

**T.C.**  
**KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**



**ALTIN NANOPARÇACIKLARIN POLEN EKSTRAKTLARI İLE  
SENTEZLENMESİ, KARAKTERİZASYONU VE  
ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİNİN BİYOKİMYASAL  
TEKNİKLER İLE BELİRLENMESİ**

**MAREİA AHMED M. ELGHALIDH**

**DOKTORA TEZİ**

**PROF. DR. TALİP ÇETER**

**OCAK - 2024**

**KASTAMONU**

## TAAHHÜTNAME

*Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu; ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını, bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini bildirir ve taahhüt ederim.*

**Mareia Ahmed M. ELGHALIDH**

## ÖZET

### DOKTORA TEZİ

ALTIN NANOPARÇACIKLARIN POLEN EKSTRAKTLARI İLE  
SENTEZLENMESİ, KARAKTERİZASYONU VE ANTİMİKROBİYAL  
ETKİLERİNİN BİYOKİMYASAL TEKNİKLER İLE BELİRLENMESİ  
MAREİA AHMED M. ELGHALIDH

KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI  
DANIŞMAN: PROF. DR. TALİP ÇETER

Bitki özütlerinin inorganik nanoparçacık sentezinden önemli bir yer işgal etmeye başlamalarına rağmen nanoparçacık morfolojisi üzerine gerçekleştirilen çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Çalışmamızda 11 bitki türüne ait polenler ile sulu ekstraktlar hazırlanarak altın ve gümüş nanoparçacık sentezinde kullanılmıştır. Polen kimyasını oluşturan ve karakteristik özelliğe sahip 37 fitokimyasal (örneğin flavonoid ve fenolik asit) nicel olarak kromatografi/kütle spektroskopisi ile belirlenmiştir. Toplam fenol, toplam flavonoid, indirgen şeker miktarı ve protein miktarı ayrıca belirlenmiştir. Tüm bu parametrelerin altın nanoparçacık morfolojisi üzerine olan etkileri istatistiksel metotlar ile araştırılmıştır. Morfolojinin belirlenmesinde markır moleküllerin takip edilmesinin ekstrakt kimyası içerisindeki tüm kimyanın belirlenmesine göre kolaylık sağlayacağı yönünde veriler elde edilmiştir. Ayrıca, ekstrakt kimyasında bulunan yüksek flavonoid miktarının yüksek fenolik asit miktarına oranlanması da nanoparçacık morfolojisinin takip edilmesinde önemlidir. Polen ekstraktlarının gümüş nanoparçacık sentezini de gerçekleştirebilecek indirgeme potansiyeline sahip olduğu tespit edilmiştir. Buna karşın, hem altın hem de gümüş nanoparçacık sentezinin hızlı bir şekilde oluşabilmesi için ortama şeker ligantları eklenmiş ve şeker ligantlarının nanoparçacıkların daha kararlı olmasını sağladığı saptanmıştır.

Polen ekstraktları tekil olarak bir antibakteriyel etkiye sahip değilken, gümüş ve altın nanoparçacık sentezinde kullanıldığı durumda polen tipine bağlı olarak yüksek antibakteriyel aktivite tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan gram (-) ve gram (+) bakteriler için ppm seviyelerinde bakterisidal aktivite gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlar polen ekstrakt kimyasının yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip ajan geliştirmede önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

**ANAHTAR KELİMELELER:**Polen, Altın nanopartikül, Antimikrobiyal, Antioksidant, Bakteri

Ocak 2024, 73 Sayfa

## **ABSTRACT**

### **PH.D THESIS**

#### **SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF POLLEN EXTRACT SYNTHESIZED GOLD NANOPARTICLES ALONG WITH THEIR ANTIMICROBIAL EFFECTS USING BIOCHEMICAL TECHNIQUES**

**MAREIA AHMED M. ELGHALIDH**

**KASTAMONU UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE**

**DEPARTMENT OF BIOLOGY**

**SUPERVISOR: PROF. DR. TALIP ÇETER**

Although plant extracts have started to occupy an important place in inorganic nanoparticle synthesis, studies on nanoparticle morphology are very limited. In our study, aqueous extracts of 11 pollen species were prepared and used for gold and silver nanoparticle synthesis. Thirty-seven phytochemicals (e.g. flavonoids and phenolic acids) characterizing pollen chemistry were quantitatively determined by chromatography/mass spectroscopy. Total phenol, total flavonoids, reducing sugars and protein content were also determined. The effects of all these parameters on gold nanoparticle morphology were investigated by statistical methods. It was concluded that following the marker molecules in the determination of morphology would facilitate the determination of the whole chemistry in the extract chemistry. In addition, the ratio of high flavonoid amount to high phenolic acid amount in the extract chemistry is also important in following the nanoparticle morphology. Pollen extracts were found to have the reduction potential to synthesize silver nanoparticles. However, sugar ligands were added to the medium for the rapid synthesis of both gold and silver nanoparticles. Sugar ligands also made the nanoparticles more stable.

While pollen extracts individually did not have an antibacterial effect, when used in the synthesis of silver and gold nanoparticles, high antibacterial activity was observed depending on the pollen type. Bactericidal activity was observed at ppm levels for gram (-) and gram (+) bacteria used in the study. The results obtained show that pollen extract chemistry has an important potential in developing agents with high antibacterial activity.

**KEYWORDS:** Pollen, Gold Nanoparticles, Antimicrobial, Antioxidant, Bacteria

January 2024, 73 Page

## TEŞEKKÜR

Doktora tezimin gerçekleştirilmesinde katkılarını esirgemeyen Danışmanım Prof. Talip ÇETER'e, nanomalzemelerin sentezlenme ve karakterizasyon süreçlerinde her daim sabırla çalışmalarına katkı sağlayan Doç. Dr. İdris YAZGAN'a, tez izleme komitesinde bulunan ve yönlendirmeleri ile çalışmamı zenginleştiren Dr. Öğretim Üyesi Kerim GÜNEY'e ve tez savunma jürisinde bulunan Prof. Dr. Cemil İŞLEK ve Dr. Öğretim Üyesi Abdurrahman GÜMÜŞ'e teşekkür ederim.

Doktora sürecinde maddi desteklerinin yanında manevi desteklerini de esirgemeyen Libya Hükümeti ve Ankara Elçiliği'ne müteşekkir olduğumu ifade etmek isterim.

Herdaim yanımda bulunan aileme ve eşim Khalid Farhat'a teşekkürlerimi ifade ederim.

Mareia Ahmed M. ELGHALIDH

Kastamonu, 2023

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

<b>TEZ ONAYI</b> .....	<b>ii</b>
<b>TAAHHÜTNAME</b> .....	<b>iii</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>vi</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>vii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>xi</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1 İnorganik Nanoparçacık Sentezi Yaklaşımları .....	2
1.2 Çalışma Sürecinde Polenleri Kullanılan Bitki Türleri .....	5
<b>2. LİTERATÜR ÖZETİ</b> .....	<b>10</b>
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	<b>15</b>
3.1 Materyal .....	15
3.2 Polen Ekstraktlarının Hazırlanması .....	15
3.3 Polen Ekstraktlarının İçerik Analizi.....	15
3.3.1 Sıvı Kromatografi-Elektrosprey İyonizasyon Kütle Spektroskopisi/Kütle Spektroskopisi Karakterizasyonu (LC-ESI-MS/MS Karakterizasyonu) .....	16
3.3.2 Toplam Polifenol Tayini .....	16
3.3.3 Toplam Flavonoid Tayini .....	16
3.3.4 Toplam Protein Miktar Tayini .....	16
3.3.5 Toplam İndirgen Şeker Tayini .....	17
3.4 Altın Nanoparçacıkların Sentezi .....	17
3.5 Şeker Ligant Varlığında Altın ve Gümüş Nanoparçacıkların Sentezi .....	17
3.6 Altın ve Gümüş Nanoparçacıkların Karakterizasyonu .....	18
3.7 Gümüş Nanoparçacıkların Antibakteriyel Aktivitelerinin Karakterizasyonu .....	19
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>20</b>
4.1 Polen Ekstraktlarının İçerik Analizleri .....	20
4.2 Polen Ekstrakt Kimyasının Altın Nanoparçacık Karakteri Üzerine Etkisi .....	21
4.3 Polen Ekstraktlarının İçerik Analizleri .....	22
4.4 Altın Nanoparçacıkların Karakterizasyonu.....	27
4.5 Şeker Ligantlarının Varlığında Altın ve Gümüş Nanoparçacıkların Sentezi.....	36
4.6 Şeker Ligant Aracılığı ile Sentezlenmiş Altın ve Gümüş Nanoparçacıkların Antibakteriyel Aktiviteleri .....	42
<b>5. TARTIŞMA</b> .....	<b>50</b>
5.1 Polen Kimyasının Altın Nanoparçacık Oluşumu Üzerine Etkisi.....	50
5.2 Şeker Ligantlarının Altın ve Gümüş Nanoparçacık Morfolojisi Üzerine Etkisi.....	59
5.3 Nanoparçacıkların Antimikrobiyal Aktiviteleri .....	59

<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>61</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>62</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>73</b>



## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 1.1 İnorganik nanoparçacık boyutunun farklı yapılar ile kıyaslanması.....	2
Şekil 1.2 İnorganik Nanoparçacık Sentez Yaklaşımları .....	2
Şekil 1.3 Çalışmada kullanılan polen kaynaklarının sistematığı. ....	6
Şekil 3.1 Şeker ligantlarının varlığında AuNP sentez şeması.....	18
Şekil 4.1 Kuru polen tanelerinin dijital kamera görüntüleri .....	20
Şekil 4.2 Polen ekstraktlarının dijital kamera görüntüleri. ....	20
Şekil 4.3 DNS standart grafiği, Total fenol standart grafiği, Total flavonoid standart grafiği ve Protein standart grafiği .....	21
Şekil 4.4 <i>C. avellana</i> , <i>A. nordmanniana</i> , <i>J. oxycedrus</i> ve <i>P. pinea</i> ve karşılık gelen AuNS IR spectrumları.....	22
Şekil 4.5 <i>C. libani</i> , <i>C. sempervirens</i> , <i>P. pinea</i> ve <i>P. nigra</i> ve karşılık gelen AuNS IR spectrumları .....	22
Şekil 4.6 Polen özütleri kullanan AuNS'lerin dijital kamera görüntüleri .....	28
Şekil 4.7 Polen tanesi özütlerinin ve AuNS'lerin UV-Vis spektrumları .....	29
Şekil 4.8 <i>P. nigra</i> , <i>P. sylvestris</i> , <i>A. nordmanniana</i> ve <i>J. horizontalis</i> 'in TEM ve SAED görüntüleri.....	30
Şekil 4.9 <i>C. libani</i> ve <i>C. Sempervirens</i> , <i>T.orientalis</i> ve <i>J.oxycedrus</i> 'un TEM ve SAED görüntüleri.....	31
Şekil 4.10 <i>C. avellana</i> AuNS'lerinin TEM ve SAED görüntüleri. ....	32
Şekil 4.11 PCA analiz sonucunda elde edilen gruplandırma. ....	34
Şekil 4.12 PCA analizi sonrasında her bir bileşen için model çalışması. ....	34
Şekil 4.13 <i>C. deodora</i> _AuNSs ve <i>P. pinea</i> _AuNSs'un SEM mikrografları.....	35
Şekil 4.14 <i>Pinus nigra</i> ekstraktı ve ekstrakt ile sentezlenen NPların dijital kamera görüntüleri. ....	36
Şekil 4.15 <i>Pinus sylvestris</i> ekstraktı ve ekstrakt ile sentezlenen NPların dijital kamera görüntüleri. ....	37
Şekil 4.16 <i>Cedrus deodora</i> ekstraktı ve ekstrakt ile sentezlenen NPların dijital kamera görüntüleri. ....	38
Şekil 4.17 <i>Cedrus libani</i> ekstraktı ve ekstrakt ile sentezlenen NPların dijital kamera görüntüleri. ....	38
Şekil 4.18 <i>Abies nordmanniana</i> ekstraktı ve ekstrakt ile sentezlenen NPların dijital kamera görüntüleri. ....	39
Şekil 4.19 <i>Juniperus horizontalis</i> ekstraktı ve ekstrakt ile sentezlenen NPların dijital kamara görüntüleri. ....	39
Şekil 4.20 <i>Thuja orientalis</i> ekstraktı ve ekstrakt ile sentezlenen NPların dijital kamera görüntüleri. ....	40
Şekil 4.21 AuNPlarının Uv-Vis karakterizasyonları.....	40
Şekil 4.22 AgNPlarının Uv-Vis karakterizasyonları.....	42
Şekil 4.23 Polen ekstraktlarının <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. casseflavus</i> ve <i>E. coli</i>	43
Şekil 4.24 Polen ekstrakt altın nanoparçacıkların <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E.</i> <i>casseflavus</i> ve <i>E. coli</i> .....	44
Şekil 4.25 Polen ekstrakt gümüş nanoparçacıkların <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E.</i> <i>casseflavus</i> ve <i>E. coli</i> .....	45
Şekil 4.26 AgNP ve AuNPlarının <i>P. aeruginosa</i> üzerine antibakteriyel etkisi. ....	46

Şekil 4.27 Bazı AgNP ve AuNPlarının *P. aeruginosa* üzerine antibakteriyel etkisi. 47  
Şekil 4.28 Geliştirilen Antibakteriyel ajanların *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*,  
*S. kentucky*, *S. marcescens* ve *E. facium* üzerine etkileri. .... 49



## TABLolar DİZİNİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
Tablo 2.1 Bitki ekstraktı temelli İNP üretim örnekleri. ....	10
Tablo 3.1 Polen ekstraktı kullanılarak sentezlenen dokuz altın ve gümüş nanoparçacığın kompozisyonu. ....	18
Tablo 4.1 IR fonksiyonel grupları* .....	23
Tablo 4.2 <i>P. pinea</i> , <i>D. deodora</i> ve <i>C. avellana</i> pollen ekstrakt fitokimyasal içerikleri .....	24
Tablo 4.3 <i>P. nigra</i> , <i>J. horizontalis</i> , <i>C. libani</i> ve <i>C. sempervirens</i> polen ekstrakt fitokimyasal içerikleri. ....	25
Tablo 4.4 <i>J. oxycedrus</i> , <i>T. orientalis</i> , <i>P. sylvestris</i> ve <i>A. nordmanniana</i> polen ekstrakt fitokimyasal içerikleri.....	26
Tablo 4.5 İstatistiksel analiz.....	33
Tablo 4.6 Altın Nanoparçacıkların SPR karakteristikleri .....	41
Tablo 4.7 Çalışmada kullanılan antibakteriyel ajanlar.....	48

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Kısaltmalar

<b>Ag</b>	: Gümüş
<b>Au</b>	: Altın
<b>NS</b>	: Nanoyapı
<b>UV-Vis</b>	: Mor ötesi-görünür bölge
<b>IR</b>	: İnfrared
<b>MIC</b>	: Minimum inhibisyon derişimi
<b>MBC</b>	: Minimum bakterisidal derişim



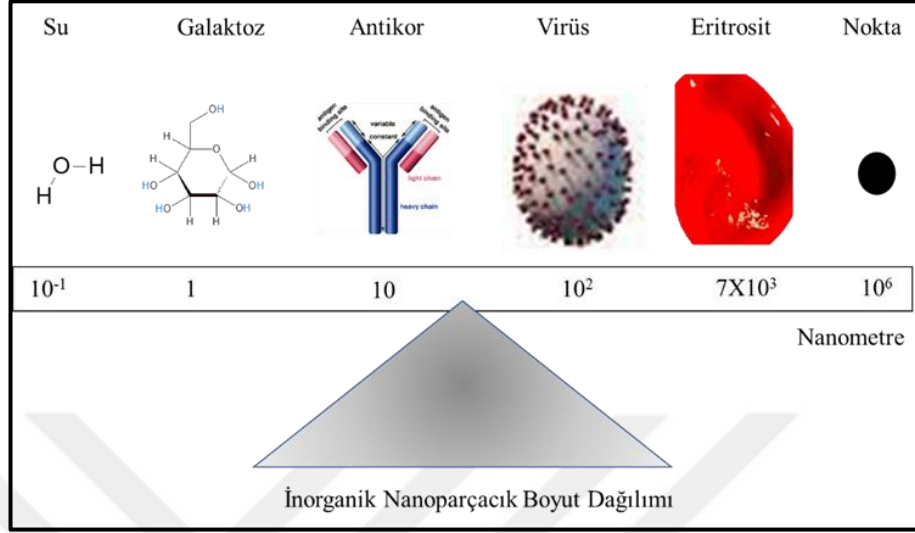
## 1. GİRİŞ

Nanoteknoloji insanlığın karşılaştığı pekçok sorunu çözmeye konusunda değerli görülmektedir. Tarihsel süreç içerisinde modern manada teknolojinin gelişimi bir seri kavramsallaştırmalardan sonra gerçekleşmiştir. 1925 yılı Nobel kimya ödülü sahibi Richard Zsigmondy “nanometre” kavramını geliştirerek kolloidal yapıların mikroskopik teknikler ile belirlenmesi üzerine çalışmıştır. 1965 yılı Nobel fizik ödülü sahibi Rishard Feynman ise maddenin atomik seviyede manipüle edilebileceği üzerine çalışmalar gerçekleştirmiştir. 1970’lerin ilk yarısında ise Japon bilim adamı Norio Taniguchi yarı iletkenlerin işlenmesi üzerine yapmış olduğu çalışmalarda “nanoteknoloji” kavramını kullanarak literatüre dahil etmiştir. Nanoteknolojinin altın çağı ise 1980’li yıllarda Koroto, Smalley ve Curl tarafından fullerenerin keşfi ile başlamıştır (Hulla vd., 2015).

Nanoteknoloji “cüce” manasına gelen yunanca “nano” ve “teknoloji” kelimelerinin birleşmesinden meydana gelmiştir. Her ne kadar 0,1 ilâ 100 nm arasında bulunan parçacıklara nanoparçacık denilse de (Nikalje, 2015), inorganik metallere elde edilen nanoparçacıklar için bu ifade en az iki boyutun 2 ila 200 nm arasında olan yapılar için kullanılmaktadır (Sancak vd., 2023; Yazgan vd., 2020). Nanometre skalasında değerlendirildiğinde bir inorganik nanoparçacık (İNP) bir su molekülünden yaklaşık 20 kat daha büyük olsa da bir kurşun kalem ile oluşturulan noktadan ~ 10.000 kat daha küçüktür (Şekil 1.1).

İNP’lerin sentezinde yaygın olarak kullanılan yaklaşım ıslak (sentez temelli) kimya kullanılarak çeşitli indirgen ajanlar, tutuklayıcı ve kararlaştırıcı ajanların varlığında metal iyonlarının bir çözgen içerisinde indirgenmesi ile gerçekleşmektedir. Kimyasal ve biyolojik olarak ana sınıflara ayrılacak iki temel yaklaşım mevcuttur. Bu yaklaşımların birbirlerine üstünlükleri olduğu gibi yenilenebilir kaynakların tercih edilmesi ve çevreye zararlı organik kimyanın kullanılmaması yönüyle biyolojik yöntemlere olan ilgi artmaktadır (Nasaruddin vd., 2021). Biyolojik yaklaşımlar içerisinde ise bitki ve bitki parçalarının kullanımı kararlı, tekrarlanabilir ve benzersiz özelliklere sahip İNP’lerin sentezinde tercih edilmektedirler. Yaygın olarak bitki

ekstraktları ve meyve ekstraktları tercih edilirken polen ekstraktlarının kullanımı sınırlıdır (Bakar vd., 2020).

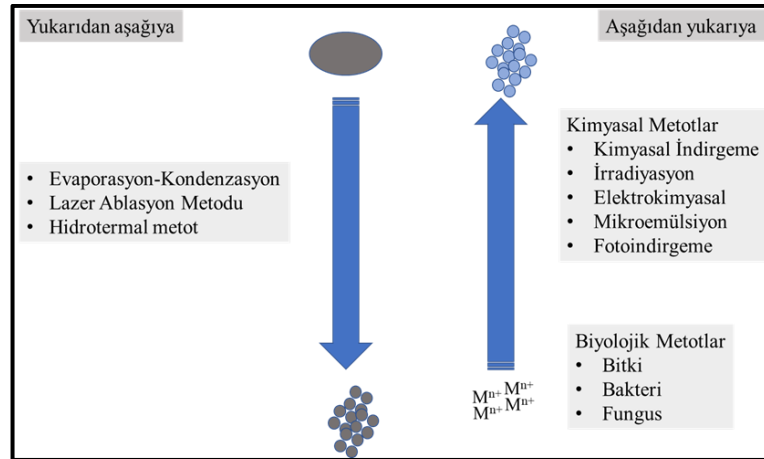


Şekil 1.1 İnorganik nanoparçacık boyutunun farklı yapılar ile kıyaslanması.

Sentez metodundan bağımsız olarak İNP'lerin biyolojik uygulamaları gün geçtikçe artmaktadır. En yaygın kullanım alanları arasında antimikrobiyal ajanların geliştirilmesi, çevre mühendisliği uygulamaları ve antikanser ajanların geliştirilmesidir (Mohammadzadeh vd., 2022).

## 1.1 İnorganik Nanoparçacık Sentezi Yaklaşımları

İnorganik nanoparçacıkların sentezinde tercih edilen yolak İNP'nin kullanım amacına bağlı olarak şekillenmektedir. Şekil 1.2 de sentez yolları özetlenmiştir.



Şekil 1.2 İnorganik Nanoparçacık Sentez Yaklaşımları

Yukarıdan aşağıya sentez yaklaşımında sentezi gerçekleştirilecek İNP'ye ait bir levha kullanılarak fiziksel metotlar ile nanoparçacık sentezi gerçekleştirilir. Fiziksel metotlar incelendiğinde işlemin zorluğu, boyut ve morfolojinin kontrolünün zor ve hatta imkânsıza yakın olması tercih edilmelerini zorlaştırmaktadır. Kimyasal buhar kondenzasyon metodu bu yaklaşımlar içerisinde en çok seçilenidir. Bu yöntemde reaktant gazlar hedef (örneğin gümüş plaka) üzerine bir reaktör içerisinde püskürtülür ve reaksiyon parametrelerinin ayarlanması ile (sıcaklık, reaksiyon süresi, sıcaklık artış ve düşüş hızı gibi) nanoparçacık sentezi gerçekleştirilir. Her ne kadar yüksek verimlilik elde edilse de sadece nanoparçacık filmlerin (1D, bir boyutlu) elde edilmesi için uygundur ve biyolojik uygulamalar için tercih edilmeyen bir yöntemdir (Abid vd., 2022).

Aşağıdan yukarı yaklaşımında ise metal iyonlarının biyolojik veya kimya metotları ile metalin atomik (M<sup>0</sup>) duruma indirgenmesi ve akabinde atomların bir araya gelerek nanoparçacıkları oluşturması gerçekleşir. Aşağıdan yukarı sentez yaklaşımları sıfır, bir, iki ve üç boyutlu nanoparçacıkların sentezine olanak verirler. Kimyasal yaklaşımlar ile sentezler günümüzde hala yaygınlıklarını sürdürmektedirler. Bu yaklaşımlara örnek olarak kimyasal indirgeme, irradiyasyon, elektrokimyasal, mikroemülsiyon ve fotoindirgeme metotları örnek olarak verilebilir. En yaygın üç metot genel hatları ile aşağıda verilmiştir.

Kimyasal indirgeme; İndirgeyici bir ajan varlığında M<sup>n+</sup>'nin M<sup>0</sup>'a dönüşmesi gerçekleşir. Bu konuda yapılmış ilk çalışmalardan bir tanesi ve en yaygın olanı 1951 yılında Turkevich tarafından geliştirilmiş sitrat varlığında altın nanoparçacık (AuNP) sentezidir. Sodyum sitrat kullanılarak gerçekleştirilen sentez, sitrat/Au<sup>3+</sup> iyonu mol oranına bağlı olarak farklı boyut ve morfolojilerde olabilmektedir. Turkevich metodunun geliştirilmesine yönelik olarak güçlü bir indirgeyici ajan olan sodyum borahidrür (NaBH<sub>4</sub>) kullanımı ile sitrat molekülüne sadece tutuklayıcı ve kararlaştırıcı ajan görevi yüklenmiştir. Turkevich ve onun modifiye formları oldukça kararlı ve morfolojisi kontrol edilebilen AuNP sentezine olanak vermektedir. AuNPlar düşünüldüğünde tetraoctilamonyum bromür'ün kullanıldığı Brust-Schiffrin metodu ve askorbik asit kullanımı Turkevich metoduna eş metotlar olarak öne çıkmaktadır (Daruich De Souza vd., 2019). Genel olarak İNP'ler düşünüldüğüne hidrazin, güçlü

indirgeyici ajanlar ve iyonik olmayan sürfaktantlar öne çıkmaktadır. Organik çözügen (örneğin hekzan), su veya su/yağ ara yüzeyinde de gerçekleşebilen indirgenme reaksiyonları hedef boyut/morfoloji ve kullanım alanına göre şekillendirilmektedir (Reverberi vd., 2016).

Elektrokimyasal metotlar; Boyut ve morfolojinin kontrol edilmesinin zorluğu nedeniyle pek tercih edilmemektedir. Buna karşın yüksek katalitik aktiviteye sahip platin nanoparçacıklarının sentezinde başarılı sonuçlar vermektedir (Reverberi vd., 2016).

Mikroemülsiyon metodu; bu metot tek başına kullanılabilirdiği gibi yüksek enerjili bir lazer ışınması altında da gerçekleştirilebilir. Bu yöntem de birbiri ile karışmayan iki tane çözügen kullanılır ve nanoparçacık oluşumu ise ortama eklenmiş olan bir sürfaktant ile desteklenir. Farklı İNP'lerin sentezine olanak sağlamaktadır. Setil trimetil amonyum bromür (CTAB) ve dioktilsülfosüksinat dodyum (AOT) gibi oldukça toksik olan sürfaktantların kullanılması nedeniyle biyolojik uygulamaları mümkün değildir (Shiri vd., 2019).

Biyolojik yöntemler içerisinde bakteri, fungus ve bitkilerin kullanımı en yaygın üç yaklaşımdır. Bakteri ve fungus kullanılarak pek çok İNP sentezinin gerçekleştirilebileceği rapor edilmiştir. Yaygın olarak kullanılan funguslara örnek olarak *Bacillus licheniformis*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma viride* ve *Streptomyces sp.* verilebilir. Ekstraselüler olarak sentezi gerçekleştirilen İNP'ler yoğunluklu olarak gümüş ve altın nanoparçacıklardır. Bakteri kaynaklı sentezlerde ise *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus sporogenes* ve *Lactobacillus crispatus* en yaygın olarak kullanılan türlerdir. Funguslara nazaran daha geniş bir İNP sentez spektrumuna sahiptirler; örneğin bakır, çinko oksit, titanyum oksit, altın ve gümüş nanoparçacıkları örnek olarak verilebilir (Fariq vd., 2017).

Bitkilerin kullanımı ile İNP'lerin sentezi mikroorganizmalara nazaran daha fazla çeşitlilik ve daha üstün özellikler barındırmaktadırlar. Bitkiler "kimya fabrikası" olarak adlandırılabilirler. Bitkinin türüne ve kullanılan kısmına bağlı olarak

hem moleküler kompozisyon değişmekte hem de moleköl kompozisyonunda bulunan organik yapıların birbirine oranı değişmektedir. Bitkiler türüne bağlı olarak bir bütün halinde kullanılacağı gibi meyveleri, kökleri, çekirdekleri, kabuk kısımları, çiçek kısımları, polenleri veya sadece posası dahi kullanılabilir. Altın, gümüş, bakır gibi sentezi termodinamik açıdan daha kolay olan İNP'lerin sentezinin yansıra paladyum ve platin gibi indirgenmesi daha zor olan İNP'lerin sentezi de mümkündür. Bitkinin türüne bağlı olarak sıfır boyutlu (0D) nanoyapılardan iki boyutlu (2D) nanoyapılara kadar çok farklı boyut ve morfolojilerde kristal İNP'lerin aktif yüzey kimyasına sahip formalarının elde edilmesi nedeniyle biyolojik uygulamalar için gittikçe öne çıkmaktadırlar (Jadoun vd., 2021).

## 1.2 Çalışma Sürecinde Polenleri Kullanılan Bitki Türleri

Çalışma sürecinde 11 adet Bitkiye ait polen kullanılmıştır. Bunlar *Abies nordmanniana subsp. equi-trojani*, *Biota orientalis*, *Cedrus deodora*, *Cedrus libani*, *Corylus avellana*, *Cupressus sempervirens*, *Juniperus oxycedrus*, *Juniperus horizontalis*, *Pinus nigra*, *Pinus sylvestris* ve *Pinus pinea* türleridir. Polenleri kullanılan bitki türlerinin sistematik bilgileri Şekil 1.3 de verilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan tüm polen tanelerinin ekstraksiyonlarına bakıldığında yüksek flavanoid, polifenol, indirgeyici şeker, protein, lipid ve nükleer materyal içerdikleri gösterilmiştir (Muthreich vd., 2020; Zimmermann, 2010). Diğer bir durum ise çalışılan tüm polen kaynakları coğrafi olarak Akdeniz bölgesinde yayılış göstermektedir. Polenleri çalışılan bitkilere ilişkin detaylı bilgiler aşağıda verilmiştir.

Alem Plantae							
Bölüm Magnoliophyta							
Alt sınıf Pinidae				Magnoliidae			
Aile Cupressaceae					Pinaceae		Betulaceae
Cins	<i>Juniperus</i>	<i>Biota</i>	<i>Cupressus</i>	<i>Abies</i>	<i>Cedrus</i>	<i>Pinus</i>	<i>Corylus</i>
Tür	<i>J. horizontalis</i> <i>J. oxycedrus</i>	<i>B. orientalis</i>	<i>C. sempervirens</i>	<i>Abies nordmanniana</i> <i>subsp. equi-trojani</i>	<i>C. deodara</i> <i>C. libani</i>	<i>P. pinea</i> <i>P. sylvestris</i> <i>P. nigra</i>	<i>C. avellana</i>

Şekil 1.3 Çalışmada kullanılan polen kaynaklarının sistematığı.

