

**KAPLAMA MALZEMELERİNİN TASARLANMIŞ  
ÇİNKO OKSİT PARTİKÜLLERİNİN SİTOTOKSİSİTE  
ÖZELLİKLERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Mahruza YUSİFLİ**

**Eskişehir 2019**

**KAPLAMA MALZEMELERİNİN TASARLANMIŞ ÇİNKO OKSİT  
PARTİKÜLLERİNİN SİTOTOKSİSİTE ÖZELLİKLERİNE ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Mahruza YUSİFLİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İleri Teknolojiler Anabilim Dalı  
Nanoteknoloji Bilim Dalı  
Prof.Dr. Ayşe Tansu KOPARAL**

**Eskişehir  
Anadolu Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Ağustos, 2019**

*Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi BAP Komisyonunca kabul edilen 1710F547 no.lu  
proje kapsamında desteklenmiştir.*

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

**Mahruza YUSİFLİ'nin “Kaplama Malzemelerinin Tasarlanmış Çinko Oksit Partiküllerinin Sitotoksistite Özelliklerine Etkilerinin Araştırılması”** başlıklı İleri **Teknolojiler** Anabilim Dalındaki, YüksekLisans Tezi 26 Ağustos 2019 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Unvanı Adı Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Prof. Dr. A.Tansu KOPARAL

Üye : Prof. Dr. Berrin Ayaz TÜYLÜ

Üye : Doç. Dr. Rana ARSLAN

Prof. Dr. Murat TANIŞLI

Enstitü Müdürü

## ÖZET

### KAPLAMA MALZEMELERİNİN TASARLANMIŞ ÇİNKO OKSİT PARTİKÜLLERİNİN SİTOTOKSİSİTE ÖZELLİKLERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Mahruza YUSİFLİ

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Nanoteknoloji Bilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ağustos 2019

Danışman: Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL

Ortak Danışman: Prof. Dr. Ender SUVACI

Kozmetik uygulamalarda üreticiler tarafından güneş kremi ve kozmetik ürün formülasyonlarında çinko oksit (ZnO), sıklıkla bir bileşen olarak kullanılır. Çinko oksit çeşitli dalga boylarındaki (290-400 nm arası) ışıklarda bütün kimyasal filtrelerden daha iyi koruma sağlamaktadır.

Bu tez çalışmasının amacı, özgün bir toz teknolojisi olan ve daha önce biyoyumluluğu ZnO nanopartikülerine göre çok daha iyi olduğu tespit edilen tasarlanmış şekle sahip mikron boyutlu hegzagonal MicNo-ZnO tozlarının kozmetik ürünlerde kullanımını yaygınlaştırmak amacıyla farklı kaplama malzemeleriyle kaplandığında oluşan sitotoksitite özelliklerinin incelenmesidir. Kaplama malzemeleri trietoksikarililsilan, polidimetilsiloksan, hidrojen polidimetilsiloksan ve silika olarak kullanılmıştır. Elde edilen farklı formlardaki MicNo-ZnO tozlarının biyolojik etkileri insan keratinosit (HaCaT) hücreleri üzerinde incelenmiştir. Sonuç olarak, polidimetilsiloksan diğer kaplamalarla karşılaştırıldığında MTT ve ROS sonuçlarına göre daha az sitotoksititeye sahip olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** HaCaT, nanopartikül, MicNo-ZnO, Güneş kremleri.

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF THE IMPACT OF COATING MATERIALS ON THE CYTOTOXICITY PROPERTIES OF DESIGNED ZNO PARTICLES

Mahruza YUSIFLI

Department of Advanced Technologies

Programme in Nanotechnology

Anadolu University, Graduate School of Sciences, August 2019

Supervisor: Prof. Dr. Ayse Tansu KOPARAL

Co- Supervisor: Prof. Dr. Ender SUVACI

Zinc oxide (ZnO) is often used as a constituent in sunscreen and cosmetic product formulations by manufacturers in cosmetic applications. Zinc oxide provides better protection from all chemical filters in various wavelengths (between 290-400 nm).

The aim of this thesis is to investigate the cytotoxicity properties of micron-sized hexagonal MicNo-ZnO powders, which are a unique powder technology and which have been designed to be much better than ZnO nanoparticles. The coating materials were used as triethoxycarylsilane, polydimethylsiloxane, hydrogen polydimethylsiloxane and silica. The biological effects of MicNo-ZnO powders in different forms were investigated on human keratinocyte (HaCaT) cells. As a result, polydimethylsiloxane was found to have less cytotoxicity compared to MTT and ROS results compared to other coatings.

**Keywords:** HaCaT, MicNo-ZnO, Sunscreens.

## TEŞEKKÜR SAYFASI

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her konuda bilgi ve desteğini almaktan çekinmediğim, beni yönlendiren, bilimsel katkılarını ve engin tecrübelerini benimle paylaşan değerli hocam Prof. Dr. A. Tansu KOPARAL' a saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

İkinci danışmanım olan ve tez çalışmalarımında kullandığım maddeleri veren Sayın Prof. Dr. Ender SUVACI hocama katkıları için minnetdarım.

Kaplama malzemelerini hazırlayan yüksek lisans öğrencisi Ozan Şükrü Ateş'e teşekkür ediyorum.

Yüksek lisans eğitimim boyunca beraber çalıştığım, hocamin değerli öğrencileri Araş.Gör. Burak BERBER ve Mahmoud ARAFAT'a tecrübelerini benimle paylaştıkları ve destekleri için teşekkür ediyorum.

Ayrıca bu çalışmanın her aşamasında yardımları, destekleri ve sevgileriyle hep yanımda olan anneme, babama, kardeşime, arkadaşlarıma ve eşime en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Mahruza YUSİFLİ

Ağustos 2019

## **ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ**

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Mahruza YUSİFLİ

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR SAYFASI.....	vii
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
TABLolar DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Nanoteknoloji .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Nanomateryaller ve Nanopartiküller .....</b>	<b>5</b>
<b>1.3. ZnO Nanopartikülleri.....</b>	<b>9</b>
<b>1.4. Nanokozmetik.....</b>	<b>13</b>
<b>1.5. Güneş Kremleri .....</b>	<b>16</b>
<b>1.6. MicNo-ZnO tozları.....</b>	<b>18</b>
<b>1.7. Kaplama malzemeleri .....</b>	<b>19</b>
<b>1.7.1. Polidimetilsiloksan (PDMS) ve Hidrojen sonlu Polidimetilsiloksan             (HPDMS) .....</b>	<b>19</b>
<b>1.7.2. Silika.....</b>	<b>21</b>
<b>1.7.3. Trietoksikaprililsilan (TECS) .....</b>	<b>23</b>
<b>1.8. Toksikite Belirleme için Kullanılan Test Yöntemleri.....</b>	<b>24</b>
<b>1.8.1. Mitokondriyal aktiviteye dayalı MTT testi .....</b>	<b>25</b>
<b>1.8.2. ROS testi .....</b>	<b>25</b>
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>28</b>
<b>2.1. Çalışmada Kullanılan Hacat Hücreleri.....</b>	<b>28</b>
<b>2.2. Kullanılan MicNo-ZnO Partikülleri.....</b>	<b>28</b>

<b>2.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler .....</b>	<b>29</b>
<b>2.4. Kullanılan Sarf Malzemeler .....</b>	<b>29</b>
<b>2.5. Kullanılan Aletler .....</b>	<b>29</b>
<b>2.6. Kullanılan Araç ve Gerecin Hazırlanması.....</b>	<b>29</b>
<b>2.7. Test Maddelerinin Dozlarının Hazırlanması.....</b>	<b>29</b>
<b>2.8. Yöntem .....</b>	<b>30</b>
<b>2.8.1. HaCaT hücrelerinin kültürü.....</b>	<b>30</b>
<b>2.8.2. Hücrelerin testler için hazırlanması.....</b>	<b>30</b>
<b>2.8.3. MTT ölçümü.....</b>	<b>30</b>
<b>2.8.4. Hücre içi ROS seviyesi ölçümü ile sitotoksosite belirlenmesi .....</b>	<b>31</b>
<b>3. BULGULAR.....</b>	<b>32</b>
<b>3.1. MTT ve ROS Testleri Sonuçları .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1.1. Tasarlanmış MicNo ZnO Partiküllerinin MTT ve ROS testleri</b> <b>sonuçları.....</b>	<b>32</b>
<b>3.1.2. HPDMS kaplı tasarlanmış MicNo ZnO Partiküllerinin MTT ve ROS</b> <b>testleri sonuçları.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1.3. PDMS kaplı tasarlanmış MicNo ZnO Partiküllerinin MTT ve ROS</b> <b>testleri sonuçları.....</b>	<b>36</b>
<b>3.1.4. Silika kaplı tasarlanmış MicNo ZnO Partiküllerinin MTT ve ROS</b> <b>testleri sonuçları.....</b>	<b>38</b>
<b>3.1.5. TECS kaplı tasarlanmış MicNo ZnO Partiküllerinin MTT ve ROS</b> <b>testleri sonuçları.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1.6. Test maddelerinin IC50 sonuçlarının değerlendirilmesi.....</b>	<b>42</b>
<b>3.1.7. Test maddelerinin ROS sonuçlarının değerlendirilmesi.....</b>	<b>43</b>
<b>4. TARTIŞMA .....</b>	<b>44</b>
<b>5. SONUÇ .....</b>	<b>49</b>
<b>KAYNAKÇA .....</b>	<b>50</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	

## TABLULAR DİZİNİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>Tablo 1.1.</b> Fabrikasyon Nanoparcacıkların Son Teknolojik Alanlara Uygulanması.....	9
<b>Tablo 1.2.</b> Nanokozmesötiklerin Ana Sınıfları .....	15
<b>Tablo 1.3.</b> Micron, nano ve MicNo-ZnO partiküllerin karşılaştırılması.....	18
<b>Tablo 2.1.</b> Deneyde Kullanılan Malzemelere Ait Özellikler .....	28

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>Şekil 1.1.</b> Farklı morfolojilere sahip nanomalzemeler .....	7
<b>Şekil 1.2.</b> ZnO kristal yapılarının şematik bir temsili .....	11
<b>Şekil 1.3.</b> Polidimetilsiloksan (PDMS) .....	19
<b>Şekil 1.4.</b> SiO <sub>2</sub> nanoparçacık modeli .....	22
<b>Şekil 1.5.</b> Trietoksikarililsilan yapısal formülü .....	24
<b>Şekil 3.1.</b> MicNo-ZnO'nun, HaCaT hücreleri üzerindeki 24 saatlik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	32
<b>Şekil 3.2.</b> MicNo-ZnO'nun, HaCaT hücreleri üzerindeki 24 saatlik etkisinin hücre içi ROS seviyesi ölçümü ile değerlendirilmesi.....	33
<b>Şekil 3.3.</b> HPDMS ile kaplanmış MicNo-ZnO'nun, farklı konsantrasyonlarının HaCaT hücreleri üzerindeki 24 saatlik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi .....	34
<b>Şekil 3.4.</b> HPDMS ile kaplanmış MicNo-ZnO'nun, farklı konsantrasyonlarının HaCaT hücreleri üzerindeki 24 saatlik etkisinin hücre içi ROS seviyesi ölçümü ile değerlendirilmesi.....	35
<b>Şekil 3.5.</b> PDMS ile kaplanmış MicNo-ZnO'nun, farklı konsantrasyonlarının HaCaT hücreleri üzerindeki 24 saatlik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	36
<b>Şekil 3.6.</b> PDMS ile kaplanmış MicNo-ZnO'nun, farklı konsantrasyonlarının HaCaT hücreleri üzerindeki 24 saatlik etkisinin hücre içi ROS seviyesi ölçümü ile değerlendirilmesi.....	37
<b>Şekil 3.7.</b> Silika ile kaplanmış MicNo-ZnO'nun, farklı konsantrasyonlarının HaCaT hücreleri üzerindeki 24 saatlik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	38
<b>Şekil 3.8.</b> Silika ile kaplanmış MicNo-ZnO'nun, farklı konsantrasyonlarının HaCaT hücreleri üzerindeki 24 saatlik etkisinin hücre içi ROS seviyesi ölçümü ile değerlendirilmesi.....	39
<b>Şekil 3.9.</b> TECS ile kaplanmış MicNo-ZnO'nun, farklı konsantrasyonlarının HaCaT hücreleri üzerindeki 24 saatlik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	40

<b>Şekil 3.10.</b> TECS ile kaplanmış MicNo-ZnO'nun, farklı konsantrasyonlarının HaCaT hücreleri üzerindeki 24 saatlik etkisinin hücre içi ROS seviyesi ölçümü ile değerlendirilmesi.....	41
<b>Şekil 3.11.</b> Test maddelerinin IC50 sonuçlarının değerlendirilmesi.....	42
<b>Şekil 3.12.</b> Test maddelerinin ROS sonuçlarının değerlendirilmesi.....	43

## **SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ**

<b>DMSO</b>	: Dimetil Sülfoksit
<b>DMEM</b>	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>EDTA</b>	: Etilen-diamin tetra asetik asit
<b>FBS</b>	: Fetal Bovine Serum
<b>MTT</b>	: 3-(4,5-dimetiliazol-2-yl)-2,5 difenil tetrazolyum bromid
<b>PBS</b>	: Fosfat Tampon Çözeltisi (Phosphate buffer saline)
<b>NP</b>	: Nanopartikül
<b>SCCS</b>	: Tüketici Güvenliği Bilim Kurulu
<b>CIR</b>	: Kozmetik Madde İncelemesi (Cosmetic Ingredient Review)
<b>FDA</b>	: Gıda ve İlaç İdaresi
<b>UVR</b>	: Ultraviyole Radyasyon

## 1. GİRİŞ

Nanoteknoloji, nanometrenin küçük boyutundan elde edilen yeni özelliklerle malzeme yapılarını ve sistemlerini küçültmek, tasarlamak, oluşturmak, karakterize etmek ve kullanmak için 1–100 nanometre (nm) ölçeğinde çalışabilme yeteneğini gösteren bir kavramdır. En az bir boyuttaki yapısal bileşenler <100 nanometre (nm), nanomalzemelerin temel özelliklerinden biridir. Bu ölçekte, nanomalzemeler, mikro parçacıklarınkinden farklı, elektronik, katalitik ve optik özelliklere sahiptir (Angel ve ark., 2016). Nanoboyutlu metal oksit nanopartiküller fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri nedeniyle günümüzde önem kazanmıştır. Metal oksit nanopartikülleri arasında, çinko oksit (ZnO), ümit verici yarı iletken, elektrik, optik, katalitik, manyetik, antimikrobiyal ve ultraviyole ışık absorbe etme özellikleri, farklı boyutlarda olabilme kabiliyeti, ve düşük üretim maliyeti nedeniyle daha dikkat çekmiştir. ZnO genellikle toksisitesi düşük bir malzemedir, çünkü çinko insan için önemli bir iz elementtir ve gıdalarda yaygın olarak bulunur veya bir besin takviyesi olarak eklenir. Nanoboyuttaki ZnO, ticari uygulamalar için uygun olan kimyasal reaktivite, oksidasyon direnci, korozyon direnci, şeffaflık ve UV filtreleme verimliliğini artırır (Shalini ve ark., 2018).

Metal oksit nanopartiküller, modern nanoteknoloji çağında önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle çinko oksit nanopartikülleri (ZnO NP) boyalar, kauçuk, giyim, elektronik, güneş koruyucuları, kozmetik ürünler ve kişisel bakım ürünleri gibi çeşitli endüstriyel ürünlerde kullanılabilmelerini sağlayan sıradışı özelliklere sahiptir.

ZnO'nun geniş uygulama alanları yarı iletkenler, elektrik, optik, katalitik, manyetik, antimikrobiyal ve ultraviyole (UV) ışık emme özellikleri gibi benzersiz özelliklerine sahiptir. Son yıllarda, nano boyutlu ZnO da üretilmiştir ve ZnO-NP'ler büyük boyutlu ZnO partiküllerine kıyasla daha yüksek kimyasal reaktivitesi, şeffaflığı, foto-katalizi ve daha güçlü yüksek fonksiyonel inorganik materyalleri olduğu bulunmuştur. Bu nedenle, şu anda birçok modern güneş koruyucu formülasyonu, etkili geniş spektrumlu fiziksel güneş kremi aktivitesi sağlamak için ağırlıkça % 25'e kadar değişen ZnO-NP'ler kullanılabilmektedir. Ayrıca son yıllarda, ZnO-NP'lerin cilt bakım ürünlerinde kullanılmasına yönelik global üretiminin sürekli olarak arttığı ve tüketici sayısının da arttığı gözlenmiştir (MahmoodAnsaria, 2016). ZnO NP'ler yüksek üretimi ve geniş uygulanabilirliği (Keller ve

ark., 2013) biyolojik sistemlerle potansiyel etkileşimlerinin dikkatlice değerlendirilmesi için artan bir ihtiyaca dikkat çekmektedir. Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) ZnO'yu GRAS olarak kabul etmiştir. (GRAS: Genel olarak güvenilir zararsız kabul edilen anlamına gelmektedir) (FDA., 2016).

Nanomateriyaller büyük bir teknolojik gelişme oluştursa da, bunların kullanımı bilimsel topluluktan, düzenleyici kurumlardan ve genel halkın güvenliğiyle ilgili soruları gündeme getirmektedir. Küçük boyutlarına ve daha yüksek özgül yüzey alanlarına bağlı olarak NP'lerin artan reaktiviteleriyle ilgili endişe artmaktadır. Nanoparçacık yüzey-hacim oranı arttığında ve canlı hücrelerle doğrudan temas olduğunda toksik etkilerin daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Leite-Silva ve ark., 2013). Birçok çalışma, nanoboyutlu formülasyonların toksisitesini göstermiştir (Pandurangan, 2015). Bazı araştırmacılar, ZnO NP'lerinin en sitotoksik NP'lerden olduğunu bildirmiştir (Hu ve ark., 2009 , Pujalté ve ark., 2015).

Nanomalzemelerin ve nanoteknolojik cihazlarda uygulanacak nanopartiküllerin toksisitesine dair bilimsel anlayış hala sınırlıdır. Akciğer, nanopartiküllerin en olası giriş kapısıdır ve bu nedenle toksikolojik incelemelerde en fazla dikkati çekmiştir.

Bununla birlikte, deri veya sindirim sistemi yoluyla alım da mümkündür (Thomassen ve ark., 2009). Ayrıca, araştırmacıların ZnO-NP'leri tarafından ROS üretimini gösterdikleri çok sayıda çalışma, NP içeren güneş kremlerinin UV ışınlarına maruz kalması durumunda ROS artışına neden olabileceği endisesinide ortaya çıkarmıştır (Pal ve ark., 2016). Hücrelerle NP etkileşimi, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırabilir veya hücre içi ROS seviyesini normal olarak düzenleyen hücrel stres savunma sistemine zarar verebilir. ROS seviyesinin yükselmesi, DNA iplikçiklerinin kopmasına, oksidatif DNA eklentilerine, DNA çapraz bağlarına ve DNA-protein çapraz bağlarına neden olur (Kononenko ve ark., 2017).

ZnO nanomalzemelerin (NM) fizikokimyasal özelliklerinin (örneğin çözünme ve oluşum hızı, morfoloji, kimyasal bileşim, yüzey reaktivitesi, partikül sayısı) toksisiteleri için kritik olduğu bildirilmektedir. ZnO NM'lerinin aracılık ettiği toksisite, serbest reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumunu ve ardından pro-enflamatuvar etkileri teşvik eden hücrel hasarı indükleyen serbest iyonik çinko salınımından kaynaklanabilir. Genel olarak nanomalzemeler için biyolojik aktivite, partikül büyüklüğü azaldıkça artar. Bununla birlikte, kimyasal bileşimin yanı sıra, şekil gibi diğer parçacık özellikleri de yüzey etkilerini ve biyolojik

reaktiviteyi azaltma ya da arttırma olasılığı ile spesifik fiziko-kimyasal ve taşıma özelliklerini etkileyebilir.

Bilim adamları, insan maruziyeti ve farklı nanomalzemelerin sağlık etkilerine ilişkin sınırlı epidemiyolojik veriler bulunduğundan, nanomalzemelerin değişken özelliklere sahip karşılaştırmalı toksik etkileri hakkında araştırmalar yapılması gerektiğini düşünmektedirler (Shalini et al., 2018).

### **1.1. Nanoteknoloji**

Teknoloji son yıllarda hızla gelişmektedir ve insanların faaliyetleri ile bu gelişim devam etmektedir. Teknolojinin tarihi aynı zamanda insanlığın tarihidir. Nanoteknoloji insanlığın hayatta kalması ve hayatı daha iyi yapması için uzunca bir tarih içeren çabaya eklenen son eklentidir ve atomların boyutlarına inen çok küçük nesnelere ilgili araçların anlaşılmasına dayanmaktadır (Wolf ve Medikonda, 2012). Günümüzde nanoteknoloji, birçok alanda performansın iyileştirilmesi açısından önemli faydaları nedeniyle, çok sayıda farklı bilim dalında kullanılmaktadır. Nano boyutlu, nanotel, nanotüp, nano kemer, nanoşerit, nanolif, nanopartiküller, kuantum noktaları ve içi boş küreler gibi nanoteknoloji stratejilerini geliştirmek için çeşitli nano boyutlu yapılar geliştirilmiştir. Nanotüp, sağlık sisteminde nanoteknolojinin özel uygulaması olarak, ilacın çözülmemiş komplikasyonları için yeni çözümler sağlamak için ortaya çıkmıştır. Bu bağlamda, nano bazlı materyaller, çeşitli hastalıkların teşhis ve tedavisi, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp stratejileri dahil olmak üzere farklı tıbbi ortamlarda kullanılmaktadır (Etheridge ve ark., 2013).

Bitkilerin, hayvanların ve insanların alanı olan biyoloji, nanoölçekli öğeleri içeren herhangi birşeyden farklı görülebilir. Fakat diğer taraftan, biyoloji hücreleri ve bakterileri de içerir. Ayrıca biyolojideki genetik ve DNA gibi konular da nanoölçek fenomeni ile ilişkilidir. Nanoteknoloji genetik, biyoteknoloji ve robotikden farklı olarak araştırmanın doğal disiplinlerarası alanıdır ve nanofiziğe, kimyaya, madde bilimine, mekaniğe ve biyolojiye dayalı mühendislik içerir (Wolf ve Medikonda, 2012). Nanoteknoloji, materyaller ve biyolojik varlıklar arasındaki etkileşimlerin, mikro-ölçeklerden moleküler seviyeye kadar, eşi görülmemiş bir kontrolünü mümkün kılmıştır (Genchi ve ark., 2017).

Nanoteknolojilerin uygulanmasında ilk adım, Binnig ve Rohrer tarafından 1983 yılında icat edilen taramalı tünelleme mikroskobu (STM) (Binnig ve Rohrer, 1983) ve Binnig ve arkadaşları tarafından icat edilen atomik kuvvet mikroskobu (AFM), nanoboyutlu nesnelerin görüntülenmesi ve manipülasyonunda devrim yaratmıştır. Gerçekten de, bu icatlar “nanodünya” için farklı alanlardaki bilim adamlarının kapısını açmış ve böylece atomik çözünürlükle ve atomları hareket ettirmekle birlikte görüntü yüzeylerini incelemek için araçlar ortaya çıkmıştır. Zamanla, nanoteknolojiler enerji, elektronik, gıda ve tarım, kozmetik ve sağlık gibi farklı alanlarda çeşitli uygulamalarda kullanılmıştır. Dünyadaki insanlar her gün nanoteknoloji tabanlı cihazlar ve sistemler kullanıyor olsalar da bunları kullanmanın önündeki engeller olarak etik ve güvenlik konuları bulunmaktadır (SaeidKargozara, 2018).

