ve en geniş fenolik bileşikler grubu olan flavonoidlerin B ve C halkarının değişmesi ile flavonlar, izoflavonlar, flavonoidler ve flavanoller gibi pek çok yeni türün oluştuğu bulunmuştur. Sonuçta literatürdeki çalışmalar, yapıdaki halka ve hidroksil grubu sayısına bağlı olarak antioksidan özelliğinin değiştiğini göstermektedir [213]. Fenolik asitler de benzen halkasına bağlı bir karboksilik veya propenoik asit grubunun varlığı ile hidroksinamik ve hidroksibenzoik asit adı verilen iki sınıfa ayrılırlar [204]. Fenolik bileşiklerin en küçük grubunu oluşturan stilbenlerin ise çok düşük konsantrasyonlarda dahi yüksek antioksidan aktivite gösterebilecekleri bulunmuştur. Özellikle şarapta bulunan resveratrolün kardiyovasküler hastalıklar için iyi olduğu bilinse de, sadece şarap tüketimi ile bu moleküllerin terapötik dozlarda alınamayacağı öngörülmektedir [214].

Son yıllarda içecekler üzerinde yapılan çalışmalar, çayın kateşin içeriği bakımından yüksek antioksidan kapasitesine sahip olduğu, üzüm ve üzüm türevlerinin yüksek ise fenolik bileşikler bakımından zengin olduğu bulunmuştur [215]. Meyvelerde yapılan

araştırmalar ise kırmızı ve mor meyvelerde flavonoidler ve fenolik asitlerin varlığını göstermektedir [216]. Wu ve arkadaşları yiyecekleri porsiyon miktarlarına göre lipofilik ve hidrofilik antioksidanlar olarak ikiye ayırmış ve sonuçta; fasulye, elma, vişne, erik, ceviz, brokoli, kırmızı lahana, fıstık ve kırmızı üzümün yüksek antioksidan; balkabağı, soğan, domates, mısır, ekmek, marul ve karpuzun düşük antioksidan içerdiğini bulmuştur [217].

Baharatlar ve şifalı bitkiler de yüksek antioksidan konsantrasyonuna sahiptir ve ilk kez antik Mısır'da 5000 yıl önce hem mumyalama için hem de tıbbi amaçla bitkilerin yaygın olarak kullanıldığını biliyoruz [206]. Baharatlarda ve şifalı bitkilerde fitokimyasallar adı verilen ve yaşlanmaya karşı koruyucu etkisi olduğu bilinen biyoaktif kimyasallar bulunmaktadır [218]. Fitokimyasallar, flavonoidler ve fenolik bileşikler dışında bitki steroller, glukosinolatlar ve diğer sülfür bileşiklerini içerirler [219]. Bitkiler fenolik bileşikler yapısal korunma, pollenleşme, tohum yayma, UV ışığa karşı korunma ve çevreye adaptasyon için üretirler. Pek çok çalışma, biberiye, adaçayı, kekik ve güveyotu gibi bitkilerin yapılarındaki fenolik bileşikler sebebi ile yüksek antioksidan kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir [220].

Baharatlar ve şifalı bitkiler arasındaki fark bitkinin neresinden elde edildiğine bağlıdır. Baharatlar bitkinin yaprak dışındaki diğer tüm bölgelerinden üretilirken, şifalı bitkiler yapraktan elde edilirler. Bu maddeler koku/tatlarına göre, bitkinin elde edildikleri bölgelerine göre 4 farklı sınıfta incelenirler; acı baharatlar (karabiber, hardal, cayenne biberi, acı biber), orta aromalı baharatlar (paprika), aromatik baharatlar (karanfil, kümin, tarçın) ve aromatik bitkiler ve sebzeler (kekik, fesleğen, defne, soğan, sarımsak). Taksonomik bakımdan baharatlar ve şifalı bitkiler, çiçekli bitkilerin angiospermae sınıfına düşerler [206]. Çizelge 2.3'de kaynaklarına göre baharatlar ve şifalı bitkiler açıklanmışlardır [206].

Çizelge 2.3 : Kaynaklarına göre baharatlar ve şifalı bitkiler [206].

Bitkinin bölümü	Baharat/şifalı bitki
Yapraklar	Fesleğen, kekik, defne, güveotu
Gövde	Tarçın
Tohum	Rezene, dereotu
Çiçek	Karanfil, safran
Meyve	Karanfil, acı biber, kara biber ve tüm baharatlar
Soğan	Soğan, sarımsak
Kök	Zencefil, zerdeçal
Kabuk	muskat

Literatürde yapılan çalışmalar ada çayında; karnasol, 12-O-metilkarnosik, rosmanol, kafeik asit, rozmarinik asit, kafeoil türleri, fenolik diterpenler, karnasol, epirosmanol ve flavonoidler, kekikte ise; fenolik asitler (gallik asit, kafeik asit, rozmarinik asit), timol, fenolik diterpenler ve flavonoidler olduğunu gösterir [herbs antiox]. Baharatlar ve şifalı bitkilerden elde edilen antioksidan maddelerin bir kısmı otooksidasyonun başlangıç aşamasında serbest radikaller ile reaksiyona girer, diğer bir kısmı ise metal iyonları ile kompleks oluştururlar [206].

Besinlerin antioksidan içeriği birden fazla antioksidan maddenin kararlı karışımı ile oluşmuş kompleks bir yapıdır. Dolayısı ile antioksidanların birbirleri ile olan etkileşimlerinin de incelenmesine ihtiyaç duyulmaktadır [203]. Yapılan çalışmalarda sinerjizm adı verilen bir etkileşim sebebi ile farklı antioksidan karışımlarının bu antioksidan maddelerin tek tek toplam antioksidan gücünden daha fazla antioksidan etki yaptığı bulunmuştur [220]. Diğer çalışmalarda ise antagonistik etkileşim sebebi ile tokoforellerin fıstık veya biberiye ekstraktları ile karışımının bu maddelerin tek tek antioksidan kapasitelerinden daha düşük antioksidan kapasiteye sahip olduğu bulunmuştur [221]. Bu antagonistik veya sinerjistik etkinin de, antioksidan maddenin ortamdaki konsantrasyonuna bağlı olarak olduğu görülmüştür. Örneğin fenolik bileşikler düşük konsantrasyonlarda antioksidan etki verirken yüksek konsantrasyonlarda kendileri de yükseltgenmeye uğradıkları için pro-oksidan etki yaparak yükseltgenme reaksiyonunu başlatabilmektedirler [222]. Dolayısı ile en uygun beslenme miktarlarının belirlenmesi için konsantrasyona bağlı etkinin ölçüldüğü daha çok çalışma yapılmalıdır.

2.6 Antioksidan Kapasitesinin Ölçümü İçin Kullanılan Yöntemler

2.6.1 Reaktif türleri süpürücü kimyasal yöntemler

Bu amaçla yapılan çalışmalar, in vitro veya in situ olarak sınıflandırılırlar. In vitro çalışmalar serbest radikallerin metal iyonları ile reaksiyonuna dayanırken, in situ çalışmalar hasar görmemiş hücreler ile yapılmaktadır [207].

Toplam antioksidan kapasitesi (TAC) antioksidanların ölçülebilmesi için vücut sıvısında ve plasmada bulunan tüm antioksidanların kümülatif miktarına dayanır ve reaktif oksijen/nitrojen türlerine karşı antioksidan aktivitenin geniş bir spektrumunu vermektedir [223]. Antioksidan kapasitesinin tayini, gerçekleşen reaksiyonun tipine

göre hidrojen atom transferine dayanan yöntemler (HAT) ve elektron transferine dayanan yöntemler (ET) olarak ikiye ayrılırlar [207].

HAT temelli yöntemlerde azo bileşiklerden termal olarak peroksil radikalleri oluşturulur. Antioksidan madde ve sübstrat bu radikaller için yarışmalı mekanizmada görev alırlar. Oksijen radikali absorpsiyon kapasitesi (ORAC), toplam radikal hapsedme antioksidan parametresi (TRAP) ve krosin ağartma yöntemleri bu şekilde çalışmaktadır [207].

ET temelli yöntemlerde ise bir yükseltgen maddenin indirgenmesi ile antioksidan kapasitesi ölçülür. Yöntem yükseltgen maddenin renginin değişmesine dayanır ve renk değişimindeki fark antioksidan maddenin gücünün bir göstergesidir. Folin-Cicalteu toplam fenol içeriği yöntemi (FCR), trolox ekivalenti antioksidan kapasitesi (TEAC), Ferrik iyonu indirgeyici antioksidan gücü (FRAP), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil-hidrat (DPPH) ve Kupric indirgeyici antioksidan kapasitesi yöntemi (CUPRAC) ET yöntemleri arasında sayılmaktadır [207].

HAT ve ET reaksiyonları birbirine paralel olarak aynı sistem içinde de kullanılabilir. Bu durumda daha dominant olan mekanizma antioksidanın yapısına, özelliklerine ve çözünürlüğüne göre belli olur [224].

2.6.1.1 Oksijen radikali absorbans kapasitesi (ORAC)

Bu yöntemde peroksil radikallerinin inhibisyonuna bağlı olarak antioksidan maddelerin radikal zincir reaksiyonlarını kırma yeteneği ölçülür. Peroksil radikalleri biyolojik sistemler ve yiyeceklerde lipidlerin oksidasyonu ile oluşan öncül radikaller olduğu için literatürde bu yöntem antioksidan etkinliğinin biyolojik referansı olarak da görülmektedir [220]. Yöntemde genelde trolox referans madde alınır ve ORAC sonucu trolox ekivalenti cinsinden ifade edilir. Yöntem proton transferine dayanır ve çok kanallı sıvı sistemleri ile birleştirilmiş floresans mikrplaka okuyucular ile çalışır [220]. Yöntemin güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği peroksil radikallerinin üretiminde ortam sıcaklığına doğrudan bağlıdır ve sıcaklığın kontrolü için inkübatöre bağlı floresans plaka okuyucuları geliştirilmişti [220]. Yöntemde prob madde olarak hem proteinden elde edilen doğal floresan maddeler hem de florosein gibi sentetik floresan maddeler kullanılmaktadır [224, 225]. TRAP ve krosin ağartma yöntemleri de ORAC ile aynı prensip ve tekniklere sahiptir. Tıpkı ORAC gibi bu yöntemlerde de peroksil radikalleri azo bileşiklerinden üretilir ve floresans veya UV probu ve bir antioksidan ortamında tayin edilir [220].

2.6.1.2 Kemilüminesans

Hidrojen peroksit sönümleme kapasitesi kemilüminesans yöntemler kullanılarak yapılmaktadır. Kemilüminesans kimyasal bir reaksiyon sonucu emisyon yapan florofor bir gruba enerji transferi veya lüminesans yapan elektronik olarak uyarılmış bir türün üretilmesi ile gerçekleşir. Kemilüminesansa dayanan yöntemlerde lüminesans yapan tür, antioksidan, hidrojen peroksit, metal ve enzimatik bir katalizör ortamda bulunur. Lüminol kemilüminesans maddesi olarak en yaygın kullanılan kimyasaldır [226, 227]. Hidrojen peroksit yükseltgeyici madde olarak bahsedilse de bu amaçla kullanılan ve süpürülen tek ROS türü değildir. Yöntemde kemilüminesans sinyali artırmak için hidrojen peroksit super oksit radikal anyonuna veya hidroksil radikallerine fenton reaksiyonunda katalizör olarak metal veya enzim kullanımı ile dönüştürülmektedir. Bu durum sinyal arttırmakla beraber ortamda birden fazla ROS türü oluşturduğu için sonuçların yorumlanmasını zorlaştırmaktadır [228]. Bu sebepten de hidrojen peroksit halen yöntemde en yaygın kullanılan maddedir. Kemilüminesans yöntemi, hassas oluşu, ucuzluğu ve hızı sebebi ile avantajlı bir yöntemdir [220].

2.6.1.3 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal süpürme yöntemi (DPPH)

DPPH, ET temelli ancak HAT mekanizmasına sahip olan ve antioksidan aktivitesinin tayini için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Yöntem mor renkteki DPPH radikalinin 517 nm’de antioksidanların elektron transferi ile nötralize edilmesine dayanır. Renk giderimi antioksidan etkinliğinin bir ölçütü olarak, antioksidan konsantrasyonuna bağlı DPPH konsantrasyonundaki %50 azalmayı ifade eden, EC_{50} değeri ile açıklanır. EC_{50} değerindeki düşüşün gerçekleştiği süreyi ifade eden T_{EC50} değeri de bu amaçla kullanılabilir. DPPH, bir UV spektrometre veya elektro manyetik rezonans (EPR) cihazı ile kolaylıkla çalışmakta olan ancak ortamda oksijen radikalleri bulunmadığı için gerçek yiyecek örnekleri veya biyolojik sistemlerde antioksidanların çalışmasını taklit edemediği için eleştirilen bir yöntemdir [220]. DPPH yönteminin etkinliği kullanılan çözücünün miktarına ve türüne, hidrojen ve metal iyonlarının konsantrasyonuna ve DPPH reaktifinin tazeliğine bağlıdır [229]. Ortamda antosiyaninler gibi DPPH reaktifi ile aynı dalgaboyunda absorbanı veren bileşiklerin varlığı girişimlere sebep olduğundan bu yöntemin en büyük dezavantajıdır. Bu yüzden EPR yöntemleri sadece renkli çözeltiler için değil, bulanık

örneklerin tayini için de spektrofotometrik yöntemlere göre üstündür [220]. DPPH reaktifi mikrodalga radyasyonu altında EPR spektrumunda karakteristik bir pik'e sahiptir ve bu pik'in şiddeti doğrudan DPPH konsantrasyonuna bağlıdır [220]. EPR dışında amperometrik olarak, elektrik sinyalinin ortamdaki DPPH reaktifinin miktarına bağlı olarak değişmesi ile voltametrik antioksidan kapasitesinin ölçümü de mümkün olmaktadır [230].

2.6.1.4 Troloks ekivalenti antioksidan kapasitesi (TEAC)

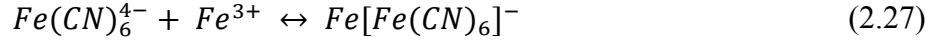
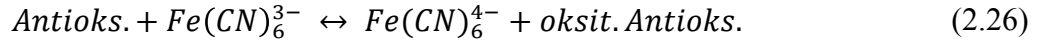
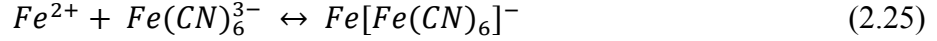
TEAC toplam antioksidan miktarının tayini için ortamdaki kararlı ABTS⁺ (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit)) katyonunun antioksidanlar tarafından süpürülmesini ölçer. ABTS⁺ katyonu 734 nm'de absorbans veren ve ortamdaki antioksidan miktarına bağlı olarak şiddeti azalan yeşil kromofor bir maddedir. Antioksidanlar elektron transferi veya hidrojen atomu transferi ile radikal sönmölüklererek bu katyonu nötrallze ederler. Bu iki mekanizmanın dengesi de ortamın pH'ı ve antioksidan maddenin yapısına bağılıdır [224]. Yani bu yöntem hem ET hem de HAT mekanizmasını uygular. 734 nm'deki absorbansın azalması reaksiyonun süresine, antioksidan aktiviteye ve örneğin konsantrasyonuna bağılıdır [231].

Potasyum persülfat ABTS⁺ katyonu üretimi için en çok kullanılan maddedir [224]. Bu yöntem saf maddelerin, vücut sıvılarının ve bitkilerin antioksidan kapasitelerinin tayininde kullanışlı olmakla beraber mikropılaka ve akış enjeksiyon yöntemleri ile de birleştirilebilir [220].

2.6.2 Redox potansiyeline dayanan yöntemler

FRAP metodu asidik ortamda, antioksidanların Fe³⁺ kompleksini mavi Fe²⁺ kompleksine dönüştürmesini inceler. Antioksidan aktivite 593 nm'de absorbansın artışına bağılı olarak mikromolar Fe²⁺ ekivalenti cinsinden ifade edilir [232]. Yöntem demir iyonlarına dayandığından işlem elektron transferi için pH 3.6 değerinde yürütölür [220]. Demir iyonunu bağlamak için tripiriltriazine, potasyum ferriksiyanür (prusya mavisi) ve ferrozine gibi ligandlar kullanılır [220, 233]. Prusya mavisinin üretilmesine dayanan yöntem iki farklı mekanizma içerir. Bu mekanizmalar prusya mavisinin Fe³⁺ iyonlarını Fe²⁺ iyonlarına indirgemek veya ortamdaki ferriksiyanürü ferrosiyanüre dönüştürmek üzere eşitlik 2.24 ve 2.27 arasında gösterilmiştir [233].

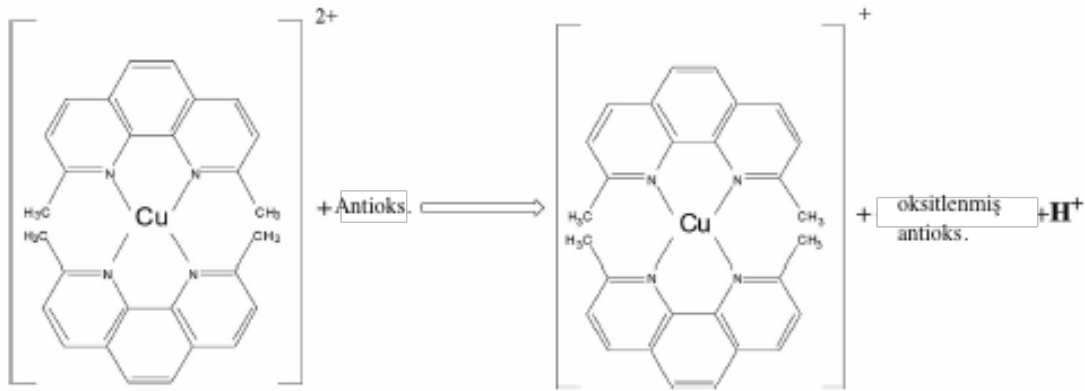




Ferriksiyandır içeren mekanizmada prusya mavisi çökebildiği için $FeCl_3$ 'ün reaksiyon ortamına eklenme zamanı önemlidir. Berker ve arkadaşları bu durumu gidermek için ortama sodyum dodesil sülfat gibi sürfaktanların eklenerek pH değerinin 1.7'ye sabitlenmesini önermiştir [233]. Bu yöntem Berker ve arkadaşları tarafından lipofilik ve hidrofilik antioksidanların tayinini kolaylaştırmak için çözücü olarak su/aseton sistemi ile modifiye edilmiştir [234]. FRAP basit, hızlı ve ucuzdur. Ayrıca son yıllarda hassaslığı, doğruluğu ve tekrarlanabilirliği elektrokimyasal metodlar ile birleştirilerek artırılmıştır [220].

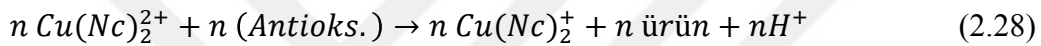
2.6.2.1 Cupric indirgeyici antioksidan kapasitesi (CUPRAC)

Bu yöntem bir ligand ortamında Cu^{2+} iyonunun Cu^{+} iyonuna indirgenmesine dayanır ve neokuprain ligandı ile 450 nm'de absorbans veren bis(neokuprain)bakır(II) $[Cu(II)-Nc]$ kromofor maddesini oluşturur [235]. Bakır(II) neokuprain reaktifi pH 7 değerinde çalışan, kolay bulunan, kararlı ve seçici bir kimyasaldır. Biyolojik öneme sahip tüm antioksidanlara olduğu kadar, yiyecek ve içeceklerde bulunan antioksidanlara da cevap verebilen bir maddedir. Dolayısı ile CUPRAC metodu yiyecek özütlerinden peynire, çaydan şaraba ve içecek türlerine, biyolojik örneklerden boyalara kadar geniş bir uygulama alanına sahiptir [236, 237]. Şekil 2.9'da görüleceği üzere antioksidan ortamında 450 nm'de Bakır(II) neokuprainin indirgenmesi ile turuncu renkli $Cu(I)-Nc$ şelatı oluşur [237].



Şekil 2.11 : CUPRAC reaksiyonu ile bis(neocupraine) bakır(I) şelat katyonu kromofor maddesinin oluşması [237].

CUPRAC reaktifinin antioksidanlar ile verdiği reaksiyon şekil 2.28 ile özetlenebilir.



Reaksiyonda polifenolik antioksidanların Ar-OH grupları kinonlara yükseltgenirken renkli Cu(Nc)_2^{+} şelatı oluşmaktadır. Cu(II/I) neokuprain kompleksinin standart redox potansiyeli Cu(II/I) çiftinin potansiyelinden (0.17 V) 0.6V yüksek olduğu için ortamda bakır iyonlarının fazlası dahi bulunsa yükseltgen madde her zaman Cu(Nc)_2^{2+} 'dir [238]. Dolayısı ile CUPRAC metodu kullanılarak fenolik -OH grupları aril oksil veya kinonlara çok hızlı bir şekilde dönüşebilmektedir. Ancak bu noktada reaksiyonun gerçekleşmesi için kinon/fenol potansiyelinin nötral ortamda Cu(I)/Cu(II) -Nc potansiyelinden daha az olması gerekmektedir [239].

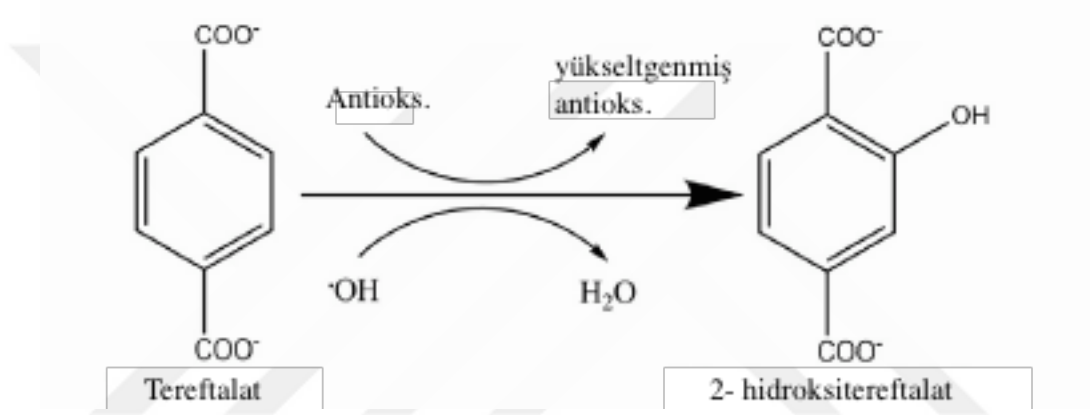
CUPRAC metodu uygulama pH'ı, kararlı reaktiflere sahip olması, kolaylığı, esnekliği ve redox potansiyeli sebebi ile diğer ET metodlarına karşın avantajlıdır [237].

Orjinal yöntem birden fazla uygulamaya sahip olması açısından farklı şekillerde modifiye edilmiştir. Örneğin hidrofilik ve lipofilik antioksidanların tayini veya özütleme ve hidroliz gerektirmeden yiyeceklerin fenolik kapasitelerinin tayini için farklı şekillerde modifiye edilmiştir [240].

Farklı bir modifikasyon yönteminde ise Cu^{2+} -neokuprain kompleksinin 450 nm'de Cu^{+} -neokuprain kompleksine dönüşmesi nasyon film üzerine immobilizasyon ile izlenmiş [241], bir diğerinde absorbans yerine 530 nm'de optik sensörün ışığı yansıtması takip edilmiştir [220]. Böylece sensör kullanımı ile yöntem kolaylaştırılmış ve daha güvenilir hale getirilmiştir.

