

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

**GIDA İLE TEMAS EDEN AMBALAJ MALZEMELERİNDE  
NANOPARÇACIKLARIN KULLANIMININ TOKSİKOLOJİK  
AÇIDAN İNCELENMESİ VE KONUYA İLİŞKİN TÜRKİYE VE  
DÜNYADAKİ YASAL DÜZENLEMELERİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Ecz. Aysel SEZER**

**Farmasötik Toksikoloji Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA  
2025**



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

**GIDA İLE TEMAS EDEN AMBALAJ MALZEMELERİNDE  
NANOPARÇACIKLARIN KULLANIMININ TOKSİKOLOJİK  
AÇIDAN İNCELENMESİ VE KONUYA İLİŞKİN TÜRKİYE VE  
DÜNYADAKİ YASAL DÜZENLEMELERİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Ecz. Aysel SEZER**

**Farmasötik Toksikoloji Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Aylin GÜRBAY**

**ANKARA  
2025**

**GIDA İLE TEMAS EDEN AMBALAJ MALZEMELERİNDE  
NANOPARÇACIKLARIN KULLANIMININ TOKSİKOLOJİK AÇIDAN  
İNCELENMESİ VE KONUYA İLİŞKİN TÜRKİYE VE DÜNYADAKİ  
YASAL DÜZENLEMELERİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Öğrenci: Aysel SEZER**

**Danışman: Prof. Dr. Aylın GÜRBAY**

Bu tez çalışması 03.01.2025 tarihinde jürimiz tarafından "Farmasötik Toksikoloji Programı"nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı:** *Prof. Dr. Ahmet Oğuz ADA*  
*Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi*

**Tez Danışmanı:** *Prof. Dr. Aylın GÜRBAY*  
*Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi*

**Üye:** *Prof. Dr. Sevtap AYDIN DİLSİZ*  
*Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi*

30 Ocak 2025

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN  
**Enstitü Müdürü**

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. <sup>(1)</sup>

o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. <sup>(2)</sup>

o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

..... / ..... / .....

Aysel SEZER

<sup>1</sup>“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internette paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir \*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

\* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

## ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Aylin GÜRBAY danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Ecz. Aysel SEZER

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim ve tezimin her aşamasında emeğini, desteğini, yol göstericiliğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleri ile çalışmalarına yön veren değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Aylin GÜRBAY'a,

Yüksek lisans ders dönemim sırasında eğitim aldığım ve tecrübelerinden faydalandığım başta danışmanım olmak üzere Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Her zaman yanımda olup beni her koşulda destekleyen sevgili aileme,

Tez yazım sürecinde desteğini ve ilgisini esirgemeyen sevgili arkadaşlarıma

En içten dileklerle teşekkür ederim.

## ÖZET

**SEZER, A., Gıda ile Temas Eden Ambalaj Malzemelerinde Nanoparçacıkların Kullanımının Toksikolojik Açıdan İncelenmesi ve Konuya İlişkin Türkiye ve Dünyadaki Yasal Düzenlemelerin Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2025.** Nanoteknolojiden, diğer birçok alanda olduğu gibi gıda ambalajlarında da yararlanılmaktadır. Nanoparçacıklar, geleneksel gıda ambalajlarının gaz geçirgenliği, ısıya dayanıklılık gibi özelliklerinin iyileştirilmesi, gıdaların raf ömrünün uzatılması, gıdanın durumu ve gıdadaki değişikliklerin izlenmesini sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Yapılan literatür taraması ve internet temelli araştırmalar, gıda ambalajlamasında en yaygın kullanılan nanoparçacıkların, gümüş nanoparçacıklar ve nanokiller olduğunu göstermektedir. Nanoparçacıkların, aynı maddelerin nano olmayan şekillerine göre çok farklı fizikokimyasal ve toksikolojik özellikler gösterebildiği net biçimde ortaya konmuştur. Toksik etkileri tam olarak aydınlatılmamış olan nanoparçacıklara gıda ambalajları yolu ile maruz kalınması endişe yaratmaktadır. Bu tez çalışması kapsamında, gümüş nanoparçacık ve nanokil içeren gıda ambalajlarından gıdaya geçişin araştırıldığı çalışmalar incelenmiştir. İncelenen migrasyon çalışmalarında gıdaya geçişin sıcaklık, temas süresi, mikrodalga uygulaması, gıdanın asidite gibi özellikleri ve benzeri birçok faktörden etkilendiği bildirilmiştir. Bu bulgular, her ambalaj malzemesi, gıda ve koşul için olguya özel değerlendirme yapılması gerektiğini göstermektedir. Çalışmamız kapsamında, söz konusu nanoparçacıkların toksisite potansiyellerinin değerlendirilmesi amacıyla, bu parçacıkların toksik etkileri üzerine gerçekleştirilen *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar incelenmiştir. Ayrıca, ülkemizde ve dünyada nanoparçacıkların gıda ambalajlarında güvenli şekilde kullanımına yönelik düzenlemeler irdelenmiş ve karşılaştırılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Nanoteknoloji, gıda ambalajlama, toksisite, güvenlik, yasal düzenleme.

## ABSTRACT

**SEZER, A., Toxicological Investigation of the Use of Nanoparticles in Food Packaging Materials Contacting Food and Evaluation of the Legal Regulations Concerning The Topic in Turkey and Around The World, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Pharmacy Department of Pharmaceutical Toxicology Master of Science Thesis, Ankara, 2025.** Nanotechnology, has been utilized in food packaging as well as many other areas. Nanoparticles are used with the aim of improving the properties such as gas permeability and heat resistance, extending shelflife or allowing monitoring the condition of food and detecting changes in food. Literature review and web-based research shows that silver nanoparticles and nanoclays are the most commonly used nanoparticles in food packaging applications. It is well-documented that engineered nanoparticles can exhibit very different physicochemical and toxicological properties compared to their non-nano scale counterparts. Concerns have been raised regarding exposure to nanoparticles, whose toxicological effects have not been fully elucidated, originating from food packaging. Within the scope of this thesis, studies on the transfer from food packaging containing silver nanoparticles and nanoclay to food were reviewed. Migration studies reviewed indicate that the transfer to food was affected by many factors such as temperature, contact time, microwave application, properties of the food such as acidity. These findings indicate that case-by-case evaluation should be made for each packaging material, food and condition. Within the scope of our study, in order to evaluate the toxicity potential of these nanoparticles, *in vitro* and *in vivo* studies on the toxic effects of these particles were reviewed. In addition, regulations for the safe use of nanoparticles in food packaging in Turkey and around the world have been scrutinized and compared.

**Keywords:** nanotechnology, food packaging, toxicity, safety, legal regulation

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
TABLolar	xiv
ŞEKİLLER	xv
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
2.1. Gıda Ambalajı Nedir	3
2.2. Gıda Ambalajlarının Temel İşlevleri	4
2.3. Geleneksel ve Yenilikçi Ambalajlama Yöntemleri	5
2.3.1. Geleneksel Ambalajlar	5
2.3.2. Aktif Ambalajlar	5
2.3.3. Akıllı Ambalajlar	6
2.3.4. Değiştirilmiş Atmosfer Ambalajlama	6
2.3.5. Biyoyıkılabilir Ambalajlar	6
2.4. Gıda Ambalajlarında Kullanılan Malzemeler	7
2.5. Nanoparçacıkların Gıda Ambalajlarında Kullanımı	8
2.5.1. Nanoparçacıkların Geliştirilmiş/ İyileştirilmiş Gıda Ambalajlarında Kullanımları	8
2.5.2. Nanoparçacıkların Aktif Gıda Ambalajlarında Kullanımları	9
2.5.3. Nanoparçacıkların Akıllı Gıda Ambalajlarında Kullanımı	10
2.6. Gıda Ambalajlarından Gıdaya Nanoparçacık Geçişi	10
2.7. Nanoparçacıkların Kendine Özgü Özelliklerinin Toksikolojik Açıdan Önemi	11
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>16</b>
<b>4. BULGULAR</b>	<b>22</b>

4.1. Seçilen Nanoparçacıkların Gıda Ambalajlarında Kullanımına İlişkin İncelemeler	22
4.1.1. Gümüş Nanoparçacıkların Genel Özellikleri ve Gıda Ambalajlarında Kullanımı	22
4.1.2. Gümüş Nanoparçacık İçeren Gıda Ambalajlarından Gıdalara Geçiş Mekanizmaları ve Migrasyon Çalışmaları	28
4.1.3. Gümüş Nanoparçacıkların Toksikolojik Açından İncelenmesi	40
4.1.4. Nanokillerin Genel Özellikleri ve Gıda Ambalajlarında Kullanımı	51
4.1.5. Nanokil İçeren Gıda Ambalajlarından Gıdalara Geçiş ve Migrasyon Çalışmaları	54
4.1.6. Nanokillerin Toksikolojik Açından İncelenmesi	65
4.2. Gıda Ambalajlarında Nanoparçacık Kullanımına İlişkin Ülkemizde ve Dünyadaki Yasal Düzenlemeler	76
4.2.1. Avrupa Birliği Ülkelerindeki Yasal Düzenlemeler	77
4.2.2. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki Yasal Düzenlemeler	83
4.2.3. Kanada'daki Yasal Düzenlemeler	85
4.2.4. Brezilya'daki Yasal Düzenlemeler	86
4.2.5. Japonya'daki Yasal Düzenlemeler	86
4.2.6. Avustralya ve Yeni Zelanda'daki Düzenlemeler	87
4.2.7. Ülkemizdeki Yasal Düzenlemeler	88
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>91</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>112</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>116</b>
<b>8. EKLER</b>	<b>146</b>
EK-1: Orjinallik Raporu	
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>148</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>AAS</b>	Atomik absorpsiyon spektroskopisi
<b>AB</b>	Avrupa Birliği
<b>ABD</b>	Amerika Birleşik Devletleri
<b>ADI</b>	Günlük Kabul Edilebilir Alım Miktarı ( <i>Acceptable Daily Intake</i> )
<b>AF<sup>4</sup></b>	Asimetrik akış-alan akış fraksiyonasyonu
<b>AFM</b>	Atomik kuvvet mikroskopisi
<b>AgNP</b>	Gümüş Nanoparçacık
<b>ALT</b>	Alanin Aminotransferaz
<b>ALP</b>	Alkalen Fosfataz
<b>AST</b>	Aspartat Aminotransferaz
<b>ANVISA</b>	Brezilya Sağlık Düzenleme Kurumu ( <i>Agência Nacional de Vigilância Sanitária</i> )
<b>BUN</b>	Kan-Üre Azotu
<b>CBMN</b>	Sitokinez Engelli Mikronükleus Testi
<b>CFR</b>	Federal Düzenlemeler Kanunu ( <i>The Code of Federal Regulations</i> )
<b>CNC</b>	Selüloz Nanokristalleri ( <i>Cellulose Nanocrystals</i> )
<b>CNT</b>	Karbon nanotüp
<b>DSÖ</b>	Dünya Sağlık Örgütü
<b>EC</b>	Avrupa Komisyonu ( <i>European Commission</i> )
<b>ECHA</b>	Avrupa Kimyasallar Ajansı ( <i>European Chemicals Agency</i> )
<b>EFSA</b>	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi ( <i>The European Food Safety Authority</i> )
<b>EM</b>	Elektron mikroskopisi
<b>EPA</b>	Doğa Koruma Ajansı ( <i>Environmental Protection Agency</i> )