Ulusal Bilim Vakfı ve Ulusal Nanoteknoloji Girişimi (NNI) tarafından tanımlandığı gibi, nanomalzemelerin boyut aralığı 1-100 nm arasındadır ve bu da optik, manyetik, elektronik ve yapısal üretimin benzersiz özelliklerine sahip olmasına neden olmaktadır. Bu ölçekte, malzemelerin fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri, ayrı ayrı atomlar, moleküller ve dökme materyallerden temel olarak farklıdır. Bir örnek olarak, nanopartiküllerin birim hacmi başına daha yüksek yüzey alanına sahip olması, kimyasal reaksiyonların ve katalizin hızını arttırmakta ve böylece birçok işlemin verimliliğinin arttığı daha yüksek yüzey etkinliği ortaya çıkmaktadır (Mozafari ve ark., 2011).

Bu bilim alanı tüm dünyada önem kazanmıştır. Günümüzde daha önce ulusal nanoteknoloji programlarını başlatan 60'tan fazla ülke vardır. Bilgiyi zenginliğe dönüştürmek için dünyanın dört bir yanındaki tüm hükümetlerin nanoteknoloji alanında temel programları vardır. Örneğin, ABD, 2000 yılında Ulusal Nanoteknoloji Girişimi'ni (NNI) başlatmıştır. Daha önce de bildirildiği üzere, ABD Kongresi tarafından ödenen bütçe, yaklaşık 1620 milyar dolar olan N-D-1616'dan elde edilen nanoteknoloji için 21.8 milyar dolar olmuştur. Ayrıca, birçok ülkede tüm eğitim düzeyleri için nanoteknoloji ile ilgili eğitim programlarının geliştirilmesine ilgi artmaktadır. Şu anda, ABD ve Çin nanoteknoloji temelli stratejileri geliştirmek için verimli bir nanoteknoloji topluluğu olan nanoteknoloji araştırma ve geliştirme alanında iki lider ülke olarak tanımlanmaktadır. Tahminlere göre, nanoteknolojiler 2020 yılına kadar küresel ekonomide en az 3 trilyon dolarlık etki yapacak ve dünya çapındaki nanoteknoloji endüstrileri on yıl sonunda onları destekleyecek en az 6 milyon işçiye ihtiyaç duyabilecektir (Gao ve ark., 2016)

## 1.2. Nanomateryaller ve Nanopartiküller

Nanoyapılı malzemeler, ilk olarak nanoteknoloji alanının ortaya çıkmasıyla birlikte ortaya çıkmamıştır. Mevcut birçok materyal, mikro ve nanometre ölçeklerinde yapılandırılmıştır ve yıllardır örneğin polimer ve çelik üretimi için kullanılan birçok endüstriyel proses, nano ölçekli fenomenlerden yararlanmaktadır. En gelişmiş nanoteknolojik üretim süreci, bilgisayar çiplerinde mikro ve nanosifik özellikler oluşturmak için ince film kaplamaların ve litografinin kullanıldığı mikroelektronik üretimdir. Doğal dünya, süt nano ölçekli kolloid, proteinler, hücreler, bakteri, virüsler, vs. gibi nano ölçekli yapılara sahip sistem örnekleri ile doludur. Ayrıca, çıplak gözle pürüzsüz görünen birçok malzemenin nanometre ölçeğinde karmaşık bir yapısı vardır. Böylece, birçok yönden, nanomalzemeler yeni değildir (Buzea, 2007).

Nanomalzemesler, nanobilim ve nanoteknolojinin temel taşlarıdır. Nanoyapı bilimi ve teknolojisi, son birkaç yılda dünya çapında hızla büyümekte olan geniş ve disiplinlerarası bir araştırma ve geliştirme faaliyet alanıdır. Malzemelerin ve ürünlerin yaratılma yöntemlerinde ve erişilebilecek işlevselliklerin kapsamında ve doğasında devrim yapma potansiyeline ve gelecekte de artacak olan önemli bir ticari etkiye sahiptir (Hedef, 2018). Geniş bir tanım olmasına rağmen, nanomalzemeler, en az bir boyutu 100nm'den daha az olan bir dizi kimyasal madde olarak tanımlanmaktadır. Nano ölçekte bir boyuta sahip olan (diğer iki boyutta uzatılmış olan) ince filmler veya yüzey kaplamaları gibi tabakalardır. Bilgisayar çiplerindeki özelliklerden bazıları bu kategoridedir. İki boyutlu nano ölçekli materyaller (ve bir boyutta genişletilmiş) nanotel ve nanotüpleri içerir. Üç boyutlu nano ölçekli olan malzemeler parçacıklar, örneğin çökelti, kolloidler ve kuantum noktalarıdır (küçük yarı iletken malzemelerin küçük parçacıkları). Nanometre boyutundaki tahıllardan oluşan nanokristal malzemeler de bu kategoriye girer (The Royal Society & The Royal Academy of Engineering, 2004).

Nanomalzemeslerin çeşitleri ve sınıflandırılması dört maddeye dayalı kategoride düzenlenebilir:

1. Karbon bazlı nanomalzemeler: Genel olarak, bu nanomalzemeler karbon içerir ve içi boş tüpler, elipsoidler veya küreler gibi morfolojilerde bulunur. Fullerenler (C60), karbon

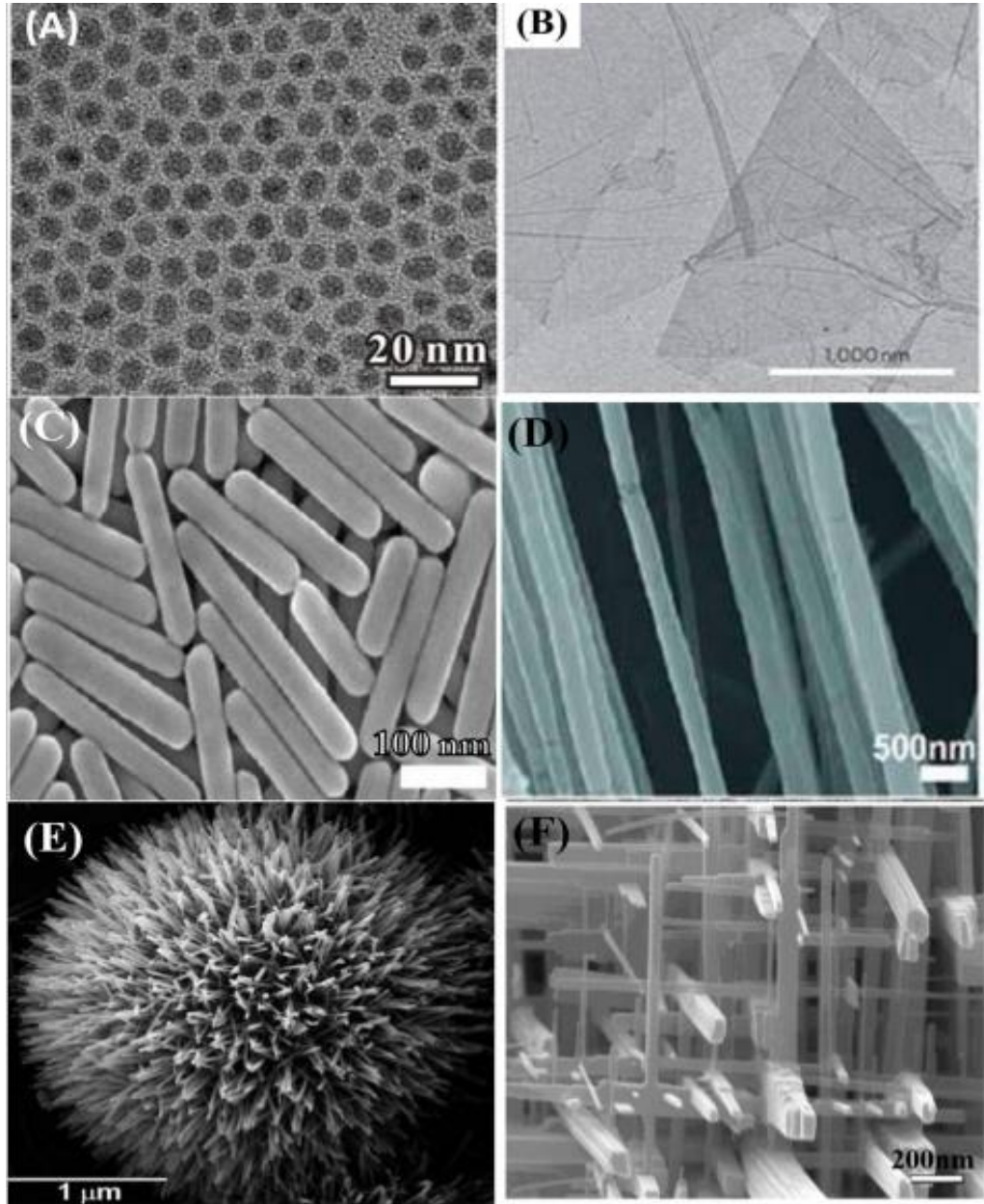
nanotüpler (CNT'ler), karbon nano lifleri, karbon karası, grafen (Gr) ve karbon soğanları karbon bazlı nanomalzemeler kategorisine dahil edilir.

2. İnorganik bazlı nanomalzemeler: Bu nanomalzemeler metal ve metal oksit NP'lerini içerir. Bu nanomalzemeler Au veya Ag NP'ler gibi metaller, TiO<sub>2</sub> ve ZnO NP'ler gibi metal oksitler ve silikon ve seramik gibi yarı iletkenler halinde sentezlenebilir.

3. Organik bazlı nanomalzemeler: Bunlar, karbon bazlı veya inorganik bazlı hariç, çoğunlukla organik maddeden yapılan nanomalzemeleri içerir.

4. Kompozit bazlı nanomalzemeler: Kompozitler, herhangi bir metal, seramik veya polimer dökme malzeme formuyla herhangi bir karbon bazlı, metal bazlı veya organik bazlı nanomalzeme kombinasyonu olabilir (Jeevanandam ve ark., 2018).

İstenen uygulama için gereken özelliklere bağlı olarak nanomalzemeler, Şekil 1.1'de belirtildiği gibi farklı morfolojilerde sentezlenir.



**Şekil 1.1.** Farklı morfolojilere sahip nanomalzemeler. (a) Gözenekli olmayan (palladium) PD nanopartikülleri (0D), (b) Grafen nanosheets (2D), (c) Ag nanorobotları (1D), (d) Polietilen oksit nanofiberleri (1D), (e) Kestane benzeri ZnO nanotelleri(3D), (f) Wo3 nanotel ağı (3D) (Jeevanandam ve ark., 2018).

Nanopartiküller genellikle nanobiyomalzemelerde çekirdeği oluşturur. Bununla birlikte, biyolojik bir hedefle etkileşime geçmek için, nanoparçacıklara bir arayüz olarak etki eden biyolojik veya moleküler bir kaplama veya katmanın bağlanması gerekir. Nanoparçacıkları biyo-uyumlu hale getiren kaplamalar arasında antikorlar, biyopolimerler

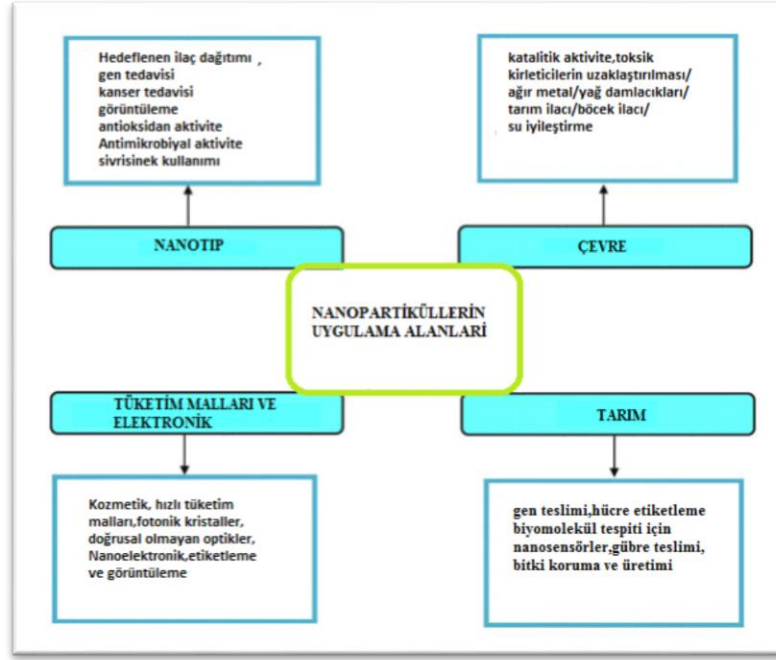
veya küçük moleküllerin mono tabakaları bulunur. Nanopartiküller, hücre terapisi, gen terapisi, aşular, RNA etkileşimi ve antisens terapötikleri içeren biyolojik terapilerin verilmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Jain, 2011).

Nanopartiküller, 10-1000nm aralığındaki katı dağılım partikülleridir. Parçacık hareketliliği, difüzyon, termal stabilite, depolama kapasitesi, daha büyük yüzey alanı artışına neden olurlar ve ayrıca ekli enzimlerin katalitik aktivitesini, toksisite, biyoyararlanım ve çeşitli ilaçların çözünürlüğünü modüle ederler. Biyosensörler, güneş pilleri, fotodetektörler, seramikler ve nanogeneratörler yapımında çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Nanotüpler, nanorotlar, nanoreller, nanoteller vb.gibi farklı topografyalara ve şekillere sahip olabilirler (Arsalan ve Younus, 2018).

Nanopartiküllerin fizyo-kimyasal özellikleri biyolojik sistemler üzerindeki etkilerinde önemli bir rol oynamaktadır. Nanopartiküllerin temel parametreleri şekilleridir (uygun olduğunda en boy oranları dahil), büyüklükleri ve maddenin morfolojik alt yapılarıdır. Kimyasal bileşim ve kimyasalın içsel toksikolojik özellikleri parçacıkların toksisitesi için de önemlidir. Partikülün zeta potansiyelinin, farklı biyomoleküllerle etkileşimlerinde önemli bir rol oynadığı ve maruz kalma ortamındaki zeta potansiyelindeki değişimin, toksik tepkime ile iyi korele olduğu gösterilmiştir (Mukherjee ve ark.,2012).

Akciğerler nanopartiküllerin insan vücudundaki en önemli giriş ve hedef organıdır. Nanopartiküllerin solunum yolu maruziyetleri sonucu amfizem, akciğer kanseri gibi hastalıklar ve aynı zamanda parkinson ve alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların oluşma riskinde artış olabileceği ile ilgili bazı düşünceler bulunmaktadır (Abudayyak, 2015).

**Tablo 1.1** Fabrikasyon nanoparçacıkların son teknolojik alanlara uygulanması (Siddiqi ve Husen, 2016).



### 1.3. ZnO Nanopartikülleri

En ilgi çekici ve gelecek vaat eden metalik nanomalzemelerden biri çinko (Zn) ve oksididir (ZnO). Çinko oldukça aktif bir elementtir ve aynı anda güçlü bir indirgeyici ajandır; İndirgenme potansiyeline göre, kolayca çinko oksit nanopartiküllerinin hazırlanmasında çok yardımcı olan çinko oksit oluşturarak oksitlenebilir. Çinko, insan organizmalarında en önemli mikro elementlerden biri olarak önemli bir rol oynar. Tüm vücut dokularında, yani kas ve kemikte (tüm vücut çinko içeriğinin% 85'i), deride (% 11) ve diğer tüm dokularda bulunur; temel olarak çekirdeğe, sitoplazmaya ve hücre zarına yerleştirilmiş hücre içidir. Çinkonun, hem katalitik (enzimlerin aktif bir merkezi olarak) hem de yapısal rollerinin olduğu çok sayıda makromolekül ve enzimin düzgün çalışması için çok önemli olduğu gösterilmiştir. Çinko parmak motifleri, protein alt alan adlarının DNA veya diğer proteinlerle etkileşime girmesini mümkün kılan benzersiz bir iskele sağlar. Her ne kadar çinko redoks aktivitesinden yoksun olsa da ve nispeten toksik olmadığı kabul edilmekle birlikte, serbest çinko iyonlarının nöronların bozulmasına neden olabileceğine dair artan miktarda kanıt vardır. Bu nedenle sitotoksik etkisini ortadan kaldırmak için çinko katyonlarının biyoaktif

ligandlarla (örneğin proteinler) bağlanması ve çinko oksit nanopartiküllerinin bu şekilde sentezi tercih edilmektedir (Shalini ve ark., 2018).

Çinko oksit (ZnO) sensörler, katalizörler, güneş pilleri, saydam elektrotlar, piezoelektrik nanogenerasyon ve optoelektronik cihazlar gibi geniş uygulamalara sahip önemli bir fonksiyonel malzemedir (Klingshirn, 1975; Meng ve ark., 2015; Ma ve ark., 2016). Ümit verici bir yarı iletken oksit olarak ZnO, büyük bir eksiton bağlanma enerjisi (60 meV), spesifik bir optik performans (örneğin, oda sıcaklığında = 3,37 eV), iyi biyouyumluluk, yüksek elektron hareketliliği ve düşük maliyet avantajlarına sahiptir. Bütün bunlar ZnO nun son yirmi yılda ilgi konusu olmasına izin vermiştir (Holmes ve ark., 2016; Zhang ve ark., 2018).

ZnO NP'leri, çoğunlukla kristallik, boyut, morfoloji ve kompozisyon ile tanımlanan içsel özelliklere sahiptir. Zaten bilinen özelliklerin dışında çinko oksit, yüksek kimyasal kararlılık, yüksek elektrokimyasal eşleşme katsayısı ve yüksek fotostabilite gibi özelliklere de sahiptir (Ficai ve Grumezescu, 2017). Ek olarak, kütle veya nano yapıları çinko oksit partiküllerinin fotoluminesan özelliği de yoğun şekilde araştırılmıştır. Özellikle farklı morfolojilere sahip çinko oksit malzemeleri çeşitli optik özellikler göstermiştir (Huang ve ark., 2010). Aynı zamanda ZnO bazlı nanokompozitler görünür ışık ile uyarılır ve hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite gösterirler (Ficai ve Grumezescu, 2017).

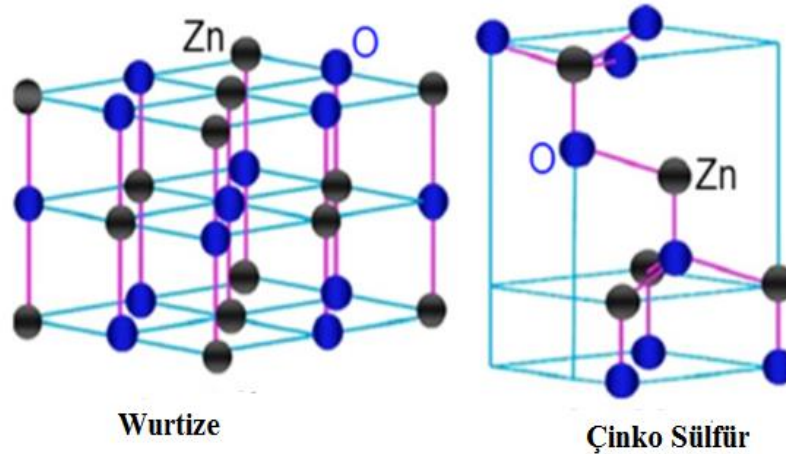
ZnO NP'leri, en fazla üretilen üçüncü metal oksit nanopartikülleridir. ZnO nanopartiküller,  $Zn^{2+}$  iyonunu serbest bırakmak için asidik sulu çözelti ( $pH < 6$ ) içinde çözülebilmektedir.  $Zn^{2+}$  iyonunun girişi, hücrede çinko homeostazını etkileyebilir. İnce küçük boyutu, bu nanopartiküllerin hücre olarak alınmasını kolaylaştırır. Hücrede ZnO nanopartiküllerin daha fazla çözünmesi, hücre içi  $Zn^{2+}$ 'ı, örneğin mitokondride  $Zn^{2+}$  iyon salınması, oksidatif stres, iltihaplanma, apoptoz ve diğer istenmeyen olaylar yoluyla toksik hale geldiği suprafizyolojik seviyelere yükseltir (Chia ve Leong, 2016).

ZnO NP'lerin iyi bildirilmiş toksik yapısı nedeniyle, NP'lerin toksik etkilerini hafifletmek için çeşitli stratejiler denenmiştir. NP'lerde yapılan yüzey modifikasyonu, istenen özellikleri geliştirmek ve eksiklikleri ortadan kaldırmak için NP'lerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini uyarlamak için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. ZnO NP'lerin yüzey modifikasyonu üzerine yapılan çalışmanın çoğu, ZnO NP'lerin iç özelliklerini,

toksisitesini azaltmak yerine, değiştirmek için yapılmıştır. ZnO NP'lerin doping ve kapatma yoluyla toksisitesini azaltmaya yönelik sadece birkaç girişimde bulunulmuştur. Yiyecekler veya gıdayla ilgili ürünlerde bulunan antimikrobiyal ajanlar gibi biyolojik uygulamalar için, ZnO NP'lerin bu yüzey modifikasyonu ZnO NP'nin toksisitesini etkili bir şekilde azaltabilmelidir (Chia ve Leong, 2016).

Tüketiciler ve endüstri çalışanları için bu nanomalzemelere maruz kalmak ciddi sağlık sorunlarına neden olur, bu nedenle toksik yan etkilerini araştırmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. ZnO NP'lerin maruz kalmasının toksik / zararlı etkilerini anlamak, özellikle biyomedikal ve kişisel bakım uygulamalarında kullanıldığında, güvenliklerini sağlamada kritik öneme sahiptir. Daha önce, ZnO NP'lerin toksisitesini analiz etmek için siyanobakteriler, bakteriler, algler, kabuklular, balıklar, nematodlar, bitkiler, hayvan ve memeli hücreleri üzerinde birçok çalışma yapılmıştır. Bu alışmalar ZnO NP'lerin mekanik hasara neden olduğunu ve hücrelerin içinde biriktiğini göstermiştir. ZnO NP'lerin neden olduğu toksisitenin olası mekanizmaları olarak oksidatif stres, sitotoksisite, genotoksisite, genomik dengesizlik ve iltihaplanma sayılmaktadır (Babele ve ark., 2018).

ZnO birden fazla kararlı kristal yapıya sahiptir (şekil 1.2). Hem altıgen wurtize hem de kübik çinko blende yapısında bulunabilir (Modi, 2015)



**şekil 1.2** ZnO kristal yapılarının şematik bir temsili: Wurtize ve inko Sülfür. Zn ve O atomları sırasıyla kül ve mavi dairelerle işaretlenmiştir (Razak ve ark., 2017).

ZnO NP'lerin önemi boyalar, elektronik, kauçuk endüstrisi, inşaat, tekstil ürünleri, ilaç ürünleri, ilaç dağıtımı, gıda ambalajı ve tıbbi bakım gibi geniş uygulama alanlarından gelmektedir. Ayrıca lösemi ve karsinom tedavisinde olası kullanımlarını bildiren çalışmalar da vardır. Biyomedikal alanda, nanoyapılandırılmış ZnO partiküllerinin, sadece kanser tedavisi ve görüntüleme yönetiminde değil, aynı zamanda çeşitli antimikrobiyal ürünlerin geliştirilmesinde de etkin bir şekilde kullanıldığı kanıtlanmıştır (Ficai ve Grumezescu, 2017).