CUPRAC metodu ile serbest radikallerin süpürülmesi

Bekdeşer ve arkadaşları tarafından orjinal CUPRAC metodu hidroksil radikali süpürücülerinin aktivitesini ölçmek bakımından modifiye edilmiştir [57]. Fe(II)-EDTA ortamında fenton reaksiyonu ile 37C’de 30 dakika bekletilmiş çözelti ortamında üretilen hidroksil radikalleri hem teraftalat probuna hem de ortamdaki süpürücü maddeye saldırarak CUPRAC reaktifine duyarlı hidroksillenmiş probe ürünlerini oluşturmuştur. Şekil 2.10’da belirtilen reaksiyona bağlı olarak süpürücü ortamında daha az hidroksillenmiş prob madde oluşacağından 450 nm’de ölçülen absorbans düşecek ve aradaki absorbans farkından süpürücü maddenin antioksidan kapasitesi dolaylı olarak ölçülebilmıştır [57].



Şekil 2.12 : Teraftlat probu ve süpürücü madde ortamında hidroksil radikalleri için verilen yarışmalı reaksiyonun şematik gösterimi [57].

2.6.2.2 Toplam fenolik içeriği yöntemi

Folin-Ciocalteu yöntemi başta proteinlerin ve proteinlerdeki fenolik amino asitlerin tayini için geliştirilse de sonradan şaraplardaki fenolik maddelerin analizi için uygulanmaya başlanmış ve zamanla yiyecek ve içeceklerdeki toplam antioksidan kapasitesinin tayininde yaygın olarak kullanılan bir yöntem haline gelmiştir [242]. Fosfomolibdik/fosfotungstik asit kompleksi olan Folin-Ciocalteu reaktifi antioksidan ortamında 765 nm’de absorbans veren mavi kromofor maddeye dönüşürken aslında kompleksin molibden merkezi fenolik antioksidandan bir elektron alarak Mo⁶⁺’dan Mo⁵⁺’ya indirgenmektedir [243]. Yöntemde genel olarak gallik asit standart madde olarak kullanılıp sonuçlar gallik asit cinsinden verilse de, çeşitli standardizasyon çalışmalarından sonra kateşin, kafeik asit, ferulik asit cinsinden sonuçların belirtildiği de olmaktadır [244].

Folin-Ciocalteu yöntemi hızlı, basit ve tekrarlanabilir olsa da güvenilir sonuçlar için ortam koşullarının belirlenmesi önemlidir çünkü reaksiyon pH, sıcaklık ve reaksiyon süresine duyarlı bir doğaya sahiptir. Ayrıca sonuçlar yorumlanırken ortamdaki şekerlerin ve bazı amino asitlerin de reaktifin indirgenmesine sebep olduğu unutulmamalıdır [244].

Çözücü maddesi sebebi ile yöntemi lipofilik antioksidanlara uygulamak çok uygun olmadığından Berker ve arkadaşları tarafından NaOH içeren isobütanol/su karışımı kullanılması önerilmiştir [50].

Literatürde kekik türevlerinin antioksidan içeriklerine dair araştırmalar olsa da Türkiye ve Orta Doğu'nun bir kısmına özgü bir bitki türü olan Zahter'in toplam fenolik ve toplam flavonoid içeriklerine dair çok fazla araştırma bulunmamaktadır. Bitki özütleri ve infüzyonlar antioksidan içerikleri bakımından değerlendirilirken toplandıkları bölgeye, toplanma ve saklanma koşullarına göre elde edilen sonuçlar farklılık gösterebilse de bu kısım da zahter üzerine yapılmış birkaç araştırmanın sonuçlarından bahsedilecektir. Türkmen ve arkadaşları tarafından Kilis'teki yerel marketlerden elde edilen 6 çeşit kahvaltılık zahter türü Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak toplam fenolik içeriği, DPPH yöntemi kullanılarak radikal süpürme kapasitesi ve agar difüzyon metodu ile *Staphylococcus aureus* ATTC25923 ve *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603 bakterilerine karşı antibakteriyel aktivitesi açısından incelenmiştir. Gallik asit eşdeğerliği bakımından toplam fenolik içerik incelenen zahter türlerinde 1200-5500 mg/L arasında değişkenlik gösterirken en yüksek içerik ev yapımı kahvaltılık zahter türünde bulunurken, antioksidan kapasiteleri inhibisyon yüzdesi bakımından %78.2 ile %91.4 arasında değişen değerler vermiştir [48]. Gümüş ve arkadaşları tarafından yapılan farklı bir zahter analizinde ise bahçe kekiği ve zahter gama radyasyona maruz bırakıldıktan sonra gama radyasyon miktarına bağlı olarak içeriklerindeki değişim izlenmiştir. Bu çalışmada toplam fenolik içerik yine Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak bulunurken, antioksidan aktivitenin tayini fosfomolibden metodu ve radikal süpürme kapasitesi DPPH metodu kullanılarak bulunmuştur. Artan Gama radyasyonu miktarlarına karşılık gallik asit ve asetik asit eşdeğerliği bakımından toplam fenolik içerik ve antioksidan aktivitesi Çizelge 2.4'te gösterildiği şekilde bulunmuştur [49]

Çizelge 2.4 : *T. vulgaris* ve *T. spicata* toplam fenolik içerik ve antioksidan aktivetelerinin gama radyasyona bağlı olarak değişimi [49].

Bitkiler	Uygulama	Gallik asit eşdeğerliği (mg/g)	Askorbik asit eşdeğerliği (mg/g)
<i>Thymus Vulgaris</i>	Kontrol	35.30	172.85
	1.2 kGy	23.46	152.18
	3.0 kGy	21.77	153.47
	5.1 kGy	21.77	154.62
<i>Thymbria Spicata</i>	Kontrol	75.19	216.80
	1.2 kGy	57.27	205.21
	3.0 kGy	75.19	263.65
	5.1 kGy	55.58	210.32

Literatürde DPPH, FRAP ve toplam fenolik içeriği yöntemleri kullanılarak Kekiğin antioksidan kapasitesi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre FRAP yöntemi ile antioksidan içeriği 56.3 mmol/100 g, DPPH yöntemi ile %52 inhibisyon, TPC ile 23.24 mg/g konsantrasyon bulunmuştur [245]. Yapılan çalışmalarda aynı bitki için farklı fenolikler içeriklerin bulunması, ortamda farklı çözücülerin kullanılması ve bitkinin farklı bölgelerden toplanmış olması bakımından oldukça normaldir [206].

2.6.3 Diğer yöntemler

Demir ve bakır dışında redoks reaksiyonu ile kullanılan diğer iyonlar; gümüş, altın, seryum ve krom'dur. Tri-sodyum sitrat ortamında Ag^+ iyonlarının Ag^0 'e indirgenmesi Özyürek ve arkadaşları tarafından 430 nm'de ölçülmüştür [246]. Benzer bir yöntem gümüş yerine altın iyonlarını setiltrimetilamonyum bromür ortamında takip etmektedir [220]. Ce^{4+} iyonlarının Ce^{3+} iyonlarına indirgenmesine dayanan Ceric indirgeyici antioksidan gücü (CERAC) yöntemi 320 nm'de spektrofotometrik ölçüme dayanmaktadır [53]. Krom indirgeyici antioksidan gücü yöntemi (CHROMAC)'ta ise Cr^{6+} iyonlarından Cr^{3+} iyonlarının oluşumu 540 nm'deki absorbansın artışı ile ölçülmektedir [247].

Farklı metallerin indirgenmesine dayanan bu yöntemlerde, önemli olan ortamdaki antioksidanları yükseltmeyecek ancak diğer türleri etkilemeyecek kadar güçlü olan yükseltgeyici maddeyi bulabilmektir [220].

2.7 Reaktif Oksijen Türlerini Tanımlamada Kullanılan Spektrometrik Problar

Bartosz tarafından spektroskopik prob, ROS ile reaksiyon verdikten sonra spektroskopik özelliklerini değiştiren madde olarak tanımlanmakta ve ideal bir prob tek bir ROS türüne duyarlı ve o türün düşük konsantrasyonlarında dahi etkili olabilen kimyasal bir madde olarak kabul görmektedir [248]. Aslında Elektron spin rezonans ve paramanyetik rezonans yöntemleri eşleşmemiş elektronları doğrudan gördüğünden radikal tayininde kullanılabilen yöntemler olsa da, bu yöntemlerin farklı reaksiyon koşullarında düşük hassasiyete sahip olmaları, yöntemin kendisinin uzmanlık gerektirmesi ve pahalı olması sebebi ile alternatif yöntemlere ihtiyaç duyulmuştur [248]. Bu sebeple spektrofotometrik prob maddeler uygulama kolaylığı bakımından tercih edilmektedir. Spektrofotometrik problemler haricinde floresans ve luminometrik problemler de özellikle hücre kültürü, DNA ve doku uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Çünkü bu yöntemler uygulama alanlarında spektrofotometrik problemlere göre daha hassas sonuç vermektedir [248]. Spektrofotometrik problemlerin seçiminde probun ve oluşturduğu ürünlerin kararlılığı, yükseltgen maddeye duyarlılığı, istenmeyen yan reaksiyonlar verip vermediği gibi konular dikkate alınmalıdır [248].

Spektrofotometrik problemlerin kullanımında karşılaşılan bazı sorunlar şu şekilde özetlenebilir;

- Prob madde kararsız olabilir; Literatürde kullanılan pek çok prob madde hem yükseltgenmeye karşı sınırlı kararlılığa sahiptir hem de bu özelliği nedeni ile pahalı, özel ve zorlu saklama koşullarına sahiptir, ancak raf ömürleri beklenenden daha uzundur [248].
- Prob ile oluşan ürün kararsız olabilir; Reaksiyon ile oluşan ürünler prob maddenin kendisinden daha kararsız olabilir. Bu durum özellikle nitroksit ürünlerinde sıklıkla görülebilir [1].
- Prob öncül maddelerinin hidrolizinden oluşan problemler; Bazı problemler hidrolize uğramadan reaksiyon vermeme eğilimindedir ve hidroliz bu problemlerin daha kararlı olmasına da yardımcı olmaktadır. Ancak hücre içinde gerçekleşen bu deneylerde hidroliz olayı deneyi sınırlayıcı etki göstermekte ayrıca diğer maddelerin hidrolizini de tetikleyebilmektedir [249].

- Prob maddeler ROS ile reaksiyonlarında seçici olmaktan uzaklaşabilir; Genel olarak prob maddenin ROS spesifik reaksiyon vermesi zor olup ortamdaki diğer biyolojik olarak aktif maddeler ile girişim yapabilir [248].
- ROS tayini için kullanılan bazı prob maddelerin kendileri ROS üretebilir; Bu durum özellikle lusijenin kullanılan reaksiyonlarda gözlenmiştir [250].
- Prob madde istenilen bölgede işlemeyebilir; Özellikle hücre çalışmalarında prob maddeler hücre zarlarına geçişte sınırlı etki gösterebilirler. Ancak bu durumda bu tür problemlerin hücre dışı ortamda kullanımlarına yol açtığı için bir avantaj olarak da görülebilir [248].

Bekdeşer ve arkadaşlarının CUPRAC metodunu kullanarak yaptıkları hidroksil radikali süpürme çalışmasında tereftalat probu kullanılarak optik bir sensor üretilmiştir. Sensör CUPRAC metodu kromojenik ajanı olan Cu(II)-Nc kompleksinin elektrostatik olarak nasyon katyon-değişim membranına tutturulması ile çalışır. Fenton reaksiyonu ile üretilen hidroksil radikallerinin tereftalat probu ve süpürücü madde ortamındaki yarışmalı reaksiyonu ikinci dereceden reaksiyon sabiti bulunarak incelenmiştir. Sonuç olarak prob maddenin %50'sinin optimum koşulda hidroksillenmiş 2-hidroksitereftalat formuna dönüşebildiği ve oluşan tek ürünün Tiyobarbitürik asit reaktif türleri (TBARS) testinde elde edilen ürünlerden daha spesifik çalıştığı anlaşılmıştır [57]. Metilen mavisi ile yapılan bir çalışmada filtre kağıtları 1.0 mM metilen mavisi çözeltisine batırılarak öncelikle indikatör kağıtlar hazırlanmış ardından fenton reaksiyonu ile üretilen hidroksil radikallerinin indikatör kağıtlarında oluşturdukları renk değişimi kalitatif olarak incelenmiştir. Aynı yapılan bir denemede de hidroksil radikallerinin benzoik asit ile renksizden açık pembeye olan renk değişimleri izlenmiş ve oluşan en son mor rengin benzoik asitin hidroksillenmesi ile oluşan salisilik asite bağlı olduğu düşünülmüştür. Oluşan mor renkli çözeltinin absorpsiyon piki 520 nm'de ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar ince tabaka kromatografisi kullanılarak karşılaştırılmıştır [251]. Rhodamin B çözeltisi de renk değişimi açısından radikal çalışmalarında tercih edilmektedir. Liu ve arkadaşları tarafından Okzalik asit ortamında rhodamin B'nin degradasyonu katı ferrit nanopartikülleri ile katalizlenen heterojen foto-fenton reaksiyonunda üretilen hidroksil radikalleri ile izlenmiştir. Sentezlenen partiküllerin elde edilen TEM sonuçlarına göre 10 nm partikül büyüklüğüne sahip olduğu bulunmuştur. Ortama ferrit nanopartiküllerinin eklenmesi ile rhodamin B'nin absorpsiyon pikinde %98 oranında azalma olduğu gözlenmiştir [252]. Suda çözünen antioksidanların hidroksil

radikali süpürme kapasitesinin incelenmesi amacı ile Özyürek ve arkadaşları tarafından 2,4-dimethoksibenzoik asit prob maddesi süpürücü antioksidan maddenin olduğu ortama eklenerek yarışmalı reaksiyon ile CUPRAC absorpsiyonundaki azalma takip edilmiştir [239]. Fenolik ve flavonoid içeriğe sahip antioksidanların hidroksil radikali süpürme kapasitelerini belirlemek amacı ile öncelikle dihidroksibenzoat izomerleri HPLC yöntemi uygulanarak birbirinden ayrılmış ve salisilat, hidroksil radikali toplama ajanı olarak CUPRAC absorbansındaki değişime bağlı takip edilmiştir [54]. Bunların dışında hidroksil radikallerinin takibinde kullanılan floresans problemler de bulunmaktadır. 4-(9-antroloksi)- 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksi, 1,3-sikloheksandion, kumarin ve kumarin-3-karboksilik asit ve floresein bahsedilebilir [253]. DMPD katyonu literatürde özellikle meyve, sebze ve şarapların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmakla beraber buğday ve yulaf türevlerinin antioksidan kapasitesinin anlaşılması için Rodriguez-Nogales ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. Bu yöntem Demir(III) ve DMPD karışımının kromofor $DMPD^+$ katyonunu oluşturması ve antioksidan madde varlığında bu katyonun 520 nm’de renk değişiminin kolorimetrik olarak ölçülmesine dayanmaktadır. Katyonun pembe renginin antioksidan varlığında renksiz hale dönüşmesi örneğin antioksidan gücünün bir şekli olarak yorumlanmış ve bu yöntem ile kepekli buğdayın en yüksek antioksidan kapasitesine sahip olduğu bulunmuştur [254]. DMPD katyonunun kullanıldığı bir diğer çalışmada ise Çekiç ve arkadaşları tarafından nafyon membran üzerindeki anyonik sülfonat gruplarının DMPD katyonu ile olan elektrostatik etkileşimleri incelenmiştir. Bu yöntemde DMPD katyonu foto-fenton ve zantan oksidaz metodları ile üretilen reaktif oksijen türlerinin DMPD kromofor maddesi ile reaksiyona girmesi ile elde edilmiştir. Nafyon sensör üzerindeki renk değişimi 514 nm’de izlenmiş ve yöntem sentetik ve gerçek antioksidan çözeltilere uygulanmıştır [255].

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Cihazlar

DMPD yönteminin optimizasyonu ve zahter analizleri için bandelin sonorex ultrasonic banyo, chilterln manyetik karıştırıcılı ısıtma cihazı, Hermle 206 A santrifüj cihazı, Whatman marka mavi ve siyah bantlı süzme kağıdı, Knick marka pH metre cihazı ve heidelph vortex kullanılmıştır. DMPD ve CUPRAC yöntemlerinde absorbans ölçümleri için Varian Cary 100 bio UV_Vis spektrometre cihazı kullanılmıştır. Sulu çözeltilerin hazırlanması için kullanılan deiyonize su Simplicity UV (M) markalı cihazda üretilmiştir.

3.2 Kimyasallar, Standartlar Ve Örnek Hazırlama

Kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır ve Merck firmasından tedarik edilmiştir. Tüm sulu çözeltilerin hazırlanmasında MiliQ deiyonize su kullanılırken, alkol çözeltileri %95 saflıkta ethanol ile hazırlanmıştır.

3.2.1 Nanoceria sentezi ve Zahter analizinde kullanılan kimyasallar

Nanoceria partiküllerinin sentezi için yerel marketlerden (Malatya Pazarı Kuruyemişçilik San. Ve Tic. A.Ş.) tedarik edilen kuru zahter, seryum(III) nitrat hekzahidrat ve sodyum karbonat, sodyum hidroksit, nişasta ve partiküllerin yıkanması için 1:1 oranında saf aseton ve su çözeltisi kullanılmıştır.

Zahter infüzyonunun fenolik ve antioksidan içeriğinin incelenmesi amacı ile yapılan çalışmada Folin Ciocalteu ayırıcı, izobütil alkol, sodyum hidroksit, sodyum karbonat, bakır(II) sülfat, sodyum potasyum tartarat, gallik asit, seryum(IV) nitrat, sodyum sülfat, sodyum nitrat, alüminyum klorür hekzahidrat ve kateşin kullanılmıştır.

3.2.1.1 Klasik yöntem ile nanoceria partiküllerinin sentezi

3,0 g katı $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 100 mL ultra saf su içinde çözüldü. Oda sıcaklığında, açık havada manyetik karıştırıcı ile 15 dakika boyunca 500 rpm’de karıştırıldı. Daha sonra 2,0 M NH_4OH çözeltisinden yaklaşık 15.0 mL bu karışıma pH 9,5 değerine ulaşana kadar damla damla ilave edildi. $\text{Ce}(\text{OH})_3$ bileşiğinin düşük çözünürlüğü ($K_{\text{ç}}=7,10^{-21}$) nedeniyle aniden açık kahverengi çökeltiler oluştu. Karıştırma hızı 1300 rpm’e çıkarılarak 1 saat boyunca oda sıcaklığında işleme devam edildi (pH 9,5). Şekil 3.1’de de görüleceği üzere reaksiyon ilerledikçe öncelikle mora dönen partikül rengi, hidroksil iyonlarının bulunduğu ortamda havadaki oksijenin de etkisi ile $\text{Ce}(\text{OH})_4$ çökeltisinin oluşumunu takiben sarı rengini aldı.



Şekil 3.1 : Nanoceria partiküllerinin sentez aşamaları.

Çökmenin tamamlanması için 30 dakika beklendi. Ardından dekantasyon işlemi yapıldı ve oluşan nanopartiküller Whatman Mavi bantlı süzgeç kâğıdından süzüldü. Çökeltiler üç kez yıkandı ve safsızlıklardan giderilmesi sağlandı. Filtre edilen seryum oksitler 30°C, 50°C ve 80°C’de etüvde kurutuldu [256].

3.2.1.2 Nişasta ile Nanoceria Partiküllerinin Sentezi

0,2 g nişasta 20 mL distile su çözeltisinde çözülmüş ve hazırlanan nişasta çözeltisi 60°C’ye kadar ısıtılmıştır. 60°C’deki çözeltinin içine 0,5 M $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ çözeltisinden 80 mL eklenmiş ve karışım 30 dakika boyunca sürekli karıştırma yapılarak 80°C’ye kadar ısıtılmıştır. 80°C’deki karışıma damla damla 1M NH_3 çözeltisi pH değeri 9-10 arasında olana kadar eklenmiştir. Oluşan beyaz çökelti iki kez aseton ile yıkanmış, santrifüj ile toplanmış ve hava atmosferinde 50-60°C arasında kurumaya bırakılmıştır [210].

3.2.1.3 Zahter ortamında nanoceria partiküllerinin sentezi

100 mL deiyonize su 60°C'ye ısıtıldıktan sonra 10g kuru zahter, infüzyon hazırlamak üzere sıcak suya eklenir ve 15 dakika sonra siyah bantlı süzme kağıdı kullanılarak süzülür. Toplam hacim 100 mL olacak şekilde deiyonize su zahter infüzyonuna eklenir. 15.0 g Seryum(III) nitrat hekzahidrat katısı mevcut zahter infüzyonu ile karıştırıldıktan sonra ortam sıcaklığı 80°C'ye gelene kadar sabit karıştırma ile artırılır. 80°C'deki karışıma damla damla 1M sodyum karbonat çözeltisi karışım pH değeri 9-10 arasında olana kadar ilave edilir. Bu aşamada oluşan açık kahverengi nanopartiküller 80°C'de 4-6 saat arası sabit karıştırmanın ardından 30 dakika boyunca ultrasonifikasyona maruz bırakılır ve aseton/su karışımı ile üçer kez yıkanır. Süzülen partiküller 70°C'de kurutulur. Kurutulan partiküller agat havanda ince toz haline gelinceye kadar öğütülür.

3.2.1.4 Zahterin klasik folin-ciocalteu yöntemi ile analizi

Lowry A çözeltisi kütlece %2'lik sodyum karbonat ve 0.1 M sodyum hidroksit çözeltilerinin karıştırılması ile hazırlanmıştır. Lowry B çözeltisi ise kütlece %0.5'lik bakır(II) sülfat çözeltisinin kütlece %1'lik sodyum potasyum tartarat içinde çözülmesi ile hazırlanmıştır. Lowry C çözeltisi 50 mL Lowry A ve 1 mL lowry B çözeltisinin karışımından oluşmaktadır. Ana yöntem için 1,80 mL su ve 200 µL zahter infüzyonu karıştırıldıktan sonra 2,50 mL Lowry C çözeltisi ortama eklenmiş ve karışım karanlıkta 10 dakika bekletilmiştir.

Üzerine 0,25 mL folin reaktifi ve toplam hacim 4.75 mL olacak şekilde su ilave edilen çözeltinin 30 dakikalık inkübasyon süresi sonrası köre karşı 750 nm'de absorpsiyon değerleri ölçülmüştür.

Gallik asit ekivalenti cinsiden hesaplamaların yapılabilmesi için standard gallik asit çözeltileri $10^{-6}M$ - $10^{-3}M$ konsantrasyonları arasında olacak şekilde $10^{-3}M$ stok çözeltinin seyreltilmesi ile hazırlanmıştır.

Zahter infüzyonu her çalışmada taze olacak şekilde 10g katı zahter 60°C'de 100 mL deiyonize suyun içinde 15 dk bekletilip süzülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan infüzyondan 0.2 mL, 10 mL hacme sahip balon joje içerisinde su ile seyreltilerek zahter çözeltisi hazırlanmıştır.

3.2.1.5 Zahterin modifiye folin-ciocalteu yöntemi ile analizi

İzobütil alkol ile Folin Ciocalteu ayırıcı 1:2 oranında olacak şekilde karıştırılmış ve oluşan çözelti 1500 rpm'de 1 dk boyunca vortex'de bekletilmiştir. Tüpte oluşan sarı renkli üst fazdan 300 µL hacme sahip olan bir kısım sırasıyla 200 µL zahter infüzyonu, 3,5 mL ve 0,1M NaOH çözeltileri ile karıştırılmış ve toplam hacim 10 mL olana kadar saf su eklenmiştir. Çözelti oda sıcaklığında 20 dakika bekledikten sonra 665 nm'de kör çözeltiye karşı absorbans değerleri ölçülmüştür. Gallik asit ekivalenti cinsiden hesaplamaların yapılabilmesi için standard gallik asit çözeltileri 10^{-6} M - 10^{-3} M konsantrasyonları arasında olacak şekilde 10^{-3} M stok çözeltinin seyreltilmesi ile hazırlanmıştır.

