

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOPOLİMER TEMELLİ NANOKOMPOZİT SİSTEMLERİ
İÇEREN ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖRLERİN
GELİŞTİRİLMESİ

VİLDAN ŞANKO
DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

GEBZE
2023

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOPOLİMER TEMELLİ
NANOKOMPOZİT SİSTEMLERİ İÇEREN
ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖRLERİN
GELİŞTİRİLMESİ

VİLDAN ŞANKO
DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. ERHAN DEMİRBAŞ

GEBZE
2023

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**DEVELOPMENT OF ELECTROCHEMICAL
BIOSENSORS INCLUDING BIOPOLYMER
BASED NANOCOMPOSITE SYSTEMS**

VİLDAN ŞANKO

**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
DEPARTMENT OF CHEMISTRY**

**THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. ERHAN DEMİRBAŞ**

GEBZE

2023

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 19/01/2023 tarih ve 2023/04 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 31/01/2023 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Vildan Şanko'nun tez çalışması Kimya Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE
(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Erhan DEMİRBAŞ

ÜYE : Prof. Dr. Ümit DEMİR

ÜYE : Prof. Dr. Seyfullah MADAKBAŞ

ÜYE : Prof. Dr. Mahmut DURMUŞ

ÜYE : Prof. Dr. Atıf KOCA

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

ÖZET

Bu tez çalışmasında, bakır ferrit (CuFe_2O_4 , CuF), kobalt ferrit (CoFe_2O_4 , CoF), nikel ferrit (NiFe_2O_4 , NiF) ve çinko ferrit (ZnFe_2O_4 , ZnF) nanoparçacıkları birlikte çöktürme yöntemi ile sentezlenerek yüzeyleri tetraetoksisilan (TEOS) ve (3-aminopropil)trietoksisilan (APTES) ile modifiye edilmiştir. Böylece nanopartiküllerin yüzeyleri $-\text{NH}_2$ fonksiyonel grubu ile enzim immobilizasyonuna hazır hâle getirilmiştir. Modifikasyon öncesi ve sonrası fonksiyonel hâle getirilen ferrit nanoparçacıkları Fourier transform kızılötesi (FTIR), X-ışını kırınımı (XRD), UV-vis spektroskopileri, taramalı elektron (SEM), geçirimli elektron (TEM) mikroskopları, termogravimetrik analiz (TGA) ve Zeta potansiyeli ile karakterize edilmiştir. Ferrit nanoparçacıkların her biri Nafyon (Nf) ve polianilin (PANI) kaplı camsı karbon elektrot yüzeyinde üreaz enzimi immobilizasyonu sonrasında (Nf/PANI/CuF/Urs, Nf/PANI/CoF/Urs, Nf/PANI/NiF/Urs, Nf/PANI/ZnF/Urs) üre analitine karşı döngüsel voltametri (CV) ve diferansiyel puls voltametri (DPV) ile ayrı ayrı test edilmiştir. En iyi elektrokimyasal performansa sahip Nf/PANI/CuF/Urs biyosensörü ile elektrot yüzeyindeki kompozit sisteme jelatin (Jel) ve nanokristalin selüloz (NKK) biyopolimerleri ilave edilerek biyopolimerlerin elektrokimyasal biyosensör performansına etkisi CV, DPV ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) yöntemleri ile incelenmiştir. Hem biyopolimer içeren biyosensörler (Nf/PANI/CuF/Jel/Urs, Nf/PANI/CuF/NKK/Urs) hem de Nf/PANI/CuF/Urs için tekrarlanabilirlik, kararlılık, tekrar kullanılabilirlik, seçicilik ve gerçek örnek analizleri (süt ve toprak) DPV yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, üre analitine karşı en iyi elektrokatalitik etki gösteren CuF nanoparçacıkları farklı bir biyopolimer olarak hyaluronik asit (HA) içeren yeni bir kompozit sistemde yeni bir biyosensör tasarımında kullanılmıştır. Elektrokimyasal olarak sentezlenen PANI nanolifleri (PANI-nl) ve CuF nanoparçacıklarını içeren elektrota ise Lakkaz (Lak) enzimi immobilize edilmiş ve tekrarlanabilirlik, kararlılık, tekrar kullanılabilirlik, seçicilik ve gerçek örnek analizleri (konserve suyu, süt ve deniz suyu) DPV yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Elektrokimyasal Biyosensör, Enzimatik Biyosensör, Üre Biyosensörü, Nanoteknoloji, Ferrit Nanoparçacıkları, Biyopolimer.

SUMMARY

In this thesis, copper ferrite (CuFe_2O_4 , CuF), cobalt ferrite (CoFe_2O_4 , CoF), nickel ferrite (NiFe_2O_4 , NiF) and zinc ferrite (ZnFe_2O_4 , ZnF) nanoparticles were synthesized by co-precipitation method and their surfaces were modified with tetraethoxysilane (TEOS) and (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES). Thus, surfaces of nanoparticles were made ready for enzyme immobilization with $-\text{NH}_2$ functional group. Ferrite nanoparticles functionalized before and after modification were characterized by Fourier transform infrared (FTIR), X-ray diffraction (XRD), UV-vis spectroscopies, scanning electron (SEM), transmission electron microscopes (TEM), thermogravimetric analysis (TGA) and Zeta potential. Each of ferrite nanoparticles was tested by cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV) against urea after urease immobilization on Nafion (Nf) and polyaniline (PANI) coated glassy carbon electrode surface (Nf/PANI/CuF/Urs, Nf/PANI/CoF/Urs, Nf/PANI/NiF/Urs, Nf/PANI/ZnF/Urs). Effect of biopolymers on electrochemical biosensor performance was investigated by CV, DPV and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) by adding gelatin (Jel) and nanocrystalline cellulose (NCC) biopolymers to the composite system on electrode surface with Nf/PANI/CuF/Urs electrode with the best electrochemical performance. Reproducibility, stability, reusability, selectivity and real sample analyzes (milk and soil) for both biopolymer containing biosensors (Nf/PANI/CuF/Jel/Urs, Nf/PANI/CuF/NCC/Urs) and Nf/PANI/CuF/Urs) were carried out by DPV method. In addition, CuF nanoparticles with the best electrocatalytic effect against urea analyte were used in a new biosensor design in a new composite system containing hyaluronic acid (HA) as different biopolymer. Laccase (Lak) enzyme was immobilized to the electrode containing electrochemically synthesized PANI nanofibers (PANI-nl) and CuF nanoparticles, Reproducibility, stability, reusability, selectivity, real sample analyses (canned water, milk, and seawater) were performed by DPV method.

Keywords: Electrochemical Biosensor, Enzymatic Biosensor, Urea Biosensor, Nanotechnology, Ferrite Nanoparticles, Biopolymer.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimi ile beni destekleyen ve ihtiyaç duyulan her imkânı sağlayan değerli tez danışman hocam Prof. Dr. Erhan DEMİRBAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Arkadaşlıkları, destekleri, yardımları ve iş paylaşımları için Doç. Dr. Ahmet ŞENOCAK ve Doç. Dr. Süreyya Oğuz TÜMAY'a en içten teşekkürlerimi bir borç bilirim. Elektrokimya ve Sensör Araştırma Laboratuvarı çalışma arkadaşlarım Taşkın ÇAMURCU, Erdem SARI, Beyza ÖMÜRLÜ ve Ahmet Akif KIZILKURTLU'ya arkadaşlıkları, yardımları ve anlayışları için teşekkür ederim. Ayrıca, destekleri ve arkadaşlığı için Doç. Dr. Duygu AKYÜZ ÇUBUKÇU'ya teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince laboratuvarını her zaman açan ve destek olan Prof. Dr. Mahmut DURMUŞ hocama, Durmuş Research Group üyelerine ve özellikle Öğr. Gör. Dr. İpek ÖMEROĞLU ve Arş. Gör. Dilek ÖZTÜRK'e çok teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında, aldığım tüm kararlarda maddi-manevi desteğini esirgemeyen annem Nilgün Nurdan ŞANKO, babam Mehmet Oğuzhan ŞANKO, kardeşim Yağmur ŞANKO AYGÜNEY, eşi Yusuf AYGÜNEY ve hayatımızın en güzel rengi olan yeğenim Aden AYGÜNEY'e çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını 2211-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı kapsamında destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumuna (TÜBİTAK) teşekkür ederim. YÖK 100/2000 doktora programına doktora eğitimimde sağlamış oldukları finansal destek için teşekkür ederim. Ayrıca, 122Z696 Proje numaralı TÜBİTAK 1002-B projesine ve TÜBİTAK 2224-B Yurt İçi Bilimsel Etkinliklere Katılım Desteği Programı'na sağladıkları destek için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	5
2.1. Biyosensörler	5
2.1.1. Nükleik Asit Temelli Biyosensörler	6
2.1.2. Aptamer Temelli Biyosensörler	6
2.1.3. Antikor Temelli Biyosensörler	7
2.1.4. Hücre Temelli Biyosensörler	8
2.1.5. Enzimatik Biyosensörler	8
2.1.6. Biyolojik Tanıma Elemanı İmmobilizasyon Yöntemleri	19
2.2. Elektroanalitik Yöntemler	22
2.3. Yöntem Geçerlilik Testleri	29
2.4. Nanoteknoloji ve Nanoparçacıklar	33
2.5. İletken Polimerler ve Özellikleri	39
2.6. Biyopolimer	46
3. DENEYSEL BÖLÜM	51
3.1. Tez Çalışması Kapsamında Kullanılan Kimyasallar	51
3.2. Tez Çalışması Kapsamında Kullanılan Cihazlar	52
3.3. Ferrit Nanoparçacıklarının Sentezi	54
3.4. TEOS ile Yüzey Modifikasyonu	56
3.5. APTES ile Yüzey Modifikasyonu	56
3.6. BPA Biyosensörü için Polianilin Sentezi	57
3.7. Üre Biyosensörü için Elektrot Modifikasyonu Enzim İmmobilizasyonu	57

3.8. Üre Biyosensörü için Jelatin Temelli Elektrot Modifikasyonu ve Enzim İmmobilizasyonu	59
3.9. Nanokristalin Selüloz Yüzey Modifikasyonu	59
3.10. Üre Biyosensörü için NKK Temelli Elektrot Modifikasyonu ve Enzim İmmobilizasyonu	60
3.11. BPA Biyosensörü için HA Temelli Elektrot Modifikasyonu ve Enzim İmmobilizasyonu	60
3.12. Gerçek Örneklerin Hazırlanması	61
4. BULGULAR VE TARTIŞMALAR	62
4.1. Ferrit Nanoparçacıklarının Karakterizasyonu	62
4.2. TEOS ve APTES ile Modifiye Edilmiş Ferrit Nanoparçacıklarının Karakterizasyonu	75
4.3. Tez Kapsamında Geliştirilen Üre Biyosensörleri	88
4.4. Tez Kapsamında Geliştirilen BPA Biyosensörü	117
5. SONUÇLAR	138
KAYNAKLAR	143
ÖZGEÇMİŞ	179
EKLER	180

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Açıklamalar

Kısaltmalar

σ	: Standart sapma
A	: Amper
cm	: Santimetre
CV	: Dönüşümlü Voltametri
DPV	: Diferansiyel Puls Voltametri
E	: Potansiyel
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
g	: Gram
GCE	: Camı Karbon Elektrot
GS	: Gözlenebilme sınırı
HA	: Hyaluronik asit
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
Jel	: Jelatin
Lak	: Lakkaz
M	: Molarite
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mV	: Milivolt
μ A	: Mikroamper
μ L	: Mikrolitre
μ M	: Mikromolar
nM	: Nanomolar

Nf	: Nafyon
NKK	: Nanokristalin selüloz
PANI	: Polianilin
PANI-nl	: Polianilin-nanolifler
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
SWV	: Kare Dalga Voltametrisi
TEM	: Geçirimli Elektron Mikroskobu
TGA	: Termogravimetrik Analiz
TS	: Tayin sınırı
Urs	: Üreaz
UV-Vis	: Morötesi-Görünür Bölge
V	: Volt
XRD	: X-ışını kırınımı

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Biyosensörün şematik çalışma modeli.	5
2.2: Ni ²⁺ 'nin doğal üreaz aktif bölgesinde koordinasyon geometrisi.	10
2.3: Üreazın katalitik mekanizması.	10
2.4: Nano-PANI: polistiren-sülfonat (PSS) biyosensörünün NH ₄ ⁺ algılama mekanizması.	13
2.5: Yb ₂ O ₃ nanodisk sentezinin şematik gösterimi, GCE modifikasyonu ve üre tespiti için uygulaması.	13
2.6: Lakkaz aktif bölüme, bakır atomları ve ligand mesafesi ile ilgili yönelimi gösteren şematik gösterim.	15
2.7: Lakkazın katalitik döngüsü.	16
2.8: BPA'nın elektrooksidasyon mekanizması.	17
2.9: BPA'nın nikel nanoparçacık/azot katkılı karbon nanolevha nanokompozitini içeren sensör ile elektrokimyasal tespiti.	17
2.10: Lakkaz ve çok duvarlı karbon nanotüp içeren BPA biyosensörünün şematik gösterimi.	18
2.11: Biyoalgılamada kullanılan yaygın immobilizasyon yöntemleri: a) Kovalent bağlanma, b) Adsorpsiyon, c) Çapraz bağlama, d) Kapsülleme ve e) Tuzak.	19
2.12: CA125 tespiti için basılı elektrotların CuBTC@MoS ₂ -AuNP'lerle modifikasyonu.	20
2.13: Elektroanalitik yöntemlerin şematik gruplandırılması.	23
2.14: Dönüşümlü voltametri de uygulanan potansiyelin a) Akımla b) Zamanla değişimini gösteren grafikler.	24
2.15: DPV'de uygulanan potansiyelin a) Akımla b) Zamanla değişimini gösteren grafikler.	26
2.16: SWV'de uygulanan potansiyelin a) Akımla b) Zamanla değişimi.	27
2.17: Kronoamperometrik ölçümde a) Akım ve b) Potansiyelin zamanla değişimi.	28
2.18: a) Misel, b) Altın nanoparçacık ve c) Zeolitik imidazol çerçeveleri.	33

2.19:	Karbon temelli nanopartiküller: a) Fulleren, b) Grafen, c) Karbon nanotüp.	34
2.20:	Tetrahedral ve oktahedral bölgeleri gösteren spinel ferrit yapısı.	36
2.21:	a) Poliasetilen, b) Polipirol, c) Politiyofen, d) Polianilin konjuge polimerlerinin ana zincir yapıları.	39
2.22:	Polianilin emeraldin bazının kimyasal yapısı ve asit ortamında protonasyon yoluyla iletken bir tuza dönüşme reaksiyonu.	40
2.23:	PANI ve yaygın türlerine ait molekül yapılarının gösterimi.	41
2.24:	a) PANI emeraldin tuzu, b) Emeraldin bazı ve c) Pernigranilin bazı.	42
2.25:	Nafyon'un molekül yapısı.	42
2.26:	Nafyon/modifiye mezogözenekli parçacıklar içeren kompozit membranlarda proton iletme mekanizmaları.	43
2.27:	PANI'nin elektropolimerizasyon mekanizması.	44
2.28:	Biyopolimerlerin sınıflandırılması.	46
2.29:	Jelatinin molekül yapısı.	47
2.30:	a) Selülozun molekül yapısı, b) Nanokristalin selülozun morfolojik yapısı.	48
2.31:	Hyaluronik asitin molekül yapısı.	48
3.1:	Ferrit nanoparçacıklarının birlikte çöktürme yöntemi ile eldesi.	54
3.2:	Elde edilen ferrit nanoparçacıklarına ait dijital fotoğraflar.	55
3.3:	Ferrit nanoparçacıkların TEOS ve APTES ile modifikasyonu için şematik gösterim.	56
3.4:	Tez kapsamında elektrot yüzeyine sentezlenen PANI için dijital fotoğraf (emeraldin).	57
3.5:	Elektrokimyasal analizlerde kullanılan elektrotlar: a) GCE, b) Platin tel ve c) Ag/AgCl elektrot.	58
3.6:	a) Gluteraldehit (GA) ile yüzey immobilizasyonu ve b) Ferritnanoparçacıklarının yüzeyine enzim immobilizasyonu için şematik gösterim (* lakkaz ya da üreaz enzimleri olabilir).	59
3.7:	EDC/NHS ile immobilizasyonun şematik gösterimi.	61
4.1:	Farklı kalsinasyon sıcaklıklarında elde edilen ferrit nanoparçacıklarına ait FTIR spektrumları: a, c, e, g) 400-4000 cm ⁻¹ ,	64

b, d, f, h) 1200-4000 cm⁻¹, *; oktahedral bölge, **: tetrahedral bölgeyi temsil etmektedir.

4.2:	Farklı kalsinasyon sıcaklıklarında elde edilen ferrit nanoparçacıklarına ait XRD spektrumları.	67
4.3:	Farklı kalsinasyon sıcaklıklarında edilen ferrit nanoparçacıklarına ait TGA grafikleri.	68
4.4:	a-d) 500 °C, e-h) 750 °C ve i-l) 1000 °C kalsinasyon sıcaklığında elde edilen sırasıyla CuF, CoF, NiF ve ZnF nanoparçacıklarına ait SEM görüntüleri (büyütmeler 30.000 X).	70
4.5:	a) CuF, b) CoF, c) NiF ve d) ZnF nanoparçacıklarına ait parçacık büyüklükleri dağılım grafikleri.	71
4.6:	Ferrit nanoparçacıklarına ait EDS spektrumları.	72
4.7:	a) CuF-750, b) CoF-750, c) NiF-750 ve d) ZnF-750 nanoparçacıklarına ait TEM görüntüleri.	73
4.8:	Ferrit nanoparçacıklarının zeta potansiyel grafiği.	74
4.9:	TEOS ve APTES ile modifiye ferrit nanoparçacıkların FTIR spektrumları.	75
4.10:	TEOS ve APTES ile modifiye edilmiş ferrit nanoparçacıkların TGA diyagramları.	76
4.11:	a-d) TEOS ve e-h) APTES ile modifiye edilmiş CuF, CoF, NiF, ZnF ferrit nanoparçacıkların SEM görüntüleri.	78
4.12:	TEOS ve APTES ile modifiye edilmiş ferritlerin ortalama parçacık boyutları.	79
4.13:	a-d) TEOS ve e-h) APTES modifiye edilmiş ferrit nanoparçacıklarına ait EDS spektrumları.	80
4.14:	a-d) TEOS ve e-h) APTES ile modifiye edilmiş CuF, CoF, NiF, ZnF ferrit nanoparçacıkların TEM görüntüleri.	82
4.15:	TEOS ve APTES modifiye edilmiş ferrit nanoparçacıklarının BET grafikleri	84
4.16:	TEOS ve APTES modifiye edilmiş ferrit nanoparçacıklarının UV-Görünür spektrum ve Tauc grafikleri.	86

4.17:	Nf/PANI/CuF/Urs sensörünün optimizasyonları a) Nf hacmi, b) PANI döngüsü, c) CuF-TS@AP, d) Urs konsantrasyonu ve e) İmmobilizasyon.	89
4.18:	Tez çalışması için geliştirilen üre biyosensörü bileşenlerinin elektrokimyasal yanıtları.	90
4.19:	Tez çalışması için geliştirilen üre biyosensöründe farklı ferrit nanoparçacıklarının elektrokimyasal yanıtlara etkisini gösteren CV voltamogramları.	91
4.20:	Üre biyosensörünün hazırlanma aşamaları ve çalışma mekanizması.	92
4.21:	a, b) Nf/PANI/CuF/Urs ($R^2= 0.9888$), c, d) Nf/PANI/CoF/Urs ($R^2= 0.9832$), e, f) Nf/PANI/NiF/Urs ($R^2= 0.9843$), g, h) Nf/PANI/ZnF/Urs ($R^2= 0.9887$) üzerindeki farklı üre konsantrasyonları için CV yanıtları ve üre konsantrasyonları ile pik akımları arasındaki doğrusal ilişki.	94
4.22:	a, b) Nf/PANI/CuF/Urs ($R^2= 0.9927$), c, d) Nf/PANI/CoF/Urs ($R^2= 0.9886$), e, f) Nf/PANI/NiF/Urs ($R^2= 0.9936$), g, h) Nf/PANI/ZnF/Urs ($R^2= 0.9941$) üzerindeki farklı üre konsantrasyonları için DPV yanıtları ve üre konsantrasyonları ile pik akımları arasındaki doğrusal ilişki.	96
4.23:	Temiz GCE ve ferrit nanoparçacıkları ile kaplı GCE'nin a) geniş ve b) daraltılmış Nyquist empedans grafikleri.	98
4.24:	Ferrit nanoparçacıkları ile kaplı GCE'nin 0.1 M KCl içeren 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisinde alınan CV voltamogramları.	99
4.25:	Nf/PANI/CuF/Jel/Urs elektrotunun 0.5-45.0 μM üre içeren ortamdaki a) DPV voltamogramları, b) Nf/PANI/CuF/Urs ve Nf/PANI/CuF/Jel/Urs elektrotlarının aynı miktarda üre için hesaplanan pik akım değerleri.	100
4.26:	a) Nf/PANI/CuF/Jel/Urs biyosensörünün DPV yanıtları, b) Pik akımları ve üre konsantrasyonları arasındaki doğrusal ilişki ($R^2= 0.9874$).	101
4.27:	NKK ve NKK-APTES'e ait FTIR spektrumları.	102
4.28:	NKK ve NKK-APTES'e ait TGA diagramları.	103

4.29:	Nf/PANI/CuF/NKK/Urs elektrotunun 0.5-45.0 μM üre içeren ortamdaki a) DPV voltamogramları, b) Nf/PANI/CuF/Urs ve Nf/PANI/CuF/Jel/Urs ve Nf/PANI/CuF/NKK/Urs elektrotlarının aynı miktarda üre için hesaplanan pik akım değerleri.	104
4.30:	Nf/PANI/CuF/NKK/Urs biyosensörünün a) DPV yanıtları, b) Pik akımları ve üre konsantrasyonları arasındaki doğrusal ilişki ($R^2=0.9898$)).	105
4.31:	a) Nf/PANI/CuF/Urs, b) Nf/PANI/CuF/Jel/Urs ve c) Nf/PANI/CuF/NKK/Urs elektrot yüzeylerine ait SEM görüntüleri (büyütmeler X 250).	105
4.32:	0.1 M KCl içeren 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ de alınan CV voltamogramları.	106
4.33:	a) Nf/PANI/CuF/Urs, b) Nf/PANI/CuF/Jel/Urs ve c) Nf/PANI/CuF/NKK/Urs biyosensörlerinin tekrarlanabilirlik analizleri.	108
4.34:	a) Nf/PANI/CuF/Urs, b) Nf/PANI/CuF/Jel/Urs ve c) Nf/PANI/CuF/NKK/Urs biyosensörlerinin tekrar kullanılabilirlik analizleri.	110
4.35:	a) Nf/PANI/CuF/Urs, b) Nf/PANI/CuF/Jel/Urs ve c) Nf/PANI/CuF/NKK/Urs biyosensörlerinin kullanım ömrü analizleri.	112
4.36:	a, b) Nf/PANI/CuF/Urs, c, d) Nf/PANI/CuF/Jel/Urs ve e, f) Nf/PANI/CuF/NKK/Urs biyosensörlerinin seçicilik analizleri.	114
4.37:	PANI-nl'in elektrokimyasal sentezinde elde edilen CV voltamogramı.	117
4.38:	Anilin ve PANI-nl'in FTIR spektrumları.	118
4.39:	PANI-nl'in TGA diyagramı.	118
4.40:	PANI-nl'in SEM görüntüleri; Büyütmeler a) 5000 X, b) 20000 X.	119
4.41:	BPA biyosensörü için kullanılan komponentlerin optimizasyonu; a) CuF-TS@AP, b) PANI-nl, c) HA ve d) Lak konsantrasyonları.	120
4.42:	BPA biyosensörü için pH optimizasyonu grafikleri.	121
4.43:	0.1 M KCl içeren 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ de alınan CV voltamogramları.	123
4.44:	BPA biyosensörünün hazırlanma aşamaları ve çalışma mekanizması.	124

4.45:	PBS içerisinde 9.0 μ M BPA varlığında alınan farklı gruplarının CV voltamogramları (pH 7.0).	125
4.46:	a) CuF/PANI-nl'nin ve b) CuF/PANI-nl/HA/Lak'ın GCE üzerine kaplanmış SEM görüntüleri.	126
4.47:	a) CuF/PANI-nl/HA/Lak/GCE'de farklı BPA konsantrasyonlarının CV yanıtları, b) BPA akımları ve konsantrasyonları arasındaki doğrusal ilişki.	126
4.48:	a) CuF/PANI-nl/HA/Lak/GCE'de farklı BPA konsantrasyonlarının DPV yanıtları, b) BPA akımları ve konsantrasyonları arasındaki doğrusal ilişki.	127
4.49:	pH 7.0 PBS'de aynı çalışma koşulları altında alınan 9 ardışık ölçüm için DPV voltamogramları.	128
4.50:	pH 7.0 PBS ortamında dört farklı zamanda tekrarlanan CuF/PANI-nl/HA/Lak/GCE elektrotlarının DPV voltamogramları.	128
4.51:	CuF/PANI-nl/HA/Lak/GCE elektrotunun pH 7.0 PBS'de yeniden kullanılabilirlik testlerinde elde edilen DPV voltamogramları.	129
4.52:	CuF/PANI-nl/HA/Lak/GCE biyosensörünün BPA'ya karşı seçicilik testleri; a, b) Katyonlar, c, d) Antioksidanlar, e, f) Organik gruplar.	131
4.53:	CuF/PANI-nl/HA/Lak/GCE biyosensör elektrotu ile DPV yöntemi kullanılarak a) Deniz suyu, b) Konserve suyu ve c) Süt numunelerinde BPA tayini.	134
4.54:	HPLC analizi için BPA kalibrasyon eğrisi.	135
4.55:	a) Analit içermeyen ve b) Farklı BPA konsantrasyonları içeren HPLC kromatogramları.	135

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
1.1: Piyasadaki çeşitli ticari klinik biyosensörler.	1
1.2: Gıda endüstrisi için kullanılan bazı ticari biyosensörler.	2
2.1: Nükleik asit temelli elektrokimyasal biyosensörler için literatürde yer alan örnekler.	6
2.2: Aptamer temelli elektrokimyasal biyosensörler için literatürde yer alan bazı örnekler.	7
2.3: Antikor temelli elektrokimyasal biyosensörler için literatürde yer alan bazı örnekler.	7
2.4: Hücre temelli elektrokimyasal biyosensörler için literatürde yer alan örnekler.	8
2.5: Enzim temelli elektrokimyasal biyosensörler için literatürde yer alan bazı örnekler.	9
2.6: Literatürde yer alan bazı enzimatik üre biyosensörleri.	14
2.7: Literatürde yer alan bazı enzimatik elektrokimyasal BPA biyosensörleri.	18
3.1: Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler.	51
4.1: Farklı kalsinasyon sıcaklıklarında elde edilen ferrit nanoparçacıklarına ait spesifik FTIR pikleri.	63
4.2: Çeşitli kalsinasyon sıcaklıklarında elde edilen ferrit numunelerinin kafes ve ortalama kristalit boyutları.	66
4.3: Ferrit nanoparçacıkları için elementlerin atomik yüzdeleri.	73
4.4: TEOS ve APTES ile modifiye edilmiş ferrit nanoparçacıklarının elementlerin atomik yüzdeleri.	79
4.5: BET modelinden hesaplanan ferrit nanoparçacıkların özellikleri.	83
4.6: Elektrokimyasal üre biyosensörlerinin karşılaştırılması.	97
4.7: Tez kapsamında geliştirilen biyosensörler ile toprak ve süt numunelerinde üre tayini.	115
4.8: Elektrokimyasal BPA sensörlerinin karşılaştırılması.	133
4.9: Deniz suyu, konserve su ve süt numunelerinde DPV ve HPLC'ye dayalı CuF/PANI-nl/HA/Lak/GCE biyosensörü ile BPA tayini.	136

1. GİRİŞ

Biyosensör çalışma alanı fizik, kimya ve biyoloji gibi temel bilimlerin prensiplerini, mikro/nano teknoloji, elektronik ve uygulama temelleriyle birleştiren çok disiplinli bir araştırma alanıdır [1]. Bu disiplinler arası çalışmalar sonucu ortaya çıkan ürünlerin tıp, eczacılık, gıda ve proses kontrolü, çevresel izleme, savunma ve güvenlik alanlarında uygulamaları bulunmaktadır [2]. Geniş bir alanda uygulama bulmasına rağmen biyosensör teknolojisinin ticarileşmesi, birçok yayın ve patent gibi araştırma çıktısının gerisinde kalmıştır [3]. Pazarın çoğu tıbbi teşhis ve özellikle diyabet hastaları için glukoz sensörü tarafından yönlendirilmektedir [2]. Diğer ticari klinik biyosensörleri gebelik, *E. coli* O157, influenza A ve B virüsleri, insan bağışıklık yetmezliği virüsü (HIV), ürik asit ve kolesterol tespiti amacıyla kullanılmaktadır [4]. Tablo 1.1’de klinik amaçlı kullanılan çeşitli ticari biyosensörlerin marka, model ve analit türleri belirtilmiştir [5].

Tablo 1.1: Piyasadaki çeşitli ticari klinik biyosensörler.

Marka	Model	Analit
Yellow Springs Instruments	23A	Glukoz
Yellow Springs Instruments	23L	Laktat
Yellow Springs Instruments	23	Etanol
Fuji Electric, Japonya	Gluko 20	Glukoz α -amilaz
LaRoche, İsviçre	LA 640	Laktat
Daiichi, Japonya	Autostat GA-1120	Glukoz
HemoCue	-	Glukoz

Gıda ve çevre güvenliği, son yıllarda gıda teknolojisi uzmanları ve sağlık bilimcileri için büyük bir endişe kaynağı olmuştur. Gıda ve su kaynaklı patojenler, toksinler ve böcek ilacı kalıntılarının yanı sıra, farklı yiyecek ve içecek bileşenlerinin hızlı ve hassas bir şekilde tespit edilmesine yönelik çalışmalara olan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır [6]. Bu nedenle ticari biyosensörler klinik amaç dışında, gıda güvenliğinin tespiti, gıda bileşimi analizinin ve proses kontrolünün analizi için de yaygın olarak kullanılmaktadır. Tablo 1.2’ de gıda endüstrisi için kullanılan çeşitli ticari biyosensörler listelenmiştir [4].

Tablo 1.2: Gıda endüstrisi için kullanılan bazı ticari biyosensörler.

Firma	Biyosensör
Oriental Electric	Balıkların bozulma takibi
Massachusetts Teknoloji Enstitüsü	Marulda <i>E. coli</i> O157: H7 Tayini
Biacore AB	Suda çözünen vitaminler, kimyasal veteriner kalıntıları ve mikotoksinler
Biomerieux	Mikroorganizmalar
Biosensores S.L	Zehirli maddeler
IVA Co. Ltd	Ağır metaller
Texas Instruments	Yerfıstığı alerjenleri, antibiyotikler

Tablo 1.1 ve 1.2’de belirtilen ve bunların dışında daha pek çok ticari biyosensör günümüzde endüstriyel olarak üretilmekte ve önemli algılama sistemleri geliştirmek için kullanılmaktadır. Genel olarak bir biyosensör, basit, kullanımı kolay bir formatla beraber karmaşık biyoanalitik ölçümleri sağlamak amacıyla, bir biyokimyasal reaksiyonun duyarlılığını ve özgüllüğünü ölçen fizikokimyasal bir dönüştürücü ve bir biyolojik algılama elemanı içeren analitiksel bir cihazdır [7]. Biyosensörün çeşitli pazarlarda yer alabilmesi için;

- Biyoalgılayıcılar analit için oldukça spesifik olmalıdır.
- Biyosensör normal depolama koşulları altında kararlı olmalıdır.
- Biyosensörün yanıtı doğru, stabil ve kararlı olmalıdır.
- Analitiksel ölçüm aralığı doğrusal olmalı ve minimum numune ön işleme (örn. seyreltme) gerektirmelidir.
- Biyosensör ucuz, küçük ve taşınabilir olmalıdır.
- Tecrübeli olmayan kişiler tarafından da kullanılabilir kadar basit olmalıdır [8].

Son yıllarda biyosensörlerle ilgili artan literatür çalışmalarına bakıldığında, kuşkusuz, biyosensörlerin sadece akademi için değil, endüstri için de ilgi çekici olduğunu ortaya koymakta ve yukarıda da bahsi geçen özellikleri sağlayabilen bir biyosensör elde etmek için pek çok çalışma hâlen artan bir şekilde devam etmektedir. Bu çalışmalar biyoalgılayıcı elemanın çeşidine göre farklılık gösterebileceği gibi (enzim, antikor, DNA, vb), sinyal dönüştürücü türüne göre de farklılık gösterebilir.

Sinyal dönüştürücü türüne göre elektrokimyasal olarak sınıflandırılan biyosensörler ise şu anda alana hâkim durumdadır ve temel olarak metabolit izlemesi üzerine odaklanmaktadır [2]. Elektrokimyasal biyosensörler, düşük tayin sınırı, özgüllük, üretim ve kullanım kolaylığı avantajı sunduğundan, en kapsamlı araştırılan biyosensörlerden biridir. Şimdiye kadar tasarlanmış olan pek çok elektrokimyasal sensör hâla gelişme ve test aşamasındadır. Ancak bunların arasından bazıları ise el tipi cihazlar, saha ölçümleri için kullanılan taşınabilir üniteler olarak tüketici pazarına ulaşmış durumdadır [9].

Biyosensör tasarımında diğer bir önemli husus, biyotanıma ünitesi ile analit arasındaki etkileşimin verimli bir şekilde kullanılmasıdır. Bu durum, biyotanıma elemanının sensör arayüzüne etkili bir şekilde immobilizasyonunu gerektirir. Ayrıca, biyosensör materyalinin, biyotanıma ünitesinin aktivitesini korumak için yüksek biyouyumluluk göstermesi gerekir. Biyotanıma elemanları pH, iyonik kuvvet, sıcaklık gibi dış koşullara karşı hassastır. Bu nedenle, immobilizasyon matrisinin, biyotanıma ünitesi faaliyetine zarar veren koşullardan koruyabilmesi gerekir. İletken polimerler, metal nanoparçacıklar, karbon temelli nanomalzemeler, biyopolimerler, vb. yapılar bu amaç için büyük ölçüde kullanılmaktadır. Bunlar arasında, biyopolimerler doğal kökenleri ve canlı sistemler ile olumlu etkileşimleri nedeniyle oldukça ümit verici yapılardır. Biyopolimerler, yukarıda belirtilen koşulların çoğunu karşılayan ve bu nedenle biyosensörlerin geliştirilmesinde geniş bir uygulama alanı bulabilen bir malzeme sınıfıdır [10].

Çeşitli endüstriyel ve biyomedikal uygulamalarda nano ölçekli maddenin işlenmesi ve kontrolü ile ortaya çıkan nanobilim ve nanoteknoloji alanındaki gelişmeler, birçoğu laboratuvar çalışmalarından mağaza raflarına transfer olan pek çok ürüne olanak sağlamıştır [11]. Biyosensör çalışma alanında da, hassasiyeti arttırmak ve tespit sınırlarını bireysel moleküllere düşürmek için çeşitli nano parçacıklardan faydalanılmaktadır [12]. Nanometre ile mikrometre boyut aralığındaki manyetik parçacıklar ise, modern biyoanalitik yöntemlerde ve biyomedikal tedavilerde yaygın olarak kullanılmaktadır [13]. Manyetik nanoparçacıklara dayanan biyotanıma sistemleri, ucuz üretim, fiziksel ve kimyasal olarak kararlı yapı, biyolojik olarak uyumlu ve çevresel olarak güvenli olmaları nedeniyle diğer tekniklere kıyasla benzersiz avantajlar sunmaktadırlar [14]. Son yıllarda, manyetik nanoparçacıklar oldukça fazla ilgi görmüş olup, sensörler ve biyosensörler gibi çeşitli analitik uygulamalarda kullanılmıştır. Ayrıca, uygun fonksiyonel gruplara sahip

fonksiyonlandırılmış manyetik nanoparçacıkların yüzey immobilizasyon tekniği ve cihazlarının duyarlılığındaki iyileştirmede önemli bir rol oynadığı gözlemlenmiştir [15].

Üre, doğada önemli bir moleküldür ve dedeksiyonu gıda güvenliği denetimi, klinik teşhis ve çevresel izlemede önemli bir role sahiptir [16]. Üre seviyesinin kanda veya diğer vücut sıvılarında normal seviyelerden farklı miktarlarda bulunması kronik böbrek hastalığı, kalp metabolik bozukluğu ve karaciğer yetmezliği için biyobelirteç olarak belirtilmiştir [17]. Bu nedenle, düzenli aralıklarla farklı vücut sıvıları, süt örnekleri, su kütleleri ile birlikte toprak ve tarım alanı sularında üre ölçümüne ihtiyaç duyulmaktadır [18].

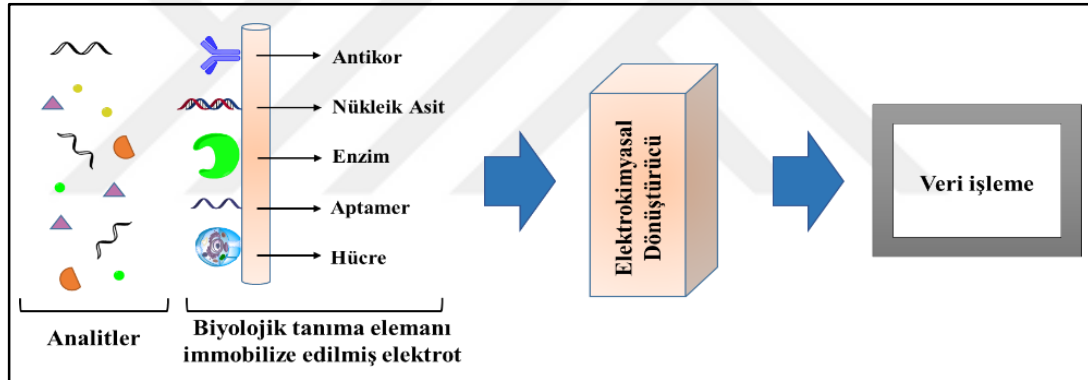
Endokrin bozucu kimyasallardan olan Bisfenol A (BPA), iki hidroksi fenil grubu içeren kimyasal bir yapıya sahiptir [19]. Endokrin bozucular, endokrin sisteme müdahale ederek obeziteye, kardiyovasküler hastalıklara, diyabete ve nörotoksisiteyle ilgili hastalıklara neden olurlar [20]. Bu nedenle, yüksek hassasiyet, seçicilik, geniş çalışma aralığı ve düşük tayin sınırı ile BPA tayini için sensör platformlarının geliştirilmesi günümüzde oldukça önemlidir.

Bu tez kapsamında, üre ve BPA analitlerinin tespitine yönelik enzimatik elektrokimyasal biyosensörlerin tasarlanması amaçlanmıştır. Bu amaç için nanoteknolojinin olumlu katkılarından faydalanılması hedef alınmış ve bakır ferrit, kobalt ferrit, nikel ferrit ve çinko ferrit manyetik nanoparçacıkları sentezlenmiştir. Yüzeyleri $-NH_2$ ile fonksiyonelleştirilen bu dört farklı ferrit nanoparçacıkları üre analiti için yüzeyi Nf ve PANI ile kaplanmış camsı karbon elektrot yüzeyindeki kompozit sisteme dâhil edilmiş ve üreaz enzimi ile immobilize edilmiştir. Her biri ayrı ayrı elektrokimyasal olarak test edilen ferrit nanoparçacıklarından bakır ferrit en iyi elektrokimyasal performansı göstermiştir. Ayrıca, en iyi sistemde biyopolimerlerin etkisini incelemek amacıyla hem çözünür özellikte (Jel) hem de yaygın organik çözücülerde çözünemeyen (NKK) biyopolimerler tercih edilmiştir. Bu biyopolimerlerin biyosensörün elektrokimyasal performansına olan etkileri ve elektrot yüzeyindeki farklılıkları tartışılmıştır. Son olarak bu sistem hyaluronik asit biyopolimeri varlığında Lakkaz enzimi ile immobilize edilerek BPA analiti tespiti için kullanılmıştır. Böylece farklı bir bakış açısıyla hassas ve seçici enzimatik elektrokimyasal üre ve BPA biyosensörleri literatüre kazandırılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Biyosensörler

Biyosensör, analitik bir sinyal üretmek için analiti tanıyan ve etkileşime giren bir biyotanıma elemanının kullanımını içerir. Bu tanımlama, bir dönüştürücü tarafından sinyale dönüştürülür [21]. Biyosensörler klinik tedavi, eczacılık ve biyomedikal gibi geniş bir sektörde uygulama bulmakta olup, hem hastalıkları tanımlama, hem de hasta sağlığı takibi açısından oldukça önem taşımaktadır. Bunlara ek olarak bakterilerin ve patojenlerin tespit edilmesi için de kullanılabilirler [22]. Clark'ın oksijen elektrot sensörünün icadından itibaren biyosensör teknolojisinde hassasiyet ve seçicilik gibi pek çok konuda önemli gelişmeler olmuştur [23]. Bir biyosensörün şematik gösterimi ve çalışma prensibi Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1: Biyosensörün şematik çalışma modeli.

Biyotanıma elemanı enzim, DNA, antikor, bütün hücreler, doku, organel vs. gibi herhangi bir biyolojik element olabilir. Biyotanıma elemanı, biyolojik bir sinyal üretmek için analitleri tanır ve etkileşime girer. Biyotanıma, biyokimyasal etkileşimin seçici doğası nedeniyle biyosensöre özgüllük sağlar. Dönüştürücünün rolü biyolojik etkileşimi ölçülebilir bir sinyale dönüştürmektir [24]. Biyosensörler, biyolojik tanıma elemanının tipine göre nükleik asit, aptamer, antikor, tüm hücre ve enzim temelli biyosensörler olarak 5 kategoride sınıflandırılabilir [21].

2.1.1. Nükleik Asit Temelli Biyosensörler

Nükleik asitler, genetik bilgiyi insanda ve hemen hemen tüm organizmalarda depolayan doğal biyopolimerlerdir. Nükleik asitler, nükleotidlerden meydana gelen DNA (deoksiribonükleik asit) ve RNA'yı (ribonükleik asit) içerir [23]. Nükleik asit zincirleri arasındaki iyi bilinen spesifik hibridizasyon özelliği de DNA biyosensörlerinin tespitinin ana prensibini oluşturmaktadır [25]. DNA dizisinin tespiti için biyosensör geliştirilmesi, gen tanımlamasında, moleküler tanıma, ilaç taramasında ve çevre korumada uygulanmasından dolayı önemlidir [26]. Ayrıca, nükleik asit temelli biyosensörler, nükleik asitler, proteinler, ağır metaller gibi diğer birçok molekül de tespit etmek amacıyla kullanılabilir [27]. Nükleik asit türünde biyotanıma elemanı içeren elektrokimyasal biyosensörlere ait örnek çalışmalar Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1: Nükleik asit temelli elektrokimyasal biyosensörler için literatürde yer alan bazı örnekler.

Biyotanıma Birimi	Diğer Biyosensör Bileşeni	Analit	Kaynaklar
DNA	Politimin-metilen mavisi modifiye elektrotlar	Hg ²⁺	[28]
DNA	Altın nanoparçacıklarla modifiye edilmiş grafen oksit	Meme kanseri biyobelirteci	[29]
DNA	Fe ₃ O ₄ /N-Trimetil kitosan/altın	RASSF1A tümör baskılayıcı gen	[30]
RNA	Azot katkılı grafen üzerinde bakır oksit ve altın nanopartiküller	Hepatit C	[31]

2.1.2. Aptamer Temelli Biyosensörler

Aptamerler, genellikle bir *in vitro* yöntem kullanılarak sentezlenebilen tek iplikli DNA veya RNA molekülleridir [32]. Aptamerler, proteinler, virüsler, bakteriler, bütün hücreler ve ayrıca metal iyonları, organik boyalar, ilaçlar, amino asitler gibi küçük moleküller de dâhil olmak üzere çok sayıda hedef moleküle özel olarak bağlanabilir. Yüksek özgüllükleri, kolay sentezleri, basit modifikasyonları ve yüksek kimyasal stabiliteleri nedeniyle biyosensörlerin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılırlar [10]. Aptamer temelli biyosensörün performansı, aptamerlerin karbon nanotüpler, grafen, metal nanoparçacıkları gibi çeşitli nanomalzemelerle birleştirilmesiyle önemli

ölçüde geliştirilebilir [33-36]. Bu nanomalzemelerin biyopolimerlerle olan kompozitleri, nanomateryal kompozitin biyomoleküler aktivitenin sağlanması açısından biyolojik uyumluluğunu geliştirmek için sıklıkla kullanılır [10]. Aptamer temelli biyotanıma elemanı içeren biyosensörlere ait bazı örnek çalışmalar Tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2.2: Aptamer temelli elektrokimyasal biyosensörler için literatürde yer alan bazı örnekler.

Biyotanıma Birimi	Diğer Biyosensör Bileşeni	Analit	Kaynaklar
S protein	Altın nanoparçacıklar	SARS-CoV-2	[33]
DNA bazlı spesifik aptamer	Ferrosen (veya metilen mavisi) ve tiyol grupları etiketleri	Cıva (II) ve kurşun (II) iyonları	[37]
Yüksek afiniteli 5'-aminoheksil bağlı aptamer	Poliakrilonitril/polipirol nanolifler	A549 hücreleri	[34]
sgc8c aptameri	Altın nanoparçacıklarla dekore edilmiş poli(3,4-etilendioksitiyofen)	İnsan lösemik lenfoblastları	[38]

2.1.3. Antikor Temelli Biyosensörler

Antikorlar, patojenler, toksik materyaller de dâhil olmak üzere yabancı maddelerin (antijen) varlığına karşılık olarak immün sistem tarafından üretilen koruyucu proteinlerdir [10]. Biyotanıma için antikor kullanan biyosensörler, tespit için antikor ve antijen arasındaki yüksek afiniteden yararlanır ve immünosensörler olarak adlandırılır [39]. Antikor temelli biyotanıma elemanı içeren biyosensörlere ait örnek çalışmalar Tablo 2.3’de verilmiştir.

Tablo 2.3: Antikor temelli elektrokimyasal biyosensörler için literatürde yer alan bazı örnekler.

Biyotanıma Birimi	Diğer Biyosensör Bileşeni	Analit	Kaynaklar
Anti-HER-2	İndirgenmiş grafen oksit üzerine sabitlenmiş molibden trioksit	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (HER-2)	[40]
Anti-CEA	Polioktopamin	Karsinoembriyonik antijen (CEA)	[41]
SARS-CoV-2 antikoru	Grafen oksit-altın nanokompoziti	SARS-CoV-2 antijeni	[42]

2.1.4. Hücre Temelli Biyosensörler

Hücreler, doğrudan immobilizasyon sırasında etkisiz hale gelen enzimlerin varlığında veya enzimin saflaştırılması mümkün olmadığı zamanlarda enzimlere alternatif olarak kullanılır. Hücrelerde bulunan enzimler, doğal konformasyonları korunduğu için uzun süreli stabiliteye sahip olmaktadır. Bu durum tasarlanan biyosensörün de stabilitesinin arttırılmasına katkı sağlayabilmektedir. Molekül tabanlı yaklaşımların aksine, hücre temelli biyosensör grupları geniş bir algılama yelpazesine sahiptir. Bütün hücrelerin çoklu enzim alternatifi sunması nedeniyle çeşitli analitlerin eşzamanlı olarak belirlenmesi için biyosensörün geliştirilmesinde tercih edilebilirler. Ayrıca, hücre temelli biyosensörler uygun substratlar kullanılarak yerinde izlemeyi de mümkün kılmaktadır [10, 43, 44]. Hücre temelli biyotanıma elemanı içeren biyosensörlere ait örnek çalışmalar Tablo 2.4’de verilmiştir.

Tablo 2.4: Hücre temelli elektrokimyasal biyosensörler için literatürde yer alan bazı örnekler.

Biyotanıma Birimi	Diğer Biyosensör Bileşeni	Analit	Kaynaklar
RAW 264.7 makrofaj hücreleri	Aljinat/grafen oksit	Hidrojen peroksit	[45]
Caco-2 hücreleri	Gümüş nanotellerle kaplanmış platinize altın elektrot	Hidrojen peroksit	[46]
A549 hücreleri	Karbon nanofiberler/manganez dioksit nanoteller/altın nanoparçacıklar	Hidrojen peroksit	[47]
RBL-2H3 hücresi	Aljinat/grafen oksit/çok duvarlı karbon nanotüpler	3OC12-HSL	[48]

2.1.5. Enzimatik Biyosensörler

Enzimler, biyokimyasal reaksiyonlar/dönüşümler için etkili biyolojik katalizörlerdir ve belirli bir substrat ya da bir substrat grubu için olağanüstü etkileşim özelliği sunarlar [10]. Bir numunedeki glukoz konsantrasyonunu doğrudan ölçmek için bir amperometrik oksijen elektrotunun yüzeyinde glukoz oksidazın yarı geçirgen bir diyaliz zarı aracılığıyla immobilizasyonu, Clark ve Lyons tarafından 1962’de ilk biyosensör olarak tanımlanmıştır [49]. Bu gelişmeden sonra çeşitli analitleri belirlemek için çok sayıda enzimatik biyosensörler geliştirilmiştir. Enzimatik türde

biyotanıma elemanı içeren biyosensörlere ait çeşitli çalışmalar Tablo 2.5’de gösterilmiştir. Bir biyosensörün yapımı sırasında en kritik parametrelerden biri de biyokatalizörün immobilizasyonudur. Biyokatalizörün verimli bir şekilde immobilizasyonu, işlevsel verimliliğini arttırmaya yardımcı olur ve biyosensörün tekrar üretilebilirliğini ve yeniden kullanılabilirliğini artırır [10, 50]. Destek matris türüne ve dâhil olan bağ türüne göre kategorize edilebilecek enzimlerin immobilizasyonu için kullanılan birkaç metot vardır. Bunlar, fiziksel adsorpsiyon, kovalent bağlanma, çapraz bağlanma gibi yöntemleri içerir [51, 52]. Tez çalışması kapsamında biyolojik tanıma üniteleri arasından enzimler tercih edilmiş olup hem üre hem de BPA analitleri için enzimatik biyosensörler tasarlanmıştır. Üre biyosensörü için üreaz, BPA için ise lakkaz enzimleri çapraz bağlanma yöntemiyle elektrot yüzeyine immobilize edilmiştir.

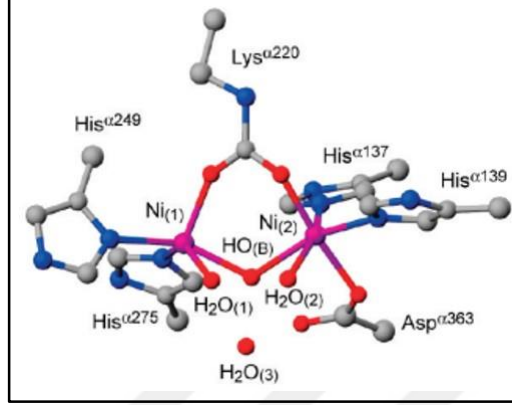
Tablo 2.5: Enzim temelli elektrokimyasal biyosensörler için literatürde yer alan bazı örnekler.

Biyotanıma Birimi	Diğer Biyosensör Bileşeni	Analit	Kaynaklar
Glukoz oksidaz	Kitosan/Au-Ti	Glukoz	[53]
Glukoz oksidaz	Au nanoparçacıklar ile işlevselleştirilmiş 3D ZnO nanoyapıları	Glukoz	[54]
Kolin oksidaz	Karbon nanotüpler ve altın nanoparçacıklar	Kolin	[55]
Kolin oksidaz	Çok duvarlı karbon nanotüpler/zirkonyum oksit	Kolin	[56]
Kolesterol oksidaz	Nano gözenekli altın	Kolesterol	[57]
Lakkaz	Karbon noktaları	Dopamin	[58]
Asetilkolinesteraz	Titanyum dioksit sol-jel taşıyıcı	Organofosforlu pestisitler	[59]

2.1.5.1. Üreaz Enzimi

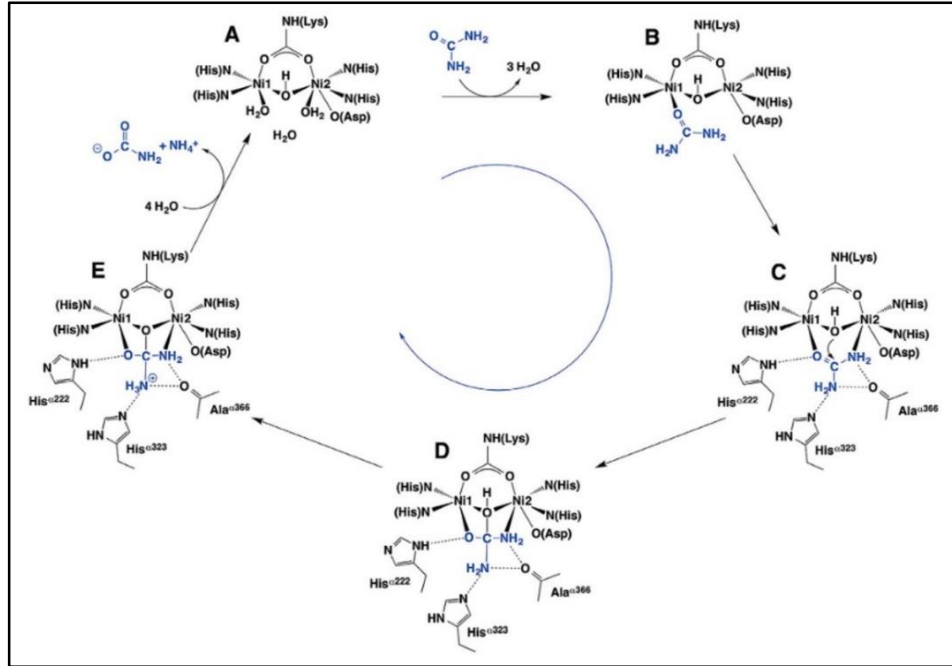
Üreaz bitkiler, algler, mantarlar ve çeşitli prokaryotlar da dâhil olmak üzere çok çeşitli organizmalarda bulunan yapısında nikel içeren bir enzimdir (Şekil 2.2) [60, 61]. Bitki ve bakteriyel üreazların amino asit dizileri benzer olmasına rağmen, bazı biyolojik aktivitelerde önemli ölçüde farklılık gösterir. Yapısal bilgiler yalnızca bakteriyel üreazlar için mevcut olup, en iyi çalışılmış bitki üreazı olan jack bean üreaz

(*Canavalia ensiformis*) dır. Ayrıca, 1926'da kristalize edilen ilk enzim olma özelliği göstermektedir ve hatta enzimlerin kristalleşebilir olduklarının keşfi ile 1946 Kimya Nobel ödülüne lâyık görülmüştür [62].



Şekil 2.2: Ni²⁺'nin doğal üreaz aktif bölgesinde koordinasyon geometrisi.

Bugüne kadar bilinen en yetkin enzimler olan üreazlar, ürenin amonyum ve bikarbonat iyonlarına hidrolizini katalize eder. Üreazların aktif bölgesinde yer alan iki nikel atomunun yanı sıra, yapıda bir karbamillenmiş lizin, dört histidin ve bir aspartat mevcuttur.



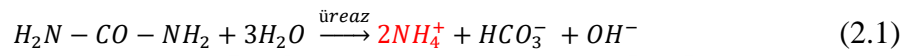
Şekil 2.3: Üreazın katalitik mekanizması.

Lizin iki nikel atomu arasında köprü kurar, Ni(1) iki histidin tarafından koordine edilir ve Ni(2) diğer iki histidin ve bir aspartat ile koordine olmuş yapıdadır. Üreaz tarafından katalize edilen üre hidrolizinin mekanizması çok tartışılan bir konu olmuştur, ancak güçlü bir şekilde desteklenen mekanizma Şekil 2.3'te verilmiştir. Üreaz aktif bölgesindeki su molekülleri (A) üre karbonil oksijen yoluyla Ni(1) iyonuna bağlanır ve üre karbonunu daha elektrofilik ve dolayısıyla nükleofilik saldırıya daha duyarlı hâle getirir (B). Daha sonra bu bağın, NH₃ ve karbamatin salındığı (E) bir tetrahedral ara ürünle sonuçlanan (C) karbonil karbon üzerindeki su nükleofilik saldırısını (D) kolaylaştırdığı düşünülmektedir [63].

2.1.5.2. Ürenin Önemi ve Biyosensör Uygulamaları

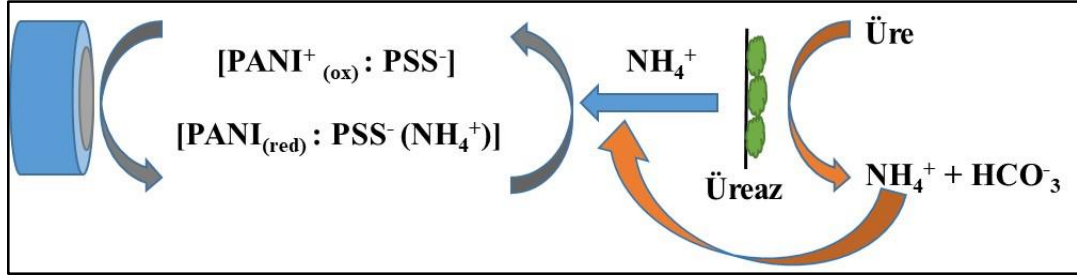
Üre (karbamid), CO(NH₂)₂ kimyasal formülüne sahip bir moleküldür ve azot metabolizmasının bir son ürünü olarak insan vücudunda protein yıkımından üretilir [64]. Üre miktarının belirlenmesi, böbrek ve karaciğer fonksiyon bozukluğunun potansiyel bir göstergesi olarak tıbbi tanıda [65-67] ve aynı zamanda gıda güvenliği [68, 69] ve çevre kontrolünde de [70, 71] son derece önemlidir. Gıda endüstrisinde, üre tespiti süt ve ilgili ürünlerinin kalite kontrolünde kullanılmaktadır [72, 73]. Üre, çeşitli ve geniş alanlarda uygulamaları bulunan mükemmel bir analit örneğidir [74]. İlk kez Guilbault ve Montalvo tarafından enzim katalizli üre tayini için potansiyometrik bir üreaz enzim elektrotu geliştirilmiştir [75]. Daha sonra farklı alanlardaki üre düzeylerini izlemenin önemi nedeniyle, farklı dönüştürücü mekanizmalarını kullanan birçok farklı üre biyosensörü gösterilmiştir. Bunlar arasında ağırlıklı olarak amperometrik [76], potansiyometrik [77] ve optik [78, 79] yöntemler incelenmiştir. Ayrıca enzimatik [70, 80] ve enzimatik olmayan [65, 68] prosedürler de geliştirilmiştir. Ancak, enzim temelli biyosensör cihazları son birkaç yıl içinde kapsamlı bir şekilde geliştirilmiştir ve çok çeşitli uygulamalar üzerinde çeşitli hedef analitlerin kalitatif ve kantitatif analizinde yenilikçi teknikler doğrultusunda kullanılmıştır. Enzim temelli biyosensörlerin yüksek hassasiyet, özgüllük, taşınabilirlik, maliyet etkinliği ve minyatürleştirme gibi sağladığı avantajlar onları klinik analiz, gıda güvenliği odaklı araştırmalar için giderek daha cazip hâle getirmektedir [81]. Literatür çalışmaları da incelendiğinde ağırlıklı olarak enzimatik üre biyosensörlerine odaklanıldığı gözlenmektedir ve üreaz immobilizasyon matrisi olarak polipropilen membran [82], polipirol filmi [83], platin ve grafit kompozit [84],

nanogözenekli alümina membranlar [85], polivinil alkol-poliakrilamid kompozit [86], altın nanopartiküller [87], kitosan-demir oksit manyetik nanoparçacıkları [88], modifiye edilmiş fulleren nanomalzemeleri [89], grafen oksit [90], karbon nanotüp [91] gibi çeşitli yapılar kullanılmıştır. Ayrıca Mahadeva ve arkadaşları kalay oksit kaplı selüloz nanokompozit temelli bir kondüktometrik üre biyosensörü geliştirmişlerdir [92]. Duong ve arkadaşları ise bir selüloz türeviden olan etil selüloz kullanarak floresan üre biyosensörü üzerine çalışmışlardır [93]. Bu çalışmalara rağmen düşük tespit limiti, özgüllük, yapım basitliği ve kullanım kolaylığı avantajı gibi özelliklerinden dolayı elektrokimyasal yöntemle ölçüm yapan (biyo)sensörler ön plana çıkmaktadır [9].



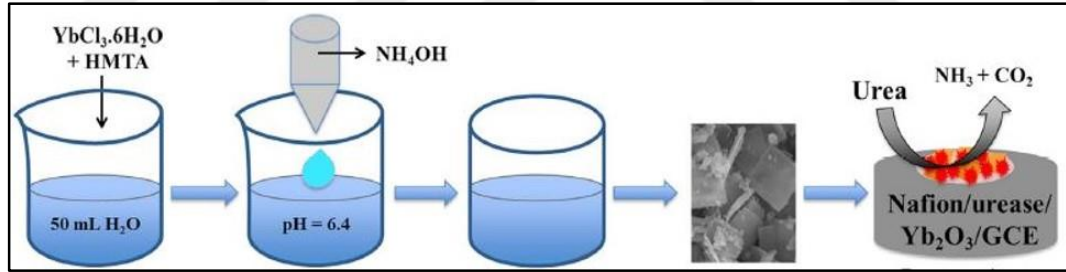
Eşitlik 2.1’de görüldüğü gibi üreez, üre ile reaksiyona girerek katalitik olarak onu amonyum ve bikarbonat iyonlarına dönüştürür. Herhangi bir üre biyosensörünün etkinliği, bu iyonların etkili bir şekilde tespit edilmesine bağlıdır. Ürenin enzimatik hidrolizi elektrokimyasal olarak aktif değildir, bu nedenle çoğu durumda bir sinyal elde etmek için farklı pH değerlerine duyarlı redoks medyatörleri ve iletken polimerler kullanılır [94, 95]. Üre tespiti için alternatif bir yöntem olarak, bir elektrik sinyali oluşturmak üzere ikinci bir enzim veya metal katalizörler kullanılabilir. Srivastava ve arkadaşları üreez kullanarak bir amperometrik üre biyosensörü ve amonyanın elektrokimyasal oksidasyonu için ikinci bir enzim olan glutamat dehidrojenaz kullanmıştır [96]. Bununla birlikte, ikili enzimlerin kullanılması, sensör tasarımının karmaşıklığını artırır ve maliyet/performans oranını yükseltir. Son zamanlarda, NH_4^+ ’nin elektrokatalitik oksidasyonu için bir metal katalizör kullanan ümit verici bir amperometrik üre sensörü çalışmaları yayımlanmaktadır [94]. Platin gibi metal katalizörler amonyanın oksidasyonu için geniş çapta araştırılmıştır [97]. Ayrıca, amonyum iyonu seçici elektrotlar kullanılarak üretilen amonyum iyonunu ya da pH cam elektrotları ve alan etkili transistörler kullanarak enzim aktivitesinden kaynaklanan pH değişikliğini izleyen çalışmalarda literatürde yer almaktadır [84, 98, 99]. Üre tespiti için tasarlanan biyosensörlerde polipirol [100], polianilin (PANI) [91] ve poli (vinilferrosen) perklorat [101] gibi çeşitli iletken polimerlerden de faydalanılmıştır. PANI temelli üre biyosensörlerinde, elektrokimyasal sinyal, PANI’nin üreez tarafından üre hidrolizi sırasında serbest bırakılan NH_4^+ ile etkileşmesiyle üretilir (Şekil 2.4) [94]. Tez çalışması kapsamında da hem üre hem de

BPA için tasarlanan biyosensörlerde iletkenliği artırmak için PANI tercih edilmiştir. Tablo 2.6’da çeşitli enzimatik üre biyosensörleri çalışmaları özetlenmiştir.



Şekil 2.4: Nano-PANI: polistiren-sülfonat (PSS) biyosensörünün NH_4^+ algılama mekanizması.

İbrahim ve arkadaşları ürenin seçici tespiti için iki boyutlu Yb_2O_3 nanodisk tabanlı biyosensör geliştirmişlerdir (Şekil 2.5). Üreaz immobilize edilen bu kompozit sistem su örneklerinde üre tespiti için de kullanılmıştır. Ayrıca, belirli girişim yapan türlere karşı iyi seçicilik, uzun vadeli stabilite, tekrar üretilebilirlik ve tekrarlanabilirlik özellikleri sunduğunu belirtmişlerdir [71].



Şekil 2.5: Yb_2O_3 nanodisk sentezinin şematik gösterimi, GCE modifikasyonu ve üre tespiti için uygulaması

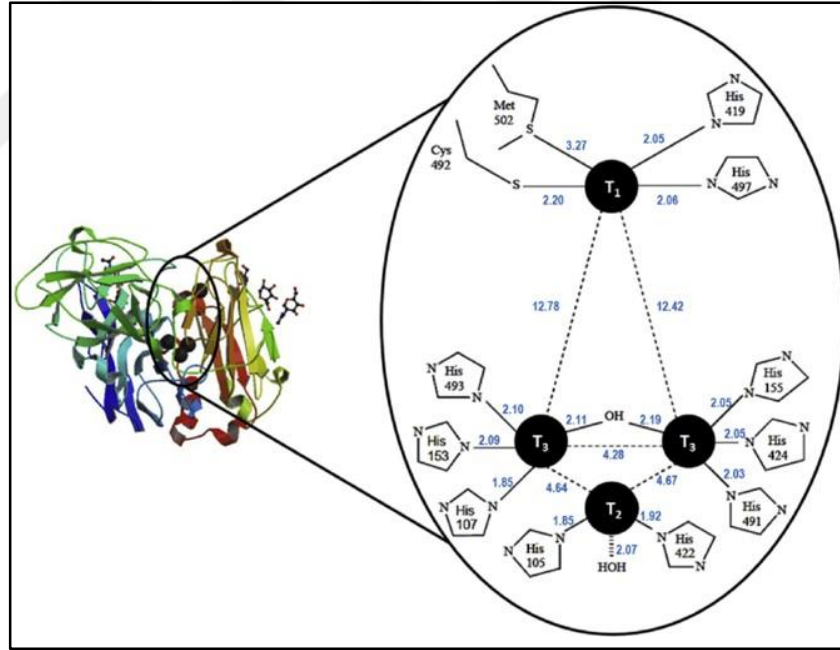
Üre (biyo)sensörleri ekonomik açıdan iyi bir pazar olma potansiyeline sahiptir ve biyolojik kararlılık, sinyal iletimi, hassasiyet ve maliyet etkinliği konularında iyileştirmeye hâlen ihtiyaç duyulmaktadır. Klinik olarak önemli metabolitlerin eşzamanlı tespiti ile böbrek bağlantılı hastalıkların hızlı bir şekilde tespit edilebilmesi için ucuz ve tek kullanımlık biyosensörlerin geliştirilmesine yönelik ilgi ise önemini korumaktadır [75]. Biyosensörlerde kullanılan gelişmiş farklı tekniklerin ve çeşitli sentezlenmiş yeni malzemelerin bu gelişmeye katkı göstereceği düşünülmektedir.

Tablo 2.6: Literatürde yer alan bazı enzimatik üre biyosensörleri.

Kompozit Sistem	Yöntem	Teşhis Sınırı	Doğrusal Ölçüm Aralığı	Kaynak
Elektro-birikimli gümüş indirgenmiş grafen oksit	Elektrokimyasal	0.163 μ M	0–10000 μ M	[102]
Fe–ZnO	Elektrokimyasal	2.5 μ M	0.8–4.0 μ M	[103]
Gümüş nanoparçacıklar	Kolorimetrik	0.0036 mM	0.00625–1 mM	[104]
Nanolifli polianilin:polistiren-sülfonat	Elektrokimyasal	51.8 μ M	200 – 900 μ M	[94]
Platin nanoparçacık modifiyeli Poli(pirrol-ko-1-(2-Aminofenil)pirrol)	Elektrokimyasal	7.58 μ M	0.1 to 30 mM	[105]
Oksazin 170 perklorat-etil selüloz membran	Floresans	0.224 mM	0.1–1.0 M	[93]
Dopamin işlevli CuInS ₂ kuantum noktaları	Floresans	0.1 mM	0.2–6 mM	[106]
Çinko oksit ve çok duvarlı karbon nanotüpler	Elektrokimyasal	0.23 mM	0.8–16.6 mM	[107]
Zeolitik imidazolat çerçevesi	Optik	0.1 mM	1–10 mM	[108]
Kitosan-g-polipirol	Optik	-	0.01–30 mM	[109]
<i>p</i> -dimetilaminobenzaldehit	Kolorimetrik	0.1 mM	2.5–100 mM ve 100–1000 mM	[110]
Fe ₃ O ₄ / çok duvarlı karbon nanotüp-polianiline	Elektrokimyasal	67 μ M	1.0–25.0 mM	[91]
Çok duvarlı karbon nanotüp/polianilin	Elektrokimyasal	10 μ M	10–50 μ M	[111]
Poli(propilen-ko imidazol)/altın nanopartiküller	Elektrokimyasal	36 μ M	0.1–30 mM	[70]
Epoksi ve ferrosen fonksiyonel polimerik aracılı fonksiyonelleştirilmiş altın mikroığneler	Elektrokimyasal	2.8 μ M	50–2500 μ M	[17]
Karbon nanotüp/poli(o-toluidin)	Elektrokimyasal	0.03 mM	0.1–11 mM	[112]
Çok duvarlı karbon nanotüp-inülin-TiO ₂	Elektrokimyasal	0.9 μ M	0.083–25 mM	[69]
ZnO-grafen nanoyapılı ince film	Elektrokimyasal	3.36 mM	5.0–125.0 mM	[113]
Poliamid 6 ve polipirolün elektrospun nanofiberleri	Elektrokimyasal	0.011 mM	0.1–250 mM	[114]
Nano-ZnO/polivinil alkol/TiO ₂	Elektrokimyasal	2.0 mM	5–205 mM	[115]
İki boyutlu iterbiyum oksit/Nafyon	Elektrokimyasal	~ 2 μ M	0.05–19 mM	[71]

2.1.5.3. Lakkaz Enzimi

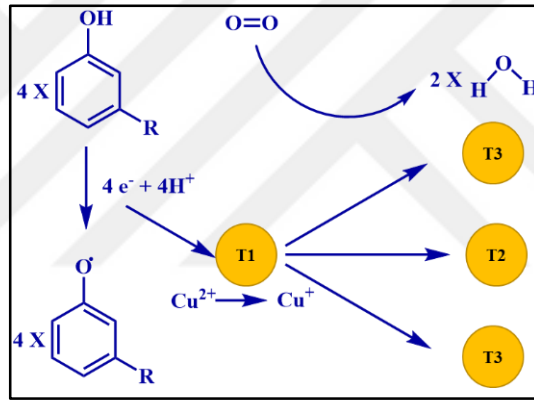
Aktif bir holoenzim formu olarak lakkaz molekülü, genellikle üç redoks bölgesine (Tip 1 (T1), Tip 2 (T2) ve Tip 3 Cu çifti (T3)) bağlı monomer başına dört bakır (Cu) atomu içeren dimerik veya tetramerik bir glikoproteindir [116]. Lakkaz aktif bölüme, bakır atomları ve ligand mesafesi ile ilgili yönelimi gösteren şematik gösterimi Şekil 2.6'da verilmiştir [117]. Katalitik aktivite için aktif protein birimi başına en az dört Cu atomu gereklidir. Tüm Cu atomları, farklı spektroskopik ve paramanyetik aktiviteleri ile tanımlanabilir. Tüm "mavi" multibakır oksidazlar için T1 bölgesi ile T2/T3 kümesi arasındaki mesafe 12 ile 14 Å aralığındadır. Oksidasyon, indirgeyici substrattan elektronları kabul eden ve onları Cys-His yoluyla T2/T3 trinükleer bakır kümesine aktaran T1 bölgesinin yakınında gerçekleşir. Bu, enzimin oksitlenmiş formunun moleküler oksijenin suya indirgenmesi zaman tamamen indirgenmiş bir duruma dönüştürülmesiyle sonuçlanır [116].



Şekil 2.6: Lakkaz aktif bölüme, bakır atomları ve ligand mesafesi ile ilgili yönelimi gösteren şematik gösterim.

Yani, çoklu bakır polifenol oksidaz olarak bilinen lakkaz, oksijen varlığında elektrot yüzeyinde fenolik bileşiklerin elektrokimyasal olarak *o*-kinonlara oksidasyonunu katalize eder (Şekil 2.7) [117]. Bu kataliz işlemi lakkaz, redoks aktif merkez sistemi olarak $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$ ile moleküler oksijeni suya indirger ve onunla

birlikte fenollerin oksidasyonunu sağlar. Enzimin tamamen indirgenmesi için dört elektronun ($4e^-$) art arda oksidasyonu gerekir. Bu mekanizmaya göre, lakkazları T1 redoks potansiyelinin değerine bağlı olarak üç kategoriye ayırmak mümkündür: düşük, orta ve yüksek potansiyelli. Redoks potansiyelinin değeri, T1 bakırın ligandlarından ve T1 cebini oluşturan amino asitlerden etkilenir. Bu nedenle, yüksek redoks potansiyeline sahip tüm lakkazlar, T1 bakır bölgesine birleştirilmiş aynı amino asit dizisine sahiptir. Yüksek potansiyelli lakkazda, T1 Cu ile His'lerden biri arasındaki mesafe, orta potansiyel grubun, örneğin *Coprinus cinereus*'tan olan mesafe ile karşılaştırıldığında daha uzundur. Son birkaç yılda, farklı türde elektrotların, nanomalzemelerin ve destek materyallerinin mevcudiyeti sayesinde, literatürde lakkazları farklı elektrokimyasal transdüksiyon sistemlerine dâhil eden birkaç biyosensör tanımlanmıştır [118].

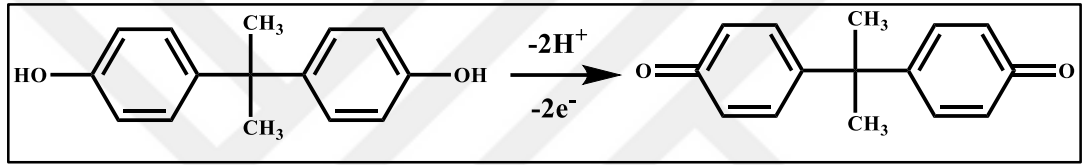


Şekil 2.7: Lakkazın katalitik döngüsü.

