

RECEP ÜSTÜNSOY

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2021

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS

**PARAMANYETİK KARBON NANOTÜPLERİN
KARAKTERİZASYONU, TOKSİSİTESİNİN
BELİRLENMESİ VE SAFLAŞTIRMA AMAÇLI
KULLANIMI**

RECEP ÜSTÜNŞOY

**DANIŞMAN
PROF. DR. MUHAMMET BEKTAŞ
2. DANIŞMAN
DR. BİRCAN DİNÇ**

**BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

İSTANBUL-2021

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmamda maddi ve manevi hiçbir desteklerini esirgemeyen değerli danışmanlarım Prof. Dr. Muhammet Bektaş ve Dr. Bircan Dinç'e en içten dileklerle teşekkür ederim. FTIR ölçümlerinde sağladığı desteklerden ötürü MSc. Emine Şen'e teşekkür ediyorum. Bu uzun süreç zarfında desteklerini esirgemeyen aileme ve arkadaşlarıma da teşekkürü bir borç bilirim. Proje prosedürlerinde yardımcı olan Prof. Dr. Leman Yalçın-tepe Güneş-tutar, Doç. Dr. Başak Varol ve Öğr. Gör. Dr. Bilge Özerman Edis'e teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 36781

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT.....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Karbon Nanotüpler.....	2
2.1.1. Tek Duvarlı Karbon Nanotüpler	2
2.1.2. Çok Duvarlı Karbon Nanotüpler	4
2.2. Karbon Nanotüplerin İşlevselleştirilmesi	4
2.2.1. KNT'lerin Kovalent Olmayan Şekillerde İşlevselleştirilmesi	5
2.2.2. KNT'lerin Kovalent Olarak İşlevselleştirilmesi	6
2.2.3. Çok Duvarlı KNT'lere Paramanyetik Özellik Kazandırma	6
2.3. Kromatografi.....	7
2.4. Manyetik Özellikteki KNT'lerin Saflaştırmada Kullanımı	7
2.5. Fitalatlar	10
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	13
3.1. Gereçler.....	13
3.2. Sarf Malzemeler	13
3.3. Kimyasal Maddeler	14
3.3.1. Kullanılan Çözeltiler	15
3.3.1.1. <i>C. elegans</i> Yumurta Senkronizasyon Karışımı	15
3.3.1.2. Bakteri üretimi için LB Agar ve hazırlama.....	15
3.3.1.3. <i>C. elegans</i> için NGM karışımı	15
3.3.2. Kullanılan Tamponlar	16
3.3.2.1. Fosfat Tamponu (PBS).....	16

3.3.2.2. Hücre Canlılığı (MTT) Solüsyonu	16
3.4. Yöntemler	16
3.4.1. KNT'lerin Paramanyetik Hale getirilmesi ve Analizleri	16
3.4.2. KNT – Geçirimli Elektron Mikroskobu analizi	17
3.4.3. KNT – Elektron Spin Rezonans Analizi	18
3.4.4. KNT-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektra Analizleri	18
3.4.5. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri Analizleri	18
3.4.6. Hücre Kültürü Çalışmaları	19
3.4.7. <i>C. elegans</i> Canlılık Testleri.....	20
3.4.8. Paramanyetik KNT'ler ile Dietil Fitalat Ayrıştırma İşlemi	21
4. BULGULAR.....	24
4.1. KNT'lerin Geçirimli Elektron Mikroskobu Görüntüleri	24
4.2. Demirli Tuzların ve Demir Bağlı KNT'lerin FTIR Spektrumları	26
4.3. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri Grafikleri	28
4.4. KNT'lerin Elektron Spin Rezonans Grafikleri	32
4.5. KNT'lerin Hücre Düzeyinde Toksik Etkileri	33
4.6. Tip-2 KNT'lerin <i>C. elegans</i> Toksisite Testleri Sonuçları.....	35
4.7. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi Miktar Analizi.....	37
5. TARTIŞMA	41
KAYNAKLAR	49
HAM VERİLER	62
FORMLAR	63
ETİK KURUL KARARI	64
PATENT HAKKI İZNİ	65
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	66

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: GC-MS analiz sonuçları	39
---------------------------------------	----



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Karbon bazlı nanotüplerin yapıları.....	2
Şekil 2.2: Karbon bazlı nanotüplerin katlanma vektörüne göre çeşitleri.....	3
Şekil 3.1: Karbon nanotüplerin paramanyetikleştirilmesi	17
Şekil 3.2: Fitalat ayrıştırma şeması.....	23
Şekil 4.1: ÇDKNT'lerin TEM görüntüleri.	24
Şekil 4.2: Tip-1 KNT'lerin üzerinde demir agregatları.	25
Şekil 4.3: Tip-2 KNT'ler üzerindeki demir agregatlarının TEM görüntüleri.....	26
Şekil 4.4: Çalışmada kullanılan demirli tuzların FTIR spektraları.	27
Şekil 4.5: KNT ve paramanyetik ÇDKNT'lerin FTIR spektrumları.	28
Şekil 4.6: Çalışmada kullanılan demirli tuzların DSC analizleri.....	29
Şekil 4.7: ÇDKNT'nin DSC grafiği.	30
Şekil 4.8: Tip-1 paramanyetik KNT'lerin DSC grafiği.	31
Şekil 4.9: Tip-2 paramanyetik KNT'lerin DSC grafiği.	32
Şekil 4.10: KNT'lerin ESR grafikleri.....	33
Şekil 4.11: KNT etkisindeki HUVEC'lerin ışık mikroskobu görüntüleri.	34
Şekil 4.12: KNT etkisindeki HUVEC'lerde % canlılık oranı.	35
Şekil 4.13: <i>C. elegans</i> 'ların mikroskopdaki görüntüleri.....	36
Şekil 4.14: Günlere göre petrilerdeki ortalama canlı <i>C. elegans</i> sayıları.	37
Şekil 4.15: Dietil Fitalat'ın GC-MS analiz kromatogramı	38
Şekil 4.16: GC-MS ile tip-2 KNT'lerin absorbe ettiği DEP miktarı	40

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

C.elegans: Caenorhabditis Elegans

ÇDKNT: Çok Duvarlı Karbon Nanotüp

DEP: Dietil Fitalat

DSC: Diferansiyel Taramalı Kalorimetri

E.Coli: Escherichia Coli

ESR: Elektron Spin Resonans / Elektron Paramanyetik Rezonans

FBS: Fetal Bovine Serum (Fetal Sığır Serumu)

Fnk-KNT : Fonksiyonel Hale Getirilmiş Karbon Nanotüp

FTIR : Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi

HUVEC : İnsan Göbek Kordon Endotel Damar Hücresi

KNT: Karbon Nanotüp

MKNT: Manyetik Olarak Fonksiyonel Hale Getirilmiş Karbon Nanotüp

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NGM: Nematot Büyütme Medyumu

PAE: Fitalat Asit Esterleri

PBS : Fosfat Tuz Tamponu

SEM : Taramalı Elektron Mikroskobu

TDKNT: Tek Duvarlı Karbon Nanotüp

TEM : Geçirimli Elektron Mikroskobu

ÖZET

Üstünsoy R. Paramanyetik Karbon Nanotüplerin Karakterizasyonu, Toksisitesinin Belirlenmesi ve Saflaştırma Amaçlı Kullanımı. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2021.

Karbon nanotüpler (KNT), sahip oldukları geniş yüzey alanı ve yüksek kapasitedeki emme güçleri ile son yıllarda saflaştırma uygulamalarında çok popüler hale gelmişlerdir. KNT'lerin tek duvarlı ve çok duvarlı olmak üzere iki çeşidi bulunmaktadır. Çok duvarlı KNT'ler iç içe geçmiş tek duvarlı KNT'ler gibidirler. Dolayısı ile yüzey alanları tek duvarlı KNT'lere göre çok geniştir. Yüzey alanının genişliği ve yüksek kapasitedeki emme güçleri sayesinde nanometre boyutundaki tüpler bu özelliklerden faydalanılarak, demir tuzları ve belli özellikteki kimyasallar ile paramanyetik hale getirilebilmektedir. Paramanyetik hale gelen KNT'ler mıknatıs yardımıyla toplanabilir duruma da gelirler. Bu özellik KNT'lerin farklı ortamlardan kolayca ayrıştırılmasını sağlamaktadır. İlave olarak yüzey alanları çok geniş olduğu için hedef ortama göre, ortamda bulunan maddeler ile bağ yapabilecek moleküller ile desteklenirse, KNT'ler mıknatıs yardımıyla ortamdan toplanabilirken hedef maddenin de ortamdan ayrıştırılması sağlanabilmektedir. Son yıllarda bu konu hakkında çok sayıda önemli araştırmalar yapılmıştır.

Ayrıştırma yöntemlerinde kullanımı oldukça verimli sonuçlar veren KNT'lerin, ftalat asit esterlerinden (PAE) dietil ftalatın (DEP) çevreden ayrıştırılmasında kullanımı amaçlanmaktadır ve bu önem arz etmektedir. Çünkü insan ve çevre için zararlı olan ve çok sayıda kişisel bakım ürünleri ve deterjan tarzı temizlik ürünlerinde bulunmaktadır. Bunlar endokrin bozucu olabilen kimyasallardandır ve doğal hormonların salgılanması, taşınması, metabolizması, eliminasyonu ve reseptöre bağlanmasını etkileyen bileşiklerdir. Bu bağlamda üretilen, toksisitesine bakılmış ÇDKNT'lerin, ayrıştırma amaçlı kullanılmasında, özellikle DEP'ler çalışılacaktır. Literatürde kısa ÇDKNT'lerle yapılmış ayrıştırıcılar yer almamaktadır. Bu nedenle elde edilen bilgiler önem taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler : Paramanyetik, Karbon Nanotüp, Fitalat, Kromatografi, DSC.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 36781

ABSTRACT

Üstünsoy R. Characterization of Paramagnetic Carbon Nanotubes, Determination of Toxicity and Purification Purposes. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Biophysics, MSc. Thesis. İstanbul. 2021.

Carbon nanotubes, become popular in the area of chromatography thanks to their high surface area and adsorption capabilities. They mainly consists of two types; single-walled (SWCNT) and multi-walled carbon nanotubes (MWCNT). Their structure is like tubes of graphene sheets formed by a direction vector. They can be at least 0,4 nm in width. From 0.4 nm to 2 nm, they are classified as single-walled. MWCNTs can be produced in the range of 2 nm- 100 nm. MWCNTs have more surface area than SWCNTs. CNTs can be modified with salts of iron (Fe) to be paramagnetic thanks to their high capacity of adsorption. Operation is basically consists of mixing and sonicating Fe-Salt complex with specific chemicals and CNTs. The final product can be collected easily with a permanent magnet. In the last decade, it is possible to see many important researches about paramagnetic CNTs. Big portion of these works are focused on purification of water from heavy metals and plastic originated compounds. In these purification processes paramagnetic MWCNTs are used generally.

Phthalate Acid Esters (PAE) are present in enormous amount of PVC based materials. Consequently, PAEs can mix with environmental water, earth and other food and drinks that are packed with plastic products. PAEs has very harmful effects on human health such as they can damage endocrine system and prevent hormones working properly. Hence, this work focused in filtration capabilities of paramagnetic CNTs by using DEP as target compound specifically. Short MWCNTs which are subjected to toxicity tests formerly will be used. There is no research made with short MWCNTs in the area. Therefore, it is important that new information about these CNTs will be obtained.

Key Words: Paramagnetic, Carbon Nanotubes, Phthalate, Chromatography, DSC

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 36781

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Karbon nanotüp (KNT)'lerin adsorban olarak kullanımları, emsallerine nazaran daha efektif sonuçlar vermesi sayesinde son yıllarda büyük bir popülerite kazanmıştır [1,2]. KNT'lerin porlu ve tüpsü yapıları, yüksek yüzey alanına sahip olması, düşük kütle yoğunluğu ve ayrıştırılmak istenilen moleküller ile bağ kurabilme yetenekleri [3] sayesinde araştırma alanları giderek yaygınlaşmaktadır [4]. Bu araştırma alanları gaz akışlarından zararlı olan gazların filtrelenmesi [5], sulu çözeltilerden istenmeyen bileşiklerin ortamdan ayrıştırılması [6] olarak gruplandırılabilir. Bu gruplar teorik hesaplamalar, deneysel ölçümler ve moleküler simülasyon yöntemleri ile araştırılmaktadır. Spesifik olarak küçük moleküllerin [7], ağır metal iyonlarının [8] ve organik kimyasalların [9] KNT'ler yardımı ile ayrıştırılması üzerine çalışmalar yürütülmektedir.

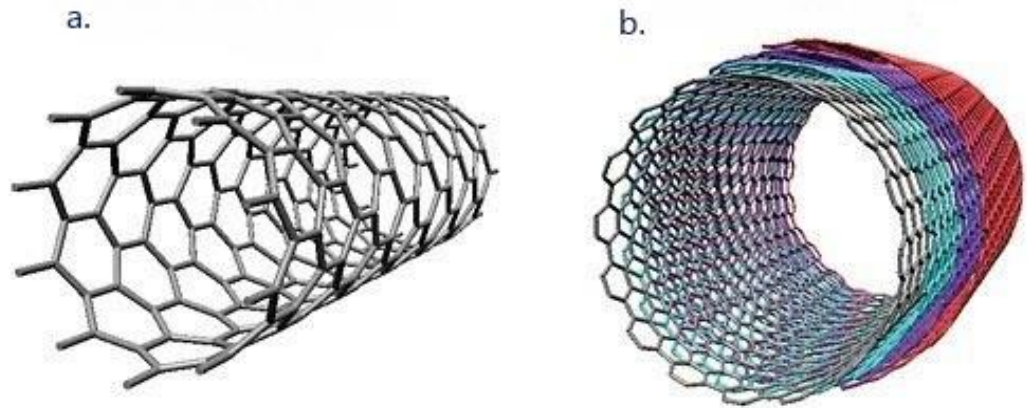
Fitalatlar ise plastik sanayisinde, insan ve çevre sağlığı için zararlı olduğunu bilinen, insan yapımı plastikleştirici ana malzeme olarak kullanılan fitalat asit esterleridir [10].

Bu çalışmada çok duvarlı KNT'lerin fonksiyonel hale getirilmesi, paramanyetik özellik kazandırılması ve karakterizasyonun yapılması amaçlandı. Mıknatıs yardımıyla paramanyetik KNT'lerin ortamlara giriş çıkışını sağlayarak, istenmeyen madde olarak fitalat familyasından olan dietil fitalatın (DEP), paramanyetik KNT'ler ile ortamdan uzaklaştırması düşünüldü. Araştırmalarımızda ayrıca, sentezlenen paramanyetik KNT'lerin karakterizasyon çalışmaları ile yapıları hakkında daha fazla bilgiye ulaşmaya çalışıldı. Son olarak ise elimizdeki KNT örneklerinin *in vitro* toksikoloji çalışmalarını yapmak ve hücre düzeyinde fikir elde ettikten sonra, besin zincirinin en alt katında bulunan *C. elegans*'lar ile paramanyetik KNT'lerin mikro canlılar üzerinde toksisite çalışmaları yapıp anlamlı ve yararlı sonuçlara ulaşılması hedeflendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karbon Nanotüpler

KNT'lerin deneysel kullanımına ilişkin ilk çalışma S. Iijima tarafından 1991 yılında rapor edilmiştir [11]. Bu çalışmayı takiben KNT'lerin farklı yöntemlerle sentezlenmesini konu alan çalışmalar yapılmıştır [12,13]. Bu çalışmalar, doksanlı yılların başından günümüze kadar karbon nanotüp konulu araştırmalara öncü olmuştur. İlk olarak araştırmalar üst üste grafen yaprakların dizilmesi ile oluşmuş, silindirik çok duvarlı karbon nanotüpler üzerine yapılmıştır. Sonrasında, 1993 yılında daha küçük yarıçapa sahip tek duvarlı karbon nanotüpler üzerine çalışmalar başlamıştır [14,15]. KNT'leri popüler yapan özelliklerinin başında iletkenliklerinin ve stabilitesinin yüksek oluşu, fiziksel olarak kuvvetli yapıda olmaları ve kimyasal olarak kararlı yapıda olmaları gelmektedir [16,17]. Tek duvarlı ve çok duvarlı olmak üzere bilinen ve üzerine çalışmalar yapılan iki çeşidi bulunmaktadır (Şekil 2.1).

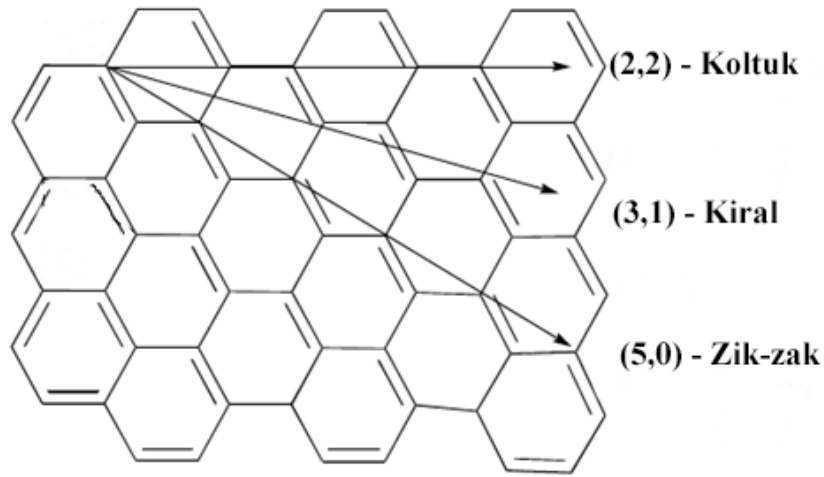


Şekil 2.1: Karbon bazlı nanotüplerin yapıları. Tek duvarlı (a) ve çok duvarlı (b) KNT yapısı.

2.1.1. Tek Duvarlı Karbon Nanotüpler

Tek duvarlı KNT'ler basit olarak karbon elementlerinin süperiletken maddeler yardımıyla bir araya getirilmesi ile oluşturulmuş atomik boyuttaki silindirik tüpsü yapılarıdır [14,15]. KNT'lerin keşfinden sonra, üzerine çok farklı alanlarda araştırmalar yapılmaya başlandı. KNT'lerin avantajlı fiziksel, kimyasal ve fizyolojik özelliklere sahip olması, KNT'leri birçok araştırmada potansiyel eleman haline getirdi. Karbon nanotüpler sp^2 hibritleşmesi yapmış karbon atomlarından üretilmiş düz kağıt şeklinde grafen yapının belirlenen bir katlanma vektörü etrafında dolanması ile ortaya çıkmış

yapılar şeklinde tanımlanabilir. Tek duvarlı KNT'ler 0.4 nm civarı dışçapa sahip olabilirken, çok duvarlı KNT'ler 5-100 nm aralığında dışçap uzunluğuna sahip olabilmektedir [18]. Bir tek duvarlı nanotüpün yapısı, çapı ve kiralitesi, ilgili bilgileri içeren bir (n,m) vektörü ile belirtilir [19]. Bu (n,m) vektörüne bağlı olarak tek duvarlı KNT'ler 3 yapıda bulunabilirler. Bunlardan ilki koltuk (armchair) yapısıdır ki bu durumda m ve n birbirine eşittir ve helisite açısı 30° olmaktadır. İkinci durum ise zik-zak (zigzag) yapısıdır, bu durumda n veya m değerinden birisi sıfıra eşittir ve helisite açısı 0° olmaktadır. Üçüncü yapı ise kiral (chiral) yapıdır; bu yapıda n ve m değerlerimiz birbirinden ve sıfırdan farklıdır, helisite açımız ise 0° ile 30° arasında gözlemlenmektedir [20] (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Karbon bazlı nanotüplerin katlanma vektörüne göre çeşitleri.

Katlanma vektöründen (n, m) elde edilen bilgilerle karbon nanotüplerin yarıçap hesaplaması yapmak mümkündür (denklem 1). Denklemde D_{cc} karbon bağının uzunluğunu ifade ederken, D_d ise yarıçap uzunluğunu ifade eder ve D_{cc} nin değeri yaklaşık olarak 0,142 nm değerinde ölçülmüştür [21].

Denklem 1 : KNT yarıçap hesaplama formülü

$$D_d = D_{cc} \sqrt{3} \frac{\sqrt{m^2 + mn + n^2}}{\pi}$$

Tek duvarlı karbon nanotüplerin icadı, ticari amaçlı; fiziksel olarak dayanıklı ve hafif spor materyallerinden, hidrojen destekli depo ortamlarına kadar, geniş bir yelpazede alanda kullanılmasını sağlamıştır [22]. Yaygınlaşan kullanım alanları arasında nano-elektronik cihazlar [23], enerji depolama alanında üretilen bataryalar [24], alan etkili transistörler [25] ve sensör cihazları [26] da yer almaktadır. Biyomedikal uygulamalarda, ilaç iletiminde taşıyıcı rolünde ve tanı koymada yardımcı ajanlar olarak potansiyel kullanım alanları mevcuttur [27]. Ayrıca hücre kültüründe hücre bakımı ve büyümesi sürecinde kullanılan iskelet yapı olarak da kullanılma potansiyeli vardır [28].

2.1.2. Çok Duvarlı Karbon Nanotüpler

Çok duvarlı karbon bazlı nanotüpler çok sayıda birbiri içine geçmiş tek duvarlı KNT bileşenleridir. Dolayısıyla tek duvarlı KNT'ler başlığı altında saydığımız özelliklere sahiptir. Ancak, dışçap uzunlukları 5 nm ile yaklaşık olarak 100 nm bandındadır. Farklı çaptaki tek duvarlı KNT lerin bir araya gelmeleri ile oluştuklarından çok duvarlı KNT ler çok daha geniş yüzey alanlarına sahiptirler. Bu avantajları sayesinde, çok duvarlı KNT'ler çeşitli enzimlerle veya metallerle birleştirilerek, çeşitli ayrıştırma yöntemlerinde veya biyosensör uygulamalarında kullanılabilir hale gelmiştir [29].

Karbon nanotüplerin toksisitesi konusunda bir uzlaşma mevcut değildir ancak çeşitli yöntemlerle karbon nanotüplerin fiziksel özellikleri üzerinde yapılacak değişikliklerle bu etkiler en aza indirilmeye çalışılmaktadır. Örneğin hayvanlar üzerinde yürütülen farklı iki çalışmada mikron mertebesindeki KNT'lere maruz bırakılan hayvanlarda pulmoner inflamasyon indükleyici etkiler ortaya çıkmıştır [30-31]. Ayrıca KNT lerin biyobozunurluk süreleri de tartışma konusudur. Toksik etkileri tartışan aynı çalışmada, daha kısa uzunlukta olan KNT lerin daha seyreltilmiş bir kanserojenik etkiye sahip olabileceği rapor edilmiştir [32]. Bu çalışmalardan sonuçla diyebiliriz ki; KNT'lerin toksik etkileri vardır; ancak yüzey modifikasyonları yaparak bu etkileri oldukça azaltmak mümkündür.

2.2. Karbon Nanotüplerin İşlevselleştirilmesi

KNT'ler üstün özelliklerinin yanında belirgin dezavantajlara ve sınırlamalara sahiptir. Bu dezavantajlardan biri, geniş yüzey alanın ortaya çıkardığı dağılım oranındaki inhomojenitedir. Diğer bir dezavantaj ise KNT lerin hidrofobik özellikte

olmaları, suda ve genel kullanımda olan diğer çözücü maddelerin içinde çözünmelerinin problem oluşturmaktadır. Bu problemlerden kaynaklanan sorunların ortadan kaldırılması için ve başka özelliklerin eklenebilmesi için KNT'lerin fonksiyonel hale getirilmeleri gerekmektedir [33]. Bugün, nanoteknoloji alanında kullanılan bütün nanotüplerin işe yarar halde çalışması için fonksiyonel hale getirilmeleri gerekmektedir [34]. Fonksiyonel hale getirilmesi kovalent olmayan ve kovalent olan metotlar ile gerçekleştirilir. Bu iki yöntemin de kendi avantajları ve dezavantajları mevcuttur. Örneğin, kovalent olmayan yöntemle fonksiyonel hale getirilen karbon nanotüpler, KNT'nin yapısı ve kendisine has olan özellikleri değişmez ancak fonksiyonel olarak daha ileri seviyeleri geliştirilmesi de zorlaşmaktadır [33-37]. Kovalent olan yöntemler tercih edilirse çözünürlük ve biyouyumluluk problemleri çözülürken, KNT'nin fizikokimyasal özellikleri bozulabiliyor veya iletkenlikleri azalma gösterebiliyor [38-39].