Zahter infüzyonu her çalışmada taze olacak şekilde 10g katı zahter 60°C'de 100 mL deiyonize suyun içinde 15 dk bekletilip süzülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan infüzyondan 0.2 mL, 10 mL hacme sahip balon joje içerisinde su ile seyreltilerek zahter çözeltisi hazırlanmıştır.

3.2.1.6 Zahterin toplam antioksidan içeriğinin CERAC yöntemi ile incelenmesi

Bir test tüpün içerisinde 2×10^{-3} M Ce(IV) çözeltisinden 1 mL ve 1 M Na_2SO_4 çözeltisinden 7 mL karıştırılarak toplam hacim 10 mL olacak şekilde x mL zahter infüzyonu eklenmiştir. Karışım 30 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletildikten sonra 320 nm'de köre karşı absorbans değeri ölçülmüştür. Gallik asit ekivalenti cinsiden hesaplamaların yapılabilmesi için standard gallik asit çözeltileri 10^{-6} M - 10^{-3} M konsantrasyonları arasında olacak şekilde 10^{-3} M stok çözeltinin seyreltilmesi ile hazırlanmıştır.

Zahter infüzyonu her çalışmada taze olacak şekilde 10g katı zahter 60°C'de 100 mL deiyonize suyun içinde 15 dk bekletilip süzülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan infüzyondan 0.2 mL, 10 mL hacme sahip balon joje içerisinde su ile seyreltilerek zahter çözeltisi hazırlanmıştır.

3.2.1.7 Zahterin Alüminyum klorür testi ile incelenmesi

Sırasıyla x mL ekstrakt/kateşin, (5-x) mL distile su ve kütlece %10'luk NaNO_2 çözeltisinden 0.2 mL karıştırılarak 10 dakika bekletilmiştir. Ardından aynı tüpe 0,4 mL kütlece %10'luk $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ile 1M NaOH çözeltisinden 1 mL eklenmiştir. Oluşan çözeltinin kör çözeltiye karşı 510 nm'de absorbsiyon değeri kateşin ekivalenti bakımından incelenmiştir. Kateşin ekivalenti cinsiden hesaplamaların

yapılabilmesi için standard kateşin çözeltileri $5 \cdot 10^{-6}$ M- $2 \cdot 10^{-5}$ M konsantrasyonları arasında olacak şekilde 10^{-3} M stok çözeltinin seyreltilmesi ile hazırlanmıştır.

Zahter infüzyonu her çalışmada taze olacak şekilde 10g katı zahter 60°C’de 100 mL deiyonize suyun içinde 15 dk bekletilip süzülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan infüzyondan 0.2 mL, 10 mL hacme sahip balon joje içerisinde su ile seyreltilerek zahter çözeltisi hazırlanmıştır.

3.2.2 3. Nanoceria ortamında üretilen reaktif türlerin DMPD probu ve CUPRAC yöntemi ile incelenmesi için kullanılan kimyasallar

DMPD probu ile yapılan kolorimetrik radikal tayini çalışmalarında zahter ortamında sentezlenen nanoceria partikülleri, kütlece %30’luk hidrojen peroksit ve DMPD reaktifi kullanılırken, CUPRAC yöntemi ile gerçekleşen radikal süpürme çalışmalarında Bakır(II) klorür, neokuprain, amonyum asetat tamponu ve katalaz enzimi kullanılmıştır. Her iki yöntemde de antioksidan standartları olarak kateşin (CAT), gallik asit (GA), kuersetin (QR), naringenin, ferulik asit (FA) ve troloks (TR) tercih edilirken, gerçek bitki infüzyonlarının hazırlanmasında yeşil çay, ada çayı, ıhlamur ve kuşburnu çayları Lipton çay poşetleri şeklinde yerel marketlerden, diğer tüm çay örnekleri ise açık olarak Malatya pazarından tedarik edilmiştir.

3.2.2.1 DMPD probu ile geliştirilen yöntem için örnek hazırlama

Nanoceria süspansiyonları 2000 ppm konsantrasyona sahip ortamdan seyreltmeler yapılarak hazırlanmıştır. Bunun için 0.20g katı nanoceria 100 mL miliQ deiyonize su içerisinde karıştırılarak taze olarak hazırlanmıştır. Süspansiyon ardından 30 dakika boyunca ultrasonic banyoda bekletilmiştir. İşlem her gün ve her çalışmadan önce tekrarlanmıştır.

60 mM hidrojen peroksit çözeltisi kütlece %30’luk stok çözeltinin seyreltilmesi ile hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti potasyum permanganat kullanılarak titrimetrik olarak standardize edilmiştir.

0.1 M DMPD çözeltisi 2.09g DMPD katı maddesinin toplam hacim 100 mL olacak şekilde deiyonize su içerisinde çözülmesi ile hazırlanmıştır.

Antioksidanların stok çözeltileri günlük olarak son konsantrasyonları $1,0 \times 10^{-3}$ M olacak şekilde etanol içerisinde hazırlanmıştır. Bu amaçla öncelikle yaklaşık 2.0 g ağırlığındaki hazır Lipton çay poşetleri 250 mL kaynar su içerisinde 3 dakika boyunca bekletilip oda sıcaklığına soğumaları sağlanmış ve her kullanımdan önce

seyreltilmiştir. Açık olarak satın alınan diğer çay örnekleri için ise 1.0g çay 100 mL kaynar su içerisinde 3 dakika bekletilmiş ve oda sıcaklığına soğutulmuştur. Çay infüzyonları deiyonize su kullanılarak 1:5 oranında seyreltilmiştir.

3.2.2.2 DMPD probu ile geliştirilen yöntemin optimizasyonu

Nanoceria ile katalizlenen reaktif türlerin incelenmesinde, DMPD prob maddesi kullanılarak geliştirilen yöntemin optimizasyonu için aşağıda belirtildiği şekilde 8 farklı parametre incelenmiştir. Optimizasyon sırasında istenen konsantrasyona sahip nanoceria süspansiyonu, deiyonize su kullanılarak her gün taze olarak hazırlanmış ve kullanımdan önce 15 dakika boyunca ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Hazırlanan çözeltiler 10 saniye vortex ile karıştırılıp oda sıcaklığında 15 dakika bekletildikten sonra santrifüj edilerek, 515 nm’de absorbans değeri ölçülmüştür. Her bir aşamada bir önceki optimizasyon verisi kullanılarak prosedür modifiye edilmiştir. Sırasıyla hidrojen peroksit, DMPD ve nanoceria konsantrasyonları, reaksiyon süresi, sıcaklığı, pH değeri ve kullanılan çözücü etkisinin incelenmesi için takip edilen prosedür aşağıda madde madde açıklanmıştır. Her bir yöntemde reaktifler belirtilen sıraya sadık kalınarak test tüp içerisinde karıştırılmışlardır. Sıcaklık çalışmasında hızlı renk değişiminin önüne geçmek için tüpler farklı derecedeki su banyolarında 5 dakika bekletilmişlerdir. Süre optimizasyonunda 0-90 dakika aralığında yapılan bekletme süresi sonrası çözelti hemen santrifüj edilmiştir. Ancak 30 dakikadan sonra DMPD reaktifinin pembe renginin ek reaksiyonlardan ötürü mora döndüğü ve 515 nm’de absorbans değerinde düşme olduğu gözlenmiştir. En uygun pH değerinin tesbiti için yapılan çalışmada asidik ortamda DMPD reaksiyonunun doğrudan pembe renk verdiği oluşan rengin nanoceria süspansiyonunun eklenmesi ile azaldığı, bazik ortamda ise pembe rengin yerini sarılığın aldığı gözlenmiştir. çözücü etkisinin incelenmesi için çözücü olarak su, etanol ve su/etanol karışımları kullanılmıştır.

Hidrojen peroksit konsantrasyonunun optimizasyonu:

- 0,25 mL farklı konsantrasyonlarda hidrojen peroksit çözeltisi (2,0-100 mM) + 1 mL 5×10^{-3} M DMPD+ 3,75 mL deiyonize su + 2,0 mL 2000 ppm nanoceria süspansiyonu.

DMPD konsantrasyonunun optimizasyonu:

- 0,25 mL 60 mM hidrojen peroksit + 1 mL farklı konsantrasyonlarda (10^{-7} M– 10^{-2} M) DMPD+ 3,75 mL deiyonize su + 2,0 mL 2000 ppm nanoceria süspansiyonu.

Nanoceria konsantrasyonunun optimizasyonu:

- 0.25 mL 60 mM hidrojen peroksit + 1 mL 8×10^{-4} M DMPD+ 3.75 mL deiyonize su + 2.0 mL farklı konsantrasyonlarda (200-2000 ppm) nanoceria süspansiyonu.

Reaksiyon ortamının sıcaklığının optimizasyonu:

- 0.25 mL 60 mM hidrojen peroksit + 1 mL 8×10^{-4} M DMPD+ 3.75 mL deiyonize su + 2.0 mL 800 ppm nanoceria süspansiyonu

Reaksiyon süresinin optimizasyonu:

- 0.25 mL 60 mM hidrojen peroksit + 1 mL 8×10^{-4} M DMPD+ 3.75 mL deiyonize su + 2.0 mL 800 ppm nanoceria süspansiyonu.

Reaksiyon ortamının pH değerinin optimizasyonu:

- 0.25 mL 60 mM hidrojen peroksit + 1 mL 8×10^{-4} M DMPD+ 3.75 mL deiyonize su + 2.0 mL 800 ppm nanoceria süspansiyonu.

3.2.2.3 Nanoceria ile katalizlenen reaktif türlerin DMPD probu ile % süpürülme değerlerinin incelenmesi

Oluşan reaktif türlerin standart antioksidan çözeltileri ve bitki infüzyonları ile süpürülme değerlerinin incelenmesi amacıyla aşağıda açıklanan örnek hazırlama prosedürü takip edilmiştir. 800 ppm nanoceria süspansiyonundan 2.0 mL, 60 mM hidrojen peroksit çözeltisinden 0.25 μ L ve 2.75 mL saf etanol iki farklı test tüp içerisinde sırası ile karıştırılmıştır. Birinci tüpe 1 mL deiyonize su eklenirken ikinci tüpe 1 mL süpürücü madde (antioksidan veya bitki infüzyonu) eklenmiştir. Son reaktif olarak 1 mL $8,0 \times 10^{-4}$ M DMPD eklenmesiyle karışımlar oda sıcaklığında 30dk bekletilmiş ve 515 nm’de absorbands değerleri ölçülmüştür. Yukarıda bahsedilen yöntemde antioksidan ile yapılan standard çalışmalarda 1 mL antioksidan çözeltisi, çay infüzyonlarının kullanıldığı çalışmalarda ise 0.5 mL çay infüzyonu ve 0.5 mL deiyonize su karışımı kullanılmıştır.

3.2.2.4 Nanoceria ile katalizlenen reaktif türlerin CUPRAC yöntemi ile % süpürülme değerlerinin incelenmesi

Oluşan reaktif türlerin standart antioksidan çözeltileri ve bitki infüzyonları ile süpürülme değerlerinin incelenmesi amacıyla aşağıda açıklanan örnek hazırlama prosedürü takip edilmiştir. CUPRAC reaktifi 1.0×10^{-2} M CuCl_2 çözeltisinden 1 mL, 7.5×10^{-3} M Neokuprain çözeltisinden 1 mL ve 1.0 M pH 7 değerine sahip amonyum

asetat tamponundan 1 mL karıştırılarak hazırlanmıştır. Kör çözelti ise 1.0×10^{-2} M CuCl_2 çözeltisinden 1 mL, 7.5×10^{-3} M Neokuprain çözeltisinden 1 mL ve 1.0 M pH 7 değerine sahip amonyum asetat tamponundan 2.1 mL içermektedir. Antioksidanların stok çözeltileri 1.0×10^{-3} M konsantrasyona sahip olacak şekilde etanol içerisinde günlük olarak hazırlanmıştır. Bu amaçla öncelikle yaklaşık 2.0 g ağırlığındaki hazır Lipton çay poşetleri 250 mL kaynar su içerisinde 3 dakika boyunca bekletilip oda sıcaklığına soğumaları sağlanmış ve her kullanımdan önce seyreltilmiştir. Açık olarak satın alınan diğer çay örnekleri için ise 1.0g çay 100 mL kaynar su içerisinde 3 dakika bekletilmiş ve oda sıcaklığına soğutulmuştur. Çay infüzyonları deiyonize su kullanılarak 1:5 oranında seyreltilmiştir. Katalaz çözeltisi 0.2 M pH 7.4 değerine sahip fosfat tamponu içerisinde ilk aktivitesi 1340 U mg^{-1} 'den son aktivitesi 804 U mL^{-1} olacak şekilde hazırlanmıştır.

3.2.2.5 Nanoceria ile katalizlenen reaktif türlerin % süpürülme değerlerinin incelenmesi amacı ile CUPRAC ve DMPD yöntemlerinin karşılaştırılması

Çalışmanın bu kısmında geliştirilen DMPD yönteminin güvenilirliğinin ölçülmesi amacı ile CUPRAC yöntemi ile aynı anda analiz edilebilecek bir radikal stok çözeltisi oluşturulmuş ve iki yöntem simültane şekilde antioksidan ve bitki infüzyonları kullanılarak değerlendirilmiştir. Yapılan ön denemelerde; birinci deney tüpüne 1×10^{-3} Kuarsetin çözeltisinden 0,2 mL ve 1 mL tampon çözelti eklendi. 3 mL CUPRAC reaktifi ilave edildi. 5 dak bekletildikten sonra ölçümü yapıldı. İkinci tüpe 1×10^{-3} M Kuarsetin çözeltisinden 0,2 mL, 500 mg/L' lik Nanoceria çözeltisinden 0,5 mL ve 60 mM hidrojen peroksit çözeltisinden 0,1 mL ilave edildi. Bu karışım 3 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra aynı tüpe 804 U/mL katalaz çözeltisinden 0,3 mL ilave edildikten sonra 3 dakika daha beklendikten sonra 3 mL CUPRAC reaktifi ilave edildi. 5 dakika sonra örneklerin spektrumu kör çözeltiye karşı ölçülmüştür. Ön denemelerin beklenen sonuçları vermesi ile aşağıdaki optimize reaksiyon prosedürü geliştirilmiştir.

Radikal stok çözeltisi 0.2 g nanoceria, 20 mL deiyonize su ve 2 mL 1.0 M hidrojen peroksit çözeltisi bir beher içerisinde karıştırılıp 5 dk sonra ortama 804 U mL^{-1} aktiviteye sahip katalaz çözeltisinden 15 mL eklenmesiyle oluşturulmuştur. Elde edilen süspansiyon katı partiküllerin herhangi bir girişim yapmaması amacıyla 10 dk boyunca 4000 rpm'de santrifüj edilmiştir.

5×10^{-4} M konsantrasyona sahip antioksidan çözeltileri farklı test tüplere eklenmiş, stok radikal çözeltisinden 0.9 mL her bir tüpe ayrı ayrı eklendikten 30 dakika sonra 3 mL CUPRAC reaktifi ile karıştırılan tüplerin absorbans değerleri 450 nm’de hemen ölçülmüştür. 5×10^{-4} M konsantrasyona sahip antioksidan çözeltilerinden 0.2 mL farklı test tüplerine eklendikten sonra 2.0 mL stok radikal çözeltisi ve 0.5 mL 5.0×10^{-3} M konsantrasyona sahip DMPD çözeltisi ortama eklenmiş 15 dakika sonra 515 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. Radikal çözeltisi (A_0) 2 mL radikal stok çözeltisi, 5.0×10^{-3} M konsantrasyona sahip DMPD çözeltisinden 0.5 mL ve deiyonize sudan 0.2 mL karıştırılarak oluşturulmuştur.



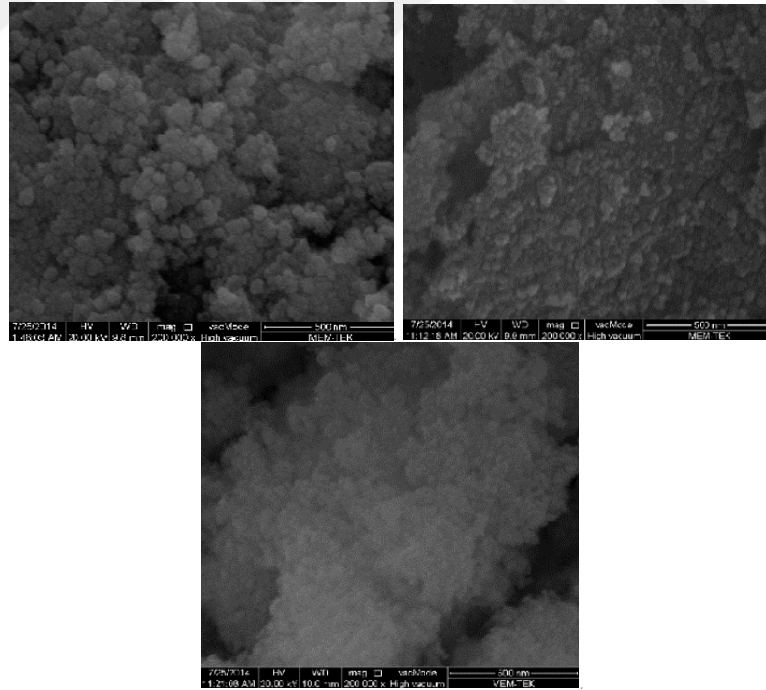
4. SONUÇLAR

4.1 Sentezlenen Nanoceria Partiküllerinin Karakterizasyonu

4.1.1 Amonyak, nişasta ve zahter ortamında sentezlenen nanoceria Partiküllerinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile karakterizasyonu

4.1.1.1 Amonyak kullanılarak sentezlenen partiküllerin SEM sonuçları

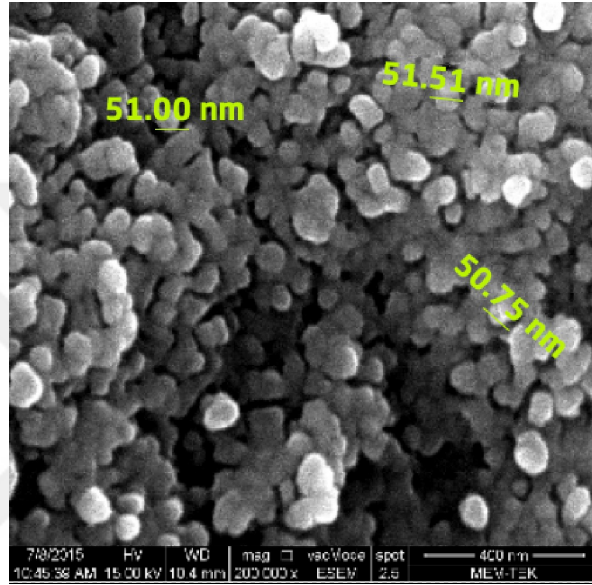
Sentezlenen nanopartiküllerin Ulusal Membran Teknolojileri Araştırma Merkezi (MEMTEK)'te alınan SEM görüntüleri sonucunda, elde edilen partiküllerin nanometre boyutunda olduğu görülmüştür. Partiküllerin SEM görüntüleri Şekil 4.1'de gösterilmektedir.



Şekil 4.1 : A: 30°C, B: 50°C, C: 80°C’de kurutulan CeONP nanopartiküllerinin SEM görüntüsü.

4.1.1.2 Nişasta kullanılarak sentezlenen partiküllerin SEM sonuçları

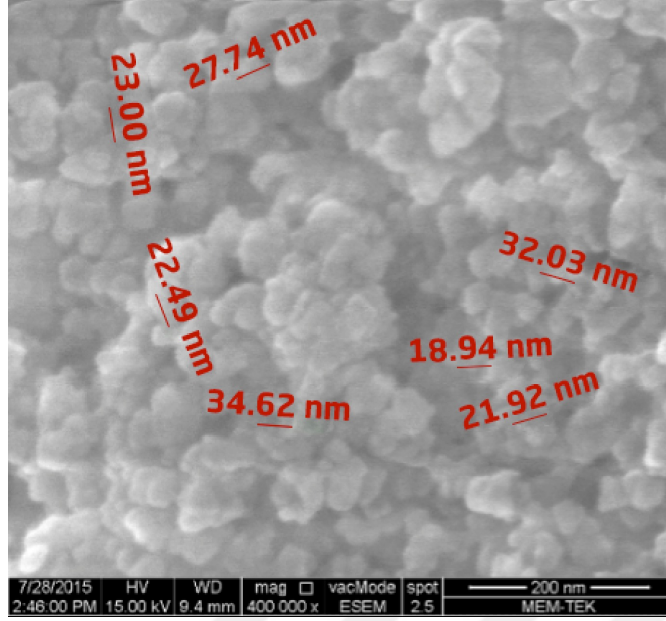
Nişasta çözeltilerinde sentezlenen nanoceria partiküllerinin görüntüleri FEI-QUANTA FEG 250 taramalı elektron mikroskobu kullanılarak İTÜ-membran araştırmaları merkezinde alınmıştır. Nişasta çözeltisi ortamında sentezlenen nanopartiküllerinin görüntüleri şekil 4.2’de verilmektedir. Nişasta ortamında sentezlenen sarı-beyaz partiküllerin büyüklüğünün yaklaşık 51 nm olduğu görüntülerden elde edilmiştir.



Şekil 4.2 : Nişasta çözeltisi ortamında sentezlenen nanoceria SEM görüntüsü (x200,000 büyütme).

4.1.1.3 Zahter kullanılarak sentezlenen partiküllerin SEM sonuçları

Zahter infüzyonu içinde sentezlenen nanoceria partiküllerinin görüntüleri FEI-QUANTA FEG 250 taramalı elektron mikroskobu kullanılarak İTÜ-membran araştırmaları merkezinde alınmıştır. Sentezlenen nanopartiküllerin görüntüleri şekil 4.3’de verilmektedir. Verilen örnekteki partikül boyutunun 19-35 nm arasında olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.3 : Zahter ekstraktı kullanılarak sentezlenen nanoceria SEM görüntüsü (x400,000 büyütme).

4.2 Zahter Bitkisinin Fenol, Flavonoid ve Toplam Antioksidan Miktarı Bakımından İncelenmesi

4.2.1 Zahterin klasik Folin-Ciocalteu yöntemi ile incelenmesi

Toplam fenolik içerik gallik asit ekivalenti olarak 750 nm’de elde edilen absorbans değerlerine bağlı olarak bulunmuştur. Gallik asit standardının kalibrasyon sonuçları şekil 5.4’de verilmiştir. Tablo 5.1’de gallik asit standartları ve zahter infüzyonlarının zahter absorbans değerlerine göre fenolik içerikleri eşitlik 5.1’de verilen formül kullanılarak hesaplanmış ve karşılaştırılmıştır. Ortalama fenolik içerik klasik folin ciocalteu yöntemine göre 0.10746 mmol GA/g Zahter olarak bulunmuştur.