2.1.5.4. BPA'nın Önemi ve (Biy)sensör Uygulamaları

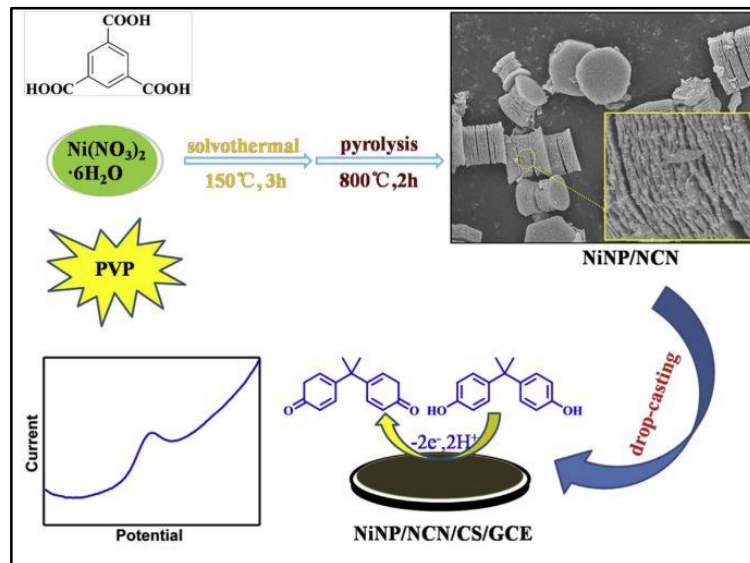
Endokrin bozucu olarak adlandırılan Bisfenol A (BPA, 2,2-Bis-(4-hidroksifenil) propan), iki hidroksi fenil grubu içeren kimyasal bir yapıya sahiptir. Gıda kapları, su şişeleri ve teneke kutuların üretiminde polikarbonat, poliakrilat ve polisülfon sentezlerinin hammaddesi olarak kullanılmaktadır [119]. Östrojen bağlayıcılara afinitesi olan endokrin hormonlara benzer moleküler yapıya sahip bir fenolik grup içermesi nedeniyle de düşük konsantrasyonlarda bile insan sağlığına oldukça zararlıdır [120]. Endokrin bozucu yapıların endokrin sisteme müdahale ederek obeziteye, kardiyovasküler hastalıklara, diyabete ve nörotoksisiteyle ilgili hastalıklara neden olduğu bilinmektedir [121]. Bu nedenle, yüksek hassasiyet, seçicilik, geniş çalışma

aralığı ve düşük tayin sınırı ile BPA tayini için (biyo)sensör platformlarının geliştirilmesi hâlen önemini korumaktadır. Literatürde enzimatik ve enzimatik olmayan mekanizmalarla ilgili BPA'nın tespiti için çeşitli kolorimetrik [122], florimetrik [123] ve elektrokimyasal [124] çalışmalar bulunmaktadır. Enzimatik yöntemlerde BPA tanıma kısmında enzim olarak tirozinaz [125], lakkaz [126] ve yaban turpu peroksidaz (HRP) [127] kullanılmıştır. Bununla birlikte, tirozinaz veya yaban turpu peroksidaz gibi redoks enzimleri, düşük yapısal stabiliteye ve kendi kendini engelleme problemlerine yol açar. Lakkaz enzimi bu iki enzimden daha kararlı ve ucuzdur [128, 129]. Bu nedenle tez çalışmasında lakkaz enziminin kullanılması tercih edilmiştir. Tablo 2.7'de literatürde yer alan bazı enzimatik BPA biyosensörleri listelenmiştir.



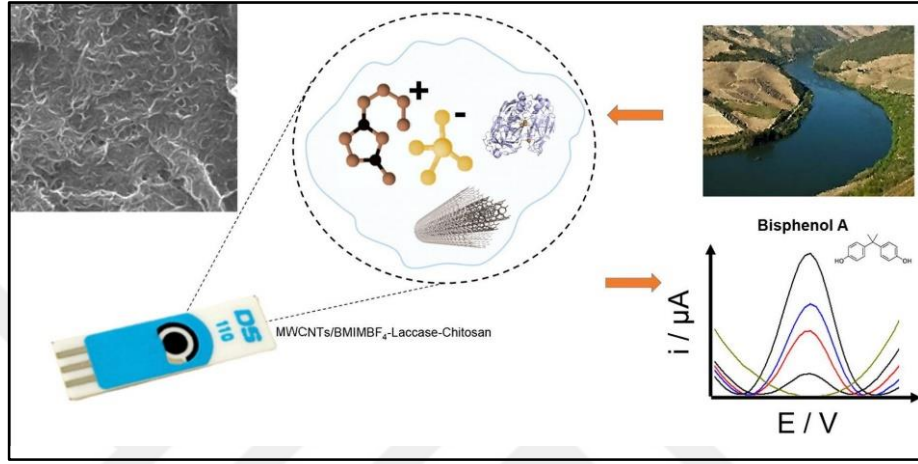
Şekil 2.8: BPA'nın elektrooksidasyon mekanizması.

BPA'nın elektrokimyasal tespiti, yapısında bulunan fenolik grupların iyi bilinen elektroaktivitesine dayanmaktadır. BPA'nın elektrooksidasyon reaksiyon mekanizması iki elektron ve iki proton transferi ile gerçekleşir (Şekil 2.8) [130].



Şekil 2.9: BPA'nın nikel nanoparçacık/azot katkılı karbon nanolevha nanokompozitini içeren sensör ile elektrokimyasal tespiti.

Enzim içermeyen sistemlerde de BPA elektroaktif özellik gösterir ve elektrokimyasal yöntemle tespiti mümkündür. Wang ve arkadaşları enzim içermeyen bir sistem ile BPA tespiti için nikel nanoparçacık/azot katkılı karbon nanolevha nanokompoziti geliştirmişlerdir (Şekil 2.9) [131]. Enzimatik sistemlerde ise enzimlerin gösterdiği katalitik etkiden faydalanılmış ve farklı bir bakış açısı ile yeni biyosensörler tasarlanmıştır.



Şekil 2.10: Lakkaz ve çok duvarlı karbon nanotüp içeren BPA biyosensörünün şematik gösterimi.

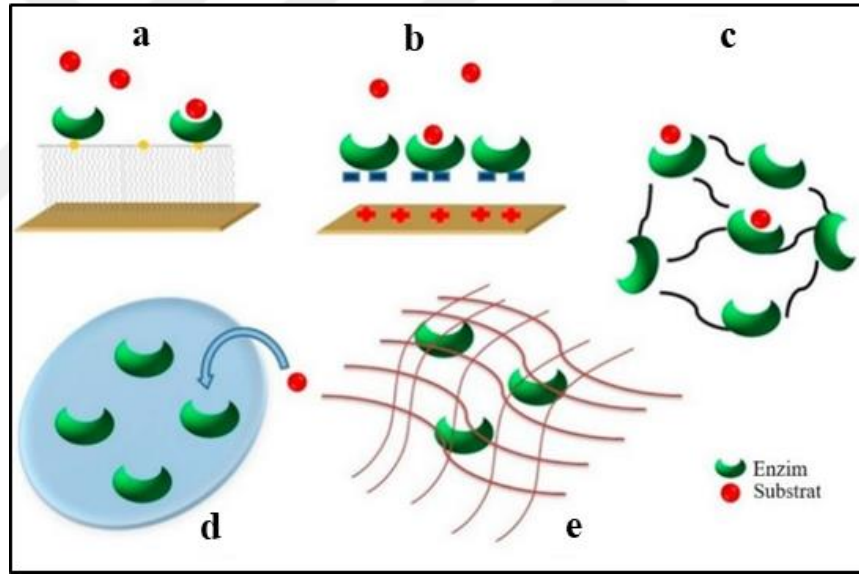
Bravo ve arkadaşları BPA tespiti için Lakkaz immobilize edilmiş ve çok duvarlı karbon nanotüp içeren ekran baskılı grafit elektrot geliştirmişlerdir (Şekil 2.10). Kare dalga voltametri yönteminde elde edilen ve nehir suyunda yapılan ölçüm verilerine göre Lakkazın enzim aktivitesine dayalı doğru ve hassas bir BPA biyosensörü geliştirildiği belirtilmiştir [132].

Tablo 2.7: Literatürde yer alan bazı enzimatik elektrokimyasal BPA biyosensörleri.

Enzim	Kompozit Sistem	Gözlenebilme Sınırı	Doğrusal Ölçüm Aralığı	Kaynak
Tirosinaz	İndirgenmiş grafen oksit levhalar ve kitosan	0.74 nM	0.01–50 µM	[125]
Tirosinaz	Fonksiyonel grafen-altın nanokompozit	1.0 nM	2.5×10^{-3} –3.0 µM	[133]
Lakkaz	Tiyonin-karbon siyahı nanokompozit ile modifiye edilmiş ekran baskılı elektrot	0.2 µM	0.5–50 µM	[126]
Lakkaz	Gümüş katkılı çinko oksit nanoparçacıklarla işlevselleştirilmiş çok duvarlı karbon nanotüpler	6.0 nM	0.5–2.99 µM	[134]
HRP	Altın nanoparçacıklar/tiyol işlevli indirgenmiş grafen oksit	2.6×10^{-12} M	2.0×10^{-11} – 1.18×10^{-9} M	[127]

2.1.6. Biyolojik Tanıma Elemanı İmmobilizasyon Yöntemleri

Biyolojik tanıma elemanının immobilizasyonu DNA, enzim, hücre gibi biyomoleküllerin yapı ve biyolojik kararlılıklarının korunabilmesi için gereklidir. Aktivite veya stabilite kaybı sorunu biyomoleküllerin inert bir destek materyaline entegre edilmesiyle çözülebilmektedir. Adsorpsiyon, kovalent bağlanma, çapraz bağlama gibi yöntemler çeşitli biyomolekül immobilizasyon teknikleri olarak geliştirilmiş ve literatürde yer alan biyosensör çalışmalarında etkin bir şekilde kullanılmıştır. Her yöntemin kendi içinde avantaj ve dezavantajları olmakla beraber immobilizasyon yönteminin seçimi, immobilize edilecek biyomolekülün çeşidine ve biyomoleküllerin immobilize edildiği yüzeyin yapısına göre çeşitlilik gösterebilir [135]. Şekil 2.11’de çeşitli immobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi verilmiştir [136].



Şekil 2.11: Biyolojide kullanılan yaygın immobilizasyon yöntemleri: a) Kovalent bağlanma, b) Adsorpsiyon, c) Çapraz bağlama, d) Kapsülleme ve e) Tuzak.

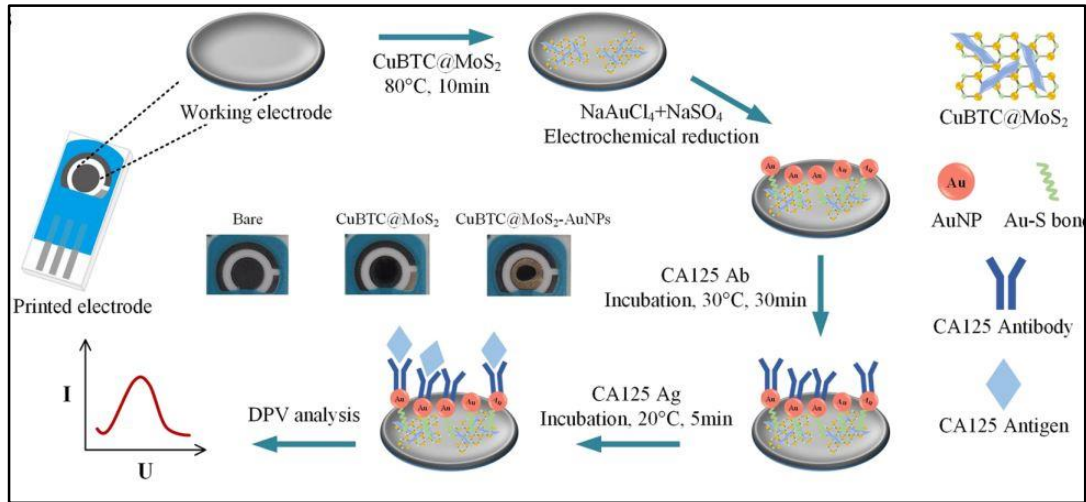
2.1.6.1. Kovalent Bağlanma

Biyolojik tanıma elemanları için geleneksel bir yöntem olarak bilinen kovalent bağ ile immobilizasyon, destek malzemeleri ile fonksiyonel gruplar arasında kimyasal reaksiyonlar oluşturulmasıyla elde edilir. Kovalent bağlar, biyolojik tanıma elemanlarının destek matrislerinden ayrılmasını önlemek için uygun bir yöntemdir ve ayrıca immobilize edilmiş yapıların stabilitesini artırır. Ancak enzim molekülleri ve

destek matrisleri arasındaki kimyasal reaksiyonlar nedeniyle biyolojik tanıma elemanları aktif bölgeleri aktivitesini kaybedebilir ve bu da katalitik aktivitelerde önemli bir azalmaya neden olabilir [137, 138].

2.1.6.2. Adsorpsiyon

Fiziksel, iyonik ve afinite olmak üzere çeşitlere ayrılan adsorpsiyon yöntemleri arasında fiziksel adsorpsiyon genellikle daha fazla tercih edilmektedir. Bu yöntemde, hidrojen bağları, van der Waals kuvvetleri, elektrostatik etkileşimler veya hidrofobik etkileşimlerden faydalanılarak enzimler, destek malzemelerin yüzeylerine adsorbe edilir [138]. Katyon ve anyon değişim reçineleri, aktif kömür, silika jel, alümina gibi malzemeler destek malzemesi olarak kullanılmaktadır [138-140]. Li ve arkadaşları, yumurtalık kanseri biyobelirteci olan CA125'in elektrokimyasal tespiti için yeni bir biyosensör geliştirmişlerdir. Bu biyosensör için CA125 antikorları elektrostatik adsorpsiyon yöntemi ile tricopperbenzene-1,3,5-trikarboksilat@molibden disülfür@altın nanoparçacıklar (CuBTC@MoS₂-AuNP) içeren elektrot yüzeyine immobilize edilmiş ve elde edilen bu biyosensör kanser biyobelirteçlerinin izlenmesinde kullanılmıştır (Şekil 2.12) [141].



Şekil 2.12: CA125 tespiti için basılı elektrotların CuBTC@MoS₂-AuNP'lerle modifikasyonu.

2.1.6.3. Çapraz Bağlanma

Çapraz bağlanma yolu ile immobilizasyon yöntemi moleküller arası reaksiyonlara dayalı olarak enzimlerin iki işlevli reaktifler kullanılarak destek malzemelere sabitlenmesine dayanmaktadır. Bu yöntemde, kovalent bağlarla biyolojik tanıma elemanları yeniden kullanılabilirlik ve stabiliteyi geliştirmek için hareketsizleştirilir. Glutaraldehit ve izosiyanat yaygın olarak kullanılan iki işlevli reaktiflerdir [138]. Taşıyıcı destek malzeme olarak metal [142] ve metal oksit nanoparçacıklar [143], biyopolimerler [144] ve iletken polimerler [145] tercih edilebilmektedir. Dabhade ve arkadaşları, suda Cr(VI)'nin amperometrik tespiti için ekran baskılı elektrot ile bir biyosensör geliştirmişlerdir. Bu çalışmada, kitosan, sodyum aljinat ve dekstran polisakkaritlerine gluteraldehit vasıtasıyla glukoz oksidazın immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir [146].

2.1.6.4. Tuzak

Bu yöntem, gaz kabarcıklarının, mekanik şeffaf ve hidrofobik çözücülerinin etkilerini en aza indirerek evre ile doğrudan teması önler ve enzimleri korumayı amaçlar. Ancak kütle transfer sınırlamaları ve düşük enzim immobilizasyonu gibi etkiler yöntemin pek çok dezavantaja sahip olmasına neden olmuştur. Enzim immobilizasyonu tipik olarak bir organik polimer veya sol-jel gibi bir polimer ağı kullanılarak gerçekleştirilir [147, 148].

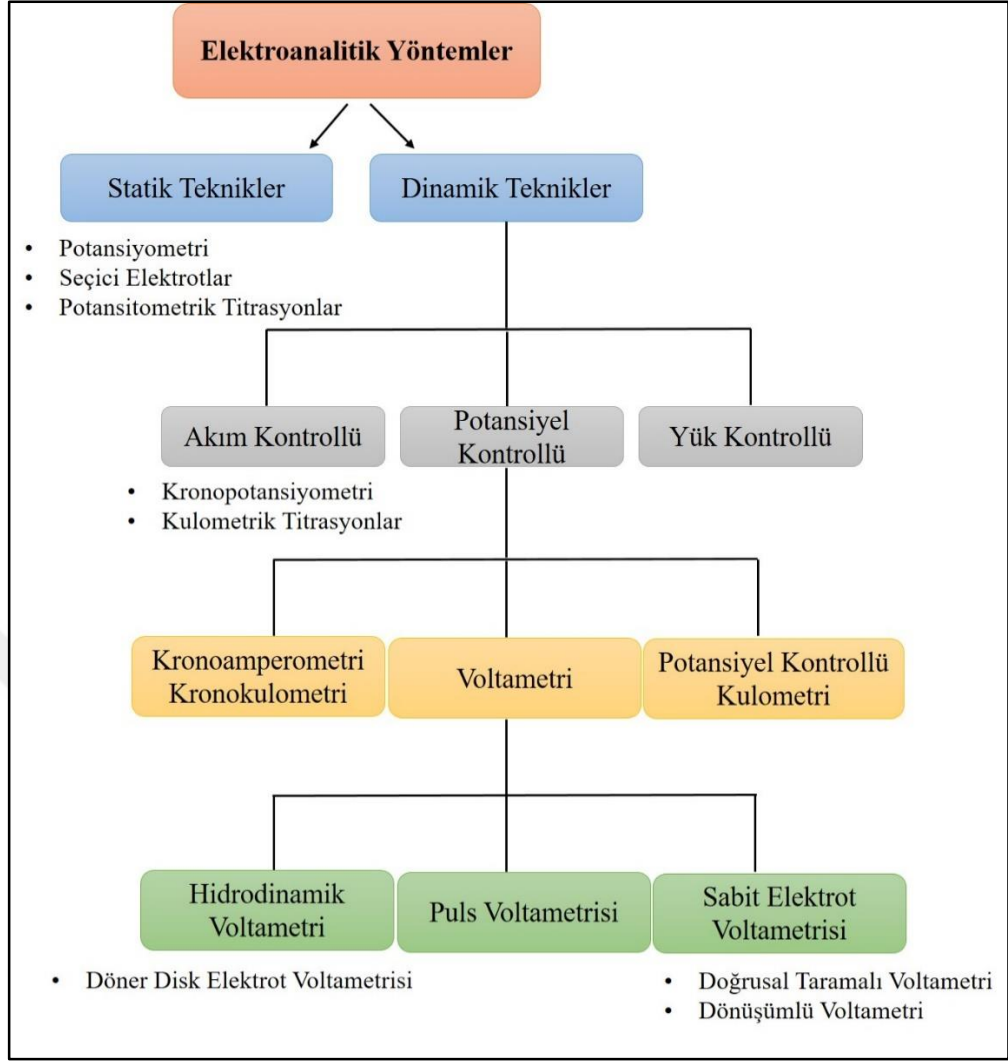
2.1.6.5. Kapsülleme

Tuzak yöntemine benzer şekilde, kapsülleme yöntemi de biyolojik tanıma elemanını dış ortamdan korur, ancak kütle transfer sınırlamasına neden olduklarından dolayı sınırlı bir uygulamaya sahiptir [147]. Literatürde *Trametes versicolor* lakkazı kapsüllemek için sulu bir polietilenimin çözeltisi içeren bir emülsiyon kullanılmıştır. Ayrıca bu yöntemin çeşitli hedef materyalleri tespit etmek için yararlı bir biyoaktif malzeme geliştirmek amacıyla farklı enzim ve substrat türlerine uygulanabileceği belirtilmiştir [149].

2.2. Elektroanalitik Yöntemler

Mevcut olarak pek çok analitin tayini için gaz kromatografisi (GC) [150], yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) [151] ve gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) [152] gibi yaygın olarak bilinen analitik cihazlar kullanılabilir. Ancak bu yöntemler karmaşık numune ön hazırlığı gerektirmesi, yerinde izleme için uygun olmaması ve uzman analist gerektirmesi gibi dezavantajlara sahiptir [9]. Bu nedenle yerinde analiz yapabilen, hassas, ucuz ve seçici elektrokimyasal (biyo)sensörlerin geliştirilmesi önemlidir.

Biyosensörler elektronik enstrüman ve biyolojik sistem arasındaki arayüzler olup, biyolojik tanıma elemanı molekülleri içeren analitik cihazlardır. Bu enstrümantasyon sistemindeki herhangi bir sensör için arayüzün işlevini etkin bir şekilde yerine getirme yeteneği oldukça önemlidir. Elektrokimyasal sensörler, kimyasal ve biyomedikal algılama elemanı olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır [153]. Örneğin, kanda yumurtalık kanseri biyobelirteci (miR-200a) [154], idrarda *Escherichia coli* [155], tükürükte grip A virüsü alt tipi H1N1'in Hemagglutinin proteini [156], terde glukoz ve laktat [157], çevresel sularda ağır metaller [158], gıda ürünlerinde laktoz [159] gibi analitlerin algılaması tamamen elektrokimyasal yollarla gerçekleştirilmektedir. Biyosensör bileşeni olan biyolojik tanıma elemanları hedeflenen analiti tanıyan biyosensör sistemlerindeki önemli bir bileşendir ancak tek başına bir biyosensör tasarımı olarak yeterli olmazlar ve sistemin bir dönüştürücü ile birleştirilmesi gerekmektedir. Bu dönüştürücü, biyolojik tanıma elemanlarından gelen sinyali elektrik sinyaline dönüştürür. Elde edilen sonuç, görsel olarak veya elektronik bir cevap olarak tespit edilebilir. Elektrokimyasal, optik veya kütle tabanlı dönüştürücüler biyosensör sistemlerinde yaygın olarak kullanılan dönüştürücülerdir [160]. Bunlar arasında elektrokimyasal dönüştürücüler her zaman cihazsal basitlik, düşük maliyet ve taşınabilir özellikleri kapsayan çeşitli analitik teknikler sağlamıştır [161]. Elektrokimyasal dönüştürücülü bir sistemde numunelerin bir biyoreseptör ile etkileşimi sonucu akım, potansiyel, empedans ve iletkenlik gibi saptanabilir sinyaller elde edilir. Bu sinyallerle bağlantılı olarak elektrokimyasal biyosensörler amperometrik, potansiyometrik, impedimetrik ve kondüktometrik olmak üzere çeşitli sınıflandırmalara dâhil edilmektedir [162, 163]. Şekil 2.13'de elektroanalitik yöntemlerin şematik gruplandırılması verilmiştir.



Şekil 2.13: Elektroanalitik yöntemlerin şematik gruplandırılması.

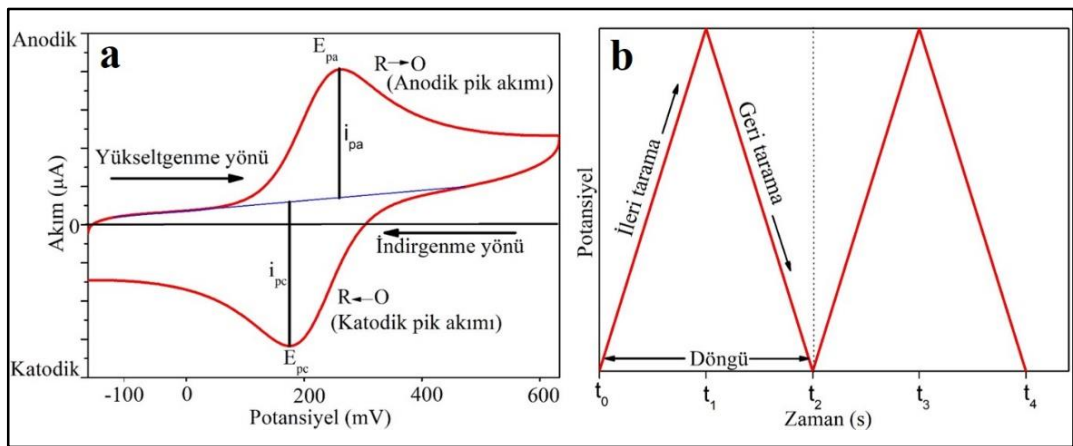
Kullanılan elektrokimyasal yöntemlere göre iki veya üç elektrotlu çalışma sistemleri kullanılabilir. Örneğin, potansiyometrik sensörler için, elektrot potansiyelinin ölçüldüğü sensör arayüzünde iki elektrot arasındaki potansiyel farkından bilgi elde edilebilir. Amperometrik sensörlerde ise bir elektroaktif analit türünün yükseltgenmesine veya indirgenmesine neden olmak için bir referans ve bir çalışma elektrotu arasında uygulanan potansiyelin kullanımından yararlanır ve sonuç olarak ortaya çıkan akım ölçülür [164]. Üç elektrotlu sistemde, ilgili reaksiyonun meydana geldiği çalışma elektrotu olarak camı karbon, indiyum kalay oksit veya karbon pasta gibi elektrotlar tercih edilebilir [165-167]. Ayrıca, referans elektrot olarak bir çalışma elektrotuna kıyasla sabit bir potansiyeli koruyan elektrot olarak Ag/AgCl veya Hg/Hg₂Cl₂, karşıt elektrot olarak ise genellikle platin gibi inert bir iletken madde kullanılır [168].

2.2.1. Voltametrik Yöntemler

Voltametri, akımın potansiyelin bir fonksiyonu olarak ölçülmesini ifade eden tüm tekniklerin genel adıdır. Çalışma elektrodunun elektrolit/elektrot arayüzündeki potansiyel farkı bir potansiyostat yardımıyla kontrol edilir [169]. Voltametrik teknikler, biyolojik, klinik ve çevresel türleri belirlemenin basit, uygun maliyetli ve hızlı bir yolu olması nedeniyle her geçen gün daha da önemli hale gelmektedir. Voltametrik teknikler analit için geçerli olan voltametrik pik potansiyeli sayesinde yüksek seçicilik ve hassasiyet gösterir. Ancak, bu tekniklerde karşılaşılan en büyük sorunlardan biri çok benzer oksidasyon pik potansiyelleri nedeniyle, örtüşen voltametrik tepkilerin elde edilmesidir. Bu sorunun üstesinden gelmek için çeşitli yeni geliştirilmiş malzemeler ve teknikler kullanılmaktadır [170]. Dönüşümlü voltametri, diferansiyel puls voltametrisi ve kare dalga voltametrisi gibi çeşitlere ayrılan voltametrik teknikler ilk bakışta çok farklı görünse de, temel prensipleri ve uygulamaları aynı elektrokimyasal teoriden kaynaklanmaktadır [171].

2.2.2. Dönüşümlü Voltametri (CV)

Dönüşümlü voltametri, redoks potansiyelleri hakkında bilgi edinebilmek ve elektroaktif analitlerin reaksiyonlarında yer alan mekanizmaları ve kinetik parametreleri araştırmak için tercih edilen en yaygın yöntemlerden biridir [172].



Şekil 2.14: Dönüşümlü voltametriye uygulanan potansiyelin a) Akımla b) Zamanla değişimini gösteren grafikler.

Bu yöntemde, çalışma ve karşıt elektrotlar arasındaki akım izlenir ancak, referans elektrot nedeniyle çalışma elektrotunun potansiyelindeki değişiklikler de kontrol edilmiş olur [172]. Ölçümler sonucundaki voltamogramlar akım-gerilim ölçümlerinin çizilmesiyle elde edilir. Potansiyelin zamanla değişme hızı da “tarama hızı” (mV/s veya V/s) olarak adlandırılır. CV’de, tarama hızı önemli bir parametredir ve tarama hızı-pik akımı değişimi ölçülerek adsorpsiyon, difüzyon ve heterojen elektrot reaksiyonunu takip eden kimyasal reaksiyonların özellikleri incelenebilir [173]. Şekil 2.14’te dönüşümlü voltametriye uygulanan potansiyelin akımla ve zamanla değişimini gösteren örnek grafikler belirtilmiştir. Grafik üzerinde belirtilen, E_{pa} =anodik pik potansiyelini, E_{pc} = katodik pik potansiyelini, I_{pa} =anodik pik akımını ve I_{pc} ise katodik pik akımını belirten kısaltmalardır. CV reaksiyon mekanizması üç farklı şekilde gerçekleşebilir. Bunlar; dönüşümlü, dönüşümsüz ve yarı dönüşümlü olarak adlandırılır. Dönüşümlü voltamogramda E_{pa} ile E_{pc} arasındaki gerilim farkının yaklaşık $(0.059/n)$ V olması, I_{pa} ile I_{pc} oranının ise yaklaşık olarak bire eşit olması beklenmektedir. Pik akımı için Randles-Sevcik eşitliği kullanılır ve transfer edilen elektron sayısı bu eşitlikten faydalanılarak belirlenebilir (Eşitlik 2.2). Bu eşitlikte, I_p (Amper); pik akımı, C (mol/cm³); konsantrasyon, A (cm²); yüzey alanı, D (cm²/s); difüzyon katsayısı, n (mol); aktarılan elektron sayısı, v (V/s); tarama hızıdır [174].

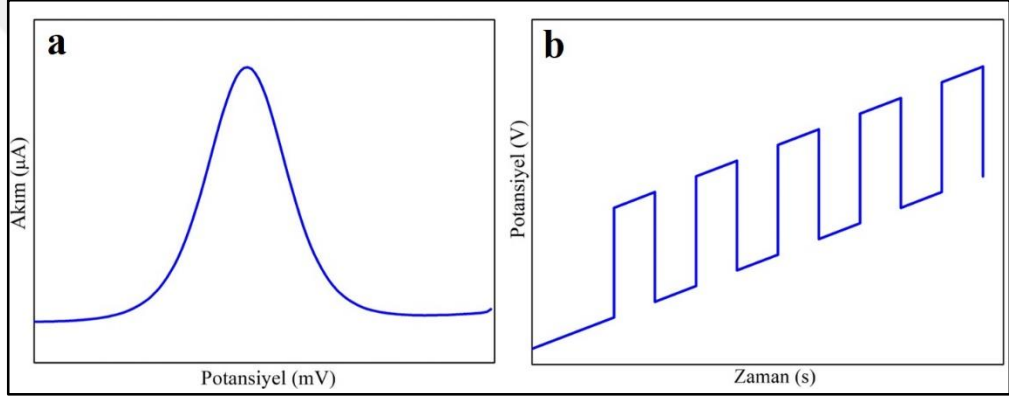
$$I_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D_0^{1/2} v^{1/2} C_0 \quad (2.2)$$

Elektrot yüzeyindeki elektron transferi, kütle taşınımına kıyasla yavaş olduğunda ise süreç elektrokimyasal olarak “dönüşümsüz” olarak adlandırılır ve redoks çifti için beklenen gerilim farkı 0.059 V’dan büyük olur. Yani, dönüşümsüz tepkimeler için anodik pik akımının katodik pik akım oranının 1’e eşit olmaması ve pik potansiyelleri arasındaki farkın $0.059/n$ değerinden fazla olması beklenir [173].

Yarı dönüşümlü reaksiyonlarda ise pik akım değerleri anodik ve katodik bölgelerde farklı çıkar. Bu farklılık taramanın hızının etkisiyle değişim gösterir. Tarama hızının artmasıyla negatif bölgeye kayar ve yine artan tarama hızıyla birlikte pikler genişlemektedir. Anodik ve katodik pik bölgelerinin potansiyelleri arasındaki fark ise tarama hızının artmasıyla $0.059/n$ değerinden fazla çıkarken, yavaş tarama hızı ile $0.059/n$ değerine yaklaşır.

2.2.3. Diferansiyel Puls Voltametri (DPV)

Potansiyel pulsları sisteme dâhil etme ve her pulsun sonundaki akımları ölçme fikri, 1958'te Barker tarafından önerilmiştir. Puls voltametri başlangıçta damlayan cıva elektrotu için tanıtıldı ve bu nedenle başlangıçta darbe polarografisi olarak adlandırıldı. Ancak son yıllarda araştırmacılar cıva elektrotunu nadiren kullanmaktadırlar. Elektrota potansiyel bir pulsun uygulanması ki elektrota potansiyel pulsların uygulanma şekli voltametrik tekniği tanımlar, çoğu deneysel durumda, doğrusal tarama voltametrisine kıyasla faradaik akımların oranında önemli bir iyileşmeye yol açar [175]. Şekil 2.15'de diferansiyel puls voltametrisinde uygulanan potansiyelin akımla ve zamanla değişimini gösteren grafikler verilmiştir.

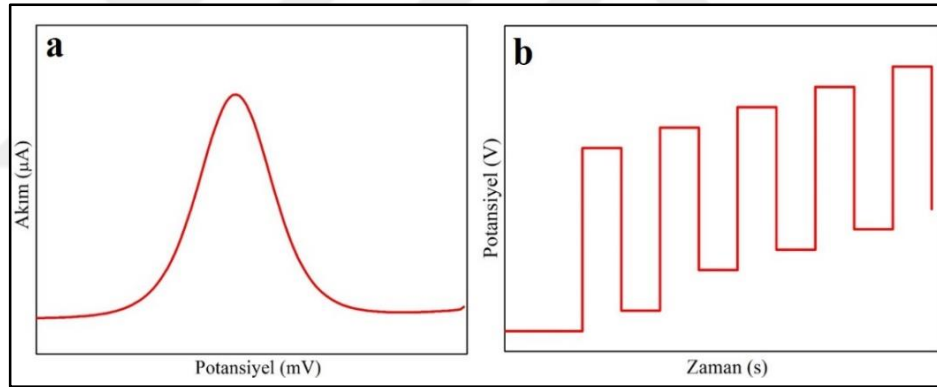


Şekil 2.15: DPV'de uygulanan potansiyelin a) Akımla b) Zamanla değişimini gösteren grafikler.

Diferansiyel puls voltametrisinde, küçük genlikli, kısa darbeler doğrusal bir artış gösterir. Darbe uygulanmadan önce ve her darbe sonunda akım ölçülür ve akımlar arasındaki fark hesaplanır. Bu prosedür, doğrusal artıştan dolayı arka plan akımını etkili bir şekilde azaltır ve böylece, kapasitif akımın olmadığı bir Faradaik akım ile sonuçlanır. DPV'nin en büyük avantajı, yüksek hassasiyete yol açan düşük kapasitif akımdır. DPV'deki küçük adım boyutları ayrıca daha dar voltametrik pik noktalarına yol açar ve bu nedenle DPV genellikle benzer oksidasyon potansiyellerine sahip analitleri ayırt etmek için kullanılır [176]. Rao ve arkadaşları, Bisfenol S'nin belirlenmesi için moleküler baskılı elektrokimyasal sensör geliştirmişlerdir. Sensör performansı için TS değerini DPV yönteminden elde ettikleri sonuca göre $0.03 \mu\text{M}$ olarak belirlemişlerdir [177].

2.2.4. Kare Dalga Voltametri (SWV)

Gözlenebilme sınırları, kromatografik ve spektroskopik tekniklerle karşılaştırılabilir olan SWV, en hızlı ve en hassas voltametri tekniklerinden biridir. SWV'de, potansiyel akım eğrisinin şekli, potansiyel bir adım E_{step} 'e (mV olarak) ve τ süresine (periyoda) göre değişen yükseklik ΔE (puls genliği) potansiyellerinin uygulanmasından elde edilir (Şekil 2.16) [178]. Kare dalga voltametrisinde akım sinyali, deneysel olarak ölçülen akımlar arasındaki farkın sonucudur. İlk akım, ileri kare dalga pulsunun sonunda ölçülür ve ikincisi, dönüş kare dalga pulsunun sonunda ölçülür [179]. Buleandră ve arkadaşları, epinefrin ve norepinefrinin aynı anda belirlenmesi için kare dalga voltametri yöntemi kullanılarak sensör geliştirmişlerdir. Yöntemin farmasötik ve biyolojik numunelerde epinefrin ve norepinefrinin eş zamanlı ölçümü için başarıyla uygulandığını ve hızlı, hassas bir yöntem olduğundan dolayı umut vaat ettiğini belirtmişlerdir [180].

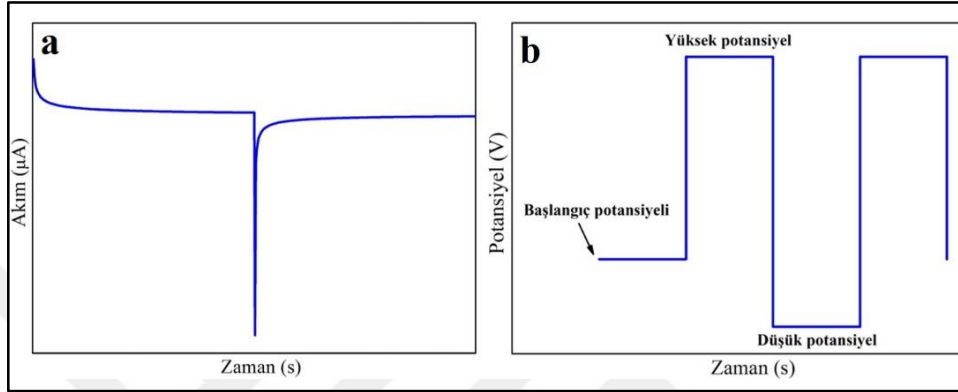


Şekil 2.16: SWV'de uygulanan potansiyelin a) Akımla b) Zamanla değişimi.

2.2.5. Amperometrik Yöntem

Amperometri, biyoanaliz için en yaygın kullanılan tespit metodlarından biridir. Bu teknikte, çalışma elektrotu, elektrot yüzeyinde ilgilenilen analiti indirgemek veya yükseltmek için yeterli olan sabit bir potansiyelde tutulur ve ortaya çıkan akım zamanla izlenir. Tek bir potansiyel uygulandığı için potansiyel seçimi önemlidir. Kronoamperometride, voltaj başlangıçta herhangi bir ilgili analitte oksidasyon veya indirgenmenin meydana gelmediği bir potansiyelde tutulur. Potansiyel daha sonra ilgilenilen analitin oksidasyonunun veya indirgenmesinin meydana gelebileceği bir değere getirilir (Şekil 2.17). Akımın sabit bir potansiyelde zaman içinde izlenmesi

nedeniyle, akımdaki tüm dinamik değişiklikler gözlemlenebilir [176]. Takeda ve arkadaşları, kanser tarama testi için idrarda L-fukozun belirlenmesi için amperometrik bir biyosensör geliştirmişlerdir. Amperometrik biyoalgılama yöntemlerinin, idrar tahlili için basit, hızlı ve kesin olma avantajına sahip olduğunu ve bu sensörün, kanserin ilk taraması için bakım noktası testlerinde kullanılmasını beklediklerini belirtmişlerdir [181].



Şekil 2.17: Kronoamperometrik ölçümde a) Akım ve b) Potansiyelin zamanla değişimi.

2.2.6. Kondüktometrik Yöntem

Elektrokimyasal hücrenin elektrik iletkenliğinin ölçümü, bir elektrokimyasal sensörün temelini oluşturabilir ve bu sistemde belirli bir çözünen konsantrasyonunun varlığında sistemin iletkenlik değişimi ölçülür [182]. Yani, kondüktometrik algılama, iyonik tür konsantrasyonunu değiştirebilen bir reaksiyonu ve bu reaksiyonun elektriksel iletkenlikte veya akım akışında değişikliklere yol açması prensibine dayanmaktadır. Literatür çalışmaları incelendiğinde Kim ve arkadaşları, hidrojen algılama için Pd ile dekore edilmiş SnO₂ nanotelleri içeren kondüktometrik sensör geliştirmişlerdir [183]. Ayrıca Zhang ve arkadaşları da, aptamer aracılığıyla *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* için kondüktometrik sensör geliştirmişlerdir. Bu sensörde aptamer seçimi yoluyla manyetik analit ayrımı ile basit ve verimli bir şekilde belirleyebilmek için tercih edilmiş ve daha sonra bakteri kültür ortamının zamana bağlı iletkenlik değişiklikleri yoluyla tespit etmişlerdir [184].

2.3. Yöntem Geçerlilik Testleri

Nanoteknoloji, biyomalzeme ve elektronik alanındaki gelişmeler özellikle bakım noktası test uygulamaları ve giyilebilir sensörler alanında önemli gelişmeler sağlamıştır. Bu sensörlerin hem tıp-bilim camiası hem de son kullanıcılar tarafından kabul gören güvenilirlikte ve doğrulukta olabilmesi için çeşitli gereksinimleri karşılaması gerekmektedir. Bu nedenle, malzeme, algılama bileşenleri ve genel elektronik tasarım da dâhil olmak üzere, her basamağın kendi içinde yöntem geçerlilik testlerinin doğrulanmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Aşağıda sensör teknolojisinde kullanılan yöntem geçerlilik testlerinden bazıları hakkında kısaca bilgi verilmiştir [185, 186].

2.3.1. Seçicilik

Seçicilik, (biyo)sensörün girişim yapabilecek türlerin var olduğu bir numunedeki belirli bir analiti saptama yeteneğini temsil eder. İdeal bir (biyo)sensörün yalnızca hedef analit için yanıt verirken herhangi bir girişim yapabilecek maddedeki değişiklik için yanıt vermemesi beklenmektedir. Girişim yapan türler mevcut analitin pikini engelleyici ya da arttırıcı bir katkı sağlamıyorsa seçicilik genellikle niteliksel anlamda iyi olarak kabul edilebilir [185, 187]. Örneğin Choi ve arkadaşları üre tespiti için pH aracılı gümüş nanoparçacıkları içeren akıllı telefon destekli bakım noktası kolorimetrik biyosensörü geliştirmişlerdir. Çalışmanın seçiciliği için sodyum nitrat, magnezyum sülfat, demir(III) klorür, demir(II) sülfat heptahidrat, potasyum fosfat ve kalsiyum nitrat dâhil olmak üzere çeşitli inorganik tuzların yanı sıra ürik asit, kreatinin, glukoz, asetilkolin, glisin, l-alanin, l-fenilalanin ve sisteamin gibi girişim yapabilecek türler denenmiştir. Tasarlanan biyosensörün yüksek seçiciliğe sahip olduğunu belirtmişlerdir [104]. Şenocak ve arkadaşları da $Ti_3Al_{0.5}Cu_{0.5}C_2$ MAX fazı ile rutin antioksidan tespiti için elektrokimyasal sensör geliştirmişlerdir. Seçicilik çalışması için pek çok anyon, katyon ve ek olarak kumarik asit, ürik asit, 6-metoksi flavon bileşiklerini girişim yapabilecek tür olarak kullanmışlardır. Kumarik asit ve ürik asit gibi analitlerin rutin antioksidanın pik verdiği potansiyelden farklı bir bölgede olmak üzere elektrokimyasal cevap verdikleri ancak bu piklerin rutin için belirlenen limitleri etkilemediği için sensörün seçici olduğu açıklanmıştır [188].

2.3.2. Doğrusallık

Doğrusal çalışma aralığı, kalibrasyon eğrisinin doğrusal olarak kabul edilebileceği analitin alt ve üst konsantrasyonlarının tanımlanmasından oluşur ve genellikle R-kare olarak ifade edilir [185]. Literatürde yer alan hemen her (biyo)sensör çalışmasında çalışılan bir parametredir. Hua ve arkadaşları, miRNA'nın hızlı tespiti için elektrokimyasal bir biyosensör geliştirmişlerdir ve doğrusal ölçüm aralığının 10 fM-50 nM olduğunu belirtmişlerdir [189]. Salahandish ve arkadaşları da merkezi sinir sistemi hasarı biyobelirteci olan glial fibril asidik protein (GFAP) tespitine yönelik biyosensör geliştirmişlerdir. Bu biyosensör için doğrusal ölçüm aralığı 1.0 pg mL^{-1} - 10 ng mL^{-1} olarak hesaplanmıştır ($R^2= 0.98$) [190].

2.3.3. Tayin Sınırı (TS)

Tayin sınırı, bir biyosensörün performansını karakterize etmek için en çok önemsenen niceliklerden biridir ve belirtilen bir güven düzeyi ile o maddenin yokluğundan ayırt edilebilecek en düşük hedef analitin miktarını ifade eder. Doğrudan sinyal-gürültü oranı ile ya da eğri yanıtının standart sapması ve kalibrasyon eğrisinin eğimi kullanılarak belirlenebilir [185, 191].

2.3.4. Gözlenebilme Sınırı (GS)

TS ile ilişkilendirilebilecek başka bir parametre de gözlenebilme sınırıdır (GS). GS genellikle aynı protokol izlenerek hesaplanır ancak, ya standart sapmanın on katı ya da TS'nin üç katı gibi basit bir hesaplama ile belirlenebilir [192]. Tasarlanan (biyo)sensörün performansının kıyaslanabilir olması için hem TS hem de GS değerlerinin belirtilmesi önemlidir. Literatür çalışmaları incelendiğinde her iki parametrenin de hesaplandığı pek çok çalışma mevcuttur. Mohammad ve arkadaşları hidrazinin elektrokimyasal tespiti için $\text{SnO}_2/\text{CeO}_2$ nanoyapılı sensör tasarlamıştır. Bu sensörün TS ve GS değerlerinin sırasıyla $0.179 \text{ } \mu\text{M}$ ve $0.52 \text{ } \mu\text{M}$ 'dir [193]. Wenninger ve arkadaşları da nitrik oksidin elektrokimyasal tespiti için yeni bir karbon pasta elektrot modifikasyonu gerçekleştirmişlerdir. Bu sensör için TS ve GS değerlerinin sırasıyla 40 nM ve 130 nM olduğunu belirtmişlerdir [194].

2.3.5. Hassaslık

Hassasiyet arttıkça, benzer konsantrasyonlar arasında ayırım yapma yeteneği artış gösterdiği için hassasiyet, elektrokimyasal biyosensörün performansını belirleyen parametrelerden biridir. Kalibrasyon eğrisinin eğimini ifade eder ve analitin farklı konsantrasyonlarında sensörün tepkisinin ölçülmesiyle elde edilir [185].

2.3.6. Tekrarlanabilirlik ve Tekrar Üretilirlik

Tekrarlanabilirlik, aynı çalışma koşulları ve ölçüm kurulumu altında aynı girdi uyarınları uygulandığında sınırlı değişkenlikle yanıt verme yeteneğidir. Tekrar üretilebilirlik ise farklı operatörler, farklı enstrümantasyonlar, farklı kurulumlar gibi çalışma koşulları altında aynı girdi uyarınları uygulandığında sınırlı değişkenlikle yanıt verebilme yeteneğini ifade eder. Hem tekrarlanabilirlik hem de tekrar üretilebilirlik parametreleri genellikle ortalama ölçümlere göre yüzde bağı standart sapma olarak ifade edilmektedir [185, 195]. Liu ve arkadaşları, insan serumunda çoklu nöroendokrin tümör belirteçlerinin eşzamanlı tespiti için bağışıklık sensörü geliştirmişlerdir. Bu sensörün tekrarlanabilirliğini değerlendirmek için, aynı konsantrasyonda standart CgA ve CgB antijen çözeltileri ile inkübe edilen biyosensör tarafından altı paralel test gerçekleştirmişler ve bağı standart sapma değerlerini (BSS) sırasıyla CgA için %4.3 ve CgB için %3.8 olarak tespit etmişlerdir. Tekrar üretilebilirlik için ise, BSS değerleri CgA için %5.2 ve CgB için %4.6 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre tasarlanan biyosensörün iyi tekrarlanabilirliğe ve tekrar üretilebilirliğe sahip olduğunu açıklamışlardır [196].

2.3.7. Kararlılık

Kararlılık, biyoalgılama sistemi içinde ve/veya çevresinde meydana gelebilecek çevresel faktörlere karşı duyarlılık derecesini ifade eder. Biyosensörlerdeki kararlılığı değerlendirmek için iki farklı yaklaşım kullanılabilir. İlk yaklaşım, sabit bir analit konsantrasyonu gibi sürekli, uzun ve sabit bir uyarana maruz kaldığında biyosensörün stabilitesini değerlendirmektir. İkinci yaklaşım ise belirli zaman noktalarında aynı numune konsantrasyonunun ayrı ölçümlerini gerçekleştirmektir. Her iki durumda da, kararlılık sonucu, sensörün başlangıç ve bitiş tepkisi arasındaki maksimum fark

hesaplanarak nicelleştirilebilir [185, 197]. Dang ve arkadaşları, H₂O₂'yi tespit eden enzimsiz elektrokimyasal sensör geliştirmişlerdir. Bu sensörün stabilitesini değerlendirebilmek için sabit potansiyelde amperometrik ölçümler alınmıştır. Ortama 0.5 mM H₂O₂ eklendiğinde, 300 saniye sonra akımın %95 oranında sabit olduğu, bunun da geliştirilen sensör için kısa vadeli kararlılığa sahip olduğunu gösterdiğini belirtmişlerdir. Uzun vadeli kararlılık için ise yedi gün sonra sensörün stabilite testleri aynı şekilde tekrarlanmış ve 0.5 mM H₂O₂'ye verilen mevcut elektrokimyasal yanıtın ilk yanıtı göre %85 olduğu tespit edilmiştir [198].

2.3.8. Doğruluk

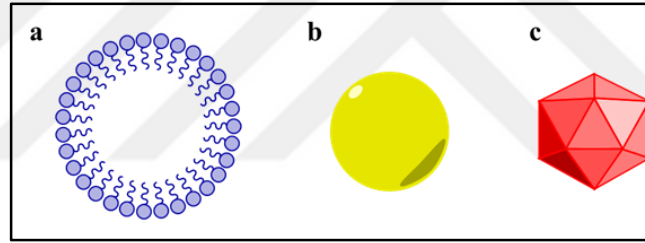
Doğruluk genellikle, geleneksel olarak kabul edilen laboratuvar ekipmanının çıktısına göre doğrulanmış biyosensörden çıktının hata yüzdesi olarak ifade edilir ve test çıktısı açısından en güvenilir “altın standarttan” maksimum sapma olarak hesaplanır [185]. Örneğin, Schazmann ve arkadaşları, terde sodyum konsantrasyonunun gerçek zamanlı ölçümü için giyilebilir bir elektrokimyasal sensör geliştirmişlerdir. Geliştirilen sensörün doğruluğunu test edebilmek için referans yöntem olarak atomik absorpsiyon spektroskopisi tercih etmişlerdir [199].

2.3.9. Geri Kazanım

Sensör çalışmalarında gerçek örnek analizi doğrulaması açısından önemli parametrelerden biri geri kazanım oranıdır. Bu parametre genellikle, hedef analitin bilinen bir miktarı ölçüm matrisine eklendiğinde ve ardından ölçülen konsantrasyon ile bilinen değer arasındaki varyasyon hesaplanarak elde edilir [185]. Ghalkhani ve arkadaşları, postmenopozal kadınlarda osteoporozu önlemek için kullanılan bir ilaç olan Raloksifen tespiti için bir elektrokimyasal sensör geliştirmişlerdir. Sensörün kan plazmasında ve farmasötik numunelerde Raloksifen ölçümü için kapasitesini değerlendirmişlerdir. Geri kazanım testlerini gerçekleştirmek için gerçek örnek matrislerine istenen miktarda Raloksifen standart çözeltisi eklemişler ve %93.7-100.5 aralığında geri kazanım sonuçları elde etmişlerdir [200].

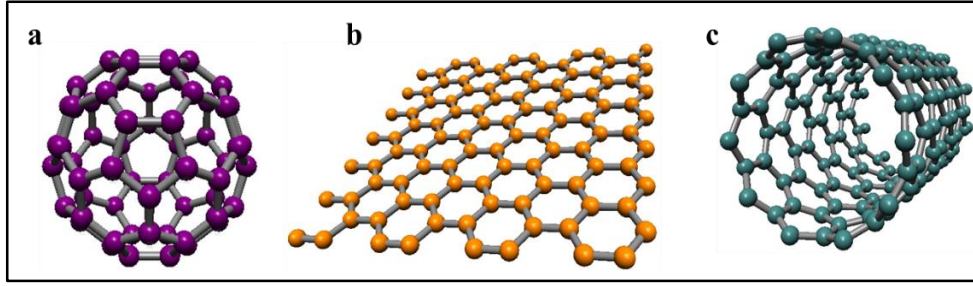
2.4. Nanoteknoloji ve Nanoparçacıklar

Nanoteknoloji, 100 nm'den küçük boyutlarda olan malzemelerin, cihazların ve sistemlerin oluşturulmasını ve kullanılmasını içermekte olup [201], temelde tüm teknik disiplinlerde güncel araştırma ve geliştirme için en popüler alanlardan biridir [202]. Araştırmacıların, boyutun bir maddenin fizikokimyasal, optik vb. özelliklerini etkileyebileceğini görmesi bu malzemelerin öneminin artmasına sebep olmuştur [203]. Bu nedenle literatürdeki çalışmalarda farklı boyut, şekil, kompozisyon ve işlevselliklere sahip pek çok nanoparçacık çeşidi yaygın olarak kullanılmaktadır [204]. Nanopartiküller genel şekline bağlı olarak 0D, 1D, 2D veya 3D olabilmekte ve genellikle organik, inorganik ve karbon temelli olarak sınıflandırılmaktadır. Dendrimerler, miseller ve lipozomlar genellikle organik nanoparçacıklar olarak bilinir. Şekil 2.18'de organik ve inorganik nanoparçacıklara ait genel gösterimler verilmiştir [205].



Şekil 2.18: a) Misel, b) Altın nanoparçacık ve c) Zeolitik imidazol çerçeveleri.

Metal ve metal oksit temelli nanopartiküller ise inorganik nanopartiküller olarak sınıflandırılır. Metallerin nanometre boyutlarındaki parçacıkları neredeyse tüm metallerden sentezlenebilmekte olup [206] yaygın olarak kullanılan metaller; alüminyum (Al), kadmiyum (Cd), kobalt (Co), bakır (Cu), altın (Au), demir (Fe), kurşun (Pb), gümüş (Ag) ve çinko (Zn)'dur [205]. Metal oksit nanoparçacıkları ise artan reaktivite ve verimleri nedeniyle tercih edilmektedir. Yaygın olarak sentezlenen metal oksit nanoparçacıkları; alüminyum oksit (Al_2O_3), seryum oksit (CeO_2), demir oksit (Fe_2O_3), manyetit (Fe_3O_4), silikon dioksit (SiO_2), titanyum oksit (TiO_2), çinko oksit (ZnO)'tir. Tamamen karbondan yapılmış nanoparçacıklar ise karbon temelli olarak bilinir ve bunlar fulleren, grafen, karbon nano tüpler ve karbon nano lifler olarak sınıflandırılabilir. Şekil 2.19'da karbon temelli nanoparçacıklara ait genel gösterimler verilmiştir [205].



Şekil 2.19: Karbon temelli nanopartiküller: a) Fulleren, b) Grafen, c) Karbon nanotüp.

Çeşitli endüstriyel ve biyomedikal uygulamalarda nano ölçekli maddelerin işlenmesi ve kontrolü ile ortaya çıkan nanobilim ve nanoteknoloji alanındaki gelişmeler sonucu, birçoğu laboratuvar çalışmalarından mağaza raflarına transfer olan pek çok ürüne olanak sağlamıştır [11]. Nanomalzemelerin bazı uygulamalarını içeren bir listesi aşağıda verilmiştir:

- Floresan biyolojik etiketleri [207],
- İlaç salınımı [208],
- Doku mühendisliği [209],
- Çevre uygulamaları [210],
- Gıda uygulamaları [211],
- Sensörler/Biyosensörler [212].

Biyosensör çalışma alanında, hassasiyeti arttırmak ve tayin sınırlarını bireysel moleküllere düşürmek için benzersiz fiziksel, kimyasal, mekanik, manyetik ve optik özellikleri nedeniyle çeşitli nanoparçacıklardan faydalanılmaktadır. Böylece algılamanın duyarlılığının ve özgüllüğünün belirgin şekilde arttığı gözlenmektedir [12, 213]. Caires ve arkadaşları, altın nanoparçacıklara bağlanmış bir biyoyumlu polimer olan karboksimetil selüloza dayalı HIV-1'in tespiti için nanosensör geliştirmişlerdir. Bu çalışma, p41 glikoproteini ile bağlantılı, lazer ışığı saçma tekniğine (LIA) dayanarak bir biyosensör geliştirilmiş ve HIV-1'in potansiyel tanısı için kullanılabilir olduğunu göstermişlerdir [212]. Zhang ve arkadaşları, triptofan (L/D-Trp) enantiyomerlerinin ayırt edilmesi için selüloz nanokristalleri ve karboksil fonksiyonlu çok duvarlı karbon nanotüpleri temel alan elektrokimyasal kiral sensör geliştirmişlerdir. Bu çalışma kapsamında, nanokristalin selülozun varlığı, triptofan

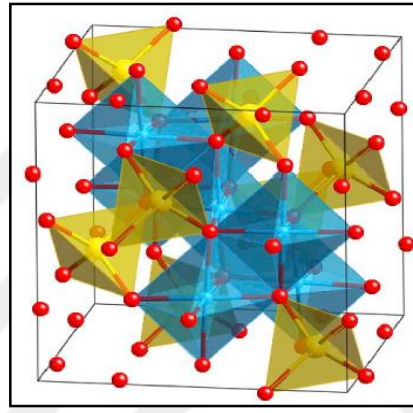
enantiyomerlerinin seçici adsorpsiyonu için kiral bir platform sağlarken, karboksil fonksiyonlu çok duvarlı karbon nanotüplerin kullanılması ise algılama işlemi sırasında üretilen elektrokimyasal sinyallerde önemli derecede artışlar sağlamıştır. Ayrıca, bu kompozit sensörün 0.04 ile 4.0 mM konsantrasyon aralığındaki triptofan enantiyomerlerinin tespitinde kullanılabilceği belirtilmiştir [214]. Liu ve arkadaşları, nanoselüloz-altın kompozitli ve kuş lökozu virüs alt grubu J'nin (ALV-J) saptanması için hassas bir sandviç tipi elektrokimyasal immünosensör geliştirmiştir. Önerilen immünosensörün iyi tekrarlanabilirlik ve stabilite özelliklerine sahip olması nedeniyle ALV-J ölçümü için iyi analitik performans gösterdiği ve bu yöntemin klinik teşhislerde potansiyel olarak uygulanabileceği belirtilmiştir [215].

Manyetik nanoparçacıklara dayanan biyotanıma sistemleri, ucuz üretim, fiziksel ve kimyasal olarak kararlı yapı, biyolojik olarak uyumlu ve çevresel olarak güvenli olmaları nedeniyle diğer tekniklere kıyasla benzersiz avantajlar sunmuşlardır [14]. Son yıllarda, manyetik nanoparçacıklar büyük ilgi görmüş olup, sensörler ve biyosensörler gibi çeşitli analitik uygulamalarda kullanılmıştır. Ayrıca, uygun fonksiyonel gruplara sahip fonksiyonlandırılmış manyetik nanoparçacıkların yüzey immobilizasyon tekniği ve cihazlarının duyarlılığındaki iyileştirmede önemli bir rol oynadığı gözlemlenmiştir [15]. Geleneksel biyosensörler ile karşılaştırıldığında, nanomalzemeye dayalı biyosensörler, gelişmiş algılama hassasiyeti ve özgüllüğü gibi belirgin avantajlara sahiptir ve çeşitli uygulamalarda büyük potansiyel oluşturmuştur [213].

2.4.1. Ferrit Nanoparçacıklarının Genel Özellikleri

Ferritler, kristal yapılarına göre dört gruba ayrılmaktadır: spinel ferritler, garnet ferritler, hekzagonal ferritler ve orto ferritler [216]. Spinel ferritler, genel formülü AB_2O_4 olan metal oksitlerdir ve buradaki A ve B, iki farklı kristalografik alanda, tetrahedral (A bölgesi) ve oktahedral (B bölgesi) bölgeleri temsil eder. Kristal yapıların genel gösterimi Şekil 2.20'de gösterilmiştir (kırmızı= oksijen, mavi= oktahedral bölge, sarı= tetrahedral bölge) [217]. Burada A, Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} ve Zn^{2+} gibi 2+ oksidasyon durumuna sahip herhangi bir metal olabilir [218]. B bölgesi ise genellikle üç değerlikli Fe^{3+} katyonunu ifade eder [219]. Ancak bazen Fe^{3+} katyonu yerine Al, Ga, Cr gibi diğer üç değerlikli iyonlar kullanılabilir. Bu nedenle spinel ferrit yapısı, iki değerlikli ve üç değerlikli katyon ile sıkıca paketlenmiş yapılar olarak belirtilebilir [220]. Her iki bölgedeki katyon dağılımı türlerine bağlı olarak, üç tip vardır ve bunlar

normal, ters ve karışık tiptedir. Normal spinelde, 2+ ve 3+ oksidasyon durumlarına sahip kanyonlar, sırasıyla tetrahedral ve oktahedral bölgeleri işgal eder. $ZnFe_2O_4$ normal spinel ferrit örneğidir. Ters spinelde +3 kanyon her iki bölgeye de eşit olarak dağılırken, tüm +2 kanyonlar oktahedral bölgeleri işgal eder. Ters spinel ferritlerin en yaygın örnekleri Fe_3O_4 ve $NiFe_2O_4$ 'tür. Karışık ferritte, her iki oksidasyon durumunun karışımları her iki bölgede de mevcuttur, örneğin $MnFe_2O_4$ ($Mn_{0.8}Fe_{0.2}$ ($Mn_{0.2}Fe_{1.8}O_4$)). $CoFe_2O_4$, sentez süresi ve kullanılan koşullara bağlı olarak (Co_xFe_{1-x} ($Co_{1-x}Fe_{1+x}$) O_4 'ün kimyasal formülüne sahip ters veya karma spinel yapısını oluşturabilir [217].



Şekil 2.20: Tetrahedral ve oktahedral bölgeleri gösteren spinel ferrit yapısı.

Magnetit (Fe_3O_4) ve maghemit ($\gamma-Fe_2O_3$) yapıları sadece demir ve oksijen bileşimi olan spinel ferritleri olup, birçok araştırmanın konusu olmuştur. Bununla birlikte, Fe_3O_4 nanomalzemelerinin fiziksel özellikleri farklı koşullar altında değişime açıktır. Örneğin, düşük pH'da, çok kararsızdırlar ve manyetik özelliklerini etkileyen diğer oksit formlarına dönüşürler. Spinel ferritlerin çoğu, Fe_3O_4 nanoparçacıklarına kıyasla yüksek kimyasal stabilite, üstün manyetik özellikler ve geniş yüzey alanı gibi üstün fiziksel özelliklere sahiptir [218].

Genel formülü $A_3Fe_5O_{12}$ olan ve 1956 yılında keşfedilen garnet ferritleri mikrodalga ve optik alanlarda kullanılmaktadır [220, 221]. Hekzagonal ferritler 1950'lerde keşfedilmiş olup, ferromanyetik davranış ve yüksek kimyasal kararlılık sergilemektedir. Genellikle A bölgesi için Pb, Sr ve Ba elementlerini içerir ve çok karmaşık bir kristal yapıya sahiptir. M, Z, Y, W, X ve U olmak üzere altı alt kategoriye sahiptirler. M-tipi genellikle fotokatalitik uygulamalar için kullanılır, ancak genellikle elektrik ve mikrodalga uygulama alanlarında hekzagonal ferritler kullanılır [222-224].

Hekzagonal, spinel ve granet ferritlerin dışında bir sonraki önemli yapı orto ferritler veya perovskitlerdir. Formül ABO_3 'tür, burada A itriyum veya bir nadir toprak iyonudur. Bu gruba örnek olarak $BaTiO_3$, $PbTiO_3$ yapıları verilebilir [216]. Tüm ferritler için katyon tipleri ve kristalografik bölgelerdeki dağılımları, ferrit nanoparçacıkların fiziksel ve kimyasal özellikleri üzerinde çok önemli bir etkiye sahiptir [225]. Bu tez çalışmasında sentezlenen ve biyosensör uygulamasında kullanılanlar spinel ferrit grubu olduğu için detaylı olarak bu grubun özellikleri üzerinde durulmuştur.

2.4.2. Ferrit Nanoparçacıklarının Sentez Yöntemleri

Spinel ferritler için kullanılan evrensel tek bir sentez yöntemi olmayıp, birlikte çöktürme [226], termal ayrışma [227], hidrotermal [228], solvotermal [229] ve sol-jel [230] gibi çeşitli yöntemler tercih edilebilir. Kullanılan sentez yöntemleri ve koşulları, ferrit nanoparçacıkların kalitesini belirleyen temel faktörlerdir. Her yöntemin kendi içerisinde avantajları ve dezavantajları olmakla beraber, sıcaklık, çözücü tipi, pH, reaktiflerin saflığı ve reaksiyon süresi gibi bir dizi parametre, sentezlenen ferrit nanoparçacıklarının kalitesini etkileyebilir. Genel olarak kullanılan ferrit nanoparçacıklar birlikte çöktürme veya termal ayrışma yoluyla sentezlenir. Birlikte çöktürme sentezi yöntemi, kaliteli ferrit nanoparçacıkların hazırlanması için pH, iyonik kuvvet, sıcaklık ve +2 değerli metalin +3 değerlikli iyona (Fe^{3+}) (1:2) uygun mol oranının dikkatli bir şekilde ayarlanmasını gerektirir [217]. Birlikte çöktürme yöntemi, çevre dostu bir alkalın sulu çözeltinin, büyüklük ve morfoloji kontrollü nanoparçacıkların sentezi için yaygın olarak kullanıldığı sentezleme seçeneklerinin en basit yollarından biridir. Birlikte çöktürme sentezi yöntemi kullanıldığında, ferrit nanoparçacıklarının boyutu sıcaklık veya karıştırma süresi ile kontrol edilebilir, çoğu durumda kalsinasyon sonrası sentezlenen nanoparçacıkların daha fazla stabilizasyonu için kalsinasyon önemlidir.

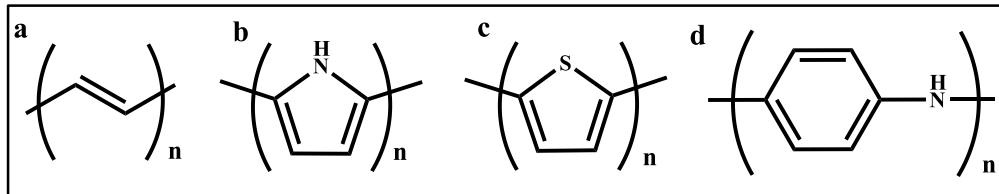
Sonuç olarak, ferrit nanoparçacıklarının yeni materyallere veya cihazlara dâhil edilmesi uygulandığı alanda umut verici sonuçlar vermiş olup, hâlen yeni uygulama alanlarındaki kullanımına olan ilgi devam etmektedir.

2.4.3. Ferrit Nanoparçacıklarının Kullanım Alanları

Ferritler, manyetik özellikler, oksidasyon direnci, kimyasal stabilite, mekanik sertlik nedeniyle [231] endüstriyel çalışmalardan biyomedikale kadar uzanan çeşitli uygulama alanlarında ilgi görmektedir [217]. Endüstride, adsorban ve katalizör [232, 233] elektronik malzeme üretimi [234] ve atık su arıtımı [235] çalışmalarında kullanılmaktadır. Biyomedikal alanlarda ise manyetik rezonans görüntüleme [236] hipertermi ile tümör tedavisi [237], ilaç salınımı [238] konularında oldukça fazla çalışma bulunmaktadır. Ayrıca, modern sensörlerin ve biyosensörlerin hazırlanmasında faydalı olduğu bilinmektedir. Rashid ve arkadaşları biyosensör alanında yapmış oldukları çalışmalarında; mangan ferrit ($MnFe_2O_4$) nanoparçacıklarını sentezledikten sonra SiO_2 kabuğu ile hem oksidasyon ve aglomerasyonu önlemek ve ayrıca $MnFe_2O_4$ 'ün yüzeyindeki -OH gruplarının yoğunluğunu arttırmak için bir çalışma yapmışlardır [239]. Asadpour-Zeynali ve arkadaşları ise $CoFe_2O_4@CdSe$ nanoparçacıklarını sentezlemiş ve bu parçacıkların kabuk yüzeyini polivinil pirolidon (PVP) ile fonksiyonlandırmışlardır. Daha sonra bu yapılar önemli bir antibiyotik ilaç olan Rifampisin (RIF) tespiti için elektrokimyasal biyosensör geliştirilmesi için kullanılmıştır. Bu amaçla, tasarlanan $CoFe_2O_4@CdSe$, RIF'in belirlenmesi için yeni elektrokimyasal biyosensörün camsı karbon elektrotun yüzeyine kaplanmıştır. $CoFe_2O_4@CdSe$ 'deki RIF'in elektrokimyasal oksidasyonu, geniş yüzey alanı, bol aktif bölgeler ve PVP başlıklı büyük yüzey alanından dolayı bu filmin mükemmel elektrokatalitik etkinliğini ortaya çıkarmış ve camsı karbon elektrot ve $CoFe_2O_4$ /camsı karbon elektrottan daha yüksek sinyaller göstermiştir. Ayrıca, geliştirilen sensör, kare dalga voltametri yöntemi kullanılarak farmasötik ve insan kan serumu örneklerinde RIF miktarlarını belirlemek için uygulanmıştır [231]. Bu çalışmalar dışında, glukoz algılaması için polipirol- $ZnFe_2O_4$ manyetik nano-kompozit sistemi [240], glukoz tespiti için $CuFe_2O_4$ /polipirol nanokompozit sistemi [241], gaz algılama özellikleri için Co ikameli $NiFe_2O_4$ nanopartikülleri [242], seçici bir katyonik sensör olarak üçlü nanokompozit esaslı poli(pirol-ko-*o*-toluidin), kobalt ferrit ve modifiye edilmiş kitosan çalışması elektrokimyasal yöntemle incelenmiş ve dönüşümlü voltametri, diferansiyel puls voltametri ve amperometrik yöntemler kullanılarak elde edilen yapıların elektrokimyasal özellikleri incelenmiştir [243].

2.5. İletken Polimerler ve Özellikleri

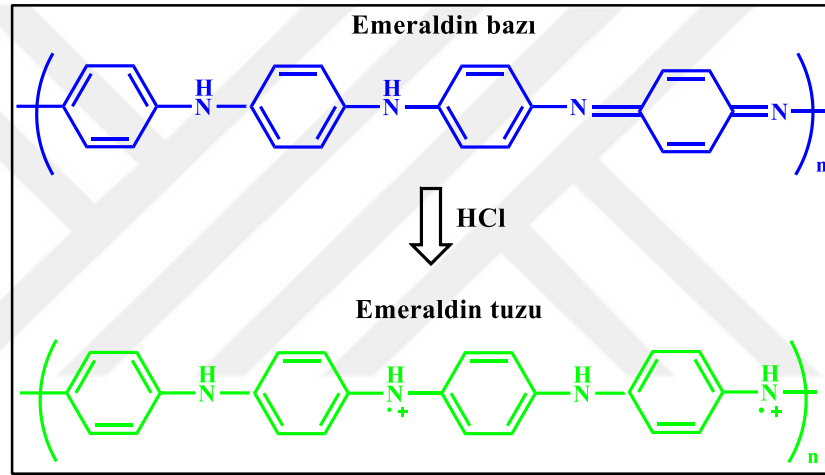
İletken polimerler, değişken oksidasyon durumları, mükemmel uyumluluk, işlenebilme kolaylığı, korozyona karşı direnç, iyi elektriksel ve optik özelliklere sahip bir organik malzeme sınıfıdır. 2000 yılında Nobel Kimya ödülüne layık görülen iletken polimerler, son yıllarda önemli bir ivme kazanmakla beraber çok geniş bir uygulama alanında yer bulmuştur [244, 245]. İletken polimerler kendinden iletken ve harici iletken olmak üzere temel olarak iki gruba ayrılabilir. Kendinden iletken polimerler, organik yarı iletkenler olarak da adlandırılmaktadır. Bu grup, yapılarında elektronlar için afinitelerini tanımlayan geniş bant aralığına (E_g) ve delokalize π -elektron sistemine sahiptirler. Organik yarı iletken olarak adlandırılan kendinden iletken konjuge polimerler için E_g değeri genellikle 1.5–3.0 eV aralığındadır [246]. Polipirol, polifuran, politiyofen, poli(*p*-fenilen vinilen) ve polianilin yapıları poli(heterosiklik) tipteki kendinden iletken polimerler sınıfında yer almaktadırlar [247]. Şekil 2.21’de bazı konjuge polimerin ana zincir yapıları verilmiştir [246]. Polimerler doğası gereği genellikle yalıtkan yapılardır. Ancak, bu yalıtkan polimerler belirli miktarda iletken dolgu maddesinin eklenmesiyle yarı iletken/iletken hale getirilebilir ve bu grup da harici iletken polimerler olarak bilinir. Karbon siyahı, karbon nanotüpler, karbon lifleri ve metal parçacıklar gibi farklı morfolojide ve tipteki pek çok yapı iletkenlik sağlamak için kullanılabilir. Harici iletken polimerlerin iletkenlik özellikleri sisteme dâhil edilen iletken dolgu malzemesinin miktarına, şekline ve boyutuna göre farklılık gösterebilir [248].



Şekil 2.21: a) Poliasetilen, b) Polipirol, c) Politiyofen, d) Polianilin konjuge polimerlerinin ana zincir yapıları.

Katkılama (doplama) işlemi, konjuge polimerlerin iletkenliğini artırma çalışmalarında uzun süredir rol oynamaktadır. Doplama işlemi sonunda polimer zincirinde elektron koparılması sonucu meydana gelen pozitif (p-tipi) veya elektron verilmesi sonucu oluşturulan negatif (n-tipi) yüklü bölgeler elektronların hareketini

kolaylaştırır ve iletkenliğin artmasını sağlar [249]. Doplama prosedüründen sonra polimerlerin iletkenliği önemli ölçüde artış gösterir. Örneğin, doplu iletken polimerlerin iletkenliği 10^{-3} - 10^3 S cm⁻¹ aralığındayken, kendinden iletken konjuge polimerlerin iletkenliği 10^{-9} - 10^{-6} S cm⁻¹ aralığındadır. İletken polimerlerin iletkenliği, polimer ana zincirinin doplama derecesi ile bağlantılıdır. Doplama derecesi, konjuge polimer ana zinciri üzerindeki yük taşıyıcı miktarı ile ilgilidir. Düşük doplama derecesi bölgesinde, konjuge polimerlerin iletkenliği, konjuge polimerlerin doplama derecesinin artmasıyla doğrusal bir artış gösterir [246]. Şekil 2.22’de PANI emeraldin bazının protonlanma yolu ile emeraldin tuzuna dönüşümünü gösteren reaksiyon verilmiştir [250].

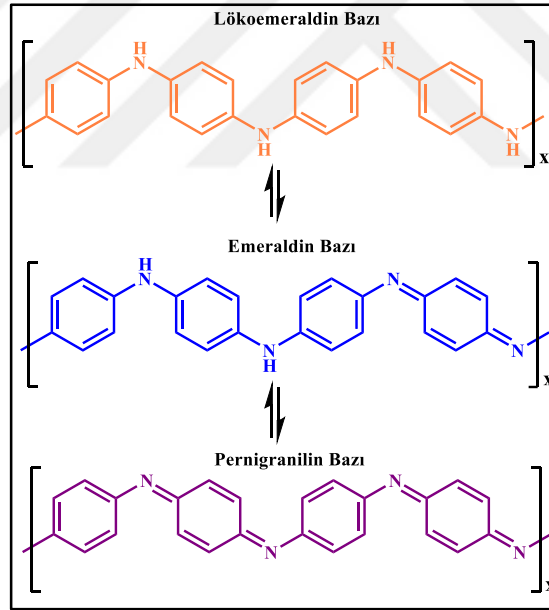


Şekil 2.22: Polianilin emeraldin bazının kimyasal yapısı ve asit ortamında protonasyon yoluyla iletken bir tuza dönüşme reaksiyonu.