<b>EU 10/2011</b>	Avrupa Komisyonu Gıda ile Temas Eden Plastik Malzemeler Tebliği
<b>FCN</b>	Gıda Temas Bildirimi ( <i>Food Contact Notification</i> )
<b>FDA</b>	Amerikan Gıda ve İlaç Ajansı (The Food and Drug Administration)
<b>FSANZ</b>	Avustralya-Yeni Zelanda Gıda Standartları Enstitüsü ( <i>Australian-New Zealand Food Standards</i> )
<b>GRAS</b>	Genellikle Güvenli Kabul Edilen Maddeler Listesi ( <i>Generally Regarded as Safe</i> )
<b>GSH</b>	Redükte Glutasyon
<b>ICP-AES</b>	İndüktif Eşleşmiş Plazma Atomik Emisyon Spektroskopisi ( <i>Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometer, ICP-AES</i> )
<b>ICP-MS</b>	İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle spektroskopisi ( <i>Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometer</i> )
<b>ICP-OES</b>	İndüktif Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon Spektroskopisi ( <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission spectroscopy</i> )
<b>LDH</b>	Tabakalı Çift Hidroksitler ( <i>Layered Double Hydroxides</i> )
<b>LDPE</b>	Düşük Yoğunluklu Polietilen ( <i>Low Density Polyethylene</i> )
<b>LOAEL</b>	Olumsuz Etki Gözlemlenen En Düşük Düzey ( <i>The Lowest Observed Adverse Effect Level</i> )
<b>MBK</b>	Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
<b>MeSH</b>	Tıbbi Konu Başlıkları ( <i>Medical Subject Heading</i> )
<b>MMT</b>	Montmorillonit
<b>MOE</b>	Maruz Kalma Sınırı ( <i>Margin of Exposure</i> )
<b>NP</b>	Nanoparçacık
<b>OECD</b>	Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü ( <i>Organisation For Economic Co-Operation and Development</i> )

<b>PE</b>	Polietilen
<b>PEG</b>	Polietilen Glikol
<b>PET</b>	Polietilen Tetraftalat
<b>PLA</b>	Polilaktik asit
<b>PP</b>	Polipropilen
<b>PVP</b>	Polivinilpirolidon
<b>RDC</b>	Üniversite Kurul Kararı ( <i>Resolução Da Diretoria Colegiada</i> )
<b>ROT</b>	Reaktif oksijen türleri
<b>SCF</b>	Gıda Bilimsel Komisyonu ( <i>Scientific Committee on Food</i> )
<b>SCHENIR</b>	Yeni Ortaya Çıkan veya Yeni Tanımlanan Risklere İlişkin Bilimsel Komisyon ( <i>Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks</i> )
<b>SEM</b>	Taramalı elektron mikroskopisi
<b>SJR</b>	(SCImago Journal Rank)
<b>sp-ICP-MS</b>	Tek Parçacık İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektroskopisi ( <i>Single Particle ICP-MS</i> )
<b>TEM</b>	Geçirimli elektron mikroskopisi ( <i>Transmission Electron Microscopy</i> )
<b>TWI</b>	Kabul edilebilir haftalık alım miktarı ( <i>The tolerable weekly intake</i> )
<b>WoS</b>	Web of Science

**TABLÖLAR**

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
<b>3.1.</b> Gıda ambalajlarında NP kullanımını konulu çalışma sayısına ilişkin veri tabanı tarama sonuçları.	17
<b>3.2.</b> Gıda ambalajlarından gıdaya nanoparçacık geçişine ilişkin erişilen çalışma sayıları.	19
<b>3.3.</b> Nanoparçacıkların oral yolla oluşturduğu toksik etkilere ilişkin erişilen çalışma sayıları.	19
<b>3.4.</b> Gıda ambalajlarında nanoparçacık kullanımına yönelik yasal düzenlemelere ilişkin erişilen çalışma sayıları.	20

## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
3.1. Nanoparçacık çeşidine göre Pubmed veri tabanındaki yayın sayısı dağılımı.	17
3.2. Nanoparçacık çeşidine göre Web of Science veri tabanındaki yayın sayısı dağılımı.	18
4.1. Gümüş nanoparçacıkların biyolojik ortamlarda uğradığı biyotransformasyonlar.	41
4.2. Avrupa Gıda Güvenliği Ajansı tarafından gıda ambalajlarında kullanılan nanoparçacıklar için uygulanması öngörülen risk değerlendirme algoritması.	82

## 1. GİRİŞ

Nanoparçacıklar (NP), Avrupa Komisyonunun (2022/C 229/01) tavsiyesine göre "*Sayı-boyut dağılımına göre % 50 veya daha fazlası 1-100 nm aralığında bir veya birden fazla dış boyuta (uzun biçimli parçacıklar için en az iki dış boyut, tabaka şekilli parçacıklar için en az bir dış boyut) sahip katı parçacıklardan oluşan; doğal, tesadüfi veya üretim sonucunda ortaya çıkan; bağımsız, küme veya yığın halinde bulunabilen maddeler*" şeklinde tanımlanmakta olup; NP'lerin üretim ve uygulamaları, endüstri, ilaç, medikal, yapı-inşaat, bilgi teknolojileri, enerji yönetimi, işlevsel yüzeyler, elektronik, gıda gibi pek çok alanda üstün olanaklar sunar ve yüzyılın kilit teknolojik gelişmelerinden bir tanesidir (1-4). Nanomalzemelerin gıda katkı maddesi veya destekleyici olarak ve gıda ile temas eden malzemelerin içeriğinde kullanımı, gıda sektöründeki en yaygın uygulama alanları arasındadır. Gıda ile temas eden NP içerikli malzemelere, gıda ambalajları, saklama kutuları, pişirme gereçleri, kaplamalar, yüzey malzemeleri ve nano membranlar örnek gösterilebilir (5). NP içerikli gıda ambalajları, gıdaların raf ömrünü uzatma, gıda işleme aşamalarının basitleştirilmesi, gıda koruyucu kullanımının azaltılması, gıda güvenliğinin artırılması ve gıda savurganlığının azaltılması gibi amaçlara hizmet etmektedir (6, 7). NP'lerden; gıda ambalaj malzemelerinin esneklik, gaz geçirgenliği gibi özelliklerinin iyileştirildiği "geliştirilmiş ambalajlar"ın; gıda, gıda ambalajı ve çevre etkileşimiyle gıdanın raf ömrünün arttırıldığı "aktif ambalajlar"ın ve gıda veya çevre koşullarının izlenmesini sağlayan "akıllı ambalajlar"ın geliştirilmesi yolu ile yararlanılmaktadır. NP'ler, nano-dolgu maddeleri olarak kullanımları ile ambalajın engelleyici özelliklerini iyileştirebilir; antibakteriyel özellikleriyle gıdanın raf ömrünü uzatabilir; ambalajın esneklik, ısı ve fiziksel dayanıklılık gibi fiziksel özelliklerini değiştirebilir veya nano algılayıcı uygulamaları ile akıllı ambalajlar geliştirilebilir (8-10).

Gıda ambalajlarında gümüş, çinko, titanyum gibi metal bazlı NP'lerin yanı sıra kil ve çitosan gibi metal dışı çok çeşitli NP'ler polimer matriks içerisinde dağılmış şekilde veya kaplama malzemesi olarak kullanılmaktadır (7, 11). Gıda ambalajlarında en yaygın kullanılan nanoparçacıklar arasında; gümüş nanoparçacıklar (AgNP), nanokiller, çinko oksit, titanyum esaslı nanopartiküller (titanyum nitrit, titanyum dioksit), silisyum dioksit sayılabilir (12, 13). Gıda ambalajlarında kullanılan NP'ler

kaynakları açısından incelendiğinde ise bir kısmının nişasta nanokristalleri gibi doğal, bir kısmının ise çinko oksit NP'leri gibi insan yapımı olduğu görülmektedir (14). Bununla birlikte; literatürdeki çalışmaların incelenmesi ve patent taraması yolu ile ticari olarak sağlanabilir NP içerikli ambalajların araştırılması sonucunda; en yüksek çalışma sayısının gümüş NP'ler, nanokiller ve nanokompozitlere ilişkin olduğu (15, 16); en yüksek sayıda patentin ise nanokiller ve gümüş NP'ler için alındığı belirlenmiştir (8). Piyasada yer bulan nanoteknolojik gıda ambalajları arasında en önde gelenlerin gümüş NP ve nanokil içeren ürünler olduğu bildirilmiştir (17, 18).

Nanoparçacıklar gıda ambalajlamasında avantajlar sağlamakla birlikte; ambalaj malzemesinden gıdaya NP geçişi, potansiyel riskler yönünden endişe yaratmaktadır (17). Gıda ambalajlarında kullanılan NP'lere maruziyet, ambalaj malzemesinden gıdaya NP geçişi ile doğrudan ilişkilidir (19). NP'lerin gıda ambalajlarında kullanımına yönelik risk değerlendirmeleri, temelde yeterli migrasyon çalışmaları bulunmamasına bağlı olarak yeterli düzeyde değildir. Söz konusu yetersizlikler ise, bu alanda uygun yasal düzenlemeler yapılmasına ve daha fazla gelişme kaydedilmesine engel oluşturmaktadır. (20). Gıda ambalajlarından gıdaya NP geçişi gerçekleştiği, pek çok çalışma ile belirlenmiş ve migrasyonun pek çok faktörden etkilendiği gösterilmiştir (21).

Gıda sektöründe nanoteknoloji hızlı gelişme göstermiş olmakla birlikte toksisiteleri hakkında yeterli düzeyde bilgi sahibi olunmaması nedeniyle NP'lerin bu alanda kullanımları risk taşımaktadır. Gıda sektöründe her geçen gün daha çok kullanıldıkları da göz önünde bulundurulduğunda; bu alanda kullanılan NP'lerin tanımlanmasının daha iyi yapılması ve NP'lerin bu alanda kullanımının güçlü yasal düzenlemelerle kontrol edilmesi gereklidir (22). Bu gerekliliğe paralel olarak; gıda ambalajlarında NP kullanımına ilişkin ülkemiz de dahil olmak üzere pek çok ülkede yasal düzenlemeler hazırlandığı belirlenmiştir.

Tez çalışması kapsamında; nanoparçacıkların (doğal ve insan yapımı) gıda ambalajlarında kullanımının insan sağlığı üzerinde oluşturduğu risklerin mevcut bilimsel çalışmalar incelenerek araştırılması ile ülkemizde ve dünyada yürürlükte bulunan yasal düzenlemelerin kapsamlı biçimde değerlendirmesi amaçlanmaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Gıda Ambalajı Nedir

Gıdalar, üretim, taşıma, depolama ve tüketim aşamalarında mekanik hasar, şok, sarsılma gibi fiziksel; gazlar, nem, ışık gibi kimyasal ve mikroorganizmalar, böcekler, kemirgenler, haşereler gibi biyolojik etkenlere maruz kalmaktadır (23).

Gıda ambalajı, gıdayı içinde bulunduran, istenmeyen iç ve dış etkilerden koruyan, pazarlama ve tüketimini kolaylaştıran ve metal, cam, kâğıt, ahşap, plastik gibi özel malzemeden yapılan kap, kılıf ya da sargı olarak tanımlanabilir (24, 25).

İnsanoğlu gezici yaşam sürdürdüğü dönemlerde gıda maddelerini yakın çevresinden elde etmiş ve bunları temin yerlerinde tüketmiş olduğu için bu dönemde taşıma veya saklama amacıyla araç gereçlere ihtiyaç duyulmamış; gıdaların saklanması (*containment*) için ise yapraklar, kabuklar, su kabağı gibi oyulmuş ağaç kütüğü, örülmüş bitkiler, hayvan iç organları vb. doğal malzemelerin kullanımı yeterli olmuştur. Ancak; göçebe hayattan yerleşik hayata geçilmesi ile birlikte gıdaların saklanması için yeni malzemelere ihtiyaç doğmuş; madenlerin ve kimyasal bileşiklerin keşfi ile metaller ve çömlekçilik gelişmeye başlamıştır. Kâğıt, cam, çeşitli metaller gibi malzemelerin kullanıldığı gıda ambalajı teknolojisine, endüstri devrimi sonucunda yeni malzeme ve üretim yöntemlerinin geliştirilmesi önemli katkı sağlamıştır (26, 27). Ordu için gıda saklama yöntemleri geliştirmek amacıyla konserve teknolojisini icat eden Nicholas Appert ile başladığına inanılan modern gıda ambalajı uygulamaları 1. ve 2. Dünya Savaşları arasında kalan dönemde büyük gelişme göstermiş, gıda ve gıda kalitesine ilginin arttığı 2. Dünya Savaşı sonrası dönemde, savaş sırasında savaş uygulamaları için geliştirilen plastik gibi malzemelerden gıda ambalajlarında yararlanılmaya başlanmıştır (27, 28).