***Juniperus oxycedrus*:** *J. oxycedrus* L., 10 *Juniperus* türünden birisidir ve tipik bir Akdeniz dağılımı gösteren geleneksel tıpta yaygın kullanım alanına sahiptir (Karaman vd., 2003). Türkiye özelinde ise neredeyse ülkenin her yerine dağılmış vaziyette bir yaygınlığa sahiptir (Klimko vd., 2007). Örneğin, hiperglisemi ve obezite gibi metabolik hastalıkların yanı sıra tüberküloz, bronşit ve zatürre gibi mikroorganizma kaynaklı enfeksiyonlarda da yaygın bir kullanıma sahiptir. Kurutulmuş yapraklarının metanol ekstraktlarının pek çok gram (+) ve gram (-) bakteri ve fungus türüne karşı in vitro toksisitelerinin oldukça yüksek oldukları gösterilmiştir (Karaman vd., 2003). Polenlerinin solunum sisteminde alerjik reaksiyonlara neden olabildiği gösterilmiştir (Iacovacci vd., 1998).

***Corylus avellana*:** Fındık Türkiye'nin önemli tarım ürünlerinden bir tanesidir. Dünya fındık üretiminin ~ %65'i Türkiye de gerçekleştirilmektedir. Karadeniz bölgesinde üretimi yoğunlaşmıştır ve önemli bir besin kaynağı olarak doğrudan tüketilebildiği gibi pek çok çikolata ve şekerlemenin de ayrılmaz bir parçası olarak değerlendirilmektedir. B vitaminlerinden B1, B2 ve B6 vitaminlerinin yanı sıra folik asit, retinol ve toplam tokoferoller yönünden oldukça zengindir. Bunların yanı sıra esansiyel amino asitlere ek olarak pek çok mineral (örneğin magnezyum, çinko vb.) içeriği yönüyle zengindir (Köksal vd., 2006).

***Abies nordmanniana subsp. equi-trojani*:** *A. nordmanniana* dar bir yayılım alanı göstermektedir. Yayılış alanı olarak Kafkasya ve Türkiye'nin Kuzeydoğusu örnek olarak verilebilir. Her ne kadar 1990'lara kadar sadece ekolojik bir değere sahipken, şimdilerde yılbaşı ağacı olarak kullanılmak için kültürü yapılmaktadır (Hansen ve

Nielsen, 2008). Danimarka için önemli bir endüstri haline gelen *A. nordmanniana* yetiştiriciliği ile yılda 10 milyondan daha fazla yılbaşı ağacı üretimi gerçekleştirmektedir (Hansen vd., 2005; Hansen ve Nielsen, 2008).

***Cedrus deodora*:** *C. deodora* her mevsim yeşil olan iğne yapraklı bir sedir türüdür. İçeriğinde bulunan seskuenterpenler nedeniyle geleneksel tıpta yaygın olarak Hint coğrafyasında kullanılmaktadır. Ekstraktları antimikrobiyal ajan olarak ve pekçok metabolik rahatsızlık için tedavi edici olarak kullanılmaktadır (Fidrianny vd., 2021). Boyu 85 metreye kadar uzanabilen ve yaprakları 2-5 veya 5-8 cm aralığında değişebilmektedir. Coğrafi olarak dünya çapında bir dağılım gösterdiği söylenebilir (Nadeem vd., 2019).

***Cupressus sempervirens*:** Akdeniz bölgesinde yaygın bir dağılıma sahiptir (Bagnoli vd., 2009). Ayrıca Kuzey Amerika ve alt tropik bölgelerde de bir dağılıma sahiptir. İçeriğinde bulunan yoğun proantosiyenin içeriğinden dolayı antiviral ve antimikrobiyal aktiviteye sahiptir (Rawat vd., 2010). Polenleri solunum yolunda alerjik reaksiyonlara neden olmaktadır. Bu durum bilhassa Akdeniz ülkelerinde kışın ve erken bahar dönemindeki solunum yolu alerjilerinde en önemli etkenlerden bir tanesidir (Papa vd., 2001).

***Juniperus horizontalis*:** Cupressaceae ailesi içerisinde en yaygın türlerden bir tanesidir. Afrika'dan Çin'e ve Avrupa'dan Amerika'ya kadar geniş bir alanda yayılım göstermektedir. Her mevsim yeşil kalabilmekte ve daha çok yatay olarak büyümektedir. Sahip olduğu esansiyel yağlar nedeniyle geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır (Eryiğit vd., 2014).

***Cedrus libani*:** Lübnan, Suriye ve Türkiye'nin 1.050-1.925 m yükseltiye sahip kıyı bölgelerinde yayılım göstermektedir. Türkiye de daha çok Toroslar bölgesinde bulunmaktadır. Parfümeri endüstrisi için önemli hammadde kaynağı olarak kullanılmaktadır. Organik çözümler ile gerçekleştirilen ekstraksiyonlar ile izole edilen esansiyel yağ asitleri nedeniyle biyolojik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Venditti vd., 2022). Türkiye özelinde bakıldığında ise önemli bir orman endüstri

hammaddesi olduğu rapor edilmiştir (Bilir ve Kang, 2021), o nedenle *C. libani* için fidan yetiştiriciliği önemlidir (Çetinkaya ve Bilir, 2019).

***Pinus nigra***: Kimyasal kompozisyonu az çalışılmış türler arasındadır (Nisca vd., 2021). Polenlerinin pek çok biyokimyasal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Örneğin *P. nigra* polen içeriğinde bulunan nukleaz aktivitesinin güçlü antikanser aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Desprat vd., 2015). Polen içeriğine bakıldığında diğer çam türlerine benzer şekilde flavonoidler, polifenoller ve lipidler yüksek orada bulunmaktadır (Joester vd., 2017). Polenlerinden elde edilen sporopolenlerin antikanser ilaçların kontrollü salınımında başarılı bir şekilde kullanılabilceği gösterilmiştir (Mujtaba vd., 2022). Buna karşın polen tanelerinin alerjen olduğu da belirtilmiştir (Gastaminza vd., 2009).

***Pinus sylvestris***: Çamlar içerisinde en yaygın türdür (Zimmermann, 2018). Polenlerinin kimyasal kompozisyonu yaygın bir şekilde çalışılmıştır. İçeriğinde bulunan flavonoid ve fenolik asitlerin yoğunluğu nedeniyle biyolojik öneme sahiptir (Nisca vd., 2021). Bilhassa anti-inflamasyon ilaçların geliştirilmesinde önemli bir yere sahiptir (Olennikov vd., 2023).

***Pinus pinea***: Akdeniz ülkelerinde yaygın olarak bulunan orta boyutlu ve şemsiye şekilli bir çam türüdür. Her ne kadar farklı coğrafyada bulunan türler arasında genetik çeşitlilik yaygın olmasa bile kuru hava şartlarında gelişebildiği gibi yüksek güneş ışığına maruz kaldığı ve yüksek sıcaklık olan alanlarda da gelişebilmektedir. Estetik amaçlar için üretilebildiği gibi toprak erozyonunu önlemek için veya kereste ve reçine üretimi için de üretimi gerçekleştirilmektedir. Polen kozalakları çok sayıdadır ve verdiği yeni sürgünler 10-20 mm uzunluğunda soluk turuncu-kahve rengi olarak kendini göstermektedir. Polen üretimi mevsime göre değişkenlik göstermektedir (Viñas vd., 2016). *P. pinea* polenleri alerjik olabilmektedir (Domínguez-Ortega vd., 2016). Çođu açık tohumlu bitki gibi çamlar da rüzgarla tozlaşır (Velasco-Jiménez vd., 2018).

### 1.3. Çalışmanın Amacı

Literatüre bakıldığında polen tane özütlerinin altın nanoparçacık sentezine dair çok kısıtlı kaynaklara rastlanılmaktadır. Polen tane özütleri yüksek antioksidant kapasite ve antimikrobiyal potansiyele sahip olduğu görülmektedir [10,11].

Yapılmak istenen 10 tane polen tipinin ekstraksiyonu yapılarak Infrared Spektroskopisinde fonksiyonel grup taraması yapılarak suda çözünür flavonoid ve şeker içeriği yüksek olan türler seçilerek fraksiyonlara ayrılarak (flash kromatografisi kullanılacak) altın nanoparçacık sentezinde kullanılacaktır. Sentezlenen bu altın nanoparçacıklar 19 tane gram (+) ve gram (-) bakteriler üzerinde antimikrobiyal aktiviteleri test edilecektir. Antimikrobiyal aktivite tayinleri klasik metotlara ek olarak lipid metabolizması, şeker metabolizması ve gen ekspresyonları (savunma ve enfeksiyon mekanizma proteinleri) takip edilecektir. Literatüre bakıldığında benzeri bir çalışma mevcut değildir. Çalışmanın olası sonuçları;

- 1- Altın nanoparçacık sentezine etki eden polen içeriği kimyasının aydınlatılması.
- 2- Polen tipine bağlı olarak sentezlenen altın nanoparçacıkların antibakteriyel aktivitesinin gram (+) ve gram (-) bakteriler üzerine etkisi hakkında temel bilgiler üretilecektir.
- 3- Aynı polen tipi ekstraktından fraksiyonlama ile gelen grupları altın nanoparçacık sentezine nasıl etki ettiğinin anlaşılması.
- 4- Polen tipi ve aynı polen ekstraktının farklı fraksiyonlarından sentezlenmiş altın nanoparçacıkların bakteri genetiğine ve metabolizmasına etkisine dair temel veriler sunulmuş olacaktır.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

Bitki ekstraktları içerik olarak karbohidratlar, lipidler, proteinler ve nükleik asitleri primer metabolitler olarak içerirken terpenler ve fenoller/polifenoller/fenolik asitler gibi ikincil metabolitleri de içermektedirler. Flavonoid, fenolik asit ve karbohidrat içerikleri  $M^{n+}$  iyonunun  $M^0$  indirgenmesinde en önemli rolü oynamaktadırlar. Bu durum çevreye zararlı olabilecek herhangi bir toksik indirgeyici ajanın kullanılmasına gereksinimi ortadan kaldırmaktadır. Literatürde yaygın olarak çalışılmış bitkiler ise *Cannabis sativa* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Vaccinium* türleri, *Punica granatum* L. ve *Olea europaea* L. olarak öne çıkmaktadır (Mohammadzadeh vd., 2022). Tablo 2.1’de bitki ekstraktlarından elde edilmiş İNP’lerin genel çerçevesi görülmektedir

Tablo 2.1 Bitki ekstraktı temelli İNP üretim örnekleri.

Bitki	Etken kimya	Nanoparçacık	Kullanım	Literatür
Greyfurt kabuğu	Belirtilmemiş	AgNP	Antibakteriyel	(Arsène vd., 2021)
Nar suyu	Belirtilmemiş	AgNP	Antikanser	(Şahin vd., 2017)
Hurma poleni	Flavonoidler	AgNP/AuNP	Antikanser	(Banu vd., 2018)
Karpuz ve Nar posası	Flavonoidler ve polifenoller	AgNP	Antikanser ve Antioksidant	(Saad vd., 2021)
Kanola çiçeği poleni	Flavonoidler ve polifenoller	AgNP	Antikanser ve Antioksidant	(Hajebi vd., 2019)
Çarkıfelek çiçeği	Terpenoidler, Flavonoidler ve alkaloidler	Çinko oksit (ZnO)	Antibakteriyel	(Santhoshkumar vd., 2017)
Cüce mürver yaprağı	Organik asitler, terpenler	ZnO	Antibakteriyel	(Alamdari vd., 2020)
<i>Cynometra ramiflora</i>	Organik asitler	Demir oksit	Antibakteriyel	(Groiss vd., 2017)

Tablo 2.1’de gösterildiği gibi farklı bitki türleri ve kısımları kullanılarak İNP’lerin sentezi yaygın olarak antibakteriyel ve antikanser çalışmalarına yönelik olarak gerçekleştirilmektedir. Bunlara ek olarak pestisit geliştirme amaçlı olarak da bitki ekstraktlarından yararlanılabilmektedir. Literatür incelendiğinde bitki ekstraktları ile sentezlenmiş nanoparçacıkların biyolojik aktivitelerinin metalik çekirdek ile sınırlı olmayıp ekstraktan gelen kompleks organik yükün ya doğrudan ya da sinerjistik etki

ile nanoparçacığın beklenen aktivitesinin maksimize edildiği sonucuna varılmaktadır (Salayová vd., 2021).

Tablo 2.1’de genel çerçevesi çizilen bitki ekstraktlarının kullanımına ek olarak bitki temelli polen, arı-poleni ve propolislerin kullanılmasına yönelik pek çok çalışma da rapor edilmiştir. Bitki ekstraktları ile sentezlenmiş nanoparçacıklar kimyasal metotlar ile sentezlenmiş nanoparçacıklara göre daha yüksek biyolojik aktiviteye sahiptirler. Örneğin, Yousefzadeh-Valendeh vd., (2023) karahindiba bitki ekstraktları ile sentezlenmiş gümüş nanoparçacıklarının benzer morfolojideki kimyasal metotla sentezlenmiş AgNP’lerine oranla daha yüksek gram (-) /gram (+) antibakteriyel aktivite,  $\alpha$ -glukozidaz inhibisyon kapasitesi ve antioksidant aktiviteye sahip olduklarını rapor etmişlerdir (Yousefzadeh-Valendeh vd., 2023). Prakash vd., (2023) Guduchi bitkisi yapraklarının sulu özütlerinden sentezledikleri bakır nanoparçacıklarının (15-70 nm aralığında sferik nanoyapılar) yüksek fenolik ve flavonoid içeriğinden ötürü güçlü antibakteriyel ve antifungal aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca bakır nanoparçacıklarının antioksidant ve antiinflamatuvar etkisine de sahip olduğu gösterilmiştir (Prakash vd., 2023). Karimi vd., (2023) ise Peygamber süpürgesi bitkisinin sulu özütlerinden bakır oksit nanoparçacıklarının sentezini gerçekleştirmişlerdir. Bakır-oksit nanoparçacıklarının yara iyileşmesi çalışmalarında kullanımı transforme edici büyüme faktörü beta-1 ve hidroksprolin seviyesini artırarak epitel dokunun düzenli bir şekilde gelişimini desteklemiştir (Karimi vd., 2023). Bakır nanoparçacıkların ve bakır oksit nanoparçacıkların kimyasının birbirinden farklı olduğunu vurgulamak gerekir. Oksit nanoparçacıkların üretimi farklı metaller için de gösterilmiştir. Örneğin, su yosunu bitki (*Sargassum wightii*) özütünden elde edilmiş çinko oksit nanoparçacıkları (20-30 nm aralığında) güçlü antibakteriyel aktivite (*Proteus vulgaris*, *Shigella dysenteriae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus megaterium*) göstermesine ek olarak güçlü in vitro antikanser (MCF-7 meme kanser hücre hattı) aktivitesi göstermiştir (Sundaresan ve Kasi, 2023). Arı ekmeği özütü kullanılarak üretilmiş olan gümüş nanoparçacıklar (AgNPlar, 60-200 nm aralığında sferik ve sferik olmayan nanoyapılar) güçlü gram (+) ve gram (-) aktiviteye ek olarak *Candida albicans* üzerine umut verici antifungal aktivite ve kolorektal adenokarsinoma (HTB-37 hücre hattı) hücrelerinin büyümelerini önemli derecede baskılamışlardır. Sentezi gerçekleştirilen

gümüş nanoparçacıkların yüzey kimyasının arı ekmeği içerisindeki yüksek polen içeriğine ek olarak fenolik ve flavonoid bileşenleri ile zenginleştirilmesi gözlemlenen bu aktivite için kritiktir (Urcan vd., 2023). Polen kimyasının kullanılması ile manyetik nanoparçacıkların üretilmesi ve fonksiyonlaştırılması da rapor edilmiştir. Shahriarinnour vd., (2023) kobalt ferrit manyetik nanoparçacıklarını hurma polenlerine yükleyerek çoklu ilaç direncine sahip patojenik *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Klebsiella pneumoniae* bakterilerinin serbest kobalt ferrit manyetik nanoparçacıklarına göre oldukça yüksek aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir (Shahriarinnour vd., 2023). Benzeri şekilde Hanafy vd., (2023) Bevasizumab antikörünün arı-poleni özütü ile birlikte kullanımının antikanser kapasitesini artırdığını göstermiştir (Hanafy vd., 2023). Polen ve polifenol yönünden zengin propolislerin kullanımı ile metalik nanoparçacıklara (Tahmasebi vd., 2023) ek olarak lipid nanoparçacıklarının üretimi de gösterilmiştir. Sentezi gerçekleştirilen lipid nanoparçacıklarının antikanser, antimikrobiyal ve antioksidant kapasiteleri metalik nanoparçacıklara eş değer ve bazı durumlarda daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Shahab-Navaei ve Asoodeh, 2023). Burada önemli bir noktayı da belirtmek gerekir. Sentezi zor olan titanyum oksit nanoparçacıklarının sentezi de propolis ekstraktları ile gerçekleştirilebilmektedir (Tahmasebi vd., 2023). Bitki ekstraktları ile sentezlenmiş metalik nanoparçacıklarının kullanımı biyolojik uygulamalar ile sınırlandırılmamıştır. Nam vd., (2023) Mangostana meyvesinin (*Garcinia mangostana*) pericarp kısmının sulu ekstraksiyonu ile elde ettikleri AgNPların güçlü antibakteriyel etkilerine ek olarak organik atıkların artımında başarılı katalizör olarak kullanılabileceğini de göstermişlerdir (Nam vd., 2023).

Polenler bitkilerin “erkek gametofitleri” olarak adlandırılmaktadırlar. Polen taneleri iki veya üç hücreli organizmalardır. Çiçekli bitkilerde olgun polen taneleri, çiçeklerin gelişmekte olan anterlerinde, mikrosporogenez ve mikrogametogenez olmak üzere iki ardışık fazda üretilirler. Anter ve polen gelişimi, yaşayabilir erkek gametlerinin oluşumu için gerekli olan ve aynı zamanda polen salımına izin verebilen ve akabinde döllenmenin oluşumunu sağlamak üzere gerekli olan dokuların ve hücre tiplerinin koordineli büyümesini ve farklılaşmasını içeren çok adımlı bir süreçtir. Polenlerin fizik ve morfolojik özellikleri bitki türüne sıkı sıkıya bağımlılık göstermektedir. Farklılıklara rağmen polen biyolojisine bakıldığında poleni oluşturan kısımlar en dış

kısımda ekzin ve aralıklı olarak germ gözeneği, ekzinin hemen altında intin ve intin ile sarılmış alan içerisinde kofullar, tüp hücreleri, tüp nükleusu ve jeneratif hücreden oluşmaktadır. Polenin sahip olduğu iç faktörler erkek gametlerinin dişi gametlere erişimini sağlayacak dinamiklikte şekillenmiştir. Çiçekli bitkilerde polen tanelerinin oluşumu anterlerde gerçekleşerek yine aynı bölgeden serbest bırakılırlar. Serbest bırakılan her bir polen tanesi tekil bir hücreyi veya hücre grubunu temsil etmektedir ve stigma üzerine gelmesi ile başlayan bir süreçle bitkinin döllenmesini sağlar. Polen tanelerinin canlılığı yani döllenmeyi sağlayacak karakterini muhafaza etmeleri 30 dk ila birkaç haftaya kadar devam edebilmektedir (Bedinger, 1992; Shivanna ve Tandon, 2020).

Polen tanelerinin kimyası incelendiğinde organik ve inorganik bileşen çeşitliliğinin muazzam derecede olduğu görülmektedir. Polen kaynağına bağlı olarak nem, kül, ham lif, yağ, protein, karbohidrat, organik molekül, vitamin ve mineral içeriği değişmektedir. Örneğin hurma polen içeriği incelendiğinde sırasıyla nem, kül, ham lif, yağ, protein ve karbohidrat olarak % ~29; %4,6; %1,4; %21; %31 ve %13 olarak verilebilir. Bunun yanında, Lösin ve lizin amino asidince zengin olmaları ile palmitik asit, limoleik asit ve miyristik asit en yaygın organik alifatik asitler olarak bulunmuştur. Çeşitli flavonoidlere ek olarak A ve E vitamini yönünden zengin olduğu belirlenmiştir (Hassan, 2011). Mısır polenine bakıldığında ise karbohidrat ve ham lif içeriği sırasıyla %44 ve %9,5 gibi çok yüksek bir değere sahipken protein içeriği %17, nem içeriği %23 ve yağ içeriği ise %0,6 olarak hurma polen içeriğine göre daha düşük olarak tespit edilmiştir. Ayrıca mısır polenlerinin fitokimyasal yönünden (örneğin flavonoidler, organik aromatik asitler vb.) çok zengin oldukları gösterilmiştir (Bujang vd., 2021). Bazı polen türleri ise kendine özgü kompozisyonlara sahip olabilmektedirler. Örneğin çayır kelp kuyruğu çimen (Timothy grass, Phleum pratense) poleni incelendiğinde ise flavoid, serbest amino asit, yüksek karbohidrat, prtoein ve lipid içeriğine ek olarak yüksek silisyum ve alerjen özellikli glikozil protein içeriği belirlenmiştir (Visez vd., 2021).

İnorganik nanoparçacıkların sentezinde indirgeyici kabiliyetlerinden ötürü polenlerin fitokimyasal kompozisyonları ve indirgeme kapasiteleri önem arz etmektedir. Her ne kadar polen kimyası türler arasında önemli ölçüde benzerlikler gösteriyor olsa da

spektroskopik teknikler ile polenlerin tanımlanmasına katkı sağlayacak kadar karakteristik farklılık göstermektedirler (Schulte vd., 2008). Ayrıca fitokimyasal içeriğin belirlenmesinde ekstraksiyon esnasında kullanılan çözünenin niteliği de rapor edilen kimyasal kompozisyona etki etmektedir. Bu durum karşılaştırmalar yapılırken dikkate alınmalıdır. Bakour vd., (2020) etanolün çözünen olarak kullanıldığı bir çalışma ile *Justicia adhatoda*, *Anethum graveolens*, *Anacyclus clavatus*, *Anacyclus radiatus*, *Calendula officinalis*, *Scolymus hispanicus*, *Papaver rhoeas*, *Mentha pulegium*, *Capparis spinosa*, *Mentha spicata*, *Malva sylvestris*, *Acacia pycnantha*, *Echium creticum* ve *Opuntia ficus-indica* polen ekstraktları için yapmış oldukları çalışma ile fenolik içeriklerinin ~9-35 mg/g aralığında değişirken flavonoid içeriklerinin ise ~1,3-15 mg/g aralığında olduğu tespit edilmiştir. Fitokimyasal içeriğe bakıldığında ise yaygın tüm türlerde yaygın olarak luteolin, kuersetin, kaempferol ve türevleri şeklinde flavonoidler ile kafeik asit ve türevleri şeklinde organik asitler bulunmaktadır. Lignan ve taninler de toplam fenolik içeriğe katkı yapmaktadır (Bakour vd., 2020). Hekzan kullanılarak ekstraksiyonu gerçekleştirilen *Cannabis sativa* L. polen içeriğine bakıldığında ise farklı kannabidiol türevleri içerirken metanol ekstraktları ise bunlara ek olarak glikozil-flavonoidler içermektedir (Ross vd., 2005). Benzeri şekilde çerez polenlerinin metanol ekstraktları da aynı şekilde farklı flavonoid ve türevlerini içermektedir (Cosmulescu vd., 2015). Çözünen seçimine ek olarak çevresel faktörlerin de polen kimyasına etki ettiği bilinmektedir. Örneğin *Citrus reticulata*, *Citrus sinensis* ve *Citrus paradisi* polenlerinin toplam flavonoid ve fenolik içeriği sıcaklık (depo sıcaklığı 5 ila 25 °C arasında çalışılmıştır) artışına bağlı olarak azaldığı gözlemlenmiştir (Mohammadrezakhani vd., 2018). Polenlerin sulu ekstraksiyonlarına bakıldığında organik çözünen kullanımına benzer olarak flavonoidlerin kazanılmasına katkı sağladıkları da rapor edilmiştir (Bakar vd., 2020). Glikozil-flavonoidlere ek olarak yağ asitlerinin de organik çözünenlere nazaran daha az olsa da su ekstraksiyonları huş ağacı poleni kullanılarak gösterilmiştir (Farah vd., 2021). Su içerisinde çözünürlüğü yüksek olan amino asitlerin izole edilmesinde sulu ekstraksiyon ise oldukça başarılı sonuçlar vermektedir (Seifert vd., 2016).

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1 Materyal**

Aurik asit ( $\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , % >99.5), Gümüş nitrat ( $\text{AgNO}_3$ , %  $\geq 99,0$ ), Mueller Hinton Broth, Mueller Hinton Agar, Kristal viole (%  $\geq 90,0$ ), 200-proof susuz etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ , % >95), Sodyum hidroksit ( $\text{NaOH}$ , % >97), Alüminyum klorür ( $\text{AlCl}_3$ , %99), Gallik asit monohidrat (% $\geq 98$ ), Folin–Ciocalteu reaktifi (2M), Bovine serum albumin (BSA, % $\geq 98$ ), Kirisin (%97), Asetik asit ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ , %  $\geq 99$ ) Sigma-Aldrich'den satın alınmıştır. Saf su laboratuvar da Humana Zenner Pure saf su cihazı ile üretilmiştir. Amerikan bezi ise yerel bir manufakturacıdan temin edilmiştir. Çalışmamızda kullanılan şeker ligantları ise Dr. İdris Yazgan (Fen Fakültesi, Kastamonu Üniversitesi, Kastamonu-Türkiye) tarafından sağlanmıştır. Şeker ligantlarının sentezi ve karakterizasyonu literatürde detaylandırılmıştır (Yazgan vd., 2021; Yazgan vd., 2020). Polen örnekleri Kastamonu bölgesinden 2017 yılında toplanmıştır.

#### **3.2 Polen Ekstraktlarının Hazırlanması**

1 gram kuru polen 20 mL saf içerisine eklenerek 2 saat süreyle  $\sim 50$  °C de inkübe edilmesinin akabinde vortekslenerek ekstraksiyon verimi artırılmaya çalışıldı. Sonrasında dört saat süreyle oda sıcaklığında orbital çalkalayıcı da inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde 6000 g de 20 dakika santrifüj edilerek polen parçalarını çökmesi ve ekstrakte edilen moleküllerin ortamdan uzaklaştırılması bir transfer pipeti ile gerçekleştirildi. Elde edilen süpernatant 0,2 µm steril filtreden geçirilerek 50 mL'lik steril bir santrifüj tüpünde toplanarak kullanıma kadar  $-20$  °C da muhafaza edildi.

#### **3.3 Polen Ekstraktlarının İçerik Analizi**

Polen ekstraktlarının içerik analizleri sıvı kromatografisi bağlantılı kütle spektroskopisi (LC-MS), toplan polifenol tayini, toplam fenol tayini, toplam protein ve indirgen şeker tayini ile belirlendi. Kimyasal karakterizasyon için fonksiyonel grup

analizleri önemli olması nedeniyle kızıl ötesi (infrared, IR) spektroskopisi kullanılmıştır.

### **3.3.1 Sıvı Kromatografi-Elektrosprey İyonizasyon Kütle Spektroskopisi/Kütle Spektroskopisi Karakterizasyonu (LC-ESI-MS/MS Karakterizasyonu)**

LC-ESI-MS/MS (Agilent 1260 Triple Quadrupole MS/MS) temelli yaklaşımda nicel olarak 37 fenolik molekülün karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Her bir örnek üçer defa çalışılmıştır ve verilen değerler ortalama değerlerdir. C18 ODS HPLC kolonu (25 mm x 4.6 mm x 5 $\mu$ ) kullanıldığı durumda 2  $\mu$ L örnek enjeksiyonu gerçekleştirilerek gradient ayırma işlemi uygulanmıştır. Taşıyıcı A çözgeni %0,1 formik asit/su ve taşıyıcı B çözgeni ise metil alkol olarak kullanılmıştır. Gradient ise 3 dakika %2 B, 6 dakika %25 B ve 10 dakika %50 B, 14 dakika %95 B ve 17,5 dakika %2 B olarak kullanılmıştır. Akış hızı sabit olarak 0,4 mL/dakika olarak kullanılmıştır (Dilek Tepe vd., 2021). Analizler Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deneysel Fen Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezinde Gerçekleştirilmiştir.

### **3.3.2 Toplam Polifenol Tayini**

Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak toplam fenol miktarı mg/mL gallik asit (GAE) olarak ifade edilmiştir (Ainsworth ve Gillespie, 2007). Standart grafiğinin oluşturulması için 0,001-0,1 mg/mL GAE kullanıldı.

### **3.3.3 Toplam Flavonoid Tayini**

Alüminyum klorür (AlCl<sub>3</sub>) metodu (Okan vd., 2018) ile 0,005-0,2 mg/mL kirisin standardı kullanılarak polen örnekleri içerisindeki toplam flavonoid miktarı belirlenmiştir.

### **3.3.4 Toplam Protein Miktar Tayini**

Toplam protein miktar tayini Coomassie Brilliant Blue G-250 boya temelli Bradford tayini ile belirlenmiştir (Yılmaz ve Arica, 2004). 0,04-10 mg/mL Bovine serum albumin derişim aralığında beş nokta kullanılarak standart grafik oluşturuldu.

Örneklerin analizlerinde ise stok polen ekstraktları 2 ve 5 kat seyreltilerek elde edilen sonuçlar ortalama olarak verilmiştir.