Spesifik olarak, ZnO NP'ler, kozmetik ve güneş koruyucuları gibi ticari ürünlerde yüksek oranda üretilmekte ve yaygın olarak kullanılmaktadır (Eixenberger ve ark., 2017). Çinko oksit (ZnO), güneş kremelerinde kullanılan en önemli inorganik UV filtrelerden biridir (Hackenberg ve Kleinsasser, 2012). ZnO NP'leri, güneşten koruyucular gibi kişisel bakım ürünlerinde 400 nm'nin altındaki bölgedeki mükemmel UV zayıflatma özellikleri nedeniyle en çok kullanılan mühendislik nanomalzemelerinden biridir. (Luo ve ark., 2014). Çinko oksit nanoparçacıkları, kozmetikler ve güneşten koruyucular da dahil olmak üzere kişisel bakım ürünlerinin ortak bir bileşenidir, çünkü bunlar ultraviyole radyasyonu etkili bir şekilde absorbe eder ve ayrıca görünür ışığa karşı çok şeffaftırlar.

Bununla birlikte, 100 nm veya daha büyük boyuta sahip ZnO partikülleri, bu yararlı özelliklerin kombinasyonuna sahip değildir. Son çalışmalar, ZnO nanopartiküllerinin, epidermal hücreler, endotel hücreleri, bakteriler (*Streptococcus agalactiae* ve *Staphylococcus aureus*), (zebra balığı (*Danio rerio*) ve fareler) dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik sistemlere toksik olabileceğini göstermiştir. Bu toksisiteyi azaltmak için, yüzey kaplamaları, dopantlar veya değiştirilmiş görünüş oranları veya spesifik yüzey alanları gibi bozulmamış ZnO NP'larına birçok tip fizikokimyasal modifikasyon uygulanmış ve önerilmiştir. Çok sayıda muhtemel modifikasyon katyonunun toksikolojik karakterizasyonu zaman, maliyet ve deneysel imkanlar açısından son derece zorlu olacaktır. Bu nedenle, nanopartiküllerin toksik davranışını tahmin etmek için hızlı hesaplama modelleri geliştirmek önemlidir. Hangi fizikokimyasal modifikasyonların toksisite üzerinde en fazla etkiye sahip olduğunu belirlemek için bu modellerin kullanılması faydalı olacaktır, böylece tasarım ve optimizasyonun azaltılmış toksisite ile nanopartiküllere doğru yönlendirilmesi yararlı olacaktır (Le ve ark., 2016).

ZnO NP'ler tüketici ürünlerinde yaygın şekilde yayılmaktadır. ZnO nanopartiküllerinin toksikolojik özellikleri ile ilgili veriler halen tartışmalıdır. İnsan cildi ZnO NP'lerine maruz kalan en önemli organdır. Sağlam derinin nanopartiküllere karşı yeterli bir engel olduğu gösterilmiştir. Bunun aksine, kusurlu cilt, nanopartikül temasının çoğalan hücrelere temas etmesine izin verebilir. Bu durumda kök hücreler nanopartiküller için en önemli toksikolojik hedefdir (Ickrath ve ark., 2017).

Uygun hücre sel cevap uç noktalarının seçimi, *in vivo* olarak olumsuz sonuçların öngörüsü olan özelliğe bağlı hücre sel hasarın nicel olarak değerlendirilmesi için çok önemlidir. ZnO nanoparçacıklarının hücrelere verebileceği hasar türleri iki genel sınıfa, endolitik işlemlerle alınan partiküllerin neden olduğu hücre içi toksisite ve nanopartiküllerin çözünmesi sonucu yaranan ortamdaki çinko iyonlarından kaynaklanan hücre zedelenmesinin neden olduğu dış toksisiteye bölünür. Nanopartiküller hücreye girdiğinde lizozomdaki asidik koşullar, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesiyle normal hücre sel fonksiyonları etkileyen metal veya metal oksit nanopartiküllerinden iyon salımını tetikleyebilir. ROS oluşumundan başka, lizozomlardaki ZnO NP'lerinin hızlı çözünmesi, yüksek hücre içi Zn<sup>2+</sup> konsantrasyonuna yol açarak çinko bağımlı enzimleri ve transkripsiyon faktörlerini etkileyebilen ve ayrıca hücre ölümüne neden olabilen yüksek hücre içi Zn<sup>2+</sup> konsantrasyonlarına yol açar. Antioksidan tepki elemanı (ARE) muhabiri, hücrelerdeki oksidatif stres tepkisini ölçmek için en güvenilir ve hassas *in vitro* yöntemlerden biridir. Nükleer faktör-E2 ile ilişkili faktör (NRF2) ile mRNA transkripsiyon düzenleme mekanizmasına dayanmaktadır. ROS kaynaklı raportör sinyalinin tespiti için lusiferaz tahlilleri geniş dinamik aralık ile hızlı ve oldukça hassastır. Membran hasarı, ZnO nanopartiküllerinin doğrudan temasından veya çinko iyonlarından kaynaklanabilecek başka bir olumsuz sonuçtur. Bu, hücre içi işlemlerin başlattığı programlanmış hücre ölümünün (apoptoz) aksine, hücre nekrozuna yol açar (Le ve ark., 2016).

#### **1.4. Nanokozmetik**

Günümüzde, milyonlarca insan günlük kozmetik ve kişisel bakım ürünleri kullanımından yararlanmaktadır. Bu nedenle kozmetik, Avrupa'da özellikle de Almanya,

Fransa, İngiltere, İtalya ve İspanya'da perakende satış fiyatını 2014'te 72,5 milyar Avro gösteren global bir sektörü temsil etmektedir (De la Calle ve ark., 2017).

Nanomalzemeler, yüzlerce yıl önce kozmetiklerin geliştirilmesinde kullanılmıştır. Altın ve gümüş nanopartiküller, kadınlar tarafından tırnak renkleri olarak kullanılmıştır. Ayrıca, altın nanopartikülleri içeren sıvı formülasyonlar Orta Çağlarda yaşlanma önleyici olarak kullanılmıştır. Ancak, son yıllarda, nano ölçekli materyaller kozmetiklerin geliştirilmesinde daha yaygın olarak kullanılmaktadır (Shokri, 2017). Nanomalzemelerin potansiyel cilt emilimi, bu malzemelerin kozmetik ürünlerdeki güvenliğini ve kullanılabilirliğini anlamalarına yardımcı olmak için ele alınması gereken bir konudur (Katz ve ark.,2015).

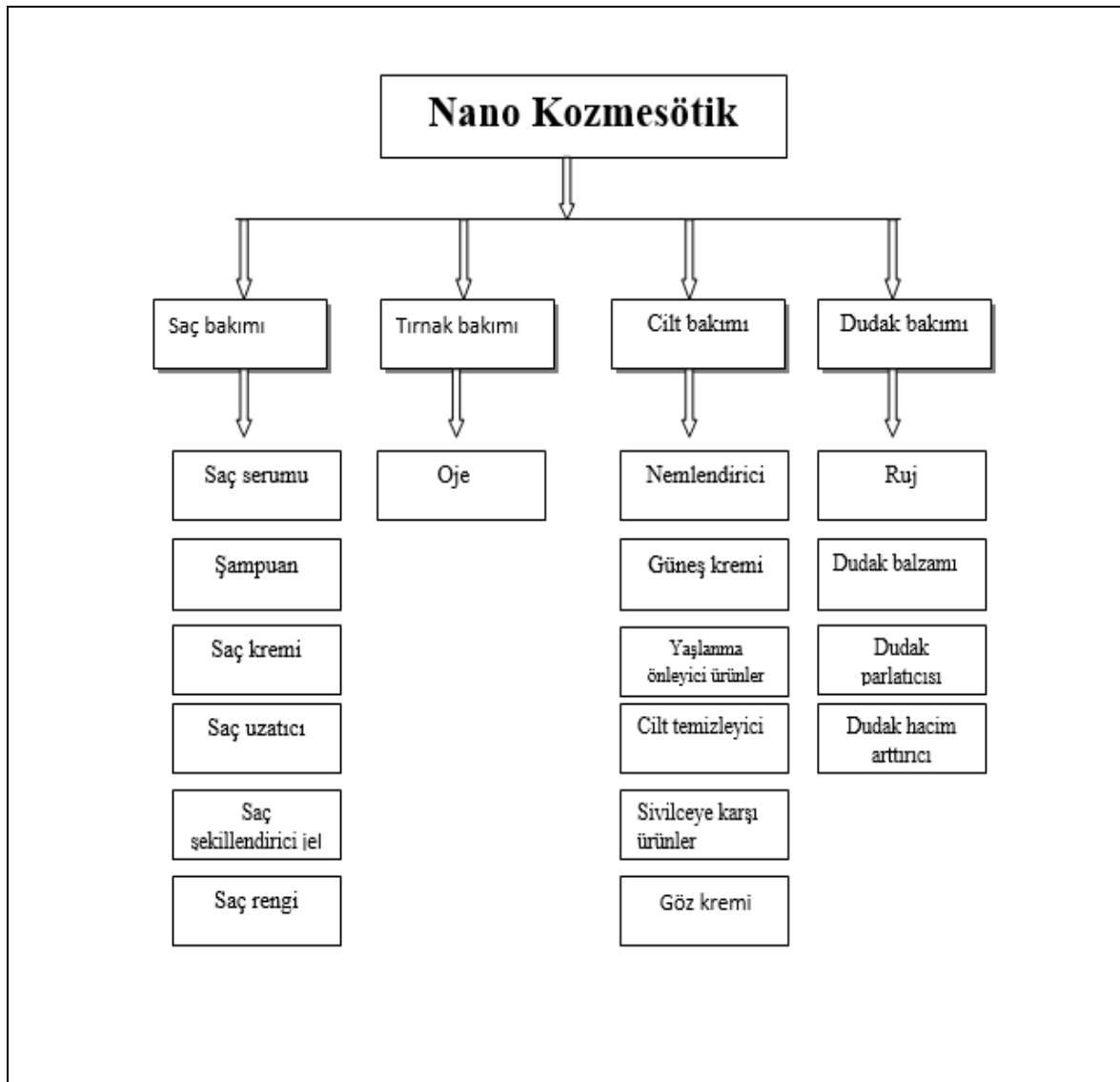
Nanoteknoloji, zarif ve etkili kozmetikler geliştirmek için kullanılan teknolojiler arasında özel bir yerde bulunur. Kozmetik arenada, daha küçük parçacıkların ciltte kolayca emildiğine ve hasarı kolay ve etkin bir şekilde tamir ettiğine inanılmaktadır. Kozmetik endüstrisinde nanoteknoloji parfümlerin daha uzun süre kalıcı olmasının sağlanmasında, cildi korumak için güneş kremlerinin, yaşlanmaya karşı savaşan kremler ve cildin nemini korumak için nemlendiricilerin üretiminde kullanılmaktadır (Lohani ve ark., 2018).

Nanoteknoloji, daha fazla koruyucu ve cilt sağlığı artırıcı verimlilik ile çoğu sorunu çözmektedir. Çeşitli nanoteknoloji yöntemleri nanoemülsiyonlar, nanokapsüller lipozomlar, katı lipit nanopartiküller, küçük boyutlu nanopartiküller, hidrojeller ve dendrimerler gibi güzellik ürünleri geliştirmede aktif rollere katılır (Ganesan ve Choi, 2016). Nanoemülsiyonlar şeffaf ve benzersiz dokunsal ve doku özelliklerine sahiptir, nanokapsüller cilt bakım ürünlerinde kullanılmaktadır, nanopigmentler şeffaf ve güneş koruyucu ürünlerin verimliliğini arttırmaktadır. Lipozomlar tipik olarak 20 nm ile birkaç yüz mikrometre arasında değişmektedir. Lipozomlar çeşitli kozmetik ürünlerinde kullanılırlar, çünkü bunlar biyolojik olarak uyumlu, çözünebilen, toksik olmayan ve esnek keseciklerdir ve aktif maddeleri kolaylıkla kapsülleyebilirler. Lipozomun ana bileşenlerinden biri fosfatidilkolin yumuşatıcı özellikleri nedeniyle cilt bakım ürünlerinde (nemlendirici, losyonlar, kremler, vb.) ve saç bakım ürünlerinde (şampuan, saç kremi) kullanılmaktadır. Dendrimerler heyecan verici yeni bir makromoleküler yapı sınıfı ve nanoteknoloji temelli kozmesötikler alanında cilt hastalıklarının çeşitlerini tedavi etmek için önemli bir bileşendir. Karbon fulleren gibi

diğer nano ölçekli malzemeler, bazı kozmetik ürünlerinde antioksidatif özelliklerinden dolayı kullanılmıştır (Lohani ve ark., 2018).

Nanoteknoloji en umut verici ve devrimci alan olarak kabul edilir. Son on yılda, nanoteknoloji yaygın olarak kullanılmaktadır ve dermatoloji, kozmetik ve biyomedikal uygulamalar alanında da faydalıdır. Yeni teknolojiler ve yeni dağıtım sistemleri, şu anda kozmesötiklerin üretiminde kullanılmaktadır (Ganesan ve Choi, 2016). Nanokozmesötiklerin ana sınıfları Tablo 1.2’de gösterilmiştir.

**Tablo 1.2.** Nanokozmesötiklerin ana sınıfları. (Ganesan ve Choi, 2016).



Nanopartiküllerin kozmetikte kullanılmasının başlıca avantajları nanopartiküller içinde kapsülleme ile kozmetik bileşenlerin, (örneğin vitaminler, doymamış yağ asitleri ve antioksidanlar) stabilitesinin iyileştirilmesi, cildin zararlı ultraviyole (UV) ışınlarından etkili korunması, estetik açıdan hoş ürünler olmasıdır, örneğin mineral güneşten koruyucularda, daha küçük etken mineral partikülleri kullanılarak bunların fark edilir bir beyaz dökümü bırakmadan uygulanmasına izin verilir. Bu aktif muhteviyatın istenen bölgeye hedeflenmesi ve uzun süreli etki için aktif bileşenlerin kontrollü salımı olarak bilinmektedir (Lohani ve ark., 2018).

### **1.5. Güneş Kremeleri**

Çıplak cildin güneş ışığına maruz kalması insan sağlığına yararlı olsa da, korunmamış cildin ultraviyole radyasyona (UVR) uzun süre maruz kalmasının gösterdiği sonuçlar arasında iltihaplanma, erken foto yaşlanma, DNA hasarı, fotokarsinogenez ve bağışıklık baskılanması yer almaktadır. Düzenli olarak güneş koruyucu uygulamasının insanlarda skuamöz hücreli karsinom, melanom ve bazal hücreli karsinom gelişme riskini azalttığı gösterilmiştir. Bu nedenle, uzun süre açık havada kalınacağı zaman, güneş koruyucularının düzenli olarak uygulanması teşvik edilmektedir (Osmond-McLeod ve ark., 2016).

İdeal güneş kremi gereksinimleri aşağıdaki gibidir.

- UVR'yi absorbe etmeli veya dağıtmalı ve geniş spektrum korumasına sahip olmalıdır. Sağlanan koruma, karsinogenez, immün baskılamayı ve diğer güneş kaynaklı hasarı önleyebilmelidir.
- İnsan derisine ve güneşe maruz kaldıktan sonra kimyasal olarak stabil olmalıdır. Fotodegradasyon olmamalıdır.
- Topikal olarak uygulanmalı ve bu nedenle cilde nüfuz etmemelidir.
- Suya karşı itici olmalı ve kozmetik olarak geliştirilecek estetik değere sahip olmalıdır.

Bütün bu özelliklerin mevcudiyeti bir aktifte bulunmadığından, aktiflerin bir kombinasyonu kullanılır. Aktiflerin bazılarının modifiye edilmesine veya daha yüksek SPF (Güneş Koruma Faktörü) elde etmek için bir taşıyıcıya dahil edilmesine ihtiyaç duyulur. Bu nedenle, güneş koruyucularında nanoteknoloji ihtiyacı doğar. Nanoteknoloji, güneş

ışığından etkilenmeyi önlemek, estetik değeri arttırmak, SPF'yi aynı aktif madde seviyesine yükseltmek, güneşten korunma aktivitesini daha uzun süre engellemek ya da topikal uygulamada cildin aktif maddelere nüfuz etmesini önlemekte rol oynamaktadır (Ischenko ve Krutikova, 2014).

Güneş kremlerinde ZnO NP'leri 1980'lerden beri yaygın halde kullanılmaktadır. Onların gelişimleri, son derece etkili UVR filtreleri olan modern formülasyonlara yol açmış, yine aynı zamanda şeffaf ve açık renkli bir dokuya sahip olmuşlardır (Wang ve Tooley, 2011). Uluslararası Kozmetik İşbirliği (ICCR)'e göre, ZnO NP'ler birçok kişisel bakım ürününde inorganik UV filtreleri olarak kullanılmaktadır. Metal oksit NP'ler yaygın olarak güneş koruyucusunda şeffaflıktan ödün vermeden geniş spektrumlu UV engelleme sağlamak için kullanılmaktadır (Lu ve ark., 2018).

Nano tanecikli parçacıkların kullanılmasından önce geleneksel güneşten koruyucu maddeler, cilde iyi karışmayan ve kozmetik açıdan hiç hoş olmayan kalın formülasyonlar olarak biliniyorlardı (Newman ve ark., 2009). ZnO NP'ler UVA ve UVB ışınlarını yansıtabilir ve dağıtabilirler; bu arada, tipik olarak kimyasal UV filtreleri tarafından indüklenen endokrin sistemin tahriş ve bozulmasını önlerler (Lu ve ark., 2015).

Aynı zamanda güneş koruyucu ürünlerinde, 20 nm'lik boyut aralığında kullanılan çinko oksit nanopartiküllerin avantajları, deride olumsuz sağlık etkilerine neden olmamasıdır (Morganti, 2010). Güneş kremlerinde nano tanecikli parçacıkların kullanımıyla ilgili en büyük endişe, serbest radikallerin oluşmasıdır. ZnO fotovoltajik hücrelerde elektrik üretmek için kullanılan fotokatalizör olarak bilinmektedir. UV ışığına maruz kaldıklarında elektronlar yayarlar. Bu elektronlar, sırasıyla, peroksitlerin, serbest radikallerin ve diğer reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu indüklemektedir (Newman ve ark., 2009).

Avrupa Birliği (AB) Komisyonunun Kozmetik Çalışma Grubu, son zamanlarda, kapsamlı güvenlik önlemleri temelinde, dermal olarak uygulanan kozmetik ürünlere nano boyutta ZnO ve TiO<sub>2</sub>'nin dahil edilmesinin, insanlarda olumsuz sağlık etkileri için risk oluşturmadığı sonucuna varmıştır. Benzer şekilde, Avustralya'daki Terapatik Mallar İdaresi (TGA) TiO<sub>2</sub> ve ZnO nanopartiküllerinin güneşten koruyucularda insan kullanımı için güvenli olmadığını gösteren hiçbir delil olmadığını kanıtlamıştır. Danimarka Çevre Koruma ajansı tarafından yaptırılan kapsamlı bir derlemede, topikal olarak uygulanan nanoparçacıkların, çoğu koşulda dermal penetrasyona maruz kalma ihtimalinin düşük olduğu sonucuna

varılmıştır. Hakemli dergilerdeki bilimsel incelemelerin çoğunluğu benzer sonuçlara ulaşmıştır. Böylece, güneşten koruyuculardaki nanoparçacıkların insanlarda kullanım için güvenli olduğu konusunda bilimsel bir fikir birliğine varıldığını söyleyebiliriz. Bununla birlikte, bu güneş kremlerinin uzun süreli kullanımından kaynaklanan olası biyolojik etkilere ilişkin bazı belirsizlikler devam etmektedir. Bu, nanoteknolojinin yeniliğiyle birleştiğinde, toplumun bazı kesimlerinde nanoparçacık içeren cildi UVR'nin bilinen zararlı etkilerinden koruyan güneş kremlerinin uzun vadede güvensiz olabileceğine dair spekülasyonlara yol açmaktadır (Osmond-McLeod ve ark., 2016).

### 1.6. MicNo-ZnO tozları

2009 yılında ZnO NP'lerden olumsuz özelliklerini ortadan kaldırmak üzere Anadolu Üniversitesinde ZnO'nun özel tasarlanmış bir formu olan MicNo ZnO geliştirilmiştir. MicNo-ZnO teknolojisi, mineral bazlı yeni bir UV filtresidir. Patentli MicNo partikül teknolojisi ile oluşturulan ürün, mikron ve nano ZnO partiküllerinin faydalarını birleştirir. Tablo 1.3'de mikron, nano ve MicNo-ZnO partikülleri UV-filtresi olarak karşılaştırılmıştır. MicNo-ZnO partiküllerin hem micron hem de nano ZnO'a oranla daha yüksek performans sergilediği görülmüştür (Suvacı ve ark., 2019).

**Tablo 3.3** Micron, nano ve MicNo-ZnO partiküllerin karşılaştırılması (Suvacı ve ark., 2019)

Özellik	Micron	Nano	MicNo
Birim kütle başına UV koruma performansı	Düşük	Yüksek	Çok yüksek
Şeffaflık	Yok	Yüksek	Yüksek
Birim kütle başına yüzey örtücülüğü	Düşük	Yüksek (eğer topaklanmamışsa)	Çok yüksek
Toksiklik derecesi	Düşük	Yüksek	Düşük
Kontrolsüz topaklanma	Düşük	Çok yüksek	Düşük

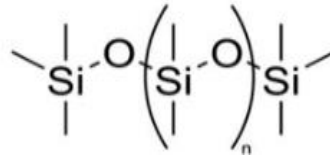
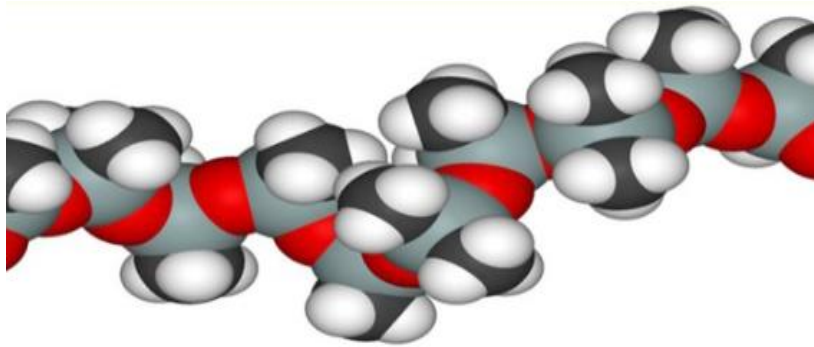
ZnO tozlar hidrofilik yüzey özellikleri sergiledikleri için ve de güneş kremi gibi pek çok kozmetik üründe yağ fazında kullanılmaları tercih edildiğinden yüzeyini kaplamaya gerek duyulmaktadır.

### 1.7. Kaplama malzemeleri

Yüzey kaplamaları olarak trietoksikaprililsilan, polidimetilsiloksan, hidrojen polidimetilsiloksan ve silika olmak üzere dört farklı malzeme seçilmiştir.