Yirminci yüzyılın sonlarına doğru ise aseptik üretim ve paketlenme, esnek ve yeniden kullanılabilir kaplar, gaz emiciler, mikrodalga fırında kullanılabilir malzemeler, açılmayı gösteren yalıtımlar, aktif, akıllı ve dönüştürülebilir paketlenme sistemleri gibi modern paketlenme ve saklama dünyasında çığır açan gelişmeler yaşanmıştır (23). Günümüzde ise yaşam tarzı değişikliklerine bağlı olarak çeşitlenen ihtiyaçlar ve bilgiye erişim olanakları aracılığıyla artan bilinç doğrultusunda

tüketiciler, taze, az işlenmiş, besleyici, güvenli, tüketime hazır ve iyi tanımlayıcı biçimde etiketlenmiş gıdalara talep oluşturmuştur. Tüketicilerin bu yöndeki talepleri, pazardaki rekabet, gıda güvenliğine ilişkin güncellenen sıkı düzenlemeler veya savaşlar gibi beklenmeyen olaylara bağlı olarak; teknolojik gelişmelerle ilerlemiş bulunan gıda ambalajlama teknolojisi üzerinde yenilik ve gelişime yönelik baskı devam etmektedir (26, 29).

## 2.2. Gıda Ambalajlarının Temel İşlevleri

Gıda ambalajlarının temel işlevleri, tanımından da anlaşılacağı üzere; içerme, koruma, kolaylaştırma ve pazarlama olarak sıralanabilir (30, 31).

Gıda ambalajlarının bu temel işlevleri aşağıdaki biçimde açıklanabilir:

İçerme işlevi; gıda ambalajının en temel işlevi olup gıdaların bir yerden başka bir yere taşınması için gereklidir. Ayrıca; çevrede her gün ve defalarca yer değiştiren sayısız çeşitte ürüne karşı çevrenin korunmasına da katkıda bulunmaktadır (30).

Koruma işlevi; gıda ambalajlarının birincil amacı olup gıdalara su, su buharı, gazlar, mikroorganizmalar, böcekler, toz, ışık, koku, şok, sarsıntı, basınç gibi dış etkenlere karşı koruma sağlar ve gıdanın mekanik anlamda korumasının yanı sıra gıda bozulmasının yavaşlatılmasına, raf ömrünün uzatılmasına, kalite ve güvenliğinin garanti altına alınmasına ve gıda savurganlığının önlenmesine hizmet eder (30, 32, 33).

Kolaylaştırma işlevi; gıdanın tüketimini kolay ve pratik hale getirme işlevidir. Gıdanın önceden hazırlanmış, tercihen paketinden çıkarılmaksızın hızlıca pişirilebilecek veya ısıtılabilir olması, paketin tutma, açma gibi eylemlerin kolay yapılmasına olanak sağlayacak biçim ve büyüklükte olması, tüketim ihtiyacına uygun miktarlarda bölünmüş olması (porsiyonlama), açılıp kapanabilir özellik taşıması bu işleve örnek oluşturmaktadır (30).

İletişim-pazarlama işlevi; gıda ambalajının tüketiciye ürünün besin değerleri, içeriği, kaynağı gibi bilgileri aktarması, ürünlerin ayırıcı paketlenmesi ve etiketlenmesi yoluyla tüketicinin ürünü tanıyabilmesine olanak sağlamanın yanı sıra ürünün pazarlaması için de büyük önem taşır. Paketleme bu yönüyle “beş P” (ürün, fiyat, yer, pazarlama, paketleme [*product, price, place, promotion, packaging*])

(olarak isimlendirilen pazarlama işlevlerinin beşinci P'si olarak tanımlanmış, ürün için “sessiz bir satıcı”ya benzetilmiştir (30, 32).

Yukarıda özetlenen dört temel işlevin yanı sıra gıdalarda izlenebilirliğin sağlanması (her ambalaja tekil bir kod verilmesi gibi), ambalajın açılıp açılmadığının gözlenmesi (açılan ambalajda renk değişimi gibi), hediye ürün veya ev kullanımı için kapların dahil edilmesi gibi çeşitli işlevler de sıralanabilir (33).

### **2.3. Geleneksel ve Yenilikçi Ambalajlama Yöntemleri**

#### **2.3.1. Geleneksel Ambalajlar**

Geleneksel ambalajlama, gıda dağıtım sistemlerine erken dönemde büyük katkı sunmuş olmakla birlikte; günümüz toplumunun ihtiyaçlarının artarak karmaşıklaşması nedeniyle yetersiz kalmaya başlamıştır. En az düzeyde işlenmiş ve koruyucu içermeyen gıdalara artan talep, yasal düzenlemeler, gıda güvenliği endişeleri, gıda biyoterörü tehdidi gibi etmenler karşısında yeni işlevleri olan yenilikçi paketleme yöntemleri aranmaya başlanmıştır. Yakın geçmişe kadar gıdaların raf ömrünü etkileyen çevresel kirletici ve etkilere karşı yalnızca pasif ve inert koruma sağlayan ambalajlar kullanılır ve bu ambalajlar sınırlı bir bilgi sağlarken, aktif ve akıllı ambalajlama yöntemlerinin kullanıma girmesi ile bu durum değişmiştir (31, 34).

Yenilikçi ambalaj yöntemleri arasında; aktif ambalajlar, akıllı ambalajlar, değiştirilmiş atmosfer ambalajlama ve biyoyıkılabilir ambalajlar sayılabilir (35).

#### **2.3.2. Aktif Ambalajlar**

Aktif gıda ambalajları, gıdaların raf ömrünü uzatmak ve gıda kalitesinin uzun süre yüksek kalmasını sağlamak amacıyla paket, ürün ve/veya paket üzerinde kalan kısım arasındaki etkileşime dayanan ambalajlardır (36). Bu ambalajlar çeşitli bileşikler veya enerjiyi tutarak (adsorbe ederek) veya salıvererek etki gösterirler. Aktif ambalajlara, oksijen yakalayıcı, etilen yakalayıcı, sıvı ve nem emici, koku veya aroma yakalayıcı/salıverici, antimikrobiyal, antioksidan ambalajlar ve faz değişim malzemelerinden yararlanan ambalajlar örnek gösterilebilir (34, 37).

### 2.3.3. Akıllı Ambalajlar

Akıllı ambalajlar, gıdanın taşıma ve depolama sürecinde gıdanın durumu ve kalitesini, paket içi atmosferdeki değişiklikleri, dağıtım ve depolama sürecindeki sıcaklık değişimlerini izlemek için kullanılan ambalajlardır. Akıllı ambalajlara zaman-sıcaklık değişimlerini, paketin yalıtım-sızdırma durumunu, gıdanın tazeliğini, çeşitli toksinleri tespit etmeyi sağlayan ambalaj şekilleri örnek gösterilebilir (34, 38).

### 2.3.4. Değiştirilmiş Atmosfer Ambalajlama

“Değiştirilmiş atmosfer ambalajlama” yöntemlerinde; gıdaların raf ömrünü uzatmak ve koruyucu kullanımını azaltmak amacıyla ambalaj içerisindeki ortam (atmosfer) koşulları değiştirilir ve sonrasında paketin yalıtımı sağlanır. Ortam değiştirilmesi vakumlama yoluyla ambalaj içerisindeki havanın boşaltılması veya uygun bir gaz karışımının (genellikle oksijen, karbondioksit ve azot gazları kullanılır) ambalaj içerisine doldurulması yoluyla gerçekleştirilir. Gıda ambalajı içerisindeki ortam koşullarına müdahale edilmeyen değiştirilmiş atmosfer ambalajlama yönteminden farklı olarak; genellikle perakende ambalaj boyutundan daha büyük ölçekte (ürünlerin hasat sonrası taşınması gibi) uygulanan “kontrollü atmosfer paketleme” yönteminde ise ambalaj içi atmosferin kontrolü ve değiştirilmesi söz konusu olabilir (39, 40).

### 2.3.5. Biyoyıkılabilir Ambalajlar

Son yıllarda, imhaları ve geri dönüştürülmeleri zor, kısıtlı ve/veya masraflı olan sentetik plastiklerin yaygın kullanımı küresel boyutta endişe yaratmaktadır. Bu sorun, gelişmiş ülkelerde geri dönüşüm sistemlerinin kullanımı ile hafifletilse de; bu sorunun ancak yenilenebilir kaynaklardan elde edilen “biyoyıkılabilir” polimerlerin kullanılması ile tam olarak aşılabileceğine inanılmaktadır. Doğada, bakteri, maya, mantar gibi canlılar tarafından enzimatik olarak yıkılabilen “biyoyıkılabilir” malzemelerin sentetik plastik ambalaj malzemeleri yerine kullanımı büyük ilgi görmektedir. Bu bağlamda; gıda ambalajlarında yenilenebilir kaynaklardan elde edilecek biyoyıkılabilir özellikte ideal malzemeler olan biyopolimerlerin kullanımının

önemi, çevresel bilincin artmasına bağlı olarak her geçen gün daha iyi anlaşılmaktadır (32, 35, 41, 42).

#### **2.4. Gıda Ambalajlarında Kullanılan Malzemeler**

Geleneksel gıda ambalajlarının yapısında; kâğıt, karton, cam, metal, plastik ve bu malzemeler birlikte kullanılabilirlerdir.

Milattan önce 7000’lerde çömlekçiliğin bir yan dalı olarak üretilmeye başlandığı bilinen cam, kokusuz, gıdalarla etkileşime girmeyen, gaz ve buharlara karşı geçirgen olmayan, çeşitli şekiller verilebilen, ısıya dayanıklılığı sayesinde ısı ile sterilize edilebilen, tekrar kullanılabilir ve geri dönüşümü mümkün olan bir malzeme olması nedeniyle tercih edilirken; ağır oluşu ve kırılma riski, kullanımını kısıtlayan özellikleridir. Günümüzde hala pek çok alanda kullanılmaktadır (26, 33).

Esnek ambalaj malzemelerinin muhtemelen en eski formu olan kâğıt, ilk önce Çin’de üretilmiş ve kâğıt üretim teknikleri sonradan dünyaya yayılmıştır. Kâğıt malzemeden yapılan ambalajlar un, şeker, kuru meyve-sebze, bisküvi gibi gıdalar için kullanılmakta iken, karton, genellikle gıda ile doğrudan temas etmeyen taşıma amaçlı dış ambalajda kullanılmaktadır. Kâğıt ve karton ambalajlar 20. yüzyıl boyunca çok tercih edilen ambalaj malzemesi olma özelliklerini korurken plastik türevlerinin gelişmesi ve hayata girmesi ile yerlerini pek çok alanda bu yeni malzemelere bırakmışlardır (26, 33).

Esneklik, yeniden kullanılabilirlik, iyi fiziksel koruma ve engelleyici özellik göstermeleri, şekil verilebilirlikleri ve dekoratif özellikleri ile tercih edilen metaller arasında en yaygın kullanılan iki tanesi alüminyum ve çeliktir. Metaller, engelleyici özelliğin artırılması amacıyla kâğıt, karton veya plastik malzemeler üzerine kaplanabilirler. Çelik üzerine kalay kaplanması ile elde edilen teneke ambalajlar, içecekler, işlenmiş gıdalar, aerosoller, şekerlemeler gibi pek çok ürün için yaygın olarak kullanılır. Teneke malzemelerin konserve teknolojisi ile kullanımı 19. yüzyılda başlamıştır ve gıda ambalajlama teknolojisinde çığır açmıştır. Göreceli olarak daha pahalı olan kalaylanmamış çelik ambalajlar ise daha kısıtlı olarak kullanılmaktadır (26, 33).

Plastikler, ısıya dayanıklılığı, hafifliği, ucuzluğu, termal ve mekanik özelliklerde esneklik sağlaması ve tek bant üzerinde üretilme, doldurma ve yalıtılabilme gibi özellikleri nedeniyle büyük üstünlük sağlar. Ancak plastik gıda ambalajların oluşturduğu çevresel atık yükü “beyaz kirlilik” olarak da adlandırılan küresel bir çevre sorununa yol açmaktadır (43).

## **2.5. Nanoparçacıkların Gıda Ambalajlarında Kullanımı**

Bütün ambalaj malzemelerinin kullanım açısından bazı olumsuz yönleri ve kısıtlamaları mevcuttur. Örneğin; cam ve teneke ambalajlar buhar ve gazlara karşı yüksek engelleyici özellik göstermesine ve geri dönüştürülebilir olmasına rağmen ağır ve üretimi enerji gerektiren malzemelerdir. Kâğıt esaslı malzemeler, çevre dostu olmasına rağmen gaz ve buharlara geçirgendir. Nanoteknoloji, ilk kullanıma girdiği dönemden bu yana; çeşitli malzemelerin yukarıda sözü edilen olumsuz özelliklerinden kurtulmak ve ambalajlama malzemelerinin işlevselliğini arttırmak için elverişli görülmüştür. Başlangıçta bu malzemelerin engelleyici ve mekanik özelliklerini geliştirmeye yönelik başlayan kullanımları, zamanla aktif ve akıllı ambalajlama alanını da kapsayacak şekilde artmıştır (44).