### 3.3.5 Toplam İndirgen Şeker Tayini

Toplam indirgen şeker tayini için dinitro salisilik asit (DNS) yöntemi (Miller, 1959) kullanılarak 0,09-9 mg/mL glukoz standardı kullanılarak polen ekstraktları içerisindeki indirgen şeker miktarı belirlenmiştir.

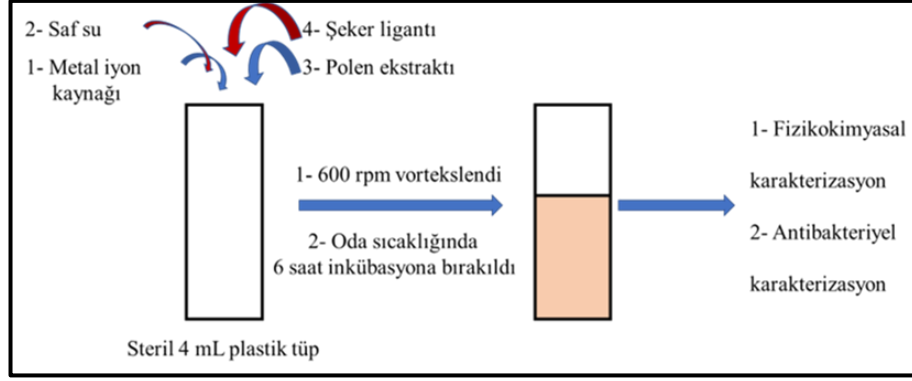
### 3.4 Altın Nanoparçacıkların Sentezi

Polen ekstrakt kimyasının altın nanoparçacık sentezi üzerine etkisinin test edilmesi amaçlanmasından dolayı ekstrakt üzerine herhangi bir değişiklik yapmadan doğrudan ekstraktan 1 mL alınarak 1 mg/mL altın tuzu (stok  $\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 20 mg/mL) eklenerek 24 saat beklenmesinin akabinde analizler gerçekleştirilmiştir.

### 3.5 Şeker Ligant Varlığında Altın ve Gümüş Nanoparçacıkların Sentezi

Polen ekstraktlarının altın nanoparçacıklarının sentezini başlatmaları yavaş olması nedeniyle, karbohidrat ligantları kullanılarak  $\text{Au}^{3+}$  iyonunun elementel  $\text{Au}^0$  a indirgemesi hızlı bir şekilde gerçekleştirildi. Karşılaştırma amacıyla  $\text{Ag}^{+1}$  iyonunun  $\text{Ag}^0$  a indirgenmesi de test edildi. Polen ekstraktlarının sentezi gerçekleşen altın nanoparçacık (altın nanoyapı, AuNS) (AuNP) ve gümüş nanoparçacık (AgNP) üzerine etkileri ultra-viyole görünür bölge (UV-Vis) spektroskopisi ile takip edildi. UV-Vis spektroskopisi ile nanoparçacıklara ait SPR tepe noktalarının takibi ile AuNP ve AgNP'a ait boyut ve şeklin analizinin başarılı bir şekilde yapılabildiği gösterilmiştir (Smitha vd., 2008).

Çalışmada kullanılan şeker ligantları Sellobioz p-aminobenzoik asit (CBpAB), Sellobioz 3-aminofenol (CB3AP) ve Galaktoz 5-aminosalisik asit (G5AS) olmak üzere üç tanedir. Bu bölümde kullanılan polen türleri ise *Pinus nigra*, *Pinus sylvestris*, *Cedrus deodora*, *Cedrus libani*, *Abies nordmanniana*, *Juniperus horizontalis* ve *Thuja orientalis* olmak üzere yedi tanedir. Türlerin seçiminde kimyasal kompozisyonlar arasındaki farklılıklar esas alınmıştır.



Şekil 3.1 Şeker ligantlarının varlığında AuNP sentez şeması

Tablo 3.1’de verilen kompozisyona bakıldığında hem polen ekstraktının kendisi hem de kullanılan üç tane şeker ligantı için AuNP ve AgNP sentezi birbirlerinin etkisi olmadan denenmiştir. Hacmin nanoparçacık sentezi üzerine etkisi bilindiğinden ötürü tüm durumlarda hacim sabit olarak alınmıştır. Stok  $\text{AgNO}_3$  ve  $\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  20 mg/mL iken polen ekstraktlarının derişimi ise 10 mg/mL olarak sabit tutulmuştur. Tüm reaksiyonlar 24 saat inkübasyona tabi tutulmuştur.

Tablo 3.1 Polen ekstraktı kullanılarak sentezlenen dokuz altın ve gümüş nanoparçacığın kompozisyonu.

NPlar	Saf su ( $\mu\text{L}$ )	Şeker ligantı ( $\mu\text{L}$ )	$\text{AgNO}_3$ ( $\mu\text{L}$ )	$\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ( $\mu\text{L}$ )	Polen ekstraktı (mL)
NP 1	800	-	-	20	100
NP 2	800	-	20	-	100
NP 3	800	CB3AP(100)	20	-	-
NP 4	800	CBpAB(100)	20	-	-
NP 5	800	G5AS(100)	20	-	-
NP 6	800	CB3AP(100)	-	25	-
NP7	800	CBpAB(100)	-	25	-
NP8	800	G5AS(100)	-	25	-
NP 9	800	CB3AP(100)	20	-	100
NP 10	800	CBpAB(100)	20	-	100
NP 11	800	G5AS(100)	20	-	100
NP 12	800	CB3AP(100)	-	25	100
NP13	800	CBpAB(100)	-	25	100
NP14	800	G5AS(100)	-	25	100

### 3.6 Altın ve Gümüş Nanoparçacıkların Karakterizasyonu

Boyut, morfoloji ve kristal yapı analizlerinde yüksek çözünürlük geçiren elektron mikroskobu (HRTEM, FEI TALOS F200S TEM 200 kV) (Bayburt Üniversitesi

Merkezi Araştırma Laboratuvarı, Türkiye). HRTEM analizlerinde nanoparçacıklar standart 300-mesh (katalog numarası 01895-F, Ted-Pella) ızgaralar kullanılmıştır. Büyük boyutlu nanoyapıların ve kompozit pamuk yapılarının morfolojik özelliklerinin analizinde ise taramalı elektron mikroskobu (FEI QUANTA 250 FEG, Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı). Yüzey plazmon rezonans ölçümleri ise 350-900 nm aralığında mikrolaka okuyucu yardımıyla Thermo Multiskan FC Microplate Reader spektroskopisi ile cihazında ölçümler gerçekleştirilmiştir. IR spektroskopik analizler ise polen özütlerinde olduğu şekliyle liyofilize nanoparçacıklar ile gerçekleştirilmiştir

### **3.7 Gümüş Nanoparçacıkların Antibakteriyel Aktivitelerinin Karakterizasyonu**

Sentezlenen altın ve gümüş nanopartikül serileri gram (+) ve gram (-) bakteriler üzerinde test edilmiştir. Antibakteriyel alışmalar için taze koloniler elde etmek amacıyla -20 °C stoktan alınan bakteri türleri 37 °C'de inkübe edilmiştir. Minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) değeri, bakterilerin %95 oranında büyümesini engelleyen nanopartikül konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Steril 96 kuyulu plaka 200 µL Nutrient Broth ile doldurulmuştur (retici talimatlarına uygun olarak hazırlanmıştır). Büyüme baskılama çalışmaları ayrıca Nutrient Agar (retici kılavuzlarına uygun olarak hazırlanmıştır) zerinde de test edilmiştir (Sancak vd., 2023).

## 4. BULGULAR

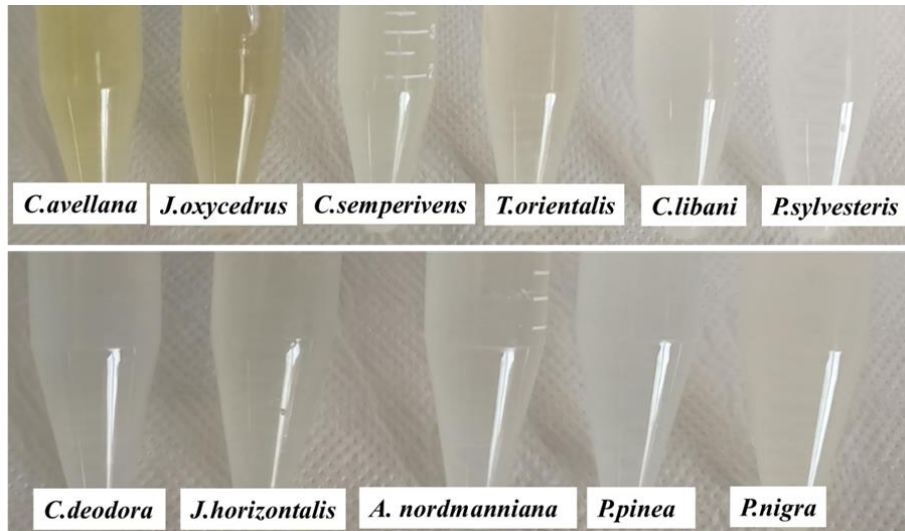
### 4.1 Polen Ekstraktlarının İçerik Analizleri

Şekil 4.1’de polen örneklerinin dijital kamera ile çekilmiş ve üzerinde herhangi bir oynamanın yapılmadığı renkleri görülmektedir. Polen tanelerinin renklerinden de görüldüğü gibi herhangi bir bozulma ya da bir kirlenmenin olmadığı görülmektedir.

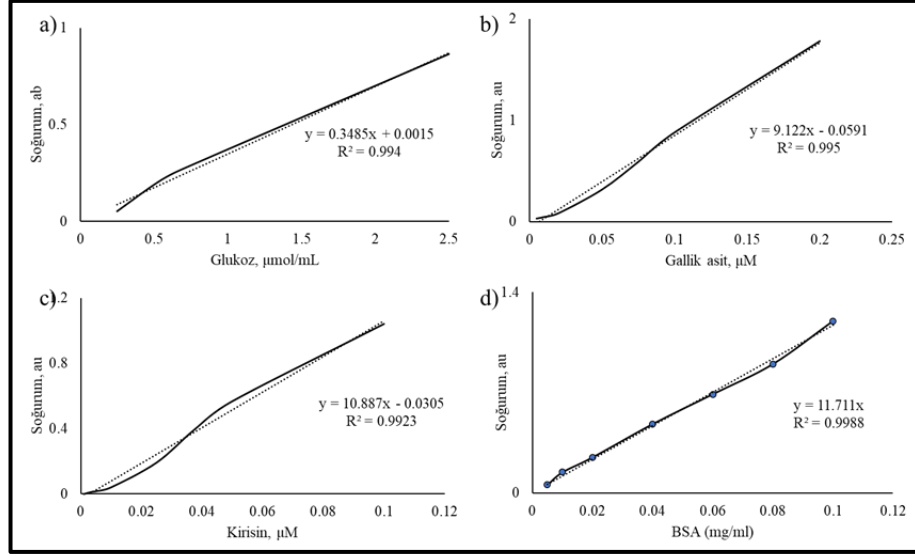


Şekil 4.1 Kuru polen tanelerinin dijital kamera görüntüleri

Şekil 4.2’de ise ekstraksiyon, izolasyon ve 0,2 µm filtrasyon akabinde elde edilen özütlerin dijital kamera görüntüleri verilmiştir. Her ne kadar tüm polen taneleri renkli bir görüntüye sahip olsa da sadece *J. oxycedrus* ve *C. avellana* türleri için sarımsı yeşil renkli özütler elde edilmiştir.



Şekil 4.2 Polen ekstraktlarının dijital kamera görüntüleri.

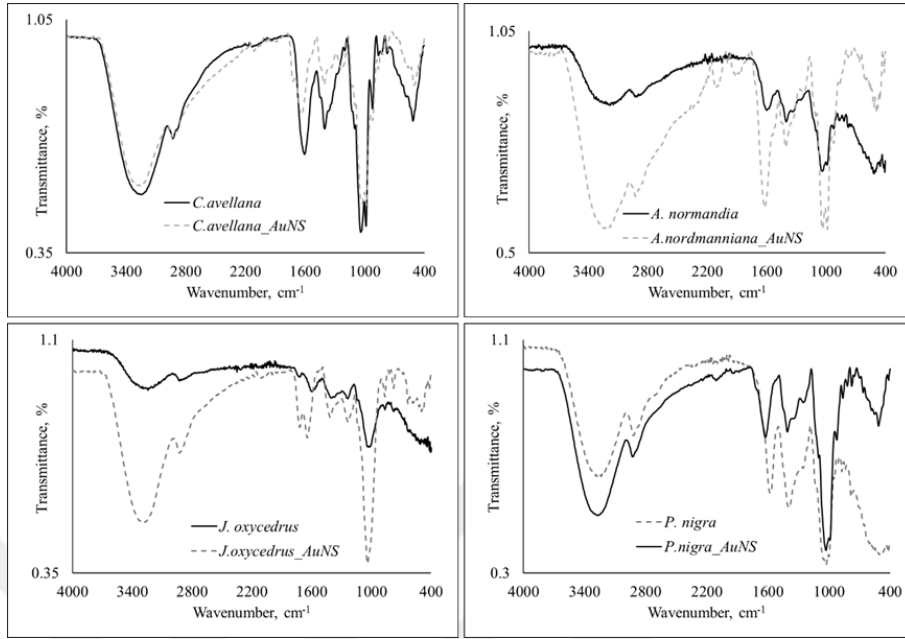


Şekil 4.3 DNS standart grafiği (a), Total fenol standart grafiği (b), Total flavonoid standart grafiği (c) ve Protein standart grafiği (d).

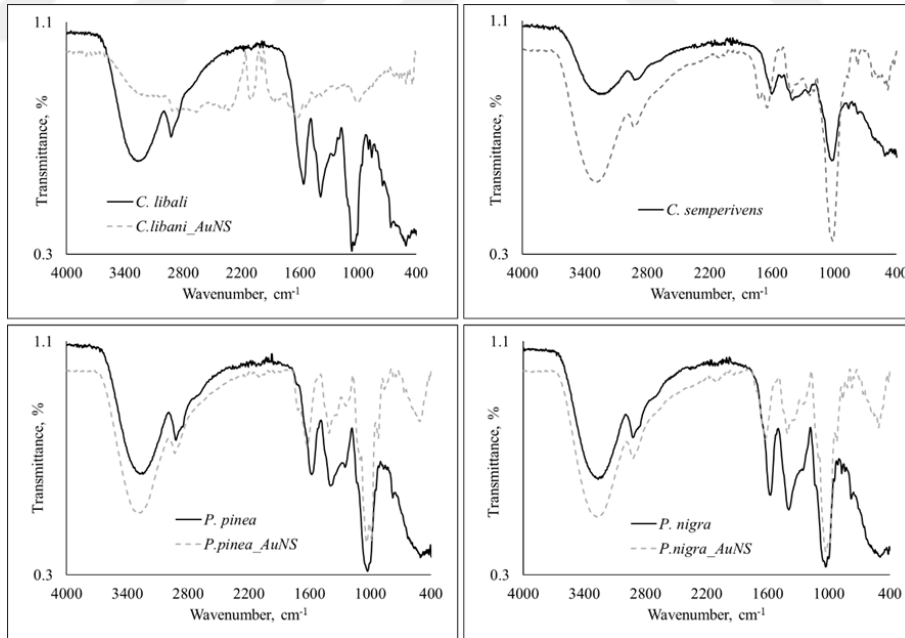
Şekil 4.3'te görüldüğü gibi standart grafiklerine ait  $R^2$  değerleri  $>0,99$  olarak elde edilmiştir. Bu değerler, çalışılan aralıkta elde edilen sonuçların doğru olduğunu ifade etmektedir. Örneklere ait bilinmeyen değerlerin bulunmasında standart grafikler ile oluşturulmuş olan denklemler aracılığı ile hesaplanmıştır.

#### 4.2 Polen Ekstrakt Kimyasının Altın Nanoparçacık Karakteri Üzerine Etkisi

### 4.3 Polen Ekstraktlarının İçerik Analizleri



Şekil 4.4 *C. avellana*, *A. nordmanniana*, *J. oxycedrus* ve *P. pinea* ve karşılık gelen AuNS IR spektrumları.



Şekil 4.5 *C. libani*, *C. sempervirens*, *P. pinea* ve *P. nigra* ve karşılık gelen AuNS IR spektrumları

Tablo 4.1 IR fonksiyonel grupları\*

Bant pozisyonu (cm <sup>-1</sup> )	Fonksiyonel gruplar	Polen kaynakları										
		CA	JO	CS	TO	CL	PS	CD	JH	AN	PP	PN
3.600-3.000	-OH deformasyon bandı	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.920±6	CH <sub>2</sub> , lipitler, proteinler ve karbonhidratlar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1.723	-COHN, C=N titreşimleri		+		+							
1.560-1.600	-Proteinlerin CNH'si, CC ve CO, sporopolleninin aromatikleri ve fenolikleri veya COO'nun C=O gerilmesi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1.516	Fenolik asitlerin C=C gerilmesi		+	+	+							
~1.390-1.411	-COO'nun varlığı	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1.241	-C-O-C- simetrik gerilmesi		+		+		+	+				
1.202	Heteropolysaccharides	+				+		+				
1.190	Cyanidin- 3-glucoside			+		+		+				
1.068	Aromatik C-O ve C-C gerilmesi ve muhtemelen amid grubunun varlığı			+		+						
1.020-1.040	Şekerlerin C-O-C esnetilmesi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
989	Polisakaritin C-O-C titreşimleri	+								+		
946 ve 956	Fenolik bileşikler ve karbonhidrat					+				+	+	+
922	Alkolik gruplar	+								+		+
914 ± 5	Fruktoz										+	+
864 ±2	C-O-C germe ve/veya aromatik C-H düzlem dışı bükme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
817	Aromatik C-H esneme		+	+						+		
778 ±3	Nükleik asitlerin fosfat uzantıları	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
751	Aromatiklerin H-C-H sallanması			+		+						

\*Karbohidrat ifadesi basit şeker ve polimerik şekerler için kullanılmıştır. Tablonun oluşturulmasında doğrudan polen ve polen ekstraktları ile yapılan çalışmalar

kullanılmıştır (Ageitos vd., 2021; Bakar vd., 2020; Buta vd., 2015; Ji vd., 2020; Jiang vd., 2009; Pummer vd., 2013; Sadik, 2017; Song vd., 2010; Zdunek vd., 2022).

Tablo 4.2 *P. pinea*, *D. deodora* ve *C. avellana* pollen ekstrakt fitokimyasal içerikleri.

İçerik	<i>P. pinea</i>	<i>C. deodora</i>	<i>C. avellana</i>
Gallik asit	21,0234	17,6975	793,0045
Pirokatekol	12,3507	14,815	13,37655
Protokatekuik asit	96,21275	268,92695	426,298
3,4-Dihidroksifenilasetik asit	13,4093	12,27255	12,48045
(+)-Kateşin	11,3146	0	26,2474
Klorojenik asit	35,01775	36,10565	189,95755
2,5-Dihidroksibenzoik asit	0	0	4,87885
4-Hidroksibenzoik asit	2102,941	91,68515	834,42025
(-)-Epicatechin	16,35815	15,0836	20,08185
Kafeik asit	363,0203	5489,2752	35,45205
Siringik asit	12,1476	13,41305	17,45295
3-Hidroksibenzoik asit	1,49725	0,5295	2,03975
Vanilin	4,5137	79,2049	11,56225
Verbascoside	0	0	0
Taksifolin	1304,5673	0	0
p-Coumaric asit	22214,188	191,22425	328,3146
Sinapik asit	7,11545	6,7167	1825,5326
Ferulik asit	730,1924	2831,2419	101,6252
Luteolin 7-glukozit	0	0	0
Hesperidin	7,34965	36,56215	831,5532
Rosmarinik asit	6,95405	6,95865	7,53955
Hiperosid	54,25305	24,3446	8689,3009
Apigenin 7-glukozit	3,09845	7,67205	10,33065
Pinoresinol	21,40805	187,58695	45,67205
2-Hidroksisinnamik asit	12,0077	10,8916	10,98165
Eriodictyol	0	0	0
Quercetin	98,2984	11,8057	292,8852
Luteolin	11,06075	11,75535	7,6775
Kaempferol	4,465	1,2138	19,448
Apigenin	0	0	0
Toplam Fenolikler (µg/mL)	41,3	35,9	570
Toal Flavonoidler (mg/mL)	13,4	93,2	14,7
Protein (µg/mL)	18,3	84,1	251,26
İndirgeyici şeker (µmol/mL)	3,72	0,85	1,11

Tablo 4.3 *P. nigra*, *J. horizontalis*, *C. libani* ve *C. sempervirens* polen ekstrakt fitokimyasal içerikleri.

İçerik	<i>P. nigra</i>	<i>J. horizontalis</i>	<i>C. libani</i>	<i>C. sempervirens</i>
Gallik asit	53,0397	173,82	242,21	76,0203
Pyrocatechol	15,0957	12,6743	16,2753	16,6547
Protokateşuik asit	2104,22	57,0234	1933,36	122,625
3,4-Dihidroksifenilasetik asit	12,3281	10,9153	12,0628	10,5499
(+)-Kateşin	67,3505	3834,31	132,997	3103,17
Klorojenik asit	42,0614	519,466	43,7397	57,1848
2,5-Dihidroksibenzoik asit	39,0073	0,28055	99,1279	0,0751
4-Hidroksibenzoik asit	17055,3	103,322	1129,24	74,9529
(-)-Epicatechin	21,6887	8651,83	29,2334	8350,68
Kafeik asit	342,535	251,576	9989,4	490,218
Siringik asit	28,5534	17,653	27,8581	19,3309
3-Hidroksibenzoik asit	23,0396	3,1529	39,8035	2,3556
Vanilin	65,5424	9,11605	419,594	8,62735
Verbascoside	0	0	0	0
Taksifolin	80,1597	0	75,5452	0
p-Coumaric asit	34114,3	4800,45	837,505	1831,09
Sinapik asit	6,46945	9,08905	8,35855	19,9147
Ferulik asit	1201,24	2013,95	3166,35	2038,54
Luteolin 7-glukozit	15,4109	3737,5	0	3522,39
Hesperidin	12,4764	2325,68	23,2417	37,2957
Rosmarinik asit	7,2529	7,2747	6,7562	7,3003
Hiperosid	14,7028	502,401	540,862	450,854
Apigenin 7-glukozit	11,9368	9360,29	9,0157	8346,02
Pinoresinol	756,632	15,9768	328,866	27,4135
2-Hidroksisinnamik asit	11,8277	11,0138	11,0481	11,2158
Eriodictyol	0	2,12985	0	21,5209
Kuersetin	3,44375	10,3263	0	33,0091
Luteolin	41,9862	3613,63	57,5025	10249,8
Kaempferol	0,7048	1,47545	1,2115	8,7924
Apigenin	0	1766,87	10,5171	3998,73
Toplam Fenolikler (µg/mL)	115	91,2	104,5	67,4
Toal Flavonoidler (mg/mL)	15,5	20,5	15,9	13,4
Protein (µg/mL)	20,32	24,1	38,32	16,7
İndirgeyici şeker (µmol/mL)	2,05	2,05	1,06	2,02

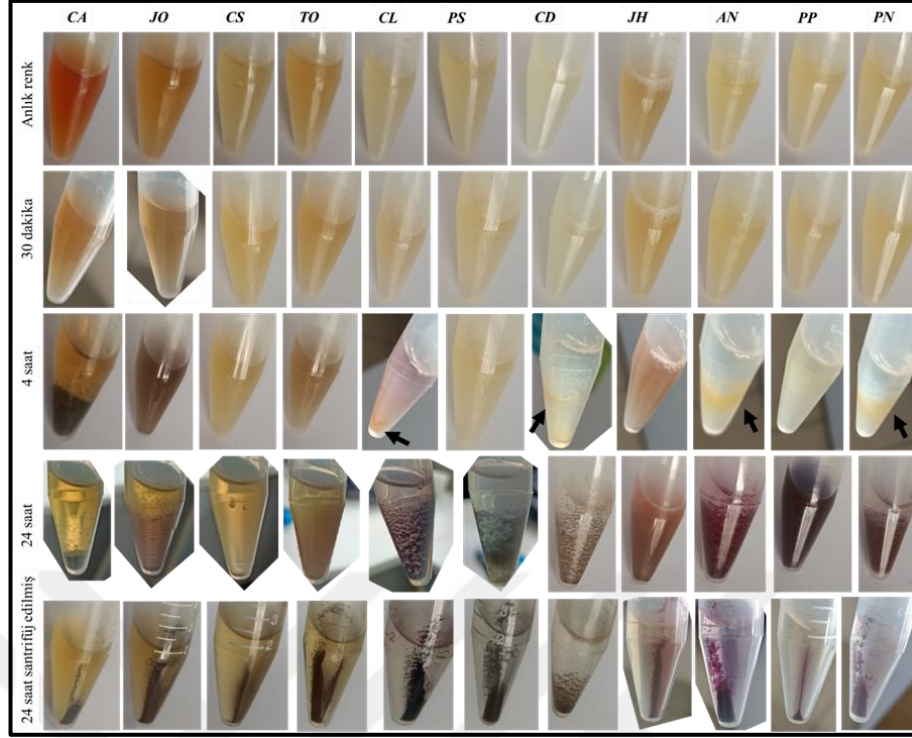
Tablo 4.4 *J. oxycedrus*, *T. orientalis*, *P. sylvestris* ve *A. nordmanniana* polen ekstrakt fitokimyasal içerikleri

İçerik	<i>J. oxycedrus</i>	<i>T. orientalis</i>	<i>P. sylvestris</i>	<i>A. nordmanniana</i>
Gallik asit	9,44	39,5428	17,7533	77,3284
Pyrocatechol	16,0001	12,7981	15,3472	13,259
Protokateşuik asit	10,0721	43,9137	419,014	280,297
3,4-Dihidroksifenilasetik asit	10,4881	10,5582	11,0684	11,1535
(+)-Kateşin	0	540,512	0	0
Klorojenik asit	72,9094	240,301	71,9415	51,5956
2,5-Dihidroksibenzoik asit	0	14,4916	1,54265	0
4-Hidroksibenzoik asit	17,8288	147,092	3047,1	7234,35
(-)-Epicatechin	14,0485	3932,68	12,3627	12,1027
Kafeik asit	4,2615	547,552	331,037	325,525
Siringik asit	12,3047	17,9652	12,0155	12,4775
3-Hidroksibenzoik asit	1,6715	1,9305	2,00475	1,52745
Vanilin	0	0	15,0184	44,3171
Verbascoside	2,7493	0	0	1,28925
Taksifolin	0	0	278,134	0
p-Coumaric asit	74,1695	5381,36	48648,9	14508,9
Sinapik asit	6,37055	16,3953	6,33285	6,0735
Ferulik asit	9,83865	1370,65	1545,6	3235,6
Luteolin 7-glukozit	14,2752	3819,08	0	0
Hesperidin	17,3902	312,298	7,9588	86,4393
Rosmarinik asit	6,952	7,2968	6,84225	6,81565
Hiperosid	10,2358	4606,49	18,8476	33,7297
Apigenin 7-glukozit	1,8478	869,577	3,7948	9,0256
Pinoresinol	3,03285	52,4785	823,727	315,74
2-Hidroksisinnamik asit	11,0723	11,4063	12,1891	11,8582
Eriodictyol	0	72,994	0	0
Kuersetin	0	105,327	0	0
Luteolin	76,6082	7159,77	2,1481	3,45885
Kaempferol	0	1,081	0	0
Apigenin	0	344,568	0	0
Toplam Fenolikler (µg/mL)	190,6	58,7	258	110
Toal Flavonoidler (mg/mL)	70,03	24,3	19,6	13,4
Protein (µg/mL)	71,4	16,82	8,13	171,56
İndirgeyici şeker (µmol/mL)	2,1	1,75	0,65	3,22

Çalışılan otuz yedi fitokimyasalın ekstraktlardaki miktarı tür düzeyinde bile farklılıklar göstermiştir (Tablo 4.3-4.4 -4.5). Tartışmayı basitleştirmek amacıyla, her tür için sadece nispeten en yüksek fenolik asitler ve flavonoidler vurgulanacaktır. 4-hidroksibenzoik asit ve p-kumarik asit *P. pinea* ekstraktında en yüksek konsantrasyona sahip fenolik asitler olurken, sadece taksifolin nispeten yüksek oranda bulunmuştur. *C. deodora* ekstraktlarında, kafeik asit ve ferulik asit en yüksek konsantrasyona sahip fenolik asitler iken pinoresinol tek konsantrasyona sahip flavonoiddir. *C. avellana*'da fenolik asitler olarak gallik asit, 4-hidroksibenzoik asit ve sinapinik asit ve flavonoid olarak hiperosid en yoğun olanlar iken, *P. nigra*'da fenolik asitler olarak 4-hidroksibenzoik asit ve p-kumarik asit ve flavonoid olarak pinoresinol en baskın olanlardı. *C. deodora*'ya benzer şekilde, *C. libani*'de kafeik asit ve ferulik asit en yoğun olanlarken, hiperosid ve pinoresinol en yoğun flavonoidler olmuştur.