#### 1.7.1. Polidimetilsiloksan (PDMS) ve Hidrojen sonlu Polidimetilsiloksan (HPDMS)

Polidimetilsiloksan (PDMS), polisiloksan grubunun en yaygın kullanılan üyesidir ve çok çeşitli uygulamalar için eşsiz özelliklere sahiptir (Çavuşoğlu, 2013). En yaygın kullanılan silikon bazlı organik polimer olarak bilinen PDMS optik olarak berraktır ve genel olarak toksik ve yanıcı değildir. Ayrıca dimetilpolisiloksan veya dimetikon olarak da adlandırılır. Çeşitli silikon yağı tiplerinden birisidir (polymerize siloksan) (http-1).



Şekil 1.3. Polidimetilsiloksan (PDMS) (Okech ve ark., 2008)

Polimerin temel yapısı, uygulamanın kısıtlamalarına bağlı olarak çeşitli özel gerekliliklere göre imal edilebilen  $-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_2-$  ünitelerden oluşmaktadır, yani çeşitli fonksiyonlar özel işlevlerle kullanılabilir (Deguchi ve ark., 2015).

PDMS'nin önemli fiziksel özellikleri geniş molar hacim, kohezif enerji yoğunluğunun düşük olması ve esnekliğinin yüksek olmasıdır. Aynı zamanda PDMS, görünür ve UV ışığına karşı saydam, ozona karşı çok dirençli, atomik oksijen ve hatta oksijen plazmalarına karşı kararlıdır. PDMS'nin üstün kılan özellikleri film şekillendirme yeteneği, çeşitli gazlara karşı yüksek geçirgenliği, hareket yeteneği, yüzey aktivitesi, kimyasal ve fiziksel etkilere karşı etkisiz olmasıdır (Çavuşoğlu ve ark., 2013).

PDMS, biyomedikal uygulamalar için MEMS ve mikroakışkan bileşenlerin geliştirilmesi için çekici hale getiren istenen özelliklere sahip bir silikon elastomerdır. Kimyasal olarak inert, gazlar için geçirgen, kullanımı kolay ve manipüle edilmiş, isotropik ve homojen özellikler sergileyen ve aynı zamanda silikondan daha düşük maliyetli olan ve mikro-yapıları geliştirmek için mikron altı özelliklere uyum sağlayabilen bir maddedir (Mata ve ark., 2005).

Bu malzeme hızlı prototipleme, yüksek optik şeffaflık göstermektedir. Bununla birlikte, PDMS'nin önemli bir dezavantajı hidrofobik olması ve yüzey hidrofilizasyonu sonrası hızla hidrofobikliği geri kazanmasıdır (Gökaltun ve ark., 2017). Polidimetilsiloksan (PDMS), desenli topografiler gibi yapay hücre dışı matris (ECM) üretmek için umut verici bir biyomateryaldir, ancak hidrofobik yapısı hücre bazlı yaklaşımlara uygulanabilirliğini sınırlandırmaktadır (Scharin-Mehlmann ve ark., 2018).

Dimetikon kozmetik ve tüketici ürünleri sektöründe de çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Örneğin, kafa derisi üzerinde kafa bitlerinin tedavisinde dimetikon kullanılabilir (Nair, 2003). Dimetikon'un (biri son derece düşük ve diğeri orta viskoziteli) bir karışımının birkaç dakika içinde *in vitro* olarak kafa bitlerini öldürdüğü gösterilmiştir. Bu yaklaşımın etkinliği, Brezilyalı çocuklarda randomize bir klinik çalışmada gösterilmiştir. Son zamanlarda, uygun bir dimetikone karışımının bit yumurtalarına da nüfuz ettiği ve hızla embriyoları öldürdüğü gösterilmiştir (Feldmeier, 2014). Dimetikone ürünü güvenli ve oldukça etkili bir anti-bit şampuandır. Fiziksel hareket tarzından dolayı (bitlerin merkezi sinir sisteminin oksijen kaynağının kesilmesi), direnç gelişmesi olası değildir (Heukelbach ve ark., 2008).

Dimetikon, deri-nemlendirici losyonlarda yaygın olarak kullanılır ve burada "cilt koruması" olan aktif bir bileşen olarak listelenir. Bazı kozmetik formülasyonlar %15'e kadar kullanım konsantrasyonlarında dimetikon ve ilgili siloksan polimerler kullanır. Kozmetik

Madde İncelemesi (CIR) Uzman Paneli, dimetikon ve ilgili polimerlerin kozmetik formülasyonlarda kullanılmasının güvenli olduğu sonucuna varmıştır (Nair, 2003). Dimetikon, düzlem tedavisinde kullanılan oral farmasötik formülasyonlarda simetikon ile birlikte kullanılabilir (Rowe ve ark., 2009).

Hidrojen sonlu polidimetilsiloksan (HPDMS) bir grup polimerik organosilikon bileşiğine ait, hidrid sonlandırılmış polidimetilsiloksan formudur. HPDMS, aromatik hidrokarbon ve petrol hidrokarbonları ve benzeri gibi birçok organik çözücüde çözünür. Yaygın olarak kullanılan bir organik silikon ara maddesidir ve genellikle organik silikon engelleme ajanı olarak kullanılabilir. Birçok cilt bakımı ve güzellik ürünüde, cildin su ve nem kaybını önleyen ve nemlendirici bir bariyer oluşturduğu görülmektedir. (http-2)

### **1.7.2. Silika**

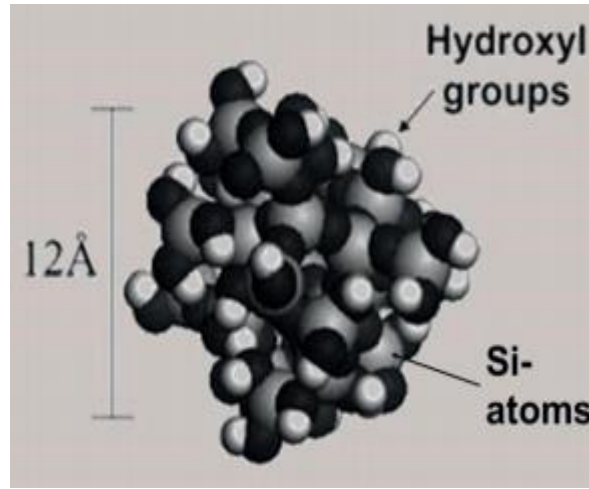
Silika, biyoyumluluk ve koruma etkileri nedeniyle NP'ler için genellikle kabuk malzemesi olarak seçilmektedir. Bir yandan silika kabuklar, kimyasal maddelerin NP'lerin içinde ve dışında dağılmasını engeller ve böylece NP'lerin hücrelere ve bu arada toksik etkilerini azaltır, kuantum noktalarının kimyasal ve fotokimyasal stabilitesini artırır. Diğer yandan, silika kabukları, biyomedikal uygulama için önemli olan biyolojik konjugasyonda zengin yüzey kimyası sağlar (Zhang ve ark., 2012).

Silika kaplı yapıları ZnO nanomalzemeleri, son zamanlarda stabiliteelerini ve süspansiyonlardaki yayılma kabiliyetlerini geliştirmek için kullanılmıştır ve bu nedenle çok çeşitli uygulamalar için kullanılabilirler. Silika bazlı kaplamalar, özellikle farklı malzemeler, yüzey modifikasyon kolaylığı ve fotokataliz ve serbest radikal oluşumu potansiyelini azalttığı için çevresel açıdan iyi bir dengeye sahip olduklarından ilgi çekicidir. Metal oksit nanoparçacıklarının silika kaplaması  $Fe_2O_3$ ,  $TiO_2$  ve diğerleri gibi geniş çapta çalışılmıştır. Bununla birlikte, ZnO nanomalzemesine silika kaplamanın eklenmesi, yüksek yüzey enerji aktivitesi ve geniş yüzey alanı ve dolayısıyla çinko oksit nanopartikülleri nedeniyle kolayca toplanabildiğinden oldukça zordur (El-Nahhal ve ark., 2016).

Silika kaplamaların ZnO nanoparçacıkları üzerine uygulanması, ZnO'nun fotokatalitik etkinliğinin, özellikle de UV koruma uygulamaları için etkin kontrolü için büyük önem taşımaktadır. Hem yüksek sıcaklık hem de UV ışınımı altında geniş bir UV ışığı

spektrumunu, fiziksel ve kimyasal stabilitesini emme kabiliyetinden dolayı, ZnO'nun etkili bir UV emici olarak uygulanmasında muazzam ticari ve akademik ilgi olmuştur (Wang ve ark., 2010). Amorf füme nanoyapılı SiO<sub>2</sub> biyolojik olarak etkisiz sayılır ve kozmetik ve kişisel bakım ürünlerinde yaygın olarak kullanılır ve nanoparçacık toksisite tarama analizlerinde negatif bir kontrol olarak kullanılır (Sotiriou ve ark., 2014).

Parçacık yüzeyindeki çok sayıda hidroksi grubu dikkat çekicidir. Parçacık üretimi için yüzey modifikasyonunun önemini açıklar: OH grupları organosilanlarla reaksiyonla bloke edilir, dolayısıyla partikülün hidroksi gruplarının yoğunlaşma reaksiyonu ile daha da büyümesi önlenir. Aynı zamanda, aglomeraların oluşumu bastırılır ve partiküller hala değişmez. Ayrıca yüzey modifikasyonu parçacıkların etrafında bir organik tabaka oluşturur ve bunları organik matris ile uyumlu hale getirir (Pueraria ve ark., 2019).



Şekil 1.4. SiO<sub>2</sub> nanoparçacık modeli ( Puerari.,ve ark.2019).

Silika fizikokimyasal özellikleri, düşük maliyeti, sentezi ve nano ölçekli kontrol kolaylığı geniş yüzey alanı, gözenekli yapısı ve aglomerasyona karşı düşük eğilim göstermesi olarak bilinir (Pueraria ve ark., 2019). Ayrıca, cilalı vitreus silika, ultraviyole görülebilir kızılötesi geçirgenliğe ve ısı direncine sahiptir ve bu nedenle lensler, prizmalar, lazer parçaları ve optik fiberler için kullanılmaktadır (Stratta ve ark., 2001). Amorf silika, 100-140 ppm'lik daha yüksek bir çözünürlüğe sahiptir (Patel ve Vashi 2015). Ayrıca silika partikülleri nanomateryal boyutun biyo-dağılımı ve çeşitli biyolojik etkiler üzerindeki etkisini incelemek

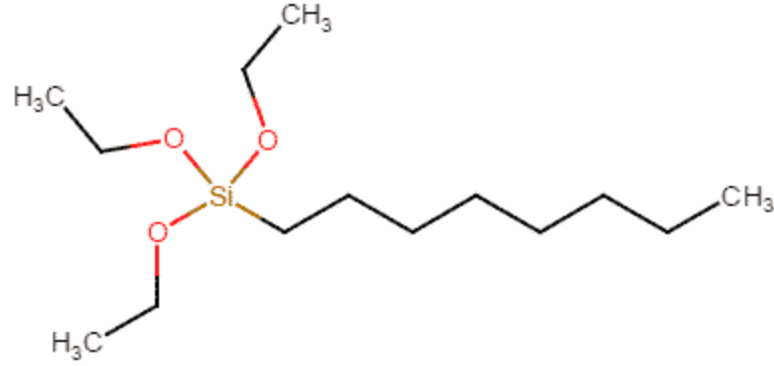
için çok uygundur, çünkü diğer birçok nanomalzemededen daha sulu çözeltilerde daha iyi dağılılabirlik gösterirler (He ve ark., 2008).

Silika nanoparçacıklar, mükemmel fizikokimyasal, mekanik ve optik özellikler gibi birçok çekici özelliği sayesinde yüksek teknoloji uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüzde silika nanopartiküller, fotonik kristaller, kimyasal sensörler, biyosensörler, gelişmiş kompozit malzemeler için nano-dolgu maddeleri, biyo-görüntüleme için işaretleyiciler, kuantum noktaları ve katalizörler için substrat olarak kullanılır. Optik absorpsiyon ve emisyon özellikleri, silanol gruplarının konsantrasyonu, özgül yüzey alanı ve yoğunluğu, çağdaş araştırma çalışmalarında silika nanopartiküllerinin kullanımını yöneten önemli parametrelerden bazılarıdır (Rahman ve ark., 2009). Silikon dioksit, cam ve seramik malzemeler üretmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Rahman ve Padavettan, 2012). Silikon dioksit nanofilmler, 1 nm kadar ince olabilen bir silikon dioksit molekülleri tabakası, transistör gibi bir cihazın iki parçası arasında elektrik yalıtımı sağlamak için kullanılır. Bu yöntem bilgisayar çipleri yapımında kullanılır (Boysen.ve ark., 2011).

SiO<sub>2</sub> nanopartiküller özellikle güneş koruyucu ve kozmetik ürünlerinde kullanılır. SiO<sub>2</sub>-NP'lerin topikal olarak uygulanması genellikle toksik olarak görülme de, insan sağlığına bazı toksikolojik tehlikeler ortaya çıkarabilir. Silikon içeren çeşitli geçiş metallerinin reaksiyon mekanizmaları aracılığıyla reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturduğu bilinmektedir (Kundu ve ark., 2018).

### **1.7.3. Trietoksikaprililsilan (TECS)**

Trietoksikaprililsilan (C<sub>14</sub>H<sub>32</sub>SiO<sub>3</sub>) sıvı görünümlü suda çözünmez bir maddedir ve mükemmel dağılma, adsorpsiyon, yağlama yetenekleri gibi özelliklere sahiptir (<http-3>).



Şekil 1.5. Trietoksikaprililsilan yapısal formülü (http-3).

Trietoksikaprililsilan kozmetik içerik olarak, Kozmetik madde veri tabanı' (CosIng) veritabanına dahil edilmiştir. Bununla birlikte, Kozmetik Yönetmeliği'nin Eklerinin herhangi birinde düzenlenmemiştir ve bu nedenle güvenilirliği ya bir renklendirici, koruyucu madde veya UV filtresi olarak değerlendirilmemiştir. Trietoksikaprililsilan Tüketici Güvenliği Bilim Kurulu (SCCS) tarafından çinko oksit nano-formları üzerinde bir kaplama olarak değerlendirilmiştir.

Kozmetik Madde İncelemesi'nin (Cosmetic Ingredient Review (CIR)) deneme raporunda (2016) özetlenen çalışmalar, trietoksikaprililsilanın nispeten toksik olmadığını ve genotoksik olma olasılığının düşük olduğunu göstermektedir. Cilde orta derecede ve yüksek tahriş edici, göze hafif tahriş edici olarak kabul edilir. CIR Uzman Paneli, güvenlik değerlendirmesinde açıklanan konsantrasyonda mevcut kozmetik uygulamalarında ve kozmetikte konsantrasyonda güvenli olduğu sonucuna varmıştır (Bernauer ve ark., 2016). Kullanım ve üretimi aşağıdaki gibidir (http-4).

1) Sanayi Kullanımları: yapıştırıcılar ve dolgu macunu kimyasalları, bitirme ajanları, ara ürünler, diğer kategoriler tarafından tarif edilmeyen boya katkı maddeleri ve kaplama katkı maddeleri

2) Tüketici Kullanımları: yapıştırıcılar ve sızdırmazlık ürünleri, boyalar ve kaplamalar.

### 1.8. Toksikite Belirleme için Kullanılan Test Yöntemleri

Nanoparçacıkların eksiksiz bir risk değerlendirmesi için, sadece bu malzemelere maruz kalma seviyesine değinmek değil, aynı zamanda potansiyel tehlikelerini de belirlemek

gereklidir. *In vitro* sitotoksosite testi, bu partiküller ve biyolojik prosesler arasındaki olası etkileşimlerin değerlendirilmesinde ilk adımı oluşturur. Nanopartikül maruziyetine bağlı *in vitro* hücre sitotoksitesini değerlendirmek için en yaygın kullanılan analizler arasında 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT), alamar mavisi (AB) ve nötr kırmızı alım (NRU) deneyleri vardır. Bunların hepsi kolorimetrik analizlerdir, ancak prensip olarak farklılık gösterir ve bu nedenle sitotoksosite mekanistik süreçleri hakkında tamamlayıcı bilgiler sunar.

### **1.8.1. Mitokondriyal aktiviteye dayalı MTT testi**

MTT deneyi, MTT reaktifinin, NAD (P) H'ye bağlı enzimler tarafından çözünmeyen formazana indirgenmesine dayanır (Costa ve ark., 2016). Bu proje kapsamında sentezlenen maddelerin hücreler üzerindeki etkin konsantrasyon aralığının belirlenmesi amacıyla MTT toksisite testi tercih edilmiştir. MTT testi, sarı renkli suda çözünebilir tetrazolyum tuzunun mor renkli çözünmeyen formazan tuzuna dönüşümüne dayalı, hızlı ve hassas, kolorimetrik bir testtir. Tetrazolyumun formazana dönüşüm ürünleri NADP ve NADPH'nin indirgenmesi ile oluşur. MTT yönteminde canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrojenazı, tetrazolyum halkasını böler, böylece hücre içerisinde tetrazolyum tuzu formazan ürününe çevrilir. Hücrenin canlılığı (metabolik aktivitesi) kaybolduğu zaman mitokondriyal fonksiyon azalır ve sonuç olarak tetrazolyum tuzunun formazan ürününe çevrilebilme yeteneği azalır. Formazan miktarı birçok hücre hattında hücre sayısı ile orantılı olarak oluşur. Bu nedenle MTT testi hücre canlılığının veya çoğalmasının ölçülmesinde kullanılır (Fotakis ve Timbrell, 2006).

### **1.8.2. ROS testi**

Reaktif oksijen türleri (ROS) normal metabolizma ve ksenobiyotik maruziyetinin ürünleridir ve konsantrasyonlara bağlı olarak ROS, hücreler ve dokular için faydalı veya zararlı olabilir. Fizyolojik düşük seviyelerde, ROS hücre içi sinyalleme ve regülasyonda "redoks haberciler" olarak işlev görürken, aşırı ROS hücrel makromoleküllerin oksidatif modifikasyonunu indükler, protein fonksiyonunu inhibe eder ve hücre ölümünü teşvik eder. Ek olarak, glutation, tioredoksin ve piridin nükleotit redoks çiftleri gibi çeşitli redoks

sistemleri, apoptotik hücre ölümü dahil olmak üzere hücre sinyalleşmesine ve hücre fonksiyonunun modülasyonuna katılır. Hücre apoptozu, hücre dışı ve hücre içi sinyallerle iki ana yol, ölüm reseptörü veya mitokondri aracılı yollar yoluyla başlatılır. Çeşitli patolojiler, ROS artışlarına ve ya antioksidan azalmaya, hücre içi redoks homeostazının bozulmasına ve lipid, protein ve ya DNA'nın geri dönüşümsüz oksidatif modifikasyonlarına neden olan oksidatif stres kaynaklı apoptotik sinyallemeden kaynaklanabilir (Circu ve Aw, 2010).

Reaktif oksijen türleri (ROS), hücrel oksidatif metabolizmanın doğal yan ürünleridir ve hücre sağkalımı, hücre ölümü, farklılaşma, hücre sinyalleşmesi ve iltihapla ilgili faktör üretiminin modülasyonunda önemli roller oynar. Biyolojik açıdan önemli ROS elemanları, singlet oksijen ( $^1O_2$ ), süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksil ( $HO^{\cdot}$ ), hidroperoksil ( $HO_2^{\cdot}$ ), karbonat ( $CO_3^{\cdot-}$ ), peroksil ( $RO_2^{\cdot}$ ), alkoksil gibi serbest radikalleri içerir. ( $RO \cdot$ ) ve karbondioksit radikali ( $CO_2^{\cdot-}$ ) ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hipobromöz asit ( $HOBr$ ), hipoklorik asit ( $HOCl$ ), ozon ( $O_3$ ), organik peroksit ( $ROOH$ ), perozinitrit gibi radikal olmayanlar ( $ONOO^-$ ), peroxynitrat ( $O_2NOO^-$ ), peroksijenit asit ( $ONOOH$ ), peroksomonokarbonat ( $HOOCO_2^-$ ), nitrik oksit ( $NO$ ) ve hipoklorit ( $OCl^-$ ).  $O_2^{\cdot-}$   $O_2 \cdot$  - süperoksit dismutazların (SOD) aracılık ettiği  $H_2O_2$ 'ye hızlı bir şekilde indirgenmesine bağlı kısa bir biyolojik yaşam ömrüne sahip serbest bir radikaldir. Bununla birlikte, ( $H_2O_2$ ), uzun bir biyolojik ömrü ve serbest radikallere kıyasla daha yüksek stabiliteye sahip, ROS'un radikal olmayan bir türevidir (Dayem ve ark., 2017).

ZnO NP'lerin bugüne kadarki en iyi çalışılmış etki mekanizması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesidir. ROS, hücre metabolizması sırasında doğal olarak üretilir ve konsantrasyonları, hücrel antioksidan sistemler (örneğin, glutation [GSH], süperoksit dismutaz, katalaz) tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir. Hücrenin antioksidan sisteminin bu bileşenleri normal hücre işlevi için önemlidir ve ROS'un fizyolojik seviyeleri, hücrel yolların ikinci habercisi ve aktivatörleri olarak işlev görebilir. NP kaynaklı ROS'un altta yatan mekanizmalarının daha iyi anlaşılması, asgari istenmeyen etkilerle en büyük terapötik faydayı sağlayan NP'lerin rasyonel mühendisliğine olanak sağlayacaktır (Jain ve ark., 2018).

NP aracılı ROS üretimi, enflamasyon, fibroz, genotoksisite ve karsinogenez gibi bir dizi patolojik olay başlatır ve büyüklük, yük, yüzey alanı ve kimyasal yapı gibi NP'lerin fizikokimyasal özellikleri ile modüle edilir. NP ile ilişkili toksisite, pro-inflamatuar ve fibrotik sitokinlerin ekspresyonunu ve artan ROS oluşumunu etkileyebilen makrofajlar ve

nötrofiller gibi enflamatuar hücrelerin aktivasyonunu tetikleyebilir (Abdal Dayem ve ark., 2017).

ROS, proteinler, lipitler ve polinükleotitler dahil olmak üzere hücrel makromoleküllerin oksidatif modifikasyonları bakımından oldukça aktif olan oksijen metabolitleridir. Hücrel redoks homeostazı, ROS üretimi ve hücredeki antioksidan sistem arasındaki denge ile sağlanır. ROS aşırı üretildiğinde veya endojen antioksidan kapasitesi azaldığında, ayırt edici olmayan oksidasyon zararlı etkiler yaratarak “oksidatif stres” e neden olur. Birçok çalışma, aşırı oksidatif stresin hücreye zararlı olduğunu ve ciddi sitotoksisteye neden olduğunu kanıtlamıştır. Mitokondri ROS kaynağıdır. ROS seviyesi aşıldığında, mitokondriyal bütünlük ve zar yapıları zarar görür; nihayetinde redoks denge sistemi tehlikeye girer ve bu sonuçta mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna yol açar ve ayrıca hücrel makromoleküllerde, özellikle DNA'da ciddi hasara neden olur. DNA hasarının kapsamı, hücre kaderini hücre döngüsü durdurma, DNA onarımı veya apoptotik yolların aktivasyonu ile belirler. Ayrıca, DNA hasarı kromozomal kırılma ve mikronükleus oluşumu ile sonuçlanır (Bai ve ark., 2017).

