T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YEŞİL SENTEZ YÖNTEMİ İLE BAKIR OKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU VE ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTESİ

Buse Simge AKINAN OKTAY

DANIŞMAN
Doç. Dr. TUBA GÜRKAYNAK ALTINÇEKİÇ

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Proses ve Reaktör Tasarımı Programı

İSTANBUL-2023

Bu çalışma, 6.01.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Proses ve Reaktör Tasarımı Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Doç. Dr. Tuba GÜRKAYNAK ALTINÇEKİÇ(Danışman)
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi

Doç. Dr. Emel AKYOL
Yıldız Teknik Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Prof. Dr. Gülin Selda POZAN SOYLU
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi

Unvan Adı SOYADI
Üniversite
Fakülte

Unvan Adı SOYADI
Üniversite
Fakülte

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

.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca tez çalışmalarımın gerçekleştirilmesinde çok emeği geçen, engin tecrübeleri ve bilgileri ile bana destek olan, yardımlarını benden esirgemeyen, her zaman yol gösteren, güler yüzünü ve samimiyetini hiçbir zaman eksik etmeyen sevgili danışman hocam Doç. Dr. Tuba Altınçekiç GÜRKAYNAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında her zaman desteklerini ve yardımlarını gördüğüm, bilgilerini benimle paylaşan hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Hasan ÖZDEMİR'e ve Arş. Gör. Dilara GÜÇTAŞ'a teşekkür ederim.

Tez dahilinde yapılan mikrobiyal analizler için büyük çaba harcayan, bilgilerinden istifade ettiğim, bizden desteğini esirgemeyen hocam Prof. Dr. Rasime DEMİREL'e teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan, bu günlere en iyi şekilde gelmemi sağlayan, hiçbir zaman benden sevgilerini ve desteklerini esirgemeyen annem Gülay AKALIN ve babam Yüksel AKINAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Son olarak, bu zorlu süreçte her zaman yanımda olan, beni motive eden, sevgisini ve desteğini her zaman bana hissettiren sevgili eşim Yağız OKTAY'a sonsuz teşekkür ederim.

Ocak 2023 Buse Simge AKINAN OKTAY

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ ..... **iv**
İÇİNDEKİLER ..... **v**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **viii**
TABLO LİSTESİ ..... **ixi**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **xii**
ÖZET ..... **xiv**
SUMMARY ..... **xvi**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL KISIMLAR **3**
2.1. NANOTEKNOLOJİ 3
2.2. NANOPARTİKÜLLER 4
2.2.1.Metalik Nanopartiküller 5
2.3. BAKIR NANOPARTİKÜLLERİN ÖZELLİKLERİ VE KULLANIM ALANLARI 6
2.4. BAKIR OKSİT NANOPARTİKÜLLERİN ÖZELLİKLERİ VE KULLANIM ALANLARI 7
2.5. NANOPARTİKÜLLER VE ÇEVRE ÜZERİNE ETKİLERİ 8
2.6. NANOPARTİKÜLLER VE SAĞLIK ÜZERİNE ETKİLERİ 9
2.6.1.Bakır Nanopartiküllerin Sağlık ve Çevre Üzerine Etkileri 11
2.6.2.Bakır Oksit Nanopartiküllerin Sağlık ve Çevre Üzerine Etkileri 11
2.7. BAKIR NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZ YÖNTEMLERİ 11
2.7.1.Kimyasal Yöntemler 11
2.7.2.Fiziksel Yöntemler 13
2.7.3.Biyolojik Yöntemler 13
2.8. BAKIR OKSİT NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZ YÖNTEMLERİ 15
2.8.1.Sol-Jel 15
2.8.2.Sonokimyasal Sentez 16
2.8.3.Elektrokimyasal Sentez 16
2.8.4.Katı Hal Reaksiyonu 16

2.8.5.Mikrodalga Işıma ile Sentez 16
2.9. YEŞİL SENTEZ 16
2.10.CEVİZ YAPRAĞI (*JUGLANS REGIA L.*)....18
2.10.1.Ceviz Yaprağı *(Juglans Regia L.)* Özellikleri....18
2.10.2.Ceviz Yaprağında *(Juglans Regia L.)* Bulunan Bileşikleri....19
2.10.3.Ceviz Yaprağının Kullanıldığı Tedavi Alanları....21
2.11.DENEYSEL TASARIM....21
2.11.1.Box-Behnken Deneysel Tasarımı 22
3. MALZEME VE YÖNTEM....24
3.1. DENEYLERDE KULLANILAN MALZEMELER....24
3.2. CEVİZ YAPRAĞI EKSTRAKTININ HAZIRLANMASI 25
3.3. BAKIR SÜLFAT ÇÖZELTİSİNİN HAZIRLANMASI 27
3.4. BAKIR OKSİT NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ....28
3.5. DENEYLERDE KULLANILAN CİHAZLAR....31
3.5.1.Hassas Terazi 31
3.5.2.Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı....31
3.5.3.Santrifüj....32
3.5.4.Etüv 32
3.5.5.Kül Fırını....32
3.5.6.X-Işını Kırınımı (XRD) 33
3.5.7.Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)....34
3.5.8.Termogravimetrik Analiz (TG/DTA) 35
3.6. CEVİZ YAPRAKLARI İLE YAPILAN DENEYSEL ÇALIŞMALAR 35
3.6.1.Box-Behnken Deneysel Tasarımı 35
3.6.2.Antibakteriyel Testler 36
3.6.2.1.Test Mikroorganizmaları....36
3.6.2.2.Kullanılan Besi Ortamları 37
3.6.2.3.Çözelti ve Kimyasallar....39
3.6.2.3.1.Fizyolojik Tuzlu Su (FTS)....39
3.6.2.3.2.Tween 80....39
3.6.2.3.3.DMSO (Dimetil Sülfoksit) Hazırlanması 39
3.6.2.4.Yöntem....39
3.6.2.4.1.Test Mikroorganizmalarının Aktivasyonu ve Hücre Süspansiyonunun Hazırlanması....39
3.6.2.4.2.Test Maddelerinin Hazırlanması 40

3.6.2.5.Minimum İnhibe Edici Konsantrasyonun (MİK) Belirlenmesi 40
3.6.2.6.Minimum Fungisidal Konsantrasyonun (MFK) Belirlenmesi 40
4. BULGULAR.....42
4.1. XRD SONUÇLARI.....42
4.2. SEM SONUÇLARI.....54
4.3. TGA SONUÇLARI.....55
4.4. ANTİBAKTERİYEL TEST SONUÇLARI.....56
4.4.1.Minimum İnhibe Edici Konsantrasyonun (MİK) Belirlenmesi.....56
4.4.2.Minimum Fungisidal Konsantrasyonun (MFK) Belirlenmesi.....56
4.5. BOX-BEHNKEN DENEYSEL TASARIM SONUÇLARI.....59
4.5.1.Kristalin Boyutuna göre Sonuçlar.....59
4.5.1.1.Kristalin Boyutu için Modelin Belirlenmesi ve Doğrulanması.....63
4.5.1.2.Kristalin Boyutuna Proses Parametrelerinin Etkisi.....63
4.5.1.2.1.Konsantrasyon Etkisi.....63
4.5.1.2.2.Sıcaklık Etkisi.....63
4.5.1.2.3.Ekstrakt Miktarı Etkisi.....64
4.5.1.3.Kristalin Boyutu için Optimizasyon.....65
4.5.2.MFK (Minimum Fungisidal Konsantrasyon) Değerine göre Sonuçlar.....66
4.5.2.1.MFK Değeri için Modelin Belirlenmesi ve Doğrulanması.....67
4.5.2.2.MFK Değerine Proses Parametrelerinin Etkisi.....70
4.5.2.2.1.Konsantrasyon Etkisi.....70
4.5.2.2.2.Sıcaklık Etkisi.....70
4.5.2.2.3.Ekstrakt Miktarı Etkisi.....71
4.5.2.3.MFK Değeri için Optimizasyon.....72
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....74
KAYNAKLAR.....85
ÖZGEÇMİŞ.....96

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Nano kristallerin diğer moleküller ile karşılaştırılması.....5

Şekil 2.2: Ceviz yaprağı *(Juglans Regia L.)* gösterimi [120].....18

Şekil 2.3: Ceviz yaprağındaki fenolik bileşiklerin kimyasal yapısı (1) 3-kafeoilkinik asit (2) 3-p-kumaroilkinik asit. (3) 5- kafeoilkinik asit; (4) 4-p-kumaroilkinik asit; (5) p-kumaroik asit (6) kersetin 3-galaktozit (7) kersetin 3-pentozit türevleri (8) kersetin 3- arabinozit; (9) kersetin 3-ksilozit; (10) kersetin 3-ramnozit.....20

Şekil 2.4: Juglon'un kimyasal yapısı (5-hidroksi-1,4-naftakinon).....20

Şekil 2.5: Merkezi nokta ve köşelerin orta noktalarını içeren bir küp 22

Şekil 2.6: Birbirine kenetlenen 2^2 faktöriyel tasarımdan oluşan bir figür ve bir merkez nokta. 23

Şekil 3.1: Bakır sülfat tozu 24

Şekil 3.2: Arifoğlu'ndan tedarik edilen ceviz yaprağı.....24

Şekil 3.3: Millipore Direct-Q markalı saf su cihazı 25

Şekil 3.4: Blenderdan geçirilecek ceviz yaprakları 25

Şekil 3.5: Blenderdan geçirilmiş ceviz yaprakları.....26

Şekil 3.6: Ceviz yaprağı ekstraktı için deney düzeneği.....26

Şekil 3.7: Filtreden süzüntü işlemi 27

Şekil 3.8: Filtreden süzülmüş ekstrakt.....27

Şekil 3.9: Bakır sülfat çözeltisi.....28

Şekil 3.10: Bakır sülfat çözeltisi (a), $CuSO_4$ çözeltisine eklenen ceviz yaprağı ekstraktı (b) 28

Şekil 3.11: 24 saat sonunda ceviz yaprağı ekstraktı ve $CuSO_4$ çözelti karışımı (a), 72 saat sonunda oluşan CuO NP karışımı (b).....29

Şekil 3.12: Santrifüj öncesi (a), 1.yıkama (b), 2.yıkama (c) 3.yıkama (d) 29

Şekil 3.13: Etüv öncesi 30
Şekil 3.14: Etüv sonrası 30
Şekil 3.15: Kalsinasyon sonrası CuO tozları 30
Şekil 3.16: Radwag marka hassas terazi 31
Şekil 3.17: IKA C-MAG marka ısıtıcılı manyetik karıştırıcı 31
Şekil 3.18: Hettich marka santrifüj cihazı 32
Şekil 3.19: Termal markalı etüv cihazı 32
Şekil 3.20: Nabertherm marka kül fırını 33
Şekil 4.1: Deney 1'e ait XRD grafiği (T:500°C; 0.125M $CuSO_4$, %5 Ekstrakt) 43
Şekil 4.2: Deney 2'ye ait XRD grafiği (T:400°C; 0.05M $CuSO_4$, %5 Ekstrakt) 43
Şekil 4.3: Deney 3'e ait XRD grafiği (T:400°C; 0.05M $CuSO_4$, %20 Ekstrakt) 44
Şekil 4.4: Deney 4'e ait XRD grafiği (T:500°C; 0.125M $CuSO_4$, %20 Ekstrakt) 44
Şekil 4.5: Deney 5'e ait XRD grafiği (T:500°C; 0.2M $CuSO_4$, %12,5 Ekstrakt) 45
Şekil 4.6: Deney 6'ya ait XRD grafiği (T:400°C; 0.125M $CuSO_4$, %12,5 Ekstrakt) 45
Şekil 4.7: Deney 7'ye ait XRD grafiği (T:400°C; 0.125M $CuSO_4$, %12,5 Ekstrakt) 46
Şekil 4.8: Deney 8'e ait XRD grafiği (T:400°C; 0.2M $CuSO_4$, %5 Ekstrakt) 46
Şekil 4.9: Deney 9'a ait XRD grafiği (T:500°C; 0.05M $CuSO_4$, %12,5 Ekstrakt) 47
Şekil 4.10: Deney 10'a ait XRD grafiği (T:400°C; 0.125M $CuSO_4$, %12,5 Ekstrakt) 47
Şekil 4.11: Deney 11'e ait XRD grafiği (T:300°C; 0.125M $CuSO_4$, %20 Ekstrakt) 48
Şekil 4.12: Deney 12'e ait XRD grafiği (T:300°C; 0.125M $CuSO_4$, %5 Ekstrakt) 48
Şekil 4.13: Deney 13'e ait XRD grafiği (T:300°C; 0.05M $CuSO_4$, %12,5 Ekstrakt) 49
Şekil 4.14: Deney 14'e ait XRD grafiği (T:300°C; 0.2M $CuSO_4$, %12,5 Ekstrakt) 49
Şekil 4.15: Deney 15'e ait XRD grafiği (T:400°C; 0.125M $CuSO_4$, %12,5 Ekstrakt) 50
Şekil 4.16: Deney 16'ya ait XRD grafiği (T:400°C; 0.125M $CuSO_4$, %12,5 Ekstrakt) 50
Şekil 4.17: Deney 17'ye ait XRD grafiği (T:400°C; 0.2M $CuSO_4$, %20 Ekstrakt) 51
Şekil 4.18: 300°C'de kalsine edilen numunelerin XRD diyagramları 51
Şekil 4.19: 400°C'de kalsine edilen numunelerin XRD diyagramları 52

Şekil 4.20: 400°C'de kalsine edilen aynı parametredeki numunelerin XRD diyagramları 52

Şekil 4.21: 500°C'de kalsine edilen numunelerin XRD diyagramları 53

Şekil 4.22: 500°C'de kalsine edilen D5 numunesinin SEM görüntüleri.....54

Şekil 4.23: 500°C'de kalsine edilen D5 numunesinin SEM analizinde tanecik boyutları görüntüsü 55

Şekil 4.24: Kalsine edilmeyen D9 numesine ait TGA grafiği.....55

Şekil 4.25: Elde edilen ve tahmin edilen kristalin boyutu değerlerine ait karşılaştırma grafiği 62

Şekil 4.26: Kristalin boyutu değerleri üzerine proses parametrelerinin etkisini gösteren kübik grafik 62

Şekil 4.27: Kristalin boyutuna konsantrasyon parametresi etkisinin 3D gösterimi 63

Şekil 4.28: Kristalin boyutuna sıcaklık parametresi etkisinin 3D gösterimi.....64

Şekil 4.29: Kristalin boyutuna ekstrakt miktarı parametresi etkisinin 3D gösterimi 65

Şekil 4.30: BBT'nin verdiği kristalin boyutuna göre optimum deney koşulları 66

Şekil 4.31: Elde edilen ve tahmin edilen MFK değerlerine ait karşılaştırma grafiği 69

Şekil 4.32: MFK değerleri üzerine proses parametrelerinin etkisini gösteren kübik grafik 69

Şekil 4.33: MFK değerine konsantrasyon parametresi etkisinin 3D gösterimi.....70

Şekil 4.34: MFK değerine sıcaklık parametresi etkisinin 3D gösterimi.....71

Şekil 4.35: MFK değerine ekstrakt miktarı parametresi etkisinin 3D gösterimi.....72

Şekil 4.36: BBT'nin verdiği MFK'ya göre optimum deney koşulları 73

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: Parametreler ve değerler. 35

Tablo 3.2: Box-Behnken tasarım koşulları 36

Tablo 3.3: Mueller Hinton Agar (MHA) (Biomark B263) besi ortamı 37

Tablo 3.4: Mueller Hinton Broth (MHB) (Biomark B367) besi ortamı 37

Tablo 3.5: Sabouraud 2% Glukoz Agar (SGA) (Fluka 84086) besi ortamı 37

Tablo 3.6: Sabouraud %2 Dekstroz Broh (SDB) (Merck 1.08339.0500) besi ortamı 38

Tablo 3.7: Potato Dekstroz Agar (PDA) (Biomark B300) besi ortamı 38

Tablo 3.8: Potato Dekstroz Broth (PDB) (Biomark B037) besi ortamı 38

Tablo 4.1: Kalsine sonrası toz numunelerin kristalin boyutu ve kafes parametre değerleri 53

Tablo 4.1: Kalsine sonrası toz numunelerin kristalin boyutu ve kafes parametre değerleri (devamı).....54

Tablo 4.2: Test maddelerinin MİK değerleri (µg/mL) [1] 57

Tablo 4.3: Test maddelerinin MFK değerleri (µg/mL) [2] 58

Tablo 4.4: Box-Behnken tasarım koşulları ve kristalin boyutları 59

Tablo 4.5: Kristalin boyutu için doğrusal model varyans analizi 60

Tablo 4.6: Kristalin boyutu için karelerin sıralı model toplamı 61

Tablo 4.7: Kristalin boyutu için uyum istatistikleri.....61

Tablo 4.8: MFK değeri için doğrusal model varyans analizi 67

Tablo 4.9: MFK değeri için karelerin sıralı model toplamı.....67

Tablo 4.10: MFK değeri için uyum istatistikleri 68

Tablo 5.1: BBT ve mikrobiyal aktivite sonuçları 82

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler **Açıklama**

ºC : santigrat derece
µg : mikrogram
µm : mikrometre
mL : mililitre
θ : teta
MHz : Megahertz
GHz : Gigahertz
V : volt
A : amper
cfu : toplam bakteri sayımının birimi (coloni forming units)
rpm : dakikadaki devir sayısı
dk : dakika

Kısaltmalar **Açıklama**

nm : nanometre
NM : Nanomalzeme
NP : Nanopartikül
Cu : Bakır
CuNP : Bakır Nanopartikül
CuO : Bakır Oksit
CuO NP : Bakır Oksit Nanopartikül
Cu/ PAA : Bakır/ Poli Akrilik Asit
$CuSO_{\circ}.5H_2O$: Bakır sülfat penta hidrat
MA : Moleküler Ağırlık
YÇTEM : Yüksek Çözünürlüklü Transmisyon Elektron Mikroskobu
SDBS : Sodyum dodesil benzensülfonat
NADH : Nikotinamid adenin dinükleotid hidrit
NADPH : Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
XRD : X-Işını Kırınımı (X-Ray Diffraction)
SEM : Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope)

TG/DTA : Termogravimetrik Analiz

BBT : Box-Behnken Tasarım

2FI : İki faktörlü etkileşim için sıralı kareler toplamı

TMV : Tütün mozaik virüsü

MİK : Minimum İnhibasyon Konsantrasyon

MFK : Minimum Fungisidal Konsantrasyon

MHA : Mueller Hinton Agar

MHB : Mueller Hinton Broth

SGA : Sabouraud Glukoz Agar

SGB : Sabouraud Glukoz Broth

PDA : Potato Dekstroz Agar

PDB : Potato Dekstroz Broth

FTS : Fizyolojik Tuzlu Su

DMSO : Dimetil Sülfoksit

CLSI : Klinik ve Laboratuvar Standartlaro Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standard Institue)

ROS : Reaktif oksijen türleri

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YEŞİL SENTEZ YÖNTEMİ İLE BAKIR OKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU VE ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTESİ

Buse Simge AKINAN OKTAY

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Tuba GÜRKAYNAK ALTINÇEKİÇ

Son yıllarda nanoteknolojiye duyulan büyük ilgi sayesinde, nanoteknolojinin tıp, endüstri, tarım gibi alanlarda etkisini ölçmek için bilim insanları tarafından bir dizi çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Biyo ve nano tekniklerin entegrasyonu sonucu, biyoteknoloji olarak bilinen nanomalzemelerin (NM'lerin) biyolojik sentezi, nanoteknolojiden doğmuştur. Son yıllarda nanoteknoloji metal nanopartiküllerin sentezi için kimyasal ve fiziksel yöntemlere alternatif olarak, güvenilir, toksik olmayan, çevre dostu ve temiz yöntemler sunmuştur.

Nanoteknoloji ile bitki biyoteknolojisini birbirine bağlayan, nanopartiküllerin bitkiler tarafından sentezi yeşil sentez yaklaşımıdır. Metal iyonlarının biyo-indirgenmesi için bitki özleri kullanılarak nanopartikül oluşturan bu yöntem oldukça dikkat çekmektedir.

Sık kullanılan bitki özlerinden biri olan ceviz, çok geniş kullanım alanına sahip bir bitkidir ve geçmişten günümüze sağlık ve tıp alanında birçok faydasının dokunmasıyla ünlüdür. Juglans Regia (ceviz), antibakteriyel, antimikrobiyal, antioksidan, antifungal etkileri sebebiyle birçok araştırmaya konu olmuştur. Uzun yıllardır antimikrobiyal ajan olarak kullanılan bakır ise güçlü bir antibakteriyel aktivite ortaya çıkarmaktadır. Bakır nanopartiküllerinin (Cu NP'lerinin) farklı gram pozitif ve gram negatif bakterilerine karşı geniş bir antibakteriyel aktivite gösterdiği bilinmektedir.

Bu çalışmada; bakır oksit nanopartikülleri (CuO NP'ler), ceviz yaprağı (Juglans Regia L.) bitki özütü kullanılarak, oda sıcaklığında yeşil sentez yöntemi ile sentezlenmiştir. Bakır tuzu miktarı,

ceviz yaprağı ekstraktı miktarı ve kalsinasyon sıcaklığı olmak üzere üç sentez parametresine dayandırılarak, Box-Behnken deneysel tasarımına dayalı yüzey metodolojisi uygulanmıştır. Box-Behnken deneysel tasarım sisteminde verilen 17 deney numunesi hazırlanmıştır ve deneysel tasarım ile optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Üretilen CuO NP'lerin XRD (X-Işını Kırınımı), SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu), TGA (Gravimetrik) analizleri ile karakterizasyonları ve antibakteriyel özellikleri incelenmiştir.

Yeşil sentez yöntemi ile bakır tuzu, ceviz yaprağı ekstraktı ile oda sıcaklığında reaksiyona bırakılmıştır. CuO oluşumunu gösteren kahverengimsi renk değişimi, 72 saat bekletilen çözeltilerde görülerek nanopartikül oluşumu varlığı gözlemlenmiştir. Daha sonra numuneler 300 ºC, 400 ºC ve 500 ºC de 2 saat kalsine edilerek XRD analizi ile karakterize edilmiştir. XRD sonuçları incelendiğinde, D14 numunesi haricindeki tüm analizlerde kristal yapılı CuO NP'leri oluşumu gerçekleşmiştir. D17 numunesinde CuO NP dışında, CuSO4 oluşumunu içeren safsızlık piklerine rastlanmıştır. D14 numunesinde ise sadece Cu varlığı görülmüştür. XRD analizindeki 2θ değerleri ile Debye-Scherrer denklemi kullanılarak numunelerin kristal boyutları ve kafes parametreleri hesaplanmıştır. Numunelere ait ortalama kristal boyutları 13,39 nm- 25,26 nm, kafes parametreleri ise 4,96 A°-6,79 A° aralığındadır. SEM analizi ile D5 numunesinin yüzey morfolojileri incelenerek, ortalama 14 µm partikül boyutuna sahip küresel ve homojen yapılı nanopartiküllerin varlığı görülmüştür.

Termogravimetrik (TGA) analiz ile kalsine edilmeyen D9 numunesinde bakır oksit nanopartiküllerinde çok fazla ağırlık kaybı olduğu görülmüştür. İlk aşamada, 200 ºC altında numune üzerinde kalan ve adsorbe edilen suyun buharlaşmasından dolayı ağırlık kaybı görülmektedir. Diğer aşamada ise 200 ºC'den sonra ani bir ağırlık kaybı görülmüştür. 200 ºC ve üzerindeki sıcaklıklarda oluşan nanopartiküller dekompoze olmuştur.

Box-Behnken deneysel tasarımdaki verilere göre sentezi etkileyen parametrenin ekstrakt miktarı olduğu görülmüştür. Tasarım programına göre kristalin boyutu verileri ve MFK (Minimum fungisidal konsantrasyon) değerleri incelediğinde D12 numunesinin gerçekleşme koşulları, optimum koşullara sahip deney olarak ortaya çıkmıştır. Bu koşullar incelendiğinde optimum koşullar; bakır tuzu konsantrasyonu 0,125 M, kalsinasyon sıcaklığı 300 ºC, ceviz yaprağı ekstraktı miktarı %5, kristalin boyutu 24,51 nm ve MFK değeri 113,051 µg/mL olduğu görülmüştür. Yapılan mikrobiyolojik analizlere göre tüm numuneler 250 µg/mL konsantrasyonda antibakteriyel etki gösterirken, bunun yanı sıra D8, D12, D13 ve D17 numaralı numuneler başarılı antifungal etki göstermiştir.

Ocak 2023, 113 sayfa.

Anahtar kelimeler: Bakır oksit nanopartikülleri, yeşil sentez, *Juglans Regia L.*, antibakteriyel etki, Box-Behnken tasarım

SUMMARY

PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF COPPER OXIDE NANOPARTICLES WITH GREEN SYNTHESIS METHOD

M.Sc. THESIS

Buse Simge AKINAN OKTAY

Istanbul University-Cerrahpasa

Institute of Graduate Studies

Department of Chemical Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Tuba GÜRKAYNAK ALTINÇEKİÇ

Thanks to the great interest in nanotechnology in recent years, a number of studies have been carried out by scientists to measure the effect of nanotechnology in fields such as medicine, industry, agriculture.

As a result of the integration of bio and nano techniques, the biological synthesis of nanomaterials, known as biotechnology, was born from nanotechnology. In recent years, nanotechnology has offered safe, non-toxic, environmentally friendly and clean methods for the synthesis of metal nanoparticles as an alternative to chemical and physical methods.

The synthesis of nanoparticles by plants, which connects nanotechnology and plant biotechnology, is a green synthesis approach. This method, which forms nanoparticles using plant extracts for the bioreduction of metal ions, attracts a lot of attention.

Walnut, one of the frequently used plant extracts, is a plant with a wide range of uses and is famous for its many benefits in the field of health and medicine from past to present. Juglans Regia (Walnut) has been the subject of many researches due to its antibacterial, antimicrobial, antioxidant and antifungal effects.

Copper, which has been used as an antimicrobial agent for many years, reveals a strong antibacterial activity. It is known that copper nanoparticles (Cu NPs) show broad antibacterial activity against different gram positive and gram negative bacteria.

In this study; copper oxide nanoparticles (CuO NPs) were synthesized by green synthesis method using walnut leaf (Juglans Regia L.) plant extract. The surface methodology based on Box-Behnken experimental design was applied, based on three synthesis parameters: copper salt amount, walnut leaf extract amount and calcination temperature. 17 test samples given in the Box-Behnken experimental design system were prepared and their optimization was carried out with the experimental design. Characterization and antibacterial properties of the produced CuO NPs were investigated by XRD (X-Ray Diffraction), SEM (Scanning Electron Microscopy), TGA (Gravimetric) analysis.

With the green synthesis method, copper salt was left to react with walnut leaf extract at room temperature. The brownish color change indicating CuO formation was observed in the solutions that were kept for 72 hours, and the presence of nanoparticle formation was observed. Afterwards, the samples were calcined at 300 ºC, 400 ºC and 500 ºC for 2 hours and characterized by XRD analysis. When the XRD results were examined, crystalline CuO NPs were formed in all analyzes except the D14 sample.Apart from CuO NP, impurity peaks including CuSO4 formation were found in D17 sample.In the D14 sample, only presence of Cu was observed.The crystal sizes and lattice parameters of the samples were calculated using the 2θ values in the XRD analysis and the Debye-Scherrer equation.The average crystal sizes of the samples are between 13.39 nm - 25.26 nm, and the lattice parameters are in the range of 4.96 A°-6.79 A°. By examining the surface morphologies of the D5 sample with SEM analysis, the presence of spherical and homogeneous nanoparticles with an average particle size of 14 µm was observed.

With thermogravimetric (TGA) analysis, it was observed that there was a lot of weight loss in the copper oxide nanoparticles of D9 sample, which was not calcined. In the first stage, a weight loss is observed due to the evaporation of absorbed water on the sample at a temperature below 200ºC. In the other stage, a sudden weight loss was observed after 200 ºC. Nanoparticles formed at temperatures of 200 ºC and above were decomposed.

According to the data in the Box-Behnken experimental design, it was seen that the parameter affecting the synthesis was the amount of extract. When the crystalline size data and MFC (Minimum fungicidal concentration) values were examined according to the design program, the realization conditions of the D12 sample emerged as an experiment with optimum conditions. When these conditions are examined, the optimum conditions are; copper salt concentration was 0.125 M, calcination temperature was 300 ºC, walnut leaf extract amount was 5%, crystalline size was 24.51 nm and MFK value was 113,051 µg/mL. According to the microbiological analysis, all samples showed antibacterial effect at 250 µg/mL concentration, while samples D8, D12, D13 and D17 showed successful antifungal effects.

January 2023, 2022 113 pages.

Keywords: Copper oxide nanoparticles, green synthesis, *Juglans Regia L.*, antibacterial activity, Box-Behnken design

1. GİRİŞ

Nanoteknoloji, mühendislik, malzeme bilimi, kimya, fizik, biyoloji ve tıp gibi çeşitli alanlarda maddenin nano ölçekteki (1-100 nm) haliyle karşımıza çıkmaktadır [1]. Bu ölçek içerisinde maddeyi karakterize eden geniş yüzey alanı-hacim oranı, kütle bileşenlerininkine kıyasla, spesifik, optik, manyetik, arayüzey, elektrik ve kimyasal gibi benzersiz özellikler verir [2]. Nanomalzemelerin ve nanoteknolojinin uygulanması, özellikle biyotıp, enerji, eczacılık, gıda, tarım ve çevre gibi birçok endüstriyel sektörde ilgi çekmiştir. Bir Business Wire raporu, küresel nanoteknoloji pazarının gelecek yıllarda %18,1'lik yıllık büyüme oranıyla 2025 yılına kadar 173,95 milyar dolarlık bir pazar büyüklüğüne ulaşmaya hazır olduğunu doğrulamaktadır [3].

Nanoteknolojinin atık su ve kirlenmiş toprak işleme, iyileştirme, sensörler ve enerji depolama gibi çevrenin spesifik durumlarında kullanım alanları mevcuttur [4]. Nanoteknolojinin çevre alanına olan bu uygulamaları, mevcut çevre sorunlarını çözmeye (reaktif uygulama) veya gelecekteki sorunları önlemeye (proaktif uygulama) yönelik olabilir. Reaktif uygulamalar, su arıtma, çevresel algılama ve iyileştirmeyi içerirken, proaktif uygulamalar öncellikle yeşil üretimi, güneş ve yakıt hücreleri gibi uygun maliyetli alternatif enerji kaynaklarının araştırılmasını inceler. Çevresel nanoteknolojinin ana hedeflerinden biri, potansiyel çevresel faydaları olan nanomalzemelerin güvenli tasarımı ve sürdürülebilir gelişimidir [5].

Yeşil nanoteknoloji, insan sağlığını ve potansiyel çevresel riskleri en aza indirmek için temiz teknolojiler geliştirmeyi amaçlayan teknolojidir. Yeşil nanoteknoloji, birçok açıdan nanoteknolojinin olası ve pratik uygulamalarının geniş çeşitliliğini sürdürülebilir kalkınmanın gerekliliği ile eşleştirme zorunluluğundan kaynaklanan nanoteknolojinin doğal evrimidir. Nanoteknoloji alanındaki kapsamlı araştırmalar, enerji, endüstri ve çevre alanlarındaki geniş kapsamlı etkiye sahip yeşil, güvenilir, verimli ve ekonomik yaklaşımların oluşmasıyla sonuçlanmıştır [6].

Nanoteknolojideki son gelişmeler, çevre dostu, uygun maliyetli sentezleme yöntemine odaklanır ve nanopartiküllerin yeşil sentezi, biyolojik kaynakları kullanarak nanomalzemenin

çevre dostu ve güvenli bir sentez yöntemidir. Bu yeşil yaklaşım, güvenli nanoteknolojide yeni bir çağın kapısını açmıştır [7].

Bitkiler, ağır metal birikimi ve detoksifikasyon için büyük potansiyele sahiptirler [8]. Çeşitli araştırmalara göre *Arabidopsis halleri* ve *Thlaspi caerulescens* gibi bitkiler tarafından toksik metallerin detoksifikasyonunu ve hiper birikiminin yaygınlığını göstermiştir [9,10]. *Acanthopanax sciadophylloides* gibi farklı bitki türleri, *Maytenus founieri, Brassica juncea, Ilex crenata, Sesbania drummondii* ve *Clethra barbinervis* gibi ağır metallerin fitoremediasyonu için potansiyel kapasiteye sahiptirler [8, 11]. Eser elementler (ağır metaller ve metaloidler) önemli çevresel kirleticiler olarak bilinirler ve çok düşük konsantrasyonlarda bile toksiktirler. Sulu çözeltilerden (biyosorpsiyon) metal giderimi için bitki biyokütlesinin kullanımı, çevre dostu bir yaklaşımla atıklardan kirleticilerin giderilmesi için çok umut verici olduğundan çok fazla dikkat çekmiştir [12].

Ceviz *(Juglans Regia L.), Juglandaceae* familyasına ait olan, çeşitli hastalıkların ve kanserin tedavisinde, Hint ve Arap geleneksel tıp sistemlerinde oldukça sık kullanılan bir bitki türüdür. *Juglans Regia L.*, bir antikanser, tonik, kan temizleyici ve detoksifiye edici ajan olarak tanımlanır [13].

Bakır nanoparçacıklarına olan ilgi, örneğin gümüşten çok daha düşük bir maliyet ile iyi termal ve elektriksel iletkenlik gibi bu metalin faydalı özelliklere sahip olmasından kaynaklanır [14]. Bu özellikler, elektronik sistemler [15] ve iletken mürekkepler [16] için soğutma sıvılarında potansiyel uygulamaya yol açmaktadır. Ayrıca Yoon ve diğ. (2007), bakır nanopartiküllerinin, gümüş nanopartiküllere kıyasla daha üstün antibakteriyel aktivite gösterdiğini incelemişlerdir [17]. Bakır nanoparçacıklarının tıpta ve antimikrobiyal maddelerin üretiminde geleceğe dair ışık tutan özellikleri vardır [18].

Bu çalışmanın temel amacı; Ceviz yaprağı *(Juglans Regia L.)* bitki özütü kullanılarak yeşil kimya yöntemi ile sentezlenen bakır oksit nanopartiküllerini Box-Behnken deneysel tasarım yöntemi uygulanarak incelenmesi, karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi ve antibakteriyel özelliklerinin araştırılmasını ortaya koymaktır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. NANOTEKNOLOJİ

Nanoteknoloji, 1 ile 100 nm arasında nano aralıktaki, farklı sentez türleri ile parçacık yapısı ve boyut değişikliklerine bağlı olarak değişen nano boyutlu parçacıkların hazırlanmasına dayandırılan bir bilim dalıdır [19, 20]. Nanoteknoloji tıp, çevresel iyileştirme, bilgi teknolojisi ve enerji dönüşümü, nano ölçekte çalışan diş hekimliği, eczacılık ve biyomühendislik gibi çeşitli bilim alanlarına farklı odak noktaları sunan bir bilimdir [20,21]. Atomik veya moleküler ölçekte boyutlara sahip malzemelerin kullanımı tıbbi uygulamalar için giderek daha fazla kullanılmaya başlandığından çok sayıda mikroorganizmanın aktivitesini öldürmeye veya azaltmaya yönelik bir yaklaşım olarak nanoteknoloji büyük ilgi görmektedir [22]. Nanoteknoloji, atomların ve moleküllerin veya molekül zincirlerinin yeni ya da tamamen farklı özelliklere sahip malzeme ve yapıların üretilmesine yol açacak şekilde manipülasyonu sayesinde veya kendi kendine bir araya gelmesidir [23]. Nanoteknolojideki son gelişmeler çevre dostu, uygun maliyetli sentezleme yöntemlerine odaklanmaktadır [24]. Nanoteknoloji, sentezleri ve uygulamaları sırasında yeşil sentez ilkelerini de dahil ederek çevresel olarak sürdürülebilir ve güvenli nanomalzemelerin geliştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. ‘Yeşil’ terimi, biyo-temelli veya nanoteknolojik süreçleri ifade etmek için yaygın olarak kullanılır. Bu bağlamda, sentez proseslerinin çevresel sürdürülebilirliğini karşılaştırmak, optimize etmek ve ölçmek için nanoteknolojiye çevresel sürdürülebilirlik matrisleri uygulanabilir. Bu sayede yeşil senteze ve nanoteknolojisindeki uygulamasına yeni bir bakış açısı kazandırılır. Aynı zamanda biyo-tabanlı nanobiyoteknoloji ve nano sentezin geliştirilmesinde yeşil sentez ilkelerinin kullanımının bir analizini sağlayarak, kantitatif analiz için sürdürülebilirlik ölçütlerinin kullanımına özel vurgu yapar [21].