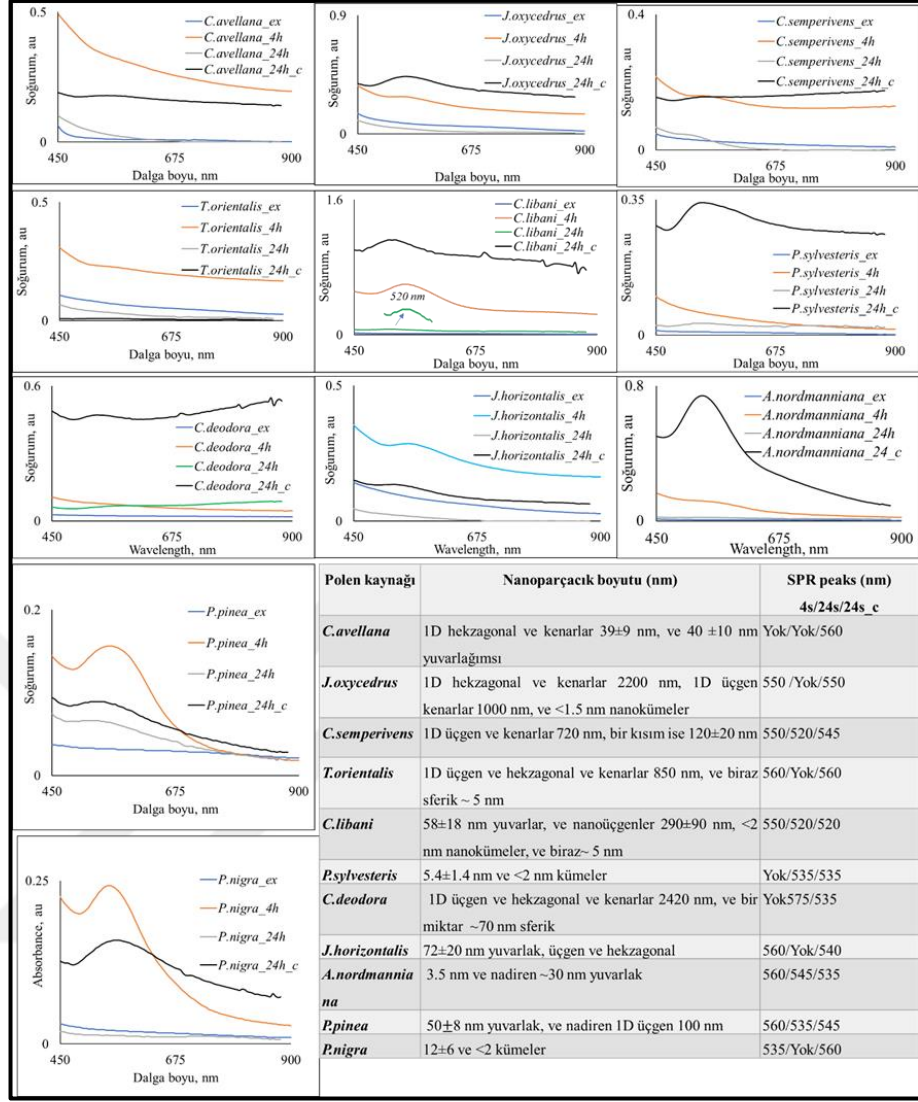
#### 4.4 Altın Nanoparçacıkların Karakterizasyonu

AuNS'lerin dijital kamera görüntüleri (Şekil 4.6), tüm ekstraktların AuNS oluşumunu tetiklediğini, ancak yüzey plazmon rezonans pik oluşumunun Şekil 4.7'de görüldüğü gibi 4 saat içinde başladığını göstermektedir. Ancak, AuNS'lerin miktarı *C. avellana*, *J. oxycedrus*, *C. libani* ve *J. horizontalis* dışında oldukça düşüktü. 24 saatlik inkübasyon süresinde, tüm ekstraktlar katı AuNS'ler vermiş ve *C. avellana* (CA), *J. oxycedrus* (JO), *C. libani* (CL), *P. sylvestris* (PS), *C. deodora* (CD) ve *P. nigra* (PN) çökelirken, *C. sempervirens* (CS), *T. orientalis* (TO), *J. horizontalis* (JH), *A. nordmanniana* (AN) ve *P. pinea* (PP) çok az veya hiç çökeltme vermemiştir. 24 saat santrifüjleme tüm AuNS'lerin çökmesiyle sonuçlanmıştır.

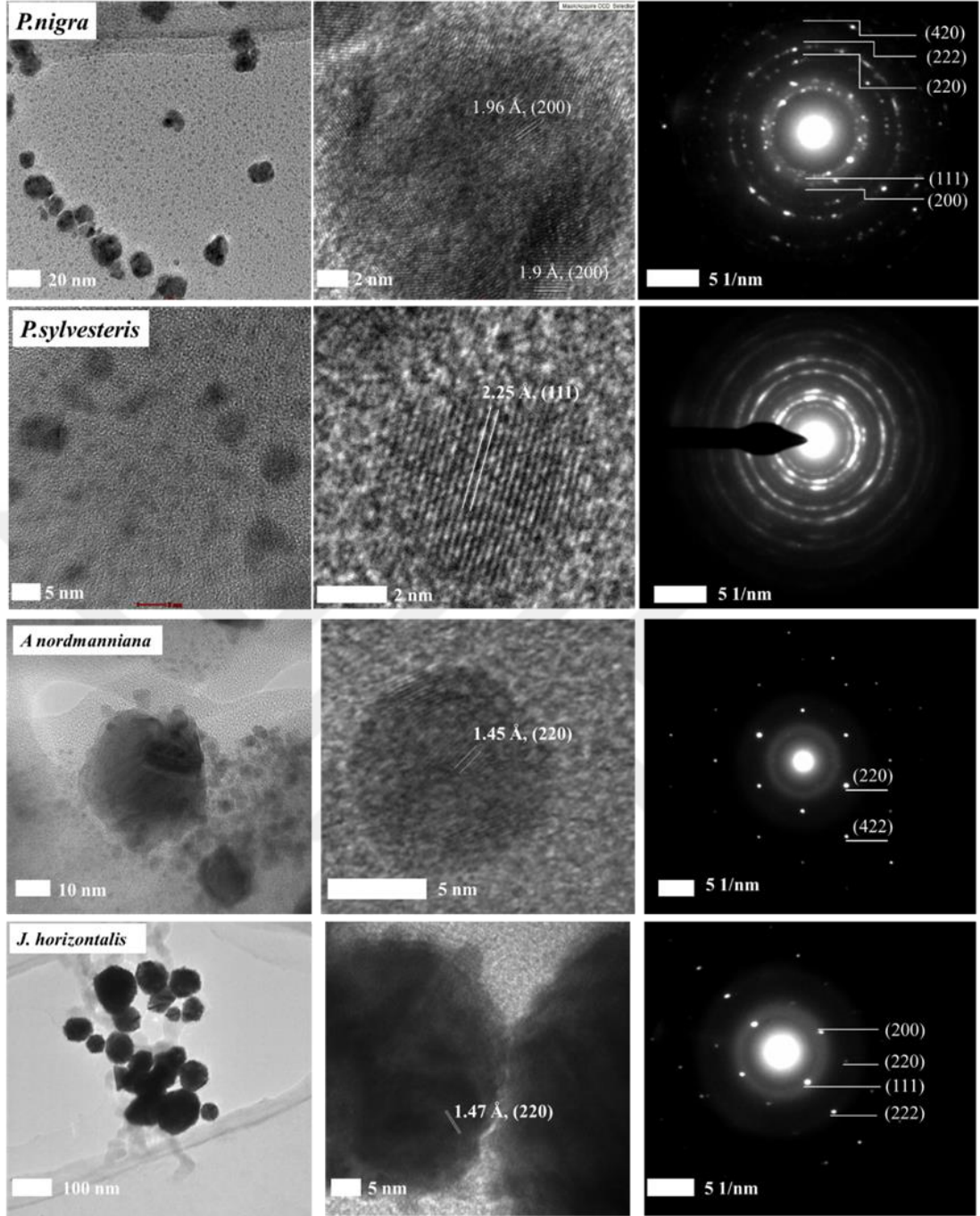


Şekil 4.6 Polen özütleri kullanan AuNS'lerin dijital kamera görüntüleri. Anlık renkler, özütlere Au<sup>3+</sup> ilavesinin ilk 30 saniyesini ifade etmektedir.

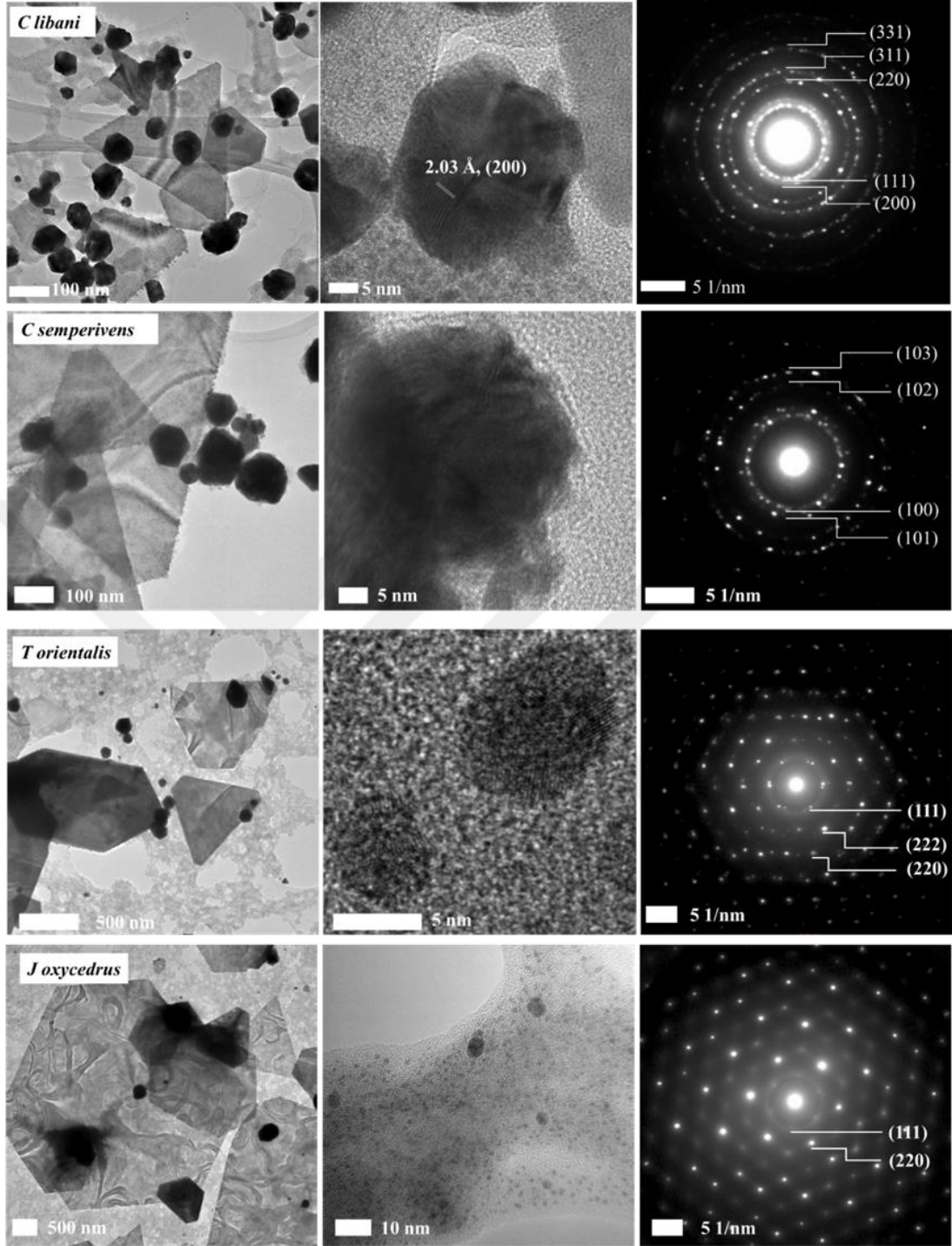
Ekstraktlar, taranan 450-900 nm aralığında herhangi bir absorbands piki vermemiştir (Şekil 4.7), dolayısıyla tüm pikler AuNS'lere ait SPR pikleridir. 4 saat ve 24 saat için verilen SPR pikleri vortekslenmiş karışımdan elde edilirken, 24 saat\_c 24 saatlik inkübasyon periyodunun santrifüjünden sonraki süpernatantı ifade etmektedir. *C. deodora*, *P. sylvestris* ve *C. avellana* hariç, hepsi 3 kez seyreltilmiş örnekleri için SPR pikleri vermiştir. Ancak, UV-Vis spektrumlarından görüldüğü üzere SPR pikleri oldukça zayıftır (Şekil 4.7). İlginç bir şekilde 24 saat inkübe edilen numuneler için *C. avellana*, *J. oxycedrus*, *T. orientalis*, *J. horizontalis* ve *P. nigra* herhangi bir SPR piki vermemiştir. Bu örnekler için neden yanıt alınamadığı net olmamakla birlikte, daha büyük AuNS'lerin SPR pikleri verebilen daha küçük AuNS'lere ulaşan ışığı engellediğini tahmin ediyoruz. Ayrıca, süpernatantlar genel olarak daha keskin ve daha güçlü SPR pikleri vermiştir, bu da santrifüj işlemi sırasında daha büyük AuNS'lerin çökmesiyle ilgili olabilir.



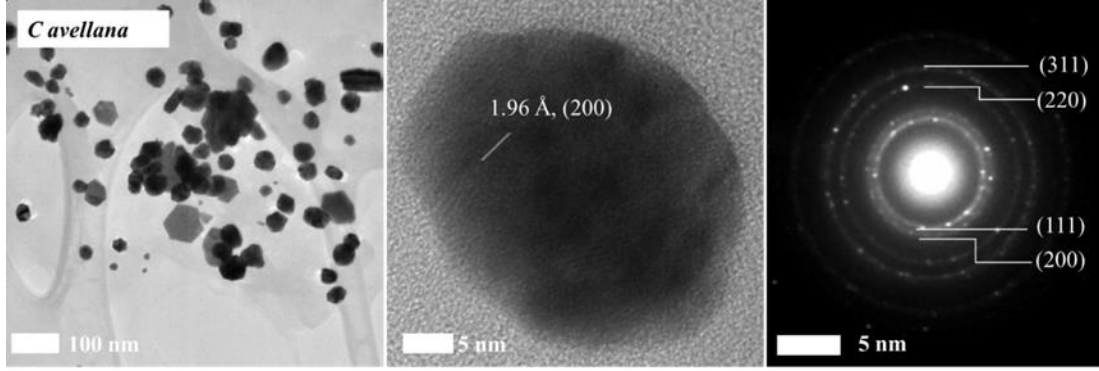
Şekil 4.7 Polen tanesi özütlerinin ve AuNS'lerin UV-Vis spektrumları



Şekil 4.8 *P. nigra*, *P. sylvestris*, *A. nordmanniana* ve *J. horizontalis*'in TEM ve SAED görüntüleri.



Şekil 4.9 *C. libani* ve *C. Sempervirens*, *T.orientalis* ve *J.oxycedrus* 'un TEM ve SAED görüntüleri.



Şekil 4.10 *C. avellana* AuNS'lerinin TEM ve SAED görüntüleri.

Sentezlenen diğer AuNS'lerin aksine, *C. avellana*  $39 \pm 9$  nm'ye kadar kenarları olan 50 nm'nin altında 1D altıgen AuNS'ler vermiştir. Ayrıca,  $40 \pm 10$  yuvarlak 0D asferik AuNS'ler oluşurken nanokümelere oluşmamıştır. Beklendiği gibi, kristal yapı (111), (200), (220) ve (311) kırınımları ile *fcc* idi (Şekil 4.8, Şekil 4.9 ve Şekil 4.10).

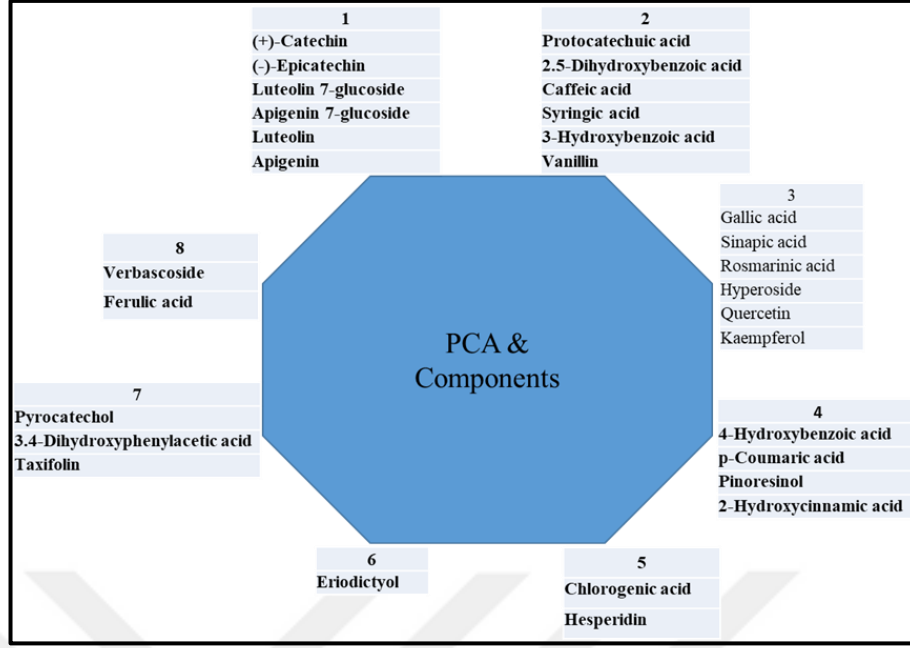
AuNS'ler santrifüjleme (20 dakika boyunca 6.000 g) kullanılarak reaksiyon karışımından izole edildi. Süpernatantlar "reaksiyon sonrası süpernatantlar" olarak adlandırıldı ve AuNS sentezine izin verip vermedikleri ayrıca test edildi. Sadece *C. avellana* reaksiyon sonrası süpernatantı 24 saatlik inkübasyon süresi boyunca AuNS sentezine izin vermiştir.

AuNS'lerin polen özütü aracılı sentezinde hangi parametrelerin rol oynadığını anlamak ve oluşan AuNS'lerin şekli hakkında fikir verebilecek olası belirteçleri bulmak için temel bileşen analizi (PCA) kullanılmıştır. İstatistiksel analizden önce, her bir AuNS'ye boyut ve morfolojinin yanı sıra boyuta dayalı bir puan atandı. En küçük AuNS'ler 100'e atanmış ve boyuttaki artışlar ve 0D'den 1D'ye geçiş, atanan puanda düşüşlerle sonuçlanmıştır. PCA analizine göre sekiz bileşen oluşmuştur. Bileşenler kendi içlerinde uyumlu ve ortak bir noktada buluşan molekül ya da molekülleri içerdiklerini göstermektedir (Tablo 4.5 ve Şekil 4.11). Bu aşamadan sonra, bir korelasyon katsayısı bulmak için her bir bileşenin içerdiği katsayılarla etkileşimleri arasındaki ilişkiyi incelemek için daha ileri çalışmalar yapıldı ve bu daha sonra bir model geliştirmek için kullanıldı. Model, ekstraktın kimyasal bileşimi ile korelasyon altın nano yapısı arasındaki ilişkiyi açıklamayı amaçlamıştır.

Tablo 4.5 İstatistiksel analiz

Döndürülmüş Bileşen Matrisi*								
	Bileşen							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Gallik asit			0,915					
Pyrocatechol							-0,404	
Protokateşuik asit		0,898						
3.4-Dihidroksifenilasetik asit							0,724	
(+)-Kateşin	0,929							
Klorojenik asit					0,854			
2.5-Dihidroksibenzoik asit		0,943						
4-Hidroksibenzoik asit				0,763				
(-)-Epicatechin	0,923							
Kafeik asit		0,682						
Siringik asit		0,936						
3-Hidroksibenzoik asit		0,965						
Vanilin		0,828						
Verbascoside								-0,471
Taksifolin							0,926	
p-Coumaric asit				0,896				
Sinapik asit			0,963					
Ferulik asit								0,753
Luteolin 7-glukozit	0,767							
Hesperidin					0,848			
Rosmarinik asit			0,632					
Hiperosid			0,895					
Apigenin 7-glukozit	0,943							
Pinoresinol				0,837				
2-Hidroksisinnamik asit				0,764				
Eriodictyol						0,969		
Kuersetin			0,915					
Luteolin	0,795							
Kaempferol			0,936					
Apigenin	0,962							

\* Ekstraksiyon Yöntemi: Temel Bileşen Analizi. Döndürme Yöntemi: Kaiser Normalizasyonu ile Varimax.



Şekil 4.11 PCA analiz sonucunda elde edilen gruplandırma.

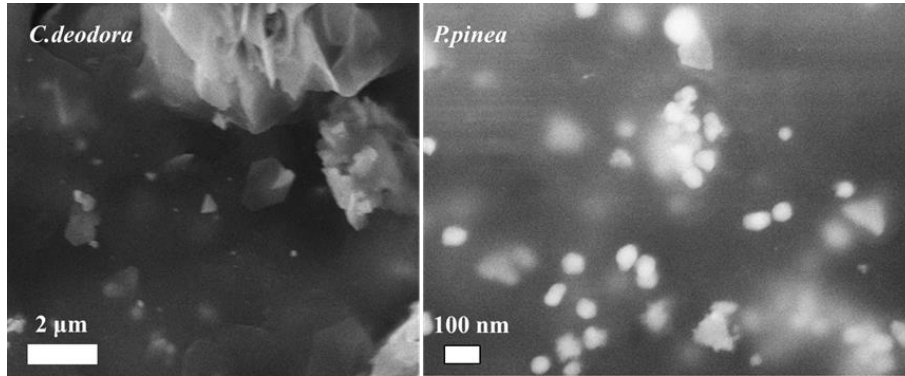
PCA analizi sonrasında 8 bileşen oluşmuştur. Bu bileşenler kendi içinde uyumlu olan ve ortak noktada buluşan molekül/molekülleri barındırdığını göstermektedir. Bu aşamadan sonra her bileşeni kendi içinde barındırdığı molekül/molekülleri etki katsayısı ile ilişkisini incelemek ve bulunan korelasyon sonunda etki katsayısı ile oluşturulabilecek model üzerinde çalışmalar gösterilmiştir.

Table. Principle Component Analysis and Components																																
1	2	3	4	5	6	7	8																									
(+)-Catechin	<b>Protocatechuic acid</b>	Gallic acid	4-Hydroxybenzoic acid	Chlorogenic acid	Eriodictyol	Pyrocatechol	Verbascoside																									
(-)-Epicatechin	2,5-Dihydroxybenzoic acid	Sinapic acid	p-Coumaric acid	Hesperidin		3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	Ferulic acid																									
Luteolin 7-glucoside	Caffeic acid	Rosmarinic acid	<b>Pinoresinol</b>			Taxifolin																										
Apigenin 7-glucoside	<b>Syringic acid</b>	Hyperoside	2-Hydroxycinnamic acid																													
Luteolin	3-Hydroxybenzoic acid	Quercetin																														
<b>Apigenin</b>	Vanillin	Kaempferol																														
Regression analysis and using methods																																
Stepwise	Backward	RMnE	Stepwise	RMnE	RMnE	RMnE	RMnE	RMnE																								
		Stepwise		Enter	Enter	Enter	Enter	Enter																								
		Backward		Stepwise	Stepwise	Stepwise	Stepwise	Stepwise																								
				Backward	Backward	Backward	Backward	Backward																								
RMnE; Regression model not established																																
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Predictor</th> <th>Coefficient</th> <th>Estimate</th> <th>Standard Error</th> <th>t-statistic</th> <th>p-value</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Constant</td> <td><math>\beta_0</math></td> <td>-5.1998</td> <td>1.5115</td> <td>-3.4402</td> <td>0.0138</td> </tr> <tr> <td>Pinoresinol</td> <td><math>\beta_1</math></td> <td>0.0113</td> <td>0.0033</td> <td>3.4056</td> <td>0.0144</td> </tr> <tr> <td>Apigenin</td> <td><math>\beta_2</math></td> <td>-0.0026</td> <td>0.0008</td> <td>-3.3303</td> <td>0.0158</td> </tr> </tbody> </table>						Predictor	Coefficient	Estimate	Standard Error	t-statistic	p-value	Constant	$\beta_0$	-5.1998	1.5115	-3.4402	0.0138	Pinoresinol	$\beta_1$	0.0113	0.0033	3.4056	0.0144	Apigenin	$\beta_2$	-0.0026	0.0008	-3.3303	0.0158			
Predictor	Coefficient	Estimate	Standard Error	t-statistic	p-value																											
Constant	$\beta_0$	-5.1998	1.5115	-3.4402	0.0138																											
Pinoresinol	$\beta_1$	0.0113	0.0033	3.4056	0.0144																											
Apigenin	$\beta_2$	-0.0026	0.0008	-3.3303	0.0158																											
Summary of Overall Fit																																
R-Squared:		$r^2 = 0.8646$																														
Adjusted R-Squared:		$r^2_{adj} = 0.8195$																														
Residual Standard Error:		2.7779 on 6 degrees of freedom.																														
Overall F-statistic:		19.1604 on 2 and 6 degrees of freedom.																														
Overall p-value:		0.0025																														
<b>Model:</b> Effect Coefficient = $-5.1998 + 0.0113 \cdot \text{Pinoresinol} - 0.0026 \cdot \text{Apigenin}$																																

Şekil 4.12 PCA analizi sonrasında her bir bileşen için model çalışması.

PCA analizi sonrasında her bileşen etki katsayısı ile regresyon modeli uygunluğu incelenmiş ve sadece 1., 2. ve 4. bileşenlerdeki (sarı renkli) apigenin, protocatechuic acid, syringic acid ve pinoresinol moleküllerinin kendi modelleri içinde anlamlı olarak öne çıktıkları bulunmuştur (Şekil 4.12). Bu adımlardan sonra sadece bu anlamlı olan 4 molekül birlikte ele alınmış ve etki katsayısı ile sadece apigenin ve pinoresinol molekülleri anlamlı bir ilişki içinde olduğu görülmüştür. Bu bilgi ışığında, %81.9 accuracy ile kurulan model sol tarafta yer almaktadır.

Ayrıca test edilen 37 fitokimyasal, toplam fenol, toplam flavonoid, indirgen şeker ve protein miktarları için doğrusal bir regresyon analizi gerçekleştirdik. Önceki çalışmamıza dayanarak, en yoğun fenoliklerin ve en yoğun flavonoidlerin AuNS'lerin şeklini ve morfolojisini belirlemede anahtar rol oynadığını gözlemledik (Tepe vd., 2023). Bu nedenle, en yoğun fenolik asitlerin toplamı en yoğun flavonoidlerin toplamına bölündü ve toplam fenolün toplam flavonoide oranı ile çarpıldı. En yoğun fenolik asitler ve flavonoidler her bir ekstrakt için spesifikti. Doğrusal regresyon analizinin özeti  $r^2$  0,8807,  $r^2_{adj}$  0.8637, standart hata 13,9596, anlamlılık F 0,00018 ve p değeri: 0,012 olarak sıralanabilir.



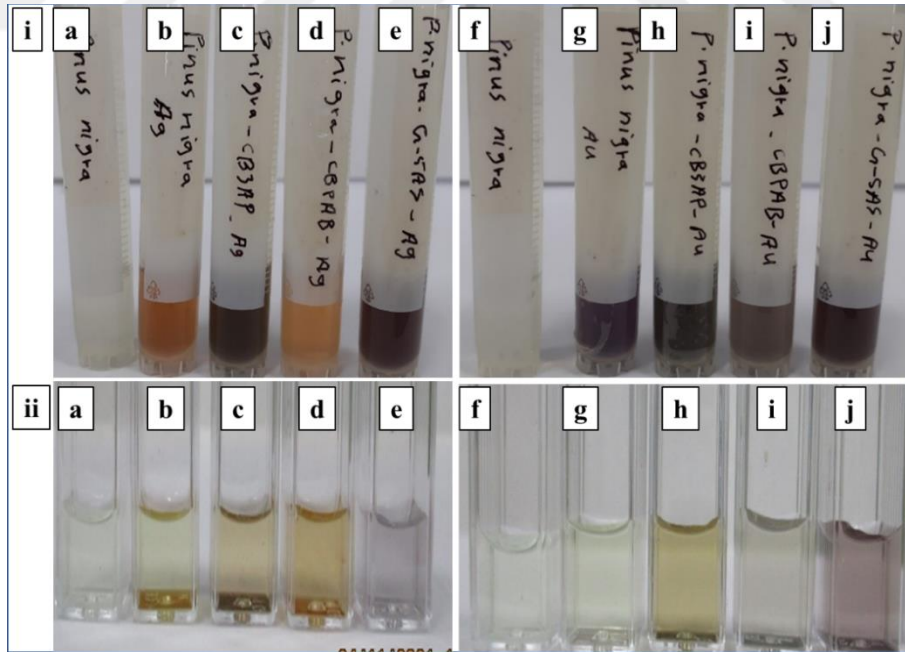
Şekil 4.13 *C. deodora*\_AuNSs ve *P. pinea*\_AuNSs'un SEM mikroskop görüntüleri.

İstatistiksel analiz performansını *P. pinea* ve *C. deodora* tane özütleri kullanılarak test edilmiştir. İki istatistiksel analize dayanarak, *C. deodora*\_AuNSs ve *P. pinea*\_AuNSs'nin sırasıyla büyük 1D AuNSs ve <100 nm küresel/yuvarlak AuNSs'ye sahip olması bekleniyordu. Şekil 4.13, istatistiksel analiz güvenilir sonuçlar verdiğini ortaya koymaktadır.

#### 4.5 Şeker Ligantlarının Varlığında Altın ve Gümüş Nanoparçacıkların Sentezi

Şekil 4.14-15-16-17-18-19-20'de gösterilen tüpler sırasıyla (i) sentez tüpü içerisinde ve (ii) 1: 10 oranında saf su içerisinde seyreltilen durumları göstermektedir. Harflerin karşılık geldiği tüpler ve seyreltik durumlar ise (a) ekstrakt, (b) ekstrakt\_AgNP, (c) ekstrakt\_CB3AP\_AgNP, d) ekstrakt-CBpAB\_AgNP, (e) ekstrakt\_GAS\_AgNP, (f) ekstrakt, (g) ekstrakt\_AuNP, (h) ekstrakt\_CB3AP\_AuNP, (i) ekstrakt\_CBpAB\_AuNP, (j) ekstrakt\_GAS\_AuNP. *Cedrus libani* için ise yeterli polen örneği elde edilemediğinden sadece gümüş nanoparçacık sentezlenmiştir.