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. Çalışmada Kullanılan HaCaT Hücreleri

Deneylerde sağlıklı hücre hatları olan HaCaT (insan deri keratinosit) hücreleri kullanılmıştır. HaCaT hücreleri, Hücre Hattı Servislerinden (CLS, Eppelheim, Almanya) satın alındı ve Dulbecco'nun Modifiye Kartal Ortamında (DMEM) yüksek glikozlu (Sigma Aldrich, Almanya) bir tek tabaka halinde tutuldu. HaCaT hücreleri için %10'luk inaktive edilmiş Fetal Sığır Serumu, % 1 Penisilin streptomisin ve %7,5 NaHCO<sub>3</sub> içeren Dulbecco's Modified Eagle's besiyeri kullanılmıştır. Hücreler 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklar içerisinde %5 CO<sub>2</sub> içeren 37 C'lik inkübatörde yetiştirilerek deneyler için hazır hale getirilmiştir.

### 2.2. Kullanılan MicNo-ZnO Partikülleri

Çalışmalarda kullandığımız farklı kaplama malzemeleriyle kaplanmış MicNo-ZnO tozları Eskişehir Teknik Üniversitesi Malzeme Bilimleri Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi Prof.Dr.Ender SUVACI tarafından sağlanmıştır. MicNo partiküller nano primer partiküllerin birbirlerine güçlü kimyasal bağlarla bağlanarak oluşturdukları mikron boyutlu altıgen plaka şekilli tozlardır. Malzemelerimiz MicNO ZnO, TECS kaplı MicNO ZnO, HPDMS kaplı MicNO ZnO, PDMS kaplı MicNO ZnO, Silika kaplı MicNO ZnO olarak sıralanmıştır.

*Tablo 2.1 Deneyde kullanılan malzemelere ait özellikler.*

MALZEME	TANE BOYUTU	SILAN AJANI	KİMYASAL FORMÜL
MicNo ZnO	<b>d10:</b> 3.01µm <b>d50:</b> 4.94 µm <b>d90:</b> 9.62 µm		
TECS Kaplı MicNo ZnO	<b>d10:</b> 4.23µm <b>d50:</b> 6.34 µm <b>d90:</b> 14.21 µm	Triethoxycaprylsilane	
HPDMS Kaplı MicNo ZnO	<b>d10:</b> 3.92µm <b>d50:</b> 5.39 µm <b>d90:</b> 11.73 µm	Hidrojen PolyDimethylSiloxane	
PDMS Kaplı MicNo ZnO	<b>d10:</b> 4.52µm <b>d50:</b> 6.16 µm <b>d90:</b> 13.01 µm	PolyDimethylSiloxane	
Silika Kaplı MicNo ZnO	<b>d10:</b> 4.26µm <b>d50:</b> 6.41 µm <b>d90:</b> 12.97 µm	Silika	

### **2.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler**

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma), Penicilin-Streptomycin (Biological Industries), Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma), Tripsin-EDTA solution (Biological Industries), Dimethyl Sulfoxide (DMSO), KCl (Sigma), NaCl (Merck), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck), EDTA (Merck), MTT (Sigma), ROS kiti (Abcam).

### **2.4. Kullanılan Sarf Malzemeler**

25 cm<sup>2</sup>'lik flasklar (TPP), 96 kuyucuklu plakalar (TPP), cam mezürler, disposable pipetler (5,10 ve 25 ml hacimlerinde), pastör pipetler, 500 ve 1000 ml'lik Durham şişeleri, Steril polipropilen santrifüj tüpleri (15 ve 50 ml hacimlerinde), rezervuar, Thoma lamı.

### **2.5. Kullanılan Aletler**

Soğutmalı ve yüksek devirli santrifüj (Heraus), CO<sub>2</sub> inkübatörü (Heraus), Steril kabin (Heraus), Kuru hava sterilizatörü (Nüve), otoklav (Sanyo), Eliza Cihazı (ELx808-IU, Bio-Tek), Derin dondurucu (-20, -86) (Thermo), buzdolabı, sıvı azot kapları, otomatik pipetler (Eppendorf), kar-buz makinesi (Scotsman), su banyosu (Clifton), 12 Kanallı mikropipet (Eppendorf), dağıtıcı pipet (Eppendorf), IX 70 Inverted mikroskop (Olympus).

### **2.6. Kullanılan Araç ve Gerecin Hazırlanması**

Çalışmalarda kullanılan bazı cam ve metal malzemeler alüminyum folyolara sarılı olarak sterilizatörde 180 °C'de 2 saat, bazı cam ve plastic malzemeler ile sıvı solüsyonlar alüminyum folyolara sarılı olarak otoklavda 121 °C, 1,5 atm/Hg basınçta 20 dakika, süre ile steril edilerek kullanılmıştır. Kullanılan bazı sıvı kimyasallar 0,2 µm aralıklı selüloz nitrat filtreden geçirmek suretiyle steril edilerek kullanılmıştır.

### **2.7. Test Maddelerinin Dozlarının Hazırlanması**

Test maddelerine uygulanan konsantrasyonlar dilüsyon yöntemi uygulanarak yapılmıştır. Konsantrasyon aralığı olarak 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 80 µg/ml aralığı tercih edilmiştir. Bu konsantrasyonlar daha önce laboratuvarımızda yaptığımız ön denemeler ve literatürde benzer malzemelerle yapılmış olan çalışmalar (Genç

ve ark., 2018) göz önünde bulundurularak belirlenmiştir. Konsantrasyonlar hazırlanırken çözücü ortam olarak besi yeri kullanılmıştır.

## **2.8. Yöntem**

### **2.8.1. HaCaT hücrelerinin kültürü**

Deneylede sağlıklı hücre hatları olan HaCaT (insan deri keratinosit) hücreleri kullanılmıştır. HaCaT hücreleri için %10'luk inaktive edilmiş Fetal Sığır Serumu, % 1 Penisilin streptomisin ve %7,5 NaHCO<sub>3</sub> içeren Dulbecco's Modified Eagle's besiyeri kullanılmıştır. Hücreler 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklar içerisinde %5 CO<sub>2</sub> içeren 37 C'lik inkübatörde yetiştirilerek deneyler için hazır hale getirilmiştir.

### **2.8.2. Hücrelerin testler için hazırlanması**

Uygun kosullarda çoğalmaya bırakılan hücreler flask yüzeyini %70 oranında kapladıkları zaman PBS-EDTA ile 2 kez yıkandıktan sonra tripsin-EDTA ile muamele edilerek flask tabanından kaldırılmıştır. Thoma lamı yardımıyla 3 kez sayılarak MTT testi için 96 kuyucuklu plakaların her kuyucuğunda belirlenen sayıda (10000) hücre olacak şekilde aktarılmıştır. Hücrelerin yapışması ve yeni ortama alışması için plakalar 37°C'de 24 saat inkübe edilmişlerdir. 24 saat inkübasyon süresi sonunda hücrelerin üzerindeki besiyerleri plakaların ters çevrilmesi suretiyle uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin üzerine test maddelerinin sitotoksik etkilerini belirlemek üzere, test maddelerinin istenen konsantrasyonlarını içeren taze besiyerleri ilave edilip 24 saat 37°C'de CO<sub>2</sub> inkübatöründe inkübe edilmiştir.

### **2.8.3. MTT ölçümü**

Test maddeleri ile 24 saatlik muameleye tabi tutulan hücreler üzerindeki medyum uzaklaştırılarak, hücreler 5 mg/ml MTT solüsyonu ile 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası uzaklaştırılmıştır. Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözünmesi için her bir kuyucuğa 0,1 ml DMSO ilave edilmiştir. Plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri ELISA cihazında 570 nm dalga boyunda okutulmuştur. Test maddesi ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılık oranı % 100 olarak

kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları yüzde olarak ifade edilmiştir. Bu testler 3 kez 8 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

#### **2.8.4. Hücre içi ROS seviyesi ölçümü ile sitotoksosite belirlenmesi**

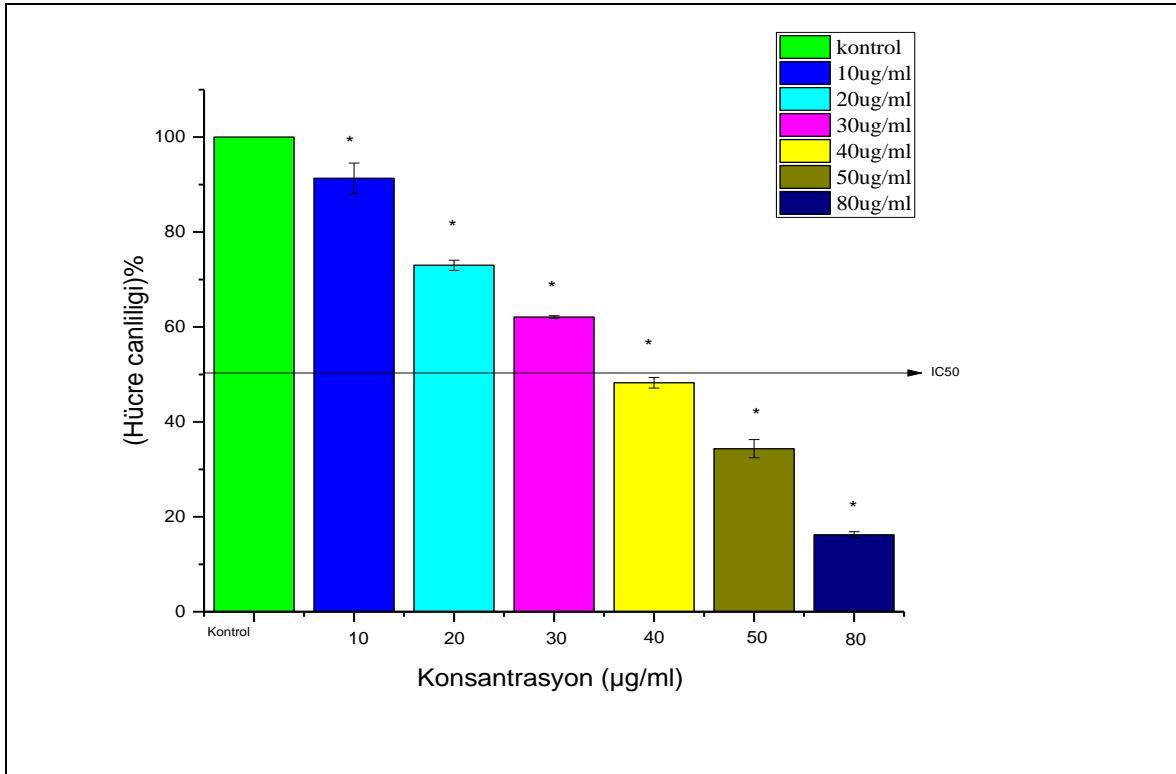
ROS deneyi Abcam marka ROS assay kit ile yapılmıştır. Deney basamakları üretici firmanın talimatları doğrultusunda uygulanmıştır. Hücreler uygun yoğunlukta siyah renkli 96 lı plakalara ekilerek 24 saatlik 37°C %5CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edilmiştir. Daha sonra ROS inhibitörü negatif kontrol hücrelerine eklenerek 30 dakika boyunca 37 °C de inkübe edilmiştir. ROS / süperoksit saptama karışımı test maddeleri ile birlikte hücrelerle muamele edilmiş ve 30-60 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra örnekler floresan mikropilaka okuyucuda Ex=488nm, Em=520nm olacak şekilde okutulmuştur. Bu test 3 kez tekrarlanmıştır

### 3. BULGULAR

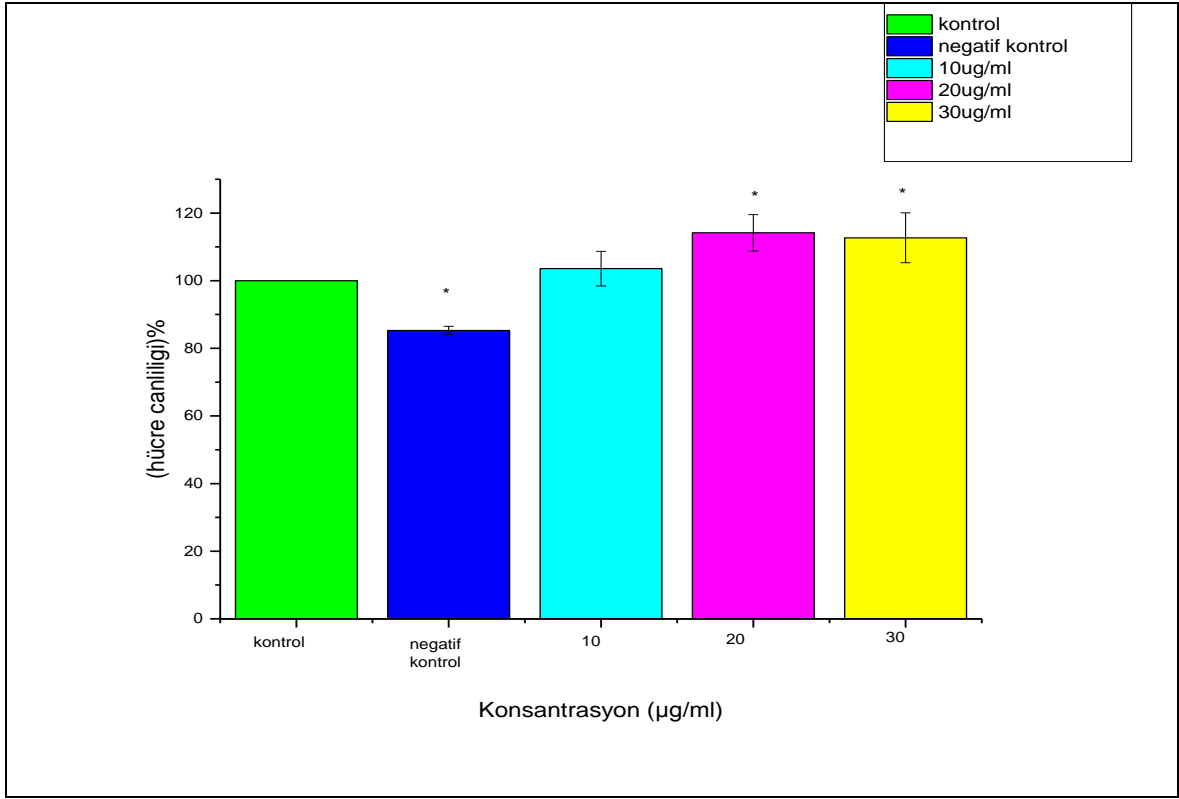
#### 3.1. MTT ve ROS Testleri Sonuçları

Test maddelerinin uygun konsantrasyonları, sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla HaCaT hücreleri üzerine 24 saat uygulanmış, sonrasında hücrelere MTT verilmiş ve ELISA plate okuyucusunda sonuçlar değerlendirilmiştir. Daha sonra 24 saat süre ile seçilmiş konsantrasyonlarda ROS oluşturma potansiyelleri tespit edilmiştir. Örnekler floresan mikropilaka okuyucuda değerlendirilmiştir.

##### 3.1.1. Tasarlanmış MicNo ZnO Partiküllerinin MTT ve ROS testleri sonuçları



**Şekil 3.1.** MicNo-ZnO'nun, HaCaT hücreleri üzerindeki 24 saatlik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (\* Kontrolle göre anlamlı grupları göstermektedir,  $p < 0.05$  kabul edilmiştir)

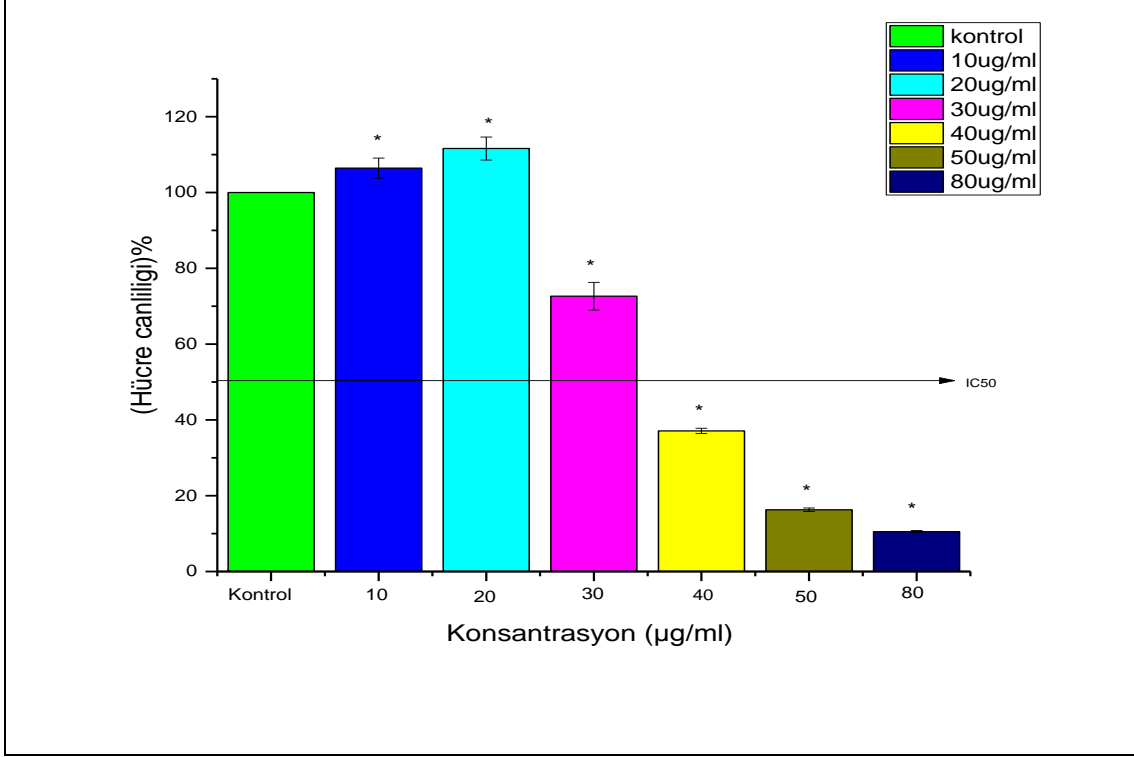


**Şekil 3.2.** *MicNo-ZnO'nun, HaCaT hücreleri üzerindeki 24 saatlik etkisinin hücre içi ROS seviyesi ölçümü ile değerlendirilmesi. (\* Kontrolle göre anlamlı grupları göstermektedir, p<0.05 kabul edilmiştir)*

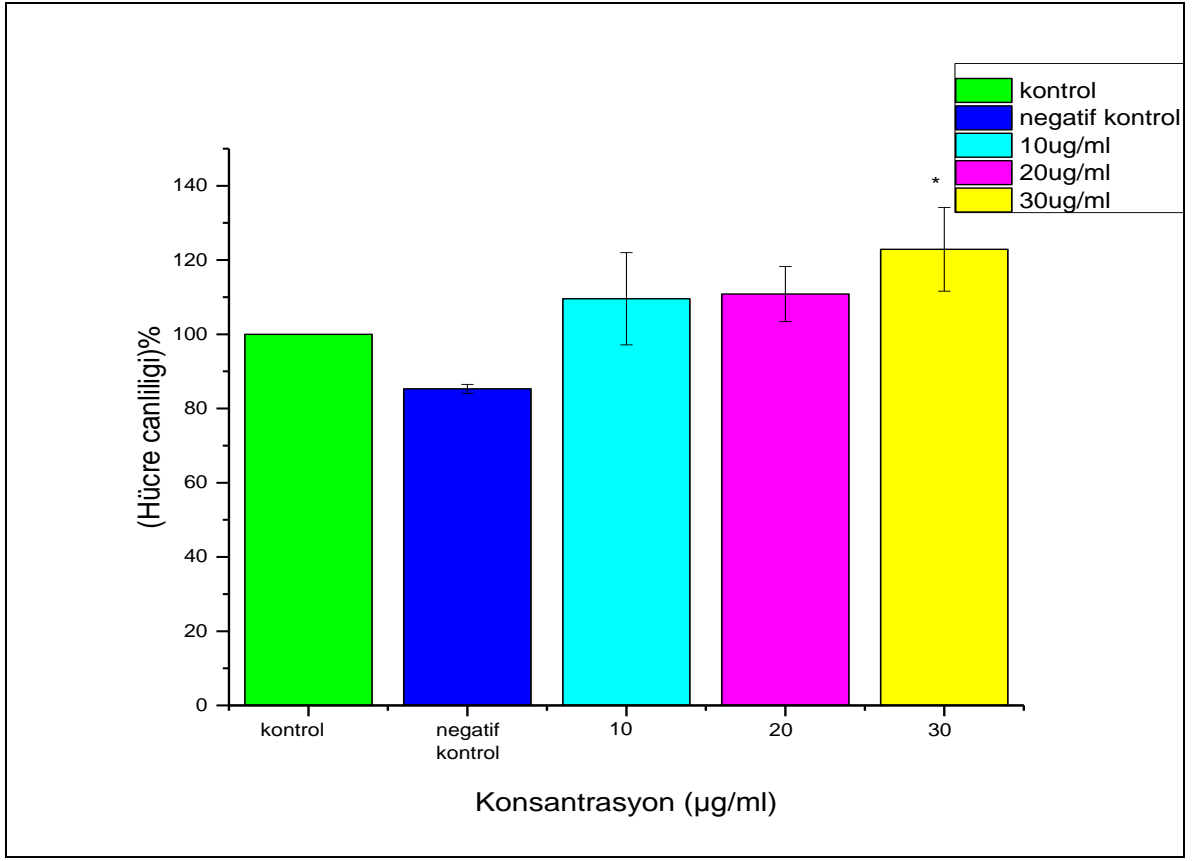
Şekil 3.1 farklı MicNo ZnO konsantrasyonlarının, MTT testine göre HaCaT hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkilerini göstermektedir, HaCaT hücreleri 10 µg/ml'lik konsantrasyona maruz kaldığında hücre canlılığında % 10 oranında düşüş saptanmıştır. 20 µg/ml'lik konsantrasyona maruz kaldığında ise hücre canlılığında % 25 oranında azalma görülmüştür. 30 µg/ml'lik konsantrasyonda % 37, 50 µg/ml'lik konsantrasyonda % 62 oranında, 80 µg/ml'lik konsantrasyonda %85 oranında düşüş belirlenmiştir. IC50, 42 ug /ml olarak hesaplanmıştır.

Şekil 3.2'deki sonuçlar, kontrol grubuna kıyasla MicNo ZnO'nun farklı konsantrasyonlarının ROS oluşumundaki etkilerini göstermektedir. ROS seviyesi, 10 µg/ml konsantrasyonda yaklaşık % 2 oranında artarken, 20 ve 30 µg/ml'lik konsantrasyonlarda % 18 oranında arttığı görülmüştür.