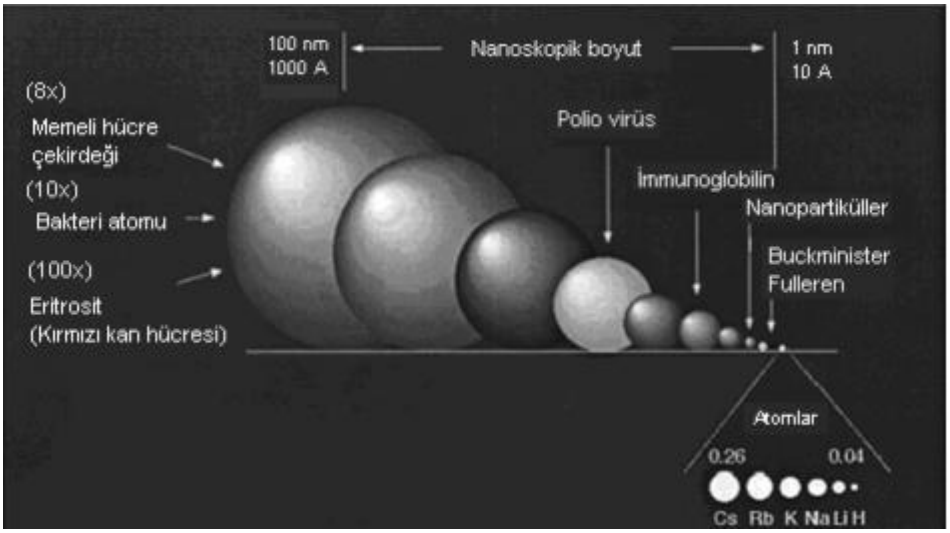
Nanoteknolojik araştırmalarda öne çıkmış iki yaklaşım vardır: Birincisi aşağıdan yukarıya yaklaşım, üretilen nanoyapıların moleküler tanıma ilkeleriyle daha yüksek makro ölçekli yapılar halinde birleştirilmesi ve organize edilmesi için yeni malzemelerin veya cihazların projeksiyonu ve geliştirilmesi ile ilgilidir. Nano ölçekteki partikül biçimlerine; nano çubuklar, nanotüpler, nano gözenekler, nano kabuklar, nano küreler, nano sürücüler, nano kayışlar, nano halkalar, kuantum noktaları, fullerenler, lipozomlar, nano kapsüller, dendrimerler örnek

verilebilir. Yukarıdan aşağıya yaklaşımda ise mevcut malzemeler nano ölçekte küçültülür, ardından istenen özellikleri elde etmek için moleküller yeniden düzenlenir [25].

Nanopartiküller insanlık ve çevre için sürdürülebilir teknolojilerin geliştirilmesinde çok önemlidir [24]. Nanoparçacıkların kontrollü üretimi, nanoteknolojiyi en umut verici ve bilimsel araştırma alanlarından biri haline getirmiştir [26].

2.2. NANOPARTİKÜLLER

Nanopartiküller, 1-100 nm boyut aralığında en az bir dış boyutu olan parçacıklar olarak adlandırılırlar. Nanopartiküller (NP'ler), nano ölçekli üç dış boyutun tümüne sahip olan katı parçacıklardır. Kaba malzemeye kıyasla fiziko-kimyasal özellikleri büyük ölçüde değiştirilebilir. Kimyasal bileşime, biyolojik faaliyetlere, boyuta ve şekle bağlı olarak eylemleri açıklayabilir. Nanoteknolojiden, biyo nanoteknoloji olarak bilinen nanomalzemelerin biyolojik sentezi için biyo ve nano tekniklerin entegrasyonu ortaya çıkmıştır. Biyolojik sentez, nano boyutlu partiküller üretmek için biyolojik ilkeler olan indirgeme/oksidasyon gibi mikrobiyal enzimler veya bitki fitokimyasalları ile fiziksel ve kimyasal yaklaşımları birleştirir. NM'ler geniş yüzey alanı/ hacim oranı göstermektedir ve bu sayede endüstrilerde geniş uygulama alanlarına sahiptir. Özellikle son yıllarda, NM'ler, tüketici ürünleri, enerji, ulaşım, kozmetik, ilaç, antimikrobiyal ajanlar ve tarım olmak üzere ekonominin birçok sektöründe iyileştirmedeki olumlu etkilerinden dolayı ilgi görmektedir. İnorganik NP'lerin sentezi, birçok fiziksel ve kimyasal yolla gerçekleşmektedir. Kimyasal yöntemlerin verimliliği oldukça düşüktür, çevre dostu değildir, maliyeti yüksektir ve toksiktir. Bu sebeple, bitkilerden ya da mikroplardan hücre dışı veya hücre içi biyolojik sentez bir üstünlük kazanmıştır [27]. Moleküler faz ve yoğunlaştırılmış faz arasında nano materyaller sayesinde bir köprü kurulmaktadır ve bu sebeple nano materyallerin optik ve manyetik özellikleri, erime noktaları, kristal morfolojileri gibi çeşitli özelliklerinde değişiklikler olabilir. Nano kristal yapıların boyutunu anlamak adına dünyadaki diğer küçük şeyler ile kıyaslama yapmak mümkündür. Şekil 2.1'de nano kristal yapı ile virüs, bakteri gibi moleküllerin karşılaştırma görseli verilmiştir [28].



Şekil 2.1: Nano kristallerin diğer moleküller ile karşılaştırılması.

Çeşitli nanoparçacık türleri arasında bakır ve bakır oksit nanoparçacıkları, katalitik, mekanik, manyetik, elektrik ve termal özellikleri ile dikkat çekmektedir. Tarımsal, endüstriyel, çevresel ve tıbbi uygulamalar dahil olmak üzere birçok alanda uygulamaları vardır. Bunlara ek olarak bakır ve bakır oksit nanoparçacıkları kataliz, sensörler, boyaların bozunması, mantar öldürücü ve nem öldürücü uygulamalarda da kullanılmaktadırlar [29].

2.2.1. Metalik Nanopartiküller

Metalik nanopartiküller, yeni nesil nano cihazların geliştirilmesinde kullanmak isteyen kimyagerler, fizikçiler, biyologlar ve mühendislerden büyük bir ilgi görmüştür [30]. Son derece küçük boyutları ve özel yüzey alanları sayesinde yeni kimyasal ve fiziksel özellikler sergileyen metal nanopartiküller popülerlik kazanmıştır. Metal nanopartiküllerin optoelektronik, nano cihazlar, nano elektronik, nano sensörler ve kataliz gibi alanlarda uygulamaları vardır [31]. Bu küçük parçacıklar, spesifik aktivite ve seçiciliğe sahip katalizörler üzerinde araştırma yapmak için ön plana çıkan malzemelerdir. Nanoparçacıkların erime noktası, boyutları küçüldükçe azalır. Metaller arasında bakır nanoparçacıklar, katalitik ve optik özellikleri, yüksek elektrik ve ısı iletkenliği sayesinde dikkat çekmektedir [32]. Bakır nanopartikülleri katalitik, optik, elektriksel ve antifungal/ antibakteriyel uygulamaları sayesinde metal partiküller arasında daha fazla dikkat çekmiştir [31]. Birçok araştırmacı, artan çevre dostu özelliklerine ihtiyaç duymaları sebebiyle farklı metal nanopartiküller için yeşil sentez yöntemini kullanmaktadır. Genellikle metal nanopartiküller, çözelti yakma, kimyasal yer değiştirme yöntemleri vb. gibi çeşitli yöntemler ile sentezlenir [33]. Metal nanopartiküller antibakteriyel ve antifungal aktivite

gösterirler [34]. Metal nanopartiküller, optik, katalitik, elektronik, manyetik ve antibakteriyel özellikleri içeren olağanüstü fizikokimyasal özelliklerinden dolayı yüksek bir spesifik yüzey alanına ve yüzey atomlarına sahiptir. Metal nanoparçacıkların sentezi, elektronik, kimya, enerji ve tıp geliştirme gibi farklı alanlarda potansiyel uygulanabilirlikleri nedeniyle çok büyüktür. (Saxena ve diğ., 2012). Metal nanoparçacıklar özellikle soy metallar, esas olarak serbest elektron gazının, grup uyarılmasının neden olduğu görünür bölgede güçlü optik absorpsiyonları nedeniyle incelenmiştir (Mohammed ve diğ., 2000) [35].

2.3. BAKIR NANOPARTİKÜLLERİN ÖZELLİKLERİ VE KULLANIM ALANLARI

Bakır nanopartiküllerinin üretimi gelişmekte olan bir teknoloji sürecidir ve konuyla ilgili birçok çalışma ortaya çıkmıştır. Bakır (Cu), bir yanda iyi elektriksel ve termal iletkenliğe sahip, diğer yanda oksidasyona karşı uzun vadeli stabilite direncine sahip ucuz bir malzemedir. Bu avantajlar, nanopartikül yapımına uygun, iyi bir şekilde kimyasal ve elektrokimyasal özellikler sergileyen bakır (II) oksit için de söylenebilir. Bakır veya bakır oksit içeren partiküller belirli optik parametreler uygularlar ve fotokatalist sentezinde kullanılabilirler.

Bakır nanopartikülleri (CuNP'ler), tarım, endüstri mühendisliği ve teknolojik alanlarda geniş uygulamalara sahiptir. Tarım ve bitki ekonomisinde bazı küçük unsurların gerekliliğini tespit etmek için son yıllarda çok fazla çalışma yapılmıştır. Biyo nanoteknoloji, belirli işlevlere sahip nano boyutlu parçacıkları üretmek için biyolojik ilkeleri fiziksel ve kimyasal yaklaşımlarla birleştirir. Nanoteknolojinin tarımda kullanımı ağırlıklı olarak teorik olmasına rağmen, Cu NP'ler tarafından tarım sektörü için gösterilen etkili antibakteriyel aktiviteler, nanoteknoloji alanındaki araştırmaları arttırmıştır. Böylece CuNp'lerinin yoğun, uygun maliyetli ve verimli biyosentez tekniklerinin geliştirilmesinde etkili olmuştur [27]. Bakır nanopartikülleri tıpta geniş bir uygulama alanına sahiptir. Bakır nanoparçacıkların sentezi için fiziksel ve kimyasal yöntemler toksik kimyasallar kullanmaktadır, ancak nanopartiküllerin yeşil sentezi, doğal bitki, meyve, yaprak veya tohum özlerini kullanır ve tıbbi uygulamalar için güvenlidir [33].

Bakır nanoparçacıkları farklı yöntemlerle sentezlenebilir ve karakterize edilebilir [36]. Bakır nanoparçacıklar için geliştirilmiş sentez yöntemlerine kimyasal indirgeme [37, 38], termal bozunma [39, 40], poliol [41, 42], lazerle ablasyon [43], elektron ışını ışınlaması [44], mikrodalga ışınlaması [31] ve kimyasal sentetik yollar örnek verilebilir [45].

Bakır parçacıklara olan ilgi, örneğin gümüşten çok daha düşük bir maliyetle beraber iyi termal ve elektriksel iletkenlik gibi faydalı özelliklerinin bulunmasından kaynaklanmaktadır. Bu, elektronik sistemler [46] ve iletken mürekkepler [47] için soğutma sıvılarında potansiyel uygulamaya yol açar. Bakır nanopartiküller, plazmon yüzey rezonansı sebebiyle optik cihazlarda, optik anahtarlarda veya fotokromik camlar gibi doğrusal olmayan optik malzemelerde birçok uygulama ile sonuçlanabilecek gelişmiş doğrusal olmayan optik özellikler sergiler [48].

2.4. BAKIR OKSİT NANOPARTİKÜLLERİN ÖZELLİKLERİ VE KULLANIM ALANLARI

Metal oksit nanopartiküller (NP'ler), optoelektronik, nano cihazlar, nano elelektronik, nano sensörler, bilgi depolama ve katalizdeki potansiyel uygulamalar gibi çeşitli alanlarda büyük ilgi görmüştür. Çeşitli metal oksit NP'leri arasında bakır oksit (CuO), bakır bileşikleri ailesinin en basit üyesidir ve yüksek sıcaklık, süper iletkenlik, elektron korelasyon etkileri ve dönüş dinamiği gibi birçok faydalı fiziksel özellik gösterdiği için özellikle dikkat çekmiştir. Bakır oksit nanopartiküller (CuO NP'ler) kataliz piller, gaz sensörleri, ısı transfer sıvıları ve güneş enerjisi gibi çeşitli uygulamalarda giderek daha fazla kullanılmaktadır. CuO kristal yapıları, kullanışlı fotokatalitik ve fotovoltaik özellikler veren dar bir bant aralığına sahiptir. Farklı mikroorganizma türleri nedeniyle hava, su ve toprağın mikrobiyal kontaminasyonu, yaşam koşullarında sorun yaratır ve sağlıkta ciddi bir sorundur. Antibiyotiğe dirençli enfeksiyonların yayılması nedeniyle, küçük antibiyotikler, katyonik polimerler, metal NP'ler ve antimikrobiyal peptitler gibi alternatif antimikrobiyal ajanlara ilgi artmıştır [49].

Bakır Oksit (CuO) nanoparçacıkları, antimikrobiyal olarak, gaz sensörlerinde ve pillerde, güneş enerjisi dönüştürme araçlarında vb uygulamaları sebebiyle önemlidir. İnsanoğlu, bakır (Cu) ve Cu komplekslerini yüzyıllardır su arıtıcıları, alg öldürücüleri, mantar öldürücüleri gibi çeşitli amaçlarla, antibakteriyel ve çürüme önleyici maddeler olarak kullanmaktadır [50].

Tüm nanopartiküller arasında, özellikle metal oksit nanopartiküllerinde, bakır oksit nanopartikülleri (CuO NP'ler), çok yönlü özellikleri sayesinde nano tıp ve biyomedikal bilimler gibi farklı alanlardaki uygulamaları ile ilgi odağı olmuştur. Bakır oksit nanopartikülleri, kimyasal, fiziksel ve biyolojik yöntemler gibi çeşitli yaklaşımlarla sentezlenebilirler. Fizikokimyasal teknikler pahalı olduğu gibi aynı zamanda çevreye yüksek toksik kimyasallar

salarak yüksek enerji tüketmektedir. Buna karşın biyolojik yöntem, bakır oksit nanopartiküllerini sentezlemek için çevre dostu, düşük maliyetli, güvenilir ve daha basit bir yoldur [51]. Kimyasal ve fiziksel yaklaşımlarla sentezlenen bakır oksit nanopartiküllerinin, tıbbi uygulamalarda olumsuz etkilere neden olabilecek, çevreye salınan veya malzemelerin yüzeyinde absorbe edilen oldukça toksik kimyasalların kullanılması, yüksek maliyet, düşük ürün verimliliği, yüksek enerji tüketimi gibi bazı sınırlamalar vardır. Yeşil sentez ise bakır oksit nanoparçacıkları için çevre dostu, uygun maliyetli, güvenli, sağlam, kararlı ve daha uzun raf ömrü sağlayan bir yöntemdir.

2.5. NANOPARTİKÜLLER VE ÇEVRE ÜZERİNE ETKİLERİ

Nanopartiküller (NP'ler), yığın malzemeye kıyasla fiziko-kimyasal özellikleri büyük ölçüde değiştirilebilen, nano ölçekte üç dış boyutun tümüne sahip katı parçacıklardır. Kimyasal bileşime, biyolojik eylemlere, boyuta ve şekle bağlı olarak aksiyonları tanımlayabilir [27].

Bu bağlamda Cu / CuO (bakır/ bakır II oksit) NP'lerini sentezlemek için fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere farklı kategoriler bulunmaktadır. Elektron kaynağı, yani indirgeyici madde kimyasal bir bileşik olduğunda yöntem kimyasal, elektron kaynağı elektrik akımı gibi fiziksel bir kaynak olduğunda yöntem fiziksel, elektron kaynağı bir organizma olduğunda ise yöntem biyolojiktir. Kimyasal yöntemler, geleneksel ve yeşil kimyasal yöntemler olmak üzere iki temel sınıfa ayrılır. Geleneksel kimyasal yöntemler çoğunlukla indirgeyici ajan olarak sodyum borohidrit, hipofosfit ve hidrazin gibi toksik sentetik kimyasalları kullanırken, yeşil kimyasal yöntemler ise genellikle indirgeyici ajan olarak sitrik asit ve Askorbik asit gibi doğal kimyasalları kullanır. Yeşil kimyasal yöntemler geleneksel yöntemlere göre toksik değildirler, çevre dostudurlar ve daha uygun maliyetlidirler. Şu anda, birçok metodoloji yüksek miktarda enerji tüketen toksik indirgeyici maddeler veya karmaşık prosedürler kullanmaktadır. Böylece birçok araştırmacı, daha az toksik ve hatta toksik olmayan kimyasallar kullanarak daha basit prosedürler geliştirmeye çalışmaktadırlar. Genel olarak metalik nanopartiküllerin ve özellikle bakır nanopartiküllerinin sentezinin ötesindeki ana fikir, en basit formlarında üç ana bileşenin sağlanmasına bağlıdır; bunlar, bakır iyonlarını sağlamak için bir öncü, bakır iyonlarını bakır atomlarına indirgemek amacıyla gerekli elektronları sağlamak için bir indirgeyici ajan, daha sonra üçüncü bileşen olan yüzey aktif maddenin kontrolü altında sınırlı bir boyutta optimum pH ve sıcaklık koşulları altında bakır nanoparçacıkları halinde toplanır [29].

Tasarlanmış nanomalzemeler, belirli bir işlev ve amaç için tasarlanmış nanomalzemelerdir. İçsel özellikleri, aynı malzemenin başka herhangi bir kimyasal durumunda veya biçiminde gerçekleştirilemeyen işlevleri sağlamak için onları benzersiz kılar, bu nedenle bunların üretimi ve kullanımı katlanarak artmaktadır. Yaşam döngüleri boyunca çeşitli dönüşümler geçirebilir ve çeşitli çevresel bölümlere ulaşabilirler. Hem deniz hem de tatlı sulardaki su ekosistemlerinden gelen sularda ve tortularda, atmosferde ve toprakta dahil olmaları beklenmektedir [52].

Nanopartiküller, küçülen nanoparçacık boyutu ile daha yüksek bir yüzey/ hacim oranı sunar. Nanoparçacıkların üretimi farklı yöntemlerle gerçekleştirilebilir. Nanoparçacıkların üretimi için en popüler yöntemler kimyasal yaklaşımlardır. Ancak bazı kimyasal yöntemler sentez protokolünde toksik kimyasalların kullanımı engelleyememektedir. Metal nanoparçacıklar, insanlarla temas eden alanlara yaygın olarak uygulandığından, toksik kimyasallar kullanmayan çevre dostu nanoparçacık sentezi süreçleri geliştirmeye artan bir ihtiyaç vardır. Mikroorganizmalar, enzimler ve bitkiler veya bitki özleri kullanılarak nanoparçacık sentezi için biyolojik yöntemler, kimyasal ve fiziksel yöntemlere olası çevre dostu alternatifler olarak önerilmiştir [53].

2.6. NANOPARTİKÜLLER VE SAĞLIK ÜZERİNE ETKİLERİ

Elektriksel iletkenlik, manyetik özellikler, sertlik, aktif yüzey alanı, kimyasal reaktivite ve biyolojik aktivite gibi özellikler malzeme bilimi açısından etkileyici olabilir, ancak toksik etkilere sebep olma nedeniyle diğer yönlerden istenmeyen etkiler ortaya çıkabilir. Nanoteknolojinin kullanımı hızla arttığından farklı nanoparçacıkların toksisitesinin araştırılması kritik önem taşımaktadır. Yüzlerce ticari üründe nanoparçacıkların üretimi ve kullanımı mevcut bir senaryodur. Mühendislik ürünü olan nanopartiküller lastiklerde, giysilerde, güneş kremlerinde, kozmetiklerde ve elektronikte kullanılmaktadır ve tıpta görüntüleme ve ilaç dağıtımı için daha da kullanımı artacaktır. Üretilen nanopartiküllerin çoğu için ne yazık ki toksisite verileri mevcut değildir [54].

Özel işler yapmak üzere nano ölçekli küçük cihazlar tasarlanmıştır. Nano montajlayıcılar olarak adlandırılan bu cihazlar bir hücre çekirdeğinden daha küçüktürler ve diş çürümesine neden olan ağız bakterilerini yok etmek ya da diş çürük lekelerini onarmak gibi elle veya başka herhangi

bir teknolojiyle mümkün olmayan görevleri yerine getirmede son derece faydalıdırlar. Nanoteknolojiler olarak kullanılan üç güçlü moleküler teknoloji şunlardır:

- Gelişmiş teşhis ve biyosensörler, akıllı ilaçlar ve hedefe yönelik ilaç dağıtımı için tasarlanmış nanomalzemeler ve cihazlar
- Genomik, proteomik ve mikrobiyal robotlar için uygulanmalı moleküler tıp
- Anında teşhis ve tedavi ve doğal fizyolojik fonksiyonun iyileştirilmesini sunan tıbbi nanorobotlar

Dolayısıyla nanoteknoloji için temel tıbbi uygulamalar, teşhis, ilaç dağıtımı ve doku mühendisliği [55] olarak sıralanabilir. Biyomalzemelerdeki ve biyoteknolojideki başarıların patlaması, nanoboyutlu parçacıklar kullanarak hastalıkları önleme, teşhis etme ve tedavi etme bilimi olan nanotıp adı verilen yeni bir alan geliştirmiştir [56].

Nano diş hekimliğinin yeni alanı diş hekimliğinde nanoteknolojinin katlanarak artan üretiminin ve kullanımının bir sonucudur. Nano diş hekimliği tarafından nano robotlar ve doku mühendisliği gibi nano malzemeler ve biyoteknolojiler kullanılarak geliştirilen uygulamalar, mükemmele yakın bir ağız sağlığına giden yolu açmaktadır [57].

Nanodiş hekimliğinin en önemli faydalarından bazılarından bahsetmek gerekirse, şunları zenginleştirir:

1. Önleme: diş macunlarında ve gargaralarda nano boyutlu partiküller kullanmak
2. Hastalık teşhisi: spesifik bakterilerin etiketlenmesini sağlayan ve böylece tanımlanmasını ve çıkarılmasını kolaylaştıran immünofloresansa dayalı nano boyutlu kuantum noktaları kullanmak.
3. Restoratif diş hekimliği: Polimerizasyon büzülmesini ve termal genleşmeyi azaltan ve kompozitlerin cilalama kabiliyetini, sertliğini ve aşınma direncini artıran nano dolgu maddeleri kullanmak
4. Rejeneratif diş hekimliği, kemik grefti, kılavuzlu doku rejenerasyonu, doku mühendisliği, sinir rejenerasyonu ile ilgili konular
5. Rehabilitatif diş hekimliği: Titanyum nano dokulu implant yüzeyini kullanan diş implantları [58]
6. Nanorobotlar kullanarak nano anestezi

7. Ağız kanserinin, tümöre yakın veya içine yerleştirilmiş nano kabuklar ve nano parçacık kaplı radyoaktif kaynaklarla tedavisi [55, 59].

2.6.1. Bakır Nanopartiküllerin Sağlık ve Çevre Üzerine Etkileri

Bakır nanopartikülleri endüstriyel olarak üretilebilmekte ve ticari olarak temin edilebilmektedir. Bakır, insan vücudunda homeostazide korunur (Jesse ve Mary, 2004). Bakır alımı tolerans aralığını aşarsa hemoliz, sarılık ve hatta ölüm gibi toksik etkilere sebep olabilir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, bakırın in-vivo aşırı yüklenmesinin hepatosiroz (Bjorn ve diğ., 2003), lipid profilindeki değişiklikler, oksidatif stres, böbrek fonksiyon bozukluğu (Galhardi ve diğ., 2004), sindirim kanalındaki mukoza zarının uyarılması gibi bir dizi toksikolojik aktiviteyi indükleyebileceği görülmüştür [60].

2.6.2. Bakır Oksit Nanopartiküllerin Sağlık ve Çevre Üzerine Etkileri

Son yıllarda CuO, hem temel hem de pratik sebepler ile ilgi odağı olmuştur. CuO, gaz sensörleri, manyetik depolama ortamları, güneş enerjisi dönüşümleri, yarı iletkenler ve kataliz gibi uygulamalarda yaygın olarak kullanılabilen endüstriyel açıdan önemli malzemedir [61]. CuO nanopartiküllerinin, ahşap koruyucu ve antimikrobiyal tekstillerde çalışmaları olmuştur (Cox, 1991, Gabbay ve diğ., 2006), [62]. Bakır oksit nanopartiküllerinin çevreye yararlı etkilerinden bir tanesi de çevre kirliliğine sebep olan gazların yok edilmesi için katalizör olarak kullanılmasıdır [63].

2.7. BAKIR NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZ YÖNTEMLERİ

2.7.1. Kimyasal Yöntemler

Bakır nanopartiküllerinin sentezi için beş farklı kimyasal sentetik prosedür öne çıkmaktadır. Ayrıca, partiküllerin büyümesinin ve morfolojisinin, yüzey aktif madde öncüsünün sıcaklığı ve konsantrasyonu gibi farklı faktörlerle optimize edilebileceği görülmektedir [64].

Kimyasal indirgeme yönteminde Cu II tuzları çeşitli indirgeme ajanları ile indirgenebilir. Örnek olarak hidrazin [65], askorbik asit [66], hipofosfit [67] veya sodyum borohidrit [68] ve poliol [69] verilebilir. Bu indirgeyici ajanlar, kontrollü boyut ve morfolojiye sahip bakır nanopartiküller üretmek için kullanılır [65, 67] Gotoh ve diğ., cam plakalar üzerinde biriktirilen Cu/ PAA kompozit filmlerin nanoparçacıklarını üretmek için uzun zincirli PAA (MA 150.000) kullandığını bildirmiştir [70]. Ostaeva ve diğ., poli (akrilik asit) pluronik karışım çözeltisinde

Cu^{2+}'nın indirgenmesiyle partikül boyutu 10 nm'den küçük olan kararlı bakır nanoparçacıklarını sentezlemeyi başarmıştır [71].

Mikroemülsiyon yöntemi, birbirine karışmayan iki sıvının (yağ içinde su, su içinde yağ veya süper kritik karbon dioksit gibi) bir yüzey aktif madde yardımı ile termodinamik olarak kararlı bir dağılım haline geldiği nanoparçacıkların sentezlenmesi için bir tekniktir [72, 73, 74]. Aslında iki ters çevrilmiş su ve yağ emülsiyonundan oluşan ters misel yöntemi de bu kategoride yer almaktadır [75]. Salzemann ve diğ., 3-13 nm boyutundaki bakır nanoparçacıklarını sentezlemek için ters misel yöntemini kullanmıştır [76]. Kaminskiene ve diğ., 70-80 nm boyutunda Cu kolloidal solüsyonu sentezlemek için aynı tekniği kullanmıştır [77].

Mikrodalga yöntemi, MHz300 ile GHz300 arasında frekans aralığındaki bir elektromanyetik enerji şeklidir. Zhu ve diğ., mikrodalga ışıması altında etilen glikolde öncü olarak bakır sülfat ve indirgeyici ajan olarak sodyum hipofosfit kullanarak bakır nanoparçacıklarının sentezi için hızlı bir yöntem bulmuşlardır. Üretilen nanoparçacıkların boyutunun grup tarafından 10 nm olduğu bildirilmiştir [78]. Kapoor ve Mukherjee, stabilizatör olarak poli (N vinil pirolidon) ile fotokimyasal yöntem kullanarak bakır nanoparçacıkların sentezinde ortalama 15 nm büyüklüğe ulaşmıştır [79]. Giuffrida, bakır nanoparçacıkların sentezi için fotokimyasal yöntemi kullanmış ve yöntemin bakır nanoparçacıkları sentezlemek için uygun bir yol olduğunu, çünkü elverişli ve ekonomik olduğunu bulmuştur. Işık yoğunluğu, bakır nanoparçacıklarının geri kazanım oranını etkileyen anahtar faktördür ve indirgeme oranı ile doğrudan ilişkilidir [80].

Bakır nanopartiküllerin üretimi için elektrokimyasal sentez yönteminde, kontrol kuvveti olarak elektrik kullanılmaktadır. Elektrokimyasal sentez, bir elektrolit ile ayrılmış iki elektrot arasında bir elektrik akımı geçirilerek gerçekleşir. Böylece sentez elektrot/ elektrolit arayüzünde gerçekleşir. Genellikle bakır nanopartiküllerin üretimi için elektrolitik bir bakır tuzu ve sülfürik asit çözeltisi kullanılır [81]. Raja ve diğ., elektrolitik çözelti olarak bakır sülfat ve sülfürik asit kullanmış ve 30 dakika boyunca 4V, 5A beslemiş ve 40-60 nm boyutunca Cu nanoparçacıklarını sentezlemiştir [82].

Termal dekompozisyon, kimyasal reaksiyonlar, çözücünün kaynama noktasının üzerinde bir sıcaklığa ulaştığı otoklav gibi basınç ve sıcaklık kontrollü bir kapta gerçekleşir. Bu yöntemde çözücü olarak su kullanılıyorsa buna hidrotermal süreç denir [83, 84]. Baco-Carles ve diğ., bu yöntemi 3.5- 40 nm'lik bakır nanoparçacıkların sentezi için kullanmıştır [85]. Chen ve diğ.,

farklı boyutlarda bakır parçacıkları sentezlemek için hidrotermal yöntemi uygulamıştır. Nanopartiküllerin şeklini ve boyutunu stabilize etmek ve kontrol etmek için yüzey aktif madde sodyum dodesil benzen sülfonat (SDBS) kullanmışlardır [86].

2.7.2. Fiziksel Yöntemler

Lazer ablasyon yöntemi tipik olarak çeşitli çözücülerde kolloidal gümüş nanopartiküller üretmek için tasarlanmıştır. Nanopartiküller, oksidasyondan korunmaları için kolloidal formda sağlanır [87, 88]. Darbeli lazer biriktirme işlemi, haznede vakum altında ve bazı inert gazların varlığında gerçekleşir. Bu yöntemde nihai ürün, lazer tipi, darbe süresi ve çözücü tipi gibi bazı faktörlerden etkilenmektedir [81].

Öğütme yöntemi mikron boyutlu malzemede bazı değişiklikler yapar. Bu yöntemde nanoparçacıkların sentezi için kullanılan ekipmanlar arasında farklı tipte öğütme makineleri yer almaktadır. Bu yöntemin, uzun zaman alan ultra ince parçacıkların üretimindeki zorluk da dahil olmak üzere bazı sınırlamaları vardır. Bu sınırlamaların aksine, bu yöntemin avantajı olarak işlem kolaylığı, düşük üretim maliyeti ve büyük ölçekli üretime olanak sağlamasına işaret etmektedir [89]. Son ürünün kalitesini, yani değirmen tipi, öğütme hızı, sıcaklık, zaman, atmosfer ve konteyner gibi farklı faktörlerin belirlediği de görülmüştür [90].

Darbeli tel deşarj yöntemi, nanoparçacıkları sentezlemek için kullanılabilecek diğer fiziksel yöntemlerden biridir [91]. Bu yöntem, yüksek maliyeti ve bazı metaller için olası verimsizliği sebebiyle endüstrilerde tipik olarak kullanılmaz. Yöntem, kolayca ince teller haline getirilebilen yüksek elektriksel iletkenliğe sahip metaller için uygundur [81, 92]. Muraia ve diğ., organik malzemelerle kaplanmış nanopartiküllerin, bakır telin oleik asit buharı/ sisi içinde buharlaştırılması ve birkaç nanometre kalınlığında bir kaplama tabakası ile başarılı bir şekilde sentezlenebileceğini göstermiştir. Bu yöntem kullanılarak 10-25 nm boyutunda nano boyutlu parçacıklar sentezlenmiştir [93]. Fiziksel yöntemlerin genel dezavantajları, nanoparçacıkları hazırlamak için genellikle maliyetli vakum sistemleri veya ekipmanı gerektirmeleridir [81].

2.7.3. Biyolojik Yöntemler

Bakteriler, mantarlar ve bitkiler gibi canlı organizmaların metal nanoparçacıkların sentezi için büyük bir potansiyele sahip olduğu keşfedilmiştir. Mikroorganizmalar bir biyo fabrika görevi görmektedir ve metal nanoparçacıkların sentezi için de kullanılabilir. Bu yöntemde sentezlenen nanopartiküllerin dağılımının boyutunun kontrol edilmesi diğer yöntemlere göre daha kolay olduğundan dolayı araştırmacılar biyolojik sentezi tercih etmektedirler. Kimyasal yöntemlerin

aksine çevreye toksik etkisi yoktur [94, 95]. Metal nanoparçacıkların biyosentezinde yer alan mekanizmaları anlamak, metal nanoparçacıkların üretim süreci üzerinde daha iyi bir kontrole sahip olmak için çok önemlidir [96].

Ramanathan ve diğ., *Morganella* bakterilerini kullanarak ve sulu fizyolojik koşullar altında bakır nanoparçacıkları sentezlemek için biyolojik bir yöntem kullanmıştır [97]. Varshney ve diğ., bakır nanoparçacıkları sentezlemek için patojenik olmayan *Pseudomonas stutzeri* bakterisi ile hızlı bir biyolojik yöntem kullanmıştır. Yüksek çözünürlüklü transmisyon elektron mikroskobu yöntemi kullanılarak üretilen nanoparçacıkların incelenmesi, nanoparçacıkların 8-15 nm boyut aralığında küresel olduğunu göstermiştir [98]. Varshney ve diğ., ayrıca elektro kaplamadan üretilen atık sudan bakır nanoparçacıkları sentezlemek için *Pseudomonas stutzeriyi* kullandı. Kübik bir şekle sahiptirler ve bu yöntemle üretilen nanoparçacıkların boyutu 50-150 nm'dir [99].

Önceki çalışmalar NADH (Nikotinamid adenin dinükleotit) ve NADPH (Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat) bağımlı enzimlerin metal nanoparçacıkların biyosentezinde önemli faktörler olduğunu göstermiştir [94]. Metalik nanoparçacıkların sentezi için mantar türlerinin kullanılmasının avantajları arasında ekonomik olması, sentez işleminin kolaylığı ve ayrıca mantar türlerinin büyümesi sebebiyle geniş yüzeylerin kaplanması olasılığı yer almaktadır. Pavani ve diğ., Cu nanoparçacıklarının sentezi için *Aspergillus* mantar türlerini kullanmıştır [100].

Birçok araştırmacı tarafından düşük maliyeti, yüksek mevcudiyeti ve tehlikeli olmayan malzemelerin kullanımı sebebiyle metal nanoparçacıkların sentezi için bitkilerin kullanımı olumlu sonuçlanmıştır [101, 102]. Biyo özler genellikle, flavonoidler, proteinler, terpenoidler, polifenoller vb. gibi metabolitleri içermektedir. Bu biyomoleküller sadece indirgeyici ajan olarak hareket etmez, aynı zamanda partikül birikimini en aza indirmek, morfolojiyi kontrol etmek ve ayrıca üretilen nanopartikülleri korumak için kapatma ajanları olarak kullanılmaktadırlar [102]. Bali ve diğ., *Brassica juncea* (Hint Hardalı), *Medicago Sative* (Alfa alfa) ve *Helianthus Annus* (Ayçiçeği) [103] gibi bitkilerde bakır nanoparçacıkları dahil olmak üzere farklı türlerde nanopartikülleri sentezlemeyi başarmışlardır.

Lee ve diğ., indirgeyici ajan olarak manolya yaprağı ekstraktını 40-100 nm boyutlarında kararlı bakır nanoparçacıkları sentezi için $Cu^{+2} \rightarrow Cu^{0}$ dönüşümünü kullanmıştır. Kararlı bakır nanopartiküllerini üretmek için sulu çözelti ve yaprak özü içinde $CuSO_4.5H_2O$ kullanmışlardır

[104]. Valodkar ve diğ., bakır nanoparçacıklarının sentezi için tıbbi özelliklere sahip bir bitki olan *Euphorbia Nivulia'*nın kök lateksini kullanmışlardır [105]. Subhankari ve Nayak, bakır sülfatı azaltmak ve bakır nanoparçacıkları üretmek için zencefili (*Zinngiber Officinale*) bakır nanoparçarcıklarının sentezi için bir yöntem olarak kullanmışlardır ve üretilen bu nanoparçacıkların anti-bakteriyel etkisini analiz etmişlerdir [106]. Ayrı bir makalede, Subhankari ve Nayak, 5-40 nm boyutunda küresel bakır nanoparçacıklarının sentezi için sulu bir özüt içinde *Syzygium Aromaticum* (karanfil) kullanmışlardır ve biyo bakırdaki biyomoleküllerin sadece metal iyonlarını azaltmakla kalmayıp, üretilen bakır nanopartiküllerin stabilizasyonu yoluyla oksidasyonu da engellediğini tespit etmişlerdir [107].

2.8. BAKIR OKSİT NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZ YÖNTEMLERİ

Bakır Oksit (CuO) nanoparçacıklarının sentezi, sol-jel, hızlı çökeltme, sonokimyasal, elektrokimyasal, katı hal reaksiyonu, alkol termal sentez, mikrodalga ışıması, organik çözücüler ve sert indirgeme ajanlarını içeren sıvı-sıvı arayüz teknikleri gibi çeşitli yöntemler sayesinde gerçekleşir. Sulu bir ortamda metal nanoparçacıklar üretmek için elverişli, hafif, toksik olmayan, doğal bir ürün bulmak zordur. Nanoparçacık yapımı için kullanılan çeşitli doğal malzemeler arasında bitkiler en iyi adaylar olarak gözükmektedir. Bitkiler tarafından üretilen nanoparçacıklar daha kararlıdır, çeşitli boyut ve şekillere sahiptir ve üretim hızı mikroorganizmalara göre daha hızlıdır [50]. Sert, toksik indirgeyici ajanlar (örneğin hidrazin hidrat, sodyum borohidrit, dimetilformamid, hidrazinyum hidroksit, sodyum hipofosfit, poli (N-vinilpirolidon), aminler, Askorbik asit, poliollerden etilen glikol vb.) [108] ve pahalı kimyasallar kullanılmadan çevre dostu yöntemler kullanılarak metal/ metal oksit nanoparçacıklarının biyosentezi yeşil sentezin ana ilkesidir. Bu indirgeyici ajanların çoğu çevresel toksisite veya biyolojik tehlikelerle ilişkilendirilmişlerdir. Atıkların en aza indirilmesi veya tamamen ortadan kaldırılmasına ve yeşil sentez temel ilkelerinin uygulanması yoluyla sürdürülebilir süreçlerin yürütülmesine artan ilgi ile nanomalzemelerin hazırlanması için doğal ve biyomimetik yaklaşımların geliştirilmesi arzu edilen bir yöndür [50].