2.2.1. KNT'lerin Kovalent Olmayan Şekillerde İşlevselleştirilmesi

KNT'lerin biyouygunluğunu geliştirmek, ilaç iletimi alanında peptit sabitleme işlemi, proteinlerin birleşmesi ve aktiflemesi için yapılan geliştirmeler için kovalent olmayan metodlar fiziksel özelliklerde bir değişme meydana getirmediği için tercih edilmektedir [40]. Bu yöntemin en önemli avantajı KNT'lerin sudaki ve diğer ortamlardaki çözünürlüklerinin artması ve elektriksel özelliklerinin korunmasıdır. Mittal ve ark. tarafından yapılan araştırmalarda KNT'ler poliaromatik absorpsiyon ile kovalent olmayan şekilde fonksiyonel hale getirilmek istenirken, π - π örtüşmesi, CH- π örtüşmesi, protein veya lipid absorpsiyonu ve bazende bu kovalent olmayan fonksiyonelleşmenin van der Waals kuvvetleri ile gerçekleştiği tespit edilmiştir [39]. Özet olarak bu yöntem çok sayıda fonksiyonel hale getirme elemanı ile gerçekleştirilebilmektedir. Bu elemanlar yüzey aktif maddeler, polimerler, bileşikler ve biyomoleküller olabilir. Yapılan bir çalışmada sodyum dodesil sülfat (SDS) ile ultra-sonikasyon ve ultrasantrifüjleme yapılarak tek duvarlı fonksiyonel KNT eldesi sağlanmıştır [41]. Yüzey aktif maddelerin yerine polimer maddelerin kullanıldığı başka bir çalışmada, polimerin yüzey dağılımını düzgün olarak yapamadığını, yüzey aktif maddenin bu konuda daha başarılı olduğu gözlemlenmiştir. Benzer şekilde, anyon, katyon bazlı ve iyonik olmayan yüzey aktif maddelerinin, dağılımları problemlili olan tek duvarlı KNT'leri fonksiyonel hale getirmek için % 5 gibi az oranlarda kullanılmıştır [42].

2.2.2. KNT'lerin Kovalent Olarak İşlevselleştirilmesi

Kovalent olan fonksiyonel hale getirme yollarının en büyük problemi KNT'lerin elektronik yapısının bozulmasıdır. Yapılan çalışmalarda elektron yönünden zayıf aromatik asitler ile çok duvarlı KNT'ler etkileşime sokulmuş ve bu problem çözülmüştür [43]. Diğer bir problem ise kovalent olarak fonksiyonel hale geldikten sonra proteinlerin KNT yüzeyine bağlanabilir durumda olmamasıydı. Bu durumun çözümü olarak da özgün olmayan polimer bağlamak önerisi ortaya atılmış ve polietilen glikol (PEG) kullanılarak bu durum ispatlanmıştır [44]. Diğer bir araştırmada çok duvarlı KNT'leri grafit ile tepkimeye sokulmuş polimer kullanarak fonksiyonel hale getirmeyi başarmışlardır [45]. Manyetik olarak fonksiyonel hale getirmek için yapılan bir çalışmada, KNT'ler aminobenzotiyazol kimyasalları ile tepkimeye sokulmuş ve başarılı sonuçlar ortaya çıkarmıştır [46].

Özetle, kovalent ya da kovalent olmayan metodlarla fonksiyonel hale getirme işlemleri büyük oranda kimyasal maddeler ile tepkimeye sokarak gerçekleştirilir. Bu kimyasal ile kurulan bağlar kovalent olduğunda, KNT ve ilişkilendiren ajan arasında güçlü bir bağ kurulmuş olur. Bir diğer tarafta ise fonksiyonelleştirme aşamalarının da güçlü ve zayıf yanları olduğu rapor edilen edilen çalışmalar ışığında tartışmaya açıktır [47].

2.2.3. Çok Duvarlı KNT'lere Paramanyetik Özellik Kazandırma

Burada bir önceki başlıkta bahsettiğimiz manyetik hale getirilme işlemi, biraz daha ayrıntılı olarak ele alacağız. Bir araştırmada ÇDKNT'ler aminobenzotiyazol ve hidrojen nitrat ile karıştırılmış, daha sonra ortaya çıkan süspansiyon distile su ve mikrofiltre kağıdı yardımı ile filtreleme işlemine tabi tutulmuştur. Kurutulduğunda elde edilen numunenin artık manyetik özellikte olduğu keşfedilmiştir [46].

Manyetik olarak fonksiyonel hale getirilmiş KNT'lere amoksisilin eklenmesi konusunda yapılan bir çalışmada ise yine amonyum demir (II) sülfat ile KNT'lerin süspansiyonunun yapıldığı ve sonrasında amonyum hidroksit ilavesi ile desteklendiğini ve ultrasonikasyon işlemine tabi tutulmasının ardından manyetik özellik kazandırıldığı rapor edilmiştir [48].

Kanserin günümüzdeki şartlarda erken safhalarda teşhisinin çok iyi yapılamadığını savunan ve tümör teşhis, tedavi safhalarında kullanım amaçlı manyetik olarak fonksiyonel hale getirilmiş KNT'leri hazırlamayı amaç edinen bir çalışmada, çok

duvarlı KNT'ler demir klorür hidrat tuzu ile sonikasyon işlemine tabi tutulup manyetik özellik kazanmıştır [49]. Genel olarak bakıldığında çalışmalarda çeşitli metaller ile desteklenmiş tuzlu bileşiklerle manyetik özellik kazandırmanın mümkün olduğu görülmektedir.

2.3. Kromatografi

Kromatografi en basit tabiriyle organik bir karışımı oluşturan maddeleri birbirinden ayırmak için kullanılan bir saflaştırma yöntemidir. İlk olarak rus kimyacı Mikhail Tswett tarafından 1903 yılında kullanılmıştır. Tswett yeşil bir yapraktaki pigmentleri, yaprağı organik bir çözeltide çözdükten sonra dikey pozisyonda ve içi tebeşir tozu ile dolu bir tüpün içerisinde aşağı yönde akmasını sağlayarak saflaştırma işlemini gerçekleştirmiştir. Farklı pigmentler farklı oranlarda aşağıya doğru hareket etmiş ve beyaz tebeşir kolonlarında farklı renk tonları bırakmışlardır. Günümüzde çok çeşitli kromatografik yöntemler mevcuttur ve genel kullanımda olanların çalıştığı temel prensip Tswett'in kullandığı prensiple örtüşmektedir. Temel prensipte hareketsiz bir ortam içeren medyum ile bunun içinden geçen ve ayrıştırılmak istenen organik bileşik ve çözelti haline getirilmiş hareketli medyumdan mevcuttur. Farklı elementler farklı oranlarda durağan medyum tarafından absorbe edilir ve böylece kromatografi kolonunun sonuna farklı oranlarda varırlar. Böylece kromatografi kolonunun sonunda ayrıştırma işlemi gerçekleşmiş olur [50].

Günümüzde en yaygın kullanılan kromatografi çeşitleri; kolon, iyon değişim, jel-filtrasyon, afinite, kağıt, ince-zar, gaz, boya-ligand, hidrofobik etkileşim, yalancı afinite ve yüksek basınçlı sıvı kromatografileri (HPLC) olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.4. Manyetik Özellikteki KNT'lerin Saflaştırmada Kullanımı

Manyetik özellik kazandırılarak fonksiyonel hale getirilmiş çok duvarlı KNT'lerin çeşitli maddeler üzerinde yapılan saflaştırma çalışmaları mevcuttur. Bu çalışmalara örnek olarak 2016 yılında yapılan, tarımda kullanılan, istenmeyen bitkilerin ortamda çoğalmasını engelleyen spesifik bir tarım ilacı üzerinde yapılan saflaştırma araştırmaları verilebilir. Sülfonilüre herbisitler üzerine yapılan bu çalışmada dünyada yaygın olarak kullanılan bu kimyasalların kullanım amaçlarını karşıladıktan sonra doğada özellikle çevrede bulunan yeraltı su kaynaklarını kirlettiği tespit edilmiştir. Bu sebeplede insan sağlığını tehdit eden bir durum haline gelmiştir. Bu problemin üzerine geliştirdikleri hipotezde manyetik olarak fonksiyonel hale getirilmiş KNT'leri

kullanarak bir kompleks oluşturulmuş ve suyu bu kirlilikten arındırma amaçlanmıştır. Demir içerikli kimyasallar ile muamele edilen çok duvarlı KNT'ler taramalı elektron mikroskobu ve X-ray kırınım testi yardımıyla karakterize edildikten sonra, bahsi geçen zararlı kimyasalları tanıyan ve kendisine bağlayan bir kompleks ile birleştirilmiştir. Daha sonra manyetik olarak fonksiyonel hale gelmiş KNT'leri içeren kompleksler istenmeyen herbisit kimyasalları ile bağlandıktan sonra dışarıdan sadece bir mıknatıs yardımıyla toplanmış ve böylece bir saflaştırma işlemi ucuz, hızlı, çevreye daha fazla zarar vermeden ve tekrar kullanımı mümkün olarak gerçekleştirilmiştir [51].

Benzer bir çalışmada, dünyanın hemen her yerinde sıklıkla tüketilen çay üzerindeki bitkisel tarım ilaçlarının etkisini yok etmeye yönelik bir çalışma yapılmıştır. Manyetik olarak fonksiyonel hale getirilmiş çok duvarlı KNT'ler (MKNT) yardımıyla, çay bitkisindeki asetonitril maddesini ayrıştırmak amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda ferrik triklorür hekzahidrat çok duvarlı KNT'ler ile etilen glikol içerisinde çözündürülüp manyetik özellik kazandırma çalışmaları yapılmış ve sonrasında karakterizasyonu Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ve X-ray spektroskopisi ile gerçekleştirilmiştir. Daha sonra manyetometre ile sayısal manyetiklik değerlerine ulaşılmıştır. Asetonitril ile bağ yapacak şekilde dizayn edilen kompleks ile birleştirildikten sonra, çay ile karıştırılan MKNT'ler daha sonra bir mıknatıs yardımı ile toplanmış ve çayın bu toksik maddeden temizlendiği belirlenmiştir. Yöntemin uygulanması ve sonucu açısından bakıldığında çalışmada uygulanması basit, hızlı ve etkili bir MKNT kompleksi oluşturulmuş ve amaca başarıyla ulaşılmıştır [52].

Karsinogenik etki gösterdiği bilinen Fitalat Asit Esterleri'nin (PAE) paket halinde satılan içeceklerden, içme sularından ve parfüm örneklerinden, MKNT ler yardımıyla ayrıştırmak amaçlanan bir çalışmada, manyetik işlevsellik kazandırma metodu, ferrik triklorür hekzahidrat ve çok duvarlı KNT lerin hidroklorik asit çözeltisinde karıştırılmasını takiben nitrojen ortamında amonyum hidroksit çözeltisi eklenmesi ve en son bir mıknatıs yardımıyla eldesi ile gösterilmiştir. Manyetik özellik kazandırılmış KNT'lerin karakterizasyon çalışması ise yine TEM ve X-ray kırınımı yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. KNT lerin yüksek absorpsiyon kapasitesi kullanılarak hedef madde ile etkileşebilir şekilde fonksiyonel hale getirilmesinden sonra, manyetik özelliğinden faydalanan hedef maddelerin istenmediği ortamda tespitleri ve potansiyel ayrıştırılmalarının, manyetik olarak fonksiyonel hale getirilmiş

çok duvarlı KNT'lerle çok hızlı, ekonomik ve efektif bir biçimde gerçekleştirilebileceği bir kez daha bu araştırma ile doğrulanmıştır [53].

MKNT'ler ile piyasada bulunan gazlı içeceklerdeki fitalat asit esterlerini (PAE) ayırmak amacıyla da kullanılmıştır. Bu doğrultuda yapılan bir çalışmanın ana gerekçesi PAE'ler potansiyel olarak karsinojenik olarak değerlendirilmesi ve dolayısıyla vücuda alınmasının oldukça tehlikeli olması gösterilmiştir. Bu çalışmada saflaştırma amacı ile, demir oksit ve gümüş ile desteklenmiş ÇDKNT'lerin kullanıldığı bir metod izlenmek istenmiştir. Yine bu yöntemdeki temel prensip, demir oksit karışımları ile çok duvarlı KNT'lerin manyetik olarak etkileşebilir hale getirilmesi ve mıknatıs yardımıyla toplanmasıdır. Methodun görece basit, ucuz ve hızlı olması nedeniyle son yıllarda sıkça kullanılmaktadır. Metalik özellikleri yüksek aktiflikteki Ag, Ni, Cu veya Pb gibi elementler ile çok duvarlı KNT'lerin katalitik kapasitenin geliştirilmesi, absorpsiyon oranının yükseltilmesi, yüzey alan artırılması ve daha düzenli yapıya geçmesi mümkün olmaktadır. Bu geliştirmeler sonrasında, çok duvarlı KNT'ler yüksek oranda metalik veya yarı metalik özellik gösteren geniş bir yüzey alanına sahip olur [54].

Çok duvarlı KNT'lere manyetik özellik kazandırma işlemi, diğer bir çalışmada üç aşama ile gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada, çok duvarlı KNT'ler nitrik asit ve sülfürik asit çözeltilerine eklenmiş ve böylece yüzeyinde hidroksil ve karboksil grupları oluşturulmuş, distile su ile yıkandıktan sonra kurutulmuştur. Manyetik özellik kazandırma işlemi, demir (III) klorür heksahidrat, çok duvarlı KNT ler , sodyum asetat ile etilen glikol çözeltisinde karıştırılmış, etanol ilavesi yapıldıktan sonra, filtrasyon ve kurutma işlemleri uygunlanarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın en son adımında, MKNT'lere katalitik özelliklerinin artırımı ve yüzey alan genişletilmesi için gümüş nano parçacık ile tepkimeye sokulmuştur. Bu amaç doğrultusunda gümüş nitrat ile manyetik KNT'ler manyetik karıştırıcıda distile su içerisinde karıştırılmış, sodyum borohidrit eklenmiş ve mıknatıs ile kabın dibinden toplandıktan sonra üst sıvının ayrıştırılması ile manyetik özellikte gümüş ile desteklenmiş çok duvarlı KNT'lerin eldesi sağlanmıştır. MKNT'lerin karakterizasyonu taramalı elektron mikroskobu (SEM), TEM, EDX analizi ve Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ile yapılmıştır. Karbonla desteklenmiş içeceklerde en çok hangi PAE grubu olduğu analiz edildikten sonra o gruba yönelik yeni sentezlenen Ag destekli MKNT'lerin ne kadar emici olduğu test edilmiş ve başarılı sonuçlar ortaya çıkarılmıştır [55].

Çevresel su kirlenmesinde önemli rol oynayan Hg elementinin sudan ayrıştırılması hedeflenen bir araştırma da mevcuttur. Bu çalışmada, sülfür ile kaplanmış manyetik özellikteki çok duvarlı KNT'ler sudaki civanın toplanması için sentezlenmiştir. Bu sentezin ilk adımında, ÇDKNT'ler nitrik asit içinde 12 saat çalkalanmış, filtreden geçirilmiş, pH'ın 7 ye gelmesi sağlanmış ve demir (II) sülfat heptahidrat ve demir (III) klorür hekzahidrat ile azot ortamında muamele edilirken, damla damla sodyum hidroksit ilavesi yapılmıştır. Bu reaksiyonun tamamlanması için sonikasyon işlemi 4 saat boyunca sürdürülmüş ve artık paramanyetik olan nanotüpler mıknatıs yardımı ile toplanarak kurutulmuştur. Bu adımdan sonra, MKNT'leri sülfürle kaplamak için, sülfür elementi ile paramanyetik özellikteki çok duvarlı KNT ler fiziksel olarak karıştırılıp, argon(Ar) gazı ile dolu bir kaptan 150 dereceye kadar ısıtılmış ve sonra oda sıcaklığında beklemeye alınmıştır. Karakterizasyon çalışmaları ise FTIR, X-ışını Kırınım Difraktometresi (XRD), SEM, TEM ve termogravimetrik analiz (TGA) cihazları kullanılarak yapılmıştır. Daha sonra da Hg elementinin ne kadar toplandığını belirlemek için, sulu karışımın önce ve sonraki derişimi ölçülmüştür. Yapılan çalışmanın sonucunda ise toplanabilen miktarın pH ile bağlantılı olduğu rapor edilmiş ve en çok toplamanın pH'ın 4.5 civarında yapıldığı görülmüştür [56].

İdrar örneklerinden mikotoksinleri, paramanyetik özellikteki çok duvarlı KNT lerin üstün absorbe etme yetenekleri sayesinde belirli oranlarda ayrıştırmayı amaçlayan başka bir çalışmada, paramanyetik hale getirmek için ÇDKNT'lere demirli tuzlar ile muamele edilmiş ve daha sonra uygun şartlar altında bunlar kurutulup toplanmıştır. MKNT'lerin karakterizasyonu X-ray spektrometresi, FTIR, SEM, ve X-ray kırınım testleri uygulanarak yapılmıştır. Belirlenen şartlar altında alınan idrar örneklerinden KNT'ler kullanılarak yapılan ayırma işleminde 5 çeşit mikotoksinin mevcut ayrıştırma yöntemlerine göre çok daha hızlı gerçekleştirildiği görülmüştür. Mevcut araştırma yöntemlerinde santrifüj, desorpsiyon ve filtreleme gibi aşamaların olmayışı zamandan tasarruf sağlamış ve daha kesin sonuçların ortaya çıktığını bildirmişlerdir. MKNT'lerin bu ayrıştırma yönteminde de tekrar tekrar kullanılabilir oluşu bir avantaj olarak doğrulanmıştır [57].

2.5. Fitalatlar

Fitalatlar genel olarak ortak bir kimyasal formüle sahip olan endüstriyel dialkyl ya da alkyl/aryl esterlerdir, 1,2-benzendikarboksilik asit familyasındandır [58].

Endüstriyel olarak 1930'lardan itibaren kullanımdadırlar. Genel olarak kullanım alanları, kişisel bakım ürünleri (parfümler, losyonlar, kozmetik ürünler), boyalar, endüstriyel plastikler, medikal gereçler ve ilaçlardır. İlaçlardan insanların fitalata maruz kaldığını gösteren çalışmalarda mevcuttur [59]. Fitalatların fiziksel özellikleri alkil gruplarının uzunluklarına ve yan zincir bağlanma dallanmalarına göre değişiklik gösterir; bu nedenle kullanım alanları da farklılık göstermektedir. Bazı fitalatlar rengi ve parlaklığı istenildiği gibi ayarlamak için ürünlere eklenir. Medikal araç ve gereçlerde kullanımı sonucu insanların maruz kaldığı fitalat çeşidi üzerine yapılan çalışmalar mevcuttur [60]. Bu örneklerin yanında yaygın kullanım alanını polivinilklorür (PVC) ürünlerine esneklik kazandırmak olan fitalat çeşitleride vardır [61]. Bu plastikleştirici fitalatların sabit bir oranda plastik ürünlerden çevreye karışığı ve onu kirlettiği bilinmektedir. Günümüzde insan yapımı olan, en fazla derecede çevre kirliliğine sebep olan atık olarak kabul edilmektedir. Dünyada yılda 5-8 milyon ton aralığında fitalat kullanımı kaydedilmiştir [62]. Bunların arasında en önemli olanlar dietil fitalat (DEP), di-(2-etilhekzil) fitalat (DEHP), dibütil fitalat (DBP), di-iso ve di-n-bütil fitalat (DiBuP, DnBUP), bütil benzenil fitalat (BBzP) ve di-izononil fitalattır [63].

İnsanlar bu fitalatlara, rahimde yaşamaya başlağı andan itibaren yaşamları boyunca sindirim, solunum ve deri teması yollarıyla maruz kalmaktadırlar ve spesifik DEP'ler en fazla temizlik ürünlerinde ve saç bakım ürünlerinde kullanıldığından, solunum ve deri teması ile insanların bu maddeye maruz kalındığı düşünülmektedir [64, 65]. Maruz kalınan tehlikeli sınırı gözler önüne seren Almanya'da yapılmış çalışmada deneklerin önemli bir bölümünde, belirlenen sınırın aşıldığı rapor edilmiştir [66]. Maruz kalınan değerlerin törelans sınırları AB Çevre Koruma Birliği tarafından DEHP için 37 µg/kg/gün olarak bildirilmiştir, aynı çalışma diğer fitalatlar içinde limit değerlere ulaşmak mümkündür [67]. Bugün gelinen noktada, fitalatların kesin olarak kanserojenik özellikte olduğu hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalarla elde edilen veriler ışığında bilinmektedir. İnsanlar üzerinde yapılan araştırmalarda bazı fitalat çeşitlerinin prostat kanseri ile ilişkilendirilmiş [68], meme kanseri ile olan ilişkerli açıklanmıştır [69].

İnsan ve hayvalarda, çeşitli toksik etkilere sahip olan, zararlı kimyasalların, su ve gıdalardan uzaklaştırılması, oldukça dikkat çeken ve önem arz eden bir konudur.

Kozmetik ürünlerden plastiklere kadar, bir çok üründe kullanılan DEP'in toprağa ve suya karışması kaçınılmazdır. Bu nedenle farklı araştırma grupları özellikle

sudan ayrıştırılması için araştırmalar yürütmektedir [70]. DEP'in toprakta biyolojik olarak parçalanması, monoetil fitalat ve iki dietil zincirinin abiotik ortamda hidroliziyle gerçekleşmektedir [71]. Toprakta DEP'in biyolojik bozunmasını sağlayan bakteriler mevcuttur ve bu yeteneğe sahip bakteriler, fitalat oksijenaz, fitalat dehidrojenaz ve fitalar dekarboksilaz gibi fitalik asit esterlerinin parçalanmasında rol oynayan spesifik enzimlere sahiptir. Ancak parçalanma sırasında ortaya çıkan ara maddeler toksik etkiyi arttırarak mikroroganizmaların zararını bozabilmektedir. Araştırmalarda DEP'in domuzlarda ve ineklerde pankreas kolesterol esteraz tarafından enzimatik monoesterlerine hidrolize edildiğini göstermektedir [72].