### 3.1.2. HPDMS kaplı tasarlanmış MicNo ZnO Partiküllerinin MTT ve ROS testleri sonuçları



**Şekil 3.3.** HPDMS ile kaplanmış MicNo-ZnO'nun farklı konsantrasyonlarının, HaCaT hücreleri üzerindeki 24 saatlik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (\* Kontrolle göre anlamlı grupları göstermektedir,  $p < 0.05$  kabul edilmiştir)

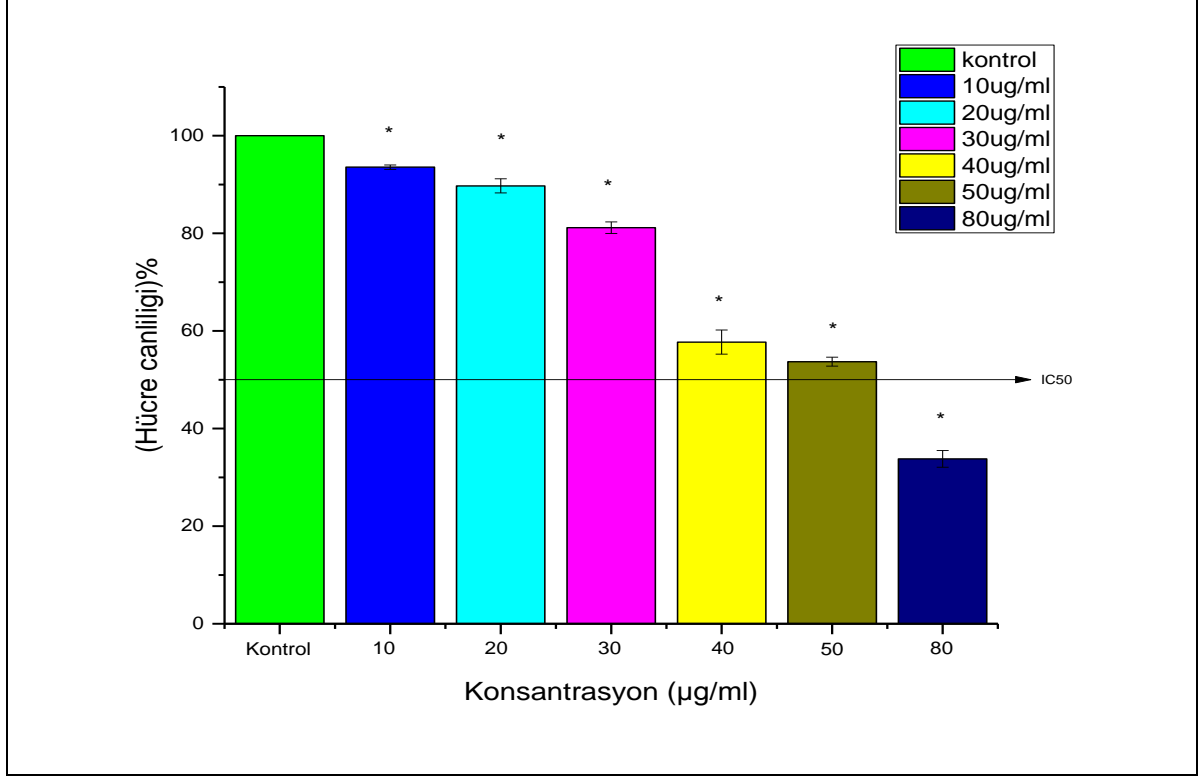


**Şekil 3.4.** HPDMS ile kaplanmış MicNo-ZnO'nun farklı konsantrasyonlarının, HaCaT hücreleri üzerindeki 24 saatlik etkisinin hücre içi ROS seviyesi ölçümü ile değerlendirilmesi. (\* Kontrolle göre anlamlı grupları göstermektedir,  $p < 0.05$  kabul edilmiştir)

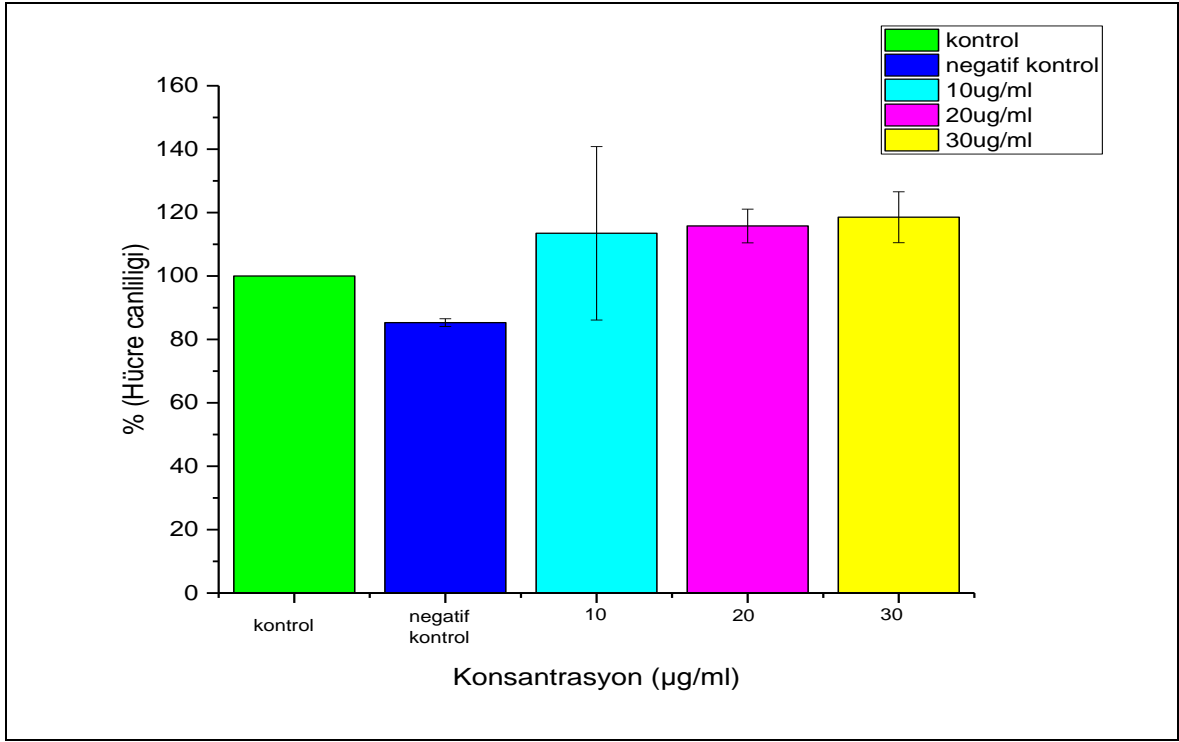
Şekil 3.3' deki sonuçlar, MTT testine göre 10 µg/ml'lik konsantrasyonda HPDMS ile kaplı MicNo-ZnO'nun, hücre canlılığının % 5 oranında, 20 µg/ml'lik konsantrasyonda ise %10 oranında arttığı, herhangi bir toksisite etkisine neden olmadan, HaCaT hücrelerinin hücre canlılığı üzerindeki olumlu etkilerini göstermektedir. 30 µg/ml konsantrasyonda hücre canlılığı % 25 oranında azalmıştır. Hücrelerin canlılığı sırasıyla 40 µg/ml konsantrasyonda % 35 oranında, 80 µg/ml konsantrasyonunda belirgin bir şekilde % 90 oranında azalmıştır. IC50, 43 µg/ml konsantrasyonundadır.

Şekil 3.4'de HPDMS ile kaplanmış MicNo-ZnO'nun, 10 µg/ml'lik konsantrasyonda 10 % oranında, 20 µg/ml'lik konsantrasyonda 15 % oranında, 30 µg/ml'lik konsantrasyonda 25 % oranında ROS üretimi kapasitesinin arttığı saptanmıştır.

### 3.1.3. PDMS kaplı tasarlanmış MicNo ZnO Partiküllerinin MTT ve ROS testleri sonuçları



Şekil 3.5. PDMS ile kaplanmış MicNo-ZnO'nun farklı konsantrasyonlarının, HaCaT hücreleri üzerindeki 24 saatlik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi (\* Kontrolle göre anlamlı grupları göstermektedir,  $p < 0.05$  kabul edilmiştir)



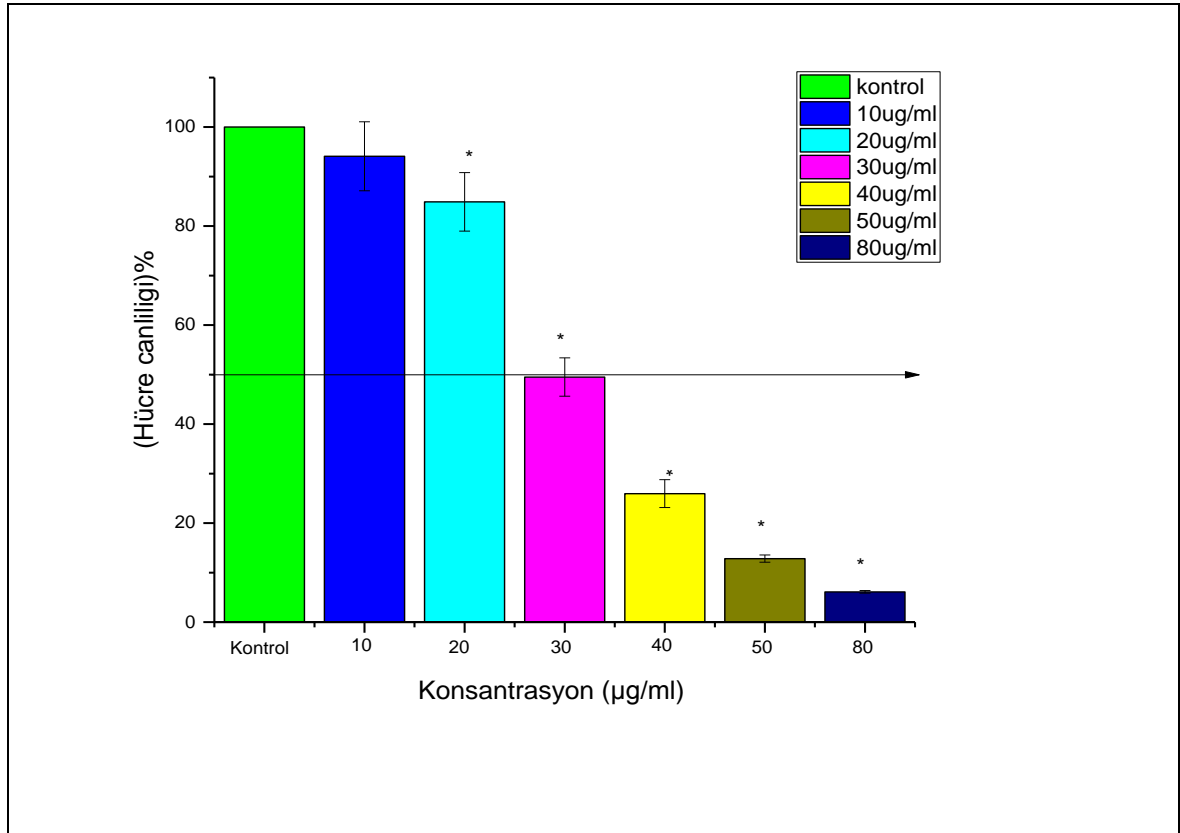
**Şekil 3.6.** PDMS ile kaplanmış MicNo-ZnO'nun farklı konsantrasyonlarının, HaCaT hücreleri üzerindeki 24 saatlik etkisinin hücre içi ROS seviyesi ölçümü ile değerlendirilmesi. (\* Kontrolle göre anlamlı grupları göstermektedir,  $p < 0.05$  kabul edilmiştir)

MTT analizine göre, Şekil 3.5'de, PDMS ile kaplı MicNo-ZnO'nun hücre canlılığında, 10 µg/ml'lik konsantrasyonda 7 % oranında, 20 µg/ml'lik konsantrasyonda 10 % oranında, 30 µg/ml'lik konsantrasyonda 20 % oranında hücre sayısında düşüşe neden olduğu saptanmıştır. Diğer bir yandan, 40 µg/ml konsantrasyonunda % 55 oranında, 80 µg/ml konsantrasyonda ise, % 65 oranında azalma belirlenmiştir. Bununla birlikte, PDMS ile kaplanmış MicNo ZnO'nun yüksek konsantrasyonlarının, HPDMS ile kaplı MicNo ZnO ve MicNo-ZnO'nun yüksek konsantrasyonları ile karşılaştırıldığında daha az sitotoksik olduğu gözlenmiştir. PDMS ile kaplanmış MicNo ZnO'nun IC50 değeri, 58 µg/ml konsantrasyonundadır.

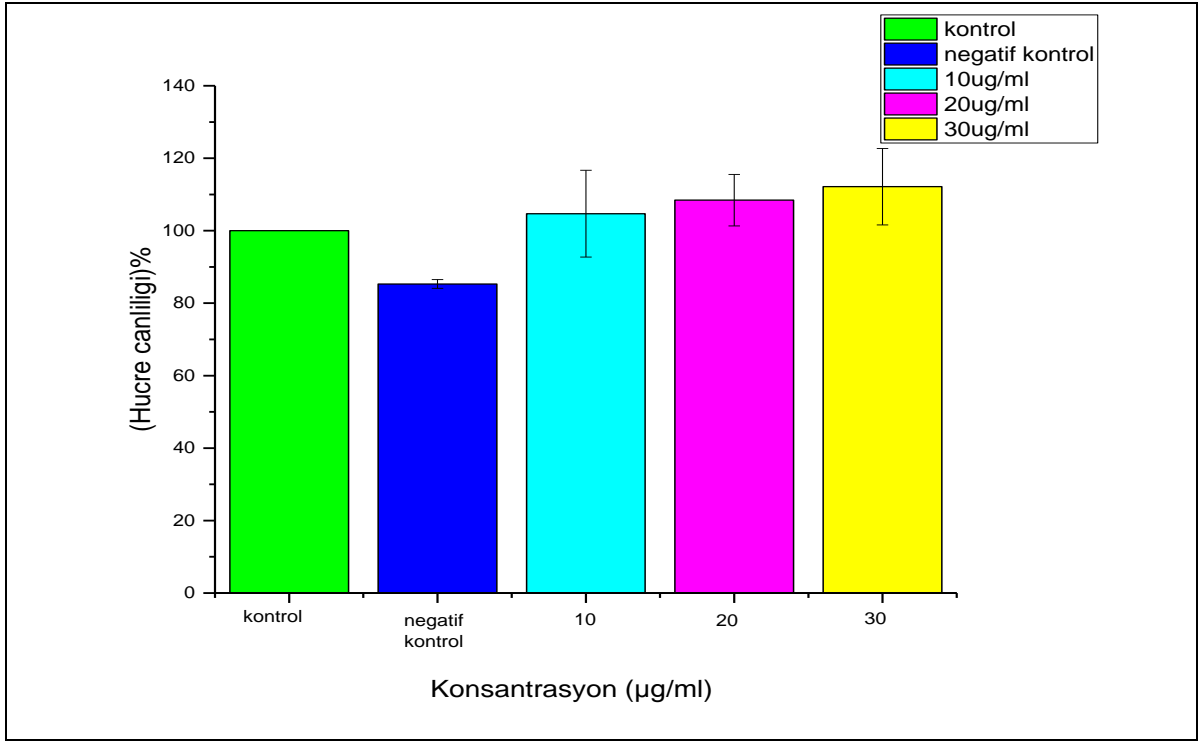
Şekil 3.6'daki ROS grafiğine bakıldığında, PDMS ile kaplanmış MicNo ZnO ile kaplanmamış MicNo ZnO (Şekil 3.2) karşılaştırıldığında 20 ve 30 µg/ml konsantrasyonlarında nispeten fazla ROS oluşumunu önlediği görülmektedir. PDMS ile kaplanmış MicNo-ZnO'nun, 10 µg/ml'lik konsantrasyonda 10 % oranında, 20 µg/ml'lik

konsantrasyonda 15 % oranında, 30 µg/ml'lik konsantrasyonda 20 % oranında ROS üretimi kapasitesinin arttığı saptanmıştır.

### 3.1.4. Silika kaplı tasarlanmış MicNo ZnO Partiküllerinin MTT ve ROS testleri sonuçları



**Şekil 3.7.** Silika ile kaplanmış MicNo-ZnO'nun farklı konsantrasyonlarının, HaCaT hücreleri üzerindeki 24 saatlik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi (\* Kontrolle göre anlamlı grupları göstermektedir,  $p < 0.05$  kabul edilmiştir)

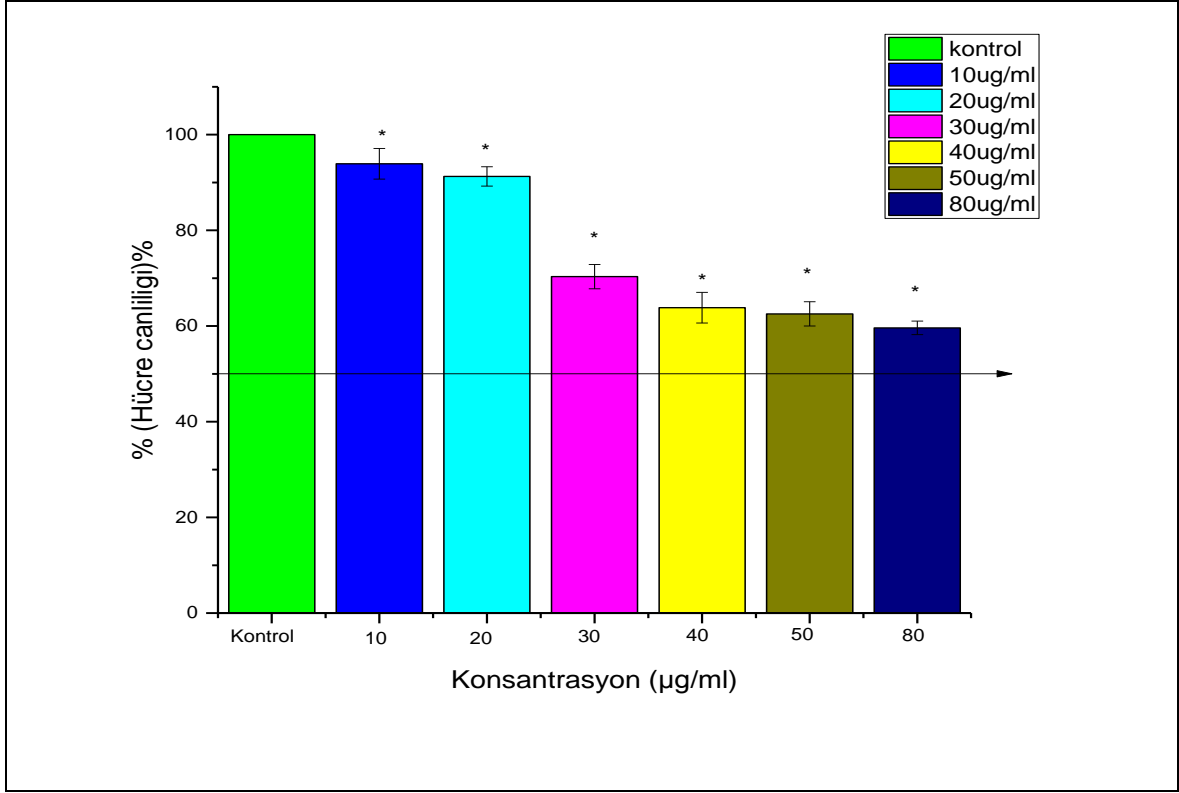


**Şekil 3.8.** Silika ile kaplanmış MicNo-ZnO'nun farklı konsantrasyonlarının, HaCaT hücreleri üzerindeki 24 saatlik etkisinin hücre içi ROS seviyesi ölçümü ile değerlendirilmesi. (\* Kontrolle göre anlamlı grupları göstermektedir,  $p < 0.05$  kabul edilmiştir)

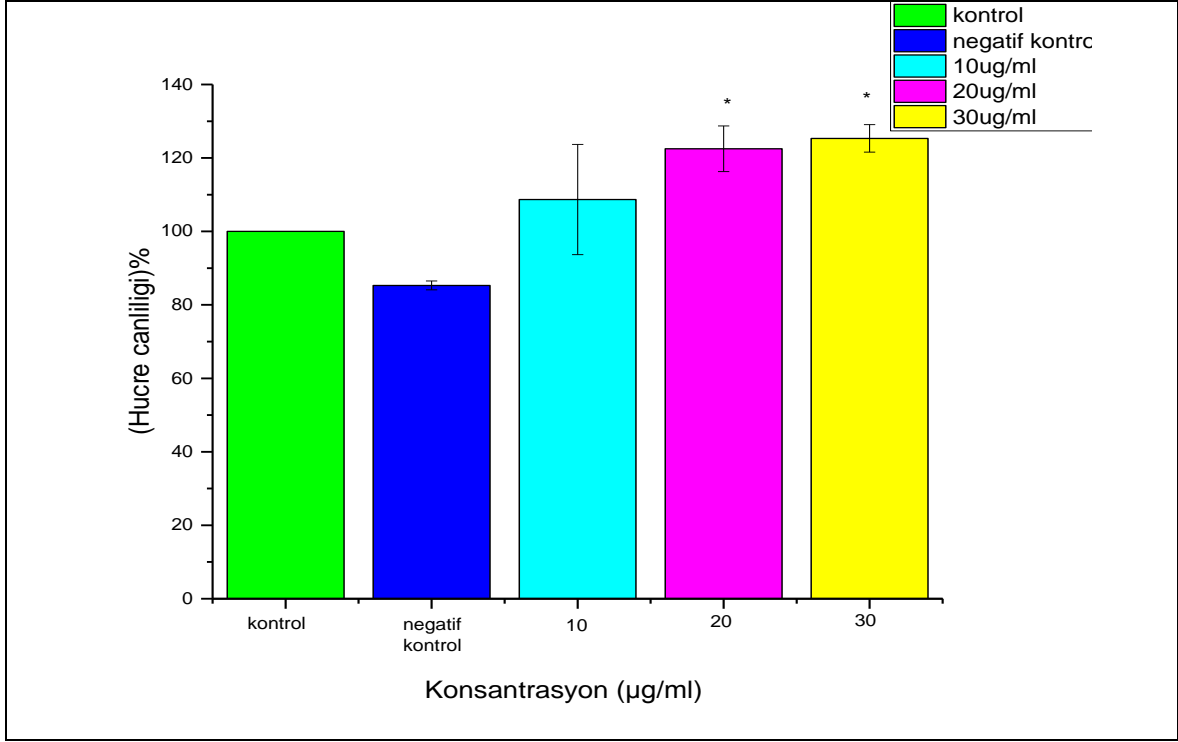
Silika ile kaplı MicNo-ZnO'nun MTT analizinde, 10 µg/ml'lik konsantrasyonda % 95 oranında ve 10 µg/ml'lik konsantrasyonda % 83 oranında hücre yaşayabilirliği içinde daha az toksik olarak kabul edilebilir. Ancak konsantrasyonu 30 µg/ml dan 80 µg/ml kadar arttırdığımız zaman, belirgin bir şekilde hücre canlılığını % 50 oranından % 7 oranına düşmüştür. IC50 35 µg/ml konsantrasyondadır.

ROS tahlilinde ise Şekil 3.8'de Silika ile kaplanmış MicNo-ZnO, uygulamanın, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında % 10, 20 ve 30 µg/ml'lik dozlarda hafifçe ROS oluşumunu indüklediğini gösterdi; ROS oluşumunun uyarılmasında MicNo-ZnO, ayrıca silika, oksidatif stresi indüklemeye kabiliyetine sahip olmadığından diğer kaplama malzemesinden daha iyidir

### 3.1.5. TECS kaplı tasarlanmış MicNo ZnO Partiküllerinin MTT ve ROS testleri sonuçları



Şekil 3.9. TECS ile kaplanmış MicNo-ZnO'nun farklı konsantrasyonlarının, HaCaT hücreleri üzerindeki 24 saatlik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. (\* Kontrolle göre anlamlı grupları göstermektedir,  $p < 0.05$  kabul edilmiştir).