2.8.1. Sol-Jel

Sol-Jel metodu jelleşebilen solüsyonlarda veya süspansiyonlarda kullanılan kimyasal bir prosestir. Bu yöntemde metal tuzları ve metal alkoksitler uygun bir çözücüde çözüldükten sonra su ve katalizör kullanılarak hidroliz ve polimerizasyon reaksiyonları oluşturulur. Reaksiyonların sonucunda toz ürünler elde edilir [109].

2.8.2. Sonokimyasal Sentez

Sonokimya tipik olarak, sulu çözeltide kabarcıkların sürekli oluşumu, büyümesi ve içe doğru çöküşünden kaynaklanan akustik kavitasyon olgusuna dayanır [110]. Sonokimyasal sentez tekniği hızlı, basit, kullanışlı, zaman kazandıran, ekonomik ve çevreye zararsızdır. Bu yöntem, nanoteknoloji alanındaki birçok uygulama için gelecekte büyük ölçekli sentezleri kolaylaştıracak bir potansiyel vaat etmektedir [111].

2.8.3. Elektrokimyasal Sentez

Katı yüzeyler üzerinde inorganik depozitler oluşturmak için elektrokimyasal sentez yöntemi kullanılır. Bu yöntem düşük maliyet, düşük sıcaklık, açık hava basıncında yapılabiliyor olması ve üretim hızının ayarlanabilmesi nedeniyle avantajlı bir yöntem olarak değerlendirilebilir [112].

2.8.4. Katı Hal Reaksiyonu

Katı hal reaksiyonu, katı reaktiflerden polikristal malzeme elde etmek için yaygın bir sentez yöntemidir. Reaksiyonun gerçekleşmesi için genellikle çok yüksek bir sıcaklık kullanılır [113]. Katı hal reaksiyonunun üç ana avantajı vardır.

1-) Uygulaması basit ve ucuzdur.

2-) Daha az solvent içerdiğinden kontaminasyon azdır.

3-) Yüksek ürün verimi sağlanır [114].

2.8.5. Mikrodalga Işıma ile Sentez

Mikrodalga ışıması ile sentez yönteminde çözücü olarak su veya çözücü maddelerden çok az miktar kullanım söz konusudur. Metodun bu özelliği pahalı ve zararlı organik çözücülerin kullanımını azalttığı için avantaj sağlamaktadır. Mikrodalga ışıması ile gerçekleştirilen reaksiyonlardan elde edilen ürünlerin saflaştırılması da daha kolaydır [115].

2.9. YEŞİL SENTEZ

Günümüzde nanoteknoloji, tıbbi kimya dahil birçok önemli alanda ön plana çıkmış ve araştırma haline gelmiştir. Araştırmalara göre nanopartiküllerin boyutu, yönü ve fiziksel özellikleri, herhangi bir malzemenin performansını etkilemektedir. Son yıllarda bilim insanları, nanoparçacıkları sentezlemek için çeşitli sentetik yöntemler üzerine çalışmaktadırlar.

Nanopartiküllerin yeşil sentez yöntemi, kimyasal veya mikro aracılı sentezlere kıyasla daha verimli, kolay ve aynı zamanda çevre dostudur. Kimyasal sentez, toksik çözücüler, yüksek basınç, enerji ve yüksek sıcaklık dönüşümlerini içerir ve mikrop içeren sentez laboratuvar bakımı sebebiyle endüstriyel olarak mümkün değildir. Bundan dolayı yeşil sentez, nanopartiküllerin sentezi için tercih edilebilecek en iyi seçenektir [116]. Yeşil sentezin 12 ilkesine göre nanopartikül sentezinin gerçekleşmesi sürdürülebilirlik ile yakından ilgilidir [117]. Nanopartiküllerin biyosentezinde, 'yeşil sentez' olarak adlandırılan bakteri, mantar, bitki, aktinomisetler vb. içeren temiz ve çevre dostu nanopartiküllerin geliştirilmesi çevresel olarak kabul edilen 'yeşil sentez' kavramı uygulanmıştır (Pal ve diğ., 2019). Mohanpuria ve diğ, (2019)'ne göre çeşitli organizmalar kullanılarak gerçekleşen nanopartiküllerin biyosentezinde, tek hücreli ve çok hücreli organizmalar reaksiyona girebilir.

Shahid ve diğ., (2017)'nin çalışmalarına göre düşük maliyetli ve az bakım gerektiren bitkiler, ağır metal detoksifikasyonunda ve ayrıca bu ağır metallerin çok küçük izleri çok düşük konsantrasyonlarda bile toksik olabileceğinden çevresel kirleticiler sorununun üstesinden gelinebilecek olağanüstü bir potansiyel ortaya çıkmıştır.

Hulkoti ve Taranath, (2014)'ın çalışmalarına göre mikrobiyal kültürlerin korunması gibi karmaşık eylemlerle sentezlenebildikleri için, mikroorganizmalar gibi diğer biyolojik sentezlere kıyasla bitki özü ile nanopartikül sentezinin avantajları mevcuttur.

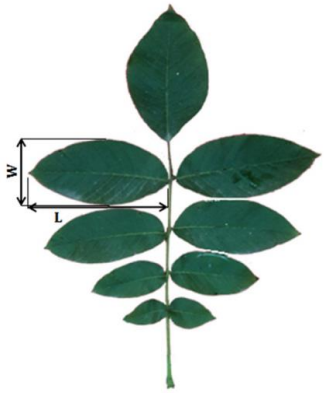
Bitki kaynaklı nanopartikül sentezinin avantajlarından biri, bu yolun kinetiğinin, kimyasal nanoparçacık hazırlamaya eşdeğer diğer biyosentetik yaklaşımlardan çok daha yüksek olmasıdır. Bitkilerin meyve, yaprak, gövde, kök gibi farklı bölümleri ürettikleri mükemmel fitokimyasallar sebebiyle nanopartiküllerin yeşil sentezi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Iravani, 2011).

Nanopartikül sentezi için bitkinin sentezde kullanılması gereken kısmı distile su ile yıkanıp kaynatılabilir. Sentezlenmek istenen nanopartiküller süzüldükten ve ilgili çözeltiler eklendikten sonra, çözelti renginde değişim meydana gelir ve nanopartikül oluşumu buradan anlaşılır. Doğal bitki özü ile sentez, ara baz gruplarının herhangi bir şekilde kullanılmasından kaçınılabileceği gibi çevre dostu ve ucuz bir işlemdir [118].

2.10. CEVİZ YAPRAĞI (*JUGLANS REGIA L.*)

"Pomolojik olarak sert kabuklu meyve türleri içerisinde yer alan ceviz *(Juglans regia L.)* botanik olarak *Dicotiledoneae* sınıfı *Juglandales* takımı, *Juglandaceae* familyası ve *Juglans* cinsinde yer almaktadır. *Juglans* cinsi içerisinde özellikleri tespit edilmiş 18 ceviz türü bulunmaktadır" (Şen, 1986). "Ceviz Orta Asya sıradağlarının doğal bitkisi olup; buradan Sincan'a (Doğu Türkistan), Kazakistan'ın bir kısmına, Özbekistan'a, Kırgızistan'ın güneyine, buradan Nepal dağlarına, Tibet'e, Hindistan'ın kuzeyine ve Pakistan üzerinden Afganistan'a, Tacikistan'a, Türkmenistan'a, İran'a, Irak'a, Azerbaycan'ın bir kısmına, Ermenistan'a, Gürcistan'a, Türkiye'nin doğusuna ve giderek Türkiye'nin tamamına yayılmıştır. Ceviz aynı zamanda Bulgaristan, eski Yugoslavya, Romanya ve Yunanistan'ın da doğal bitki örtüsü içinde yer almaktadır" (Şen, 2011).

Ceviz yaprakları 22-35 cm arasında değişen uzunluğa sahiptir ve yapraklar genelde 5-9 yaprakçığa ayrışır [119]**.** Şekil 2.2'de ceviz yaprağı görseli verilmiştir [120].



Şekil 2.2: Ceviz yaprağı *(Juglans Regia L.)* gösterimi. [120]

2.10.1. Ceviz Yaprağı *(Juglans Regia L.)* Özellikleri

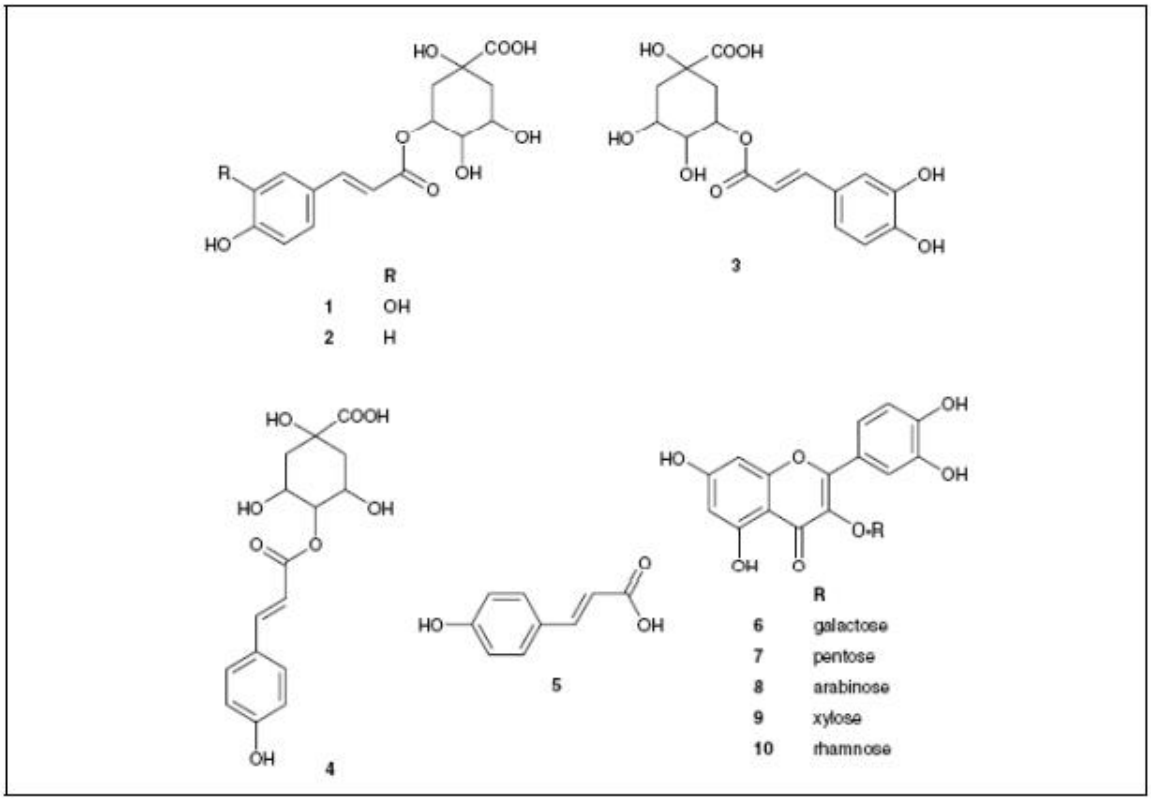
Ceviz ağacının yaprakları, kabukları, meyveleri ve yeşil kabuklarının sıcak ve soğuk çözücüsü ve sulu özütü, gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı geniş spektrumlu antibakteriyel aktivite gösterir. Ceviz ağacının meyveleri, yaprakları ve kabuğunun sulu özü; disk difüzyon yöntemi, agar dilüsyon yöntemi, agar çizgi seyreltme yöntemi ve Radish yöntemi kullanılarak çok çeşitli mantarlara karşı antifungal aktivite gösterir. %95 etanol ve ceviz ağacının yaprak ekstresinden elde edilmiş etil asetatın, tütün mozaik virüsünü (TMV) inhibe ettiğini bildirmiştir ve antiviral aktivite sergilemiştir. Ceviz çekirdeği, kabuğu ve yapraklarının etil asetat, bütanol, metanol, eter ve sulu metanol ekstraktının antioksidan potansiyeli farklı yöntemlerle

ölçüldüğünde tüm özler güçlü antioksidan aktivite göstermiştir. Ceviz yaprağının 250mg/kg dozundaki metanolik özü hem kısa hem de uzun vadeli modellerde yemek sonrası plazma kan şekeri düzeylerini düşürür ve antidiyabetik aktivite gösterir. Ceviz yapraklarının etanolik özleri, farelerde herhangi bir gastrik hasara neden olmadan karagenan kaynaklı arka pençe ödem modeline karşı güçlü anti-inflamatuar aktivite sergiler [121].

2.10.2. Ceviz Yaprağında *(Juglans Regia L.)* Bulunan Bileşikler

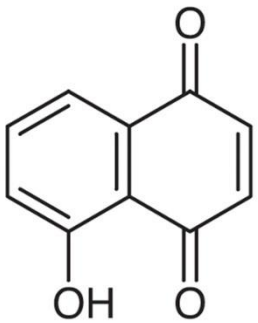
Ceviz bitkisinin yaprak, meyve, tohum ve yeşil kabuk bölümlerinde bulunan fenolik bileşikler, juglon ve flavonoitler üzerine yapılan çalışmalarda, ceviz yaprağında bulunan fenolik bileşiklerin kalitatif ve kantitatif tespiti için bitki örtüsü ve iklimleri farklı olan 6 farklı kültürün ceviz yaprağı örnekleri incelendiğinde tüm numunelerde 7 fenolik bileşik (3-kafeoilkinik, 3-p-kumaroilkinik ve 4-p-kumaroilkinik asit, kersetin 3-galaktozit, kersetin 3-arabinozit, kersetin 3- ksilozit, kersetin 3-ramnozit) teşhis edilmiştir. Kersetin 3-pentozit ve kemferol 3–pentozit, iki fenolik bileşik türevi ise kısmen teşhis edilmiştir. Yapılan ölçümlerde kersetin 3- galaktozit her zaman ana bileşik iken, 4-p-kumaroilkinik asit ise minör bileşik olarak tespit edilmiştir. Fenolik bileşiklerin en yüksek olduğu dönemin Mayıs ve temmuz aylarında olduğu gözlemlenmiştir.

Portekiz'de farklı kültürlerde yetişen ceviz yaprakları ile yapılan çalışmalarda ise fenolik bileşiklerden,10 bileşik (3- ve 5- kafeoilkinik asitler, 3- ve 4-p-kumaroilkinik asitler, p-kumarik asit, kersetin 13 3-galaktozit, kersetin 3-pentozit türevleri, kersetin 3-arabinozit, kersetin 3-ksilozit ve kersetin 3- ramnozit) tespit edilmiştir. Şekil 2.3'de fenolik bileşiklerin yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.3: Ceviz yaprağındaki fenolik bileşiklerin kimyasal yapısı (1) 3-kafeoilkinik asit (2) 3-p-kumaroilkinik asit. (3) 5- kafeoilkinik asit; (4) 4-p-kumaroilkinik asit; (5) p-kumaroik asit (6) kersetin 3-galaktozit (7) kersetin 3-pentozit türevleri (8) kersetin 3- arabinozit; (9) kersetin 3-ksilozit; (10) kersetin 3-ramnozit.

Ceviz bitkisinin yapraklarında ve yeşil kabuğunda uçucu yağ, tanen ve juglon isimli acı olan bir madde bulunmaktadır. Juglon, cevizin yeşil bölümlerinde doğal olarak bulunmazken, doğal olarak bulunan alfa hidrojuglonun oksidasyonu ile biçimlenir.



Şekil 2.4: Juglon'un kimyasal yapısı (5-hidroksi-1,4-naftakinon).

Ceviz yaprağında juglonun varlığını göstermek için yapılan çalışmalarda, yapraklar metanol ile kaynatılıp ekstre edilerek, juglon glikozitleri %10'luk H_2SO_4 ile hidrolize edilmiş, serbest

haldeki juglon dietileter ile tekrar ekstre edilmiştir. Dietileter uçurularak, ekstre metanol içinde çözülmüştür ve benzen etil format (9:1) solvan sisteminde silika jel g plaklara tabi tutulmuştur. Juglona ait kahverengi lekeler (R_f=0,86) toplanarak, etanol ile ekstre edilip santrifüj edilmiştir. 10N NaOH ile değişen rengin 15 dakikalık süre içerisindeki absorbans değeri 520 nm olarak ölçülmüştür.

Ceviz yaprağında flavonoitlerin varlığı için yapılan çalışmalarda, 1 kg ceviz yaprağı metanol ile ekstre edilerek, metanollü ekstre uçurulduktan sonra temizleme işlemi ardından kersetin aglikonuna sahip arabinoz ve galaktoz bağlı flavonozitler bulunmuş ve bu flavonozitlerin kersetin 3- arabinozit ve hiperozit olabilecekleri bildirilmiştir.

Başka bir çalışmada ise cevizin yaprakları kurutulmuş ve analiz edilerek bileşik düzeyleri tespit edilmiştir; itoller %11,2, kül %8,7, müsilaj %7,6, tanenler %4,5, flavonoitler %3,4, kalsiyum %1,9, potasyum %1,4 ve hiperozit %0,6 oranında bulunmuştur.

Yapılan çalışmalarda ceviz yapraklarında C vitamininin en yüksek konsantrasyonu, gövde üzerinde vasküler dokularda, rahis ve petiolde ve ayrıca mezofilde görülmektedir.

Diğer bir çalışmada ise ceviz yapraklarının hekzanlı ekstresinde progestinik hormon (3,20 pregnanodion) görülmüştür [119].

2.10.3. Ceviz Yaprağının Kullanıldığı Tedavi Alanları

Ceviz yaprakları antimikrobiyal, depuratif, keratolitik, ishal önleyici, gaz giderici, antelmintik, hipoglisemik ve sinüzit, soğuk algınlığı ve karın ağrısı tedavisi için tamamlayıcı ve alternatif tedavide popülerdir. Türk halkı arasında da taze toplanmış ceviz yaprakları alında ve vücutta ateşi hafifletmek için ve eklemlerde romatizma ağrılarını azaltmak için kullanılır [122].

2.11. DENEYSEL TASARIM

Mühendislik ve Ar-Ge uygulamalarında hedeflenen nihai durum, prosesin minimum kaynak kullanılarak maksimum performansa sahip olmasıdır. En iyi sonuçları elde edebilmek için, prosesin sonuçlarını etkileyebilecek ve performansa doğrudan veya dolaylı etkisi bulunan parametreler tespit edilir ve bu parametrelerin en iyi proses çıktısını verecek şekilde uygun kombinasyonlarının bulunması adına deneyler yapılması gerekir. Yapılan farklı deneylerde değiştirilen parametreler ve deney sonuçları karşılaştırılarak optimum koşullar tespit edilir.

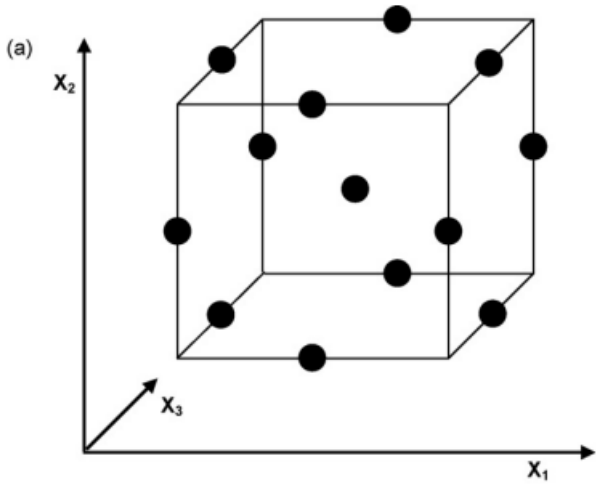
Endüstriyel imkanlar göz önünde bulundurulduğunda, bu deneylerin yapılışı sırasında sonuçların doğruluğu kadar ekonomik şartlar ve zamansal kısıtlamalar da gözetilerek, doğru deney sonuçlarına ulaşılmalıdır [123]. Tüm bu kısıtlar göz önünde bulundurulduğunda 'Deneysel Tasarım' yaklaşımı, bilgisayar ortamında simüle edilerek gerçekleştirilen son derece bir verimli yaklaşımdır.

2.11.1. Box- Behnken Deneysel Tasarımı

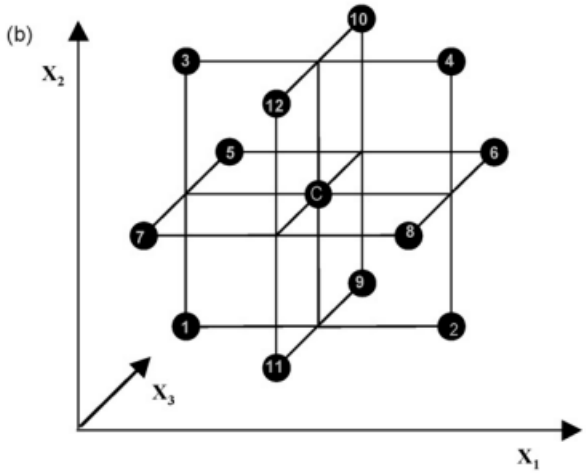
Box-Behnken Tasarımı (BBT) 1960 yılında Box ve Behnken tarafından geliştirilmiş deneysel bir tasarım ve doğrusal olmayan bir tepki yüzeyi metodolojisi modelidir [124]. Box-Behnken tasarımı, iki seviyeli faktöriyel seviye kombinasyonları tarafından oluşturulan kübik bölgenin uç noktalarında, deney üzerindeki fiziksel kısıtlamalar nedeniyle test edilmesi çok pahalı veya imkânsız olan herhangi bir nokta içermediğinden avantajları yönleri vardır. Bu tasarım büyük miktarda bilgi sağlar ve yanıt üzerindeki bağımsız değişkenlerin etkileşimini izlemek için az sayıda deney yapıldığından daha ekonomik bir yaklaşımdır [125].

Box-Behnken tasarımı spektroanalitik metot, kromatografik metot, kapiler elektroforez ve elektroanalitik metot gibi alanlarda yapılan analizlerin optimizasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır [126].

Üç faktörlü Box-Behnken Tasarımı için grafik gösterimi 2.5 ve 2.6'da verilmiştir [126].



Şekil 2.5: Merkezi nokta ve köşelerin orta noktalarını içeren bir küp.



Şekil 2.6: Birbirine kenetlenen 2^2 faktöriyel tasarımdan oluşan bir figür ve bir merkez nokta.

Box-Behnken modelinde deney sayısı denklem (2.1)'de belirtilen formül ile hesaplanır [126].

$$N = 2k(k-1) + C_o \quad (2.1)$$

N: deney sayısı

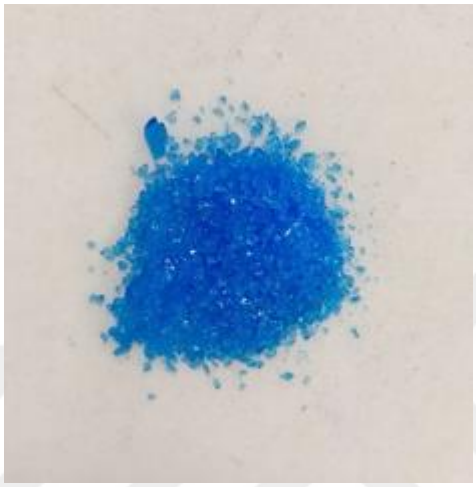
k: değişken sayısı

C_o: merkezi nokta sayısı

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. DENEYLERDE KULLANILAN MALZEMELER

Bu çalışmada, bakır oksit nanopartiküllerinin sentezi için analitik saflıkta bakır (II) sülfat olarak bilinen bakır sülfat penta hidrat ($CuSO_4.5H_2O$) (Merck) kullanılmıştır.



Şekil 3.1: Bakır Sülfat tozu**.**

Bitki ekstraktı için ceviz yaprakları kullanılmıştır ve Arifoğlu Baharat ve Gıda San. Ltd. Şti, (İstanbul, Türkiye)'den tedarik edilmiştir.



Şekil 3.2: Arifoğlu'ndan tedarik edilen ceviz yaprağı.

Çözelti hazırlıklarında çözücü olarak saf su (destile su) kullanılmıştır.



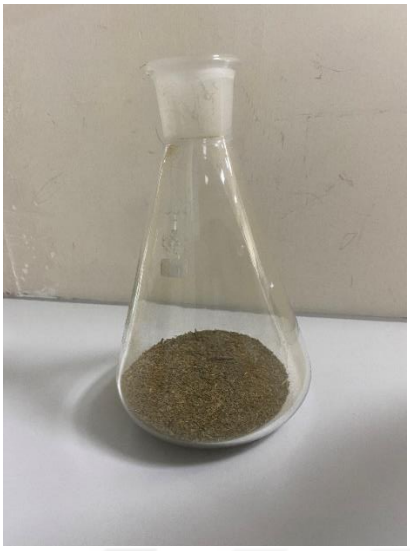
Şekil 3.3: Millipore Direct-Q markalı saf su cihazı.

3.2. CEVİZ YAPRAĞI EKSTRAKTININ HAZIRLANMASI

Kurutulmuş ceviz yaprakları bir blender yardımıyla küçük parçalar haline getirilerek ceviz yaprağı tozu elde edilmiştir.

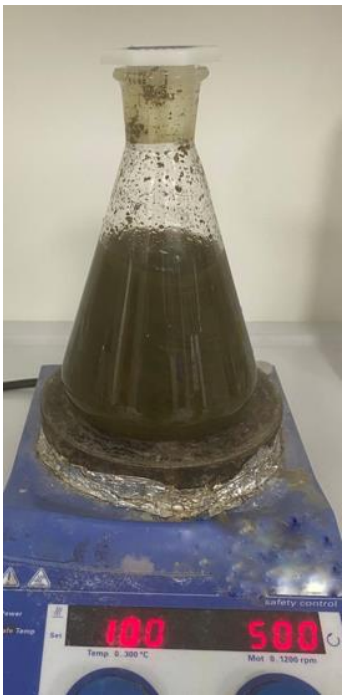


Şekil 3.4: Blenderdan geçirilecek ceviz yaprakları.



Şekil 3.5: Blenderdan geçirilmiş ceviz yaprakları.

Juglans Regia L. familyasından olan ceviz yaprağının tozu 5 gr tartılarak 100 ml saf su içerisinde 100°C'de 30 dakika boyunca 500 rpm karıştırma hızıyla kaynatılmıştır. Ceviz yaprağı ekstraktı, oda koşullarında soğumaya bırakılmıştır. Soğumuş ekstrakt, Whatmann No 4 filtre kâğıdı ile filtre edilmiştir. Süzüntü, daha sonra kullanılmak üzere oda sıcaklığında (25°C) ağzı sıkıca kapatılmış bir şişe içerisinde saklanmıştır.



Şekil 3.6: Ceviz yaprağı ekstraktı için deney düzeneği.



Şekil 3.7: Filtreden süzüntü işlemi.

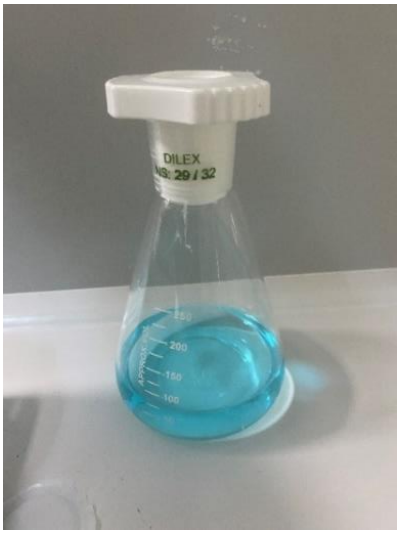


Şekil 3.8: Filtreden süzülmüş ekstrakt.

Ceviz yaprağı ekstraktları %5, %12,5 ve %20'lik olarak deneylerde kullanılmak üzere üç farklı konsantrasyonda hazırlanmıştır.

3.3. BAKIR SÜLFAT ÇÖZELTİSİNİN HAZIRLANMASI

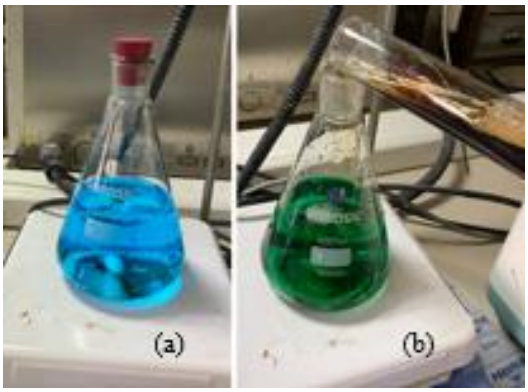
Deneylerde kullanılmak üzere saf su içerisinde 0,125 M, 0,05 M ve 0,2M olarak üç farklı konstantrasyon halinde $CuSO_4$ çözeltileri hazırlanmıştır.



Şekil 3.9: Bakır sülfat çözeltisi.

3.4. BAKIR OKSİT NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ

1:4 oranında ceviz yaprağı ekstraktı, bakır sülfat çözeltisi içerisinde 500 mL'lik bir erlen kullanılarak hazırlanmıştır. Ceviz yaprağı ekstraktı, $CuSO_4$ çözeltisine damla damla eklenmiştir. Karışım oda koşullarında (25°C) 24 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Karışım daha sonra 3 gün boyunca bekletilmiştir ve 72 saatin sonunda belirgin bir şekilde renk değişimi gerçekleşerek, CuO NP'lerinin oluşumu gözlenmiştir. Box- Behnken deneysel tasarım programından elde edilen farklı parametrelere sahip 17 tane deney düzeneği kurulmuştur.

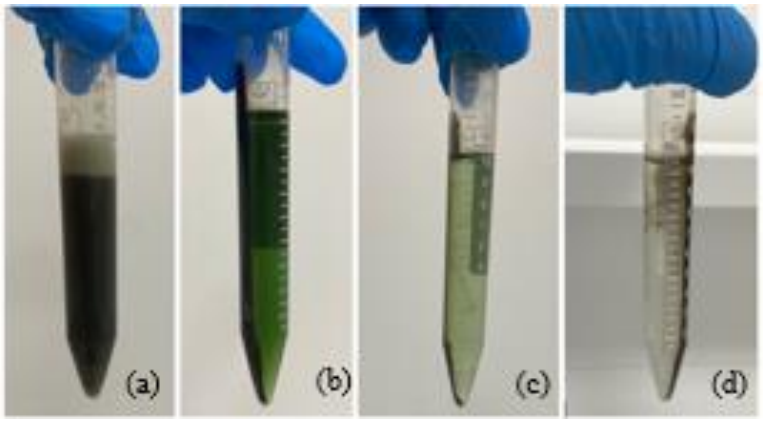


Şekil 3.10: Bakır sülfat çözeltisi (a), $CuSO_4$ çözeltisine eklenen ceviz yaprağı ekstraktı (b).



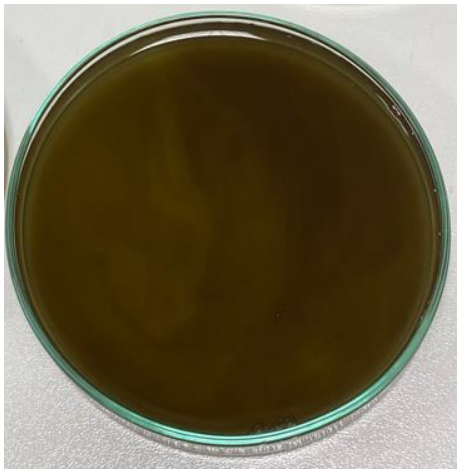
Şekil 3.11: 24 saat sonunda ceviz yaprağı ekstraktı ve $CuSO_4$ çözelti karışımı (a), 72 saat sonunda oluşan CuO NP karışımı (b).

Cu^{2+} indirgemesi renk değişimi ile oluşmuştur. Şekil 3.11'de görüldüğü gibi CuO NP sentezi, açık renkten koyu renge doğru kendini göstermektedir. Oluşan bakır oksit (CuO) numuneleri destile su (saf su) ile yıkanarak Şekil 3.12'de görüldüğü gibi safsızlıkları giderilmiştir ve iki kez 20 dk 5500 rpm ve bir kez 10 dk 5500 rpm ile santrifüj edilmiştir.



Şekil 3.12: Santrifüj öncesi (a), 1.yıkama (b), 2.yıkama (c) 3.yıkama (d).

Santrifüjleme ile süpernatant, çökeltiden arındırılmıştır ve çökelti nano CuO'tir. Safsızlıklardan arındırılmış bakır oksit (CuO) numuneleri 70°C'de etüvde 6 saat boyunca kurutulmuştur.



Şekil 3.13: Etüv öncesi.



Şekil 3.14: Etüv sonrası.

Oda koşullarında soğumaya bırakıldıktan sonra nano CuO tozları 300°C, 400°C ve 500°C'deki farklı sıcaklıklarda 2 saat kalsine edilmiştir.



Şekil 3.15: Kalsinasyon sonrası CuO tozları.

3.5. DENEYLERDE KULLANILAN CİHAZLAR

3.5.1. Hassas Terazi

Radwag AS 220/ C/2 markalı hassas terazi tartım işlemleri için kullanılmıştır. Maksimum 220 gr ağırlığında tartım yapabildiği gibi 0,0001 gr hassasiyete sahiptir.



Şekil 3.16: Radwag marka hassas terazi.

3.5.2. Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı

Çözeltilerin, oluşan manyetik alan etkisi sayesinde karıştırılmasını sağlayan ve tabla içindeki ısıtıcılar sayesinde ısıtılmasını sağlayan cihazdır. IKA C-MAG HS 7 marka ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanılmıştır.



Şekil 3.17: IKA C-MAG marka ısıtıcılı manyetik karıştırıcı.

3.5.3. Santrifüj

Çözeltilerin saflaştırılması için Hettich EBA-21 marka santrifüj cihazı kullanılmıştır. Dijital ekrana sahip bu cihazın çalışma hızı maksimum 18.000 rpm'dir. 1 sn – 99 dk – 59 sn / süresiz çalışma özelliği ve 6 x 50 ml (Açılı Rotor) / 6 x 15 ml (Açılır Rotor) / 24 Standart Kapiler (Hematokrit Rotorda) maksimum kapasitesi mevcuttur.



Şekil 3.18: Hettich marka santrifüj cihazı.

3.5.4. Etüv

Kurutma işlemleri için Termal markalı etüv kullanılmıştır. Cihaz, +5°C ile 250°C sıcaklık aralığında çalışabilmektedir.



Şekil 3.19: Termal markalı etüv cihazı.

3.5.5. Kül Fırını

Bakır oksit nanopartiküllerinin kalsinasyonu için Nabertherm markalı kül fırını kullanılmıştır. Bu cihaz 30-3000 °C aralığında çalışmaktadır.



Şekil 3.20: Nabertherm marka kül fırını.

Yeşil sentez ile sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyonu için XRD (X-Işını Kırınımı), SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) ve TGA (Termogravimetrik) analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.5.6. X-Işını Kırınımı (XRD)

X-Işını Kırınımı (XRD), kristal malzemelerin geometrik düzeni, kristal yönelimleri, kristal dizilişleri, aralarındaki mesafe gibi özelliklerin incelenmesinde ve karakterizasyonunda kullanılan önemli yöntemlerden bir tanesidir. X-ışınlarının dalga boyu 0,1 Aº ile 100 Aº arasında değişirken, kristal yapı analizinde 0,2 Aº ile 2,5 Aº olan X-ışınları kullanılır ve yapı analizinde kullanılan X-ışınları malzeme üzerinde herhangi bir deformasyon yaratmaz [127, 128].

Bu çalışmada yeşil sentez yöntemi ile sentezlenen toz numuneler 300°C, 400°C ve 500°C'de kalsine edildikten sonra istenilen fazların gerçekleşip gerçekleşmediğini görmek amacıyla XRD analizi yapılmıştır. Analiz, İstanbul Üniversitesi– Cerrahpaşa Merkez Laboratuvarı'nda bulunan Rigaku D/Max-2200 marka XRD cihazı ile 1,54 Aº dalga boylu, 2°/dk tarama hızıyla 20°-90° tarama aralığında çekimi gerçekleştirilmiştir.

Numunelerin ortalama kristalit boyutları Debye-Scherrer denklem (3.1) kullanılarak hesaplanmıştır [129].

$$D = \frac{0.9\lambda}{\beta Cos\theta} \quad (3.1)$$

Burada;

D= Kristalit boyutu (nm)

λ= X-ışını dalga boyu (0,15418 nm)

β= 100'lük pikin yarı yüksekliğindeki genişliği (radyan)

θ= Bragg açısı

Numunelerin kafes parametreleri ise denklem (3.2) ve denklem (3.3) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$d = \frac{\lambda}{2\sin\theta} \quad (3.2)$$

$$a = d\sqrt{h^2 + k^2 + +l^2} \quad (3.3)$$

d= Atomik düzlemler arası mesafe

X-ışını dalga boyu (0,15418 nm)

a= Kafes parametresi (A^o)

h, k, l= Düzlemin Miller indisleri

3.5.7. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu nanomalzemelerin mikro yapılarının incelenmesi ve tane boyutlarının belirlenmesi için kullanılan karakterizasyon yöntemidir [130]. Bu çalışmada, yeşil sentez metodu ile oluşan CuO nanopartiküllerinin morfolojik yapısı ve şekilleri Taramalı Elekton Mikroskobu (Scanning Electron Microscope (SEM)) ile tespit edilmiştir. Analiz, Namık Kemal Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda bulunan FEI markalı Quanta FEG 250 model cihaz ile gerçekleşmiştir.