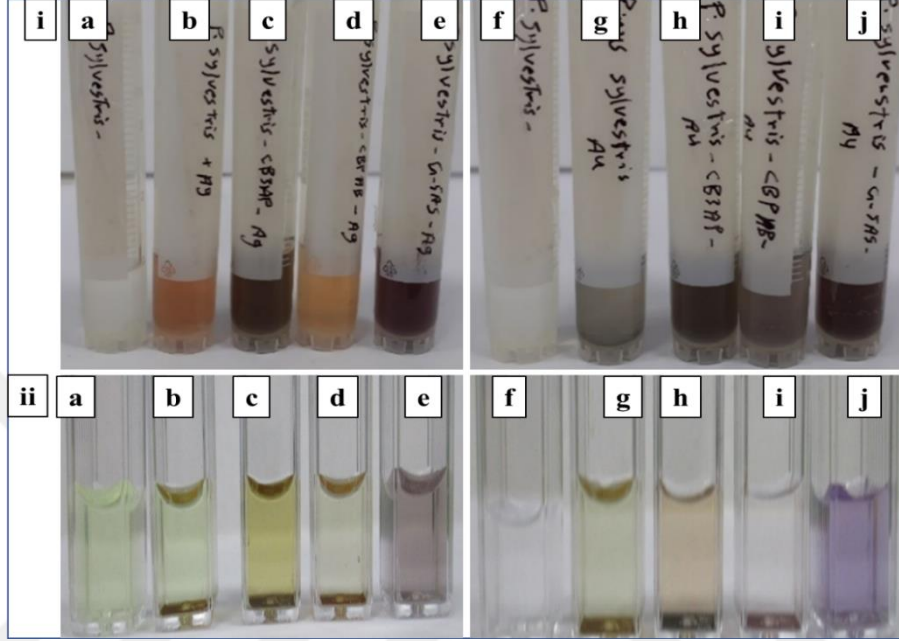
İnorganik nanoparçacıklar için gözlemlenen renk oluşumu yoğunluklu olarak nanoparçacığın şekil, boyut ve boyut dağılımı ile ilgilidir (Apyari vd., 2014; Burns vd., 2006; Merza vd., 2012). Karbohidrat ligandlarının kullandığı durumda ise yüzey kimyasının da önemli ölçüde renk oluşumuna etki ettiği bilinmektedir (Yazgan vd., 2021).



Şekil 4.14 *Pinus nigra* ekstraktı ve ekstrakt ile sentezlenen NPLarın dijital kamera görüntüleri.

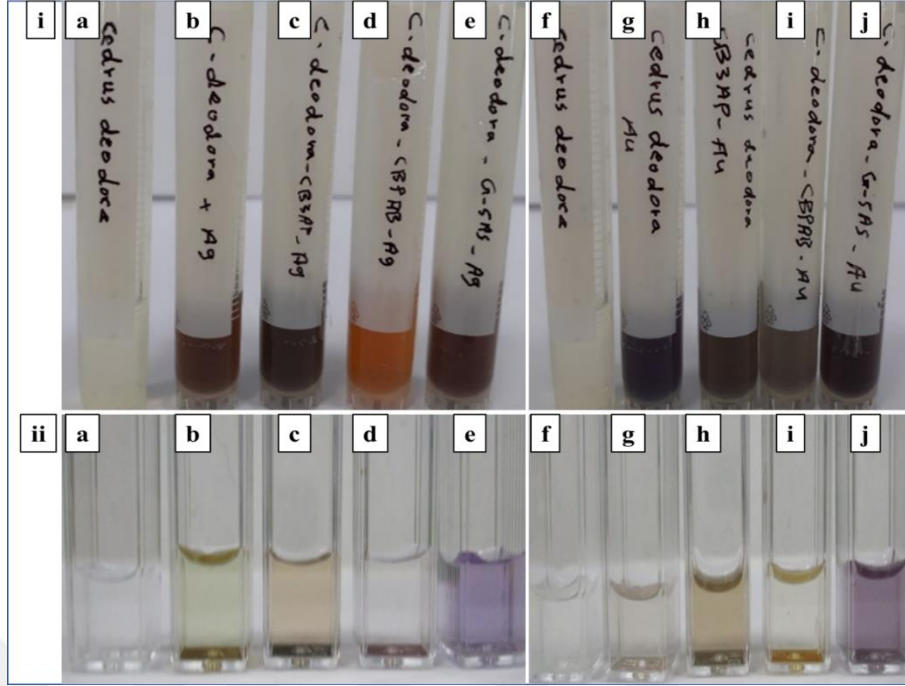
Şekil 4.14 de görüldüğü üzere gümüş nanoparçacıklar turuncu, sarımsak ve koyu mavi renk verirken altın nanoparçacıklar ise sarımsak, yeşilimsi ve pembe renkler

vermektedir. Gözlemlenen bu durum kullanılan şeker ligandından bağımsızdır. Reaksiyonun gerçekleştiği tüplerde gözlemlenen koyu renk ise nanoparçacığın tam renginin ne olduğunu söylememize olanak vermez çünkü ışığın geçemeyeceği kadar yoğunlukta bir nanoparçacık oluşumu söz konusudur.



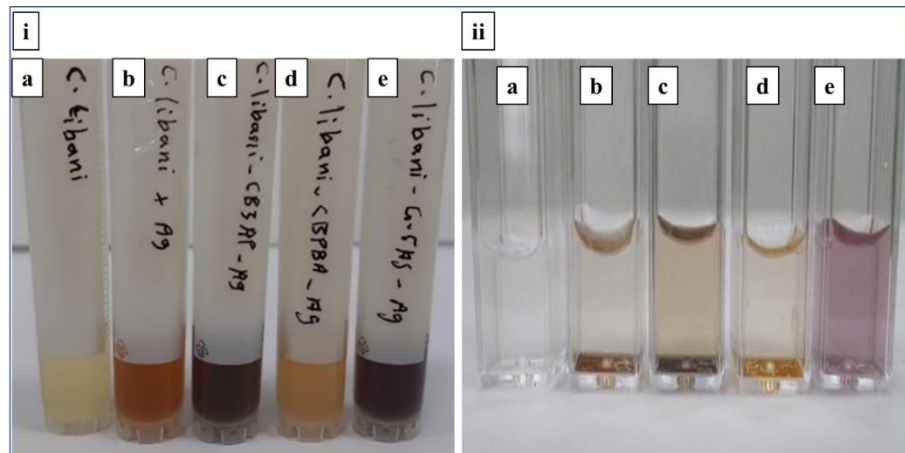
Şekil 4.15 Pinus sylvestris ekstrektü ve ekstrektü ile sentezlenen NPların dijital kamera görüntüleri.

*P. sylvestris* ekstrektü ile sentezlenen nanoparçacıklar ise (Şekil 4.15) aynı şeker ligandları varlığında daha yoğun renkler vermiştir.

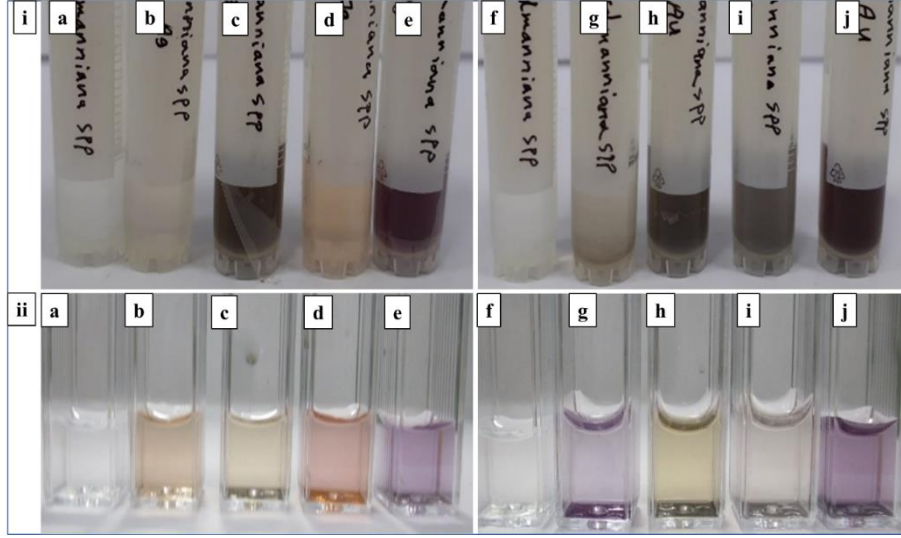


Şekil 4.16 *Cedrus deodora* ekstraktı ve ekstrakt ile sentezlenen NPların dijital kamera görüntüleri.

Şekil 4.16 ve 4.17'den görüldüğü üzere *C. deodora* ve *C. libani* ekstraktlarını varlığında aynı şeker ligandları için AgNPları farklı renkler vermiştir. *C. deodora* içinde yine aynı şekilde altın nanoparçacıklarının rengi *P. nigra* ve *P. sylvestris* ekstraktlarına nazaran belirgin farklar gözlemlenmiştir. Ekstraktların içeriklerine baktığımızda toplam fenol ve toplam flavonoid içeriklerindeki farklılıklarının ve nicel olarak belirlenmiş fitokimyasal miktarlarındaki değişiklerin burada belirgin bir etkiye sahip oldukları söylenebilir.

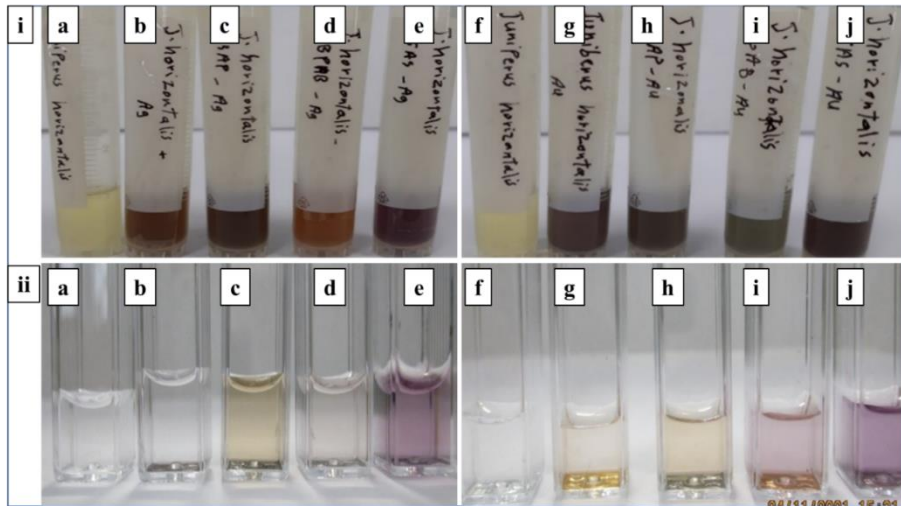


Şekil 4.17 *Cedrus libani* ekstraktı ve ekstrakt ile sentezlenen NPların dijital kamera görüntüleri.



Şekil 4.18 *Abies nordmanniana* ekstreği ve ekstreği ile sentezlenen NPLarın dijital kamera görüntüleri.

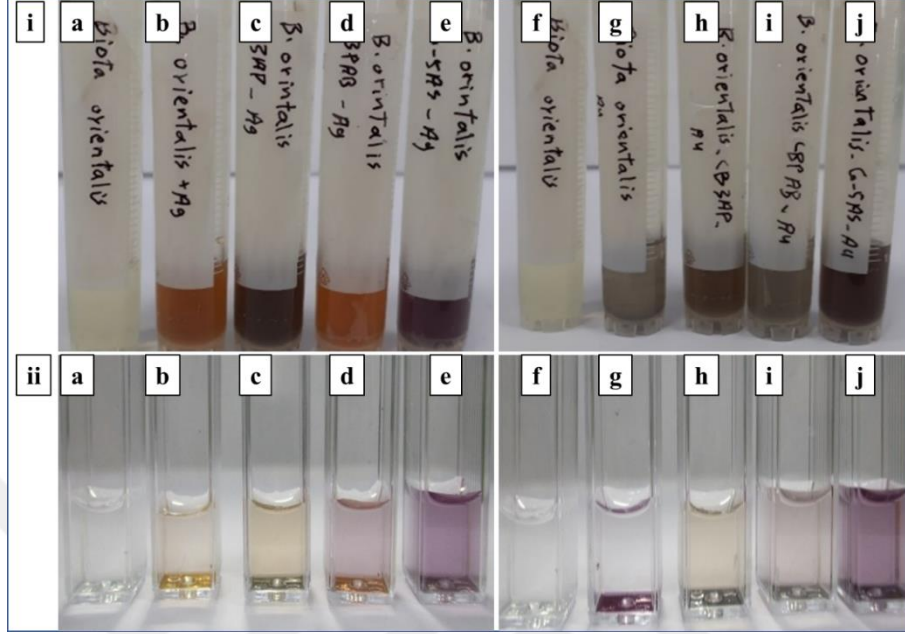
*A. nordmanniana* ekstreğleri ile sentezlenmiş olanlara baktığımızda ise ekstreğtin yalnız kullanıldığı durumda mavimsi bir renk gözlemlenerek diğer ekstreğlerin tek olarak kullanıldığı duruma göre belirgin bir fark görölmektedir. Bu durum nanoçiçek sentezinin (Yazgan vd., 2021) gerçekleştiği manasına gelmektedir. Aynı şekilde gümüş nanoparçacık oluşumununsa net bir şekilde ekstreğtin tekil olarak kullanılmasıyla oluştuğunu göstermektedir.



Şekil 4.19 *Juniperus horizontalis* ekstreği ve ekstreği ile sentezlenen NPLarın dijital kamara görüntüleri.

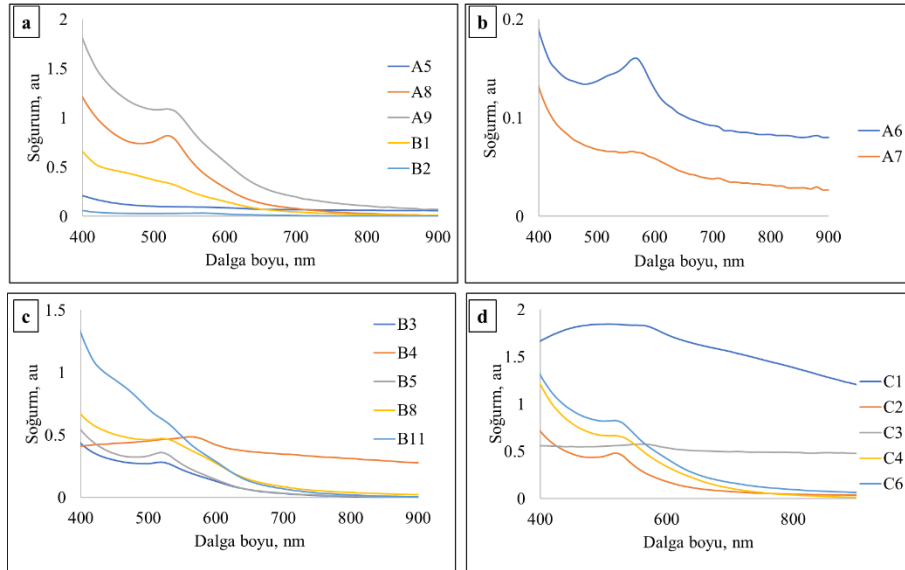
*J. horizontalis* ekstreğt kullanımında ise AgNPLarın ise çökeldiği gözlemlenmiştir ve bu durum ekstreğt kimyasının iyi bir kararlaştırıcı ajan olmadığını göstermektedir.

Buna karşın altın nanoparçacıkların ise sarımtırak ve pembemsi bir renk olarak nanoplaka ve nanoçiçek şeklinde olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.20 *Thuja orientalis* ekstrektü ve ekstrektü ile sentezlenen NPLarın dijital kamera görüntüleri.

*T. orientalis* de ise ekstrektün ise altın nanoparçacık sentezine olanak verdiği fakat kararlaştırıcı/tutuklayıcı özelliğinin pek olmadığı görülmektedir (Şekil 4.20).

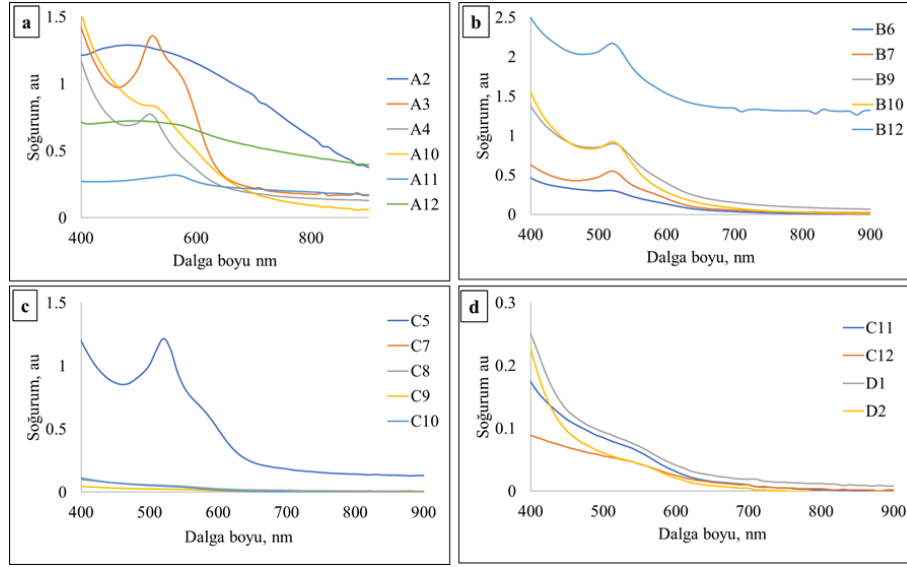


Şekil 4.21 AuNPLarının Uv-Vis karakterizasyonları.

UV-Vis karakterizasyonlar renklere nazaran daha doğru sonuç vermektedir. UV-Vis spektroskopisi ile elde edilen spektrumların şekilleri ve SPR tepe nokta ( $\lambda_{max}$ ) değerleri nanoparçacıklar için boyut ve morfoloji hakkında detaylı bilgi sunmaktadır. NPlara ait  $\lambda_{max}$  değerlerinin kıyaslanmasında ise şeker ligandının yalnız kullanıldığı duruma göre bir kıyaslama yapılacaktır. Şekil 4.22’de grafik olarak gösterilen verilerin kolay takip edilebilmesi maksadıyla Tablo 4.6 oluşturulmuştur.

Tablo 4.6 Altın Nanoparçacıkların SPR karakteristikleri

<b>Nanoparçacık Numarası ve kimyası</b>	<b>Tepe nokta (<math>\lambda_{max}</math>) (nm)</b>
A5: CBpAB_CD_AuNP	600
A8: CB3AP_JH_AuNP	530
A9: CB3AP_Cu_AuNP	530
B1: CBpAB-JH_AuNP	530
B2: CB3AP_JH_AuNP	620
A6: CBpAB_Cu_AuNP	570
A7: CBpAB_JH_AuNP	580
B3: CBpAB_Cu_AuNP	520
B4: CBpAB_PP_AuNP	570
B5: CB3AP_PP_AuNP	520
B8: CB3AP_CD_AuNP	530
B11:CB3AP_CD_AuNP	530
C1: CB3AP_JH_AuNP	570
C2: CBpAB_Cu_AuNP	530
C3: CB3AP_Cu_AuNP	540
C4: B3AP_PS_AuNP	530
C6: CB3AP_CL_AuNP	530

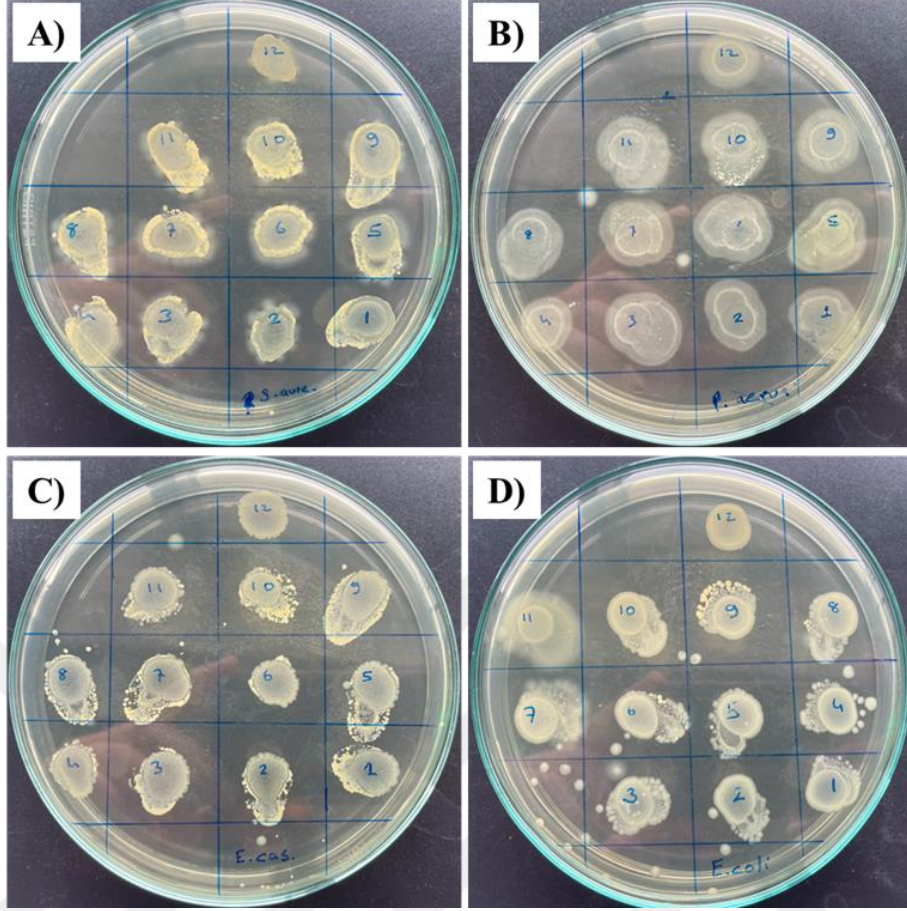


Şekil 4.22 AgNPlarının Uv-Vis karakterizasyonları.

Şekil 4.22 de verilen grafiğe ait sembollerin açıklamaları ise (a) A2: CBpAB\_JH\_AgNP; A3: CB3AP\_AgNP ( $\lambda_{\max}$  490 nm); A4: CB3AP\_Cu\_AgNP ( $\lambda_{\max}$  520 nm); A10: CBpAB-JH\_AgNP ( $\lambda_{\max}$  530 nm); A11: CBpAB\_AgNP ( $\lambda_{\max}$  570 nm) ve A12: CB3AP\_Cu\_AgNP ( $\lambda_{\max}$  560 nm); (b) B6: CBpAB\_PP\_AgNP ( $\lambda_{\max}$  530 nm); B7: CB3AP\_PP\_AgNP ( $\lambda_{\max}$  520 nm); B9: CB3AP\_CD1\_AgNP ( $\lambda_{\max}$  530 nm); B10: CB3AP-CD2\_AgNP ( $\lambda_{\max}$  530 nm) ve B12: CB3AP\_CL\_AgNP ( $\lambda_{\max}$  520 nm); (c) C5: CB3AP\_CL\_AgNP ( $\lambda_{\max}$  520 nm); C7: CB3AP\_PN\_AgNP; C8: CB3AP\_PS\_AgNP; C9: CB3AP\_PP\_AgNP ve C10: CB3AP\_CD\_AgNP; (d) C11: CB3AP\_CL\_AgNP ( $\lambda_{\max}$  550 nm); C12: CB3AP\_AN\_AgNP ( $\lambda_{\max}$  550 nm); D1: CB3AP\_JH\_Ag NP ( $\lambda_{\max}$  550 nm) ve D2: CB3AP\_TO\_AgNP ( $\lambda_{\max}$  540 nm).

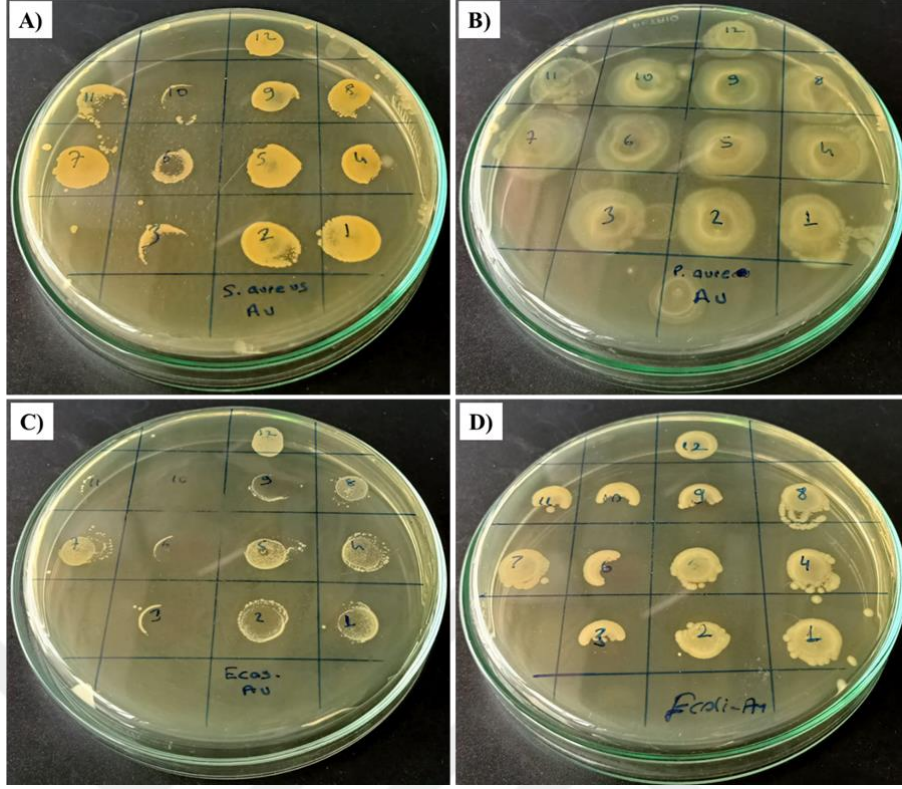
#### 4.6 Şeker Ligant Aracılığı ile Sentezlenmiş Altın ve Gümüş Nanoparçacıkların Antibakteriyel Aktiviteleri

Polen ekstraktlarının kendiliğinden bir antibakteriyel aktivite kapasitesine sahip olup olmadığı ilk olarak gram (+) ve gram (-) bakteriler kullanılarak test edildi. 1: *Thuja orientalis*; 2: *Corylus avellana*; 3: *Pinus pinea*; 4: *Juniperus oxycedrus*; 5: *Juniperus horizontalis*; 6: *Abies nordmanniana subsp. equi-trojani*; 7: *Cupressus sempervirens*; 8: *Cedrus libani*; 9: *Cedrus deodora*; 10: *Pinus nigra* ve 11: *Pinus sylvestris* örneklerine ait altın ve gümüş nanoparçacıklar için numaralandırmalar olarak belirlenmiştir.



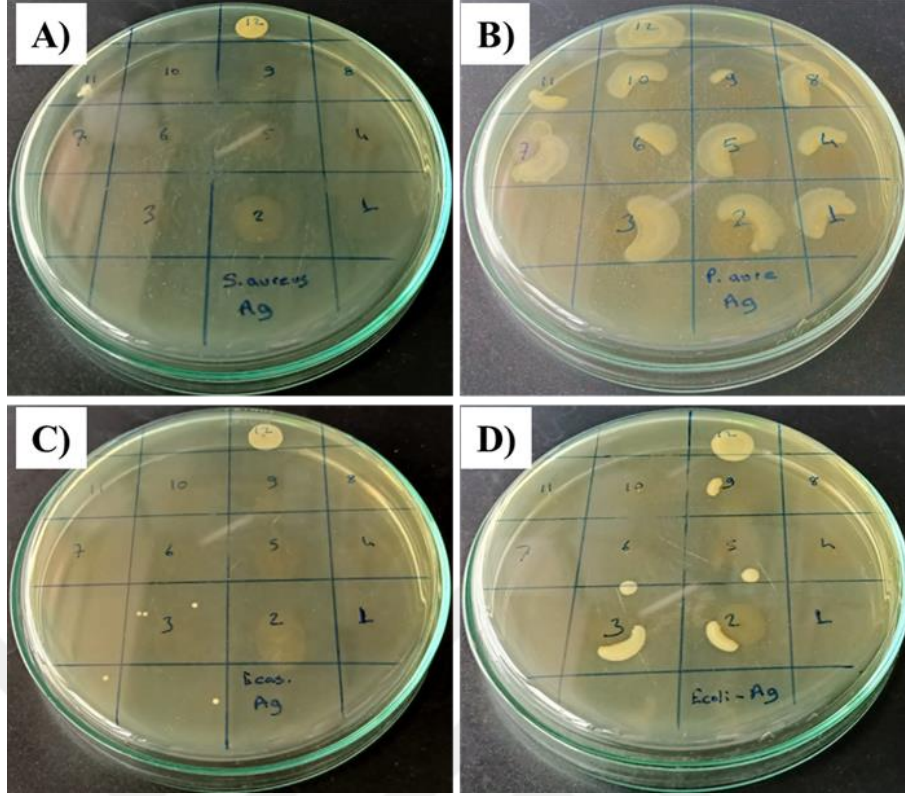
Şekil 4.23 Polen ekstraktlarının *S. aureus* (A), *P. aeruginosa* (B), *E. casseflavus* (C) ve *E. coli* (D).

Şekil 4.23’de görüldüğü gibi polen ekstraktlarının herhangi bir şekilde bakteriler üzerine bir toksisite göstermediği görülmektedir.