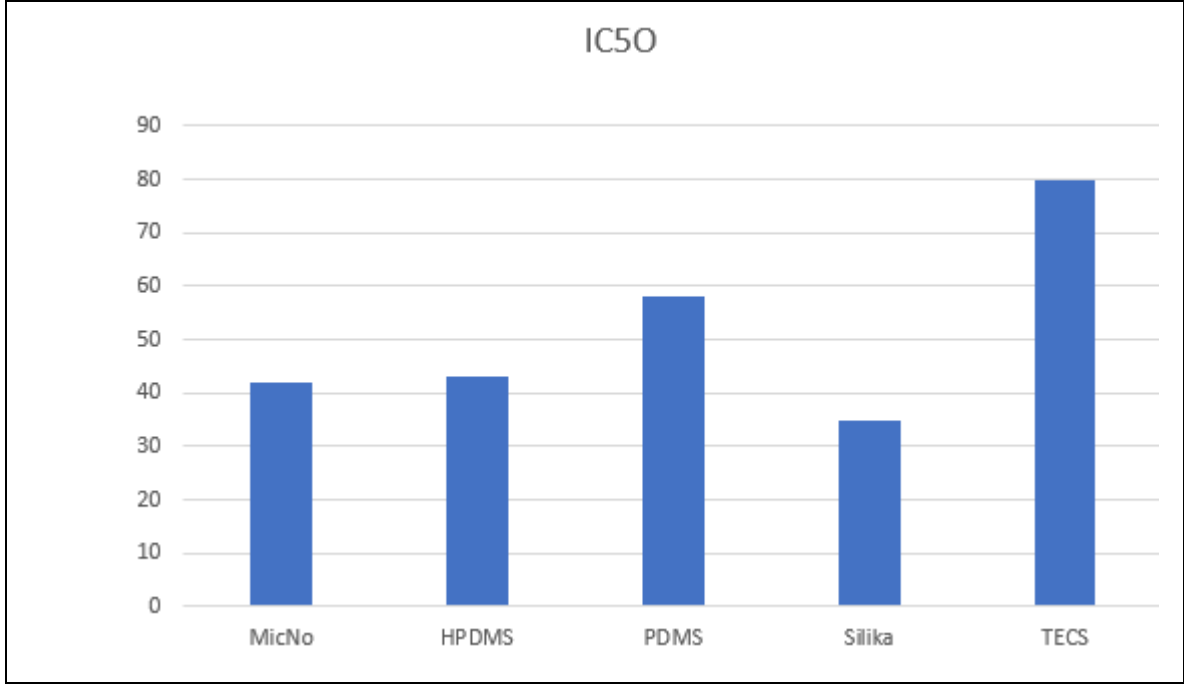


**Şekil 3.10.** TECS ile kaplanmış MicNo-ZnO'nun farklı konsantrasyonlarının, HaCaT hücreleri üzerindeki 24 saatlik etkisinin hücre içi ROS seviyesi ölçümü değerlendirilmesi (\* Kontrolle göre anlamlı grupları göstermektedir,  $p < 0.05$  kabul edilmiştir)

TECS ile kaplanmış MicNo-ZnO'nun MTT analizine göre (şekil 3.9), 10 µg/ml'lik konsantrasyonda % 7 oranında ve 20 µg/ml'lik konsantrasyonda % 10 oranında çok düşük toksisite göstermiştir. Aynı zamanda dozu 30 ila 80 µg/ml arasında arttırmak, hücre canlılığında, % 70 ila % 60 oranında olmak üzere çok az değişikliğe yol açmıştır.

TECS ile MicNo ZnO kaplanmasının ROS üretim analizinde 10 µg/ml'lik konsantrasyonda % 10 oranında ve 30 µg/ml'lik konsantrasyonda % 25 oranında ROS oluşumunu arttırdığı ve bu zaman MicNo-Zno kaplanması, kaplanmamış MicNo ZnO'dan daha fazla ROS formasyonu yarattığı görülmüştür.

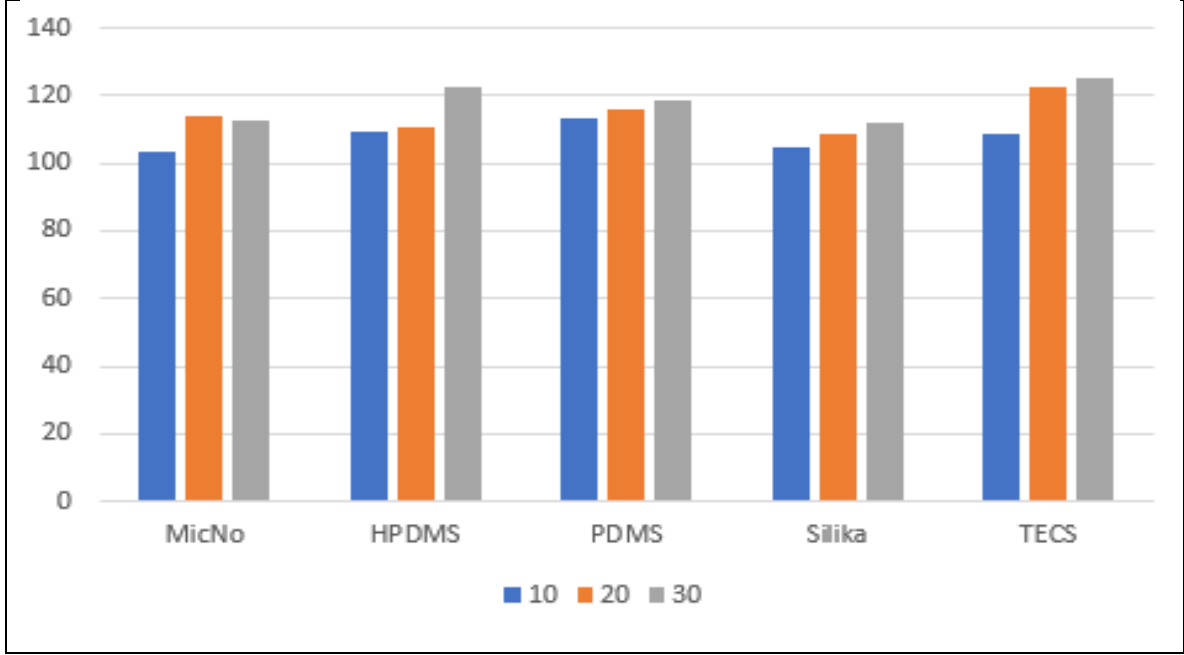
### 3.1.6. Test maddelerinin IC50 sonuçlarının değerlendirilmesi



Şekil 3.11. Test maddelerinin IC50 sonuçlarının değerlendirilmesi.

MTT deney sonuçlarına göre farklı kaplama malzemeleri ile kaplanmış MicNo ZnO NP'lerin IC50 değerlerine bakıldığında, hücre canlılığını en az etkileyen kaplama malzemesinin TECS olduğu saptanmıştır.

### 3.1.7. Test maddelerinin ROS sonuçlarının değerlendirilmesi



Şekil 3.11. Test maddelerinin ROS sonuçlarının değerlendirilmesi

Farklı kaplama malzemeleri ile kaplanmış MicNo ZnO NP'lerin ROS analiz değerlerine bakıldığında, hücre canlılığını en az etkileyen kaplama malzemesinin Silika olduğu gözlemlenmiştir.

#### 4. TARTIŞMA

ZnO NP sitotoksitesini azaltmada daha etkili bir strateji hücrelerin içine NP alımını azaltmak ve solüsyonda çözünmelerini engellemektir. ZnO NP'lerin toksisitesi ile ilgili bazı çalışmalar, NP kaynaklı oksidatif stres ile sitotoksitede merkezi bir rol oynayan yedi farklı hücrede doza bağlı sitotoksite göstermiştir. Bugüne kadar yapılan çalışma önemli olmasına rağmen, kesin NP çözünme mekanizmaları ve bunların ZnO nanopartiküllerinin sitotoksitesini nasıl etkilediği henüz net değildir. Bu süreç için kritik olan, NP biyolojik etkileşimlerinde özel öneme sahip olan NP'lerin yüzey özellikleridir (Luo ve ark., 2014).

ZnO NP'ler gibi metal oksit nanoparçacıkları (NP'ler), kozmetik losyonlarında yaygın olarak kullanılmaktadır, çünkü bu bileşiklerin etkili UV emici özelliklere sahip olduğu bilinmektedir, bu nedenle başarılı UV blokerleri olarak işlev görürler. Genel olarak, ZnO NP'leri, mikroelektronik cihazlarda yarı iletken olarak kullanım gibi endüstriyel amaçlar için ve fotokatalitik aktivite ile su kirleticilerin bozulmasını hızlandırmak için kullanılmıştır. Dahası, son zamanlarda, ZnO NP'lerinin bu nanomalzemelerin çekici kimyasal özellikleri nedeniyle biyomedikal ve kanser uygulamalarında kullanım potansiyeline sahip olduğu bulunmuştur. Önceki çalışmalar, ZnO NP'lerin, kemoterapötik ajanlarla karşılaştırıldığında terapötik endeksleri aşma kabiliyetine sahip yüksek derecede kanser hücresi seçiciliği gösterdiğini bildirmiştir (Bai ve ark., 2017).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, sadece  $Zn^{2+}$  iyonlarının değil, aynı zamanda yüzey kimyasının, özellikle ZnO NP'lerinden ROS oluşumunun, ZnO toksisitesinde çok önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Şimdiye kadar, yüzeysel olarak fonksiyonel hale getirilmiş, biyolojik ortamlarda kararlı, toksisitesi düşük ve çok parlak olan ZnO NP'lerin sentezlenmesi için uygun yöntemler geliştirmek hala büyük bir çaba gerektirmektedir (Luo ve ark., 2014).

Suvaci ve arkadaşları (2012), nano boyutların rolünü koruyarak nanopartiküllerin yan etkilerini gidermek için MicNo (= Micron + nano) partikülleri olarak adlandırılan nano primer partiküllerden oluşan altıgen plaka şeklindeki MicNo-ZnO partiküllerini tasarlamışlardır. MicNo antimikrobiyal aktiviteye sahiptir (Suvaci ve ark., 2019). Genç ve arkadaşlarının (2018) yaptığı çalışmada hem mikro hem de nano boyutlu partiküllerden oluşan ve HaCaT hücreleri üzerinde incelenen MicNo-ZnO partikülleri, ZnO nanopartiküllerine kıyasla daha az sitotoksite, genotoksite ve fototoksite göstermiştir.

Toksisitedeki bu farkın, hücrelere nüfuz etme eğilimlerini etkileyebilecek olan partiküllerin boyutundaki farklılıklarla ilgili olduğu rapor edilmiştir (Genç ve ark., 2018).

Bu tez çalışmasında, MicNo-ZnO'yu PDMS, HPDMS, TECS ve Silika ile kaplayarak kozmetik uygulamalarda kullanımının yaygınlaşmasını hedefleyerek, yüzey kaplamalarının MicNo-ZnO tozlarının sitotoksisite özelliklerini nasıl etkilediğini belirlemeyi amaçladık. Yüzey modifikasyonu ve doping, çinko oksit nanopartiküllerinin sitotoksisite etkilerini azaltmak ve kontrol etmek için temel bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Yüzey modifikasyonu, partiküllerin yüzey kimyasını değiştirerek toksisiteyi en aza indirebilir. Polietilen glikol, ZnO NP yüzeyinin, ZnO NP ile karşılaştırıldığında hücresel alımın en aza indirilmesi sonucunda değiştirilebileceği iyi bir örnektir (Luo, 2014; Sruthi ve ark., 2018). Çinko oksitli yüzey kaplama ayrıca hücreleri oksidatif strese karşı koruyabilir ve sitotoksisite etkilerini azaltabilir (Ramasamy ve ark., 2014). Bu arada, yüzey modifikasyonu nanopartiküllerin sitotoksik etkisine karşı esasen çinko iyonlarının salınımını minimize ederek, hücrelerle yüzey temasını azaltarak ve serbest radikal oluşumunu önleyerek bir koruma yolu sağlar (Sruthi ve ark., 2018). Manganezli doping çinko oksit NP'nin stabiliteğini arttırdığı tespit edilen sitotoksisiteyi azaltmaya yardımcı olur. Ek olarak Sn ile doping yapmanın, antibiyotiklere karşı direnç kabiliyetine sahip bakterilere daha fazla antibakteriyel aktivite gösterdiği, buna karşın sitotoksisitenin azaldığı ancak çok fazla olmadığı görülmüştür (Tariq Jan ve ark., 2013).

MTT testi sonuçlarına göre 10, 20 ve 30 µg/ml konsantrasyonlarda MicNo ZnO NP'leri (Şekil 3.1), hücrelerin canlılığını sırasıyla % 7, % 10 ve % 20 oranında azalttığı saptanmıştır. Diğer yandan, 40 µg/ml'den başlayan konsantrasyon hücre canlılığını % 55'e, 80 µg/ml'lik konsantrasyon hücre canlılığını % 35'e kadar düşürmüştür. Ancak PDMS ile kaplanmış MicNo ZnO NP'leri ile HPDMS ile kaplanmış MicNO ZnO NP'lerinin yüksek konsantrasyonları karşılaştırıldığında, PDMS'nin daha az toksik olduğu belirlenmiştir. PDMS ile kaplı MicNo-ZnO NP'lerinin IC50 değeri 48 µg / ml'dir.

Şekil 3.2'deki ROS sonuçlarına göre, MicNo ZnO'nun PDMS ile kaplanmasının, 20 ve 30 µg/ml konsantrasyonlarında kaplanmamış MicNo ZnO ROS deneyine kıyasla (Şekil 3.6.) nispeten daha fazla ROS oluşumunu önlediğini tespit edilmiştir; 30 µg/ml ROS oluşumunu sırasıyla % 10 ve % 15 arttırmıştır, ancak 10 µg/ml konsantrasyonda % 20 artışla daha fazla ROS oluşumu görülmüştür.

Bu tez çalışmasında, önceki çalışmalarımızda, MicNo ZnO'nun sitotoksitesinin azaltılmasında farklı kaplama malzemelerinin faydalı rolünü doğruladık.

PDMS yaygın olarak kullanılmaktadır (Çavuşoğlu, 2013). MTT ve ROS sonucuna göre deneyimizde PDMS ile kaplı MicNo-ZnO, IC50'nin 58 µg/ml konsantrasyonunda ve ROS seviyesinin, 10 µg/ml'lik konsantrasyonda 10 % oranında, 20 µg/ml'lik konsantrasyonda 15 % oranında, 30 µg/ml'lik konsantrasyonda 20 % oranında ROS üretimine neden olduğu MicNo ZnO'nun sitotoksitesinin azaltılmasında PDMS en iyi kaplanmış yöntem olarak kabul edilir. Pek çok çalışmada, hücre çoğalması ve ROS oluşumundaki olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak için nanoparçacıkların kaplanmasında PDMS kullanılmıştır ve birçok hücre tipindeki toksisiteyi araştırılmıştır. Bir çalışmada, farklı PDMS malzemelerine maruz kalan fare 3T3 fibroblast kültürlerinin çoğalmasında hiçbir olumsuz etki gözlenmemesi farklı PDMS materyallerinin güvenliğine dikkat çekmiştir (Delivopoulos ve ark., 2011). Ayrıca, intraoküler lens uygulamaları için farklı PDMS moleküler ağırlıklarına dayanan polisiloksan bazlı üre (PSU) elastomerlerini sentezlemeyi amaçlayan başka bir çalışmada da hücre proliferasyonu üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığı HaCaT hücrelerinde gözlemlenmiştir (Riehle ve ark., 2019). PDMS ayrıca özellikle göz içi lenslerin sentezlenmesinde çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılır. İyi şeffaflık özelliklerine sahip olması nedeni ile hücre morfolojisi ve canlılığını değiştirmedeği L929 fare fibroblastlarında rapor edilmiştir (Riehle ve ark., 2019 ; Jellali ve ark., 2017). Yukarıda belirtildiği gibi PDMS birçok uygulamada güvenilir olarak kabul edilir ve kozmetiklerde yaygın olarak kullanılır, bu nedenle PDMS ile nanopartiküllerin kaplanması toksisiteyi azaltabilir ve birçok çalışmada hücre proliferasyonunun korunmasında ve ekstra ROS oluşumunun önlenmesindeki rolü araştırılmıştır (Fisichella ve ark. 2012).

Literatürde HPDMS ile kaplanmış MicNo-ZnO'nun hücre canlılığı ve toksisitesi üzerindeki etkisine ilişkin kanıt yoktur; bu tez çalışmasında, hücre canlılığının % 5 arttığı ve hücre çoğalması üzerindeki 10 ve 20 µg/ml konsantrasyonlarda HPDMS ile kaplamanın MicNo-ZnO ile pozitif etkisini araştırdık. Hücre canlılığı sırasıyla % 5 ve % 10 artarken, 30 µg/ml konsantrasyonda hücre canlılığı % 25 oranında azalmıştır. Hücrelerin canlılığı sırasıyla 40 µg/ml konsantrasyonda % 35 oranında, 80 µg/ml konsantrasyonunda belirgin bir şekilde % 90 oranında azalmıştır. IC50, 43 µg/ml konsantrasyonundadır ve bu, 10 ila 20 µg/ml'lik konsantrasyonlarda HPDMS'nin hücre çoğalmasını arttırmada ve nanopartiküllerin

sitoksisite etkilerini kontrol etmede etkili bir kaplama yöntemi olduğunu göstermiştir. Diğer taraftan HPDMS, MicNo-ZnO kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hafifçe ROS oluşumunu indüklerken, MTT sonucu aynı konsantrasyonlarda hücre çoğalmasını arttırmaktadır. Bu arada, nanopartiküllerin HPDMS ile kaplanmasının olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak ve cildi UV ışığına karşı korumadaki rolünü analiz etmek için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Nanoparçacıkların veya çinko oksidin, hücrelerin nanomalzemelerin zararlı etkilerine karşı korunmasında tecrübe ile kaplanmasının rolü bu tez çalışmasında araştırılmıştır. Çalışmamızda, MicNo ZnO'nun TECS ile kaplanmasının teknik olarak özellikle yüksek konsantrasyonlarda bile hücreleri koruyabildiği belirlenmiştir. 80 µg/ml'lık konsantrasyonda bile hücre canlılığını % 30 oranında azalttığı gözlemlenmiştir. Ancak TECS ile kaplama, kontrol grubu ile kıyasla hafif bir yüksek ROS oluşumuna neden olmuştur.

Önceki araştırmalar, ZnO NP'lerinin trietoksikapirilsilan ile kaplanmasının, fare akciğer epitel hücre hattında ZnO NP ile karşılaştırıldığında daha az toksisite etkisi gösterdiğini ortaya koymuştur. MTT deneylerinde daha iyi bir hücre metabolik aktivite gözlenir. Ek olarak, çinko oksit TECS kaplamasına göre ROS üretimi daha fazla görülmektedir (Zhang ve ark., 2014). TECS ile kaplanan çinko oksit nanopartiküllerinin insan karaciğer stellat hücreleri üzerindeki etkileri başka bir çalışmada incelenmiştir. Bu çalışmada TECS ile kaplanmış ZnO NP'ler ile hücrelerin muamele edilmesi sonucunda MTT analiz sonuçlarına göre, konsantrasyon artışının, hücre canlılığında belirgin bir şekilde azalmaya neden olduğu rapor edilmiştir (Osmond ve ark., 2014).

Başka bir çalışmada da çinko oksit silika ile kaplanmış ve kolorektal hücre hatları ile muamele edilmeden önce mide suyunun nanopartiküller üzerindeki modifikasyon etkilerini analiz etmek için sentetik tükürük ve sentetik mide suyu gibi alım sıvılarına maruz bırakılmıştır. Sonuçlar, ZnO NP'nin silika ile kaplanmasının, NP'in nötr ve asidik durumda iyonların ayrışmasını engelleyerek NP'nin kolorektal hücre hatları üzerindeki toksisite etkilerini en aza indirmekte çok etkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu çalışma, yüksek dozlarda silika kaplı ZnO NP'nin toksik olabileceğini ve dozun uygulamadan önce dikkate alınması gerektiği anlamına geldiğini göstermiştir (Chia ve Leong, 2016).

Ek olarak, silika kaplı ZnO NP'leri, akut toksisiteyi indüklemeye üzerindeki etkilerini analiz etmek için farelerde araştırılmıştır. 10 mg / kg ve 30 mg / kg dozlarda intravenöz çinko

oksit NP enjeksiyonu tüm farelerde ölüme neden olmuş, buna karşın tüm fareler aynı konsantrasyon silika kaplı ZnO ile muamele edildiğinde hayatta kalmıştır (Tongu ve ark., 2014). Elde ettiğimiz sonuçlara ve literatür sonuçlarına göre silikanın güvenli olduğu ve 10 ila 20 mg / ml'lik konsantrasyonlarda MicNo-ZnO toksisitesini kontrol edip yönetebildiği sonucuna varabiliriz.

## 5. SONUÇ

Özgün MicNo-ZnO partikülleri adı verilen nano primer ZnO partiküllerinden oluşan, altıgen plaka şeklindeki mikron partikülleri, ZnO nanopartiküllerine göre çok daha az sitotoksisite sergilemektedir.

HPDMS ile kaplanmış MicNo ZnO NP'leri MTT testi sonucuna göre en iyi sonucu vermektedir. TECS ile kaplanmış MicNo ZnO NP'ler ile yapılan MTT deneyinde yüksek dozların daha az toksik olduğu görülmüştür. Ancak fazla ROS üretimine sebep olmaktadır. Silika ise ROS a göre en iyi sonuç veren kaplamadır. Fakat MTT testi sonucuna göre toksikdir. Son olarak PDMS diğer kaplamalarla karşılaştırıldığında MTT ve ROS sonuçlarına göre daha az sitotoksisiteye sahip olduğu görülmüştür. Buna göre, kaplanmış MicNo-ZnO parçacıkları, görünür ışık şeffaflığı, yüksek yüzey alanı ve daha güvenli özellikleri gibi nanoparçacıklara kıyasla avantajlar sergiler. Mikron boyutundaki ZnO partikülleri, bu şekilde tasarlanan kaplanmış partiküller, güneşten koruyucu uygulamalar için şu anda mevcut aktif bileşenlere bir alternatif olarak düşünülebilir.