Literatürde doplanmış iletken polimerler ile ilgili pek çok uygulama vardır. Örneğin, Trung ve arkadaşları korozyon koruma uygulaması için molibdat ve salisilat katkılı polipirol filmler geliştirmişlerdir. Dopant olarak hem molibdat hem de salisilat varlığında, çelik üzerindeki filmlerin sadece salisilat katkılı polipirol filminden daha iyi bir korozyon direnci sergilediğini tespit etmişlerdir [251]. Bir başka çalışmada ise Ballav ve arkadaşları L-sistein doplu polipirol sentezi gerçekleştirmişlerdir. Bu yeni iletken polimer Hg²⁺'nın sulu ortamda uzaklaştırılması için yüksek verimli bir adsorban olarak tasarlanmıştır. Hg²⁺ adsorpsiyonu için optimum pH'ın sulu ortamda güçlü etkileşimden kaynaklanan maksimum negatif yük elde edilmesinden dolayı L-sistein katkılı polipirol adsorban için pH 5.5 olduğunu belirlemişlerdir [252].

2.5.1. Polianilin

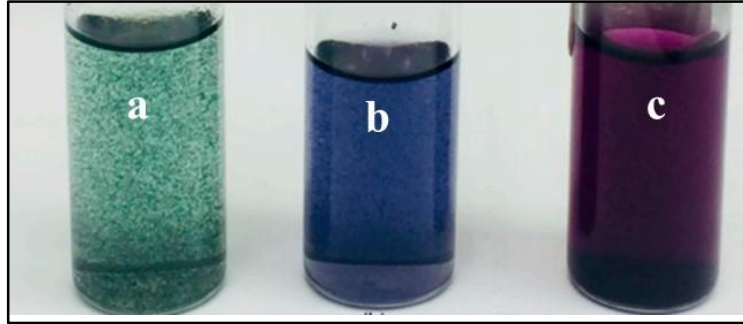
PANI, düşük maliyetli bir monomer olan anilinin polimerizasyonu ile elde edilen iletken bir polimerdir [253]. İyi elektriksel iletkenliği, benzersiz redoks kimyası ve biyouyumluluğundan dolayı en sık araştırılan kendinden iletken polimerlerden biridir [254]. PANI yapısı $[(-B-NH-B-NH-)_n (-B-N=Q=N-)_{1-n}]_m$ genel formülü ile ifade edilebilir; burada B ve Q sırasıyla, benzenoid ve kinonoid formlardaki halkaları gösterir. PANI'nin belirtilen üç oksidasyon durumu vardır: lökoemeraldin (LE, $n=1$), pernigranilin (PG, $n=0$) ve emeraldin ($n=0.5$). LE tamamen indirgenmiş durumdur. PG, amin bağları yerine imin bağları ile tamamen oksitlenmiş durumdadır. LE ve PG asitle doplandığında bile zayıf iletkenlerdir. Kısmen oksitlenmiş polimere karşılık gelen emeraldin, ayarlanabilir durumları nedeniyle PANI'nin en kullanışlı formu olarak kabul edilir [255]. Şekil 2.23'de farklı tipteki PANI yapıları için molekül yapıları gösterilmiştir.



Şekil 2.23: PANI ve yaygın türlerine ait molekül yapılarının gösterimi.

PANI türleri farklı renklere, kararlılıklara ve iletkenliklere sahiptir. Örneğin, lökoemeraldin rensizdir. Bu polimer sadece benzen ve amino grupları içerdiğinden, havada yavaşça oksitlenir ve elektriksel olarak iletken değildir. Ancak, asidik ortamda p-tipi katkılama ile emeraldin tuzuna oksidasyonu sağlanabilir [256]. Tamamen oksitlenmiş PANI, pernigranilin bazı olarak bilinir ve mavi menekşe rengi ile karakterize edilebilir. Ayrıca, PANI'nin en yaygın türü olan emeraldin formunun tuzu

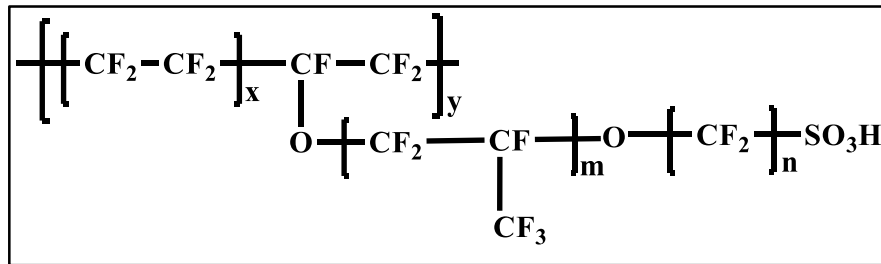
yeşil ve baz formu ise mavi renktedir [257]. Şekil 2.24'te farklı PANI türlerinin renkleri gösterilmiştir [258].



Şekil 2.24: a) PANI emeraldin tuzu, b) Emeraldin bazı ve c) Pernigranilin bazı.

2.5.2. Nafyon

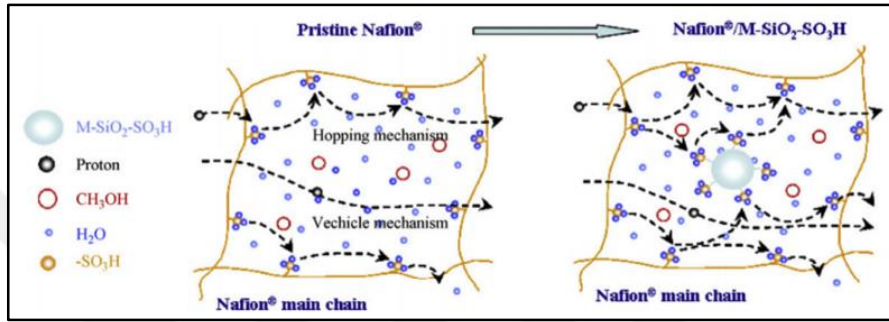
Nafion, DuPont Company tarafından geliştirilmiş, üretilmiş ve elektrokimyasal cihazlarda gösterdiği iyi performans sayesinde en çok çalışılan iyonomer membranlardan biri olmuştur. Bu yapı, perflorlu bir vinil eter komonomerinin tetrafloroetilen ile kopolimerizasyonu ile üretilir ve Şekil 2.25'te verilen kimyasal yapı elde edilir [259, 260]. Aslında nafyon, sülfonik asit grupları ($-\text{SO}_3\text{H}$) ile sonlandırılan perflorovinil eter yan zincirleri ile perflorlu bir omurgadan (PTFE) oluşan rastgele bir yarıkristalin kopolimerdir. İyonların bu tür polimerler yoluyla taşınması, bir ağ-küme modeli ile tarif edilir [261].



Şekil 2.25: Nafyon'un molekül yapısı.

Hidrofilik alanlar, sülfonik asit grupları, su ve protonları içeren hidratlı zar içinde oluşturulmuş kümelerdir. Bu kümeler artan su içeriği ile genişler ve proton iletkenliğini sağlamak için kanallarla bağlanır. Membran içindeki yük aktarımı, bir proton sıçraması (proton-hopping) ve matris taşıma mekanizması (vehicular) ile

tanımlanır. Proton sıçraması mekanizması, bir hidratlı sülfonik asit grubu tarafından oluşturulan hidronyum iyonları ve ardından bir sonraki sülfonik asit grubuna yük aktarımı ile yükün taşınmasını tanımlar. Taşıt mekanizması ise hidronyum iyonunun elektro ozmotik sürüklemenin neden olduğu difüzyon yoluyla diğer iyonların formülasyonu ile taşınmasını ifade etmektedir. Nafyon yapısındaki sülfonik asidin yapının proton iletkenliği üzerindeki önemli rolü her zaman dikkat çekmiş olup, sülfonik asit gruplarının içeriğini artırmak için literatürde farklı yaklaşımlar sunulmuştur [261].



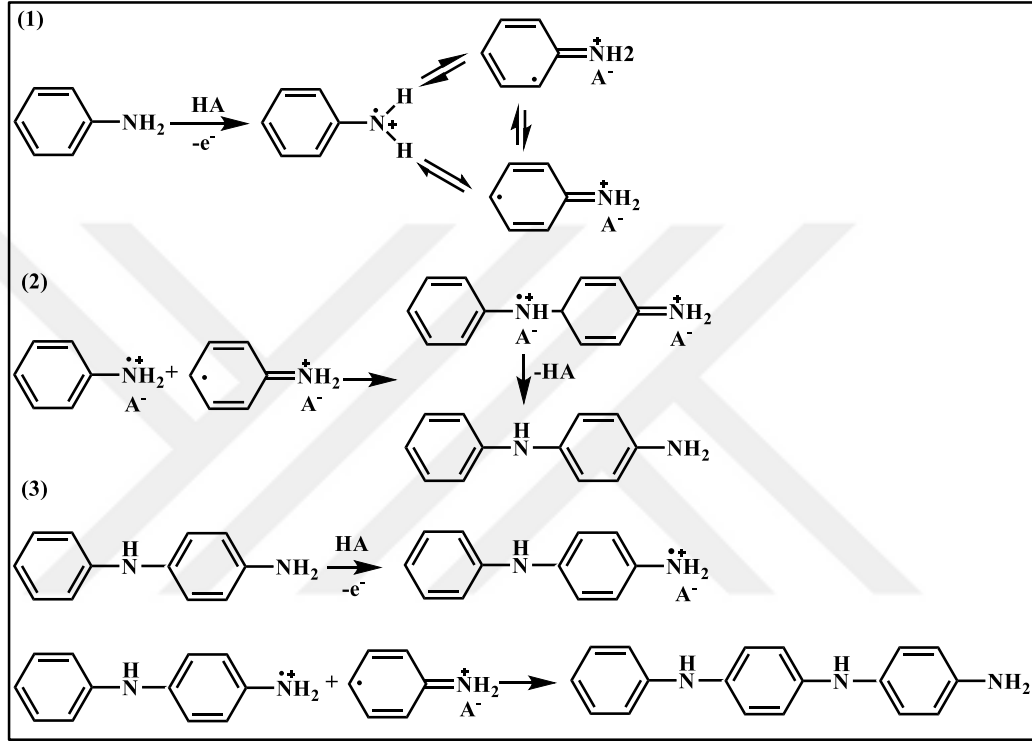
Şekil 2.26: Nafyon/modifiye mezogözenekli parçacıklar içeren kompozit membranlarda proton iletme mekanizmaları.

Lin ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada nafyon iletkenliği üzerinde yüzeyi modifiye edilmiş mezogözenekli silikanın etkisini incelemiştir. Bu çalışmada, silika parçacıkları üzerinde sülfonik asit gruplarının varlığı, silika partiküllerinin yüzeyinde sıçrama mekanizması ve matris taşıma mekanizmasının arttığı ve dolayısıyla iyonik iletkenliğinde artış gösterdiği belirtilmiştir. Sisteme modifiye edilmemiş mezo gözenekli silika parçacıkları eklendiğinde ise proton iletkenliğinin azaldığı tespit edilmiştir. Şekil 2.26'da, nafyon/modifiye mezogözenekli parçacıkların kompozit membranlardaki proton iletme mekanizması göstermektedir [261, 262].

2.5.3. İletken Polimerlerin Sentez Yöntemleri

İletken polimerleri sentezlemek için tek bir yöntem yoktur ve kimyasal, elektrokimyasal, fotokimyasal, katı hal polimerizasyonu gibi çeşitli yöntemlerden biri kullanılabilir. İletken polimerlerin sentezindeki temel gereksinim, sentez işlemi sırasında monomerin konjuge yapısının korunmasıdır. Elektrokimyasal yöntemle iletken polimer eldesi, hem yöntemin basitliği hem de aynı anda katkılı iletken bir

polimer elde etmenin avantajları nedeniyle oldukça fazla ilgi görmektedir [263]. Ayrıca, elektrot yüzeyinde doğrudan biriktirme ve nihâi ürünün kalınlığı ve morfolojisi üzerinde daha kolay bir kontrol sunar [264]. Bu teknik kullanılarak polipirrol, politiyofen, polianilin, polifenilen gibi çeşitli iletken polimerler sentezlenebilmektedir. Şekil 2.27’de tez çalışmasında kullanılan ve iletken bir polimer olan PANI üzerinden elektrokimyasal sentez mekanizması kısaca açıklanmaktadır.



Şekil 2.27: PANI'nin elektropolimerizasyon mekanizması.

İlk olarak (1), birincil katyon-radikal oluşumu (monomerin anotta oksidasyonu) meydana gelir. İkinci aşamada (2), deprotonasyon ve yeniden aromatisasyon yoluyla dimerlerin oluşumu, son aşamada (3) ise dimerlerin bir katyon radikaline oksidasyonu ve monomer katyon radikalleri ile büyüme ve zincir oluşumu meydana gelmektedir. Son PANI polimerik zincirinin yapısı, yükseltgenmiş ve indirgenmiş tekrar eden iki birimin bir kombinasyonundan meydana gelir [264].

Kimyasal polimerizasyon yöntemi de oldukça fazla tercih edilen yöntemlerden biridir ve özellikle büyük ölçeklerde iletken polimer sentezleyebilmek için tercih edilmektedir [263]. Ancak, ince filmler oluşturamaması bu tekniğin en büyük dezavantajı olarak görülmektedir [265].

2.5.4. İletken Polimerlerin Kullanım Alanları

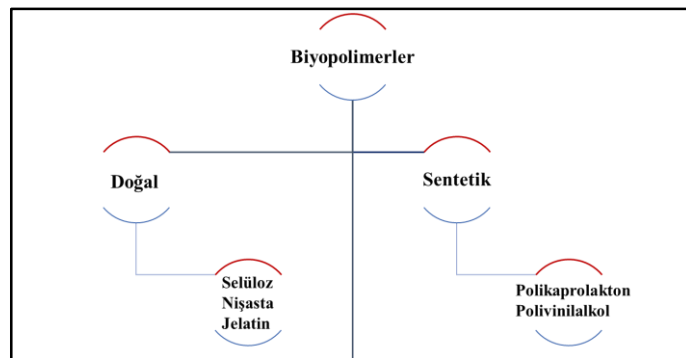
İletken polimerler biyomalzemeler ve biyosensörler dâhil olmak üzere pek çok biyomedikal uygulamaya entegre etmek ve arayüz oluşturmak için kullanılmıştır. Biyomühendislik, rejeneratif tıp ve biyosensörler gibi biyotibbin çeşitli alanlarında, potansiyel olarak tercih edilen iletken polimerlere olan ilgi hâla devam etmektedir. Chakraborty ve arkadaşları kardiyak doku mühendisliği için biyomalzeme geliştirmişlerdir ve bu malzemeye iletkenlik sağlamak için PANI kullanılmıştır [266]. Heo ve arkadaşları, sinir dokusu mühendisliği için iletken bir hidrojel çalışmışlardır. Hidrojelle iletkenlik sağlamak için ise poli(3,4-etilendioksitiyofen) (PEDOT): polistiren sülfonat (PSS) iletken polimerlerini tercih etmişlerdir [267]. Shahrokhian ve arkadaşları, kanser biyobelirteci olan BRCA1'i algılamaya yönelik elektrokimyasal bir biyosensör geliştirmişlerdir. Bu biyosensörde hassasiyeti artırmak için iletken polimer olarak polipirol-3-karboksilik asit kullanılmıştır. Modifiye edilmiş elektrotun kan plazma örneklerinde eser miktardaki analitin doğru bir şekilde belirlenmesi için başarıyla kullanıldığını ifade etmişlerdir [268]. Ratautaite ve arkadaşları, SARS-CoV-2 spike glikoprotein tespiti için moleküler baskılı polipirol temelli sensör geliştirmişler ve bu sensörün SARS-CoV-2 virüs proteinlerinin tespiti için uygulanabileceğini vurgulamışlardır [269]. Bu çalışmalara ek olarak süper kapasitörler ve piller gibi enerji depolama uygulamalarına uyumlu hale getirmek için iletken polimerler ile çeşitli yaklaşımlar oluşturulmuştur. Li ve arkadaşları, sulu çinko-iyon pil elde etmek için V_2O_5 /iletken polimer kompoziti oluşturmuşlardır. Bu kompozit sistemde iletken polimer olarak PEDOT kullanılmış olup, yüksek verimli enerji depolaması için farklı organik-inorganik katot malzemelerinin tasarımı için öncü olabileceğini belirtmişlerdir [270]. Rehman ve arkadaşları süper kapasitör için elektrot malzemesi olarak iletken polimer-metal oksit temelli nanokompozit sistemini geliştirmişlerdir. İletken polimer olarak PANI kullanılmış ve metal oksit olarak ise Pr_2O_3 , NiO, Co_3O_4 kullanılarak PANI temelli farklı kompozitler elde etmişlerdir. Elde ettikleri performans neticesinde bu çalışmanın, süper kapasitör elektrot malzemeleri için iletken polimer temelli metal oksit nanokompozit üretimi için yeni bir araştırma fikri sunduğunu belirtmişlerdir [271]. Sonuç olarak, sergiledikleri iyi özellikler sayesinde iletken polimerler ve iletken polimer içeren kompozitlerin elektronik cihazların geliştirilmesi için kullanılmaya devam edeceği düşünülmektedir.

2.6. Biyopolimer

Biyopolimerler, çevreye zarar vermeyen ve yenilenebilir kaynak temelli malzemelerdir. Biyopolimerler, canlı organizmaların etkisiyle biyolojik olarak parçalanabilmekte ve sahip oldukları özellikler sayesinde farklı uygulamalar için her geçen gün artan bir öneme sahip olmaktadır [272].

2.6.1. Biyopolimerlerin Sınıflandırılması

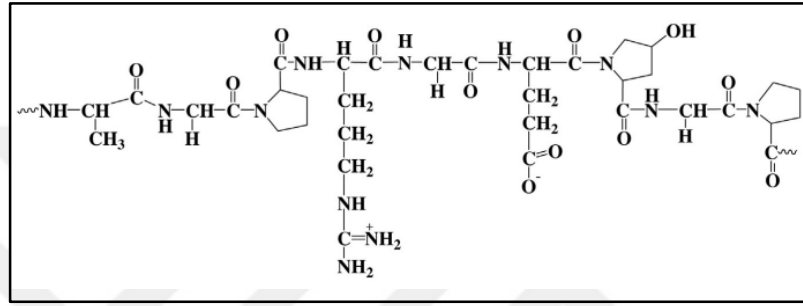
Biyopolimerler elde edildiği kaynağa göre doğal veya sentetik olarak sınıflandırılabilir. Şekil 2.28'de sınıflandırmaya ait temel gösterim verilmiştir. Bakteriler ve mantarlar tarafından üretilen karbonhidrat polimerleri; selüloz, nişasta, aljinat gibi polisakaritler; kitin/kitosan, yün, ipek, jelatin ve kollajen gibi hayvansal protein temelli polimerler biyopolimerlerin bazı örnekleridir. Protein, nişasta, selüloz ve kitin gibi doğal olarak oluşan polimerler yenilenebilir, biyoyumluluk ve biyobozunurluk gibi özelliklere sahiptirler [273]. Polikaprolakton, polilaktik asit, polivinil alkol, poliglikolik asit, polihidroksibütirat ve polibütilen süksinat ise sentetik biyopolimer örnekleridir. Bu grup öngörülebilir ve tekrarlanabilir mikro yapı ve mekanik özelliklerle büyük ölçekte sentezlenebilir olmaları nedeniyle özellikle tekstil, tıp ve ambalaj endüstrisi gibi çeşitli uygulamalarda tercih edilmektedir. Yenilenebilir kaynaklardan elde edilen biyopolimerler, petrol kaynaklarının sınırlı olduğu kaygısı nedeniyle son yıllarda oldukça dikkat çekici olmuştur. Amaç, çevreye zarar vermeyen ve çevreye atıldığında doğal olarak parçalanabilen yeni polimerler geliştirmektir [274].



Şekil 2.28: Biyopolimerlerin sınıflandırılması.

2.6.2. Jelatin

Hayvan derileri, kemikleri ve tendonlarından elde edilen kollajenin kısmi hidrolizi ile elde edilen jelatin, suda çözünür fonksiyonel bir proteindir. Elde edildiği kaynak ve hazırlama tekniklerindeki farklılıklar nedeniyle değişken fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olabilir [275]. Jelatin çok sayıda glisin, prolin ve 4-hidroksi prolin yapısından oluşur. Yarı saydam, renksiz ve neredeyse tatsız özellikler gösterir. Jelatin biyopolimerine ait molekül yapısı Şekil 2.29’da verilmiştir. [274].



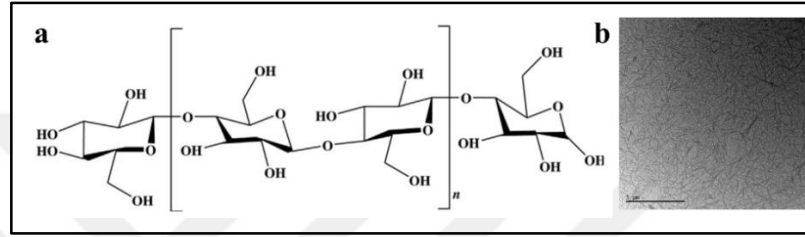
Şekil 2.29: Jelatinin molekül yapısı.

Jelatinin jelleşme özellikleri kimyasal çapraz bağlama ile sağlanabildiği için ilaç, kozmetik endüstrilerinde jelleştirici olarak kullanılmakta ve doku mühendisliği uygulamalarında da oldukça fazla tercih edilmektedir. Ayrıca, dünya çapında hâla birçok gıda uygulamasında tercih edilmesine neden olmuştur [274].

2.6.3. Nanokristalin Selüloz

Endüstriyel ölçekte sürdürülebilir en önemli malzemelerden biri olan selüloz, doğada en bol bulunan doğal polimerdir. Mısır papirüslerinden bu yana, selüloz ürünleri insan kültürünün kaydedilmesi ve iletilmesinde etkin bir şekilde yer almıştır. Selülozun kimyasal modifikasyonu ise geniş bir ürün yelpazesine sahip olmasına yol açmıştır. Örneğin, kaplamalar, filmler, membranlar, yapı malzemeleri, ilaçlar ve gıda maddeleri için tasarlanan yeni malzemeler için selülozun ester ve eter türevleri tercih edilebilmektedir. Son yıllarda ise, çeşitli şekillerde kristalitler, nanokristaller, nanofibriller ve nanolifler olarak adlandırılan selülozun yeni formlarının elde edilmesi yeni uygulama alanlarına yer açmıştır [276]. Bu formlar arasında nanokristalin selüloz, selüloz kaynağının amorf bölümlerinin asit hidrolizi ile çıkarılmasından elde edilir.

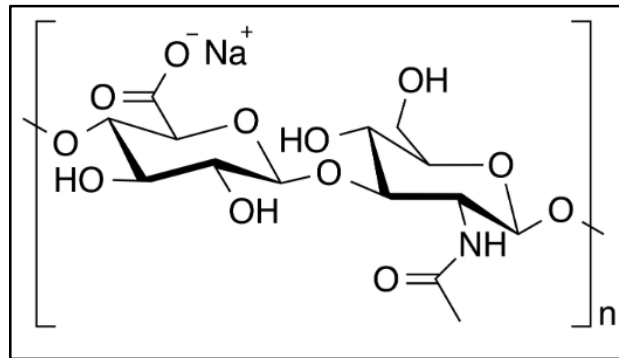
Yaklaşık 5-70 nm genişlik ve 100 nm-birkaç mikrometre arasında uzunluğa sahip çubuk benzeri selüloz kristalleridir. Şekil 2.30'da selülozun molekül yapısı ve nanokristalin selülozun morfolojik yapısını göstermek için bir TEM görüntüsü verilmiştir. Oldukça kristalin yapıda olması nedeniyle dâhil olduğu kompozit sistemin mekanik mukavemetinide artırmaktadır. Biyolojik olarak parçalanabilen plastikler, biyomedikal uygulamalar, kaplamalar, yapıştırıcılar, köpükler, organik yarı iletkenler, alan etkili transistörler, fotovoltaik hücreler ve sensörler gibi geniş kullanım alanındaki tasarımlarda tercih edilmiştir [276, 277].



Şekil 2.30: a) Selülozun molekül yapısı, b) Nanokristalin selülozun morfolojik yapısı.

2.6.4. Hyaluronik Asit

Hyaluronik asit, tıbbın çeşitli alanlarında uygulaması olan, yaygın olarak bulunan, biyoyumlu bir polisakarittir. Hyaluronik asit, D-glukuronik asit moleküllerini ve β -(1-4) ve β -(1-3) glikozitlerle bağlı N-asetilglukozamin moleküllerini içeren tekrarlayan disakkarit birimlerinden oluşan bir biyopolimerdir [278]. Hyaluronik asit horoz ibiğinden elde edilmektedir ancak, viral enfeksiyon riski ve alerji ihtimalleri nedeniyle genetiği değiştirilmiş bir *Bacillus subtilis* suşu kullanılarak üretilmektedir [279].



Şekil 2.31: Hyaluronik asitin molekül yapısı.

2.6.5. Biyopolimerlerin Kullanım Alanları

Rejeneratif tıp için ideal bir biyomalzeme, toksik özellik göstermeyen, biyouyumlu, yeterli mekanik ve fiziksel özelliklere sahip, doku gelişimini teşvik eden özelliklere sahip olmalıdır. Bu özellikleri sağlayabilen biyopolimerler, ekstrasellüler matrikse benzerliklerinden dolayı sentetik polimerlerle ilişkilendirilen kronik inflamatuvar veya immünolojik reaksiyonları ve toksisiteyi artırıcı özellik göstermezler [280]. Dolayısıyla biyopolimerler doku mühendisliği [281], yara örtüsü [282], implante edilebilir cihazlar [283] ve ilaç salınım sistemleri [284] tasarımında kullanılabilir. Ghamkhari ve arkadaşları akıllı ilaç salınım sistemi olarak bir polilaktid biyopolimeri içeren nanokompoziti geliştirmişlerdir. Bu kompozit sistem ile doksorubisinin oral yoldan verilmesi için nano ölçekli bir malzeme tasarlanmış ve meme kanseri tedavisi için umut verici olabileceğini belirtmişlerdir [285]. Nguyen ve arkadaşları gıda paketlenme uygulamaları için polipropilen üzerine nanoselüloz/nanokitin biyopolimerlerini içeren film geliştirmişlerdir. Bu filmin bakteri yapışması için elverişsiz olması ve termal olarak geri dönüştürülebilir özelliğe sahip olması gelişmiş gıda paketlenme uygulamaları için umut verici olduğunu belirtmiştir [286].

Biyopolimer nanokompozitler, 1-100 nm boyutunda nanoparçacık içeren biyopolimerlerden oluşur. Kullanılan dolgu maddelerinin yüksek en/boy oranı ve yüksek yüzey alanı nedeniyle daha gelişmiş özellikler sergiler. Takviye nanoparçacıkları iletken ise, ortaya çıkan kompozitler mükemmel elektriksel iletkenlik gösterir ve böylece elektronik uygulamalarda kullanılan ve genellikle “iletken polimer nanokompozitler” olarak bilinen yapılar elde edilir [287]. Peng ve arkadaşları yüksek performanslı süper kapasitör geliştirmek için biyopolimer temelli iletken kompozit film geliştirmişlerdir [288]. Najafi ve arkadaşları polilaktik asit-grafen içeren iletken pamuklu kumaşlar tasarlamışlardır. Bu kompozit yapının gerilim sensörleri olarak kullanılabilmesini rapor etmişlerdir [289]. Elektronik uygulamalar için biyolojik temelli malzemelerin üretimi günümüzde hızla büyüyen bir alandır ve bu yaklaşımın gelecekteki elektronik atık sorunlarını etkili bir şekilde çözebileceği düşünülmektedir [289]. Ayrıca, biyopolimer temelli yapılar gelişmekte olan ve yenilenebilir elektrolit malzemeler olarak esnek ve akıllı elektrokimyasal enerji depolama ve dönüştürme cihazları için rekabetçi adaylar olarak kabul edilmektedir [290].

2.6.6. (Biy)Sensör Teknolojisinde Biyopolimerler

Biyosensörlerde kullanılan fonksiyonel materyallerin çoğu, biyotanıma elemanını korumak için gerekli biyoyumluluktan yoksundur. Biyopolimerler ise biyoyumluluk sağlamak için fonksiyonel malzemelerle kolayca kompozit oluşturabilir. Biyopolimerler, son yıllarda bu malzemelerdeki artan bilimsel ve teknolojik ilgiden dolayı biyosensör gelişimi alanında dikkat çekmektedir. Biyopolimer temelli biyoanalitik cihazların gelişimi, biyopolimer temelli malzeme sentezindeki ilerlemenin ve çeşitli biyosensör konfigürasyonlarının üretimindeki teknolojik ilerlemeden kaynaklanmaktadır. Biyopolimerlerle ilgili araştırmaların önümüzdeki yıllarda biyosensör bilimcileri ve teknoloji uzmanlarına tamamen yeni yetenekler sağlayacağı düşünülmektedir. Nihai amaç, çeşitli hastalıkların erken teşhisi için düşük maliyetli, güvenilir cihazlarının geliştirilmesidir [10]. Aghris ve arkadaşları insektisit flubendiamidin tespiti için elektrokimyasal platform olarak kitosan biyopolimer kaplı grafit elektrot geliştirmişlerdir. Geliştirilen elektroanalitik yöntem, CV ve DPV ile çalışılmış olup, önerilen sensörün su ve beyaz pirinç örneklerinde iyi geri kazanım oranlarıyla hassas flubendiamidin tespiti yapabildiğini belirtmişlerdir [291]. Joshi ve arkadaşları influenza virüsü sensörü için biyopolimer içeren indirgenmiş grafen oksit yapılarını kullanmışlardır. Dişi bir lak böceği tarafından salgılanan ucuz bir doğal biyopolimer olan Shellac, son zamanlarda biyomedikal organik cihazlarda gösterildiği gibi mükemmel biyoyumluluğa sahiptir. Bu nedenle bu çalışmada da biyopolimer olarak Shellac kullanmışlardır ve elde edilen sensörün yaygın klinik uygulamalar için güvenilir ve sağlam nanomalzeme olarak büyük potansiyel gösterdiği belirtilmiştir [292]. Khalilzadeh ve arkadaşları antidepresan bir ilaç olan venlafaksin tespiti için elektrokimyasal bir sensör geliştirmişlerdir. Bu sensörde hassasiyeti artırabilmek için bakır ile selüloz nanokristaller üzerine biriktirilmiş demir oksit parçacıkları kullanmış olup, idrar, su ve farmasötik formülasyon örneklerinde venlafaksini tanımlamak için seçici, kolay ve hassas bir sensör olarak kullanılabileceğini söylemişlerdir [293]. Thirumalraj ve arkadaşları da platin nanopartikül destekli grafit/jelatin hidrojel kullanılarak biyolojik numunelerde H₂O₂ tayini için elektrokimyasal bir sensör geliştirmişlerdir. Modifiye elektrotun pratik uygulamalar için insan serumu ve tükürük gibi biyolojik örneklerde H₂O₂ tayini için başarıyla uygulandığını belirtmişlerdir [294].

3. DENEYSEL BÖLÜM

3.1. Tez Çalışması Kapsamında Kullanılan Kimyasallar

Tablo 3.1: Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler.

Kimyasal Adı	CAS-No
Lakkaz (<i>Trametes versicolor</i> , 26.0 U/mg)	80498-15-3
Üreaz (<i>Canavalia ensiformis</i> (Jack bean), Tip IX, 50.000-100.000 U/mg)	9002-13-5
Demir(III) klorür heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	10025-77-1
Bakır(II) klorür (CuCl_2)	7447-39-4
Nikel(II) klorür heksahidrat ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	7791-20-0
Kobalt(II) klorür heksahidrat ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	7791-13-1
Çinko klorür heksahidrat ($\text{ZnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	7646-85-7
Sodyum hidroksit (NaOH)	1310-73-2
Tetraetoksisilan ($\text{C}_8\text{H}_{20}\text{O}_4\text{Si}$)	78-10-4
(3-aminopropil) trietoksisilan ($\text{C}_9\text{H}_{23}\text{NO}_3\text{Si}$)	919-30-2
Anilin ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_2$)	62-53-3
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	7778-77-0
Dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4)	7758-11-4
Amonyak çözeltisi (NH_4OH , 30-33%)	1336-21-6
Üre ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$)	57-13-6
Bisfenol A ($\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_2$)	80-05-7
Toluen (C_7H_8)	108-88-3
Hidroklorik asit (HCl, %37)	7647-01-0
Glutaraldehit çözeltisi ($\text{OHC}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$, 50% w/v)	111-30-8
Nafyon	31175-20-9
Potasyum hekzasiyanoferrat(III) ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$)	13746-66-2
Potasyum hekzasiyanoferrat(II) trihidrat ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	14459-95-1
Hyaluronik asit sodyum tuzu ($\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{NNaO}_{11}$, 10.000-50.000 Mw)	9067-32-7
Nanokristalin Selüloz	9004-34-6
Jelatin, porcine skin, Type A	9000-70-8

3.2. Tez Çalışması Kapsamında Kullanılan Cihazlar

3.2.1. Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

Tez kapsamında hazırlanan malzemelerin yapısal analizini belirlemek için FTIR ölçümleri (Perkin Elmer, ABD), 16 tarama için saniyede 4 cm^{-1} çözünürlükte alındı.

3.2.2. X Işını Kırınım Analizi (XRD)

Ferrit nanoparçacıklarının kristal yapılarını değerlendirmek için XRD (Rigaku, Japonya) analizi yapıldı.

3.2.3. Termal Gravimetrik Analiz (TGA)

Nanopartiküllerin TGA ile termogravimetrik analizi (Mettler Toledo STARe, İsviçre), 50 mL dk^{-1} Ar akışında, $25\text{-}750 \text{ }^\circ\text{C}$ aralığında ve $10 \text{ }^\circ\text{C dk}^{-1}$ sıcaklık artışında gerçekleştirildi.

3.2.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Numunelerin ve elektrotların yüzeyleri palladyum-altın ince film ile kaplandıktan sonra SEM (FEI-Nova, Amerika) ile yüzey morfolojisi incelendi.

3.2.5. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)

Numunelerin morfolojik karakterizasyonu için ayrıca TEM analizi yapıldı ve görüntüler Hitachi HT-7700 (Japonya) cihazı ile elde edildi.

3.2.6. UV-Vis Spektrometre

Ferrit nanopartiküllerin optik absorpsiyon spektrumları ve bant aralığı enerjilerini bulmak için T80+ UV-Vis spektrometresi (PG Instruments LTD, Birleşik Krallık) kullanıldı.

3.2.7. Brunauer-Emmett-Teller (BET) Yüzey Alan Analizi

Ferrit nanoparçacıklarının spesifik yüzey alanı özellikleri, 77 K'de (Micromeritics Gemini VII, Amerika) N₂ adsorpsiyon/desorpsiyon izotermi kullanılarak BET analizi ile belirlendi.

3.2.8. Zeta Potansiyeli Analizi

Ferrit nanoparçacıkların yüzey yükleri, pH 7.0'de 0.05 M fosfat tamponu içinde Malvern Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instrument, Birleşik Krallık) cihazı kullanılarak hesaplandı.

3.2.9. Elektrokimyasal Ölçümler

Tez çalışmasında elektrokimyasal ölçümler CV ve DPV yöntemleri CH Instruments CHI440B ile oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

3.2.10. Parçacık Boyutu Analizi

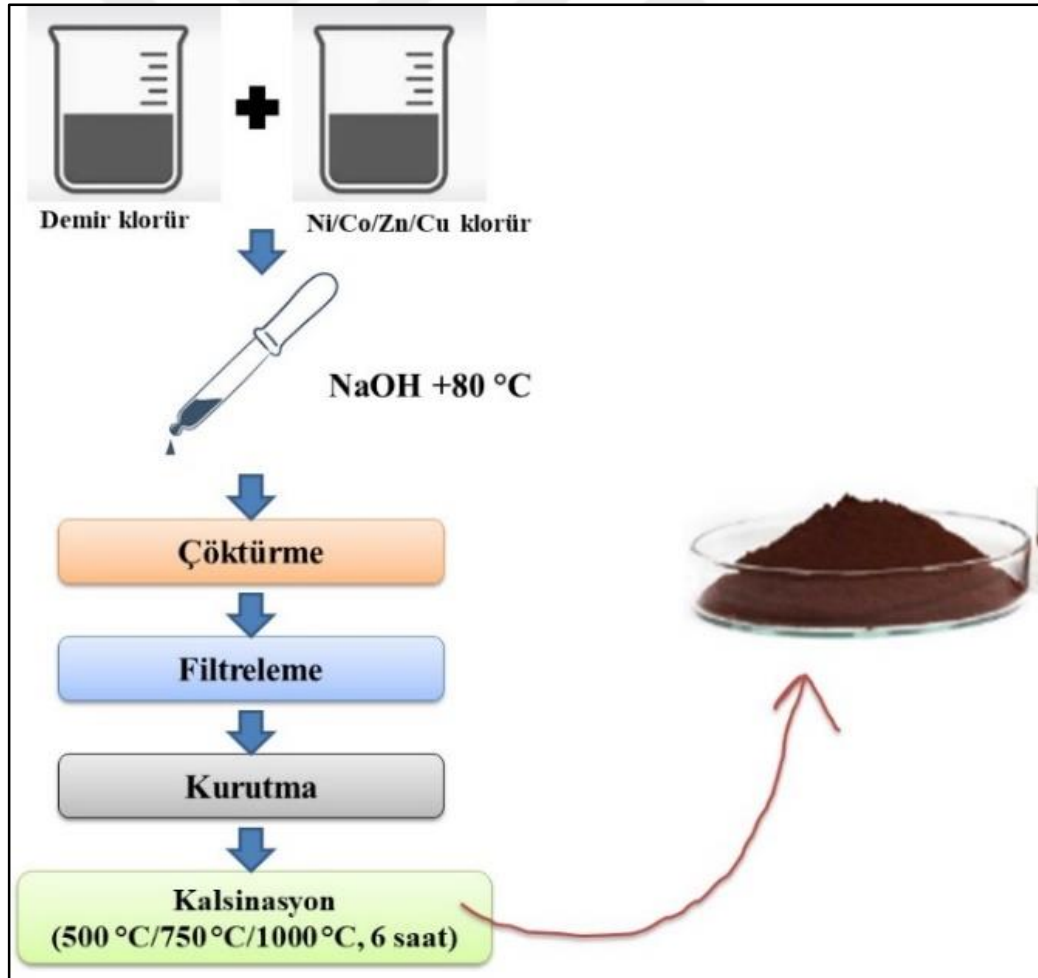
Nanopartiküllerin ortalama çapları SEM görüntüleri üzerinden ImageJ 1.30v (Amerika) programı ile belirlendi.

3.2.11. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

BPA analizi için sunulan elektrokimyasal yöntemin doğruluğu, yarı genişliğinin 4 nm olarak belirlendiği G1315B diyot dizi dedektörüne (DAD) sahip HPLC sistemi (Agilent, 1100 serisi) kullanılarak yapıldı. BPA analizini yapabilmek için, dalga boyu olarak 235 nm seçilmiştir. Sabit faz olarak SVEA C18 kolonu (5 nm, 250x4.6) kullanılırken, mobil faz olarak %0.1 asetik asit ve metanol (60:40, v/v) karışımı kullanılmıştır. Numunelerin enjeksiyon hızı ve mobil fazın akış hızı sırasıyla 100 µL ve 1.0 mL dk⁻¹ olarak belirlendi. İzokratik elüsyon ile gerçekleşen analizde BPA için alıkonma süresi 14.925 dakika olarak belirlenmiştir. BPA'nın stok çözeltisi su:metanol içinde hazırlanmış ve gerçek numunelerde BPA'nın HPLC analizi için kullanılan standart BPA çözeltileri (1000, 250, 50, 10, 1 µM) ile kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir.

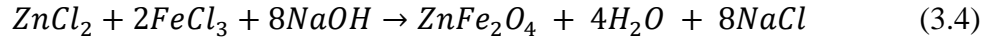
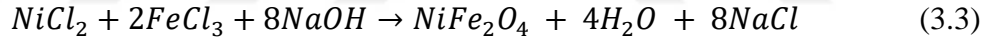
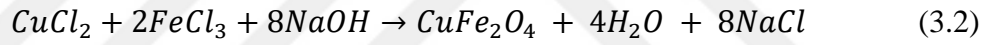
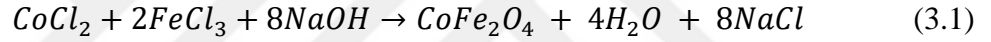
3.3. Ferrit Nanoparçacıklarının Sentezi

Tez çalışması kapsamında tasarlanan elektrokimyasal biyosensörlerde, elektrokatalitik aktiviteleri ve yüksek yüzey alanlarından dolayı ferrit nanoparçacıkları tercih edilmiştir [295]. Bu amaçla dört adet ferritin nano boyuttaki parçacıklarının sentezi gerçekleştirilmiştir. Tercih edilen ferritler; oksidasyon direnci, kimyasal stabilite, mekanik sertlik nedeniyle immünosensörler dâhil hücre etiketleme, manyetik rezonans görüntüleme gibi çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılan bakır ferrit (CuFe_2O_4 , CuF), kobalt ferrit (CoFe_2O_4 , CoF), nikel ferrit (NiFe_2O_4 , NiF) ve çinko ferrit (ZnFe_2O_4 , ZnF) bileşikleridir. Ferrit nanoparçacıklarını elde edebilmek için inorganik tuzları içeren sulu bir çözeltinin uygun stokiyometride pH'ını artırarak çöktürmesinden oluşan “birlikte çöktürme” yöntemi tercih edilmiştir. Uygulanan prosedür şematik olarak Şekil 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.1: Ferrit nanoparçacıklarının birlikte çöktürme yöntemi ile eldesi.

İlk olarak, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ve CuCl_2 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tuzlarının mol olarak 2:1 oranındaki ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ve 2+ değerlik metal tuzları) miktarları hesaplanarak 80 mL saf su içerisinde çözeltileri hazırlandı. İki çözelti 250 mL'lik balona konarak yaklaşık 10 dakika 200 rpm'de ve oda sıcaklığında karıştırıldı. Karışımın içerisine 0.5 M'lık NaOH çözeltisinden damla damla eklenerek pH değerinin yaklaşık 11.0'e gelmesi sağlandı. Bu işlem sırasında çözelti manyetik karıştırıcı yardımıyla 250 rpm'de karıştırıldı. NaOH eklenmeye başladığı andan itibaren koyu kahve-siyah renkte çökelek oluşumu gözlemlendi. İstenilen pH değeri elde edildikten sonra sıcaklık 80°C'ye ayarlanarak 2 saat karıştırıldı. Bu işlem sonrasında karışımın oda sıcaklığına gelmesi beklendi ve saf su ile 3 defa yıkanarak santrifüjde (4000 rpm, 15 dk) çöken ürünler toplandı. Elde edilen ürünler etüvde 1 gün boyunca 100°C'de kurutuldu, sonrasında ise kül fırınında 500°C, 750°C ve 1000°C olmak üzere üç farklı sıcaklıkta kalsinasyon işlemleri yapıldı [296]. İşlemler esnasında gerçekleşen reaksiyonlar Eşitlik 3.1-3.4'te gösterilmiştir;



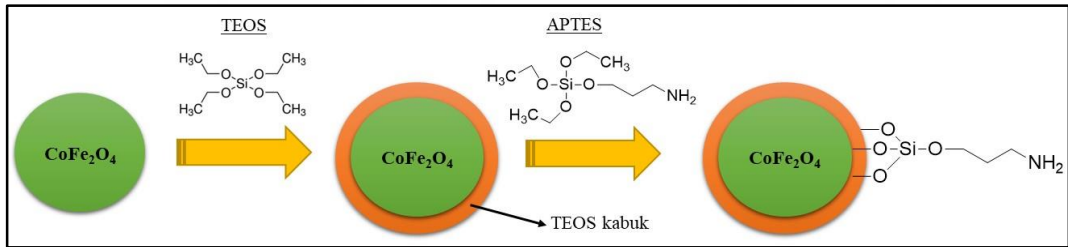
Elde edilen ürünler fiziksel, kimyasal ve morfolojik olarak karakterize edilmiş olup, dijital görüntüler Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Farklı kalsinasyon sıcaklığında kalsine edilen ferrit nanoparçacıkları için kodlamalar şu şekildedir: 500°C kalsinasyon sıcaklığında elde edilen ferritler için NiF-500, CoF-500, ZnF-500, CuF-500; 750°C kalsinasyon sıcaklığında elde edilen ferritler için NiF-750, CoF-750, ZnF-750, CuF-750; 1000°C kalsinasyon sıcaklığında elde edilen ferritler için NiF-1000, CoF-1000, ZnF-1000, CuF-1000 kısaltmaları kullanılmıştır.



Şekil 3.2: Elde edilen ferrit nanoparçacıklarına ait dijital fotoğraflar.

3.4. TEOS ile Yüzey Modifikasyonu

Tez çalışmasında 750 °C kalsinasyon sıcaklığında elde edilen 4 adet ferritin (CuF-750, CoF-750, ZnF-750 ve NiF-750) kullanılması yapılan karakterizasyonların değerlendirilmesi sonucu uygun görülmüştür ve TEOS ile modifikasyon prosedürü uygulanmıştır. Kalsinasyon sıcaklığının 750 °C olarak optimize edilmesi ile ilgili detaylı açıklamalar Bölüm 4.1’de verilmiştir. Şekil 3.3’te TEOS ve APTES modifikasyonlarına yönelik şematik bir gösterim sunulmuştur. Uygulanan prosedür şu şekildedir; 0.250 g ferrit nanoparçacıkları 1 saat susuz etanol içerisinde sonikatör yardımı ile homojen olarak dağılması sağlandı. 4.5 mL amonyak çözeltisi ve ardından 2.0 mL TEOS karışıma eklendi. Magnetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılan sistem 12 saat oda sıcaklığında karıştırılmaya devam edildi (500 rpm). TEOS ile modifiye edilen ürün santrifüj (4000 rpm) yardımıyla su ve etanol ile yıkandı. Son olarak elde edilen modifiye ferrit nanoparçacıkları 60-70°C’de etüvde kurularak karakterizasyon ve elektrokimyasal ölçümler için oda sıcaklığında depolandı [297]. TEOS modifikasyonundan sonra elde edilen ürünlerin kodları şu şekildedir: CuF-TS, CoF-TS, ZnF-TS ve NiF-TS.



Şekil 3.3: Ferrit nanoparçacıklarının TEOS ve APTES ile modifikasyonu için şematik gösterim.

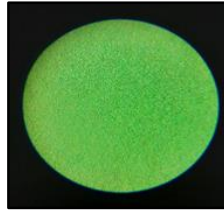
3.5. APTES ile Yüzey Modifikasyonu

TEOS ile modifiye edilen ferritler enzim immobilizasyonu için uygun fonksiyonel gruplara sahip değildir. Dolayısıyla bu modifiye nanoparçacıkların APTES ile de modifiye edilerek -NH₂ fonksiyonel grubuna sahip olması istenmektedir. Tez çalışmasında kullanılacak olan 4 adet ferrit için aynı prosedür uygulanmıştır. Uygulanan APTES ile silanlama prosedürü şu şekildedir; 0.1 g TEOS ile modifiye edilmiş ferrit nanoparçacıkları 150 mL susuz toluen içinde yaklaşık 30 dk

dispers edildi. İçerisine 2.0 mL APTES ilave ederek 100°C'de yaklaşık 16 saat karıştırıldı. Karıştırma işlemleri magnetik karıştırıcı ile yapıldı (500 rpm). Isıtma sonrası elde edilen ürün toluen ile yıkanarak santrifüjde çöktürüldü (4000 rpm). Son olarak elde edilen modifiye ferrit nanoparçacıkları etanol ile yıkandı ve 60-70°C'de etüvde kurularak sonraki deneysel aşamalar için oda sıcaklığında saklandı [298]. APTES modifikasyonundan sonra elde edilen ürünlerin kodları şu şekildedir: CuF-TS@AP, CoF-TS@AP, ZnF-TS@AP ve NiF-TS@AP.

3.6. BPA Biyosensörü için Polianilin Sentezi

Polianilin nanoliflerinin (PANI-nl) elektropolimerizasyonu için üç elektrotlu sistem kullanıldı: çalışma elektrotu, karşıt ve referans elektrot için sırasıyla, kare şeklinde bir platin plaka (10 mm X 10 mm), platin tel ve Ag/AgCl. Elektropolimerizasyon, elektrolit olarak HCl (1.0M):CH₃OH (0.5M):anilin (0.2M) içerisinde CV yöntemi ile yapıldı. Polianilin nanolifleri için polimerizasyon 0.2 V ile 0.6 V arasında gerçekleştirildi. Çalışma elektrotu yüzeyinde oluşan yeşil renkteki emeraldin tuzu olan polimerler (Şekil 3.4) elektrottan sonikatör yardımıyla etanol içeren cam vialde toplandı [299].

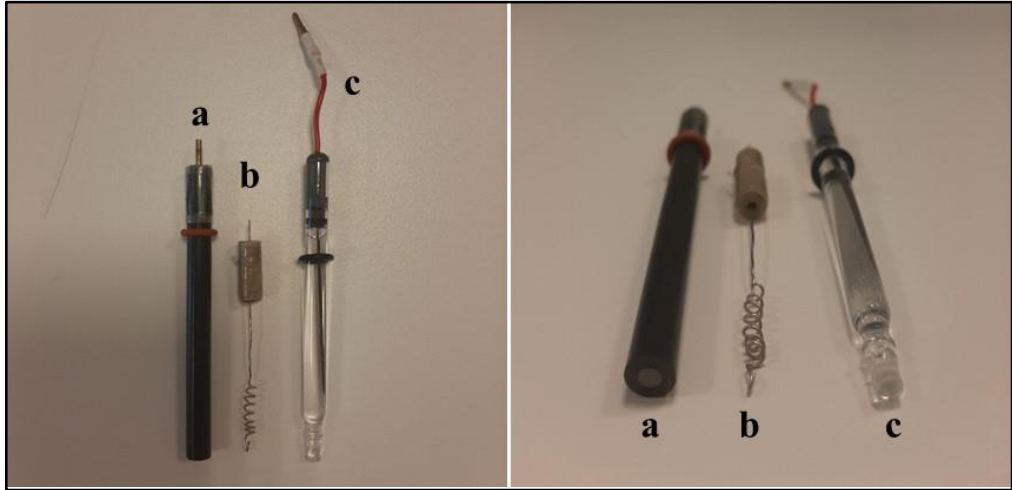


Şekil 3.4: Tez kapsamında elektrot yüzeyine sentezlenen PANI için dijital fotoğraf (emeraldin).

3.7. Üre Biyosensörü için Elektrot Modifikasyonu ve Enzim İmmobilizasyonu

Tüm elektrokimyasal çalışmalar 10 mL'lik elektrokimyasal hücre içerisinde gerçekleştirildi. Çalışma elektrotu olarak camsı karbon elektrot (GCE, 3 mm çap), karşıt elektrot olarak platin tel ve referans elektrot olarak ise Ag/AgCl (3.0 M KCl) elektrot kullanıldı. Öncelikle, %5'lik nafyon çözeltisi etanol ile %1'lik olacak şekilde seyreltildi ve mikropipetle 1.5 µL alınarak 0.1 µm, 0.05 ve 0.03 µm alümina

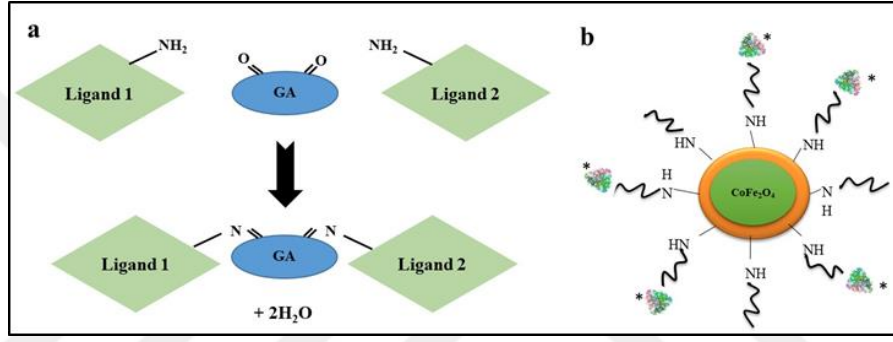
bulamaçları ile temizlenmiş GCE üzerine damlatıldı, oda sıcaklığında kurutuldu. Daha sonra 0.1 M'lık anilin çözeltisi (0.1 M anilin:1.0 M HCl) kullanılarak nafyon kaplanmış elektrotun yüzeyi 3 döngü olacak şekilde PANI kaplandı. Polimerizasyon parametreleri; -0.3-1.0 V arasında ve 0.05 mV tarama hızı olarak sabit tutuldu. Polimerizasyon işleminden sonra elektrot yüzeyi saf su ile yıkanarak monomerlerden uzaklaştırıldı ve oda sıcaklığında kuruması sağlandı. TEOS ve APTES ile modifiye edilmiş ferrit nanoparçacıklarının 2.0 mg mL⁻¹ lık dispersiyonu saf su içerisinde hazırlandı ve içerisinden 3.0 µL mikropipetle alınarak nafyon ve PANI kaplanmış elektrot yüzeyine kaplandı. Son olarak, pH 7.0 (0.05 M) tampon içinde hazırlanan 6.0 mg mL⁻¹ üreaz çözeltisine çapraz bağlayıcı olarak kullanılan gluteraldehit ilave edildi ve hazırlanan çözeltiden 10.0 µL alınarak elektrotun yüzeyine damlatıldı. Böylece enzimin elektrot yüzeyine immobilize edilmesi sağlandı. Yaklaşık 2 saat boyunca oda sıcaklığında elektrot yüzeyi tamamen kuruduktan sonra saf su ile yıkanarak bağlanmamış enzim ve çapraz bağlayıcılardan uzaklaştırıldı. Kullanıma hazır hale gelen elektrot her kullanım için aynı prosedür kullanılarak hazırlandı. CV ölçümleri, -0.6 ile 1.0 V potansiyelde ve 100 mV s⁻¹ tarama hızında alınmıştır. DPV ölçümleri ise 1.0 s'lik bir puls periyodunda, 0.2 V'lik bir genlik ve 0.01'lik bir puls genişliğinde, -0.6 ile 0.8 V arasında kaydedildi.



Şekil 3.5: Elektrokimyasal analizlerde kullanılan elektrotlar: a) GCE, b) Platin tel ve c) Ag/AgCl elektrot.

3.8. Üre Biyosensörü için Jelatin Temelli Elektrot Modifikasyonu ve Enzim İmmobilizasyonu

Jelatin içeren kompozit sistem için öncelikle jelatinin 5.0 mg mL^{-1} miktarı saf su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla ve $40-45^\circ\text{C}$ 'de tamamen çözünmesi sağlandı. Elde edilen berrak çözelti içerisine TEOS ve APTES ile modifiye edilen CuF nanoparçacıklarından 2.0 mg mL^{-1} ilave edilerek sonikatörde 45 dakika boyunca sonike edildi. Nafyon ve PANI kaplı GCE elektrot yüzeyine $3.0 \mu\text{L}$ damlatıldıktan sonra diğer prosesler Bölüm 3.7'de ki ile aynı olacak şekilde devam etmiştir (Şekil 3.6) [300].



Şekil 3.6: a) Gluteraldehit (GA) ile yüzey immobilizasyonu ve b) Ferrit nanoparçacıklarının yüzeyine enzim immobilizasyonu için şematik gösterim (* lakkaz ya da üreaz enzimleri olabilir).

3.9. Nanokristalin Selüloz Yüzey Modifikasyonu

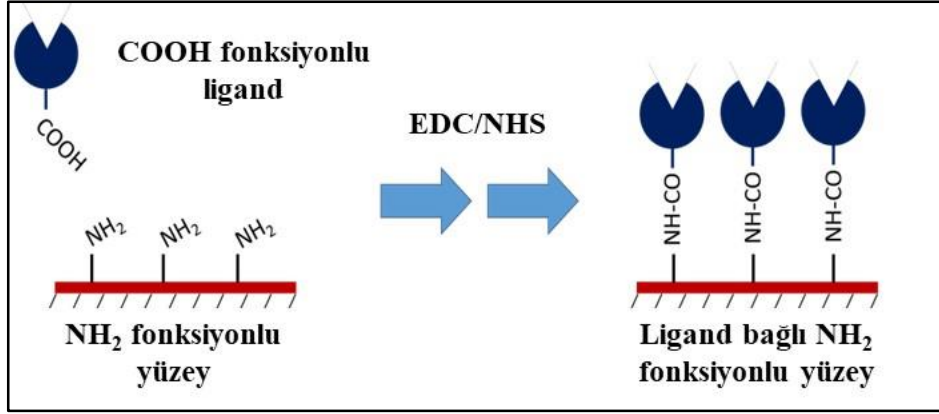
0.5 g NKK tartımı alındıktan sonra 100 mL saf su içerisinde sonikatör yardımıyla yaklaşık yarım saat dispers edildi. Elde edilen dispersiyona damla damla 0.1 M'lık sitrik asit çözeltisi eklenerek pH değeri 5.4 e getirildi. Proses süresince karışım manyetik karıştırıcı ile 250 rpm de sürekli karıştırıldı. 100 mM'lık APTES miktarı hesaplanarak karışıma yavaşça eklendi ve 2 saat oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıyla 50 rpm de karıştırılarak NKK'nın yüzey modifiyasyonunun gerçekleşmesi sağlandı. Modifikasyon sonunda elde edilen ürün santrifüj yardımıyla (4000 rpm, 20 dk) çöktürülerek saf su ile 3 kez yıkandı [301]. Kurutma işlemi için dondur-kurut cihazı kullanıldı (24 saat) ve kuruyan APTES-modifiye NKK'ya 110°C 'de 8 saat kalsinasyon işlemi uygulandı.

3.10. Üre Biyosensörü için NKK Temelli Elektrot Modifikasyonu ve Enzim İmmobilizasyonu

Çalışmada kullanılan diğer biyopolimer nanokristalin selülozdur. Bu biyopolimer yaygın organik solventlerde çözünür özellikte değildir. Dolayısıyla nano yapılı formunun saf su içerisindeki dispersiyonu kullanılmıştır. 5.0 mg mL⁻¹ miktarı saf su içerisine alınarak yaklaşık yarım saat dispers olması sağlanmıştır. Daha sonra TEOS ve APTES ile modifiye edilen CuF nanoparçacıklarından 2.0 mg mL⁻¹ ilave edilerek sonikatörde 45 dakika boyunca daha sonikasyona devam edilmiştir. Daha sonra nafyon ve PANI kaplı GCE elektrotunun yüzeyine damlat kurut yardımıyla kaplanmıştır. Biyopolimer ilavesi proseslerinden sonraki aşamalar biyopolimer içermeyen ve Bölüm 3.7’de verilen şekilde devam edilmiştir [300].

3.11. BPA Biyosensörü için HA Temelli Elektrot Modifikasyonu ve Enzim İmmobilizasyonu

Tüm elektrokimyasal çalışmalar için, 10 mL'lik bir elektrokimyasal hücrede, çalışma elektrotu olarak GCE, karşı elektrot olarak platin tel ve referans elektrot olarak Ag/AgCl (3 M KCl) kullanıldı. Elektrot yüzeyini kaplamadan önce, GCE alümina bulamacı (0.1 µm, 0.05 µm ve 0.03 µm) ile temizlendi. 0.5 mg HA, bir cam şişe içinde PBS (pH 7.0) içinde çözüldü. Çözeltiye çapraz bağlayıcı olarak kullanılan 1-(3-Dimetilaminopropil)-3-etilkarbodiimid hidroklorür ve N-Hidroksisüksinimit (EDC/NHS) (1:1 mol/mol) sistemi ilave edildi ve 2 saat karıştırıldı. Bu aktif çözeltiye 1.0 mg CuF-TS@AP ve 2.0 mg PANI-nl ilave edilerek ultrasonik banyoda homojen bir dağılım sağlandı. Temizleme işleminden sonra hazırlanan kompozit sistemden 5.0 µL mikropipet ile elektrot yüzeyine damlatıldı. Tamponda hazırlanan 10.0 µL 4.0 mg mL⁻¹ lakkaz çözeltisi elektrot yüzeyine damlatıldı ve oda sıcaklığında immobilize olması beklendi. İmmobilizasyon sonrası elektrot yüzeyi saf su ile yıkandı ve bağlanmamış yapılardan uzaklaştırıldı. CV ölçümleri, -0.2 ile 1.0 V potansiyelde ve 100 mV s⁻¹ tarama hızında pH 7.0'lik PBS içinde gerçekleştirilmiştir. DPV ölçümleri, 0.05 V'luk bir genlikte, 0.2'lik bir puls genişliğinde ve 0.5 s'lik bir puls periyodunda-0.2 ila 1.0 V arasında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.7: EDC/NHS ile immobilizasyonun şematik gösterimi.

3.12. Gerçek Örneklerin Hazırlanması

Üre biyosensörleri gerçek örnek analizleri için süt ve toprak örnekleri tercih edilmiştir. DPV yöntemiyle ürenin elektrokimyasal ölçümü için Kocaeli'nin kırsal bölgesinden süt örneği temin edildi. Süt örneği herhangi bir ön işleme maruz bırakılmadan elektrokimyasal ölçüme kadar buzdolabında +4 °C'de saklandı. Elektrokimyasal parametreler, Bölüm 3.7'de belirtildiği gibi kullanılmıştır. Sütteki üre miktarı, DPV boş ölçüm sabitlendikten sonra ölçüm hücreğine süt numunesi eklenerek belirlendi. Toprak örneğinde üre tayini için 1.0 g toprak örneği tartıldı ve 20 mL distile suda yarım saat dispers edildi. Karışım, 4000 rpm'de santrifüj edilerek toplandı [18]. Biyosensörün doğruluğu, iki farklı konsantrasyonda spike ve geri kazanım testi ile araştırıldı.

BPA biyosensörü için ise deniz suyu, konserve suyu ve süt örnekleri tercih edildi. Biyosensörün doğruluğu, iki farklı konsantrasyonda (1.5, 5.0 µM) spike ve geri kazanım testi ile araştırıldı. Marmara Denizi'nden alınan deniz suyu numunesi 0.22 µm gözenek boyutunda süzülerek çözünmeyen maddelerden uzaklaştırıldı ve pH'ı PBS ile 7.0'ye ayarlandı. Marketten alınan konserve su numunesi ise 0.45 µm gözenek boyutuna sahip süzgeçten süzüldükten sonra direkt kullanıldı. Tüm numuneler elektrokimyasal ölçüme kadar buzdolabında +4 °C'de saklandı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMALAR

4.1. Ferrit Nanoparçacıklarının Karakterizasyonu

Tez çalışması kapsamında sentezlenen ferrit nanoparçacıklarına ait fiziksel, kimyasal ve morfolojik karakterizasyonlar aşağıda açıklanmıştır.

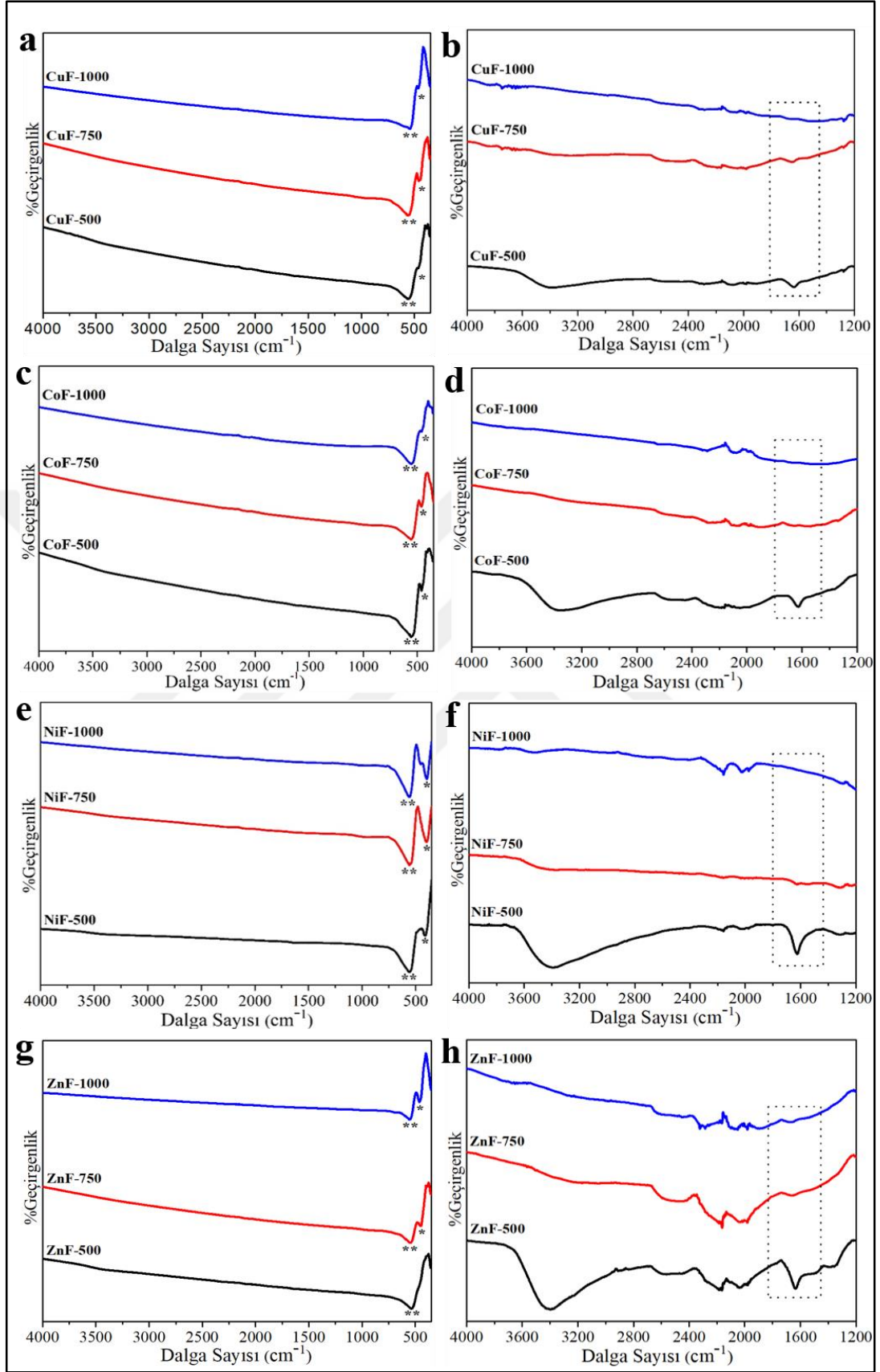
4.1.1. FTIR

Kalsinasyon sonrası elde edilen ferrit nanoparçacıklarının kimyasal karakterizasyonu için FTIR analizi yapıldı. Genel olarak tüm spinel ferritlerin ana metal-oksijen bağları $400-600\text{ cm}^{-1}$ aralığında tetrahedral ve oktahedral bölgelerdeki metal-oksijen bağının titreşimine karşılık geldiği ve tetrahedral metal oksijen bağının daha kısa olması nedeniyle, tetrahedral bölgelerdeki titreşimin oktahedral bölgelerdekinden daha yüksek olduğu literatürde belirtilmiştir [302]. Tez çalışması kapsamında elde edilen ferrit nanoparçacıklarının $350-4000\text{ cm}^{-1}$ arasındaki FTIR spektrumları Şekil 4.1 a, c, e, g'de verilmiştir ve spektrumlar incelendiğinde tetrahedral ve oktahedral bölgelere ait pikler $400-600\text{ cm}^{-1}$ arasında net olarak gözlemlenmektedir. Ferrit eldesini gösteren bu pikler incelendiğinde metal-oksijen yapılarına ait karakteristik piklerin gözlenmesi ferrit nanoparçacıkların oluşumunu doğrulamaktadır. Tez çalışması kapsamında elde edilen ferritler normal (ZnFe_2O_4) ve ters spinel yapıdadır (CoFe_2O_4 , NiFe_2O_4 , CuFe_2O_4) ve ilgili bölgelerdeki karakteristik metal-oksijen piklerini genel olarak göstermektedir. Yüksek frekans ($500-600\text{ cm}^{-1}$) aralığında ve düşük frekans ($400-500\text{ cm}^{-1}$) aralığındaki pik pozisyonundaki farklılıklar spinel ferritlerdeki tetrahedral ve oktahedral bileşenlerin farklılıklarından kaynaklanabilmektedir [303]. ZnF-500'de tetrahedral ve oktahedral bölgelere ait ayırım gözlenmemektedir olup yalnızca tek bir pik oluşmuştur. CuF-500 örneğinde ise bu ayırım oldukça belirsizdir. Bu iki kristal bölgeye ait ayırım kalsinasyon sıcaklığının artması ile bir miktar daha belirginleşmiştir. Bu durum $500\text{ }^\circ\text{C}$ kalsinasyon sıcaklığının kristal bölgelerin oluşması için yeterli olmadığını göstermektedir [304]. En net ayırım NiF örneğinin her 3 farklı kalsinasyon sıcaklığı için de gözlenebilmiştir. Ayrıca, CoF örneği içinde farklı kristal bölgelere ait pik ayırımı gözlenmiştir ancak NiF örneğindeki kadar belirgin değildir. Yaklaşık $3300-3400\text{ cm}^{-1}$ ve yaklaşık 1600 cm^{-1} 'deki pikler

nanoparçacıkların hazırlanması sırasında parçacıkların yüzeylerinin su ile etkileşiminden kaynaklanan hidroksil gruplarına ait karakteristik piklerdir [305, 306]. Ancak, yüzeyde bulunan OH gruplarına ait pikler net olarak gözlenemediği için spektrumun ilgili kısımları ($1200-4000\text{ cm}^{-1}$) açılarak ayrıca gösterilmiştir (Şekil 4.1b, d, f, h). Kalsinasyon sıcaklığının artması ile spektrumda özellikle OH gruplarına ait piklerde değişiklikler olduğu gözlenmiştir. Her 4 ferrit için 500°C 'lik kalsinasyon sıcaklığında OH gruplarının varlığı ($3300-3400\text{ cm}^{-1}$ ve yaklaşık 1600 cm^{-1}) belirgindir. 750°C 'lik kalsinasyon sıcaklığında ise OH grubunun varlığını gösteren piklerde önemli bir azalma olmuş ve hatta CoF-750 için bu pikler hiç gözlenmemiştir. 1000°C 'lik kalsinasyon sıcaklığında ise NiF-1000'de NiF-500 ve NiF-750'ye kıyasla OH pikleri önemli bir azalma göstermiş olsa da yaklaşık 3500 cm^{-1} 'de ki pik hâlen gözlenmektedir. CoF-1000, ZnF-1000 ve CuF-1000 için ise 1000°C 'lik kalsinasyon sıcaklığında bu pikler tespit edilememiştir. Ferritlere ait FTIR spektrumların elde edilen spesifik pikler ise Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1: Farklı kalsinasyon sıcaklıklarında elde edilen ferrit nanoparçacıklarına ait spesifik FTIR pikleri.

Ferritler	O-H Gerilmesi (cm^{-1})	O-H Eğilmesi (cm^{-1})	Tetrahedral Bölge (cm^{-1})	Oktahedral Bölge (cm^{-1})
NiF-500	3404	1628	565	414
NiF-750	3459	1623	562	405
NiF-1000	3535	-	560	397
CoF-500	3362	1626	461	458
CoF-750	-	-	557	459
CoF-1000	-	-	553	455
ZnF-500	3405	1639	529	-
ZnF-750	3337	1664	545	456
ZnF-1000	-	1675	555	466
CuF-500	3421	1640	560	456
CuF-750	3395	1652	559	449
CuF-1000	-	-	545	465



Şekil 4.1: Farklı kalsinasyon sıcaklıklarında elde edilen ferrit nanoparçacıklarına ait FTIR spektrumları: a, c, e, g) 400-4000 cm^{-1} , b, d, f, h) 1200-4000 cm^{-1} , *: oktahedral bölge, **: tetrahedral bölgeyi temsil etmektedir.

4.1.2. XRD

Farklı geçiş metalleri içeren ferrit nanoparçacıklarının kristal yapıları hakkında ayrıntılı bilgi elde etmek için XRD analizi kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.2'de verilmiş ve ferrit nanoparçacıklarının karakteristik kırınım pikleri şekil üzerinde işaretlenmiştir. 2θ 'daki 33.36, 35.58, 38.76, 44.02, 49.8, 54.08, 62.84 derecelerindeki pikler tetragonal spinel CuFe_2O_4 değerlerini desteklemektedir (ICDD Kart no: 00-072-1174) [307]. 2θ değerinde karşılık gelen 18.18, 30.08, 35.73, 43.26, 57.24, 62.98 derecelik pik değerleri kübik spinel CoFe_2O_4 değerlerini (ICDD Kart no: 00-003-0864) [308], 30.0, 35.5, 37.1, 43.1, 57.5 ve 62.3 derecedeki 2θ pik değerleri kübik spinel NiFe_2O_4 değerlerini (ICDD Kart no: 00-054-0964) [309] ve 30.2, 35.4, 43.2, 58.8 ve 62.2 derecedeki 2θ pikleri kübik spinel ZnFe_2O_4 (ICDD Kart no: 00-022-1012) değerlerini desteklemektedir [310]. Spektrumlardan elde edilen bilgilere göre 500°C ' de elde edilen ferrit nanoparçacıklarının yeterli kristalin yapıya sahip olmadığı ve karakteristik pikleri belirgin bir şekilde vermediği gözlenmiştir. Ancak kalsinasyon sıcaklığının artması ile beraber pikler belirginleşmiş ve daha kristalin yapıda ferrit eldesi sağlanmıştır.