DEP'lerin toksisitesi ile ilgili araştırmalar gün geçtikte artmaktadır. Araştırmalar, bazı fitalatların androjen biyosentezini inhibe ederek, erkek üreme gelişimini etkilediğini göstermektedir. Sıçanlarda tekrarlanan DEP uygulamasının, testislerde germ hücre popülasyonunda azalmaya sebep olduğu görülmüştür [73-77]. Düşük dozlarda fitalata maruz kalmanın, toksik etkilerinin olduğu bilinse de, toksik etkilerinin insandaki değerlendirmesi, toksisite testleri oral maruziyet yoluyla yapıldığından, doğru şekilde yapılamamaktadır. Çünkü fitalat maruziyeti çoğunlukla deri yoluyla olmaktadır [78-81].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

TEM (2100F 200kV HRTEM, Jem Jeol)

Derin Dondurucu, -80 °C (Daihan Scientific)

Distile Su Sentez Cihazı (Pure Lab, Elga)

DSC-60 plus (Shimadzu)

Etüv, %5 CO₂, 37 °C (Panasonic)

Fırın (NÜVE, EV018)

FTIR (Shimadzu)

GCMS-QP2010 (Shimadzu)

Hassas Tartı (Shimadzu)

TEM (HT7700, Hitachi High Tech)

İnvert Mikroskop (Zeiss, Stemi 305)

Işık Mikroskobu (Leica)

Laminar Akış Kabini (Telstar, Bio II Advance)

Plaka Okuyucu (HIDEX)

Santrifüj (NÜVE, NF800)

Santrifüj (Hettich, Universal 320R)

Sonikatör (TRANSSONIC, 460-H)

Tank, Sıvı Azot (Taylor Wharton, LS4800)

Vorteks (Dragon Lab MX-1F)

ESR spectrometer (X-band, JES-FA 300)

3.2. Sarf Malzemeler

10 µl pipet ucu (Nest)

100 µl pipet ucu (Nest)

1000 µl pipet ucu (Nest)

15 cm² flask (Nest)

15 ml santrifüj tüpü (Nest)

24'lü plaka (Nest)

50 ml santrifüj tüpü (Nest)

75 cm² flask (Nest)

Alüminyum mühürlenir pan (Shimadzu)

Filtre Kağıdı (Durapore)

Hücre Kazıyıcı (Nest)

Thoma Sayım Lamı (Superior)

3.3. Kimyasal Maddeler

Aseton (Sigma)

Çamaşır suyu (Domestos)

COOH- foksiyonel kısa ÇDKNT, saflık en az %96, dış çap en fazla 8nm (Nanografi)

Demir (II) klorür tetrahidrat (Merck)

Demir (III) klorür hekzahidrat (Merck)

DMEM/Ham's F-12 50/50 with Lglutamine, phenol red & sodium pyruvate (Multicell)

Etanol (Sigma)

Etilen Glikol (Merck)

FBS (Gibco)

Kalsiyum Klorür (Merck)

Kolesterol (Sigma)

Magnezyum Sülfat (Merck)

Magnezyum Sülfat (Sigma)

Metanol (Sigma)

MTT (Sigma)

Penisilin ve Streptomisin (Gibco)

Potasyum Klorür (Merck)

Sodyum asetat (Multicell)

Sodyum Hidroksit (Merck)

Sodyum Klorür (Carlo Erba)

Toz Agar (Himedia)

3.3.1. Kullanılan Çözeltiler

3.3.1.1. *C. elegans* Yumurta Senkronizasyon Karışımı

0,5 ml NaOH (5 M)

1 ml Çamaşır suyu (%5 hipoklorit)

3,5 ml Distile su

3.3.1.2. Bakteri üretimi için LB Agar ve hazırlama

Luria-Bertani (LB) Broth;

10 g Bacto trytone

10 g Bacto yeast

5 g NaCl

NaOH (1 M, pH 7,5)

1 L hacime üzerine dH₂O ilavesiyle tamamlanır

Luria-Bertani (LB) Agar;

10 g Bacto tryotone

5 g Bacto yeast

5 g NaCl

15 g Agar

NaOH, (1 M, pH 7,5)

1 L hacime üzerine dH₂O ilavesiyle tamamlanır

3.3.1.3. *C. elegans* için NGM karışımı

3 gr NaCl

17 gr Agar

25 gr Pepton

975 ml dH₂O

1 ml CaCl_2 (1 M)
 1 ml kolesterol, (5 mg/ml)
 1 ml MgSO_4 (1M)
 25 ml KPO_4 tampon (1 M, pH 6,0)

3.3.2. Kullanılan Tamponlar

3.3.2.1. Fosfat Tamponu (PBS)

10 mM K-fosfat, pH: 7,2
 150 mM NaCl

3.3.2.2. Hücre Canlılığı (MTT) Solüsyonu

50 mg MTT
 10 ml PBS

Çalışmada ayrıca HUVEC (ATCC, CRL-1730), *E.coli* OP50 (Fisher Sc.S29021) ve *C.elegans* (N2, Carolina) kullanılmıştır.

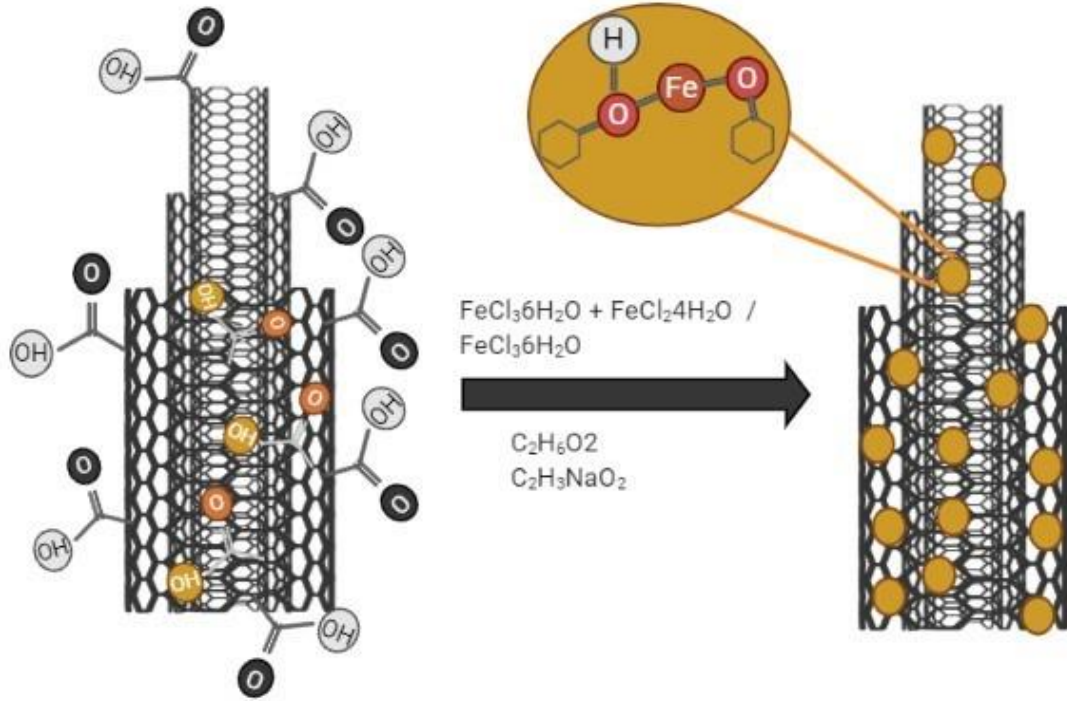
3.4. Yöntemler

3.4.1. KNT'lerin Paramanyetik Hale getirilmesi ve Analizleri

Paramanyetik hale getirmek için iki farklı yöntem izlenmiştir. Birinci yöntemin sonucunda oluşan KNT'ler tip-1 paramanyetik KNT, ikinci yöntemin sonucunda oluşan KNT'ler ise tip-2 paramanyetik KNT olarak isimlendirilmiştir.

KNT'leri paramanyetik hale getirmek için demir tuzları kullanıldı. 1.4 g demir (III) klorür heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 75 ml etilen glikol içinde 0.4 g çok duvarlı KNT ile karıştırıldıktan sonra 3,6 g sodyum asetat eklendi ve 1 saat boyunca sonikasyon işlemi ile iyice karışması sağlandı. Karışım balçık kıvamına ulaştıktan sonra 12 saat boyunca paslanmaz çelik kap içerisinde 200 °C'de kurutuldu. Daha sonraki işlem olarak, KNT'lere bağlanmamış demir ve ortamda kalan kimyasalları KNT'lerden uzaklaştırmak için önce etanol daha sonra distile su ile yıkama yapıldı. Yıkama işlemini takiben, numune 60 °C'de 48 saat boyunca tekrar kurutulmaya bırakıldı ve sonrasında cam şişe içinde oda koşullarında (25 °C, 1 atm) saklandı. Bu adımda sentezlenen ve yalnız bir demir tuzu içeren KNT'ler tip-1 KNT olarak adlandırıldı.

Benzer biçimde ilk yöntemde demir tuzu eklenen adımda ilaveten 0.4 gram demir (II) klorür tetrahidrat ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) eklendi ve diğer adımlar tekrarlandı. Bu yöntemle sentezlenen paramanyatik KNT'lere tip-2 KNT ismi verildi.



Şekil 3.1: Karbon nanotüplerin paramanyetikleştirilmesi

3.4.2. KNT – Geçirimli Elektron Mikroskobu analizi

TEM analizleri kullandığımız demirli tuzların içerisindeki demirlerin KNT'ler ile birleşip birleşmediğini anlamak ve KNT'lerin duvar sayılarını, iç yapısını görmek için önemli bir adımdır. Bunun için ilk olarak Erzurum Atatürk Üniversitesi bünyesinde bulunan Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM) ve daha sonra da Ortadoğu Teknik Üniversitesi Merkezi Laboratuvarı'ndan hizmet alımı yapılmıştır. TEM görüntülerinin alınması için, KNT'ler izopropil alkol içinde, sonik banyo kullanılarak çözdürüldü (1 mg/ml) ve 15 ml tüp içerisinde saklandı. Analize hazır hale gelmesi için bakır ızgaralar arasına 1 ml hacminde alındı ve en az 1 gün süreyle kurutuldu. ODTÜ'deki görüntüler için hızlandırıcı voltaj değeri 200 kV, DAYTAM'da ise 120 kV olarak ayarlanmıştır.

3.4.3. KNT – Elektron Spin Rezonans Analizi

Bu aşama ESR spektrası analiz yöntemi Gebze Teknik Üniversitesi, Nanomanyetizma ve Spintronik Araştırma Merkezi (NASAM) bünyesinde bulunan JES-FA 300 X-band ESR spectrometer (9.4 GHz) cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Relatif değerlerin belirlenmesi için paramanyetik hale gelen tip-1 ve tip-2 örneklerinin yanında paramanyetik halde bulunmayan KNT örneğinin de spektrasında bakılmıştır. Bu işlem için her üç numuneden toz örnekler, kuartz tüplere konularak ESR cihazına yerleştirilmiştir. Cihazda mikrodalga gücü 5 mW, manyetik alan modülasyonu 100 kHz, modülasyon genliği ise 2 mT olarak ayarlanmıştır.

3.4.4. KNT-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektra Analizleri

KNT, tip-1 KNT, tip-2 KNT, demir (III) klorür hekzahidrat ve demir (II) klorür tetrahidrat toz örnekleri Altınbaş Üniversitesi bünyesinde bulunan FTIR cihazında spektrasına bakılmıştır. Ölçümler $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ IR aralığında yapılmıştır. Cihazda kullanılan sinyal gürültü oranı 60.000:1'dir. Ayrıca çözünürlük 0.25 cm^{-1} , tarama oranında saniyede 20 spektra olarak ayarlanmıştır. Her bir numune için ölçüm en az 3 defa tekrarlanmıştır. Değerler oluşturulmadan önce gerekli eğri düzeltmeleri Spectra yazılımı üzerinden yapılmıştır. Elde edilen ham data ise essential FTIR (eFTIR) programı kullanılarak görselleştirilmiştir.

3.4.5. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri Analizleri

Termal analiz yöntemi olarak yüksek sıcaklıklarda KNT yapısı hakkında bilgi üretmek için DSC yöntemi kullanılmıştır. Bu analiz için Bahçeşehir Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim dalı bünyesinde bulunan Shimadzu, DSC 60+ marka ve modelindeki DSC cihazı kullanılmıştır. DSC ayarlamalarında referans ve örnek panlarının bulunduğu ortamın inert olması azot gazı ile sağlanmıştır. Kullanılan panlar alüminyum panlardır ve 600 °C 'ye kadar dayanıklıdırlar. Cihazın sıcaklık artışı 5 °C/dakika , nitrojen gazı akışı 50 ml/saat olacak şekilde ayarlanmış ve ölçümler 30 °C ile 600 °C arasında alınmıştır. Elde edilen sonuçlar cihazın kendi programında analiz edilmiş, grafik haline getirilmiştir. KNT, tip-1 ve tip-2 analiz edilmiş panlara konulan ağırlıkları ise sırasıyla 10, 9 ve 15 miligramdır. Her ölçümde referans panları boş olarak ayarlanmıştır. Veriler TA60 programı ile işlenmiştir.

Demir (II) klorür tetrahidrat ve demir (III) klorür hekzahidrat bileşiklerinin de DSC analizler 30-600 °C arasında yapılmıştır. Her iki numunenin ağırlığı 10 mg olarak ve sıcaklık artışı 10 °C/dak. olarak ayarlanıp ölçümler aynı şartlarda alınmıştır.

3.4.6. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmaları için seçilen hücre insan göbek kordon endotel (HUVEC, CRL-1730™) hücreleridir. Sıvı azot tankının içinde yaklaşık -180 °C sıcaklıkta bulunan HUVEC hücreleri 37 °C sıcaklıkta maksimum 2 dak. içinde çözündürüldükten sonra 5 ml DMEM-F12 medyumunu ile 15 mililitrelik tüpe alındı ve 1500 devir/dak. 5 dak. süre boyunca santrifüjlendi. Santrifüj tamamlandıktan sonra üst sıvısı döküldü ve sonra üzerine 1 ml medyum eklenilerek hücrelerin kalkması ve homojen olarak karışması için pipetaj yapıldı. Hücreler daha sonra önceden hazırlanan ve içinde 10 ml DMEM-F12 medyum bulunan 25'lik flaska ekildi. Ekimi tamamlanan hücreler etüvlerde 37 °C ve % 5 CO₂ koşullarında çoğaltıldı.

Hücre pasajlama çalışmaları için, HUVEC hücreleri 25'lik flask içerisinde yeteri çoğunluğa ulaşmış artık flask yüzeyinde yer kalmayacak seviyeye ulaştığında pasaj yapıldı. Bunun için 25'lik flaskta bulunan hücreler hücre kazıyıcı yardımı ile kazındı. Kazınan ve medyuma kalkan hücreler 15 ml falcon içerisine alındı ve 1500 devir/dak. 5 dak. süreyle santrifüjlendi. Pellet ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra 1 ml DMEM F-12 medyumunu ile pipetaj yapıldı. Homojen olarak dağılımı sağlanan hücreler 10 ml DMEM F-12 medyumunu ile hazırlanmış 75'lik flask içine ekildi. Ekim işleminden sonra hücreler %5 CO₂ ve 37 °C koşullarını sağlayan etüvde inkübe edildi.

Hücre dondurma aşamasına geldiğimizde, çoğalan hücrelerin analiz için kullanılmayan miktarları daha sonraki analizler için saklandı. Pasaj sayıları not edildi. Bunun için, flasklardan hücre kazıyıcı yardımı ile kaldırılan hücreler santrifüj tüpü içerisinde santrifüj edildikten sonra üst sıvısından ayrıştırıldı. Falcon dibindeki çökelti haldeki HUVEC hücreleri 1 ml DMEM F-12 medyumunu eklenerek pipetaj yapıp, 1 adet 1.8 ml maksimum hacmi olan criyotüpe alındı ve üzerine 100 ml DMSO çözeltisi eklendi. Steril çalışmak adına bütün adımlarda kapak kapatma aşamalarında kapak ve ağız kısımları alkol beki ile sağlanan alevden geçirildi. Kapatılan hücreler izopropil alkol kabına alındı ve -80 °C sıcaklıktaki dondurucuda 24 saat süreyle beklemeye bırakıldıktan sonra azot tankına alındı ve stoğu tamamlandı.

Hücre sayımı için, Thoma lamı ile yapılan sayım yöntemi kullanıldı. Hücreyi içeren çözeltiden 1 µl hacimde alınarak Thoma camına yerleştirildi ve üzerine cam kapatılarak 1 milimetre küp hacminin sayılması sağlandı. İlk aşama olarak Thoma camındaki 16 büyük karedeki hücre miktarı sayıldı bu sayı seyreltme faktörü ile çarpıldı. Elde edilen yeni sayı 10.000 ile çarpılarak 1 ml hacimdeki ortalama hücre sayısına ulaşıldı.

Hücre canlılık testi deneyleri için HUVEC'ler üzerinde MTT yöntemi uygulanmıştır. 24'lük plakalar kuyu başına 50.000 hücre olacak şekilde ekilip 24 saat süreyle etüvlerde inkübe edilmiştir. Ertesi gün hücreler toksik olduğu düşünülen KNT, tip-1 paramanyetik ve tip-2 paramanyetik nanotüplere maruz bırakıldı. 3 örnekte 1 mg/ml derişimine sahip olacak şekilde distile su içerisinde çözöldü ve hücrelere canlılık testleri sırasında her kuyuya 100 µl olacak şekilde eklendi. Maddeler uygulandıktan sonra 24 saat süreyle inkübe edildi. Sonraki adım da ise MTT çözeltisi her kuyuya 50 µl olacak şekilde etkilendi. MTT sıvısının ışıktan etkilenmemesi için işlemler karanlıkta herhangi bir kontaminasyona sebebiyet vermemek içinde laminar akış kabini içerisinde işlemler tamamlanmıştır. MTT eklendikten sonra 2 saat süre ile tekrar inkübasyona bırakılan hücrelerin sonrasında üst sıvısı pipetler yardımıyla çekildi ve her kuyuya 200 µl DMSO çözeltisi eklendi ve yarım saat süre ile oda koşullarında bekletildi. Sonrasında 570 nm de okuma yapmak üzere ayarlanan plaka okuyucu cihazda absorbans değerlerine bakıldı.

3.4.7. *C. elegans* Canlılık Testleri

Hücre deneylerinden sonra çevreye olan etkilerini incelemek ve canlı bir organizmadaki toksik etkilerini belirlemek için tip-2 KNT'ler 10 deney, 5 kontrol petrisinde üremesi 5-flourasil yardımıyla kısıtlanmış N2 tip *C. elegans*'lar üzerinde denendi.

C. elegans'ların üzerinde yaşayacağı medyum ortamı olan nematot büyütme medyumunu (NGM) hazırlamak için 2,5 g pepton, 17 gram agar ve 3 gram NaCl tuzu 975 ml distile su ile karıştırıldıktan sonra 15 dk boyunca 121 °C'de otoklavlandı. Otoklav işleminden sonra 15 dk boyunca oda koşullarında bekletilerek sıcaklığın 55-60 °C aralığına düşmesi sağlandı. 1 ml CaCl₂ (1 M) ve 1 ml MgSO₄ (1 M) ve 1 ml kolesterol (5 mg/ml etil alkol) eklenerek iyice karışması sağlandı. Son adım olarak petri kaplarına (çap: 100 mm) 20 ml NGM eklenerek oda şartlarında kabin içerisinde

soğumaya bırakıldı. Canlılık testlerinde 5 kontrol, 10 deney grubu olmak üzere toplamda 15 petri kullanıldı. 5-flourasil kuruyan petriler üzerine eklendi ve üremesi kontrol altında tutuldu.

C. elegans besini olarak *E.coli* (OP50) kullanıldı. Bakterilerin besi yeri için ise LB Broth ile LB agar 121 °C sıcaklıkta 15 dakika boyunca otoklavlandı. Bakteriler stoklarından çıkarılarak 1 koloni/12 ml besiyeri olacak şekilde medyum sıvısına eklendi. 24 saat süre ile 37 °C de inkübe edilen OP50 tip bakteriler her petri kabına 500 µl olacak şekilde ekildi.

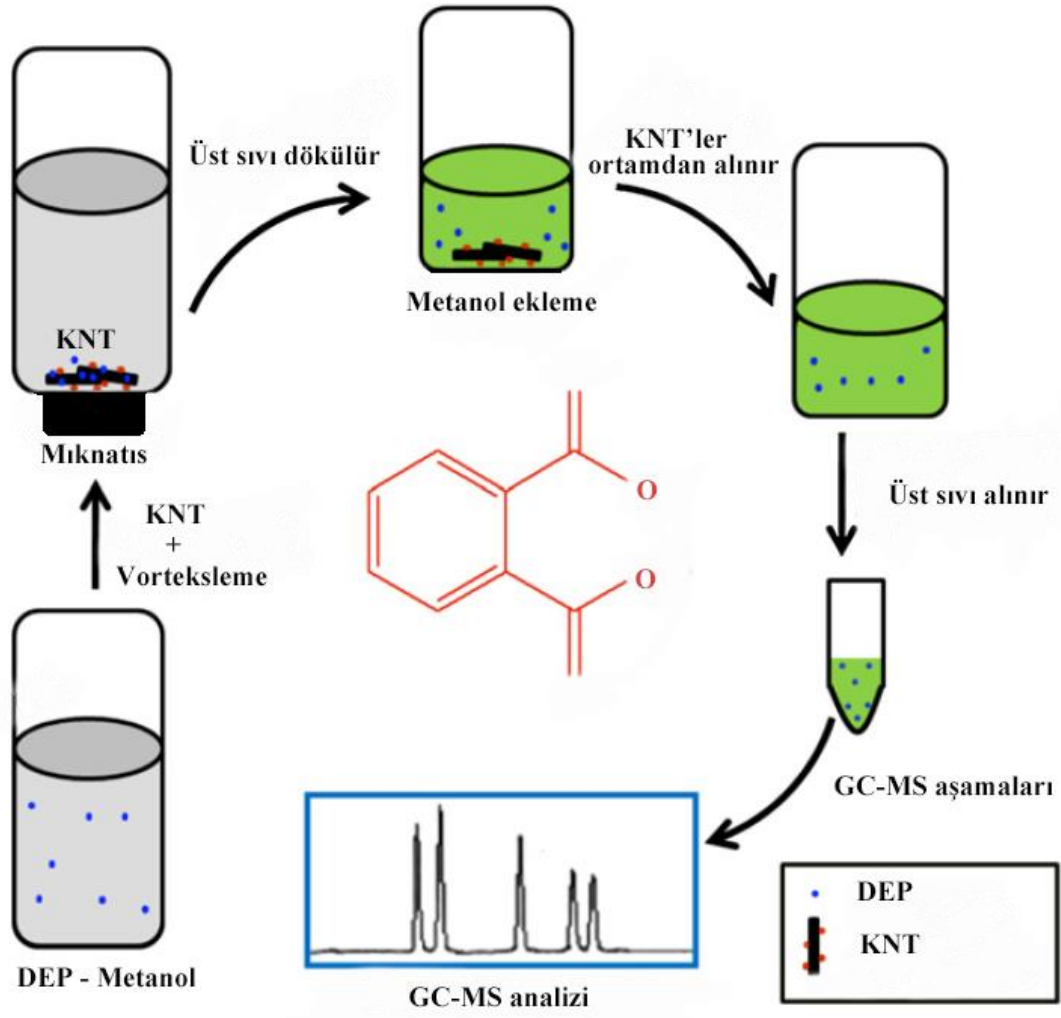
Deney grubu oluşturma aşamasında, L4 evresi ismi verilen yetişkin birey evresi deney grubu olarak seçildi. L4 evresine yumurta evresinden başlanılarak senkronize bir şekilde ulaşması sağlandı. Yumurta evresinde eldesi için içinde erişkin ve yumurta evresinde *C. elegans* olan petriler 3 ml distile su ve pastör pipeti yardımıyla yıkanarak toplanan yumurta ve bireyler 15 ml santrifüj tüpleri içerisine alındı. Bu aşamadan sonra tüpler 5 dak. boyunca 5000 devir/dak. santrifüj edildi. Daha sonra üzerlerine 1 ml çamaşır suyu ve 0,5 ml NaOH (1 M) eklenerek her 2 dakikada bir 10 saniye olmak üzere 10 dakikada 6 defa vortekslendi. Sonrasında 1300 devir/dak. 30 saniye süre ile santrifüjlenen tüplerden üst sıvısı ayrıştırıldı. Steril su eklenerek yumurtaların toplanması sağlandı. Bütün bu süreç içerisinde güçlü zar yapısı sayesinde yumurtalar santrifüj tüpünün dibinde hayatta kalırken bireyler ise parçalandı ve üst sıvılar içerisinde ortamdan uzaklaşmış oldu. Son adım olarak yumurtalar eşit şekilde besi yerlerine alındı ve L4 evresine gelmesi sağlandı. Bu aşamadaki petrilere 5-flourasil eklenmedi. Daha sonra L4 evresine gelen bireyler öze yardımıyla toplanarak içerisinde 5-flourasil olan besi yerlerine alındı. Petriler parafilm ile kaplandı.