## KAYNAKÇA

- Abdal Dayem, A., Hossain, M., Lee, S., Kim, K., Saha, S., Yang, G. M., ... & Cho, S. G. (2017). The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles. *International journal of molecular sciences*, 18(1), 120.
- Abudayyak, M. (2015). Bazi metal bazli nanomateryallerin toksik etki potansiyellerinin arastirilmesi. Yayinlanmis doktora tezi.
- Angel, R. G. M., Francisco, R. F., Enrique, M. R., Antonio, A. J., Arturo, B. R., & Jacobo, A. M. (2016). Applications of Nanotechnology in The Agriculture, Food, and Pharmaceuticals. *Nanoscience and Nanotechnology*, 16, 1-20.
- Arsalan, A., & Younus, H. (2018). Enzymes and nanoparticles: Modulation of enzymatic activity via nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 1833–1847.
- Arsalan, A., & Younus, H. (2018). Enzymes and nanoparticles: Modulation of enzymatic activity via nanoparticles. *International journal of biological macromolecules*, 118, 1833-1847.
- Babele, P. K., Thakre, P. K., Kumawat, R., & Tomar, R. S. (2018). Zinc oxide nanoparticles induce toxicity by affecting cell wall integrity pathway, mitochondrial function and lipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemosphere*, 213, 65–75.
- Bai, D. P., Zhang, X. F., Zhang, G. L., Huang, Y. F., & Gurunathan, S. (2017). Zinc oxide nanoparticles induce apoptosis and autophagy in human ovarian cancer cells. *International journal of nanomedicine*, 12, 6521.
- Bernauer, U., Bodin, L., Celleno, L., Chaudhry, Q. M., Coenraads, P. J., Dusinska, M., ... & Granum, B. B. (2016). OPINION ON Titanium Dioxide (nano form) coated with Cetyl Phosphate, Manganese Dioxide or Triethoxycaprylylsilane as UV-filter in dermally applied cosmetic, 21-22.
- Binnig, G and Rohrer, H. (1983). Scanning Tunneling Microscopy. *Surface Science*, 236–244.
- Boysen, E., & Muir, N. C. (2011). *Electronics projects for dummies*. John Wiley & Sons. 32-49

- Buzea, C., Pacheco, I. I., & Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), MR17-MR71.
- Çavuşoğlu, Y., Özkoç, G., Uyanık, N., “Synthesis and Characterization Of CrossLinked Poly (dimethyl siloxane) Nanocomposites” 1<sup>st</sup> International Plastic and Rubber Technologies Symposium and Product Exhibition, May 29-31, 2013, Ankara, Turkey
- Chia, S. L. and Leong, D. T. (2016). “Reducing ZnO nanoparticles toxicity through silica coating,.” *Heliyon*, 2(10).
- Circu, M. L., & Aw, T. Y. (2010). Free Radical Biology & Medicine Reactive oxygen species, cellular redox systems , and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(6), 749–762.
- Costa, C., Brandao, F., Bessa, M. J., Costa, S., Valdiglesias, V., Kiliç, G., Teixeira, J. P. (2016). In vitro cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles on neuronal and glial cells. Evaluation of nanoparticle interference with viability tests. *Journal of Applied Toxicology*, 36(3), 361–372.
- De la Calle, I., Menta, M., Klein, M., & Séby, F. (2017). Screening of TiO<sub>2</sub> and Au nanoparticles in cosmetics and determination of elemental impurities by multiple techniques (DLS, SP-ICP-MS, ICP-MS and ICP-OES). *Talanta*, 171, 291-306.
- Deguchi, S., Hotta, J., Yokoyama, S., & Matsui, T. S. (2015). Viscoelastic and optical properties of four different PDMS polymers. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 25(9), 097002.
- Delivopoulos, E., Minev, I. R., & Lacour, S. P. (2011, April). Evaluation of negative photo-patternable PDMS for the encapsulation of neural electrodes. In 2011 5th International IEEE/EMBS Conference on Neural Engineering (pp. 490-494). IEEE.
- Demirel, R., Suvacı, E., Şahin, İ., Dağ, S., & Kılıç, V. (2018). Antimicrobial activity of designed undoped and doped MicNo-ZnO particles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 47, 309-321.
- Eixenberger, J. E., Anders, C. B., Hermann, R. J., Brown, R. J., Reddy, K. M., Punnoose, A., & Wingett, D. G. (2017). Rapid dissolution of ZnO nanoparticles induced by biological buffers significantly impacts cytotoxicity. *Chemical research in toxicology*, 30(8), 1641-1651.

- El-Nahhal, I. M., Salem, J. K., Kuhn, S., Hammad, T., Hempelmann, R., & Al Bhaisi, S. (2016). Synthesis & characterization of silica coated and functionalized silica coated zinc oxide nanomaterials. *Powder technology*, 287, 439-446.
- Etheridge, M. L., Campbell, S. A., Erdman, A. G., Haynes, C. L., Wolf, S. M., & McCullough, J. (2013). The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine*, 9(1), 1-14.
- Etheridge, M. L., Campbell, S. A., Erdman, A. G., Haynes, C. L., Wolf, S. M., & McCullough, J. (2013). The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine*, 9(1), 1-14. FDA. (2016). U.S. Food and Drug Administration.
- Feldmeier, H. (2014). Treatment of parasitic skin diseases with dimeticones a new family of compounds with a purely physical mode of action. *Tropical medicine and health*, 42(2SUPPLEMENT), S15-S20.
- Ficai, D., & Grumezescu, A. M. (Eds.). (2017). *Nanostructures for novel therapy: synthesis, characterization and applications*. Elsevier.
- Food and Drug Administration, HHS. (2016). Deeming tobacco products to be subject to the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act, as amended by the Family Smoking Prevention and Tobacco Control Act; restrictions on the sale and distribution of tobacco products and required warning statements for tobacco products. Final rule. *Federal register*, 81(90), 28973.
- Fotakis, G., & Timbrell, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology letters*, 160(2), 171-177.
- Ganesan, P., & Choi, D. K. (2016). Current application of phytochemical-based nanocosmeceuticals for beauty and skin therapy. *International journal of nanomedicine*, 11, 1987.
- Gao, Y., Jin, B., Shen, W., Sinko, P. J., Xie, X., Zhang, H., & Jia, L. (2016). China and the United States—global partners, competitors and collaborators in nanotechnology development. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12(1), 13-19.

- Genç, H., Barutca, B., Koparal, A. T., Özögüt, U., Şahin, Y., & Suvacı, E. (2018). Biocompatibility of designed MicNo-ZnO particles: Cytotoxicity, genotoxicity and phototoxicity in human skin keratinocyte cells. *Toxicology in Vitro*, 47, 238-248.
- Genchi, G. G., Marino, A., Grillone, A., Pezzini, I., & Ciofani, G. (2017). Remote control of cellular functions: The role of smart nanomaterials in the medicine of the future. *Advanced healthcare materials*, 6(9), 1700002.
- Gokaltun, A., Yarmush, M. L., Asatekin, A., & Usta, O. B. (2017). Recent advances in nonbiofouling PDMS surface modification strategies applicable to microfluidic technology. *Technology*, 5(01), 1-12.
- Gosens, I., Kermanizadeh, A., Jacobsen, N. R., Lenz, A. G., Bokkers, B., De Jong, W. H., ... & Stoeger, T. (2015). Comparative hazard identification by a single dose lung exposure of zinc oxide and silver nanomaterials in mice. *PloS one*, 10(5), e0126934.
- Hackenberg, S., & Kleinsasser, N. (2012). Dermal toxicity of ZnO nanoparticles: a worrying feature of sunscreen?. *Nanomedicine*, 7(4), 461-463.
- Hadef, F. (2018). An Introduction to Nanomaterials. In *Environmental Nanotechnology* (pp. 1-58). Springer, Cham.
- He, X., Nie, H., Wang, K., Tan, W., Wu, X., & Zhang, P. (2008). In vivo study of biodistribution and urinary excretion of surface-modified silica nanoparticles. *Analytical chemistry*, 80(24), 9597-9603.
- Heukelbach, J., Pilger, D., Oliveira, F. A., Khakban, A., Ariza, L., & Feldmeier, H. (2008). A highly efficacious pediculicide based on dimeticone: randomized observer blinded comparative trial. *BMC infectious diseases*, 8(1), 115.
- Holmes, A. M., Song, Z., Moghimi, H. R., & Roberts, M. S. (2016). Relative penetration of zinc oxide and zinc ions into human skin after application of different zinc oxide formulations. *ACS nano*, 10(2), 1810-1819.
- Hu, X., Cook, S., Wang, P., & Hwang, H. M. (2009). In vitro evaluation of cytotoxicity of engineered metal oxide nanoparticles. *Science of the Total Environment*, 407(8), 3070-3072.
- Huang, M. H., Mao, S., Feick, H., Yan, H., Wu, Y., Kind, H., ... & Yang, P. (2001). Room-temperature ultraviolet nanowire nanolasers. *science*, 292(5523), 1897-1899.

- Ickrath, P., Wagner, M., Scherzad, A., Gehrke, T., Burghartz, M., Hagen, R., ... & Hackenberg, S. (2017). Time-dependent toxic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles after long-term and repetitive exposure to human mesenchymal stem cells. *International journal of environmental research and public health*, 14(12), 1590.
- Ischenko, A. A., Fetisov, G. V., & Aslalnov, L. A. (2014). *Nanosilicon: properties, synthesis, applications, methods of analysis and control*. CRC Press.
- Jain, A., Koyani, R., Muñoz, C., Sengar, P., Contreras, O. E., Juárez, P., & Hirata, G. A. (2018). Blue light triggered generation of reactive oxygen species from silica coated Gd<sub>3</sub>Al<sub>5</sub>O<sub>12</sub>: Ce<sup>3+</sup> nanoparticles loaded with rose Bengal. *Data in brief*, 20, 1023-1028.
- Jain, K.K. (2011). Nanobiotechnology. *Comprehensive Biotechnology*, 5(1), 599–614.
- Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A., & Danquah, M. K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein journal of nanotechnology*, 9(1), 1050-1074.
- Jellali, R., Bertrand, V., Alexandre, M., Rosière, N., Grauwels, M., De Pauw-Gillet, M. C., & Jérôme, C. (2017). Photoreversibility and Biocompatibility of Polydimethylsiloxane-Coumarin as Adjustable Intraocular Lens Material. *Macromolecular bioscience*, 17(7), 1600495.
- Josh E. Eixenberger, Catherine B. Anders, Rebecca J. Hermann, Raquel J. Brown, Kongara Reddy, M., Punnoose, A. and D. G. W. (2017). Rapid Dissolution of ZnO Nanoparticles Induced by Biological Buffers Significantly Impacts Cytotoxicity. *Chem. Res. Toxicol*, 1641–1651.
- Kargozar, S., & Mozafari, M. (2018). Nanotechnology and Nanomedicine: Start small, think big. *Materials Today: Proceedings*, 5(7), 15492-15500.
- Katz, L. M., Dewan, K., & Bronaugh, R. L. (2015). Nanotechnology in cosmetics. *Food and Chemical Toxicology*, 85, 127-137.
- Keller, A. A., McFerran, S., Lazareva, A., & Suh, S. (2013). Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *Journal of nanoparticle research*, 15(6), 1692.
- Klingshirn, C. (1975). The luminescence of ZnO under high one-and two-quantum excitation. *physica status solidi (b)*, 71(2), 547-556.
- Kononenko, V., Repar, N., Marušič, N., Drašler, B., Romih, T., Hočevar, S., & Drobne, D. (2017). Comparative in vitro genotoxicity study of ZnO nanoparticles, ZnO

- macroparticles and ZnCl<sub>2</sub> to MDCK kidney cells: Size matters. *Toxicology in Vitro*, 40, 256-263.
- Kundu, J., Kim, D. H., Chae, I. G., Lee, J. K., Lee, S., Jeong, C. H., & Chun, K. S. (2018). Silicon dioxide nanoparticles induce COX-2 expression through activation of STAT3 signaling pathway in HaCaT cells. *Toxicology in Vitro*, 52, 235-242.
- Le, T. C., Yin, H., Chen, R., Chen, Y., Zhao, L., Casey, P. S., ... & Winkler, D. A. (2016). An experimental and computational approach to the development of ZnO nanoparticles that are safe by design. *Small*, 12(26), 3568-3577.
- Leite-Silva, V. R., Le Lamer, M., Sanchez, W. Y., Liu, D. C., Sanchez, W. H., Morrow, I., ... & Roberts, M. S. (2013). The effect of formulation on the penetration of coated and uncoated zinc oxide nanoparticles into the viable epidermis of human skin in vivo. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 84(2), 297-308.
- Lohani, A., Verma, A., Joshi, H., Yadav, N., & Karki, N. (2014). Nanotechnology-based cosmeceuticals. *ISRN dermatology*, 2014.
- Lu, P. J., Fang, S. W., Cheng, W. L., Huang, S. C., Huang, M. C., & Cheng, H. F. (2018). Characterization of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreen powder by comparing different measurement methods. *journal of food and drug analysis*, 26(3), 1192-1200.
- Lu, P. J., Huang, S. C., Chen, Y. P., Chiueh, L. C., & Shih, D. Y. C. (2015). Analysis of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in cosmetics. *Journal of food and drug analysis*, 23(3), 587-594.
- Luo, M., Shen, C., Feltis, B. N., Martin, L. L., Hughes, A. E., Wright, P. F., & Turney, T. W. (2014). Reducing ZnO nanoparticle cytotoxicity by surface modification. *Nanoscale*, 6(11), 5791-5798.
- Ma, L., Fan, H., Tian, H., Fang, J., & Qian, X. (2016). The n-ZnO/n-In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> heterojunction formed by a surface-modification and their potential barrier-control in methanal gas sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 222, 508-516.
- Mata, A., Fleischman, A. J., & Roy, S. (2005). Characterization of polydimethylsiloxane (PDMS) properties for biomedical micro/nanosystems. *Biomedical microdevices*, 7(4), 281-293.

- Meng, F., Hou, N., Ge, S., Sun, B., Jin, Z., Shen, W., ... & Wang, C. (2015). Flower-like hierarchical structures consisting of porous single-crystalline ZnO nanosheets and their gas sensing properties to volatile organic compounds (VOCs). *Journal of Alloys and Compounds*, 626, 124-130.
- Modi, G. (2015). Zinc oxide tetrapod: a morphology with multifunctional applications. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 6(3), 033002.
- Morganti, P. (2010). Use and potential of nanotechnology in cosmetic dermatology. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology: CCID*, 3, 5.
- Mozafari, M., Moztarzadeh, F., & Tahriri, M. (2011). Green synthesis and characterisation of spherical PbS luminescent micro-and nanoparticles via wet chemical technique. *Advances in Applied Ceramics*, 110(1), 30-34.
- Mukherjee, S. G., O'Claonadh, N., Casey, A., & Chambers, G. (2012). Comparative in vitro cytotoxicity study of silver nanoparticle on two mammalian cell lines. *Toxicology in Vitro*, 26(2), 238-251.
- Nair, B. (2003). Final report on the safety assessment of stearoxy dimethicone, dimethicone, methicone, amino bispropyl dimethicone, aminopropyl dimethicone, amodimethicone, amodimethicone hydroxystearate, behenoxy dimethicone, C24-28 alkyl methicone, C30-45 alkyl methicone, C30-45 alkyl dimethicone, cetearyl methicone, cetyl dimethicone, dimethoxysilyl ethylenediaminopropyl dimethicone, hexyl methicone, hydroxypropyldimethicone, stearamidopropyl dimethicone, stearyl dimethicone, stearyl methicone, and vinyl dimethicone. *International journal of toxicology*, 22, 11-35.
- Newman, M. D., Stotland, M., & Ellis, J. I. (2009). The safety of nanosized particles in titanium dioxide–and zinc oxide–based sunscreens. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 61(4), 685-692.
- Okech, B. A., Mwobobia, I. K., Kamau, A., Muiruri, S., Mutiso, N., Nyambura, J., ... & Mwandawiro, C. S. (2008). Use of integrated malaria management reduces malaria in Kenya. *PLoS One*, 3(12), e4050.
- Osmond-McLeod, M. J., Osmond, R. I., Oytam, Y., McCall, M. J., Feltis, B., Mackay-Sim, A., ... & Cook, A. L. (2013). Surface coatings of ZnO nanoparticles mitigate

- differentially a host of transcriptional, protein and signalling responses in primary human olfactory cells. *Particle and fibre toxicology*, 10(1), 54.
- Osmond-McLeod, M. J., Oytam, Y., Osmond, R. I. W., Sobhanmanesh, F., & McCall, M. J. (2014). Surface Coatings Protect against the.
- Osmond-McLeod, M. J., Oytam, Y., Rowe, A., Sobhanmanesh, F., Greenoak, G., Kirby, J., ... & McCall, M. J. (2015). Long-term exposure to commercially available sunscreens containing nanoparticles of TiO<sub>2</sub> and ZnO revealed no biological impact in a hairless mouse model. *Particle and fibre toxicology*, 13(1), 44.
- Pal, A., Alam, S., Mittal, S., Arjaria, N., Shankar, J., Kumar, M., ... & Ansari, K. M. (2016). UVB irradiation-enhanced zinc oxide nanoparticles-induced DNA damage and cell death in mouse skin. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 807, 15-24.
- Pandurangan, M., & Kim, D. H. (2015). In vitro toxicity of zinc oxide nanoparticles: a review. *Journal of Nanoparticle Research*, 17(3), 158.
- Patel, H., & Vashi, R. T. (2015). *Characterization and treatment of textile wastewater*. Elsevier.
- Patel, H., & Vashi, R. T. (2015). *Characterization and treatment of textile wastewater*. Elsevier.
- Puerari, R. C., Ferrari, E., de Cezar, M. G., Gonçalves, R. A., Simioni, C., Ouriques, L. C., ... & Matias, W. G. (2019). Investigation of toxicological effects of amorphous silica nanostructures with amine-functionalized surfaces on Vero cells. *Chemosphere*, 214, 679-687.
- Puerari, R. C., Ferrari, E., de Cezar, M. G., Gonçalves, R. A., Simioni, C., Ouriques, L. C., ... & Matias, W. G. (2019). Investigation of toxicological effects of amorphous silica nanostructures with amine-functionalized surfaces on Vero cells. *Chemosphere*, 214, 679-687.
- Pujalté, I., Passagne, I., Daculsi, R., de Portal, C., Ohayon-Courtès, C., & L'Azou, B. (2015). Cytotoxic effects and cellular oxidative mechanisms of metallic nanoparticles on renal tubular cells: impact of particle solubility. *Toxicology Research*, 4(2), 409-422.

- Rahman, I. A., & Padavettan, V. (2012). Synthesis of silica nanoparticles by sol-gel: size-dependent properties, surface modification, and applications in silica-polymer nanocomposites—a review. *Journal of Nanomaterials*, 2012, 8.
- Rahman, I. A., Vejayakumaran, P., Sipaut, C. S., Ismail, J., & Chee, C. K. (2009). Size-dependent physicochemical and optical properties of silica nanoparticles. *Materials Chemistry and Physics*, 114(1), 328-332.
- Ramasamy, M., Das, M., An, S. S. A., & Yi, D. K. (2014). Role of surface modification in zinc oxide nanoparticles and its toxicity assessment toward human dermal fibroblast cells. *International journal of nanomedicine*, 9, 3707.
- Razak, K. A., Nor, N. M., & Ridhuan, N. S. (2017). Metal Oxide Nanostructure-modified Electrode for Glucose Biosensor. *Advanced Materials and their Applications: Micro to nano scale*, One Central Press (OCP), United Kingdom, 31-68.
- Riehle, N., Thude, S., Kandelbauer, A., Tovar, G. E., & Lorenz, G. (2019). Synthesis of Soft Polysiloxane-urea Elastomers for Intraocular Lens Application. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (145), e58590.
- Rowe, R. C., Sheskey, P. J., & Quinn, M. E. (2009). *Handbook of Pharmaceutical Excipients* 6th edition Pharmaceutical Press. London, England, 637.
- Scharin-Mehlmann, M., Häring, A., Rommel, M., Dirnecker, T., Friedrich, O., Frey, L., & Gilbert, D. F. (2018). Nano-and micro-patterned S-, H-and X-PDMS for cell-based applications: Comparison of wettability, roughness and cell-derived parameters. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 6, 51.
- Shalini, D., Senthilkumar, S., & Rajaguru, P. (2018). Effect of size and shape on toxicity of zinc oxide (ZnO) nanomaterials in human peripheral blood lymphocytes. *Toxicology mechanisms and methods*, 28(2), 87-94.
- Shokri, J. (2017). Nanocosmetics: benefits and risks. *BioImpacts: BI*, 7(4), 207.
- Siddiqi, K. S., & Husen, A. (2016). Fabrication of metal and metal oxide nanoparticles by algae and their toxic effects. *Nanoscale research letters*, 11(1), 363.
- Sotiriou, G. A., Watson, C., Murdaugh, K. M., Darrah, T. H., Pyrgiotakis, G., Elder, A., ... & Demokritou, P. (2014). Engineering safer-by-design silica-coated ZnO nanorods with reduced DNA damage potential. *Environmental Science: Nano*, 1(2), 144-153.

- Sruthi, S., Ashtami, J., & Mohanan, P. V. (2018). Biomedical application and hidden toxicity of Zinc oxide nanoparticles. *Materials today chemistry*, 10, 175-186.
- Stratta, P., Canavese, C., Messuerotti, A., Fenoglio, I., & Fubini, B. (2001). Silica and renal diseases: no longer a problem in the 21<sup>st</sup> century?. *Journal of nephrology*, 14(4), 228-247.
- Suvacı, E., Kesim, T., Sapan, Z., Kang C.S. (2019) MicNo-ZnO: The clean beauty UV filter, *Eurocosmetics*, 5, 28-32.
- Suvacı, E., Şahin, Y., Koparal, A.T. (2012). Güvenli, nano boyutlu tasarlanmış şekillere sahip ZnO ve TiO<sub>2</sub> partiküllerinin üretilmesi, TUBİTAK PROJESİ (109M585)
- Tariq Jan, J. I., Ismail, M., Zakaullah, M., Naqvi, S. H., & Badshah, N. (2013). Sn doping induced enhancement in the activity of ZnO nanostructures against antibiotic resistant *S. aureus* bacteria. *International journal of nanomedicine*, 8, 3679.
- The Royal Society, & The Royal Academy of Engineering. (2004). Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. *Neuroradiology*, 618–618.
- Thomassen, L. C., Aerts, A., Rabolli, V., Lison, D., Gonzalez, L., Kirsch-Volders, M., ... & Martens, J. A. (2009). Synthesis and characterization of stable monodisperse silica nanoparticle sols for in vitro cytotoxicity testing. *Langmuir*, 26(1), 328-335.
- TONGU, M., HASHIMOTO, H., YAMADA, T., KIMURA-KATAOKA, K., YASUDA, T., AKIYOSHI, H., ... & FUJIHARA, J. (2014). Comparison of acute toxicity of ZnO and silica-coated ZnO nanoparticles in mice after single intravenous injection: preliminary experiment to apply to biological imaging. *Shimane J. Med. Sci*, 31, 7-11.
- Wang, J., Tsuzuki, T., Tang, B., Cizek, P., Sun, L., & Wang, X. (2010). Synthesis of silica-coated ZnO nanocomposite: the resonance structure of polyvinyl pyrrolidone (PVP) as a coupling agent. *Colloid and polymer science*, 288(18), 1705-1711.
- Wang, S. Q., & Tooley, I. R. (2011, December). Photoprotection in the era of nanotechnology. In *Seminars in cutaneous medicine and surgery* (Vol. 30, No. 4, pp. 210-213). WB Saunders.
- Wolf, E. L., & Medikonda, M. (2012). *Understanding the nanotechnology revolution*. John Wiley & Sons. P 41-53

- Zhang, H. J., Xiong, H. M., Ren, Q. G., Xia, Y. Y., & Kong, J. L. (2012). ZnO@ silica core–shell nanoparticles with remarkable luminescence and stability in cell imaging. *Journal of Materials Chemistry*, 22(26), 13159-13165.
- Zhang, Y., Nguyen, K. C., Lefebvre, D. E., Shwed, P. S., Crosthwait, J., Bondy, G. S., & Tayabali, A. F. (2014). Critical experimental parameters related to the cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 16(6), 2440.
- http-1 O Kimya. (2019). Dimethicone (Polidimetilsiloksan) okimya.com. (Erişim tarihi: 29.07.2019)
- Trietoksikarililsilan (2018) Database on toxicology, hazardous chemicals, environmental health and toxic publications
- http-2 [https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB7476770.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB7476770.htm) (Erişim tarihi: 30.08.2019)
- http-3 <http://toxnet.nlm.nih.gov/>: 2943-75-1. (n.d.). (Erişim tarihi: 12.06.2019)
- http-4 ([ttp://www.epa.gov](http://www.epa.gov)). Chemicals and Toxics Topics. (Erişim tarihi: 30.06.2019)