3.5.8. Termogravimetrik Analiz (TG/DTA)

Termogravimetrik (TG) analiz ile sıcaklığa bağlı olarak kütle değişikliği incelenirken, Karşılaştırmalı Termal Analiz (DTA) termal ölçümleri ile sıcaklık farkı ölçülerek faz diyagramları oluşturulur ve faz geçişleri incelenir [132]. Bu çalışmada, TG/ DTA analizleri Seiko EXSTAR 6000 TG/DTA 6300 markalı cihaz ile gerçekleştirilmiştir. Analiz sırasında sıcaklık en yüksek 700C'ye kadar çıkarılmıştır.

3.6. CEVİZ YAPRAKLARI İLE YAPILAN DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.6.1. Box-Behnken Deneysel Tasarımı

Bu çalışmada, oda sıcaklığında oluşan nanopartiküllerde kristalit boyutu parametrelerinin etkilerini incelemek amacıyla Design Expert 11 programında yanıt yüzey metodlarından biri olan üç faktörlü Box-Behnken Tasarım modeli kullanılmıştır. Üç farklı parametrenin kristalit boyutu üzerindeki etkilerini incelemek ve optimize etmek amacı ile 17 deney yapılmıştır. Deneysel parametreler; konsantrasyon (A: 0,05 M, 0,125 M ve 0,2 M), kalsinasyon sıcaklığı (B: 300 ºC, 400 ºC ve 500 ºC) ve ekstrakt miktarı (C: %5, %12,5 ve %20) olarak belirlenmiştir.

Modelin hassasiyeti için beş orta nokta deneyi yapılarak, Box-Behnken Tasarım modeli ile en uygun matematiksel model elde edilmiştir. Bu modelin istatiksel analizi ANOVA (varyans analizi) ile yapılarak optimum koşullara ulaşılmıştır. F değerleri R^2 ile hesaplanmıştır.

Box-Behnken Tasarım modelinde seçilen parametreler ve tanımlanan değerler Tablo 3.1'de gösterilmiştir. Seçilen parametrelerin farklı kombinasyonları ile 17 deney yapılmıştır ve bu tasarım koşulları ile elde edilen kristalit boyutları Tablo 3.2'de gösterilmektedir.

Tablo 3.1: Parametreler ve değerler

Parametre	Birim	Düşük	Orta	Yüksek
Konsantrasyon (A)	M	0,05	0,125	0,2
Sıcaklık, T (B)	ºC	300	400	500
Ekstrakt Miktarı (C)	%	5	12,5	20

Tablo 3.2: Box-Behnken tasarım koşulları

Deney No	Konsantrasyon (M)	Ekstrakt Miktarı (%)	Sıcaklık (ºC)
1	0,125M	%5	500 ºC
2	0,05M	%5	400 ºC
3	0,05M	%20	400 ºC
4	0,125M	%20	500 ºC
5	0,2M	%12,5	500 ºC
6	0,125M	%12,5	400 ºC
7	0,125M	%12,5	400 ºC
8	0,2M	%5	400 ºC
9	0,05M	%12,5	500 ºC
10	0,125M	%12,5	400 ºC
11	0,125M	%20	300 ºC
12	0,125M	%5	300 ºC
13	0,05M	%12,5	300 ºC
14	0,2M	%12,5	300 ºC
15	0,125M	%12,5	400 ºC
16	0,125M	%12,5	400 ºC
17	0,2M	%20	400 ºC

3.6.2. Antibakteriyel Testler

3.6.2.1. Test Mikroorganizmaları

Çalışma kapsamında *Bacillus cereus* (NRRL-B-3711), *B. subtilis* (NRS-744), *Escherichia coli* (ATCC-25922), *Staphylococcus aureus* (NRRL B-767) bakteri, *Candida albicans* (ATCC-22019), *C. glabrata* (NRRL-Y-17815), *C. parapsilosis* (NRLL Y-12696), *Aspergillus niger* (ATCC 1094) ve *Fusarium solani* (NRRL-13414) mikroorganizmaları kullanılmıştır.

3.6.2.2. Kullanılan Besi Ortamları

Tablo 3.3: Mueller Hinton Agar (MHA) (Biomark B263) besi ortamı

Sığır İnfüzyonu	**300,0 g/L**
Kazein Asit Hidrolizat	17,50 g/L
Çözünür Nişasta	1,50 g/L
Agar	17,0 g/L
pH	7,3±0,1 (25 °C)

Ticari haldeki MHA'dan 38 gram tartılarak 1000 ml distile su içerisinde homojen hale getirilmiştir. 121 ℃'de 1,5 atm basınçta 15 dakika steril edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra, steril petrilere yaklaşık 15-20 ml şeklinde dağıtılır. Bu besiyeri bakterilerin aktiflenmesinde kullanılmıştır.

Tablo 3.4: Mueller Hinton Broth (MHB) (Biomark B367) besi ortamı

Et İnfüzyonu	**2,0 g/L**
Kazein Asit Hidrolizat	17,5 g/L
Çözünür Nişasta	1,5 g/L
pH	7,3±0,1 (25 °C)

Ticari haldeki MHB den 21 gram tartılarak 1000 ml distile su içerisinde homojen hale getirilmiştir. 121 ℃'de 1,5 atm basınçta 15 dakika steril edilmiştir. Bu besiyeri bakterilerin MİK çalışmasında besin ortamı olarak kullanılmıştır. Deney sırasında MHB çift kuvvetli olarak kullanılacağından dolayı standart hacminin iki katı hacminde kullanılarak hazırlanmıştır.

Tablo 3.5: Sabouraud 2% Glukoz Agar (SGA) (Fluka 84086) besi ortamı

Pepton	**10 g/L**
D (+) Glukoz	20 g/L
Agar agar	17 g/L
pH	5.6±0.2 (25 °C)

Yukarıda içeriği belirtilen hazır SGA litreye 47 g olacak şekilde tartılıp agar çözününceye kadar ısıtılır ve 121°C' de 15 dakika 1,5 atm. basıncında steril edilir. Sterilizasyon işleminden sonra,

steril petrilere yaklaşık 15-20 ml şeklinde dağıtılır. Hazırlanan besiyeri mayaların aktive edilmesinde kullanılmıştır.

Tablo 3.6: Sabouraud %2 Dekstroz Broh (SDB) (Merck 1.08339.0500) besi ortamı

Pancreatic Digest of Casein	**5 g/L**
Peptone from Meat	5 g/L
D (+)-Glukoz (=Dekstroz)	20 g/L
pH	5,6 ± 0,2 (25 °C)

Ticari haldeki SDB den 30 gram tartılarak 1000 ml distile su içerisinde homojen hale getirilmiştir. 121 ℃'de 1,5 atm basınçta 15 dakika steril edilmiştir. Bu besiyeri mayaların MİK çalışmasında besin ortamı olarak kullanılmıştır. Deney sırasında SDB çift kuvvetli olarak kullanılacağından dolayı standart hacminin iki katı hacminde kullanılarak hazırlanmıştır.

Tablo 3.7: Potato Dekstroz Agar (PDA) (Biomark B300) besi ortamı

Potatoes Infusion From	**200 g/L**
Dekstroz	20 g/L
Agar	30 g/L
pH	5,6 ± 0,2 (25 °C)

Ticari haldeki PDA'dan 54 gram tartılarak 1000 ml distile su içerisinde homojen hale getirilmiştir. 121 ℃'de 1,5 atm basınçta 15 dakika steril edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra, steril petrilere yaklaşık 15-20 ml şeklinde dağıtılır. Hazırlanan besiyeri küflerin aktive edilmesinde kullanılmıştır.

Tablo 3.8: Potato Dekstroz Broth (PDB) (Biomark B037) besi ortamı

Potatoes Infusion From	**200 g/L**
Dekstroz	20 g/L
pH	5,6 ± 0,2 (25 °C)

Ticari haldeki PDA'dan 24 gram tartılarak 1000 ml distile su içerisinde homojen hale getirilmiştir. 121 ℃'de 1,5 atm basınçta 15 dakika steril edilmiştir. Bu besiyeri küflerin MİK

çalışmasında besin ortamı olarak kullanılmıştır. Deney sırasında PDB çift kuvvetli olarak kullanılacağından dolayı standart hacminin iki katı hacminde kullanılarak hazırlanmıştır.

3.6.2.3. Çözelti ve Kimyasallar

3.6.2.3.1. Fizyolojik Tuzlu Su (FTS)

Çalışmada kullanılacak FTS hazırlığı için 0,85 NaCl tartılarak 100 ml distile su içerisinde çözündürülmüştür. 10 ml olacak şekilde deney tüplerine paylaştırılmıştır. Deney tüpleri pamuk kapatıldıktan sonra 121 ℃'de 1,5 atm basınçta 15 dakika süreyle steril edilmiştir. Bu çözelti bakteri ve maya hücre süspansiyonlarının hazırlanmasında kullanılmıştır.

3.6.2.3.2. Tween 80

Ticari haldeki Tween 80 (Merck 822187)' den 0,1 gram alınarak 100 ml distile su içerisinde çözündürülmüştür. 10 ml olacak şekilde deney tüplerine paylaştırılmıştır. Deney tüpleri pamuk kapatıldıktan sonra 121 ℃'de 1,5 atm basınçta 15 dakika steril edilmiştir. Bu çözelti küf spor süspansiyonlarının hazırlanmasında kullanılmıştır.

3.6.2.3.3. DMSO (Dimetil Sülfoksit) Hazırlanması

Aktivitesi test edilecek test materyalinin çözünmesi için 121 ℃'de 1,5 atm basınçta 15 dakika otoklavlanarak DMSO (Merck 8.02912.1000) steril edilmiştir.

3.6.2.4. Yöntem

3.6.2.4.1. Test Mikroorganizmalarının Aktivasyonu ve Hücre Süspansiyonunun Hazırlanması

-85 ºC'de gliserol ortamında muhafaza edilen test mikroorganizmalarından bakteriler MHA, mayalar SDA ve küfler PDA petrilerine bakteri ve mayalar çizgi ekim tekniği ile küfler ise üç nokta ekim tekniği ile inokule edilmiştir. Bakteri ve mayalar 37 ºC'de 24 saatlik, küfler ise 25 ºC'de 5-7 gün inkübasyon ile aktive edilmiştir.

Taze ve saf olarak geliştirilen test mikroorganizmalarından bakteri ve mayalar FTS ortamında McFarland 0,5 (10^8 hücre/ml) ile kıyaslanarak süspansiyon haline getirilmiştir. Her bir bakteri stok süspansiyonlardan 1'er mL hacim ayrı ayrı erlenlerde steril olarak hazırlanmış olan 100 ml çift kuvvetli MHB besi ortamına aktarılır. Aynı işlem maya stok solüsyonu için de çift kuvvetli SDB besi ortamı kullanılarak gerçekleştirilir. Küfler ise %0,1'lik Tween 80 ortamında spor süspansiyonu olarak hazırlanmış ve thoma lamında sayılarak 10^6 spor/ml konsantrasyonunda olması sağlanmıştır.

3.6.2.4.2. Test Maddelerinin Hazırlanması

Test maddelerinin stok solüsyonları dimetil sülfoksit (DMSO)'de hazırlanmıştır. Stok solüsyondan steril distile su içerisinde bir seri dilüsyonu yapılarak 0,0039-4 mg/mL aralığında konsantrasyon serisinden 100'er µL hacminde 96'lık mikro platelerde her bir test mikroorganizması için oluşturulmuştur.

3.6.2.5. Minimum İnhibe Edici Konsantrasyonun (MİK) Belirlenmesi

Antimikrobiyal aktivite gösteren maddeler CLSI M27-A2 (2002) standart yöntemi ile iki katlı seri mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak MİK değerleri belirlenmiştir (Winn vd. 2006). Bu amaçla antimikrobiyal aktivitesi belirlenen madde uygun ortamda çözüldükten sonra distile su ile seyreltilecek ve 100 µL hacminde mikrotitrasyon petrisine aktarılmıştır. Çift kuvvetli müeller hilton broth (MHB) ortamında geliştirilen test bakteriler Mcfarland 0,5'e ayarlanacak ve 100 µL hacminde mikrotitrasyon petrilerindeki her bir dilüsyon üzerine ilave edilmiştir. Mikrotitrasyon petrisinin 11. kuyucuğuna MHA ve test bakterisi ilave edilerek pozitif gelişme kontrolü, 12. kuyucuğuna ise sadece MHA yerleştirilerek sterilizasyon kontrolü oluşturulmuştur. Hazırlana mikrotitrasyon petrileri 37 ºC'de 24 saat inkübe edildikten sonra üremeyi işaret eden bulanıklık varlığı dikkate alınarak incelenmiştir. Mikroorganizma üremesini temsil eden bulanıklığın olmadığı konsantrasyon MİK olarak değerlendirilmiştir. Ketoconazole ve Streptomycin ticari antibiyotikleri ise referans madde olarak kullanılmıştır.

3.6.2.6. Minimum Fungisidal Konsantrasyonun (MFK) Belirlenmesi

Fungisidal aktivitenin belirlenmesinde filamentli küfler için CLSI M07-A10 (2008), mayalar için ise CLSI M38-A2 (2008) standart yöntemleri bazı modifikasyonlar yapılarak kullanılmıştır. Kısaca PDA ortamında 25 ºC'de 7 gün boyunca geliştirilmiş olan küf, 37°C'de 24 saat inkübasyonla geliştirilen maya kültürlerinden sırasıyla % 0,1'lik Tween 80 ve FTS ortamında spor ana stoğu hazırlanmıştır. Hazırlanan spor/hücre stoğu 1-5x10^5 cfu/ml spor içerecek şekilde küfler için PDB, mayalar için ise MHB ortamlarında dilue edilmiştir. Mikrotitrasyon petrisine 100 µl hacminde aktarılan madde dilüsyon serisinin üzerine 100 µl hacminde spor süspansiyonu ilave edilmiştir. Mikrotitrasyon petrisinin 11. kuyucuğu ilgili besi ortamı ve test küf/mayasını içerecek şekilde hazırlanarak pozitif üreme kontrolü, 12. kuyucuğu ise sadece besi ortamını içerecek şekilde hazırlanarak negatif kontrol olarak kullanılmıştır. 25 ºC'de 72 saat inkübasyon işleminden sonra küfler binoküler mikroskop altında miselyal yapı oluşumu yönünden değerlendirilmiştir. Mayalar ise üremeye dayalı bulanıklık oluşumunun

dikkate alınması ile incelenmiştir. Üremenin olmadığı son konsantrasyon MFK olarak değerlendirilmiştir (Espinel-Ingroff, 2001). Ketoconazole ve Streptomycin ticari antibiyotikleri ise referans madde olarak kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. XRD SONUÇLARI

Yeşil sentez yöntemi kullanılarak farklı parametre değerlerinde, oda sıcaklığında sentezlenen numunelerin faz yapılarını incelemek amacıyla kalsinasyon sonrasında XRD Analizi gerçekleştirilmiştir ve 17 deneyin sonucunda elde edilen numunelerin XRD Analiz grafikleri Şekil 4.1-4.17'de verilmiştir. Analiz sonuçları incelediğinde numunelerin kristalin yapıda olduğu görülmektedir. Yeşil sentez ile elde edilen D14 haricindeki tüm numunelerin kalsinasyon sonucunda kristalin yapılı CuO yapısına ulaştığı (JCPDS kart no: 45-0937; 35º, 38º) görülmüştür. Yaklaşık 35,4º'de CuO (1 1 1) ve 38,6º'de CuO (0 2 2) bakır oksit nanopartiküllerinin oluşumunu gösteren en şiddetli iki pike ait fazlar bulunmaktadır.

D1 örneğinde ise CuO fazı dışında, $CuSO_4$ (JCPDS kart no: 00-080-2209) fazına ait pikler de görülmüştür. 25,06º ve 34,26º deki en şiddetli iki pik $CuSO_4$'ı temsil etmektedir.

Sentezlenen D3, D5, D6, D7, D9, D11, D15, D16 ve D17 numaralı deney numunelerinde (1 1 0), (1 1 1), (0 2 2), (2 0 2), (2 0 2), (1 1 3) (0 2 2), (2 2 0) ve (2 2 2) düzlemine ait (h k l) değerleri görülerek CuO oluşumu gerçekleşmiştir.

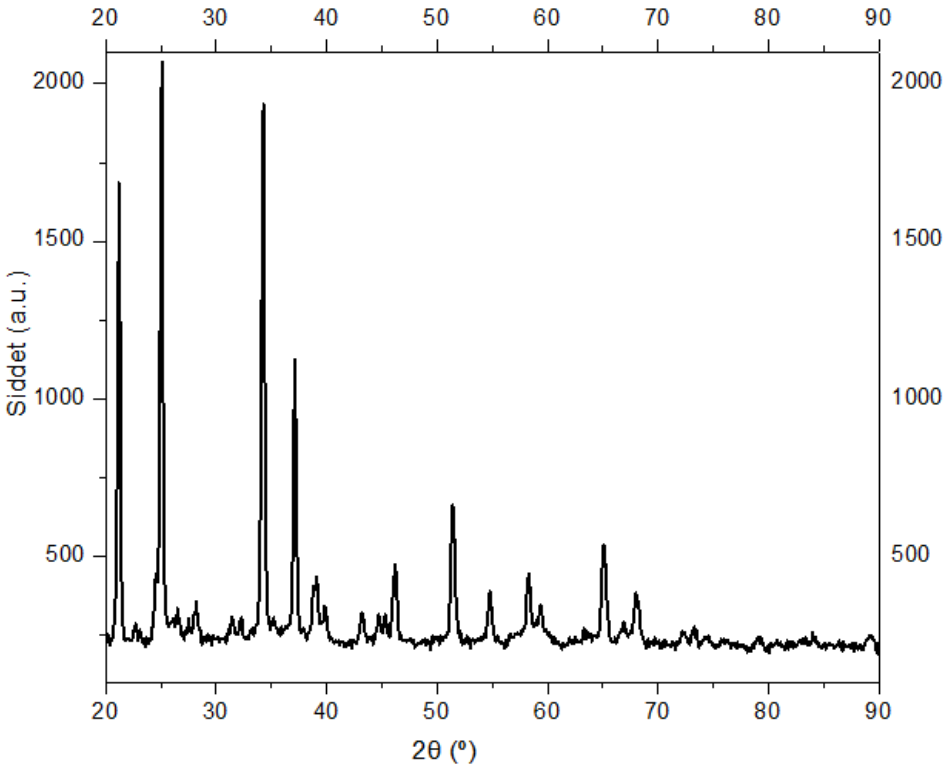
Sentezlenen D8 ve D10 numaralı deney numunelerinde (1 1 0), (1 1 1), (0 2 2), (2 0 2), (2 0 2), (1 1 3) (0 2 2) ve (2 2 0) (h k l) değerleri görülerek CuO oluşumu gerçekleşmiştir.

D4 numaralı deneyde (1 1 1), (0 2 2), (2 0 2), (2 0 2), (1 1 3) (0 2 2) ve (2 2 0) (h k l) değerleri görülerek CuO oluşumu gözlemlenmiştir.

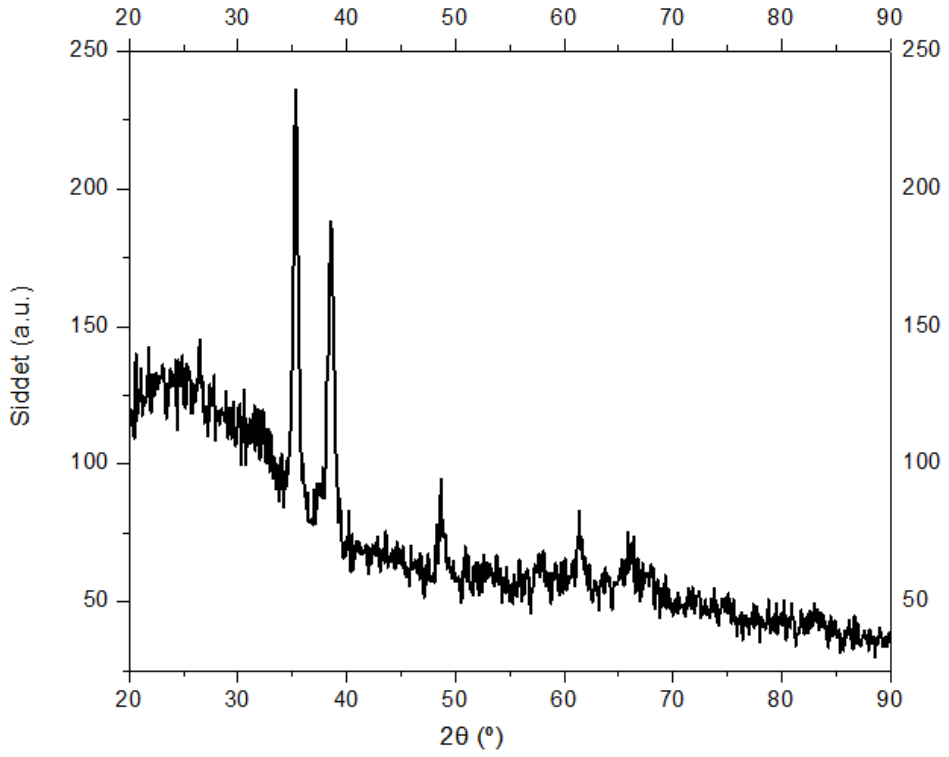
D2, D12 ve D13 numaralı deney numunelerinde en şiddetli iki pikin varlığı ile (1 1 1) ve (0 2 2) (h k l) değerleri sayesinde CuO oluşumu gerçekleşmiştir.

D1 numaralı deney numunesinde (1 1 0), (1 1 1), (0 2 2), (2 0 2), (2 0 2), (1 1 3) (0 2 2) ve (2 2 0) CuO oluşumunun varlığını kanıtlayan (h k l) değerlerine rastlanmıştır, fakat en şiddetli iki pikin $CuSO_4$' e ait olduğu görülmüştür.

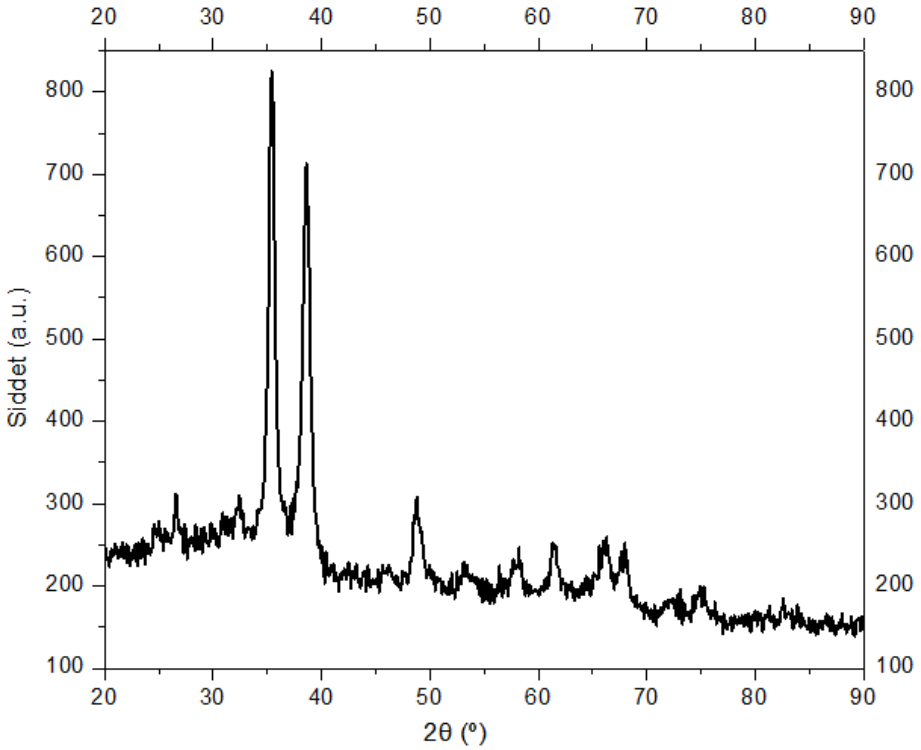
D14 numaralı deney numunesinde ise CuO oluşumunun gerçekleşmediği, sadece Cu (JCPDS kart no: 85-1326) fazına ait piklerin varlığı görülmüştür. 43,21º'de Cu(1 1 1), 50,32º'de Cu(2 0 0) ve 73,93º'de Cu(2 2 0) fazları bulunmaktadır.



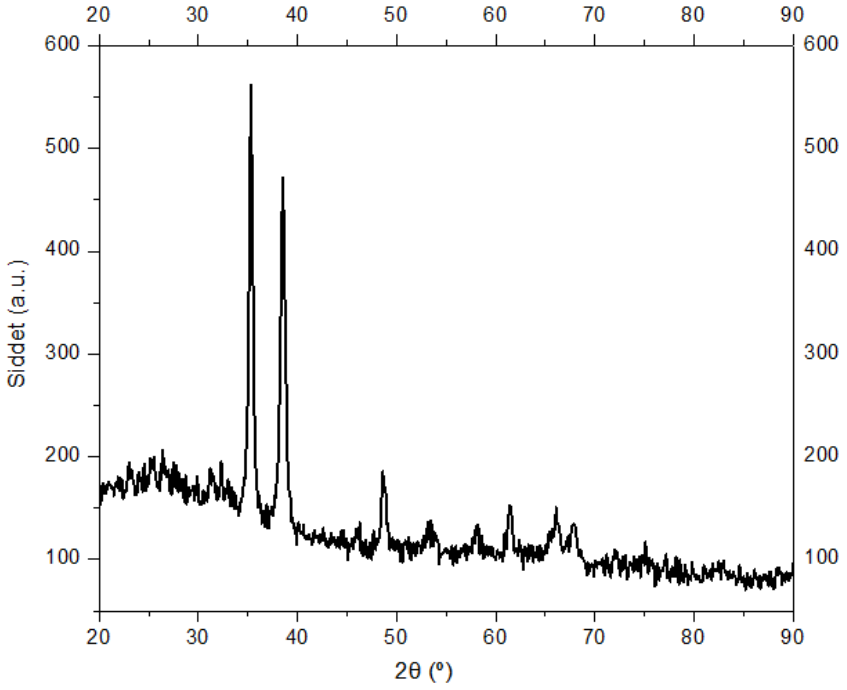
Şekil 4.1: Deney 1'e ait XRD grafiği (T:500°C; 0.125M $CuSO_4$, %5 Ekstrakt).



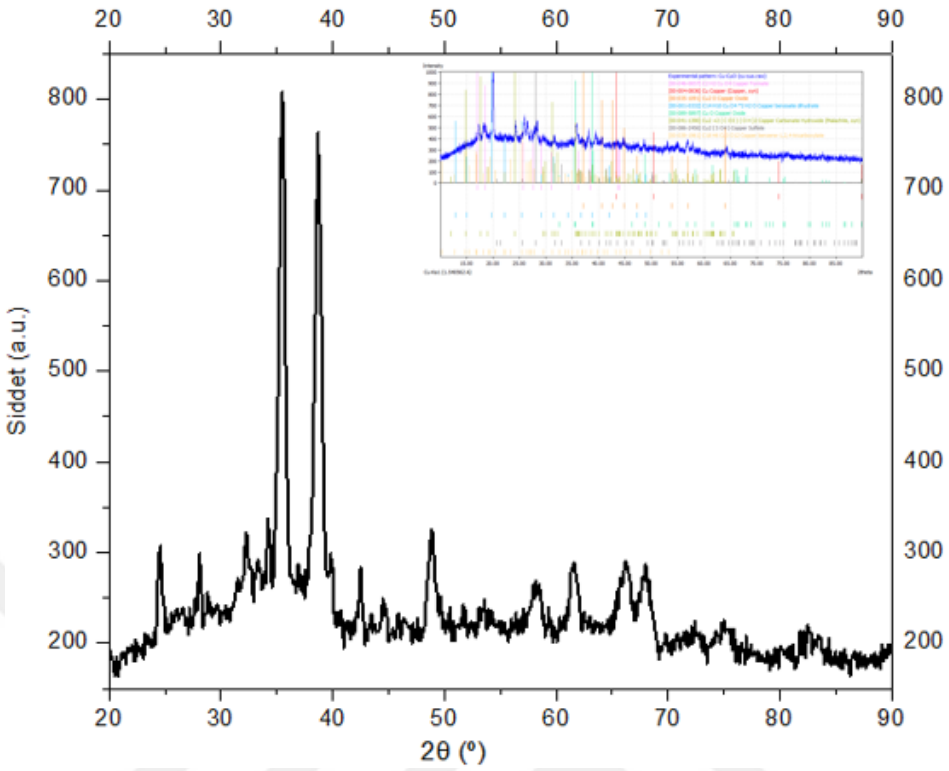
Şekil 4.2: Deney 2'ye ait XRD grafiği (T:400°C; 0.05M $CuSO_4$, %5 Ekstrakt).



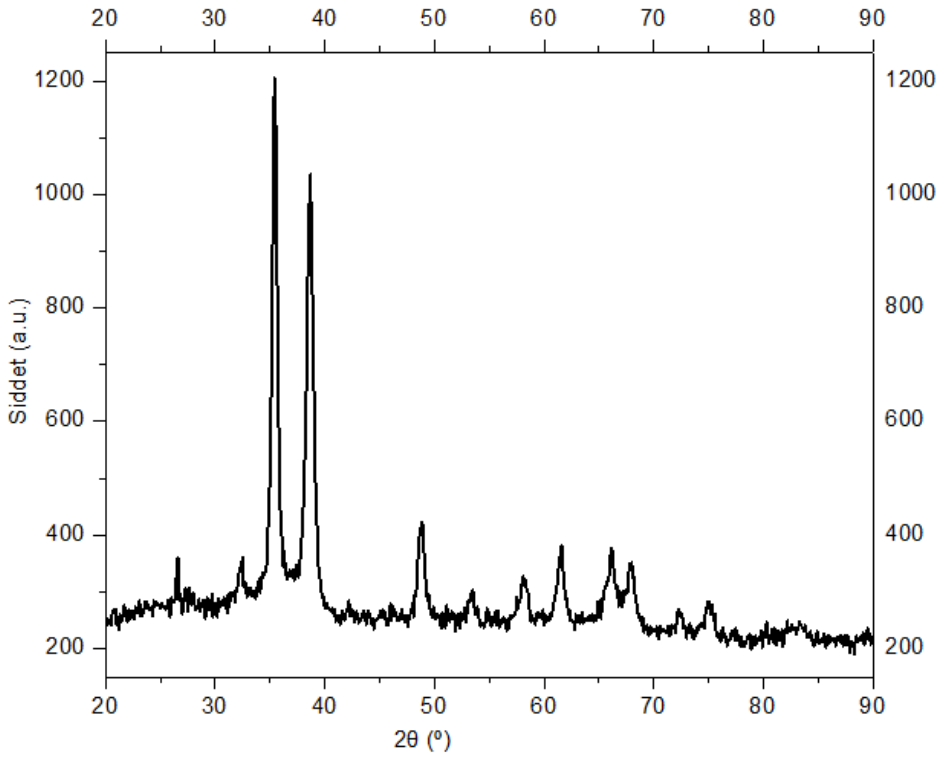
Şekil 4.3: Deney 3'e ait XRD grafiği (T:400°C; 0.05M $CuSO_4$, %20 Ekstrakt).



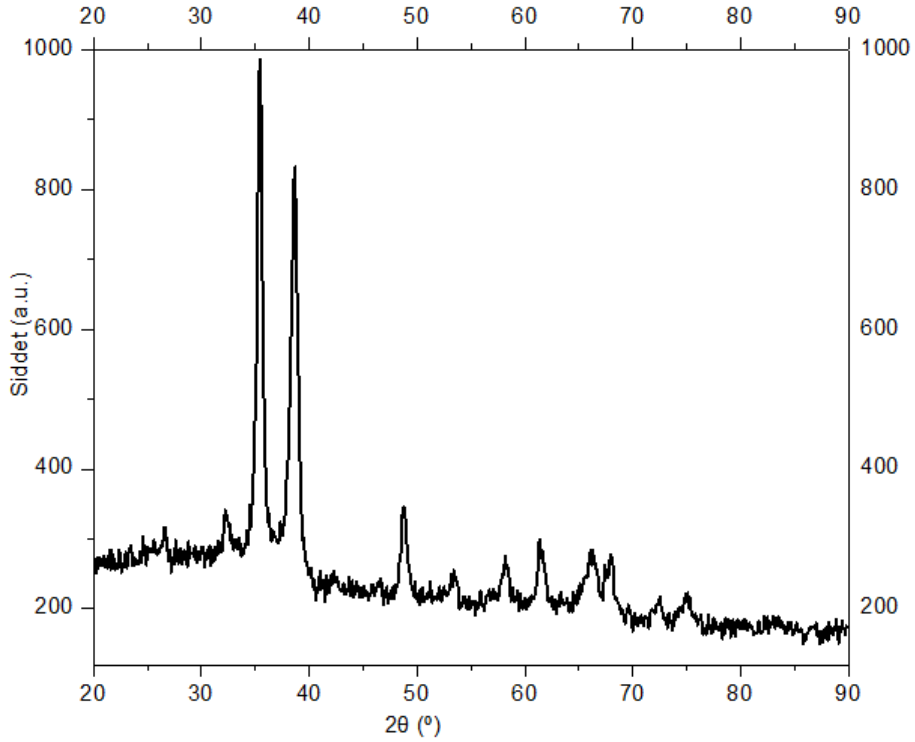
Şekil 4.4: Deney 4'e ait XRD grafiği (T:500°C; 0.125M $CuSO_4$, %20 Ekstrakt.



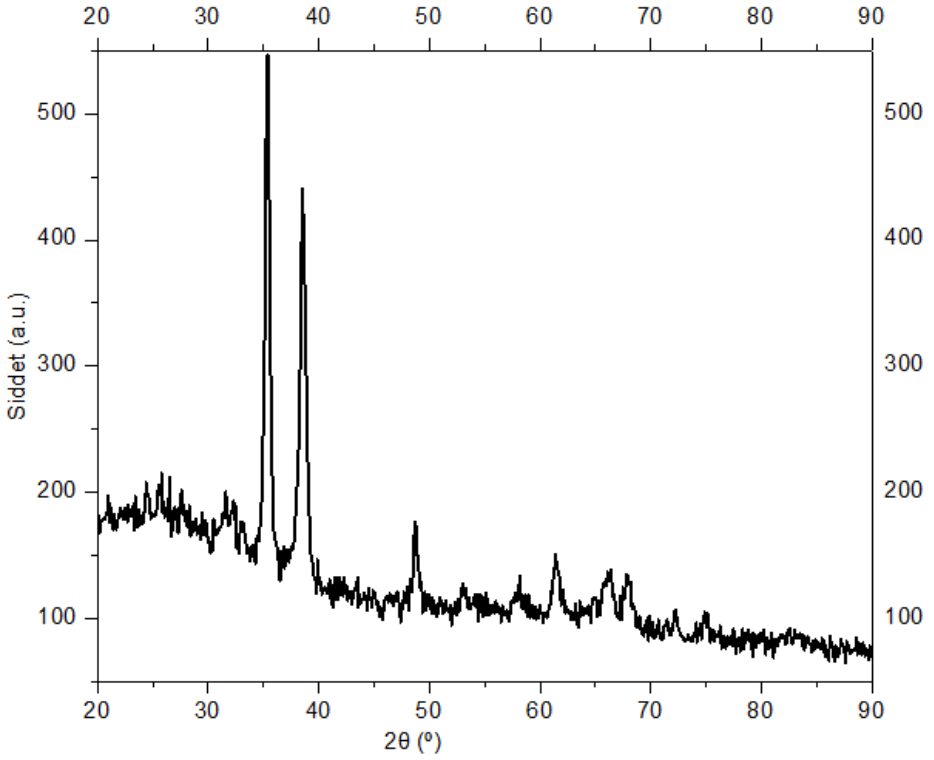
Şekil 4.5: Deney 5'e ait XRD grafiği (T:500°C; 0.2M $CuSO_4$, %12,5 Ekstrakt).



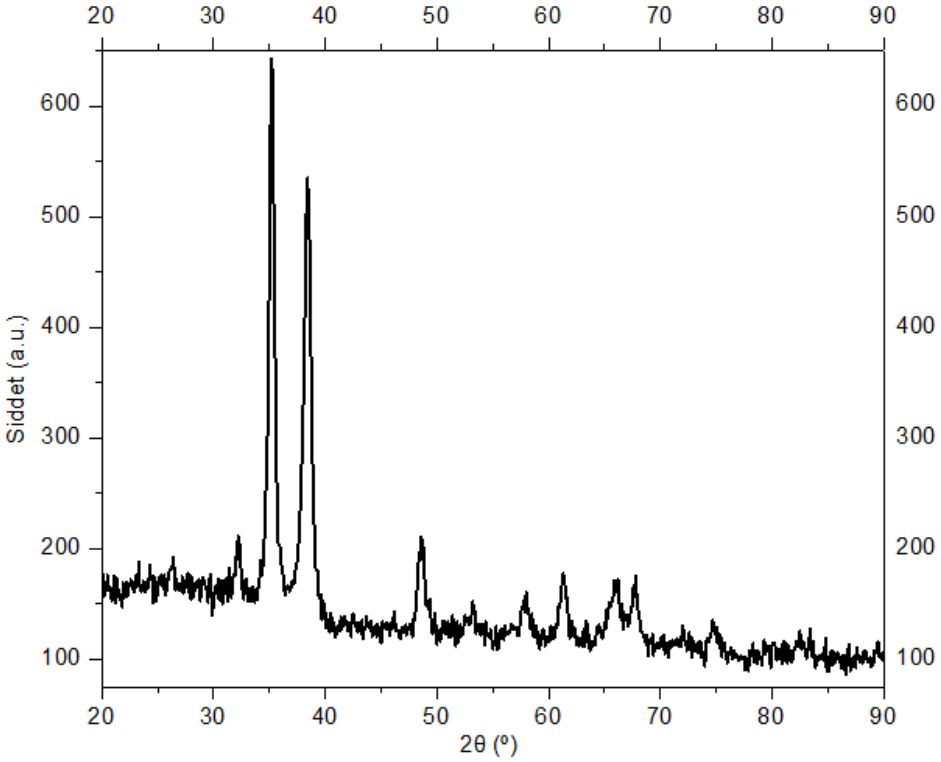
Şekil 4.6: Deney 6'ya ait XRD grafiği (T:400°C; 0.125M $CuSO_4$, %12,5 Ekstrakt).