Ferrit nanoparçacıklarının kristalit boyutları Scherrer denklemi ile her bir numune için ayrı ayrı XRD spektrumlarından elde edilen 35° tepe noktaları temel alınarak hesaplandı [311]. Bu hesaplama için kullanılan Scherrer eşitliği (Eşitlik 4.1) aşağıdaki gibidir:

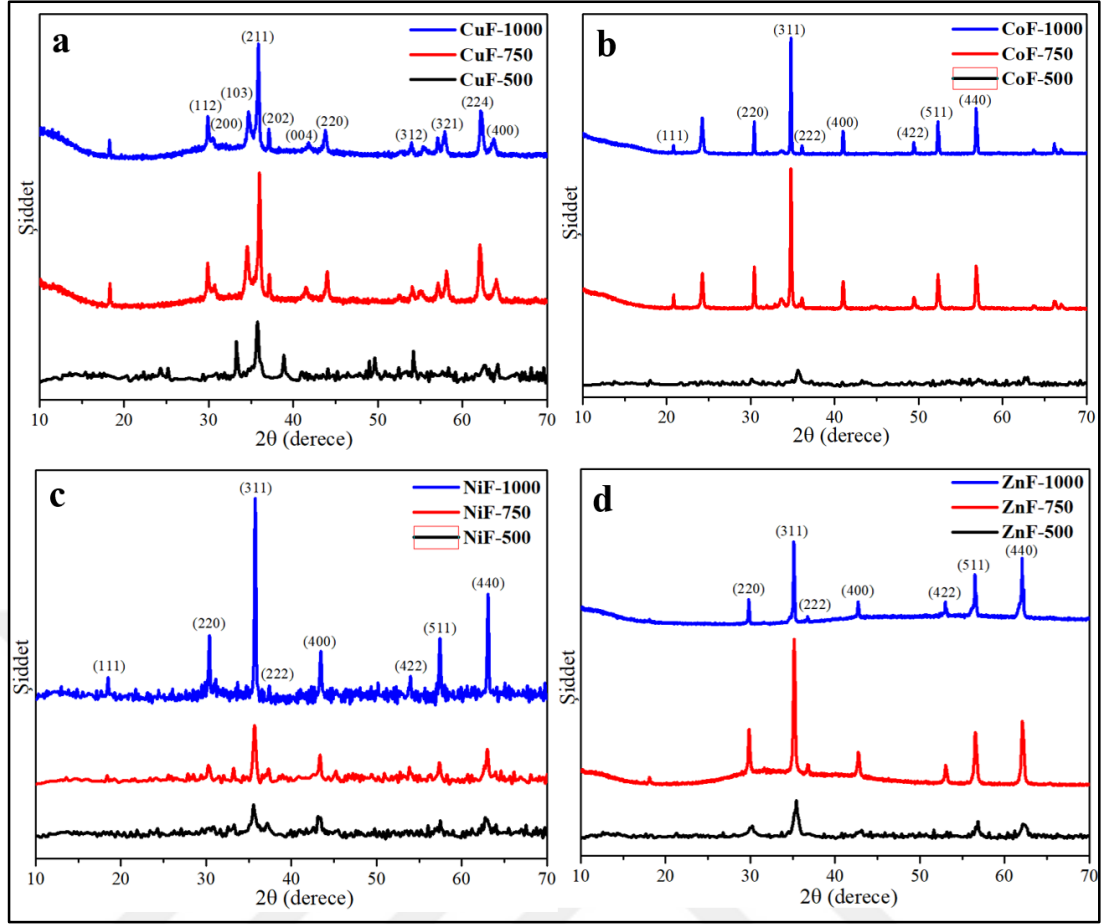
$$D = \frac{k\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (4.1)$$

λ ve k sırasıyla 1.54 \AA ve 0.89 olarak alınmıştır. Tablo 4.2'de birim hücre hacmi (V^3) ve kafes sabitleri (a) kalsinasyon sıcaklıkları ile beraber listelenmiştir. Kafes parametrelerinin literatürde bildirilen değerlerle uyumlu olduğu belirlenmiştir. V^3 ve a 'nın beklendiği gibi kalsinasyon sıcaklığı ile arttığı gözlenmiştir. Çünkü, artan kalsinasyon sıcaklığı saf kristal birimlerinin oluşumunu desteklemektedir [312]. Literatür çalışmaları incelendiğinde Silva ve arkadaşları, farklı kalsinasyon sıcaklıklarında elde ettikleri kobalt ferrit nanoparçacıklarının kalsinasyon sıcaklığı arttıkça ortalama kristalit boyutunun da artış gösterdiğini açıklamışlardır. Örneğin 750°C 'de kalsine edilen kobalt ferrit nanoparçacıklarının ortalama kristalit boyutu XRD spektrumundan alınan dataları kullanılarak Scherrer denklemi ile 94 nm

hesaplanmışken, 950°C’de kalsine edilen kobalt ferrit nanoparçacıklarının kristalit boyutu 100 nm olarak hesaplanmıştır [313]. Joshi ve arkadaşları, birlikte çöktürme yöntemi ile nikel ferrit elde etmişlerdir ve bu çalışma da kalsinasyon sıcaklığını kristalit boyutunun artmasına neden olmuştur. 450°C’de kalsine edilen nikel ferritin ortalama kristalit boyutu 12 nm iken, 550°C’de kalsine edilen nikel ferritin ortalama kristalit boyutu 20 nm olarak hesaplanmıştır [314].

Tablo 4.2: Çeşitli kalsinasyon sıcaklıklarında elde edilen ferrit numunelerinin kafes sabiti ve ortalama kristalit boyutları.

Ferrit	Kalsinasyon sıcaklığı	a (Å)	V (Å) ³	Ortalama kristalit boyutu (nm)
CoFe ₂ O ₄	500	8.374	587.22	17.31
	750	8.377	587.85	44.71
	1000	8.380	588.48	56.94
NiFe ₂ O ₄	500	8.344	580.93	10.61
	750	8.347	581.62	21.63
	1000	8.349	581.71	40.34
ZnFe ₂ O ₄	500	8.347	581.55	12.37
	750	8.442	601.64	27.88
	1000	8.445	602.28	47.15
CuFe ₂ O ₄	500	-	-	17.35
	750	5.810/5.810/8.710	294.02	25.42
	1000	5.844/5.844/8.630	294.79	31.84

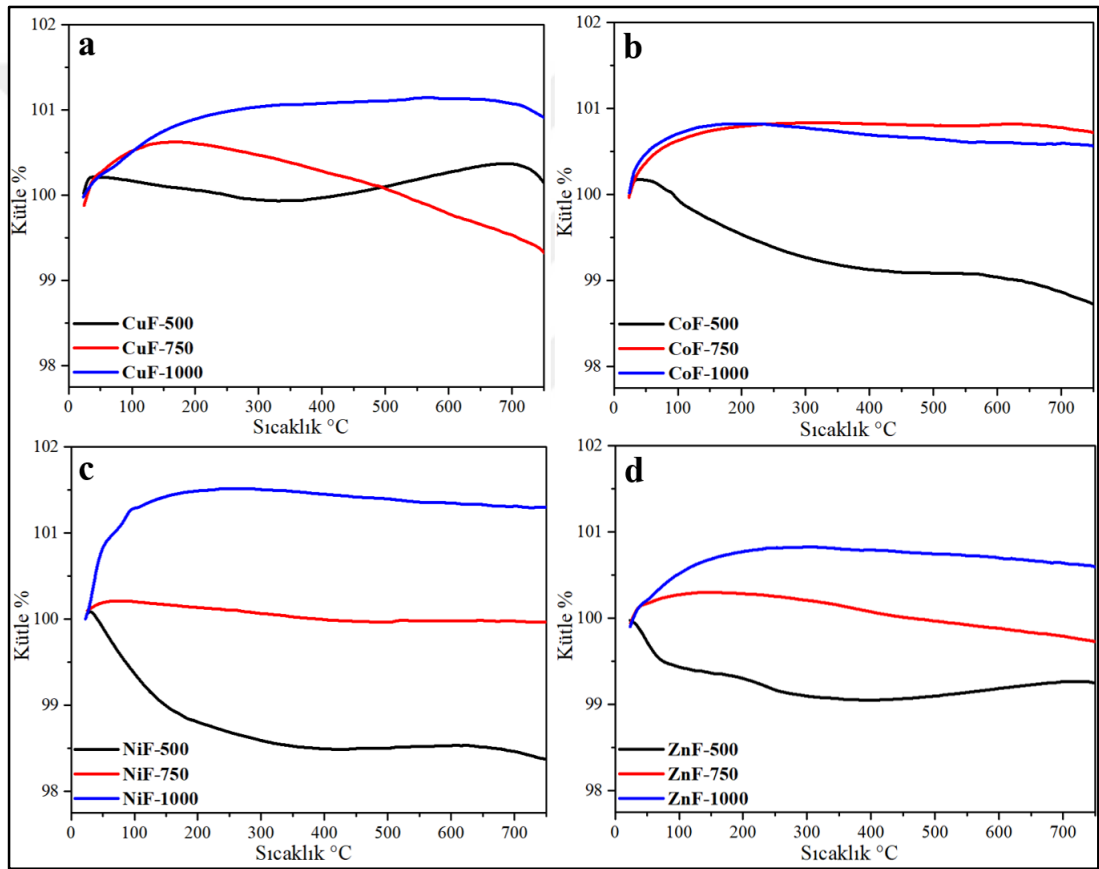


Şekil 4.2: Farklı kalsinasyon sıcaklıklarında elde edilen ferrit nanoparçacıklarına ait XRD spektrumları.

4.1.3. TGA

Ferrit nanoparçacıkların eldesinde kullanılan üç ayrı kalsinasyon sıcaklığı için termal özellikleri TGA analizi ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara ait grafikler Şekil 4.3'te verilmiştir. Elde edilen TGA grafiklerine göre kalsinasyon sıcaklığının termal kararlılığa etkisi olduğu belirlenmiştir. Kalsinasyon sıcaklığı 500°C iken 50-150°C arasında NiF-500, CoF-500 ve ZnF-500 gruplarında kütle kaybı gözlenmiştir. Bu kütle kaybı bu 3 ferrit için sırasıyla %1.2, %0.89 ve %0.58 olarak hesaplanmıştır. Mevcut kütle kaybı ferrit nanoparçacıklarının yüzeyine tutunan suyun uzaklaşmasından kaynaklanmaktadır [315]. FTIR spektrumunda 500°C kalsinasyon sıcaklığında elde edilen ferritlerin yapısında tutulan suyu gösteren belirgin pikler TGA sonuçları ile de uyumludur. CuF-500 numunesinde ise bu bölgede belirgin bir pik gözlenmemiş olup, 250-400°C arasında bir kütle kaybı gözlenmiştir. Aynı şekilde ZnF-500 numunesinde de gözlenen bu pikin inorganik tuzların dekompozisyonu ile

ilgili olduğu düşünülmektedir [315]. Dolayısıyla 500°C'lik kalsinasyon sıcaklığının kristalin yapıda ferrit elde etmek için yeterli olmadığı gözlenmiştir. Bu sonuç XRD spektrumlarından elde ettiğimiz bilgiler ile de örtüşmektedir. Kalsinasyon sıcaklığının artması kristaliniteyi artırmış ve dolayısıyla 750°C ve 1000°C kalsinasyon sıcaklığında herhangi bir kütle kaybı gözlenmemiştir. Bu durumda, 750°C ve 1000°C kalsinasyon sıcaklığında elde edilen ferrit nanoparçacıkların termal kararlılıklarının 25-750°C arasında iyi olduğu sonucuna varılabilir. Ancak bu sıcaklıklarda bir miktar kütle artışı gözlenmiştir. Bu kütle artışının nedeni gaz adsorpsiyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.3: Farklı kalsinasyon sıcaklıklarında elde edilen ferrit nanoparçacıklarına ait TGA grafikleri.

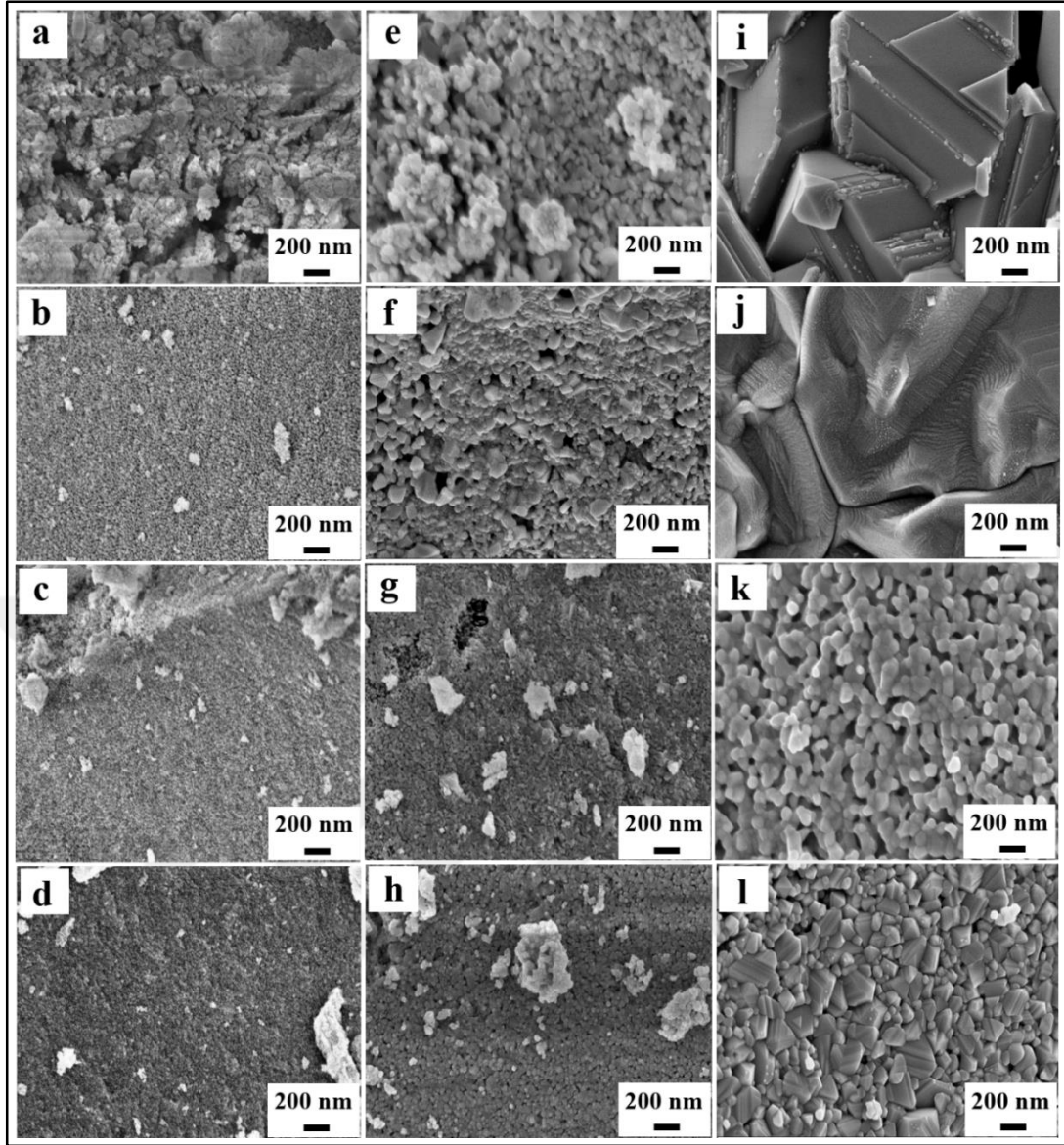
Gul ve arkadaşları, Al-ikameli çinko ferrit nanopartikülleri sentezlemişlerdir. Kalsine edilmemiş numunenin 25 °C ila 1000 °C arasındaki termogravimetrik analizinde 350 °C ve 550 °C olmak üzere iki ayrı bölgede kütle kaybı tespit etmişlerdir. Bu sonuçtan yola çıkarak, spinel yapının gelişiminin başlangıç sıcaklık noktasını belirlemişler ve ferrit nanoparçacıklarının homojen fazının yaklaşık 600 °C'de

gelişmeye başladığını tespit etmişlerdir. 600 °C'de 8 saat kalsinasyon yaptıktan sonra ise termal olarak kararlı ferrit nanoparçacıkları elde etmişlerdir [316]. Yousuf ve arkadaşları da, mangan ferrit nanopartikülleri sentezmişler ve diğer çalışmalarla benzer şekilde iki ayrı sıcaklık noktasında (248.72 °C ve 414.60 °C) kütle kaybı gözlemlemişlerdir. Sentezledikleri ferrit nanoparçacıklarına 400°C'de 4 saat kalsinasyon işlemi uyguladıktan sonra termal olarak kararlı ve tek fazdan oluşan ürün elde etmişlerdir [317].

4.1.4. SEM ve Parçacık Boyutu Analizi

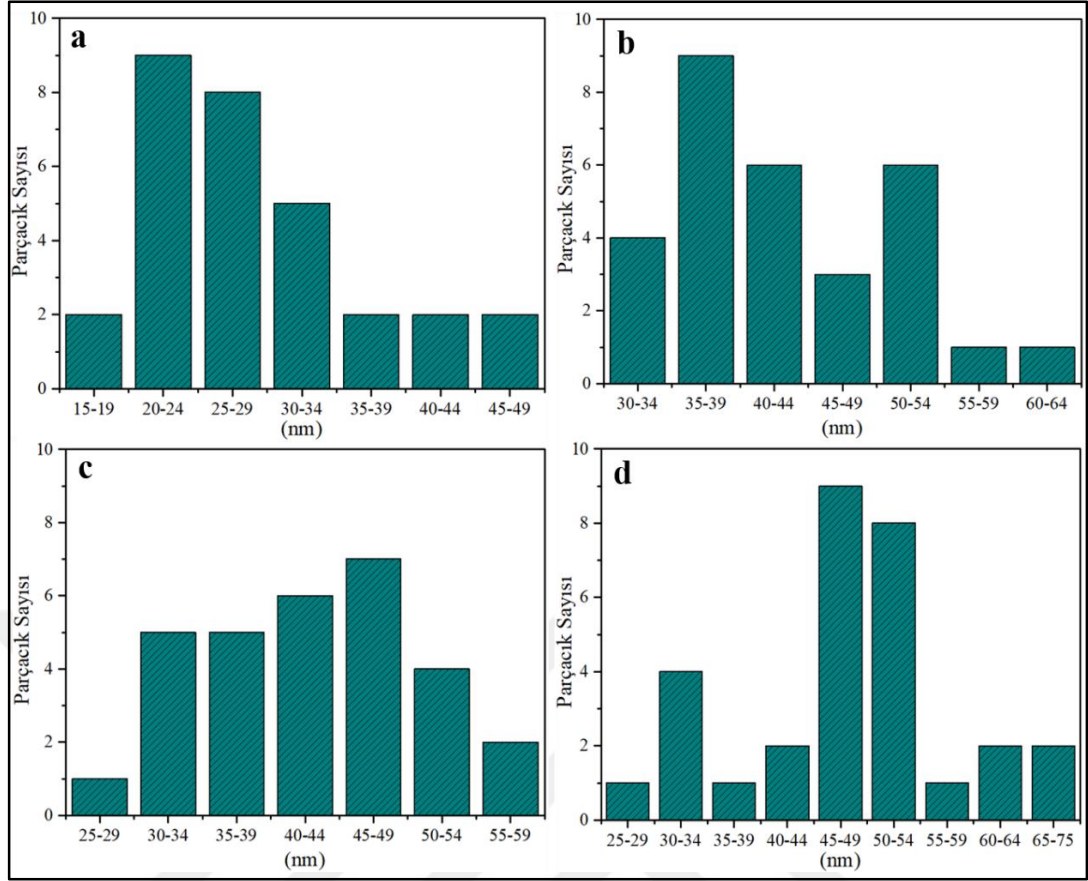
Tez çalışması kapsamında sentezlenen farklı geçiş metallerine sahip ve farklı kalsinasyon sıcaklığında elde edilmiş ferrit nanoparçacıklarının morfolojilerini anlamak için SEM analizi kullanıldı. Elde edilen SEM görüntüleri Şekil 4.4'te verilmiştir. Görüntülerde, manyetik özellikleri ve küçük parçacık boyutları nedeniyle tüm ferrit nanoparçacık gruplarında yoğun bir aglomerasyon olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca kalsinasyon sonrası öğütme işleminden dolayı parçacık şekillerinin düzensiz olduğu gözlenmiştir. Diğer dikkat çekici nokta olarak ise 1000°C kalsinasyon işleminden sonra elde edilen ürünlerde (Şekil 4.4i-l) “kaynaşma” olarak tanımlanabilecek bir durumun oluştuğu gözlemlenmektedir [318].

Sonuç olarak yapılan FTIR, XRD, TGA ve SEM analizlerinden sonra ferrit nanoparçacıklarının kristaliniteleri, termal kararlılıkları ve morfolojik görüntüleri açısından tez çalışmasının devamında 750 °C kalsinasyon sıcaklığında elde edilen CuF-750, CoF-750, NiF-750 ve ZnF-750 grupları ile devam edilmesine karar verilmiştir. 500 °C'nin yeterli kristaliniteye sahip ürünlerin elde edilmesinde yeterli olmadığı FTIR, XRD ve TGA analizleri ile gözlemlenmiştir. 750 °C ve 1000 °C'de elde edilen ürünlerin kristalinite ve termal kararlılıkları birbirine yakın olmakla beraber 1000°C'de elde edilen ürünlerin SEM görüntülerinden de anlaşıldığı gibi artık bir nanoparçacık olmaktan ziyade yüksek sıcaklığın etkisi ile kaynaştığı tespit edilmiştir. Bu sonuç, modifikasyon ve yüzey alanı açısından istenmeyen bir durumdur. Dolayısı ile karakterizasyonların bütünü göz önüne alındığında TEOS ve APTES modifikasyonları ve sonrasında ise biyosensör çalışmaları için 750°C kalsinasyon sıcaklığında elde edilen ferrit nanoparçacıklarının kullanılması uygun görülmüştür.



Şekil 4.4: a-d) 500 °C, e-h) 750 °C ve i-l) 1000 °C kalsinasyon sıcaklığında elde edilen sırasıyla CuF, CoF, NiF ve ZnF nanoparçacıklarına ait SEM görüntüleri (büyütmeler 30.000 X).

Parçacık büyüklüğü dağılımları ise Şekil 4.5’de gösterilmiş olup, nanoparçacıkların ortalama çaplarının CuF-750, CoF-750, NiF-750 ve ZnF-750 için sırasıyla 48.38 ± 1.99 nm, 29.12 ± 1.55 nm, 43.37 ± 1.56 nm ve 43.33 ± 1.40 nm olduğu belirlenmiştir. Bu durumda en yüksek ortalama parçacık büyüklüğüne sahip ferrit CuF-750 olmakla beraber CoF-750 ve NiF-750 yapılarının ortalama parçacık büyüklükleri yaklaşık olarak aynıdır. En küçük parçacık boyutuna sahip olan ferrit ise CoF-750 olduğu tespit edilmiştir.

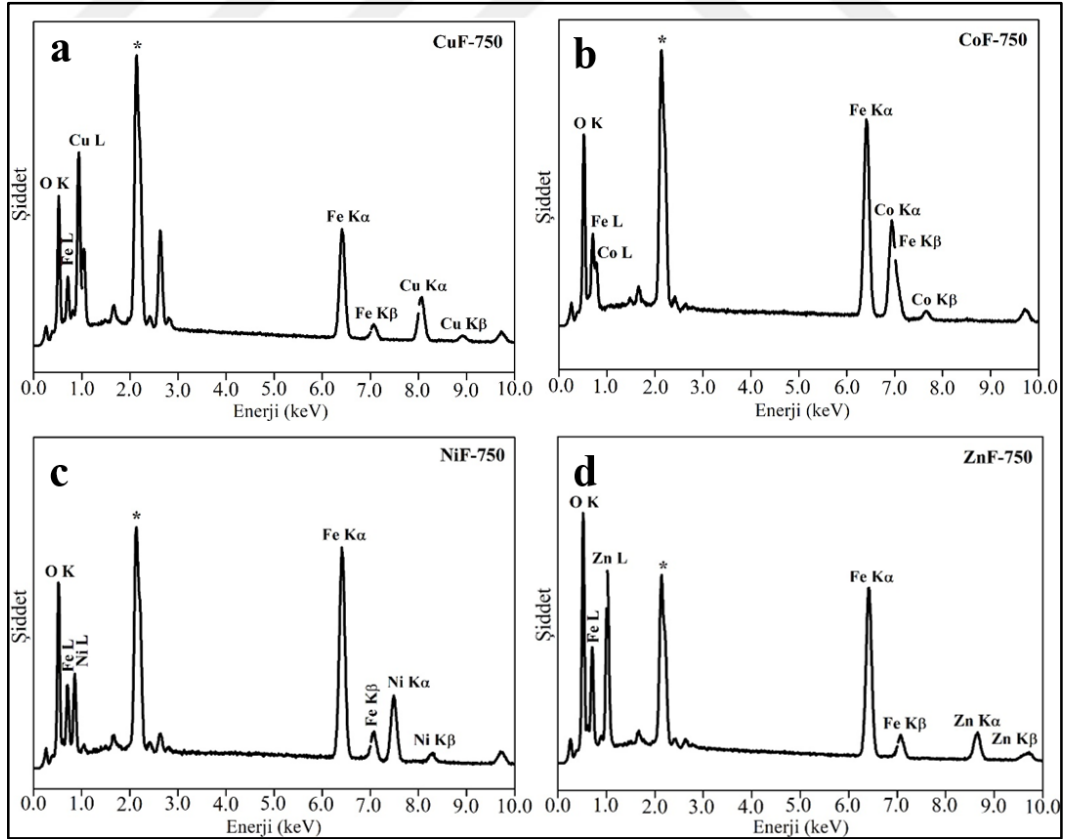


Şekil 4.5: a) CuF, b) CoF, c) NiF ve d) ZnF nanoparçacıklarına ait parçacık büyüklükleri dağılım grafikleri.

Swathi ve arkadaşları, fotokatalitik bozunma için kobalt ferrit nanoparçacıklarını sentezlemiştir. Morfolojik karakterizasyon için yapmış oldukları SEM analizinde elde ettikleri ürünün aglomerasyona ve düzgün olmayan boyut dağılımına sahip olduğunu tespit etmişlerdir. 400 °C'de kalsine edilen ürünün 600 °C'de kalsine edilen ürüne kıyasla morfolojisinin daha küçük parçacıklardan oluştuğunu ve en az aglomerasyona sahip olduğunu göstermişlerdir [319]. Magdalane ve arkadaşları, bir fotokatalitik bozunma çalışmasında kullanılmak üzere TiO₂ katkılı kobalt ferrit nanopartiküllerin mikrodalga yöntemiyle sentezlemişler ve hem CoFe₂O₄ hem de TiO₂ katkılı CoFe₂O₄'ün yüzey morfolojisi, boyutu ve şeklini SEM ile incelenmişlerdir. Numunelerin SEM görüntülerine göre oldukça fazla aglomerasyona sahip oldukları ve parçacık şekillerinin küresel olduğunu belirtmişlerdir. Bu küresel şeklin mikrodalga yönteminden kaynaklanabileceğini açıklamışlar ve kobalt ferrit nanoparçacıklarının boyutlarının 45-60 nm aralığında olduğunu hesaplamışlardır [320].

4.1.5. EDS

Çalışmaya devam edilecek olan CuF-750, CoF-750, NiF-750 ve ZnF-750 nanoparçacıklarının bileşimleri EDS ile analiz edildi. Sentezlenen nanoparçacıkların EDS verileri (Şekil 4.6), yalnızca sentezlenen nanoparçacıkların saflığını gösteren demir, oksijen ve ferrit nanoparçacıkların yapısında bulunan +2 değerlikli metallerin varlığını göstermektedir. EDS spektrumunda 2.1 keV’da gözlemlenen ve “ * ” ile işaretlenen pik SEM analizi için altın kaplanan örneklerde “Au” olarak tespit edilmiştir [321]. EDS spektrumunun kantitatif analizi Tablo 4.3’te gösterilmiş olup, % atomik oranlar Fe/Cu için 2.20, Fe/Co için 1.77, Fe/Ni için 1.74 ve Fe/Zn için 2.0 olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, ferrit nanoparçacıklarının atomik yüzdesinin beklenen stokiyometrik oranıyla yakından eşleştiğini göstermektedir. Patade ve arkadaşları sentezlemiş oldukları $MnFe_2O_4$ için % atomik oranları Fe için % 27.48 ve Mn için % 14.50 olarak hesaplamış ve Fe/Mn oranını ise yaklaşık 1.90 olarak belirtilmiştir [322]. Andhare ve arkadaşları da $CoFe_2O_4$ için % atomik oranları için Fe/Co değerini 1.74 olarak bildirmişlerdir [323].



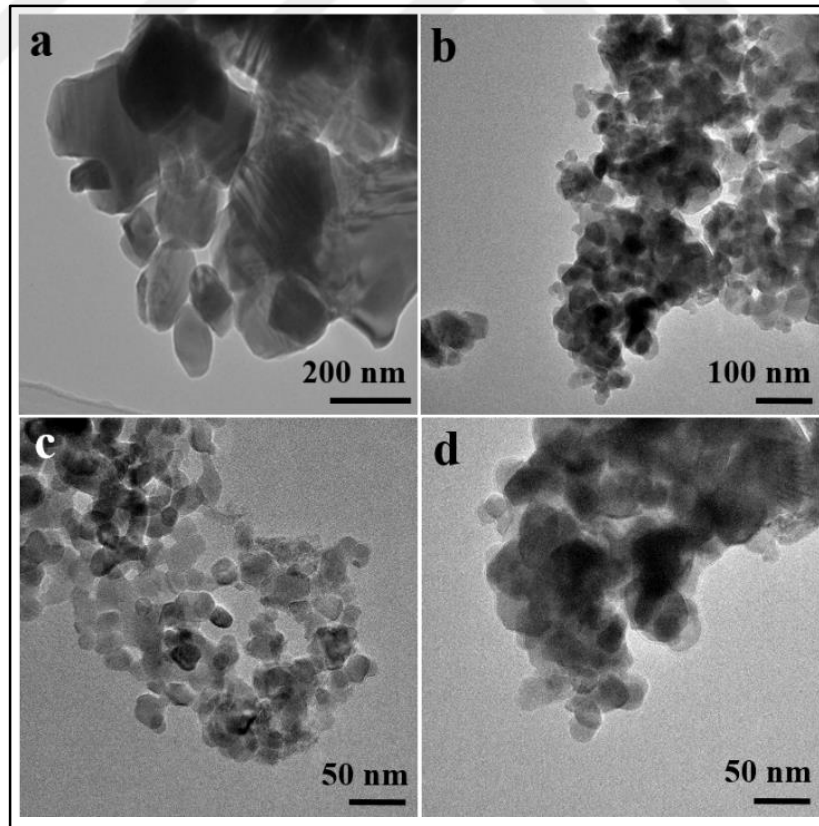
Şekil 4.6: Ferrit nanoparçacıklarına ait EDS spektrumları.

Tablo 4.3: Ferrit nanoparçacıkları için elementlerin atomik yüzdeleri.

Ferritler	% Atomik oranlar		
	Fe	Cu/Co/Ni/Zn	O
CuF-750	48.21	21.87	29.92
CoF-750	42.44	23.92	33.64
NiF-750	44.05	25.32	30.63
ZnF-750	43.17	21.61	35.22

4.1.6. TEM

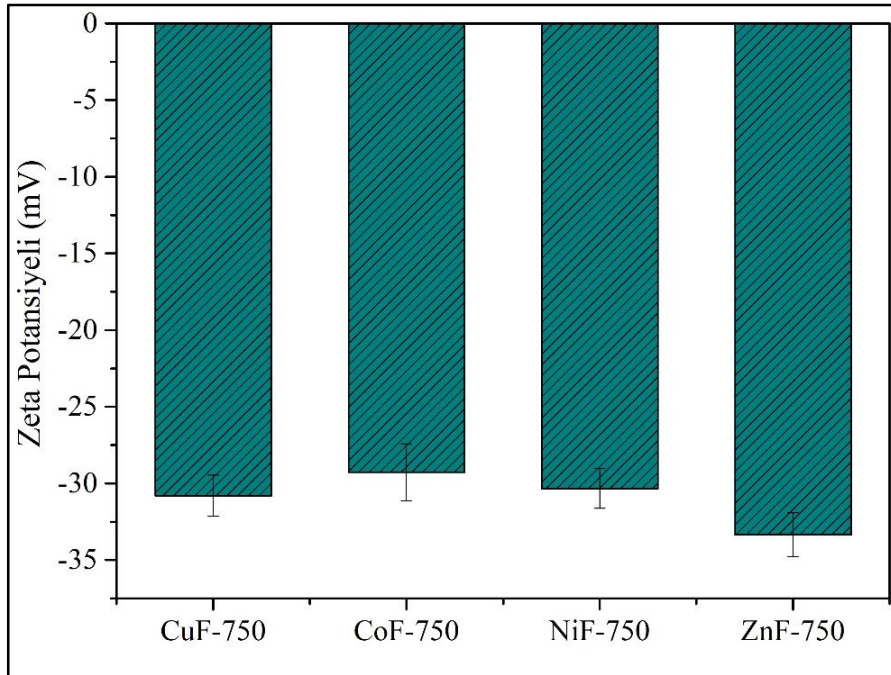
Şekil 4.7’de CuF-750, CoF-750, NiF-750 ve ZnF-750 gruplarına ait TEM görüntüleri verilmiştir. SEM görüntülerini destekler şekilde hem aglomerasyon hem de düzensiz parçacık şekillerine sahip nanoparçacıkların varlığı desteklenmektedir.



Şekil 4.7: a) CuF-750, b) CoF-750, c) NiF-750 ve d) ZnF-750 nanoparçacıklarına ait TEM görüntüleri.

4.1.7. Zeta Potansiyeli

Nanoparçacık yüzey yük yoğunluğu birçok uygulamada önemli bir rol oynar. Elektrokinetik potansiyel olarak da adlandırılan zeta potansiyeli, elektrik alan altında hareket eden bir koloid parçacığın kayma/kesme düzlemindeki potansiyeldir. Zeta potansiyeli, parçacıklar üzerindeki ve parçacıklarla ilişkili yükün doğasının yanı sıra parçacığa ve çevresindeki çözücüye bağlı yükün dağılımını açıklamak için kullanılan bir analizdir [324]. Zeta potansiyeline etki eden en önemli faktör ortamın pH değeridir. Diğer faktörler arasında iyonik güç, katkı maddesinin konsantrasyonu ve sıcaklık bulunur [325]. Tez çalışmasındaki ölçümler 25°C'de 0.05 M'lık pH 7.0 fosfat tamponunda süspanse edilerek kaydedildi. Ölçümlerdeki hatayı belirlemek için her numune için üç tekrar yapıldı. Elde edilen yüzey yükleri CuF-750, CoF-750, NiF-750, ZnF-750 için sırasıyla, $-30.8 \pm 1,34$ mV, -29.27 ± 1.85 mV, -30.33 ± 1.30 mV, -33.34 ± 1.42 mV olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.8'de verilmiş olup, yüzey yükleri arasında önemli bir farklılık olmadığı tespit edildi. Akhlaghi ve arkadaşları, patojenlerin ablasyonu için antibiyotiklerle kaplanmış manyetik $MnFe_2O_4$ nanoparçacıkları geliştirmişlerdir. Numuneler için ölçümlerin saf su içinde yapıldığı belirtilmiştir. Zeta potansiyeli ölçümlerine göre, $MnFe_2O_4$ nanoparçacıklarının -29.9 ± 3 mV negatif zeta potansiyeli sergilediğini açıklamışlardır [326].

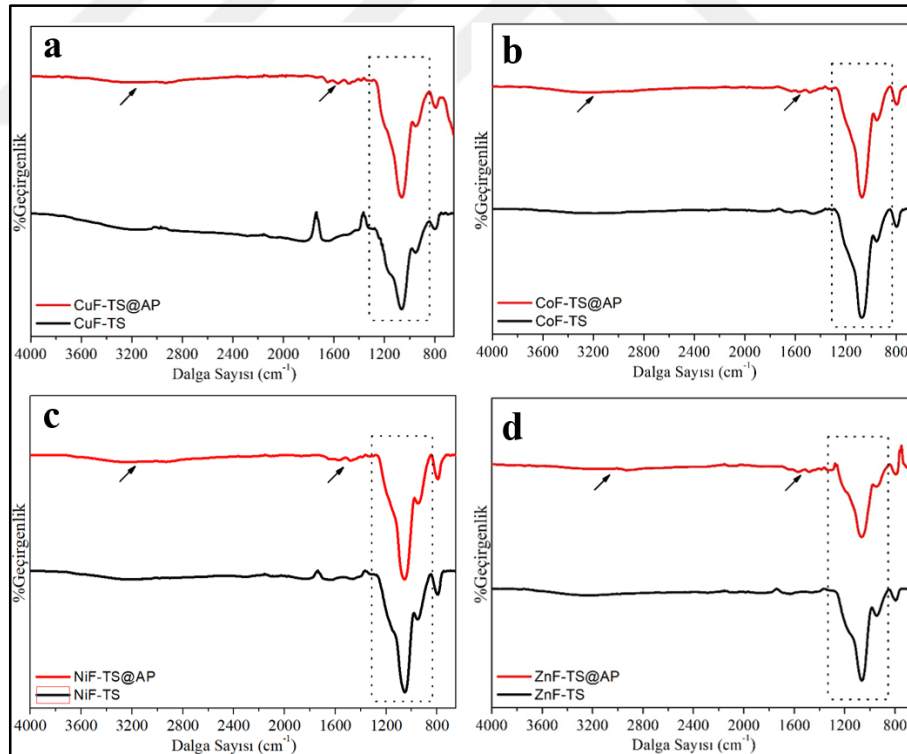


Şekil 4.8: Ferrit nanoparçacıklarının zeta potansiyel grafiği.

4.2. TEOS ve APTES ile Modifiye Edilmiş Ferrit Nanoparçacıklarının Karakterizasyonu

4.2.1. FTIR

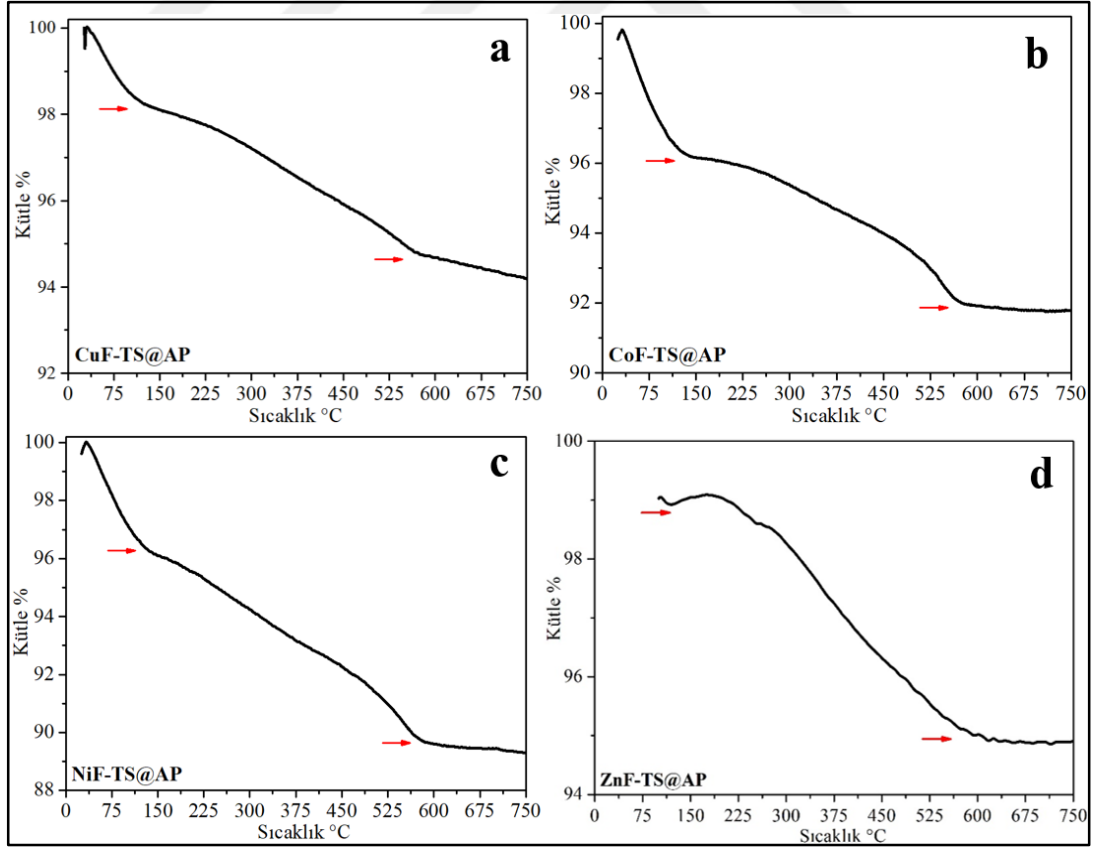
Elde edilen FTIR spektrumları Şekil 4.9’da verilmiştir. İlk aşama olan TEOS ile modifiye edilmiş spektrumlar incelendiğinde yaklaşık 1000 cm^{-1} ’de belirgin bir şekilde Si-O-Si bağlarının varlığı gözlemlenir. Modifiye edilmemiş ferritlerin FTIR spektrumlarında bu bölgede herhangi bir pike rastlanmaz. Dolayısıyla bu karakterizasyon ile ferrit yüzeylerinin silika ile modifiye edildiği doğrulanmıştır [327]. İkinci aşama olan APTES ile modifikasyon işlemi sonrası elde edilen nanoparçacıkların FTIR spektrumları incelendiğinde ise APTES yapısında yer alan propil grubunun varlığı 2930 cm^{-1} ’de ortaya çıkan C-H titreşimleri ile doğrulanmıştır [328]. 3510 cm^{-1} ’deki titreşimler N-H gerilmesi ve 1560 cm^{-1} ’de N-H bükülme titreşimleri ile ilişkilendirilebilir [329].



Şekil 4.9: TEOS ve APTES ile modifiye edilmiş ferrit nanoparçacıklarının FTIR spektrumları.

4.2.2. TGA

TEOS ve APTES ile modifiye edilmiş ferrit nanoparçacıklarına ait TGA diagramları Şekil 4.10'da verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde APTES ile modifiye edilmiş ferrit nanoparçacıklarda yaklaşık 110°C ve 550°C'de 2 ayrı kütle kaybı olduğu gözlenmiştir. İlk kütle kaybının nedeni, nanoparçacık seviyesindeki parçacıklarda modifikasyon prosesinde absorplanan solventin buharlaşmasından kaynaklanmaktadır [330]. İkinci kütle kaybı ise silan tabakasının termal ayrışmasından kaynaklanmaktadır [331]. İlk kütle kaybı CoF-TS@AP, CuF-TS@AP, NiF-TS@AP ve ZnF-TS@AP için sırasıyla %1.75, %3.82, %3.75, %1.32 olarak hesaplanmıştır. İkinci kütle kaybında yine aynı sıralama için sırasıyla %5.20, %8.02, %10.30, %5.10 olarak belirlenmiştir. Literatürde TiO₂, Fe₃O₄, CoFe₂O₄ gibi farklı nanoparçacıklar silan ile kaplanmış ve kütle kayıpları %2.7, %5.0, %12.0 olarak farklılık göstermiştir [332-334]. Çalışma kapsamında hesaplanan değerlerin literatür çalışmaları ile uyum gösterdiği gözlemlenmektedir.

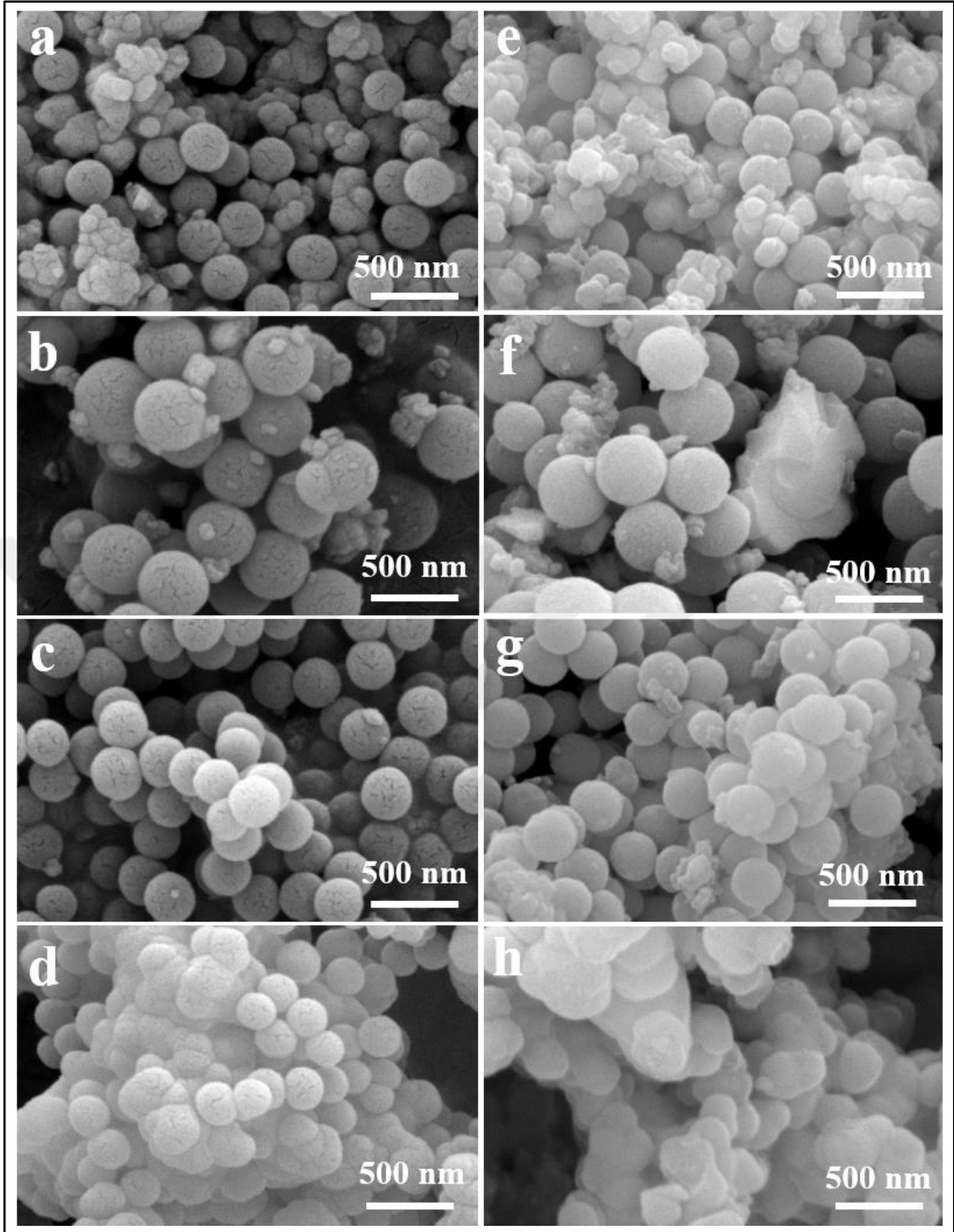


Şekil 4.10: TEOS ve APTES ile modifiye edilmiş ferrit nanoparçacıklarının TGA diyagramları.

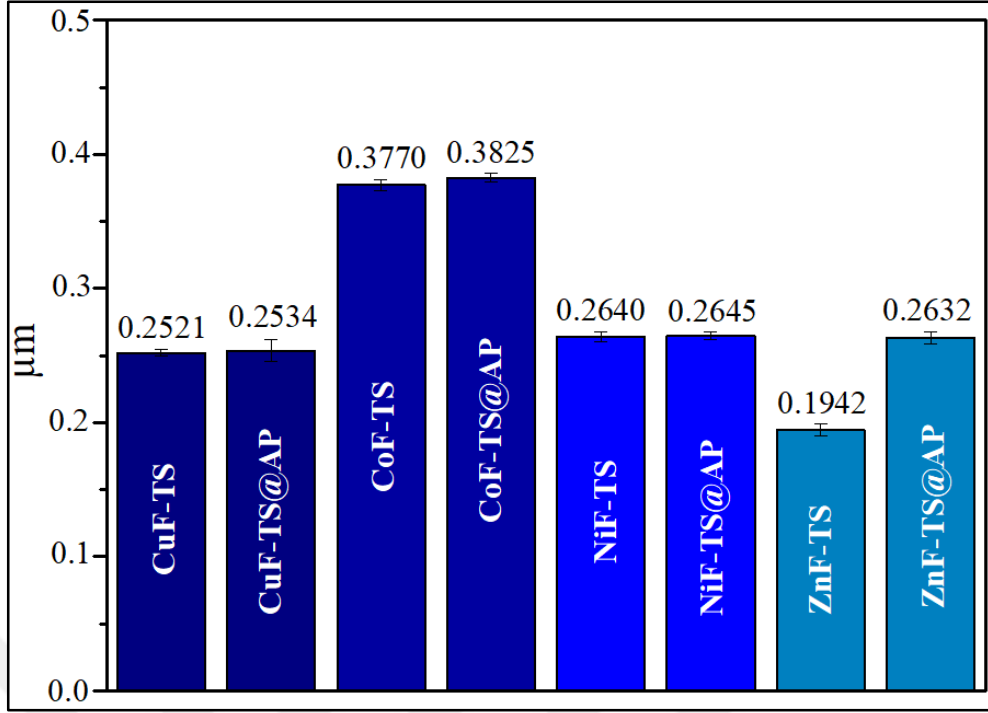
4.2.3. SEM ve Parçacık Boyutu Analizi

TEOS modifikasyonu ile küresel nanoparçacıkların elde edilmesi ve aglomerasyonun kısmen de olsa engellenmesi beklenmekteydi. Şekil 4.11’de verilen SEM görüntüleri incelendiğinde bu modifikasyon ile istenilen amaca ulaşıldığı gözlenmektedir. TEOS ile modifikasyon sonucunda tüm ferritlerin küresel morfolojiye sahip olduğu gözlenmektedir. Küresel yapıların yüzeyleri düzgün ve boyutlarının homojen olduğu görülmektedir. APTES ile modifikasyon sonrası ise morfolojide herhangi bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Parçacık boyutu analizi kısmında her iki modifikasyon içinde ortalama boyutlar ve standart sapmalar detaylı olarak verilmiştir. Literatür çalışmaları incelendiğinde, Gao ve arkadaşları 2011 yılında yapmış oldukları çalışmada, Fe_3O_4 nanoparçacıklarını TEOS ile modifiye etmişler ve modifikasyon sonrası küresel yapılar elde etmişlerdir. Modifikasyon sonrasında parçacıkların boyut dağılımında neredeyse aynı olduğu ve düzgün bir morfolojide olduğu belirtilmiştir [335]. Huang ve arkadaşları da Fe_3O_4 nanoparçacıkları sentezlemiş ve kurutma işleminden kaynaklı aglomerasyon olduğunu ancak TEOS ile fonksiyonlandırmış formunda azalmış aglomerasyona sahip küresel nanoparçacıklar elde ettiklerini belirtmişlerdir [333]. Kobalt ferrit nanoparçacıkları içinde aynı durum geçerlidir ve yine homojen dağılımlı küresel yapılar elde edilmiştir [336].

TEOS ve APTES ile modifiye edilmiş 4 adet ferrit nanoparçacıklarına ait SEM görüntüleri üzerinden ImageJ 1.30v programı ile hesaplanan ortalama parçacık büyüklüklerine (30 nanoparçacık üzerinden alınan ölçümler) ait değerler Şekil 4.12’de verilmiştir. Nanoparçacıkların ortalama çaplarının CuF-TS, CoF-TS, NiF-TS ve ZnF-TS için sırasıyla 252 nm, 377 nm, 264 nm ve 194 nm olarak hesaplanmıştır. Her ferrit için parçacık boyutları birbirine oldukça yakın olup standart sapmaları oldukça küçüktür. APTES modifikasyonunda ise TEOS’a kıyasla kobalt, bakır ve nikel ferritler için değişiklik gözlenmemiştir. Çinko ferritteki yaklaşık %35’lik artış TEOS’a kıyasla kısmen partiküllerin birleşmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Literatür çalışmalarında Fe_3O_4 nanoparçacıkları 20 nm olarak elde edilmiş ve TEOS modifikasyonu sonucunda parçacık boyutu 320 nm olarak tespit edilmiştir [333]. Ayrıca başka bir çalışmada elde edilen kobalt ferritin ortalama parçacık boyutu 18 nm olarak belirlenmiştir ve yine modifikasyon sonucu parçacık boyutu yaklaşık olarak 500 nm olarak hesaplanmıştır [336]. Tez çalışmasında elde edilen sonuçların literatürle uyumlu olduğu görülmektedir.



Şekil 4.11: a-d) TEOS ve e-h) APTES ile modifiye edilmiş CuF, CoF, NiF, ZnF ferrit nanoparçacıkların SEM görüntüleri.



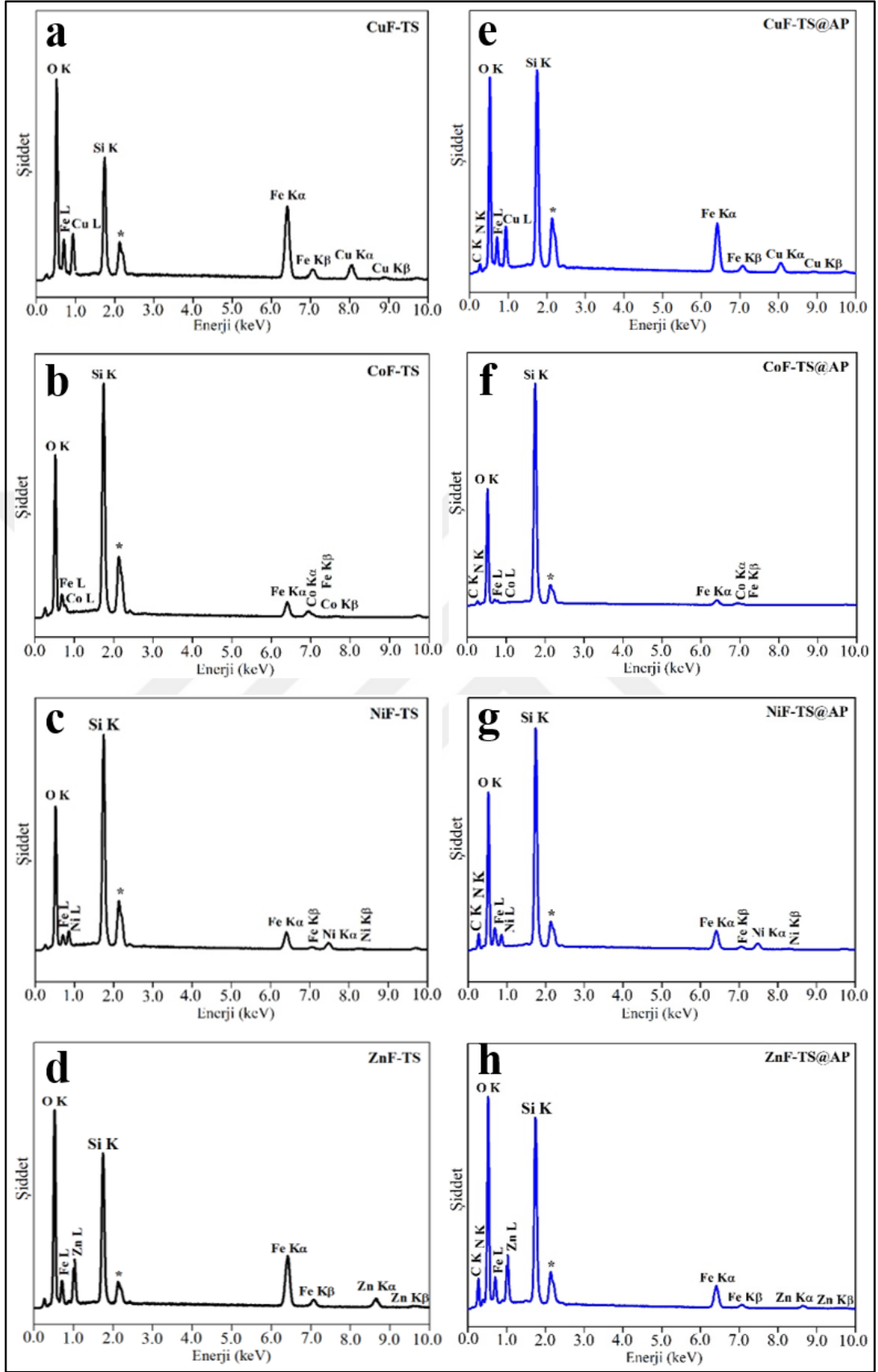
Şekil 4.12: TEOS ve APTES ile modifiye edilmiş ferritlerin ortalama parçacık boyutları.

4.2.4. EDS

Ferrit nanoparçacıklarının TEOS ve APTES ile modifikasyonunu doğrulamak için EDS analizi gerçekleştirildi ve elde edilen spektrumlar Şekil 4.13’de, elementlerin % atomik değerleri ise Tablo 4.4’de verilmiştir.

Tablo 4.4: TEOS ve APTES ile modifiye edilmiş ferrit nanoparçacıkları için elementlerin atomik yüzdeleri.

Ferritler	O	Si	Fe	Cu/Co/Ni/Zn	C	N
CuF-TS	22.10	10.57	45.85	21.48	-	-
CuF-TS@AP	26.50	17.48	32.49	16.04	5.40	2.09
CoF-TS	38.45	33.95	18.48	9.12	-	-
CoF-TS@AP	41.34	37.26	7.64	3.8	7.27	2.69
NiF-TS	34.43	31.94	20.17	13.46	-	-
NiF-TS@AP	34.06	23.53	17.13	9.66	12.44	3.18
ZnF-TS	27.05	15.48	37.77	19.7	-	-
ZnF-TS@AP	39.07	16.24	17.04	6.41	15.9	5.34

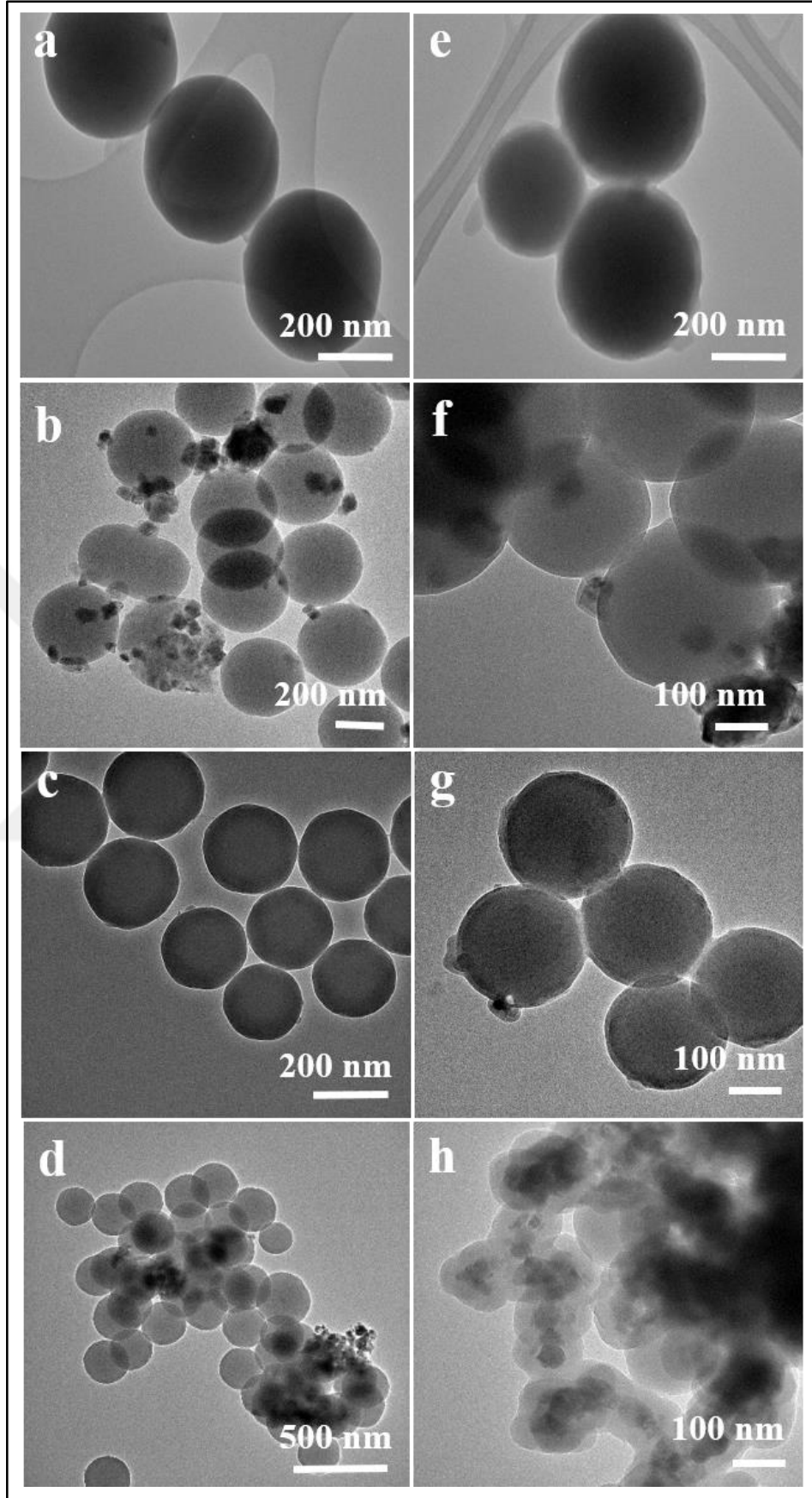


Şekil 4.13: a-d) TEOS ve e-h) APTES modifiye edilmiş ferrit nanoparçacıklarına ait EDS spektrumları.

EDS spektrumları, oluşan tüm elementlerin varlığını açıkça gösterir ve tespit edilen silisyum piki TEOS ve azot piki APTES modifikasyonunu doğrulamaktadır. Wang ve arkadaşları, glukoz oksidazın immobilizasyonu için $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$ nanoparçacıklarını sentezlemişlerdir. Aminlenmiş $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$ nanoparçacıkların bileşimini desteklemek amacıyla SEM-EDS analizini uygulamış ve EDS element analizi sonucu Co, Fe, Si, O, C ve N'nin varlığını doğrulamışlardır [337]. Aygar ve arkadaşları, kobalt ferrit manyetik nanopartiküllerini TEOS ve (3-aminopropil)trimetoksisilan ile modifiye etmişlerdir. $\text{SiO}_2\text{-CoFe}_2\text{O}_4$ nanoparçacıkları için TEM görüntüsü-EDS analizi yapılmış ve EDS spektrumundaki karbon ve silisyum piklerinin varlığının CoFe_2O_4 nanoparçacıklarının yüzeyinde silisyum tabakası oluşumunun göstergesi olarak kabul edildiğini açıklamışlardır [338].

4.2.5. TEM

TEOS ve APTES ile modifiye edilmiş ferrit nanoparçacıklarına ait TEM görüntüleri Şekil 4.14'te verilmiştir. TEOS ile modifiye edilmiş ferritlerin TEM görüntüleri sırasıyla Şekil 4.14a-d'de verilmiştir. TEM görüntülerinde görüldüğü gibi bu modifikasyon ile istenilen amaca ulaşılmış ve TEOS modifiye nanoparçacıklar küresel, pürüzsüz yüzeylere ve homojen boyutlara sahip olmuştur. APTES ile yapılan modifikasyondan sonra ise morfolojide herhangi bir değişiklik olmadığı gözlemlendi. Ancak yaklaşık $20 \text{ nm} \pm 4.2$ kalınlığında bir kabuk kabuğun oluştuğu gözlemlenmiştir. Bu değişiklikler de ferritlerin modifikasyonları destekler niteliktedir. Bai ve arkadaşları, amino grubuna sahip silika kaplı manyetik nanoparçacıklar geliştirmişlerdir. TEM görüntüleri incelendiğinde TEOS ile modifiye edilen nanoparçacıkların yüzeyinde belirgin bir silika tabakasının olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, APTES ile modifikasyon sonrasında ise TEM görüntülerinde iki silika tabakası gözlemlendiğini açıklamışlardır [339]. Araghi ve arkadaşları, mezogözenekli silika manyetit nanoparçacıklarının APTES ile modifikasyonunu gerçekleştirmişlerdir. 150–200 nm çapındaki modifiye edilmemiş nanoparçacıkların modifikasyon sonrası mezogözenekli silika tabakası ile nanoparçacık çapının yaklaşık 25 nm'lik artış gösterdiğini açıklamışlardır [340]. Literatür çalışmaları incelendiğinde, tez çalışmasında elde edilen TEOS ve APTES ile modifiye edilmiş ferrit nanoparçacıkların TEM görüntülerinin literatür ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.14: a-d) TEOS ve e-h) APTES ile modifiye edilmiş CuF, CoF, NiF, ZnF ferrit nanoparçacıkların TEM görüntüleri.

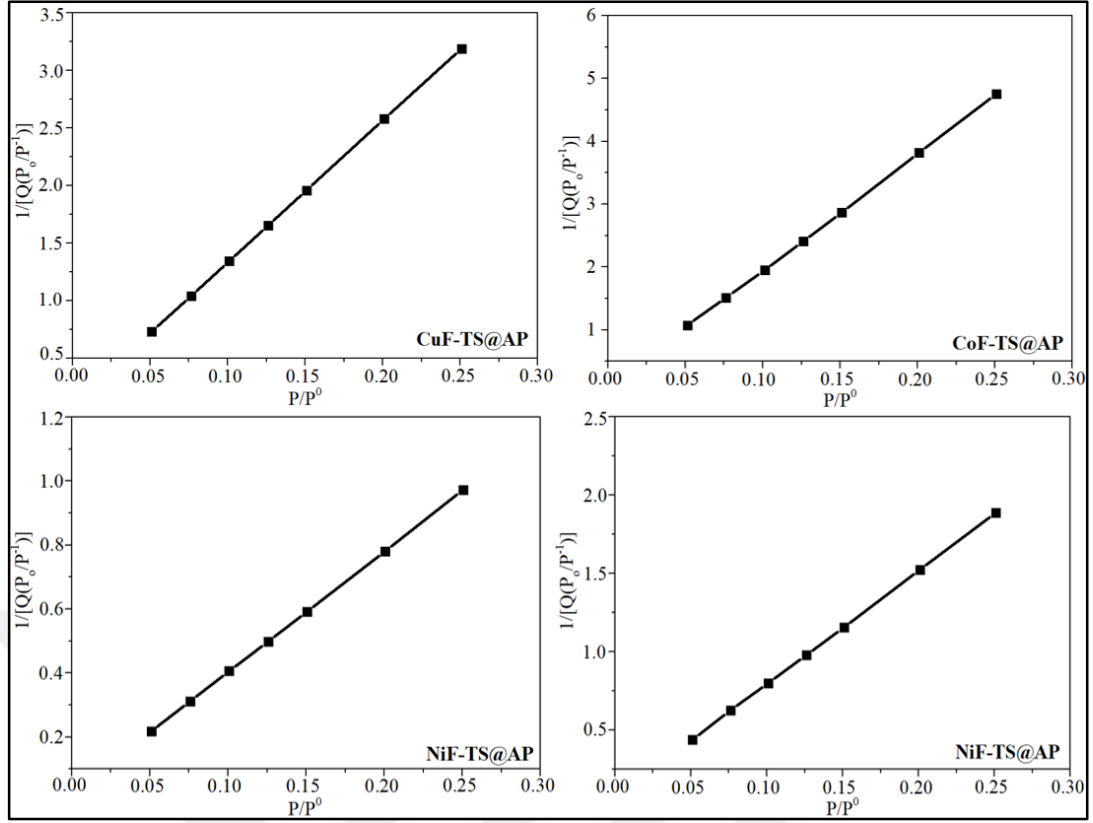
4.2.6. BET Analizi

Tez çalışması için sentezlenen TEOS ve APTES ile modifiye edilmiş ferrit nanoparçacıkların yüzey alanları incelenmiş ve BET yüzey alanı grafikleri Şekil 4.15’de verilmiştir. Elde edilen verilere göre BET yüzey alanları CuF-TS@AP, CoF-TS@AP, NiF-TS@AP, ZnF-TS@AP için sırasıyla 7.85, 5.24, 25.67, 13.35 m² g⁻¹ olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.5). Elde edilen sonuçlara göre her bir ferritin yüzey alanının farklı olduğu belirlenmiştir. Son yıllarda silisyum, metal oksitler, metal hidroksitler, hibrit malzemeler, organik yapılar gibi mezoyapılı malzemeler yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Bu malzemelerin ilaç salımı, biyogörüntüleme, doku mühendisliği, biyosensör teknolojilerindeki uygulamaları üzerine kapsamlı çalışmalar tasarlanmaktadır. Çok sayıda biyobelirteçlerin hızlı bir şekilde belirlenmesine ve çeşitli çevresel kirleticilerin izlenmesine olanak tanıyan gözenekli algılama malzemelere olan ilgi halen devam etmektedir [341].

Tablo 4.5: BET modelinden hesaplanan ferrit nanoparçacıkların özellikleri.

Gruplar	BET Yüzey Alanı (m ² g ⁻¹)
CuF-TS@AP	7.85
CoF-TS@AP	5.24
NiF-TS@AP	25.67
ZnF-TS@AP	13.35

Mezogözenekli malzemeler, yüksek yüzey alanları, büyük gözenek hacimleri ve ayarlanabilir gözenek boyutları sayesinde biyosensörler alanında giderek daha fazla dikkat çekmektedir. Enzimatik biyosensörler ve enzimatik olmayan biyosensörler dâhil olmak üzere mezogözenekli malzeme temelli biyosensörlerin duyarlılık, kararlılık ve yeniden kullanılabilirlik açısından çeşitli analitlere karşı mükemmel algılama performansı sergilediği belirtilmiştir. Özellikle enzimatik biyosensörler açısından bakıldığında, mezogözenekli malzemelerin enzimleri immobilize etmek için bir destek malzemesi olarak kullanıldığı gözlemlenmektedir. Ancak, enzim immobilizasyon performansı, gözenek boyutu, gözenek yapısı ve yüzey özellikleri gibi çeşitli özelliklere de bağlıdır [342].



Şekil 4.15: TEOS ve APTES modifiye edilmiş ferrit nanoparçacıklarının BET grafikleri.

BET yüzey alanını etkileyen en önemli parametrelerden biri kalsinasyon sıcaklığıdır. Kalsinasyon sıcaklığının artması ile nanoparçacıkların kristalleşmesi artar ve yüzey alanları ile gözenek hacimleri azalır. Kim ve arkadaşları, kalsinasyon sıcaklığının TiO_2 özelliklerine olan etkisini incelemiştir. Kalsinasyon için 300, 500, 700, 900 ve 1100 °C olmak üzere beş farklı sıcaklık denemişler ve BET yüzey alanlarının artan sıcaklıkla beraber $101.24 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ 'den $3.25 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ kadar düşüş gösterdiğini tespit etmişlerdir [343]. Ayrıca, nanoparçacık kompozisyonu ve yüzey modifikasyonunun da BET yüzey alanına etkisi literatürde incelenmiştir. Kurtuldu ve arkadaşları, kemik rejenerasyonu için seryum ve galyum içeren gözenekli biyoaktif cam nanopartikülleri sentezlemiştir. BET yüzey alanları incelendiğinde, %60 SiO_2 , %39 CaO ve %1 Ce_2O_3 bileşenleri içeren Ce1 maddesinin BET yüzey alanı $412 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ iken aynı miktarda SiO_2 ve CaO içeren kompozisyonun Ce_2O_3 yerine aynı miktarda yani %1 oranında Ga_2O_3 ile değiştirilmesi sonucu elde edilen Ga1 maddesinin BET yüzey alanının $486 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ olduğunu belirlemiştir [344]. Yalnızca %1 oranındaki bu kompozisyon değişikliği elde edilen nanoparçacıklarının BET yüzey alanında yaklaşık %18'lik bir artışa neden olmuştur. Bu sonuç tez çalışması için aynı sıcaklıkta kalsine

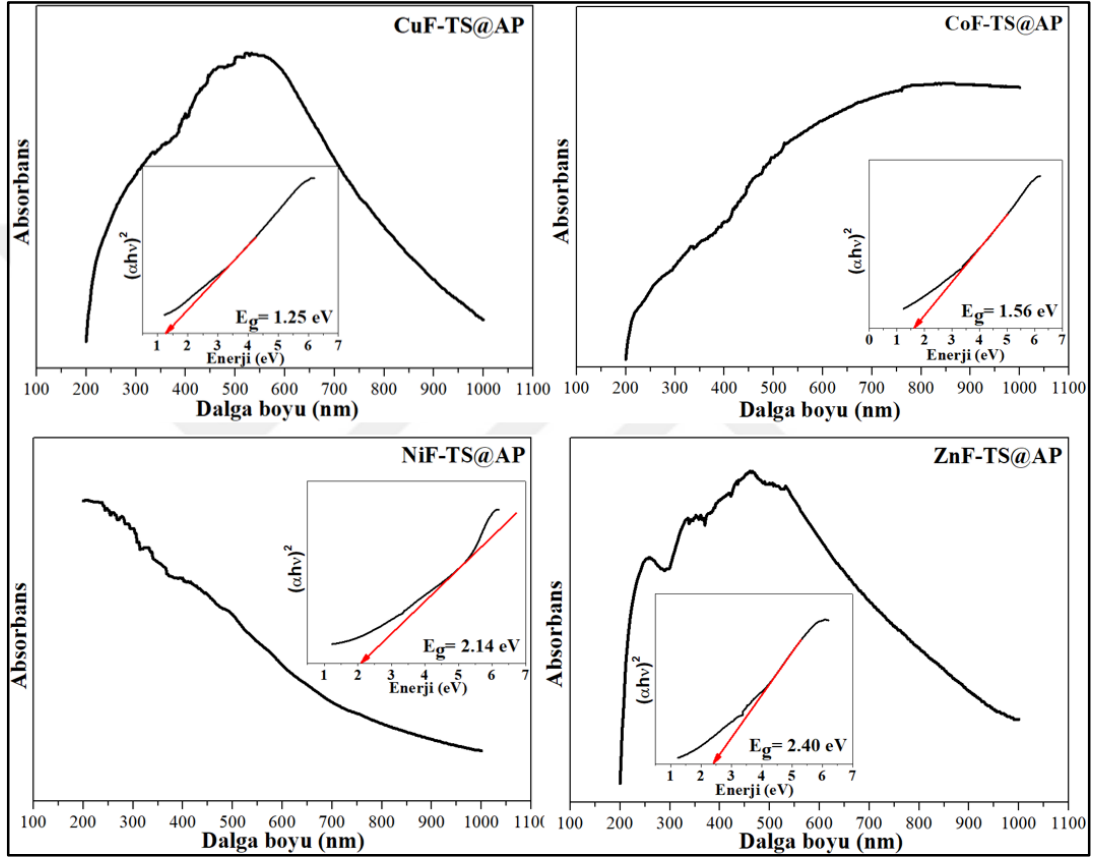
edilen ferrit nanoparçacıklarının BET yüzey alanlarının farklı çıkmasının sebebi olarak değerlendirilebilir. Farklı geçiş metallerine sahip ferrit nanoparçacıkları farklı elementel kompozisyonlara sahip olduğundan diğer tüm özelliklerinde olduğunda gibi BET yüzey alanlarında da farklılığa sebebiyet vermiştir. Isasi ve arkadaşları, APTES–silisyum modifiye edilmiş NiFe₂O₄ nanokompozitleri geliştirmişlerdir. SiO₂ ile modifiye edilmiş NiFe₂O₄ nanoparçacıklarının yüzey alanı 84.9 m² g⁻¹ iken aynı nanoparçacıkları ek olarak APTES ile de modifiye edildiğinde BET yüzey alanının 24.1 m² g⁻¹ olduğunu tespit etmişlerdir [345]. Yang ve arkadaşları da, çeşitli miktarlarda organosilan ile modifiye edilmiş mezogözenekli silika nanopartiküllerin özellikleri üzerine çalışma gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada, modifiye edilmemiş nanoparçacıkların BET yüzey alanı 869 m² g⁻¹ olarak hesaplanmıştır. TEOS/APTES oranı mol olarak 4:1 olduğunda BET yüzey alanı önemli oranda düşmüş ve 411 m² g⁻¹ belirlenmiştir. TEOS/APTES oranı mol olarak 3:1 olduğunda 375 m² g⁻¹ ve 2:1 olduğunda ise 161 m² g⁻¹ değerine kadar azalmıştır. Bu oran 15:1'e çıkartıldığında ise aynı malzemenin BET yüzey alanı 715 m² g⁻¹ tespit edilmiştir [346]. Tüm bu deneysel çalışma sonuçlarından anlaşıldığı üzere BET yüzey alanı pek çok parametreden etkilenmekte olup, genellikle yüzey modifikasyonu yüzey alanının azalmasına sebebiyet vermektedir.