Nanoparçacıklardan yararlanılan gıda ambalajlarını, geleneksel gıda ambalajlarına göre sağladıkları üstünlükler açısından üç ana başlık altında incelememiz mümkündür (10, 45):

- Geliştirilmiş/ iyileştirilmiş gıda ambalajları
- Aktif gıda ambalajları
- Akıllı gıda ambalajları

### **2.5.1. Nanoparçacıkların Geliştirilmiş/ İyileştirilmiş Gıda Ambalajlarında Kullanımları**

Gıda ambalajları, gıdayı çeşitli etkenlerden koruyacak sertlik, yanmaya dayanıklılık, neme dayanıklılık, esneklik gibi fiziksel özelliklere sahip olmanın yanı sıra; gıdanın raf ömrünün uzun olmasını sağlamak için gazlar, su buharları gibi maddelere karşı yeterli engelleyici işlev göstermelidir (25). Nanoparçacık kullanımı

ile gıda ambalajlarının fiziksel (mekanik) ve engelleyici özelliklerinin iyileştirilmesi mümkündür. Belirli nanoparçacıkların gıda ambalajlarına eklenmesinin gıda ambalajını ateşe dayanıklı ve hafif hale getirdiği, termal, mekanik ve geri dönüştürülebilirlik özelliklerini iyileştirdiği, gaz geçirgenliğini azalttığı gösterilmiştir (12, 45, 46).

Gıda ambalajlarının mekanik ve/veya engelleyici özelliklerini nanoparçacıklardan yararlanarak iyileştirmek amacıyla iki farklı uygulama yöntemi bulunmaktadır. Bu yöntemlerden bir tanesi, nanoparçacıkların veya nanofazın (dolgu) polimer bir matriks (sürekli faz) içerisinde dağıtıldığı “nanokompozit”lerin hazırlanmasıdır. Nanokompozitlerin yaygın kullanım alanına sahip olduğu görülmektedir. Kompozitlerde iki fazın ara yüzeyinde zayıf etkileşim bulunmaktadır ve büyük boyutlu dolgularda genellikle çeşitli eksiklikler bulunmaktadır; ancak dolgu malzemelerinin boyutlarının küçülmesi bu sorunları azaltır (45).

Gıda ambalajlarında nanoparçacıkların kullanımına yönelik diğer yöntemde ise polimer malzeme yüzeyine sürekli bir nano kaplama uygulanabilir (10, 25, 44, 47, 48).

On yıllardır yaygın olarak kullanılan petrol bazlı plastikler, toprak ve kara ekosistemine zarar vermekte, zararlı kimyasalların salınmasına neden olmaktadır. Bu plastiklerden yıllık 300 ton civarında atık oluştuğu ve bu miktarın büyük kısmının tek kullanımlık gıda ambalajlarından kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Polilaktik asit (PLA) ve polisakkarit filmler gibi biyoyıkılabilir polimerler ise bu ürünler yerine kullanılabilir (49). Ancak; biyoyıkılabilir ambalaj malzemelerinin kullanımı, kırılabilirlik, zayıf gaz ve nem engelleyicilik gibi performans sorunları, ısı etkisiyle düşük sıcaklıkta şekil bozulması gibi işleme sorunları ve yüksek maliyet nedeniyle kısıtlıdır (45). Biyoyıkılabilir ambalajların dezavantaj oluşturan bu özelliklerinin iyileştirilmesi için kullanılan yöntemlerden biri de nanoparçacıklarla güçlendirme işlemidir (49).

### **2.5.2. Nanoparçacıkların Aktif Gıda Ambalajlarında Kullanımları**

Gıdaların raf ömrünü uzatmayı, gıda kalitesi ve güvenliğini korumayı amaçlayan aktif gıda ambalajları, yapısındaki çeşitli aktif maddeler (antimikrobiyal, koruyucu, oksijen tutucu, su buharı emici, etilen emici/yıkıcı vb.) aracılığıyla gıda

veya gıdanın içinde bulunduğu ortam ile etkileşime girer ve geleneksel ambalajlardan farklı biçimde aktif bir koruma sağlar (10, 25).

Aktif gıda ambalajlarının geliştirilmesinde; antimikrobiyal özellik gösteren nanoparçacıklardan (gümüş, çinko oksit, magnezyum oksit, titanyum dioksit, çitosan gibi), oksijen yakalayıcı veya etilen yıkıcı (titanyum dioksit gibi) nanoparçacıklardan aktif madde olarak yararlanılmaktadır (10, 50). Aktif gıda ambalajlarının geliştirilmesi için nanoparçacıkların aktif madde olarak kullanılmasının yanı sıra; farklı aktif maddelerin nanoparçacıklara bağlanması yolu da uygulanabilmektedir. Örneğin; nanokiller üzerine esansiyel yağlar, antioksidanlar gibi çeşitli aktif maddelerin bağlandığı ve böylece aktif maddenin etkin biçimde dağıtımının sağlandığı ambalaj malzemeleri geliştirilmiştir (51, 52).

### **2.5.3. Nanoparçacıkların Akıllı Gıda Ambalajlarında Kullanımı**

Gıdanın depolama ve dağıtım süreçlerindeki durumu ile iç ve dış ortamdaki değişikliklerin izlenmesi, takip edilmesi ve kaydedilmesini sağlayan akıllı gıda ambalajlarında; gazlar, aromalar, kimyasal kirleticiler, patojenler ve çevre koşullarındaki değişikliklerin izlenmesini sağlayan nano algılayıcılar, gıda sahteciliğini önlemek amacıyla nanobarkodlar ve radyofrekans tanımlayıcı etiketler kullanılmaktadır (48, 53, 54).

Bu kapsamda, nanoteknoloji kullanılarak gıda ve ortamdaki değişiklikleri algılayan ve bozulma başladığında ortama koruyucu madde salıverilmesini sağlayacak ambalajların dahi geliştirilmesi üzerinde çalışmalar yapılmaktadır (55).

### **2.6. Gıda Ambalajlarından Gıdaya Nanoparçacık Geçişi**

Tüketicilerde, gıda ambalajı kaynaklı nanoparçacık maruziyeti oluşması için nanoparçacıkların ambalaj malzemelerinden gıdaya geçişi gereklidir. Nanoparçacıkların ambalaj malzemelerinden gıdaya geçişi için dört mekanizma öne sürülmüştür (56, 57):

- i) *Desorpsiyon (yüzeyden salım/salıverilme)*: Ambalaj malzemesinin dış yüzeyinde tutunmuş (*adsorbe*) durumdaki NP'nin kopması

- ii) *Difüzyon*: Ambalaj malzemesinden dış yüzeye ve sonrasında gıdaya düşük konsantrasyona doğru taşınma
- iii) *Dissolüsyon (çözünme)*: Nanoparçacıkların iyonize şekle dönüşerek gıdaya geçişi
- iv) *Ambalaj matriksi yıkımı*: NP'lerin, içerisinde yer aldığı matriksin yıkımına bağlı olarak serbest kalması

Desorpsiyon, nanoparçacığın malzemeye elektrostatik kuvvetlerle bağlı olduğu ve malzeme yüzeyinde bulunduğu durumlarda söz konusu olup, nanoparçacıkların temas yüzeyinde kısıtlanmış olduğu durumlarda (nanoparçacık kaplanmış malzemeler gibi) bu mekanizma ile geçiş olasıdır. Yüksek konsantrasyonlu bölgeden düşük konsantrasyonlu bölgeye doğru kütle göçü olarak tanımlanan difüzyon ile nanoparçacıklar, ambalaj malzemesi içerisinde ve gıda ile temas yüzeyinde ilerleyerek gıdaya geçerler. Dissolüsyon yoluyla geçişte ise nanoparçacıklar temas yüzeyinden iyonik forma dönüşerek geçerler. Nanoparçacıkların malzeme matriksine çok sıkı bağlı olduğu (kovalent bağlı veya hareketli olamayacak kadar büyük parçacık) durumlarda ise matriksin yıkımı (yüzey yıkımı) ile gıdaya geçiş gerçekleşebilir (56, 57).

Simon ve ark. (58), 2008 tarihli çalışmalarında yalnızca düşük dinamik viskoziteli matriks içerisinde çok küçük parçacıkların (1 nm'den küçük çapta) gıdaya geçiş yapabileceği sonucuna ulaşmış ve bu verilerden yola çıkarak gıda ambalajlarında nanoteknoloji kullanımının ortalama bir tüketici için nanoparçacık maruziyetine neden olmayacağını belirtmiştir. Ancak; gıda ambalajlarından gıdaya daha büyük boyutta nanoparçacıkların geçişini gösteren pek çok çalışma sonucu da bulunmakta olup bu çalışmalara işbu tez çalışmasının ilgili bölümlerinde yer verilmiştir.

## **2.7. Nanoparçacıkların Kendine Özgü Özelliklerinin Toksikolojik Açıdan Önemi**

Nanoparçacıklar, aynı maddenin nano olmayan şekillerinden farklı fizikokimyasal özelliklere sahiptir ve nanoparçacıkların toksikokinetik ve toksisite profilleri bu özellikleri nedeniyle, aynı maddenin çözülmüş veya mikro/makro metrik boyutlardaki şekillerinden farklıdır. Bu nedenlerle; NP'lerin kinetik özellikleri ile

toksik etkilerine, maddenin nano olmayan formlarına ilişkin verilerin uyarlanması yoluyla tam olarak ulaşılması mümkün değildir (59). Benzer şekilde; NP'lerin biyolojik sistemler üzerine nano olmayan formlar ile benzer etkiler gösterdiğinin varsayılması da, aksi yönde veri mevcut değilse, uygun değildir (60). Bu durum ile bağlantılı olarak; toksisite çalışmalarında NP'lerin fizikokimyasal karakterizasyonunun gerekliliği, düzenleyici otoriteler ve bilim çevreleri tarafından kabul görmüştür. Fizikokimyasal karakterizasyon, çoğunlukla parçacık şekli ve boyutu ile ilişkili özellikleri kapsamaktadır ve deneysel çalışmalar için gereklidir (61). Nanoparçacıkların karakterizasyonu, fiziksel, sentetik ve biyolojik kimliğinin belirlenmesini kapsar. Maddenin fiziksel kimliği, kimyasal bileşimi ile ilgili bilgileri içerir. Fiziksel kimlik, kendiliğinden gelen ve temel işlevsel özelliklerini (manyetik özellikler, gözeneklilik, elektrik iletkenliği gibi) tanımlar. Yüzey değişimi işlemi yapılan nanoparçacıklarda fiziksel kimlik, sentetik kimlik olarak isimlendirilir. Yüzey değişim işlemi yapılan nanoparçacıklarda nanoparçacığın kendinden gelen özellikleri korunur; ancak yüzey ile ilişkili özellikleri önemli ölçüde değişir. Biyolojik kimlik ise NP biyolojik bir ortama maruz kaldığında ortaya çıkar. Biyolojik kimlik, fiziksel ve sentetik kimlikten farklı olarak, rutin fizikokimyasal karakterizasyon yöntemleri ile belirlenemez; nanoparçacığın belirli bir biyolojik ortamdaki biyolojik yapılarla afinitesi ayrı ayrı incelenmelidir (62).

Nanoparçacıkların boyut, dağılım, elektrostatik özellikler gibi çeşitli özelliklerinin bu maddelerin toksikokinetiği ve toksisitesi üzerindeki etkisi bilinmektedir (63). Örneğin; Hillyer ve Albrecht (64)'in altın NP'ler üzerinde gerçekleştirilen çalışmasında; parçacık büyüklüğünün emilimi ve dağılımı olumsuz etkilediği gösterilmiştir. Çalışma sonucunda büyük parçacıkların sindirim kanalı içerisinde lokalize olduğu, daha küçük parçacıkların böbrek, dalak, akciğer gibi organlara ulaştığı belirtilmiştir. Park ve ark. (65)'nin parçacık boyutunun toksisite üzerine etkisini incelediği çalışmada ise, daha küçük boyutlu gümüş NP'lerin toksik etkisinin daha şiddetli olduğu gösterilmiştir.