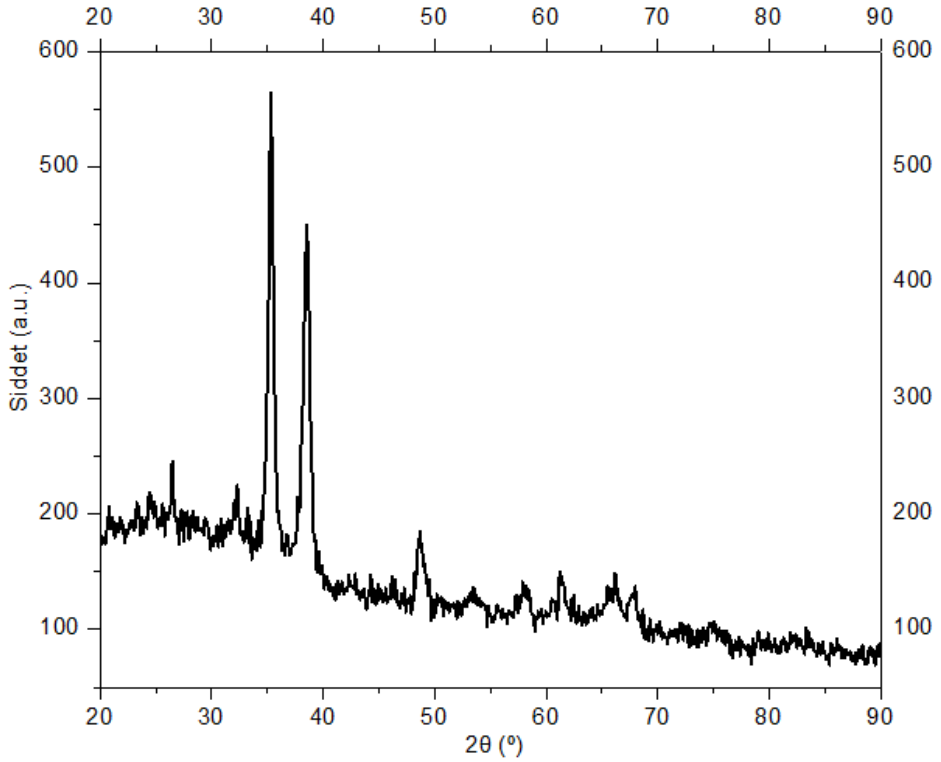
Şekil 4.7: Deney 7'ye ait XRD grafiği (T:400°C; 0.125M $CuSO_4$, %12,5 Ekstrakt).



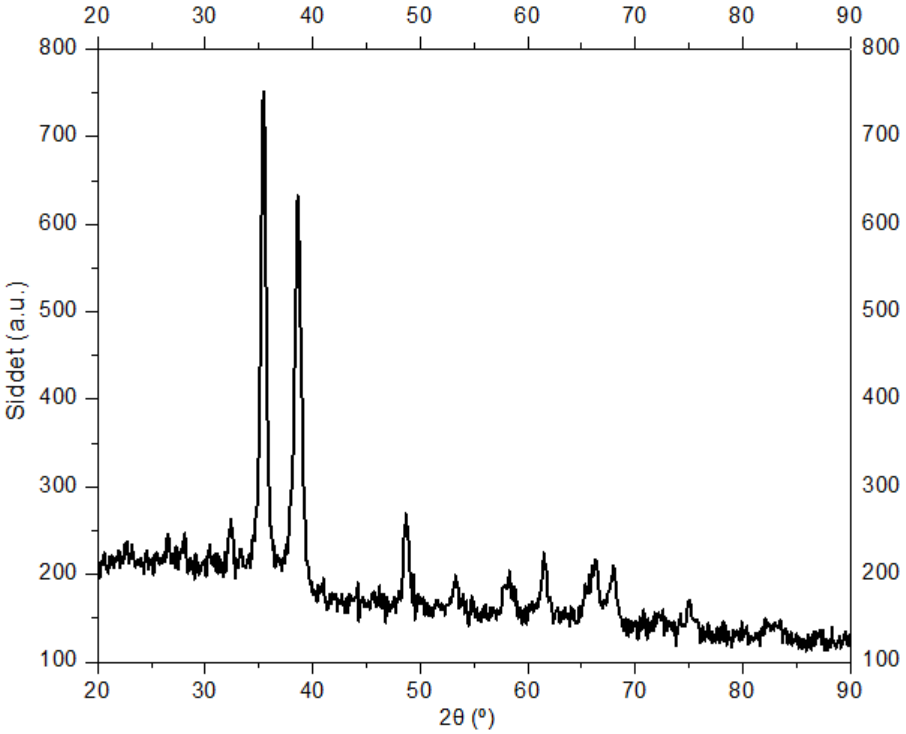
Şekil 4.8: Deney 8'e ait XRD grafiği (T:400°C; 0.2M $CuSO_4$, %5 Ekstrakt).



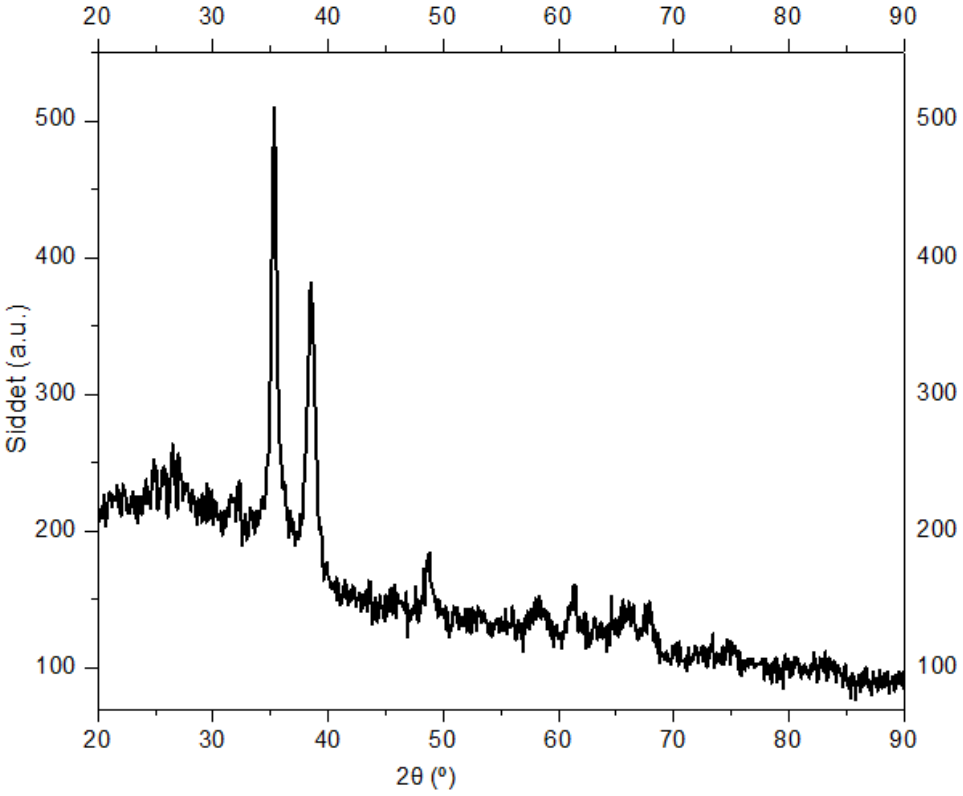
Şekil 4.9: Deney 9'a ait XRD grafiği (T:500°C; 0.05M $CuSO_4$, %12,5 Ekstrakt).



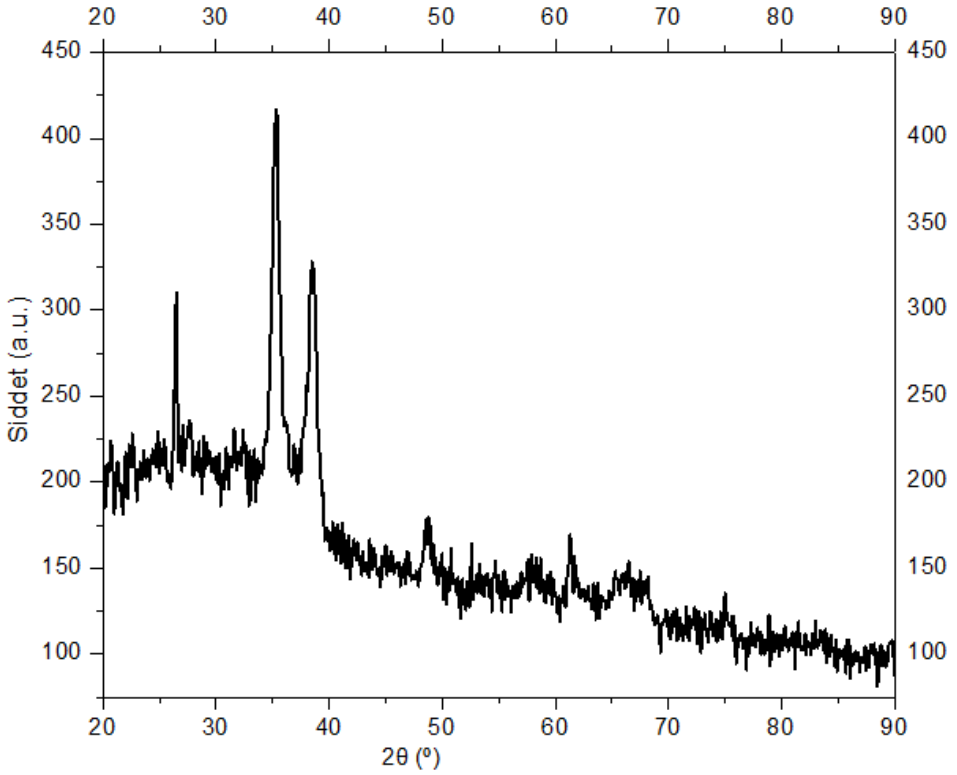
Şekil 4.10: Deney 10'a ait XRD grafiği (T:400°C; 0.125M $CuSO_4$, %12,5 Ekstrakt).



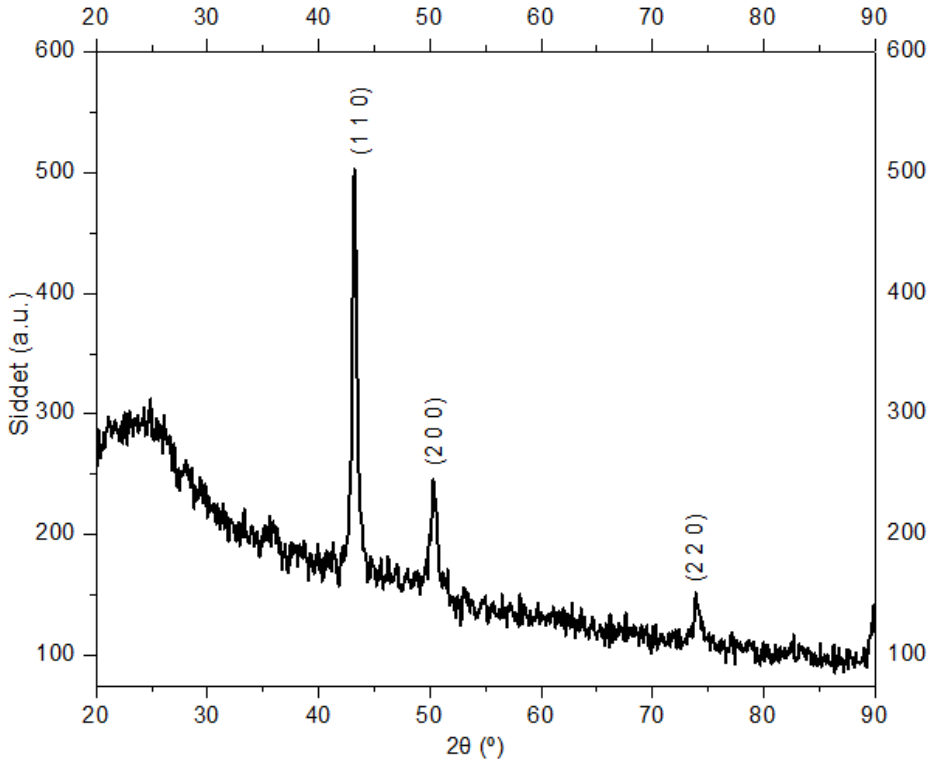
Şekil 4.11: Deney 11'e ait XRD grafiği (T:300°C; 0.125M $CuSO_4$, %20 Ekstrakt).



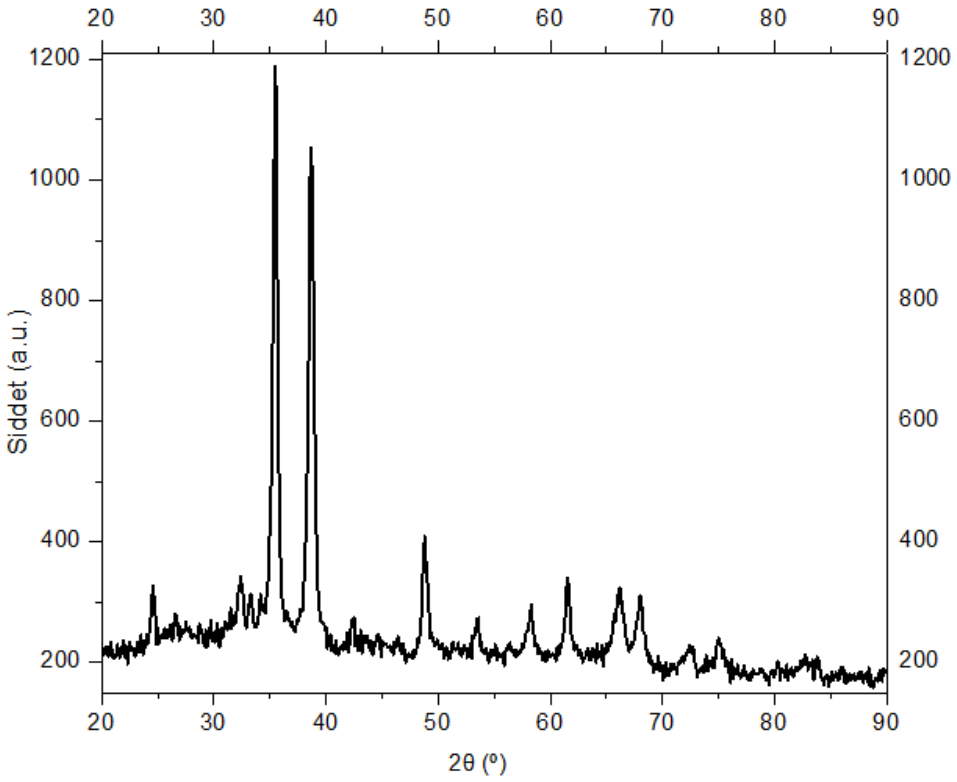
Şekil 4.12: Deney 12'e ait XRD grafiği (T:300°C; 0.125M $CuSO_4$, %5 Ekstrakt).



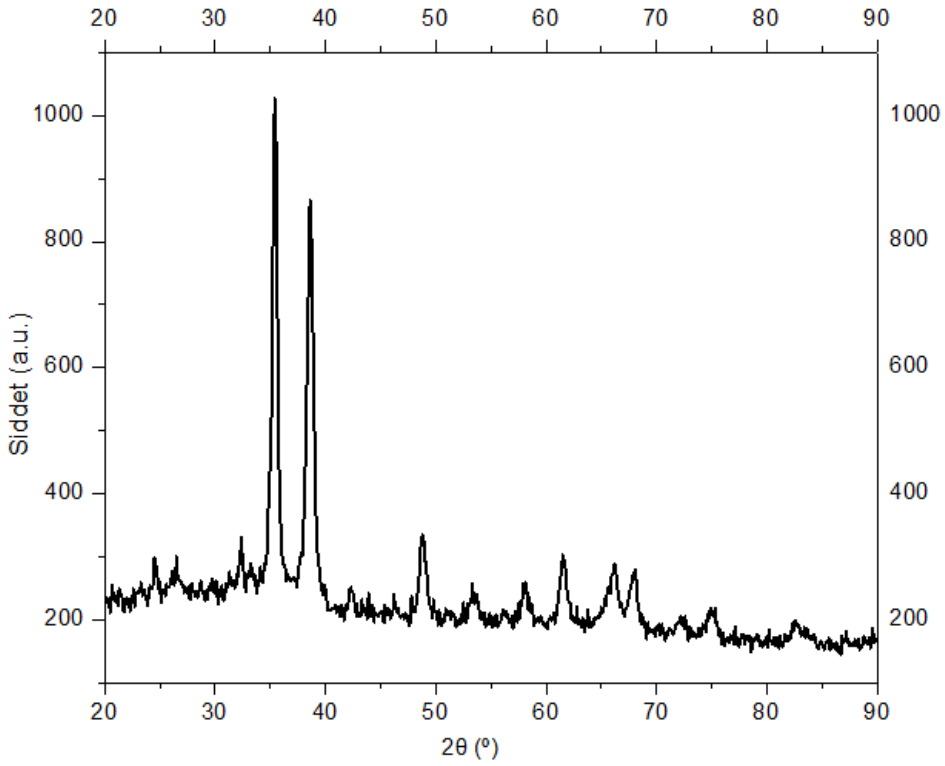
Şekil 4.13: Deney 13'e ait XRD grafiği (T:300°C; 0.05M $CuSO_4$, %12,5 Ekstrakt).



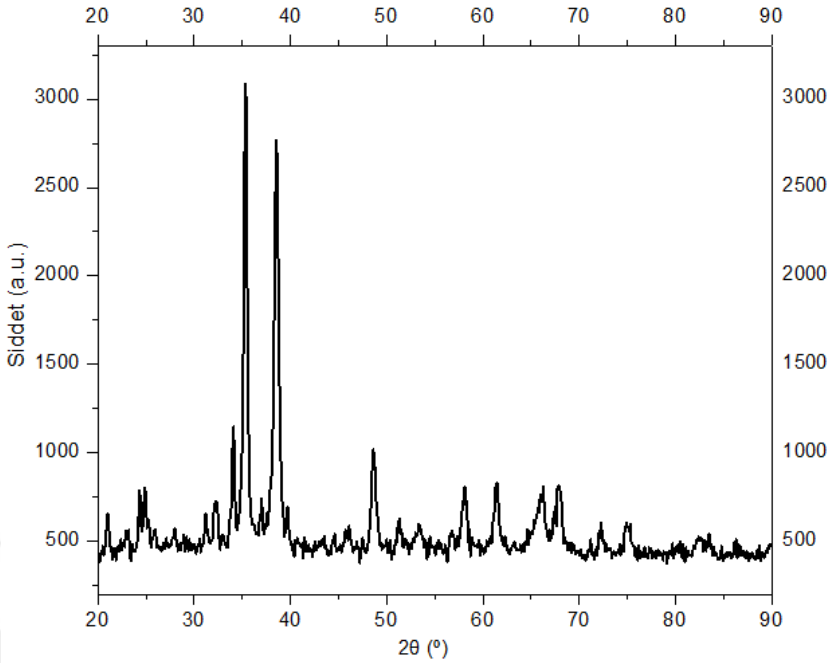
Şekil 4.14: Deney 14'e ait XRD grafiği (T:300°C; 0.2M $CuSO_4$, %12,5 Ekstrakt).



Şekil 4.15: Deney 15'e ait XRD grafiği (T:400°C; 0.125M $CuSO_4$, %12,5 Ekstrakt).

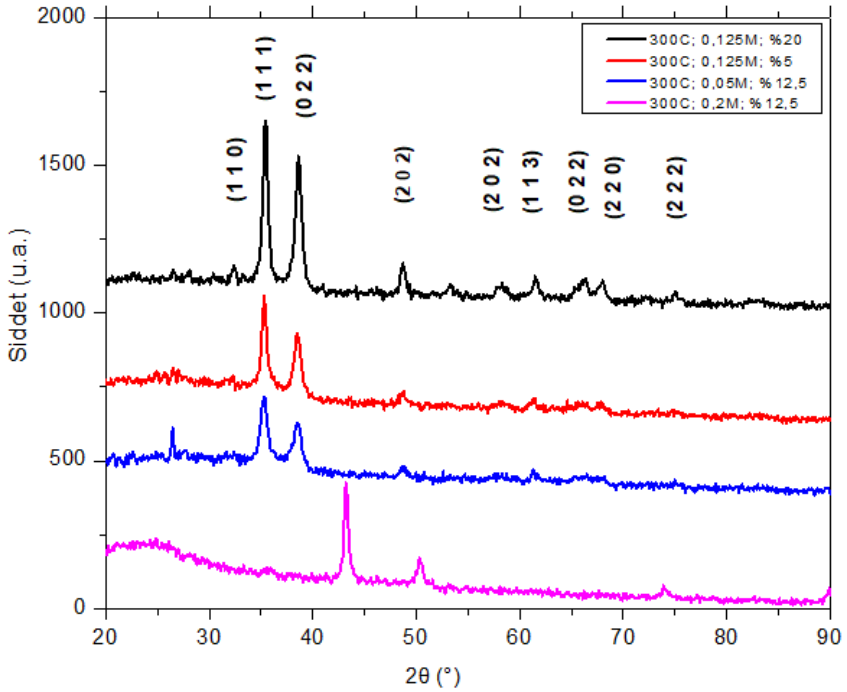


Şekil 4.16: Deney 16'ya ait XRD grafiği (T:400°C; 0.125M $CuSO_4$, %12,5 Ekstrakt).

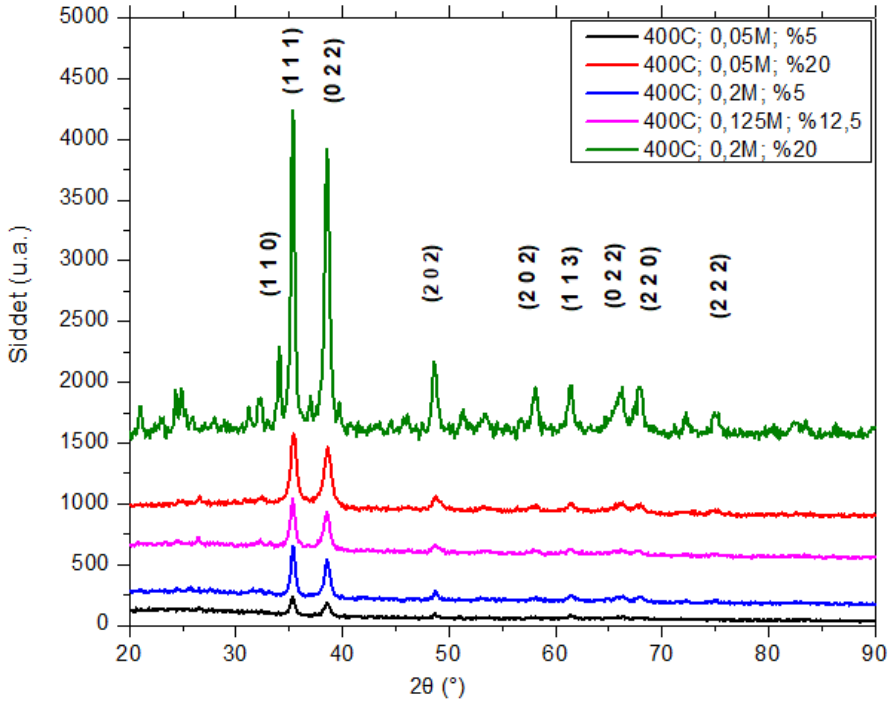


Şekil 4.17: Deney 17'ye ait XRD grafiği (T:400°C; 0.2M $CuSO_4$, %20 Ekstrakt).

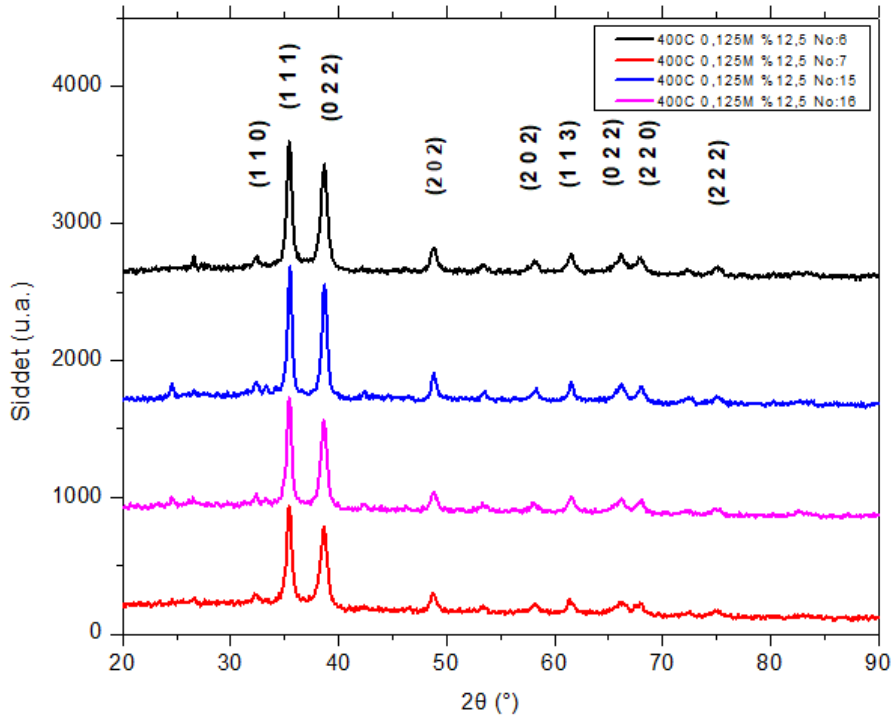
Numunelere ait 300℃, 400 ℃ ve 500 ℃'de 2 saat kalsinasyon sonrası XRD grafikleri Şekil 4.18'de verilmiştir.



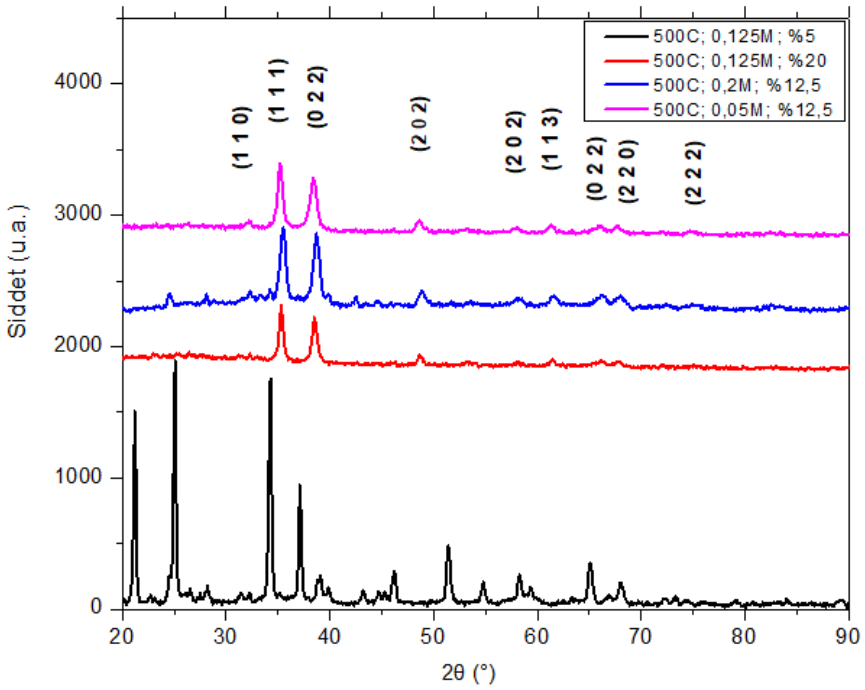
Şekil 4.18: 300°C'de kalsine edilen numunelerin XRD diyagramları.



Şekil 4.19: 400°C'de kalsine edilen numunelerin XRD diyagramları.



Şekil 4.20: 400°C'de kalsine edilen aynı parametredeki numunelerin XRD diyagramları.



Şekil 4.21: 500°C'de kalsine edilen numunelerin XRD diyagramları.

Numuneler kalsine edildikten sonra XRD verileri kullanılarak elde edilen kristalin boyutları ve kafes parametreleri Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1: Kalsine sonrası toz numunelerin kristalin boyutu ve kafes parametre değerleri

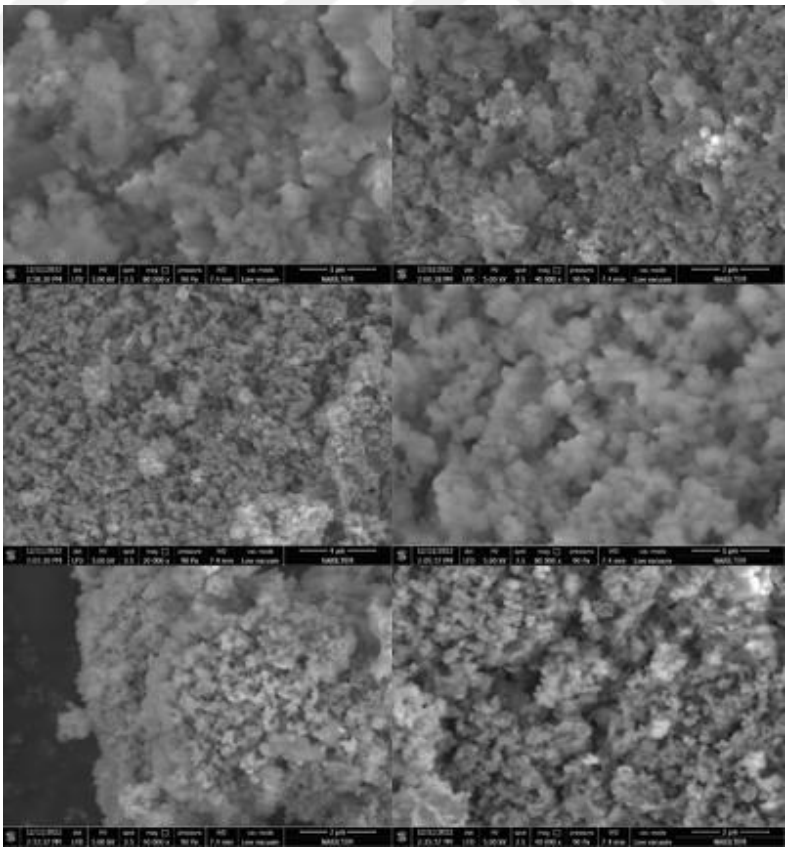
Deney No	Kalsinasyon Sıcaklığı (°C)	Kristalin Boyutu (nm)	Kafes Parametresi (A°)
11	300°C	18,39	5,27
12	300°C	20,47	6,04
13	300°C	26,80	6,79
14	300°C	20,87	4,96
2	400°C	22,61	6,77
3	400°C	17,64	5,28
8	400°C	23,20	5,71
10	400°C	25,09	5,81
17	400°C	13,39	5,25
6	400°C	16,18	5,27

Tablo 4.1: Kalsine sonrası toz numunelerin kristalin boyutu ve kafes parametre değerleri (devamı)

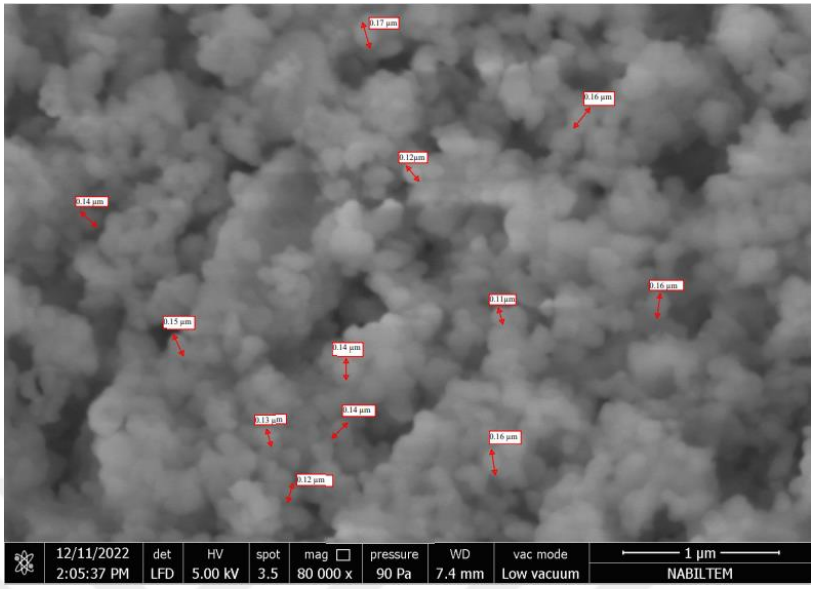
7	**400°C**	**18,24**	**5,25**
15	400°C	19,67	5,27
16	400°C	25,26	5,25
1	500°C	23,62	5,26
4	500°C	15,54	5,62
5	500°C	15,01	5,26
9	500°C	24,06	5,27

4.2. SEM SONUÇLARI

Sentezi gerçekleştirilen, 500°C'de kalsine edilmiş D5 toz numunelerinin yüzey morfolojisini incelemek amacıyla Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile yüzey görüntüleri alınmıştır. SEM analizi görüntüleri Şekil 4.22 – 4.23'de verilmiştir.



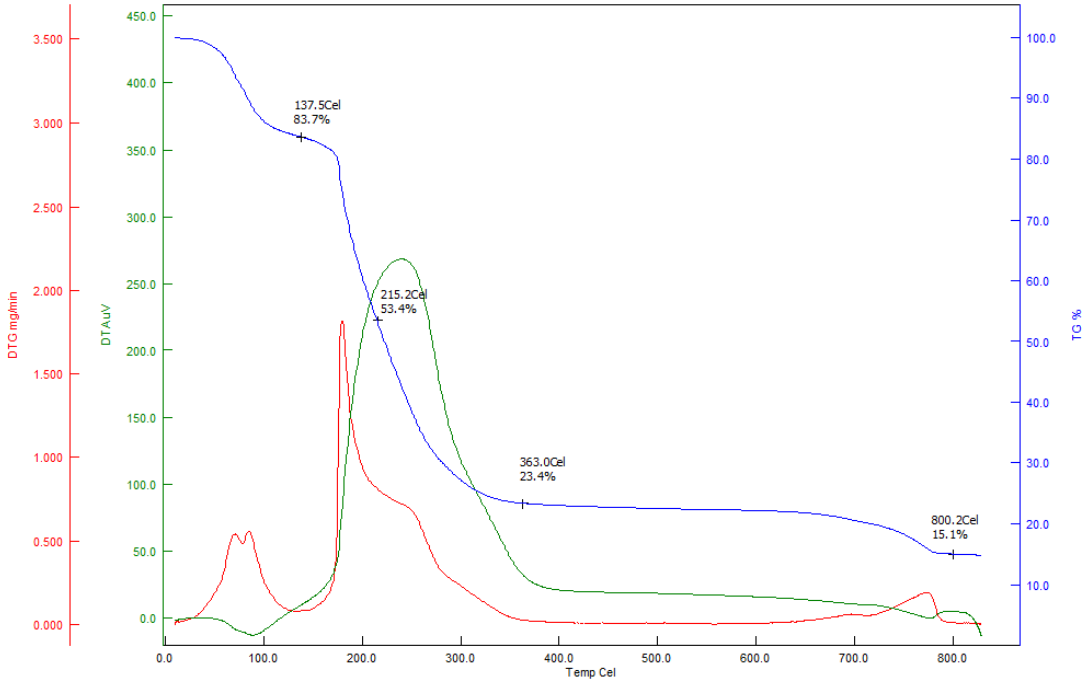
Şekil 4.22: 500°C'de kalsine edilen D5 numunesinin SEM görüntüleri.



Şekil 4.23: 500°C'de kalsine edilen D5 numunesinin SEM analizinde tanecik boyutları görüntüsü.

4.3. TGA SONUÇLARI

Kalsine edilmeyen D9 numunesine ait ağırlık kaybını incelemek amacıyla Termogravimetrik (TGA/DTA) analiz gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.24'te TGA grafiği verilmiştir.



Şekil 4.24: Kalsine edilmeyen D9 numesine ait TGA grafiği.

4.4. ANTİBAKTERİYEL TEST SONUÇLARI

4.4.1. Minimum İnhibe Edici Konsantrasyonun (MİK) Belirlenmesi

Antimikrobiyal aktivite gösteren maddeler CLSI M27-A2 (2002) standart yöntemi ile iki katlı seri mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak MİK değerleri belirlenmiştir (Winn vd. 2006) Bu amaçla antimikrobiyal aktivitesi belirlenen madde uygun ortamda çözüldükten sonra distile su ile seyreltilecek ve 100 µL hacminde mikrotitrasyon petrisine aktarılmıştır. Çift kuvvetli müeller hilton broth (MHB) ortamında geliştirilen test bakteriler Mcfarland 0.5'e ayarlanacak ve 100 µL hacminde mikrotitrasyon petrilerindeki her bir dilüsyon üzerine ilave edilmiştir. Mikrotitrasyon petrisinin 11. kuyucuğuna MHA ve test bakterisi ilave edilerek pozitif gelişme kontrolü, 12. kuyucuğuna ise sadece MHA yerleştirilerek sterilizasyon kontrolü oluşturulmuştur. Hazırlanan mikrotitrasyon petrileri 37 ºC'de 24 saat inkübe edildikten sonra üremeyi işaret eden bulanıklık varlığı dikkate alınarak incelenmiştir. Mikroorganizma üremesini temsil eden bulanıklığın olmadığı konsantrasyon MİK olarak değerlendirilmiştir. Ketoconazole ve Streptomycin ticari antibiyotikleri ise referans madde olarak kullanılmıştır.