Deney grubu için 5 kontrol ve 10 deney petrisi oluşturuldu. Deney gruplarına 1 ml tip-2 KNT (1 mg/ml stok çözeltisi) eklendi. Eklendikten sonra petrilere hiç birey kalmayana dek takibi yapıldı. Deney süresi boyunca bir-iki günde bir yüksek çözünürlüklü EPSON tarayıcı yardımıyla fotoğrafları çekilen petrilere canlı bireyler sayılırken, öze yardımıyla da ölü bireyler mikroskop altında toplandı ve sayılar not edildi.

3.4.8. Paramanyetik KNT'ler ile Dietil Fitalat Ayrıştırma İşlemi

DEP'ler 2 ml (2DP), 5 ml (5DP) ve 10 ml (10DP) ml hacimlerde ayarlanıp 15 ml'lik santrifüj tüplerine alındı ve 15 ml'ye metanol ile tamamlandı. Hemen sonrasında

3 dak. boyunca vorteksleme işlemine tabi tutulup iyice karışma sağlandı. Paramanyetik KNT'ler vorteksleme sonrası mıknatıs yardımıyla 15 ml santrifüj tüpü içerisinde tutulurken sıvı ortamdan dökülerek uzaklaştırıldı. Bu aşamada tüpün içerisinde artık KNT'ler ve onların ortamdan ayırdığı dietil fitalat ve metanol kalıntıları olması beklenmektedir. KNT'ler içerisinde tutunan dietil fitalatların ayrışması için tüpün içerisine 500 µl civarı metanol eklenir ve tekrar 1 dakika vortekslenir. 50 kat seyreltilip GC-MS analizine hazır hale getirilir. Ayrıştırma yönteminin şematize edilmiş hali Şekil 3.2'de gösterilmiştir. KNT'ler yine mıknatıs yardımıyla sabit tutularak sıvı alınır ve içerisindeki dietil fitalatın miktar tayini için gaz kromatografi-kütle spektrometresi (GC-MS) analizine tabi tutulur. GC-MS analizi Erzurum Atatürk Üniversitesi bünyesinde bulunan Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (DAYTAM) hizmet alımı yapılarak Shimadzu GCMS-QP2010 model cihaz ile tamamlanmıştır. Daha sonra elde edilen veriler ppm olarak verilmiş bunlar ng/ml'ye çevirilmiştir. En son olarakta absorbe edilen derişimleri hesaplanıp, ortamdaki DEP miktarına göre değişimi MATLAB programı yardımıyla grafiğe dökülmüş, maksimum noktası hesaplanmıştır.



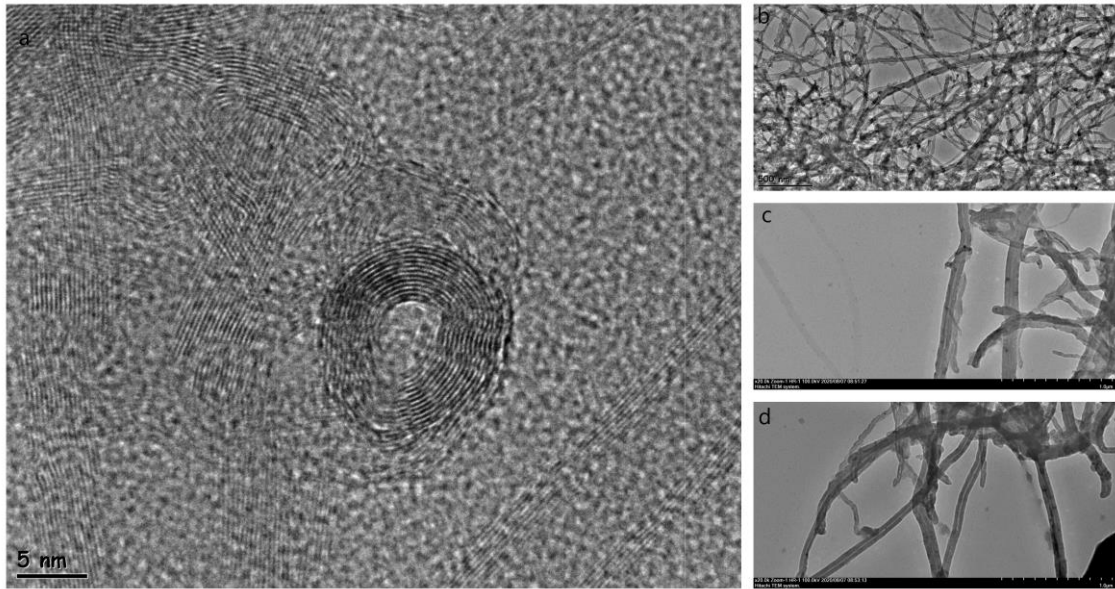
Şekil 3.2: Fitalat ayırıştırma şeması [53]

4. BULGULAR

4.1. KNT'lerin Geçirimli Elektron Mikroskobu Görüntüleri

Litaratürde KNT'lerin karakterizasyon yöntemlerinden birisi olarak TEM görüntüleme göze çarpmaktadır. TEM görüntüleme ile çok duvarlı KNT'lerin duvar yapıları ve paramanyetikleştirme sonrası bu duvar yapılarında ki değişimler gözlemlenebilir.

TEM görüntüleme ile çok duvarlı KNT'ler ve paramanyetik formlarının duvar yapıları ve uzunluk dağılımları gözlemlenebilir, paramanyetikleştirme yöntemleri uygulanan KNT'lerin ise yapısındaki değişiklikler gözlemlenebilir.



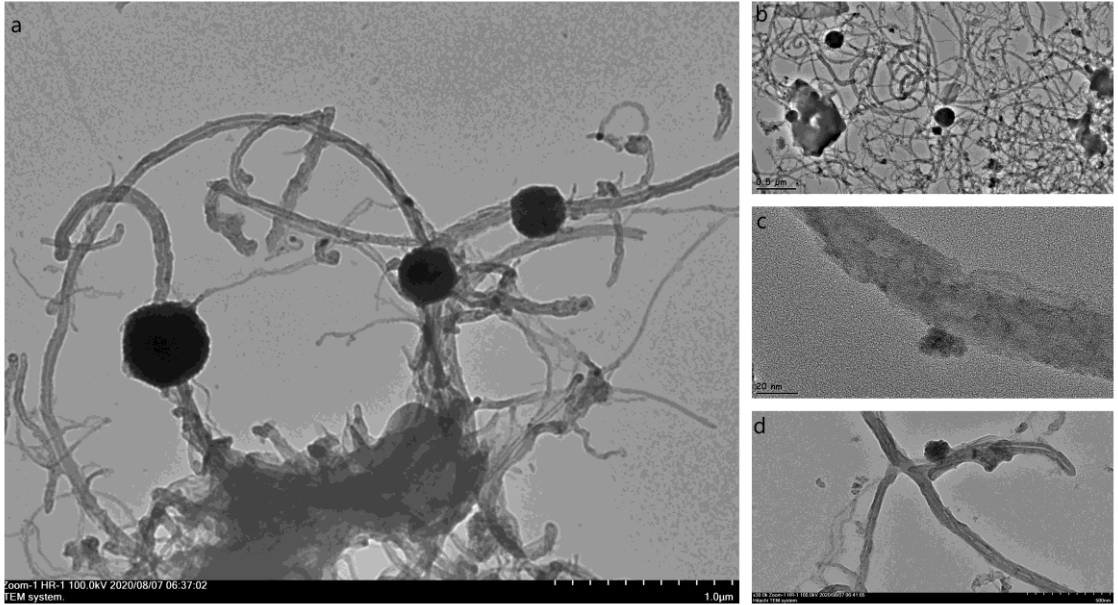
Şekil 4.1: ÇDKNT'lerin TEM görüntüleri. (a) ÇDKNT'lerin iç içe duvar yapısı, (b) 500 nm ölçeğe ÇDKNT'lerin dallı yapısı, (c) 100 nm ölçeğe ÇDKNT'lerin çok duvarlı yapısı, (d) 100 nm ölçeğe ÇDKNT'lerin kümelenmiş yapısı)

TEM görüntülerinin farklı ölçeklerde olması için 2 farklı TEM görüntüleme merkezinde görüntüleme gerçekleştirildi. Bunlardan ilki Erzurum Atatürk Üniversitesi'ne bağlı Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (DAYTAM, kullanılan cihaz: Hitachi TEM System, 100 kV), ikincisi ise Ortadoğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'ndan (ODTÜ, Merlab, kullanılan cihaz: Jeol 2100F, 200 kV RTEM) olmak üzere farklı ölçeklerde görüntüler elde edildi.

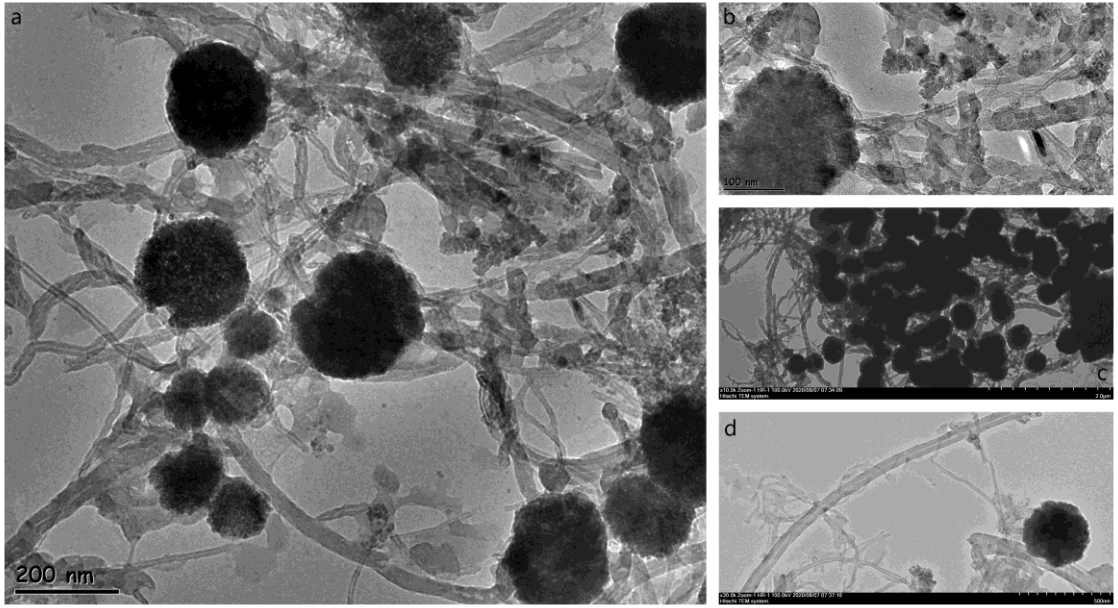
Paramanyetikleştirme adımları uygulanmamış ÇDKNT'lerin iç yapısı Şekil 4.1'le gösterilmektedir. Yaklaşık 5 nm ölçekteki görüntülere (a) bakıldığında

nanotüplerimizin çok duvarlı yapısı gözükmemektedir ve 10 civarında duvar sayısına sahip olduğu ve iç ve dış çapının 8 nm civarına çıkabildiği görülmektedir. Ayrıca 500 nm ölçekteki görüntü (b) incelendiğinde farklı uzunlukta dallanmış nanotüpler görülmektedir. Son olarak, 100 nm ölçekteki görüntüler (c,d) ise tüpsü yapıları ve kimi bölgelerde üst üste binmiş dalsı yapıları göstermektedir. Bu dalsı yapılar, ortalama uzunlukların da belirlenmesinde kullanılmaktadır.

Tip-1 ÇDKNT'lerin TEM görüntüleri (Şekil 4.2) incelendiğinde ise 100 nm ölçekteki (a) küresel koyu renk yapılar, yüzeye tutunan demiri göstermektedir. KNT'nin dallanmış yapısına tutunmuş sıklığı çok olmayan demir yapıları, 0.5 μm civarındaki görüntülerde (b) izlenmektedir. Benzer çok duvarlı yapıların 20-50 nm ölçekteki görüntülerde gözlemlenmektedir (c,d).



Şekil 4.2: Tip-1 KNT'lerin üzerinde demir agregatları. a) 1 μm , b) 1 μm KNT'ler, c) 20 nm, d) 50 nm

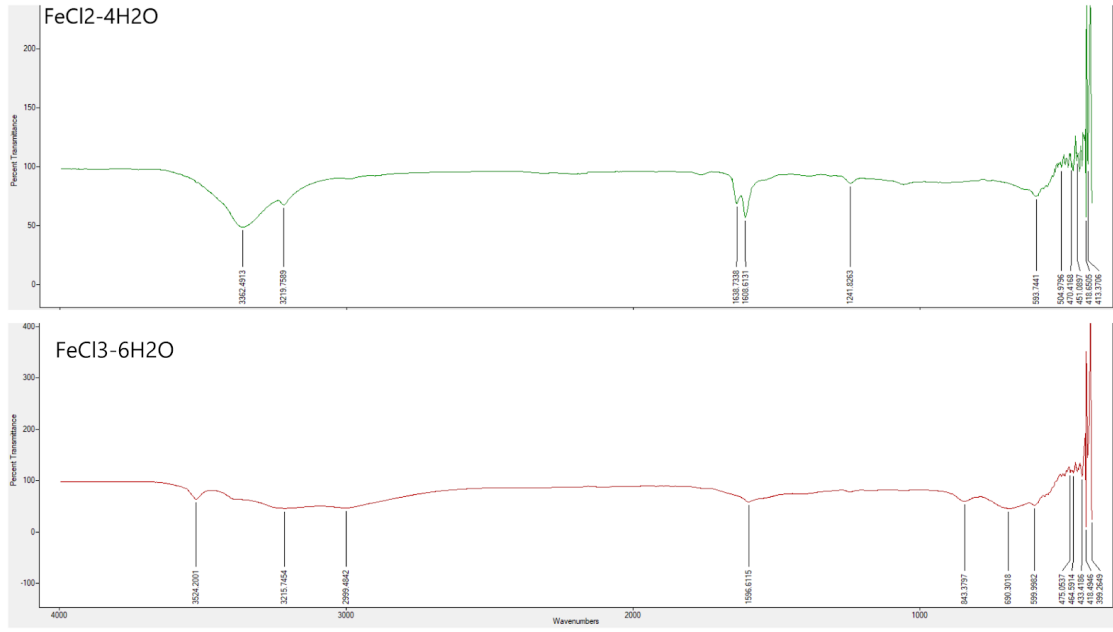


Şekil 4.3: Tip-2 KNT'ler üzerindeki demir agregatlarının TEM görüntüleri. a) 200 nm, b) 100 nm, c) 2 μ m, d) 50 nm

Sentez aşamasında demir (III) klorür heksahidrat ile demir (II) klorür tetrahidratın beraber kullanıldığı tip-2 ÇDKNT'lerin TEM görüntülerinden (Şekil 4.3), 200 nanometre ölçekteki (a) görüntüler, dallanmış yapıları ve üzerinde farklı büyüklüklerde agrege olmuş demiri göstermektedir. Dört farklı TEM görüntüsünde de demir yapıları görmek mümkündür. Özellikle 2 μ m ölçekteki (c) görüntülerden demir yoğunluğunun tip-1'e göre daha yoğun olduğunu söylemek mümkündür. TEM görüntülerinde 100 nm ölçekteki demir kümelenmesinde bazı yerlerin daha yoğun olduğunu 50 nm civarında ise tüpsü yapının korunduğu görülmektedir (b, d).

4.2. Demirli Tuzların ve Demir Bağlı KNT'lerin FTIR Spektrumları

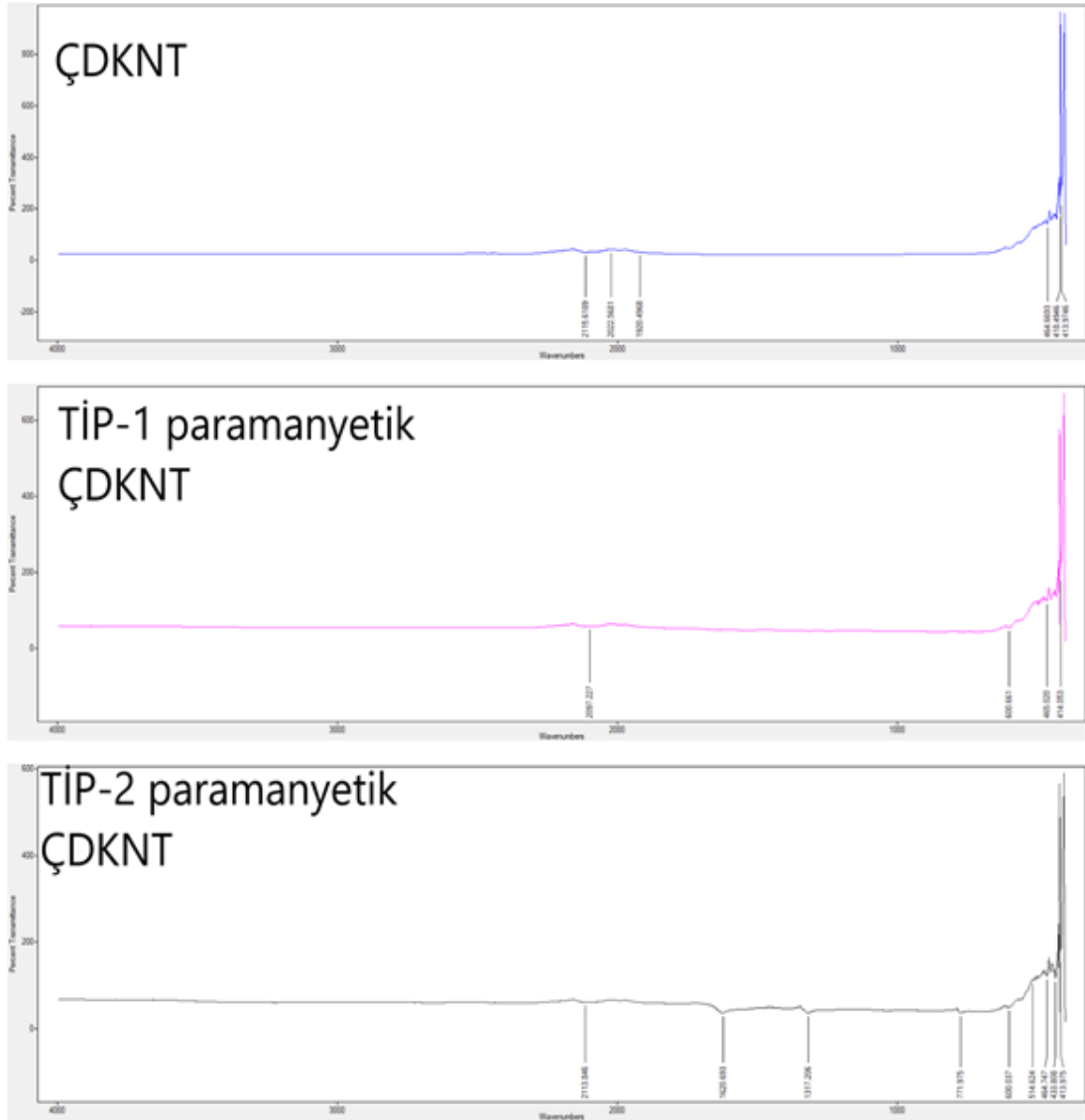
FTIR analizleri ile kızılötesi ışınlar katı, sıvı veya gaz örnekler üzerine gönderilen kızılötesi ışınların maddenin içinden geçerken ne kadarının soğurulduğuna bakarak analiz yapan bu işleviyle de maddenin moleküler yapısının karakterizasyonunda kullanılan önemli bir yöntemdir. Çalışma prensibi farklı elementlerin arasındaki bağlar farklı ışığı farklı frekanslarda emmesi üzerine kurulmuştur. Şekillerde görülen grafikler ve tepe noktası belirlenmesi eFTIR programı aracılığı ile yapılmıştır.



Şekil 4.4: Çalışmada kullanılan demirli tuzların FTIR spektralleri.

Demir (II) klorür tetrahidrat ve demir (III) klorür heksahidrat tuzlarının FTIR spektrumları Şekil 4.4’de görülmektedir. Bu spektraya baktığımızda demir (II) klorür tetrahidrat tuzunun spektrasında 410, 450, 470, 504, 593, 1241, 1608, 1638, 3219 ve 3362 cm^{-1} dalga boylarında tepeler ortaya çıkardığı görülmektedir.

Demir (III) klorür heksahidrat tuzunun FTIR spektrasına baktığımızda ise 400, 450, 470, 600, 690, 843, 1596, 2999, 3215, 3524 cm^{-1} noktalarında tepe oluşumları görülmektedir. Normal ve paramanyetikleştirilmiş çok duvarlı karbon nanotüplerin (ÇDKNT, tip-1 KNT ve tip-2 KNT) kızılötesi spektrumlarını Şekil 4.5 göstermektedir. ÇDKNT’nin analiz grafiğine bakıldığında saptanan tepe noktaları 413, 418, 464, 1920, 2022, 2115 cm^{-1} civarlarında olmuştur. Tip-1 KNT’lerin tepe noktaları ise 414, 465, 600, 2097 cm^{-1} civarlarında görülmektedir. Tip-2 KNT’nin FTIR spektrasına baktığımızda ise 413, 433, 464, 514, 600, 771, 1317, 1620 ve 2113 cm^{-1} civarlarındaki tepe noktaları gösterilmiştir.

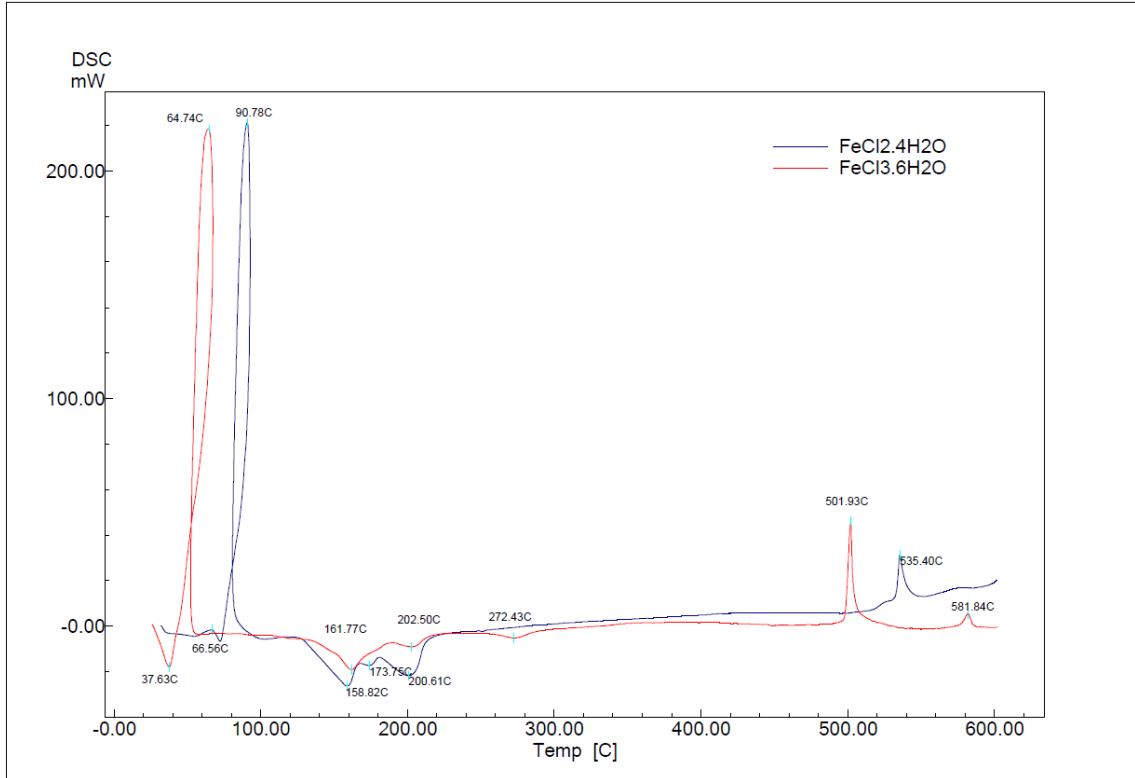


Şekil 4.5: KNT ve paramanyetik ÇDKNT’lerin FTIR spektrumları.