4.2.7. Bant Aralığı

Tez çalışması için sentezlenen manyetik nanomalzemelerin optik davranışı UV-Vis spektroskopisi kullanılarak incelenmiş olup, spektrumlar 200 ila 1000 nm arasında kaydedildi. Elde edilen spektrumlar Şekil 4.16'da verilmiştir. Ayrıca, tüm örneklerin bant aralığı (E_g) değerleri Tauc grafiği kullanılarak hesaplandı ve her bir ferrit grubu için UV-Vis spektrumun içerisine ek olarak yerleştirildi. Bant aralığı hesaplamaları için malzemelerin enerjiye (hv) karşı (αhv)² grafikleri kullanıldı ve grafiğin doğrusal kısmının enerji ekseninde kesişme yapan ekstrapolasyonu ile hesaplanmıştır [103]. Burada, α; absorpsiyon katsayısı, h; Plank sabiti, hv; foton enerjisidir. CuF-TS@AP, CoF-TS@AP, NiF-TS@AP, ZnF-TS@AP nanoparçacıkları için elde edilen bant aralığı değerleri sırasıyla 1.25, 1.56, 2.14 ve 2.40 eV olarak hesaplandı.

Tauc, 1966'da optik absorpsiyon spektrumlarını kullanarak yarı iletkenlerin bant aralığı enerjisini tahmin etmek için bir yöntem önermiş olup, bu yöntem Davis ve Mott tarafından daha da geliştirilmiştir. Bir yarı iletkenin bant aralığı enerjisi, bir elektronu

değerlik bandından iletim bandına uyarılmak için gereken enerjiyi tanımlar. Bant aralığı enerjisinin doğru bir şekilde belirlenmesi, yarı iletkenlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin tahmin edilmesinde çok önemlidir [347]. Absorbans, tane boyutu, bant aralığı, yüzey pürüzlülüğü ve kafes parametreleri gibi çok sayıda faktöre bağlıdır ve nispeten dar bant aralığı, üstün iletkenlik ve elektron transferini teşvik etmek için faydalı özellikler sergiler [348].



Şekil 4.16: TEOS ve APTES modifiye edilmiş ferrit nanoparçacıklarının UV-Görünür spektrum ve Tauc grafikleri.

Literatürde farklı alanlardaki çalışmalarda ferrit nanoparçacıklarının bant aralığı değerleri hesaplanmıştır. Chaturvedi ve arkadaşları, bizmut ferrit-polianilin çekirdek-kabuk nanoparçacıklarının bant aralığı üzerine çalışmalar yapmışlar ve polianilin tabakası kalınlığının bant aralığına olan etkisini incelemişlerdir. Yaklaşık 85 nm boyutunda olan bizmut ferritin bant aralığını Tauc grafiğine göre 2.24 eV olarak hesaplamışlardır. Polianilin tabakasının ~5, 10 and 15 nm olarak artışıyla absorpsiyonun daha yüksek dalga boyuna kaydığını ve bant aralığının azaldığını belirtmişlerdir. Kabuk kalınlığı için bant aralığı değerleri sırasıyla 2.18 eV, 2.01 eV ve

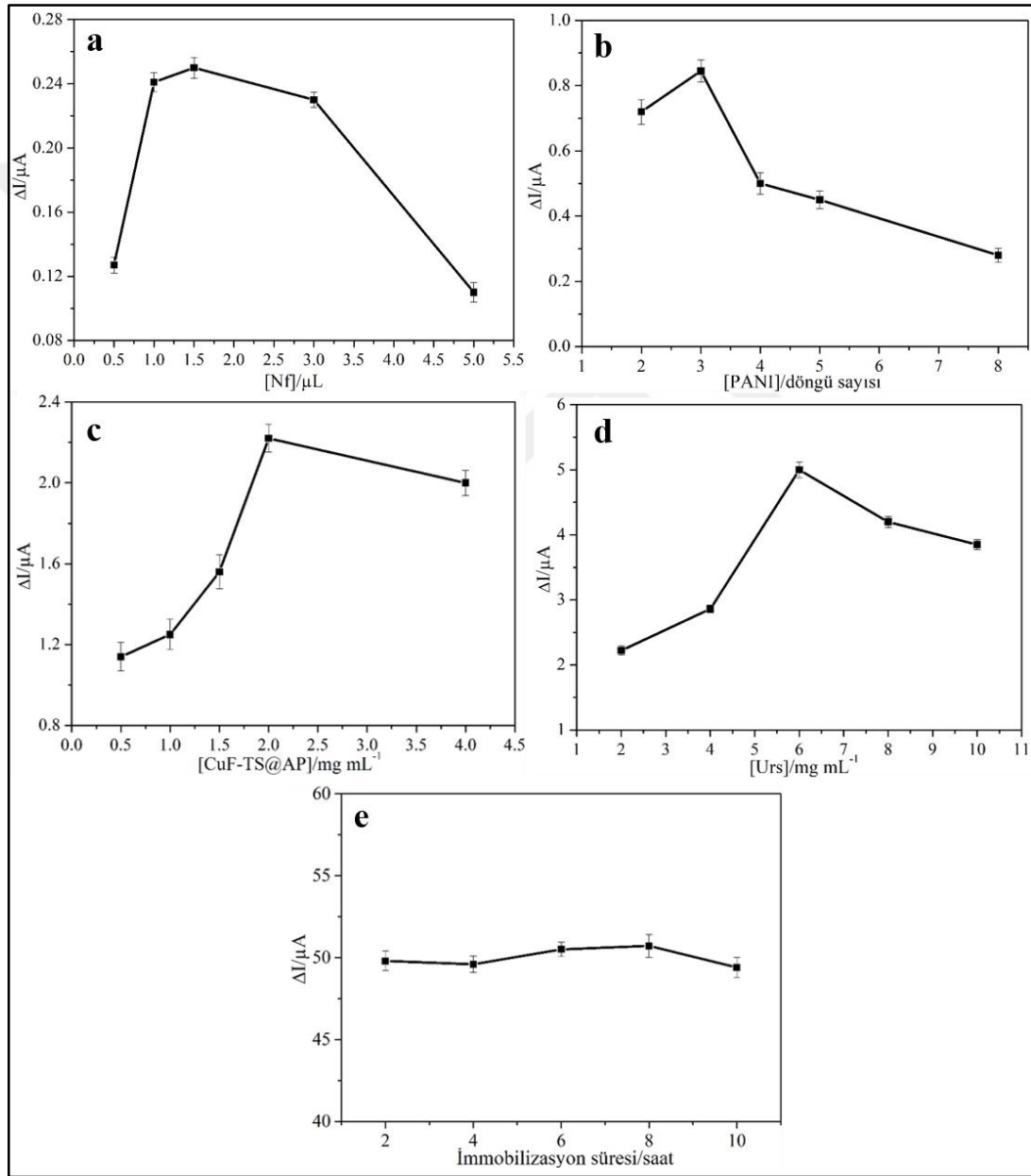
1.98 eV olarak açıklanmıştır [349]. Swathi ve arkadaşları, fotokatalitik bozunma için kobalt ferrit nanoparçacıkları üzerinde tavlama sıcaklığı etkisini incelemiş ve bu çalışma için 300°C, 400°C, 600°C’de kalsine edilen kobalt ferrit nanoparçacıklarının bant aralığı değerleri Tauc grafiğine göre hesaplanmıştır. Tüm kobalt ferrit nanoparçacıkları için elde edilen bant aralığı değerleri sırasıyla 2.84 eV, 2.75 eV ve 2.89 eV olarak hesaplanmıştır [319]. Tez çalışmasında yalnızca TEOS ve APTES ile modifiye edilmiş ferrit nanoparçacıklarının bant aralığı hesaplanmıştır. Çünkü tez çalışması kapsamı gereği biyosensör çalışmalarını içermekte olup, elektrokimyasal biyosensör çalışmalarında kullanılacak olan son ürünler CuF-TS@AP, CoF-TS@AP, NiF-TS@AP, ZnF-TS@AP’dir. Bu ürünlerin aynı kompozit sistemde sahip oldukları farklı elektrokimyasal performanslar tez kapsamında Bölüm 4.3’de açıklanmıştır. Elektrokimyasal sensör çalışmalarında elde edilen sonuçların bant aralığı ile bağlantısından literatürde bahsedilmiştir. Örneğin, Dhinasekaran ve arkadaşları, hibrit ZnO nanoyapıları ile modifiye edilmiş grafit elektrodu ile çevre kirliliğinin izlenmesi için elektrokimyasal sensör geliştirmiştir. Bu çalışma için ZnO, Cu-ZnO ve Fe-ZnO’nun absorpsiyon çalışmaları UV–Vis absorpsiyon spektroskopik ölçümü yoluyla analiz edilmiş olup, bant aralığı değerleri sırasıyla 3.62 eV, 3.37 eV ve 3.17 eV olarak hesaplanmıştır. Sensör çalışmalarında ise en düşük bant aralığı değerine sahip olan Fe-ZnO’nun ZnO ve Cu-ZnO ile karşılaştırıldığında analite karşı daha hassas özellikler gösterdiği açıklanmıştır [103].

4.3. Tez Kapsamında Geliştirilen Üre Biyosensörleri

4.3.1. Optimizasyon Çalışmaları

Elektrokimyasal yöntemle üre tespitinde yeni tasarlanan biyosensörün en iyi performansını elde etmek için Nf hacmi, PANI döngüleri, ferrit nanoparçacık miktarı, Urs konsantrasyonu ve immobilizasyon süresi optimize edildi. Enzim içermeyen grupların hiçbiri üre analitine karşı cevap vermediği için tüm kontrol gruplarında 2.0 mg mL^{-1} Urs enzimi immobilize edilerek optimizasyon çalışmaları yapıldı. CV ölçümlerinden elde edilen pik akım değerleri, Şekil 4.17'de sunulmaktadır. Optimizasyon çalışmalarında çalışma elektrotunun hazırlanma prosesi izlenmiştir ve bu nedenle ilk olarak Nf optimizasyonu çalışılmıştır. Temizlenmiş GCE elektrodunun yüzeyinde farklı hacimlerde Nf (0.5, 1.0, 1.5, 3.0, 5.0 μL) kaplanarak araştırılsa da, elde edilen CV yanıtları ihmal edilebilir değişiklikler gösterdi. Şekil 4.17a'da görüldüğü gibi, optimum Nf hacminin 1.5 μL olduğu belirlendi. İkinci optimizasyon adımında PANI'nin 2 ve 8 arasında 5 farklı döngüde 1.5 μL Nf kaplanmış olan GCE üzerine elektrokimyasal olarak polimerizasyonu gerçekleştirildi. Şekil 4.17b'de 3 döngü PANI'nin en yüksek pik akım değerini verdiği ve bu nedenle optimum döngü olarak belirlendiği gösterilmiştir. Ancak PANI'nin elektropolimerizasyonu için döngü sayısı üçü geçtiğinde elektrot yüzeyi ve çözelti aralarındaki bağlantının zayıflaması nedeniyle daha düşük biyosensör performansı gözlenmiştir. Üçüncü optimizasyon basamağında, 5 farklı konsantrasyonda (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0 mg mL^{-1}) hazırlanan CuF-TS@AP dispersiyonu 1.5 μL Nf ve 3 döngü PANI içeren elektrot yüzeyine damlat-kurut yöntemi ile kaplandı. Ferrit nanoparçacıklarının 2.0 mg mL^{-1} 'de daha yüksek pik akım değeri gösterdiği, ancak pik akımının daha küçük ve daha yüksek konsantrasyonlarda önemli ölçüde azaldığı gözlenmiş olup, elde edilen sayısal değerler Şekil 4.17c'de verilmiştir. Dördüncü optimizasyon basamağında, optimize edilmiş koşullar altında enzim konsantrasyonu 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mg mL^{-1} olarak test edildi. Üre biyosensörünün elektrokimyasal tepkisindeki artış nedeniyle optimum enzim konsantrasyonu 6.0 mg mL^{-1} olarak bulunmuş olup, sonuçlar Şekil 4.17c'de verilmiştir. Dördüncü optimizasyon basamağında ise elektrot yüzeyi enzim ile immobilize edildikten sonra aynı konsantrasyondaki analite karşı farklı zamanlarda CV ölçümleri alınmıştır (Şekil 4.17d). Oda koşullarında elektrotun tamamen kuruması yaklaşık 2 saat sürer. Bu nedenle beşinci ve son optimizasyon basamağında 5 farklı

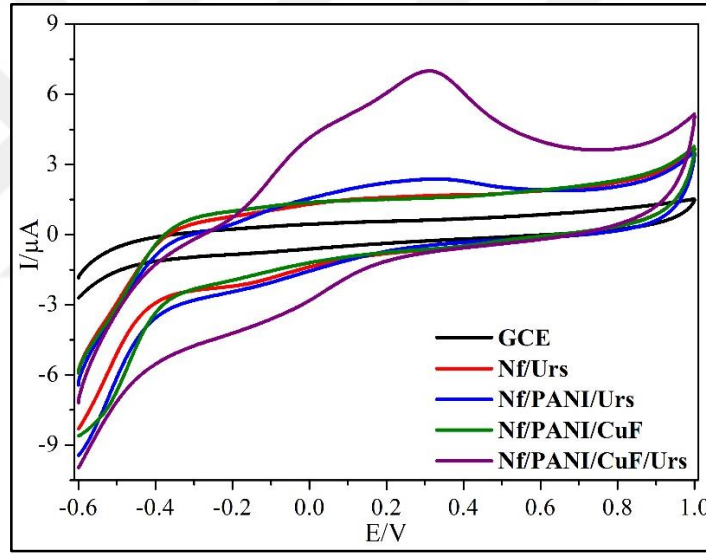
zamanda ölçümler yapılmıştır; 2, 4, 6, 8 ve 10 saat. 2 saat ile 10 saat immobilizasyon süreleri arasında anlamlı bir fark olmadığı için elektrot yüzeyinin tamamen kurduğu süre olan 2 saat optimum immobilizasyon süresi olarak kabul edildi (Şekil 4.17e). Yapılan tüm optimizasyon çalışmaları sonucunda analitik parametrelerin çalışılması için Nf (1.5 μL)/PANI (3 döngü)/Ferrit nanoparçacıkları (2.0 mg mL^{-1})/Urs (6.0 mg mL^{-1}) kaplı GCE elektrot uygun görülmüş olup, immobilizasyon süresi 2 saat olarak sabit turulmuştur.



Şekil 4.17: Nf/PANI/CuF/Urs sensörünün optimizasyonları a) Nf hacmi, b) PANI döngüsü, c) CuF-TS@AS, d) Urs konsantrasyonu ve e) İmmobilizasyon süresi.

4.3.2. Üre Biyosensörlerinin Elektrokimyasal Karakterleri

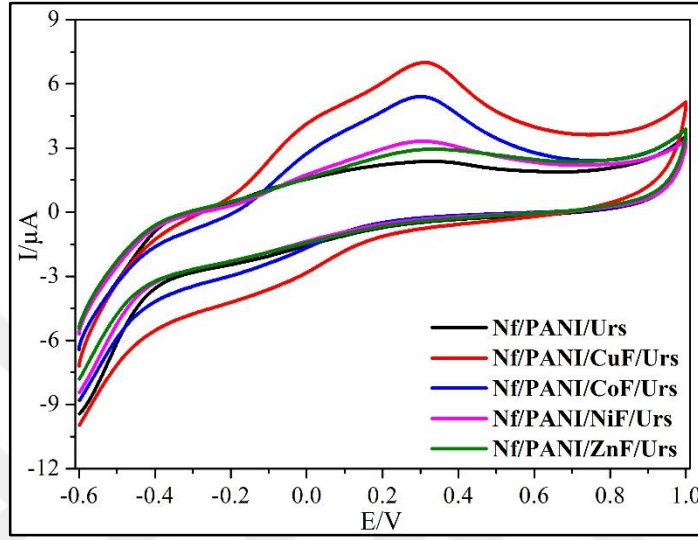
Sentezlenen ferrit nanopartiküllerin üre tayini için sinerjik katkısı, Nf/PANI sisteminin optimizasyonundan sonra ferrit nanopartiküllerin eklenmesiyle incelenmiştir. Şekil 4.18'de verilen voltamogramlar, tasarlanan biyosensörün bileşenlerinin sensör performansına katkısını göstermektedir. Enzim immobilize edilmiş olsa bile Nf veya PANI sisteminin ayrı ayrı voltammetrik yanıt vermediği açıkça görülmektedir. Daha da önemlisi, Nf/PANI sistemine ferrit nanopartiküllerin eklenmesinin pik akım değerine oldukça olumlu katkısı olduğu belirlendi. Ancak bu sistemde enzim olmadığında üreye karşı elektrokimyasal reaksiyon elde edilemediği tespit edildi. Sonuç olarak, biyosensör mekanizmasının enzimatik mekanizma yolu ile çalıştığı açıktır.



Şekil 4.18: Tez çalışması için geliştirilen üre biyosensörü bileşenlerinin elektrokimyasal yanıtları.

Aynı konsantrasyonda üreye karşı ferrit nanopartiküllerin ve ferrit içermeyen algılama elektrodunun CV yanıtları Şekil 4.19'da gösterilmektedir. Ferritsiz sistemin voltamogramı incelendiğinde en düşük pik akım değerine sahip olduğu gözlenmiştir. ZnF-TS@AP içeren sistem, aynı üre konsantrasyonunda Nf/PANI/Urs'den yaklaşık 2 kat daha yüksek pik akım değerleri vermiştir. NiF-TS@AP içeren sistemin pik akım değerlerinin yaklaşık 3 kat, CoF-TS@AP ve CuF-TS@AP içeren sistemlerin ferrit olmayan biyosensör sistemine göre yaklaşık 6 ve 7 katı pik akım değeri gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca ürenin elektro oksidasyon piklerinin potansiyel değerlerinde de

bazı değişimler olmuştur. Ferrit içermeyen sistemin oksidasyon piki 0.33 V, CuF-TS@AP için 0.30 V, CoF-TS@AP için 0.30 V, NiF-TS@AP için 0.31 V ve ZnF-TS@AP için 0.32 V'ta gözlemlendi. Bu durumda ferritlerin beklendiği gibi katalitik etki gösterdiği sonucuna varılmıştır. Aynı zamanda en yüksek pik akım değeri CuF-TS@AP içeren sistem ile belirlenmiştir.

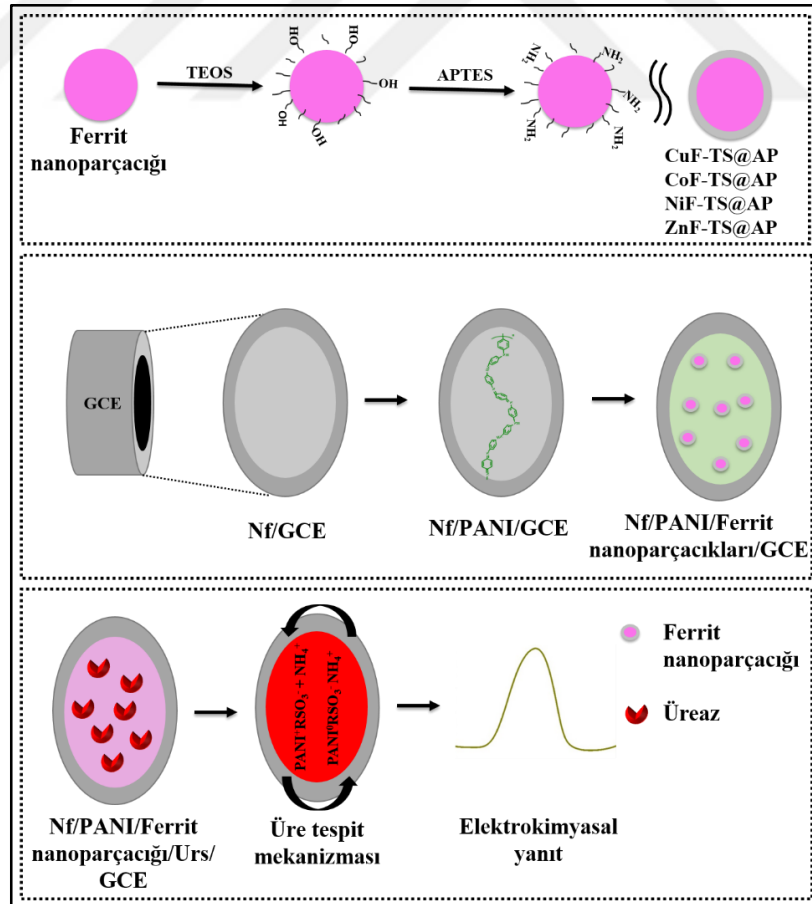


Şekil 4.19: Tez çalışması için geliştirilen üre biyosensöründe farklı ferrit nanoparçacıklarının elektrokimyasal yanıtlara etkisini gösteren CV voltamogramları.

Literatürde nikel temelli katalizörlerin, özellikle enzimatik olmayan sistemlerde üre oksidasyonu için mükemmel katalitik yetenekler sergilediklerinden bahsedilmesine rağmen [350, 351], enzimatik sistemler için böyle bir genelleme doğru olmayabilir çünkü enzimatik üre biyosensörleri için literatürde çok çeşitli nanopartiküller tasarlanmıştır [352, 353]. Nf/PANI/ferrit nanoparçacık/Urs temelli biyosensör hazırlama prosedürünün şematik gösterimi ve ürenin enzimatik bozunmasının ürünü olan NH_4^+ için tespit mekanizması Şekil 4.20'de verilmektedir. Bilindiği gibi Urs, üre ile reaksiyona girerek amonyum ve bikarbonat iyonlarına katalitik olarak dönüştürür. Ürenin enzimatik hidrolizi ile elde edilen ürünler elektrokimyasal olarak aktif değildir ve bir elektrik sinyali üretmek üzere NH_4^+ iyonunun tespiti için ikinci bir enzim kullanılabilir. Srivastava ve arkadaşları, amonyağın elektrokimyasal oksidasyonu için üreaz ve glutamat dehidrojenazı aynı anda kullanan bir amperometrik üre biyosensörü geliştirmiştir. Bununla birlikte, ikili enzimlerin kullanımı, sensör tasarımının karmaşıklığını ve maliyet/performans oranını

artırmıştır [96]. Üre sensörleri için polipirol [100] ve poli(3,4-etilendioksitiyofen) [354] gibi çeşitli iletken polimerler kullanılmıştır.

Tez çalışmasındaki elektrokimyasal sinyal, PANI içeren üre biyosensörlerinde ürenin hidrolizi sırasında Urs tarafından salınan NH_4^+ ile PANI'nin birleştirilmesiyle üretildi. Bununla birlikte, katyonik NH_4^+ 'nın PANI ile saptanması, “doping/de-doping” işlemi sırasında bir yük dengeleyici olarak sonlandırılmış bir sülfonat grubu sağlamak için polimerin Nf ile modifikasyonunu gerektirebilir. Başlangıçta, PANI'nin emeraldin formu, pozitif yüklü bir yapıya sahiptir ve negatif yüklü Nf, polimer matris içinde aktif olmayan bir poli-anyonik yük dengeleyici görevi görür [94]. Ayrıca PANI:Nf elektrodu ile NH_4^+ 'nın kantitatif tayini için, NH_4^+ konsantrasyonu arttıkça anodik ve katodik akımların kademeli olarak artacağı sonucuna varılabilir. Ferrit nanopartikülleri, manyetik özellikleri, mekanik sertlikleri, kimyasal kararlılıkları ve oksidasyon dirençleri nedeniyle endüstriyel çalışmalardan biyotıpba kadar çeşitli uygulama alanlarında ilgi görmektedir [217, 231]. Ancak henüz elektrokimyasal üre tespiti için bir sistemde kullanılmamışlardır.



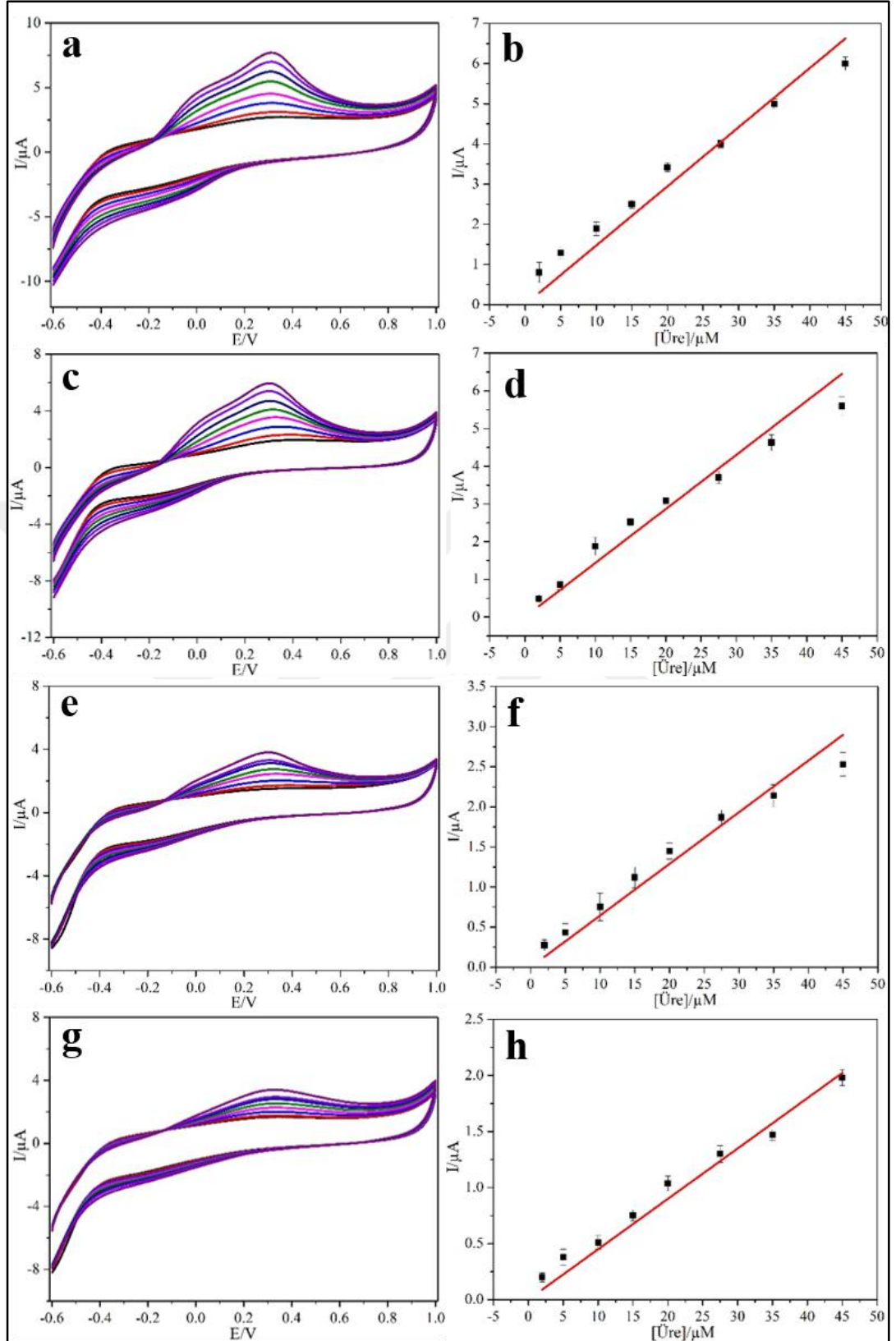
Şekil 4.20: Üre biyosensörünün hazırlanma aşamaları ve çalışma mekanizması.

Bu nedenle bu çalışmada dört elektro-katalitik özellik sergileyen ferrit nanopartiküllerin etkisi araştırılmıştır. Şekil 4.21, farklı konsantrasyonlarda üre varlığındaki CV voltamogramlarını göstermektedir. Ferrit nanoparçacıklar içeren tüm elektrotlarda NH_4^+ 'nın kantitatif tespiti için üre konsantrasyonu arttıkça pik akımlarının kademeli olarak arttığı gözlemlendi. Tez çalışması için tasarlanan üre biyosensörlerinin TS ve GS değerleri Eşitlik 4.2 ve Eşitlik 4.3'deki formülasyona göre hesaplanmıştır. Formülasyondaki " σ " yanıtın standart sapmasıdır ve S ise kalibrasyon eğrisinin eğimidir. CV voltamogramlarından 2.0-45 μM lineer aralıkta elde edilen TS değerleri CuF-TS@AP, CoF-TS@AP, NiF-TS@AP ve ZnF-TS@AP içeren sistemler için sırasıyla 6.4 μM , 7.7 μM , 12.2 μM ve 13.3 μM olarak hesaplanmıştır.

$$TS = \frac{3.3 \sigma}{S} \quad (4.2)$$

$$GS = \frac{10 \sigma}{S} \quad (4.3)$$

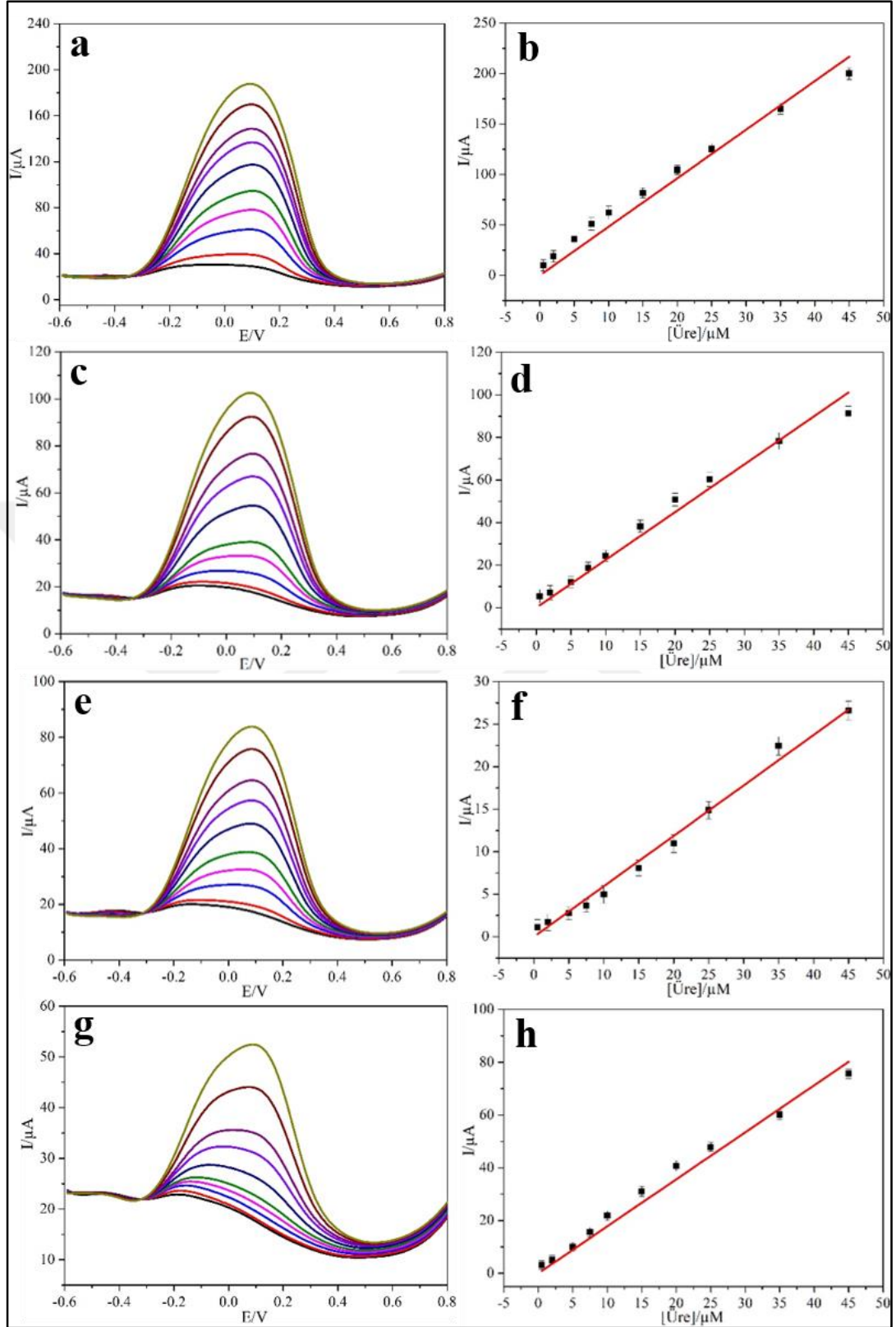
Sentezlenen ferrit nanopartiküllerinin Nf/PANI kompozitine eklenmesiyle elde edilen DPV grafikleri ise Şekil 4.22'de verilmiştir. Dört ferritin tümü için pik akım değerleri, Nf/PANI ile kaplanmış GCE'den daha yüksek olduğu belirlendi. DPV'den elde edilen TS değerleri CuF-TS@AP, CoF-TS@AP, NiF-TS@AP ve ZnF-TS@AP içeren sistemler için pik akım değerlerine göre sırasıyla 0.17 μM , 0.23 μM , 0.37 μM ve 0.42 μM olarak hesaplanmıştır. Aynı sıralama için GS değerleri ise 0.56 μM , 0.76 μM , 1.22 μM ve 1.39 μM olarak belirlendi. Doğrusal ölçüm aralığı, dört ferrit nanopartikülün tümü için 0.5-45 μM olarak belirlendi. Daha düşük TS değeri ve daha yüksek hassasiyeti nedeniyle CuF-TS@AP ile ileri analitik çalışmalar yapılmıştır. Voltametrik ölçüm sonuçlarının pik akım değerleri büyükten küçüğe doğru CuF > CoF > NiF > ZnF şeklinde belirlendi. Elektrokimyasal tepkideki farklılığın, tespit edilen iyonla ilgili olarak ferritlerin yüzey yükünden veya bant aralığı değerlerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Yani çalışmada, CuF-TS@AP, elektron transferini teşvik etmek için nispeten dar bant aralığı, üstün iletkenlik ve faydalı özellikler sergiledi [319].



Şekil 4.21: a, b) Nf/PANI/CuF/Urs ($R^2= 0.9888$), c, d) Nf/PANI/CoF/Urs ($R^2= 0.9832$), e, f) Nf/PANI/NiF/Urs ($R^2= 0.9843$), g, h) Nf/PANI/ZnF/Urs ($R^2= 0.9887$) üzerindeki farklı üre konsantrasyonları için CV yanıtları ve üre konsantrasyonları ile pik akımları arasındaki doğrusal ilişki.

CuF-TS@AP, CoF-TS@AP, NiF-TS@AP ve ZnF-TS@AP bant aralığı değerleri sırasıyla 1.25, 1.56, 2.14 ve 2.40 eV olarak hesaplanmıştır. Yeni elektrokimyasal biyosensör sisteminde ferrit nanopartikülleri üre duyarlılığı açısından değerlendirildiğinde elde edilen bant aralığı ile doğrusal bir ilişki olduğu belirlenmiştir. Literatürde de benzer yaklaşımda bulunan çalışmalar mevcuttur. Örneğin, Dhinasekaran ve arkadaşları üre sensörü için bir hibrit CuO/ZnO ve Fe₂O₃/ZnO nanoyapıları modifiye grafit elektrot geliştirdi. Sonuçlar, en düşük bant aralığı değerine sahip Fe₂O₃/ZnO kaplı grafit elektrodun üreye diğerlerine göre daha yüksek tepki verdiğini göstermiştir [103].

Tasarlanan yeni biyosensöre yakın TS değerinin literatür çalışmalarına göre anlamlı derecede düşük olduğu belirlenmiş olup, yakın çalışmalar Tablo 4.6'da listelenmiştir. Uzunçar ve arkadaşları hem çalışmanın içeriği hem de nanolifli polianilin:polistiren-sülfonatın enzim bağlantılı üre biyosensörleri için fonksiyonel bir bileşik olarak tasarlandığı ve rapor edildiği güncel yapısı nedeniyle bu çalışma ile karşılaştırılabilir olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, doğrusal ölçüm aralığını 0.2-0.9 mM aralığında ve TS değerini 51.8 µM olarak belirlemişlerdir. Bu çalışma ile karşılaştırıldığında, referans çalışmanın hem oldukça dar bir çalışma aralığına hem de yüksek bir TS değerine sahip olduğu fark edildi [94]. Singh ve arkadaşları, üre tespiti için Fe₃O₄/MWCNT-poliyanilin nanokompozit kullanmış ve lineer ölçüm aralığını 1.0-25.0 mM ve TS değerini 67.0 µM olarak hesaplamışlardır [91]. Elde edilen veriler, tasarlanan yeni üre biyosensörünün alanında yapılan çalışmalarla karşılaştırılabilir olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, geliştirilen yeni enzimatik elektrokimyasal üre biyosensörünün avantajları düşük TS, geniş lineer ölçüm aralığı, seçicilik, nispeten düşük maliyet ve kolay hazırlama sürecine sahiptir.



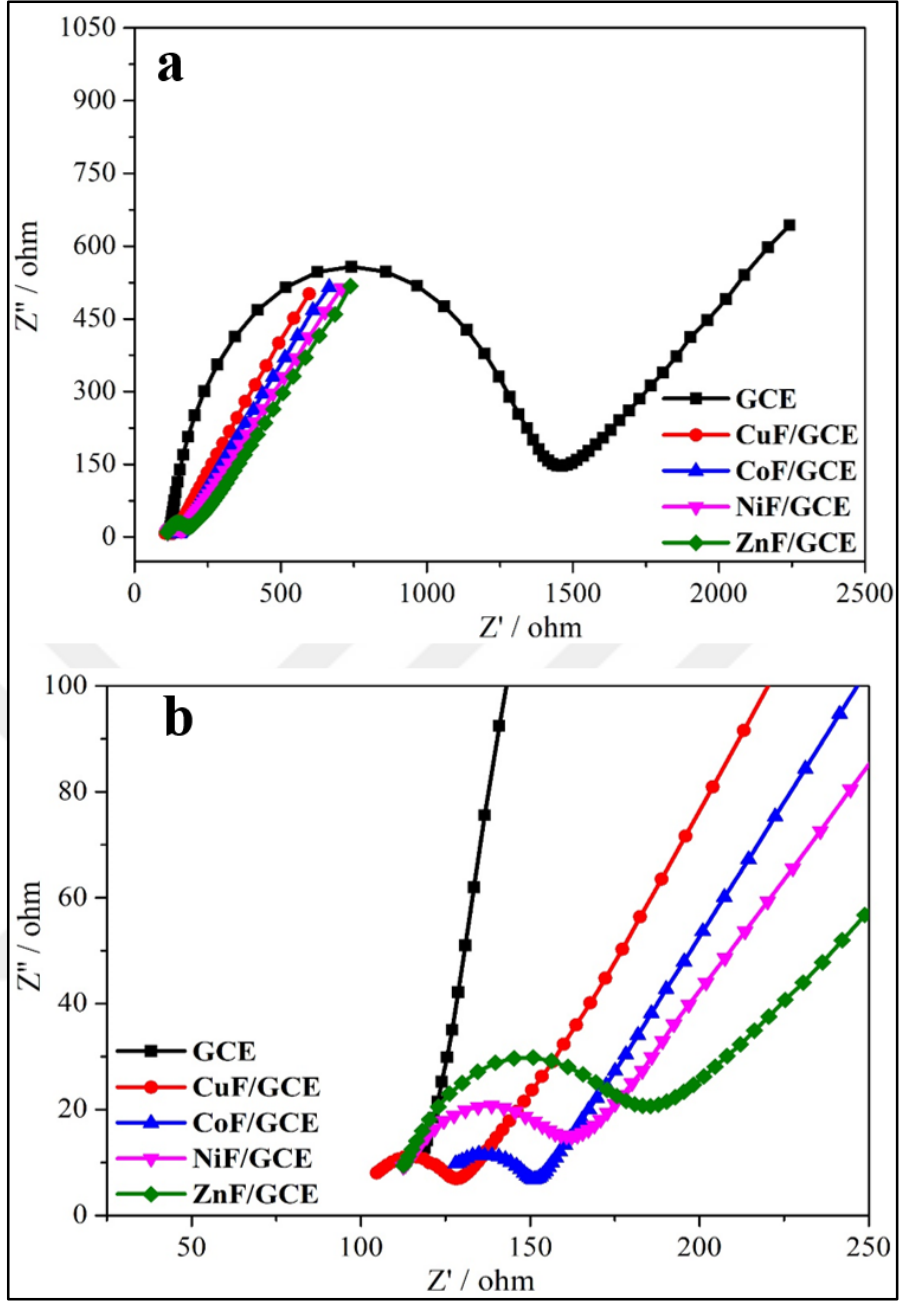
Şekil 4.22: a, b) Nf/PANI/CuF/Urs ($R^2= 0.9927$), c, d) Nf/PANI/CoF/Urs ($R^2= 0.9886$), e, f) Nf/PANI/NiF/Urs ($R^2= 0.9936$), g, h) Nf/PANI/ZnF/Urs ($R^2= 0.9941$) üzerindeki farklı üre konsantrasyonları için DPV yanıtları ve üre konsantrasyonları ile pik akımları arasındaki doğrusal ilişki.

Tablo 4.6: Elektrokimyasal üre biyosensörlerinin karşılaştırılması.

Modifiye elektrotlar	TS	Doğrusal ölçüm aralığı	Gerçek örnekler	% Geri kazanım	Kaynak
Fe-ZnO@PGE	2.55	0.8-4.0 μ M	-	-	[103]
nano-PANI:PSS	51.8	0.2-0.9 mM	-	-	[94]
Fe ₃ O ₄ /MWCNT/PANI-Nafion	67.0	1.0-25.0 mM	Süt	97.26-98.13	[91]
GND/PANI	5.0	10-90 μ M	Süt bazlı yapay matris	-	[355]
Au/PANI-PSS hydrogel/ Urease	-	10 ⁻⁴ -7×10 ⁻² M	-	-	[356]
ITO/SG-PANI/Urs	50	0.1212-3 mM	İdrar	96-116	[254]
Nafion®(urease)/PANI-Nafion®	300	3-30 mM	-	-	[357]
Nf/PANI/CuF/Urs	0.17	0.5-45.0 μ M	Toprak, süt	97-104.43	Mevcut çalışma
Nf/PANI/CoF/Urs	0.23	0.5-45.0 μ M	-	-	Mevcut çalışma
Nf/PANI/NiF/Urs	0.37	0.5-45.0 μ M	-	-	Mevcut çalışma
Nf/PANI/ZnF/Urs	0.42	0.5-45.0 μ M	-	-	Mevcut çalışma

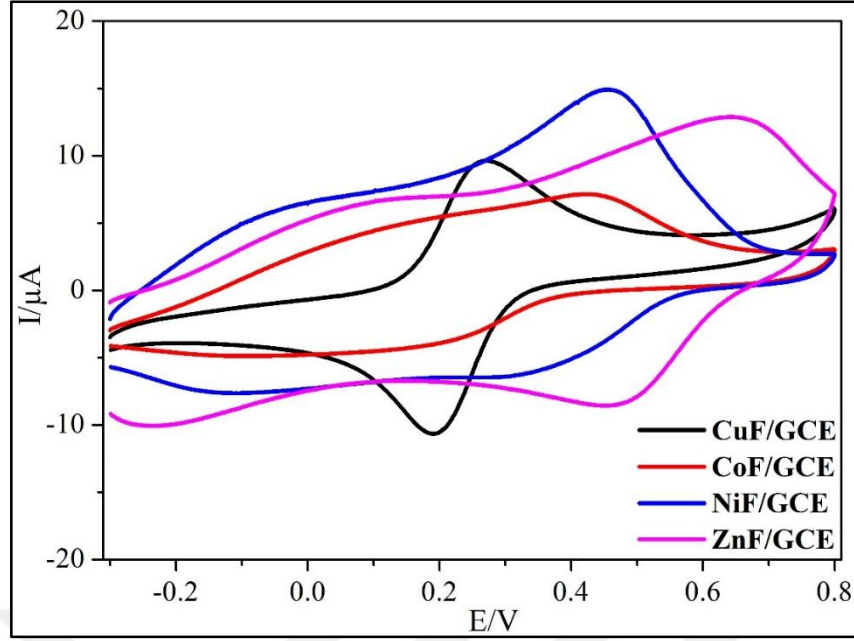
PGE: Kalem grafit elektrot, PSS: Poli(stiren sülfonat), GND: Grafitize nanoelmas, Au: Altın, MWCNT: Çok Duvarlı Karbon Nanotüp, ITO: İndiyum kalay oksit, SG: Sülfonlanmış grafen.

EIS, sensör yüzeyinin elektrokimyasal özelliklerini incelemek için yaygın olarak kullanılan bir elektrokimyasal analiz yöntemidir. Bu nedenle, EIS eğrisi önemlidir ve elektrotun yüzey özellikleri değerlendirilmesi için kullanılır. Bir Nyquist grafiğinin şekli, çalışma elektrotu bileşimine ve çalışma elektrotun yüzeyinde veya çözeltide meydana gelen elektrokimyasal tepkilere bağlıdır [358]. Bu nedenle ferrit nanoparçacıklarının üre analitine karşı verdiği tepkilerin farklılıklarının incelenmesi için Nf/PANI/CuF/Urs, Nf/PANI/CoF/Urs, Nf/PANI/NiF/Urs, Nf/PANI/ZnF/Urs kaplı GCE ve temiz GCE'nin EIS spektrumları 0.1 M KCl içeren 5.0 mM [Fe(CN)₆]^{3-/4-} çözeltisinde alınmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.23a'da verilmiştir. Temiz GCE'nin ferrit nanoparçacıkları ile kaplı olan GCE'ye kıyasla çok daha büyük bir yük transfer direnci (R_{ct}) gösterdiği tespit edildi.



Şekil 4.23: Temiz GCE ve ferrit nanoparçacıkları ile kaplı GCE'nin a) geniş ve b) daraltılmış Nyquist empedans grafikleri.

Ferrit nanoparçacıklarının kendi aralarındaki farkı belirleyebilmek için ise EIS spektrumunun ilgili bölgesi daraltılarak Şekil 4.23b'de sunulmuştur. ZnF/GCE'nin yüksek R_{ct} değerine sahip olduğu ve onu takiben NiF/GCE'nin geldiği gözlemlenmektedir. CuF/GCE ve CoF/GCE'nin nispeten birbirine yakın olduğu tespit edilmiştir. Ancak bu iki elektrot arasında da CuF/GCE'nin kısmen daha düşük solvent direnci gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen veriler üre analitine karşı biyosensörlerin elektrokimyasal tepkilerini destekler niteliktedir.



Şekil 4.24: Ferrit nanoparçacıkları ile kaplı GCE'nin 0.1 M KCl içeren 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisinde alınan CV voltamogramları.

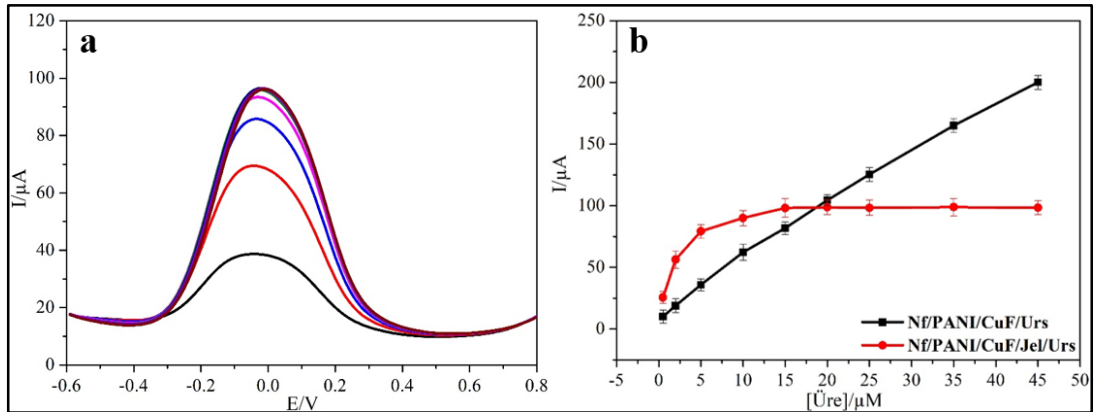
Şekil 4.24'te ise ferrit nanoparçacıkları ile kaplanmış GCE'nin 0.1 M KCl içeren 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisinde alınan CV voltamogramları verilmiş olup, aralarında önemli farklılıklar tespit edilmiştir. Öncelikle CuF/GCE'in indirgenme ve yükseltgenme piklerinin belirgin ve düzgün oluşu dikkat çekmektedir. Daha sonra her dört ferrit içinde indirgenme ve yükseltgenme pikleri önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Oksidasyon pik potansiyelleri sıralamasına bakıldığında CuF/GCE'nin piki 0.26 V'da iken CoF/GCE, NiF/GCE ve ZnF/GCE'nin pik potansiyellerinin sırasıyla 0.44 V, 0.46 V ve 0.64 V değerlerine kaydığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak, modifiye edilmiş ferrit nanopartiküller, ürenin elektrokimyasal tespiti için Nf/PANI sistemi ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildi ve önemli sonuçlar elde edildi. Bu modifiye edilmiş ferrit nanopartiküller arasında CuF-TS@AP'nin diğer ferritlere göre çok daha hassas bir elektrokimyasal biyosensör performansı gösterdiği belirlendi. Tasarlanan enzimatik elektrokimyasal biyosensörün doğrusal çalışma aralığı, TS ve GS değerleri tespit edildikten sonra amaç bu kompozit sisteme yaygın organik çözücülerde çözünebilir (jelatin) ve çözünemeyen (nanokristalin selüloz) biyopolimerlerinin eklenmesi ile biyosensörlerin üreye karşı vermiş olduğu elektrokimyasal yanıtlardaki değişimlerin gözlenmesidir. Çalışmanın bu kısmı bölüm 4.3.3 ve 4.3.4'te incelenmiş ve literatür ile kıyaslanarak detaylı olarak tartışılmıştır.

4.3.3. Jelatin Temelli Üre Biyosensörünün Elektrokimyasal Karakteri

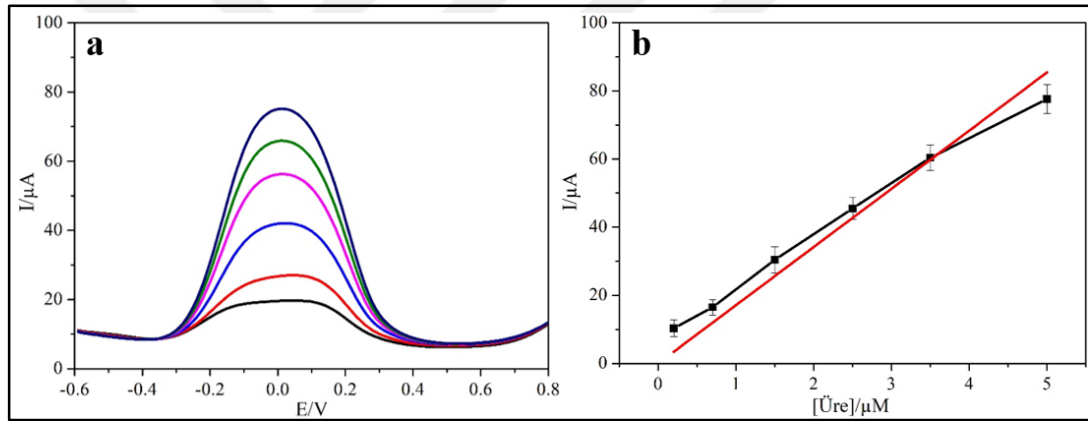
Biyopolimerler, son yıllarda malzemelere artan bilimsel ve teknolojik ilgiden de anlaşılacağı gibi biyosensör geliştirme alanında kesinlikle çok dikkat çekmektedir. Özellikle, biyotanıma elemanının aktivitesini korumaya ve biyolojik sinyalden verimli bir şekilde yararlanmaya yardımcı olabilecek çeşitli biyosensör malzemelerinin eldesi için malzeme bilimi alanında kapsamlı araştırmalar devam etmektedir. Bunlar arasında biyopolimerler, doğal kökenleri ve canlı sistemlerle olumlu etkileşimleri nedeniyle oldukça umut vericidir. Bu polimerlerin rolü ve bunların kompozitlerinin fonksiyonel malzemelerle kullanımı, bu alanda devam eden araştırma faaliyetlerine dayalı olarak kapsamlı bir şekilde incelenmektedir [10].

Nf/PANI/CuF/Urs kompozit sistemi ile kaplı elektrot yüzeyine suda çözünür özellikte olan jelatin biyopolimeri ilave edilerek oluşturulan yeni biyopolimer temelli elektrokimyasal üre biyosensörü (Nf/PANI/CuF/Jel/Urs) tasarlanmıştır. Jelatin biyopolimeri kendi molekül zinciri üzerinde sahip olduğu $-NH_2$ grupları sayesinde gluteraldehit yardımıyla elektrot yüzeyinde kolayca film oluşturabilir. Çalışmanın bu kısmında amaçlanan, iletken bir özelliğe sahip olmayan biyopolimerin elektrot yüzeyinde oluşturduğu film tabakasının biyosensörün üre analitine karşı verdiği elektrokimyasal cevaptaki değişikliklerin izlenmesidir. Ayrıca, Bölüm 4.3.5-4.3.7 arasında tekrarlanabilirlik, kararlılık, yeniden kullanılabilirlik, kullanım ömrü, seçicilik ve gerçek örnek analizleri Nf/PANI/CuF/Urs biyosensörü ile kıyaslanmıştır.



Şekil 4.25: Nf/PANI/CuF/Jel/Urs elektrotunun 0.5-45.0 μM üre içeren ortamdaki a) DPV voltamogramları, b) Nf/PANI/CuF/Urs ve Nf/PANI/CuF/Jel/Urs elektrotlarının aynı miktarda üre için hesaplanan pik akım değerleri.

Şekil 4.25a'da biyopolimer içermeyen biyosensörün çalışma aralığında (0.5-45.0 μM) üre analiti artışına karşı alınmış DPV voltamogramlarını vermektedir. Elde edilen elektrokimyasal sonuçlara göre Nf/PANI/CuF/Jel/Urs biyosensörünün çalışma aralığının Nf/PANI/CuF/Urs biyosensörüne kıyasla daraldığı ve 5.0 μM üre artışından sonra voltamogramdaki pik akım değerinin sabit kaldığı belirlenmiştir. Bu durum, biyopolimerin yüzeyde olmasından dolayı enzim ve analitin yüzeyde daha düşük konsantrasyonlarda yalıtkan bir tabaka oluşturmasından kaynaklanıyor olabilir [359]. Şekil 4.25b'de ise Nf/PANI/CuF/Urs ve Nf/PANI/CuF/Jel/Urs elektrotlarının aynı miktarda üreye için hesaplanan pik akım değerleri kıyaslanmaktadır. Nf/PANI/CuF/Jel/Urs biyosensörünün çalışma aralığı daralmış olsa bile 5.0 μM üre konsantrasyonuna kadar Nf/PANI/CuF/Urs biyosensörüne göre daha yüksek pik akım değeri verdiği ve dolayısıyla daha hassas bir biyosensör elde edildiği tespit edilmiştir.



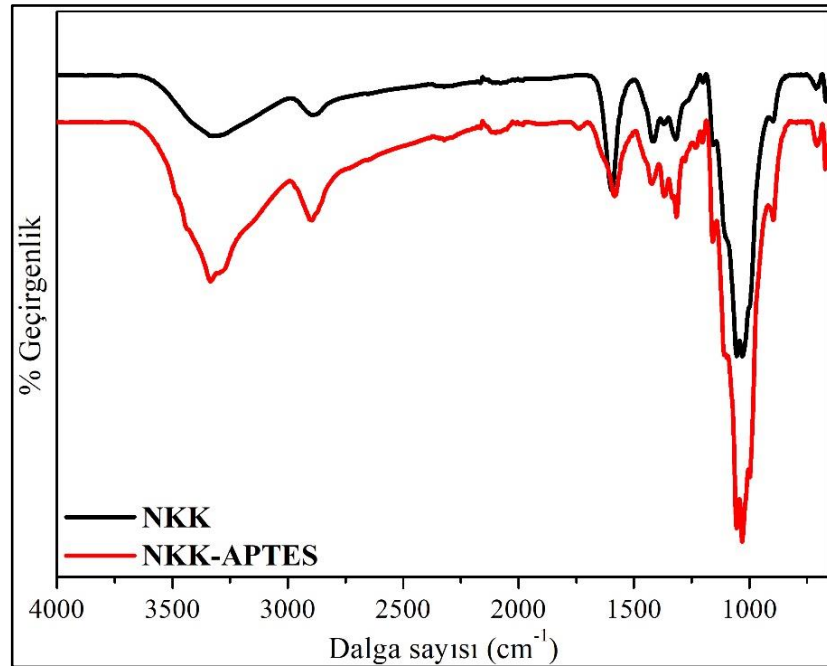
Şekil 4.26: a) Nf/PANI/CuF/Jel/Urs biyosensörünün DPV yanıtları, b) Pik akımları ve üre konsantrasyonları arasındaki doğrusal ilişki ($R^2 = 0.9874$).

Daha düşük konsantrasyonlarda daha hassas elektrokimyasal cevap veren Nf/PANI/CuF/Jel/Urs biyosensörünün doğrusal çalışma aralığının tespiti için 0.2-5.0 μM üre varlığında DPV ölçümleri alındı ve elde edilen voltamogramlar Şekil 4.26a'da gösterilmektedir. Şekil 4.26b'de ise üre konsantrasyonları ile pik akımları arasındaki doğrusal ilişki verilmiştir. Elde edilen verilere göre Nf/PANI/CuF/Jel/Urs biyosensörünün TS ve GS değerleri Nf/PANI/CuF/Urs biyosensörüne kıyasla daha düşük ve sırasıyla 64.0 nM ve 211.2 nM olarak hesaplanmıştır. Biyopolimerler, suya karşı yüksek geçirgenliğe sahiptirler, böylece elektrolitlerin biyosensör yüzeyi boyunca verimli bir şekilde ileri geri difüzyonunu sağlarlar. Bu durum difüzyon bariyeri ile ilgili sorunları ve sınırlamaları azaltmaya yardımcı olur [10].

4.3.4. Nanokristalin Selüloz Temelli Üre Biyosensörünün Elektrokimyasal Karakteri

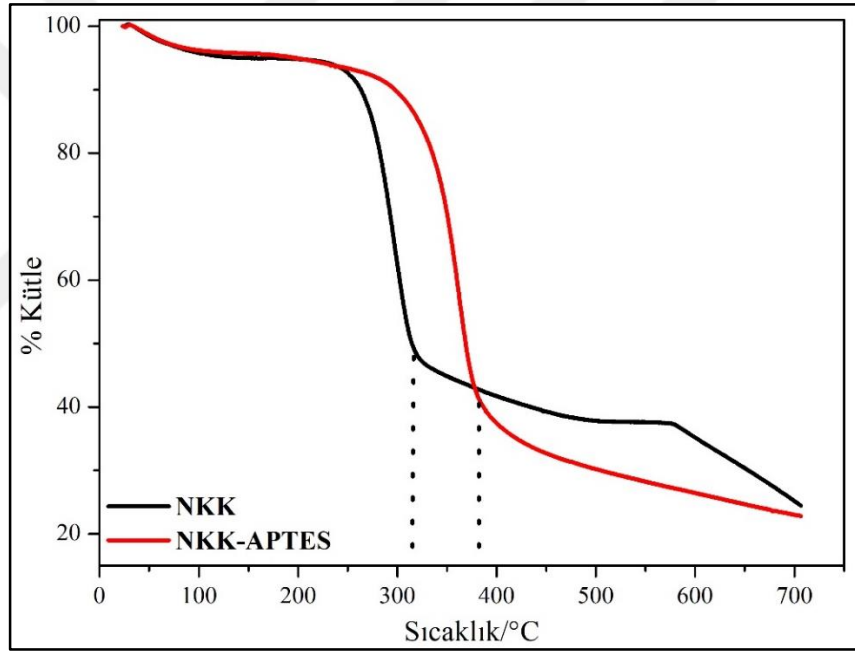
Nf/PANI/CuF/Urs kompozit sistemi ile kaplı elektrot yüzeyine yaygın organik solventlerde çözünürlük özelliği göstermeyen NKK biyopolimeri ilave edilerek oluşturulan yeni biyopolimer temelli elektrokimyasal üre biyosensörü (Nf/PANI/CuF/NKK/Urs) tasarlanmıştır. NKK biyopolimeri kendi molekül zinciri üzerinde yoğun olarak -OH grupları içermekte ancak -NH₂ grupları bulundurmamaktadır. Bu nedenle biyosensör çalışmalarına başlamadan önce NKK biyopolimeri APTES kullanılarak yüzey modifikasyonu ile fonksiyonlandırılmıştır. Çalışmanın bu kısmında amaçlanan, iletken bir özelliğe sahip olmayan biyopolimerin elektrot yüzeyindeki dispersiyonunun biyosensörün üre analitine karşı verdiği elektrokimyasal cevaptaki değişikliklerin izlenmesidir. Ayrıca, Bölüm 4.3.5-4.3.7 arasında tekrarlanabilirlik, kararlılık, yeniden kullanılabilirlik, kullanım ömrü, seçicilik ve gerçek örnek analizleri Nf/PANI/CuF/Urs biyosensörü ile kıyaslanmıştır.

NKK'nın APTES modifikasyonunu doğrulamak için FTIR ve TGA karakterizasyonları gerçekleştirildi. Şekil 4.27'de modifiye edilmiş ve edilmemiş NKK için FTIR spektrumları verilmiştir. Şekil 4.28'da ise modifiye edilmiş ve edilmemiş NKK için TGA diyagramları gösterilmiştir.



Şekil 4.27: NKK ve NKK-APTES'e ait FTIR spektrumları.

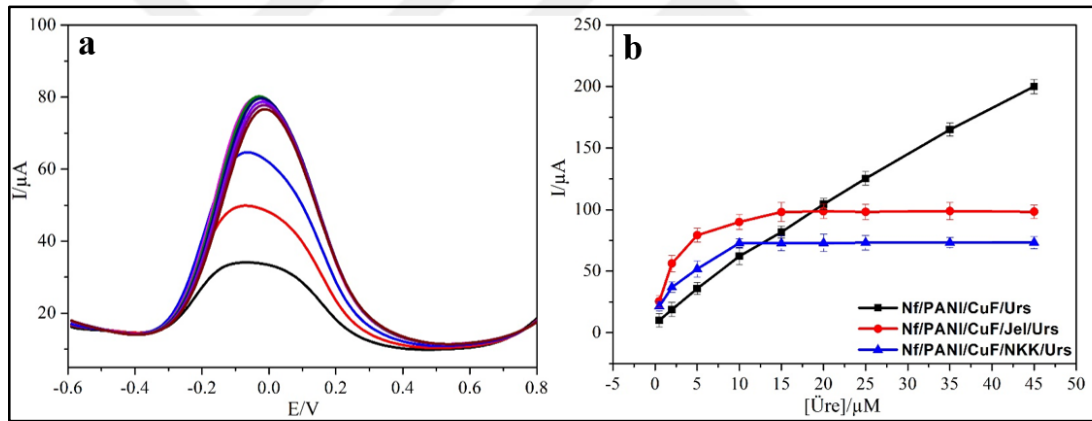
NKK'nın FTIR spektrumunda 3600–3200 cm^{-1} 'de gözlemlenen pik selülozun doğal yapısında bulunan -OH gerilme titreşimine, 2930 cm^{-1} 'deki alifatik zincirlerin simetrik ve asimetrik C-H gerilme titreşimine ve 1645 cm^{-1} 'de yüzeye absorbe edilen suyun -OH bükülme titreşimine aittir [360]. 1313'ten 1395 cm^{-1} 'e kadar kaydedilen pikler ise selülozun polisakkarit halkalarındaki C-H ve C-O gruplarının bükülme titreşiminden dolayı oluşmuştur. APTES modifikasyonundan sonra ise NKK'nın FTIR spektrumunda modifikasyonu doğrulayan bazı değişiklikler tespit edilmiştir. NKK-APTES'in FTIR spektrumunda gözlemlenen 1594 cm^{-1} 'deki pik APTES yapısında bulunan -NH₂ gruplarının eğilme titreşimlerine karşılık gelir. Ayrıca, C-O bükülme titreşimleri, silan tabakasına ait Si-O-Si bağlarından meydana gelen piklerin üst üste binmesine neden olmuştur [361].



Şekil 4.28: NKK ve NKK-APTES'e ait TGA diagramları.

NKK ve NKK-APTES'in TGA diyagramları incelendiğinde farklı sıcaklıklarda kütle kayıpları tespit edilmiştir. Bu kütle kayıpları NKK için 321 °C ve NKK-APTES için ise 385 °C'de gözlemlenmiştir. Kütle kaybının gözlemlendiği sıcaklıktaki yaklaşık 64 °C'lik artışın organosilan modifikasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca, kütle kayıplarının gözlemlendikleri sıcaklıklarda termal olarak bozunmadan kalan kütleleri NKK ve NKK-APTES için sırasıyla %48 ve %40 olarak hesaplanmıştır. Yine aradaki kütle kaybındaki farklılık silan modifikasyonuna atfedilebilmektedir [362].

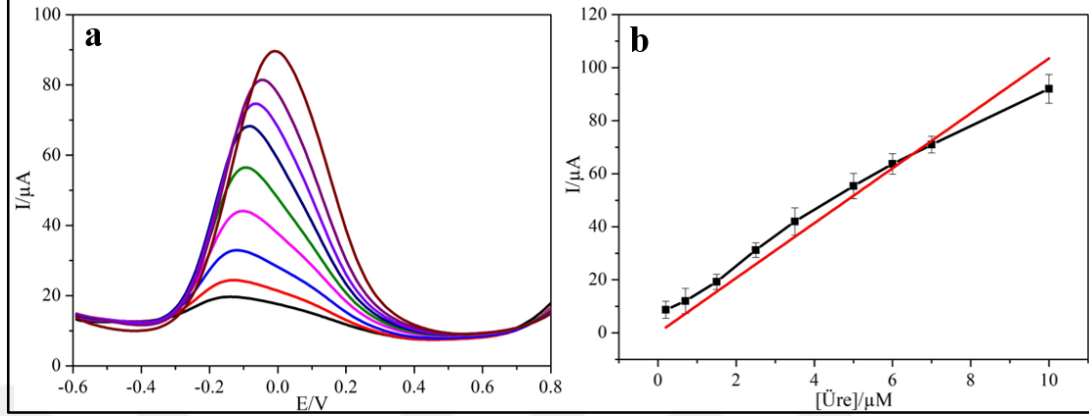
NKK'nın yüzey modifikasyonu tamamlandıktan sonra elde edilen NKK-APTES nanoparçacıkları Nf/PANI/CuF/Urs kompozit sistemine dâhil edildi. Böylece, Nf/PANI/CuF/NKK/Urs biyosensörün elektrokimyasal çalışmaları gerçekleştirildi. Şekil 4.29a'da biyopolimer içermeyen biyosensörün çalışma aralığında (0.5-45.0 μM) üre analiti artışına karşı alınmış DPV voltamogramlarını vermektedir. Elde edilen elektrokimyasal sonuçlara göre Nf/PANI/CuF/NKK/Urs biyosensörünün çalışma aralığının Nf/PANI/CuF/Urs biyosensörüne kıyasla daraldığı ve 10.0 μM üre artışından sonra voltamogramdaki pik akım değerinin sabit kaldığı belirlenmiştir. Bu durum, biyopolimerin yüzeyde olmasından dolayı enzim ve analitin yüzeyde daha düşük konsantrasyonlarda yalıtkan bir tabaka oluşturmasından kaynaklanıyor olabilir [359]. Şekil 4.29b'de ise Nf/PANI/CuF/Urs ve Nf/PANI/CuF/NKK/Urs elektrotlarının aynı miktarda üreye için hesaplanan pik akım değerleri kıyaslanmaktadır.



Şekil 4.29: Nf/PANI/CuF/NKK/Urs elektrotunun 0.5-45.0 μM üre içeren ortamdaki a) DPV voltamogramları, b) Nf/PANI/CuF/Urs ve Nf/PANI/CuF/Jel/Urs ve Nf/PANI/CuF/NKK/Urs elektrotlarının aynı miktarda üreye için hesaplanan pik akım değerleri.

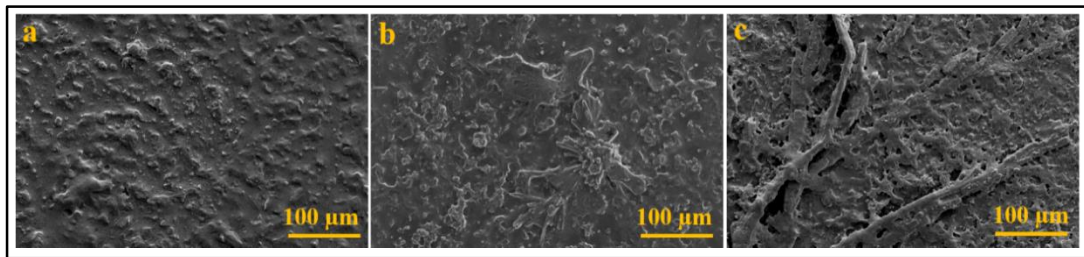
Nf/PANI/CuF/NKK/Urs biyosensörünün çalışma aralığı daralmış olsa bile 10.0 μM üre konsantrasyonuna kadar Nf/PANI/CuF/Urs biyosensörüne göre daha yüksek pik akım değeri verdiği ve dolayısıyla daha hassas bir biyosensör elde edildiği tespit edilmiştir. Daha düşük konsantrasyonlarda daha hassas elektrokimyasal cevap veren Nf/PANI/CuF/NKK/Urs biyosensörünün doğrusal çalışma aralığının tespiti için 0.2-10.0 μM üre varlığında DPV ölçümleri alındı ve elde edilen voltamogramlar Şekil 4.30a'da gösterilmektedir. Şekil 4.30b'de ise üre konsantrasyonları ile pik akımları arasındaki doğrusal ilişki verilmiştir. Elde edilen verilere göre

Nf/PANI/CuF/NKK/Urs biyosensörünün TS ve GS değerleri Nf/PANI/CuF/Urs biyosensörüne kıyasla daha düşük ve sırasıyla 75.0 nM ve 247.5 nM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.30: Nf/PANI/CuF/NKK/Urs biyosensörünün a) DPV yanıtları, b) Pik akımları ve üre konsantrasyonları arasındaki doğrusal ilişki ($R^2= 0.9898$)).

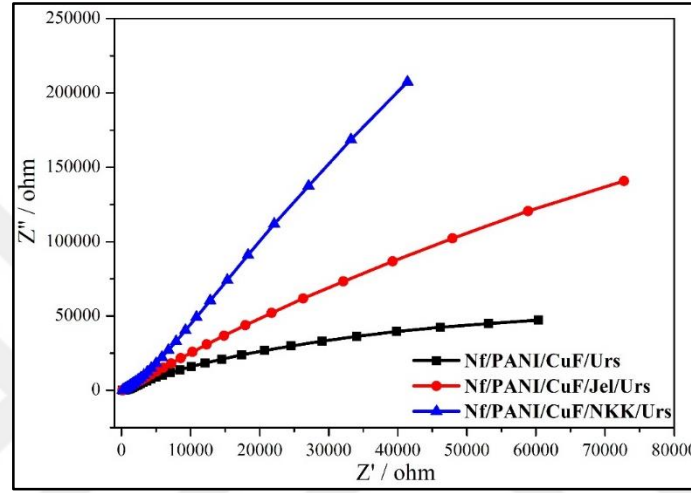
Nf/PANI/CuF/Urs, Nf/PANI/CuF/Jel/Urs ve Nf/PANI/CuF/NKK/Urs elektrotları DPV yöntemiyle kıyaslandıktan sonra yüzeydeki farklılıkların değerlendirilmesi için 0.1 M KCl içeren 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisinde EIS ölçümleri alındı. Ayrıca bu üç elektrot için elektrot yüzeyinden alınan SEM görüntüleri değerlendirildi. Böylece aynı koşullarda alınan elektrokimyasal ölçümlerdeki farklılıkların sebebi tartışıldı.



Şekil 4.31: a) Nf/PANI/CuF/Urs, b) Nf/PANI/CuF/Jel/Urs ve c) Nf/PANI/CuF/NKK/Urs elektrot yüzeylerine ait SEM görüntüleri (büyütmeler X 250).

Elektrotların yüzey morfolojisini değerlendirmek için ise SEM analizi kullanıldı ve elde edilen görüntüler Şekil 4.31’de gösterilmiştir. Nf/PANI/CuF/Urs elektrotunun yüzeyine ait SEM görüntüsünde (Şekil 4.31a) yüzeyin nispeten homojen ve pürüzlü bir yapıya sahip olduğu gözlemlenmektedir. Şekil 4.31b’de Nf/PANI/CuF/Jel/Urs

elektrotunun yüzeyinin kompozit sisteme jelatin eklenmesinden sonra bir miktar değişikliğe uğradığı belirlenmiştir. Jelatinin de gluteraldehit yardımıyla yüzeyde çapraz bağlanmasından dolayı daha fazla yığın şeklinde pürüzlülükler meydana gelmiştir. Şekil 4.31c'de ise Nf/PANI/CuF/NKK/Urs elektrotunun yüzey SEM görüntüsü verilmiş olup, NKK'nın nanoparçacık yapısından dolayı yüzeyde Nf/PANI/CuF/Urs ve Nf/PANI/CuF/Jel/Urs elektrotlarına kıyasla daha fazla pürüzlülük mevcuttur.