4.4.2. Minimum Fungisidal Konsantrasyonun (MFK) Belirlenmesi

Fungisidal aktivitenin belirlenmesinde filamentli küfler için CLSI M07-A10 (2008), mayalar için ise CLSI M38-A2 (2008) standart yöntemleri bazı modifikasyonlar yapılarak kullanılmıştır. Kısaca PDA ortamında 25 ºC'de 7 gün boyunca geliştirilmiş olan küf, 37°C'de 24 saat inkübasyonla geliştirilen maya kültürlerinden sırasıyla %0,1'lik Tween 80 ve FTS ortamında spor ana stoğu hazırlanmıştır. Hazırlanan spor/hücre stoğu 1-5x10^5 cfu/ml spor içerecek şekilde küfler için PDB, mayalar için ise MHB ortamlarında dilue edilmiştir. Mikrotitrasyon petrisine 100 µl hacminde aktarılan madde dilüsyon serisinin üzerine 100 µl hacminde spor süspansiyonu ilave edilmiştir. Mikrotitrasyon petrisinin 11. kuyucuğu ilgili besi ortamı ve test küf/mayasını içerecek şekilde hazırlanarak pozitif üreme kontrolü, 12. kuyucuğu ise sadece besi ortamını içerecek şekilde hazırlanarak negatif kontrol olarak kullanılmıştır. 25 ºC'de 72 saat inkübasyon işleminden sonra küfler binoküler mikroskop altında miselyal yapı oluşumu yönünden değerlendirilmiştir. Mayalar ise üremeye dayalı bulanıklık oluşumunun dikkate alınması ile incelenmiştir. Üremenin olmadığı son konsantrasyon MFK olarak değerlendirilmiştir (Espinel-Ingroff, 2001). Ketoconazole ve Streptomycin ticari antibiyotikleri ise referans madde olarak kullanılmıştır.

Tablo 4.2: Test maddelerinin MİK değerleri (µg/mL) [1]

Toz	A	B	C	D
D0	250	250	250	250
D1	250	250	250	500
D2	250	250	TE	TE
D3	250	250	250	250
D4	250	250	TE	TE
D5	250	250	TE	TE
D6	250	250	250	250
D7	250	250	250	250
D8	250	250	TE	TE
D9	250	250	250	250
D10	250	250	250	TE
D11	250	250	250	250
D12	250	250	TE	TE
D13	250	250	TE	TE
D14	250	250	250	250
D15	250	250	250	250
D16	250	250	250	250
D17	250	250	250	TE
Referans1	31.25	31.25	TE	15.625
Referans2	-	-	-	-

[1] **Referans 1**: Streptomycin, **Referans 2:** Ketoconazole, **TE:** Test edilmemiştir, **A)** *E. coli* (ATCC-25922), **B)** *S. aureus* (NRRL B-767), **C)** *B. cereus* (NRRL-B-3711), **D)** *B. subtilis* (NRS-744)

Tablo 4.3: Test maddelerinin MFK değerleri (µg/mL) [2]

Toz	A	B	C	D
D0	250	250	250	250
D1	250	250	250	250
D2	250	TE	250	TE
D3	250	250	250	250
D4	250	TE	**125**	250
D5	250	TE	**125**	TE
D6	250	250	250	250
D7	250	250	250	250
D8	**125**	TE	**125**	TE
D9	250	250	250	250
D10	250	250	250	250
D11	250	250	250	250
D12	**125**	TE	**125**	TE
D13	**125**	TE	**125**	**125**
D14	250	250	**125**	250
D15	250	250	**125**	250
D16	250	250	250	250
D17	**125**	TE	**125**	**125**
Referans1	-	-	-	-
Referans2	15.62	62.5	250	31.25

Referans 1: Streptomycin, **Referans 2:** Ketoconazole, **NT:** Not tested, **A**) *A. flavus* (NRRL 980) **B**) *F. solani* (NRRL 13414), **C**) *C. albicans* (ATCC 90028), **D)** *C.glabrata* NRRL Y 178151[2]

[2] **Referans 1**: Streptomycin, **Referans 2:** Ketoconazole, **NT:** Not tested, **A**) *A. flavus* (NRRL 980) **B**) *F. solani* (NRRL 13414), **C**) *C. albicans* (ATCC 90028), **D)** *C.glabrata* NRRL Y 178151[2]

4.5. BOX-BEHNKEN DENEYSEL TASARIM SONUÇLARI

4.5.1. Kristalin Boyutuna göre Sonuçlar

Oda sıcaklığında (25°C) yeşil sentez yöntemi ile sentezlenen numuneler, farklı sıcaklıklarda kalsinasyon edilerek XRD analizi gerçekleştirilmiştir. XRD analizi sonuçlarına göre elde edilen veriler yardımı ile kristalin boyutu değerleri hesaplanmıştır ve Tablo 4.4'de görüldüğü üzere Box-Behnken deneysel tasarımında kristalin boyutu değerleri sisteme girilmiştir.

Tablo 4.4. Box-Behnken tasarım koşulları ve kristalin boyutları

Deney No	Konsantrasyon (M)	Ekstrakt Miktarı (%)	Sıcaklık (ºC)	Kristalin Boyutu (nm)
1	0,125M	%5	500 ºC	23,62
2	0,05M	%5	400 ºC	22,61
3	0,05M	%20	400 ºC	17,64
4	0,125M	%20	500 ºC	15,54
5	0,2M	%12,5	500 ºC	15,01
6	0,125M	%12,5	400 ºC	16,18
7	0,125M	%12,5	400 ºC	18,24
8	0,2M	%5	400 ºC	23,20
9	0,05M	%12,5	500 ºC	24,06
10	0,125M	%12,5	400 ºC	25,09
11	0,125M	%20	300 ºC	18,39
12	0,125M	%5	300 ºC	20,47
13	0,05M	%12,5	300 ºC	26,80
14	0,2M	%12,5	300 ºC	20,87
15	0,125M	%12,5	400 ºC	19,67
16	0,125M	%12,5	400 ºC	25,26
17	0,2M	%20	400 ºC	13,39

Kristal boyut değerleri ile bağımsız değişkenler arasında birinci dereceden denklem olduğu görülmüştür. Elde edilen denklem (4.1)'de gösterilmektedir.

Kristalin boyutu (nm) = 20,36 – 2,33 (A) – 1,04 (B) – 3,12 (C) (4.1)

Denkleme göre parametrelerin önündeki (+) simgesinin anlamı, o parametrenin deneysel tasarımı olumlu etkilediğini, (–) simgesi ise o parametrenin deneysel tasarıma olumlu etki etmediğini ifade eder. Buna göre; A (konsantrasyon), B (kalsinasyon sıcaklığı) ve C (ekstrakt miktarı) deneysel tasarıma olumlu etki etmemektedir.

4.5.1.1. Kristalin Boyutu için Modelin Belirlenmesi ve Doğrulanması

Tablo 4.5. Kristalin boyutu için doğrusal model varyans analizi

Kaynak	Kareler Toplamı	Df	Ortalama Kare	F-değeri	P-değeri	
Model	129,79	3	43,26	4,33	0,0253	Anlamlı
A-Konsantrasyon	43,43	1	43,43	0,0574		
B-Sıcaklık	8,61	1	8,61	0,8615	0,3702	
C-Ekstrakt Miktarı	77,75	1	77,75	7,78	0,0153	
Arta Kalan	129,94	13	10,00			
Uyum Eksikliği	62,51	9	6,95	0,4120	0,86761	Anlamlı değil
Hata	67,43	4	16,86			
Düzeltilmiş Toplam	259,73	16				

Box-Behnken modelinin istatiksel analizi, ANOVA (varyans analizi) ile gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucu Tablo 4.5'de gösterilmiştir. Bu verilere göre 4,33 model F değeri denklemin anlamlı olduğunu gösterir. 0,05'ten küçük P değerleri, model terimlerinin anlamlı olduğunu gösterir. Bu durumda C- Ekstrakt miktarı anlamlı bir model terimidir. Ekstrakt miktarının deney üzerinde etkili bir parametre olduğunu söyleyebiliriz. 0,4120'lik uyum eksikliği F değeri, uyum eksikliğinin saf hataya göre önemli olmadığını ve deneysel hataları içermediğini gösterir. Bu veriler Lineer (doğrusal) modelin geçerli ve bu modelin deneysel çalışma için uygun olduğunu göstermektedir. Tablo 4.6'da karelerin sıralı model toplamı, Tablo 4.7'de uyum istatistikleri verilmiştir.

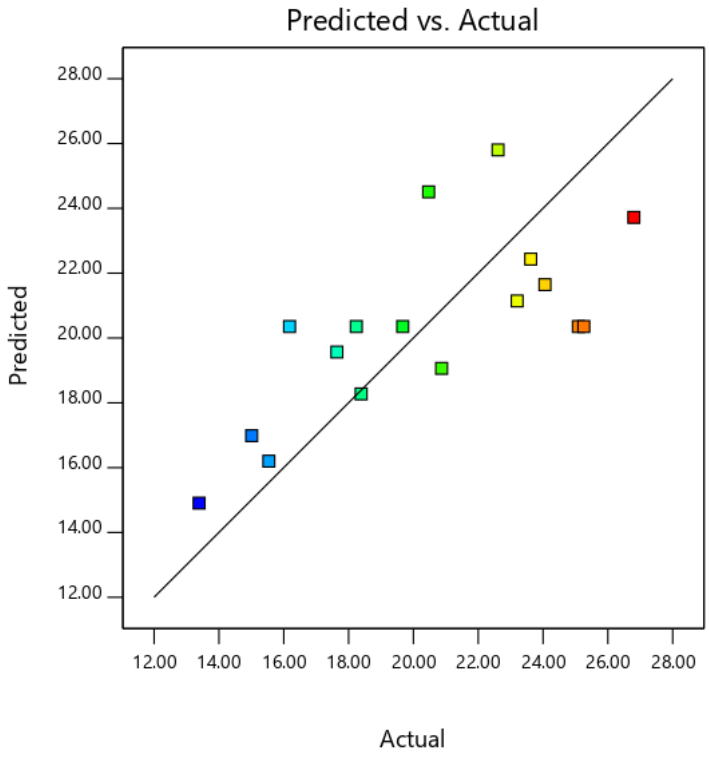
Tablo 4.6. Kristalin boyutu için karelerin sıralı model toplamı

Kaynak	Kareler Toplamı	Df	Ortalama Kare	F-değeri	p-değeri	
Ortalama ve Toplam	7043,75	1	7043,75			
Doğrusal ve Ortalama	**129,79**	**3**	**43,26**	**4,33**	**0,0253**	**Önerilen**
2FI ve Doğrusal	17,29	3	5,76	0,5116	0,6833	
Kuadratik ve 2FI	16,63	3	5,54	0,4041	0,7548	
Kübik ve Kuadratik	28,59	3	9,53	0,5653	0,6664	Geçersiz
Arta Kalan	67,43	4	16,86			
Toplam	7303,48	17	429,62			

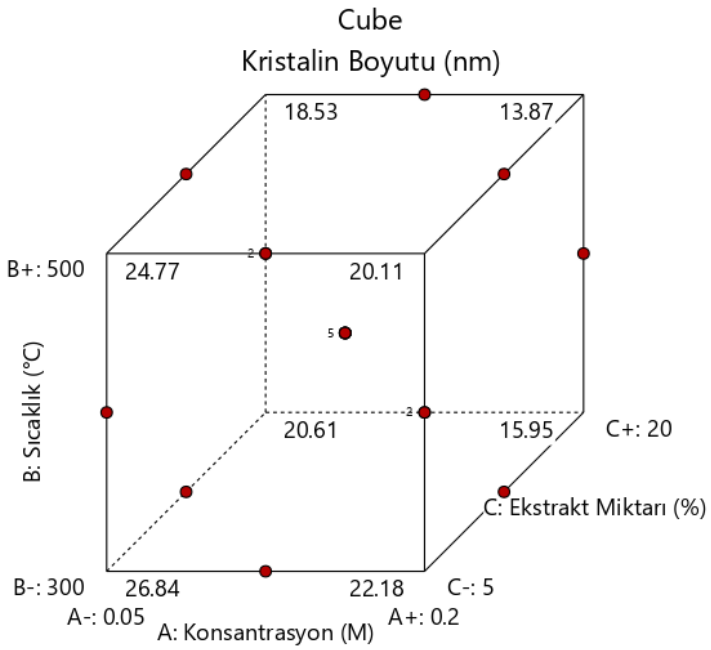
Tablo 4.7 Kristalin boyutu için uyum istatistikleri

Standart Sapma	**3,16**	**R^2**	**0,4997**
Ortalama	20,36	**Elde Edilen R^2**	0,3843
C.V. %	15,53	**Tahmin Edilen R^2**	0,2084
		Hassasiyet	7,1043

Elde edilen R^2 0,3843, tahmin edilen R^2 0,2084 makul bir uyum içerisindedir ve aradaki fark 0,2'den azdır. Bu iki değerin birbirine yakın olması yapılan deneylerin doğru olduğunu göstermektedir. Hassasiyetin 7,1043 olması, 4'ten büyük olduğu için modelin deneysel tasarım için uygun olduğunu göstermektedir. Elde edilen ve tahmin edilen kristalin boyutu değerlerine ait karşılaştırma grafiği Şekil 4.25'de verilmiştir. Kristalin boyutu yüzde değerleri üzerine proses parametrelerine etkisi gösteren kübik grafik ise Şekil 4.26'da verilmiştir.



Şekil 4.25: Elde edilen ve tahmin edilen kristalin boyutu değerlerine ait karşılaştırma grafiği.

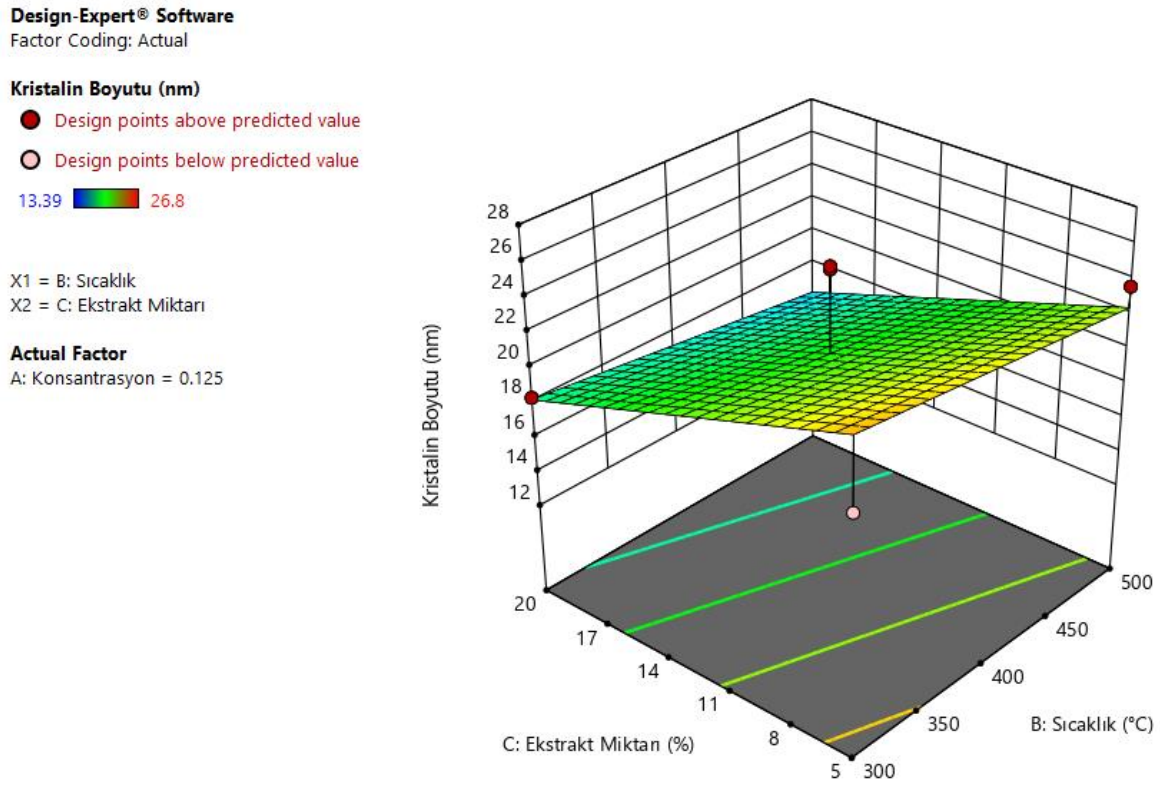


Şekil 4.26: Kristalin boyutu değerleri üzerine proses parametrelerinin etkisini gösteren kübik grafik.

4.5.1.2. Kristalin Boyutuna Proses Parametrelerinin Etkisi

4.5.1.2.1. Konsantrasyon Etkisi

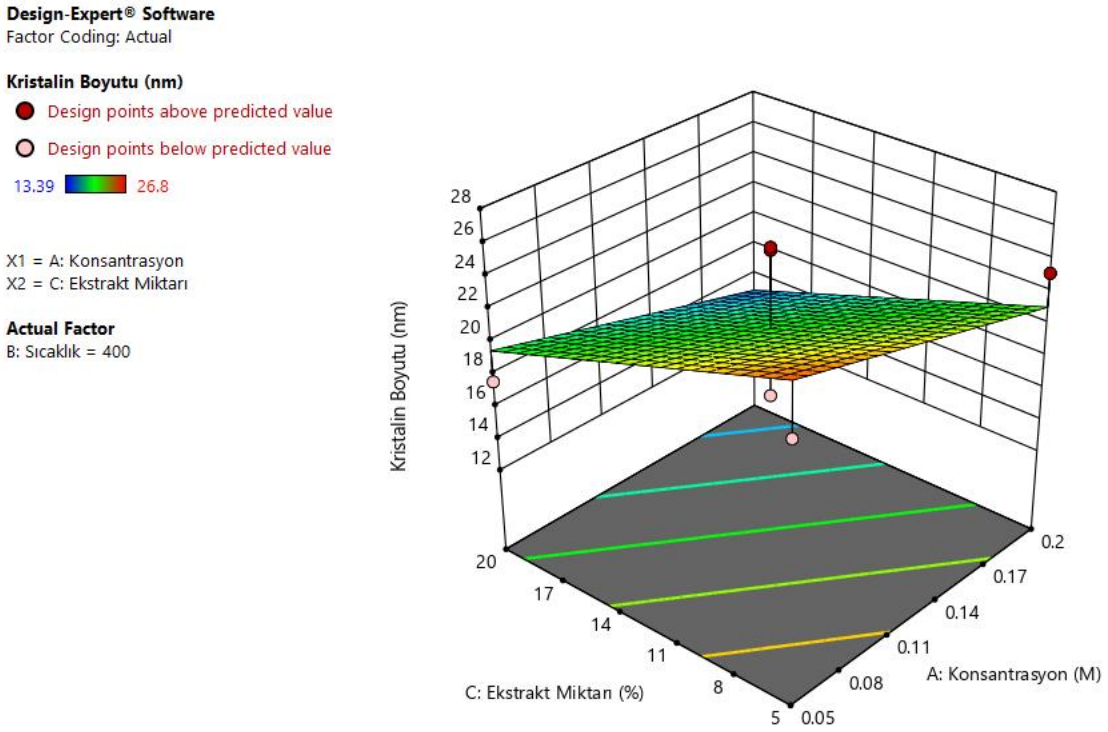
Kristalit boyutu değerleri üzerine bakır tuzu konsantrasyonunun etkisi, Design Expert programında Box-Behnken deneysel metodundan elde edilen 3D grafik ile Şekil 4.27'de gösterilmiştir.



Şekil 4.27: Kristalin boyutuna konsantrasyon parametresi etkisinin 3D gösterimi.

4.5.1.2.2. Sıcaklık Etkisi

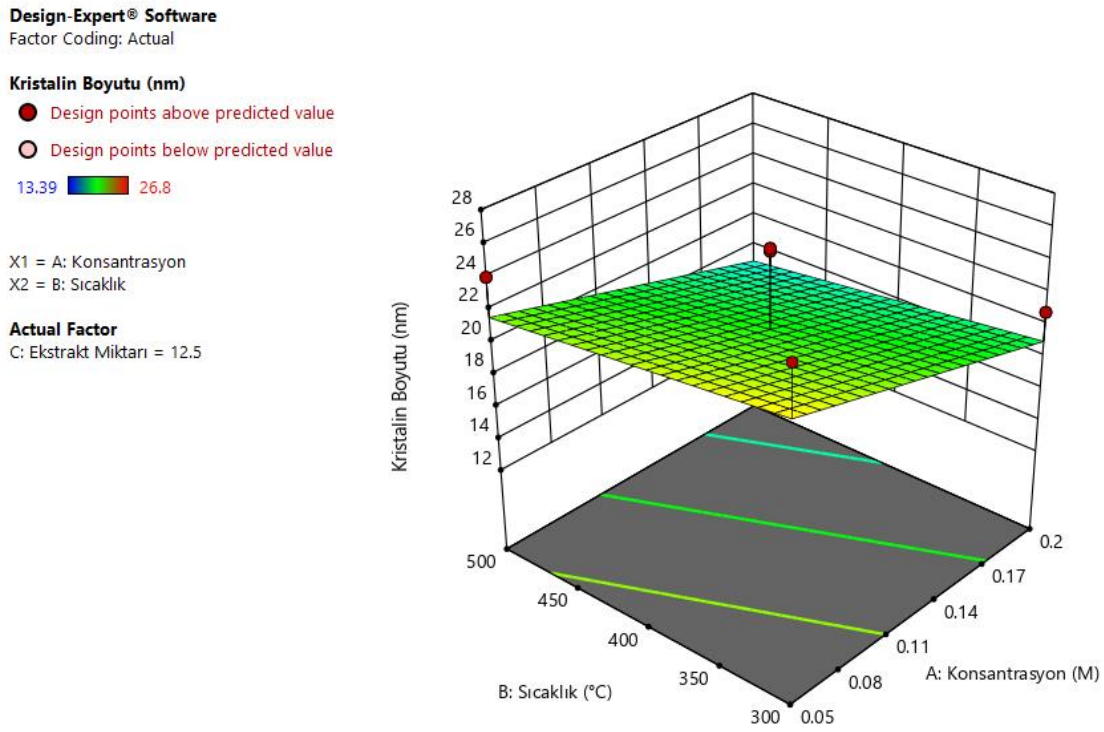
Kristalit boyutu değerleri üzerine kalsinasyon sıcaklığının etkisi, Design Expert programında Box-Behnken deneysel metodundan elde edilen 3D grafik ile Şekil 4.28'de gösterilmiştir.



Şekil 4.28: Kristalin boyutuna sıcaklık parametresi etkisinin 3D gösterimi.

4.5.1.2.3. Ekstrakt Miktarı Etkisi

Kristalit boyutu değerleri üzerine ceviz yaprağı ekstrakt miktarının etkisi, Design Expert programında Box-Behnken deneysel metodundan elde edilen 3D grafik ile Şekil 4.29'da gösterilmiştir.



Şekil 4.29: Kristalin boyutuna ekstrakt miktarı parametresi etkisinin 3D gösterimi.

4.5.1.3. Kristalin Boyutu için Optimizasyon

Deneysel tasarım programının en önemli amaçlarından biri, farklı parametreler ile birçok analiz gerçekleştirerek, optimum deneysel parametreleri bulmaktır. Hedef, yüksek verim ve düşük maliyet ile işin gerçekleşmesini sağlamaktır. Bu sebeple; kristalin boyutu ve kalsinasyon sıcaklığı minimum, konsantrasyon ve ekstrakt miktarı ise belirli aralık olarak seçilirse Box-Behnken deneysel tasarım programına göre optimum deneysel koşullarımız 17 farklı analiz incelendiğinde 12 numaralı deney olduğu görülmektedir.

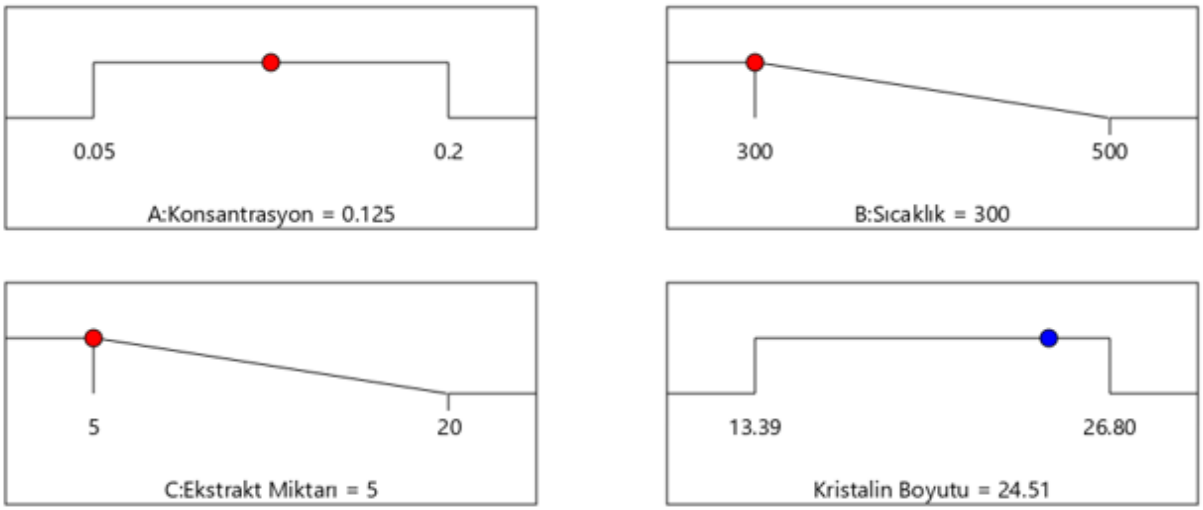
Parametreler ve değerler Şekil 4.30'da verilmiştir.

Konsantrasyon: 0,125M

Kalsinasyon Sıcaklığı: 300°C

Ekstrakt Miktarı: %5

Ortalama Kristalin Boyutu: 24,51 nm



Şekil 4.30: BBT'nin verdiği kristalin boyutuna göre optimum deney koşulları.

4.5.2. MFK (Minimum Fungisidal Konsantrasyon) Değerine göre Sonuçlar

Oda sıcaklığında yeşil sentez yöntemi ile sentezlenen ve CuO NP oluşumuna sahip numunelerin antimikrobiyal ve antifungal aktivite analizleri gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucunda Tablo 4.3'de görüldüğü üzere MFK değerlerine ulaşılmıştır ve Box-Behnken deneysel tasarımında bu değerler sisteme girilmiştir.

MFK değerleri ile bağımsız değişkenler arasında birinci dereceden denklem olduğu görülmüştür. Elde edilen denklem (4.2)'de gösterilmektedir.

$$\text{MFK (µg/mL)} = 191.18 - 46.87\,(A) + 15.63\,(B) - 31.25\,(AB) - 62.50\,(BC) \qquad (4.2)$$

A: konsantrasyon

B: kalsinasyon sıcaklığı

C: ekstrakt miktarı

Denkleme göre parametrelerin önündeki (+) ve (–) simgelerinin anlamıına göre, A (konsantrasyon), AB (konsantrasyon*sıcaklık) ve BC (sıcaklık*ekstrakt miktarı) deneysel tasarıma olumlu etki etmez iken B (sıcaklık) denkleme olumlu bir katkı sağlar.

4.5.2.1. MFK Değeri için Modelin Belirlenmesi ve Doğrulanması

Tablo 4.8: MFK değeri için sıralı karelet toplamı

Kaynak	Kareler Toplamı	Df	Ortalama Kare	F-değeri	p-değeri	
Doğrusal	34145.22	9	3793.91	1.21	0.4581	
2FI	**14613.97**	**6**	**2435.66**	**0.7794**	**0.6269**	**Önerilen**
Kuadratik	3906.25	3	1302.08	0.4167	0.7510	
Kübik	0.0000	0				
Hata	12500.00	4	3125.00			Geçersiz

Tablo 4.9. MFK değeri için doğrusal model varyans analizi

Kaynak	Kareler Toplamı	df	Ortalama Kare	F-değeri	P-değeri	
Model	39062.50	6	6510.42	2.40	0.1060	Anlamlı değil
A-Konsantrasyon	17578.12	1	17578.12	6.48	0.0291	
B-Sıcaklık	1953.12	1	1953.12	0.7203	0.4159	
C-Ekstrakt Miktarı	7.276×10^{-12}	1	7.276×10^{-12}	2.683×10^{-15}	1.0000	
AB	3906.25	1	3906.25	1.44	0.2577	
AC	0.0000	1	0.0000	0.0000	1.0000	
BC	15625.00	1	15625.00	5.76	0.0373	
Arta Kalan	27113.97	10	2711.40			
Uyum Eksikliği	14613.97	6	2435.66	0.7794	0.6269	Anlamlı değil
Hata	12500.00	4	3125.00			
Düzeltilmiş Toplam	66176.47	16				

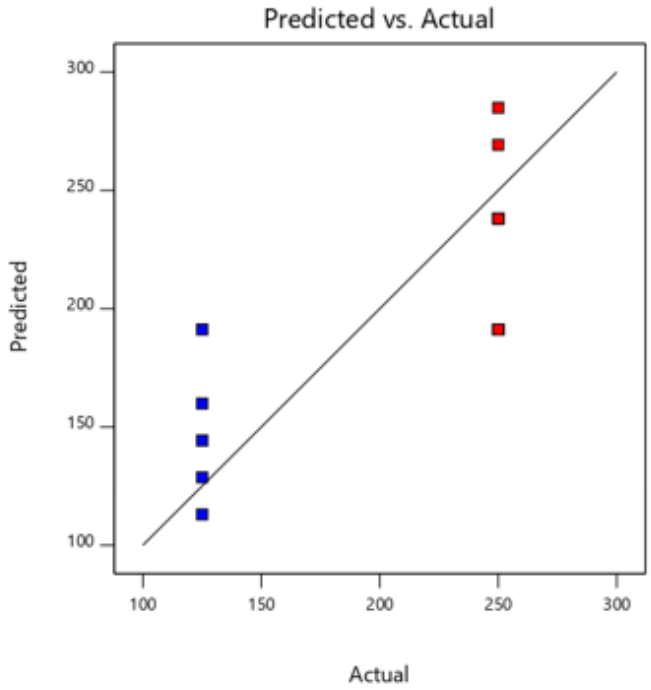
Varyans analizine (ANOVA) göre önerilen model Tablo 4.8'de görüldüğü gibi 2FI (iki faktörlü etkileşim için sıralı kareler toplamı) tasarım modelidir. Tablo 4.9'da varyans analizi verilerine

göre 2,40 model F değeri, modelin gürültüye göre anlamlı olmadığını ifade etmektedir. Gürültü sebebiyle bu kadar büyük bir F değerinin ortaya çıkma olasılığı %10.60'tır. 0.05'den küçük P değerleri, model terimlerinin önemli olduğunu göstermektedir ve bu durumda A(konsantrasyon), BC (sıcaklık ekstrakt× miktarı) anlamlı model terimleridir. 0.1'den büyük değerler ise model terimlerinin anlamlı olmadığını gösterir. Uyum eksikliği F değeri 0.78'dir ve bu değer, uyum eksikliğinin saf hataya göre önemli olmadığını göstermektedir. Gürültü nedeniyle bu kadar büyük bir uygunluk F değeri oluşma olasılığı %62.69'dur.

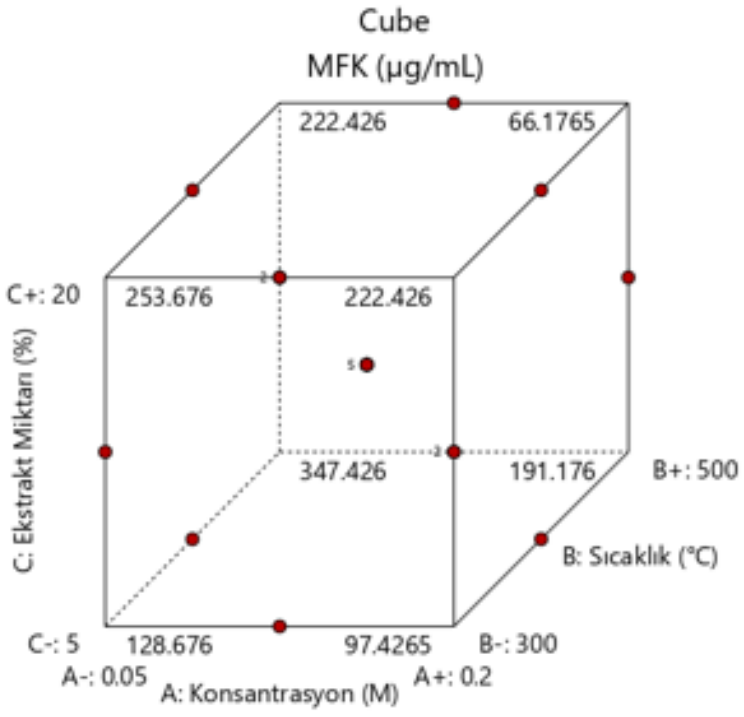
Tablo 4.10: MFK değeri için uyum istatistikleri

Standart Sapma	**52.07**	**R^2**	**0.5903**
Ortalama	191.18	**Elde Edilen R^2**	0.3444
C.V. %	27.24	**Tahmin Edilen R^2**	-0.0013
		Hassasiyet	5.1439

Tablo 4.10'da uyum istatistikleri verilerine göre daha yüksek dereceli bir model, daha iyi tahmin edilebilir olabilir. Negatif tahmin edilen R^2, genel ortalamaya göre mevcut modelden daha iyi bir tahmin edici olabileceği anlamına gelmektedir. Hassasiyet, sinyal gürültü oranını ölçer ve 4'ten büyük bir oran beklenmektedir. 5.1439 olan sinyal gürültü oranı yeterli sinyalin varlığını göstermektedir. Bu model, tasarımda kullanılabilir olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.31: Elde edilen ve tahmin edilen MFK değerlerine ait karşılaştırma grafiği.

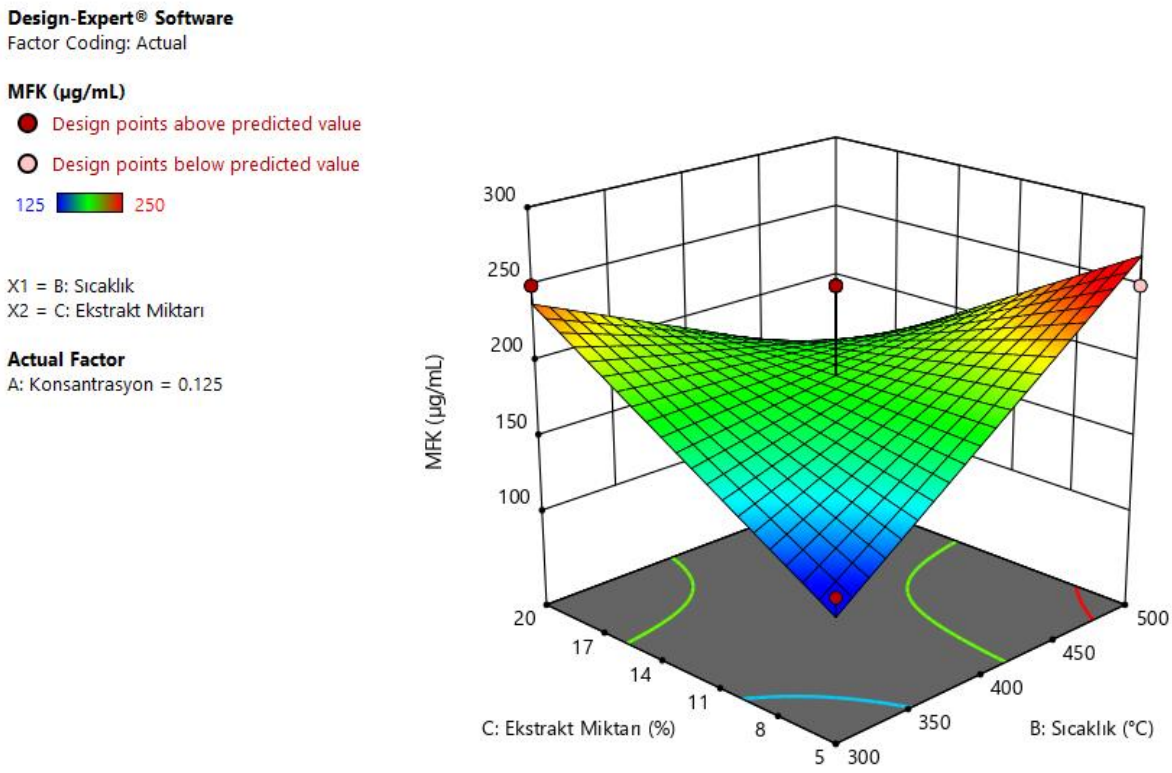


Şekil 4.32: MFK değerleri üzerine proses parametrelerinin etkisini gösteren kübik grafik.