4.3. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri Grafikleri

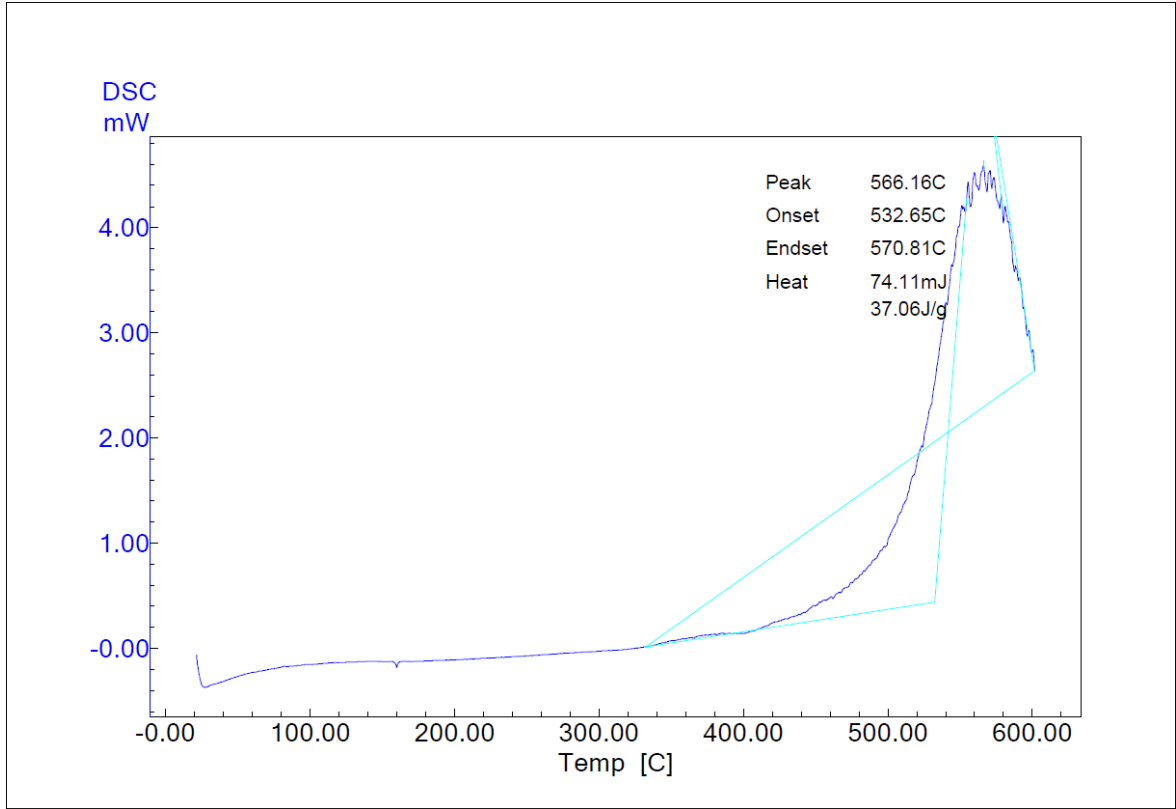
DSC analizleri termal analiz yöntemleri arasında önemli bir yer tutmaktadır. Yaklaşık 600 °C’ye kadar ısıtılan ortamdaki maddenin iç yapısındaki enerji değişimlerine bakılarak, yapı hakkında fikir elde etmek mümkündür. Bu fikirlere ulaşabilmek adına DSC grafikleri ve grafikler üzerindeki analizleri TA60 programı ile yapılmıştır. Bütün analizler yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi, 600 °C’ye kadar ısıtılan KNT örnekleri üzerinde yapılmıştır. Ölçüm DSC 60+, Shimadzu cihazı ile yapılırken değerler bilgisayar ortamında TA60 Collection Monitor programı ile kayıt altına alınmıştır.

Paramanyetik hale getirme işlemlerinde kullanılan demirli tuzların DSC analizlerini Şekil 4.6 bize göstermektedir. Demir (II) klorür tetrahidrat için oluşan tepe noktaları sırasıyla 66, 90, 158, 173, 200, 535 °C olarak tespit edilmiştir. Demir (III) klorür hekzahidrat için bu tespit edilen değerler ise 37, 64, 161, 202, 272, 501, 581 °C olmuştur. Belirtilen tepe oluşumlarına denk gelen bölgelerin entalpi değerleri ise hesaplanıp toplanmış ve toplam entalpi değeri demir (II) klorür tetrahidrat için -1,60 J olarak, demir (III) klorür hekzahidrat için 875,96 mJ olarak bulunmuştur.



Şekil 4.6: Çalışmada kullanılan demirli tuzların DSC analizleri.

Çok duvarlı karbon nanotüplerin diferansiyel taramalı kalorimetrik analizi sonucu 500-600 °C aralığında pik yaptığı görülmektedir (Şekil 4.7). Termal analiz sonucunda tepe değerinin yaklaşık 565 °C olduğu saptanmıştır.

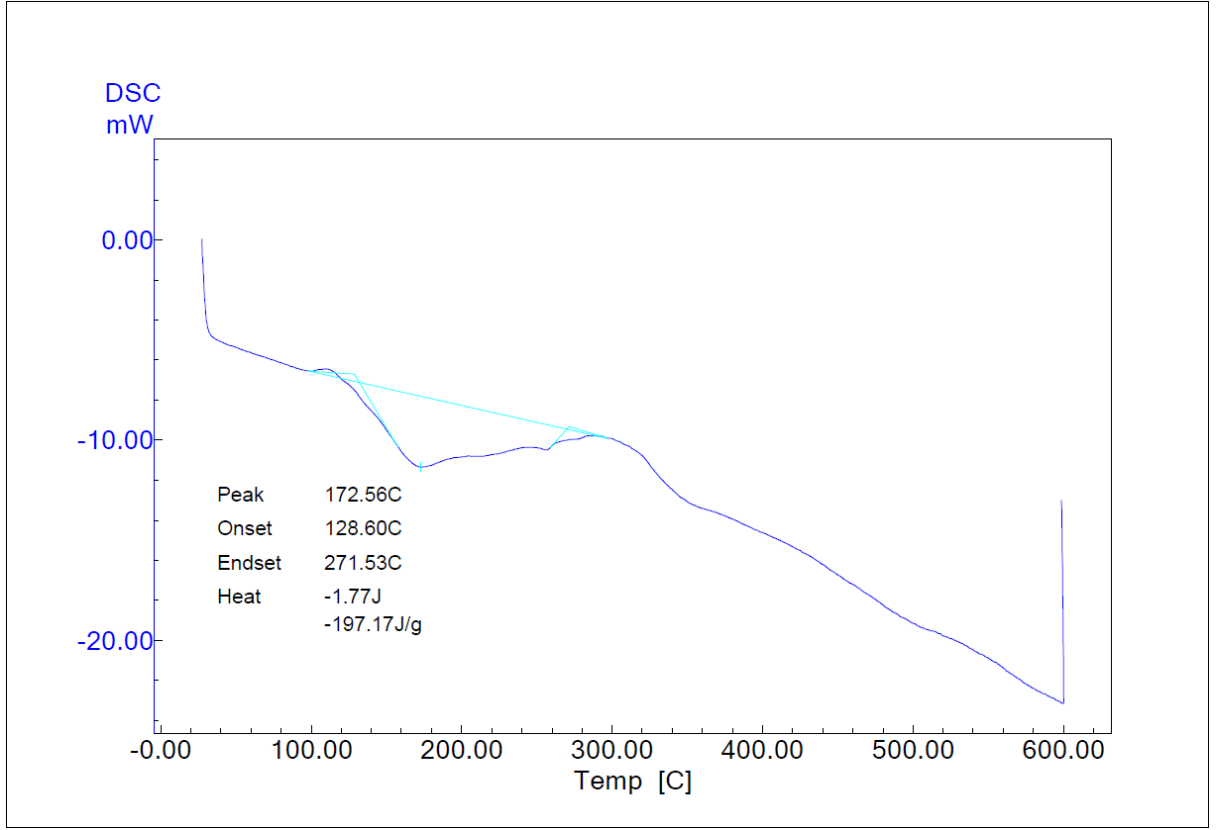


Şekil 4.7: ÇDKNT'nin DSC grafiği.

Tip-1 KNT'lerin DSC analizinde 172.56 °C'de ilk tepe görülmektedir. Bu tepenin oluştuğu bölgedeki entalpi değişimi (ΔH) değeri -1.77 J olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.8).

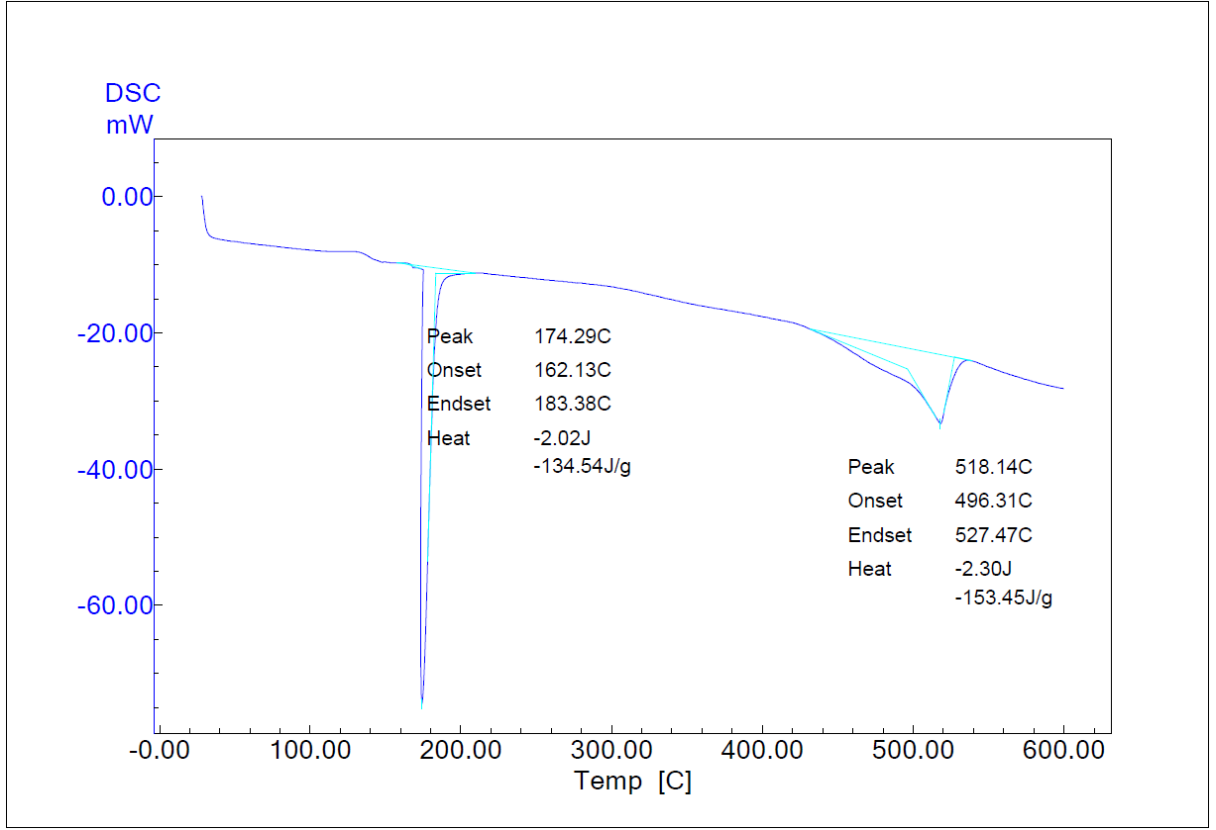
ΔH hesaplaması yapılırken denklem 2 (115) cihaz yazılımları tarafından kullanılmaktadır. Bu denklemde K kalorimetrik sabiti ifade ederken A ise DSC grafiği ile sıcaklığı gösteren grafikte fonksiyonun X-ekseni ile arasında kalan alanı ifade eder. Çalışmamızda, bu alan TA60 programı ile hesaplanmaktadır.

$$\Delta H = KA \text{ (denklem 2)}$$



Şekil 4.8: Tip-1 paramanyetik KNT'lerin DSC grafiği.

Tip-2 KNT'lerin DSC analiz grafiği ise Şekil 4.9 ile gösterilmiştir. Tip-2 paramanyetik KNT'lerin tip-1 ile yakın bir noktada ilk tepesini oluşturduğu görülmektedir ve bu değer 174.29 °C olarak saptanmış ve entalpi değişimi -2,02 J olarak hesaplanmıştır. Tip-2 KNT'de ikinci bir tepe noktası olarak 518.14 °C analiz edilmiştir ve tepe bölgesinde eltalpi değeri -2.30 J olarak bulunmuştur.



Şekil 4.9: Tip-2 paramanyetik KNT'lerin DSC grafiği.

4.4. KNT'lerin Elektron Spin Rezonans Grafikleri

ESR'nin bir diğer adı da Elektron Paramanyetik Rezonans (EPR)'tır. Katı veya sıvı malzemelere uygulanabilen bu yöntem ile maddelerin manyetik enerji seviyeleri hakkında fikir elde edilebilmektedir.

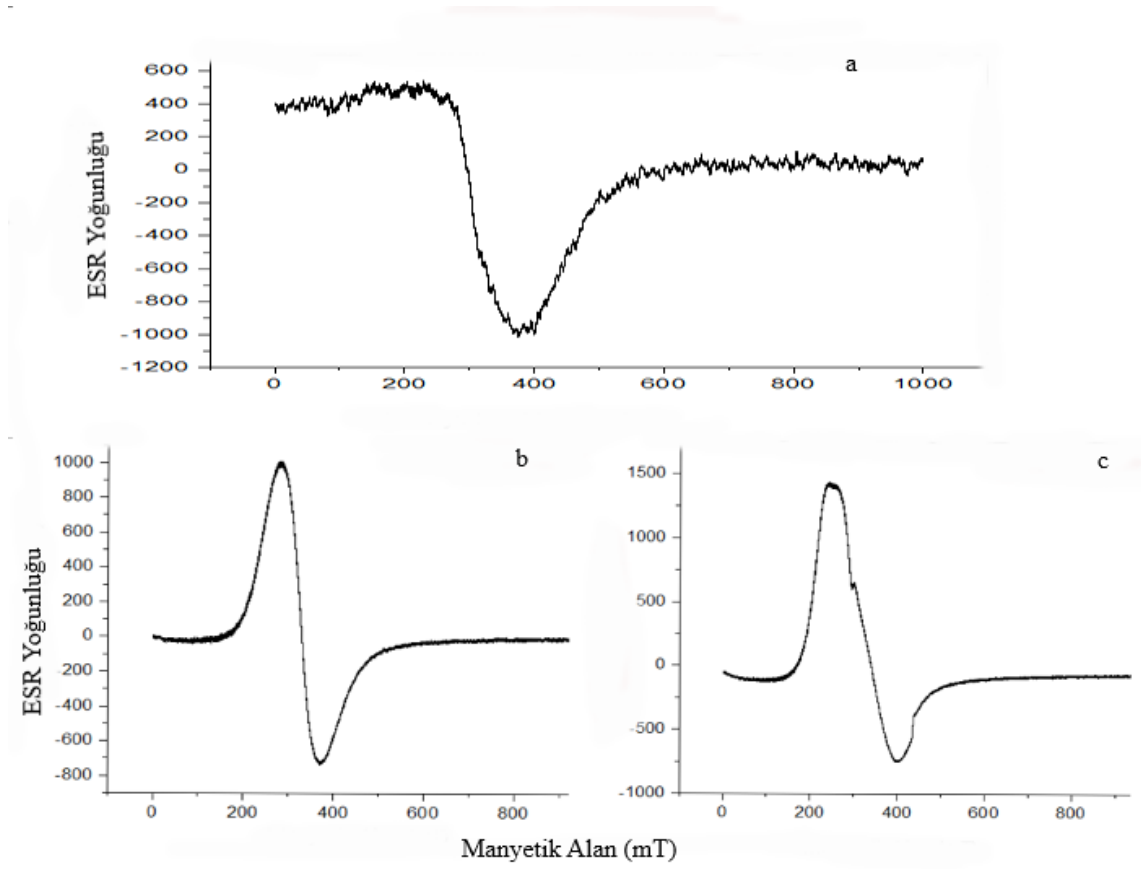
ESR analiz grafiklerinde bulunan eksenlerden X eksenini uygulanan manyetik alanı ifade ederken birimi tesla yada gauss olabilmektedir. Y eksenini ESR yoğunluğunu (ESR Intensity) gösterir ve birimi yoktur.

Grafiklerde göze ilk çarpan bulgu artan manyetik alan şiddetine paralel bir şekilde iki adet biri eksi biri artı y bölgesinde olmak üzere 2 tepe noktası olmuştur. Bu tepeler manyetik alan yaklaşık olarak 200-500 mT arasında iken oluşmaktadır. 500 mT'dan daha büyük manyetik alan değerleri için ESR yoğunluğu sıfır civarında sabitlenmektedir.

Karboksil gruplarıyla fonksiyonel hale getirilmiş ve paramanyetik hale getirme adımları uygulanmamış çok duvarlı KNT örneğimizin ESR grafiğinde (Şekil 4.10.a)

pozitif tepe görülmezken, yaklaşık 400 civarı olan başlangıç nokatasının 500 değerine kadar çıkabildiği görülmektedir. Negatif tepe -1000 civarında konumlanmıştır.

Tip-1 ve tip-2 KNT'lerinin ESR spektrumlarında ise pozitif tepelerin belirgin bir şekilde oluştuğunu ve büyüklüklerinin negatif tepelerden daha fazla olduğunu görmekteyiz. Tip-1 KNT için pozitif tepe konumu 1000 civarı iken negatif tepe 800 civarıdır (Şekil 4.10.b). Tip-2 KNT'ye baktığımızda ise pozitif tepenin 1500 civarı ve negatif tepenin yine 800 civarı konumlandığını görebilmekteyiz (Şekil 4.10.c).

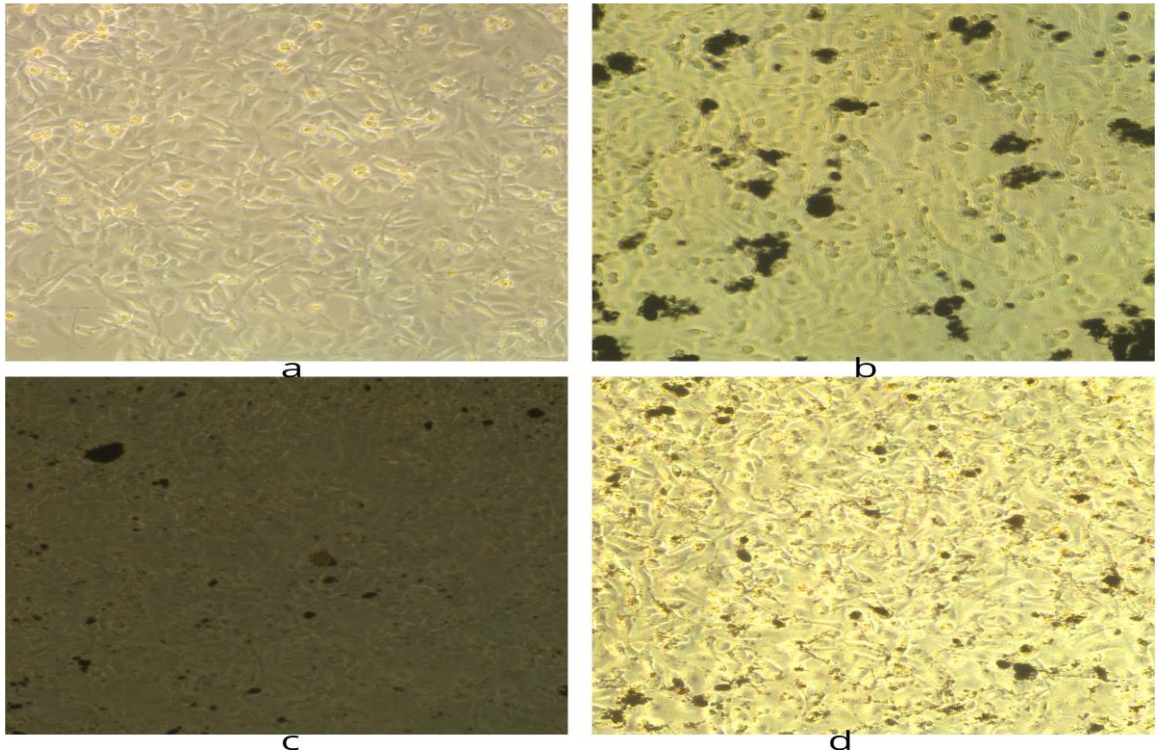


Şekil 4.10: KNT'lerin ESR grafikleri

4.5. KNT'lerin Hücre Düzeyinde Toksik Etkileri

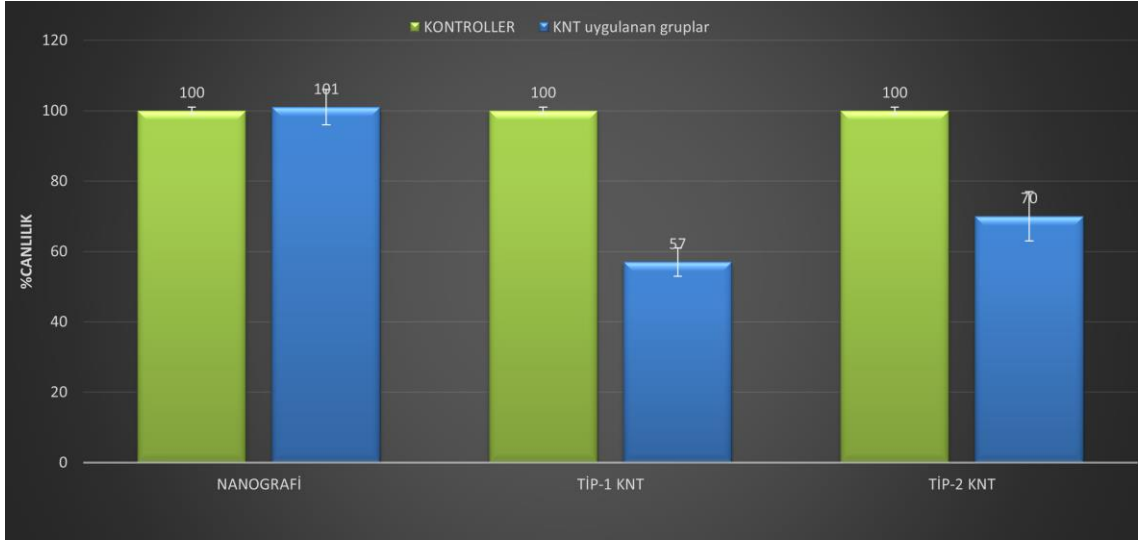
HUVEC hücreleri yöntemlerde belirtilen koşullarda kültür ortamında yeterli sayıya ulaşınca, üç adet 24 kuyulu plakalara kuyu başına 50.000 hücre olarak KNT'ler varlığında ekildi. Yaklaşık 2 gün boyunca KNT varlığında çoğaltılan hücreler ışık mikroskobunda görüntülendi (Şekil 4.11). Ayrıca, 2. günün sonunda MTT uygulanarak plaka okuyucu cihazda absorbans değerlerine 570 nm dalga boyunda ölçülerek canlılık tespiti yapıldı.

Çalışmada kontrol grubu HUVEC'lerin (Şekil 4.11.a), paramanyetik olmayan Nanografi şirketinden alınmış COOH grupları ile fonksiyonel hale getirilmiş ÇDKNT uygulanmış hücrelerin (Şekil 4.11.b), tip-1 paramanyetik ÇDKNT uygulanmış (Şekil 4.11.c) ve tip-2 paramanyetik ÇDKNT uygulanmış HUVEC'lerin (Şekil 4.11.d) durumu 2. gün sonunda fotoğraflanmıştır. Görüntülerde KNT'ler siyah topaklar şeklinde b, c ve d'de görülmektedir. Hücreler ise flask yüzeyine yapışmış olarak net bir biçimde görülmektedir.