Maddelerin dış yüzeylerinde bulunan parçacıklar ve yüzey kimyası, maddenin çevre ile etkileşimleri üzerinde belirleyici rol oynar. Maddenin yüzeyinde bulunan ve enerji açısından kararsız durumdaki parçacıkların oranı, yüzey alanı artışına bağlı olarak -nanomateryallerde olduğu gibi- arttığında; maddenin yüzey reaktivitesini

arttıran bu parçacıkların özellikleri baskın hale gelmeye başlar ve madde, kendisine pek çok yeni uygulama alanı açan yeni fizikokimyasal ve mekanik özellikler kazanır (59, 66).

Nanoparçacıkların, içerisinde buldukları çevreye göre de dinamik olarak değişiklik göstermesi toksikolojik değerlendirmeler açısından önem taşıyan bir durumdur. Yüksek yüzey aktivitesine sahip olan nanoparçacıklar, farklı mekanizmalar ile kümeleşmeler (*agglomerat*) oluşturma eğilimi gösterirler ve nanoparçacık özelliklerinin bir kısmını taşımaya devam edebilen bu kümeler, yine ortam koşullarına bağlı olarak yıkılabilir ve yeniden oluşabilir (59). NP'ler, Van der Waals gibi zayıf kuvvetler ile kümeleşerek, sabit bir yapı göstermeyen ve ortam koşullarına göre şekil ve büyüklük değiştirebilen kümeleşmeler oluşturabilir. Kümeleşmelerde yüzey alanı, bileşimindeki parçacıkların toplam yüzey alanından önemli farklılık göstermez iken, bileşenlerin kovalan veya metalik bağlar gibi daha kuvvetli bağlar ile bir araya geldikleri topaklanmalarda (*aggregat*) ise birincil parçacıkların toplam yüzey alanından daha düşük toplam yüzey alanı ortaya çıkar (59, 67).

Nanoparçacıkların bu özellikleri, çalışmalarda uygulanacak dozimetre açısından da önem taşır. Örneğin; NP'ler için kullanılması en basit doz birimi ağırlık olmasına rağmen; ağırlık ölçüsünün kullanılması sonuçların doğruluğunu olumsuz etkileyebilir. Dozimetre için yüzey alanı, parçacık sayısı, parçacık boyut dağılımı gibi özellikler de devreye girmekte ve seçim, incelenecek toksik etkinin mekanizmasına göre yapılmaktadır (61, 68).

Gıda alımı ile maruz kalınan NP'lerin değerlendirilmesi konusunda ise; gıda içerisinde NP'lerin genellikle kümeleşmiş formda olduğu varsayılmakta olup gıda ortamında, mide-bağırsak sisteminde ve biyolojik dokular içerisinde kümeleşmelerin parçalanmaya uğrayıp uğramadığı tam olarak bilinmemektedir (59). Toksikolojik çalışmaların yürütülmesi ve biyolojik etkiler hakkında yorum yapılmasında, bu kümeleşmeler üzerinde etkili olan pH, ortamın iyonik kuvveti gibi çevresel etmenlerin değerlendirilmesi büyük önem taşımaktadır (69). Topaklanma/kümeleşme oluşumu ve özelliklerinin NP'lerin toksisitesi üzerine etkisini gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Zook ve ark. (70), gümüş NP'lerin kan hücreleri üzerindeki toksisitelerinin topaklanma büyüklüğündeki artış ile azaldığını bildirmişlerdir. Farklı

kümeleşme durumundaki karbon nanotüp (CNT) örneklerinin mezotelyoma hücre kültürü üzerindeki sitotoksik etkilerinin MTT testi ile, hücre proliferasyonunun ise DNA miktar tayini ile değerlendirildiği bir başka çalışmada ise, kümeleşmiş durumdaki CNT'nin iyi dağılmış CNT'ye göre daha yüksek düzeyde istenmeyen etki gösterdiği belirlenmiştir (71). Albanese ve ark. (72)'nin farklı hücre türleri üzerinde gerçekleştirdikleri bir çalışmada, topaklanma oluşumunun NP'lerin hücre içerisine alımını hücre tipine göre değişen biçimde etkilediği; ancak toksik etki üzerinde önemli bir değişikliğe yol açmadığı bildirilmiştir .

Nanoparçacıkların boyutlarının küçüklüğü de, yabancı maddelerin organizmaya girişi ve organizma içindeki yer değişimine karşı işlev yapan engellerin etkinliğini azaltabilir (59). NP'ler hücre içerisine aktif ve pasif taşıma ile alınabilir ve her iki geçiş şekli üzerinde de NP'lerin boyutlarının etkili olduğu öne sürülmüştür (73). Bunun yanı sıra; NP'ler küçük boyutları ve büyük yüzey alanı/kütle oranına bağlı olarak; proteinler, membranlar, DNA, organeller, metabolitler gibi biyolojik yapılar ve biyomoleküllerle çeşitli etkileşimlere girebilirler. Bu etkileşimler, protein taç oluşumu, parçacığın çevrenmesi, hücre içine alımı ve biyoyıkımı gibi durumlar ile sonuçlanır (74, 75).

Nanoparçacıkların biyomoleküller ile etkileşimleri açısından; özellikle proteinler ile etkileşimleri büyük önem taşımaktadır. NP'ler biyolojik ortam içerisine girdiğinde, proteinlerin NP yüzeyine bağlanması ile oluşan ve dinamik bir yapı olan "protein taç" (*protein corona*) ile çevrenir (76). Protein taç oluşumu, NP'nin büyüklük, şekil ve yüzey özelliklerinin yanı sıra; proteinlerin NP yüzeyine bağlanmaya yatkınlıkları, biyolojik sıvının özellikleri ve bileşimi gibi pek çok faktörden etkilenen bir süreçtir. Protein taç oluşumu, NP'lerin membran geçişleri, biyodağılımları ve biyoakümülyasyonları açısından büyük öneme sahiptir (75-77). Etrafı biyolojik ortamdaki çeşitli proteinler ile çevrenmiş NP'ler (protein taç), bu şekilde proteinlerin arkasına gizlenerek biyolojik bir benzerlik kazanır. Böylece, hücre tarafından tanınan ve uygun proteinler ile çevrili olan NP'lerin hücre içerisine endositoz mekanizması ile girişi, kaplanmamış parçacıktan çok daha kolay hale gelmiş olur (78, 79). Maiorano ve ark.(80), altın NP'lerin uygulandığı iki farklı hücre kültürü ortamında (HeLa ve U937) değişik özellik ve bileşimlerde protein taçlar oluştuğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar bu çalışma ile, farklı protein taçlar oluşumunun

NP'lerin hücre içine alımı ve sitotoksitesi üzerinde etkili olduğunu ve daha küçük taç oluştuğunda hücre içine alım ve toksisitenin daha yüksek olduğunu göstermişlerdir.

Nanoparçacıkların biyolojik sıvılar içerisinde girdikleri etkileşimlerin yanı sıra gıda matrisi içerisindeki bileşenler ile etkileşimleri de önem taşımaktadır. NP'ler gıda içerisinde bulunan protein, lipit gibi bileşenlerle, gıda işleme, saklama ve sindirim süreçlerinde fizikokimyasal özelliklerini değiştirecek etkileşimlere girebilir ve bu etkileşimler biyoyararlanım, etkinlik ve toksisitelerinde değişikliklerle sonuçlanabilir (81-83). Ayrıca, matrisin sindiriminin NP yapısı üzerine etkileri olabileceği de göz önünde bulundurulması gereken bir başka noktadır (59).

Go ve ark. (82), gıda katkı maddesi olarak kullanılan silisyum dioksitin sakkarit, protein, yağ asidi ve minerallerle etkileşimlerini çeşitli gıda benzerleri kullanarak göstermiş ve nicel olarak belirlemiştir. Di Silvio ve ark. (84), magnetit ( $Fe_3O_4$ ) nanoparçacıklarına eklemek ile eşzamanlı olarak *in vitro* sindirim modeli uygulamış ve NP çevresinde protein taç oluşumunu göstermiştir. Bu çalışmada; sindirim ürününün Caco-2 hücreleri üzerinde etkileri incelenerek protein taç büyüklük, yoğunluk ve bileşiminin NP'nin hücre içine alım ve yer değiştirmesi üzerine etkili olabileceği ve farklı protein taç bileşimlerinin hücre morfolojisi üzerinde farklı etkiler yarattığı bildirilmiştir. Lichtenstein ve ark. (85) poliakrilik asit kaplı gümüş nanoparçacıklarının hücre içerisine alımlarını protein, karbonhidrat ve yağ asitleri varlığında *in vitro* sindirim modeli kullanarak incelemiş ve Caco-2 hücrelerine NP alımının, sindirime maruz bırakılan NP'lerde sindirim uygulanmayanlara göre daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Wang ve ark. (86) ise; *in vitro* ve *in vivo* koşullarda gerçekleştirdikleri bir çalışmada; C vitamininin çinko oksit NP'lerinin hücreye içine alımını ve dissolüsyonu arttırarak NP'nin sitotoksik etkisini güçlendirdiğini bildirmiştir. Bu çalışmada titanyum dioksit NP için ise benzer bir etkileşim gözlenmemiştir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma kapsamında gıda ambalajlarında nanoparçacıkların kullanımının toksikolojik açıdan değerlendirilmesine yönelik ayrıntılı incelemelere başlanmadan önce; gıda ambalajlarının tanımı, yapısı, işlevleri, ambalaj malzemeleri ile nanoparçacıkların kendilerine has özellikleri ve gıda ambalajlarında kullanımına ilişkin genel bilgilerin sunulması amaçlanmıştır. Bu amaçla kapsamlı web taraması yoluyla elde edilen veriler ile Hacettepe Üniversitesi Kütüphaneleri'nin erişimine açık olan veri tabanları üzerinden erişilebilen kaynaklar incelenmiş ve tezin genel bilgilerini içeren bölümleri oluşturulmuştur.

Gıda ambalajlarında nanoparçacıkların kullanımının toksikolojik açıdan değerlendirilmesi amacıyla; gıda ambalajlarında kullanımı üzerine en çok araştırma gerçekleştirilen ve en yaygın olarak kullanılan iki NP seçilerek bu NP'ler üzerine detaylı araştırma yapılması planlanmıştır. Bu amaçla; Pubmed ve Web of Science (WoS) veri tabanları üzerinden, genel bilgilerin derlenmesi aşamasında gıda ambalajlarında yaygın olarak kullanıldığı tespit edilmiş olan metal ve kil nanoparçacıkları konu alan çalışmalar taranmıştır. Yapılan taramalarda Boolean operatörleri (AND, OR, NOT, \* gibi) de kullanılarak farklı kombinasyonların yer aldığı yayınların da değerlendirmeye alınabilmesi, yazım farklılığı ve benzeri durumlar nedeniyle kapsam dışı kalmaması amaçlanmıştır.