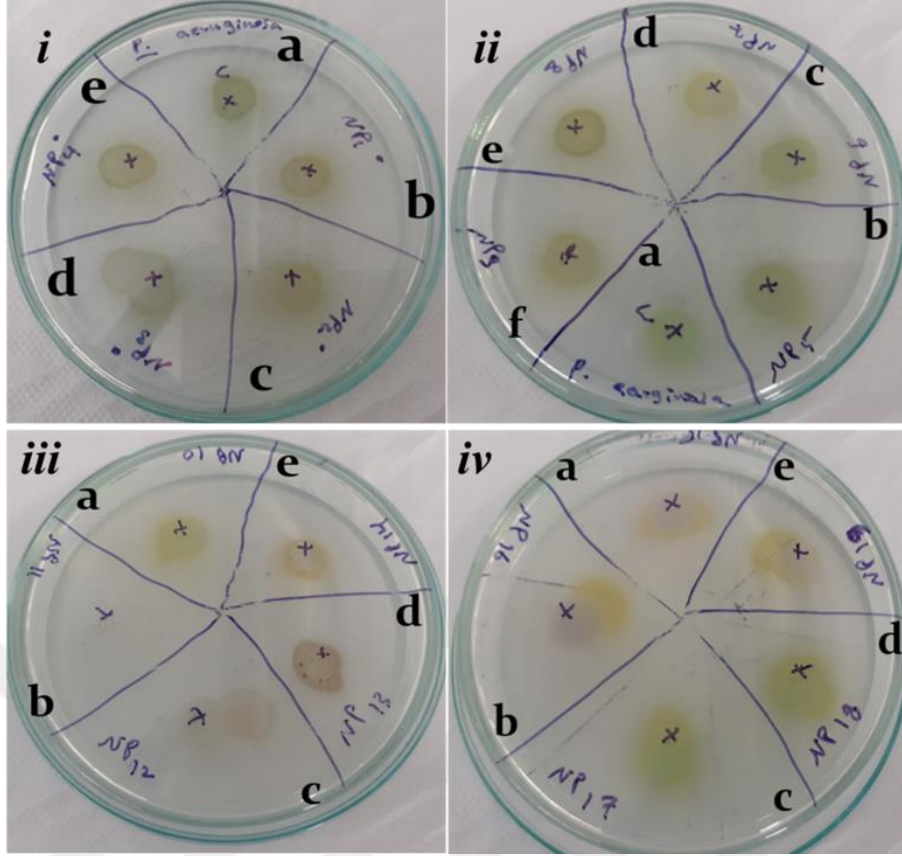
Şekil 4.24 Polen ekstrakt altın nanoparçacıkların *S. aureus* (A), *P. aeruginosa* (B), *E. casseflavus* (C) ve *E. coli* (D).

Polen ekstraktlarının altın nanoparçacık sentezi ile ekstrakt içeriğindeki fitokimyasalların nanoparçacıklar üzerine birikmesi multivalent karakterin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Şekil 4.24’de görüldüğü gibi *P. pinea*, *A. nordmanniana* ve *P. nigra* altın nanoparçacıkları *S. aureus* ve *E. casseflavus* üzerine çok yüksek antibakteriyel aktivite göstermişler. Bu iki bakteri de gram (+) bakterilerdir. Buna karşın ekstrakt-altın nanoparçacıklar gram (-) bakteri olan *P. aeruginosa* üzerine hiçbir etki göstermezken yine gram (-) bakteri olan *E. coli* üzerine ise minimal bir etki göstermişlerdir.



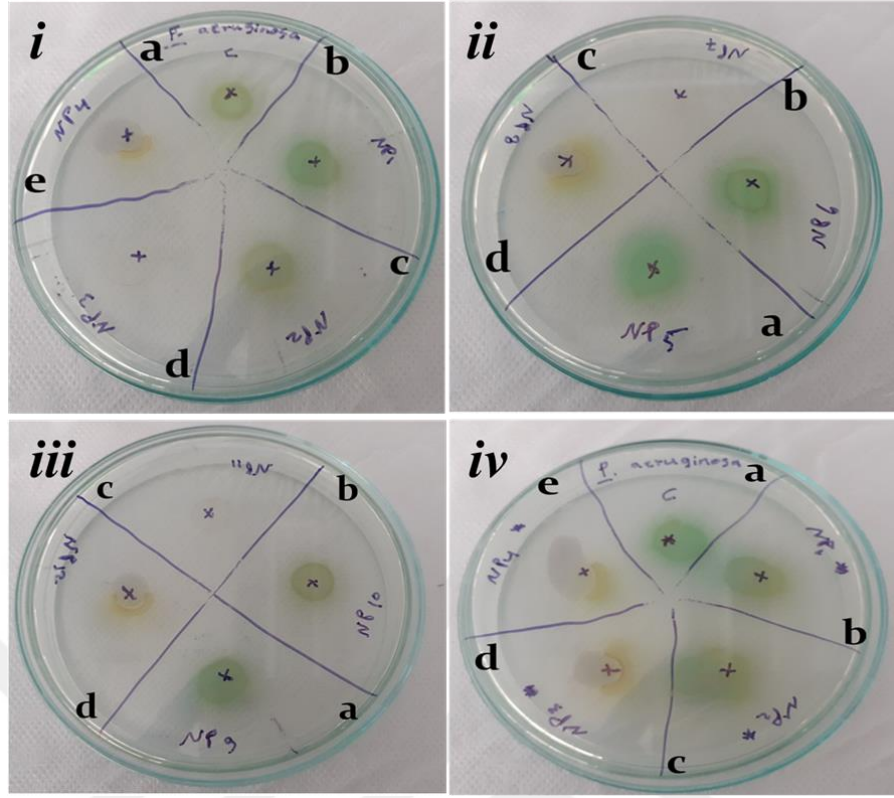
Şekil 4.25 Polen ekstrakt gümüş nanoparçacıkların *S. aureus* (A), *P. aeruginosa* (B), *E. casseflavus* (C) ve *E. coli* (D).

Şekil 4.25'ten polen ekstraktı-gümüş nanoparçacıkların serbest polen ekstraktlarına ve ekstrakt-altın nanoparçacıklara nazaran oldukça yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip oldukları görülmektedir. Tüm ekstrakt-gümüş nanoparçacıkları *S. aureus* (*C. avellana* hariç), *E. casseflavus* (*C. avellana* hariç) ve *E. coli* bakterileri üzerine %100 oranında sidal etki gösterirken *P. aeruginosa* için *C. deodora*-gümüş nanoparçacık hariç ekstrakt-gümüş nanoparçacıklar sadece kısmi bir toksisite göstermişlerdir.



Şekil 4.26 AgNP ve AuNPlarının *P. aeruginosa* üzerine antibakteriyel etkisi.

Şekil 4.26 deki grafiklere ilişkin açıklamalar: (i) a) kontrol, b) 100 µl CB-pAB-100µl Ju\_25µl Au c) 100µl CB3AP-100µl Ju\_25µl AuNP; d) 100µl CB-pAB-100µl Cu\_25µl AuNP, e) 100µl CB3AP-100µL Cu\_25 AuNP; (ii) a) Control, b) 100µl CB-pAB\_25µL AuNP, c) 100µl CB-pAB- 200µL Cu\_25 µl AuNP d) 100µl CB-pAB- 200µL Ju\_25 µl AuNP, e) 100µL CB3AP\_25µL AuNP f) 100µl CB3AP- 200µL Cu\_25µl AuNP; (iii) a) 100µl CB3AP- 200µL Ju\_25µl AuNP, b) 100µL CB-pAB\_20µL AgNP, c) 100µl CB-pAB-200µL Cu\_20µl AgNP, d) 100µl CB-pAB-200µL Ju\_20µl AgNP, e) 100µl CB3AP\_20µL AgNP; (iv) a) 100 µl CB3AP- 200µL Cu\_20 µl Ag NP, b) 100 µl CB3AP-200 µL Ju\_20 µl AgNP, c) 100 µl CB-pAB-400 µL Cu\_25 µl AuNP, d) 100 µl CB3AP-400 µL Cu\_25 µl AuNP, e) 200 µl CB3AP-100 µL Ju\_25 µl AuNP.



Şekil 4.27 Bazı AgNP ve AuNPlarının *P. aeruginosa* üzerine antibakteriyel etkisi.

Şekil 4.27'deki grafiklere ilişkin açıklamalar: (i) a) control, b) 100µl CB-pAB- 200µL Pi\_25µl AuNP, c) 100µl CB3AP-200µL Pi\_25µl AuNP, d) 100µl CB-pAB- 200µL Pi\_20µl AgNP, e) 100µl CB3AP- 200µL Pi\_20µl AgNP; (ii) a) 100µl CB-pAB- 200µL Ce\_25µl AuNP, b) 100µl CB3AP- 200µL Ce\_25µl AuNP, c) 100µl CB-pAB- 200µL Ce\_20µl AgNP, d) 100µl CB3AP- 200µL Ce\_20 µl AgNP; (iii) a) 100µl CB-pAB – 200µL Ce\_25µl AuNP, b) 100µl CB3AP – 200µL Ce\_25µl AuNP, c) 100µl CB-pAB- 200µL Ce\_20µl Ag NP, d) 100µl CB3AP- 200µL Ce\_20µl AgNP; (iv) a) Control, b) 100µl CB3AP- 400µL Ce\_25µl AuNP, c) 100µl CB3AP-600µL Ce\_25µl AuNP, c) 100µl CB3AP- 400µL Ce\_20µl AgNP ve e) 100µl CB3AP- 600µL Ce\_20µl AgNP.

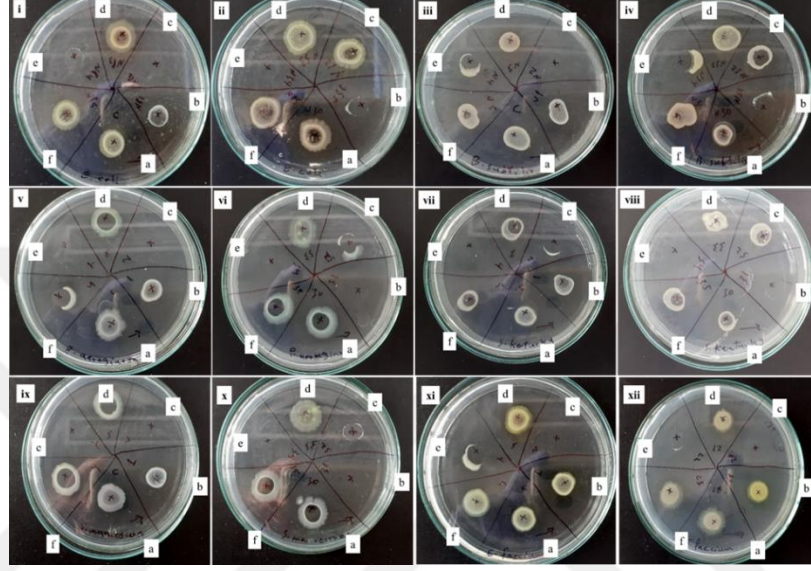
NPların *P. aeruginosa* üzerine olan toksisitesi hem büyümenin baskılanması hem de mavi-yeşil renk oluşturan pyoverdine-pyochelin üretimin baskılanması ile takip edilmektedir (Saladino vd., 2021). Mevcut bulgular AuNPların herhangi bir toksik etki oluşturmadığı, buna karşın AgNPların ise hem büyümeyi baskılaması hem de mavi-yeşil renk oluşturan moleküllerin sentezini baskılaması olarak anti *P. aeruginosa* aktivitesi olarak belirlenmiştir. Devam etmekte olan çalışmalar ile AgNPları için hem

*P. aeruginosa* hem de diğ er bakteri türleri için minimum inhibisyon derişimleri (MIC), minimum bakteri öldürücü derişimleri (MBC) ve biyofilm testleri gerçekleştirilmektedir.

Tablo 4.7 Çalışmada kullanılan antibakteriyel ajanlar

NP numarası	Antibakteriyel Ajan	NP numarası	Antibakteriyel Ajan
1	<i>Pinus nigra</i>	36	<i>A. nordmanniana</i> -CBp-AB_Ag
2	<i>P. nigra</i> _AgNP	37	<i>A. nordmanniana</i> -G-5AS_Ag
3	<i>P. nigra</i> -CB3AP_AgNP	38	<i>A. nordmanniana</i> _AuNP
4	<i>P. nigra</i> -CBp-AB_AgNP	39	<i>A. nordmanniana</i> -CB3AP_Au
5	<i>P. nigra</i> -G-5AS_AgNP	40	<i>A. nordmanniana</i> -CBp-AB_Au
6	<i>P. nigra</i> _AuNP	41	<i>A. nordmanniana</i> -G-5AS?_Au
7	<i>P. nigra</i> -CB3AP_Au	42	<i>Juniperus horizontalis</i>
8	<i>P. nigra</i> -CBp-AB_Au	43	<i>J. horizontalis</i> _Ag
9	<i>P. nigra</i> -G-5AS_Au	44	<i>J. horizontalis</i> -CB3AP_Ag
10	<i>Pinus sylvestris</i>	45	<i>J. horizontalis</i> -CBp-AB_Ag
11	<i>P. sylvestris</i> _Ag	46	<i>J. horizontalis</i> -G-5AS_Ag
12	<i>P. sylvestris</i> -CB3AP_Ag	47	<i>J. horizontalis</i> _Au
13	<i>P. sylvestris</i> -CBp-AB_Ag	48	<i>J. horizontalis</i> -CB3AP_Au
14	<i>P. sylvestris</i> -G-5AS_Ag	49	<i>J. horizontalis</i> -CBp-AB_Au
15	<i>P. sylvestris</i> _Au	50	<i>J. horizontalis</i> -G-5AS_Au
16	<i>P. sylvestris</i> -CB3AP_Au	51	<i>Biota orientalis</i>
17	<i>P. sylvestris</i> -CBp-AB_Au	52	<i>B. orientalis</i> _Ag
18	<i>P. sylvestris</i> -G-5AS_Au	53	<i>B. orientalis</i> -CB3AP_Ag
19	<i>Cedrus deodora</i>	54	<i>B. orientalis</i> -CBp-AB_Ag
20	<i>C. deodora</i> _Ag	55	<i>B. orientalis</i> -G-5AS_Ag
21	<i>C. deodora</i> -CB3AP_Ag	56	<i>B. orientalis</i> _Au
22	<i>C. deodora</i> -CBp-AB_Ag	57	<i>B. orientalis</i> -CB3AP_Au
23	<i>C. deodora</i> -G-5AS_Ag	58	<i>B. orientalis</i> -CBp-AB_Au
24	<i>C. deodora</i> _Au	59	<i>B. orientalis</i> -G-5AS_Au
25	<i>C. deodora</i> -CB3AP_Au	60	CB3AP_Ag
26	<i>C. deodora</i> -CBp-AB_Au	61	CB3AP_Au
27	<i>C. deodora</i> -G-5AS_Au	62	CBp-AB_Ag
28	<i>Cedrus libani</i>	63	CBp-AB_Au
29	<i>C. libani</i> _Ag	64	G-5AS_Ag
30	<i>C. libani</i> -CB3AP_Ag	65	G-5AS_Au
31	<i>C. libani</i> -CBp-AB_Ag		
32	<i>C. libani</i> -G-5AS_Ag		
33	<i>Abies nordmanniana nordmanniana</i> spp.		
34	<i>A. nordmanniana</i> _Ag		
35	<i>A. nordmanniana</i> -CB3AP_Ag		

Sentezi gerçekleştirilen 65 nanoparçacığın antibakteriyel kapasiteleri 8 bakteri kullanılarak gerçekleştirildi (Tablo 4.7). Çalışmada kullanılan bakteriler *E. coli*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus aeruginus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*, *Salmonella kentucky* ve *Salmonella enteridis* türleridir.



Şekil 4.28 Geliştirilen Antibakteriyel ajanların (i, ii) *E. coli*, (iii, iv) *B. subtilis*, (v,vi) *P. aeruginosa*, (vii, viii) *S. kentucky*, (ix, x) *S. marcescens* ve (xi,xii) *E. faecium* üzerine etkileri.

Şekil 4.28'deki grafiklere ilişkin açıklamalar: İ, iii, v, vii, ix, xi için a= kontrol *E. coli* b. *Pinus nigra* c= *P.nigra*\_Ag d= *P.nigra*-CB3AP\_Ag, e= *P.nigra*-CBp-AB\_Ag ve f= *P.nigra*-G-5AS\_Ag ; ii, iv, vi, viii, x ve xii için a=*C.libani*-CB3AP\_Ag, b= *C.libani*-CBp-AB\_Ag, c=*C.libani*-G-5AS\_Ag d= *Abies nordmanniana nordmanniana* spp, e=*A.nordmanniana*\_Ag ve f= *A.nordmanniana*-CB3AP\_AgNP.

Şekil 4.28'de gösterilen sonuçlara bakıldığında polen ekstraktının kendisi kadar kullanılan şeker ligandının da sentezlenen nanoparçacıkların antibakteriyel aktivitesi üzerine etkin olduğu gösterilmiştir. Özellikle p-aminobenzoik asit içeren şeker ligandları içeren gümüş nanoparçacıkları çok yüksek antibakteriyel aktivite göstermişlerdir. Literatürde de ifade edildiği gibi (Zhang vd., 2013) ve bizim de sonuçlarımızın gösterdiğine göre altın nanoparçacıkların antibakteriyel aktiviteleri oldukça düşüktür. *P.nigra*\_AgNP, *P.nigra*-CBp-AB\_AgNP, *C.libani*-CBp-AB\_AgNP ve *A. nordmanniana*-CBp-AB\_AgNP en yüksek aktiviteyi gösteren AgNP'lerdir.

## 5. TARTIŞMA

### 5.1 Polen Kimyasının Altın Nanoparçacık Oluşumu Üzerine Etkisi

Bitkiler, yeşil inorganik nano yapıların (INS) sentezinde en yaygın olarak kullanılan malzemeler arasındadır ve çoğunlukla bitkilerin parçaları olarak meyveler, kökler ve yapraklar kullanılır. Bitki özleri, INS sentezi sırasında indirgeyici, kaplayıcı ve stabilize edici maddeler olarak hizmet edebilecek çok çeşitli organik bileşikler sağlar (Mwakalesi, 2023; Patil vd., 2018; Zayed ve Eisa, 2014). Sentezlenen INS'ler tarafından taşınan karmaşık organik yük, yeni biyolojik işlevler ortaya çıkarmaktadır. Bununla birlikte, polen taneleri çok zengin ve çeşitli organik bileşikler içermesine rağmen, bunların INS sentezinde kullanımı sınırlıdır.

Erkek üreme hücreleri olan polen taneleri (Hassan, 2011), benzersiz morfolojik yapıya sahip karmaşık organik bileşikler taşıyan işlevsel nano yapılar geliştirmek için malzeme bilimi de dahil olmak üzere çeşitli alanlarda özel ilgi görmektedir (Ávila-Avilés vd., 2020). Polen tanelerinin kimyasal bileşimi, toplam karbonhidrat içeriği (indirgen ve indirgen olmayan şekerler, şeker polimerleri vb.), protein ve lipidler, fenolik/flavonoid bileşikler (Hassan, 2011; Rezanejad, 2012), nükleik asitler ve balmumu (Rittenour vd., 2012) açısından bitki türleri arasında farklılık göstermektedir. Ekstraksiyon yöntemleri hedeflenen bileşiklerin izolasyonunda kilit rol oynamaktadır (Farah vd., 2021) ve sulu ekstraksiyonun, hidrofilik olması için daha fazla yüzey modifikasyonu gerektirmeyen inorganik nanomalzemelerin sentezinde kullanılabilir suda çözünür bileşiklerin toplanmasına izin verdiği bilinmektedir (Bakar vd., 2020). Bu, daha çevreci ve hatta yeşil inorganik nanomalzemelerin sentezi için önemlidir. Bununla birlikte, bitki parçalarının kullanımıyla tekrarlanabilir inorganik nanomalzemelerin geliştirilmesinde, ekstraktın kimyasal bileşimi hakkında bilgi eksikliğinden kaynaklanan büyük bir sorun vardır.

Bitki özütleri, karmaşık organik havuzları nedeniyle yeşil inorganik nanoyapıların (INS'ler) üretiminde büyük kaynaklar olarak önerilmiştir. Ancak, numunenin karmaşık organik yükü nedeniyle morfolojisini ve boyutunu tahmin etmek kolay değildir. Bu nedenle, bu çalışmada altın nanoyapıları (AuNSs) sentezlemek için sekiz farklı cinsten

dokuz farklı sulu polen tanesi özütü kullanarak karşılaştırmalı bir çalışma gerçekleştirdik. Ekstraktlar toplam protein, indirgen şeker, flavonoid ve fenol içerikleri ile 37 sitokimyasal (örn: flavonoidler ve fenolik asitler) açısından analiz edilerek bileşimin AuNS'lerin morfolojisi ve boyutu üzerinde nasıl bir rol oynadığı araştırıldı. Elde edilen AuNS'ler nano-küreler (~2-10 nm), nano-plakalar (örneğin 2 µm'ye kadar üçgenler) ve nanokümelere (< 2nm) dahil olmak üzere çeşitli morfoloji ve boyutlar vermiştir. Nanopartiküllerin morfolojisi ve boyutunun nasıl olacağını hızlı bir şekilde anlamayı sağlayan herhangi bir işaret molekülü olup olmadığını bulmak için bir temel bileşen analizi (PCA) gerçekleştirdik ve analiz edilen 37 bileşik arasından Apigenin ve Pinoresinol, PCA ve regresyon analizine dayalı işaret molekülleri olarak elde edildi. Bunun aksine, toplam fenolik asit ve flavonoid içerikleri ile indirgen şeker ve protein içerikleri, AuNS'lerin şekli ve morfolojisi ile istatistiksel olarak herhangi bir ilişki göstermemiştir. Ayrıca, toplam fenolik asit/flavonoid oranı ile birlikte doğrusal regresyon analizi kullanılarak şekil ve boyutu belirleyen olası baskın faktör olarak test edilen en konsantre fenolik asitlere ve flavonoidlere de dikkat ettik. İşaretleyici moleküllerin ve oluşturulan doğrusal regresyon modelinin uygunluğu iki farklı polen tanesi özütü kullanılarak test edilmiş ve umut verici bir sonuç elde edilmiştir. Bu nedenle, bitki özütleri kullanıldığında AuNS'lerin morfolojisini ve boyutunu tahmin etmek için özütlerin kimyasal bileşiminin bilinmesi gerektiğine inanıyoruz.

Tablo 4.2, 4.3 ve 4.4, 37 fitokimyasalın miktarını ve toplam fenolik, flavonoid, protein ve indirgen şeker içeriklerini göstermektedir. Fenolik bileşikler INS'lerin bitki ekstraktları aracılı sentezi sırasında önemli rol oynasa da (Liu vd., 2020), protein ve karbonhidratlar INS'lerin morfolojisinin ve boyutunun stabilizasyonunda rol oynar. Proteinler ayrıca INS morfolojisi gelişimi için şablon görevi görebilir (Mosleh vd., 2019; Shervani ve Yamamoto, 2011). Bu nedenle, ekstraktların toplam protein ve toplam indirgen karbonhidrat içerikleri kantitatif olarak belirlenmiştir. Ekstraktların ortalama şeker içeriği 1,87 µmol/mL olup *P. pinea* ve *A. nordmanniana* ekstraktları ~2 ve 1,72 kat daha yüksek şeker içeriği verirken en düşük indirgen şeker içerikleri ortalama içeriğe kıyasla yaklaşık %65, %55, %43 ve %42 daha az olan *P. sylvestris*, *C. deodora*, *C. libani* ve *C. avellana* için elde edilmiştir. Geri kalan ekstraktlar ortalama içerikle hemen hemen aynıydı. Bunun aksine, toplam protein, ortalama

içeriğın 65,55 µg/mL olduğu ekstraktlar için farklı bir eğilim göstermiştir. En yüksek konsantrasyonlar *C. avellana* (251,26 µg/mL) ve *A. nordmanniana* (171,56 µg/mL) için elde edilmiştir. Toplam indirgen şeker içeriğine benzer şekilde, *P.sylvestris* en düşük protein konsantrasyonunu (8,13 µg/mL) vermiştir.

Toplam flavonoid içeriği 13,4 ile 93,2 µg/mL arasında değişmekte olup ortalama 28,54 µg/mL'dir. En yüksek flavonoid içeriği *C. deodora* (93,2 µg/mL) ve *J. oxycedrus* (70.03 µg/mL) ekstraktlarında elde edilirken, en düşük içerik *P. pinea* (1,4 µg/mL), *C. semperivens* (13,4 µg/mL) ve *A. nordmanniana* (13,4 µg/mL) ekstraktlarında elde edilmiştir. Ortalama toplam fenol içeriği 149,33 µg/mL ve aralık 35.9-570 µg/mL idi. Toplam fenolik içeriği en yüksek *C. avellana* (570 µg/mL) ve en düşük *C. deodora* (35,9 µg/mL) için elde edilmiştir. Ayrıca, *P. sylvestris* (258 µg/mL) ve *J. oxycedrus* (190,6 µg/mL) ortalama değere kıyasla daha yüksek fenolik içerik vermiştir.

Bunların aksine, *J. horizontalis* ekstraktlarında (-)-Epicatechin, (+)-Catechin, Luteolin, Apigenin, Luteolin 7-glucoside, Hesperidin ve Apigenin 7-glucoside dahil olmak üzere aşağıdaki flavonoidler çok yüksek konsantrasyonlarda elde edilirken, sadece p-coumaric asit ve ferulic asit nispeten yüksek konsantrasyonlarda elde edilmiştir. Benzer şekilde, *C. semperivens* ekstraktları flavonoid olarak (-)-Epicatechin, (+)-Catechin, Luteolin, Apigenin, Luteolin 7-glucoside, Hesperidin ve Apigenin 7-glucoside ve fenolik asit olarak p-coumaric acid ve ferulic acid'i daha yüksek konsantrasyonlarda vermiştir. *T. orientalis* polen tanesi ekstraktlarında, (-)-Epicatechin, Luteolin, Apigenin, Luteolin 7-glucoside, Hesperidin ve Hyperoside flavonoidler ve p-coumaric asit ve ferulic asit fenolik asitler olarak en yoğun olanlardı. Bu nedenle, her bir flavonoid ve fenolik asidin göreceli konsantrasyonlarının, en konsantre olanlar için, tam miktarları farklı olsa da *J. horizontalis*, *C. semperivens* ve *T. orientalis* polen tanesi ekstraktları arasında benzerlik gösterdiği söylenebilir. *P. sylvestris* ve *A. nordmanniana* polen tanesi ekstraktları için, fenolik asitler olarak 4-hidroksibenzoik asit, ferulic asit ve p-kumarik asit ve flavonoid olarak pinoresinol en konsantre olanlardı. Çalışılan ekstraktlar arasında, *J. oxycedrus*, klorojenik asit ve p-kumarik asit ve luteolinin en yoğun olduğu çok düşük fenolik asit ve flavonoid seviyeleri ile en benzersiz fitokimyasal profili vermiştir. Bununla birlikte, toplam

flavonoid ve toplam fenolik içerikleri, çalışılan ekstraktlar arasında *J. oxycedrus* için en yüksek ve üçüncü en yüksek olarak elde edilmiştir.

Polen taneleri, yakınında trafik veya kömür yanığı kirleticilerinin bulunmadığı temiz ortamlarda toplanmıştır. Bu, herhangi bir kirleticinin nano yapı oluşum dinamiklerine karışmasını önlemek için önemlidir. Polen ekstraktlarının dijital kamera görüntüleri Şekil 4.2'de verilmiştir ve polen tanelerinin temiz doğasını göstermektedir. Şekil 4.2'de ayrıca, sadece *C. avellana* ve *J. oxycedrus*'un keskin sarı renk verdiği, *P. pinea*, *C. deodora*, *P. sylvestris* ve *A. nordmanniana*'nın ise net bir görünüm verdiği polen tanesi özütleri gösterilmektedir. *T. orinetalis*, *C. sempervirens*, *J. horizontalis* ve *P. nigra* özütleri sarı rengin tonlarını vermiştir. Polen taneleri ve ilgili ekstraktlar arasındaki renk farklılıkları, ekstraksiyon işlemi sırasında polen tanelerinden salınan kimyasal içeriklerle ilgilidir. Örneğin, *C. avellana*'nın güçlü sarı renginin karetonoid içeriğinden kaynaklandığı bilinmektedir (Bakar vd., 2020) ve bu durum *J. oxycedrus* için de geçerli olabilir. 2.916-2.912  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki bant metilen grubunun  $-\text{CH}_2$ 'sinin asimetrik gerilmesine aitken, 2.861  $\text{cm}^{-1}$  ve 2.854  $\text{cm}^{-1}$ 'deki simetrik  $\text{CH}_3$  titreşim bantları (Lutzke vd., 2020) sadece *P. pinea*, *P. nigra* ve *C. deodora* için gözlenmiştir. 2.693- 2.673  $\text{cm}^{-1}$  arasında değişen bant, *C. libani* ve *P. sylvestris* hariç tüm ekstraktlarda açıkça bulunan farklı karboksilik grupların kombinasyonu ile ilgili olabilir (Lutzke vd., 2020). Proteinlerin varlığı, tüm polen tanesi ekstraktları için 1.566-1.598  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki amid karbonil grubu bandı ile ortaya konmuştur (Bakar vd., 2020). 1.411-1.392  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki zayıf bantlar muhtemelen sporopollenine aittir (Lutzke vd., 2020), ancak orta ila güçlü olanlar karboksilat grubuna aittir. Benzer şekilde, 1.515-1.511  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki omuza benzeyen bantlar da sporopollenin ile ilişkili olabilir (Zimmermann ve Kohler, 2014). 1.256-1.231  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki bant lipidler (Buta vd., 2015) ve lignin ile ilişkili olabilir.