Şekil 4.11: KNT etkisindeki HUVEC'lerin ışık mikroskobu görüntüleri. a) Kontrol HUVEC b) Nanografi KNT, HUVEC c) Tip-1 KNT, HUVEC d) Tip-2 KNT, HUVEC

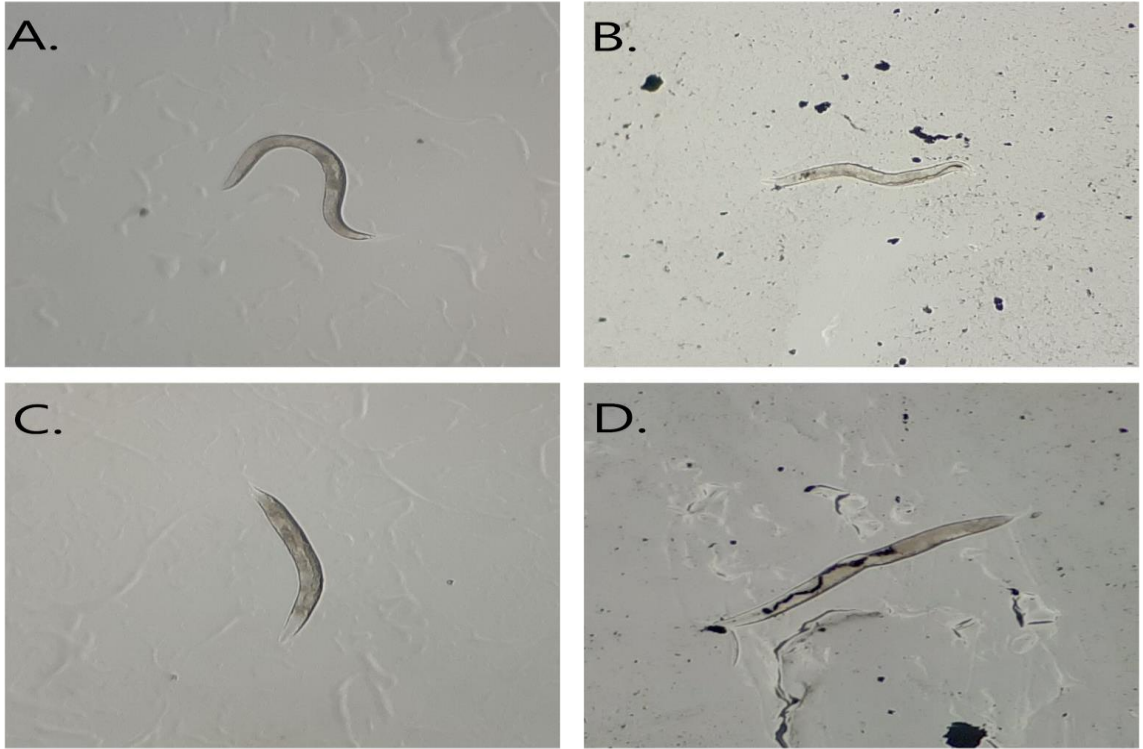
MTT testleri sonucu HUVEC hücrelerinde paramanyetik olan ve olmayan KNT'lerin toksisitesine bakıldı. Saptanan % canlılık değerleri okunan absorbans değerlerinin ortalamaları alınarak hesaplandı (Şekil 4.12). Paramanyetik olmayan sadece önceden işlevselleştirilmiş KNT'lerin hücre canlılığına olumsuz bir etkisi görülmez iken paramanyetik KNT'lerde, tip-1 KNT'de % 40, tip-2 KNT'de % 30 civarlarına kadar canlılıkta azalma görülmektedir.



Şekil 4.12: KNT etkisindeki HUVEC'lerde % canlılık oranı.

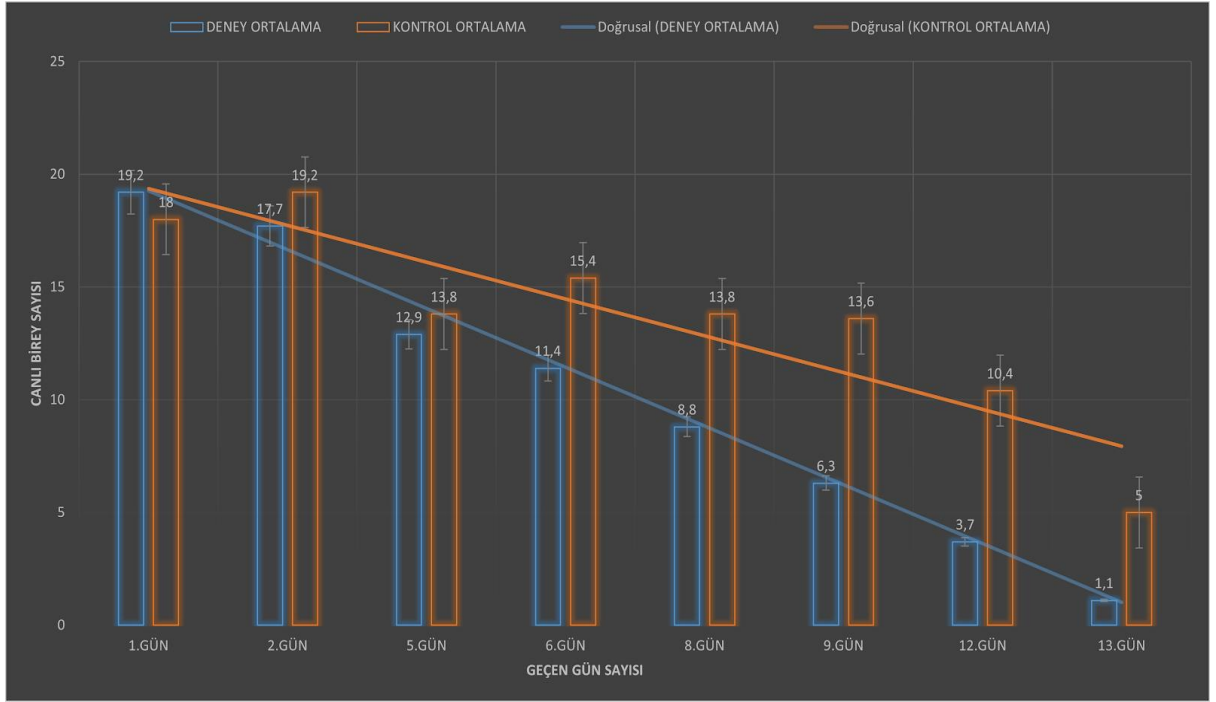
4.6. Tip-2 KNT'lerin *C. elegans* Toksisite Testleri Sonuçları

C. eleganslar besin piramidinin en alt halkasında bulunan nematotlardır. Sentezlenen yeni maddelerin üzerindeki etkilerini incelemek sentezlenen maddenin çevreye zarar verip vermeyeceği konusunda fikir edinmek için önemli bulgular vermektedir. Çalışmada 15 petri içerisinde (10 deney ve 5 kontrol grubu) üreme durumlarını kontrol altında tutmak için 5-flourasil eklenmiş *C. eleganslar* gün aşırı 2 hafta boyunca sayıldı. Buradaki bir önemli nokta ise deneye tabi tutulan *C. elegans* çeşidinin yaşam süresinin normal şartlarda 15 gün civarında olmasıdır. Ölü bireyler tespit edildikten hemen sonra öze yardımı ile petrilere uzaklaştırılmıştır. Canlı yetişkin bireyler Epson yüksek çözünürlüklü tarayıcıda fotoğraflanıp kayıt altında tutulmuştur. Bu fotoğraflar yardımı ile canlı yetişkin bireylerin sayıları not edilmiştir. Canlı ve ölü haldeki *C. elegans*'ların KNT ve KNT'siz hallerinin resimleri Şekil 4.13'te gösterilmiştir.



Şekil 4.13: *C. elegans*'ların mikroskopdaki görüntüleri. a) Kontrol *C. elegans*, canlı b) KNT, *C. elegans*, canlı c) Kontrol *C. elegans*, ölü d) KNT, *C. elegans*, ölü

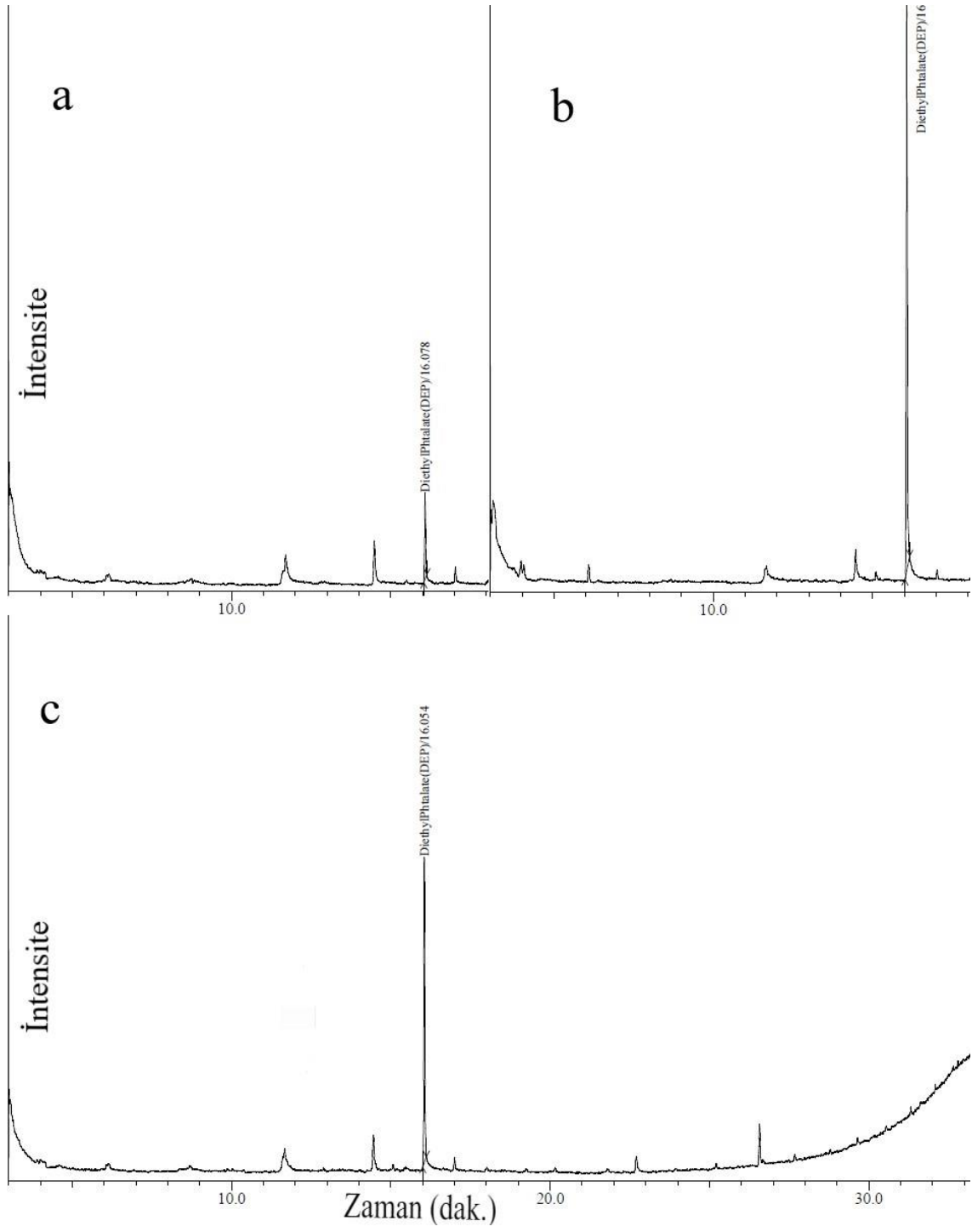
Petrilerdeki sayılara bakıldığında tip-2 KNT uygulanan deney petrilerindeki canlı birey sayılarının daha hızlı azaldığı görülmektedir (Şekil 4.14). Ortalama sayılara göre bir eğri çizildiğinde ise deney gruplarındaki azalışın daha hızlı olduğu göze çarpmaktadır. Bu adımdaki bir diğer bulgumuz ise deney ve kontrol petrilerine yetişkin birey ekimi yaparken ister istemez yetişkin bireylere yapışık gelen yavru bireylerde olmuştur. Bu yavru bireyler sayılara tabi tutulmamıştır ama kontrol gruplarında canlı yavrular yaşayabilirken, deney gruplarında yavru bireylerin yaşamlarını devam ettiremedikleri gözlemlenmiştir. Deney gruplarında bireylerin tamamına yakını 12. Gün sonunda ölmüştür. Kontrol petrilerinde ise sıfıra ulaşma 14. günde gözlemlenmiştir. Sonuç olarak paramanyetik KNT'lerin toksik etkilerinin olduğu hücre deneylerinde olduğu gibi *C. elegans* 'larda da görülmektedir.



Şekil 4.14: Günlere göre petrillerdeki ortalama canlı *C. elegans* sayıları.

4.7. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi Miktar Analizi

Bu çalışmada dietil fitalatın gaz kromatografisinde tanımlanması için DAYTAM'da çalışmalar yürütülmüştür. Daha önce yöntemlerde anlatıldığı gibi hazırlanan 3 farklı konsantrasyondaki dietil fitalat (DEP) gaz kromatografisi ve kütle spektrometresinden geçirilerek kromatogramları oluşturuldu. Her üç örnekte 16. dakikalar itibarı ile tepeler oluşturduğu ve bu tepelerin genliğinin konsantrasyona bağlı olarak arttığı gözlemlendi.



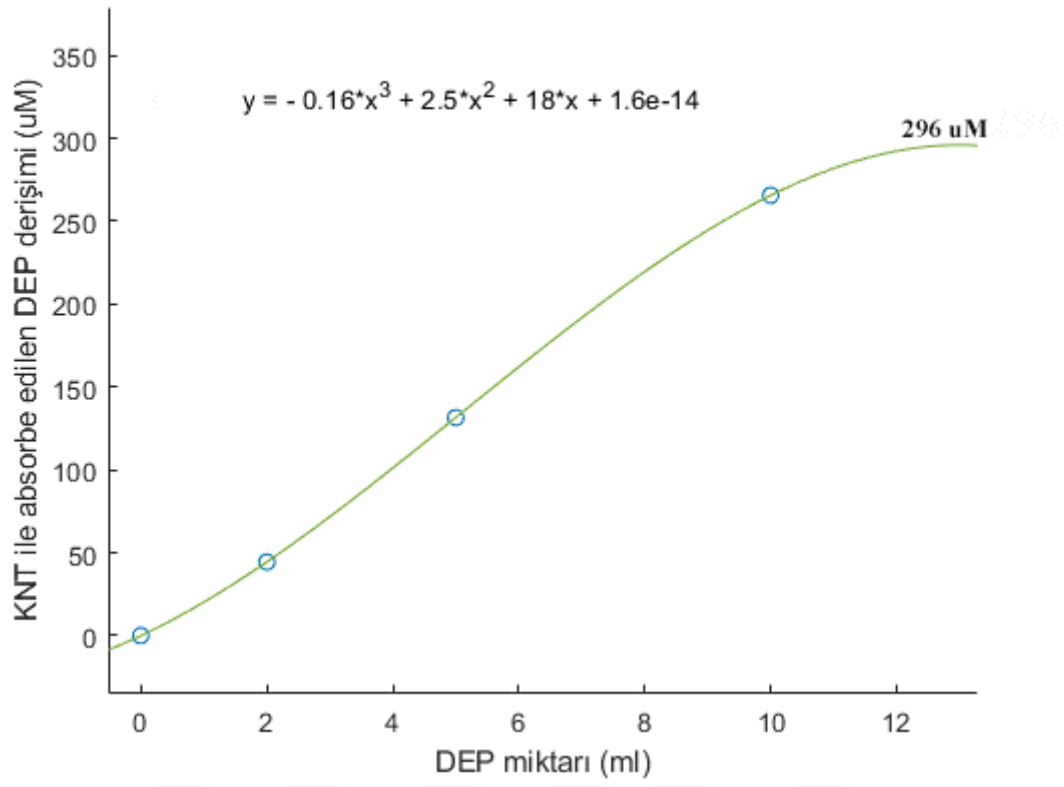
Şekil 4.15: Dietil Fitalat'ın GC-MS analiz kromatogramı

2DP, 5DP ve 10DP kodlu numulerimizin içerisinde bulunan dietil fital GC-MS kromatogramlarını sırasıyla Şekil 4.15a, 4.15b, 4.15c göstermektedir. Şekillerde dietil fitalatın tepe verdiği yerler işaretlenmiştir. Üç numunenin analiz sonuçları ise Tablo 1'de gösterilmektedir.

Tablo 1: GC-MS analiz sonuçları

Numune	R.Time	m/z	Alan	Yükseklik	Miktar
2DP	16.079	149.00	318677	110746	9.882 ppm
5DP	16.052	149.00	994264	373668	29.237 ppm
10DP	16.075	149.00	2033641	750912	59.014 ppm

2DP numunenin içerisine atılan tip-2 KNT'ler absorbe ettiği miktar 9,882 ppm iken , bu değer 5DP için 29,237 ppm ve 10DP için 59,019 ppm olarak analiz edilmiştir. Sonuçlarda ppm olarak verilen değerler ng/ml ye 1000 ile çarpılarak dönüştürülebilir. DEP için bilinen molekül ağırlığı ise 222,24 g/mol'dür [96]. Bu bilgiden yola çıkarak absorbe edilen DEP miktarları sırasıyla 44.46, 131.55 ve 265.54 μM olarak hesaplanır. Bu değerlerin grafiğe dökülmüş hali başlangıç (0,0) noktası dahil edilip gösterilmiştir (Şekil 4.16). Grafikte doyum noktası yaklaşık olarak 300 μM olarak gözükmemektedir.



Şekil 4.16: GC-MS ile tip-2 KNT'lerin absorbe ettiği DEP miktarı

5. TARTIŞMA

Klinik öncesi çalışmalar araştırılacak olursa, PAE ailesinin bir üyesi olan dietilhekzil fitalat (DEHP) ve onun ana metaboliti olan monoetil hekzil fitalatik asit esteri (MEHP) üzerine yapılan bir toksikoloji araştırmasında, MTT canlılık testleri bahsi geçen fitalatlara maruz bırakılmış embriyonik böbrek hücreleri (HEK-293) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonucu ise hücrelerin canlılık değerlerinin fitalat ana metaboliti varlığında düştüğünü göstermektedir [82]. Yine aynı çalışmada *in vivo* çalışma olarak 45 gün boyunca farklı dozlarda DEHP'ye maruz bırakılan deney farelerinin böbrek dokularından saflaştırılan mitokondri organelleri çeşitli testlerle incelenmiştir. Çalışmada sonuç olarak DEHP/MEHP varlığının mitokondrik fonksiyon bozukluğuna, mitokondri için yaşamsal önem atfeden oksidatif hasara sebebiyet verebileceği gösterilmiştir. Zebra balığı larvası üzerinde yapılan bir araştırmada ise DEP'lerin de içerisinde bulunduğu 6 ana fitalat grubunun toksikoloji araştırmaları yürütülmüştür [83]. Çalışmada ortaya çıkan veriler ışığında 6 PAE grubunun gelişimsel anomalileri indükleyici etki yapabileceği saptanmıştır. Bu anomaliler anormal hareket, düşük kalp ritmi, omurga eğrilği ve perikardiyal ödem olarak zebra balıklarında gözlemlenmiştir. Ayrıca PAE'lerin akut maruziyetinin zebra balıklarının kemik gelişiminde etkilediği rapor edilmiştir. Türkiye' de yapılan bir araştırmada ise hadım edilen köpeklerden alınan testislerden saflaştırılan primer hücreler üzerinde, DEP'in de içerisinde bulunduğu 8 adet fitalat çeşidinin ve bisfenol A'nın (BPA) sitotoksik etkileri incelenmiştir [84]. MTT canlılık testleri ile yapılan bu araştırmada ise bahsi geçen maddelerin toksik etkileri gözlemlenmiş ve toksisite seviyelerinin uygulanan maddenin molekül ağırlıkları ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Bir başka araştırmada ise sığır hemoglobinleri üzerinde yapılan araştırmada ise DEP içeren 3 çeşit fitalat grubunun hemoglobin ile bağ yapabildiği gözlemlenmiştir [85]. Buda bizlere fitalatların hematolojik olarak toksik etkilerinin de olabileceğini göstermektedir.

Klinik araştırma olarak yapılan bir çalışmada ise prostat kanseri olan hasta erkeklerden ürin örnekleri alınmış ve incelenmiştir [68]. İncelenen ürinlerden, fitalatlara maruz kalmanın prostat kanseri ile pozitif bir korolasyon içerisinde olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu incelemede fitalat belirleme işlemi için sıvı kromatografisi kullanılmıştır. Geliştirdiğimiz tip-2 KNT'leri de kromatografi öncesi malzeme olarak

kullanım potasyeli mevcuttur. Prostat kanserine fitalatların nasıl sebebiyet vereceğini araştıran bir çalışmada ise, fitalatların kanser baskılayıcı rolde olan mikro RNA miR-34a kısıtlayıcı özellikte olduğu rapor edilmiştir [86]. Fitalatların varlığını meme kanseri ile ilişkilendiren araştırmalarda literatürde mevcuttur. Bu çalışmalardan birinde fitalatların meme kanserine sebebiyet verdikten sonra osteoklastogenezi artırarak kemik metastazına yol açabileceği araştırılmıştır [87]. Kolon kanserini konu alan bir çalışmada ise fitalatlardan DEHP'ye maruz kalımı durumunda kolon kanseri hücrelerinin, kullanılan kanser ilaçlarına karşı direnç kazandığı sonucuna ulaşılmıştır [88]. Aynı sonuca ulaşan başka bir makalede ise ilaç direncinin fitalat maruziyeti sonra MDR1 gen ekspresyonunun artımına bağlı olarak gerçekleştiği sonucuna ulaşılmıştır [89].

DNA'ya verdiği hasarı araştıran bir çalışmada çeşitli fitalat türlerine kırmızı kaliforniya solucanları, farklı konsantrasyon ve zamanlarla maruz bırakılmıştır. Bu çalışmada sonuç olarak, fitalatların oksidatif stresi ve DNA hasarını indükleyici etki yaptığı rapor edilmiştir [90]. Aynı sonucu destekleyici başka bir araştırma ise hamile kadınlardan alınan ürünler üzerinde yapılmıştır. Bu araştırmada ise hamilelik sürecinde fitalatlara maruz kalımının DNA hasarına ve lipid peroksidasyonuna sebebiyet verebildiği rapor edilmiştir [91]. Önemli bir diğer çalışmada ise endokrin bozucu olarak nitelendiren fitalatlardan bazılarının NRF1 genini etkileyerek kronik, kompleks beyin hastalıklarıyla ilişkilendirildiği görülmüştür [92].