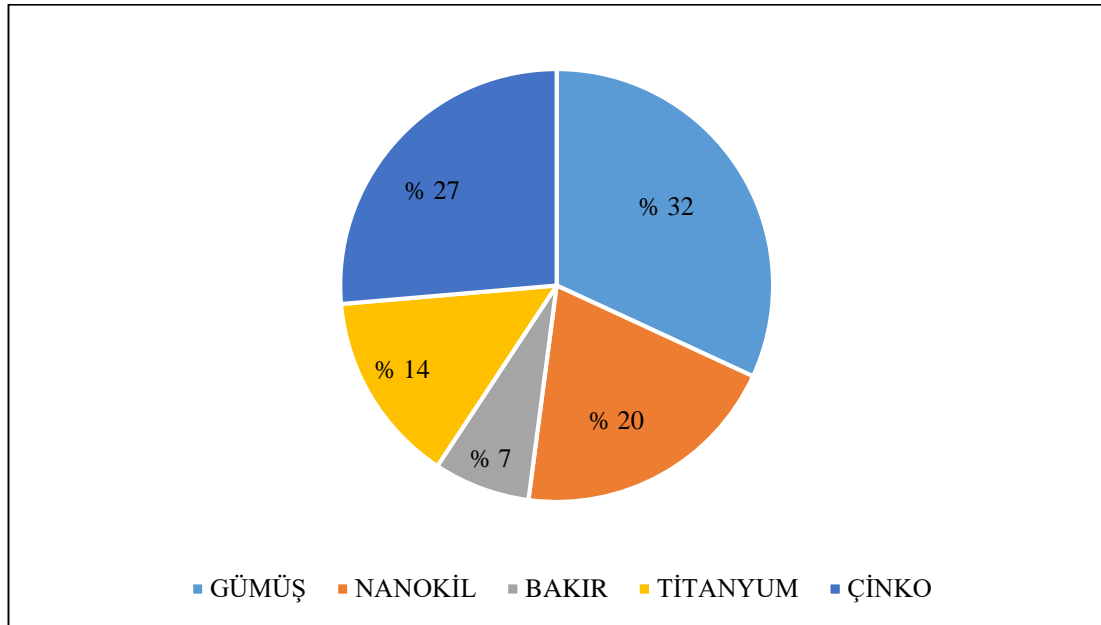
Tarama sonuçlarına göre, gıda ambalajlarında kullanım amacıyla üzerinde en çok araştırma yapılan ilk üç nanoparçacığın gümüş, çinko oksit ve nanokil olduğu belirlenmiştir. Pubmed ve WoS veri tabanlarında 26.09.2024 tarihi itibarıyla bu üç nanoparçacığı kapsayacak şekilde yapılan taramada kullanılan anahtar kelimeler ile tarama sonucunda ulaşılan çalışma sayı ve dağılımları tablo (Bkz. Tablo 3.1.) ve grafik şeklinde sunulmuştur (Bkz. Şekil 3.1.) (Bkz. Şekil 3.2.). Söz konusu veri tabanı taramaları, üzerinde en çok bilimsel yayın olan iki nanoparçacığın gümüş nanoparçacıklar ve nanokiller olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte; çeşitli bilimsel yayınlarda da nanoparçacıklarla geliştirilen gıda ambalajları içerisinde en büyük pazar payına nanokil ve gümüş nanoparçacıkların sahip olduğu bildirilmiştir (18). Pazardaki NP içerikli ambalaj malzemelerine örnekler içeren yayınlarda da en çok kullanılan iki nanoparçacığın gümüş ve nanokil olduğu görülmektedir (13, 87, 88).

Belirtilen nedenlerle ayrıntılı araştırma yapılacak iki nanoparçacık olarak gümüş nanoparçacıklar ve nanokiller belirlenmiştir.

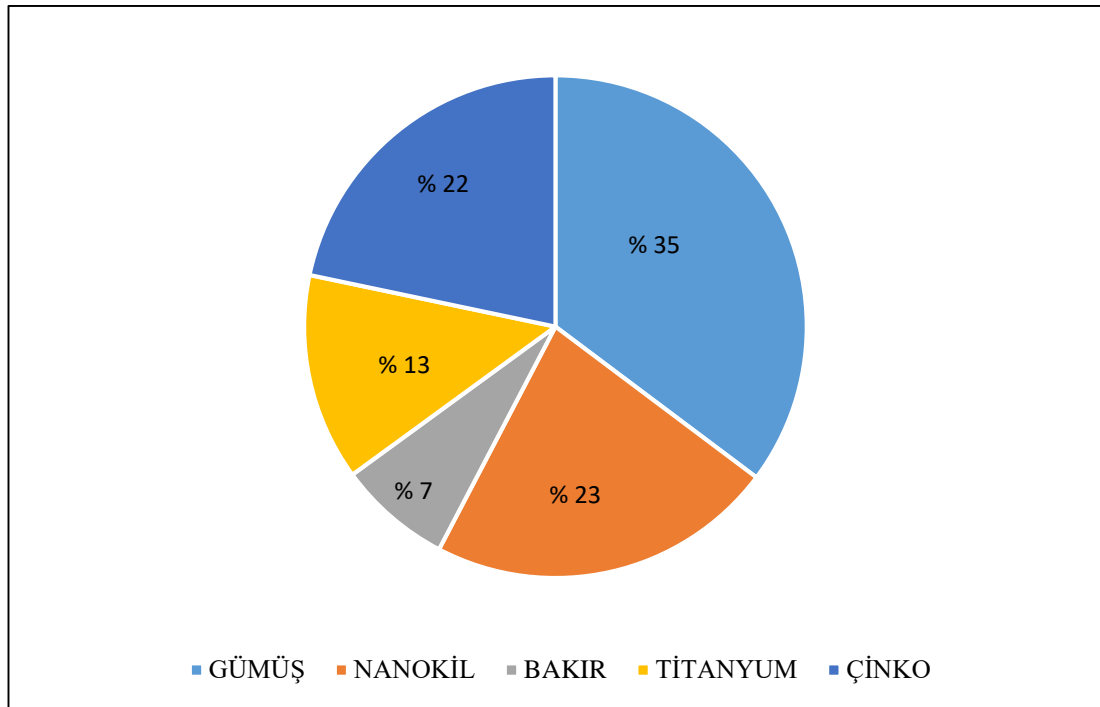
**Tablo 3.1.** Gıda ambalajlarında NP kullanımı konulu çalışma sayısına ilişkin veri tabanı tarama sonuçları.

NANOPARÇACIK	ANAHTAR KELİMELER	MAKALE SAYISI	
		PUBMED	WoS
GÜMÜŞ	nano* AND ("food pack*" OR "food contact") AND (silver OR "silver nano*" OR Agnp* OR ag)	398	1312
NANOKİL	nano* AND ("food pack*" OR "food contact") AND (mmt or montmorillonite or clay or nanoclay or kaolin or halloysite or sepiolite or bentonite)	252	835
ÇİNKO (ve oksit formları)	nano* AND ("food pack*" OR "food contact") AND (zinc OR zn OR zno)	329	808
TİTANYUM (ve oksit formları)	nano* AND ("food pack*" OR "food contact") AND (titanium OR tio2 OR tio)	179	496
BAKIR (ve oksit formları)	nano* AND ("food pack*" OR "food contact") AND (copper OR cu OR cuo)	90	272

(Veri tabanı taraması 26.09.2024 tarihinde gerçekleştirilmiştir.)



**Şekil 3.1.** Nanoparçacık çeşidine göre Pubmed veri tabanındaki yayın sayısı dağılımı.



**Şekil 3.2.** Nanoparçacık çeşidine göre Web of Science veri tabanındaki yayın sayısı dağılımı.

Çalışmanın nanoparçacıkların gıda ambalajında kullanımının oluşturduğu risklere ilişkin bölümünde kullanılmak üzere; seçilen her iki nanoparçacık için Pubmed ve WoS veri tabanlarında taramalar gerçekleştirilmiştir. Anahtar kelimeler, olası tüm çalışmaları içermesi için kapsamlı şekilde seçilmiş ve Boolean operatörleri kullanılmıştır. Sözü edilen veri tabanları üzerinde gerçekleştirilen taramalar dışında Google akademik veri tabanı ve web taraması sonucunda elde edilen veriler ve kaynaklardan da yararlanılmıştır. Tarama sonucu elde edilen yayınlar, çalışmamızla ilgi düzeyleri ve SJR (SCImago Journal Rank) çeyreklik sınıfları gibi parametreler kullanarak seçilmiş ve uygun bulunanlardan yararlanılmıştır. Bunun yanı sıra; gerekli görülen durumlarda, yararlanılan kaynaklar tarafından referans gösterilen kaynaklar üzerinde de incelemeler yapılarak; uygun bulunanlar kaynak olarak kullanılmıştır.

Gıda ile temas eden malzemelerin risk değerlendirmelerine ilişkin Avrupa Birliği (AB) ve Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) uygulanan rehberler, gıda ambalaj malzemesinden gıdaya tahmini geçiş miktarına bağlı olarak toksisite testi gerekliliği öngören basamaklı bir yaklaşımı benimsemiştir. Basamaklı yaklaşımda risk değerlendirmesi, migrasyon değerlendirmesi, toksisite değerlendirmesi, maruziyet değerlendirmesi ve risk karakterizasyonu olarak dört ana basamaktan oluşmaktadır

(89). Bu nedenle, bu çalışmada da öncelikle maruziyet gerçekleşmesinin temel kaynağı olan gıda ambalajından gıdaya geçişin değerlendirildiği migrasyon çalışmaları incelenmiştir. Bu amaçla Pubmed ve WoS veri tabanlarında tabloda belirtilen anahtar kelimeler kullanılarak tarama gerçekleştirilmiştir (Bkz. Tablo 3.2.).

**Tablo 3.2.** Gıda ambalajlarından gıdaya nanoparçacık geçişine ilişkin erişilen çalışma sayıları.

NANOPARÇACIK	ANAHTAR KELİMELER	MAKALE SAYISI	
		PUBMED	WoS
GÜMÜŞ	nano* AND ("food pack*" OR "food contact") AND (silver OR "silver nano*" OR Agnp* OR ag) AND (migrat* OR release)	122	402
NANOKİL	nano* AND ("food pack*" OR "food contact") AND (mmt or montmorillonite or clay or nanoclay or kaolin or halloysite or sepiolite or bentonite) (migrat* OR release)	66	235

(Veri tabanı taraması 26.09.2024 tarihinde gerçekleştirilmiştir.)

Çalışmanın bir sonraki aşamasında ise gümüş NP ve nanokillerin farmakokinetik özellikleri, toksik etkileri ve toksisite mekanizmalarına ilişkin araştırmalar yapılmıştır. Pubmed ve WoS veri tabanlarında yapılan taramalarda aşağıdaki tabloda yer verilen anahtar kelimeler kullanılmış olmakla birlikte (Bkz. Tablo 3.3.); alt başlıklara göre hepatotoksisite, nefrotoksisite gibi organa özel toksik etkilere, toksisite mekanizmalarına ve biyoyararlanım, farmakokinetik gibi alanlara yönelik farklı anahtar kelimeler ve kombinasyonları kullanılarak da taramalar gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 3.3.** Nanoparçacıkların oral yolla oluşturduğu toksik etkilere ilişkin erişilen çalışma sayıları.

NANOPARÇACIK	ANAHTAR KELİMELER	MAKALE SAYISI	
		PUBMED	WoS
GÜMÜŞ	nano* AND (silver OR "silver nano*" OR Agnp* OR ag) AND (toxic* OR safe*) AND (oral OR ingest*)	606	1380
NANOKİL	nano* AND (mmt or montmorillonite or clay or nanoclay or kaolin or halloysite or sepiolite or bentonite) AND (toxic* OR safe*) AND (oral OR ingest*)	44	121

(Veri tabanı taraması 26.09.2024 tarihinde gerçekleştirilmiştir.)

Çalışmanın nanoparçacıkların gıda ambalajlarında kullanımına ilişkin ülkemiz ve dünyadaki mevzuat düzenlemelerine ilişkin kısmında web kaynaklarından diğer bölümlere göre daha ağırlıklı şekilde yararlanılmıştır. Amerikan Gıda ve İlaç Ajansı (*The Food and Drug Administration, FDA*) ve Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (*The European Food Safety Authority, EFSA*) gibi otoritelerin web sayfaları ve ilgili ülkelerin yasal düzenlemelerinin yer aldığı resmî web sayfaları incelenmiştir. Bunun yanı sıra; resmî web sayfası olmamakla birlikte konuya yönelik bilgi ve gelişmeleri içeren web sayfaları da incelenmiştir. Ayrıca; Hacettepe Üniversitesi Kütüphanelerinin erişimine açık olan veri tabanları üzerinden tabloda belirtilen anahtar sözcüklerle yasal düzenleme ve rehberlere yönelik taramalar gerçekleştirilmiş (Bkz. Tablo 3.4.) ve konuyla ilgili yararlı olabilecek yayınlar kaynak olarak kullanılmıştır.

**Tablo 3.4.** Gıda ambalajlarında nanoparçacık kullanımına yönelik yasal düzenlemelere ilişkin erişilen çalışma sayıları.

ANAHTAR KELİMELER	MAKALE SAYISI	
	PUBMED	WoS
Nano* AND ("food pack*" OR "food contact") AND (regulation OR legislation OR guid*)	187	325

(Veri tabanı taraması 26.09.2024 tarihinde gerçekleştirilmiştir)

Aynı anahtar sözcükler kullanılarak gerçekleştirilen taramalar sonucunda Pubmed veri tabanında ulaşılan çalışma sayısının WoS veri tabanında ulaşılan çalışma sayısından daha düşük olduğu görülmektedir.