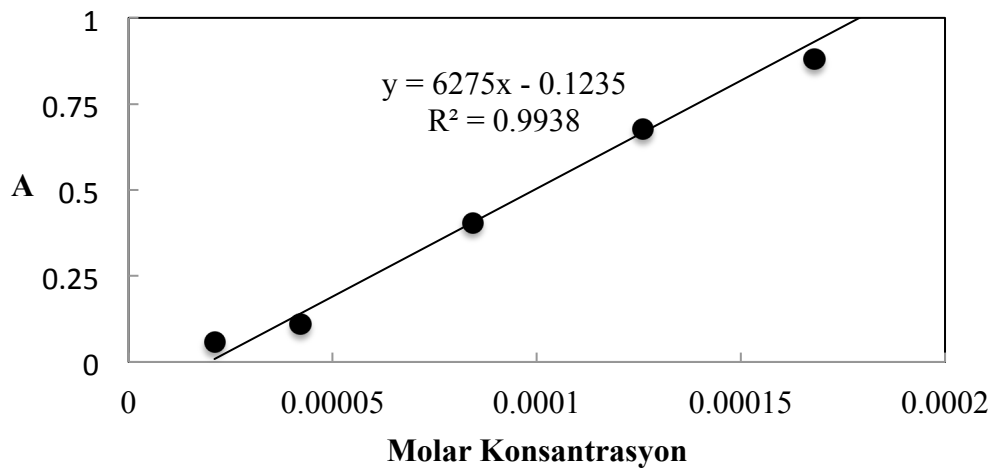
4.2.2 Zahterin klasik folin-ciocalteu yöntemi ile incelenmesi

Toplam fenolik içerik gallik asit ekivalenti olarak 750 nm’de elde edilen absorbans değerlerine bağlı olarak bulunmuştur. Gallik asit standardının kalibrasyon sonuçları şekil 4.4’de verilmiştir. Çizelge 4.1’de gallik asit standartları ve zahter infüzyonlarının zahter absorbans değerlerine göre fenolik içerikleri eşitlik 4.1’de verilen formül kullanılarak hesaplanmış ve karşılaştırılmıştır. Ortalama fenolik içerik klasik folin ciocalteu yöntemine göre 0.10746 mmol GA/g Zahter olarak bulunmuştur.

$$\text{Toplam fenolik içerik} = \frac{\frac{A}{\epsilon} \cdot \frac{V_f}{V_t} \cdot \frac{10}{0.2} \cdot x^{55}}{10} = \frac{\frac{\text{mmol}}{\text{g}}}{\text{g}} \text{ örnek} \quad (4.1)$$

Çizelge 4.1 : Gallik asit standartları ve zahter infüzyonlarının 750 nm’de absorbans değerleri ve fenolik içerikleri.

Gallik asit		Zahter	
Gallik Asit konsantrasyonu (M)	Absorbans değeri (750 nm)	Absorbans değeri (750 nm)	Hesaplanan fenolik içerik (mmol/g)
2.1×10^{-5}	0,0565	0.05	0.104
4.2×10^{-5}	0,11	0.108	0.112
8.4×10^{-5}	0,40486	0.224	0.117
12.6×10^{-5}	0,677	0.317	0.110
16.8×10^{-5}	0,879	0.441	0.115
21.05×10^{-5}	1,162	0.427	0.0890
25.3×10^{-5}	1,524	---	----



Şekil 4.4 : 750 nm’de gallik asit standartlarının absorbansa karşı molar konsantrasyon grafiği.

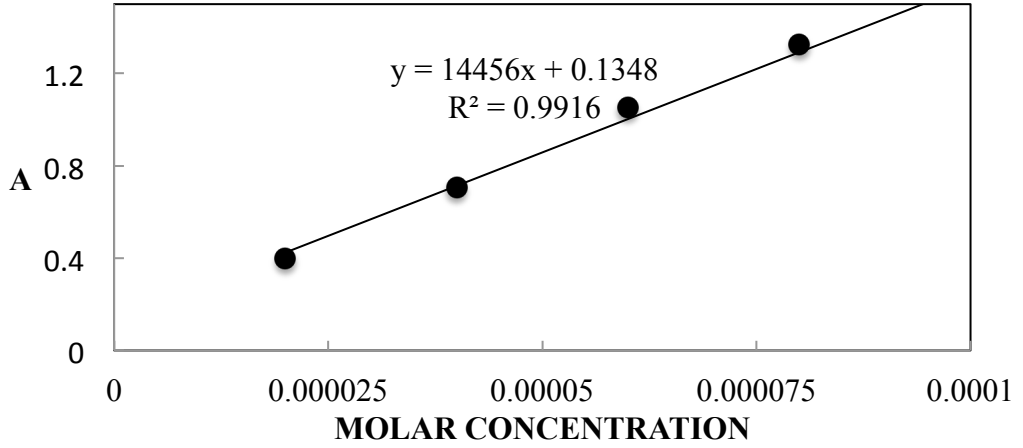
4.2.3 Zahterin modifiye Folin-Ciocalteu yöntemi ile incelenmesi

Toplam fenolik içerik gallik asit ekivalenti olarak 665 nm’de elde edilen absorbans değerlerine bağlı olarak bulunmuştur. Gallik asit standardının kalibrasyon sonuçları şekil 4.5’de verilmiştir. Çizelge 4.2’de gallik asit standartları ve zahter infüzyonlarının zahter absorbans değerlerine göre fenolik içerikleri eşitlik 4.2’de verilen formül kullanılarak hesaplanmış ve karşılaştırılmıştır. Ortalama fenolik içerik modifiye Folin-Ciocalteu yöntemine göre 0.0814 mmol GA/g Zahter olarak bulunmuştur.

$$\text{Toplam fenolik içerik} = \frac{\frac{A}{\epsilon} \cdot \frac{V_f}{V_i} \cdot \frac{10}{0.2} \cdot x^{55}}{10} = \frac{\frac{\text{mmol}}{\text{gallik acid}}}{g} \text{ örnek} \quad (4.2)$$

Çizelge 4.2 : Gallik asit standartları ve zahter infüzyonlarının 665 nm’de absorbans değerleri ve hesaplanan fenolik içerikleri.

Gallik asit		Zahter	
Gallik Asit konsantrasyonu (M)	Absorbans değeri (750 nm)	Absorbans değeri (750 nm)	Hesaplanan fenolik içerik (mmol/g)
2.0×10^{-5}	0,3957	0.09	0.0856
4.0×10^{-5}	0,7055	0.17	0.0808
6.0×10^{-5}	1,0525	0.25	0.0793
8.0×10^{-5}	1,327	0.33	0.0794
1.0×10^{-4}	1,5306	0.43	0.0818



Şekil 4.5 : 665 nm’de gallik asit standartlarının absorbansa karşı molar konsantrasyon grafiği.

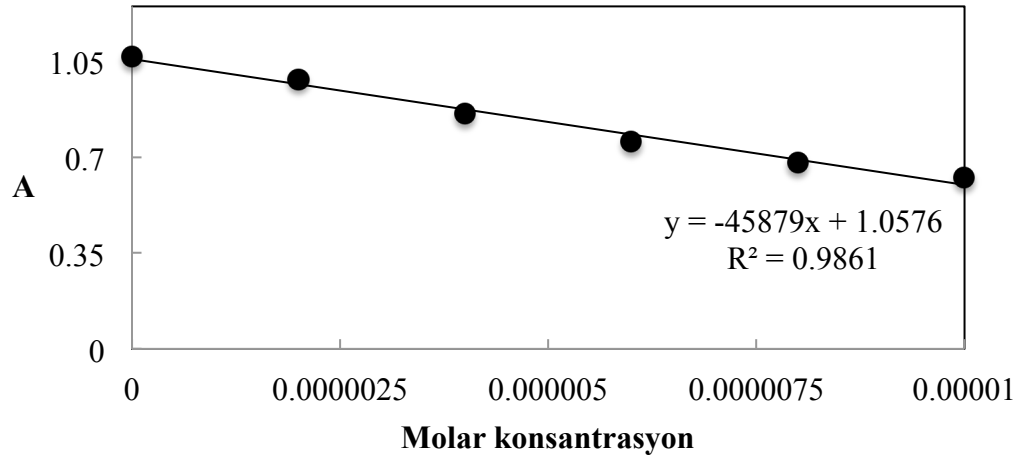
4.2.4 Zahterin toplam antioksidan kapasitesinin CERAC yöntemi ile incelenmesi

Toplam antioksidan kapasitesi gallik asit ekivalenti olarak 320 nm’de elde edilen absorbans değerlerine bağlı olarak bulunmuştur. Gallik asit standardının kalibrasyon sonuçları şekil 4.6’de verilmiştir. Çizelge 4.3’de gallik asit standartları ve zahter infüzyonlarının absorbans değerlerine göre antioksidan kapasiteleri eşitlik 4.3’de verilen formül kullanılarak hesaplanmış ve karşılaştırılmıştır. Ortalama antioksidan kapasitesi CERAC yöntemine göre 0.0493 mmol GA/g Zahter olarak bulunmuştur.

$$\text{Toplam antioksidan içerik} = \frac{\frac{A}{\epsilon} \cdot \frac{V_f}{V_i} \cdot \frac{10}{0.2} \cdot x^{55}}{10} = \frac{\frac{\text{mmol}}{\text{gallik acid}}}{g} \text{ örnek} \quad (4.3)$$

Çizelge 4.3 : Gallik asit standartları ve zahter infüzyonlarının 320 nm’de absorbands değerleri ve antioksidan kapasitesi.

Gallik asit		Zahter	
Gallik Asit konsantrasyonu (M)	Absorbans değeri (750 nm)	Absorbans değeri (750 nm)	Hesaplanan antioksidan kapasitesi (mmol/g)
0	1,065	0,771	0,114
2.0x10 ⁻⁵	0,984	0,623	0,0615
4.0x10 ⁻⁵	0,858	0,529	0,0383
6.0x10 ⁻⁵	0,757	0,549	0,0324
8.0x10 ⁻⁵	0,6805	----	----
1.0 x 10 ⁻⁴	0,625	----	----



Şekil 4.6 : Gallik asidin 320 nm’deki absorbanda karşı molar konsantrasyonu grafiği.

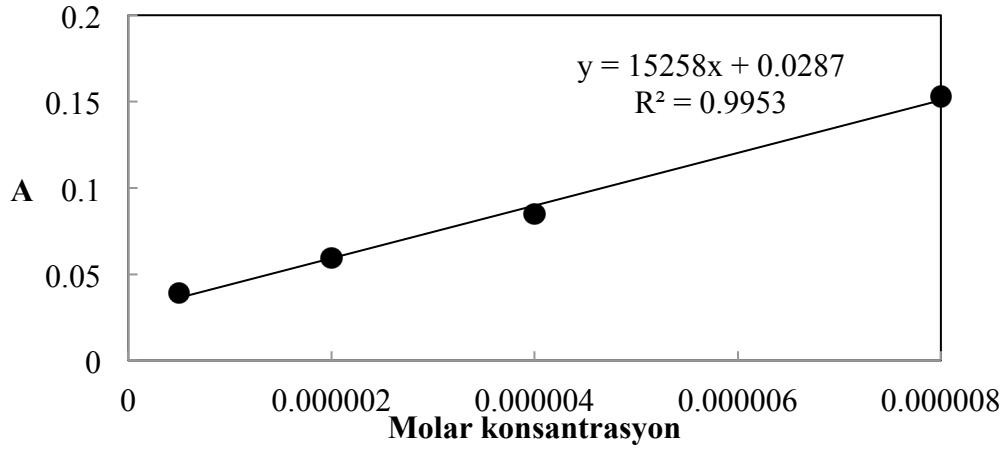
4.2.5 Zahterin Alüminyum klorür yöntemi ile incelenmesi

Toplam flavonoid içeriği kateşin ekivalenti olarak 510 nm’de elde edilen absorbands değerlerine bağlı olarak bulunmuştur. Kateşin standardının kalibrasyon sonuçları şekil 4.7’de verilmiştir. Çizelge 4.4’de kateşin standartları ve zahter infüzyonlarının absorbands değerlerine göre flavonoid içerikleri eşitlik 4.4’de verilen formül kullanılarak hesaplanmış ve karşılaştırılmıştır. Ortalama flavonoid içeriği alüminyum klorür yöntemine göre 0.0178 mmol kateşin/g Zahter olarak bulunmuştur.

$$\text{Toplam flavonoid içeriği} = \frac{\frac{A}{\epsilon} \times \frac{V_f}{V_i} \times \frac{10}{0.2} \times 10}{10} = \frac{\frac{\text{mmol}}{\text{kateşin}}}{g} \text{ örnek} \quad (4.4)$$

Çizelge 4.4 : Kateşin standartları ve zahter infüzyonlarının 510 nm’de absorbens değerleri ve flavonoid içerikleri.

Kateşin		Zahter	
Kateşin konsantrasyonu (M)	Absorbans değeri (750 nm)	Absorbans değeri (750 nm)	Hesaplanan flavonoid içeriği (mmol/g)
5×10^{-7}	0,039	0,114	0,0268
10×10^{-7}	---	0,140	0,0239
20×10^{-7}	0,059	0,140	0,0187
40×10^{-7}	0,085	0,169	0,0197
80×10^{-7}	0,152	--	---
160×10^{-7}	---	--	---



Şekil 4.7 : Kateşinin 510 nm’deki absorbansa karşı molar konsantrasyonu grafiği.

Elde edilen değerlerin literatürde belirtilen molar absorpsiyon katsayıları da göz önüne alınarak karşılaştırmasını içeren çizelge 4.5 aşağıda eklenmiştir.

Çizelge 4.5 : Zahter infüzyonunun antioksidan ve fenolik içeriklerinin karşılaştırılması.

	Ortalama eşdeğer konsantrasyon (M)	Molar absorpsiyon katsayısı (ε)	Litertürde belirtilen molar absorpsiyon katsayıları (ε)
Klasik Folin-Ciocalteu	0,1075	6275	5140
Modifiye Folin-Ciocalteu	0,0814	14456	9820
CERAC yöntemi	0,1057	-45879	-45400
Alüminyum klorür yöntemi	0,0178	15258	12350

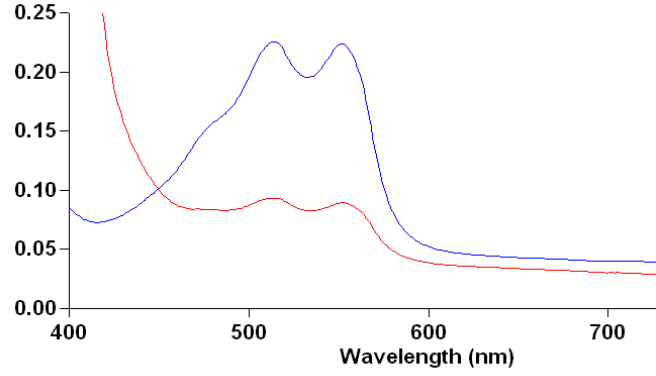
4.3 Nanoceria İle Katalizlenen Reaktif Türlerin Doğası

Hidrojen peroksit ve nanoceria varlığında üretilen muhtemel hidroksil radikallerinin varlığı salisilat prob maddesinin hidroksillenmesine bağlı olarak işleyen iki ayrı spektrofotometrik yöntem kullanılarak test edilmiştir (Bektaşoğlu 2008; bayarsaikhan 2018). Süperoksit anyon radikallerinin varlığı ise Beauchamp & Fridovich (1971)'in önerdiği nitroblue tetrazolium (NBT) kolorimetrik yöntemi kullanılarak incelenmiştir. İki yöntem ile de negative sonuçlar elde edilmesi Ornatska ve arkadaşları (2011) tarafından önerildiği üzere cerianın hidrolizi sonucu hidrojen peroksit ile $\text{Ce}(\text{OH})_2(\text{O}_2)$, $\text{Ce}(\text{O}_2)^+$ and $\text{Ce}(\text{H}_2\text{O}_2)^{3+}$ olarak gösterilen reaktif türlerin oluşması ile açıklanmaktadır [179]. Zhang ve arkadaşları (2011) seryum partiküllerinin Ce(III) ve Ce(IV) iyonları arasındaki dönüşüme bağlı olarak ROS oluşturduklarını doğrudan gösteren gözlemler yapmışlardır. Cerianın hidrojen peroksit ile gösterdiği bu peroksidaz benzeri yüzey kompleksleri doğrudan kanıtlanamasa da varlıkları farklı çalışmalarda önerilmiştir. Çalışmamızda da DMPD maddesinin renklenmesi ortamdaki bu reaktif türlerin varlığına bağlanmıştır. Ayrıca antioksidan maddeler bu reaktif türler ile reaksiyon verdiklerinden de reaktif türlerin süpürülme kapasiteleri de ayrıca CUPRAC ve DMPD yöntemleri ile incelenmiştir.

4.3.1 Nanoceria ile katalizlenen reaktif türlerin DMPD probu kullanılarak

kolorimetrik tayini, yöntemin optimizasyonu ve % süpürme çalışması

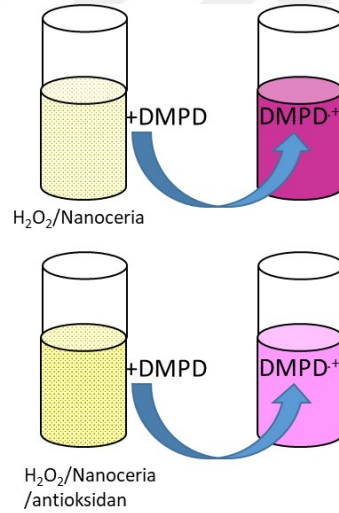
Nanoceria ve hidrojen peroksitin bulunduğu ortama yarışmalı reaksiyon göstermesi için DMPD ve süpürücü maddeler eklenmiş, sonuçta ortamdaki DMPD^+ katyonuna bağlı oluşan kırmızı mor renkte açılma olduğu görülmüştür. Şekil 4.8'de kinon radikallerinin oluşumuna bağlı olarak görülen kırmızı rengin absorbansının ortama eklenen süpürücü kateşin antioksidan maddesine bağlı olarak nasıl değiştiği rahatlıkla görülmektedir.



Şekil 4.8 : DMPD çözeltisi ile reaktif türlerin süpürülmesi.

- (mavi çizgi) 100 ppm Nanoceria süspansiyonundan 2 mL + 2.0×10^{-4} M H_2O_2 çözeltisinden 2 mL + 5.0×10^{-3} M DMPD çözeltisinden 0.2 mL ($A=0,223$) ($V_T=10$ mL)
- (kırmızı çizgi) 100 ppm Nanoceria süspansiyonundan 2 mL + 2.0×10^{-4} M H_2O_2 çözeltisinden 2 mL + 5.0×10^{-3} M Kuercetin çözeltisinden 1 mL + 5.0×10^{-3} M DMPD çözeltisinden 0.2 mL ($A=0,089$) ($V_T=10$ mL)

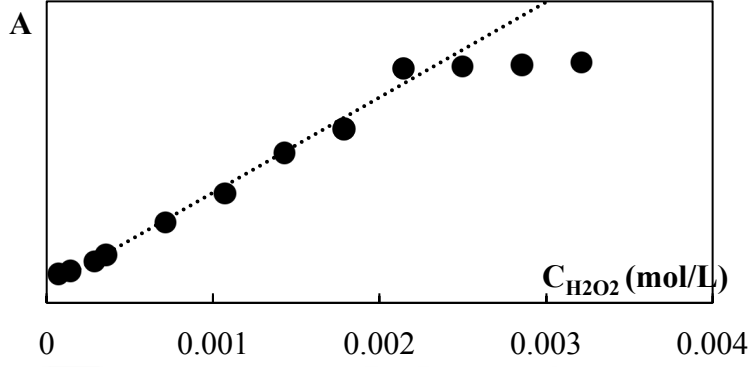
Şekil 4.9’de ise yarışmalı reaksiyon sonucu test tüpün içinde $DMPD^+$ oluşumundaki azalmaya bağlı olarak kırmızı mor rengin değişimi gösterilmektedir.



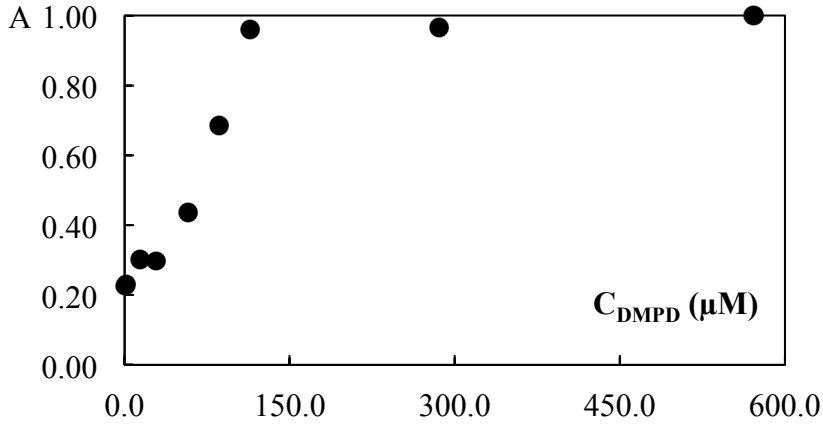
Şekil 4.9 : Yarışmalı reaksiyon ortamında hidroksil radikallerinin süpürülmesinin temsili gösterimi.

Yukarıda da bahsedildiği üzere denemelerimiz nanoceria/hidrojen peroksit ortamında reaktif türlerin oluştuğunu ve antioksidanların radikal süpürme aktivitelerinin 515 nm’de takip edilebileceğini göstermektedir. Ayrıca $DMPD^+$ katyonunun kırmızı renginin değişen nanoceria ve hidrojen peroksit konsantrasyonlarına göre de cevap verdiği bulunmuştur. Bu amaçla reaktif türlerin oluşumuna etki eden bazı parametrelerin optimizasyonu ihtiyacı doğmuştur. İncelenen parametreler daha önce

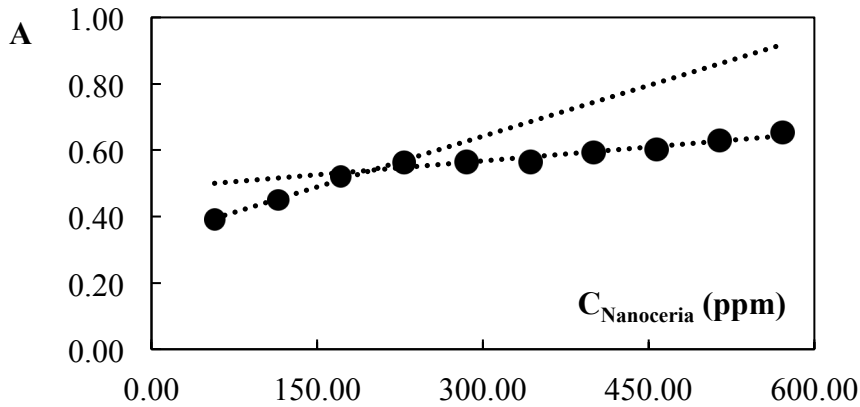
de bahsedildiği gibi hidrojen peroksit, DMPD ve nanoceria süspansiyonu konsantrasyonları, reaksiyon ortamının pH değeri, sıcaklık, zaman, süre ve çözücü etkisidir. Elde edilen optimum değerlerin grafikleri şekil 4.10 ve 4.15 arasında gösterilmiştir.



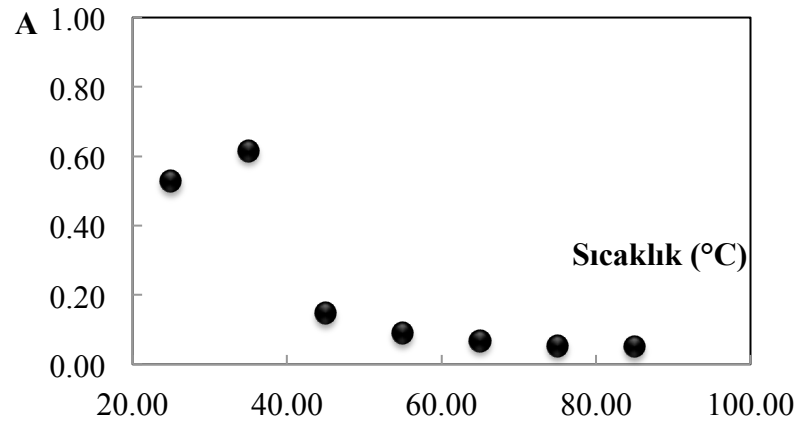
Şekil 4.10 : Hidrojen peroksit konsantrasyonu optimizasyon grafiği.