Paramanyetik KNT'lerle yapılan çalışmalara daha önce verdiğimiz örnekleri özetleyecek olursak; tarım ilaçlarının ve ağır metallerin yeraltı sularına ve bitkilere karıştığı durumlarda ayrıştırılmasını [51,52,56] ve fitalatların paketlenmiş içeceklerden ayrıştırılması [53-55] konu alan çalışmalar mevcuttur. Klinik bir çalışmada ise ürünlerden mikotoksinlerin paramanyetik KNT'ler yardımıyla ayrıştırılması gerçekleştirilmiştir [57]. Örneğini verdiğimiz bu çalışmalar paramanyetik KNT'lerin ayrıştırma, saflaştırma amaçlı kullanımının önemini gösterir niteliktedir. KNT'ler üzerine yapılan çalışmalar ise gün geçtikçe artmaktadır. En önemli çalışma alanlarından biriside ilaç iletimidir [93]. İlaç iletiminde güncel çalışmalarda artık KNT destekli ilaç iletimini konu alan simülasyon çalışmalarının akciğer kanserinde önemli bir aşama kaydettiğini görmek mümkündür [94]. KNT'lerin bir diğer önemli kullanım alanını ise biyosensör araştırmalarında görmekteyiz [95]. Paramanyetik hale getirilen KNT'ler daha ileri modifikasyonlara da açık halde bulunduğundan biyomelüküllerin toplanması

veya çıkarılması için kullanımı yüksek potansiyel taşımaktadır [96]. Artık geline son noktada paramanyetik KNT'lere ligand bağlayıp, hedef kanserli hücrelerde istenmeyen ekspresyonların oluşmasını engellemek için çalışmalar yapabiliyoruz [97]. Immonuassayleri paramanyetik KNT'ler ile modifiye edip zamandan tasarruf edebileceğimizi görüyoruz [98].

KNT'ler üstün fizikokimyasal özellikleri ile rejeneratif tıpta, doğal ve sentetik malzemelerle entegre edilerek, daha sağlam ve daha esnek doku ya da implantların geliştirilmesinde, gamma sintigrafi için radyofarmasotiklerin geliştirilmesinde, geniş yüzey alanlarına bağlanabilen protein ve DNA yapılarla, yüksek hassasiyetli biyosensörlerin geliştirilmesinde kullanılmaktadır [99]. Medikal uygulamalarının yanında, geniş yüzey alanları, sağlam ve esnek yapıları ile kromotografik yöntemlerde de verimli sonuçlar ortaya çıkarmaktadır. Son birkaç yılda, araştırmacılar, emme kapasitesinin yüksek oluşu ve tekrar kullanıma uygun oluşu nedeniyle, katı faz mikro ekstraksiyon, manyetik dispersif katı faz ekstraksiyon, analit zenginleştirme, numune fraksiyonlama ve temizleme dahil, farklı bir çok ayırma yönteminde, KNT'lerin verimliliklerini ortaya çıkarmışlardır [100,101]. Ayırıştırılan malzemeler, hidrojen bağları, hidrofilik etkileşimler ve van der Waals kuvvetleri gibi etkileşimlerle ayırıştırılmaktadır. Ayırıştırılan malzemeler kimi zaman kandan ayırıştırılan proteinler olabiliyorken [102], toksik etkileri olduğu bilinen kimyasallar da olabilmektedir.

Örneklerini verdiğimiz araştırmalardan yola çıkarak denilebilir ki, DEP'lerin ve toksik etkileri bilinen ve yaygın olarak kullanılmaya devam eden fitalat türlerinin maruz kaldığımız medyumlardan ayırıştırılması insan, hayvan ve çevre sağlığı açısından önemli bir araştırma konusudur. Yaptığımız çalışmada bu ayırıştırmaı gerçekleştirebilmek için paramanyetik hale getirdiğimiz daha ileriki modifikasyonlara açık halde ki KNT'lerden faydalanılmaya çalışılmıştır. Diğer bir önemli durum ise ortamdan mıknatıs yardımıyla kolayca toplanabilen KNT'lerin, tekrar kullanılmesi sayesinde sürdürülebilir bir malzeme olmasıdır. Çalışmamızda DEP içeren karışıma dağılan paramanyetik KNT'ler, katı fazla ayırma gerçekleştirmede kullanılmışlardır. Geniş yüzey alanları ile yüksek bağ yapabilme kapasiteli nanotüplerin, paramanyetik hale getirilmesi, öncesi ve sonrasında karakterizasyonu gerçekleştirilmiş ve DEP'lerin sıvılardan ayırıştırılmasındaki performansı GC-MS kullanılarak değerlendirilmiştir.

Karakterizasyon aşamasında ilk olarak, asit bileşikleri ile muamele edilmiş ÇDKNT'lerin karakterizasyonu ve sonrasında 2 farklı yöntemle paramanyetik hale getirilen ÇDKNT'lerin karakterizasyonu ilk olarak TEM görüntüleri alınarak gerçekleştirilmiş, yapı ve morfolojileri incelenmiştir. ÇDKNT'lerin duvar sayılarını ve çok duvarlı yapıyı doğrulayan TEM görüntüleri incelendiğinde 8 nm'ye ulaşan dış yarıçap bilgisinin ve 100-500 nm ölçekte elde edilen görüntülerden de 0.5-2 μm aralığında verilen uzaklık dağılımı bilgisinin doğrulandığı görülmektedir. Elde edilen görüntülerin benzer uzunluk ve yarıçap bilgisine sahip ÇDKNT'ler ile uyuşan görüntüler olduğu görülmektedir [103].

İlk olarak sentezlenen Tip-1 KNT'lerin, 200 nm ölçekte verilen görüntülerinde, farklı boyutlarda ve bazı bölgelerde aggrege olarak KNT'lerin üzerine demirlerin tutunduğu görülmektedir. Farklı boyutlarda demir parçacıkların aggrege KNT'lerin bulunduğu bölgelere de tutunarak KNT'lerin aralarına da yerleştiği görülmektedir (Şekil 4.2).

Tip-2 KNT'lerin TEM görüntülerinde ise yüzeye ve aralara yerleşen demirlerin tip-1 KNT'ye göre daha fazla olduğunu söyleyebiliriz. Bu görüntülerden Tip-2 KNT'lerin tip-1'e göre manyetik alana daha duyarlı olmasını bekleyebiliriz. Görüntülerden ayrıca, paramanyetik hale getirilmek için kimyasal tepkimelere sokulan, ısıtılan ve sonikasyon işlemine tabi tutulan KNT'lerin tüpsü yapısının nispeten bozulmadığı, fiziksel yapısını koruduğu çıkarımları yapılabilir.

Karakterizasyon aşamasında FTIR sonuçları değerlendirildiğinde FeCl_2 ve FeCl_3 'ün $400\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ arasında aynı tepeleri verdiği görülmektedir. Bu aralıktaki tepeler yapılan bir çalışmada, bu bileşiklerinin kızılötesi spektrumunu, farklı pH'larda incelediği çalışmasında da doğrulanmaktadır [104]. Bir atomun ya da bileşiğin, diğer bir atom ya da bileşik ile kompleks bir yapı oluşturmaya kompleksleşme (complexation) denir. $400\text{-}500$ arası görülen tepeler C-Cl kompleksleşmesine bağlanmaktadır [105]. Bu aralıktaki tepeler FeCl_2 , FeCl_3 'de hem de KNT'ye bağlanan bileşiklerin oluşturduğu, tip-1 ve tip-2 paramanyetik KNT'lerde de bu tepeler görülmektedir.

FTIR analizlerinde demirli tuzların 3200 cm^{-1} civarı verdiği pikler O-H gruplarına atfedilir. 1600 cm^{-1} yakınında olan tepeler ise su moleküllerinin deformasyonunu gösterir. 1200 cm^{-1} civarı olan peakler ise Fe ile ilişkilendirilen hidroksil gruplarını ifade eder. 739 ile 549 arasında olan peakler ise Fe-O bağlarının

hareketlerine atfedilir [106]. Yine Fe-O bağlarından başka bir kaynaktan 582 cm^{-1} olarak bahsedilmiştir [107]. Bu bağları 580-640 cm^{-1} aralığındaki tepelerle doğrulayan çalışmalar da mevcuttur [108].

Paramanyetik KNT'lerimizin FTIR tepe noktalarına bakıldığında O-H gruplarına rastlanmadığını görüyoruz 3000 cm^{-1} ve üzerinde tepe gözlemlenmemektedir. 1637 cm^{-1} tepeleri C=O ve C=C bağları ile ilişkilendirilir, ayrıca 1396 cm^{-1} ölçümünde C-H bağına atfedilmiştir [105]. Gözlemlenen 2000-2200 cm^{-1} arası tepeler, KNT yapısal zincirindeki C-C germe moduna atfedilebilir [109]. Verilen bilgiler ışığında bakıldığında Fe-O bağlarını tip-1 ve tip-2 KNT, FTIR grafiklerinde görülmektedir. Bu demirli tuzlardan KNT'ye olan başarılı demir bağlanmalarını gösterir niteliktedir.

DSC ısınma eğrileri değerlendirildiğinde, saf KNT'nin grafiğinde 500-600 °C'lere kadar termal kararlılığını koruduğu görülmektedir. Bu durum KNT'lerin farklı sıcaklık artış oranlarındaki DSC grafiklerini araştıran makalelerdeki DSC grafikleri ile örtüşmektedir [110,111].

ÇDKNT'lerin ısınma sırasında aşağı yönlü endotermik tepeler verdiği görülmektedir [112]. Ancak kullandığımız SCHIMADZU DSC 60 Plus, bu eğrilerin yönünü tam tersi yönde vermektedir. Bu nedenle ÇDNT'ler için elde ettiğimiz ısınma eğrilerinin yönü yukarıdır.

Daha önce ferrik klorür bileşiklerinin DSC eğrileri elde edilmemiştir. Bu nedenle elde ettiğimiz kalorimetrik ölçüm eğrisini karşılaştırabileceğimiz bir data yoktur. Her defasında kalibrasyon yapılarak gerçekleştirilen tekrarlı ölçümlerde, bu bileşikler için aynı öz ısı sıcaklık değişimi grafiği elde edilmiştir. DSC grafiklerine bakıldığında, 64,74 ve 90,78 °C sıcaklıklarda elde edilen endotermik tepeler, çözücü moleküllerin uzaklaştırılması olarak değerlendirilebilir. Grafiğin devamındaki tepeler olan 150 ve 272 °C sıcaklık aralığında elde edilen egzotermik tepeler ise demirlerin ortaya çıkardığı tepelerdir [113]. Son pikler ise 500 °C'den sonra ortaya çıkan egzotermik tepelerdir ve bunları klorürün kristallenmesi sırasında ortaya çıkan tepeler olarak değerlendirmek mümkündür [114].

DSC grafiklerinden ΔH değerleri hesaplanırken denklem 2 kullanılır [115]. ÇDKNT için ΔH değeri pozitif iken, tip-1 ve tip-2 paramanyetik KNT'lerimiz için negatif değerlerdedir. Buradan ΔH değerlerine bakarak normal ÇDKNT için

endotermik, bu ÇKDNT'ler üzerinden sentezlediğimiz tip-1 ve tip-2 için ekzotermik reaksiyonlar sınıflandırması yapabiliriz. Kullandığımız cihazın bu yönleri standart bir çok DSC cihazından farklı olarak, tam tersi yönde verdiği daha önce belirtilmiştir. Uyguladığımız işlemlerin ÇDKNT'nin yapısını değiştirmiş olduğu ve sentezlediğimiz KNT'lerin ilk hali kadar termal stabilite göstermediğini görmek mümkündür. Tip-1 paramanyetik KNT'nin 172.56 °C'de yapısındaki demiri doğruladığını ve tip-2 paramanyetik KNT'nin 174.29 °C'de demir ve 518.14 °C'de yapıya katılmış klorürün ortaya çıkardığı öz ısı tepelerini izlemek mümkündür. Tip-2'nin daha fazla ΔH değerine sahip bir demir tepesi ortaya çıkarması ise, TEM görüntülerini doğrular nitelikte, yapıda daha fazla demir tutulduğu bilgisini doğrulamaktadır.

EPR ya da diğer adıyla ESR numunelerdeki bağ yapmamış elektronların tespitini yapan bir spektroskopik yöntemdir. Bağ yapmamış elektron sayıları hakkında ise EPR grafiklerinin y-ekseni olan ESR yoğunluğu'na bakarak relatif olarak fikir sahibi olmak mümkündür. Grafiğe bakıldığında bu iki farklı tepe oluşumu görülme durumu elektronların spin momentinin iki farklı seviyede görülmesi ile alakalıdır [116]. Paramanyetik olmayan grafiğe baktığımızda 400 seviyesinde başlayan yoğunluğun 500'ler seviyesine kadar çıktığını görüyoruz. 100 birim bir artış söz konusudur. Mıknatıs normal ÇDKNT'lere yaklaştırıldığında KNT'ler herhangi bir tepki vermemektedir. Tip-1'e baktığımızda pozitif tepe noktası 1000 civarındadır ve mıknatıs ile tepki vermektedir. Tip-2 KNT ise pozitif tepe noktasını 1500 civarında görmekteyiz. Bu tepeler bize bağ yapmamış elektron sayısı hakkında fikir verir, diğer bir deyişle manyetik alana ne kadar duyarlı olacağı hakkında relatif bir veri sunar. Mıknatısla yaptığımız gözlemlerde (KNT, tip-1 ve tip-2 KNT'ye mıknatıs yaklaştırılması) gözlemlediğimiz sonuç, tip-2 paramanyetik KNT'lerin tip-1 emsallerinden daha çok mıknatıs ile etkileştiği olmuştur. EPR sonuçları ise bu durumu doğrular niteliktedir.

Saflaştırma amacıyla, daha paramanyetik olan tip-2 KNT'ler EPR sonuçlarının da doğrulaması ile seçilmiştir. Paramanyetik KNT'leri ortamdan ayırmak için kullanacağımız mıknatısın kuvveti sabit olacağından, daha etkin kullanım için daha fazla paramanyetik olanın kullanımı uygun görülmüştür.

MTT canlılık testleri paramanyetik olmayan ÇDKNT, tip-1 ve tip-2 ÇDKNT değerlerine ayrı ayrı 24'lük plakalar üzerinde kontrol edildi. HUVEC hücreleri üzerinde yapılan deneylerde paramanyetik olmayan ÇDKNT'lerin kendi kümesindeki kontrol

gruplarından yaklaşık % 1 gibi bir oranda daha fazla canlılığa sahip olduğu görülmektedir. Bu sonuca bakarak paramanyetik olmayan ÇDKNT'nin toksik etkisinin *in vivo* deneyimizde hiç görülmediği çıkarımı yapılabilir. Tip-1 ÇDKNT ise kendi kontrol grubundan % 40 civarında daha az bir canlılık değerine sahiptir ve hücre için aşırı derecede toksik özelliktedir. Tip-2 ÇDKNT ise yine % 30 daha az canlılık değerine sahip olduğu için, toksik özelliktedir ama bu toksiklik derecesi relatif olarak tip-1'e göre daha az derecededir. Bu sonuçlara bakarak, paramanyetik ÇDKNT'lerin hücre içi çalışmalar için uygun olmadığı sonucuna ulaşabiliriz. İlaç iletimi ve benzeri çalışmalarda ise paramanyetik olmayan ÇDKNT'lerimizin kullanılabilir olduğunu düşünmekteyiz.

Hücre içi çalışmalardan sonra kromatografik amaçlar doğrultusunda kullanacağımız tip-2 ÇDKNT'lerin doğa için tehlike oluşturup oluşturmadığına bakmak için *C. elegans* nematotları üzerinde toksisite deneyleri yapıldı ve çıkan sonuçlara baktığımızda yetişkin bireylerin yaşam sürelerini kısalttığı sonucuna ulaşıldı. Bir diğer ortaya çıkan sonuç ise yetişkin olmayan yavru olan bireylerin hiç büyümeden 1-2 gün içerisinde ölmesiydi. Bu sonuçlar ise tip-2 ÇDKNT'lerin çevreye karışmasının besin zincirinin en alt halkasında bulunan bu canlıyı etkileyeceği için, çevresel sorunlara sebebiyet verebileceğini bizlere göstermektedir.

GC-MS çalışmalarında değerlere baktığımızda konsantrasyonlara göre doğru orantılı bir DEP miktar artışı söz konusudur. Amacımız dietil fitalatı tutup tutmayacağını belirlemenin yanı sıra ne kadar emiş gücü olduğu belirlemektir. Fakat, rakamlara baktığımızda net bir oran vermek mümkün değildir ama DEP ayrıştırma potansiyellerinin yüksek olduğu görülmektedir. 40 mg tip-2 KNT'ler 2DP, 5DP ve 10DP kodlu DEP-metanol karışımlarından sırasıyla 9,882 ppm, 29,237 ppm, 59,014 ppm miktarlarında DEP absorbe etmişlerdir. Bu sayıları ng/ml'ye çevirecek olursak sırasıyla 9882, 29237 ve 59014 ng/ml miktarlarına ulaşırız. Yine sırasıyla DEP-metanol karışımları 2 ml, 5 ml ve 10 ml DEP içermektedirler. Bu sayılarla doğru orantılı bir şekilde, emilen miktarında arttığı görülmektedir. DEP için bilinen molekül ağırlığı ise 222,24 g/mol'dür [117]. Bu bilgilerden yola çıkarak absorbe edilen DEP miktarları sırasıyla 44.46, 131.55 ve 265.54 μ M olarak hesaplanabilir. DEP'ler için hesaplanan KNT tarafından emilen DEP molarite verileri ve ortamdaki DEP miktarları MATLAB programı yardımıyla grafiğe çevirilmiştir (Şekil 4.16). Grafikte deneysel olarak elde

edilen veriler ve (0,0) noktasından geçen fonksiyon ve teorik olarak hesaplanan maksimum derişim 296 μM gösterilmiştir. Bu değer bize 40 mg tip-2 KNT'lerin yaklaşık olarak 296 μM derişimde doyum noktasına ulaşacağını ve en fazla bu civarda DEP emebileceğini göstermektedir. Bu değeride dilusyon faktörü olan 50 ile çarptığımızda 40 mg tip-2 KNT 15 mM derişime kadar DEP emebilir sonucuna ulaşılmaktadır.

Yapılan bir çalışmada çeşitli ürünlerden paramanyetik KNT'ler yardımıyla toplanan DEP miktarlarına bakılmıştır [53]. Bu çalışmada bazı içecek örneklerinde DEP saptanmayabilirken en fazla DEP miktarı yaklaşık 6000 ng/ml ile parfümde absorbe edilmiştir. Paramanyetik olması sayesinde ise ortamdan rahatça toplanabilir ve bir sonraki ayrıştırma işlemi için tekrardan kullanılabilirler. Bu özellikleri sayesinde sürdürülebilir bir saflaştırma malzemesi olarak kullanılabilirler.

Çalışmamızın sonuçlarına baktığımızda başarılı olarak 2 adet paramanyetik kısa uzunlukta ÇDKNT sentezledik. Sentezlenmeden önceki halinin ve sentezden sonraki hallerin canlılık testleri ile hücre içi çalışmalar için toksidite sonuçlarını sunduk. Yine üç ÇDKNT'mizin de FTIR, TEM, ESR ve DSC analizlerini yaparak literatür bilgisine katkıda bulunduk. Kromatografik amaçlar doğrultusunda kullanacağımız KNT'lerin tip-2 olmasını belirledik ve tip-2 KNT'lerin kullanımından sonra çevreye karışmaması gerektiğini yaptığımız *C. elegans* canlılık deneylerinde tespit ettik. Ana amacımız olan paramanyetik KNT'leri saflaştırma amaçlı kullanma fikrini ise başarı ile karserojen etkileri bilinen PAE ailesinin bir üyesi olan DEP'ler üzerinde gerçekleştirdik. Mıknatıs ile etkileşebilen KNT'ler ise ortamdan rahatça toplanarak bir sonraki ayrıştırma için tekrardan kullanılabilmesi sayesinde, sürdürülebilir bir malzeme elde edilmiş oldu. Elde edilen bu sürdürülebilir malzeme pre-klinik ve klinik çalışmalarda DEP bağlayıcı ajan olarak veya kromatografi öncesi yardımcı ajan olarak kullanılabilme potansiyeli mevcuttur. Fitalatların ayrıştırılması insan canlısının içinde bulunduğu her sağlık alanı açısından önem taşımaktadır. Yaptığımız çalışmamız bize KNT'ler ile bu fitalat familyasından olan DEP'lerin ayrıştırılabileceğini göstermiştir.

KAYNAKLAR

1. Rafique, I., Kausar, A., Anwar, Z., & Muhammad, B. (2016). Exploration of epoxy resins, hardening systems, and epoxy/carbon nanotube composite designed for high performance materials: A review. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 55(3), 312-333.
2. Fazelirad, H., Ranjbar, M., Taher, M. A., & Sargazi, G. (2015). Preparation of magnetic multi-walled carbon nanotubes for an efficient adsorption and spectrophotometric determination of amoxicillin. *Journal of industrial and engineering chemistry*, 21, 889-892.
3. Chen, C., Hu, J., Shao, D., Li, J., & Wang, X. (2009). Adsorption behavior of multiwall carbon nanotube/iron oxide magnetic composites for Ni (II) and Sr (II). *Journal of hazardous materials*, 164(2-3), 923-928.
4. Ren, X., Chen, C., Nagatsu, M., & Wang, X. (2011). Carbon nanotubes as adsorbents in environmental pollution management: A review. *Chemical Engineering Journal*, 170(2-3), 395-410.
5. Long, R. Q., & Yang, R. T. (2001). Carbon nanotubes as a superior sorbent for nitrogen oxides. *Industrial & engineering chemistry research*, 40(20), 4288-4291.
6. Di, Z. C., Li, Y. H., Luan, Z. K., & Liang, J. (2004). Adsorption of chromium (VI) ions from water by carbon nanotubes. *Adsorption Science & Technology*, 22(6), 467-474.
7. Masenelli-Varlot, K., McRae, E., & Dupont-Pavlovsky, N. (2002). Comparative adsorption of simple molecules on carbon nanotubes: dependence of the adsorption properties on the nanotube morphology. *Applied surface science*, 196(1-4), 209-215.
8. Li, Y. H., Ding, J., Luan, Z., Di, Z., Zhu, Y., Xu, C., ... & Wei, B. (2003). Competitive adsorption of Pb²⁺, Cu²⁺ and Cd²⁺ ions from aqueous solutions by multiwalled carbon nanotubes. *Carbon*, 41(14), 2787-2792.

9. Hyung, H., & Kim, J. H. (2008). Natural organic matter (NOM) adsorption to multi-walled carbon nanotubes: effect of NOM characteristics and water quality parameters. *Environmental science & technology*, 42(12), 4416-4421.
10. Heudorf, U., Mersch-Sundermann, V., & Angerer, J. (2007). Phthalates: toxicology and exposure. *International journal of hygiene and environmental health*, 210(5), 623-634.
11. Iijima, S. (1991). *Nature (London) Phys. Sci*, 354, 56.
12. Ebbesen, T. W., & Ajayan, P. M. (1992). Large-scale synthesis of carbon nanotubes. *Nature*, 358(6383), 220-222.
13. Tanigaki, K., Hirosawa, I., Ebbesen, T. W., Mizuki, J. I., & Tsai, J. S. (1993). Structure and superconductivity of C₆₀ fullerides. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 54(12), 1645-1653.
14. Iijima, S., & Ichihashi, T. (1993). Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *nature*, 363(6430), 603-605.
15. Bethune, D. S., Kiang, C. H., De Vries, M. S., Gorman, G., Savoy, R., Vazquez, J., & Beyers, R. (1993). Cobalt-catalysed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layer walls. *Nature*, 363(6430), 605-607.
16. Baughman, R. H., Zakhidov, A. A., & De Heer, W. A. (2002). Carbon nanotubes--the route toward applications. *science*, 297(5582), 787-792.
17. Ajayan, P. M. (1999). Nanotubes from carbon. *Chemical reviews*, 99(7), 1787-1800.
18. Liang, F., & Chen, B. (2010). A Review on Biomedical Applications of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Current Medicinal Chemistry*, 17(1), 10–24.
19. Saito, R., Fujita, M., Dresselhaus, G., & Dresselhaus, U. M. (1992). Electronic structure of chiral graphene tubules. *Applied physics letters*, 60(18), 2204-2206.
20. Wei, D., & Liu, Y. (2008). The intramolecular junctions of carbon nanotubes. *Advanced materials*, 20(15), 2815-2841.