1.040-1.015  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki bant polisakkaritlere aittir (Lutzke vd., 2020) ve tüm örnekler sakkaritlerin varlığı için büyük kayma verir. Benzer şekilde, karbonhidrat titreşim bantları 870-862  $\text{cm}^{-1}$  arasında gözlenmiştir (Bakar vd., 2020), ancak bu aralığın aromatik grup bantlarını da kapsadığı belirtilmelidir. Ayrıca, 1.003-995  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki kaymalar da basit sakkaritlere aittir ve bu kaymalar sadece *C. libani*, *C. deodora*, *P. nigra* ve *A. nordmanniana* polen tanesi ekstraktlarında bulunmuştur. 1.068

$\text{cm}^{-1}$  'deki kayma sadece *C. libani* ve *C. deodora*'da bulunmuştur ve polisakkaritlere ve aromatik C-O ve C-C gerilmesine atanmıştır (Buta vd., 2015; Lutzke vd., 2020).

930-500  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki pikler flavonoidler, fenolik asitler ve şekerler gibi farklı bileşiklerle ilişkilidir (Bakar vd., 2020; Lutzke vd., 2020). 780 ila 520  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki bantlar flavonoidlere aittir (Unsalan ve Gulluoglu, 2009; Zdunek vd., 2022), ancak karakteristik flavonoidleri ayırt etmek mümkün değildir.  $778 \pm 3 \text{ cm}^{-1}$  'deki bant nükleik asitlerin fosfat uzantılarına aittir. IR atamalarının diğer ayrıntıları Tablo 4.1'de verilmiştir.

Şekil 4.9, *C. libani*'nin 1D ve 0D AuNS'lerin karışımını verdiğini ortaya koymaktadır. AuNS'lerin yarısının  $58 \pm 18$  yuvarlak (Örn: altıgen, asferik vb.) 0D olduğu, kalan yarısının ise  $290 \pm 90$  kenarlı nanotriangles ve nanohexagons olduğu söylenebilir. Ayrıca çok az miktarda  $< 2$  kümeleri ve  $\sim 5$  AuNS vardı. *C. libani* AuNS'lerinin SPR (Şekil 4.9) pikleri, pik 520 nm'de olduğu için daha çok 5 nm'lik olanlarla ilişkiliydi. (111), (200), (220), (311) ve (331) miller indeksli SAED spektrumu ve  $2,03 \text{ \AA}$  (200) ihlali AuNS'lerin fcc kristal yapıya sahip olduğunu göstermektedir. *C. sempervirens* 720 nm'ye kadar kenarları olan 1D üçgenler ve bazı yuvarlak 0D  $120 \pm 20$  nm boyutlu olanlar vermiştir. İlginç bir şekilde, *C. sempervirens* altıgen paketlenmiş kristal yapı (100), (101), (102) ve (103) miller indeksleri vermiştir. Ancak, yuvarlak şekilli AuNS'leri ihlal eden katı bir kristal gözlemlenmedi (Şekil 4.9). *T. orientalis* 850 nm'ye kadar 1D üçgen ve altıgen kenarlar ve bazı küresel  $\sim 5$  nm boyutlu AuNS'ler verdi. SAED spektrumu (111), (220) ve (222) miller indeksli tek fcc kristal yapı göstermektedir. Benzer şekilde, *J. oxycedrus* 2.200 nm'ye kadar kenarları olan 1D altıgen, 1.000 nm'ye kadar 1D üçgen kenarlar ve çok az miktarda  $< 1.5$  nm kümeler vermiştir. SAED spektrumu ayrıca (111) ve (220) miller indeksli tek fcc kristal yapısını da ortaya koymaktadır.

Toplam fenolik ve toplam flavonoid içerikleri AuNS'lerin boyutu ve morfolojisi üzerinde doğrudan bir etkiye sahip değildir, daha ziyade özel moleküllerin bolluğu bu özellikler üzerinde daha önemli bir rol oynamaktadır, bu da ekstraktların kimyasal içeriklerinin bilinmesini kritik hale getirmektedir. Ancak, ekstraktlarda bol miktarda bulunan molekülleri tanımlamak kolay ve pratik değildir. Bu nedenle, sentezlenmeden

önce AuNS'lerin olası morfolojisini ve boyutunu tahmin etmek için işaretleyici molekülleri tanımlamak daha pratik olabilir. Bu şekilde bulgularımız bu alandaki araştırmacılara yardımcı olacaktır. IR çalışmaları ayrıca, nişasta bileşenlerine sahip olmanın AuNS'lerin erken agregasyonuna neden olabileceğini, ancak agregasyonun zaman içinde ortadan kalktığını açıklığa kavuşturmuştur.

Şekil 4.7'den, çalışılan tüm AuNS'ler için IR bant aralığındaki değişikliklerin yanı sıra yeni bantların ortadan kalktığı ve oluştuğu gözlenmiştir. 3.600-3.000  $\text{cm}^{-1}$  bant aralığı bozulsada, *C.deodora*\_AuNSs dahil olmak üzere oluşturulan AuNS'lerin bazıları için hala -OH deformasyon bandı, hidroksimetil ve protonlanmış birincil amin bantları fark edilebilir. Bununla birlikte, genel olarak, hidroksietil ve protonlanmış primer amin bantları AuNS'ler üzerinde kaybolmuştur, bu da AuNS'lerin oluşumu üzerine değişen hidrojen bağı ile ilgilidir. *C.deodora*\_AuNSs spektrumunda, 2.922  $\text{cm}^{-1}$  piki 2.912  $\text{cm}^{-1}$ 'e kaymış ve 2.846 ve 2.664  $\text{cm}^{-1}$  'deki pikler belirgin bantlar haline gelmiştir. Bu aralık, proteinlerin ve karbonhidratların -CH<sub>2</sub>- gerilmesinden kaynaklanmaktadır. Çalışılan tüm AuNS'ler için benzer değişiklikler meydana gelmiştir. Bunun aksine, AuNS yüzeyine mono- ve di-karbonil bağlanmasını kapsayan 2.084-2.345  $\text{cm}^{-1}$  aralığında güçlü bant oluşumları gözlenmiştir. Özellikle, 2.070-2.135  $\text{cm}^{-1}$  aralığında, AuNS'ler üzerinde absorbe edilen karbon monoksit bir kayma verebilir. Bununla birlikte, aynı aralıkta bir karbonil grubu ile bir örtüşmenin de mümkün olduğu belirtilmelidir (Boronat vd., 2009). Şekil 4.7'ye dayanarak, hem polen tanesi ekstraktlarında hem de karşılık gelen AuNS'lerde artefakt gibi görünen daha küçük piklerin, karbondioksit adsorpsiyonundan ve protonlanmış grupların moleküller arası / içi etkileşimlerinden kaynaklandığını, *C.deodora*\_AuNSs, *C.libani*\_AuNSs ve *A.nordmanniana*\_AuNSs için gözlemlenen büyük piklerin ise AuNSs yüzeyi ile etkileşime giren karbonil grupları oluşturmak için hidroksilik grupların oksidasyonundan kaynaklandığını düşünüyoruz. 1.900-2.000  $\text{cm}^{-1}$  aralığında görülen pikler moleküller arası ve molekül içi hidrojen bağlanmalarından kaynaklanan artefaktlardır.

1.723  $\text{cm}^{-1}$ 'de yeni oluşan pik -COHN grubuna ait C=N titreşiminden kaynaklanmaktadır ve muhtemelen keto-enol dönüşümü AuNSs sentezi sırasında veya *C. avellana*, *P. pinea* ve *C. sempervirens* özütleri kullanılarak sentezlenen AuNSs

üzerinde gerçekleşmiştir. *J.oxycedrus*\_AuNSs'de  $1.714\text{ cm}^{-1}$ 'deki bant daha güçlü bir pik ile  $1.723\text{ cm}^{-1}$ 'e kaymıştır. *C. libani*'nin  $1.067\text{ cm}^{-1}$  'deki keskin bantı AuNSs oluşumu üzerine kaybolmuştur, bu da AuNSs ile amin grubu etkileşimi ile ilgilidir. Bu nedenle, amid veya amin gruplarına ait bantların AuNSs yüzeyleri ile etkileşime girdikten sonra değişmesi beklenmektedir. Sentezlenen tüm AuNS'ler için,  $1.560\text{--}1.608\text{ cm}^{-1}$  aralığında bulunan karboksilat iyonu bantlarının C=O'su için mavi kaymalar gözlenmiş, *C. avellana* özütleri için AuNS'lerin oluşumu üzerine  $1.609\text{ cm}^{-1}$ 'den  $1.638\text{ cm}^{-1}$ 'e böyle bir kayma gözlenmiştir. *J.oxycedrus*\_AuNSs için  $1.585\text{ cm}^{-1}$ 'den  $1.645\text{ cm}^{-1}$ 'e daha dramatik bir mavi kayma gözlenmiştir. Benzer şekilde, *A. nordmanniana*\_AuNSs, *C.deodora*\_AuNSs, *C.libani*\_AuNSs ve *P.nigra*\_AuNSs için sırasıyla  $1.596\text{ cm}^{-1}$  ila  $1.616\text{ cm}^{-1}$ ,  $1.574\text{ cm}^{-1}$  ila  $1.617\text{ cm}^{-1}$  ve  $1.570\text{ cm}^{-1}$  ila  $1.634\text{ cm}^{-1}$ ,  $1.572\text{ cm}^{-1}$  ila  $1.623\text{ cm}^{-1}$  arasında büyük kaymalar gözlenmiştir. Bu aralık aynı zamanda protein kaymalarının -CNH'lerini de kapsamaktadır, bu nedenle değişiklikler, oluşan AuNS yüzeyleriyle hem karboksilik grup hem de amino grubu etkileşimleriyle ilgili olabilir. Bununla birlikte, karboksilat iyon bandının  $1.390\text{--}1.408\text{ cm}^{-1}$  aralığında dramatik bir değişiklik olmamıştır, burada *P.nigra*\_AuNSs hariç AuNSs oluşumu üzerine sadece pikin keskinleşmesi gözlenmiştir (zayıflamıştır). Bu da karboksilik grupların AuNS'lerin stabilizasyonunu gerçekleştirdiğinin bir işaretidir. *C.libani*\_AuNS ve *C.deodora*\_AuNSs spektrumlarındaki  $1.386\text{ cm}^{-1}$ 'deki yeniliğin AuNSs'lerdeki amino grubunun C-N titreşiminden kaynaklandığını belirtmek kayda değerdir. Diğer önemli değişiklik ise  $\sim 1.020\text{--}1.040\text{ cm}^{-1}$  aralığında bant veren şeker titreşimlerinde gözlenmiştir. Bu aralığın yanı sıra,  $\sim 989\text{ cm}^{-1}$ 'deki bant polisakaritleri ifade etmektedir. *A.nordmanniana*\_AuNSs ( $989\text{ cm}^{-1}$ 'deki bandın da keskinleştiği), *J.oxycedrus*\_AuNSs, *T.orientalis*\_AuNSs ve *C. semperivens*\_AuNSs için  $\sim 1.020\text{--}1.040\text{ cm}^{-1}$  aralığındaki bandın keskinleştiği gözlenmiştir. *P.sylvesteris*\_AuNSs ve *P.pinea*\_AuNSs örneklerinde bant  $1.033\text{ cm}^{-1}$  ve  $989\text{ cm}^{-1}$  kaymalarla iki banda ayrılmıştır. *C.libani*\_AuNSs'de şeker bantı kaybolmuş ve  $1.003\text{ cm}^{-1}$ 'de zayıf bir bant ortaya çıkmıştır. Bunlar karbonhidratların AuNS'lerin stabilizasyonunda rol oynadığının açık işaretleridir. Bunların aksine,  $1.032\text{ cm}^{-1}$ 'deki bant *C.deodora*\_AuNSs spektrumunda bir omuz haline gelirken, *P.pinea*\_AuNSs ve *P.nigra*\_AuNSs IR spektrumlarındaki bant karbonhidrat bantları için önemli bir değişiklik göstermemiştir.

*C.avellana*\_AuNSs için yeni bir bant gibi görünen 1.232 cm<sup>-1</sup>'de yeni bir bant oluşmuştur. Benzer şekilde, *A.nordmanniana*\_AuNSs için 1.232 cm<sup>-1</sup>'deki yeni zayıf bant ligninden kaynaklanıyor olabilir (Shi vd., 2012), *C. avellana* ve *A. nordmanniana* polen tanesi ekstraktlarında çok düşük miktarlarda lignin bulunması ve oluşan AuNSs'lere bağlandığında IR görünür hale gelmesi mümkündür. Bunun nedeni, 1.235 cm<sup>-1</sup>'deki bandın (muhtemelen 1.232 cm<sup>-1</sup>'deki bantla aynı) *J.oxycedrus*\_AuNSs spektrumunda nispeten daha güçlü hale gelmesidir. Bununla birlikte, *C.deodora*\_AuNSs'deki 1.223 cm<sup>-1</sup>'deki pik ligninden değil, riboflavinin aromatik halkasından kaynaklanıyor olabilir (Švecová vd., 2018). AuNSs oluşumları üzerine ekstraktların IR spektrumlarında da değişiklikler olmuştur; *P.sylvesteris*\_AuNSs'de 1.001 cm<sup>-1</sup> ve 923 cm<sup>-1</sup>'deki bantlar daha net hale gelirken, *T.orientaliss*\_AuNSs'de 816 cm<sup>-1</sup> ve 779 cm<sup>-1</sup>'deki bantlar yeni oluşmuştur. *C.semperivens*\_AuNS'lerde ~ 779 cm<sup>-1</sup>'deki bant daha keskin hale gelmiştir. *C.libani*\_AuNSs ve *C.deodora*\_AuNSs spektrumlarında 897 cm<sup>-1</sup> ve 860 cm<sup>-1</sup>'deki bantlar omuz haline gelmiş veya kaybolmuş, *P.pinea*\_AuNSs spektrumunda ise 923 cm<sup>-1</sup>'de yeni bir bant ortaya çıkmıştır. <1.000 cm<sup>-1</sup> IR aralığı çok spesifik değildir ve amilopektin ve amiloz gibi farklı fonksiyonel grupları veya molekülleri kapsar (Stiebing vd., 2022), bu nedenle sentezlenen AuNS'ler arasındaki farklılıklar Tablo 4.2, 4.3 ve 4.4'te verildiği gibi ilgili ekstraktların farklı bileşimleriyle ilişkili olabilir. Fosfatın gerilme modunun 1.252 cm<sup>-1</sup>'deki pikleri *P.nigra*\_AuNS'lerde belirginleşirken, *C.avellana*\_AuNS'lerde ve *P.pinea*\_AuNS'lerde kaybolmuştur. Fosfat grupları *P.nigra*\_AuNSs ile etkileşime girerken *C.avellana*\_AuNSs ve *P.pinea*\_AuNSs için etkileşim olmaması olasıdır.

Şekil 4.6'dan görüldüğü üzere *P. nigra*, *A. nordmanniana*, *C. deodora* ve *C. libani* ekstraktları için AuNSs sentezi sırasında dört saatlik inkübasyonda jelleşme gözlenmiştir. Bu davranışa olası katkıyı değerlendirmek için AuNS'lerin IR spektrumları karşılaştırılmıştır. *C.libani*\_AuNS ve *C.deodora*\_AuNS spektrumlarında, ~1.538 cm<sup>-1</sup>'deki pik muhtemelen aromatik ligninin gerilmesiyle ilgilidir (literatüre göre, pik bir polen tanesi için 1.520 cm<sup>-1</sup>'dedir (Sapiña vd., 2017)), ~1.000 cm<sup>-1</sup>'deki pik ise bağırsak bileşeninin selülozik bileşenlerinden kaynaklanmaktadır (Domínguez vd., 1998). 479 cm<sup>-1</sup>, 854 cm<sup>-1</sup> ve 1.116 cm<sup>-1</sup>'deki pikler de *C.libani*\_AuNSs ve *C.deodora*\_AuNSs'de amiloz ve amilopektin varlığını desteklemektedir. Bu pikler *C. libani* spektrumunda görülemediği, bu da 1.588 cm<sup>-1</sup>

ve 1.407 cm<sup>-1</sup>'deki büyük piklerin söz konusu pikleri görünmez hale getirmesiyle ilgili olabilir. *C.libani*\_AuNSs ve *C.deodora*\_AuNSs'a benzer şekilde, *A.nordmanniana*\_AuNSs ve *P.nigra*\_AuNSs spektrumları nişasta ile ilişkili moleküllere ait ~ 1.100 cm<sup>-1</sup> pik vermiştir. *A.nordmanniana*\_AuNS'de 479 cm<sup>-1</sup>, 854 cm<sup>-1</sup> ve 922 cm<sup>-1</sup>'deki pikler amilopektin ve amiloz varlığını desteklerken, *P.nigra*\_AuNS spektrumunda 863 cm<sup>-1</sup>, 922 cm<sup>-1</sup> ve 1.250 cm<sup>-1</sup>'deki pikler sırasıyla amilopektin/amiloz ve lignin varlığını desteklemektedir. 1.101 cm<sup>-1</sup> ve ~862 cm<sup>-1</sup>'deki pikler *P.pinea*\_AuNS, *P.sylvesteris*\_AuNS ve *C.avellana*\_AuNS'de mevcuttur. Ancak, amiloz ve amilopektin varlığına ilişkin diğer pikler mevcut değildir. Bu nedenle, amilopektin ve amiloz içeriğinin herhangi bir çökelmeye neden olacak kadar düşük olduğu söylenebilir.

*C. deodora* ve *C. libani* IR spektrumları, özellikle 3.600-3.000 cm<sup>-1</sup>, 2.350-1.810 cm<sup>-1</sup> ve 1.100-980 cm<sup>-1</sup> aralığında olmak üzere, AuNSs oluşumu üzerine en dramatik değişiklikleri vermiştir. Bununla birlikte, oluşan AuNS'ler bu farklılıklara özgü herhangi bir karakteristik boyut, morfoloji ve SPR bandı göstermemiştir. TEM görüntüleri, *P. nigra*'nın 18 nm'de nispeten düzgün yuvarlak şekilli AuNS'lerin sentezine izin verdiğini, bazı AuNS'lerin ise 6-12 nm ve < 2 nm nanokümelere arasında olduğunu göstermiştir. SAED, AuNS'lerin (111), (200), (220), (222) ve (420) miller indeksleri ve her bir nanoparçacık üzerinde 1,96 Å (200) saçak ile yüz merkezli kübik (fcc) kristal yapıya sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 4.8). SPR pikinin 535 nm'den (4 saat inkübasyon) 560 nm'ye (24 saat\_c) değişmesi nanoyapının zamana bağlı olarak şekil aldığı bir işarettir. *P. sylvesteris* 5.4 ±1.4 nm boyutunda küreselden asferik olan AuNS'ler vermiştir (Şekil 4.8), bu da 535 nm'de SPR piki oluşumunu açıklamaktadır. Nanopartiküllerin oldukça küçük olması nedeniyle, SAED sırasında bakır ızgaraya odaklanılmış ve SAED spektrumu bakırın kristal yapısını göstermiştir (Fernández-Arias vd., 2020). Bununla birlikte, nanoparçacık üzerindeki 2,25 Å (111) saçak fcc kristal yapı göstermektedir. *A. nordmanniana* büyük oranda 3,5 nm, ancak az miktarda 30 nm boyutunda AuNS'ler vermiştir. SPR pikleri 4 saat ile 24 saat inkübasyon süresi boyunca 560 nm'den 545 nm'ye maviye kayma göstermiştir. Bu, AuNS'lerin zaman içinde bozunmaya uğrayan daha büyük agregatlar oluşturma eğiliminde olmasıyla ilgili olabilir. İlginç bir şekilde SAED, AuNS'lerdeki kristal saçığın 1,45 Å (220) olduğu (220) ve (422) ile tek bir fcc kristalini ortaya çıkarmıştır.

Bunların aksine, *J. horizontalis*  $72 \pm 20$  nm boyut aralığında yuvarlak, trigonal ve hegzagonal AuNS'ler vermiş ve nanokümelere içermemiştir. SAED, AuNS'lerin (111), (200), (220) ve (222) miller indeksleri ve 1.47 Å (220) kristal ihlali ile tek fcc kristal yapısına sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 4.8).

## 5.2 Şeker Ligantlarının Altın ve Gümüş Nanoparçacık Morfolojisi Üzerine Etkisi

Nanoparçacıkların boyut ve morfolojisinin takip edilmesinde ilk başvurulan yöntem UV-Vis spektroskopisidir. Yüzey plazmon rezonans (SPR) tepe noktası ve SPR aralığı nanoparçacığın boyut ve şekli üzerine bilgi edinmemize katkı sağlamaktadır (Tepe vd., 2023). Polen ekstraktları SPR değerleri ve aralığına etki etse de, asıl etki kullanılan şeker ligantının karakteristiğinden gelmiştir.

## 5.3 Nanoparçacıkların Antimikrobiyal Aktiviteleri

Polen ekstraktlarının test edilen bakteriler üzerine herhangi bir antibakteriyel aktivite göstermemelerine karşın, altın nanoparçacıklar üzerinde toplandıkları takdirde bir antibakteriyel aktiviteye sahip hale gelmişlerdir. *S. aureus* ve *E. casseliflavus* bakterileri için sırasıyla *P.pinea*\_AuNP ve *P.nigra*\_AuNP nanoparçacıkları ve *P.pinea*\_AuNP, *P.nigra*\_AuNP, *A.nordmanniana*\_AuNP, *C.deodora*\_AuNP ve *P.sylvestris*\_AuNP güçlü antibakteriyel aktivite göstermişlerdir. *E. coli* üzerinde ise kısıtlı bir antibakteriyel aktivite *P.pinea*\_AuNP, *P.nigra*\_AuNP, *A.nordmanniana*\_AuNP ve *C.deodora*\_AuNP nanoparçacıkları için görülürken *P. aeruginosa* üzerine herhangi bir antibakteriyel aktivite gözlemlenmemiştir.

Gümüş nanoparçacıklara baktığımızda ise *C.avellana*\_AgNP hariç hepsi *S. aureus* ve *E. Cassefliflavus*'a etki etmiştir. *E. coli* de ise *C.avellana*\_AgNP ve *P.pinea*\_AgNP gümüş nanoparçacıkları kısmı etki ederken, diğerlerinin hepsi kuvvetli etki etmiştir. *P. aeruginosa* için ise *C.deodora*\_AgNP ve *P.sylvestris*\_AgNP'ları güçlü diğerleri ise kısmi bir antibakteriyel aktivite göstermişlerdir.

Sonuçlar analiz edildiğinde bitki ekstraktlarının altın nanoparçacıklar üzerine eklendiklerinde gram (+) bakteriler olan *S. aureus* ve *E. casseliflavus* için güçlü

antibakteriyel aktivite gözlemlendi. Buna karşın gram (-) *E. coli* ve *P. aeruginosa* için ise güçlü bir antibakteriyel aktivite gözlemlenmemiştir. Benzeri durum gümüş nanoparçacıklar içinde gözlemlenmiştir. Bu durum polen ekstrakt kimyasının ve nanoparçacıkların bakterinin gram karakterine göre etki ettiğini göstermektedir. Literatür incelendiğinde bitki ekstraktları ve karşılık gelen metal nanoparçacıkların bakterinin membran özelliklerine bağlı olarak toksisite farklılıkları gözlenmektedir (Adeyemi vd., 2022; Bakar vd., 2020).



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Polen kimyası oldukça karmaşık bir içeriğe sahip ve polen kaynağına bağlı olarak fitokimyasalların yoğunluğu ve çeşitliliği farklılıklar gösteriyor olmasına rağmen flavonoidler, organik asitler, amino asitler, tuzlar, protein ve nükleik asit kompozisyonları bakımında belirgin benzerliklere sahiptirler. Yapılan bu çalışma ile sulu polen ekstraktlarının kimyasal kompozisyonu için nicel olarak seviyesi belirlenen 37 molekül, toplam protein, toplam indirgen şeker ve toplam flavonoid ve fenolik asit içeriklerinin altın nanoparçacık sentez ve kararlılığı üzerine etkisi incelendiğinde markır molekül tayininin tüm kompozisyonu analiz etmeye gerek kalmadan belirleyici bir sonuç verdiği tespit edildi. Polen ekstraktlarının nanoparçacık oluşumunu zaman yönünden pratik olmayan bir süre içerisinde gerçekleştirmesi nedeniyle şeker ligandlarının kullanımı ise hem nanoparçacık sentez süresini kısaltmıştır hem de kararlılığını artırmıştır. Yapılan antibakteriyel çalışmalar ise her ne kadar gümüş nanoparçacıkların belirli bir antibakteriyel aktiviteye sahip olsalar da bu aktivitelerinin maksimize edilmesi için kararlı bir yapıya sahip olmaları gerektiği belirlenmiştir. Tüm bu doğrultuda yapılması gerekenler ise şu şekilde listelenebilir.

- i. Polen ekstraktlarının kromatografik metotlar kullanılarak fraksiyonlanması.
  - a. Fraksiyonlama ile benzer molekül gruplarının izolasyonu gerçekleştirilerek altın ve gümüş nanoparçacık üzerine tekil etkilerinin anlaşılması.
  - b. Protein ve nükleik asit gibi biyopolimerlerin uzaklaştırılması ile bu yapıların nanoparçacık morfolojisi üzerine olan etkisinin anlaşılması.
  - c. Fraksiyonlama ile elde edilecek karışımların belirli oranlarda birbirileri ile karıştırılmaları ile gerçekleştirilecek deney tasarımları sonucu ortaya çıkan nanoparçacık morfolojilerinin istatistiksel yöntemler kullanılarak flavonoid, fenolik asit ve indirgen şekere bağımlılıklarının ortaya çıkarılması.
- ii. Şeker ligand miktarının kimyasının bakteriye spesifik olarak belirlenmesi ve polen yükünün optimize edilmesi.
- iii. Bakteriler için gözlemlenen toksisitenin moleküler nedenlerinin anlaşılması için protein ve gen ekspresyonu bazında çalışmaların gerçekleştirilmesi.

## KAYNAKLAR

- Abid, N., Khan, A. M., Shujait, S., Chaudhary, K., Ikram, M., Imran, M., Haider, J., Khan, M., Khan, Q., & Maqbool, M. (2022). Synthesis of nanomaterials using various top-down and bottom-up approaches, influencing factors, advantages, and disadvantages: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, *300*(2021), 102597. doi:10.1016/j.cis.2021.102597.
- Adeyemi, J. O., Oriola, A. O., Onwudiwe, D. C., & Oyedeji, A. O. (2022). Plant Extracts Mediated Metal-Based Nanoparticles: Synthesis and Biological Applications. *Biomolecules*, *12*(5). doi:10.3390/biom12050627.
- Ageitos, J. M., Robla, S., Valverde-Fraga, L., Garcia-Fuentes, M., & Csaba, N. (2021). Purification of hollow sporopollenin microcapsules from sunflower and chamomile pollen grains. *Polymers*, *13*(13). doi:10.3390/polym13132094.
- Ainsworth, E. A., & Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, *2*(4), 875–877. doi:10.1038/nprot.2007.102.
- Alamdari, S., Ghamsari, M. S., Lee, C., Han, W., Park, H., Tafreshi, M. J., & Afarideh, H. (2020). Preparation and Characterization of Zinc Oxide Nanoparticles Using Leaf Extract of *Sambucus ebulus*. *Applied Sciences*, *10*(3620), 1–19. doi:10.3390/app10103620.
- Apyari, V. V., Arkhipova, V. V., Dmitrienko, S. G., & Zolotov, Y. A. (2014). Using gold nanoparticles in spectrophotometry. *Journal of Analytical Chemistry*, *69*(1), 1–11. doi:10.1134/S1061934814010031.
- Arsène, M. M. J., Podoprighora, I. V., Davares, A. K. L., Razan, M., Das, M. S., & Senyagin, A. N. (2021). Antibacterial activity of grapefruit peel extracts and green-synthesized silver nanoparticles. *Veterinary World*, *14*(5), 1330–1341. doi:10.14202/vetworld.2021.1330-1341.
- Ávila-Avilés, R. D., Torres-Gómez, N., Camacho-López, M. A., & Vilchis-Nestor, A. R. (2020). SERS activity of hybrid nano/microstructures Ag-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> based on *Dimorphotheca ecklonis* pollen grains as bio-template. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–9. doi:10.1038/s41598-020-73615-x.
- Bagnoli, F., Vendramin, G. G., Buonamici, A., Doulis, A. G., González-Martínez, S. C., La Porta, N., Magri, D., Raddi, P., Sebastiani, F., & Fineschi, S. (2009). Is *Cupressus sempervirens* native in Italy? An answer from genetic and palaeobotanical data. *Molecular Ecology*, *18*(10), 2276–2286. doi:10.1111/j.1365-294X.2009.04182.x.