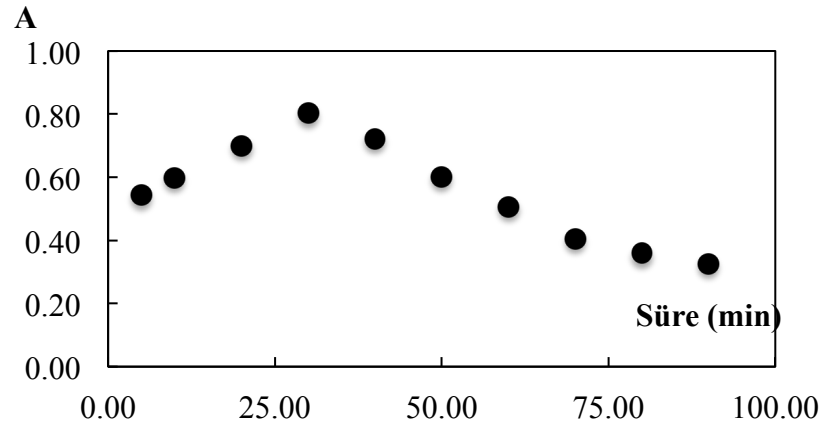
Şekil 4.11 : DMPD konsantrasyonu optimizasyon grafiği.



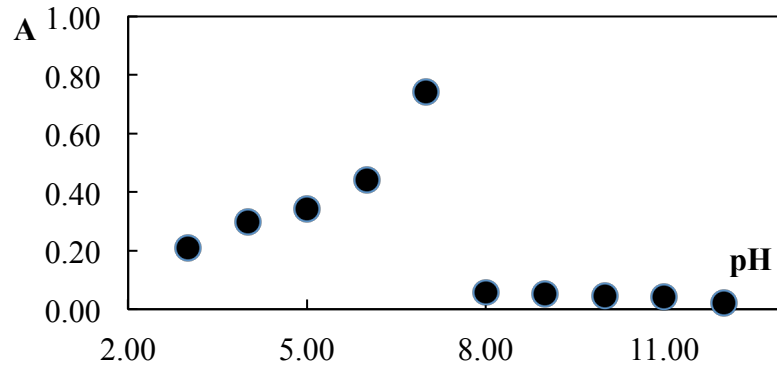
Şekil 4.12 : Nanoceria konsantrasyonu optimizasyon grafiği.



Şekil 4.13 : Sıcaklık optimizasyonu grafiği.



Şekil 4.14 : Süre optimizasyonu grafiği.



Şekil 4.15 : pH değeri optimizasyonu grafiği.

Yapılan alışmalar sonucunda DMPD ve reaktif türler arasındaki reaksiyon için en uygun değerler şu şekilde kabul edilmiştir; 2.14 mM hidrojen peroksit, 1.14×10^{-4} M DMPD, 228 ppm nanoceria, oda sıcaklığı, 30 dakika reaksiyon süresi ve pH değeri 7. Ancak bu değerlerin kullanımı açısından yöntem esneklik göstermektedir. Örneğin şekil 4.14'den da anlaşılacağı gibi 5dk ile 30dk arasındaki bekleme sürelerinde kromofor maddenin absorbans değerinde büyük farklılıklar ortaya çıkmamaktadır. Reaksiyonun nanoceria konsantrasyonu bakımından da 250 ppm civarında en yüksek absorbans değerini verdiği gözlenirse de, 250-800 ppm aralığındaki absorbans değerinin bir noktadan sonra değişme göstermemesi sistemin konsantrasyon bakımından dengeye ulaştığını belirtmektedir. DMPD ve hidrojen peroksit konsantrasyonları açısından da sırasıyla 100-200 μ M ve 20 mM civarındaki değerler yöntemin tekrarlanabilirliği açısından uygun sonuçlar verecekse de absorbans değerlerinin bu seviyelerde sabit kalması konsantrasyon çalışma aralığının daha geniş lde tutulabileceğini göstermektedir. Bu amaçla yöntemin diğer kolorimetrik yöntemlere avantaj sağlaması için reaksiyon zamanı düşürülüp, nanoceria partiküllerinin yüzeyindeki Ce(III) – Ce(IV) geçiş yüzdelerinin artması için de süspansiyon konsantrasyonunun artırılması yöntem optimizasyonu açısından negatif bir sonuç doğurmayacaktır. Sonuç olarak DMPD reaktif türlerin ölçülmesi açısından ideal bir prob madde davranışı sergilemektedir. Ancak reaksiyon karışımına son olarak DMPD maddesinin eklenmesi yarışmalı reaksiyon açısından önemli bir husustur. Ayrıca süpürücü madde konsantrasyonları ayarlanırken de uygun bir absorbans değerinin ölçülebilmesi için ortamda fazladan reaktif türün kalarak DMPD ile reaksiyon vermesine dikkat edilmelidir. Her ne kadar başlangıçta yaptığımız gözlemlerde ortamdaki nanoceria ve hidrojen peroksit konsantrasyonlarına bağlı olarak katyonun kırmızı mor renğinde farklılıklar olduğu görülse de, hesaplamalarımız 515 nm'deki reaksiyon öncesi ve sonrası absorbans değişimine bağlı olduğundan, kırmızı renkteki ufak değişiklikler elde edilen sonuçlara etki etmemiştir. Eğer en uygun konsantrasyonda nanoceria yöntem sırasında kullanılacaksa çözeltilerin spektrofotometrik ölçüm öncesi her seferinde santrifüj edilmeleri önerilir. Bu en uygun nanoceria konsantrasyonu uygulama kolaylığı açısından, optimizasyon grafiklerinden de görüleceği gibi kesinliği etkilemeden rahatlıkla azaltılabilmektedir. Yntemimizde sentetik antioksidan örnekleri ve çay infüzyonları DMPD metodu ile incelenmiş ve yüzde süpürme aktivitesi eşitlik 4.5'de

gösterildiği şekilde hesaplanmıştır. A_0 başlangıç DMPD absorbansı, A ise son DMPD absorbansını temsil etmektedir.

$$\text{Yüzde süpürme aktivitesi} = 100 \times (A_0 - A)/A_0 \quad (4.5)$$

Çizelge 4.6 ve 4.7’de DMPD ortamında antioksidan süpürücü maddeler ve bitki infüzyonları kullanılarak başlangıç ve son absorbans değerlerindeki değişme gösterilmektedir.

Çizelge 4.6 : Reaktif türlerin antioksidan çözeltileri ortamında DMPD metodu ile süpürülme aktiviteleri ($A_0 = 1.895 (\pm 0.007)$; Tüm antioksidan konsantrasyonları 2.0×10^{-5} mol/L).

Antioksidan	Antioksidanlı ortamda karışımın absorbansı	% Süpürülme
Troloks	1.520 (± 0.002)	19.8 (± 0.4)
Kafeik asit	0.891 (± 0.007)	53.0 (± 0.6)
Rutin	0.895 (± 0.001)	52.8 (± 0.4)
Kuersetin	0.493 (± 0.005)	74.0 (± 0.5)
Ferulik acid	0.946 (± 0.002)	50.1 (± 0.4)
Gallik acid	0.660 (± 0.006)	65.2 (± 0.5)
Kateşin	1.213 (± 0.011)	36.0 (± 0.7)

Çizelge 4.7 : Reaktif türlerin seçilen bitki infüzyonları ile süpürülme aktivitelerinin DMPD metodu ile ölçülmesi. RS ($A_0=1.8953 (\pm 0.007)$).

Süpürücü çay	Absorbans (A)	% Süpürülme
Yeşil çay	1.008 (± 0.001)	46.80 (± 0.41)
Ada çayı	1.243 (± 0.010)	34.44 (± 0.66)
Ihlamur	1.383 (± 0.009)	27.01 (± 0.61)
Kuşburnu	0.649 (± 0.011)	65.75 (± 0.73)
Hibiskus	0.826 (± 0.008)	56.42 (± 0.60)
Kekik	0.953 (± 0.011)	49.73 (± 0.71)
İspanyol kekiği	1.422 (± 0.015)	25.44 (± 0.90)
Nane	1.194 (± 0.006)	37.06 (± 0.51)

4.3.2 Nanoceria ile katalizlenen reaktif türlerin süpürülmesi sonrası kalan antioksidan miktarının CUPRAC metodu ile ölçülmesi

CUPRAC metodu reaktif türlerin süpürülmesi sonrası, ortamda kalan antioksidan madde miktarlarının DMPD yönteminden elde edilen süpürme miktarları ile karşılaştırmak amacıyla uygulanmıştır. Yöntemde bu miktarlar daha öncede bahsedildiği üzere maddelerin cupric neocuprain şelatına elektron transfer yeteneği ile ölçülmüştür. Bu amaçla öncelikle kullanılacak antioksidan sentetik örneklerin lineer korelasyon denklemleri CUPRAC metodu uygulanarak elde edilmiş ve

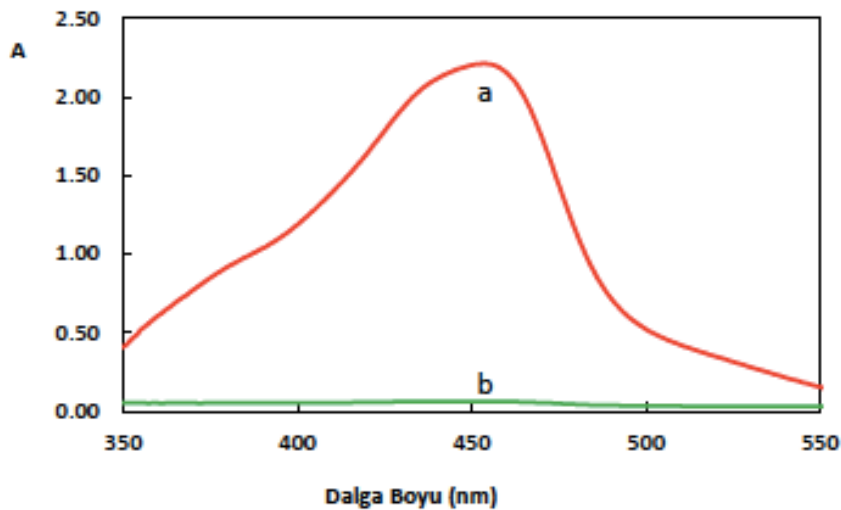
yöntemin kalibrasyonu gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.8’de kalibrasyon sonucu elde edilen lineer korelasyon denklemleri gösterilmektedir.

Çizelge 4.8 : CUPRAC metodunda kullanılan antioksidanların Absorbans vs molar konsantrasyon cinsinden lineer korelasyon denklemleri.

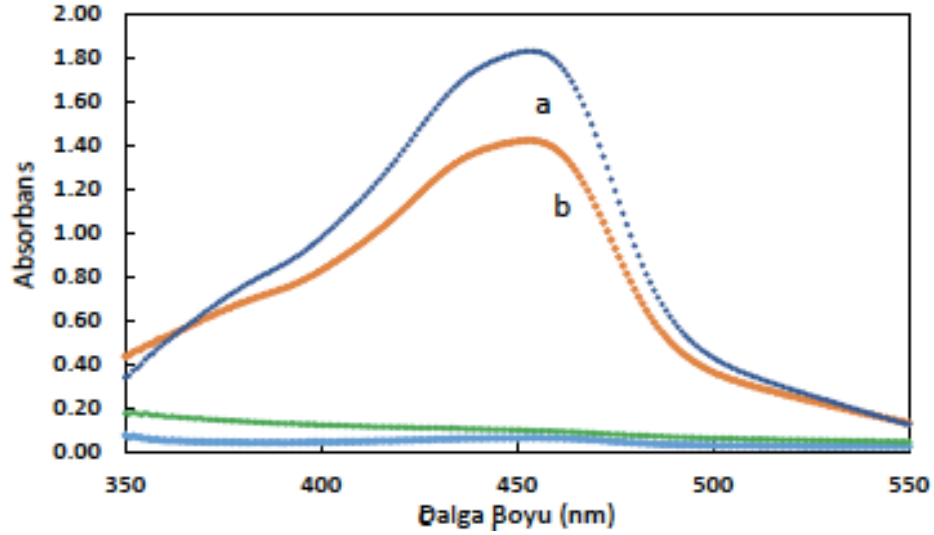
Süpürücü antioksidan	Lineer korelasyon denklemi
Gallik asit	$A = 35539 C + 0.7749$
Kuersetin	$A = 75582 C + 0.0250$
Troloks	$A = 15287 C - 0.0043$
Kafeik asit	$A = 44013 C - 0.0190$
Rutin	$A = 40953 C - 0.0652$
Kateşhin	$A = 39649 C + 0.0409$
Ferulik Asit	$A = 18902 C + 0.005$

Kalibrasyon çalışması ile absorbans ve molar konsantrasyon arasında iyi bir doğrusal ilişki elde edilmiştir. Yapılan çalışmalarda antioksidan/nanoceria/hidrojen peroksit karışımından elde edilen absorbans değerinin düşürülmesi için minimum 3dk lık bir CUPRAC inkübasyon zamanının olması gerektiği bulunmuştur. Ayrıca reaktif türlerin üretimi ortama katalaz enziminin eklenmesi ile durdurulmuş ve bir 3dklık inkübasyon zamanının daha geçmesi beklenmiştir. Ortamdaki cupric-neocuprain kompleksinin hidrojen peroksit varlığında indirgendiğini gösteren çalışmalar bulunduğu ortama katalaz eklenmesi ve kompleks ile hidrojen peroksit arasındaki reaksiyonun durdurulması gereği doğmuştur.

Şekil 4.16 ve 4.17 nanoceria/katalaz/hidrojen peroksit karışımının CUPRAC spektrumundaki değişimini göstermektedir.

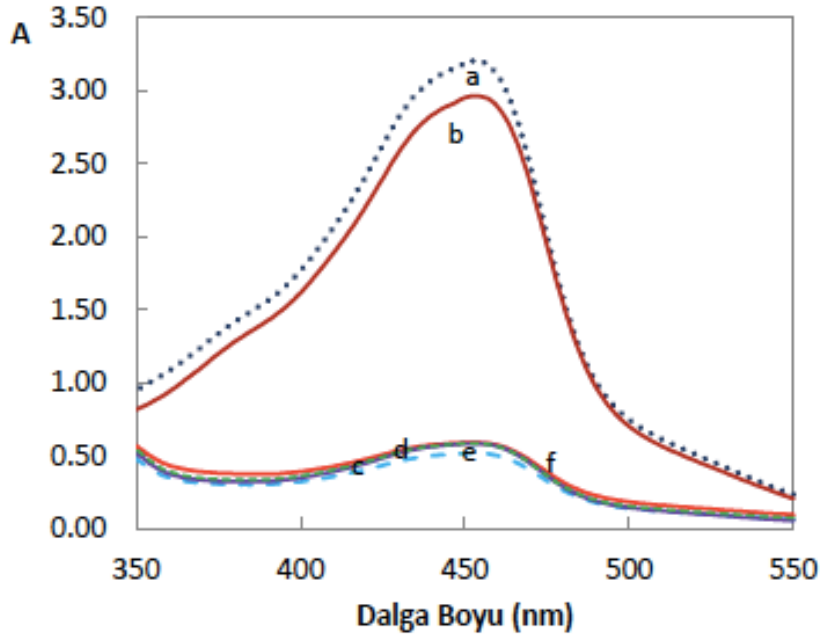


Şekil 4.16 : a) 0.05 mL 40 mM H_2O_2 çözeltisi ve b) 0.05 mL 40 mM H_2O_2 çözeltisine pH 7 asetat tampon içerisinde hazırlanmış 804 U mL^{-1} katalaz enziminin 0.150 mL katıldıktan sonra bu çözelti tampon çözelti ile 1.1 mL’ye tamamlanmış ve üzerine 3 mL CUPRAC reaktifi eklenmiştir.

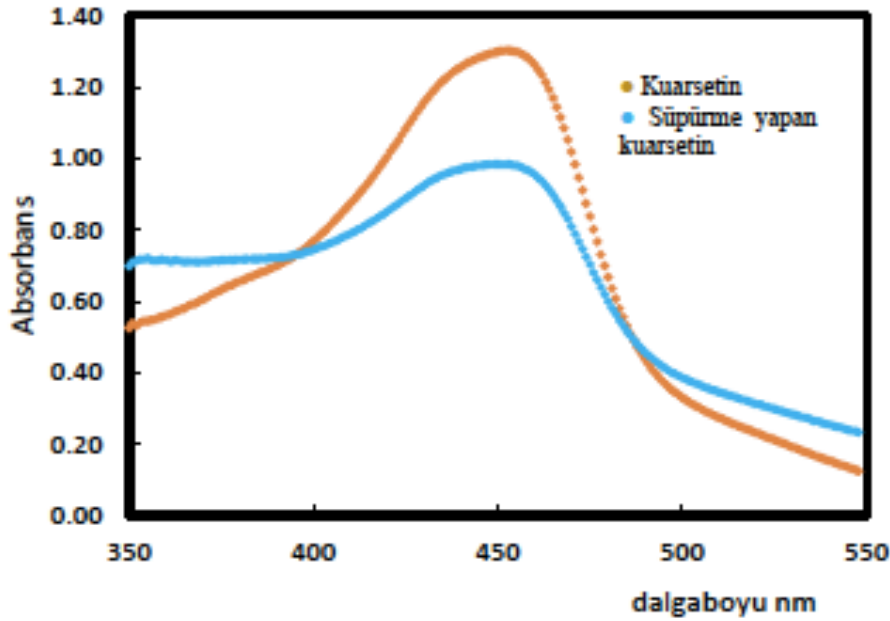


Şekil 4.17 : (a) 0,05 mL 20 mM H_2O_2 çözeltisi (b) 0,05 mL 20 mM H_2O_2 çözeltisi + 500 ppm 0,4 mL nanoceria çözeltisi (c) 500 ppm 0,4 mL nanoceria ve (d) 0,05 mL 20 mM H_2O_2 çözeltisi + 0,4 mL nanoceria çözeltisi (500 ppm) + 0,150 mL 804 U mL⁻¹ katalaz enzimi. Bu çözeltiler tampon çözelti ile 1,1 mL'ye tamamlanmış ve üstlerine 3 mL cuprac reaktifi eklenmiştir.

Nanoceria'nın cuprac reaktifine cevap vermediği şekil 4.18, (c)'de görülmektedir. Nanoceria üzerine katılan H_2O_2 çözeltisi reaktif türleri oluşturduğu için H_2O_2 spektrumunda (a) absorbans düşüşü görülmektedir (b). Artan H_2O_2 miktarları üstteki şıkta olduğu gibi katalaz enzimi ile söndürülmüştür (d) reaktif türleri üretmek için kullanılan nanoceria ve hidrojen peroksitin, ayrıca fazla hidrojen peroksiti söndürmek için kullanılan katalaz'ın ve antioksidanların CUPRAC reaktifi ile belirlenmesini bozup bozmadığı incelenmiştir. Bu amaçla kafeik asit ve kuarsetin bileşikleriyle denemeler yapılmıştır. Şekil 4.19'da görüldüğü gibi Nanoceria ve katalaz ilaveleri kafeik asidin CUPRAC reaktifi ile verdiği absorbansa etki etmemiştir (d-e). Antioksidan üzerine hidrojen peroksit ilave edilip CUPRAC metodu uygulandığında elde edilen spektrum, bu bileşiklerin tek tek spektrumlarının toplamına yakın sonuç vermiştir (a-b-c). Hidrojen peroksit/katalaz karışımına antioksidan eklendiğinde bu etki görülmemiştir (f).



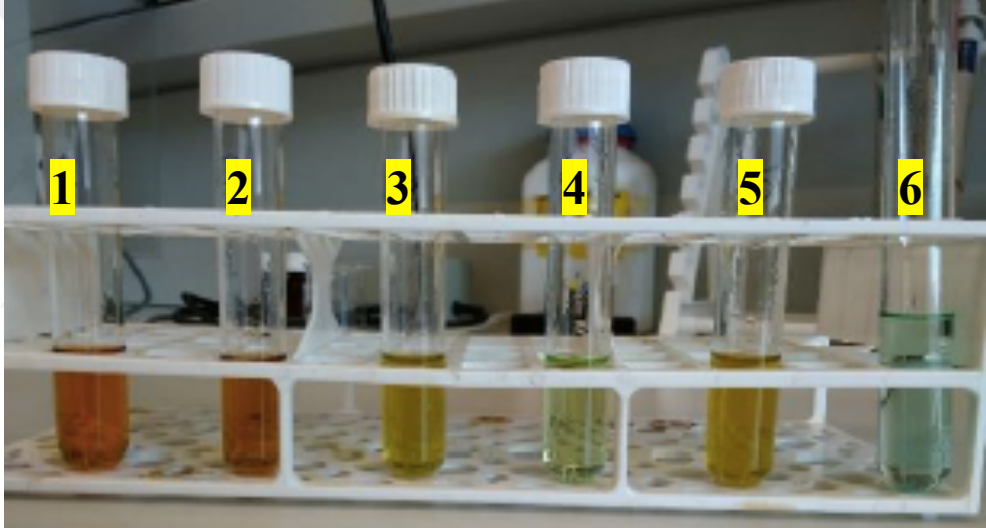
Şekil 4.18 : (a) 0,05 mL 20 mM H_2O_2 + 0,5 mL 1×10^{-4} M kafeik asit (b) 0,05 mL 20 mM H_2O_2 (c) 0,5 mL 1×10^{-4} M kafeik asit (d) 0,5 mL 1×10^{-4} M kafeik asit + 0,4 mL 500 ppm nanoceria (e) 0,5 mL 1×10^{-4} M kafeik asit + 0,5 mL $804 U mL^{-1}$ katalaz (f) 0,05 mL 20 mM H_2O_2 + 0,5 mL $804 U mL^{-1}$ katalaz + 0,5 mL 1×10^{-4} M kafeik asit. Bütün çözeltiler tampon ile 1,1 mL'ye tamamlandıktan sonra 3 mL CUPRAC reaktifi eklenmiştir.



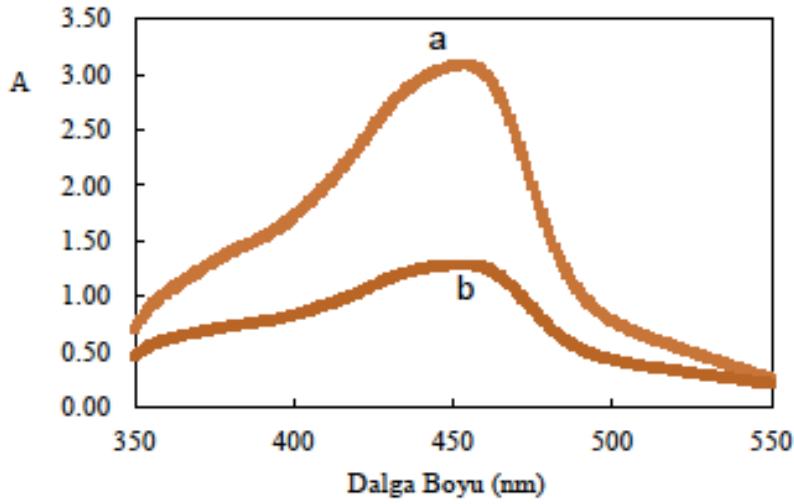
Şekil 4.19 : ● 0,2 mL 1×10^{-3} M Kuarsetin-3 mL CUPRAC reaktifi (toplam hacim 4,1 mL); ● 0,2 mL 1×10^{-3} M Kuarsetin+0,5 mL NC+0,1 mL H_2O_2 +0,3 mL Katalaz+3 mL CUPRAC reaktifi (toplam hacim 4,1 mL).