4.5.2.2. MFK Değerine Proses Parametrelerinin Etkisi

4.5.2.2.1. Konsantrasyon Etkisi

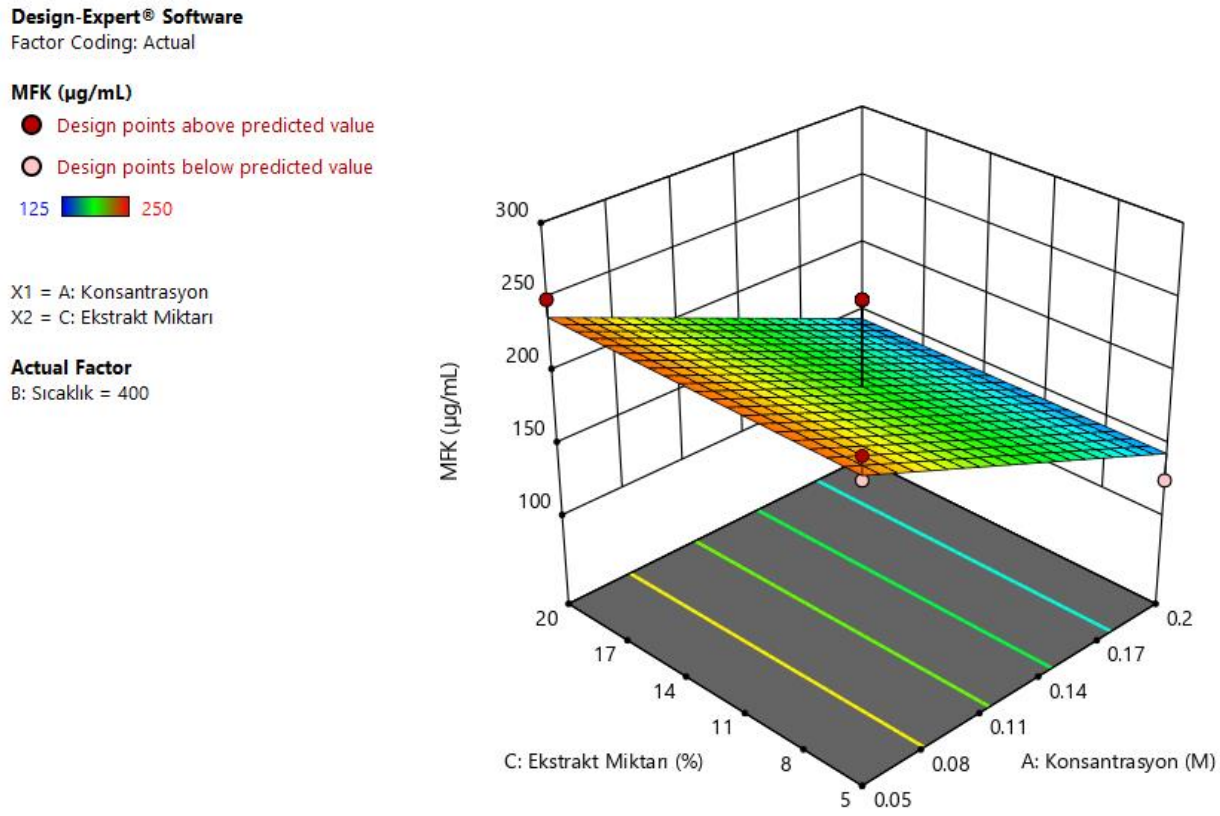
MFK (Minimum fungisidal konsanstrayon) değerleri üzerine bakır tuzu konsantrasyonunun etkisi, Design Expert programında Box-Behnken deneysel metodundan elde edilen 3D grafik ile Şekil 4.33'de gösterilmiştir.



Şekil 4.33: MFK değerine konsantrasyon parametresi etkisinin 3D gösterimi.

4.5.2.2.2. Sıcaklık Etkisi

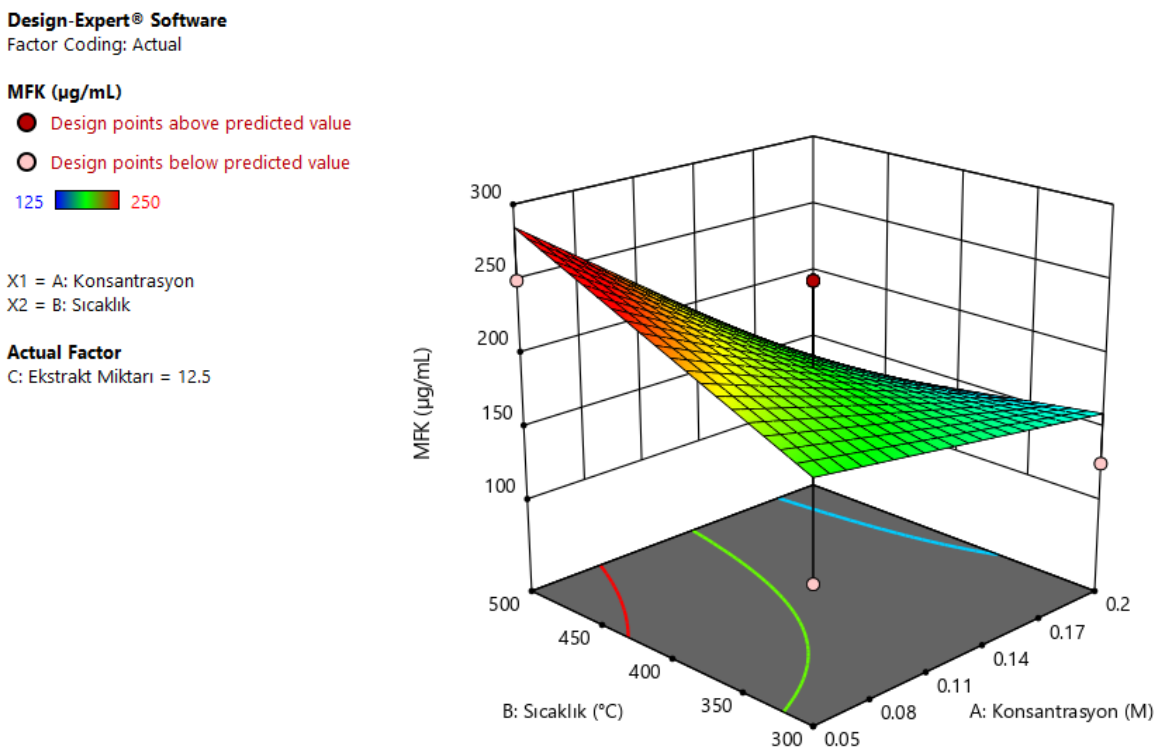
MFK (Minimum fungisidal konsanstrayon) değerleri üzerine kalsinasyon sıcaklığının etkisi, Design Expert programında Box-Behnken deneysel metodundan elde edilen 3D grafik ile Şekil 4.34'de gösterilmiştir.



Şekil 4.34: MFK değerine sıcaklık parametresi etkisinin 3D gösterimi.

4.5.2.2.3. Ekstrakt Miktarı Etkisi

MFK (Minimum fungisidal konsanstrayon) değerleri üzerine ceviz yaprağı ekstrakt miktarının etkisi, Design Expert programında Box-Behnken deneysel metodundan elde edilen 3D grafik ile Şekil 4.35'de gösterilmiştir.



Şekil 4.35: MFK değerine ekstrakt miktarı parametresi etkisinin 3D gösterimi.

4.5.2.3. MFK Değeri için Optimizasyon

Box-Behnken deneysel tasarımında MFK (Minimum fungisidal konsantrasyon) değerine göre optimum deneysel parametreleri bulmak için MFK değeri ve kalsinasyon sıcaklığı minimum, konsantrasyon ve ekstrakt miktarı ise belirli aralık olarak seçilirse Box-Behnken deneysel tasarım programına göre optimum deneysel koşullarımız 17 farklı analiz incelendiğinde 12 numaralı deney olduğu görülmektedir.

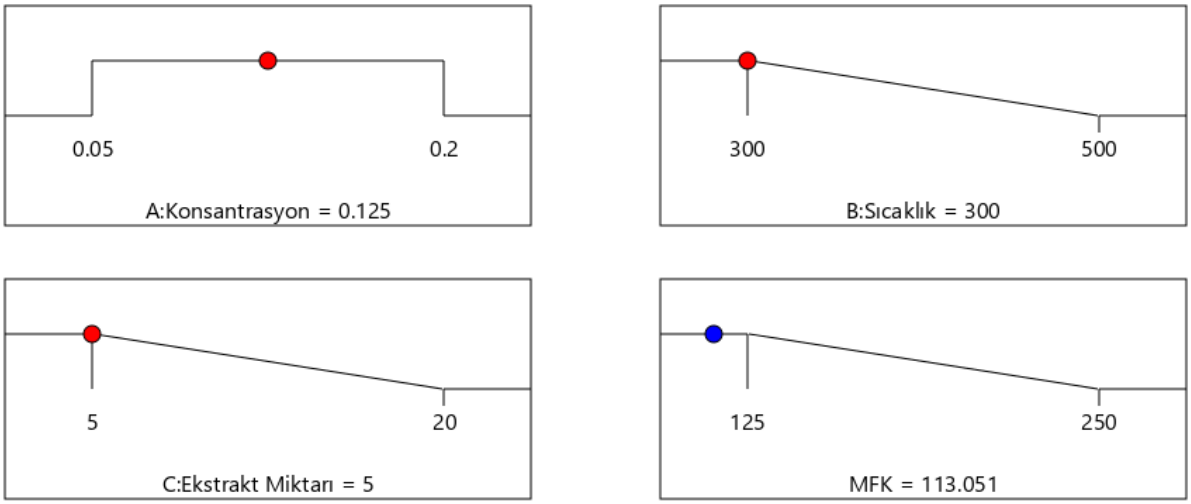
Parametreleri ve değerler Şekil 4.36'daki gibidir.

Konsantrasyon: 0,05M

Kalsinasyon Sıcaklığı: 300°C

Ekstrakt Miktarı: %5

Ortalama MFK Değeri: 113,051 µg/mL



Şekil 4.36: BBT'nin verdiği MFK'ya göre optimum deney koşulları.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Nanopartikül sentezlemek için fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler olmak üzere birçok sentez yöntemi karşımıza çıkmaktadır. Her bir sentez yönteminin ayrı özellikleri ve gerçekleşme koşulları mevcuttur. Son zamanlarda biyolojik yöntemlerden yeşil sentez yöntemi çok fazla araştırılmış ve oldukça dikkat çekmiştir. Yeşil sentez yöntemi, çevre dostu, toksik olmayan, güvenilir ve temiz bir yöntemdir. Bitki özlerini kullanarak, metal iyonların biyo-indirgemesi sayesinde nanopartikül sentezini gerçekleştiren bir yöntem yaklaşımıdır. Birçok araştırmacı yeşil sentez yöntemi sayesinde mühendislik ve biyomedikal alanlarda kullanılan çeşitli metal nanopartiküllerinin oluşumunu gerçekleştirmiştir. Araştırmacılar, yeşil sentez yöntemi ile metal nanopartiküllerin oluşumunu gerçekleştirirken bir yandan da bu metal nano partiküllerin biyomedikal uygulamalar için antimikrobiyal ajanlar olarak kullanımının araştırmalarını da gerçekleştirmektedirler.

Bu kapsamlı çalışmalar doğrultusunda Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, metal nanopartiküllerin bakterilere karşı seçicilikleri ve küçültülmüş boyutlarının yanında, öncelikli olarak listenen patojenlere karşı da etkili olduğu kanıtlanmıştır. [133]

Bu tez çalışmasında, bakır oksit nanopartiküllerinin sentezi için yeşil sentez yöntemi kullanılmıştır. Bitki özütü olarak ise ceviz yaprağı *(Juglans Regia L.)* ekstraktı hazırlanmıştır. Bakır oksit nanopartiküllerinin yeşil sentezi oda koşullarında gerçekleştirilmiştir. Bakır tuzu konsantrasyonu, kalsinasyon sıcaklığı ve ekstrakt miktarı incelenmek üzere üç farklı deney parametresi seçilmiştir. Box-Behnken deneysel tasarım yüzey metodolojisine göre üç parametrenin farklı değerlerinin kıyaslanabileceği 17 deney gerçekleştirilmiştir. Her bir parametrenin minimum ve maksimum noktaları seçilmiştir. Tablo 3.1'de parametreler ve seviyeleri, Tablo 3.2'de 17 deneyin tasarım koşulları ve değerleri verilmiştir.

Yeşil sentez sayesinde CuO sentezinin gerçekleştiği reaksiyon denklemi (5.1)'de verilmiştir. Birinci reaksiyon, oksijen varlığında oldukça kararsız olan Cu^0 oluşumu ile iyonik Cu^{+2} indirgenmesinden oluşur ve bu yüzden ikinci reaksiyon gerçekleşerek CuO'ya yükseltgenir.

$$Cu^{+2} + 2e^- \rightarrow Cu^0 + O_2 \rightarrow CuO \qquad (5.1)$$

Reaksiyonun gerçekleştiği, çözeltinin renk değişimi gözlemlenerek değerlendirilir. Cu^0 formu hava ile tekrar reaksiyona girerek çözeltinin ağartılmasını sağlar ve CuO oluşumundan sonra

genellikle çözelti rengi kahverengimsi bir tona dönüşür [134]. Şekil 3.11'de görüldüğü üzere çözeltinin 72 saat bekletilmesi sonucunda, çözelti renginin kahverengimsi bir renk almasıyla CuO oluşumu renk değişimi ile görülmüştür.

CuNP ve CuONP'ler çeşitli proseslerle sentezlenebilirler ve sentez sırasında $CuSO_4$, $CuCl_2.2H_2O$, Cu $(NO_3)_2$ ya da Cu $(CH_3COO)_2$ en sık kullanılan bakır öncülleridir [134].

17 deney sonucunda sentezlenen nanopartiküllerde CuO oluşumunu belirlemek amacıyla X-Işını Kırınımı (XRD) analizi gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen numunelerin XRD grafikleri Şekil 4.1 – Şekil 4.17 arasında verilmiştir.

Tablo 3.2'deki deneysel tasarım koşullarına göre gerçekleştirilen numunelerin 2 saat kalsine edilmesi sonucunda XRD analizi ile D14 dışındaki tüm numunelerde CuO yapısının oluştuğu (JCPDS Card No: 45-0937; 35º, 38º) görülmüştür. D1 ve D14 dışındaki tüm numunelerde yaklaşık olarak 35,4º'de CuO (1 1 1) ve 38,6º'de CuO (0 2 2) bakır oksit nanopartiküllerinin oluşumunu gösteren en şiddetli iki pike ait fazlar bulunmaktadır.

(1 1 1) ile 35° konumunda gözlenen güçlü ve keskin pik, numunenin yüksek kristal kaliteye sahip olduğunu, monoklinik yapıda olduğunu göstermiştir. Şekil 4.1 – Şekil 4.17 arasındaki grafikler incelendiğinde tüm tepe noktalarının keskin olduğu görülmüştür ve kristallik safsızlıklarının olmaması, sentezlenen örneklerin yüksek saflığa sahip olduğunu göstermiştir [135].

XRD diyagramları incelendiğinde 300°C, 400°C ve 500°C'deki kalsinasyon sonuçlarına bakıldığında nanopartiküllerin kristalin yapıda olduğu görülmüştür. D14 haricindeki tüm analizlerde CuO oluşumu gerçekleşmiştir.

XRD analizleri incelendiğinde D3, D5, D6, D7, D9, D11, D15, D16 ve D17'de literatüre uygun olarak (1 1 0), (1 1 1), (0 2 2), (2 0 2), (2 0 2), (1 1 3) (0 2 2), (2 2 0) ve (2 2 2) düzlemlerine ait piklerin tamamı görülmüştür ve CuO nanopartiküllerinin sentezi gerçekleşmiştir. Burada bakır tuzu konsantrasyonu olarak bakıldığında, D3 ve D9 en düşük seviye 0,05 M, D5 ve D7 ise en yüksek seviye 0,2 M'dır. D5, D6, D7, D11, D15 ve D16 ise orta seviye 0,125 M'dır. Kalsinasyon sıcaklıklarına bakıldığında D3, D,6 D7, D15 ve D16'nın orta seviye 400°C'de, D11'in en düşük seviye olan 300°C ve D5 ile D9'un ise en yüksek seviye 500°C olduğu bilinmektedir. Ekstrakt miktarlarına bakıldığında ise D5, D6, D7, D9, D15 ve D16'nın orta

seviye %12,5 olduğu görülmekte iken D3, D11 ve D17'nin en yüksek seviye %20 olduğu bilinmektedir.

D8 ve D10 numaralı deneylerde ise literatüre göre (1 1 0), (1 1 1), (0 2 2), (2 0 2), (2 0 2), (1 1 3) (0 2 2) ve (2 2 0) düzlemlerine ait pikler görülerek CuO NP'lerinin sentezlendiği görülmüştür. Kalsinasyon sıcaklıklarına göre bakıldığında her ikisinin de 400°C'de kalsinasyonu gerçekleşmiştir. D8 en yüksek seviye 0,2 M bakır tuzu konsantrasyonuna sahip iken D10 ise orta seviye 0,125 M bakır tuzu konsantrasyonuna sahiptir. Ekstrakt miktarlarına göre bakıldığında ise D8 en düşük seviye %5 iken, D10 orta seviye %12,5'tur.

D4 numaralı deneyde ise literatüre göre (1 1 1), (0 2 2), (2 0 2), (2 0 2), (1 1 3) (0 2 2) ve (2 2 0) düzlemlerine ait pikler varlığında CuO NP'lerinin sentezlendiği görülmüştür. Kalsinasyon sıcaklığı en yüksek seviye 500°C, ekstrakt miktarı en yüksek seviye %20 ve bakır tuzu konsantrasyonu orta seviye 0,125 M olduğu bilinmektedir.

D2, D12 ve D13 numunelerinde ise yukarıda belirtilen deneylere nazaran daha az pikin varlığına rastlanmıştır ancak bu numunelerde de CuO NP oluşumunu gösteren ve literatüre göre en şiddetli (1 1 1), (0 2 2), (2 0 2) bu üç pikin varlığı görülmüştür. Kalsinasyon sıcaklıklarına göre bakıldığında D12 ve D13 en düşük seviye olan 300°C'ye sahip iken, D2 ise orta seviye 400°C'dir. D2 ve D13'ün en düşük seviye olan 0,05 M bakır tuzu konsantrasyonunda olduğu görülürken D12'nin ise orta seviye 0,125 M olduğu görülmektedir. Ekstrakt miktarlarına bakıldığında ise D2 ve D12 en düşük seviye olan %5'lik bir oran gösterirken, D13 ise orta seviye %12,5'tedir.

D1 numunesi incelendiğinde, literatüre göre CuO NP'lerinin varlığını gösteren pikler görülse de aynı zamanda $CuSO_4$ fazının varlığını gösteren pikler de mevcuttur. Bu piklerden en şiddetli iki pikin, CuO oluşumunu gösteren piklerden daha yüksek olduğu görülmüştür. $CuSO_4$ (JCPDS kart no: 00-080-2209) fazına ait 25,06º ve 34,26º en şiddetli iki pik $CuSO_4$'ı temsil etmektedir. Bu yüzden D1'de kısmen CuO NP'lerinin varlığı görülmüştür.

D14 numaralı deney numunesi incelendiğinde ise en düşük seviye olan 300°C kalsinasyon sıcaklığına, en yüksek seviye olan 0,2 M bakır tuzu konsantrasyona ve orta seviye olan %12,5 ekstrakt miktarına sahip olduğu bilinmektedir. Şekil 4.14 incelendiğinde ise literatüre göre CuO NP oluşumunu gösterecek herhangi bir pike rastlanmamıştır. Sadece Cu (JCPDS kart no: 85-1326) varlığı görülmüştür. 43,21º ve 50,32º'lerde şiddetli Cu fazı pikleri tespit edilmiştir.

Şekil 4.18’de 300°C’de kalsinasyonu gerçekleşmiş deneyler sınıflandırılmıştır. D11 örneğinde CuO oluşumunu gösteren tüm pikler varlığını gösterirken, D14’te CuO oluşumu gerçekleşmemiştir. D12 ve D13 ise D11’den daha az pik vererek, birbirine benzer tepe noktaları oluşturmuş ve en şiddetli üç pikin varlığı ile CuO oluşumunu kanıtlamıştır.

Şekil 4.19’da 400°C’de kalsinasyonu gerçekleşmiş, diğer iki parametrenin farklı değerlere sahip olduğu deneyler sınıflandırılmıştır. D2, D3, D8 ve D10’nin XRD dağılımlarının vermiş olduğu pikler birbirine benzer olduğu görülürken, D3 örneğinde görülen piklerin şiddeti diğerlerine nazaran daha yüksek olduğu görülmüştür. D17 örneğinde ise diğerlerine göre çok daha fazla tepe noktası belirginleşmiştir. Literatürde verilen CuO oluşumuna karşılık gelen tüm pikler oluşmuştur, ancak CuO dışında $CuSO_4$ oluşumuna ait safsızlık piklerinin varlığı da görülmektedir.

Şekil 4.20'de 400°C’de kalsinasyonu gerçekleşmiş, bakır tuzu konsantrasyonu 0,125 M ve %12,5 ekstrakt miktarları ile gerçekleştirilen dört analizin XRD grafik dağılımları sınıflandırılmıştır. D6, D7, D15 ve D16 örnekleri incelendiğinde CuO varlığını kanıtlayan ve literatürde verilen tüm tepe noktalarına sahip birbirine benzer dört grafik görülmüştür.

Şekil 4.21’de ise 500°C’de kalsinasyonu gerçekleşmiş deneyler sınıflandırılmıştır. D5, D4 ve D9 numunelerinde benzer XRD grafik dağılımı gözükürken, D5’in pik şiddetlerinin diğer iki numuneye göre daha yüksek olduğu görülmüştür. D1 ise diğer üçünden daha farklı bir dağılım sergilemiştir. CuO oluşumunu gösteren ve literatürde verilen tüm pikler görülmesine rağmen, farklı safsızlıklara sahip piklerin varlığı da görülmüştür. D1 numunesinde de $CuSO_4$ oluşumu görülmüştür.

Şekil 4.5’de D5’e ait iç içe geçmiş iki grafik verilmiştir. Bu grafikler, numunenin kalsine öncesi ve kalsine sonrası yapılarını gösteren grafiklerdir. İçerideki grafikte, numunenin kalsine edilmeden önceki amorf yapısı gösterilmiştir. Numune, 500°C’de kalsine edilerek kristalin yapıya ulaşılmıştır ve ana grafikte görülmektedir.

Oda koşullarında sentezlenen nanopartiküllerin ortalama kristalit boyutları ve kafes parametreleri XRD dağılımının yardımıyla Debye-Scherrer denklem (3.1) denklemi kullanılarak hesaplanmıştır [135]. Numunelerin ortalama kristalin boyutları 13,39 nm- 25,26 nm aralığında iken kafes parametrelerinin 4,96 A°-6,79 A° aralığında olduğu görülmüştür. Örneklere ait kristalin boyutları ve kafes parametreleri Tablo 4.1’de verilmiştir.

Optimum koşulların tespit edilebilmesi için parametreler değiştirilerek birçok farklı deney gerçekleştirilir ve sonuçlar karşılaştırılır. En iyi sonuçları elde edebilmek için önemli olan prosesi ve performansı etkileyebilecek parametrelerin bulunmasını gerçekleştirmektir ve buna göre de deneysel kombinasyonların sağlanması gerekir. En önemli hedef, minimum kaynak ile maksimum verimi alabilmektir [123].

Bu tez çalışmasının da en önemli hedeflerinden biri maksimum performansa ulaşmak için minimum girdileri kullanmaktır. Bu hedefe ulaşabilmek adına Box-Behnken deneysel tasarımı yüzeysel metodolojisinin sunmuş olduğu deneysel kombinasyonların analizleri gerçekleştirilerek, optimum deney koşulları belirlenmiştir.

Box-Behnken deneysel tasarımın en büyük avantajı, bağımsız değişkenlerin etkileşimini incelemek için gerekli en az sayıda deney sunması ve çok fazla bilgi vermesidir [125].

Oda sıcaklığında CuO NP'leri elde etmek için yeşil sentez ile gerçekleştirilen ve farklı parametre değerlerine sahip 17 analizin kristalin boyutları ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişki incelendiğinde Box-Behnken deneysel tasarımına göre birinci dereceden bir denklem (4.1) olduğu görülmüştür. Box-Behnken deneysel tasarımının varyans analizi (ANOVA), R^2 (belirleme katsayısına), p-değeri ($p<0,05$) ve F değeri terimlerine dayanmaktadır. Böylece elde edilen indirgenmiş modellerin anlamlılık belirlemelerinde bu terimler kullanılmıştır [136]. Tablo 4.5'de verilen değerlere göre 4,33 olan F değeri denklemin anlamlı olduğunu göstermiştir. 0,05'ten küçük olan p-değeri de denklemin anlamlı olduğunu gösterir ve C (ekstrakt miktarı) değeri 0,0153 <0,05 olduğu için C'nin anlamlı bir model terimi olduğu görülmüştür. 0,1'den büyük olan p- değerleri ise model terimlerinin anlamlı olmadığının göstergesidir. Böylece ekstrakt miktarının (C) deney üzerinde çok etkili bir parametre olduğu görülmüştür. 0,4120'lik F-değeri uyum eksikliğinin saf hataya göre önemli olmadığını göstermektedir. Bu veriler Linear (doğrusal) modelin geçerli olduğunu göstermiştir. Tablo 4.7'de tahmin edilen R^2 değeri ile elde edilen R^2 değerinin birbirine yakın olması yapılan deneylerin doğru olduğunu göstermiştir. Yine aynı tabloda 7,1043 hassasiyet değerinin 4'ten büyük olması linear (doğrusal) modelin deneysel tasarım için uygun olduğun göstermiştir [137]. Box-Behnken deneysel tasarım programına göre 17 farklı deneyden optimum deney parametrelerinin Şekil 4.30'a göre 0,125M bakır tuzu konsantrasyonu, 300°C ve %5 ekstrakt miktarı olduğu görülmüştür. Ortalama kristalin boyutu değeri ise 24,51 nm olarak görülmüştür

Box-Behnken deneysel tasarım programında MFK (Minimum fungisidal konsantrasyon) değerinin, bağımsız değişkenler ile arasındaki ilişkinin birinci dereceden denklem (4.2) olduğu görülmüştür. Box-Behnken deneysel tasarımında varyans analizi (ANOVA) terimleri incelendiğinde 2FI (iki faktörlü etkileşim için sıralı kareler toplamı) modelinin önerilen deneysel model olduğu görülmüştür. Tablo 4.9'a göre p-değerleri ($p < 0,05$) için model terimlerinin önemli olduğunu göstermektedir. A (konsantrasyon) ve BC (sıcaklık × ekstrakt miktarı) model terimleri 0,05'ten küçük olduğu için anlamlı model terimleri olduğu görülmüştür. 0,78 olan F değeri, uyum eksikliğinin saf hataya göre önemli olmadığını gösterir. Tablo 4.10'da 5.1439 hasssasiyet değerinin 4'ten büyük olması 2FI modelin deneysel tasarım için uygun olduğunu göstermektedir. Tablo 4.9'da 2,40 model F-değeri ise modelin gürültüye göre anlamlı olmadığını göstermiştir [136, 137]. Box-Behnken deneysel tasarımda MFK değerlerine göre optimum deney parametreleri Şekil 4.36'da görüldüğü üzere, 0,125M bakır tuzu konsantrasyonu, 300°C ve %5 ekstrakt miktarı ve MFK değeri ise 113,051 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

Numunelerin yüzey morfolojilerini incelemek amacıyla çeşitli büyütme oranlarında gerçekleştirilen Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizinde, 2 saat boyunca 500°C'de kalsinasyon edilmiş D5 numunesinin analiz görselleri Şekil 4.22'de verilmiştir. Şekil 4.23'de 500°C'de 2 saat kalsine edilmiş D5 numunesinin SEM görüntülerinde, tanecik dağılımlarının homojen olduğu ve küresel bir yapı sergilediği görülmüştür. Küçük veya büyük gözeneklere ya da çatlaklara rastlanmamıştır. Ortalama tanecik boyutunun ise işaretlenen benzer nanopartiküller doğrultusunda 14 µm olduğu hesaplanmıştır. SEM görüntüleri ile yapılan karakterizasyon işleminde, yeşil sentez ile CuO NP'lerine ait tanecik boyutları ve yapıları tespit edilmiştir.

CuO nano partiküllere ait bir başka karakterizasyon çalışmasında da termal gravimetrik analiz yöntemi ile nanopartiküllerin ağırlık kayıpları 20-800 ºC'de incelenmiştir. Şekil 4.24'de D9 numunesi olan kalsine edilmemiş denemeye ait Sıcaklık (°C)- % TG ve %DTA grafiği bulunmaktadır. Yeşil sentez yöntemiyle hazırlanan bakır oksit nanopartiküllerin TGA analizi, iki aşamalı dikkat çekici bir ağırlık kaybı olduğunu göstermektedir. %DTA eğrisine bakıldığında yaklaşık 200-400 °C aralığında belirgin ve geniş bir endotermik pik gözlemlenmiştir. Bu sıcaklık aralığı bakiye $Cu(SO_4)_2$ ve ceviz yaprağı ekstraktından gelen organiklerin bozunmasına karşılık gelmektedir. 200 °C'nin altında birinci aşamada meydana

gelen ağırlık kaybı numune üzerinde kalan ve adsorbe edilen su içeriğinin buharlaşmasından kaynaklanmaktadır. Bir sonraki noktada 200ºC'den sonra ani bir ağırlık düşüşü meydana gelmiştir. Daha önceden yapılmış çalışmalar 200ºC ve üzerindeki sıcaklıklarda oluşan nanopartiküllerin dekompoze olduğunu göstermektedir [138].

Metal nanopartiküllerin, sadece bakterilerin direnç geliştirmesini zorlaştırmakla kalmaz, aynı zamanda aktibakteriyel aktivite spektrumunu genişleten ve spesifik olmayan yani bakteri hücresindeki spesifik bir reseptöre bağlanmadıkları bakteriyel toksisite mekanizmalarına sahip olduğu bilinmektedir. Şu ana kadar gerçekleştirilen metal nanopartiküller için etkinlik çalışmalarının çoğunluğu hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilerde umut vaat edici olmuştur [133].

CuNP'lerin bakteri hücreleri ile doğrudan temasları nedeniyle bakteriyel büyümeyi engelleme konusunda büyük bir yeteneğe sahip olduğu ileri sürülmüştür. Bu sebeple, hafif negatif bakteriler ve metalik nanoparçacıklar hem elektron transferi hem de bakteri zarının yırtılmasına katkıda bulunan elektron alıcıları olarak işlev görmektedirler. Ayrıca ışık ışıması, CuO'de uyarılmış elektron-boşluk çiftlerine yol açabilir bu da bakteri inaktivasyonunun bir fotokotalitik süreçten kaynaklanabileceğini gösterir. Bakırın gösterdiği antibakteriyel özellikler, salınan Cu^{2+} iyonları ile bakteri zarı arasındaki temas sonrası hücresel hasarın bir sonucudur. Ancak Cu NP'ler kararsızdır ve oksidasyona karşı yüksek duyarlılığa sahiptir. Bundan dolayı CuNP'ler CuO NP'lere dönüşür. CuO daha fazla kararlığa sahip iken, Cu'a göre daha az aktivite gösterirler. Yapılan çalışmalar, CuO NP'lerin antibakteriyel etki oluşturduğunu göstermiştir. Araştırmalar, CuO NP'lerin antibakteriyel etkinlik mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olsa da elektrostatik etkileşimler tarafından tetiklenen bakteri hücre duvarı yapışması olduğuna dayandırılmıştır. Cu^{2+} ayrışması, hücresel zarlar ile temas eden ROS (reaktif oksijen türleri) oluşumunu indüklemektedir. Oluşan oksidatif stres, glutatyonun oksidasyonuna yol açarak bakterilerin ROS'a karşı antioksidan savunma mekanizmasını baskılar. Metal iyonları, aynı zamanda hücre içine girme kapasitesine sahiptir. Hücre fonksiyonlarını bozarak, bakteriyel hücre sızıntısı ile ilişkili zar hasarına sebep olduğu ve hücresel yapılarla etkileşime girmek için serbest kaldığı görülmüştür [139,140,141].

Bu tez çalışmasında da sentezlenen CuO nanopartiküllerine ait antibakteriyel özelliklerin araştırılması için antibakteriyel ve antifungal aktivite analizleri gerçekleştirilerek, MİK ve MFK değerleri incelenmiştir.

Antimikrobiyal özellikleri yönünden incelenen test maddelerinin yaygın olarak karşılaşılan patojen bakteriler üzerine inhibe edici etkilere sahip olduğu belirlenmiştir. İncelenen ham test maddeleri ve türevlerinin hem gram pozitif hem de gram negatif özellikteki bakteriler üzerine inhibe edici sonuçların elde edilmiş olması, test maddelerinin bakteriler üzerinde geniş spektrumlu etki niteliği taşıdığını işaret etmektedir.

Test maddelerinin tümü 250 µg/mL konsantrasyonda antibakteriyel etki sergilemiştir. Ancak ham test maddesinin etki şiddetinin uygulanan türevlendirme yöntemleri ile antibakteriyel etki şiddetini arttırıcı yönde olumlu bir değişim göstermediği belirlenmiştir.

İncelenen tüm test maddeleri tıbbi öneme sahip mayaların gelişimini belirli seviyelerde inhibe etmesinin yanı sıra D4, D5, D8, D12, D13, D14, D15 ve D17'nin 125 µg/mL ile en düşük etkili konsantrasyonu göstermesi dikkat çekicidir.

Denenmiş olan tüm maddelerin önde gelen bir patojen olan *C. albicans* (ATCC 90028)'i referans antifungal antibiyotik olan ketokonazol ile aynı konsantrasyonda inhibe etmiş olmasının yanı sıra D4, D5, D8, D12, D13, D14, D15 ve D17'nin referans antifungalden daha düşük dozda (125 µg/mL) etki gösteriyor olması umut vaat edicidir.

Çalışma kapsamında incelenen test maddelerinin değerlendirilmesi konusunda önde gelen gıda, tıp ve tarım kökenli patojen filamentli küfler ele alınmıştır. Filamentli küflerin gelişimi üzerine etkilerine bakıldığında her bir test maddesinin belirli bir seviyede inhibe edici etkisinin olduğu belirlenmiştir. Kontrol antifungal antibiyotikten yüksek olmakla beraber D8, D12, D13 ve D17 no'lu maddeler *A. niger*'i 125 µg/mL konsantrasyonunda inhibe edilerek geniş spektrumlu antifungal aktivite göstermişlerdir.

Çalışma kapsamında türevlendirilerek elde edilen tozların *Candida* ve test küflerinden *A. niger*'e karşı göstermiş oldukları etki onların iyi bir antifungal ajan olduklarını göstermektedir. Bu maddeler için uygulanan türevlendirme alternatiflerinin ise toza antifungal etkisini iyileştirici yönde katkı yaptığını da ortaya çıkartmaktadır. Söz konusu tozların antibakteriyal etkinliklerinin yanı sıra başarılı antifungal etkiye sahip olması özellikle antifungal yüzeylerin oluşturulmasında etken madde olarak kullanılabilirliğini gündeme getirmektedir.

Tablo 5.1: BBT ve mikrobiyal aktivite sonuçları

Deney No	Konsantrasyon (M)	Ekstrakt Miktarı (%)	Sıcaklık (ºC)	Kristalin Boyutu (nm)	Kafes Parametreleri (A°)	MİK (µg/mL)	MFK (µg/mL)
1	0,125M	%5	500 ºC	23,62	5,26	250	250
2	0,05M	%5	400 ºC	22,61	6,77	250	250
3	0,05M	%20	400 ºC	17,64	5,28	250	250
4	0,125M	%20	500 ºC	15,54	5,62	250	125
5	0,2M	%12,5	500 ºC	15,01	5,26	250	125
6	0,125M	%12,5	400 ºC	16,18	5,27	250	250
7	0,125M	%12,5	400 ºC	18,24	5,25	250	250
8	0,2M	%5	400 ºC	23,2	5,71	250	125
9	0,05M	%12,5	500 ºC	24,06	5,27	250	250
10	0,125M	%12,5	400 ºC	25,09	5,8	250	250
11	0,125M	%20	300 ºC	18,39	5,27	250	250
12	0,125M	%5	300 ºC	20,47	6,04	250	125
13	0,05M	%12,5	300 ºC	26,8	6,79	250	125
14	0,2M	%12,5	300 ºC	20,87	4,96	250	125
15	0,125M	%12,5	400 ºC	19,67	5,27	250	125
16	0,125M	%12,5	400 ºC	25,26	5,25	250	250
17	0,2M	%20	400 ºC	13,39	5,25	250	125

Sonuç;

Bu tez kapsamında, CuO NP'leri, yeşil sentez yöntemi ile bakır tuzu ve ceviz yaprağı ekstraktı kullanılarak sentezlenmiştir. Sentezlenen numuneler 300℃, 400℃ ve 500℃'de 2 saat kalsine edilmiştir. Kalsinasyon sonrası XRD analizi ile karakterize edilerek kristalin yapılı CuO NP'leri oluştuğu gözlemlenmiştir. Bakır tuzu konsantrasyonu, kalsinasyon sıcaklığı ve ceviz yaprağı ekstraktı olmak üzere deneysel üç parametre seçilmiştir. Box-Behnken deneysel tasarım yüzeysel metodolojisine göre 17 farklı analiz gerçekleştirilmiş ve numuneler karakterize edilmiştir. Tablo 5.1'de deneysel tasarım koşulları ve sonuçları ile mikrobiyal aktivite sonuçları özet olarak verilmiştir.