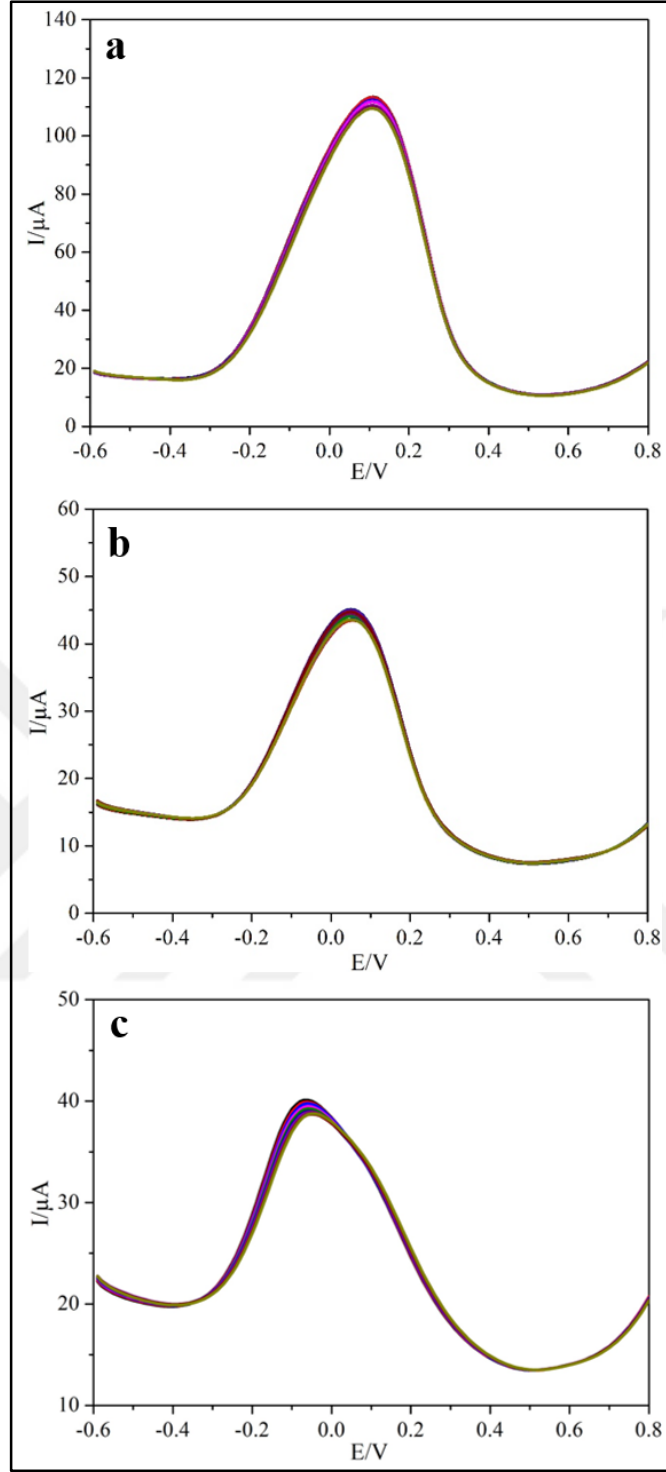


Şekil 4.32: 0.1 M KCl içeren 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisinde alınan EIS Spektrumları.

Şekil 4.32'de 0.1 M KCl içeren 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisinde alınan EIS spektrumları verilmiştir. Her üç elektrot yüzeyinde de zayıf iletkenliğe sebep olan enzim yapısı mevcuttur. Ayrıca Nf/PANI/CuF/Jel/Urs ve Nf/PANI/CuF/NKK/Urs elektrotların yüzeyinde ek olarak yer alan yalıtkan özellikteki polimerler elektron transfer direncini artırmaktadır. Her ne kadar Nf/PANI/CuF/NKK/Urs elektrotunun yüzey SEM görüntüsü diğer elektrotlara kıyasla daha pürüzlü olsa bile mevcut yüzey alanı yalnızca morfolojik olarak farklılığı temsil etmekte olup, elektrokimyasal aktif yüzey alanı değildir. Dolayısıyla bu durum redoks transfer direncini artırmıştır [363]. Nf/PANI/CuF/Jel/Urs ve Nf/PANI/CuF/NKK/Urs elektrotları kendi aralarında değerlendirildiğinde ise DPV sonuçlarında ortak doğrusal çalışma aralıkları olan 0.2-5.0 μM aralığında üre içeren ölçüm ortamında Nf/PANI/CuF/Jel/Urs elektrotunun daha yüksek pik akım değerleri verdiği gözlemlenmiştir. EIS sonuçlarında da Nf/PANI/CuF/Jel/Urs elektrotunun daha az direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

4.3.5. Üre Biyosensörlerinin Tekrarlanabilirlik, Yeniden Kullanılabilirlik, Yarı Ömür Analizleri

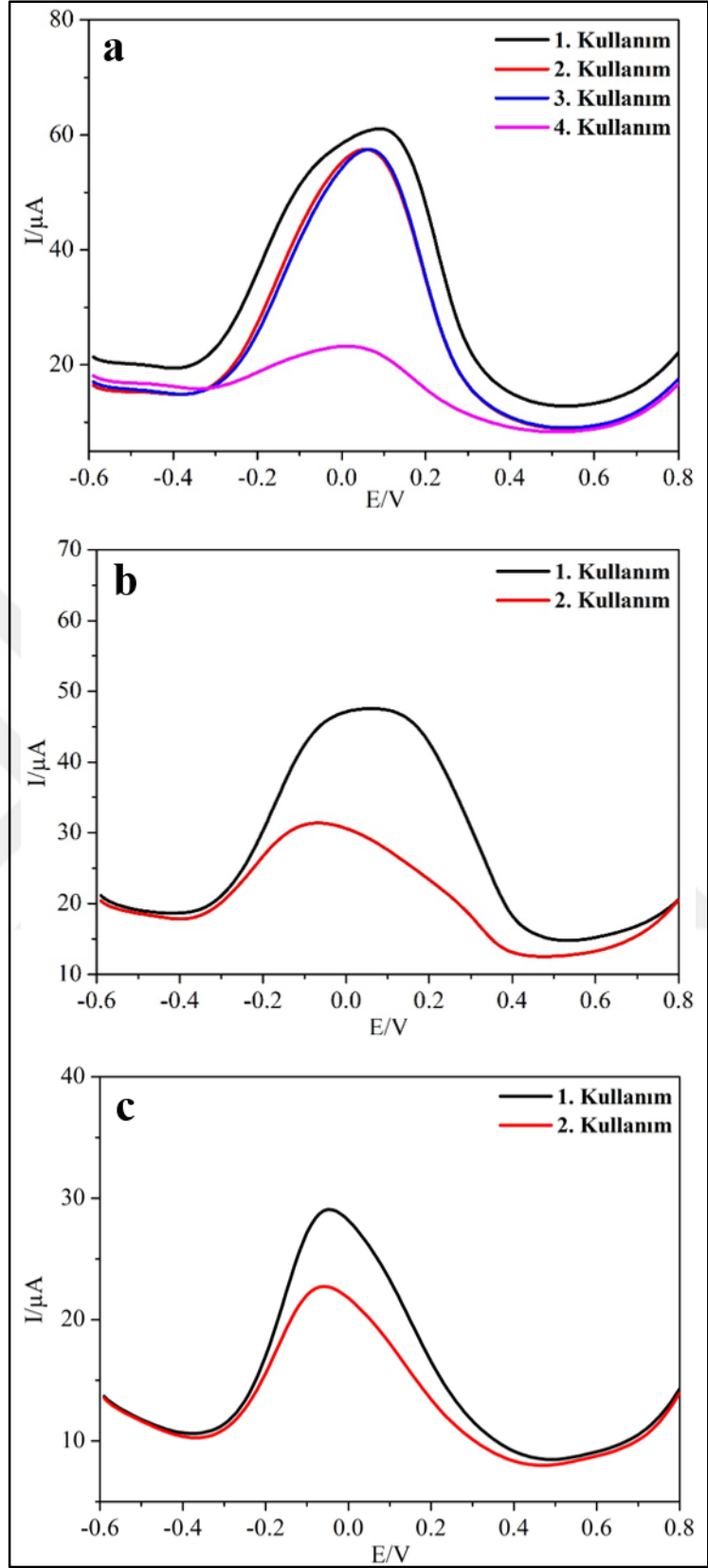
Nf/PANI/CuF/Urs, Nf/PANI/CuF/Jel/Urs ve Nf/PANI/CuF/NKK/Urs elektrotlarının tekrarlanabilirlik özellikleri için % bağıl standart sapma değeri hesaplandı. Elde edilen voltamogramlar Şekil 4.33' de verilmiştir. Her bir elektrot için PBS ortamında sırasıyla 15.0 µM, 1.5 µM ve 1.5 µM üre içeren ortamda 10 ardışık ölçümün sonuçları alındı. Hesaplamalar sonucunda % bağıl standart sapma değerleri Nf/PANI/CuF/Urs elektrotu için %2.07, Nf/PANI/CuF/Jel/Urs elektrotu için %2.19 ve Nf/PANI/CuF/NKK/Urs elektrotu için ise %2.87 olarak hesaplandı. Üç elektrot için de sensör performansı başarılı (<%5) olarak değerlendirilmiş olup, gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Elektrot yüzeyinde farklı çözünürlük özelliklerine sahip biyopolimerlerin yer almasının biyosensörün tekrarlanabilirliği üzerinde olumsuz bir etkisi olmamıştır. Literatürde hemen her biyosensör çalışmasında tasarlanan biyosensörün tekrarlanabilirliği çalışılmıştır. Xu ve arkadaşları, glukoz oksidaz immobilize edilmiş çok duvarlı karbon nano tüp temelli elektrokimyasal bir glukoz biyosensörü geliştirmişlerdir. Biyosensörün tekrarlanabilirliği, 0.5 mM glukoz çözeltisine karşılık gelen mevcut yanıtların sekiz kez ardışık olarak kaydedilmesiyle incelenmiş olup, sekiz tekrarlı ölçüm için %3.55'lik kabul edilebilir bir bağıl standart sapma tespit etmişlerdir [364]. Biyopolimer içeren farklı bir biyosensör çalışmalarında yapılan tekrarlanabilirlik çalışmalarında da oldukça iyi sonuçlar elde edilmiştir. Balu ve arkadaşları, grafit üzerinde guar gum biyopolimeri stabilize edilmiş bakır oksidin sonokimyasal sentezini gerçekleştirmiştir. Bu biyosensörü süt ve farmasötik numunelerde H₂O₂'nin elektrokimyasal tespitinde uygulamışlardır. Beş ölçüm için hesaplanan bağıl standart sapma değeri %3.92 olarak bulunmuştur [300]. Li ve arkadaşları, tarım, balıkçılık, veterinerlik ilaçları ve halk sağlığı gibi birçok alanda yaygın kullanılan antelmintik bir ilaç olan Niklozamidin tayini için kitosan temelli üç boyutlu hiyerarşik gözenekli karbon içeren elektrokimyasal sensör geliştirmiştir. Tekrarlanabilirlik sonuçları, modifiye edilmiş tek bir sensörün karşılık gelen pik akım değerlerinden analiz edilmiş ve %2.12 olarak hesaplanan düşük bağıl standart sapma değerleri sayesinde Niklozamidin sensörünün iyi tekrarlanabilirliğe sahip olduğunu tespit etmişlerdir [365].



Şekil 4.33: a) Nf/PANI/CuF/Urs, b) Nf/PANI/CuF/Jel/Urs ve c) Nf/PANI/CuF/NKK/Urs biyosensörlerinin tekrarlanabilirlik analizleri.

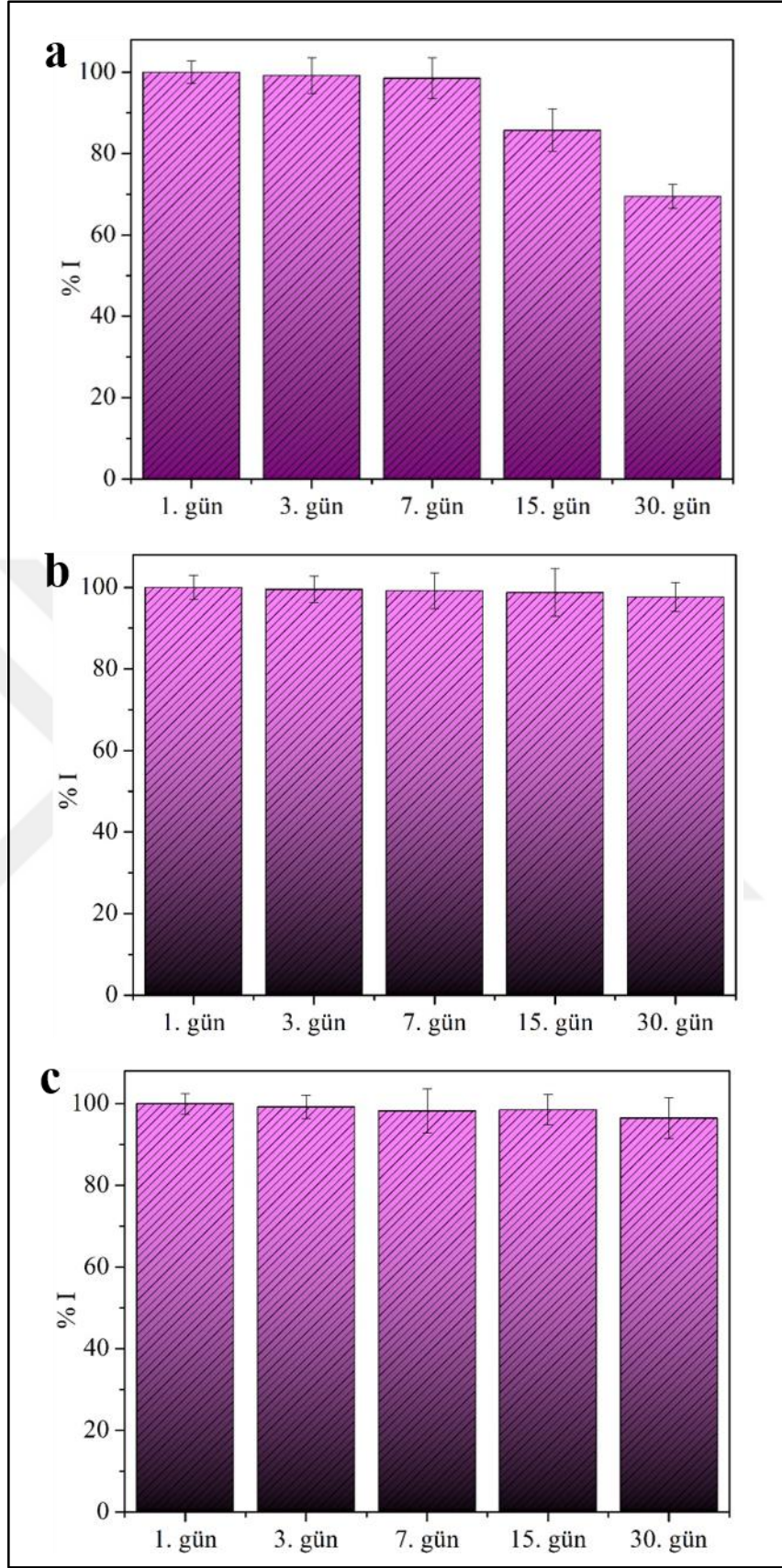
Nf/PANI/CuF/Urs, Nf/PANI/CuF/Jel/Urs ve Nf/PANI/CuF/NKK/Urs biyosensörlerinin tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için aynı elektrotlar üzerinde DPV ölçümleri yapılmış olup, elde edilen voltamogramlar Şekil 4.34’de verilmiştir. Nf/PANI/CuF/Urs biyosensörü için uygulana prosedür şu şekildedir; 5.0 μM üre

varlığında ilk DPV ölçümünden sonra elektrot yüzeyi distile su ile hafifçe yıkandı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Bu işlem 4 kez tekrarlanmış ve ilk üç ölçümde pik akım değerleri için bağıl hata %1.57 olarak hesaplanmıştır. Ancak dördüncü ölçümden sonra pik akımındaki düşüş %72.2 olarak bulundu. Bu durumun elektrot yüzeyinin deformasyonundan ve enzim aktivitesinde azalmadan kaynaklandığı söylenebilir. Nf/PANI/CuF/Urs elektrotunun ilk üç ölçüm için elektrokimyasal olarak doğru sonuç verdiği sonucuna ulaşılabilir. Nf/PANI/CuF/Jel/Urs ve Nf/PANI/CuF/NKK/Urs biyosensörlerinin tekrar kullanılabilirliği için uygulanan prosedür ise şu şekildedir; sırasıyla 1.5 μ M ve 1.0 μ M üre varlığında ilk DPV ölçümünden sonra elektrot yüzeyi distile su ile hafifçe yıkandı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Ancak ikinci ölçümden sonra biyopolimer içeren biyosensörler benzer davranış sergiledi ve ölçülen pik akımlarının sırasıyla %56.4 ve %24.7 azaldığı tespit edildi. Pik akım değerlerinde gözlemlenen önemli düşüş miktarları Nf/PANI/CuF/Jel/Urs ve Nf/PANI/CuF/NKK/Urs biyosensörlerinin sadece ilk ölçüm için elektrokimyasal olarak doğru sonuç verdiğini gösterdi. Bu durum ölçüm esnasında analitin biyopolimer içeren elektrot yüzeyine adsorbe olup, yüzeyi bir sonraki ölçüm için engellemesinden kaynaklanıyor olabilir. El-Moghazy ve arkadaşları, insanların piretroid insektisitlere maruz kalmasının bakım noktasında izlenmesi için naylon nanofiberler kullanılan elektrokimyasal bir immunosensör geliştirmişlerdir. Tüm biyosensörler için yeniden kullanılabilirlik özelliğinin tıbbi tarama testlerinin maliyetini en aza indirmek ve tıbbi atıkları azaltmak için yararlı olabileceğini belirtmişler ve bu nedenle kendi geliştirdikleri biyosensör için de yeniden kullanılabilirlik analizi yapmışlardır. Biyosensörün ikinci ölçümde başlangıç aktivitesinin %90'ından fazlasını ve üçüncü ölçümden sonra ise yaklaşık %66'sını koruduğunu belirtmişlerdir [366].



Şekil 4.34: a) Nf/PANI/CuF/Urs, b) Nf/PANI/CuF/Jel/Urs ve c) Nf/PANI/CuF/NKK/Urs biyosensörlerinin tekrar kullanılabilirlik analizleri.

Nf/PANI/CuF/Urs, Nf/PANI/CuF/Jel/Urs ve Nf/PANI/CuF/NKK/Urs biyosensörlerinin kullanım ömrünü belirlemek için bir ay içerisinde beş farklı zamanda aynı konsantrasyonda DPV ölçümleri alınmıştır. Ölçüm alınan konsantrasyonlar biyosensörlerin doğrusal çalışma aralıkları gözüne alınarak seçilmiş ve Nf/PANI/CuF/Urs için 25.0 μM , Nf/PANI/CuF/Jel/Urs için 3.0 μM ve Nf/PANI/CuF/NKK/Urs için 5.0 μM olarak belirlenmiştir. Üre konsantrasyonları farklılık gösterebileceği uygulanan prosedür üç biyosensör için de aynıdır ve ölçümler en az üç kez tekrarlanmıştır. Uygun kompozit sistemler ile kaplanan elektrotlar oda koşullarında tutuldu ve yüzeyleri havaya açık olacak şekilde bir stand üzerine yerleştirildi. Ölçüm süreleri 1. gün, 3. gün, 7. gün, 15. gün ve 30. gün olarak belirlendi. Elde edilen elektrokimyasal verilerin grafiği Şekil 4.35'de verilmiştir. Nf/PANI/CuF/Urs biyosensöründe 7. güne kadar yapılan elektrokimyasal ölçümlerde biyosensörün aynı üre konsantrasyonuna verdiği tepkide anlamlı bir fark gözlenmedi ve yaklaşık %1.5 olarak hesaplandı. Ancak 15. günde pik akım değerinde %14.28, 30. günde ise ilk güne göre %30.51 oranında azalma gözlemlendi. Sonuç olarak, tasarlanan yeni elektrokimyasal üre biyosensörünün ilk 7 gün içerisinde doğru sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Pik akım değerinde 7. günden sonra gözlenen düşüş, enzim aktivitesinin azalmasına bağlanabilir [367]. Biyopolimer içeren sistemlerde ise durum farklı olmuş ve Nf/PANI/CuF/Jel/Urs ve Nf/PANI/CuF/NKK/Urs biyosensörleri 30 gün süresince alınan ölçümlerde üre analitine karşı yaklaşık aynı elektrokimyasal yanıtı vermiştir. Pik akım değerlerindeki 30 günlük fark Nf/PANI/CuF/Jel/Urs için %2.4 ve Nf/PANI/CuF/NKK/Urs biyosensörü için ise %3.53 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç, literatüründe belirttiği gibi biyopolimerlerin enzimler için iyi birer immobilizasyon matrisi oldukları bilgisini doğrulamaktadır [10]. Böylece enzimin biyopolimer matrisi varlığında daha uzun süre stabilitesini koruduğu ve kullanım ömrünün biyopolimer içermeyen sistemle kıyaslandığında 7 günden en az 30 güne kadar çıktığı tespit edilmiştir. Huang ve arkadaşları, geliştirdikleri elektrokimyasal sensör ile eş zamanlı çift metal iyon tespitini amaçlamışlardır. Uzun vadeli stabiliteyi değerlendirmek için, 7 günlük aralıklarla elektrokimyasal sinyali ölçerek karşılık gelen bağıl standart sapmayı hesaplamışlar ve böylece biyosensörün depolama ömrü araştırmışlardır. Elde ettikleri sonuca göre üç hafta içinde azalan sinyalin yüzdesi %5'ten az olacak şekilde sabit olma eğilimi gösterdiği yönünde olduğunu belirttiler. Sinyaller, algılama malzemeleri deaktivasyonu olarak dört hafta sonra %86.56 Cu(II) ve %97.82 Zn(II) ve beş hafta sonra %85.21 ve %84.12'yi koruduğu açıklanmıştır [368].

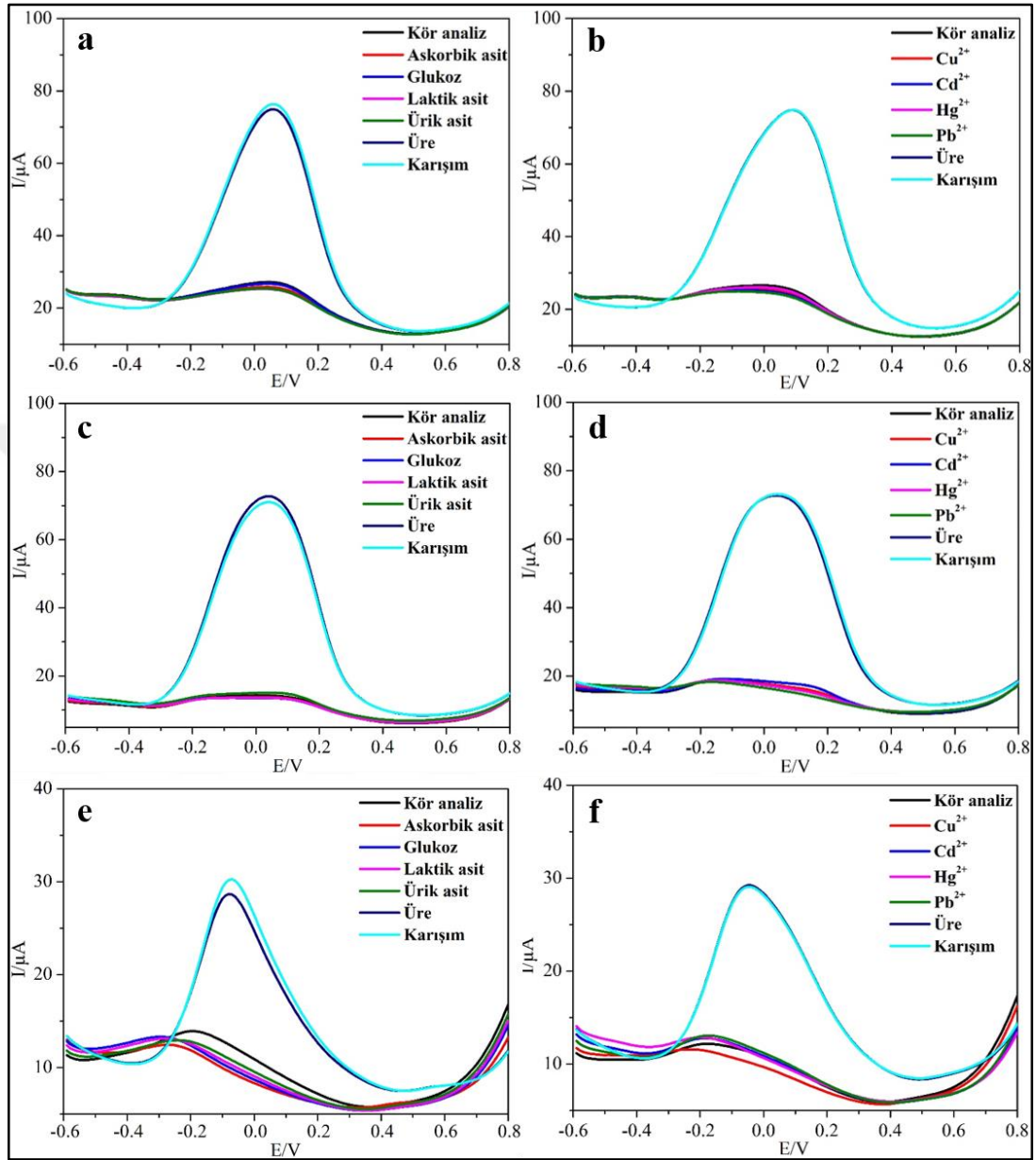


Şekil 4.35: a) Nf/PANI/CuF/Urs, b) Nf/PANI/CuF/Jel/Urs ve c) Nf/PANI/CuF/NKK/Urs biyosensörlerinin kullanım ömrü analizleri.

4.3.6. Üre Biyosensörünün Seçicilik Analizleri

Bir sensörün seçiciliği, analitin girişim yapabilecek moleküllerden ayırt etme ve hedefe özel bir sensör tepkisi gösterme yeteneği olarak tanımlanabilir. Girişim yapabilecek türler analitin bulunacağı ortamlara (toprak, su, tükürük, idrar vb.) göre belirlenmektedir. Seçicilik biyosensör çalışmalarında oldukça önemli bir parametre olup, detaylı olarak çalışılmaktadır. Tez çalışması kapsamında geliştirilen Nf/PANI/CuF/Urs, Nf/PANI/CuF/Jel/Urs ve Nf/PANI/CuF/NKK/Urs biyosensörlerinin seçicilik analizleri, ürik asit, glukoz, askorbik asit, laktik asit, Hg²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺, Cu²⁺ gibi çeşitli girişim yapabilecek maddelerin etkisini değerlendirmek için araştırıldı. İlk olarak, PBS ölçüm ortamına 50 kat girişim yapabilecek türler eklendi ve üre yokluğunda DPV ile analiz edildi ve üç elektrot için de hiçbir pik oluşumu gözlenmedi. Daha sonra ortama üre eklenerek pik akım değeri belirlendi. Eklenen üre miktarları Nf/PANI/CuF/Urs için 7.5 µM, Nf/PANI/CuF/Jel/Urs için 6.0 µM ve Nf/PANI/CuF/NKK/Urs için 1.5 µM'dır. Son olarak DPV ölçümü, üre varlığına girişim yapabilecek grupların karışımının eklenmesiyle tekrar alındı. Elde edilen voltamogramlar Şekil 4.36'da verilmiştir. Nf/PANI/CuF/Urs biyosensörü için bağıl hatalar organik gruplar ve iyonlar için sırasıyla %2.26 ve %0.78 olarak hesaplanmıştır. Bağıl hatalar Nf/PANI/CuF/Jel/Urs ve Nf/PANI/CuF/NKK/Urs biyosensörleri için ise sırasıyla %2.57 ve %0.92, %4.31 ve %1.28 olarak belirlendi. Üreye karşı seçicilik testleri için literatürde birçok çalışma yapılmıştır. Wang ve arkadaşları seçicilik testi için seçilen ürik asit ve glukoz, enterferans ajanlarının varlığında pik akım değerlerinde önemli bir değişiklik göstermediğini ve %bağıl hata değerlerinin %0.7-4.36 aralığında olduğunu açıklamışlardır [343]. Bao ve arkadaşları seçicilik testinde glukoz ve askorbik asit kullanmışlardır. Pik akımındaki değişimin glukoz için %8.89, askorbik asit için %17.45 olduğu belirtmişlerdir [111]. Parsaee ve arkadaşları üre varlığında ürik, askorbik asit ve glukozun ana girişim ajanları olarak değerlendirildiğini ve bu nedenle bu grupların çalışılmasının önemli olduğunu belirtmiştir [369]. Yukarıda bahsedilen sonuçlar, üre tespiti için hazırlanan biyosensörlerin (Nf/PANI/CuF/Urs, Nf/PANI/CuF/Jel/Urs ve Nf/PANI/CuF/NKK/Urs) yanıtının tekrar üretilebilir ve seçici olduğunu doğruladı. Nf/PANI/CuF/Urs biyosensörünün ilk üç ölçüm için güvenilir veri sağladığı yeniden kullanılabilirlik deneylerinden belirlenmiştir. Ancak Nf/PANI/CuF/Jel/Urs ve

Nf/PANI/CuF/NKK/Urs biyosensörlerinin tek kullanım için doğru ve güvenilir sonuç verdiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.36: a, b) Nf/PANI/CuF/Urs, c, d) Nf/PANI/CuF/Jel/Urs ve e, f) Nf/PANI/CuF/NKK/Urs biyosensörlerinin seçicilik analizleri.

4.3.7. Üre Biyosensörü İçin Gerçek Örnek Analizleri

Beslenmeye göre, üre konsantrasyonu 3.0 ila 6.0 mM ve tolere edilebilir üre sınırı ise ≤ 11.0 mM olmalıdır. Yüksek üre konsantrasyonunda süt tüketimi insanlarda çeşitli böbrek fonksiyon bozukluklarına, hazımsızlığa ve ülserlere neden olabilir [91]. Ayrıca azot içeren gübreler halen yaygın olarak kullanılmaktadır ve bu nedenle toprakta ve çevre suyunda üre varlığı artmaktadır [18]. Bu sebeplerden dolayı gıda ve çevre numunelerinde ürenin kolay, kesin ve doğru bir şekilde tespit edilmesi önemlidir.

Tablo 4.7: Tez kapsamında geliştirilen biyosensörler ile toprak ve süt numunelerinde üre tayini.

Gerçek Örnekler		Eklenen (μM)	Bulunan (mM) ^a	Geri Kazanım (%) ^b
Nf/PANI/CuF/Urs	Toprak	0	-	-
		5.00	4.85 \pm 0.48	97.00
		7.50	7.65 \pm 0.34	102.00
	Süt	0	2.02 \pm 0.21	-
		5.00	7.24 \pm 0.27	104.44
		7.50	9.82 \pm 0.31	104.00
Nf/PANI/CuF/Je/Urs	Toprak	0	-	-
		1.0	0.96 \pm 0.28	96.50
		1.5	1.47 \pm 0.31	98.21
	Süt	0	1.97 \pm 0.23	-
		1.0	2.88 \pm 0.27	96.88
		1.5	3.55 \pm 0.19	102.40
Nf/PANI/CuF/NKK/Urs	Toprak	0	-	-
		1.0	0.97 \pm 0.33	97.47
		2.0	1.91 \pm 0.21	95.50
	Süt	0	1.95 \pm 0.27	-
		1.0	2.99 \pm 0.37	101.32
		2.0	4.10 \pm 0.32	103.70

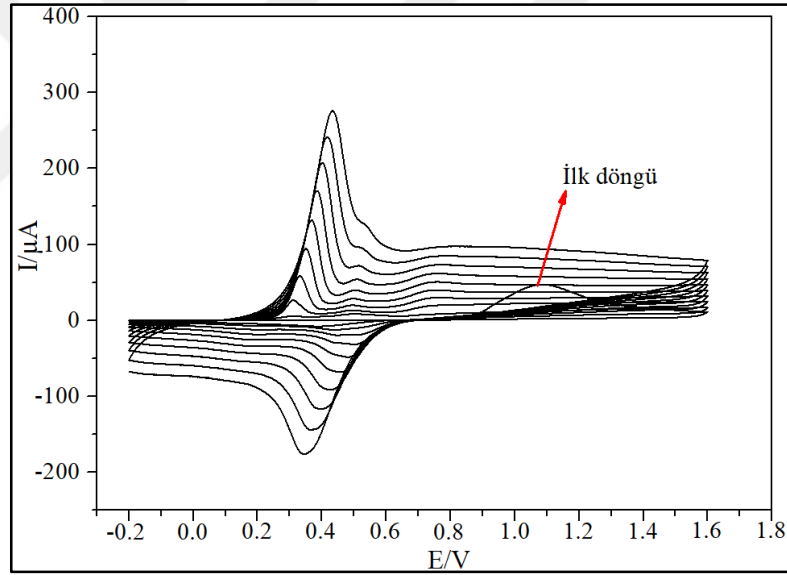
^aGerekli seyreltme faktörü ile çarpılarak hesaplanmıştır.
^bOrtalama \pm SD (n = 3).

Tez çalışması kapsamında geliştirilen Nf/PANI/CuF/Urs, Nf/PANI/CuF/Jel/Urs ve Nf/PANI/CuF/NKK/Urs biyosensörlerinin gerçek numune analizi için numunelerin hesaplanan hacimleri, PBS'de belirlenen taban çizgisinden sonra ölçüm hücresine eklendi. Böylece numunelerdeki üre miktarı belirlenmiş ve doğruluğu iki farklı konsantrasyonda spike ve geri kazanım testi ile belirlenmiştir. Eklenen üre konsantrasyonu Nf/PANI/CuF/Urs için 5.0 and 7.5 μM , Nf/PANI/CuF/Jel/Urs için 1.0 and 1.5 μM , Nf/PANI/CuF/NKK/Urs için 1.0 and 2.0 μM olarak belirlenmiştir. Geri kazanımlar Tablo 4.7'de verilmiştir. % geri kazanım değerleri Nf/PANI/CuF/Urs %97.0 ve %104.43 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, Nf/PANI/CuF/Jel/Urs için %96.5 ve %102.4, Nf/PANI/CuF/NKK/Urs için ise %95.5 ve %103.7 olduğu belirlenmiştir. Yeni tasarlanan elektrokimyasal biyosensörler gerçek numunelerde yüksek doğrulukta üre tayini için doğru sonuçlar vermiştir.

4.4. Tez Kapsamında Geliştirilen BPA Biyosensörü

4.4.1. PANI-nl Karakterizasyonu

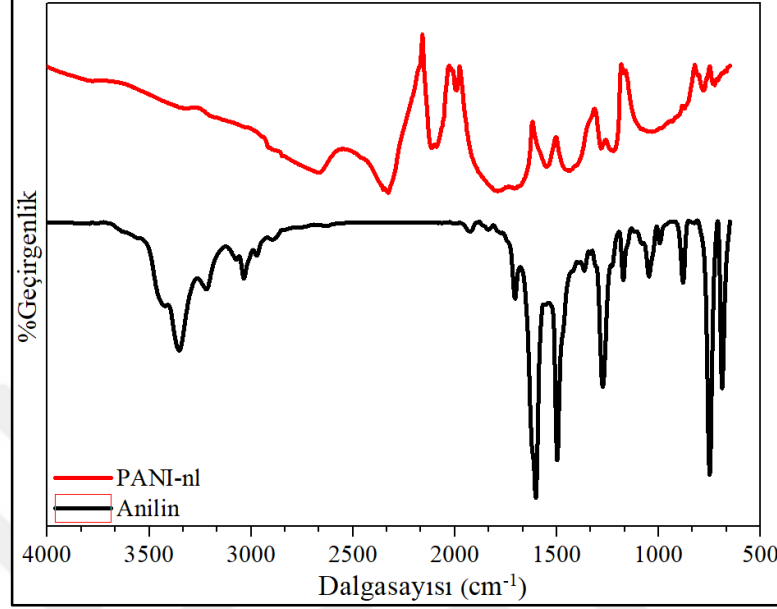
Tez çalışması kapsamında tasarlanan BPA biyosensöründe iletkenliği artırmak amacıyla iletken bir polimer olarak PANI kullanılmıştır. Bu amaçla sentezlenen PANI-nl için elektrokimyasal yöntem kullanılmış olup, elde edilen voltamogram Şekil 4.37’de verilmiştir. Voltamogram incelendiğinde ilk döngüde polianilin nükleasyonu nedeniyle yaklaşık 1.1 V’da anilin oksidasyonu meydana gelir. Sonraki taramalar sırasında, anilin oksidasyonu, polianilin katalitik etkisine bağlı olarak daha düşük potansiyelde gerçekleşir. Tekrarlanan potansiyel taramaların bir sonucu olarak redoks piklerinin genliğinde gözlenen artış polimerin elektrot yüzeyine birikmesi ile ilgilidir [370].



Şekil 4.37: PANI-nl’in elektrokimyasal sentezinde elde edilen CV voltamogramı.

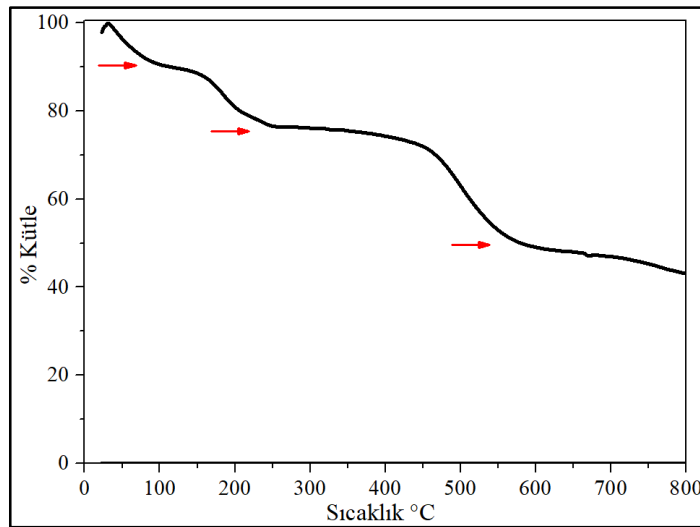
Monomer olarak kullanılan anilin ve CV yöntemiyle elde edilen PANI-nl yapılarına ait FTIR spektrumları Şekil 4.38’de verilmiştir. Aniline ait spektrum incelendiğinde $3530-3230\text{ cm}^{-1}$ arasındaki pikler sırasıyla asimetric ve simetric N-H gerilmelerine, 3030 cm^{-1} ’de C-H gerilmelerine, 1618 cm^{-1} ’de ki pik N-H bükülmesine ve 1268 cm^{-1} ’de ise C-N gerilmesine ait titreşim pikleridir [371]. PANI-nl yapısına ait spektrumda; 1287 cm^{-1} ’deki pik benzenoid halkasının C-N gerilme titreşimine ve 1033 cm^{-1} ’deki pik aromatik C-H düzlem içi bükülmesine aittir. 1426 cm^{-1} ve 1535 cm^{-1} ’deki

pikler sırasıyla benzenoid ve kinoid halkaların C=C ve C=N gerilmesinden kaynaklanmaktadır. Spektrumdaki bu absorpsiyon pikleri polimerize olmuş anilin varlığını doğrulamaktadır [372].



Şekil 4.38: Anilin ve PANI-nl'in FTIR spektrumları.

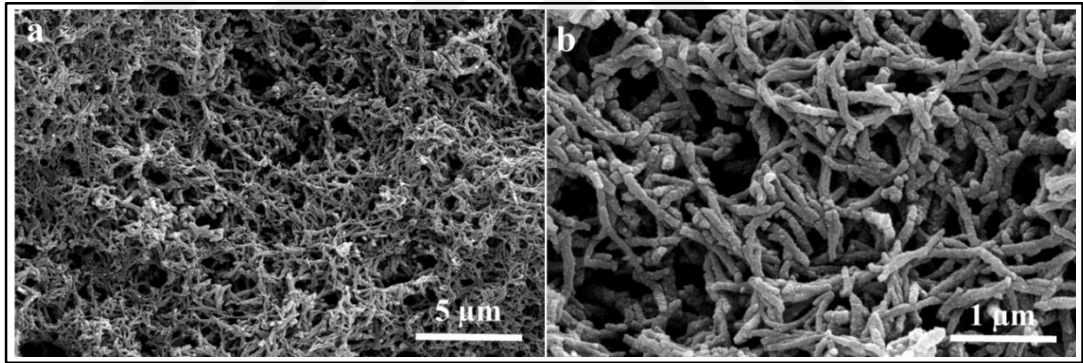
PANI'nin termal ayrışması ve stabilitesinin belirlenmesi için TGA yöntemi kullanıldı ve ölçümler 25-800°C arasında inert atmosfer ortamında alındı (Şekil 4.39). Elde edilen sonuçlara göre yapıda 3 ayrı kütle kaybı olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.39: PANI-nl'in TGA diyagramı.

Bunlardan birincisi 50-110°C arasında gerçekleşen kütle kaybıdır (%10.4) ve numune yüzeyinde adsorbe edilmiş nemin uzaklaşmasından kaynaklanır. İkinci kütle kaybı 200-250°C arasında gerçekleşmiş olup (%13.35), düşük moleküler ağırlıklara sahip elektrolit ve oligomer kalıntısının uzaklaşmasından kaynaklanmaktadır. Üçüncü kütle kaybı ise 460-580°C arasında gözlenmiştir (%28.37). Buradaki kütle kaybı ise PANI'nin termo-oksidatif ayrışmasından kaynaklanmaktadır. TGA grafiğinden elde edilen veriler sonucunda sentezlenen PANI'nin oldukça yüksek termal stabiliteye sahip olduğunu belirlenmiştir [373].

Polimerin morfolojik olarak lifli yapıyı tercih etmesinin nedeni olarak; polimer ve alkol molekülleri arasındaki öncelikli hidrojen bağının varlığı ifade edilebilir. Kısaca, PANI molekülleri ile etanol arasında güçlü bir moleküller arası H-bağı vardır ve bu etkileşim PANI zincirlerinin etanol molekülleri tarafından sarılmasına neden olur. Bu durum polimer zincirlerini birbirinden ayırarak nanofiberlerin büyümesini teşvik eder ve aglomerasyonlarını önler. Ayrıca, alkol amfipatik bir molekül olduğu için, yüzey aktif madde molekülü rolü oynayarak PANI moleküllerini sarar [299].

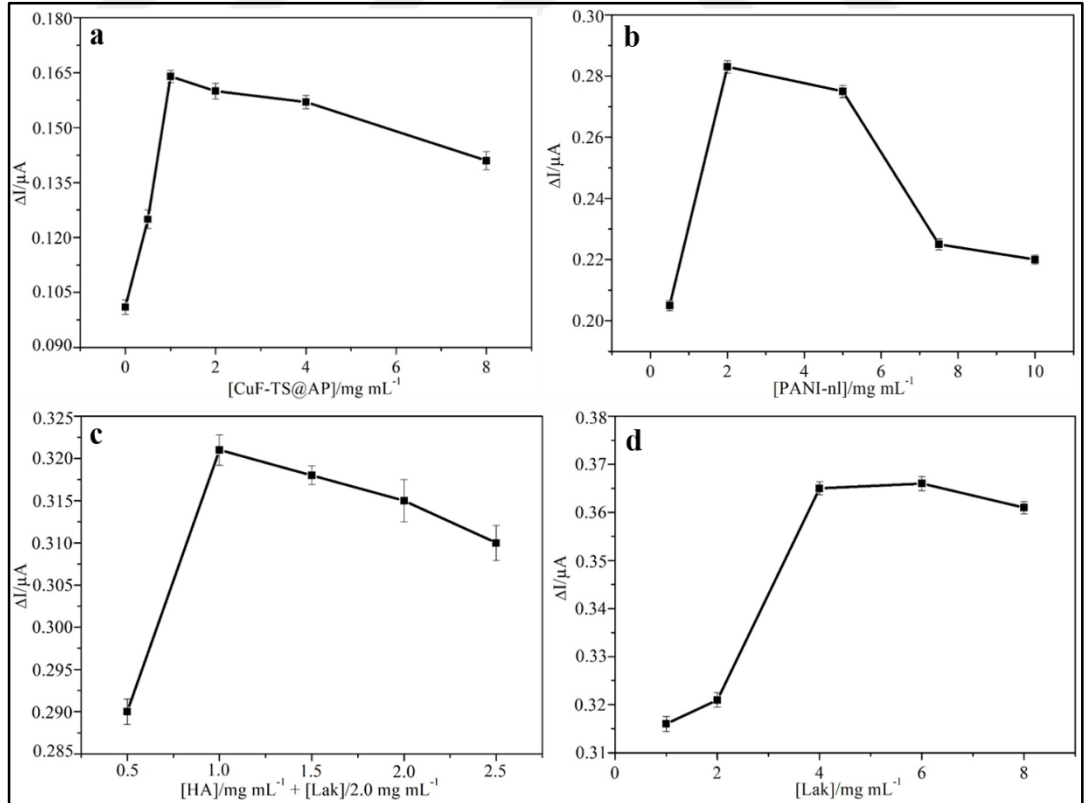


Şekil 4.40: PANI-nl'in SEM görüntüleri; Büyütmeler a) 5000 X, b) 20000 X.

PANI-nl'nin SEM analizi yapılarak morfolojik olarak karakterize edilmiş ve elde edilen görüntüler Şekil 4.40'da verilmiştir. Elde edilen SEM görüntüleri incelendiğinde yapının beklenildiği gibi nano boyutta, lif yapısında olduğu ve porlu bir yüzeye sahip olduğu açıkça gözlenmektedir. Ayrıca oluşan liflerin kalınlıklarının homojen bir dağılımda olduğu belirlenmiştir. Polianilin nanoliflere ait ortalama lif kalınlığı dağılımı ölçümleri için ImageJ programı kullanıldı. SEM görüntüsü üzerinden rastgele seçilen 30 adet lifin kalınlığı ölçüldü ve elde edilen sonuçlara göre ortalama lif kalınlığının yaklaşık 92 nm olduğu hesaplandı.

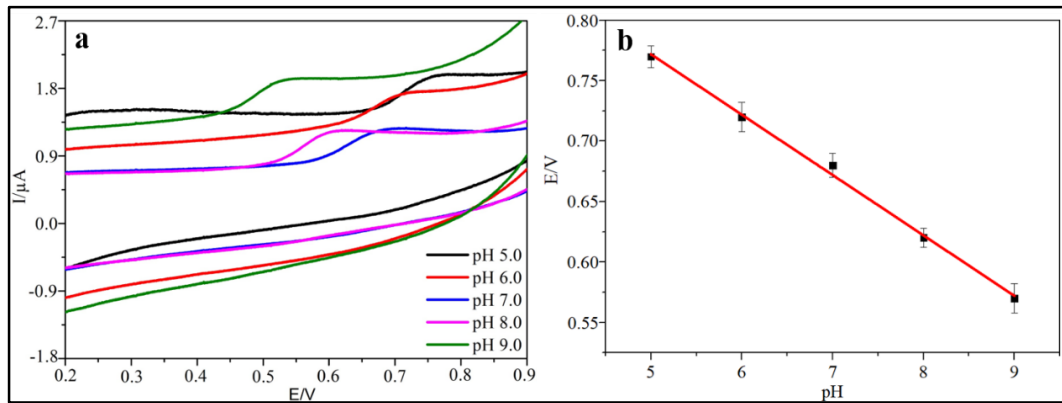
4.4.2. Optimizasyon Çalışmaları

Tasarlanan BPA biyosensörü için deneysel parametrelerin optimizasyonu daha hassas algılamalar için büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle ilk olarak TEOS ve APTES ile modifiye edilen ferrit nanoparçacıklarının elektrokatalitik aktivitesi hakkında bilgi edinmek için CuF-TS@AP miktarı optimizasyonu gerçekleştirildi ve CV ile elde edilen elektrokimyasal sonuçlar (-0.2 ile 1.0 V arasında) modifiye edilmemiş GCE ile karşılaştırıldı (Şekil 4.41a). Optimizasyon için 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 mg mL⁻¹ olmak üzere CuF-TS@AP için 5 farklı konsantrasyon kullanıldı ve en yüksek yanıt 1.0 mg mL⁻¹ CuF-TS@AP varlığında elde edildi. BPA'nın pik akımı GCE'ye kıyasla 1.62 kat artış göstermiştir. Elektrotun duyarlılığını ve iletkenliğini artırmak için kullanılan PANI-nl miktarı, 1.0 mg mL⁻¹ CuF-TS@AP içinde dispers edilmiş PANI-nl (0.5, 2.0, 5.0, 7.5, 10.0 mg mL⁻¹) konsantrasyonları ile optimize edildi. Optimizasyon sonuçlarına göre, en yüksek pik akımı 2.0 mg mL⁻¹ olarak belirlendi ve yalnız GCE'ye göre 1.72, CuF-TS@AP kaplı GCE'ye göre ise 2.8 kat artış gösterdi (Şekil 4.41b).



Şekil 4.41: BPA biyosensörü için kullanılan komponentlerin optimizasyonu; a) CuF-TS@AP, b) PANI-nl, c) HA ve d) Lak konsantrasyonları.

Elektrot yüzeyindeki ince film hidrofilik bir ortam oluşturarak seçiciliği artırabilse de aşırı kullanımda yüzeyi kaplayabilir ve iletken olmayan yüzeyinden dolayı sensör özelliklerini olumsuz etkiler. Bu nedenle HA miktarı önemli bir parametredir ve optimize edilmesi gerekir. Bu amaçla, diğer parametreler sabit tutularak farklı miktarlarda HA konsantrasyonları (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 ve 2.5 mg mL⁻¹) kullanıldı. HA elektrokimyasal açıdan doğrudan bir etkiye sahip olmadığından, ölçümler 2.0 mg mL⁻¹ Lak enzimi varlığında alındı. En yüksek pik akımı, CuF/PANI-nl/Lak'a kıyasla BPA'nın pik akımının 1.13 kat artması nedeniyle 1.0 mg.mL⁻¹ HA konsantrasyonunda gözlenmiştir (Şekil 4.41c). Ayrıca, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 mg mL⁻¹ konsantrasyonlarında Lak enzimi için enzim konsantrasyonunun optimizasyonu da gerçekleştirildi (Şekil 4.41d). BPA'nın pik akımı, optimize edilmiş CuF/PANI-nl/HA/Lak konsantrasyonuna kıyasla 1.14 kat artmıştır. En yüksek pik akımı, 4.0 mg mL⁻¹ Lak için belirlendi ve immobilizasyon süresi tüm ölçümler için gece boyu olarak sabit tutuldu. Tüm ölçümler üç tekrarda yapılmıştır. Son olarak çalışma ortamının pH'ı 5.0-9.0 aralığında optimize edilmiş ve elde edilen en yüksek pik akım değeri nedeniyle optimum pH 7.0 olarak belirlenmiştir. Şekil 4.42a, CuF/PANI-nl/HA/Lak'ın BPA'ya (9.0 µM) karşı CV yanıtlarını gösterirken, potansiyel 100 mV s⁻¹ tarama hızında 0.57'den 0.77 V'a yükselmiştir. Ayrıca, oksidasyon pik potansiyeli pH'daki artışla negatif bölgeye kaydı ve proton ile elektrot arasındaki reaksiyon nedeniyle pik potansiyeli ($E_p = -0.0523\text{pH} + 1.022$, $R^2 = 0.9956$) arasında doğrusal ilişki sağladığı gözlemlendi (Şekil 4.42b). Transfer edilen proton sayısı, 5.0-9.0 pH aralığında elektrot reaksiyonundaki elektron sayısı ile aynı ve BPA için oksidasyon potansiyeli değeri teorik Nernst değerine (59 mV/pH) yakın olan 52 mV civarında olduğu belirlenmiştir [307].

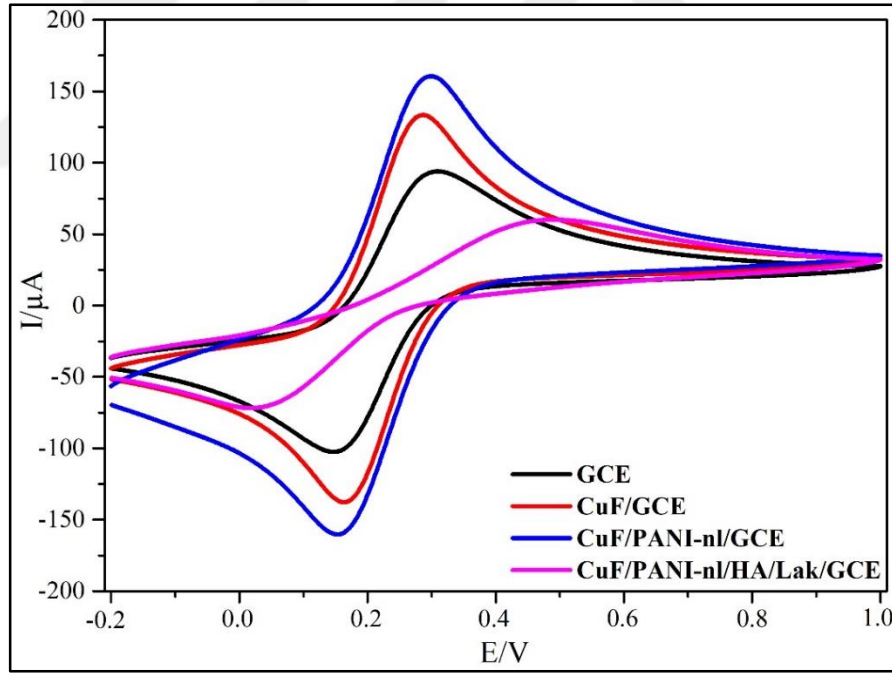


Şekil 4.42: BPA biyosensörü için pH optimizasyonu grafikleri.

pH değerinin elektrokimyasal yöntemle tespit için önemli bir faktör olduğu iyi bilinen bir gerçektir. Literatürde pH değerinin elektrokimyasal davranış üzerindeki etkisini araştırmak için farklı pH değerlerine sahip çözeltilerle BPA'nın tespiti gerçekleştirilmiştir. Kochana ve arkadaşları, BPA tayini için tirozinaz temelli elektrokimyasal bir biyosensör geliştirmişlerdir. Ölçüm ortamı için kullanılan tampon pH'nın biyosensör tepkisi üzerindeki etkisini incelemek için pH 5.0, 6.0, 7.0 ve 8.0'lik PBS içerisinde CV ölçümleri gerçekleştirmişlerdir. Elde ettikleri kalibrasyon eğrisine dayanarak, BPA'ya karşı en yüksek duyarlılığın pH 6.0 PBS kullanılarak elde edildiğini tespit etmişlerdir [374]. Zhang ve arkadaşları, BPA'nın saptanması için CdTe kuantum noktalarıyla modifiye edilmiş çok duvarlı karbon nanotüplere dayanan moleküler baskılı elektrokimyasal bir BPA sensörü geliştirmişlerdir. Optimizasyon çalışmaları için moleküler baskılı polimer konsantrasyonu, pH ve adsorpsiyon süresi çalışılmıştır. pH'nın sensör performansı üzerindeki etkisini analiz etmek için, sırasıyla 4.0-8.0 pH aralığında PBS içerisinde aynı konsantrasyondaki BPA'ya karşı elektrokimyasal ölçümleri alınmış ve pH 7.0'ye ulaştığında mevcut tepki değeri maksimum olduğunu belirlemişlerdir [375]. Tian ve arkadaşları, nanogözenekli PtFe alaşımı ve grafen modifiye camısı karbon elektroduna dayalı elektrokimyasal BPA sensörü geliştirmiş ve pH optimizasyonu ile ilgili detaylı bir çalışma yapmışlardır. CV yönteminde elde ettikleri oksidasyon pik akımları değerleri 0.1M PBS'de pH 3.0-7.0 arasında artış gösterirken pH 7.0-9.0 arasında düşüş olduğunu tespit etmişlerdir. Böylece, oksidasyon pik akımı ile pH değeri arasındaki ilişkiyi değerlendirdiklerinde ve BPA sensörünün hassasiyeti dikkate alındığında pH 7.0'nin oksidasyon pik akımının maksimum yanıt değeri olduğunu açıklamışlardır. Ayrıca, çalışmanın devamında oksidasyon pik potansiyeli (E_{pa}) ve pH değeri arasındaki karşılık gelen ilişkiyi de incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre, oksidasyon pik potansiyeli, pH değerinin artmasıyla doğrusal olarak negatife geçmiş ve regresyon denklemi E_{pa} (V)=-0.051pH+0.852 ($R^2=0.995$) olarak tanımlanmıştır. Burada, 0.051V/pH'lik eğimin teorik değere yaklaştırılarak elektrot reaksiyon sürecinde elektron transferi ve proton sayısının eşit olduğunu yorumuna varılmıştır [376]. Wang ve arkadaşları da MOF-indirgenmiş grafen oksit kompozitlerine dayalı elektrokimyasal BPA sensörü geliştirmiş olup, pH çalışmalarından elde ettikleri veriler ile literatüre göre yakın sonuçlar elde etmişlerdir. DPV ile gerçekleştirdikleri pH optimizasyonunda optimum pH değerini 7.0 olarak tespit etmişler ve pik potansiyelinin de pH arttıkça negatif olarak kayma gösterdiğini gözlemlemişlerdir [377].

4.4.3. BPA Biyosensörünün Elektrokimyasal Performansı

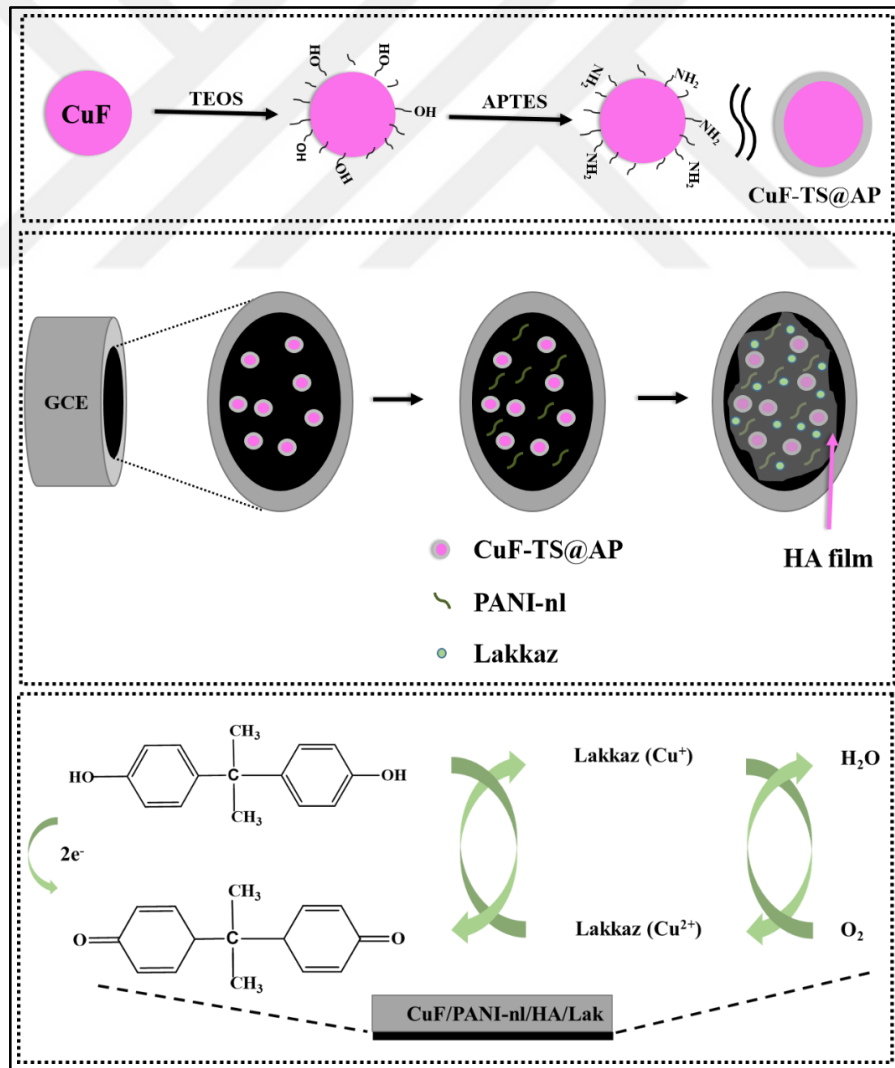
Tez çalışması için tasarlanan enzimatik BPA biyosensörünün elektrot yüzeyinin her modifikasyon adımından sonra elektrokimyasal karakterizasyonu için 0.1 M KCl içeren 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisi içerisinde alınan CV sonuçları değerlendirildi (Şekil 4.43). GCE yüzeyi optimize edilmiş miktarda CuF-TS@AP ile kaplandıktan sonra, iyi bir elektrokatalitik aktivite nedeniyle pik akımında 106 μA 'dan 146 μA 'ya bir artış oldu ve elektrot yüzeyinde elektron transfer kinetiğini önemli ölçüde artırdı. Daha sonra, elektrot yüzeyine PANI-nl'in modifikasyonu ile pik akımı 180 μA 'ya yükseldi. Bununla birlikte, enzim ve HA ile modifiye edilmiş elektrot yüzeyin hesaplanan pik akımının önemli ölçüde azaldığı gözlemlendi ve bu azalmanın enzim molekülünün büyük ve yalıtkan yapısından dolayı elektrot yüzeyinin difüzyonunun bloke edilmesi ve yüzeyin iletken olmayan HA filmi ile kaplanmasından kaynaklandığı düşünülmektedir [378].



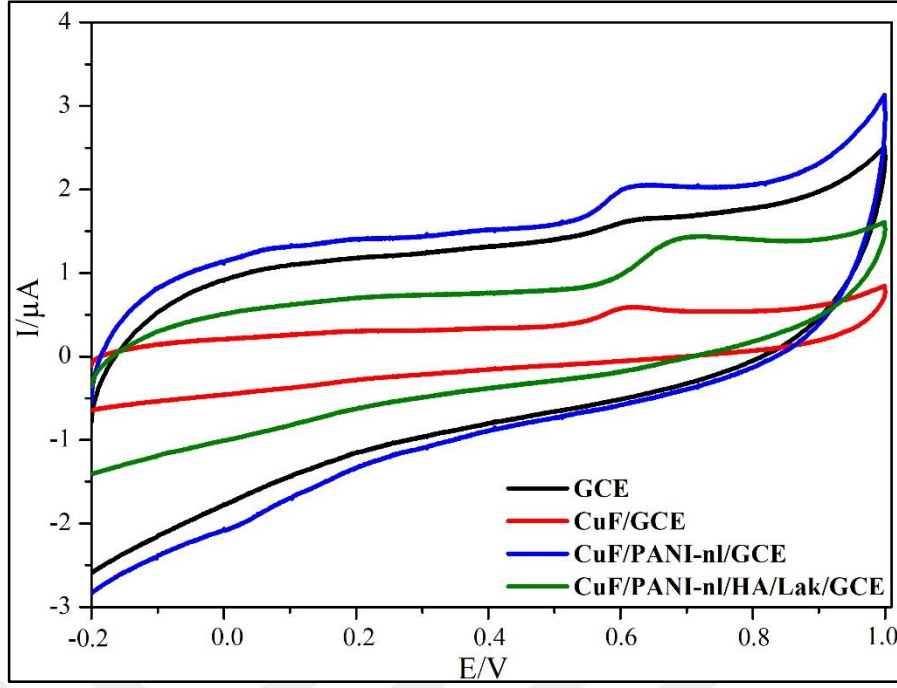
Şekil 4.43: 0.1 M KCl içeren 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisinde alınan CV voltamogramları.

Şekil 4.45 ise 9.0 μM BPA varlığında ve 100 mV s^{-1} tarama hızında GCE, CuF/GCE, CuF/PANI-nl/GCE, CuF/PANI-nl/HA/Lak/GCE'nin CV yanıtlarını göstermektedir. GCE'nin yüzeyi kaplandıktan sonra BPA analitine karşı enzimin

elektrokatalitik aktivitesi nedeniyle CuF/PANI-nl/HA/Lak/GCE elektrotu ile GCE, CuF ve CuF/PANI-nl'ye göre daha hassas elektrokimyasal sonuçlar elde edilmiştir. CuF/PANI-nl/HA/Lak nanokompozit yapısının *o*-kinon elektrokatalizini desteklemek için lakkaz ile sinerjik bir etki yarattığı söylenebilir. Lakkazın, sistemde ek bir kofaktör olmadan elektron transfer reaksiyonunu katalize etme kabiliyetine sahip olması avantajlıdır [136]. Enzimatik mekanizmalarda, enzimin spesifik moleküler fonksiyonlarına göre farklı kimyasal reaksiyonlar meydana gelir. Bu çalışmanın mekanizması şu şekilde açıklanabilir; çoklu bakır polifenol oksidaz olarak bilinen lakkaz, oksijen varlığında elektrot yüzeyinde fenolik bileşiklerin *o*-kinonlara elektrokimyasal olarak oksidasyonunu katalize eder [379]. Aslında, lakkaz redoks aktif merkez sistemi olarak sahip olduğu $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$ ile moleküler oksijeni suya indirger ve bununla birlikte fenollerin oksidasyonunu sağlar (Şekil 4.44) [126].



Şekil 4.44: BPA biyosensörünün hazırlanma aşamaları ve çalışma mekanizması.

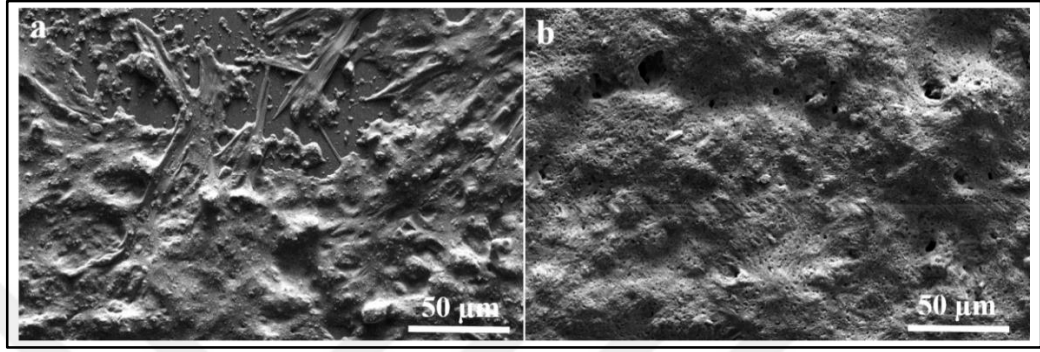


Şekil 4.45: PBS içerisinde 9.0 μM BPA varlığında alınan farklı gruplarının CV voltamogramları (pH 7.0).

Çalışma elektrotu için her bir modifikasyon basamağındaki değişiklikler önemlidir ve bu nedenle elektrotların yüzey karakterizasyonu SEM analizi ile yapıldı ve kıyaslandı. Şekil 4.46a'da gözlemlenen iğnemsli şekilli yapılar PANI-nl ve küresel yapılar ise CuF-TS@AP kaplı elektrot yüzeyini göstermektedir. Şekil 4.46b'de ise hafif gözenekli bir tabaka olmasına rağmen yüzeyin neredeyse tamamen bir film ile kaplandığı görülmüştür. Ayrıca yüzey genel olarak homojendir. Biyolojik bir katalizör olarak enzimler, orta sıcaklık ve basınç, nötr pH gibi koşullar altında reaksiyonları katalize etme avantajını sunar. Bir biyosensörün yapımı sırasındaki en kritik parametrelerden biri biyokatalizörün immobilizasyonudur. Biyokatalizörün verimli bir şekilde immobilizasyonu, fonksiyonel verimliliğinin artmasına yardımcı olur [10]. Bu çalışmada HA'nın biyouyumluluğundan dolayı lakkazın stabilitesinin artırılması amaçlanmıştır. Elektrot yüzeyinin nihai yüzey alanı daha düşük olmasına rağmen, yüzeye kaplanan malzemelerin analite afinitesi nedeniyle BPA varlığında voltamogramda pik akımı önemli ölçüde daha yüksek olduğu tespit edildi.

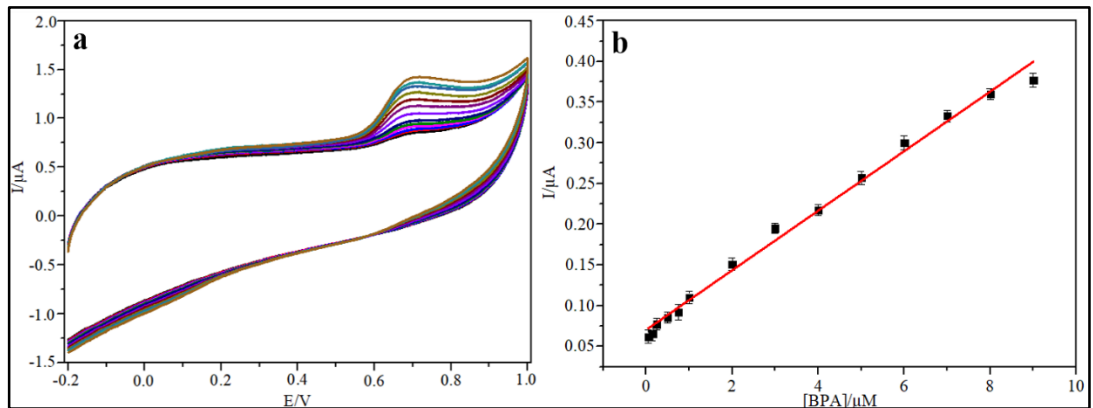
CuF/PANI-nl/HA/Lak/GCE biyosensörünün farklı BPA konsantrasyonlarındaki analitik performansları CV ve DPV yöntemleriyle incelenmiştir. Şekil 4.47a'daki CV voltamogramlarında gösterildiği gibi, pik akım değerleri BPA konsantrasyonundaki artışla doğrusal olarak artmıştır. Ayrıca, BPA konsantrasyonundaki değişiklik ile pik

akım değerleri arasında iyi bir doğrusal ilişki tespit edildi ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.47b'de gösterilmiştir. Grafiğe göre doğrusal regresyon denklemi ise $I(\mu A) = 0.0365C (\mu M) + 0.0702$ ($R^2 = 0.9928$) olarak belirlendi. Enzimatik elektrokimyasal BPA biyosensörü için CV'den hesaplanan değerlere göre TS ve GS sırasıyla 15.6 ve 46.8 nmol L^{-1} olarak tespit edildi.



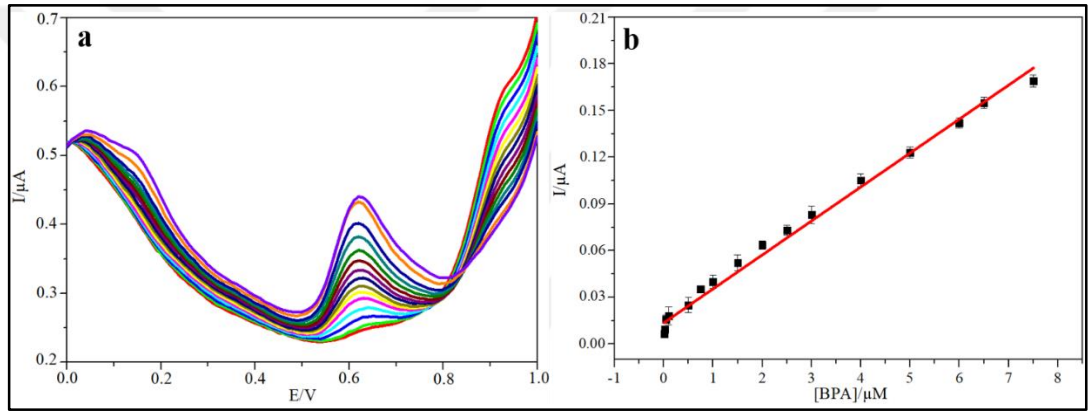
Şekil 4.46: a) CuF/PANI-nl'nin ve b) CuF/PANI-nl/HA/Lak'ın GCE üzerine kaplanmış SEM görüntüleri.

Şekil 4.48a, CuF/PANI-nl/HA/Lak/GCE elektrotu ile alınan DPV yanıtlarını göstermektedir. DPV yöntemine göre biyosensörün doğrusal çalışma aralığı $0.01-7.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Grafiğe göre doğrusal regresyon denklemi ise (Şekil 4.48b) $I(\mu A) = 0.0218C (\mu M) + 0.0136$ ($R^2 = 0.9910$) olarak belirlendi. Enzimatik elektrokimyasal BPA biyosensörü için DPV'den hesaplanan değerlere göre TS ve GS sırasıyla 5.4 ve 16.2 nmol L^{-1} olarak tespit edildi.



Şekil 4.47: a) CuF/PANI-nl/HA/Lak/GCE'de farklı BPA konsantrasyonlarının CV yanıtları, b) BPA akımları ve konsantrasyonları arasındaki doğrusal ilişki.

DPV yönteminden elde edilen elektrokimyasal sonuçların daha hassas olmasının sebebi, DPV’de kapasitif akımın minimizasyonudur. Tablo 4.8’de listelenen enzimatik sistemler göz önüne alındığında, mevcut çalışma daha düşük tespit değeri limiti ile daha iyi bir performans göstermiştir. Enzimatik olmayan sistemler arasında MnP/PANI-PMMA-TiO₂/GCE sensörü 0.2-1.2 nM lineer ölçüm aralığı ile çok dar bir aralıkta çalışmıştır. Mevcut çalışmanın, 0.01-7.50 µM doğrusal ölçüm aralığı ile bu çalışmayı geride bıraktığı açıktır. Bu çalışmada deniz suyu, konserve su, süt gibi gerçek örnek ortamlarda biyosensörün performansı değerlendirilmiştir. HPLC ölçümleri ile doğrulandıktan sonra oldukça iyi geri kazanımlar elde edildiği görülmüştür [380].

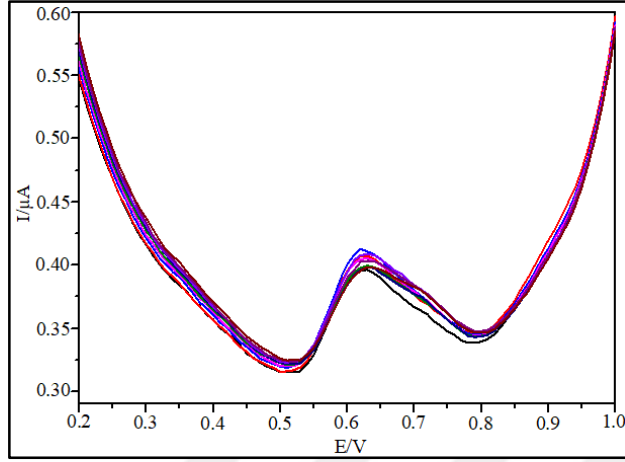


Şekil 4.48: a) CuF/PANI-nl/HA/Lak/GCE’de farklı BPA konsantrasyonlarının DPV yanıtları, b) BPA akımları ve konsantrasyonları arasındaki doğrusal ilişki.