4.3.3 Nanoceria ile katalizlenen reaktif türlerin % süpürülme değerlerinin incelenmesi amacı ile CUPRAC ve DMPD yöntemlerinin karşılaştırılması

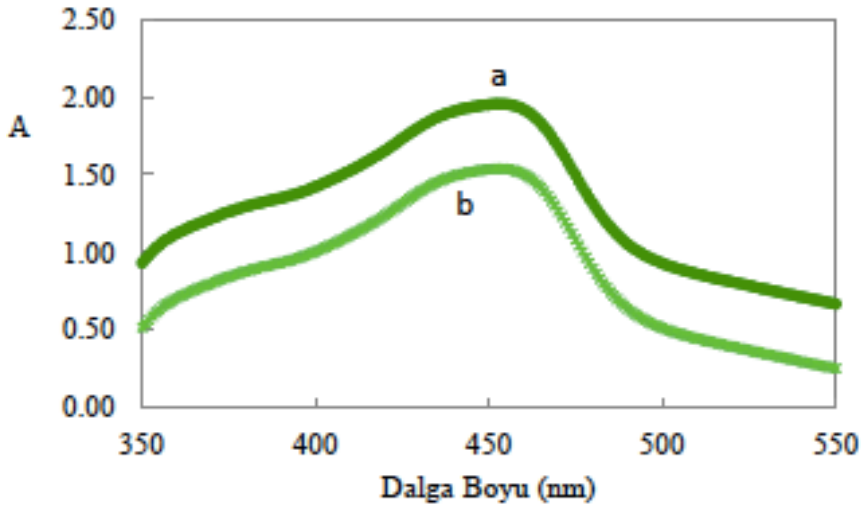
Yapılan ön denemelerde reaktif türlerin üretildiği ortama antioksidanın (Kuarcetin, kafeik asit ve yeşil çay örnek olarak seçilmiştir) fazlası ilave edilmiş, radikalleri süpürdükten sonra ortamda kalan antioksidan CUPRAC yöntemiyle tayin edilmiştir. Şekil 4.20, 4.21 ve 4.22 sırasıyla ön deneme prosedürünü takiben elde edilen sonuçların karşılaştırmasını göstermektedir. Hidrojen peroksit içermeyen (reaktif türleri üretmeyen) aynı miktarlardaki reaksiyon karışımı aynı şekilde CUPRAC yöntemiyle analiz edilmiştir. Aradaki fark süpürülen hidroksil radikali ile aynı zamanda antioksidan aktivitesi ile orantılı bulunmuştur.



Şekil 4.20 : (1) 0,05 mL 20 mM H₂O₂ (2) 0,5 mL 5x10⁻⁴ M kafeik asit+0,05 mL 20 mM H₂O₂ (3) 0,5 mL 5x10⁻⁴ M kafeik asit + 0,4 mL 500 ppm nanoceria + 0,05 mL 20 mM H₂O₂ + 0,150 mL 804 U mL⁻¹ katalaz (4) 0,05 mL 20 mM H₂O₂ +0,150 mL 804 U mL⁻¹ katalaz (5) 0,5 mL 5x10⁻⁴ M kafeik asit (6) Referans. Çözeltiler tampon ile 1,1 mL'ye tamamlandıktan sonra 3 mL CUPRAC reaktifi eklenmiştir.



Şekil 4.21 : (a) 0,5 mL 5×10^{-4} M kafeik asit (b) 0,5 mL 5×10^{-4} M kafeik asit + 0,4 mL 500 ppm nanoceria + 0,05 mL 20 mM H_2O_2 + 0,150 mL 804 U mL⁻¹ katalaz. Çözeltiler tampon ile 1,1 mL'ye tamamlandıktan sonra 3 mL CUPRAC reaktifi eklenmiştir.



Şekil 4.22 : (a) 0,5 mL yeşil çay çözeltisi (b) 0,5 mL yeşil çay çözeltisi + 0,4 mL 500 ppm nanoceria + 0,05 mL 20 mM H_2O_2 + 0,150 mL 804 U mL⁻¹ katalaz. Çözeltiler tampon ile 1,1 mL'ye tamamlandıktan sonra 3 mL CUPRAC reaktifi eklenmiştir.

Yapılan ön deneme sonuçlarına göre en uygun çalışma koşulları belirlenmiştir. Nanoceria ve hidrojen peroksit karışımı ile radikaller oluşturulduktan sonra hidrojen peroksidin fazlasının uzaklaştırılması için katalaz enzimi kullanılmıştır. Bu karışım santrifüj edildikten sonra elde edilen çözelti stok radikal çözeltisi olarak kullanılmıştır. Bu işlemler sırasında hidrojen peroksitin uzaklaştırıp uzaklaştırılmadığı CUPRAC yöntemiyle, radikal olup olmadığı ise DMPD reaktifi ile kontrol edilir. Bu denemelerden elde edilen sonuçlarla materyal ve metod kısmında bahsedilen ve radikal stok çözeltisi kullanılan prosedür geliştirilmiştir. Bu prosedürle

antioksidanların hidroksil radikalini süpürme çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.9’da verilmiştir. Aynı prosedürle gerçek örnek olarak marketlerden sağlanan bitki çayları ile de çalışılmıştır. Çay infüzyonları için bir poşet çay, 250 mL kaynar suda 3 dakika tutulmuş oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra 1/5 oranında seyreltilmiştir. Bu çözeltilerden 0,2 mL alınarak süpürme çalışmaları yapılmıştır. Sonuçlar çizelge 4.10’de verilmiştir. Yüzde süpürme aktivitesi eşitlik 4.6’ya göre hesaplanmıştır.

$$\text{Yüzde süpürme aktivitesi} = 100 \times (A_0 - A)/A_0 \quad (4.6)$$

A_0 : Antioksidanın başlangıç absorbansı/CUPRAC reaktifi ile (reaktif türlerin yokluğunda)

A : NC/H₂O₂/Katalaz/Antioksidan/CUPRAC reaktifi içeren karışımın absorbansı (reaktif türlerin varlığında)

Çizelge 4.9 : Seçilen antioksidanların CUPRAC metodu ile ölçülen yüzde süpürme kapasiteleri (Tüm antioksidan konsantrasyonları 2.44×10^{-5} mol/L olarak alınmıştır).

Süpürücü Antioksidan	Absorbans		Süpürme aktivitesi (%)
	A_0	A	
Troloks	0.306 (± 0.003)	0.291 (± 0.008)	4.90 (± 0.03)
Kafeik asit	0.915 (± 0.002)	0.487 (± 0.003)	46.73 (± 0.01)
Rutin	0.845 (± 0.001)	0.634 (± 0.002)	25.00 (± 0.02)
Kuersetin	1.421 (± 0.009)	0.658 (± 0.012)	53.70 (± 0.10)
Ferulik asit	0.368 (± 0.002)	0.294 (± 0.009)	20.00 (± 0.02)
Gallik asit	0.754 (± 0.011)	0.567 (± 0.005)	24.80 (± 0.02)
Kateşin	1.048 (± 0.012)	0.860 (± 0.002)	18.00 (± 0.01)

Çizelge 4.10 : Çeşitli bitki infüzyonlarının CUPRAC metodu ile ölçülen yüzde süpürme kapasiteleri.

Süpürücü çay örneği	Absorbans		Süpürme aktivitesi (%)
	A_0	A	
Yeşil çay	0.632 (± 0.006)	0.363 (± 0.002)	42.65 (± 0.01)
Ada çayı	1.182 (± 0.001)	0.862 (± 0.008)	27.04 (± 0.01)
Ihlamur	0.206 (± 0.012)	0.165 (± 0.010)	19.80 (± 0.07)
Kuşburnu	0.531 (± 0.008)	0.405 (± 0.005)	23.70 (± 0.02)
Hibiskus	0.301 (± 0.006)	0.233 (± 0.009)	22.76 (± 0.04)
Kekik	0.243 (± 0.011)	0.1064 (± 0.001)	56.25 (± 0.05)
İspanyol kekiği	1.759 (± 0.009)	1.247 (± 0.002)	29.10 (± 0.01)
Nane	0.524 (± 0.002)	0.307 (± 0.008)	41.35 (± 0.02)

DMPD ve CUPRAC metodu ile ölçülen seçilen antioksidanların reaktif türleri süpürücü aktiviteleri Spearman korelasyonu ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar N=7 sayıda antioksidan bileşiğin korelasyon katsayısının 0.89286 ve iki uçlu P değerinin 0.00681 olduğunu göstermektedir. DMPD sonuçlarının CUPRAC sonuçlarından yüksek olmasının nedeni iki metodunun mekanizmaları arasındaki farktan ötürüdür. DMPD metodu DMPD-kinon katyonik radikallerinin nanoceria ile indüklenen ortamdaki renk değişimine bağlı olarak ölçüm yaparken, CUPRAC metodu antioksidanların elektron transferi kapasitelerini bakır-neokuprain kompleksi oluşumuna bağlı olarak ölçmektedir. DMPD çalışmasında antioksidanların birincil ara yükseltgenme ürünleri reaktif türlerin sönmelenme etkinliğini devam ettirmiş, böylece CUPRAC metoduna göre daha yüksek süpürme aktivitesi göstermiş olabilir. Çünkü CUPRAC metodunda sadece ana antioksidan maddesinden kalan miktar cuprik-neokuprain reaktifine cevap verirken, kinon yükseltgenme ürünleri reaktifte cevap vermemektedir. Ayrıca CUPRAC metodunda antioksidan maddenin fazlasının eklenmesine önem verilmesi gerekmektedir çünkü reaktif türlerin süpürülmesinden sonra kalan miktarının yeterli bir kesinlik içinde tayin edilebilmesi gerekmektedir. Diğer yandan Spearman korelasyon analizi istatistiksel olarak bitki çaylarına dair belirgin bir ilişki göstermemektedir. Bunun sebebi de muhtemelen bitki çaylarının çok daha kompleks bir ortama sahip olması ve kolorimetrik cevap açısından daha fazla çeşitlilik göstermesidir.

5. GENEL SONUÇ VE DEĞERLENDİRMELER

Antioksidan aktivitesi çalışmalarında reaktif türlerin biyolojik olarak sönümlenmesi, sadece elektron transferine dayanan yöntemlere karşın daha gerçekçi bir yaklaşım sunmaktadır. Bu nedenle nanoceria olarak da adlandırılan seryum partiküllerini temel alan bir tayin metodu, reaktif türleri nanopartikül yüzeyinde oluşturacak şekilde geliştirilmiştir. Çalışmada nanoceria, Türkiye'ye özgü bir kekik türü olan zahter infüzyonu içerisinde yeşil sentez pratikleri uygulanarak üretilmiştir. Zahter içeriğindeki yüksek antioksidan ve fenolik maddeler sebebi ile nanopartikül sentezinin zararlı bir yükseltgen madde kullanılmadan gerçekleşmesini sağlamış, ayrıca ikinci bir kaplama veya stabilizasyon ajanına olan ihtiyacı da ortadan kaldırmıştır.

Sentezlenen seryum partikülleri, nano yüzey özellikleri ve trivalent ve tetravalent seryum iyonları arasındaki geçişinden doğan peroksidaz benzeri davranışı sebebi ile hidrojen peroksit varlığında reaktif türler üretmiştir. Üretilen reaktif türlerin tayini DMPD probunun renkli DMPD katyonuna dönüşümü üzerinden kolorimetrik olarak takip edilmiş ve 515 nm'de antioksidan madde varlığında ve yokluğunda yapılan ölçümler ile reaktif türlerin yüzde süpürülme kapasiteleri ilk ve son absorbans değerleri kullanılarak hesaplanmıştır. Nanoceria'nın reaktif türleri hızlı ve kolay üretmesi, ve DMPD prob maddesinin renk değişiminin inkübasyona gerek duymaması sebebi ile tekrarlanabilir bir antioksidan aktivitesi yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemin validasyonu literatürde yaygın olarak kullanılan modifiye-CUPRAC yöntemi ile yapılmış ve iki yöntemden elde edilen sonuçlar hem sentetik hem de gerçek çay örnekleri için karşılaştırılmıştır. Validasyon örneklerinin saf ve sentetik antioksidan bileşikler bakımından uyduğu gözlenmiştir. Literatürde yer alan bazı nanoceria yöntemlerine kıyasla, geliştirilen yöntem nanoceria'nın renk değişiminden ziyade DMPD maddesinin dolaylı olarak renk değişimini izlediği için yüksek hassasiyete sahiptir. Analitik dalgaboyunun kırmızıya kayması UV ölçümlerinde bitki pigmentlerinden kaynaklanan bir girişimi de ayrıca önlemektedir. Geliştirilen yöntem hızlı ve ucuz olduğu gibi rutin laboratuvar

alışmalarında kullanılan ekipmanlarla da yapılabilmektedir. Konsantrasyon, zaman ve pH gib pek çok reaksiyon parametresi etkin bir şekilde tekrarlanabilirlik açısından optimize edilmiştir. Pek çok benzer yöntemin aksine, tez sürecinde geliştirilen yöntem inkübasyon zamanına ihtiyaç duymaz ve kolay uygulanır. Reaksiyon DMPD reaktifinin eklenmesi ile hızlıca başlatılır. Geliştirilen yöntemin Nanomaddeler üzerinden reaktif türleri süpürerek yapılan antioksidan aktivitesi çalışmalarında kendine özgü konumunu edinmesi beklenmektedir.



KAYNAKLAR

- [1] Halliwell, B. ve Gutteridge, J. (2015). *Free radicals in biology and medicine*, Oxford: Oxford University Press.
- [2] Halliwell, B. ve Aruoma, O. (1991). DNA damage by oxygen-derived species its mechanism and measurement in mammalian systems, *FEBS Letters.*, 281(1-2), 9-19.
- [3] Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., Bekdeşer, B. ve Bener, M. (2014). The CUPRAC Methods of Antioxidant Measurement for Beverages, *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*, 235-244.
- [4] Xu, L. ve Wang, J. (2012). Magnetic nanoscaled Fe₃O₄/CeO₂ composite as an efficient Fenton-like heterogeneous catalyst for degradation of 4-chlorophenol, *Environ Sci Technol*, 46(18), 10145-10153.
- [5] Choe, E. ve Min, D. B. (2006). Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods, *Crit Rev Food Sci Nutr*, 46(1), 1-22. doi:10.1080/10408390500455474
- [6] Babuponnussami, A. ve Muthukumar, K. (2014). A review on Fenton and improvements to the Fenton process for wastewater treatment, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1), 557-572.
- [7] Munter, R. (2010). ChemInform Abstract: Advanced Oxidation Processes: Current Status and Prospects, *ChemInform*, 32(41).
- [8] Eberhardt, M. K., Ramirez, G., ve Ayala, E. (1989). Does the reaction of copper(I) with hydrogen peroxide give hydroxyl radicals? A study of aromatic hydroxylation, *The Journal of Organic Chemistry*, 54(25), 5922-5926.
- [9] Rivas, F. J. (2002). Reply to comment on "Oxidation of p-hydroxybenzoic acid by Fenton's reagent". *Water Res*, 36(19), 4942.
- [10] Eisenhauer, H. R. (1964). Oxidation of phenolic wastes, *J. Water Pollut. Control Fed.*, 36, 1116-1128.
- [11] Ma, Y.S., Huang, S.T. ve Lin J.G. (2000). Degradation of 4-nitro phenol using the Fenton process, *Water Sci. Technol.*, 42, 155-160.
- [12] Babuponnusami, A. ve Muthukumar, K. (2011). Degradation of phenol in aqueous solution by Fenton, sono-Fenton, Sono-photo-Fenton methods, *Clean-Soil Air Water*, 39, 142-147.
- [13] Parsons, S. (2004). *Advanced Oxidation Processes for Water and Wastewater Treatment*. IWA Publishing, London, 2004.

- [14] **Xu, L., ve Wang, J.** (2011). A heterogeneous Fenton-like system with nanoparticulate zero-valent iron for removal of 4-chloro-3-methyl phenol, *J Hazard Mater*, 186(1), 256-264.
- [15] **Zhang, W. X.** (2003). Nanoscale iron particles for environmental remediation; an overview, *J. Nanopart. Res.*, 5, 323–332.
- [16] **Zi, X. Q., Elliott, D. W. ve Zhang, W.X.** (2006). Zero-valent nano particles for abatement of environmental pollutants; materials and engineering aspects, *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.*, 31, 111–112.
- [17] **Phenrat, T., Saleh, N., Sirk, K., Tilton, R. D. ve Lowry, G. V.** (2007). Aggregation and sedimentation of aqueous nanoscale zerovalent iron dispersions, *Environ Sci Technol*, 41(1), 284-290.
- [18] **Orera, V. M., Merino, R.I., ve Peña, F.** (1994). $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$ conversion in ceria-doped zirconia single crystals induced by oxido-reduction treatments, *Solid State Ionics*, 72(2), 224–231.
- [19] **Grulke, E., Reed, K., Beck, M., Huang, X., Cormack, A. ve Seal, S.** (2014). Nanoceria: factors affecting its pro- and anti-oxidant properties, *Environ. Sci.: Nano*, 1(5), 429-444.
- [20] **Rebellato, J., Natalie, A. A., ve Glisenti, A.**, (2008). Influence of the synthesis procedure on the properties and reactivity of nanostructured ceria powders, *Appl. Catal., A*, 339, 108–120.
- [21] **Paier, J., Penschke, C., ve Sauer, J.** (2013). Oxygen defects and surface chemistry of ceria: quantum chemical studies compared to experiment, *Chem Rev*, 113(6), 3949-3985.
- [22] **Reed, K., Cormack, A., Kulkarni, A., Mayton, M., Sayle, D., Klaessig, F., ve Stadler, B.** (2014). Exploring the properties and applications of nanoceria: is there still plenty of room at the bottom?, *Environ. Sci. Nano.*, 1(5), 390-405.
- [23] **Sun, C., Li, H., ve Chen, L.** (2012). Nanostructured ceria-based materials: synthesis, properties, and applications, *Energy & Environmental Science*, 5(9).
- [24] **Palma, V. ve Barba, D.** (2014). H_2S purification from biogas by direct selective oxidation to sulfur on $\text{V}_2\text{O}_5\text{-CeO}_2$ structured catalysts, *Fuel*, 135, 99-104.
- [25] **Aktas, O., Yasyerli, S., Dogu G. ve Dogu, T.** (2010). Effect of synthesis conditions on the structure and catalytic performance of V and Ce-incorporated SBA-15-like materials in propane selective oxidation, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 49, 6790–6802.
- [26] **Xu, C. ve Qu, X.**, (2014). Cerium oxide nanoparticle: a remarkably versatile rare earth nanomaterial for biological applications, *NPG Asia Materials*, 6, 1-16.
- [27] **Kullgren, J.** (2012). *Oxygen vacancy chemistry in ceria*, Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology 896, (pp. 21-24). Sweden: University of Uppsala.

- [28] **Bokare, A. D. ve W. Choi** (2014). Review of iron-free Fenton-like systems for activating H_2O_2 in advanced oxidation processes, *J. Hazard Mater.*, 275, 121-135.
- [29] **Campbell, C. T. ve Peden, C. H.** (2005). Chemistry oxygen vacancies and catalysis on ceria surfaces, *Science*, 309, 713-714.
- [30] **Heckert, E. G., Seal, S. ve Self, W. T.** (2008). Fenton-like reaction catalyzed by the rare earth inner transition metal cerium. *Environ Sci Technol*, 42(13), 5014-5019.
- [31] **Ji, P., Wang, L., Chen, J. ve Zhang, J.** (2010). Ce^{3+} centric organic pollutant elimination by CeO_2 in the presence of H_2O_2 , *Chem. Cat. Chem.*, (2), 1552-1554.
- [32] **Chen, F., Shen, X., Wang, Y. ve Zhang, J.** (2012). $\text{CeO}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ system catalytic oxidation mechanism study via a kinetic investigation to the degradation of acid orange, *Appl. Catal. B. Environ.*, 121(122), 223-229
- [33] **Wang, Y., Shen, X. ve Chen, F.** (2014) Improving the catalytic activity of $\text{CeO}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ system by sulfation pretreatment of CeO_2 , *J. Mol. Catal. A. Chem.*, 381, 38-45.
- [34] **Chen, L., Fleming, P., Morris, V., Holmes, J. D. ve Morris, M. A.** (2010). Size related lattice parameter changes and surface defects in ceria nanocrystals, *J. Phys. Chem. C*, 114, 12909–12919.
- [35] **Muccillo, E. N. S., Rocha, R. A., Tadokoro, S. K., Rey, J. F. Q., Muccillo, R. Ve Steil, M. C.** (2004). Electrical conductivity of CeO_2 prepared from nanosized powders, *J. Electroceram.*, 13, 609–612.
- [36] **Zhang, F., Chan, S.-W., Spanier, J. E., Apak, E., Jin, Q., Robinson, R. D. ve Herman, I. P.** (2002). Cerium oxide nanoparticles: Size-selective formation and structure analysis. *Applied Physics Letters*, 80(1), 127-129.
- [37] **Zhang, F., Jin, Q., ve Chan, S. W.** (2004). Ceria Nanoparticles: Size, size distribution, and shape, *J. Appl. Phys.*, 95, 4319–4326.
- [38] **Kamruddin, M., Ajikumar, P. K., Nithya, R., Tyagi, A. K. ve Raj, B.** (2004). Synthesis of nanocrystalline ceria by thermal decomposition and soft chemistry methods, *Scr. Mater.*, 50, 417–422.
- [39] **Mädler, L., Stark, W. ve Pratsinis, S.** (2002). Flame-made Ceria Nanoparticles. *Journal of Materials Research*, 17(6), 1356-1362.
- [40] **Purohit, R. D., Sharma, B. P., Pillai, K. T., ve Tyagi, A. K.** (2001). *Ultrafine Ceria Powders Via Glycine–Nitrate Combustion* (Vol. 36).
- [41] **Ozer, N.** (2001). *Optical properties and electrochromic characterization of sol–gel deposited ceria films* (Vol. 68).
- [42] **Laberty-Robert, C., Long, J. W., Lucas, E. M., Pettigrew, K. A., Stround, R. M., Doescher, R. M. ve Rolison, D. R.** (2006). Sol-gel driven ceria nanoarchitectures: synthesis, characterization, and electrical properties, *Chem. Mater.*, 18, 50–58.

- [43] Yuan, Q., Duan, H. H., Li, L. L., Sun, L. D., Zhang, Y. W., ve Yan, C. H. (2009). Controlled synthesis and assembly of ceria-based nanomaterials, *J Colloid Interface Sci*, 335(2), 151-167.
- [44] Sankar, V., Salinraj, P., Athira, R., Soumya, R. S., ve Raghu, K. G. (2015). Cerium nanoparticles synthesized using aqueous extract of *Centella asiatica*: Characterization, determination of free radical scavenging activity and evaluation of efficacy against cardiomyoblast hypertrophy, *RSC Advances*, 5(27), 21074-21083.
- [45] Rajan, R., Chandran, K., Harper, S. L., Yun, S., ve Kalaichelvan, P. T. (2015). Plant extract synthesized silver nanoparticles: An ongoing source of novel biocompatible materials, *Industrial Crops and Products*, 70, 356-373.
- [46] Makarov, V., Love, A. J., Sinitsyna, O., S Makarova, S., Yaminsky, I., Taliansky, M., ve Kalinina, N. (2014). "Green" Nanotechnologies: *Synthesis of Metal Nanoparticles Using Plants* (Vol. 6).
- [47] Arumugam, A., Karthikeyan, C., Hameed, A. S., Gopinath, K., Gowri, S. ve Karthika, V. (2015). Synthesis of cerium oxide nanoparticles using *Gloriosa superba* L. leaf extract and their structural, optical and antibacterial properties, *Materials Science and Engineering: C*, 49, 408-415.
- [48] Turkmen, F. U., Mercimek, H.A. ve Sekeroglu, N. (2016). Total Phenolic Content, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Homemade and Industrial Samples of Breakfast Zahter, Herbal Mixture, *Akademik Gıda*, 14(3), 242-246.
- [49] Gumus, T., Albayrak, S., Sagdic, O., ve Arici, M. (2011). Effect of Gamma Irradiation on Total Phenolic Contents and Antioxidant Activities of *Satureja Hortensis*, *Thymus Vulgaris*, and *Thymbra Spicata* from Turkey. *International Journal of Food Properties*, 14(4), 830-839.
- [50] Berker, K. I., Olgun, F. A., Ozyurt, D., Demirata, B., ve Apak, R. (2013). Modified Folin–Ciocalteu Antioxidant Capacity Assay for Measuring Lipophilic Antioxidants, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(20), 4783-4791.
- [51] Blainski, A., Lopes, G., ve Mello, J. D. (2013). Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense*, *L. Molecules*, 18(6), 6852-6865.
- [52] Rebaya, A., Belghith, S., Baghdikian, B., Leddet, V. M., Fathi, M., Olivier, E., . . . Trabelsi ayadi, M. (2015). Total Phenolic, Total Flavonoid, Tannin Content, and Antioxidant Capacity of *Halimium halimifolium* (Cistaceae), *J. of App. Pharm. Science*, 5, 52-57.
- [53] Ozyurt, D., Demirata, B., ve Apak, R. (2010). Modified cerium(IV)-based antioxidant capacity (CERAC) assay with selectivity over citric acid and simple sugars, *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(3), 282-288.