- Bakar, F., Sönmez, H., Evecen, S., Turan, B., Demir, M., Gümüş, A., Çeter, T., & Yazgan, İ. (2020). Synthesis and Characterization of Pollen Extract Mediated Gold Nanostructures. *Türk Doğa ve Fen Dergisi*, 9(2), 1–8. doi:10.46810/tdfd.822928.
- Bakour, M., Campos, M. da G., Imtara, H., & Lyoussi, B. (2020). Antioxidant content and identification of phenolic/flavonoid compounds in the pollen of fourteen plants using HPLC-DAD. *Journal of Apicultural Research*, 59(1), 35–41. doi:10.1080/00218839.2019.1675336.
- Banu, H., Renuka, N., Faheem, S. M., Ismail, R., Singh, V., Saadatmand, Z., Khan, S. S., Narayanan, K., Raheem, A., Premkumar, K., & Vasanthakumar, G. (2018). Gold and Silver Nanoparticles Biomimetically Synthesized Using Date Palm Pollen Extract-Induce Apoptosis and Regulate p53 and Bcl-2 Expression in Human Breast Adenocarcinoma Cells. *Biological Trace Element Research*, 186(1), 122–134. doi:10.1007/s12011-018-1287-0.
- Bedinger, P. (1992). The remarkable biology of pollen. *Plant Cell*, 4(8), 879–887. doi:10.1105/tpc.4.8.879.
- Bilir, N., & Kang, K. S. (2021). Fertility variation, seed collection and gene diversity in natural stands of Taurus cedar (*Cedrus libani*). *European Journal of Forest Research*, 140(1), 199–208. doi:10.1007/s10342-020-01324-1.
- Boronat, M., Concepción, P., & Corma, A. (2009). Unravelling the nature of gold surface sites by combining IR spectroscopy and DFT calculations. Implications in catalysis. *Journal of Physical Chemistry C*, 113(38), 16772–16784. doi:10.1021/jp905157r.
- Bujang, J. S., Zakaria, M. H., & Ramaiya, S. D. (2021). Chemical constituents and phytochemical properties of floral maize pollen. *PLoS ONE*, 16(2 February 2021), 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0247327.
- Burns, C., Spendel, W. U., Puckett, S., & Pacey, G. E. (2006). Solution ionic strength effect on gold nanoparticle solution color transition. *Talanta*, 69(4), 873–876. doi:10.1016/j.talanta.2005.11.038.
- Buta, E., Cantor, M., Tefan, R., Pop, R., Mitre, I., Buta, M., & Sestra, R. E. (2015). FT-IR Characterization of Pollen Biochemistry, Viability, and Germination Capacity in Saintpaulia H. Wendl. Genotypes. *Journal of Spectroscopy*, 2015, 706370. doi:10.1155/2015/706370.
- Çetinkaya, D., & Bilir, N. (2019). Toros Sediri 'nde ( *Cedrus libani* A . Rich . ) Fidan Tipi x Fidan Morfolojisi Etkileşimi. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10(1), 28–33.
- Cosmulescu, S., Trandafir, I., & Nour, V. (2015). Chemical composition and antioxidant activity of walnut pollen samples. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 43(2), 361–365. doi:10.15835/nbha43210090.

- Daruich De Souza, C., Ribeiro Nogueira, B., & Rostelato, M. E. C. M. (2019). Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction. *Journal of Alloys and Compounds*, 798, 714–740. doi:10.1016/j.jallcom.2019.05.153.
- Desprat, S., Díaz Fernández, P. M., Coulon, T., Ezzat, L., Pessarossi-Langlois, J., Gil, L., Morales-Molino, C., & Sánchez Goñi, M. F. (2015). *Pinus nigra* (European black pine) as the dominant species of the last glacial pinewoods in southwestern to central Iberia: A morphological study of modern and fossil pollen. *Journal of Biogeography*, 42(10), 1998–2009. doi:10.1111/jbi.12566.
- Dilek Tepe, H., Uğurlu, A., & Yazgan, İ. (2021). Determination of phenolic compounds, organic volatile molecules and anti-cancer properties in *Inula Viscosa* L., *Viscum album* L. and *Raphanus Sativus* L. *Sakarya University Journal of Science*, 25(62736), 647–662. doi:10.16984/saufenbilder.742432.
- Domínguez-Ortega, J., López-Matas, M. Á., Alonso, M. D., Feliu, A., Ruiz-Hornillos, J., González, E., Moya, R., Carnés, J., & the GYMNALL consortium. (2016). Prevalence of Allergic Sensitization to Conifer Pollen in a High Cypress Exposure Area. *Allergy and Rhinology*, 7(4), 200–206. doi:10.2500/ar.2016.7.0183.
- Domínguez, E., Heredia, A., Mercado, J. A., & Quesada, M. A. (1998). Isolation of intact pollen exine using anhydrous hydrogen fluoride. *Grana*, 37(2), 93–96. doi:10.1080/00173139809362649.
- Eryiğit, T., Okut, N., Ekici, K., & Yildirim, B. (2014). Chemical composition and antibacterial activities of *Juniperus horizontalis* essential oil. *Canadian Journal of Plant Science*, 94(2), 323–327. doi:10.4141/CJPS2013-242.
- Farah, J., Choël, M., de Nadaï, P., Balsamelli, J., Gosselin, S., & Visez, N. (2021). Organic and aqueous extraction of lipids from birch pollen grains exposed to gaseous pollutants. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(26), 34527–34538. doi:10.1007/s11356-021-12940-8.
- Fariq, A., Khan, T., & Yasmin, A. (2017). Microbial synthesis of nanoparticles and their potential applications in biomedicine. *Journal of Applied Biomedicine*, 15(4), 241–248. doi:10.1016/j.jab.2017.03.004.
- Fernández-Arias, M., Boutinguiza, M., Del Val, J., Riveiro, A., Rodríguez, D., Arias-González, F., Gil, J., & Pou, J. (2020). Fabrication and deposition of copper and copper oxide nanoparticles by laser ablation in open air. *Nanomaterials*, 10(2), 1–16. doi:10.3390/nano10020300.
- Fidrianny, I., Kanapa, I., & Singgih, M. (2021). Phytochemistry and pharmacology of moringa tree: An overview. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 11(3), 10776–10789. doi:10.33263/BRIAC113.1077610789.

- Gastaminza, G., Lombardero, M., Bernaola, G., Antepará, I., Muñoz, D., Gamboa, P. M., Audicana, M. T., Marcos, C., & Ansotegui, I. J. (2009). Allergenicity and cross-reactivity of pine pollen. *Clinical and Experimental Allergy*, *39*(9), 1438–1446. doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03308.x.
- Groiss, S., Selvaraj, R., Varadavenkatesan, T., & Vinayagam, R. (2017). Structural characterization, antibacterial and catalytic effect of iron oxide nanoparticles synthesised using the leaf extract of *Cynometra ramiflora*. *Journal of Molecular Structure*, *1128*, 572–578. doi:10.1016/j.molstruc.2016.09.031.
- Hajebi, S., Homayouni, M., Mahboobeh, T., Moghaddam, N., & Shahraki, F. (2019). Rapeseed flower pollen bio - green synthesized silver nanoparticles : a promising antioxidant , anticancer and antiangiogenic compound. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, *24*(3), 395–404. doi:10.1007/s00775-019-01655-4.
- Hanafy, N. A. N., Eltonouby, E. A. B., Salim, E. I., Mahfouz, M. E., Leporatti, S., & Hafez, E. H. (2023). Simultaneous Administration of Bevacizumab with Bee-Pollen Extract-Loaded Hybrid Protein Hydrogel NPs Is a Promising Targeted Strategy against Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(4), 3548. doi:10.3390/ijms24043548.
- Hansen, O. K., & Nielsen, U. B. (2008). Crossing success in *Abies nordmanniana* following artificial pollination with a pollen mixture of *A. nordmanniana* and *A. alba*. *Silvae Genetica*, *57*(2), 70–76. doi:10.1515/sg-2008-0011.
- Hansen, O. K., Vendramin, G. G., Sebastiani, F., & Edwards, K. J. (2005). Development of microsatellite markers in *Abies nordmanniana* (Stev.) Spach and cross-species amplification in the *Abies* genus. *Molecular Ecology Notes*, *5*(4), 784–787. doi:10.1111/j.1471-8286.2005.01062.x.
- Hassan, H. M. M. (2011). Chemical Composition and Nutritional Value of Palm Pollen Grains. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, *6*(1), 1–7.
- Hulla, J. E., Sahu, S. C., & Hayes, A. W. (2015). Nanotechnology: History and future. *Human and Experimental Toxicology*, *34*(12), 1318–1321. doi:10.1177/0960327115603588.
- Iacovacci, P., Afferni, C., Barletta, B., Tinghino, R., Di Felice, G., Pini, C., & Mari, A. (1998). *Juniperus oxycedrus*: A new allergenic pollen from the Cupressaceae family. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *101*(6 II), 755–761. doi:10.1016/s0091-6749(98)70304-5.
- Jadoun, S., Arif, R., Jangid, N. K., & Meena, R. K. (2021). Green synthesis of nanoparticles using plant extracts: a review. *Environmental Chemistry Letters*, *19*(1), 355–374. doi:10.1007/s10311-020-01074-x.
- Ji, Y., Yang, X., Ji, Z., Zhu, L., Ma, N., Chen, D., Jia, X., Tang, J., & Cao, Y. (2020). DFT-Calculated IR Spectrum Amide I, II, and III Band Contributions of N-Methylacetamide Fine Components. *ACS Omega*, *5*(15), 8572–8578. doi:10.1021/acsomega.9b04421.

- Jiang, B., Shen, Z., Shen, J., Yu, D., Sheng, X., & Lu, H. (2009). Germination and growth of sponge gourd (*Luffa cylindrica*) pollen tubes and FTIR analysis of the pollen tube wall. *Scientia Horticulturae*, 122(4), 638–644. doi:10.1016/j.scienta.2009.06.021.
- Joester, M., Seifert, S., Emmerling, F., & Kneipp, J. (2017). Physiological influence of silica on germinating pollen as shown by Raman spectroscopy. *Journal of Biophotonics*, 10(4), 542–552. doi:10.1002/jbio.201600011.
- Karaman, I., Şahin, F., Güllüce, M., Öğütçü, H., Şengül, M., & Adigüzel, A. (2003). Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 85(2–3), 231–235. doi:10.1016/S0378-8741(03)00006-0.
- Karimi, B., Mardani, M., Kaboutari, J., Javdani, M., Albadi, J., & Shirian, S. (2023). Green synthesis of copper oxide nanoparticles using *Artemisia annua* aqueous extract and its characterization, antioxidant, and burn wound healing activities. *Chemical Papers*. doi:10.1007/s11696-023-03069-8.
- Klimko, M., Boratyńska, K., Montserrat, J. M., Didukh, Y., Romo, A., Gómez, D., Kluza-Wieloch, M., Marcysiak, K., & Boratyński, A. (2007). Morphological variation of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* (Cupressaceae) in the Mediterranean region. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 202(2), 133–147. doi:10.1016/j.flora.2006.03.006.
- Köksal, A. I., Artik, N., Şimşek, A., & Güneş, N. (2006). Nutrient composition of hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties cultivated in Turkey. *Food Chemistry*, 99(3), 509–515. doi:10.1016/j.foodchem.2005.08.013.
- Liu, H., Zhang, X., Xu, Z., Wang, Y., Ke, Y., Jiang, Z., Yuan, Z., & Li, H. (2020). Role of polyphenols in plant-mediated synthesis of gold nanoparticles: identification of active components and their functional mechanism. *Nanotechnology*, 31(41), 415601.
- Lutzke, A., Morey, K. J., Medford, J. I., & Kipper, M. J. (2020). Detailed characterization of *Pinus ponderosa* sporopollenin by infrared spectroscopy. *Phytochemistry*, 170(November), 112195. doi:10.1016/j.phytochem.2019.112195.
- Merza, K. S., Al-Attabi, H. D., Abbas, Z. M., & Yusr, H. A. (2012). Comparative Study on Methods for Preparation of Gold Nanoparticles. *Green and Sustainable Chemistry*, 02(01), 26–28. doi:10.4236/gsc.2012.21005.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. doi:10.1021/ac60147a030.
- Mohammadrezakhani, S., Hajilou, J., & Rezanejad, F. (2018). Evaluation of phenolic and flavonoid compounds in pollen grains of three Citrus species in response to low temperature. *Grana*, 57(3), 214–222. doi:10.1080/00173134.2017.1358763.

- Mohammadzadeh, V., Barani, M., Amiri, M. S., Taghavizadeh Yazdi, M. E., Hassanisaadi, M., Rahdar, A., & Varma, R. S. (2022). Applications of plant-based nanoparticles in nanomedicine: A review. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 25(September 2021), 100606. doi:10.1016/j.scp.2022.100606.
- Mosleh, I., Benamara, M., Greenlee, L., Beyzavi, M. H., & Beitle, R. (2019). Recombinant peptide fusion proteins enable palladium nanoparticle growth. *Materials Letters*, 252, 68–71. doi:10.1016/j.matlet.2019.05.080.
- Mujtaba, M., Yilmaz, B. A., Cansaran-Duman, D., Akyuz, L., Yangin, S., Kaya, M., Çeter, T., & Khawar, K. M. (2022). Newly isolated sporopollenin microcages from *Cedrus libani* and *Pinus nigra* as carrier for Oxaliplatin; xCELLigence RTCA-based release assay. *Polymer Bulletin*, 79(1), 519–540. doi:10.1007/s00289-020-03531-7.
- Muthreich, F., Zimmermann, B., Birks, H. J. B., Vila-Viçosa, C. M., & Seddon, A. W. R. (2020). Chemical variations in *Quercus* pollen as a tool for taxonomic identification: Implications for long-term ecological and biogeographical research. *Journal of Biogeography*, 47(6), 1298–1309. doi:10.1111/jbi.13817.
- Mwakalesi, A. J. (2023). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Aqueous Extract of *Vachellia xanthophloea* and Their Potential Use for Antibacterial and Sensing of Mercury Ions. *Plasmonics*, 0123456789. doi:10.1007/s11468-023-01909-7.
- Nadeem, F., Khalid, T., Jilani, M. I., & Rahman, S. (2019). A review on ethnobotanical, phytochemical and pharmacological potentials of *Cedrus deodara*. *International Journal of Chemical and Biochemical Sciences*, 15, 28–34.
- Nam, N. T. H., Linh, N. T. T., Dat, N. M., Bao, P. P., Tinh, N. T., Cong, C. Q., Hai, N. D., Giang, N. T. H., Phong, M. T., & Hieu, N. H. (2023). Applications of Highly Stable Silver Nanoparticles from *Garcinia mangostana* Pericarp Extract: Bioactivities, Catalysis, and Optical Sensing. *ChemistrySelect*, 8(38), e202301602. doi:10.1002/slct.202301602.
- Nasaruddin, R. R., Chen, T., Yao, Q., Zang, S., & Xie, J. (2021). Toward greener synthesis of gold nanomaterials: From biological to biomimetic synthesis. *Coordination Chemistry Reviews*, 426, 213540. doi:10.1016/j.ccr.2020.213540.
- Nikalje, A. P. (2015). Nanotechnology and its Applications in Medicine. *Medicinal Chemistry*, 5, 81–89. doi:10.4172/2161-0444.1000247.
- Nisca, A., Ștefănescu, R., Stegăruș, D. I., Mare, A. D., Farczadi, L., & Tanase, C. (2021). Comparative study regarding the chemical composition and biological activity of pine (*Pinus nigra* and *p. sylvestris*) bark extracts. *Antioxidants*, 10(2), 1–14. doi:10.3390/antiox10020327.

- Okan, O. T., Deniz, I., Yayli, N., Şat, I. G., Öz, M., & Serdar, G. H. (2018). Antioxidant activity, sugar content and phenolic profiling of blueberries cultivars: A comprehensive comparison. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 46(2), 639–652. doi:10.15835/nbha46211120.
- Olennikov, D. N., Shishmarev, V. M., & Shiretorova, V. G. (2023). Alkyl Cinnamates from Pollen of *Pinus sylvestris*. *Chemistry of Natural Compounds*, 59(2), 179–183. doi:10.1007/s10600-023-03957-1.
- Papa, G., Romano, A., Quarantino, D., Di Fonso, M., Viola, M., Cristina Artesani, M., Sernia, S., Di Gioacchino, M., & Venuti, A. (2001). Prevalence of sensitization to *Cupressus sempervirens*: A 4-year retrospective study. *Science of the Total Environment*, 270(1–3), 83–87. doi:10.1016/S0048-9697(00)00795-6.
- Patil, M. P., Jin, X., Simeon, N. C., Palma, J., Kim, D., Ngabire, D., Kim, N. H., Tarte, N. H., & Kim, G. Do. (2018). Anticancer activity of sasa borealis leaf extract-mediated gold nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46(1), 82–88. doi:10.1080/21691401.2017.1293675.
- Prakash, M. V. D., Sampath, S., Amudha, K., Nadeem, A., Lopes, B. S., Durga, B., & Muthupandian, S. (2023). Eco-friendly green synthesis of copper nanoparticles from *Tinospora cordifolia* leaves: optical properties with biological evaluation of anti-microbial, anti-inflammatory and anti-oxidant applications. *Materials Technology*, 38(1), 2247908. doi:10.1080/10667857.2023.2247908.
- Pummer, B. G., Bauer, H., Bernardi, J., Chazallon, B., Facq, S., Lendl, B., Whitmore, K., & Grothe, H. (2013). Chemistry and morphology of dried-up pollen suspension residues. *Journal of Raman Spectroscopy*, 44(12), 1654–1658. doi:10.1002/jrs.4395.
- Rawat, P., Khan, M. F., Kumar, M., Tamarkar, A. K., Srivastava, A. K., Arya, K. R., & Maurya, R. (2010). Constituents from fruits of *Cupressus sempervirens*. *Fitoterapia*, 81(3), 162–166. doi:10.1016/j.fitote.2009.08.014.
- Reverberi, A. P., Kuznetsov, N. T., Meshalkin, V. P., Salerno, M., & Fabiano, B. (2016). Systematical analysis of chemical methods in metal nanoparticles synthesis. *Theoretical Foundations of Chemical Engineering*, 50(1), 59–66. doi:10.1134/S0040579516010127.
- Rezanejad, F. (2012). Air pollution effects on flavonoids in pollen grains of some ornamental plants. *Turkish Journal of Botany*, 36(1), 49–54. doi:10.3906/bot-1008-15.
- Rittenour, W. R., Hamilton, R. G., Beezhold, D. H., & Green, B. J. (2012). Immunologic, spectrophotometric and nucleic acid based methods for the detection and quantification of airborne pollen. *Journal of Immunological Methods*, 383(1–2), 47–53. doi:10.1016/j.jim.2012.01.012.
- Ross, S. A., ElSohly, M. A., Sultana, G. N. N., Mehmedic, Z., Hossain, C. F., & Chandra, S. (2005). Flavonoid glycosides and cannabinoids from the pollen of *Cannabis sativa* L. *Phytochemical Analysis*, 16(1), 45–48. doi:10.1002/pca.809.

- Saad, A. M., El-Saadony, M. T., El-Tahan, A. M., Sayed, S., Moustafa, M. A. M., Taha, A. E., Taha, T. F., & Ramadan, M. M. (2021). Polyphenolic extracts from pomegranate and watermelon wastes as substrate to fabricate sustainable silver nanoparticles with larvicidal effect against *Spodoptera littoralis*: Polyphenolic extracts from pomegranate and watermelon wastes. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(10), 5674–5683. doi:10.1016/j.sjbs.2021.06.011.
- Sadik, J. D. I. K. O. (2017). FTIR analysis of molecular composition changes in hazel pollen from unpolluted and urbanized areas. *Aerobiologia*, 33, 1–12. doi:10.1007/s10453-016-9445-3.
- Şahin, B., Demir, E., Aygün, A., Gündüz, H., & Şen, F. (2017). Investigation of the effect of pomegranate extract and monodisperse silver nanoparticle combination on MCF-7 cell line. *Journal of Biotechnology*, 260(July), 79–83. doi:10.1016/j.jbiotec.2017.09.012.
- Saladino, G. M., Hamawandi, B., Demir, M. A., Yazgan, I., & Toprak, M. S. (2021). A versatile strategy to synthesize sugar ligand coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles and investigation of their antibacterial activity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 613(December 2020), 126086. doi:10.1016/j.colsurfa.2020.126086.
- Salayová, A., Bedlovičová, Z., Daneu, N., Baláž, M., Lukáčová Bujňáková, Z., Balážová, L., & Tkáčiková, L. (2021). Green synthesis of silver nanoparticles with antibacterial activity using various medicinal plant extracts: Morphology and antibacterial efficacy. *Nanomaterials*, 11, 1005. doi:10.3390/nano11041005.
- Sancak, S., Yazgan, İ., Bayarslan, A. U., Ayna, A., Evecen, S., Taşdelen, Z., Gümüş, A., Sönmez, H. A., Demir, M. A., Demir, S., Bakar, F., Dilek-Tepe, H., Kasemets, K., Otsus, M., & Çeter, T. (2023). Surface chemistry dependent toxicity of inorganic nanostructure glycoconjugates on bacterial cells and cancer cell lines. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 79(July 2022). doi:10.1016/j.jddst.2022.104054.
- Santhoshkumar, J., Kumar, S. V., & Rajeshkumar, S. (2017). Synthesis of zinc oxide nanoparticles using plant leaf extract against urinary tract infection pathogen. *Resource-Efficient Technologies*, 3(4), 459–465. doi:10.1016/j.refit.2017.05.001.
- Sapiña, M., Jimenez-Relinque, E., Nevshupa, R., Roman, E., & Castellote, M. (2017). Degradation of pollen on nanofunctionalized photocatalytic materials. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 92(1), 210–216. doi:10.1002/jctb.4932.
- Schulte, F., Lingott, J., Panne, U., & Kneipp, J. (2008). Chemical characterization and classification of pollen. *Analytical Chemistry*, 80(24), 9551–9556. doi:10.1021/ac801791a.

- Seifert, S., Merk, V., & Kneipp, J. (2016). Identification of aqueous pollen extracts using surface enhanced Raman scattering (SERS) and pattern recognition methods. *Journal of Biophotonics*, 9(1–2), 181–189. doi:10.1002/jbio.201500176.
- Shahab-Navaei, F., & Asoodeh, A. (2023). Synthesis of optimized propolis solid lipid nanoparticles with desirable antimicrobial, antioxidant, and anti-cancer properties. *Scientific Reports*, 13(1), 1–14. doi:10.1038/s41598-023-45768-y.
- Shahriarinour, M., Divsar, F., Mehdipour, A., Youseftabar-Miri, L., & Barkhordri, V. (2023). Antibacterial Properties of Cobalt Ferrite Magnetic Nanoparticles Loaded on Date Palm Pollen Against Multidrug-Resistant Bacteria. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 48(6), 7315–7322. doi:10.1007/s13369-023-07811-y.
- Shervani, Z., & Yamamoto, Y. (2011). Carbohydrate-directed synthesis of silver and gold nanoparticles: Effect of the structure of carbohydrates and reducing agents on the size and morphology of the composites. *Carbohydrate Research*, 346(5), 651–658. doi:10.1016/j.carres.2011.01.020.
- Shi, J., Xing, D., & Li, J. (2012). FTIR studies of the changes in wood chemistry from wood forming tissue under inclined treatment. *Energy Procedia*, 16(PART B), 758–762. doi:10.1016/j.egypro.2012.01.122.
- Shiri, M. S. Z., Henderson, W., & Mucalo, M. R. (2019). A review of the lesser-studied microemulsion-based synthesis methodologies used for preparing nanoparticle systems of the noble metals, Os, Re, Ir and Rh. *Materials*, 12(12). doi:10.3390/ma12121896.
- Shivanna, K. R., & Tandon, R. (2020). Developmental biology of dispersed pollen grains. *International Journal of Developmental Biology*, 64(1–3), 7–19. doi:10.1387/ijdb.190166ks.
- Smitha, S. L., Nissamudeen, K. M., Philip, D., & Gopchandran, K. G. (2008). Studies on surface plasmon resonance and photoluminescence of silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 71(1), 186–190. doi:10.1016/j.saa.2007.12.002.
- Song, J. Y., Kwon, E. Y., & Kim, B. S. (2010). Biological synthesis of platinum nanoparticles using *Diopyros kaki* leaf extract. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33(1), 159–164. doi:10.1007/s00449-009-0373-2.
- Stiebing, C., Post, N., Schindler, C., Göhrig, B., Lux, H., Popp, J., Heutelbeck, A., & Schie, I. W. (2022). Revealing the Chemical Composition of Birch Pollen Grains by Raman Spectroscopic Imaging. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 5112. doi:10.3390/ijms23095112.
- Sundaresan, U., & Kasi, G. (2023). Synthesis of ZnO nanoparticles using *Sargassum wightii* ethanol extract and their antibacterial and anticancer applications. *Biomass Conversion and Biorefinery*. doi:10.1007/s13399-023-04977-1.

- Švecová, M., Ulbrich, P., Dendisová, M., & Matějka, P. (2018). SERS study of riboflavin on green-synthesized silver nanoparticles prepared by reduction using different flavonoids: What is the role of flavonoid used? *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *195*, 236–245. doi:10.1016/j.saa.2018.01.083.
- Tahmasebi, E., Mohammadi, M., Yazdani, M., Alam, M., Abbasi, K., Hosseini, H. M., Tavakolizadeh, M., Khayatan, D., Hassani, Z., & Tebyaniyan, H. (2023). Antimicrobial properties of green synthesized novel TiO<sub>2</sub> nanoparticles using Iranian propolis extracts. *Journal of Basic Microbiology*, *63*(9), 1030–1048. doi:10.1002/jobm.202300221.
- Tepe, H. D., Aktaş, Ş., Çeter, T., & Yazgan, İ. (2023). Comparison of Blueberry and Dandelion Aqueous Extracts in the Synthesis of Gold and Silver Nanostructures, and Their Applications as Anti-Pseudomonas aeruginosa Agent. *ChemistrySelect*, *8*(18), e202300362.
- Unsalan, O., & Gulluoglu, M. T. (2009). *FT-Raman and FT-IR spectral and quantum chemical studies on some flavonoid derivatives : Baicalein and Naringenin*. July 2008, 562–570. doi:10.1002/jrs.2166.
- Urcan, A. C., Criste, A. D., Szanto, K. I., Ştefan, R., Zahan, M., Muscă, A. S., Focsan, M., Burtescu, R. F., & Olah, N. K. (2023). Antimicrobial and Antiproliferative Activity of Green Synthesized Silver Nanoparticles Using Bee Bread Extracts. *Pharmaceutics*, *15*(7), 1797. doi:10.3390/pharmaceutics15071797.
- Velasco-Jiménez, M. J., Alcázar, P., Valenzuela, L. R., Gharbi, D., Díaz de la Guardia, C., & Galán, C. (2018). Pinus pollen season trend in South Spain. *Plant Biosystems*, *152*(4), 657–665. doi:10.1080/11263504.2017.1311962.
- Venditti, A., Maggi, F., Saab, A. M., Bramucci, M., Quassinti, L., Petrelli, D., Vitali, L. A., Lupidi, G., El Samrani, A., Borgatti, M., Bernardi, F., Gambari, R., Abboud, J., Saab, M. J., & Bianco, A. (2022). Antiproliferative, antimicrobial and antioxidant properties of Cedrus libani and Pinus pinea wood oils and Juniperus excelsa berry oil. *Plant Biosystems*, *156*(2), 384–395. doi:10.1080/11263504.2020.1864495.
- Viñas, R. A., Caudullo, G., Oliveira, S., & Rigo, D. de. (2016). Pinus pinea in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In *European Atlas of Forest Tree Species* (Issue March, pp. 130–131).
- Visez, N., de Nadaï, P., Choël, M., Farah, J., Hamzé, M., Sénéchal, H., Pauwels, M., Frérot, H., Thibaudon, M., & Poncet, P. (2021). Biochemical composition of Phleum pratense pollen grains: A review. *Molecular Immunology*, *136*(June), 98–109. doi:10.1016/j.molimm.2021.05.014.
- Yazgan, I., Gümüş, A., Gökkuş, K., Demir, M. A., Evecen, S., Sönmez, H. A., Miller, R. M., Bakar, F., Oral, A., Popov, S., & Toprak, M. S. (2020). On the effect of modified carbohydrates on the size and shape of gold and silver nanostructures. *Nanomaterials*, *10*(7), 1–17. doi:10.3390/nano10071417.

- Yazgan, İ., Osonga, F. J., Miller, R. M., Kariuki, V. M., Zhang, J., Feng, J., Skeete, Z., Crapo, H., Schulte, J., Panetier, J., & Sadik, O. A. (2021). Green one-pot sugar-ligands synthesized property-controlled gold-nanoparticles. *ACS Agricultural Science & Technology*, *1*(4), 379–389.
- Yazgan, I., Osonga, F. J., Miller, R. M., Kariuki, V. M., Zhang, J., Feng, J., Skeete, Z., Crapo, H., Schulte, J., & Sadik, O. A. (2021). Greener One-Pot Synthesis of Gold Nanoparticle Glycoconjugates Using Functionalized Sugars. *ACS Agricultural Science & Technology*, *1*(4), 379–389. doi:10.1021/acsagscitech.1c00093.
- Yilmaz, M., & Arica, M. Y. (2004). Immobilization of a thermostable  $\alpha$ -amylase onto reactive membranes: kinetics characterization and application to continuous starch hydrolysis. *Food Chemistry*, *84*, 591–599. doi:10.1016/S0308-8146(03)00283-8.
- Yousefzadeh-Valendeh, S., Fattahi, M., Asghari, B., & Alizadeh, Z. (2023). Dandelion flower-fabricated Ag nanoparticles versus synthetic ones with characterization and determination of photocatalytic, antioxidant, antibacterial, and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities. *Scientific Reports*, *13*(1), 15444. doi:10.1038/s41598-023-42756-0.
- Zayed, M. F., & Eisa, W. H. (2014). Phoenix dactylifera L. leaf extract phytosynthesized gold nanoparticles; Controlled synthesis and catalytic activity. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *121*, 238–244. doi:10.1016/j.saa.2013.10.092.
- Zdunek, A., Krysa, M., & Szyma, M. (2022). FT-IR and FT-Raman fingerprints of flavonoids– A review. *Food Chemistry*, *393*, 133430.
- Zhang, D., Chen, L., Zang, C., Chen, Y., & Lin, H. (2013). Antibacterial cotton fabric grafted with silver nanoparticles and its excellent laundering durability. *Carbohydrate Polymers*, *92*(2), 2088–2094. doi:10.1016/j.carbpol.2012.11.100.
- Zimmermann, B. (2010). Characterization of pollen by vibrational spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, *64*(12), 1364–1373. doi:10.1366/000370210793561664.
- Zimmermann, B. (2018). Chemical characterization and identification of Pinaceae pollen by infrared microspectroscopy. *Planta*, *247*(1), 171–180. doi:10.1007/s00425-017-2774-9.
- Zimmermann, B., & Kohler, A. (2014). Infrared spectroscopy of pollen identifies plant species and genus as well as environmental conditions. *PLoS ONE*, *9*(4), e95417. doi:10.1371/journal.pone.0095417.