Pubmed veri tabanı tıp ve biyomedikal alanlara odaklı iken WoS veri tabanı bilimsel alanların çoğunu kapsamaktadır (90). Falagas ve ark. (91)'nin Pubmed ve WoS'ın da dahil olduğu veri tabanlarının karşılaştırılması amacıyla aynı anahtar kelimeler kullanarak tarama yaptığı bir çalışmada da Pubmed veri tabanında 6.000 çalışmaya ulaşılırken, WoS veri tabanında 8.700 çalışmaya ulaşılmıştır. Veri tabanlarının karşılaştırıldığı bir başka çalışmada da aynı anahtar kelimeler ile yapılan taramalarda Pubmed veri tabanında WoS veri tabanında ulaşılandan daha az çalışma sayısına ulaşılmıştır (92). Ayrıca; Pubmed veri tabanı, tıbbi konu başlıkları (*medical subject heading, MeSH*) olarak adlandırılan karmaşık bir anahtar kelime düzeltme servisi kullanmaktadır (92). Sözü edilen veri tabanlarının erişebileceği kaynakların

tarih aralığı göz önüne alındığında WoS veri tabanının 1900 yılından; Pubmed veri tabanının 1966 yılından itibaren sonuçlara ulaşabildiği bilinmektedir (92). Ancak; her iki veri tabanında yapılan tarama sonucunda elde edilen eserlerin büyük çoğunluğu, 1966 yılından sonraki yıllarda gerçekleştirilen çalışmalara aittir. Bu nedenle; belirlenen eser sayılarındaki farklılığın veri tabanlarının erişebildiği tarih aralığından kaynaklanmadığı değerlendirilmektedir. İki veri tabanındaki taramalarda elde edilen farklı eser sayılarının, veri tabanlarının kapsadığı bilimsel alanların farklı olması ve farklı arama algoritmalarına sahip olmalarından kaynaklanması olasıdır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Seçilen Nanoparçacıkların Gıda Ambalajlarında Kullanımına İlişkin İncelemeler

Nanoparçacıklarla geliştirilen gıda ambalajları içerisinde en büyük pazar payına nanokil ve gümüş nanoparçacıkların sahip olduğu bildirilmiştir (18). Nanokiller, bol bulunurluğu, ucuz oluşu, mekanik, engelleyici ve ısı dayanıklılığı özelliklerini iyileştirici işlevleri nedeniyle gıda ambalajlarında en çok kullanılan malzemelerden biridir (93). Pazardaki NP içerikli ambalaj malzemelerine örnekler içeren yayınlarda da en çok kullanılan iki nanoparçacığın gümüş ve nanokil olduğu görülmektedir (87). Bu nedenle, tez çalışması kapsamında nanokil ve gümüş NP içeren gıda ambalajlarının toksikolojik açıdan değerlendirilmesi amacıyla; bu NP'lerden gıdaya geçiş ve bu NP'lerin, özellikle oral maruziyet durumundaki, toksik etkileri incelenmiştir.

#### 4.1.1. Gümüş Nanoparçacıkların Genel Özellikleri ve Gıda Ambalajlarında Kullanımı

##### *Gümüş Nanoparçacıkların Genel Özellikleri*

Gümüş, mikroorganizmaların enfeksiyon kaynağı olduğunun henüz bilinmediği Milattan önce 4000 yıllarından bu yana çeşitli tıbbi amaçlarla ampirik olarak kullanılmıştır. Gümüşten, Fenike, Yunan, Roma, Mısır dönemlerinden itibaren gıda ve su depolamasında çeşitli şekillerde yararlanılmıştır (67). Benzer şekilde 1. Dünya Savaşı döneminde yaraların enfekte olmasını önlemek amacıyla yaraların üzerine gümüş yapraklar konmuş, suyun hijyenini sağlamak için suyun içine gümüş sikke atılması veya gümüş kapta saklanması gibi uygulamalar günlük hayatta yer bulmuştur (94, 95).

Gümüş NP'ler genellikle 100 nm'den küçük ve yaklaşık 20 ila 15.000 gümüş atomundan oluşan parçacıklardır (96).

Gümüş NP'lerin varlığı ve sentezine ilişkin ilk veriler 120 yılı aşkın bir süre öncesine ait olup, 1889 yılında M.C. Lea tarafından, sitratla kararlılığı sağlanmış 7-9 nm boyutlarında kolloidal gümüş NP sentezlediği bildirmiştir. 1900'lü yılların

başından itibaren farklı yöntemler de kullanılarak kararlı hale getirilen çeşitli gümüş NP'ler üretilerek pazarlanmaya başlanmıştır (97).

Gümüş NP'ler küre, üçgen prizma, çubuk, küp, yıldız ve benzeri pek çok farklı şekle sahip olabilirler. Bu nanoparçacıklar, yüksek yüzey alanı/hacim oranı ve yüzey plazmon rezonansı gibi özellikleri sayesinde fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler açısından nano olmayan şekillerine göre önemli farklılıklar gösterirler (98).

Gümüş NP'ler, elektronik ürünler, sağlık, gıda ve tekstil gibi sektörlerde geniş uygulama alanına sahip olan ve ticari anlamda en çok ilgi çeken nanoparçacıklardır (99).

Gümüş NP'lerin sentez yöntemleri, yığın şeklindeki malzemenin nano forma çevrilmesi “yukarıdan aşağı, *top-down*” veya atomlardan nanoparçacık oluşturulması “aşağıdan yukarı, *bottom-up*” prensiplerine dayanmaktadır. Bu işlemlerin gerçekleştirilmesi amacıyla kullanılan yöntemler ise fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler olarak sınıflandırılabilir. “*Yukarıdan aşağı*” yaklaşımı genellikle fiziksel yöntemler içermekte iken, kimyasal ve biyolojik sentez genellikle “*aşağıdan yukarı*” yaklaşıma dayanmaktadır. Fiziksel yaklaşım ile gerçekleştirilen sentez yöntemlerine lazerle yakma (lazer ablasyonu), termal buharlaştırma, elektrospreyleme; kimyasal sentez yöntemlerine ise kimyasal indirgeme, mikroemülsiyon tekniği, hidrotermal sentez, *sol-gel* metodu örnek verilebilir (100-103).

Biyolojik yöntemler, genellikle yüksek maliyetli olmalarına rağmen; toksik ve tehlikeli kimyasallar aracılığıyla canlılar ve ekosisteme zarar verebilen fiziksel ve kimyasal modeller yerine önemli bir seçenek olarak öne çıkmaktadır (100-102). “Yeşil sentez” yöntemi olarak adlandırılan biyolojik sentez yöntemleri, düşük maliyetleri, düşük enerji gereksinimi, daha hafif tepkime koşullarında gerçekleştirilmesi, diğer yöntemlerde kullanılması gerekebileen toksik kimyasalların kullanımını gerektirmemesi nedenleriyle çevre dostu ve sürdürülebilirdir. Biyolojik sentez, bu özellikleri nedeniyle öne çıkmakta ve son yıllarda üzerinde önemle durulmaktadır. Bu yöntemlerde sentez işlemleri, bakteriler, mantarlar, mayalar gibi canlılar veya bitki ekstraktları kullanılarak indirgenme-yükseltgenme tepkimeleri içeren basamaklar sonucunda gerçekleştirilir (102, 104).

### ***Gümüş Nanoparçacıkların Gıda Ambalajlarında Kullanım Amaçları***

Gıda ambalajlarında antimikrobiyal amaçla potasyum pedyosin, nisin, lizozim-nisin gibi enzimler kullanılmış olmakla birlikte; enzimlerin optimum bir pH aralığında etkin olması ve ısıya karşı düşük dayanıklılık gibi olumsuz yönleri vardır. Metal NP'ler, ağır gıda işleme basamaklarına dayanıklılık yönünden aktif gıda ambalajlarında yaygın olarak kullanılan organik ve inorganik asitlere göre üstün ve umut vaat eden bir seçenek olmuştur (105, 106).

Gümüş, yaygın bilinen antibakteriyel özelliklerinin yanı sıra antifungal ve antiviral özellikleri sayesinde viral ve fungal gıda kontaminasyona karşı da koruyucu amaçlı kullanım potansiyeli taşımaktadır (107, 108). Gümüş NP'ler pek çok metal nanoparçacığa göre yüksek antimikrobiyal aktivite ve memeli hücrelerine karşı daha düşük toksisite gösterir. NP formundaki gümüşün antimikrobiyal aktivite potansiyeli ise, iyonize veya tuz formundaki gümüşten de daha yüksektir. Ayrıca, gümüş NP'lere direnç gelişme olasılığı pek çok germisit ajana karşı direnç gelişme olasılığına göre daha düşüktür (101).

Günümüzde gümüş NP katkılı antimikrobiyal kompozitlerin kullanımı büyük ilgi görmektedir. Gümüş NP'lerin polimer yapısına katılması için bir çok yöntem uygulanabilmektedir. Gümüş NP'ler, doğrudan polimer matriks içerisine dağıtılabilmektedir. Ayrıca, zeolit gibi gözenekli bir madde içerisine hapsedilip daha sonra polimer püskürtücü aracılığı ile polimer matrikse gömülebilir veya ince bir tabaka halinde gıda ile temas eden yüzeye kaplama yapılabilir (109). Bunun yanı sıra; nanoparçacıkların polimer matrikse katılan metal atomlarından üretim sırasında oluşturulduğu *in situ* üretim yöntemleri de bulunmaktadır (110).

Gümüş nanoparçacıklar, geliştirilmiş, aktif veya akıllı ambalajlama yöntemlerinde kullanılabilir. Gümüş NP'ler, gıda ambalajlarına su buharı ve diğer gazlara karşı geçirgenliği azaltmak, ambalajın gerilim ve yırtılmaya direnç gibi mekanik özelliklerini iyileştirmek, UV ışınlarını engellemek, termal kararlılığı arttırmak, ambalaja antimikrobiyal etkinlik sağlamak gibi amaçlarla veya tazelik indikatörü olarak (örneğin, H<sub>2</sub>S dedektörü olarak) eklenebilir (106, 111-114).

Gıda ambalajlarında en yaygın kullanılan malzemeler, Bölüm 2.4'te de belirtildiği gibi, düşük maliyetleri, ağırlıklarının az oluşu, şeffaflıkları, gaz ve neme karşı düşük geçirgenlikleri nedenleriyle plastiklerdir. Ancak; plastiklerin ısıya dayanıklılıklarının düşük olması, toksik yumuşatıcı maddeler içerebilmeleri ve biyoyıkılabilir olmamaları nedeniyle çevre kirliliğine yol açmaları gibi olumsuz özellikleri bulunmaktadır (109). Biyoyıkılabilir ambalaj üretimi için çitosan, jelatin gibi biyopolimerler içerisine antibakteriyel, antioksidan veya ambalajın mekanik özelliklerini iyileştirmek amacı ile AgNP eklenmesine ilişkin örnekler de bulunmaktadır (112, 115, 116). Bu uygulamanın, çevre kirliliğinin önemli bir nedeni olan gıda ambalaj atıklarının azaltılması yönünden avantaj sağlayabileceği düşünülse de; mevcut güvenlik test yöntemlerinin nanoparçacıkların gıda ambalajlarında kullanımı için yeterli düzeyde olmadığı bildirilmektedir (117). Bununla birlikte; gümüş nanoparçacık eklenmesinin, biyoyıkılabilir polimerlerin doğadaki yıkımını, polimer içerisindeki yoğunlukla orantılı olarak yavaşlatabildiği de bildirilmiştir (118). Bu durum, bir başka çalışmada antimikrobiyal etkinin topraktaki mikroorganizmalar üzerinde de görülmesine bağlanmıştır (119).