- [54] **Bektasoglu, B., Ozyurek, M., Guclu, K., ve Apak, R.** (2008). Hydroxyl radical detection with a salicylate probe using modified CUPRAC spectrophotometry and HPLC, *Talanta*, 77(1), 90-97.
- [55] **Yu, F., Xu, D., Lei, R., Li, N. ve Li, K.** (2008). Free-Radical Scavenging Capacity Using the Fenton Reaction with Rhodamine B as the Spectrophotometric Indicator, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 730-735.
- [56] **Wang, Q., Tian, S., ve Ning, P.** (2013). Degradation Mechanism of Methylene Blue in a Heterogeneous Fenton-like Reaction Catalyzed by Ferrocene, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 53(2), 643-649.
- [57] **Bekdeser, B., Ozyurek, M., Guclu, K., ve Apak, R.** (2012). Novel spectroscopic sensor for the hydroxyl radical scavenging activity measurement of biological samples, *Talanta*, 99, 689-696.
- [58] **Setsukinai, K., Urano, Y., Kakinuma, K., Majima, H. J., ve Nagano, T.** (2002). Development of Novel Fluorescence Probes That Can Reliably Detect Reactive Oxygen Species and Distinguish Specific Species, *Journal of Biological Chemistry*, 278(5), 3170-3175.
- [59] **Can, Z., Üzer, A., Türkekul, K., Erçağ, E., ve Apak, R.** (2015). Determination of Triacetone Triperoxide with a N,N- Dimethyl-p-phenylenediamine Sensor on Nafion Using Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles, *Analytical Chemistry*, 87(19), 9589-9594.
- [60] **Hayon, E. ve S. Rao, P.** (1975). Oxidation of aromatic amines and diamines by OH radicals. Formation and ionization constants of amine cation radicals in water, *The Journal of Physical Chemistry*, 79(11), 1063-1066.
- [61] **Lugasi, A.** (1997), *Natural Antioxidants Chemistry, Health Effects, and Applications*. Edited by F. Shahidi. VIII and 432 pages, numerous figures and tables. AOCS Press, Champaign, Illinois, 1997.
- [62] **Klaunig, J. E., ve Wang, Z.** (2018). Oxidative stress in carcinogenesis, *Current Opinion in Toxicology*, 7, 116-121.
- [63] **Zukowski, P., Maciejczyk, M., ve Waszkiel, D.** (2018). Sources of free radicals and oxidative stress in the oral cavity, *Arch Oral Biol*, 92, 8-17.
- [64] **Matouhg, F. A., Budin, S. B., Hamid, Z. A., Alwahaibi, N., ve Mohamed, J.** (2012). The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications, *SQU Medical Journal*, 12, 5–18.
- [65] **Lushchak, V. L.** (2014a). Classification of oxidative stress based on its intensity, *Exp ClinSci*, 13, 922–937.
- [66] **Jimenez-Del-Rio, M. ve Velez-Pardo, C.** (2012). *The Bad, the Good, and the Ugly about Oxidative Stress. Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 13.
- [67] **Halliwell, B. ve Gutteridge, J. M. C.** (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, *Biochemical Journal*, 219, 1-14.

- [68] **Fridovich, I.** (1986). Superoxidase dismutases, *Methods Enzymol*, 58, 61-97.
- [69] **Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O. ve Remacle, J.** (1994). Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress, *Free Radical Medicine and Biology*, 17, 235–248.
- [70] **Lu, A. L., Li, X., Gu, Y., Wright, P. M. ve Chang, D. Y.** (2001). Repair of oxidative DNA damage: mechanisms and functions. *Cell Biochem Biophys*, 35(2), 141-170.
- [71] **Naqui, A., Chance, B. ve Cadenas, E.** (1986). Reactive oxygen intermediates in biochemistry, *Annual Review of Biochemistry*, 55, 137- 166.
- [72] **Ishikawa, K., Takenaga, K., Akimoto, M., Koshikawa, N., Yamaguchi, A., Imanishi, H., . . . Hayashi, J.** (2008). ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science*, 320(5876), 661-664.
- [73] **Barbusinski, K.** (2009). *Fenton reaction - Controversy concerning the chemistry* (Vol. 16).
- [74] **Dunford, H. B.** (2002). Oxidations of iron(II)/(III) by hydrogen peroxide: from aquo to enzyme. *Coordination Chemistry Reviews*, 233-234, 311-318.
- [75] **Casero, I., Sicilia, D., Rubio, S. ve Pérez-Bendito, D.** (1997). *Chemical degradation of aromatic amines by Fenton's reagent* (Vol. 31).
- [76] **Kuo, W. G.** (1992). Decolorizing dye wastewater with Fenton's reagent, *Water Research*, 26(7), 881-886.
- [77] **Nam, S., Renganathan, V. ve Tratnyek, P.** (2001). *Substituent effects on azo dye oxidation by the FeIII-EDTA-H₂O₂ system* (Vol. 45).
- [78] **Barbusiński, K.** (2005). The Modified Fenton Process for Decolorization of Dye Wastewater, *Polish Journal of Environmental Studies*, 14(3), 281-285.
- [79] **Huston P. L. ve Pignatello J.J.** (1999). Degradation of selected pesticide active ingredients and commercial formulations in water by the photo-assisted Fenton reaction, *Water Res.*, 33, 1238-1246.
- [80] **Barbusiński K. ve Filipek K.** (2001). Use of Fenton's reagent for removal of pesticides from industrial wastewater, *Polish Journal of Environmental Studies*, 10(4), 207-212.
- [81] **Ikehata K. ve Gamal El-Din M.** (2006). Aqueous pesticide degradation by hydrogen peroxide/ultraviolet irradiation and Fenton-type advanced oxidation processes: a review, *J. Environ. Eng. Sci.*, 5, 81-135.
- [82] **Lin S.H., Lin C.M. ve Leu H.G.** (1999). Operating characteristics and kinetic studies of surfactant wastewater treatment by Fenton oxidation, *Water Res.*, 33, 1735-1741.
- [83] **Kitis M., Adams C.D. ve Daigger G.T.** (1999). The effects of Fenton's reagent pretreatment on the biodegradability of nonionic surfactants, *Water Res.*, 1999, 33, 2561-2568.

- [84] **Perkowski, J., Jóźwiak, W., Kos, L. ve Stajszczyk, P.** (2006). Application of Fenton's reagent in detergent separation in highly concentrated water solutions, *Fibres and Textiles in Eastern Europe*, 14, 114-119.
- [85] **Liou, M.-J., Lu, M.-C., ve Chen, J.-N.** (2003). Oxidation of explosives by Fenton and photo-Fenton processes, *Water Research*, 37(13), 3172-3179.
- [86] **Deguillaume, L., Leriche, M., ve Chaumerliac, N.** (2005). Impact of radical versus non-radical pathway in the Fenton chemistry on the iron redox cycle in clouds, *Chemosphere*, 60(5), 718-724.
- [87] **Haber F. ve Willstätter R.** (1931). Unpaarigkeit und radikalketten im reaktionsmechanismus organischer und enzymatischer vorgange, Ber. Dtsch. Chem. Ges., 64, 2844-2856.
- [88] **Kremer M.L.** (1999). Mechanism of the Fenton reaction. Evidence for a new intermediate, *Phys. Chem.*, 1, 3595-3605.
- [89] **Barb, W. G., Baxendale, J. H., George, P. ve Hargrave, K. R.** (1951). Reactions of ferrous and ferric ions with hydrogen peroxide. Part I.—The ferrous ion reaction. *Transactions of the Faraday Society*, 47(0), 462-500.
- [90] **Prousek, J.** (1995). Fenton Reaction After a Century, *Chemické Listy*, 89, 11-21.
- [91] **Mwebi, N.O.** (2005). Fenton & Fenton-like reactions: the nature of oxidizing intermediates involved, Faculty of the Graduate School of the University of Maryland, Maryland.
- [92] **Branchaud, B.P.** (1999). Free radicals as a result of dioxygen metabolism in A. Sigel & H. Sigel (eds.), *Metal ions in biological system*. Mercel & Decker NY (publ.), 36, 79-102 (1999).
- [93] **Goldstein, S., ve Meyerstein, D.** (1999). Comments on the Mechanism of the "Fenton-Like" Reaction, *Accounts of Chemical Research*, 32(7), 547-550.
- [94] **Sawyer, D. T., Sobkowiak, A., ve Matsushita, T.** (1996). Metal [ML_x; M = Fe, Cu, Co, Mn]/Hydroperoxide-Induced Activation of Dioxygen for the Oxygenation of Hydrocarbons: Oxygenated Fenton Chemistry, *Accounts of Chemical Research*, 29(9), 409-416.
- [95] **Walling, C.** (1998). Intermediates in the Reactions of Fenton Type Reagents, *Accounts of Chemical Research*, 31(4), 155-157.
- [96] **Yamazaki, I., ve Piette, L. H.** (1991). EPR spin-trapping study on the oxidizing species formed in the reaction of the ferrous ion with hydrogen peroxide, *Journal of the American Chemical Society*, 113(20), 7588-7593.
- [97] **Pignatello, J. J., Oliveros, E., ve MacKay, A.** (2006). Advanced Oxidation Processes for Organic Contaminant Destruction Based on the Fenton Reaction and Related Chemistry, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 36(1), 1-84.

- [98] **Rivas, F.J., Beltran, F.J., Frades, J. ve Buxeda, P.** (2001). Oxidation of p-hydroxybenzoic acid by Fenton's reagent, *Water Res.*, 35, 387–396.
- [99] **Eisenhauer, H.R.** (1964). Oxidation of phenolic wastes, *J. Water Pollut. Control Fed.*, 36, 1116–1128.
- [100] **Pignatello, J. J.** (1992). Dark and photoassisted iron(3+)-catalyzed degradation of chlorophenoxy herbicides by hydrogen peroxide, *Environmental Science & Technology*, 26(5), 944-951.
- [101] **Kavitha, V. ve Palanivelu, K.** (2005). Destruction of cresols by Fenton oxidation process. *Water Research*, 39(13), 3062-3072.
- [102] **Kwon, B. G., Lee, D. S., Kang, N., ve Yoon, J.** (1999). Characteristics of p-chlorophenol oxidation by Fenton's reagent, *Water Research*, 33(9), 2110-2118.
- [103] **Xu, X.R., Li, X.Y., Li, X.Z. ve Li, H.B.** (2009). Degradation of melatonin by UV, UV/H₂O₂, Fe²⁺/H₂O₂ and UV/Fe²⁺/H₂O₂ processes, *Sep. Purif. Technol.*, 68, 261–266.
- [104] **Ito, K., Jian, W., Nishijima, W., Baes, A. U., Shoto, E., ve Okada, M.** (1998). Comparison of ozonation and AOPs combined with biodegradation for removal of THM precursors in treated sewage effluents, *Water Science and Technology*, 38(7), 179-186.
- [105] **Lin, S. H. ve Lo, C. C.** (1997). Fenton process for treatment of desizing wastewater. *Water Research*, 31(8), 2050-2056.
- [106] **Mason, T. J. ve Cordemans, E. D.** (1996). Ultrasonic intensification of chemical processing and related operations: a review, *Chem. Eng. Res. Des.*, 74, 511–516.
- [107] **Kurt, U., Apaydin, O., ve Gönüllü, M.** (2007). Reduction of COD in wastewater from an organized tannery industrial region by Electro-Fenton process, *J. Hazard. Mater.*, 143, 33–40.
- [108] **Brillas, E. ve Casado, J.** (2002). Aniline degradation by electro-Fenton1 and peroxi-coagulation processes using a flow reactor for waste water treatment, *Chemosphere*, 47, 241–248.
- [109] **Badellino, C., Rodrigues, C. A. ve Bertazzoli, R.** (2006). Oxidation of pesticides by in situ electrogenerated hydrogen peroxide: study for the degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, *J. Hazard. Mater.*, 137, 856–864.
- [110] **Zhang, H., Zhang, D. ve Zhou, J.** (2006). Removal of COD from landfill leachate by electro- Fenton method, *J. Hazard. Mater.*, 135,106–111.
- [111] **Zhang, H., Fei, C., Zhang, D. ve Tang, F.** (2007). Degradation of 4-nitrophenol in aqueous medium by electro-Fenton method, *J. Hazard. Mater.* 145, 227–232.
- [112] **Ting, W.P., Lu, M.C. ve Huang, Y. H.** (2008). The reactor design and comparison of Fenton, electro-Fenton and photoelectron-Fenton processes for mineralization of benzene sulfonic acid (BSA), *J. Hazard. Mater.*, 156, 421–427.

- [113] **Ruppert, G., Bauer, R. ve Heisler, G.** (1993). The photo-Fenton reaction – an effective photochemical wastewater treatment process, *J. Photochem. Photobiol. A-Chem.*, 73, 75–78.
- [114] **Sun, Y. ve Pignatello, J. J.** (1993). Photochemical reactions involved in the total mineralization of 2,4-D by $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$, *Environ. Sci. Technol.*, 27, 304–310.
- [115] **Gogate, P. R. ve Pandit, A. B.** (2004). A review of imperative technologies for wastewater treatment II: hybrid methods, *Adv. Environ. Res.*, 8, 553–597.
- [116] **Faust, B. C. ve Hoigne, J.** (1990). Photolysis of $\text{Fe}(\text{III})$ –hydroxy complexes as sources of OH radicals in clouds, fog and rain, *Atmos. Environ.* 24A, 79–89.
- [117] **Safarzadeh-Amiri, A., Bolton, J. R. ve Cater, S. R.** (1997). Ferrioxalate-mediated photodegradation of organic pollutants in contaminated water, *Water Res.* 31, 787–798.
- [118] **De Oliveira, I.S., Viana, L., Verona, C., Fallavena, V. L. V., Azevedo, C. M. N. ve Pires, M.** (2007). Alkydic resin wastewaters treatment by Fenton and photo-Fenton processes, *J. Hazard. Mater.*, 146, 564–568.
- [119] **Legrini, O., Oliveros, E. ve Braun, A. M.** (1993). Photochemical processes for water treatment, *Chem. Rev.*, 93, 671–698.
- [120] **Vaishnave, P., Kumar, A., Ameta, R., Punjabi, P. B. ve Ameta, S. C.** (2014). Photo oxidative degradation of azure-B by sono-photo-Fenton and photo-Fenton reagents, *Arabian J. Chem.*, 7, 981–985.
- [121] **Joseph, J.M., Destailats, H., Hung, H.M. ve Hoffmann, M. R.** (2000). The sonochemical degradation of azobenzene and related azo dyes: rate enhancements via Fenton's reactions, *J. Phys. Chem. A*, 104, 301–307.
- [122] **Minero, C., Lucchiari, M., Vione, D. ve Maurino, V.** (2005). $\text{Fe}(\text{III})$ -enhanced sonochemical degradation of methylene blue in aqueous solution, *Environ. Sci. Technol.*, 39, 8936–8942.
- [123] **Adewuyi, Y. G.** (2005). Sonochemistry in environmental remediation. 1. Combinative and hybrid sonophotochemical oxidation processes for the treatment of pollutants in water, *Environ. Sci. Technol.*, 39, 3409–3420.
- [124] **Abdelsalam, M. E. ve Birkin, P. R.** (2002). A study investigating the sonoelectrochemical degradation of an organic compound employing Fenton's reagent, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 4, 5340–5345.
- [125] **Yasman, Y., Bulatov, V., Gridin, V.V., Agur, S., Galil, N., Armon, R. ve Schechter, I.** (2004). A new sono-electrochemical method for enhanced detoxification of hydrophilic chloroorganic pollutants in water, *Ultrason. Sonochem.*, 11, 365–372.
- [126] **Boye, B., Dieng, M. M. ve Brillas, E.** (2002). Degradation of herbicide 4-chlorophenoxyacetic acid by advanced electrochemical oxidation methods, *Environ. Sci. Technol.*, 36, 3030–3035.

- [127] **Babuponnusami, A. ve Muthukumar, K.** (2012). Advanced oxidation of phenol: a comparison between Fenton, electro-Fenton, sono-electro-Fenton and photo-electro-Fenton processes, *Chem. Eng. J.*, *183*, 1–9.
- [128] **Bautista, P., Mohedano, A. F., Casas, J. A., Zazo, J. A. Ve Rodriguez, J. J.** (2008). An overview of the application of Fenton oxidation to industrial wastewaters treatment, *J. Chem, Technol. Biotechnol.*, *83*, 1323-1338.
- [129] **Brillas E., Sires I. Ve Oturan, M. A.** (2009). Electro-Fenton process and related electro-chemical technologies based on fenton's reaction chemistry, *Chem. Rev.*, *109*, 6570-6631.
- [130] **Pouran, S. R., Raman, A. A. A. ve Daud, W. M. A. W.** (2014). Review on the application of modified iron oxides as heterogeneous catalysts in Fenton reactions, *Journal of Cleaner Production*, *64*, 24-35.
- [131] **Lofrano, G., Rizzo, L., Grassi ve M., Belgiorno, V.** (2009). Advanced oxidation of catechol: a comparison among photocatalysis, Fenton and photo-Fenton processes, *Desalination*, *249*, 878–883.
- [132] **Sedlak, D. L., ve Andren, A. W.** (1991). Oxidation of chlorobenzene with Fenton's reagent, *Environmental Science & Technology*, *25*(4), 777-782.
- [133] **Ai, Z., Lu, L., Li, J., Zhang, L., Qiu, J., ve Wu, M.** (2007). Fe@Fe₂O₃ Core–Shell Nanowires as Iron Reagent. 1. Efficient Degradation of Rhodamine B by a Novel Sono-Fenton Process, *The Journal of Physical Chemistry C*, *111*(11), 4087-4093.
- [134] **Moreno, A. D., Uribe, B. A. F. ve Zamora, R. M. R.** (2004). Electro-Fenton as a feasible advanced treatment process to produce reclaimed water, *Water Sci. Technol.*, *50*, 83–90.
- [135] **Iurascu, B., Siminiceanu, I., Vione, D., Vicente, M. A. ve Gil, A.** (2009). Phenol degradation in water through a heterogeneous photo-Fenton process catalyzed by Fe-treated laponite, *Water Res.*, *43*, 1313–1322.
- [136] **Faust, B.C. ve Hoigne, J.** (1990). Photolysis of Fe(III)-hydroxyl complexes as sources of OH radicals in clouds, fog and rain, *Atmos. Environ.*, *24*, 79e89.
- [137] **Katsumata, H., Kaneco, S., Suzuki, T., Ohta, K. ve Yobiko, Y.** (2005). Degradation of linuron in aqueous solution by the photo-Fenton reaction, *Chem. Eng. J.*, *108*, 269-276.
- [138] **Tamimi, M., Qourzal, S., Barka, N., Assabbane, A. ve Ait-Ichou, Y.** (2008). Methomyl degradation in aqueous solutions by Fenton's reagent and the photo-Fenton system, *Sep. Purif. Technol.*, *61*, 103-108.
- [139] **Pariente, M.I., Martínez, F., Melero, J.A., Botas, J.A., Velegraki, T., Xekoukoulotakis, N.P. ve Mantzavinos, D.** (2008). Heterogeneous photo-Fenton oxidation of benzoic acid in water: effect of operating conditions, reaction by-products and coupling with biological treatment, *Appl. Catal. B: Environ.*, *85*, 24-32.

- [140] **Usman, M., Faure, P., Hanna, K., Abdelmoula, M. ve Ruby, C.** (2012). Application of magnetite catalyzed chemical oxidation (Fenton-like and persulfate) for the remediation of oil hydrocarbon contamination, *Fuel*, 96, 270-276.
- [141] **Chun, J., Lee, H., Lee, S.-H., Hong, S.-W., Lee, J., Lee, C. ve Lee, J.** (2012). Magnetite/mesocellular carbon foam as a magnetically recoverable fenton catalyst for removal of phenol and arsenic, *Chemosphere*, 89, 1230-1237.
- [142] **Xia, M., Chen, C., Long, M., Chen, C., Cai, W. ve Zhou, B.** (2011). Magnetically separable mesoporous silica nanocomposite and its application in Fenton catalysis, *Microporous Mesoporous Mater.* 145, 217-223.
- [143] **Dükkancı, M., Gündüz, G., Yılmaz, S. ve Prihodko, R.V.** (2010). Heterogeneous Fenton-like degradation of Rhodamine 6G in water using CuFeZSM-5 zeolite catalyst prepared by hydrothermal synthesis, *J. Hazard. Mater.*, 181, 343-350.
- [144] **Ortiz de la Plata, G.B., Alfano, O.M. ve Cassano, A.E.** (2008). Optical properties of goethite catalyst for heterogeneous photo-Fenton reactions: comparison with a titanium dioxide catalyst, *Chem. Eng. J.*, 137, 396-410.
- [145] **Ortiz de la Plata, G.B., Alfano, O.M. ve Cassano, A.E.** (2010). Decomposition of 2- chlorophenol employing goethite as Fenton catalyst. I. Proposal of a feasible, combined reaction scheme of heterogeneous and homogeneous reactions, *Appl. Catal. B: Environ.*, 95, 1-13.
- [146] **Kwan, W.P. ve Voelker, B.M.** (2003). Rates of hydroxyl radical generation and organic compound oxidation in mineral-catalyzed fenton-like systems, *Environ. Sci. Technol.*, 37, 1150-1158.
- [147] **Ramankutty, C.G. ve Sugunan, S.** (2001). Surface properties and catalytic activity of ferrosinels of nickel, cobalt and copper, prepared by soft chemical methods, *Appl. Catal. A: Gen.*, 218, 39-51.
- [148] **Litter, M.I.** (1999). Heterogeneous photocatalysis: transition metal ions in photocatalytic systems, *Appl. Catal. B: Environ.*, 23, 89-114.
- [149] **Litter, M.I. ve Blesa, M.A.** (1992). Photodissolution of iron oxides. IV. A comparative study on the photodissolution of hematite, magnetite, and maghemite in EDTA media, *Can. J. Chem.*, 70, 2502-2510.
- [150] **Rusevova, K., Kopinke, F.-D. ve Georgi, A.** (2012). Nano-sized magnetic iron oxides as catalysts for heterogeneous Fenton-like reactions - influence of Fe(II)/Fe(III) ratio on catalytic performance, *J. Hazard. Mater.*, 241-242.
- [151] **Bergendahl, J.A. ve Thies, T.P.** (2004). Fenton's oxidation of MTBE with zero-valent iron, *Water Res.*, 38, 327-334.
- [152] **Hanna, K., Kone, T. ve Medjahdi, G.** (2008). Synthesis of the mixed oxides of iron and quartz and their catalytic activities for the Fenton-like oxidation, *Catal. Commun.*, 9, 955-959.