21. Hirsch, A., & Vostrowsky, O. (2005). Functionalization of carbon nanotubes. In *Functional molecular nanostructures* (pp. 193-237). Springer, Berlin, Heidelberg.
22. Terrones, M. (2003). Science and technology of the twenty-first century: synthesis, properties, and applications of carbon nanotubes. *Annual review of materials research*, 33(1), 419-501.
23. Feldman, A. K., Steigerwald, M. L., Guo, X., & Nuckolls, C. (2008). Molecular electronic devices based on single-walled carbon nanotube electrodes. *Accounts of chemical research*, 41(12), 1731-1741.
24. Umeyama, T., & Imahori, H. (2008). Carbon nanotube-modified electrodes for solar energy conversion. *Energy & Environmental Science*, 1(1), 120-133.
25. Qu, L., Du, F., & Dai, L. (2008). Preferential syntheses of semiconducting vertically aligned single-walled carbon nanotubes for direct use in FETs. *Nano letters*, 8(9), 2682-2687.
26. Agüí, L., Yáñez-Sedeño, P., & Pingarrón, J. M. (2008). Role of carbon nanotubes in electroanalytical chemistry. *Analytica Chimica Acta*, 622(1-2), 11–47.
27. Xue, Y. (2017). Carbon Nanotubes for Biomedical Applications. *Industrial Applications of Carbon Nanotubes*, 4(2), 323–346.
28. Aoki, N., Yokoyama, A., Nodasaka, Y., Akasaka, T., Uo, M., Sato, Y., Tohji, K., & Watari, F. (2006). Cell Culture on a Carbon Nanotube Scaffold. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 1(4).
29. Zhang, Y., Arugula, M. A., Wales, M., Wild, J., & Simonian, A. L. (2015). A novel layer-by-layer assembled multi-enzyme/CNT biosensor for discriminative detection between organophosphorus and non-organophosphorus pesticides. *Biosensors and Bioelectronics*, 67, 287–295.
30. Morimoto, Y., Kobayashi, N., Shinohara, N., Myojo, T., Tanaka, I., & Nakanishi, J. (2010). Hazard assessments of manufactured nanomaterials. *Journal of occupational health*, 52(6), 325-334.

31. Morimoto, Y., Horie, M., Kobayashi, N., Shinohara, N., & Shimada, M. (2013). Inhalation toxicity assessment of carbon-based nanoparticles. *Accounts of chemical research*, 46(3), 770-781.
32. Kobayashi, N., Izumi, H., & Morimoto, Y. (2017). Review of toxicity studies of carbon nanotubes. *Journal of occupational health*, 17-0089.
33. Punetha, V. D., Rana, S., Yoo, H. J., Chaurasia, A., McLeskey Jr, J. T., Ramasamy, M. S., ... & Cho, J. W. (2017). Functionalization of carbon nanomaterials for advanced polymer nanocomposites: A comparison study between CNT and graphene. *Progress in Polymer Science*, 67, 1-47.
34. Merum Sireesha, Veluru Jagadeesh Babu, A. Sandeep Kranthi Kiran & Seeram Ramakrishna (2018) A review on carbon nanotubes in biosensor devices and their applications in medicine, *Nanocomposites*, 4:2, 36-57.
35. Zhu, Z. (2017). An overview of carbon nanotubes and graphene for biosensing applications. *Nano-micro letters*, 9(3), 1-24.
36. Di Crescenzo, A., Ettore, V., & Fontana, A. (2014). Non-covalent and reversible functionalization of carbon nanotubes. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 5(1), 1675-1690.
37. Mananghaya, M. R., Santos, G. N., & Yu, D. N. (2017). Solubility of amide functionalized single wall carbon nanotubes: a quantum mechanical study. *Journal of Molecular Liquids*, 242, 1208-1214.
38. Girardi, F. A., Bruch, G. E., Peixoto, C. S., Dal Bosco, L., Sahoo, S. K., Gonçalves, C. O., ... & Barros, D. M. (2017). Toxicity of single-wall carbon nanotubes functionalized with polyethylene glycol in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Journal of Applied Toxicology*, 37(2), 214-221.
39. Mittal, V. (Ed.). (2011). *Surface modification of nanotube fillers*. John Wiley & Sons.
40. Antonucci, A., Kupis-Rozmysłowicz, J., & Boghossian, A. A. (2017). Noncovalent protein and peptide functionalization of single-walled carbon nanotubes for biodelivery and optical sensing applications. *ACS applied materials & interfaces*, 9(13), 11321-11331.

41. O'connell, M. J., Bachilo, S. M., Huffman, C. B., Moore, V. C., Strano, M. S., Haroz, E. H., ... & Ma, J. (2002). Band gap fluorescence from individual single-walled carbon nanotubes. *Science*, 297(5581), 593-596.
42. Moore, V. C., Strano, M. S., Haroz, E. H., Hauge, R. H., Smalley, R. E., Schmidt, J., & Talmon, Y. (2003). Individually suspended single-walled carbon nanotubes in various surfactants. *Nano letters*, 3(10), 1379-1382.
43. Setaro, A., Adeli, M., Glaeske, M., Przyrembel, D., Bisswanger, T., Gordeev, G., ... & Arenal, R. (2017). Preserving π -conjugation in covalently functionalized carbon nanotubes for optoelectronic applications. *Nature communications*, 8(1), 1-7.
44. Ostuni, E., Chapman, R. G., Holmlin, R. E., Takayama, S., & Whitesides, G. M. (2001). A survey of structure– property relationships of surfaces that resist the adsorption of protein. *Langmuir*, 17(18), 5605-5620.
45. Song, W., Zheng, Z., Tang, W., & Wang, X. (2007). A facile approach to covalently functionalized carbon nanotubes with biocompatible polymer. *Polymer*, 48(13), 3658-3663.
46. Hariharasubramanian, A., Ravichandran, Y. D., Rajesh, R., Rajkumari, R., Selvan, G. K., & Arumugam, S. (2014). Functionalization of multi-walled carbon nanotubes with 6-aminobenzothiazole and their temperature-dependent magnetic studies. *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures*, 22(10), 874-886.
47. Bose, S., Khare, R. A., & Moldenaers, P. (2010). Assessing the strengths and weaknesses of various types of pre-treatments of carbon nanotubes on the properties of polymer/carbon nanotubes composites: A critical review. *Polymer*, 51(5), 975-993.
48. Fazelirad, H., Ranjbar, M., Taher, M. A., & Sargazi, G. (2015). Preparation of magnetic multi-walled carbon nanotubes for an efficient adsorption and spectrophotometric determination of amoxicillin. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 21, 889–892.

49. Wang, L., Shi, J., Hao, Y., Zhang, P., Zhao, Y., Meng, D., ... Zhang, Z. (2015). Magnetic Multi-Walled Carbon Nanotubes for Tumor Theranostics. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 11(9), 1653–1661.
50. McMurry, J. E. (2014). *Organic chemistry with biological applications*. Nelson Education. (2nd ed.). Belmont, CA: Brooks/Cole. p. 395. ISBN 9780495391470.
51. Ma, J., Jiang, L., Wu, G., Xia, Y., Lu, W., Li, J., & Chen, L. (2016). Determination of six sulfonylurea herbicides in environmental water samples by magnetic solid-phase extraction using multi-walled carbon nanotubes as adsorbents coupled with high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1466, 12–20.
52. Deng, X., Guo, Q., Chen, X., Xue, T., Wang, H., & Yao, P. (2014). Rapid and effective sample clean-up based on magnetic multiwalled carbon nanotubes for the determination of pesticide residues in tea by gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry*, 145, 853–858.
53. Luo, Y.-B., Yu, Q.-W., Yuan, B.-F., & Feng, Y.-Q. (2012). Fast microextraction of phthalate acid esters from beverage, environmental water and perfume samples by magnetic multi-walled carbon nanotubes. *Talanta*, 90, 123–131.
54. Moazzen, M., Khaneghah, A. M., Shariatifar, N., Ahmadloo, M., Eş, I., Baghani, A. N., ... & Rastkari, N. (2019). Multi-walled carbon nanotubes modified with iron oxide and silver nanoparticles (MWCNT-Fe₃O₄/Ag) as a novel adsorbent for determining PAEs in carbonated soft drinks using magnetic SPE-GC/MS method. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(4), 476-488.
55. Ghaedi, M., Sadeghian, B., Pebdani, A. A., Sahraei, R., Daneshfar, A., & Duran, C. E. L. A. L. (2012). Kinetics, thermodynamics and equilibrium evaluation of direct yellow 12 removal by adsorption onto silver nanoparticles loaded activated carbon. *Chemical Engineering Journal*, 187, 133-141.
56. Fayazi, M. (2020). Removal of mercury (II) from wastewater using a new and effective composite: sulfur-coated magnetic carbon nanotubes. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-10..

57. Arroyo-Manzanares, Peñalver-Soler, Campillo, & Viñas. (2020). Dispersive Solid-Phase Extraction using Magnetic Carbon Nanotube Composite for the Determination of Emergent Mycotoxins in Urine Samples. *Toxins*, 12(1), 51.
58. Latini, G. (2005). Monitoring phthalate exposure in humans. *Clinica Chimica Acta*, 361(1–2), 20–29.
59. Hauser, R., Duty, S., Godfrey-Bailey, L., & Calafat, A. M. (2004). Medications as a source of human exposure to phthalates. *Environmental health perspectives*, 112(6), 751-753.
60. Koch, H. M., Preuss, R., & Angerer, J. D. (2006). Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure—an update and latest results 1. *International journal of andrology*, 29(1), 155-165.
61. Gu, S., Zheng, H., Xu, Q., Sun, C., Shi, M., Wang, Z., & Li, F. (2017). Comparative toxicity of the plasticizer dibutyl phthalate to two freshwater algae. *Aquatic Toxicology*, 191, 122-130.
62. Ebenau-Jehle, C., Mergelsberg, M., Fischer, S., Bröls, T., Jehmlich, N., von Bergen, M., & Boll, M. (2017). An unusual strategy for the anoxic biodegradation of phthalate. *The ISME journal*, 11(1), 224-236.
63. Koch, H. M., Rossbach, B., Drexler, H., & Angerer, J. (2003). Internal exposure of the general population to DEHP and other phthalates—determination of secondary and primary phthalate monoester metabolites in urine. *Environmental research*, 93(2), 177-185.
64. Adibi, J. J., Perera, F. P., Jedrychowski, W., Camann, D. E., Barr, D., Jacek, R., & Whyatt, R. M. (2003). Prenatal exposures to phthalates among women in New York City and Krakow, Poland. *Environmental health perspectives*, 111(14), 1719-1722.
65. Silva, M. J., Barr, D. B., Reidy, J. A., Kato, K., Malek, N. A., Hodge, C. C., ... & Brock, J. W. (2003). Glucuronidation patterns of common urinary and serum monoester phthalate metabolites. *Archives of Toxicology*, 77(10), 561-567.
66. Koch, H. M., Drexler, H., & Angerer, J. (2003). An estimation of the daily intake of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and other phthalates in the general population. *International journal of hygiene and environmental health*, 206(2), 77-83.

67. CSTEE, C. (1998). Opinion on Phthalate migration from soft PVC toys and child-care articles—opinion expressed at the 6th CSTEE plenary meeting.
68. Chuang, S. C., Chen, H. C., Sun, C. W., Chen, Y. A., Wang, Y. H., Chiang, C. J., Chen, C. C., Wang, S. L., Chen, C. J., & Hsiung, C. A. (2020). Phthalate exposure and prostate cancer in a population-based nested case-control study. *Environmental research*, 181, 108902.
69. Mughees, M., Chugh, H., & Wajid, S. (2020). Mechanism of phthalate esters in the progression and development of breast cancer. *Drug and Chemical Toxicology*, 1-5.
70. Huang, W. Bin, & Chen, C. Y. (2010). Photocatalytic Degradation of Diethyl Phthalate (DEP) in water using TiO₂. *Water, Air, and Soil Pollution*, 207(1–4), 349–355.
71. Cartwright, C. D., Owen, S. A., Thompson, I. P., & Burns, R. G. (2000). Biodegradation of diethyl phthalate in soil by a novel pathway. *FEMS Microbiology Letters*, 186(1), 27-34.
72. Saito, T., Hong, P., Tanabe, R., Nagai, K., & Kato, K. (2010). Enzymatic hydrolysis of structurally diverse phthalic acid esters by porcine and bovine pancreatic cholesterol esterases. *Chemosphere*, 81(11), 1544-1548.
73. J. Autian (1973). "Toxicity and health threats of phthalate esters: review of the literature". *Environmental Health Perspectives*. 4: 3–25.
74. Antonia M. Calafat and Richard H. McKee (2006). "Integrating Biomonitoring Exposure Data into the Risk Assessment Process: Phthalates [Diethyl Phthalate and Di(2-ethylhexyl) Phthalate] as a Case Study". *Environmental Health Perspectives*. 114 (11): 1783–1789.
75. Paul M. D. Foster et al. (1980). "Study of the testicular effects and changes in zinc excretion produced by some n-alkyl phthalates in the rat". *Toxicology and Applied Pharmacology*. 54 (3): 392–398.
76. P. M. D. Foster et a. (1981). "Studies on the testicular effects and zinc excretion produced by various isomers of monobutyl-o-phthalate in the rat". *Chemico-Biological Interactions*. 34 (2): 233–238.

77. L. Earl Gray Jr. et al. (2000). "Perinatal Exposure to the Phthalates DEHP, BBP, and DINP, but Not DEP, DMP, or DOTP, Alters Sexual Differentiation of the Male Rat". *Toxicological Sciences*. 58 (2): 350–365.
78. L. Earl Gray Jr. et al. (2006). "Adverse effects of environmental antiandrogens and androgens on reproductive development in mammals". *International Journal of Andrology*. 29 (1): 96–104.
79. Kembra L. Howdeshell et al. (2008). "A Mixture of Five Phthalate Esters Inhibits Fetal Testicular Testosterone Production in the Sprague-Dawley Rat in a Cumulative, Dose-Additive Manner". *Toxicological Sciences*. 105 (1): 153–165.
80. Kembra L. Howdeshell et al. (2008). "Mechanisms of action of phthalate esters, individually and in combination, to induce abnormal reproductive development in male laboratory rats". *Environmental Research*. 108 (2): 168–176.
81. Shanna H. Swan (2008). "Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans". *Environmental Research*. 108 (2): 177–184.
82. Ashari, S., Karami, M., Shokrzadeh, M., Ghandadi, M., Ghassemi-Barghi, N., Dashti, A., ... & Mohammadi, H. (2020). The implication of mitochondrial dysfunction and mitochondrial oxidative damage in di (2-ethylhexyl) phthalate induced nephrotoxicity in both in vivo and in vitro models. *Toxicology mechanisms and methods*, 30(6), 427-437.
83. Pu, S. Y., Hamid, N., Ren, Y. W., & Pei, D. S. (2020). Effects of phthalate acid esters on zebrafish larvae: Development and skeletal morphogenesis. *Chemosphere*, 246, 125808.
84. Tekin, K., Arslan, P., Cil, B., Filazi, A., Akçay, E., & Yurdakok-Dikmen, B. (2020). Companion animals get close to the toxic aspects of antropogenic world: cytotoxicity of phthalates and bisphenol A on dog testicular primary cells. *Cytotechnology*, 72, 629-638.
85. Chi, Z., Zhao, J., You, H., & Wang, M. (2016). Study on the mechanism of interaction between phthalate acid esters and bovine hemoglobin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(30), 6035-6041.

86. Zhu, M., Wu, J., Ma, X., Huang, C., Wu, R., Zhu, W., ... & Zhong, C. (2019). Butyl benzyl phthalate promotes prostate cancer cell proliferation through miR-34a downregulation. *Toxicology In Vitro*, 54, 82-88.
87. Hsu, Y. L., Tsai, E. M., Hou, M. F., Wang, T. N., Hung, J. Y., & Kuo, P. L. (2014). Obtusifolin suppresses phthalate esters-induced breast cancer bone metastasis by targeting parathyroid hormone-related protein. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(49), 11933-11940.
88. Chen, H. P., Lee, Y. K., Huang, S. Y., Shi, P. C., Hsu, P. C., & Chang, C. F. (2018). Phthalate exposure promotes chemotherapeutic drug resistance in colon cancer cells. *Oncotarget*, 9(17), 13167.
89. Takeshita, A., Inagaki, K., Igarashi-Migitaka, J., Ozawa, Y., & Koibuchi, N. (2006). The endocrine disrupting chemical, diethylhexyl phthalate, activates MDR1 gene expression in human colon cancer LS174T cells. *Journal of endocrinology*, 190(3), 897-902.
90. Song, P., Gao, J., Li, X., Zhang, C., Zhu, L., Wang, J., & Wang, J. (2019). Phthalate induced oxidative stress and DNA damage in earthworms (*Eisenia fetida*). *Environment international*, 129, 10-17.
91. Waits, A., Chen, H. C., Kuo, P. L., Wang, C. W., Huang, H. B., Chang, W. H., ... & Huang, P. C. (2020). Urinary phthalate metabolites are associated with biomarkers of DNA damage and lipid peroxidation in pregnant women–Tainan Birth Cohort Study (TBCS). *Environmental Research*, 188, 109863.
92. Preciados, M., Yoo, C., & Roy, D. (2016). Estrogenic endocrine disrupting chemicals influencing NRF1 regulated gene networks in the development of complex human brain diseases. *International journal of molecular sciences*, 17(12), 2086.
93. Wong, B. S., Yoong, S. L., Jagusiak, A., Panczyk, T., Ho, H. K., Ang, W. H., & Pastorin, G. (2013). Carbon nanotubes for delivery of small molecule drugs. *Advanced drug delivery reviews*, 65(15), 1964-2015.
94. Sohrabi, N., Alihosseini, A., Pirouzfard, V., & Pedram, M. Z. (2020). Analysis of Dynamics Targeting CNT-Based Drug Delivery through Lung Cancer Cells: Design, Simulation, and Computational Approach. *Membranes*, 10(10), 283.

95. Tîlmaciu, C. M., & Morris, M. C. (2015). Carbon nanotube biosensors. *Frontiers in chemistry*, 3, 59.
96. Ni R, Wang Y, Wei X, Chen J, Meng J, Xu F, Liu Z, Zhou Y. Magnetic carbon nanotube modified with polymeric deep eutectic solvent for the solid phase extraction of bovine serum albumin. *Talanta*. 2020 Jan 1;206:120215.
97. Pineux, F., Federico, S., Klotz, K. N., Kachler, S., Michiels, C., Sturlese, M., Prato, M., Spalluto, G., Moro, S., & Bonifazi, D. (2020). Targeting G Protein-Coupled Receptors with Magnetic Carbon Nanotubes: The Case of the A3 Adenosine Receptor. *ChemMedChem*, 15(20), 1909–1920.
98. Huang, Y., Wu, T., Wang, F., Li, K., Qian, L., Zhang, X., & Liu, G. (2019). Magnetized Carbon Nanotube Based Lateral Flow Immunoassay for Visual Detection of Complement Factor B. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(15), 2759.
99. Eatemadi, A., Daraee, H., Karimkhanloo, H., Kouhi, M., Zarghami, N., Akbarzadeh, A., ... & Joo, S. W. (2014). Carbon nanotubes: properties, synthesis, purification, and medical applications. *Nanoscale research letters*, 9(1), 1-13.
100. B.Eatemadi, A., Daraee, H., Karimkhanloo, H., Kouhi, M., Zarghami, N., Akbarzadeh, A., ... & Joo, S. W. (2014). Carbon nanotubes: properties, synthesis, purification, and medical applications. *Nanoscale research letters*, 9(1), 1-13.
101. Alothman, Z. A., & Wabaidur, S. M. (2019). Application of carbon nanotubes in extraction and chromatographic analysis: A review. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(5), 633-651.
102. Kuboki, Y., Koshikawa, T., Takita, H., Fujisawa, R., Lee, M. H., Abe, S., ... & Sammons, R. (2010). Chromatography of carbon nanotubes separated albumin from other serum proteins: a method for direct analysis of their interactions. *Dental materials journal*, 1006210022-1006210022.
103. Islam, M., Hameed, A., & Saeed, S. (2013). Polyamide 6/multiwalled carbon nanotubes nanocomposites with modified morphology and thermal properties. *Polymers*, 5(4), 1380–1391.

104. Lin, Y., Wu, B., Ning, P., Qu, G., Li, J., Wang, X., & Xie, R. (2017). Stabilization of arsenic in waste slag using FeCl₂ or FeCl₃ stabilizer. *RSC advances*, 7(87), 54956-54963.
105. Gano, Z. S., Mjalli, F. S., Al-Wahaibi, T., Al-Wahaibi, Y., & AlNashef, I. M. (2015). Extractive desulfurization of liquid fuel with FeCl₃-based deep eutectic solvents: experimental design and optimization by central-composite design. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 93, 10-20.
106. Inam, M. A., Khan, R., Park, D. R., Lee, Y. W., & Yeom, I. T. (2018). Removal of Sb (III) and Sb (V) by ferric chloride coagulation: Implications of Fe solubility. *Water*, 10(4), 418.
107. Ramachandran, S., Sathishkumar, M., Kothurkar, N. K., & Senthilkumar, R. (2018, February). Synthesis and characterization of graphene quantum dots/cobalt ferrite nanocomposite. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (p. 012139). IOP Publishing.
108. Xu, Y., Li, D., Liu, M., Niu, F., Liu, J., & Wang, E. (2017). Enhanced-quantum yield sulfur/nitrogen co-doped fluorescent carbon nanodots produced from biomass *Enteromorpha prolifera*: Synthesis, posttreatment, applications and mechanism study. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12.
109. Dinç, B., Ünlü, A., & Bektaş, M. (2020). Characterization of short-length multi-walled carbon nanotubes and cytotoxicity on MDA-MB-231 and HUVEC cell lines. *Carbon Letters*, 30(2), 143-153.
110. Lin, C. P., Lin, J. Z., Shu, C. M., & Tseng, J. M. (2012). Multi-walled carbon nanotube thermal stability characteristics evaluation by DSC tests. *Journal of Loss Prevention in the Process Industries*, 25(2), 302–308.
111. Merkulova, Y. I., Kondrashov, S. V., D'yachkova, T. P., Marakhovskii, P. S., & Yurkov, G. Y. (2015). Effect of carbon nanotubes dispersed in binder on properties of epoxy nanocomposite. *Russian Journal of Applied Chemistry*, 88(11), 1848-1854.
112. Paszkiewicz, S., Szymczyk, A., Pawlikowska, D., Subocz, J., Zenker, M., & Masztak, R. (2018). Electrically and thermally conductive low density

polyethylene-based nanocomposites reinforced by mwcnt or hybrid mwcnt/graphene nanoplatelets with improved thermo-oxidative stability. *Nanomaterials*, 8(4), 264.

113. Baharvand, H. (2008). Encapsulation of ferromagnetic iron oxide particles by polyester resin. *e-Polymers*, 8(1).
114. Karbhari, V. M. (Ed.). (2013). *Non-destructive evaluation (NDE) of polymer matrix composites*. Elsevier..
115. Pungor E (1995). *A Practical Guide to Instrumental Analysis*. Florida: Boca Raton. pp. 181–191.
116. Eaton, G. R., Eaton, S. S., Barr, D. P., & Weber, R. T. (2010). *Quantitative EPR: A practitioners guide*. *Quantitative EPR: A Practitioners Guide*, 1–185.
117. National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 6781, Diethyl phthalate. Retrieved December 17, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diethyl-phthalate>.

HAM VERİLER



FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

PARAMANYETİK KARBON NANOTÜPLERİN KARAKTERİZASYONU, TOKSİSİTESİNİN BELİRLENMESİ VE SAFLAŞTIRMA AMAÇLI KULLANIMI

ORIJINALLIK RAPORU

% 4	% 4	% 1	% 2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
2	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	% 1
3	www.afyonanahaber.com.tr İnternet Kaynağı	<% 1
4	www.scribd.com İnternet Kaynağı	<% 1
5	polen.itu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	Haibin Wang, Qun Lu, Shiya Cheng, Xiaochen Wang, Hong Zhang. " Autophagy activity contributes to programmed cell death in ", Autophagy, 2014 Yayın	<% 1
7	Submitted to Bard High School Early College Öğrenci Ödevi	<% 1