4.4.4. BPA Biyosensörünün Tekrarlanabilirlik, Kararlılık, Yeniden Kullanılabilirlik Testleri

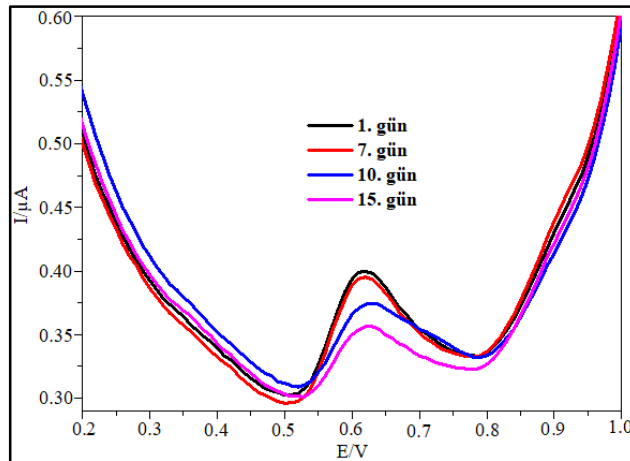
CuF/PANI-nl/HA/Lak/GCE’nin tekrarlanabilirliği, kararlılığı ve tekrar kullanılabilirliği DPV ile incelenmiş olup sonuçlar Şekil 4.49-51’de verilmiştir. Tez kapsamında geliştirilen kompozit sistem ile modifiye edilen GCE elektrotunun tekrarlanabilirliği PBS içinde 2.5 µM BPA konsantrasyonunda 9 ardışık tekrar ölçümü kaydedilerek incelendi. Şekil 4.49’da verilen deney voltamogramları şu şekilde açıklanabilir: Elektrokimyasal ölçüm hücresine pH 7.0’deki PBS çözeltisi eklendi. 2.5 µM BPA eklendikten sonra 9 ardışık ölçüm yapıldı. Bağlı standart sapma ölçümü için uygulanan bu prosedür farklı çalışma elektrotu ile 3 kez tekrarlandı ve sonuç olarak her seferinde yaklaşık olarak aynı değerler elde edildi. Çalışma için % bağlı standart

sapma değeri %3.7 olarak hesaplandı. Bu sonuç, CuF/PANI-nl/HA/Lak/GCE'nin iyi bir tekrarlanabilirliğe sahip olduğunu gösterdi.



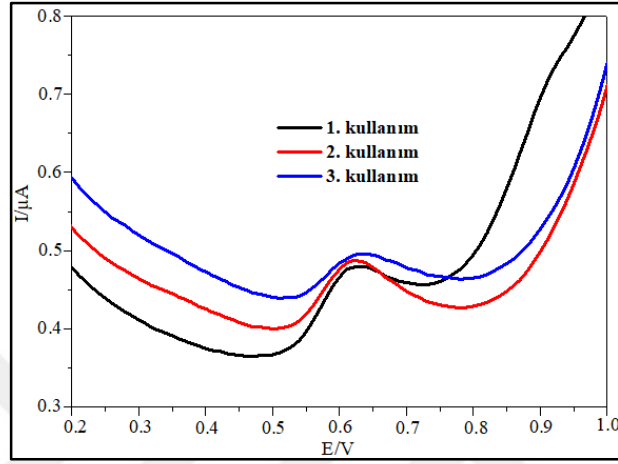
Şekil 4.49: pH 7.0 PBS'de aynı çalışma koşulları altında alınan 9 ardışık ölçüm için DPV voltamogramları.

CuF/PANI-nl/HA/Lak/GCE'nin kararlılığı, 2.5 μ M BPA'nın farklı dönemlerde (1-15 gün) ölçüm ortamına ilavesi yapılarak elektrokimyasal tepkilerinin ölçülmesi yöntemiyle yapıldı. 7 gün sonra ölçülen pik akım değerinin ilk ölçüme göre yaklaşık %5 daha düşük olduğu, mevcut pik akım değerlerinin 10 gün sonra yaklaşık %20, 15 gün sonra ise %40 oranında azaldığı tespit edildi. Sonuçlar, modifiye elektrotun bir hafta içinde daha iyi stabiliteye sahip olduğunu gösterdi. Elde edilen voltamogramlar Şekil 4.50'de verilmiştir.



Şekil 4.50: pH 7.0 PBS ortamında dört farklı zamanda tekrarlanan CuF/PANI-nl/HA/Lak/GCE elektrotlarının DPV voltamogramları.

CuF/PANI-nl/HA/Lak/GCE'nin yeniden kullanılabilirliğini incelemek için ilk olarak 2.5 μ M BPA içeren PBS ortamında DPV ile ölçüm alındı (Şekil 4.51). Ölçüm sonrası elektrot yüzeyi PBS ile yıkandı ve tekrar kullanılmak üzere laboratuvar ortamında tekrar kurutuldu. Bu işlem üç kez tekrarlandı ve her seferinde ilk ölçümle aynı konsantrasyonda BPA için elektrokimyasal ölçüm alındı.



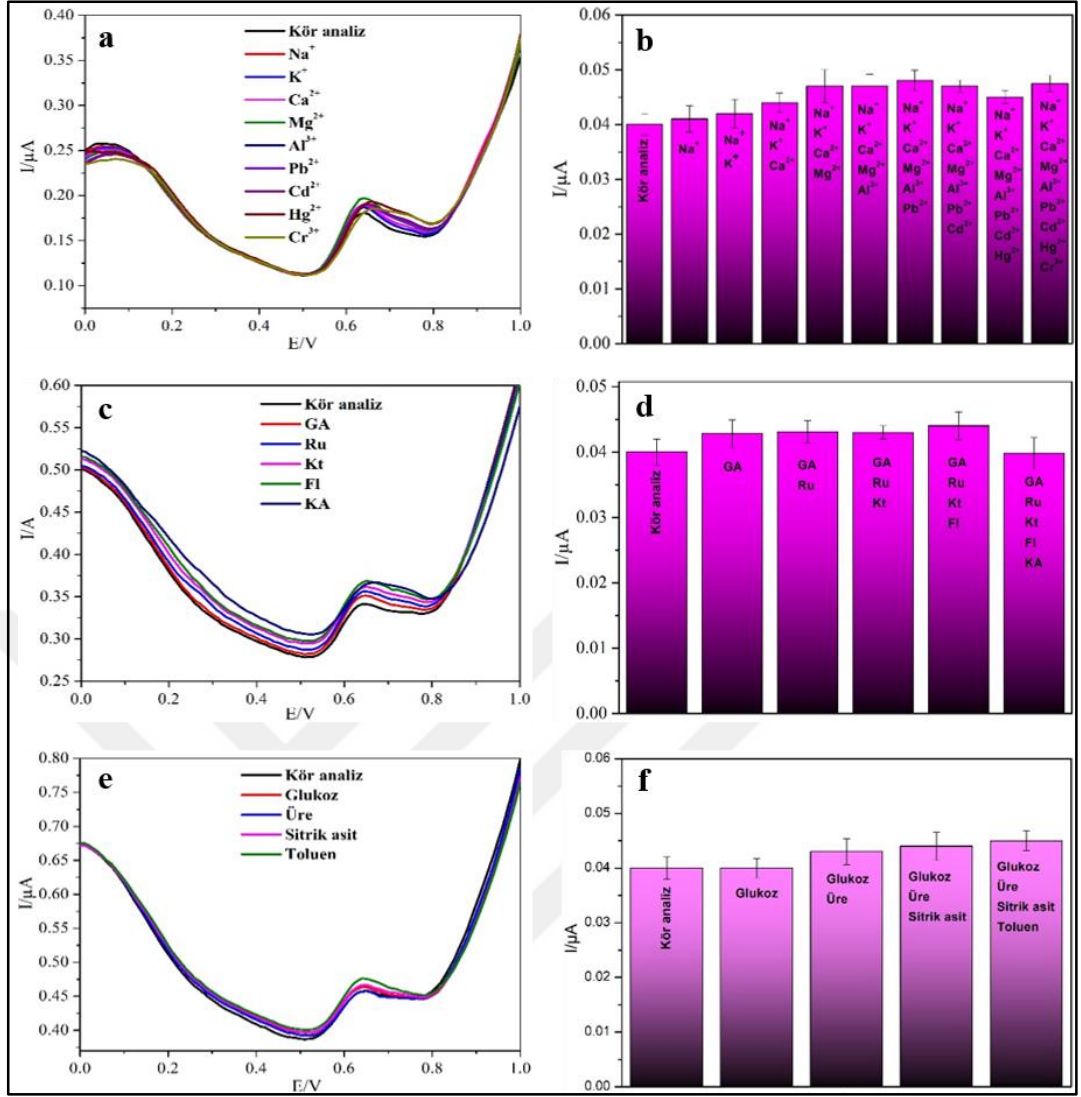
Şekil 4.51: CuF/PANI-nl/HA/Lak/GCE elektrotunun pH 7.0 PBS'de yeniden kullanılabilirlik testlerinde elde edilen DPV voltamogramları.

Pik akımında ikinci kullanımda yaklaşık %4.6 oranında değişiklik oldu ve üçüncü ölçüm sonunda %40 gibi önemli bir düşüş gözlemlendi. Yeniden kullanılabilirlik testinde, çalışma aynı elektrot üzerinde gerçekleştirilmiştir. BPA varlığında DPV ölçümü alındıktan sonra elektrot oda sıcaklığında yıkayıp kurutuldu ve tekrar kullanıldı. Amaç aynı elektrodun kaç kez kullanılabileceğini test etmektir. Yıkama ve kurutma aşamasında yüzey deforme olabilir ve BPA modifiye elektrot yüzeyi gözeneklerden tam olarak temizlenemeyebilir. Bu nedenle 3. ölçümde pik akım değeri %40 azalmıştır. Stabilite testinde tespit edilen tepe akımındaki %40'lık azalma, oda koşullarında bekletme süresinden kaynaklanıyor olabilir. Yani elektrot yüzeyindeki filmin zamanla kademeli olarak bozulması olarak kabul edilir. Literatür çalışmaları incelendiğinde BPA biyosensörleri için ileri analitik parametre özellikleri inceleyen çalışmalar mevcuttur. Razavipanah ve arkadaşları tespiti için çok duvarlı karbon nanotüp-SiO₂@Au çekirdek-kabuk nanokompozitine dayalı elektrokimyasal bir aptasensör geliştirmişlerdir. Aptasensörün stabilitesini 10 nM BPA analitine karşı iki haftalık süre boyunca elektrokimyasal cevaplarına göre incelemişlerdir. Sensörün kullanılmadığında 4°C'de buzdolabında saklandığı ve daha sonra düzenli aralıklarla

BPA ölçümü için kullanıldığı belirtilmiştir. Deneysel sonuçlar, pik akım değerinin iki hafta sonunda başlangıç değerinden yaklaşık %5 düşüşe sahip olduğunu göstermiştir [378]. He ve arkadaşları, BPA tespiti için enzim immobilize edilmiş iletken manyetik biyokömür nanoparçacıkları kullanmışlar ve bu sensör için tekrarlanabilirlik, depolama stabilite özelliklerini incelemişlerdir. Tekrarlanabilirlik çalışmasını pH 7.0 PBS içerisinde 200 nM BPA'nın sekiz tekrarlı ölçümü ile gerçekleştirmişlerdir. Bağlı standart sapmanın %4.2 olduğunu ve mevcut değerde önemli bir değişiklik olmadığı için önerdikleri biyosensörün iyi tekrarlanabilirlik özelliği sergilediğini belirtmişlerdir. Sensörün depolama stabilitesi için 4°C'de PBS çözeltisinde inkübe ettikleri ve 200 nM BPA'ya karşı aldıkları amperometrik yanıtlar ile çalışma yapmışlardır. Sekiz haftalık depolamadan sonrasında sensörün BPA'ya karşı oldukça reaktif olduğunu ve mevcut sinyalde önemli bir değişiklik olmadığını göstermişlerdir [381]. Yu ve arkadaşları da, BPA tespiti için bir sinyal amplifikasyon platformu olarak tek sarmallı DNA-metilen mavisini kullandıkları tek kullanımlık bir elektrokimyasal aptasensör geliştirmişlerdir. Immobilize edilmiş aptamerin yalnızca bir biyotanıma elemanı olarak hareket etmekte kalmayıp aynı zamanda seçiciliği ve hassasiyeti sağladığını ayrıca, tek kullanımlık bir sinyal amplifikasyon platformu olarak davrandığını belirtmişlerdir [382].

4.4.5. BPA Biyosensörünün Seçicilik Analizleri

CuF/PANI-nl/HA/Lak/GCE'nin seçiciliğini incelemek için analiz matrisinde bulunan metal iyonlarının (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Cr^{3+}) elektrokimyasal sinyal değişimi 1.5 μM BPA varlığında değerlendirildi (Şekil 4.52a, b). BPA'nın elektrokimyasal tepkisinin test edilen metal iyonlarının 100 katı eklendikten sonra %5'ten daha az değiştiği tespit edildi. İkinci ve üçüncü seçicilik deneyleri için gallik asit (GA), rutin (Ru), kateşin (Ct), flovanon (Fv), kafeik asit (CA) (Şekil 4.31c, d) ve organik gruplar; glukoz, üre, sitrik asit ve toluen (Şekil 4.52e, f) kullanıldı. DPV ölçümleri, antioksidanlar için 10 kat daha yüksek ve diğer organik bileşikler için 100 kat daha yüksek konsantrasyonların varlığında alınmış ve geliştirilen biyosensörün bu grupların varlığında <%5 değeri ile kabul edilebilir bir seçiciliğe sahip olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.52: CuF/PANI-nl/HA/Lak/GCE biyosensörünün BPA'ya karşı seçicilik testleri; a, b) Katyonlar, c, d) Antioksidanlar, e, f) Organik gruplar.

Lakkaz enziminin fenolik bileşiklere karşı afinitesinin olduğu bilinmesine rağmen tez çalışmasında kullanılan biyosensörün seçicilik analizi için incelenen fenolik antioksidanlara karşı herhangi bir girişime neden olmadığı belirlendi. Bunun nedeni yapılan optimizasyon çalışmalarının BPA analiti için tasarlanmış olmasının yanında bu sistemdeki bileşenler ve ortam pH'ı, antioksidanların yeterli pik akımı göstermesi için uygun olmadığından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Bu antioksidanlar, uygun bileşenleri içeren kompozit sistemlerde nötr pH'ta optimum pik akım değerleri vermesine rağmen, ağırlıklı olarak asidik ortamlarda çalışılmıştır [383]. Mevcut çalışmanın bileşenleri ise asidik ortam için uygun değildir ve nötr pH'ta BPA, diğer moleküllerin girişimini önleyerek yüksek bir pik akım değeri vermiştir.

Seçicilik özelliği sensörler için oldukça önemlidir. Bu nedenle literatür çalışmalarının hemen hepsi bu özellik ile ilgili analizlere yer vermektedirler. Jemmel ve arkadaşları, kobalt ftalosiyanın ile modifiye edilmiş bir karbon pasta elektroduna dayalı seçici BPA sensörü geliştirmişlerdir. Elektrokimyasal sensörün BPA'ya karşı seçiciliğini BPA'nınkinden 100 kat daha yüksek konsantrasyonlarda olan çeşitli girişim yapabilecek maddelerin varlığında incelemişlerdir. Böylece, bazı yaygın fenolik kompleksler ve inorganik iyonlar, BPA tayini ile etkileşim düzeylerini kontrol etmek için test edilmiş olup, sonuçların 100 kat yüksek konsantrasyondaki hidrokinon, fenol, 4-oktilfenol pirokatekol, dopamin ve askorbik asit konsantrasyonunun BPA pik akımları üzerinde önemli bir etkisinin olmadığını göstermişlerdir. Benzer şekilde, 100 kat yüksek konsantrasyondaki K^+ , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ gibi bazı iyonların da BPA sinyalinde önemli bir değişikliğe yol açmadığını tespit etmişlerdir [384]. Geliştirilen sensör için olası girişim yapan ağır metal iyonları ve organik kirleticilerin 5.0 μM BPA içeren ortama eklenmesiyle ve DPV yöntemiyle test etmişlerdir. 500 μM Mn^{2+} , Ag^+ , Cd^{2+} , Cu^{2+} ve Pt^{2+} eklendikten sonra 5.0 μM BPA'nın tüm elektrokimyasal sinyal değişikliklerinin $\leq 5\%$ten daha az olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca, 100 μM nitrobenzen, *p*-klorotoluen, metanol veya *p*-nitroanilin varlığında da BPA'nın elektrokimyasal sinyali üzerinde dikkate değer bir etki olmadığı belirtilmiştir [385]. Tez çalışması kapsamında geliştirilen enzimatik elektrokimyasal BPA biyosensörünün seçicilik çalışmaları sonucunda elde edilen veriler geliştirilen elektrokimyasal yöntemin yüksek konsantrasyonlu girişim yapabilecek türlerin varlığında BPA analizi için literatür ile kıyaslanabilir iyi seçiciliğe sahip olduğunu göstermektedir.

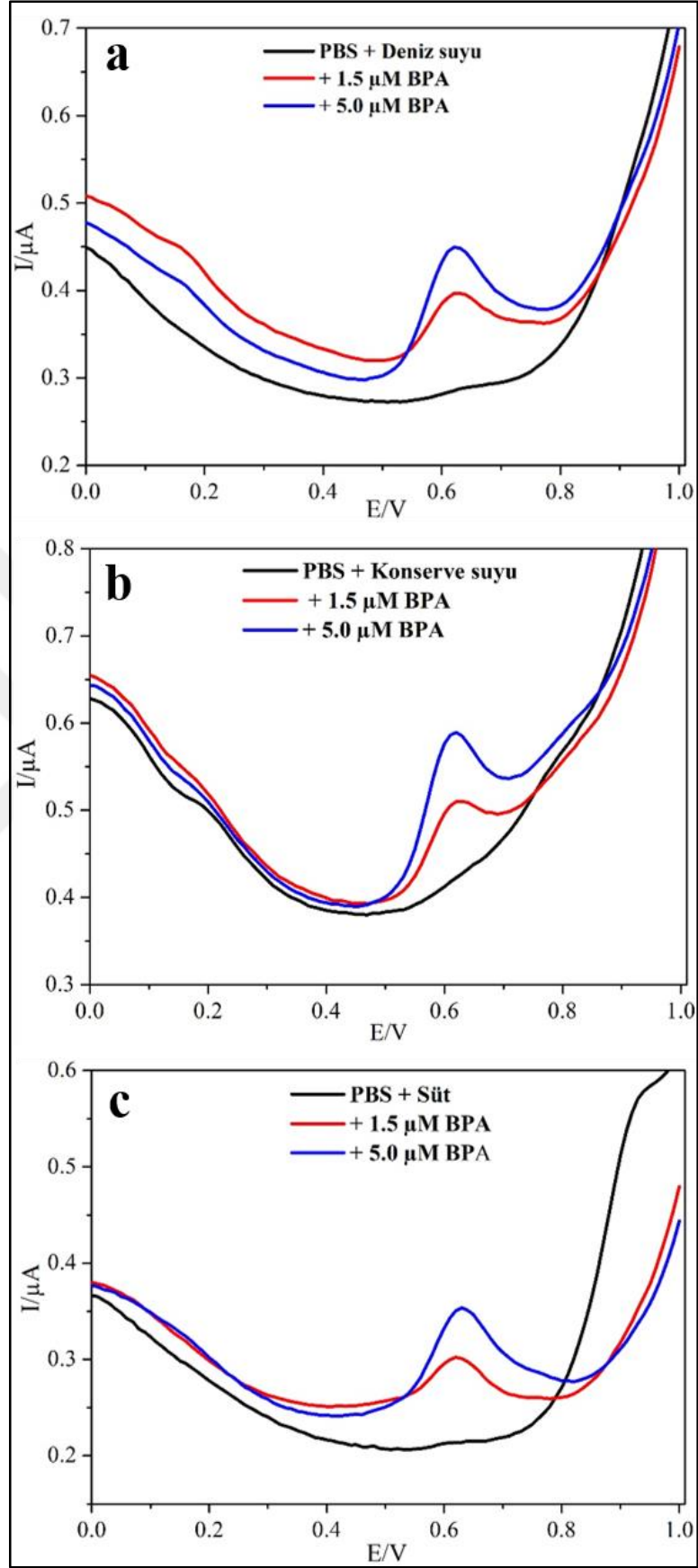
4.4.6. BPA Biyosensörü için Gerçek Örnek ve HPLC Analizleri

BPA, polikarbonat ve epoksi reçinelerin üretiminde kullanıldığı için içme suyu şişeleri, konserve kapları, gıda ambalaj malzemeleri ve içme suyu gibi günlük kullanıma yönelik çeşitli ürünlerde bulunabilmekte ve tüketicilerin gıda yoluyla BPA'ya maruz kalmasına neden olmaktadır. Bu nedenle bu çalışma için deniz suyu, konserve suyu ve süt gerçek örnekleri tercih edilmiş ve elde edilen voltamogramlar Şekil 4.53'de verilmiştir. Tablo 4.9'da sunulan sonuçlar, tüm durumlarda geri kazanımların %96.0 ile %100.7 arasında değiştiğini göstermiştir. Deniz suyu, konserve su ve süt için %BSS değerleri ise %1.81 ile %3.38 aralığında belirlendi.

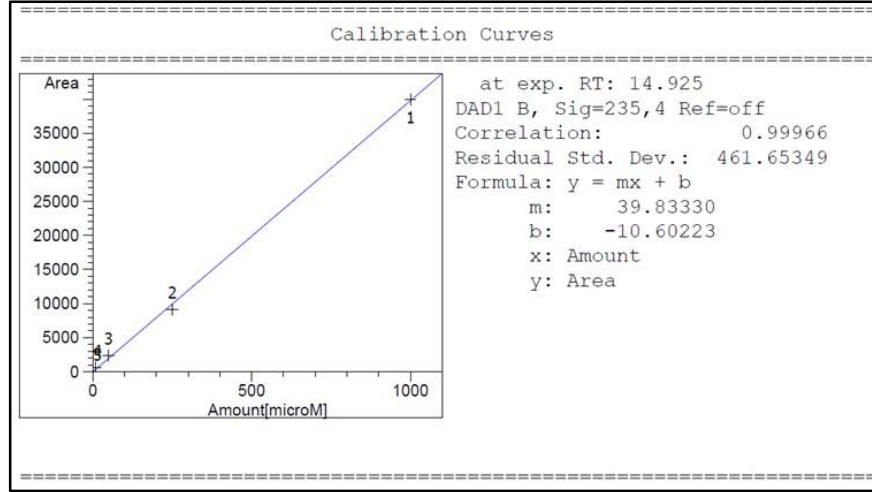
Tablo 4.8: Elektrokimyasal BPA sensörlerinin karşılaştırılması.

Modifiye elektrotlar	TS	Doğrusal ölçüm aralığı	Gerçek örnekler	%Geri kazanım	Kaynaklar
MWCNT/CuFe ₂ O ₄ /GCE	3.2 nM	0.01-120 µM	Su ve biberonlar	95.8-103.1	[386]
CoFe ₂ O ₄ /GCE	3.6 nM	0.05-10 µM	Musluk suyu ve süt örnekleri	95.5-102.0	[387]
NiFe ₂ O ₄ /SPCE	6 nM	0.02-12.5 µM	Siyah ve yeşil çay	96.0-101.0	[388]
GCE/rGO-Fe ₃ O ₄ NP/Chit95/TvL	18.10 nM	2.5x10 ⁻⁵ -0.025 µM	Şişelenmiş su	107.0-124.0	[389]
Lacc/Gr-Au-Chit/SPCE	0.023 µM	0.05-12 µM	Maden suyu şişesi, plastik bardak, mama kabı ve biberon	98.31-102.92	[390]
Laccase-thionine-carbon black	0.2 µM	0.5-50 µM	Metalik kutularda bulunan domates suyu örnekleri	92.0-120.0	[126]
GNPs-MWCNTs-CS/GCE	0.05 nM	0.1-100 µM	Süt örnekleri	85.0-113.8	[391]
Tyrs-rGO/Mn ₃ O ₄ /ITO	10.0 nM	0.01-100 µM	-	-	[392]
MnP/PANI-PMMA-TiO ₂ /GCE	0.17 nM	0.2-1.2 nM	-	-	[380]
Lac/Ag-ZnO/MWCNTs/C-SPE	6.0 nM	0.5-2.99 µM	Plastik şişeler	89.3-111.1	[134]
CuF/PANI-nf/HA/Lacc/GCE	5.4 nM	0.01-7.5 µM	Deniz suyu, konserve su, süt	96.0-100.7	Mevcut çalışma

Çok Duvarlı Karbon Nanotüp (MWCNT), Bakır ferrit (CuFe₂O₄), Camsı karbon elektrot (GCE), Kobalt ferrit (CoFe₂O₄), Nikel ferrit (NiFe₂O₄), Ekran baskılı karbon elektrot (SPCE), İndirgenmiş grafen oksit/demir-ferrit oksit nanoparçacıkları (rGO-Fe₃O₄), Kitosan DD= 95% (Chit95), *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkaz (TvL), Lakkaz (Lacc), Grafenle süslenmiş altın nanopartiküller (Gr-Au), Kitosan (Chit), Grafen nanoplateletler (GNPs), Kitosan (CS), Tirozinaz (Tyrs), Trimangan tetraoksit (Mn₃O₄), İndiyum kalay oksit (ITO), Mangane peroksidaz (MnP), Polianilin (PANI), Polimetil metakrilat (PMMA), Titanyum dioksit (TiO₂).

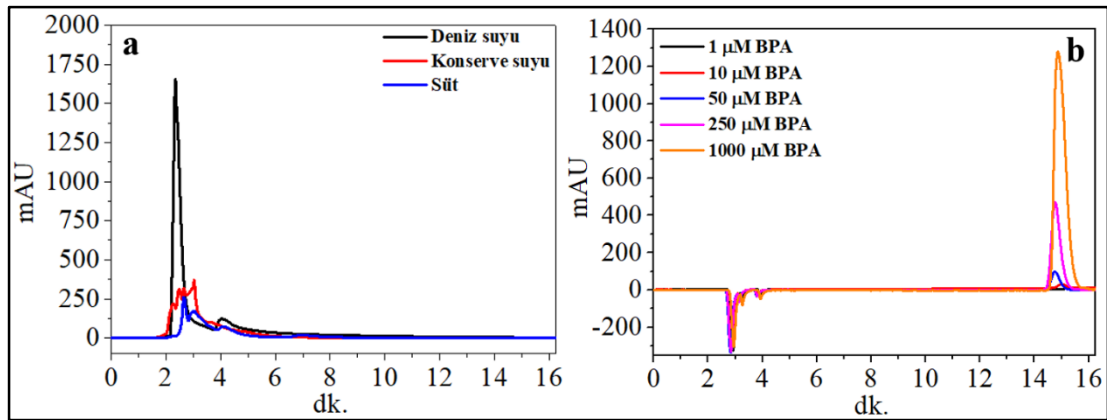


Şekil 4.53: CuF/PANI-nl/HA/Lak/GCE biyosensör elektrotu ile DPV yöntemi kullanılarak a) Deniz suyu, b) Konserve suyu ve c) Süt numunelerinde BPA tayini.



Şekil 4.54: HPLC analizi için BPA kalibrasyon eğrisi.

Elektrokimyasal tayin sonuçlarından da görüldüğü gibi geliştirilen yöntem BPA tespiti için kabul edilebilir bir kesinliğe sahiptir. Ek olarak, mevcut elektrokimyasal yöntemin doğruluğunun daha fazla değerlendirilmesi için BPA analizleri için referans yöntem olarak seçilen gerçek numunelerin HPLC analizleri kullanılmıştır. BPA'nın farklı konsantrasyonlardaki HPLC kromatogramları, Şekil 4.55'de gösterilmektedir. BPA konsantrasyonu, deniz suyu, konserve suyu ve süt örneklerinde tespit limitinin altında olduğu ve ekleme/geri kazanım sonuçları, geliştirilen elektrokimyasal yöntem ile HPLC sonuçları arasında önemli farklılıklar olmadığını gösterdi (Tablo 4.9). Mevcut enzimatik elektrokimyasal biyosensörün (CuF/PANI-nl/HA/Lak/GCE) gerçek numunelerde BPA tayini için başarılı, hassas ve kolay bir şekilde uygulandığı sonucuna varılabilir.



Şekil 4.55: a) Analit içermeyen ve b) Farklı BPA konsantrasyonları içeren HPLC kromatogramları.

Liu ve arkadaşları analitik uygulamalarda BPA tespiti için CoFe_2O_4 modifiye edilmiş camı karbon elektrotunu geliştirmişler ve su ve süt gerçek örneklerindeki performansını değerlendirmek DPV yöntemini uygulamışlardır. Sonuçlara göre, ilk aşamada tüm örneklerde mevcut BPA için elektrokimyasal bir yanıt saptayamamışlardır. Bu nedenle numuneleri optimize edilmiş koşullar altında önerilen standart ekleme yöntemiyle analiz etmiş ve geri kazanım değerlerini %95.5-102.0 arasında tespit etmişlerdir [393]. Başka bir literatür çalışmasında ise Zou ve arkadaşları, BPA'nın süt numunelerinde tespiti için grafen-çok duvarlı karbon nanotüp-kitosan nanoyapısına dayalı bir elektrokimyasal sensör tasarlamışlardır. Bu sensörün BPA'yı gerçek numuneleri iyi doğruluk ve hassasiyetle tespit ettiği ve geri kazanım değerlerinin ise %85-113.8 olduğu bildirilmiştir [391].

Tablo 4.9: Deniz suyu, konserve su ve süt numunelerinde DPV ve HPLC'ye dayalı CuF/PANI-nl/HA/Lak/GCE biyosensörü ile BPA tayini.

Önerilen voltametrik yöntem					HPLC		
Gerçek örnekler	Eklene (µM)	Bulunan (µM) ^a	Geri kazanım (%)	RSD (%)	Bulunan (µM) ^a	Geri kazanım (%)	RSD (%)
Deniz suyu	0	TE	-	-	TE	-	-
	1.50	1.51±0.03	100.7	1.99	1.49±0.05	99.33	3.36
	5.00	4.91±0.11	98.2	2.24	4.97±0.14	99.40	2.82
Konserve suyu	0	TE	-	-	TE	-	-
	1.50	1.48±0.05	98.7	3.38	1.43±0.05	95.33	3.50
	5.00	4.96±0.09	99.2	1.81	4.84±0.16	96.80	3.31
Süt	0	TE	-	-	TE	-	-
	1.50	1.51±0.04	100.7	2.65	1.49±0.03	99.33	2.01
	5.00	4.80±0.12	96.0	2.50	4.90±0.10	98.00	2.04

a: Üç bağımsız ölçümün standart sapması, TE: Tespit edilmedi.

Ferritler genellikle çok yönlü gaz algılama malzemeleri olarak kullanılır ve yüksek hassasiyet, seçicilik ve uzun vadeli kararlılık sunar [394]. Ferrit yapılar, son yıllarda çeşitli analitlerin tespiti için çeşitli kompozit sistemlerin bileşenlerinden biri olarak kullanılmasına rağmen, BPA sensör tasarımlarında çok az ferrit yapısı ile karşılaşılmaktadır [395]. Tablo 4.6'da görüldüğü gibi bu yapılar genel olarak enzimatik

olmayan sistemlerdir [386-388]. Kunene ve arkadaşlarının geliştirdiği enzimatik bir sistem olan BPA biyosensörü ise çok dar bir lineer ölçüm aralığına ve geniş bir geri kazanım yüzdesine sahiptir [134]. Bu çalışmadaki biyosensör ise toksik olmayan bileşenlerle biyoyumlu özellikler göstermiştir. Ayrıca daha düşük TS, daha yüksek tekrarlanabilirlik ve daha iyi seçicilik gibi özelliklerle daha önce bildirilen BPA sensörlerinin çoğundan daha iyi özellikler gösterdi.

Sonuç olarak, bu çalışmada, BPA tespiti için yeni bir bakış açısı olarak CuF/PANI-nl/HA/Lak/GCE tabanlı enzimatik ve biyopolimer temelli bir biyosensör sistemi geliştirilmiştir. Biyosensör deniz suyu, konserve su ve süt numunelerinde BPA'nın oldukça seçici, hassas, kolay ve hızlı tayini için hassas bir etki sağlamış ve %96.0'dan %100.7'ye kadar analitik geri kazanımlar elde edildiğini göstermiştir. Ayrıca, mevcut çalışma için sonuçların doğruluğu HPLC ile doğrulanmıştır.

5. SONUÇLAR

Biyosensör alanındaki hızlı ilerlemelere rağmen elde edilen çıktıların çok küçük bir kısmı ticari olarak karşılık bulmaktadır. Son yıllarda enzim ve malzeme kombinasyonlarını inceleyen çok sayıda yayınlanmış çalışma bulunmasına rağmen çok az biyocihazın ticari olarak uygulanabilir olduğu literatürde belirtilmiştir. Ticari olarak en yaygın bilinen ürün glukoz oksidaz veya glukoz dehidrojenaz enzimlerini içeren glukoz biyosensörüdür. Bu ürünün küresel biyosensör pazarının %75'inden fazlasına hâkim olduğu ve 2027 yılına kadar 38 milyar dolarlık bir pazara sahip olmasının beklediği tahmin edilmektedir [396].

Mevcut sorunların aşılması ve biyosensör alanında daha fazla ticari ürün çıkabilmesi için pek çok yaklaşım yapılmış olup, bunlar ağırlıklı olarak; enzimlerin aktif bölgelerindeki mekanizmaların değerlendirilmesi için yerinde/operando tekniklerinin keşfi/geliştirilmesi, spesifik olmayan etkileşim sorunlarını ele almak için işlevselleştirme yoluyla daha etkili arayüzlerin tasarlanması, biyolojik tanıma elemanının, özellikle enzimlerin kararlılığının artırılması, karmaşık matrise sahip vücut sıvıları olan kan, idrar ve tükürük gibi ortamlarda biyosensörlerin performansının geliştirilmesi olarak açıklanmaktadır [396]. Enzimatik biyosensörler ele alındığında, hızlı aktivite kaybı ve gerçek numunelerdeki biyolojik kirlenme iki yaygın sorunu temsil etmektedir. Bunun için immobilize edilmiş enzimlerin inhibitör moleküllerden nasıl etkilenebileceğini ve immobilizasyon yöntemlerinin algılama performansını nasıl etkilediği hakkında detaylı araştırmalar yapılmaktadır [397]. Ayrıca, enzimlerin ve destek malzemelerinin nasıl etkileşime girdiği ve dolayısıyla bunun immobilize enzimlerin özelliklerini nasıl etkileyebileceği konusunda birçok tema hâla tam olarak anlaşılammıştır. Aslında, bazı durumlarda, belirli koşullar altında bir enzim için pozitif olan bir etkileşim başka koşullar altında negatif özellikler sergileyebilir [50]. Yeni immobilizasyon protokolleri tasarlama zorunluluğunun yanı sıra, günümüzde araştırılması gereken öneme sahip birkaç yeni bilimsel konu da vardır. Karbon temelli nanomalzemelerin, nanoparçacıkların ve hidrojellerin kullanımının tam olarak olmasa da bu sorunların üstesinden gelmek için iyileştirici özellikler sergilediği gözlemlenmiştir. Ayrıca, araştırmacılar, enzimlerin düşük kararlılığına karşı avantajlı yapılar üzerine odaklanmakta ve gelecekteki çalışmaların

tasarımında moleküler baskılı polimerler, mikro/nanokanallar ve nanozimlerin avantaj sağlayacağı yönünde umut vadettiklerini vurgulamaktadırlar [396].

Son yıllarda, biyosensör sistemlerine nanomalzemelerin entegre edilmesi biyoalgılama üzerinde büyük bir gelişmeye sebep olmuştur. İşlevselleştirilmiş nanomalzemeler, yeni nesil biyoelektronik cihazların tasarımında biyolojik tanıma proseslerini geliştirmek amacıyla iyi arayüz özelliği sergilemek için beklentileri nispeten karşılamaktadır [398]. Elektrotlar veya elektrokatalizörler olarak nanomalzemelerin kullanıldığı elektriksel tekniklerin daha yüksek hassasiyet ve daha düşük algılama limitleri gösterdiği iyi bilinmektedir. Nanomalzemelerin çeşitli biyoalgılama sistemleri ve iletişim teknolojileri ile sinerjisi, teşhis alanındaki uygulamalar için Dünya Sağlık Örgütü tarafından belirtilen kriterleri (uygun fiyatlı, hassas, spesifik, kullanıcı dostu, hızlı ve sağlam, ekipmansız ve son kullanıcılara teslim edilebilir) yerine getirmek üzere araştırma laboratuvarlarından geliştirilebilen yenilikçi bakım noktası (point-of-care, PoC) sistemlerini ortaya çıkarmak için önemli olduğu belirtilmiştir [399].

Biyosensör tasarımında diğer bir önemli husus, biyotanıma ünitesi ile analit arasındaki etkileşimin verimli bir şekilde kullanılmasıdır. Bu durum, biyotanıma elemanının sensör ara yüzüne etkili bir şekilde immobilizasyonunu gerektirir. Biyosensörlerde kullanılan fonksiyonel materyallerin çoğu, biyotanıma elemanını korumak için gerekli biyoyumluluktan yoksundur. Biyopolimerler ise biyoyumluluk sağlamak için bu fonksiyonel malzemelerle kolayca kompozit oluşturabilir. Biyopolimerler, son yıllarda bu malzemelerdeki artan bilimsel ve teknolojik ilgiden dolayı biyosensör gelişimi alanında dikkat çekmektedir. Biyopolimer temelli biyoanalitik cihazların gelişimi, biyopolimer temelli malzeme sentezindeki ilerlemenin ve çeşitli biyosensör konfigürasyonlarının üretimindeki teknolojik ilerlemeden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, biyosensör materyalinin, biyotanıma ünitesinin aktivitesini korumak için iyi biyoyumluluğa sahip olması gerekir. Biyopolimerler doğal kökenleri ve canlı sistemler ile olumlu etkileşimleri nedeniyle oldukça ümit vericidir. Biyopolimerler, yukarıda belirtilen ön koşulların çoğunu karşılayan ve bu nedenle biyosensörlerin geliştirilmesinde geniş bir uygulama alanı bulabilen bir malzeme sınıfıdır [10].

Tez çalışmasında, biyosensör çalışma alanındaki zorluklar ve bu zorlukların üstesinden gelme önerileri göz önünde bulundurularak nanoparçacık içeren biyopolimer temelli elektrokimyasal enzimatik biyosensörler geliştirilmiştir. Burada

hedef analit olarak üre ve BPA tercih edilmiş olup, asıl amaç farklı geçiş metallerine sahip ferrit nanoparçacıklarının ve çözünebilirlik açısından farklılık gösteren biyopolimerlerin biyosensör sistemine olan katkılarının ve kısıtlamalarının incelenmesidir. Tez çalışması dört basamaktan oluşmaktadır. Bunlar; (i) ferrit nanoparçacıklarının sentezlenmesi ve organosilanlar ile yüzey modifikasyonu, (ii) üre biyosensörü için dört farklı ferrit nanoparçacıklarının elektrokimyasal katkısının incelenmesi, (iii) optimize edilen üre biyosensörü kompozit sistemine jelatin ve nanokristalin biyopolimerlerinin eklenmesi ile üre analitine karşı biyosensör performansının incelenmesi ve (iv) üre biyosensöründe en iyi performansı gösteren bakır ferritin BPA analitine karşı lakkaz immobilize edilmiş PANI-nl ve hyaluronik asit içeren kompozit sistem ile elektrokimyasal özelliklerinin incelenmesi basamaklarını içermektedir.

İlk olarak CuFe_2O_4 , CoFe_2O_4 , NiFe_2O_4 ve ZnFe_2O_4 nanoparçacıkları birlikte çöktürme yöntemi ile sentezlendi. Her biri için üç farklı kalsinasyon sıcaklığı ($500\text{ }^\circ\text{C}$, $750\text{ }^\circ\text{C}$, $1000\text{ }^\circ\text{C}$) uygulanarak kalsinasyon sıcaklığının nanoparçacıklar üzerine olan etkisi FTIR, XRD, TGA, SEM karakterizasyonları ile incelendi. Tüm karakterizasyonlar değerlendirildiğinde $750\text{ }^\circ\text{C}$ optimum kalsinasyon sıcaklığı olarak tespit edildi. Bu aşamadan sonraki organosilanlar ile modifikasyon çalışmalarına dört adet ferrit nanoparçacığın $750\text{ }^\circ\text{C}$ 'de kalsine edilmiş grupları (CuF-750, CoF-750, NiF-750, ZnF-750) ile devam edildi. Böylece nanopartiküllerin yüzeyleri $-\text{NH}_2$ fonksiyonlandırılması ile enzim immobilizasyonuna hazır hale getirildi. Yüzeyleri TEOS ve APTES ile modifiye edilen gruplar FTIR, UV-Vis absorpsiyonu, SEM, TEM, parçacık boyutu ve BET analizleri ile karakterize edildi.

Çalışmanın ikinci basamağında modifikasyonun sonunda elde edilen CuF-TS@AP, CoF-TS@AP, NiF-TS@AP, ZnF-TS@AP gruplarının her biri üre analitinin tespiti için PANI/Nf kompozitine ilave edildi ve elektrot yüzeyine Urs enzimi immobilizasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen Nf/PANI/CuF/Urs, Nf/PANI/CoF/Urs, Nf/PANI/NiF/Urs, Nf/PANI/ZnF/Urs elektrotları elektrokimyasal yöntemler olan CV ve DPV ile incelendi. Sentezlenen dört ferrit grubundan elde edilen sonuçların beklenildiği gibi elektrokimyasal yöntemle üre tespiti için umut verici olduğunu gösterdi. Ayrıca, pik akım değerlerinin ferrit nanoparçacıklarını içermeyen PANI/Nf sistemine kıyasla önemli ölçüde iyileştiği tespit edildi. Bu değerler PANI/Nf sistemine göre CuF, CoF, NiF ve ZnF içeren elektrot yüzeylerinde sırasıyla, 7 kat, 6 kat, 3 kat ve 2 kat olarak hesaplanmıştır. Ürenin elektrokimyasal tespiti için en iyi performansı

en düşük bant aralığı değerine sahip olan bakır ferrit nanopartikülleri içeren kompozit sistemin (Nf/PANI/CuF/Urs) gösterdiği ve biyosensör performansını önemli ölçüde arttırdığı belirlendi. Yapılan tekrarlanabilirlik, yeniden kullanılabilirlik, seçicilik ve gerçek numune (toprak ve süt) analizlerinin sonuçlarından elde edilen verilere göre tez çalışması kapsamında tasarlanan biyosensörün hassas, kararlı, seçici ve gerçek örnek ortamlarında doğru sonuç verdiği tespit edildi. DPV yöntemiyle üre tespiti için 0.17 μM 'lik bir TS ve 0.5–45.0 μM 'lik geniş bir doğrusal ölçüm aralığı belirlendi. Ayrıca gerçek örnek analizlerinde % geri kazanım değerleri %97.0 ve %104.43 olarak hesaplanmıştır. Yeni tasarlanan elektrokimyasal biyosensörün (Nf/PANI/CuF/Urs) gerçek numunelerde yüksek doğrulukta üre tayini için geçerli olduğu söylenebilir. Sonuç olarak, ferrit nanoparçacıklarını içeren biyosensörün iyi elektrokimyasal özellikleri sayesinde, enzimatik tayin için yeni tasarımların perspektifine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

Çalışmanın üçüncü basamağında TS, GS, doğrusal ölçüm aralığı ve diğer ileri sensör parametreleri belirlenmiş olan Nf/PANI/CuF/Urs sistemine jelatin ve nanokristalin selüloz biyopolimerleri ilave edilmiştir. Genel olarak bakıldığında sisteme biyopolimer ilave edilmesinin doğrusal çalışma aralığını daralttığı sonucuna ulaşılmıştır. Bu aralık jelatin içeren biyopolimer sistemi için 0.2-5.0 μM ve nanokristalin selüloz için ise 0.2-10.0 μM olarak hesaplandı. Ancak, düşük analit konsantrasyonu olan ortamda her iki biyopolimerde daha hassas elektrokimyasal sonuç vermiş olup, TS değerleri jelatin ve nanokristalin selüloz içeren sistem için sırasıyla 64.0 nM ve 75.0 nM olarak belirlenmiştir. Ayrıca biyopolimer ilavesi biyosensörün kullanım ömrünü artırmıştır. Bu durumun biyopolimer kullanımı ile enzimin stabilitesinin daha uzun süre korunabildiğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yapılan tekrarlanabilirlik, yeniden kullanılabilirlik, seçicilik ve gerçek örnek analizlerinin sonuçlarından elde edilen verilere göre biyopolimer içermeyen sisteme göre önemli bir farklılık olmadığı ve iyi bir performansa sahip olduğu tespit edilmiştir. Gerçek örnek analizlerinde % geri kazanım değerleri jelatin içeren sistem için %96.5 ve %102.4 nanokristalin selüloz içeren sistem için ise olarak %95.5 ve %103.7 olarak hesaplanmıştır.

Çalışmanın son kısmı olan dördüncü basamağında BPA tayini için yeni bir enzimatik elektrokimyasal biyosensör (CuF/PANI-nl/HA/Lak/GCE) tasarlanmıştır. Bu biyosensörün elektrokimyasal performanslarını değerlendirmek için CV ve DPV voltametrileri kullanıldı ve 0.01-7.50 μM doğrusal çalışma aralığında TS değeri 5.40

nM ve GS değeri ise 16.20 nM olarak tespit edildi. Sunulan yeni biyosensör sistemi, düşük tespit limiti, yüksek hassasiyet ve seçicilik açısından iyi bir performansa sahip olduğu gözlemlendi. Yapılan tekrarlanabilirlik, kararlılık, yeniden kullanılabilirlik ve seçicilik analizlerinin sonuçlarından elde edilen verilere göre tez çalışması kapsamında tasarlanan biyosensörün hassas, kararlı, seçici özellikler sergilediği tespit edildi. Biyosensörün gerçek örnek analizleri ise %96.0 ile %100.7 arasında değişen geri kazanımlarla deniz suyu, konserve su ve süt numunelerinde BPA tayini için başarıyla uygulandı. Ayrıca voltametrik belirleme yönteminin gerçek numunelerdeki doğruluğu HPLC ve spike/geri kazanım testi ile çalışıldı. Tasarlanan CuF/PANI-nl/HA/Lak/GCE biyosensörünü hem BPA tayini hem de enzimatik elektrokimyasal biyosensörlerin yapısında biyopolimer kullanımı konusunda yeni bir bakış açısı sağladığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak, tez çalışması kapsamında yapılan tüm biyosensör analizleri değerlendirildiğinde elektrot yüzeyinde yer alan kompozit sistemde nanoparçacıkların yer almasının analitik performansı arttırdığı belirlenmiştir. Yalnızca ferrit nanoparçacıkları arasında yapılan kıyaslamaya göre bant aralığı daha düşük olan bakır ferrit daha yüksek biyosensör performansı sergilemiştir. Elbette farklı morfoloji ve boyutlardaki nanoparçacıklar farklı davranışlar sergileyebilir. Ayrıca, kompozit sisteme biyopolimer ilavesinin elektrot yüzeyinin analite karşı afinitesini arttırdığı tespit edilmiştir. Farklı biyopolimerlerin köpük, jel, lif vb. gibi farklı formlarda pek çok analitin elektrokimyasal tespitine ve kullanım ömrüne katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Daha farklı nanoparçacıkların ve biyopolimerin biyosensör platformunda incelenmesi ile elde edilen bilgiler ışığında ticari alanda yer bulabilecek biyosensörlerin tasarlanması daha mümkün olacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Bhalla N., Jolly P., Formisano N., Estrela P., (2016), "Introduction to biosensors", *Essays Biochem*, 60 (1), 1-8.
- [2] Turner A. P. F., (2013), "Biosensors: sense and sensibility", *Chemical Society Reviews*, 42 (8), 3184-3196.
- [3] Luong J. H. T., Male K. B., Glennon J. D., (2008), "Biosensor technology: technology push versus market pull", *Biotechnology Advances*, 26 (5), 492-500.
- [4] Bahadır E. B., Sezgentürk M. K., (2015), "Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and biothreat/biowarfare analyses", *Analytical Biochemistry*, 478, 107-120.
- [5] Malhotra B. D., Chaubey A., (2003), "Biosensors for clinical diagnostics industry", *Sensors and Actuators B: Chemical*, 91 (1-3), 117-127.
- [6] Thakur M. S., Ragavan K. V., (2013), "Biosensors in food processing", *Journal of Food Science and Technology*, 50 (4), 625-641.
- [7] Mehrotra P., (2016), "Biosensors and their applications - A review", *J Oral Biol Craniofac Res*, 6 (2), 153-9.
- [8] Di Lorenzo M., (2016), "Use of microbial fuel cells in sensors", *Microbial Electrochemical and Fuel Cells*, 341-356.
- [9] Ronkainen N. J., Halsall H. B., Heineman W. R., (2010), "Electrochemical biosensors", *Chemical Society Reviews*, 39 (5), 1747-1763.
- [10] Sawant S. N., (2017), "Development of biosensors from biopolymer composites". In: Sadasivuni K. K., Ponnamma D., Kim J., Cabibihan J. J., AlMaadeed M. A., "Biopolymer composites in electronics", Elsevier.
- [11] Jeevanandam J., Barhoum A., Chan Y. S., Dufresne A., Danquah M. K., (2018), "Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations", *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 9 (1), 1050-1074.
- [12] Holzinger M., Le Goff A., Cosnier S., (2014), "Nanomaterials for biosensing applications: a review", *Frontiers in Chemistry*, 2, 63.
- [13] Chen Y. T., Kolhatkar A. G., Zenasni O., Xu S., Lee T. R., (2017), "Biosensing using magnetic particle detection techniques", *Sensors*, 17 (10), 2300.
- [14] Haun J. B., Yoon T. J., Lee H., Weissleder R., (2010), "Magnetic nanoparticle biosensors", *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2 (3), 291-304.

- [15] Rocha-Santos T. A. P., (2014), "Sensors and biosensors based on magnetic nanoparticles", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 62, 28-36.
- [16] Li G., Xiao F., Liao S., Chen Q., Zhou J., Wu Z., Yu R., (2018), "Label-free 2D colloidal photonic crystal hydrogel biosensor for urea and urease inhibitor", *Sensors and Actuators B: Chemical*, 277, 591-597.
- [17] Senel M., Dervisevic M., Voelcker N. H., (2019), "Gold microneedles fabricated by casting of gold ink used for urea sensing", *Materials Letters*, 243, 50-53.
- [18] Alizadeh T., Ganjali M. R., Rafiei F., (2017), "Trace level and highly selective determination of urea in various real samples based upon voltammetric analysis of diacetylmonoxime-urea reaction product on the carbon nanotube/carbon paste electrode", *Analytica Chimica Acta*, 974, 54-62.
- [19] Kim M., Song Y. E., Xiong J. Q., Kim K. Y., Jang M., Jeon B. H., Kim J. R., (2021), "Electrochemical detection and simultaneous removal of endocrine disruptor, bisphenol A using a carbon felt electrode", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 880, 114907.
- [20] Zhang Y., Lei Y., Lu H., Shi L., Wang P., Ali Z., Li J. J. F. C., (2021), "Electrochemical detection of bisphenols in food: A review", *Food Chemistry*, 346, 128895.
- [21] Yogeswaran U., Chen S. M., (2008), "A review on the electrochemical sensors and biosensors composed of nanowires as sensing material", *Sensors*, 8 (1), 290-313.
- [22] Haleem A., Javaid M., Singh R.P., Suman R., Rab S., (2021), "Biosensors applications in medical field: a brief review", *Sensors International*, 2, 100100.
- [23] Karunakaran C., Rajkumar R., Bhargava K., (2015) "Introduction to biosensors", In: Karunakaran C., Bhargava K., Benjamin R., "Biosensors and bioelectronics", Elsevier.
- [24] Thévenot D. R., Toth K., Durst R. A., Wilson G. S., (2001), "Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification", *Biosensors and Bioelectronics*, 16 (1-2), 121-131.
- [25] Du Y., Dong S., (2017), "Nucleic acid biosensors: recent advances and perspectives", *Analytical Chemistry*, 89 (1), 189-215.
- [26] Xu B., Zheng D., Qiu W., Gao F., Jiang S., Wang Q., (2015), "An ultrasensitive DNA biosensor based on covalent immobilization of probe DNA on fern leaf-like α -Fe₂O₃ and chitosan hybrid film using terephthalaldehyde as arm-linker", *Biosensors and Bioelectronics*, 72, 175-181.

- [27] Huo B., Hu Y., Gao,Z., Li G., (2021), “Recent advances on functional nucleic acid-based biosensors for detection of food contaminants”, *Talanta*, 222, 121565.
- [28] Tortolini C., Bollella P., Antonelli M. L., Antiochia R., Mazzei F., Favero G., (2015), “DNA-based biosensors for Hg²⁺ determination by polythymine–methylene blue modified electrodes”, *Biosensors and Bioelectronics*, 67, 524-531.
- [29] Saeed A. A., Sánchez J. L. A., O'Sullivan C. K., Abbas M. N., (2017), “DNA biosensors based on gold nanoparticles-modified graphene oxide for the detection of breast cancer biomarkers for early diagnosis”, *Bioelectrochemistry*, 118, 91-99.
- [30] Daneshpour M., Izadi P., Omidfar K., (2016), “Femtomolar level detection of RASSF1A tumor suppressor gene methylation by electrochemical nanogenosensor based on Fe₃O₄/TMC/Au nanocomposite and PT-modified electrode”, *Biosensors and Bioelectronics*, 77, 1095-1103.
- [31] Roohizadeh A., Ghaffarinejad A., Salahandish R., Omidinia E., (2020), “Label-free RNA-based electrochemical nanobiosensor for detection of Hepatitis C”, *Current Research in Biotechnology*, 2, 187-192.
- [32] Song S., Wang L., Li J., Fan,C., Zhao J., (2008), “Aptamer-based biosensors”, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27 (2), 108-117.
- [33] Abrego-Martinez J. C., Jafari M., Chergui S., Pavel C., Che D., Siaj M., (2022), “Aptamer-based electrochemical biosensor for rapid detection of SARS-CoV-2: Nanoscale electrode-aptamer-SARS-CoV-2 imaging by photo-induced force microscopy”, *Biosensors and Bioelectronics*, 195, 113595.
- [34] Kivrak E., Ince-Yardimci A., Ilhan R., Kirmizibayrak P.B., Yilmaz S., Kara P., (2020), “Aptamer-based electrochemical biosensing strategy toward human non-small cell lung cancer using polyacrylonitrile/polypyrrole nanofibers”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412 (28), 7851-7860.
- [35] Ghanbari K., Roushani M., (2018), “A nanohybrid probe based on double recognition of an aptamer MIP grafted onto a MWCNTs-Chit nanocomposite for sensing hepatitis C virus core antigen”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 258, 1066-1071.
- [36] Wang L., Wu A., Wei G., (2018), “Graphene-based aptasensors: from molecule–interface interactions to sensor design and biomedical diagnostics”, *Analyst*, 143 (7), 1526-1543.
- [37] Abu-Ali H., Nabok A., Smith T. J., (2019), “Development of novel and highly specific ssDNA-aptamer-based electrochemical biosensor for rapid detection of mercury (II) and lead (II) ions in water”, *Chemosensors*, 7 (2), 27.

- [38] Tabrizi M. A., Shamsipur M., Saber R., Sarkar S., (2017), "Flow injection amperometric sandwich-type aptasensor for the determination of human leukemic lymphoblast cancer cells using MWCNTs-Pdnano/PTCA/aptamer as labeled aptamer for the signal amplification", *Analytica Chimica Acta*, 985, 61-68.
- [39] Holford T. R. J., Davis F., Higson S. P. J., (2012), "Recent trends in antibody based sensors", *Biosensors and Bioelectronics*, 34 (1), 12-24.
- [40] Augustine S., Kumar P., Malhotra B. D., (2019), "Amine-functionalized MoO₃@ RGO nanohybrid-based biosensor for breast cancer detection", *ACS Applied Bio Materials*, 2 (12), 5366-5378.
- [41] Shamsuddin S. H., Gibson T. D., Tomlinson D. C., McPherson M. J., Jayne D. G., Millner P. A., (2021), "Reagentless Affimer- and antibody-based impedimetric biosensors for CEA-detection using a novel non-conducting polymer", *Biosensors and Bioelectronics*, 178, 113013.
- [42] Sadique M. A., Yadav S., Ranjan P., Khan R., Khan F., Kumar A., Biswas D., (2022), "Highly Sensitive Electrochemical Immunosensor Platforms for Dual Detection of SARS-CoV-2 Antigen and Antibody based on Gold Nanoparticle Functionalized Graphene Oxide Nanocomposites", *ACS Applied Bio Materials*, 5, 2421-2430.
- [43] Liu Q., Wu C., Cai H., Hu N., Zhou J., Wang P., (2014), "Cell-based biosensors and their application in biomedicine", *Chemical reviews*, 114 (12), 6423-6461.
- [44] Gupta N., Renugopalakrishnan V., Liepmann D., Paulmurugan R., Malhotra B. D., (2019), "Cell-based biosensors: Recent trends, challenges and future perspectives", *Biosensors and Bioelectronics*, 141, 111435.
- [45] Ge Q., Ge P., Jiang D., Du N., Chen J., Yuan L., Yu H., Xu X., Wu M., Zhang W., (2018), "A novel and simple cell-based electrochemical biosensor for evaluating the antioxidant capacity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese dry-cured ham", *Biosensors and Bioelectronics*, 99, 555-563.
- [46] Xing L., Ge Q., Jiang D., Gao X., Liu R., Cao S., Zhuang X., Zhou G., Zhang W., (2018), "Caco-2 cell-based electrochemical biosensor for evaluating the antioxidant capacity of Asp-Leu-Glu-Glu isolated from dry-cured Xuanwei ham", *Biosensors and Bioelectronics*, 105, 81-89.
- [47] Ye Y., Sun X., Zhang Y., Han X., Sun X., (2022), "A novel cell-based electrochemical biosensor based on MnO₂ catalysis for antioxidant activity evaluation of anthocyanins", *Biosensors and Bioelectronics*, 202, 113990.
- [48] Jiang D., Liu Y., Jiang H., Rao S., Fang W., Wu M., Yuan L., Fang W., (2018), "A novel screen-printed mast cell-based electrochemical sensor for detecting spoilage bacterial quorum signaling molecules (N-acyl-homoserine-lactones) in freshwater fish", *Biosensors and Bioelectronics*, 102, 396-402.

- [49] Sassolas A., Blum L. J., Leca-Bouvier B. D., (2012), "Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors", *Biotechnology Advances*, 30 (3), 489-511.
- [50] Bolivar J. M., Woodley J. M., Fernandez-Lafuente R., (2022), "Is enzyme immobilization a mature discipline? Some critical considerations to capitalize on the benefits of immobilization", *Chemical Society Reviews*, 51, 6251-6290.
- [51] Sheldon R. A., (2007), "Enzyme immobilization: the quest for optimum performance", *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349 (8-9), 1289-1307.
- [52] Ahmad R., Sardar M., (2015), "Enzyme immobilization: an overview on nanoparticles as immobilization matrix", *Biochemistry and Analytical Biochemistry*, 4 (2), 1.
- [53] Lipińska W., Siuzdak K., Karczewski J., Dołęga A., Grochowska K., (2021), "Electrochemical glucose sensor based on the glucose oxidase entrapped in chitosan immobilized onto laser-processed Au-Ti electrode", *Sensors and Actuators B: Chemical*, 330, 129409.
- [54] Fang L., Liu B., Liu L., Li Y., Huang K., Zhang Q., (2016), "Direct electrochemistry of glucose oxidase immobilized on Au nanoparticles-functionalized 3D hierarchically ZnO nanostructures and its application to bioelectrochemical glucose sensor", *Sensors and Actuators B: Chemical*, 222, 1096-1102.
- [55] Magar H. S., Ghica M. E., Abbas M. N., Brett C. M. A., (2017), "A novel sensitive amperometric choline biosensor based on multiwalled carbon nanotubes and gold nanoparticles", *Talanta*, 167, 462-469.
- [56] Pundir S., Chauhan N., Narang J., Pundir, C. S., (2012), "Amperometric choline biosensor based on multiwalled carbon nanotubes/zirconium oxide nanoparticles electrodeposited on glassy carbon electrode", *Analytical Biochemistry*, 427 (1), 26-32.
- [57] Wang S., Chen S., Shang K., Gao X., Wang X., (2021), "Sensitive electrochemical detection of cholesterol using a portable paper sensor based on the synergistic effect of cholesterol oxidase and nanoporous gold", *International Journal of Biological Macromolecules*, 189, 356-362.
- [58] Wu R., Yu S., Chen S., Dang Y., Wen S. H., Tang J., Zhou Y., Zhu J. J., (2022), "A carbon dots-enhanced laccase-based electrochemical sensor for highly sensitive detection of dopamine in human serum", *Analytica Chimica Acta*, 1229, 340365.
- [59] Hu H., Wang B., Li Y., Wang P., Yang L., (2020), "Acetylcholinesterase Sensor with Patterned Structure for Detecting Organophosphorus Pesticides Based on Titanium Dioxide Sol-gel Carrier", *Electroanalysis*, 32 (8), 1834-1842.

- [60] Zambelli B., Musiani F., Benini S., Ciurli S., (2011), "Chemistry of Ni²⁺ in urease: sensing, trafficking, and catalysis", *Accounts of Chemical Research*, 44 (7), 520-530.
- [61] Mazzei L., Musiani F., Ciurli S., (2020), "The structure-based reaction mechanism of urease, a nickel dependent enzyme: tale of a long debate", *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 25 (6), 829-845.
- [62] Balasubramanian A., Ponnuraj K., (2010), "Crystal structure of the first plant urease from jack bean: 83 years of journey from its first crystal to molecular structure", *Journal of Molecular Biology*, 400 (3), 274-283.
- [63] Kappaun K., Piovesan A. R., Carlini C. R., Ligabue-Braun R., (2018), "Ureases: Historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties—A review", *Journal of Advanced Research*, 13, 3-17.
- [64] Botewad S. N., Gaikwad D. K., Girhe N. B., Thorat H. N., Pawar P. P., (2021), "Urea biosensors: A comprehensive review", *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1-17.
- [65] Irzalinda A. D., Gunlazuardi J., Wibowo R., (2020), "Development of a non-enzymatic urea sensor based on a Ni/Au electrode", *Journal of Physics: Conference Series*, 1442, 012054,
- [66] Mansouri R., Azadbakht A., (2019), "Aptamer-based approach as potential tools for construction the electrochemical aptasensor", *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 29 (2), 517-527.
- [67] Smrčka F., Lubal P., Šídlo M., (2017), "The urea biosensor based on luminescence of Eu (III) ternary complex of DO3A ligand", *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 148 (11), 1945-1952.
- [68] Naik T. S. S. K., Saravanan S., Saravana K. N. S., Pratiush, U., Ramamurthy, P.C., (2020), "A non-enzymatic urea sensor based on the nickel sulfide/graphene oxide modified glassy carbon electrode", *Materials Chemistry and Physics*, 245, 122798.
- [69] Kalaivani G. J., Suja S. K., (2018), "Electroenzymatic sensing of urea using CP/MWCNT-inulin-TiO₂ bioelectrode", *Applied Surface Science*, 449, 266-276.
- [70] Korkut S., Uzuncar S., Kilic M.S., Hazer B., (2019), "Electrochemical determination of urea using a gold nanoparticle-copolymer coated-enzyme modified gold electrode", *Instrumentation Science & Technology*, 47 (1), 1-18.
- [71] Ibrahim A. A., Ahmad R., Umar A., Al-Assiri M. S., Al-Salami A. E., Kumar R., Ansari S.G., Baskoutas S., (2017), "Two-dimensional ytterbium oxide nanodisks based biosensor for selective detection of urea", *Biosensors and Bioelectronics*, 98, 254-260.

- [72] Mishra G. K., Mishra R. K., Bhand S., (2010), "Flow injection analysis biosensor for urea analysis in adulterated milk using enzyme thermistor", *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (4), 1560-1564.
- [73] Trivedi U. B., Lakshminarayana D., Kothari I. L., Patel N. G., Kapse H. N., Makhija K. K., Patel P. B., Panchal C. J., (2009), "Potentiometric biosensor for urea determination in milk", *Sensors and Actuators B: Chemical*, 140 (1), 260-266.
- [74] Berto M., Diacci C., Theuer L., Di Lauro M., Simon D. T., Berggren M., Biscarini F., Beni V., Bortolotti C. A., (2018), "Label free urea biosensor based on organic electrochemical transistors", *Flexible and Printed Electronics*, 3 (2), 024001.
- [75] Dhawan G., Sumana G., Malhotra B. D., (2009), "Recent developments in urea biosensors", *Biochemical Engineering Journal*, 44 (1), 42-52.
- [76] Dervisevic M., Dervisevic E., Senel M., Cevik E., Yildiz H. B., Camurlu P., (2017), "Construction of ferrocene modified conducting polymer based amperometric urea biosensor", *Enzyme and microbial technology*, 102, 53-59.
- [77] Lai C. Y., Foot P. J. S., Brown J. W., Spearman P., (2017), "A urea potentiometric biosensor based on a thiophene copolymer", *Biosensors*, 7 (1), 13.
- [78] Duan R., Li Y., Shi B., Li H., Yang J., (2020), "Real-time, quantitative and sensitive detection of urea by whispering gallery mode lasing in liquid crystal microdroplet", *Talanta*, 209, 120513.
- [79] Syshchyk O., Skryshevsky V. A., Soldatkin O. O., Soldatkin A. P., (2015), "Enzyme biosensor systems based on porous silicon photoluminescence for detection of glucose, urea and heavy metals", *Biosensors and Bioelectronics*, 66, 89-94.
- [80] Mello H. J. N. P. D., Mulato M., (2020), "Enzymatically functionalized polyaniline thin films produced with one-step electrochemical immobilization and its application in glucose and urea potentiometric biosensors", *Biomedical microdevices*, 22 (1), 1-9.
- [81] Nguyen H. H., Lee S. H., Lee U. J., Fermin C. D., Kim M., (2019), "Immobilized enzymes in biosensor applications", *Materials*, 12 (1), 121.
- [82] Wang Y. J., Chen C. H., Hsiue G. H., Yu B. C., (1992), "Urea sensor with single poly (propylene) membrane", *Biotechnology and Bioengineering*, 40 (3), 446-449.
- [83] Adeloju S. B., Shaw S. J., Wallace G. G., (1993), "Polypyrrole-based potentiometric biosensor for urea part 1. Incorporation of urease", *Analytica Chimica Acta*, 281 (3), 611-620.

- [84] Pizzariello A., Stredanský M., Stredanská S., Miertuš S., (2001), "Urea biosensor based on amperometric pH-sensing with hematein as a pH-sensitive redox mediator", *Talanta*, 54 (4), 763-772.
- [85] Yang Z., Si S., Dai H., Zhang C., (2007), "Piezoelectric urea biosensor based on immobilization of urease onto nanoporous alumina membranes", *Biosensors and Bioelectronics*, 22 (12), 3283-3287.
- [86] Jha S. K., Topkar A., D'Souza S. F., (2008), "Development of potentiometric urea biosensor based on urease immobilized in PVA-PAA composite matrix for estimation of blood urea nitrogen (BUN)", *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70 (6), 1145-1150.
- [87] Tiwari A., Aryal S., Pilla S., Gong S., (2009), "An amperometric urea biosensor based on covalently immobilized urease on an electrode made of hyperbranched polyester functionalized gold nanoparticles", *Talanta*, 78 (4-5), 1401-1407.
- [88] Sadasivuni K. K., Saha P., Adhikari J., Deshmukh K., Ahamed M. B., Cabibihan J. J., (2020), "Recent advances in mechanical properties of biopolymer composites: A review", *Polymer Composites*, 41 (1), 32-59.
- [89] Saeedfar K., Heng L. Y., Ling T. L., Rezayi M., (2013), "Potentiometric urea biosensor based on an immobilised fullerene-urease bio-conjugate", *Sensors*, 13 (12), 16851-16866.
- [90] Abraham S., Ciobota V., Srivastava S., Srivastava S. K., Singh R. K., Dellith J., Malhotra B. D., Schmitt M., Popp J., Srivastava A., (2014), "Mesoporous silica particle embedded functional graphene oxide as an efficient platform for urea biosensing", *Analytical Methods*, 6 (17), 6711-6720.
- [91] Singh A. K., Singh M., Verma N., (2020), "Electrochemical preparation of Fe₃O₄/MWCNT-polyaniline nanocomposite film for development of urea biosensor and its application in milk sample", *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14 (1), 163-175.
- [92] Mahadeva S. K., Kim J., (2013), "Porous tin-oxide-coated regenerated cellulose as disposable and low-cost alternative transducer for urea detection", *IEEE Sensors Journal*, 13 (6), 2223-2228.
- [93] Duong H. D., Rhee J. I., (2015), "Development of a ratiometric fluorescent urea biosensor based on the urease immobilized onto the oxazine 170 perchlorate-ethyl cellulose membrane", *Talanta*, 134, 333-339.
- [94] Uzunçar S., Meng L., Turner A. P. F., Mak W. C., (2021), "Processable and nanofibrous polyaniline: polystyrene-sulphonate (nano-PANI: PSS) for the fabrication of catalyst-free ammonium sensors and enzyme-coupled urea biosensors", *Biosensors and Bioelectronics*, 171, 112725.

- [95] Hao W., Das G., Yoon H. H., (2015), "Fabrication of an amperometric urea biosensor using urease and metal catalysts immobilized by a polyion complex", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 747, 143-148.
- [96] Srivastava R. K., Srivastava S., Narayanan T. N., Mahlotra B. D., Vajtai R., Ajayan P. M., Srivastava A., (2012), "Functionalized multilayered graphene platform for urea sensor", *ACS Nano*, 6 (1), 168-175.
- [97] Branzoi F., Branzoi V., Musina A., (2012), "Amperometric urea biosensor based on platinum electrode modified with a nanocomposite film", *Surface and Interface Analysis*, 44 (8), 895-898.
- [98] Lee C. T., Chiu Y. S., (2015), "Gate-recessed AlGaIn/GaN ISFET urea biosensor fabricated by photoelectrochemical method", *IEEE Sensors Journal*, 16 (6), 1518-1523.
- [99] Zhybak M., Beni V., Vagin M. Y., Dempsey E., Turner A. P. F., Korpan Y., (2016), "Creatinine and urea biosensors based on a novel ammonium ion-selective copper-polyaniline nano-composite", *Biosensors and Bioelectronics*, 77, 505-511.
- [100] Hosseinian M., Darzi G. N., Rahimpour A., (2019), "A novel bioelectrochemical sensor based on immobilized urease on the surface of nickel oxide nanoparticle and polypyrrole composite modified Pt electrode", *Electroanalysis*, 31 (12), 2530-2537.
- [101] Kuralay F., Özyörük H., Yıldız A., (2006), "Amperometric enzyme electrode for urea determination using immobilized urease in poly (vinylferrocenium) film", *Sensors and Actuators B: Chemical*, 114 (1), 500-506.
- [102] Ashakirin S. N., Haniff M. A. S. M., Zaid M. H. M., Razipwee M. F. M., Mahmoudi E., (2022), "Urease immobilized electrodeposited silver reduce graphene oxide modified screen-printed carbon electrode for highly urea detection", *Measurement*, 196, 111058.
- [103] Dhinasekaran D., Soundharraj P., Jagannathan M., Rajendran A. R., Rajendran S., (2022), "Hybrid ZnO nanostructures modified graphite electrode as an efficient urea sensor for environmental pollution monitoring", *Chemosphere*, 296, 133918.
- [104] Choi C. K., Shaban S. M., Moon B. S., Pyun D. G., Kim D. H., (2021), "Smartphone-assisted point-of-care colorimetric biosensor for the detection of urea via pH-mediated AgNPs growth", *Analytica Chimica Acta*, 1170, 338630.
- [105] Korkut U. S., Samet K. M., Yetiren, F., (2021), "Improved Sensing Performance of Amperometric Urea Biosensor by Using Platinum Nanoparticles", *Electroanalysis*, 33 (8), 1911-1922.

- [106] Liu S., Shi F., Chen L., Su X., (2014), "Dopamine functionalized CuInS₂ quantum dots as a fluorescence probe for urea", *Sensors and Actuators B: Chemical*, 191, 246-251.
- [107] Tak M., Gupta V., Tomar M., (2013), "Zinc oxide–multiwalled carbon nanotubes hybrid nanocomposite based urea biosensor", *Journal of Materials Chemistry B*, 1 (46), 6392-6401.
- [108] Zhu G., Cheng L., Qi R., Zhang M., Zhao J., Zhu L., Dong M., (2020), "A metal-organic zeolitic framework with immobilized urease for use in a tapered optical fiber urea biosensor", *Microchimica Acta*, 187 (1), 1-9.
- [109] Shukla S. K., Parlak O., Shukla S. K., Mishra S., Turner A. P. F., Tiwari A., (2014), "Self-reporting micellar polymer nanostructures for optical urea biosensing", *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 53 (20), 8509-8514.
- [110] Phonchai A., Rattana S., Thongprajukaew K., (2020), "A portable sol-gel urea colorimetric method for the determination of urea in feedstuffs", *Food chemistry*, 319, 126545.
- [111] Bao Q., Yang Z., Song Y., Fan M., Pan P., Liu J., Liao Z., Wei J., (2019), "Printed flexible bifunctional electrochemical urea-pH sensor based on multiwalled carbon nanotube/polyaniline electronic ink", *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 30 (2), 1751-1759.
- [112] Hassan R. Y. A., Kamel A. M., Hashem M. S., Hassan H. N. A., El-Ghaffar A., Mahmoud A., (2018), "A new disposable biosensor platform: carbon nanotube/poly (o-toluidine) nanocomposite for direct biosensing of urea", *Journal of Solid State Electrochemistry*, 22 (6), 1817-1823.
- [113] Ghayedi Karimi K., Mozaffari S.A., Ebrahimi M., (2018), "Spin-coated ZnO–graphene nanostructure thin film as a promising matrix for urease immobilization of impedimetric urea biosensor", *Journal of the Chinese Chemical Society*, 65 (11), 1379-1388.
- [114] Migliorini F. L., Sanfelice R. C., Mercante L. A., Andre R. S., Mattoso L. H. C., Correa D. S., (2018), "Urea impedimetric biosensing using electrospun nanofibers modified with zinc oxide nanoparticles", *Applied Surface Science*, 443, 18-23.
- [115] Rahmanian R., Mozaffari S. A., Amoli H. S., Abedi M., (2018), "Development of sensitive impedimetric urea biosensor using DC sputtered Nano-ZnO on TiO₂ thin film as a novel hierarchical nanostructure transducer", *Sensors and Actuators B: Chemical*, 256, 760-774.
- [116] Castrovilli M. C., Bolognesi P., Chiarinelli J., Avaldi L., Calandra P., Antonacci A., Scognamiglio V., (2019), "The convergence of forefront technologies in the design of laccase-based biosensors—An update", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 119, 115615.