- [153] **Oliveira, L.C.A., Gonçalves, M., Guerreiro, M.C., Ramalho, T.C., Fabris, J.D., Pereira, M.C. ve Sapag, K.** (2007). A new catalyst material based on niobia/iron oxide composite on the oxidation of organic contaminants in water via heterogeneous Fenton mechanisms, *Appl. Catal. A: Gen.*, 316, 117-124.
- [154] **Takemura, Y., Mukai, T., Senoo, K. ve Suzuki, M.** (1995). Decomposition of Organic Chlorine Compounds by Fenton's Reaction on Reticulated Iron, *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, 21, 32-40.
- [155] **Trovarelli, A.** (1996). Catalytic properties of ceria and CeO₂-containing materials, *Catal. Rev. Sci. Eng.*, 38, 439-520.
- [156] **Kaspar, J., Fornasiero, P. ve Graziani, M.** (1999). Use of CeO₂-based oxides in the three-way catalysis, *Catal. Today*, 2, 285-298.
- [157] **Beie, H. J. ve Gnorich, A.** (1991). Oxygen gas sensors based on CeO₂ thick and thin films, *Sens. Actuators, B*, 4, 393-399.
- [158] **Steele, B. C. H.** (2000). Appraisal of Ce_{1-y}Gd_yO_{2-y/2} electrolytes for ITSOFC operation at 500C, *Solid State Ionics*, 129, 95-110.
- [159] **Park, S. D., Vohs J. M. ve Gorte, R. J.** (2000). Direct oxidation of hydrocarbons in a solid oxide fuel cells, *Nature*, 404, 265-267.
- [160] **Sun, C. W., Hui, R. ve Roller, J.** (2010). Cathode materials for solid oxide fuel cells: a review, *J. Solid State Electrochem.*, 14, 1125-1144.
- [161] **Porqueras, I., Person, C., Corbella, C., Vives, M., Pinyol, A. ve Bertran, E.** (2003). Characteristics of e-beam deposited electrochromic CeO₂ thin films, *Solid State Ionics*, 165(1), 131-137.
- [162] **Azens, A., Kullman, L., D. Ragan, D., Granqvist, C., Hjörvarsson, B. ve Vaivars, G.** (1996). Optical and electrochemical properties of dc magnetron sputtered Ti-Ce oxide films, *Applied Physics Letters*, 68(26), 3701-3703.
- [163] **Asati, A. , Santra, S. , Kaittanis, C. , Nath, S. ve Perez, J.** (2009). Oxidase-Like Activity of Polymer-Coated Cerium Oxide Nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition*, 48, 2308-2312.
- [164] **Tarnuzzer, R. W., Colon, J., Patil, S. ve Seal, S.** (2005). Vacancy Engineered Ceria Nanostructures for Protection from Radiation-Induced Cellular Damage, *Nano Letters*, 5(12), 2573-2577.
- [165] **Ji, P. , Wang, L. , Chen, F. ve Zhang, J.** (2010). Ce³⁺-Centric Organic Pollutant Elimination by CeO₂ in the Presence of H₂O₂, *ChemCatChem*, 2, 1552-1554.
- [166] **Asati, A., Santra, S., Kaittanis, C. ve Perez, J. M.** (2010). Surface-Charge-Dependent Cell Localization and Cytotoxicity of Cerium Oxide Nanoparticles, *ACS Nano*, 4(9), 5321-5331.
- [167] **Hailstone, R. K., DiFrancesco, A. G., Leong, J. G., Allston, T. D. ve Reed, K. J.** (2009). A Study of Lattice Expansion in CeO₂ Nanoparticles by Transmission Electron Microscopy, *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(34), 15155-15159.

- [168] **Mogensen, M. B., Sammes, N. M. ve Tompsett, G. A.** (2000). Physical, chemical and electrochemical properties of pure and doped ceria, *Solid State Ionics*, 129(1-4), 63-94.
- [169] **Kilner, J. A.** (2008). Defects and conductivity in ceria-based oxides, *Chem. Lett.*, 37, 1012–1015.
- [170] **Holgado, J. P., Alvarez, R. ve Munuera, G.** (2000). Study of CeO₂ XPS spectra by factor analysis: reduction of CeO₂, *Appl. Surf. Sci.*, 161, 301–315.
- [171] **Lawrence, N. J., Brewer, J. R., Wang, L., Wu, T.-S., Wells-Kingsbury, J., Ihrig, M. M., . . . Cheung, C. L.** (2011). Defect engineering in cubic cerium oxide nanostructures for catalytic oxidation, *Nano Letters*, 11(7), 2666-2671.
- [172] **Land, P. L.** (1973). Defect equilibria for extended point-defects, with application to nonstoichiometric ceria, *J. Phys. Chem. Solids*, 34, 1839–1845.
- [173] **Chen, J., Patil, S., Seal, S. ve McGinnis, J. F.** (2006). Rare earth nanoparticles prevent retinal degeneration induced by intracellular peroxides, *Nature Nanotechnology*, 1, 142.
- [174] **Herman, G. S.** (1999). Characterization of surface defects on epitaxial CeO₂ (001) film, *Surf. Sci.*, 437, 207–214.
- [175] **Conesa, J. C.** (1995). Computer modeling of surfaces and defects on cerium dioxide, *Surf. Sci.*, 339, 337–352.
- [176] **Mamontov, E., Egami, T., Brezny, R., Koranne, M. ve Tyagi, S.** (2000). Lattice Defects and Oxygen Storage Capacity of Nanocrystalline Ceria and Ceria-Zirconia, *The Journal of Physical Chemistry B*, 104(47), 11110-11116.
- [177] **Skorodumova, N. V., Simak, S. I., Lundqvist, B. I., Abrikosov, I. A. ve Johansson, B.** (2002). Quantum Origin of the Oxygen Storage Capability of Ceria, *Physical Review Letters*, 89(16), 166601.
- [178] **Esch, F., Fabris, S., Zhou, L., Montini, T., Africh, C., Fornasiero, P., Comelli, G. ve Rosei, R.** (2005). Electron localization determines defect formation on ceria substrates, *Science*, 309, 752–755.
- [179] **Ornatska, M., Sharpe, E., Andreescu, D. & Andreescu, S.** (2011). Paper bioassay based on ceria nanoparticles as colorimetric probes. *Anal. Chem.* 83, 4273–4280.
- [180] **Deshpande, S., Patil, S., Kuchibhatla S. V. N. T. ve Seal, S.** (2005). Size dependency variation in lattice parameter and valency states in nanocrystalline cerium oxide, *Appl. Phys. Lett.*, 87, 133113.
- [181] **LaMer, V. K. ve Dinegar, R. H.** (1950). Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols, *Journal of the American Chemical Society*, 72(11), 4847-4854.
- [182] **Zhang, Y.-W., Si, R., Liao, C.-S., Yan, C.-H., Xiao, C.-X. ve Kou, Y.** (2003). Facile Alcohothermal Synthesis, Size-Dependent Ultraviolet Absorption, and Enhanced CO Conversion Activity of Ceria

Nanocrystals, *The Journal of Physical Chemistry B*, 107(37), 10159-10167.

- [183] **Xiangqian, L., Huizhong X., Zhe-Sheng, C. ve Guofang, C.** (2011). Biosynthesis of Nanoparticles by Microorganisms and Their Applications, *Journal of Nanomaterials*, 2011, 16.
- [184] **Narayanan, K. B. ve Sakthivel, N.** (2010). Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes, *Advances in Colloid and Interface Science*, 156(1), 1-13.
- [185] **Kumar, V., Yadav, S.C. ve Yadav, S.K.** (2010). Syzygium cumini leaf and seed extract mediated biosynthesis of silver nanoparticles and their characterization, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 85, 1301–1309.
- [186] **Iravani, S.** (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants, *Green Chem.*, 13, 2638–2650.
- [187] **Bumajdad, A. Eastoe, J. ve Mathewa, A.** (2009). Cerium oxide nanoparticles prepared in self-assembled systems, *Advances in Colloid and Interface Science*, 147, 56–66
- [188] **Laosiripojana, N., Sutthisripok, W. ve Assabumrungrat, S.** (2007). Reactivity of high surface area CeO₂ synthesized by surfactant-assisted method to ethanol decomposition with and without steam, *Chemical Engineering Journal*, 127(1), 31-38.
- [189] **Terribile, D., Trovarelli, A., Llorca, J., de Leitenburg, C. ve Dolcetti, G.** (1998). The Synthesis and Characterization of Mesoporous High-Surface Area Ceria Prepared Using a Hybrid Organic/Inorganic Route, *Journal of Catalysis*, 178(1), 299-308.
- [190] **Zhang, J. H., Yang, Y. Q., Shen, J. M. ve Wang, J. A.** (2005). Mesostructured CeO₂ and Pd/CeO₂ nanophases: Templated synthesis, crystalline structure and catalytic properties, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 237(1), 182-190.
- [191] **Liu, H., Ma, L., Shao, S., Li, Z., Wang, A., Huang, Y. ve Zhang, T.** (2007). Preferential CO Oxidation on Ce-Promoted Pt/ γ -Al₂O₃ Catalysts under H₂-Rich Atmosphere, *Chinese Journal of Catalysis*, 28(12), 1077-1082.
- [192] **Bumajdad, A., Zaki, M. I., Eastoe, J. ve Pasupulety, L.** (2004). Microemulsion-Based Synthesis of CeO₂ Powders with High Surface Area and High-Temperature Stabilities, *Langmuir*, 20(25), 11223-11233.
- [193] **Darroudi, M., Sarani, M., Oskuee, R. K., Zak, A. K., Hosseini, H. A. ve Gholami, L.** (2014). Green synthesis and evaluation of metabolic activity of starch mediated nanoceria, *Ceramics International*, 40(1), 2041-2045.
- [194] **Darroudi, M., Hoseini, S. J., Oskuee, R. K., Hosseini, H. A., Gholami, L. ve Gerayli, S.** (2014). Food-directed synthesis of cerium oxide nanoparticles and their neurotoxicity effects, *Ceramics International*, 40(5), 7425-7430.

- [195] **Ali Khan, S. ve Ahmad, A.** (2013). Fungus mediated synthesis of biomedically important cerium oxide nanoparticles, *Materials Research Bulletin*, 48(10), 4134-4138.
- [196] **Zhai, Y., Zhou, K., Xue, Y., Qin, F., Yang, L. ve Yao, X.** (2013). Synthesis of water-soluble chitosan-coated nanoceria with excellent antioxidant properties, *RSC Advances*, 3(19), 6833.
- [197] **Karakoti, A., Singh, S., Dowding, J. M., Seal, S. ve Self, W. T.** (2010). Redox-active radical scavenging nanomaterials, *Chemical Society Reviews*, 39(11), 4422-4432.
- [198] **Ranjit, K. ve Ahmed, A.** (2013). Nanoparticle: An overview of preparation, characterization and application, *International Research Journal of Pharmacy*, 4(4), 47-57
- [199] **Laborda, F., Bolea, E. ve Jiménez-Lamana, J.** (2016). Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry for the analysis of inorganic engineered nanoparticles in environmental samples, *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 9, 15-23.
- [200] **Laborda, F., Bolea, E. ve Jiménez-Lamana, J.** (2014). Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Nanoanalysis, *Analytical Chemistry*, 86(5), 2270-2278.
- [201] **Weigel, S., Peters, R., Loeschner, K., Grombe, R. ve Linsinger, T.** (2017). Results of an interlaboratory method performance study for the size determination and quantification of silver nanoparticles in chicken meat by single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry (sp-ICP-MS), *Analytical and bioanalytical chemistry*, 409(20), 4839–4848.
- [202] **Klaine, S. J., Koelmans, A. A., Horne, N., Carley, S., Handy, R. D., Kapustka, L., . . . von der Kammer, F.** (2012). Paradigms to assess the environmental impact of manufactured nanomaterials, *Environ Toxicol Chem*, 31(1), 3-14.
- [203] **Zhong, Y. ve Shahidi, F.** (2015). Methods for the assessment of antioxidant activity in foods in Fereidoon Shahidi (Ed), *Handbook of Antioxidants for Food Preservation* (pp. 287-231). Woodhead Publishing.
- [204] **Cömert, E. D. ve Gökmen, V.** (2018). Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century, *Food Research International*, 105, 76-93.
- [205] **Kadin, H. ve Osadca, M.** (1959). Food antioxidants, biochemistry of erythorbic acid. Human blood levels and urinary excretion of ascorbic and erythorbic acids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 7(5), 358–360.
- [206] **Embuscado, M. E.** (2015). Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review, *Journal of functional foods*, 18, 811–819.
- [207] **Somogyi, A., Rosta, K., Pusztai, P., Tulassay, Z. ve Nagy, G.** (2007). Antioxidant measurements, *Physiol Meas.*, 28(4), R41-55.

- [208] **Riley, P. A.** (1994). Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation, *Int. J. Radiat. Biol.*, 65, 27–33
- [209] **Sherwin, E. R.** (1990). Antioxidants. In L. Branen (Ed.), *Food additives* (pp. 139–193). New York: Marcel Dekker.
- [210] **Davey, M. W., Van Montagu, M., Inzé, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N. et al. ve Fletcher, J.** (2000). Plant L-ascorbic acid: Chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 825–860.
- [211] **Comunian, T. A., Thomazini, M., Alves, A. J. G., de Matos Junior, F. E., de Carvalho Balieiro, J. C. ve Favaro-Trindade, C. S.** (2013). Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release, *Food Research International*, 52(1), 373–379.
- [212] **Rice-Evans, C., Miller, N. ve Paganga, G.** (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152–159.
- [213] **Balasundram, N., Sundram, K. ve Samman, S.** (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chemistry*, 99(1), 191–203.
- [214] **Frombaum, M., Le Clanche, S., Bonnefont-Rousselot, D. ve Borderie, D.** (2012). Antioxidant effects of resveratrol and other stilbene derivatives on oxidative stress and *NO bioavailability: Potential benefits to cardiovascular diseases, *Biochimie*, 94(2), 269–276.
- [215] **Perumalla, A. V. S. ve Hettiarachchy, N. S.** (2011). Green tea and grape seed extracts Potential applications in food safety and quality, *Food Research International*, 44(4), 827–839.
- [216] **Häkkinen, S., Heinonen, M., Kärenlampi, S., Mykkänen, H., Ruuskanen, J. ve Törrönen, R.** (1999). Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries, *Food Research International*, 32(5), 345–353.
- [217] **Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E. ve Prior, R. L.** (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), 4026–4037.
- [218] **Shan, B., Cai, Y. Z., Sun, M. ve Corke, H.** (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7749–7759.
- [219] **Jaganath, I. B. ve Crozier, A.** (2010). Dietary flavonoids and phenolic compounds. In C. G. Fraga (Ed.), *Dietary Flavonoids and Phenolic compounds* (pp. 1–49). Hoboken, NJ: JohnWiley & Sons.
- [220] **Pizzale, L., Bortolomeazzi, R., Vichi, S., Uberegger, E. ve Conte, L. S.** (2002). Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O. onites*) extracts related to their phenolic compound content, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 1645–1651.

- [221] **Banias, C., Oreopoulou, V. ve Thomopoulos, C. D.** (1992). The effect of primary antioxidants and synergists on the activity of plant extracts in lard, *Journal of American Oil Chemistry Society*, 69, 520–524.
- [222] **Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P. ve Glover, W.** (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits, *Food Chemistry*, 66(4), 401–436.
- [223] **Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F. ve Scaccini, C.** (2000) Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data, *Free Radic. Biol. Med.*, 29, 1106–14.
- [224] **Prior, R. L., Wu, X. ve Schaich, K.** (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *J. Agric. Food Chem.* , 18, 4290–302
- [225] **Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K. M., Özyürek, M. ve Güçlü, K.** (2013). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity, *Pure and Applied Chemistry*, 85, 957–998.
- [226] **Papadopoulos, K., Triantis, T., Yannakopoulou, E., Nikokavoura, A. ve Dimotikali, D.** (2003). Comparative studies on the antioxidant activity of aqueous extracts of olive oils and seed oils using chemiluminescence, *Analytica Chimica Acta*, 494, 41–47.
- [227] **Stepanyan, V., Arnous, A., Petrakis, C., Kefalas, P. ve Calokerinos, A.** (2005). Chemiluminescent evaluation of peroxide value in olive oil, *Talanta*, 65, 1056–1058.
- [228] **Sariahmetoglu, M., Wheatley, R. A., Cakici, I., Kanzik, I. ve Townshend, A.** (2003). Flow injection analysis for monitoring antioxidant effects on luminol chemiluminescence of reactive oxygen species, *Analytical Letters*, 36, 749–765.
- [229] **Musa, K. H., Abdullah, A., Kuswandi, B. ve Hidayat, M. A.** (2013). A novel high throughput method based on the DPPH dry reagent array for determination of antioxidant activity, *Food Chemistry*, 141, 4102–4106.
- [230] **Amatatongchai, M., Laosing, S., Chailapakul, O. ve Nacapricha, D.** (2012). Simple flow injection for screening of total antioxidant capacity by amperometric detection of DPPH radical on carbon nanotube modified-glassy carbon electrode, *Talanta*, 97, 267–272.
- [231] **Huang, D., Ou, B. ve Prior, R. L.** (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841–1856.
- [232] **Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S. ve Robards, K.** (2002). Methods for testing antioxidant activity, *Analyst*, 127, 183–198.
- [233] **Berker, K. I., Gueclue, K., Tor, I., Demirata, B. ve Apak, R.** (2010). Total antioxidant capacity assay using optimized ferricyanide/Prussian blue method, *Food Analytical Methods*, 3, 154–168.

- [234] **Berker, K. I., Demirata, B. ve Apak, R.** (2012). Determination of total antioxidant capacity of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the same solution by using ferric-ferricyanide assay, *Food Analytical Methods*, 5, 1150–1158.
- [235] **Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. Ve Karademir, S. E.** (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols, vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970–7981.
- [236] **Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E. ve Altun, M.** (2005). Total antioxidant capacity assay of human serum using copper(II)-neocuproine as chromogenic oxidant: The CUPRAC method, *Free Radic. Res.*, 39, 949–961.
- [237] **Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E. ve Erçağ, E.** (2006). The cupric ion reducing antioxidant capacity (CUPRAC) and polyphenolic content of some herbal teas, *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 57, 292–304.
- [238] **Tütem, E. ve Apak, R.** (1991). Simultaneous spectrophotometric determination of cystine and cysteine in amino acid mixtures using copper(II)-neocuproine reagent, *Anal. Chim. Acta*, 255, 121–125.
- [239] **Özyürek, M., Güçlü, K. ve Apak, R.** (2011). The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement, *Trends Anal. Chem.*, 30, 652–664.
- [240] **Tufan, A. N., Celik, S. E., Özyürek, M., Güçlü, K. ve Apak, R.** (2013). Direct measurement of total antioxidant capacity of cereals: QUENCHER-CUPRAC method, *Talanta*, 108, 136–142.
- [241] **Bener, M., Özyürek, M., Güçlü, K. ve Apak, R.** (2013). Novel optical fiber reflectometric CUPRAC sensor for total antioxidant capacity measurement of food extracts and biological samples, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 8381–8388.
- [242] **Folin, O. ve Ciocalteu, V.** (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins, *Journal of biological chemistry*, 73, 627–650.
- [243] **Magalhaes, L. M., Segundo, M. A., Reis, S. ve Lima, J. L. F.C.** (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties, *Analytica Chimica Acta*, 613, 1–19.
- [244] **Karadag, A., Ozcelik, B. Ve Saner, S.** (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities, *Food Analytical Methods*, 2, 41–60.
- [245] **Carlsen, M. H., Halvorsen, B. L., Holte, K., Böhn, S. K., Dragland, S., Sampson, L... Blomhoff, R.** (2010). The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide, *Nutrition Journal*, 9, 1475–289.1.
- [246] **Özyürek, M., Güngör, N., Baki, S., Güçlü, K. ve Apak, R.** (2012). Development of a silver nanoparticle-based method for the antioxidant capacity measurement of polyphenols. *Analytical Chemistry*, 84, 8052–8059.

- [247] **Isik, E., Sahin, S. ve Demir, C.** (2013). Development of a new chromium reducing antioxidant capacity (CHROMAC) assay for plants and fruits, *Talanta*, 111, 119–124.
- [248] **Bartosz, G.** (2006). Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species, *Clin Chim Acta*, 368(1-2), 53-76.
- [249] **Balcerczyk A, Soszynski M ve Bartosz G.** (2005). On the specificity of 4-amino-5-methylamino-2V,7V-difluorofluorescein as a probe for nitric oxide, *Free Radic Biol Med.*, 39, 327– 335.
- [250] **Auclair C, Torres M ve Hakim J.** (1978). Superoxide anion involvement in NBT reduction catalyzed by NADPH-cytochrome P-450 reductase: a pitfall, *FEBS Lett*, 89, 26-28.
- [251] **Satoh, A. Y., Trosko, J. E. ve Masten, S. J.** (2007). Methylene Blue Dye Test for Rapid Qualitative Detection of Hydroxyl Radicals Formed in a Fenton's Reaction Aqueous Solution, *Environmental Science & Technology*, 41(8), 2881-2887.
- [252] **Liu, S.-Q., Feng, L.-R., Xu, N., Chen, Z.-G. ve Wang, X.-M.** (2012). Magnetic nickel ferrite as a heterogeneous photo-Fenton catalyst for the degradation of rhodamine B in the presence of oxalic acid, *Chemical Engineering Journal*, 203, 432-439.
- [253] **Gomes, A., Fernandes, E. ve Lima, J. L. F. C.** (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 65(2), 45-80.
- [254] **Rodriguez Nogales, J., Vila-Crespo, J. ve Gómez, M.** (2011). Development of a rapid method for the determination of the antioxidant capacity in cereal and legume milling products using the radical cation DMPD +, *Food Chemistry*, 129(4), 1800-1805.
- [255] **Çekiç, S. D., Avan, A. N., Uzunboy, S. ve Apak, R.** (2015). A colourimetric sensor for the simultaneous determination of oxidative status and antioxidant activity on the same membrane: N,N-Dimethyl-p-phenylene diamine (DMPD) on Nafion, *Analytica Chimica Acta*, 865, 60–70.
- [256] **Jiao, X. Song, H., Zhao, H., Bai, W., Zhang L. ve Lv. Y.** (2012). Well-redispersed ceria nanoparticles: *Anal. Methods*, 4, 3261.



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Gözde Mediha KAMER
Doğum Tarihi ve Yeri : 12-06-1986
E-posta : gozde.kamer@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2008, Dokuz Eylül Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Kimya Öğretmenliği Bölümü
- **Yükseklisans** : 2012, İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı, Kimya Programı

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2018 yılından beri Özel Amerikan Robert Lisesi'nde çalışmaktadır.
- 2011 yılında İstanbul Teknik Üniversitesi'nde yüksek lisansını tamamladı.
- 2010-2018 yılları arasında Özel Üsküdar Amerikan Lisesinde çalıştı.

DOKTORA TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Kamer, G.**, Demirata, B., Bayraktar, R., Ozyurt, D., ve Apak, R. (2019). Nanoceria-based reactive species scavenging activity of antioxidants using N,N-dimethyl-p-phenylenediamine (DMPD) probe, *Analytical Methods*, 11(14), 1908-1915.

DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- Olgun, A., **Kamer, G.** ve Ozturk, B. (2018). Synthesis of Fe₃O₄/Humic acid/silver nanoparticles and their application in Cu and Cd adsorption, *Environ. Res. And Tech.*, 1(3), 19-24.