- Ceviz yaprağı ekstraktı ve bakır tuzu reaksiyonu sonrasında tüm çözeltiler 72 saat sonunda kahverengimsi renk göstermişlerdir. Kahverengimsi renk değişimi ile CuO NP oluşumu gözlemlenmiştir.
- Sentezlenen numuneler, her bir numunenin deney koşuluna göre 300℃, 400℃ ve 500℃'de 2 saat kalsine edilmiştir ve kalsinasyon sonrasında XRD analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9, D10, D11, D12, D13, D15, D16 ve D17'de CuO NP'leri oluşumu gözlemlenmiştir. D1'de kısmen CuO NP'leri oluşurken, $CuSO_4$ safsızlıklarına da rastlanmıştır. D14'de sadece Cu fazı görülmüştür.
- Kalsinasyon sonrası kristalin boyutları 13,39 nm-25,26 nm aralığında iken, kafes parametreleri ise 4,96 A°-6,79 A° aralığındadır.
- 500℃'de 2 saat kalsine edilen D5 numunesinin SEM görüntüleri alınmıştır, mikro çatlak ve gözeneklere rastlanmamıştır. Taneciklerin homojen bir şekilde dağıldığı ve küresel yapıya sahip olduğu görülmüştür. Bu numunelerin ortalama tanecik boyutları 14 μm civarındadır.
- Tüm numuneler farklı sıcaklıklarda 2 saat kalsine edilmiştir. Kalsinasyon öncesi amorf yapı gösteren örnekler, kalsine edildikten sonra kristalin yapı formuna ulaşmışlardır.
- Kalsinasyon sıcaklıkları 300℃, 400℃ ve 500℃ olan koşullar incelendiğinde, Box-Behnken deneysel tasarımına göre sıcaklık parametresi, analizi etkileyen bir parametre değildir. Kalsinasyon sonucu XRD analizlerine bakıldığında da tüm sıcaklıklarda kristalin yapıya ulaşıldığı ve D14 haricinde diğer numunelerde CuO NP oluşumu gözlemlenmiştir.
- Kalsinasyon sıcaklığına göre kristalin boyutları karşılaştırıldığında 500℃'de ortalama kristalin boyutu 19,56 nm, 400℃'de 20,15 nm ve 300℃'de 21,63 nm'dir.
- Kalsinasyon sıcaklıkları ve antibakteriyel analizler karşılaştırıldığında tüm sıcaklıklarda MİK değerleri 250 μg/mL gösterirken, 125 μg/mL MFK değerlerine karşılık gelen değerlere 300℃, 400℃ ve 500℃'deki koşullarda rastlanmıştır.
- Box-Behnken deneysel tasarıma göre bakır tuzu konsantrasyonu da analize doğrudan bir etki göstermemektedir.
- Box-Behnken deneysel tasarıma göre ceviz yaprağı ekstrakt miktarı analizi etkileyen önemli bir parametredir. Bu durum, XRD analiz sonuçları incelendiğinde de görülmüştür.

- Kalsine edilmeden önce sentezi gerçekleştirilmiş D9 numunesinin TGA/DTA (Termogravimetrik) analizi ile iki aşamalı önemli bir ağırlık kaybı olduğu görülmüştür. İkinci aşamada 200°C üzerinde ağırlık kaybı görülmesi numunelerin dekompoze olduğunu göstermiştir.
- Box-Behnken deneysel tasarıma göre optimum deney koşullarının D12'ye ait olduğu görülmüştür. Bakır tuzu konsantrasyonu 0,125M, kalsinayon sıcaklığı 300°C ve ekstrakt miktarı %5 olarak sistemde görülmüştür. Deneysel tasarıma göre optimum kristalin boyutu 24,51 nm iken MFK değeri ise 113,051 µg/mL'dir.
- Tüm numuneler 250 µg/mL konsantrasyonda MİK (minimum inhibe edici konsantrasyon) değerinde antibakteriyel etki göstermişlerdir. Ana test maddesinin etki şiddetinin, yapılan türevlendirme yöntemleri ile antibakteriyel etki şiddetini arttırıcı bir özellik göstermemişlerdir.
- D8, D12, D13 ve D17 numuneleri, *A. niger*'i 125 µg/mL konsantrasyonunda inhibe edilmesi sonucunda geniş spektrumlu antifungal aktivite göstermişlerdir. D4, D5, D8, D12, D13, D14, D15 ve D17'nin referans antifungalden daha düşük bir dozda (125 µg/mL) etki göstermesi umut vaat edicidir.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, yeşil kimya sentezi ile oda sıcaklığında, bakır tuzu ve ceviz yaprağı ekstraktı haricinde herhangi bir indirgeyici madde kullanılmadan sentezin gerçekleşmesinin önemi ortaya konmuştur. İlerleyen çalışmalarda, daha farklı parametreler (farklı başlangıç tuzu, farklı metal tuzları, sentez sıcaklığı, süre vb.) ile yeni deneysel tasarımlar yapılarak, reaksiyon verimini artırmaya yönelik çalışmalar planlanabilir. Böylece sentezi etkileyen parametrelerin ayrıntılı bir şekilde incelenmesi ve umut vaat eden antifungal etkileri inceleyen çalışmaların yapılması planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

[1] Auffan, M., Rose, J., Bottero, J. Y., Lowry, G. V., Jolivet, J. P., Wiesner, M. R., 2009, Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective, Nature Nanotechnology, 4, (10), 634, DOI: 10.1038/nnano.2009.242.

[2] Weiss, J, Takhistov, P., McClements, D. J., 2006, Functional materials in food nanotechnology, Journal of Food Science, Vol. 71, No. 9.

[3] Tewari, D., 2021, Allied Market Research, Nanotechnology Market, Global Opportunity Analysis and Industry Forecast 2021-2030, 248, Report Code: A04928.

[4] Wang, H., Dai, H., 2013, Strongly coupled inorganic-nano-carbon hybrid materials for energy storage, Chemical Society Reviews, Vol. 42, No. 7. DOI: 10.1039/c2cs35307e.

[5] Ciambelli, P., La Guardia, G., Vitale, L., 2019, Nanotechnology for green materials and processes, catalysis, Green Chemistry and Sustainable Energy. DOI: 10.1016/B978-0-444-64337-7.00007-0.

[6] Gul, K., Sohni, S., Waqar, M., Ahmad, N. A., Norulaini, N., Omar, A. K. M., 2016, Functionalization of magnetic chitosan with graphene oxide for removal of cationic and anionic dyes from aqueous solution, Carbohydrate Polymers, 152 DOI: 0.1016/j.carbpol.2016.06.045.

[7] Balasooriya, E. R., Jayasinghe, C. D., Jayawardena, U. A., Ruwanthika, R. W. D., de Silva, R. M., Udagama, P. V., 2017, Honey mediated green synthesis of nanoparticles new era of safe nanotechnology, Journal of Nanomaterials, DOI: 10.1155/2017/5919836.

[8] Yang, X., Feng, Y., He, Z., Stoffella, P. J., 2005, Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation, Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 18, 339-353.

[9] Milner, M. J., Kochian, L. V., 2008, Investigating heavy metal hyperaccumulation using *Thlaspi Caerulesceus* as a model system, Annals of Botany, 102, 3–13.

[10] Hall, J. L., 2002, Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerancce, Journal of Experimental Botany, Vol. 53, No. 366, DOI: 10.1093/jexbot/53.366.1.

[11] Memon, A. R., Schroder, P., 2009, Implications of metal accumulation mechanism to phytoremadiation, Environmental Science Pollution Research., 16, 162–175.

[12] Iravani, S., 2011, Green synthesis of metal nanoparticles using plants, Green Chemistry, 13, 2368, DOI: 10.1039/c1gc15386b.

[13] Haque, R., Bin-Hafeez, B., Parvez, S., Pandey, S., Sayeed, I., Ali, M., Raisuddin, S., 2003, Aqueous extract of walnut *(Juglans Regia L.)* protects mice against cyclophosphamide-induced Biochemical Toxicity, Human and Experimental Toxicology, 22, 473-480.

[14] Dang, T. M. D., Le, T. T. L.2011, Synthesis and optical properties of copper nanoparticles prepared by a chemical reduction method, Advances in Natural Sciences Nanoscience and Nanotechnology, 2, 015009, DOI: 10.1088/2043-6262/2/1/015009.

[15] Kim, H. S., Dhage, S. R., Shim, D. E., Hahn, H. T., 2009, Intense pulsed light sintering of copper nanoink for printed electronics, Applied Phyics A, Material Science and Processing, 97, 791-798, DOI: 10.1007/s00339-009-5360-6.

[16] Lee, Y., Choi, J. R., Lee, K. J., Stott, N. E., Kim, D., 2008, Large-scale synthesis of copper nanoparticles by chemically controlled reduction for applications of inkjet-printed electronics, Nanotechnology, 19, 415604, DOI:10.1088/0957-4484/19/41/415604.

[17] Karthik, A. D., Geetha, K., 2013, Synthesis of copper precursor, copper and its Oxide nanoparticles by green chemical reduction method and its antimicrobial activity, Journal of Applied Pharmaceutical Science, Vol. 3, No.5, DOI: 10.7324/JAPS.2013.3504.

[18] Din, M. I., Rehan, R., 2017, Synthesis, characterization, and applications of copper nanoparticles, Analytical Letters, 50, (1), 50-62, DOI: 10.1080/00032719.2016.1172081.

[19] [1] Jamkhande, P. G., Ghule, N. W., Bamer, A. H., Kalaskar, M. G., 2019, Metal nanoparticles synthesis: an overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications, Journal of Drug Delivery Science and Technology, 53, 101174.

[20] Gour, A., Jain, N. K., 2019, Advances in green synthesis of nanoparticles, Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, Vol. 47, No. 1, 844-851, DOI: 10.1080/21691401.2019.1577878.

[21] Garcia-Quintero, A., Palencia, M., 2021, A critical analysis of environmental sustainability metrics applied to green synthesis of nanomaterials and the assessment of environmental risks associated with the nanotechnology, Science of the Total Environment, 793, 148524.

[22] Seil, J. T., Webster, T. J., 2012, Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature, International Journal of Nanomedicine, 7, 2767-2781.

[23] Khatami, M., Sharifi, I., Nobre, M. A. N., Aflatoonian, Z., Aflatoonian, M. R., 2018, Waste-grass-mediated green synthesis of silver nanoparticles and evaluation of their anticancer, antifungal and antibacterial activity, Green Chemistry Letters and Reviews, 125-134, DOI: 10.1080/17518253.2018.1444797.

[24] Parveen, K., Banse, V., Ledwani, L., 2016, Green synthesis of nanoparticles: their advantages and disadvantages, American Institute of Pyhsics, 1724, 020048; DOI: 10.1063/1.4945168.

[25] Gavrilescu, C. M., Paraschiv, C., Horjinee, P., Sotropa, D. M., Barbu, R. M., 2018, The advantages and disadvantages of nanotechnology, Romanian Journal of Oral Rehabilitation, Vol. 10, No. 2.

[26] Khan, A., Rashid, A., Younas, R., Chong, R., 2015, A chemical reduction approach to the synthesis of copper nanoparticles, International Nano Letters, DOI: 10.1007/s40089-015-0163-6.

[27] Shobha, G., Moses, V., Ananda, S., 2014, Biological synthesis of copper nanoparticles and its impact a review, International Journal of Pharmaceutical Science Invention, 2319-6718.

[28] Bulut, E., 2007, Gümüş nanopartiküllerin polifenollerle sentezi ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi.

[29] Mohammed, E. A., 2020, Green synthesis of copper & copper oxide nanoparticles using the extract of seedles dates, Heliyon, 6, e03123.

[30] Kouvaris, P., Delimitis, A., Zaspalis, V., Papadopoulos, D., Tsipas, S. A., Michailidis, N., 2012, Green synthesis and characterization of silver nanoparticles produced using *Arbutus Unedo* leaf extract, Materials Letters, 76, 18-20.

[31] Ramyadevi, J., Jeyasubramanian, K., Marikani, A., Rajakumar, G., Rahuman, A. A., 2012, Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles, Materials Letters, 71, 114-116.

[32] Hashemipour, H., Zadeh, M. E., Pourakbari, R., Rahimi, P., 2011, Investigation on synthesis and size control of copper nanoparticle via electrochemical and chemical reduction method, International Journal of the Physical Sciences, Vol. 6, (18), 4331-4336.

[33] Shah, R., Pathan, A., Vaghela, H., Ameta, S. C., Parmar, K., 2019, Green synthesis and characterization of copper nanoparticles using mixture (*Zingiber officinale*, *Piper nigrum* and *Piper longum*) extract and its antimicrobial activity, Chemical Science Transactions, 8, (1), 63-69, DOI: 10.7598/cst2019.1517.

[34] Usman, M. S., Zowalaty, M. E. E., Shameli, K., Zainuddin, N., Salama, M., Ibrahim, N. A., 2013, Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles, International Journal of Nanomedicine, 8, 4467-4479.

[35] Anandalakshmi, K., Venugobal, J., Ramasamy, V., 2016, Characterization of silver nanoparticles by green synthesis method using *Pedalium murex* leaf extract and their antibacterial activity, Applied Nanoscience, 6, 399-408, DOI: 10.1007/s13204-015-0449-z.

[36] Khanna, P. K., Gaikwad, S., Adhyapak, P. V., Singh, N., Marimuthu, R., 2007, Synthesis and characterization of copper nanoparticles, Materials Letters, 61, 4711-4714.

[37] Wu, C., Mosher, B. P., Zeng, T., 2006, One-step green route to narrowly dispersed copper nanoparticles, Journal of Nanoparticle Research, 8, 965-969.

[38] Yu, W., Xie, H., Chen, L., Li, Y., Zhang, C., 2009, Synthesis and characterization of monodispersed copper colloids in polar solvents, Nanoscale Research Letters, 4, 465-470.

[39] Salavati-Niasari, M., Davar, F., 2009, Synthesis of copper and copper (I) oxide nanoparticles by thermal decomposition of a new precursor, Materials Letters, 63, 441-443.

[40] Salavati-Niasari, M., Fereshteh, Z., Davar, F., 2009, Synthesis of oleylamine capped copper nanocrystals via thermal reduction of a new precursor, Polyhedron, 28, 126-130.

[41] Woo, K., Kim, D., Kim, J. S., Lim, S., Moon, J., 2009, Ink-jet printing of Cu-Ag-based highly conductive tracks on a transparent substrate, Langmuir, 25, 429-433.

[42] Park, B. K., Kim, D., J. S., Moon, J., Kim, J. S., 2007, Direct writing of copper conductive patterns by ink-jet printing, Thin Solid Films, 515, 7706-7711.

[43] Tilaki, R. M., Irajizad, A., Mahdavi, S. M., 2007, Size, composition and optical properties of copper nanoparticles prepared by laser ablation in liquids, Applied Physics A Materials Science & Processing, 88, 415-419.

[44] Dang, T. M. D., Le, T. T. T., Fribourg-Blanc, E., Dang, M. C., 2011, Synthesis and optical properties of copper nanoparticles prepared by a chemical reduction method, Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology, 2, 015009.

[45] Mallick, K., Witcomb, M. J., Scurrell, M. S., 2006, In situ synthesis of copper nanoparticles and Poly(o-toluidine): a metal-polymer composite material), European Polymer Journal, 42, 670-6765.

[46] Kim, H. S., Dhage, S. R., Shim, D. E., Hahn, H. T., 2009, Intense pulsed light sintering of copper nanoink for printed electronics, Applied Physics A Materials Science & Processing, 97, 791-798.

[47] Lee, Y., Choi, J. R., Lee, K. J., Stott, N. E., Kim, D., 2008, Large-scale synthesis of copper nanoparticles by chemically controlled reduction for applications of inkjet-printed electronics, Nanotechnology, 19, 415604.

[48] Dang, T. M. D., Le, T. T. T., Fribourg-Blanc, E., Dang, M. C., 2011, Synthesis and optical properties of copper nanoparticles prepared by a chemical reduction method, Advances in Natural Sciences Nanoscience and Nanotechnology, 2, DOI: 10.1088/2043-6262/2/1/015009.

[49] Ahamed, M., Alhadlaq, H. A., Khan, M. A. M., Karuppiah, P., Al-Dhabi, N. A., 2014, Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of copper oxide nanoparticles, Journal of Nanomaterials, 637858, DOI: 10.1155/2014/637858.

[50] Padil, V. V. T., Cernik, M., 2013, Green synthesis of copper oxide nanoaprticles using Gum Kraya as a biotemplate and their antibacterial application, International Journal of Nanomedicine, 8, 889-898.

[51] Waris, A., Din, M., Ali, A., Ali, M., Afridi, S., Baset, A., Khan, A. U., 2021, A compherensive review of green synthesis of copper oxide nanoparticles and their diverse biomedical applications, Inorganic Chemistry Communications, Vol. 123, 108369.

[52] Loureiro, S., Tourinho, P. S., Cornelis, G., Van Den Brink, N., Diez-Ortiz, M., Vazquez-Campos, S., Pomar-Portillo, V., Svendsen, C., Van Gestel, C. A. M., 2018, Nanomaterials as soil pollutants, From Monitoring to Remediation, 161-190.

[53] Lee, H. J., Lee, G., Jang, N.R., Yun, J. H., Song, J. Y., Kim, B. S., 2011, Biological synthesis of copper nanoparticles using plant extract, Nano Science and Technology Institute Vol. 1, ISBN: 978-1-4398-7142-3.

[54] Karlsson, H. L., Cronholm, P., Gustafsson, J., Möller, L., 2008, Copper oxide nanoparticles are highly toxic: A comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes, Chemical Research in Toxicology, 21, 1726-1732.

[55] Abiodun-Solanke, I.M.F., Ajayi, D.M., Arigbede, A.O., 2014, Nanotechnology and its application in dentistry, Annals of Medical and Health Sciences Research, Vol. 4, (3).

[56] Robert, A., Freitas, JR., J. D., B.S., 2000, Nanodentistry, Journal of the American Dental Association, Vol. 131.

[57] Rybachuk, A., V., Chekman, I., S., Nebesna, T., Y., 2008, Nanotechnology and nanoparticles in dentistry, Pharmacology and Pharmaceutics, 1, 18-20.

[58] Bhavikatti, S., K., MDS, Bhardwaj, S., BDS, Prabhuji, M., L., V., MDS, 2014, Current applications of nanotechnology in dentistry, General Dentistry, 62, (4), 72-7.

[59] Shetty, N. J., Swati, P., David, K., 2013, Nanorobots: future in dentistry, The Saudi Dental Journal, 25, 49-52.

[60] Chen, Z., Meng, H., Xing, G., Chen, C., Zhao, Y., Jia, G., Wang, T., Yuan, H., Ye, C., Zhao, F., Chai, Z., Zhu, C., Fang, X., Ma, B., Wan, L., 2006, Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo, Toxicology Letters, 163, 109-120.

[61] Hong, Z. S., Cao, Y., Deng, J.F., 2002, A Convenient alcohothermal approach for low temperature synthesis of CuO nanoparticles, Materials Letters, 52, 34-38.

[62] Heinlaan, M., Ivask, A., Blinova, I., Dubourguier, H. C., Kahru, A., 2008, Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO_2 to bacteria *Vibrio Fischeri* and *Crustaceans Daphnia Magna and Thamnocephalus Platyurus*, Chemosphere, 71, 1308-1316.

[63] Gervasini, A., Manzoli, M., Martra, G., Ponti, A., Ravasio, N., Sordelli, L., Zaccheria, F., 2006, Dependence of copper species on the nature of the support for dispersed CuO catalysts, The Journal of Physical Chemistry B, 110, 7851-7861.

[64] Cheng, X. N., Zhang, X. F., Yin, H. B., Wang, A. L., Xu, Y. Q., 2006, Modifier effects on chemical reduction synthesis of nanostructured copper, Applied Surface Science, 253, 2727-2732.

[65] Su, X., Zhao, J., Bala, H., Zhu, Y., Gao, Y., Ma, S., Wang, Z., 2007, Synthesis of stable cubic copper nanocages in the aqueous phase, The Journal of Physical Chemistry C., 111, 14689.

[66] Wu, C., Mosher, B. P., Zeng, T., 2006, One-step green route to narrowly dispersed copper nanocrystals, Journal of Nanoparticle Research, 8, 965-969.

[67] Zhu, H. T., Lin, Y. S., Yin, Y. S., 2004, A Novel one-step chemical method for preparation of copper nanofluids, Journal of Colloid and Interface Science., 277, 100-103.

[68] Song, X., Sun, S., Zhang W., Yin, Z., 2004, A Method for the Synthesis of spherical Copper nanoparticles in the organic phase, Journal of Colloid and Interface Science., 273, 463-469.

[69] Park, B. K., Jeong, S., Kim, D., Moon, J., Lim, S., Kim, J. S., 2007, Synthesis and size control of monodisperse copper nanoparticles by polyol method, Journal of Colloid and Interface Science., 311, 417-424.

[70] Gotoh, Y., Igarashi, R. Ohkoshi, Y., Nagura, M., Akamatsu, K., Deki, S., 2000, Preparation and structure of copper nanoparticle/ poly(acrylic acid) composite films, Journal of Material Chemistry, 10, 2548-2552.

[71] Ostaeva, G. Y., Selishcheva, E. D., Pautov, V. D., Papisov, I. M., 2008, Pseudotemplate synthesis of copper nanoparticles in solutions of poly(acrylic acid) -pluronic blends, Polymer Science Series B, Vol. 50, (5-6), 147-149.

[72] Chen, L., Zhang, D., Chen, J., Zhou, H., Wan, H., 2006, The use of CTAB to control the size of copper nanoparticles and the concentration of alkylthiols on their surfaces, Materials Science and Engineering A, 415, 156-161.

[73] Kapoor, S., Joshi, R., Mukherjee, T., 2002, Influence of I^- anions on the formation and stabilization of copper nanoparticles, Chemical Physics Letters., 354, 444-448.

[74] Jackelen, A. M. L., Jungbaur, M., Glavee, G. N., 1999, Nanoscale materials synthesis 1. solvent effects on hydridoborate reduction of copper ions, Langmuir, 15, 2322-2326.

[75] Dadgostar, N., Ferdous, S., Henneke, D., 2010, Colloidal synthesis of copper nanoparticles in a two-phase liquid- liquid system, Materials Letters, 64, 45-48.

[76] Salzemann, C., Lisiecki, I., Brioude, A., Urban, J., Pileni, M. P., 2004, Collections of copper nanocrystals characterized by different sizes and shapes: optical response of these nanoobjects, Journal of Physical Chemistry B, 108, 13242-13248.

[77] Kaminskiene, Z., Prosycevas, I., Stonkute, J., Guobiene, A., 2013, Evaluation of optical properties of Ag, Cu, and Co nanoparticles synthesized in organic medium, Acta Physica Polonica A., 123, 111.

[78] Zhu, H. T., Zhang, C. Y., Yin, Y. S., 2004, Rapid Synthesis of Copper Nanoparticles by Sodium Hypophospite Reduction in Ethylene Glycol Under Microwave Irradiation, Journal of Crystal Growth, 270, 722-728.

[79] Kapoor, S., Mukherjee, T., 2003, Photochemical Formation of Copper NAnoparticles in poly(N-vinylpyrrolidone), Chemical Physics Letters, 370, 83-87.

[80] Giuffrida, S., Costanzo, L. L., Ventimiglia G., Bongiorno, C., 2008, Photochemical synthesis of copper nanoparticles incorporated in poly(vinyl pyrrolidone), Journal of Nanoparticle Research., 10, 1183-1192 DOI: 10.1007/s11051-007-9343-2.

[81] Umer, A., Naveed, S., Ramzan, N., 2012, Selection of a suitable method for the synthesis of copper nanoparticles, World Scientific Publishing Company, Vol. 7, No. 5, 1230005. DOI: 10.1142/S1793292012300058.

[82] Raja, M., Subha, J., Binti Ali, F., Ryu, S. H., 2008, Synthesis of copper nanoparticles by electroreduction, Materials and Manufacturing Processes, 23, (8), 782.

[83] Yu, S. H., 2001, Hydrothermal/ solvothermal processing of advanced ceramic materials, Journal of the Ceramic Society of Japan, 109, (5), 65-75.

[84] Rajamathi, M., Seshadri, R., 2002, Oxide and Chalcogenide nanoparticles from Hydrothermal/ solvothermal reactions, Current Opinion in Solid State Materials Science, 6, 337-345.

[85] Baco-Carles, V., Datas, L., Tailhades, P., 2011, Copper nanoparticles prepared from oxalic precursors, International Scholarly Research Network ISRN Nanotechnology, Article ID 729594, DOI: 10.5402/2011/729594.

[86] Chen, H., Lee, J. H., Kim, Y. H., Shin, D. W., Park, S. C., Meng, X., Yoo, J. B., 2010, Metallic copper nanostructures synthesized by a facile hydrothermal method, Journal of Nanoscience and Nanotechnology, Vol. 10, 629-636.

[87] Amendola, V., Meneghetti, M., 2009, Laser ablation synthesis in solution and size manipulation of noble metal nanoparticles, Physical Chemistry Chemical Physics, 11, 3805-3821. DOI:10.1039/b900654k.

[88] Amendola, V., Polizzi, S., Meneghetti, M., 2006, Laser ablation synthesis of gold nanoparticles in organic solvents, The Journal of Physical Chemistry B, 110, 7232-7237.

[89] Suryanarayana, C., 2001, Mechanical alloying and milling, Progress in Materials Sciemce, 46, 1-184.

[90] Benjamin, J.S., 1989, In New Materials by Mechanical Alloying Techniques, In: Arzt, E., Schultz, L., DGM Information Gesellschaft, Oberursel, Germany, 1-18.

[91] Lisiecki, I., Filankembo, A., Sack-Kongehl, H., Weiss, K., Pileni, M. P., Urban, J., 2000, Structural investigations of copper nanorods by high-resolution TEM, Physical Review B, Vol. 61, No. 7 4968.

[92] Jiang, W., Yatsui, K., 1998, Pulsed wire discharge for nanosize powder synthesis, IEEE Transactions on Plasma Science., Vol. 26, No. 5.

[93] Muraia, K., Watanabea, Y., Saito, Y., Nakayama, T., Suematsu, H., Jiang, W., Yatsui, K., Shim, K. B., Niihara, K., 2007, Preparation of copper nanoparticles with an organic coating by a pulsed wire discharge method, Journal of Ceramic Processing Research, Vol. 8, No.2, 114-118.

[94] Bansal, V., Rautaray, D., Bharde, A., Ahire, K., Sanyal, A., Ahmad, A., Sastry, M., 2005, Fungus-mediated biosynthesis of silica and titania particles, Journal of Materials Chemistry, 15, 2583-2589. DOI: 10.1039/b503008k.

[95] Varshney, R., Bhadauria, S., Gaur, M. S., A Review: biological synthesis of silver and copper nanoparticles, Nano Biomedicine and Engineering, 4, (2), 99-106. DOI: 10.5101/nbe.v4i2.p99-106.

[96] Ramanathan, R., Bhargava, S. K., Bansal, V., 2011, Biological synthesis of copper/ copper oxide nanoparticles, conference: Chemeca Engineering A Better World, Australia.

[97] Varshney, R., Bhadauria, S., Gaur, M.S., Pasricha, R., 2010, Characterization of copper nanoparticles synthesized by a novel microbiological method, Journal of Metals, Vol. 62, No. 12, 102.

[98] Varshney, R., Bhadauria, S., Gaur, M. S., Pasricha, R., 2011, Copper nanoparticles synthesis from electroplating industry effluent, Nano Biomedicine and Engineering, Vol. 3, No. 2, 115-119. DOI: 10.5101/nbe.v3i2.p115-119.

[99] Pavani, K. V., Srujana, N., Preethi, G., Swati, T.,2013, Synthesis of copper nanoparticles by *Aspergillus Species*, Letters in Applied NanoBioScience, Vol. 2 No. 2, 110-113.

[100] Ahmad, A., Senapati, S., Khan, M. I., Kumar, R., Sastry, M., 2003, Extracellular biosynthesis of monoodisperse gold manoparticles by a novel *Extremophilic Actinomycete*, *Thermomonospora sp.*, Langmuir, 19, 3550-3553.

[101] Khalil, M. M. H., Ismail, E. H., El-Baghdady, K. Z., Mohamed, D., 2013, Green synthesis of silver nanoparticles using *Olive* leaf extract and its antibacterial activity, Arabian Journal of Chemistry, DOI:10.1016/j.arabjc.2013. 04.007.

[102] Yallappa, S., Manjanna, J., Sindhe, M. A., Satyanarayan, N. D., Pramod, S. N., Nagaraja, K., 2013, Microwave assisted rapid synthesis and biological evaluation of stable copper nanoparticles using *T. Arjuna Bark* extract, Spectrochimica Acta Part A Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 110, 108-115.

[103] Bali, R., Razak, A., Lumb, A., Harris, A. T., 2006, The synthesis of metallic nanoparticles inside live plants, IEEE, DOI:10.1109/ICONN.2006.340592.

[104] Lee, H. J., Lee, G., Jang, N. R., Yun, J. H., Song, J. Y., Kim, B. S., 2011, Biological synthesis of copper nanoparticles using plant extract, NSTI-Nanotechology, Vol. 1, ISBN 978-1-4398-7142-3.

[105] Subhankari, I., Nayak, P. L., 2013, Antimicrobial activity of copper nanoparticles synthesised by *Ginger (Zingiber Officinale)* extract, World Journal of Nano Science & Technology, 2, (1), 10-13, DOI:10.5829/idosi.wjnst.2013.2.1.21133.

[106] Subhankari, I., Nayak, P. L., 2013, Synthesis of copper nanoparticles using *Syzygium Aromaticum (Cloves) Aqueous* extract by using green chemistry, World Journal of Nano Science & Technology, 2, (1), 14-1, DOI:10.5829/idosi.wjnst.2013.2.1.21134.

[107] Khodashenas, B., Ghorbani, H. R., 2014, Synthesis of copper nanoparticles: An overview of the various methods, Korean Journal of Chemical Engineering, 31, (7), 1105-1109. DOI: 10.1007/s11814-014-0127-y.

[108] Tokarek, K., Hueso, J. L., Kustrowski, P., Stochel, G., Kyziol, A., 2013, Green synhtesis of chitosan-stabilized copper nanoparticles, European Journal of Inorganic Chemistry, 4940-4947, DOI:10.1002/ejic.201300594.

[109] Leblebicier, Y., H., Emrullahoğlu, Ö. F., 2000, Sol-jel metodu ile mikronaltı incelikte alümina üretimi, AKÜ-Journal of Science, 2, (1), 1-12.

[110] Narongdet, W., Charoonsuk, P., Vittayakorn, N., Pecharapa, W., 2011, Sonochemical synthesis and characterization of copper oxide nanoparticles, Energy Procedia, 9, 404-409.

[111] Pinjari, D. V., Pandit, A. B., 2011, Room temperature synthesis of crystalline CeO_2 nanopowder, advantage of sonochemical method over conventional method, Ultrasonics Sonochemistry, 18, 1118-1123.

[112] Biçer, M., 2008, Bakır nanopartiküllerin sentezi ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi.

[113] Li, F., Yu, X., Pan, H., Wang, M., Xin, X., 2000, Synthesis of MO_2 (M=Si, Ce, Sn) nanoparticles by solid-state reactions at ambient temperature, Solid State Sciences 2, 767-772.

[114] Cho, S. J., Uddin, M. J., Alaboina, P., 2017, Review of nanotechnology for cathode materials in batteries, Emerging Nanotechnologies in Rechargeable Energy Storage Systems.

[115] Korkmaz, Ç., 2013, Mikrodalga sentez yöntemiyle Vanadil Siklohekzan-1,4-Dikarboksilat bileşiğinin sentez ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi.

[16] Mubayi, A., Chatterji, S., Rai, P. M., Watal, G., 2012, Evidence based green synhesis of nanoparticles, Advanced Material Letters, 3 (6), 519-525, DOI: 10.5185/amlett.2012.icnano.353.

[117] Duan, H., Wang, D., Li, Y., 2014, Green chemistry for nanoparticle synthesis, Royal Society of Chemistry, DOI: 10.1039/c4cs00363b.

[118] Jadoun, S., Arif, R., Jangid, N. K., Meena, R. K., 2020, Green Synthesis of Nanoparticles Using Plant Extracts, Environmental Chemistry Letters, DOI: 10.1007/s10311-020-01074-x.

[119] Erdem, E., 2010, *Juglans Regia* L.'nin fitoterapideki önemi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi.

[120] Keramatlou, I., Sharifani, M., Sabouri, H., Alizadeh, M., Kamkar, B., 2015, A Simple linear model for leaf area estimation in persian walnut *(Juglans Regia L.)*, Scientia Horticulturae, 184, 36-39.

[121] Taha, N. A., Al-wadaan, M. A., 2011, Utility and importance of walnut, *Juglans Regia* linn a review, African Journal of Microbiology Research, Vol. 5, No.32, DOI: 10.5897/AJMR11.610.

[122] Panth, N., Paudel, K. R., Karki, R., 2016, Phytochemical profile and biological activity of *Juglans Regia*, Journal of Integrative Medicine, 14, (5), 359-373.

[123] Savaşkan, M., Taptık, Y., Ürgen, M., 2004, Deney tasarımı yöntemi ile matkap uçlarında performans optimizasyonu, İtü Dergisi/d Mühendislik, Cilt. 3, Sayı.6, 117-128.

[124] Aliemeke, B. N. A., Oladeinde, M. H., 2020, Box-Behnken design optimization of sand casting process parameters, International Journal of Engineering Technologies-Ijet, Vol. 6, No. 2.

[125] Ahmad, A., Alkharfy, K. M., Wani, T. A., Raish, M., 2015, Application of Box-Behnken design for ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from *Paonia Emodi*, International Journal of Biological Macromolecules, 72, 990-997.

[126] Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandao, G. C., da Silva, E. G. P., Portugal, L. A., dos Reis, P. S., Souza, A. S., dos Santos, W. N. L., 2007, Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods, Analytica Chimica Acta, 597, 179-186.

[127] Akkaş, R., 2018, Kimyasal çöktürme yöntemiyle $Zn_4(OH)_6SO_4$ sentezi, karakterizasyonu ve termal bozunması ile elde edilen ZnO'in karakterizasyonu ve optiksel özelliklerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi

[128] Günbat, M., 2019, Ce, Mo ve La katkılı ZnS nanopartiküllerinin karakterizasyonu ve özelliklerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Siirt Üniversitesi.

[129] Güçtaş, D., 2020, Katı oksit yakıt Hücreleri için serya esaslı elektrolitlerin hazırlanması, sinterleme kinetiğinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa.

[130] Demirkan, E., 2009, Bacillus Subtilis (alfa)-amilaz enziminin nişasta granüllerine etkisinin taramalı elektron mikroskobu ile İncelenmesi, Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, Cilt.23, Sayı. 1, 13-19.

[131] Özbudak, A.S., 2021, Bor nitrür karbon nanotüp uapılarının sentezi, karakterizasyonu ve hidrojen depolamada kullanımı, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi.

[132] Surat, M. S., 2015, Bazı polimerler, şeker pancarı küspesi ve karışımlarının termal parçalanma kinetiklerinin termogravimetrik analiz cihazı kullanılarak incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi.

[133] Sanchez-Lopez, E., Gomes, D., Esteruelas, G., Bonilla, L., Lopez-Machado, A. L., Galindo, R., Cano, A., Espina, M., Ettcheto, M., Camins, A., Silva, A. M., Durazzo, A., Santini, A., Garcia, M. L., Souto, E. B., 2020, Metal-based nanoparticles as antimicrobial agents: an overview, Nanomaterials, 10, 292, DOI: 10.3390/nano10020292.

[134] Losasso, C., Belluco, S., Cibin, V., Zavagnin, P., Micetic, I., Gallocchio, F., Zanella, M., Bregoli, L., Biancotto, G., Ricci, A., 2014, Antibacterial activity of silver nanoparticles: sensitivity of different *Salmonella Serovars*. Frontiers in Microbiology, 5, 1–9.

[135] Ashok, C. H., Rao, K. V., Chakra, C. H. S., 2014, Structural analysis of CuO nanomaterials prepared by novel microwave assisted method, Journal of Atoms and Molecules, 4, (5), 803-806.

[136] Asemani, M., Anarjan, Navideh, 2019, Green synthesis of copper oxide nanoparticles using *Juglans Regia* leaf extract and assessment of their physico-chemical and biological properties, Green Process Synthesis, 8, 557-567.

[137] Sevimli, S., Remazol ultra kırmızı RGB boyasının sulu çözeltilerden palmiye yaprakları/ lifleri kullanılarak adsoprsiyonu ve yanıt yüzey metodu ile optimizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi.

[138] Ardakani, L. S., Alimardani, V., Tamaddon, A. M., Amani, A. M., Taghizadeh, S., 2021, Green synthesis of iron-based nanoparticles using *Chlorophytum Comosum* leaf extract methyl orange dye degradation and antimicrobial properties, Heliyon, 7, e06159.

[139] Lara, H.H., Ayala-Nunez, N.V., Ixtepan-Turrent, L., Rodriguez-Padilla, C., 2010, Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1., Journal of Nanobiotechnology, 8, 1–10.

[140] Stensberg, M.C., Wei, Q., McLamore, E.S., Porterfield, D.M., Wei, A., Sepulveda, M.S., 2011, Toxicological studies on silver nanoparticles: challenges and opportunities in assessment, monitoring and imaging. Nanomedicine, 6, (5), 879–898, DOI: 10.2217/nnm.11.78.

[141] Slavin, Y.N., Asnis, J., Hafeli, U.O., Bach, H. 2017, Metal nanoparticles understanding the mchanisms behind antibacterial activity, Journal of Nanobiotechnology, 15,(65), 1–20, DOI: 10.1186/s12951-017-0308-z.