- [117] Rivera-Hoyos C. M., Morales-Álvarez E. D., Poutou-Piñales R. A., Pedroza-Rodríguez A. M., Rodríguez-Vázquez R., Delgado-Boada J. M., (2013), “Fungal laccases”, *Fungal Biology Reviews*, 27 (3-4), 67-82.
- [118] Li D., Yang J., Zhou J., Wei Q., Huang F., (2014), “Direct electrochemistry of laccase and a hydroquinone biosensing application employing ZnO loaded carbon nanofibers”, *RSC advances*, 4 (106), 61831-61840.
- [119] Kim M., Song Y. E., Xiong J. Q., Kim K. Y., Jang M., Jeon B. H., Kim J. R., (2021), “Electrochemical detection and simultaneous removal of endocrine disruptor, bisphenol A using a carbon felt electrode”, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 880, 114907.
- [120] Rubin B. S., (2011), “Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects”, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127 (1-2), 27-34.
- [121] Zhang Y., Lei Y., Lu H., Shi L., Wang P., Ali Z., Li J., (2021), “Electrochemical detection of bisphenols in food: A review”, *Food Chemistry*, 346, 128895.
- [122] Kong Q., Wang Y., Zhang L., Ge S., Yu J., (2017), “A novel microfluidic paper-based colorimetric sensor based on molecularly imprinted polymer membranes for highly selective and sensitive detection of bisphenol A”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 243, 130-136.
- [123] Molina-García L., Fernández-de Córdova M. L., Ruiz-Medina A., (2012), “Analysis of Bisphenol A in milk by using a multicommutated fluorimetric sensor”, *Talanta*, 96, 195-201.
- [124] Jebri S., Cubillana-Aguilera L., Palacios-Santander J. M., Dridi C., (2021), “A novel electrochemical sensor modified with green gold sononanoparticles and carbon black nanocomposite for bisphenol A detection”, *Materials Science and Engineering: B*, 264, 114951.
- [125] Reza K. K., Ali M. A., Srivastava S., Agrawal V. V., Biradar A. M., (2015), “Tyrosinase conjugated reduced graphene oxide based biointerface for bisphenol A sensor”, *Biosensors and Bioelectronics*, 74, 644-651.
- [126] Portaccio M., Di Tuoro D., Arduini F., Moscone, D., Cammarota M., Mita D.G., Lepore M., (2013), “Laccase biosensor based on screen-printed electrode modified with thionine-carbon black nanocomposite, for Bisphenol A detection”, *Electrochimica Acta*, 109, 340-347.
- [127] Vilian A. T. E., Giribabu K., Choe S. R., Muruganatham R., Lee H., Roh C., Huh Y. S., Han Y. K., (2017), “A spick-and-span approach to the immobilization of horseradish peroxidase on Au nanospheres incorporated with a methionine/graphene biomatrix for the determination of endocrine disruptor bisphenol A”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 251, 804-812.

- [128] Fernandes P., Campiña J. M., Silva A. F., (2020), "A layered nanocomposite of laccase, chitosan, and Fe₃O₄ nanoparticles-reduced graphene oxide for the nanomolar electrochemical detection of bisphenol A", *Microchimica Acta*, 187 (5), 1-10.
- [129] Fartas F. M., Abdullah J., Yusof N. A., Sulaiman Y., Saiman, M. I., Zaid M. H. M., (2020), "Laccase Electrochemical Biosensor Based on Graphene-Gold/Chitosan Nanocomposite Film for Bisphenol A Detection", *Current Analytical Chemistry*, 16 (5), 570-579.
- [130] Tajik S., Beitollahi H., Nejad F. G., Zhang K., Le Q. V., Jang H. W., Kim S. Y., Shokouhimehr M., (2020), "Recent advances in electrochemical sensors and biosensors for detecting bisphenol A", *Sensors*, 20 (12), 3364.
- [131] Wang Y., Yin C., Zhuang Q., (2020), "An electrochemical sensor modified with nickel nanoparticle/nitrogen-doped carbon nanosheet nanocomposite for bisphenol A detection", *Journal of Alloys and Compounds*, 827, 154335.
- [132] Bravo I., Prata M., Torrinha Á., Delerue-Matos C., Lorenzo E., Morais S., (2022), "Laccase bioconjugate and multi-walled carbon nanotubes-based biosensor for bisphenol A analysis", *Bioelectrochemistry*, 144, 108033.
- [133] Pan D., Gu Y., Lan H., Sun Y., Gao H., (2015), "Functional graphene-gold nano-composite fabricated electrochemical biosensor for direct and rapid detection of bisphenol A", *Analytica Chimica Acta*, 853, 297-302.
- [134] Kunene K., Sabela M., Kanchi S., Bisetty K., (2020), "High performance electrochemical biosensor for bisphenol a using screen printed electrodes modified with multiwalled carbon nanotubes functionalized with silver-doped zinc oxide", *Waste and Biomass Valorization*, 11 (3), 1085-1096.
- [135] Sandhyarani N., (2019), "Surface modification methods for electrochemical biosensors", In: Ensafi, A. A., "Electrochemical Biosensors", Elsevier.
- [136] Rodríguez-Delgado M. M., Alemán-Nava G. S., Rodríguez-Delgado J. M., Dieck-Assad G., Martínez-Chapa S. O., Barceló D., Parra R., (2015), "Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 74, 21-45.
- [137] Cirillo G., Nicoletta F. P., Curcio M., Spizzirri U. G., Picci N., Iemma F., (2014), "Enzyme immobilization on smart polymers: Catalysis on demand", *Reactive and Functional Polymers*, 83, 62-69.
- [138] Liu D. M., Chen J., Shi Y. P., (2018), "Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 102, 332-342.
- [139] Rezwani K., Meier L. P., Rezwani M., Vörös J., Textor M., Gauckler L. J., (2004), "Bovine serum albumin adsorption onto colloidal Al₂O₃ particles: a

new model based on zeta potential and UV– Vis measurements”, *Langmuir*, 20 (23), 10055-10061.

- [140] Bastida A., Sabuquillo P., Armisen P., Fernández-Lafuente R., Huguet J., Guisán J. M., (1998), “A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports”, *Biotechnology and Bioengineering*, 58 (5), 486-493.
- [141] Li S., Hu C., Chen C., Zhang J., Bai Y., Tan C. S., Ni G., He F., Li W., Ming D., (2021), “Molybdenum disulfide supported on metal–organic frameworks as an ultrasensitive layer for the electrochemical detection of the ovarian cancer biomarker CA125”, *ACS Applied Bio Materials*, 4 (7), 5494-5502.
- [142] Lipińska W., Grochowska K., Siuzdak K., (2021), “Enzyme immobilization on gold nanoparticles for electrochemical glucose biosensors”, *Nanomaterials*, 11 (5), 1156.
- [143] Ariffin M. F. K., Idris A., (2022), “Fe₂O₃/Chitosan coated superparamagnetic nanoparticles supporting lipase enzyme from *Candida Antarctica* for microwave assisted biodiesel production”, *Renewable Energy*, 185, 1362-1375.
- [144] Dragomirescu M., Vintila T., Vlase T., Mihali C. V., Preda G., (2021), “Microbial cellulases immobilized in biopolymer/silica matrices used as enzyme release systems”, *Acta Biochimica Polonica*, 68 (4), 775-783.
- [145] Kuznetsova L. S., Arlyapov V. A., Kamanina O. A., Lantsova E. A., Tarasov S. E., Reshetilov A. N., (2022), “Development of Nanocomposite Materials Based on Conductive Polymers for Using in Glucose Biosensor”, *Polymers*, 14 (8), 1543.
- [146] Dabhade A., Jayaraman S., Paramasivan B., (2021), “Development of glucose oxidase-chitosan immobilized paper biosensor using screen-printed electrode for amperometric detection of Cr (VI) in water”, *3 Biotech*, 11 (4), 1-11.
- [147] Brady D., Jordaan J., (2009), “Advances in enzyme immobilisation”, *Biotechnology Letters*, 31 (11), 1639-1650.
- [148] Imam H. T., Marr P. C., Marr A. C., (2021), “Enzyme entrapment, biocatalyst immobilization without covalent attachment”, *Green Chemistry*, 23 (14), 4980-5005.
- [149] Kouisni L., Rochefort D., (2009), “Confocal microscopy study of polymer microcapsules for enzyme immobilisation in paper substrates”, *Journal of Applied Polymer Science*, 111 (1), 1-10.
- [150] Shin H. S., Park C. H., Park S. J., Pyo H., (2001), “Sensitive determination of bisphenol A in environmental water by gas chromatography with nitrogen–phosphorus detection after cyanomethylation”, *Journal of Chromatography A*, 912 (1), 119-125.

- [151] Badawy M. E. I., Marei A. E. S. M., El-Nouby M. A. M., (2018), "Preparation and characterization of chitosan-siloxane magnetic nanoparticles for the extraction of pesticides from water and determination by HPLC", *Separation Science Plus*, 1 (7), 506-519.
- [152] Wahjudi P. N., Patterson M. E., Lim S., Yee J. K., Mao C. S., Lee W. N. P., (2010), "Measurement of glucose and fructose in clinical samples using gas chromatography/mass spectrometry", *Clinical Biochemistry*, 43 (1-2), 198-207.
- [153] Brozino J. D., (2000), "Electrochemical sensors", 3rd Edition, Taylor & Francis.
- [154] Moazampour M., Zare H. R., Shekari Z., (2021), "Femtomolar determination of an ovarian cancer biomarker (miR-200a) in blood plasma using a label free electrochemical biosensor based on L-cysteine functionalized ZnS quantum dots", *Analytical Methods*, 13 (17).
- [155] Raj P., Oh M. H., Han K., Lee T. Y., (2021), "Label-Free electrochemical biosensor based on Au@MoS₂-PANI for Escherichia coli detection", *Chemosensors*, 9 (3), 49.
- [156] Torres-Méndez C., Ellamathy J., Mascarenhas M. I., Liu Y., Gkoutana G. V., Kühne P., Sebastián J., Jovanovic I., Bern D., Nandi S., (2021), "Developing an Electrochemical Biosensor for the Detection of Hemagglutinin Protein of Influenza A Virus Subtype H1N1 in Artificial Saliva", *Chemistry Proceedings*, 5 (1), 80.
- [157] Yu M., Li Y. T., Hu Y., Tang L., Yang F., Lv W. L., Zhang Z. Y., Zhang G. J., (2021), "Gold nanostructure-programmed flexible electrochemical biosensor for detection of glucose and lactate in sweat", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 882, 115029.
- [158] Hara T. O., Singh B., (2021), "Electrochemical biosensors for detection of pesticides and heavy metal toxicants in water: recent trends and progress", *ACS ES&T Water*, 1 (3), 462-478.
- [159] De Brito A.R., de Jesus R. S., de Carvalho Tavares I. M., Silva F. N., Santana N. B., Ferrao S. P. B., Bilal M., de Santana Santos A., Salay L. C., de Oliveira J. R., (2021), "Application of the electrochemical biosensor in the detection of lactose in skimmed milk", *Surfaces and Interfaces*, 22, 100839.
- [160] Yahaya M. L., Noordin R., Razak K. A., (2019), "Advanced Nanoparticle-Based Biosensors for Diagnosing Foodborne Pathogens", *Advanced Biosensors for Health Care Applications*, 1-43.
- [161] Sanko V., Şenocak A., Tümay S. O., Orooji Y., Demirbas E., Khataee A., (2022), "An electrochemical sensor for detection of trace-level endocrine

disruptor bisphenol A using $\text{Mo}_2\text{Ti}_2\text{AlC}_3$ MAX phase/MWCNT composite modified electrode”, *Environmental Research*, 212, 113071.

- [162] Sharma H., Mutharasan R., (2013), “Review of biosensors for foodborne pathogens and toxins”, *Sensors and actuators B: Chemical*, 183, 535-549.
- [163] Velusamy V., Arshak K., Korostynska O., Oliwa K., Adley C., (2010), “An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors”, *Biotechnology Advances*, 28 (2), 232-254.
- [164] Stradiotto N. R., Yamanaka H., Zanoni M. V. B., (2003), “Electrochemical sensors: A powerful tool in analytical chemistry”, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14, 159-173.
- [165] Karaman C., Karaman O., Atar N., Yola M. L., (2022), “A molecularly imprinted electrochemical biosensor based on hierarchical $\text{Ti}_2\text{Nb}_{10}\text{O}_{29}$ (TNO) for glucose detection”, *Microchimica Acta*, 189 (1), 1-11.
- [166] Prabhakaran D. C., Ramamurthy P. C., Sivry Y., Subramanian S., (2022), “Electrochemical detection of Cr (VI) and Cr (III) ions present in aqueous solutions using bio-modified carbon paste electrode: a voltammetric study”, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 102 (9), 2053-2073.
- [167] Wan C., Qu A., Deng L., Liu X., Wu C., (2022), “Preparation of an electrochemical biosensor based on indium tin oxide and its performance in detecting antibiotic resistance genes”, *Microchemical Journal*, 107953.
- [168] Baranwal J., Barse B., Gatto G., Broncova G., Kumar A., (2022), “Electrochemical sensors and their applications: a review”, *Chemosensors*, 10 (9), 363.
- [169] Scholz F., (2015), “Voltammetric techniques of analysis: the essentials”, *Chem Texts*, 1 (4), 1-24.
- [170] Chillawar R. R., Tadi K. K., Motghare R. V., (2015), “Voltammetric techniques at chemically modified electrodes”, *Journal of Analytical Chemistry*, 70 (4), 399-418.
- [171] Kounaves S. P., (1997), “Voltammetric Techniques”, In: Settle F., “Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry”, Hall PTR.
- [172] Rezaei B., Irannejad N., (2019), “Electrochemical Detection Techniques in Biosensor Applications”, In: Ensafi A. A., “Electrochemical biosensors”, Elsevier.
- [173] Soğancı T., (2013), “Ferrosenil ditiyofosfonat içeren iletken polimerlerin sentezi ve biyosensör uygulamaları”, *Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi*.

- [174] Şenocak A., (2019), “Karbon tabanlı yeni hibrid malzemelerin hazırlanması ve elektrokimyasal sensör özelliklerinin incelenmesi”, Doktora Tezi, Gebze Teknik Üniveristesi.
- [175] Scholz F., Bond A. M., Compton R. G., Fiedler D. A., Inzelt G., Kahlert H., Lovric S. K., Lohse H., Lovric M., Marken F., Neudeck A., Retter U., Scholz F., Stojek Z., (2010), “Electroanalytical methods”, Springer.
- [176] Patel B. A., (2021), “Electrochemistry for Bioanalysis”. Elsevier.
- [177] Rao H., Zhao X., Liu X., Zhong J., Zhang Z., Zou P., Jiang Y., Wang X., Wang Y., (2018), “A novel molecularly imprinted electrochemical sensor based on graphene quantum dots coated on hollow nickel nanospheres with high sensitivity and selectivity for the rapid determination of bisphenol S”, *Biosensors and Bioelectronics*, 100, 341-347.
- [178] Simões F. R., Xavier M. G., (2017), “Electrochemical sensors”, *Nanoscience and its Applications*, 155-178.
- [179] Westbroek P., (2005), “Electrochemical methods”, In: “Analytical Electrochemistry in Textiles”, Elsevier.
- [180] Buleandră M., Popa D. E., David I. G., Ciucu A. A., (2021), “A simple and efficient cyclic square wave voltammetric method for simultaneous determination of epinephrine and norepinephrine using an activated pencil graphite electrode”, *Microchemical Journal*, 160, 105621.
- [181] Takeda K., Kusuoka R., Inukai M., Igarashi K., Ohno H., Nakamura N., (2021), “An amperometric biosensor of L-fucose in urine for the first screening test of cancer”, *Biosensors and Bioelectronics*, 174, 112831.
- [182] Bronzino J. D., Peterson D. R., (2018), “Medical Devices and Human Engineering”, 1st Edition, CRC Press.
- [183] Kim J. H., Mirzaei A., Kim H. W., Kim S. S., (2019), “Improving the hydrogen sensing properties of SnO₂ nanowire-based conductometric sensors by Pd-decoration”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 285, 358-367.
- [184] Zhang X., Wang X., Yang Q., Jiang X., Li Y., Zhao J., Qu K., (2020), “Conductometric sensor for viable *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* based on magnetic analyte separation via aptamer”, *Microchimica Acta*, 187 (1), 1-10.
- [185] Tonello S., Abate G., Borghetti M., Lopomo N.F., Serpelloni M., Sardini E., (2022), “How to assess the measurement performance of mobile/wearable point-of-care testing devices? A systematic review addressing sweat analysis”, *Electronics*, 11 (5), 761.

- [186] Sardini E., Serpelloni M., Tonello S., (2020), "Printed electrochemical biosensors: Opportunities and metrological challenges", *Biosensors*, 10 (11), 166.
- [187] Alizadeh A., Burns A., Lenigk R., Gettings R., Ashe J., Porter A., McCaul M., Barrett R., Diamond D., White P., (2018), "A wearable patch for continuous monitoring of sweat electrolytes during exertion", *Lab on a Chip*, 18 (17), 2632-2641.
- [188] Şenocak A., Sanko V., Tümay S.O., Orooji Y., Demirbas E., Yoon Y., Khataee, A., (2022), "Ultrasensitive electrochemical sensor for detection of rutin antioxidant by layered $Ti_3Al_{0.5}Cu_{0.5}C_2$ MAX phase", *Food and Chemical Toxicology*, 164, 113016.
- [189] Hua X., Fan J., Yang L., Wang J., Wen Y., Su L., Zhang X., (2022), "Rapid detection of miRNA via development of consecutive adenines (polyA)-based electrochemical biosensors", *Biosensors and Bioelectronics*, 198, 113830.
- [190] Salahandish R., Haghayegh F., Khetani S., Hassani M., Nezhad A. S., (2022), "Immuno-affinity Potent Strip with Pre-Embedded Intermixed PEDOT: PSS Conductive Polymers and Graphene Nanosheets for Bio-Ready Electrochemical Biosensing of Central Nervous System Injury Biomarkers", *ACS Applied Materials & Interfaces*, 14 (25), 28651-28662.
- [191] Loock H. P., Wentzell P. D., (2012), "Detection limits of chemical sensors: Applications and misapplications", *Sensors and Actuators B: Chemical*, 173, 157-163.
- [192] Gauglitz G., (2018), "Analytical evaluation of sensor measurements", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410, 5-13.
- [193] Mohammad A., Khan M. E., Alarifi I. M., Cho M. H., Yoon T., (2021), "A sensitive electrochemical detection of hydrazine based on SnO_2/CeO_2 nanostructured oxide", *Microchemical Journal*, 171, 106784.
- [194] Wenninger N., Bračić U., Kollau A., Pungjunun K., Leitinger G., Kalcher K., Ortner A., (2021), "Development of an electrochemical sensor for nitric oxide based on carbon paste electrode modified with Nafion, gold nanoparticles and graphene nanoribbons", *Sensors and Actuators B: Chemical*, 346, 130532.
- [195] Karnes H. T., Shiu G., Shah V. P., (1991), "Validation of bioanalytical methods", *Pharmaceutical research*, 8 (4), 421-426.
- [196] Liu X., Li Y., He L., Feng Y., Tan H., Chen X., Yang W., (2021), "Simultaneous detection of multiple neuroendocrine tumor markers in patient serum with an ultrasensitive and antifouling electrochemical immunosensor", *Biosensors and Bioelectronics*, 194, 113603.
- [197] Xu G., Cheng C., Yuan W., Liu Z., Zhu L., Li X., Lu Y., Chen Z., Liu J., Cui Z., (2019), "Smartphone-based battery-free and flexible electrochemical patch

for calcium and chloride ions detections in biofluids”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 297, 126743.

- [198] Dang W., Sun Y., Jiao H., Xu L., Lin M., (2020), “AuNPs-NH₂/Cu-MOF modified glassy carbon electrode as enzyme-free electrochemical sensor detecting H₂O₂”, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 856, 113592.
- [199] Schazmann B., Morris D., Slater C., Beirne S., Fay C., Reuveny R., Moyna N., Diamond D., (2010), “A wearable electrochemical sensor for the real-time measurement of sweat sodium concentration”, *Analytical Methods*, 2 (4), 342-348.
- [200] Ghalkhani M., Shahrokhian S., Navabi M., (2021), “Development of an electrochemical sensor based on (rGO-CNT) nanocomposite for raloxifene analysis”, *Materials Chemistry and Physics*, 263, 124131.
- [201] Jianrong C., Yuqing M., Nongyue H., Xiaohua W., Sijiao L., (2004), “Nanotechnology and biosensors”, *Biotechnology Advances*, 22 (7), 505-518.
- [202] Paul D. R., Robeson L. M., (2008), “Polymer nanotechnology: nanocomposites”, *Polymer*, 49 (15), 3187-3204.
- [203] Khan I., Saeed K., Khan I., (2019), “Nanoparticles: Properties, applications and toxicities”, *Arabian Journal of Chemistry*, 12 (7), 908-931.
- [204] Wang E. C., Wang A. Z., (2014), “Nanoparticles and their applications in cell and molecular biology”, *Integrative Biology*, 6 (1), 9-26.
- [205] Ealia S. A. M., Saravanakumar M. P., (2017), “A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application”, *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering*, 263, 032019.
- [206] Fadeel B., Garcia-Bennett A. E., (2010), “Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62 (3), 362-374.
- [207] Fu A., Gu W., Boussert B., Koski K., Gerion D., Manna L., Le Gros M., Larabell C. A., Alivisatos A. P., (2007), “Semiconductor quantum rods as single molecule fluorescent biological labels”, *Nano Letters*, 7 (1), 179-182.
- [208] Suri S. S., Fenniri H., Singh B., (2007), “Nanotechnology-based drug delivery systems”, *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 2 (1), 1-6.
- [209] Goenka S., Sant V., Sant S., (2014), “Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering”, *Journal of Controlled Release*, 173, 75-88.
- [210] Mauter M. S., Elimelech M., (2008), “Environmental applications of carbon-based nanomaterials”, *Environmental Science & Technology*, 42 (16), 5843-5859.

- [211] Pérez-López B., Merkoçi A., (2011), “Nanomaterials based biosensors for food analysis applications”, *Trends in Food Science & Technology*, 22 (11), 625-639.
- [212] Caires A. J., Mansur H. S., Mansur A. A. P., Carvalho S. M., Lobato Z. I. P., Dos Reis J. K. P., (2019), “Gold nanoparticle-carboxymethyl cellulose nanocolloids for detection of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) using laser light scattering immunoassay”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 177, 377-388.
- [213] Zhang X., Guo Q., Cui D., (2009), “Recent advances in nanotechnology applied to biosensors”, *Sensors*, 9 (02), 1033-1053.
- [214] Zhang Y., Liu G., Yao X., Gao S., Xie J., Xu H., Lin N., (2018), “Electrochemical chiral sensor based on cellulose nanocrystals and multiwall carbon nanotubes for discrimination of tryptophan enantiomers”, *Cellulose*, 25 (7), 3861-3871.
- [215] Liu C., Dong J., Waterhouse G. I. N., Cheng Z., Ai S., (2018), “Electrochemical immunosensor with nanocellulose-Au composite assisted multiple signal amplification for detection of avian leukosis virus subgroup J”, *Biosensors and Bioelectronics*, 101, 110-115.
- [216] Shaikh S. F., Ubaidullah M., Mane R. S., Al-Enizi A. M., (2020), “Types, Synthesis Methods and Applications of Ferrites”, In: Mane R., Jadhav V., “Spinel Ferrite Nanostructures for Energy Storage Devices”, Elsevier.
- [217] Kefeni K. K., Msagati T. A. M., Nkambule T. T. I., Mamba B. B., (2020), “Spinel ferrite nanoparticles and nanocomposites for biomedical applications and their toxicity”, *Materials Science and Engineering: C*, 107, 110314.
- [218] Masunga N., Mmelesi O. K., Kefeni K. K., Mamba B. B., (2019), “Recent advances in copper ferrite nanoparticles and nanocomposites synthesis, magnetic properties and application in water treatment”, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7 (3), 103179.
- [219] Narang S. B., Pubby K., (2021), “Nickel spinel ferrites: a review”, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 519, 167163.
- [220] Jadhav V. V., Shirsat S. D., Tumberphale U. B., Mane R. S., (2020), “Properties of Ferrites”, In: Mane R., Jadhav V., “Spinel Ferrite Nanostructures for Energy Storage Devices”, Elsevier.
- [221] Abdulkhaidov K., Soldatov A., Dmitrenko I., Li Z., Kallaev S., Omarov Z., (2021), “The influence of the structural defects on the physical properties of $\text{Er}_3\text{Fe}_5\text{O}_{12}$ ferrite-garnet”, *Results in Physics*, 22, 103905.
- [222] Bheema R. K., Ojha A. K., Praveen Kumar A. V., Etika K. C., (2022), “Synergistic influence of barium hexaferrite nanoparticles for enhancing the

EMI shielding performance of GNP/epoxy nanocomposites”, *Journal of Materials Science*, 57 (19), 8714-8726.

- [223] Bielan Z., Dudziak S., Kubiak A., Kowalska E., (2021), “Application of spinel and hexagonal ferrites in heterogeneous photocatalysis”, *Applied Sciences*, 11 (21), 10160.
- [224] Pullar R. C., Bhattacharya A. K., (2001), “The synthesis and characterization of the hexagonal Z ferrite, $\text{Sr}_3\text{Co}_2\text{Fe}_{24}\text{O}_{41}$, from a sol-gel precursor”, *Materials Research Bulletin*, 36 (7-8), 1531-1538.
- [225] Marinca T. F., Chicinaş I., Isnard O., (2013), “Structural and magnetic properties of the copper ferrite obtained by reactive milling and heat treatment”, *Ceramics International*, 39 (4), 4179-4186.
- [226] Thakur S., Rai R., Sharma S., (2015), “Structural characterization and magnetic study of NiFe_xO_4 synthesized by co-precipitation method”, *Materials Letters*, 139, 368-372.
- [227] Darezereshki E., Bakhtiari F., Alizadeh M., Ranjbar M., (2012), “Direct thermal decomposition synthesis and characterization of hematite ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) nanoparticles”, *Materials Science in Semiconductor Processing*, 15 (1), 91-97.
- [228] Nemati A., Shadpour S., Khalafbeygi H., Barkhi M., (2014), “Hydrothermal Synthesis and Size Control of Fe_3O_4 Nanoparticles in the Presence of 2, 2', 2'', 2'''-(ethane-1, 2-diylbis (azanetriyl)) tetraacetohydrazide”, *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry*, 44 (8), 1161-1165.
- [229] Ameer S., Gul I. H., Mujahid M., (2015), “Ultra low permittivity/loss CoFe_2O_4 and $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-rGO}$ nanohybrids by novel 1-hexanol assisted solvothermal process”, *Journal of Alloys and Compounds*, 642, 78-82.
- [230] Masthoff I. C., Kraken M., Mauch D., Menzel D., Munevar J. A., Baggio Saitovitch E., Litterst F. J., Garnweitner G., (2014), “Study of the growth process of magnetic nanoparticles obtained via the non-aqueous sol-gel method”, *Journal of Materials Science*, 49 (14), 4705-4714.
- [231] Asadpour-Zeynali K., Mollarasouli F., (2017), “Novel electrochemical biosensor based on PVP capped $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{@CdSe}$ core-shell nanoparticles modified electrode for ultra-trace level determination of rifampicin by square wave adsorptive stripping voltammetry”, *Biosensors and Bioelectronics*, 92, 509-516.
- [232] Reddy D. H. K., Lee S. M., (2013), “Three-dimensional porous spinel ferrite as an adsorbent for Pb (II) removal from aqueous solutions”, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 52 (45), 15789-15800.

- [233] Zhang G., Qu J., Liu H., Cooper A.T., Wu R., (2007), “CuFe₂O₄/activated carbon composite: a novel magnetic adsorbent for the removal of acid orange II and catalytic regeneration”, *Chemosphere*, 68 (6), 1058-1066.
- [234] Kefeni K. K., Msagati T. A. M., Mamba B. B., (2017), “Ferrite nanoparticles: synthesis, characterisation and applications in electronic device”, *Materials Science and Engineering: B*, 215, 37-55.
- [235] Barrado E., Prieto F., Garay F.J., Medina J., Vega M., (2002), “Characterization of nickel-bearing ferrites obtained as by-products of hydrochemical wastewater purification processes”, *Electrochimica Acta*, 47 (12), 1959-1965.
- [236] Yang H., Zhang C., Shi X., Hu H., Du X., Fang Y., Ma Y., Wu H., Yang S., (2010), “Water-soluble superparamagnetic manganese ferrite nanoparticles for magnetic resonance imaging”, *Biomaterials*, 31 (13), 3667-3673.
- [237] Pradhan P., Giri J., Samanta G., Sarma H.D., Mishra K.P., Bellare J., Banerjee R., Bahadur D., (2007), “Comparative evaluation of heating ability and biocompatibility of different ferrite-based magnetic fluids for hyperthermia application”, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 81 (1), 12-22.
- [238] Rana S., Gallo A., Srivastava R. S., Misra R. D. K., (2007), “On the suitability of nanocrystalline ferrites as a magnetic carrier for drug delivery: functionalization, conjugation and drug release kinetics”, *Acta Biomaterialia*, 3 (2), 233-242.
- [239] Rashid Z., Soleimani M., Ghahremanzadeh R., Vossoughi M., Esmaili E., (2017), “Effective surface modification of MnFe₂O₄@SiO₂@PMIDA magnetic nanoparticles for rapid and high-density antibody immobilization”, *Applied Surface Science*, 426, 1023-1029.
- [240] Shahnava Z., Lorestani F., Alias Y., Woi P.M., (2014), “Polypyrrole–ZnFe₂O₄ magnetic nano-composite with core–shell structure for glucose sensing”, *Applied Surface Science*, 317, 622-629.
- [241] Shahnava Z., Lorestani F., Meng W. P., Alias Y., (2015), “Core-shell–CuFe₂O₄/PPy nanocomposite enzyme-free sensor for detection of glucose”, *Journal of Solid State Electrochemistry*, 19 (4), 1223-1233.
- [242] Kumar E. R., Srinivas C., Seehra M. S., Deepty M., Pradeep I., Kamzin A. S., Mehar M. V. K., Mohan N. K., (2018), “Particle size dependence of the magnetic, dielectric and gas sensing properties of Co substituted NiFe₂O₄ nanoparticles”, *Sensors and Actuators A: Physical*, 279, 10-16.
- [243] Katowah D. F., Rahman M. M., Hussein M. A., Sobahi T. R., Gabal M. A., Alam M. M., Asiri A. M., (2019), “Ternary nanocomposite based poly

(pyrrole-co-O-toluidine), cobalt ferrite and decorated chitosan as a selective Co^{2+} cationic sensor”, *Composites Part B: Engineering*, 175, 107175.

- [244] Rawat N. K., Ahmad S., (2019), “Unveiling Nanoconducting Polymers and Composites for Corrosion Protection”, In: Tri P. N., Rtimi S., Plamondon O., “Nanomaterials-Based Coatings”, Elsevier.
- [245] Nezakati T., Seifalian A., Tan A., Seifalian A. M., (2018), “Conductive polymers: opportunities and challenges in biomedical applications”, *Chemical Reviews*, 118 (14), 6766-6843.
- [246] Li Y., (2015), “Conducting Polymers”, In: Li Y., “Organic Optoelectronic Materials”, Springer.
- [247] Hatchett D. W., Josowicz M., (2008), “Composites of intrinsically conducting polymers as sensing nanomaterials”, *Chemical Reviews*, 108 (2), 746-769.
- [248] Rahaman M., Aldalbahi A., Govindasami P., Khanam N. P., Bhandari S., Feng P., Altalhi T., (2017), “A new insight in determining the percolation threshold of electrical conductivity for extrinsically conducting polymer composites through different sigmoidal models”, *Polymers*, 9 (10), 527.
- [249] Altun A., (2019), “İletken Polimer Tabanlı Amperometrik Biyosensörlerin Geliştirilmesi”, Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi.
- [250] Llorens E., Armelin E., Pérez-Madrigal M. D. M., Del Valle L. J., Alemán C., Puiggalí J., (2013), “Nanomembranes and nanofibers from biodegradable conducting polymers”, *Polymers*, 5 (3), 1115-1157.
- [251] Trung V. Q., Hung H. M., Van Khoe L., Duc L. M., Bich Viet N. T., Linh D. K., Huong V. T., Dat N. D., Yen Oanh D. T., Luong N. X., (2022), “Synthesis and Characterization of Polypyrrole Film Doped with Both Molybdate and Salicylate and Its Application in the Corrosion Protection for Low Carbon Steel”, *ACS Omega*, 7, 19842–19852.
- [252] Ballav N., Das R., Giri S., Muliwa A. M., Pillay K., Maity A., (2018), “L-cysteine doped polypyrrole (PPy@ L-Cyst): a super adsorbent for the rapid removal of Hg^{+2} and efficient catalytic activity of the spent adsorbent for reuse”, *Chemical Engineering Journal*, 345, 621-630.
- [253] Vahdatiyekta P., Zniber M., Bobacka J., Huynh T. P., (2022), “A review on conjugated polymer-based electronic tongues”, *Analytica Chimica Acta*, 340114.
- [254] Das G., Yoon H. H., (2015), “Amperometric urea biosensors based on sulfonated graphene/polyaniline nanocomposite”, *International Journal of Nanomedicine*, 10 (Spec Iss), 55.

- [255] Lai J., Yi Y., Zhu P., Shen J., Wu K., Zhang L., Liu J., (2016), "Polyaniline-based glucose biosensor: A review", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 782, 138-153.
- [256] Boeva Z. A., Sergeyev V. G., (2014), "Polyaniline: Synthesis, properties, and application", *Polymer Science Series C*, 56 (1), 144-153.
- [257] Beygisangchin M., Abdul Rashid S., Shafie S., Sadrolhosseini A.R., Lim H.N., (2021), "Preparations, properties, and applications of polyaniline and polyaniline thin films-A review", *Polymers*, 13 (12), 2003.
- [258] Mota M. L., Carrillo A., Verdugo A. J., Olivas A., Guerrero J. M., De la Cruz E. C., Noriega Ramírez N., (2019), "Synthesis and novel purification process of PANI and PANI/AgNPS composite", *Molecules*, 24 (8), 1621.
- [259] Rollet A.L., Diat O., Gebel G., (2002), "A new insight into Nafion structure", *The Journal of Physical Chemistry B*, 106 (12), 3033-3036.
- [260] Mauritz K. A., Moore R. B., (2004), "State of understanding of Nafion", *Chemical Reviews*, 104 (10), 4535-4586.
- [261] Karimi M.B., Mohammadi F., Hooshyari K., (2019), "Recent approaches to improve Nafion performance for fuel cell applications: A review", *International Journal of Hydrogen Energy*, 44 (54), 28919-28938.
- [262] Lin Y. F., Yen C. Y., Ma C. C.M., Liao S. H., Lee C. H., Hsiao Y. H., Lin H. P., (2007), "High proton-conducting Nafion®/–SO₃H functionalized mesoporous silica composite membranes", *Journal of Power Sources*, 171 (2), 388-395.
- [263] Kumar D., Sharma R. C., (1998), "Advances in conductive polymers", *European Polymer Journal*, 34 (8), 1053-1060.
- [264] Korent A., Soderžnik K. Ž., Šturm S., Rožman K. Ž., (2020), "A correlative study of polyaniline electropolymerization and its electrochromic behavior", *Journal of The Electrochemical Society*, 167 (10), 106504.
- [265] Iqbal S., Ahmad S., (2018), "Recent development in hybrid conducting polymers: synthesis, applications and future prospects", *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 60, 53-84.
- [266] Chakraborty P., Oved H., Bychenko D., Yao Y., Tang Y., Zilberzwige-Tal S., Wei G., Dvir T., Gazit E., (2021), "Nanoengineered Peptide-Based Antimicrobial Conductive Supramolecular Biomaterial for Cardiac Tissue Engineering", *Advanced Materials*, 33 (26), 2008715.
- [267] Heo D. N., Lee S. J., Timsina R., Qiu X., Castro N. J., Zhang L. G., (2019), "Development of 3D printable conductive hydrogel with crystallized PEDOT: PSS for neural tissue engineering", *Materials Science and Engineering: C*, 99, 582-590.

- [268] Shahrokhian S., Salimian R., (2018), "Ultrasensitive detection of cancer biomarkers using conducting polymer/electrochemically reduced graphene oxide-based biosensor: Application toward BRCA1 sensing", *Sensors and Actuators B: Chemical*, 266, 160-169.
- [269] Ratautaite V., Boguzaitė R., Brazy E., Ramanaviciene, A., Ciplys E., Juozapaitis M., Slibinskas R., Bechelany M., Ramanavicius A., (2022), "Molecularly imprinted polypyrrole based sensor for the detection of SARS-CoV-2 spike glycoprotein", *Electrochimica Acta*, 403, 139581.
- [270] Li S., Wei X., Wu C., Zhang B., Wu S., Lin Z., (2021), "Constructing three-dimensional structured V₂O₅/conductive polymer composite with fast ion/electron transfer kinetics for aqueous zinc-ion battery", *ACS Applied Energy Materials*, 4 (4), 4208-4216.
- [271] Ur Rehman M. N., Munawar T., Nadeem M. S., Mukhtar F., Maqbool A., Riaz M., Manzoor S., Ashiq M. N., Iqbal F., (2021), "Facile synthesis and characterization of conducting polymer-metal oxide based core-shell PANI-Pr₂O-NiO-Co₃O₄ nanocomposite: As electrode material for supercapacitor", *Ceramics International*, 47 (13), 18497-18509.
- [272] Smith R., (2005), "Biodegradable polymers for industrial applications", Woodhead Publishing.
- [273] Chandra R., Rustgi R., (1998), "Biodegradable polymers", *Progress in Polymer science*, 23 (7), 1273-1335.
- [274] Deshmukh K., Ahamed M. B., Deshmukh R. R., Pasha S. K. K., Bhagat P. R., Chidambaram K., (2017), "Biopolymer Composites with High Dielectric Performance: Interface Engineering", In: Sadasivuni K. K., Ponnamma D., Kim J., Cabibihan J. J., AlMaadeed M. A., "Biopolymer Composites in Electronics", Elsevier.
- [275] Djagny K. B., Wang Z., Xu S., (2001), "Gelatin: a valuable protein for food and pharmaceutical industries", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 41 (6), 481-492.
- [276] Klemm D., Kramer F., Moritz S., Lindström T., Ankerfors M., Gray D., Dorris, A., (2011), "Nanocelluloses: a new family of nature-based materials", *Angewandte Chemie International Edition*, 50 (24), 5438-5466.
- [277] Jorfi M., Foster E.J., (2015), "Recent advances in nanocellulose for biomedical applications", *Journal of Applied Polymer Science*, 132 (14).
- [278] Salwowska N. M., Bebenek K. A., Żądło D. A., Wcisło-Dziadecka D. L., (2016), "Physicochemical properties and application of hyaluronic acid: a systematic review", *Journal of Cosmetic Dermatology*, 15 (4), 520-526.

- [279] Chien L. J., Lee C. K., (2007), "Enhanced Hyaluronic Acid Production in *Bacillus subtilis* by Coexpressing Bacterial Hemoglobin", *Biotechnology progress*, 23 (5), 1017-1022.
- [280] Park S. B., Lih E., Park K. S., Joung Y. K., Han D. K., (2017), "Biopolymer-based functional composites for medical applications", *Progress in Polymer Science*, 68, 77-105.
- [281] Dreanca A., Muresan-Pop M., Taulescu M., Tóth Z. R., Bogdan S., Pestean C., Oren S., Toma C., Popescu A., Páll E., (2021), "Bioactive glass-biopolymers-gold nanoparticle based composites for tissue engineering applications", *Materials Science and Engineering: C*, 123, 112006.
- [282] Deng L., Wang B., Li W., Han Z., Chen S., Wang H., (2022), "Bacterial cellulose reinforced chitosan-based hydrogel with highly efficient self-healing and enhanced antibacterial activity for wound healing", *International Journal of Biological Macromolecules*, 217, 77-87.
- [283] Maleki H., Gharehaghaji A. A., Toliyat T., Dijkstra P. J., (2016), "Drug release behavior of electrospun twisted yarns as implantable medical devices", *Biofabrication*, 8 (3), 035019.
- [284] Parashar P., Kumar P., Gautam A. K., Singh N., Bera H., Sarkar S., Saraf, S. A., Saha S., (2021), "Gelatin-based Nanomaterials in Drug Delivery and Biomedical Applications", In: Bera H., Hossain C. M., Saha S., "Biopolymer-Based Nanomaterials in Drug Delivery and Biomedical Applications". Elsevier.
- [285] Ghamkhari A., Abbaspour-Ravasjani S., Talebi M., Hamishehkar H., Hamblin M. R., (2021), "Development of a graphene oxide-poly lactide nanocomposite as a smart drug delivery system", *International Journal of Biological Macromolecules*, 169, 521-531.
- [286] Nguyen H. L., Tran T. H., Hao L. T., Jeon H., Koo J. M., Shin G., Hwang D. S., Hwang S. Y., Park J., Oh D. X., (2021), "Biorenewable, transparent, and oxygen/moisture barrier nanocellulose/nanochitin-based coating on polypropylene for food packaging applications", *Carbohydrate Polymers*, 271, 118421.
- [287] Rhim J. W., Park H. M., Ha C. S., (2013), "Bio-nanocomposites for food packaging applications", *Progress in Polymer Science*, 38 (10-11), 1629-1652.
- [288] Peng Z., Zhong W., (2020), "Facile preparation of an excellent mechanical property electroactive biopolymer-based conductive composite film and self-enhancing cellulose hydrogel to construct a high-performance wearable supercapacitor", *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8 (21), 7879-7891.

- [289] Najafi M., Zahid M., Ceseracciu L., Safarpour M., Athanassiou A., Bayer I. S., (2022), "Polylactic acid-graphene emulsion ink based conductive cotton fabrics", *Journal of Materials Research and Technology*, 18, 5197-5211.
- [290] Xu T., Liu K., Sheng N., Zhang M., Liu W., Liu H., Dai L., Zhang X., Si C., Du H., (2022), "Biopolymer-based hydrogel electrolytes for advanced energy storage/conversion devices: properties, applications, and perspectives", *Energy Storage Materials*, 48, 244-262.
- [291] Aghris S., Azriouil M., Matrouf M., Ettadili F.E., Laghrib F., Saqrane S., Farahi A., Bakasse M., Lahrich S., El Mhammedi M.A., (2022), "Chitosan biopolymer coated graphite electrode as a robust electrochemical platform for the detection of the insecticide flubendiamide", *Journal of Food Composition and Analysis*, 114, 104749.
- [292] Joshi S. R., Sharma A., Kim G. H., Jang J., (2020), "Low cost synthesis of reduced graphene oxide using biopolymer for influenza virus sensor", *Materials Science and Engineering: C*, 108, 110465.
- [293] Khalilzadeh M. A., Tajik S., Beitollahi H., Venditti R. A., (2020), "Green synthesis of magnetic nanocomposite with iron oxide deposited on cellulose nanocrystals with copper ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CNC}/\text{Cu}$): investigation of catalytic activity for the development of a venlafaxine electrochemical sensor", *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 59 (10), 4219-4228.
- [294] Thirumalraj B., Sakthivel R., Chen S. M., Rajkumar C., Yu L. K., Kubendhiran S., (2019), "A reliable electrochemical sensor for determination of H_2O_2 in biological samples using platinum nanoparticles supported graphite/gelatin hydrogel", *Microchemical Journal*, 146, 673-678.
- [295] Kingsley M. P., Kalambate P. K., Srivastava A. K., (2016), "Simultaneous determination of ciprofloxacin and paracetamol by adsorptive stripping voltammetry using copper zinc ferrite nanoparticles modified carbon paste electrode", *RSC advances*, 6 (18), 15101-15111.
- [296] Kerroum M. A. A., Essyed A., Iacovita C., Baaziz W., Ihiawakrim D., Mounkachi O., Hamedoun M., Benyoussef A., Benaissa M., Ersen O., (2019), "The effect of basic pH on the elaboration of ZnFe_2O_4 nanoparticles by co-precipitation method: Structural, magnetic and hyperthermia characterization", *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 478, 239-246.
- [297] Kulkarni S. A., Sawadh P. S., Palei P. K., (2014), "Synthesis and characterization of superparamagnetic $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ nanoparticles", *Journal of the Korean Chemical Society*, 58 (1), 100-104.
- [298] Gao D., Zhang Z., Wu M., Xie C., Guan G., Wang D., (2007), "A surface functional monomer-directing strategy for highly dense imprinting of TNT at surface of silica nanoparticles", *Journal of the American Chemical Society*, 129 (25), 7859-7866.

- [299] Pedrós J., Boscá A., Martínez J., Ruiz-Gómez S., Pérez L., Barranco V., Calle F., (2016), "Polyaniline nanofiber sponge filled graphene foam as high gravimetric and volumetric capacitance electrode", *Journal of Power Sources*, 317, 35-42.
- [300] Balu S., Palanisamy S., Velusamy V., Yang T. C. K., (2019), "Sonochemical synthesis of gum guar biopolymer stabilized copper oxide on exfoliated graphite: application for enhanced electrochemical detection of H₂O₂ in milk and pharmaceutical samples", *Ultrasonics Sonochemistry*, 56, 254-263.
- [301] Raquez J. M., Murena Y., Goffin A. L., Habibi Y., Ruelle B., DeBuyl F., Dubois P., (2012), "Surface-modification of cellulose nanowhiskers and their use as nanoreinforcers into polylactide: A sustainably-integrated approach", *Composites Science and Technology*, 72 (5), 544-549.
- [302] Wu X., Wang W., Li F., Khaimanov S., Tsidaeva N., Lahoubi M., (2016), "PEG-assisted hydrothermal synthesis of CoFe₂O₄ nanoparticles with enhanced selective adsorption properties for different dyes", *Applied Surface Science*, 389, 1003-1011.
- [303] Jeseentharani V., George M., Jeyaraj B., Dayalan A., Nagaraja K.S., (2013), "Synthesis of metal ferrite (MFe₂O₄, M= Co, Cu, Mg, Ni, Zn) nanoparticles as humidity sensor materials", *Journal of experimental nanoscience*, 8 (3), 358-370.
- [304] Mohamed R. M., Rashad M. M., Haraz F. A., Sigmund W., (2010), "Structure and magnetic properties of nanocrystalline cobalt ferrite powders synthesized using organic acid precursor method", *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 322 (14), 2058-2064.
- [305] Deng J., Shao Y., Gao N., Tan C., Zhou S., Hu X., (2013), "CoFe₂O₄ magnetic nanoparticles as a highly active heterogeneous catalyst of oxone for the degradation of diclofenac in water", *Journal of hazardous materials*, 262, 836-844.
- [306] Reddy M. P., Mohamed A. M. A., Zhou X. B., Du S., Huang Q., (2015), "A facile hydrothermal synthesis, characterization and magnetic properties of mesoporous CoFe₂O₄ nanospheres", *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 388, 40-44.
- [307] Sanko V., Şenocak A., Oğuz Tümay S., Çamurcu T., Demirbas E., (2022), "Core-shell hierarchical enzymatic biosensor based on hyaluronic acid capped copper ferrite nanoparticles for determination of endocrine-disrupting bisphenol a", *Electroanalysis*, 34 (3), 561-572.
- [308] Mansour S. F., Hemedat O. M., El-Dek S. I., Salem B. I., (2016), "Influence of La doping and synthesis method on the properties of CoFe₂O₄ nanocrystals", *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 420, 7-18.

- [309] Antonello A., Jakob G., Dolcet P., Momper R., Kokkinopoulou M., Landfester, K., Munoz-Espi R., Gross S., (2017), "Synergy of miniemulsion and solvothermal conditions for the low-temperature crystallization of magnetic nanostructured transition-metal ferrites", *Chemistry of Materials*, 29 (3), 985-997.
- [310] Güy N., Özacar M., (2018), "Visible light-induced degradation of indigo carmine over ZnFe₂O₄/Tannin/ZnO: role of tannin as a modifier and its degradation mechanism", *International Journal of Hydrogen Energy*, 43 (18), 8779-8793.
- [311] Kumar L., Kumar P., Narayan A., Kar M., (2013), "Rietveld analysis of XRD patterns of different sizes of nanocrystalline cobalt ferrite", *International Nano Letters*, 3 (1), 1-12.
- [312] Yıldırım Ö. A., Durucan C., (2010), "Synthesis of zinc oxide nanoparticles elaborated by microemulsion method", *Journal of Alloys and Compounds*, 506 (2), 944-949.
- [313] Silva J. B., De Brito W., Mohallem N. D. S., (2004), "Influence of heat treatment on cobalt ferrite ceramic powders", *Materials Science and Engineering: B*, 112 (2-3), 182-187.
- [314] Joshi S., Kumar M., Chhoker S., Srivastava G., Jewariya M., Singh V. N., (2014), "Structural, magnetic, dielectric and optical properties of nickel ferrite nanoparticles synthesized by co-precipitation method", *Journal of Molecular structure*, 1076, 55-62.
- [315] Sivakuma P., Ramesh R., Ramanand A., Ponnusamy S., Muthamizhchelvan C. J. M. R. B., (2011), "Preparation and properties of nickel ferrite (NiFe₂O₄) nanoparticles via sol-gel auto-combustion method", *Materials Research Bulletin*, 46 (12), 2204-2207.
- [316] Gul S., Yousuf M. A., Anwar A., Warsi M. F., Agboola P. O., Shakir I., Shahid M., (2020), "Al-substituted zinc spinel ferrite nanoparticles: Preparation and evaluation of structural, electrical, magnetic and photocatalytic properties", *Ceramics International*, 46 (9), 14195-14205.
- [317] Yousuf M. A., Baig M. M., Al-Khalli N. F., Khan M. A., Aboud M. F. A., Shakir I., Warsi M. F., (2019), "The impact of yttrium cations (Y³⁺) on structural, spectral and dielectric properties of spinel manganese ferrite nanoparticles", *Ceramics International*, 45 (8), 10936-10942.
- [318] Foroughi F., Hassanzadeh-Tabrizi S. A., Bigham A., (2016), "In situ microemulsion synthesis of hydroxyapatite-MgFe₂O₄ nanocomposite as a magnetic drug delivery system", *Materials Science and Engineering: C*, 68, 774-779.

- [319] Swathi S., Yuvakkumar R., Kumar P. S., Ravi G., Velauthapillai D., (2021), "Annealing temperature effect on cobalt ferrite nanoparticles for photocatalytic degradation", *Chemosphere*, 281, 130903.
- [320] Magdalane C. M., Priyadharsini G. M. A., Kaviyarasu K., Jothi A. I., Simiyon G. G., (2021), "Synthesis and characterization of TiO₂ doped cobalt ferrite nanoparticles via microwave method: Investigation of photocatalytic performance of congo red degradation dye", *Surfaces and Interfaces*, 25, 101296.
- [321] Saleh T. A., Satria M., Al Moshawer D., Al Abdulgader H., (2022), "Synthesis of novel smart pH-sensitive modified silica nanoparticles for controllable oil-water separation", *Surfaces and Interfaces*, 34, 102346.
- [322] Patade S. R., Andhare D. D., Somvanshi S. B., Jadhav S. A., Khedkar M. V., Jadhav K. M., (2020), "Self-heating evaluation of superparamagnetic MnFe₂O₄ nanoparticles for magnetic fluid hyperthermia application towards cancer treatment", *Ceramics International*, 46 (16), 25576-25583.
- [323] Andhare D. D., Patade S. R., Kounsalye J. S., Jadhav K. M., (2020), "Effect of Zn doping on structural, magnetic and optical properties of cobalt ferrite nanoparticles synthesized via. Co-precipitation method", *Physica B: Condensed Matter*, 583, 412051.
- [324] Lowry G. V., Hill R. J., Harper S., Rawle A. F., Hendren C. O., Klaessig F., Nobbmann U., Sayre P., Rumble J., (2016), "Guidance to improve the scientific value of zeta-potential measurements in nanoEHS", *Environmental Science: Nano*, 3 (5), 953-965.
- [325] Lu G. W., Gao P., (2010), "Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery", In: Kulkarni V. S., "Handbook of Non-invasive Drug Delivery Systems", Elsevier.
- [326] Akhlaghi N., Najafpour-Darzi G., Barras A., Mohammadi M., Boukherroub R., Szunerits S., (2021), "Magnetic MnFe₂O₄ core-shell nanoparticles coated with antibiotics for the ablation of pathogens", *Chemical Papers*, 75 (1), 377-387.
- [327] Dabagh S., Dini G., (2019), "Synthesis of silica-coated silver-cobalt ferrite nanoparticles for biomedical applications", *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism*, 32 (12), 3865-3872.
- [328] Yamaura M., Camilo R. L., Sampaio L. C., Macedo M. A., Nakamura M., Toma H. E., (2004), "Preparation and characterization of (3-aminopropyl) triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles", *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 279 (2-3), 210-217.
- [329] Nonkumwong J., Pakawanit P., Wipatanawin A., Jantaratana P., Ananta S., Srisombat L., (2016), "Synthesis and cytotoxicity study of magnesium ferrite-

gold core-shell nanoparticles”, *Materials Science and Engineering: C*, 61, 123-132.

- [330] Jazini Zadeh R., Sayadi M., Rezaei M. R., (2020), “Removal of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid from aqueous solutions by modified magnetic nanoparticles with amino functional groups”, *Journal of Water and Environmental Nanotechnology*, 5 (2), 147-156.
- [331] Wang Z., Wang H., Liu J., Zhang Y., (2014), “Preparation and antifouling property of polyethersulfone ultrafiltration hybrid membrane containing halloysite nanotubes grafted with MPC via RATRP method”, *Desalination*, 344, 313-320.
- [332] Mirabedini A., Mirabedini S. M., Babalou A. A., Pazokifard S., (2011), “Synthesis, characterization and enhanced photocatalytic activity of TiO₂/SiO₂ nanocomposite in an aqueous solution and acrylic-based coatings”, *Progress in Organic Coatings*, 72 (3), 453-460.
- [333] Huang W., Yang X., Zhao S., Zhang M., Hu X., Wang J., Zhao H., (2013), “Fast and selective recognizes polysaccharide by surface molecularly imprinted film coated onto aldehyde-modified magnetic nanoparticles”, *Analyst*, 138 (21), 6653-6661.
- [334] Dutta M. M., Talukdar H., Phukan P., (2019), “CuI incorporated cobalt ferrite nanoparticles as a magnetically separable catalyst for oxidative amidation reaction”, *Dalton Transactions*, 48 (42), 16041-16052.
- [335] Gao M., Li W., Dong J., Zhang Z., Yang B., (2011), “Synthesis and characterization of superparamagnetic Fe₃O₄@SiO₂ core-shell composite nanoparticles”, *World Journal of Condensed Matter Physics*, 1 (2), 49-54.
- [336] Kooti M., Nasiri E., (2015), “Phosphotungstic acid supported on silica-coated CoFe₂O₄ nanoparticles: an efficient and magnetically-recoverable catalyst for N-formylation of amines under solvent-free conditions”, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 406, 168-177.
- [337] Wang H., Huang J., Wang C., Li D., Ding L., Han Y., (2011), “Immobilization of glucose oxidase using CoFe₂O₄/SiO₂ nanoparticles as carrier”, *Applied Surface Science*, 257 (13), 5739-5745.
- [338] Aygar G., Kaya M., Özkan N., Kocabıyık S., Volkan M., (2015), “Preparation of silica coated cobalt ferrite magnetic nanoparticles for the purification of histidine-tagged proteins”, *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 87, 64-71.
- [339] Bai Y., Cui Y., Paoli G.C., Shi C., Wang D., Zhou M., Zhang L., Shi X., (2016), “Synthesis of amino-rich silica-coated magnetic nanoparticles for the efficient capture of DNA for PCR”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 145, 257-266.

- [340] Araghi S. H., Entezari M. H., Chamsaz M., (2015), "Modification of mesoporous silica magnetite nanoparticles by 3-aminopropyltriethoxysilane for the removal of Cr (VI) from aqueous solution", *Microporous and Mesoporous Materials*, 218, 101-111.
- [341] Moritz M., Geszke-Moritz M., (2015), "Mesoporous materials as multifunctional tools in biosciences: principles and applications", *Materials Science and Engineering: C*, 49, 114-151.
- [342] Yang X., Qiu P., Yang J., Fan Y., Wang L., Jiang W., Cheng X., Deng Y., Luo W., (2021), "Mesoporous materials-based electrochemical biosensors from enzymatic to nonenzymatic", *Small*, 17 (9), 1904022.
- [343] Kim M. G., Kang J. M., Lee J. E., Kim K. S., Kim K. H., Cho M., Lee S. G., (2021), "Effects of calcination temperature on the phase composition, photocatalytic degradation, and virucidal activities of TiO₂ nanoparticles", *ACS Omega*, 6 (16), 10668-10678.
- [344] Kurtuldu F., Mutlu N., Michálek M., Zheng K., Masar M., Liverani L., Chen S., Galusek D., Boccaccini A. R., (2021), "Cerium and gallium containing mesoporous bioactive glass nanoparticles for bone regeneration: Bioactivity, biocompatibility and antibacterial activity", *Materials Science and Engineering: C*, 124, 112050.
- [345] Isasi J., Arévalo P., Martín E., Martín-Hernández F., (2019), "Preparation and study of silica and APTES-silica-modified NiFe₂O₄ nanocomposites for removal of Cu²⁺ and Zn²⁺ ions from aqueous solutions", *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 91 (3), 596-610.
- [346] Yang H., Zheng K., Zhang Z., Shi W., Jing S., Wang L., Zheng W., Zhao D., Xu J., Zhang P., (2012), "Adsorption and protection of plasmid DNA on mesoporous silica nanoparticles modified with various amounts of organosilane", *Journal of Colloid and Interface Science*, 369 (1), 317-322.
- [347] Makuła P., Pacia M., Macyk W., (2018), "How to correctly determine the band gap energy of modified semiconductor photocatalysts based on UV-Vis spectra", *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 9, 6814-6817.
- [348] Cheng Y., He L., Xia G., Ren C., Wang Z., (2019), "Nanostructured g-C₃N₄/AgI composites assembled by AgI nanoparticles-decorated g-C₃N₄ nanosheets for effective and mild photooxidation reaction", *New Journal of Chemistry*, 43 (37), 14841-14852.
- [349] Chaturvedi S., Das R., Poddar P., Kulkarni S., (2015), "Tunable band gap and coercivity of bismuth ferrite-polyaniline core-shell nanoparticles: the role of shell thickness", *RSC Advances*, 5 (30), 23563-23568.
- [350] Nia S. M., Kheiri F., Jannatdoust E., Sirousazar M., Chianeh V.A., Kheiri G., (2021), "A Highly Sensitive Non-Enzymatic Urea Sensor Based on Ni(OH)

$\text{Mn}_3\text{O}_4/\text{rGO}/\text{PANi}$ Nanocomposites Using Screen-Printed Electrodes”, *Journal of The Electrochemical Society*, 168 (6), 067504.

- [351] Li J., Zhang J., Yang J. H., (2022), “Research progress and applications of nickel-based catalysts for electrooxidation of urea”, *International Journal of Hydrogen Energy*, 47, 7693-7712.
- [352] Kumar V., Kaur I., Arora S., Mehla R., Vellingiri K., Kim K. H., (2020), “Graphene nanoplatelet/graphitized nanodiamond-based nanocomposite for mediator-free electrochemical sensing of urea”, *Food chemistry*, 303, 125375.
- [353] Hussain S., Park S.Y., (2020), “Sweat-based noninvasive skin-patchable urea biosensors with photonic interpenetrating polymer network films integrated into PDMS Chips”, *ACS Sensors*, 5 (12), 3988-3998.
- [354] Wang W., Wang W., Davis J. J., Luo X., (2015), “Ultrasensitive and selective voltammetric aptasensor for dopamine based on a conducting polymer nanocomposite doped with graphene oxide”, *Microchimica Acta*, 182 (5), 1123-1129.
- [355] Kumar V., Mahajan R., Kaur I., Kim K. H., (2017), “Simple and mediator-free urea sensing based on engineered nanodiamonds with polyaniline nanofibers synthesized in situ”, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9 (20), 16813-16823.
- [356] Słoniowska A., Pałys B., (2014), “Supramolecular polyaniline hydrogel as a support for urease”, *Electrochimica Acta*, 126, 90-97.
- [357] Luo Y. C., Do J. S., (2004), “Urea biosensor based on PANi (urease)-Nafion®/Au composite electrode”, *Biosensors and Bioelectronics*, 20 (1), 15-23.
- [358] Magar H. S., Hassan R. Y. A., Mulchandani A., (2021), “Electrochemical impedance spectroscopy (EIS): Principles, construction, and biosensing applications”, *Sensors*, 21 (19), 6578.
- [359] Zhang F., Fan L., Liu Z., Han Y., Guo Y., (2022), “A label-free electrochemical aptasensor for the detection of cancer antigen 125 based on nickel hexacyanoferrate nanocubes/polydopamine functionalized graphene”, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 116424.
- [360] Huq T., Salmieri S., Khan A., Khan R. A., Le Tien, C., Riedl B., Frascini C., Bouchard J., Uribe-Calderon J., Kamal M. R., (2012), “Nanocrystalline cellulose (NCC) reinforced alginate based biodegradable nanocomposite film”, *Carbohydrate Polymers*, 90 (4), 1757-1763.
- [361] Kawalerczyk J., Walkiewicz J., Dziurka D., Mirski R., Brózdowski J., (2022), “APTES-Modified Nanocellulose as the Formaldehyde Scavenger for UF Adhesive-Bonded Particleboard and Strawboard”, *Polymers*, 14 (22), 5037.

- [362] Tümay S. O., Şanko V., Demirbas E., Şenocak A., (2020), "Fluorescence determination of trace level of cadmium with pyrene modified nanocrystalline cellulose in food and soil samples", *Food and Chemical Toxicology*, 146, 111847.
- [363] Đurđić S., Ognjanović M., Ristivojević M. K., Antić B., Veličković T. Č., Mutić J., Kónya Z., Stanković D., (2022), "Voltammetric immunoassay based on MWCNTs@Nd(OH)₃-BSA-antibody platform for sensitive BSA detection", *Microchimica Acta*, 189 (11), 1-12.
- [364] Xu S., Zhang Y., Zhu Y., Wu J., Li K., Lin G., Li X., Liu R., Liu X., Wong C. P., (2019), "Facile one-step fabrication of glucose oxidase loaded polymeric nanoparticles decorating MWCNTs for constructing glucose biosensing platform: Structure matters", *Biosensors and Bioelectronics*, 135, 153-159.
- [365] Li F., Liu R., Dubovyk V., Ran Q., Li B., Chang Y., Wang H., Zhao H., Komarneni S., (2022), "Three-dimensional hierarchical porous carbon coupled with chitosan based electrochemical sensor for sensitive determination of niclosamide", *Food Chemistry*, 366, 130563.
- [366] El-Moghazy A. Y., Huo J., Amaly N., Vasylieva N., Hammock B. D., Sun G., (2020), "An innovative nanobody-based electrochemical immunosensor using decorated nylon nanofibers for point-of-care monitoring of human exposure to pyrethroid insecticides", *ACS Applied Materials & Interfaces*, 12 (5), 6159-6168.
- [367] Colmati F., Sgobbi L. F., Teixeira G. F., Vilela R. S., Martins T. D., Figueiredo G. O., (2019), "Electrochemical Biosensors Containing Pure Enzymes or Crude Extracts as Enzyme Sources for Pesticides and Phenolic Compounds with Pharmacological Property Detection and Quantification", In: Rincken T., Kivirand K., "Biosensors for Environmental Monitoring", IntechOpen.
- [368] Huang Y., Yan X., He Q., Qiu J., Zhang Y., Han L., (2023), "Ceria and gold co-decorated porous MoS₂@graphene nanocomposite electrochemical electrode integrated with smartphone-controlled microstation for simultaneous dual metal ions detection", *Electrochimica Acta*, 437, 141509.
- [369] Parsaee Z., (2018), "Synthesis of novel amperometric urea-sensor using hybrid synthesized NiO-NPs/GO modified GCE in aqueous solution of cetrimonium bromide", *Ultrasonics Sonochemistry*, 44, 120-128.
- [370] Wang Z., Liu S., Wu P., Cai C., (2009), "Detection of glucose based on direct electron transfer reaction of glucose oxidase immobilized on highly ordered polyaniline nanotubes", *Analytical Chemistry*, 81 (4), 1638-1645.
- [371] Huang C., Li A., Li L. J., Chao Z. S., (2017), "Synthesis of quinolines from aniline and propanol over modified USY zeolite: catalytic performance and mechanism evaluated by in situ Fourier transform infrared spectroscopy", *RSC Advances*, 7 (40), 24950-24962.

- [372] Zu L., Cui X., Jiang Y., Hu Z., Lian H., Liu Y., Jin Y., Li Y., Wang X., (2015), "Preparation and electrochemical characterization of mesoporous polyaniline-silica nanocomposites as an electrode material for pseudocapacitors", *Materials*, 8 (4), 1369-1383.
- [373] Lee Y. H., Kim C. A., Jang W. H., Choi H. J., Jhon M. S., (2001), "Synthesis and electrorheological characteristics of microencapsulated polyaniline particles with melamine-formaldehyde resins", *Polymer*, 42 (19), 8277-8283.
- [374] Kochana J., Wapiennik K., Kozak J., Knihnicki P., Pollap A., Woźniakiewicz M., Nowak J., Kościelniak P., (2015), "Tyrosinase-based biosensor for determination of bisphenol A in a flow-batch system", *Talanta*, 144, 163-170.
- [375] Zhang Y., Zhang W., Zhang L., Song G., Wang N., Xu W., Huang W., (2021), "A molecularly imprinted electrochemical BPA sensor based on multi-walled carbon nanotubes modified by CdTe quantum dots for the detection of Bisphenol A", *Microchemical Journal*, 170, 106737.
- [376] Tian C., Chen D., Lu N., Li Y., Cui R., Han Z., Zhang G., (2018), "Electrochemical bisphenol A sensor based on nanoporous PtFe alloy and graphene modified glassy carbon electrode", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 830, 27-33.
- [377] Wang X., Shi, Y., Shan J., Zhou H., Li, M., (2020), "Electrochemical sensor for determination of bisphenol A based on MOF-reduced graphene oxide composites coupled with cetyltrimethylammonium bromide signal amplification", *Ionics*, 26 (6), 3135-3146.
- [378] Razavipanah I., Rounaghi G. H., Deiminiat B., Damirchi S., Abnous K., Izadyar M., Khavani M., (2019), "A new electrochemical aptasensor based on MWCNT-SiO₂@Au core-shell nanocomposite for ultrasensitive detection of bisphenol A", *Microchemical Journal*, 146, 1054-1063.
- [379] Hua Z., Qin Q., Bai X., Wang C., Huang X., (2015), "β-Cyclodextrin inclusion complex as the immobilization matrix for laccase in the fabrication of a biosensor for dopamine determination", *Sensors and Actuators B: Chemical*, 220, 1169-1177.
- [380] Sidwaba U., Ntshongontshi N., Feleni U., Wilson L., Waryo T., Iwuoha E. I., (2019), "Manganese peroxidase-based electro-oxidation of bisphenol A at hydrogellic polyaniline-titania nanocomposite-modified glassy carbon electrode", *Electrocatalysis*, 10 (4), 323-331.
- [381] He L., Yang Y., Kim J., Yao L., Dong X., Li T., Piao Y., (2020), "Multi-layered enzyme coating on highly conductive magnetic biochar nanoparticles for bisphenol A sensing in water", *Chemical Engineering Journal*, 384, 123276.
- [382] Yu Z., Luan Y., Li H., Wang W., Wang X., Zhang Q., (2019), "A disposable electrochemical aptasensor using single-stranded DNA-methylene blue

complex as signal-amplification platform for sensitive sensing of bisphenol A”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 284, 73-80.

- [383] Liu H., Hassan M., Bo X., Guo L., (2019), “Fumarate-based metal-organic framework/mesoporous carbon as a novel electrochemical sensor for the detection of gallic acid and luteolin”, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 849, 113378.
- [384] Jemmeli D., Dridi C., Abbas M. N., Dempsey E., (2021), “Development of highly sensitive and selective bisphenol A sensor based on a cobalt phthalocyanine-modified carbon paste electrode: application in dairy analysis”, *Analytical Methods*, 13 (39), 4674-4682.
- [385] Liu C., Sun Z. C., Pei W. Y., Yang J., Xu H. L., Zhang J. P., Ma J. F., (2021), “A porous metal-organic framework as an electrochemical sensing platform for highly selective adsorption and detection of bisphenols”, *Inorganic Chemistry*, 60 (16), 12049-12058.
- [386] Baghayeri M., Amiri A., Fayazi M., Nodehi M., Esmaeelnia A., (2021), “Electrochemical detection of bisphenol a on a MWCNTs/CuFe₂O₄ nanocomposite modified glassy carbon electrode”, *Materials Chemistry and Physics*, 261, 124247.
- [387] Liu Q., Kang X., Xing L., Ye Z., Yang Y., (2020), “A facile synthesis of nanostructured CoFe₂O₄ for the electrochemical sensing of bisphenol A”, *RSC Advances*, 10 (11), 6156-6162.
- [388] Kesavan G., Nataraj N., Chen S. M., Lin L. H., (2020), “Hydrothermal synthesis of NiFe₂O₄ nanoparticles as an efficient electrocatalyst for the electrochemical detection of bisphenol A”, *New Journal of Chemistry*, 44 (19), 7698-7707.
- [389] Fernandes P. M. V., Campiña J. M., Silva A. F., (2020), “A layered nanocomposite of laccase, chitosan, and Fe₃O₄ nanoparticles-reduced graphene oxide for the nanomolar electrochemical detection of bisphenol A”, *Microchimica Acta*, 187 (5), 262.
- [390] Fartas F. M., Abdullah J., Yusof N. A., Sulaiman Y., Saiman M. I., Zaid M. H. J. C. A. C., (2020), “Laccase Electrochemical Biosensor Based on Graphene-Gold/Chitosan Nanocomposite Film for Bisphenol A Detection”, *Current Analytical Chemistry*, 16 (5), 570-579.
- [391] Zou J., Yuan M. M., Huang Z. N., Chen X. Q., Jiang X. Y., Jiao F. P., Zhou N., Zhou Z., Yu J. G., (2019), “Highly-sensitive and selective determination of bisphenol A in milk samples based on self-assembled graphene nanoplatelets-multiwalled carbon nanotube-chitosan nanostructure”, *Materials Science and Engineering: C*, 103, 109848.
- [392] Kamil Reza K., Azahar Ali M., Singh M. K., Agrawal V. V., Biradar A. M., (2017), “Amperometric enzymatic determination of bisphenol A using an ITO

electrode modified with reduced graphene oxide and Mn₃O₄ nanoparticles in a chitosan matrix”, *Microchimica Acta*, 184 (6), 1809-1816.

- [393] Liu Q., Kang X., Xing L., Ye Z., Yang Y., (2020), “A facile synthesis of nanostructured CoFe₂O₄ for the electrochemical sensing of bisphenol A”, *RSC Advances*, 10 (11), 6156-6162.
- [394] Šutka A., Gross K. A., (2016), “Spinel ferrite oxide semiconductor gas sensors”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 222, 95-105.
- [395] El-Akaad S., Mohamed M. A., Elmasri M. M., Abdelwahab N. S., Abdelaleem E. A., De Saeger S., Beloglazova N., (2020), “3D bismuth ferrite microflowers electrochemical sensor for the multiple detection of pesticides”, *Journal of The Electrochemical Society*, 167 (2), 027543.
- [396] Colombo R. N. P., Sedenho G. C., Crespilho F. N., (2022), “Challenges in Biomaterials Science for Electrochemical Biosensing and Bioenergy”, *Chemistry of Materials*.
- [397] Fan R., Andrew T. L., (2020), “Perspective—Challenges in developing wearable electrochemical sensors for longitudinal health monitoring”, *Journal of The Electrochemical Society*, 167 (3), 037542.
- [398] Walcarius A., Minter S. D., Wang J., Lin Y., Merkoçi A., (2013), “Nanomaterials for bio-functionalized electrodes: recent trends”, *Journal of Materials Chemistry B*, 1 (38), 4878-4908.
- [399] Quesada-González D., Merkoçi A., (2018), “Nanomaterial-based devices for point-of-care diagnostic applications”, *Chemical Society Reviews*, 47 (13), 4697-4709.

ÖZGEÇMİŞ

Lise eğitimini Oruç Reis Anadolu Lisesi'nde tamamlayan Vildan Şanko, 2005 yılında Kocaeli Üniversitesi Rafineri ve Petrokimya Bölümü ön lisans eğitimine başladı ve 2007 yılında mezun oldu. Aynı yıl Adnan Menderes Üniversitesi Kimya Bölümü'nde lisans eğitimine başladı ve 2012 yılında mezun oldu. 2017 yılında ise Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimini tamamladı. Aynı yıl Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında doktora eğitimine başladı. Doktora eğitimi sırasında TÜBİTAK 2211-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı ve YÖK 100/2000 doktora programı kapsamında burs almaya hak kazandı. 2022 yılında Yurt İçi Doktora Sonrası Araştırma Burs Programı kapsamında destek almaya uygun görüldü ve doktora eğitimi sonrasında Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü'nde doktora sonrası araştırmacı olarak akademik çalışmalarına devam edecektir.

EKLER

Ek A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayınlar

Şanko V., Şenocak A., Tümay S.O., Çamurcu T., Demirbas E., (2022), “Core-shell hierarchical enzymatic biosensor based on hyaluronic acid capped copper ferrite nanoparticles for determination of endocrine-disrupting bisphenol A”, *Electroanalysis*, 34, 561-572.

Şanko V., Şenocak A., Tümay S.O., Demirbas E., (2023), “A novel comparative study for electrochemical urea biosensor design: effect of different ferrite nanoparticles (MFe₂O₄, M: Cu, Co, Ni, Zn) in urease immobilized composite system”, *Bioelectrochemistry*, 149, 108324.

Ek B: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Bildiriler

Şanko V., Şenocak A., Demirbas E., (2020), “Kobalt Ferrit İçeren Nanokompozit Sistemlerin Elektrokimyasal Üre Biyosensörü Olarak Geliştirilmesi”, 32. Ulusal Kimya Kongresi, 100, Türkiye, 17-19 Eylül (Sözlü Sunum).

Şanko V., Şenocak A., Tümay S.O., Çamurcu T., Demirbas E., (2021), “Synthesis, Optimization and Electrochemical Sensor Application of Copper Ferrite Nanoparticles”, World Congress on Applied Nanotechnology, 121, Erzurum/Turkey, 24-26 November (Oral Presentation).

Şanko V., Şenocak A., Tümay S.O., Demirbas E., (2022), “Enzimatik Elektrokimyasal Biyosensör Tasarımında Biyopolimer Etkisinin İncelenmesi”, 34. Ulusal Kimya Kongresi, 56, Türkiye, 17-19 Eylül (Sözlü Sunum).

Şanko V., Şenocak A., Tümay S.O., Demirbas E., (2022), “Effect of Calcination Temperature on Structural and Morphological Properties of Nickel Ferrite Nanoparticles and Biosensor Application”, 16th Nanoscience and Nanotechnology Conference, 250, Ankara/Turkey, 5-8 September (Poster Presentation).

Şanko V., Şenocak A., Tümay S.O., Demirbas E., (2022), “Design and Characterization of Zinc Ferrite Nanoparticles as Enzyme Immobilization Matrix”, 16th Nanoscience and Nanotechnology Conference, 251, Ankara/Turkey, 5-8 September (Poster Presentation).

Şanko V., A. Şenocak, S.O. Tümay, T. Çamurcu, E. Demirbaş, Different Behaviors of Soluble and Insoluble Biopolymers in Electrochemical Urea Biosensor, 5th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences, 23-25 November 2022, Ankara, Turkey (Oral Presentation).

Şanko V., A. Şenocak, S.O. Tümay, T. Çamurcu, E. Demirbaş, New Approaches to Increase Lifetime in Enzymatic Urea Biosensor, 9th International Marmara Science and Social Science Congress, 9-10 December 2022, Kocaeli, Turkey (Oral Presentation).