### ***Gümüş Nanoparçacıkların Antimikrobiyal Etki Mekanizması***

Gümüş NP'lerin toksik etkilerinin esas olarak gümüş iyonu salımına dayandığı gösterilmiş olmakla birlikte; farklı mekanizmalar da toksik etki oluşmasına katkıda bulunabilir (120, 121). Gümüş NP'lerin birim kütle başına yüzey alanı mikro boyuttaki gümüş parçacıklarına göre çok daha büyük olduğu için, bu parçacıkların ortama gümüş iyonu salıverme kapasitesi de çok daha yüksektir (109). Benzer şekilde; 10 nm'den daha küçük boyuttaki gümüş NP'lerin hücre içerisine girerek burada iyon salımı da gerçekleştirdiği ve daha büyük parçacıklara göre yüksek antimikrobiyal etki gösterdiği bildirilmiştir (122). Çeşitli çalışmalarda antimikrobiyal etki için en uygun (*optimum*) nanoparçacık büyüklüğünün, iyi dağılım gösteren ve kümelenmemiş gümüş NP'ler için 1-10 nm olduğu bildirilmiştir (50). Gümüş NP'lerin hücre içerisine girerek bu şekilde hücre içerisinde iyon salımı yaparak antimikrobiyal etki göstermesi "Truva Atı mekanizması" şeklinde adlandırılmıştır (123). Ancak, nanoparçacıkların iyonizasyondan bağımsız olarak parçacığa özgü antimikrobiyal etkiye sahip olduğu da gösterilmiştir (124).

Gümüş NP'lerin antimikrobiyal etkileri üç ana mekanizma ile açıklanabilir:

i) Gümüş NP'lerin hücre zarına veya duvarına tutunması (adhezyon) ve bu yapılara zarar vermesi: Pek çok çalışmada, gümüş NP'lerin hücre duvarı ile etkileşimlerinin antimikrobiyal etkinin birincil mekanizması olduğu öne sürülmüştür (125). Pozitif yüklü gümüş iyonları veya daha az negatif yüklü olan gümüş NP'ler, negatif yüklü hücre zarı veya duvarına yapışarak bu yapıların depolarizasyonuna yol açar ve böylece geçirgenliği artırır. Ayrıca; hücre duvarı ile etkileşime giren gümüş NP'ler sürekli bir gümüş iyonu salımına neden olurlar. Gümüş NP'lerin ayrıca hücre duvarında çukurlaşmalar (*pit formation*) oluşturduğu da gösterilmiştir (121). Özetle; hücre duvarı ve zarı üzerindeki yapısal bozulma, taşıma işlevlerinin olumsuz etkilenmesine, hücre bütünlüğünün bozulmasına ve hücre ölümüne yol açar. Örneğin; gram pozitif bakterilerin hücre duvarı kalın bir peptidoglikan tabakası içerir ve dış lipid tabakaları yoktur. Gram negatif bakterilerin hücre duvarları ise ince peptidoglikan tabaka ve dış lipid tabaka içerir. Gümüş NP'lerin daha az peptidoglikan içeren ince hücre duvarı üzerine toksik etkileri, gram pozitif bakteriler üzerine toksik etkilerinden daha fazladır. Ayrıca; gram negatif bakterilerdeki lipopolisakkaritlerin negatif yükü de pozitif yüklü gümüş NP'lerin tutunmasını kolaylaştırır (125).

ii) Gümüş iyonlarının hücre içi yapılarla etkileşimi: Hücre içerisine giriş yapan gümüş NP'ler veya gümüş iyonları, protein yapıları ve DNA ile etkileşime girer. Tiyol grupları ile etkileşerek protein yapı ve işlevlerini bozar, solunum gibi hücre işlevleri için önemli enzimlerin çalışmasını engeller, DNA'nın hidrojen bağlarını bozarak DNA hasarına yol açar. Gümüş NP'lerin DNA'da yapı bozulması, denatürasyon ve replikasyon yeteneğinde kayba yol açtığı bildirilmiştir (111, 125).

iii) Gümüş NP'lerin hücre içerisinde reaktif oksijen türleri (ROT) ve oksidatif stres oluşumuna yol açtığı, lipid ve proteinlerin oksidasyonu yoluyla hücre zarı hasarı ve DNA hasarı oluşturduğu gösterilmiştir (111, 121, 125). Tripathi ve ark. (125) tarafından yayımlanan bir derleme çalışmasında, 2022 tarihine kadar yapılmış olan çalışmalar (126, 127) değerlendirilerek antimikrobiyal etkide birincil mekanizmanın hücre zarı hasarı olarak kabul gördüğü bildirilmiştir.

Yukarıda özetlenen mekanizmalarla oluşan toksik etkilere ek olarak; gümüş NP'lerinin, bakterilerin hayatta kalmalarını kolaylaştıran koruyucu biyofilm

oluşumunu da engellediği gösterilmiştir (125). Gıdalarda üreyen patojen bakterilerin de biyofilm oluşturduğu bilinmektedir (128). Bu nedenle; biyofilm oluşumunu engelleyici özellikleri de gümüş NP'lerin gıda ambalajlarında kullanımının etkinliği yönünden önem taşımaktadır.

Gümüş nanoparçacıkların 650'den fazla mikroorganizmaya karşı etkili olduğu ve gümüş NP'lere, diğer antimikrobiyal maddeler ile karşılaştırıldığında, daha az direnç geliştiği gösterilmiştir (129). Öte yandan, bakterilerin gümüş NP'lere de gümüş nanoparçacıkların topaklanmasına yol açan flajellin proteini üretimi veya NP'lerin hücre dışına atımına yönelik genlerin yukarı düzenlenmesi (*up regülasyon*) gibi çeşitli mekanizmalarla direnç geliştirebildiği gösterilmiştir (130).

### ***Gümüş Nanoparçacıkların Nitel ve Nicel Analiz Yöntemleri***

Gıda ambalajlarından gıdaya geçen nanoparçacıkların belirlenmesi için genelde uygulanan yöntemlere göre daha duyarlı analitik yöntemler gereklidir (131). Polimer katkı maddelerinin analizinde yaygın olarak kullanılan kromatografik yöntemler, NP'lerin fizikokimyasal özellikleri nedeniyle bu maddelerin analizi için kullanıma uygun değildir. NP'lerin belirlenmesi ve tanımlanmasında (karakterizasyonunda) kullanılabilen yöntemler oldukça kısıtlıdır (132).

Nanoparçacıkların yapı, şekil, boyut ve yoğunluklarının belirlenmesi amacıyla elektron mikroskopisi (EM), taramalı elektron mikroskopisi (SEM), geçirimli elektron mikroskopisi (*transmission electron microscopy*, TEM) ve atomik kuvvet mikroskopisi (AFM) gibi yüksek çözünürlüklü görüntüleme yöntemleri kullanılmakta olup gümüş NP'lerin nitel analizlerinde de bu yöntemler kullanılabilir. Ancak bu yöntemlerin, karmaşık matrisler için uygulama zorluğunun yanı sıra, örneği iyi temsil etmeyen örneklem alımı, işleme ve hazırlama sırasında gerçekleşebilecek yapısal değişiklikler, çok seyreltik örnekler üzerinde çalışmada karşılaşılan sorunlar ve örneğin tekrar çalışılmaması gibi zayıf yönleri bulunmaktadır (132-134). TEM, parçacık boyut, şekil ve küme yapıları hakkında bilgi verir ve enerji dağıtım X-ışını spektroskopisi ile birlikte kullanılarak kimyasal bileşimi belirleyebilir. Ancak; karmaşık ortamlarda asimetrik akış-alanı akış fraksiyonasyonu (AF<sup>4</sup>) gibi yöntemlerle birlikte kullanılması gerekir (135).

Çalışılan örneklerde ng/ml düzeyi gibi oldukça düşük konsantrasyonlarda bulunan metal NP'lerin nicel analizi için, indüktif eşleşmiş plazma kütle spektroskopisi (*Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometer*, ICP-MS) ve İndüktif Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon Spektroskopisi (*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy*, ICP-OES) uygun yöntemlerdir. ICP-MS yönteminin diğer tekniklerle birlikte kullanımının daha yerinde sonuçlar verdiği gösterilmiştir. Atomik absorpsiyon spektroskopisi (AAS) de, ICP yöntemlerine göre hız ve duyarlılık açısından öne çıkmakla birlikte çoklu element analizlerine elverişli değildir (132, 133). Gıdaya hem iyonize hem de iyonize olmayan formda geçiş gerçekleşebileceği göz önünde bulundurulduğunda; elementel ve iyonize formdaki gümüşün ayırt edilmesi gerekmektedir. ICP-MS yönteminin tek parçacık modunda çalışılması (*single particle ICP-MS*, sp-ICP-MS) yoluyla elementel ve iyonize formdaki gümüşün ayırt edilmesi mümkün olmaktadır (112, 136). ICP-MS ve ICP-OES yöntemlerinin uygulanması öncesinde; organik moleküller atomizasyona engel olabileceği için ölçüm öncesi uzaklaştırılmaları amacıyla hazırlık işlemleri gereklidir. Ayrıca; ölçümlerde migrasyon kaynaklı olan ve migrasyon öncesinde örnekte bulunan gümüş iyonları ayırt edilmeyeceği için bu yöntemlerin duyarlılık ve doğruluğunun zayıf olduğu bildirilmiştir (13).

Özetle; gümüş NP'lerin belirlenmesi ve tanımlanması için tek başına yeterli bir yöntem bulunmayıp, farklı yöntemlerin birlikte kullanımı gerekmektedir.

#### **4.1.2. Gümüş Nanoparçacık İçeren Gıda Ambalajlarından Gıdalara Geçiş Mekanizmaları ve Migrasyon Çalışmaları**

Gıda ile temas eden malzeme bileşenlerinden gıdaya gerçekleşen kütle geçişi olarak tanımlanan migrasyon, gıda ambalajları konusunda risk değerlendirmesi yönünden önemli bir unsurdur (137). Gıda ile temas eden malzemelerin güvenliliğinin belirlenmesinde; gıdaya geçiş sonucunda maruz kalınan maddelerin risk potansiyellerine ilişkin toksikolojik veriler, tahmini insan maruziyeti verileri ile bir arada kullanılmalıdır. Maruziyet miktarı ise, migrasyon çalışmaları sonucunda gıda veya gıda benzerine (*gıda simulanına*) geçişe ilişkin veriler kullanılarak ve incelemeye konu ambalaja temas eden gıdalardan günlük yaklaşık 1 kg'a kadar tüketildiği varsayımı üzerinden değerlendirilir (138).

Gümüş NP'lerin antimikrobiyal etkisi için gümüş iyonu salımı önemli bir basamaktır (139). Gümüş NP içeren gıda ambalajlarından migrasyon ve antimikrobiyal etkinliğin bir arada değerlendirildiği çalışmalarda migrasyon belirlenmemesi durumunda antimikrobiyal etki de gözlenmemiş olduğu için, antimikrobiyal etki için bir miktar migrasyon gerektiği öne sürülmüştür (140).

Gümüş NP'lerin gıda ambalajından gıdaya geçişi Bölüm 2.6'da açıklanan desorpsiyon, difüzyon, dissolüsyon ve ambalaj matriksi yıkımı mekanizmaları ile gerçekleşir. Bu mekanizmalardan her biri tek başına veya bir arada migrasyonda rol oynayabilir. Gümüş NP'nin sentezlenme bilgisi, kullanılan gümüşün yapısı veya malzeme içine yerleştirilme yöntemi vb. noktalar bilinmediğinde hangi mekanizmanın baskın olduğunun öngörülmesi mümkün olmamaktadır (141).

Desorpsiyon ve difüzyon sonucu gerçekleşen migrasyonda NP'ler nanoparçacık şeklindedir (56). Bununla birlikte; gıda ortamında gümüş nanoparçacıkların hızlıca oksidatif çözünmeye uğrayarak iyonize şekle dönüştüğü gösterilmiştir (142, 143).

Dissolüsyonda ise migrant artık NP formunda olmamakla birlikte ortam içerisinde uygun koşullar mevcutsa yeniden NP oluşma olasılığı bulunmaktadır (56, 57, 144). Gümüş NP'ler gıda içeriğinde bulunan protein, lipid, mineral, karbonhidrat ve diğer bileşenlerle etkileşim sonucunda da şekil değiştirir (145).

Nanoparçacıkların salım ve salım sonrası davranışlarına ilişkin çalışmalarda karşılaşılan bir diğer sorun ise, üzerinde çalışılan nanokompozitlerin ticari ürünler olması ve bunların tanımlanmasına ilişkin veriler yönünden ticari kaynağa bağımlı olunması ve bu ticari kaynakların üretim yöntemleri gibi verileri paylaşmaya istekli olmamasıdır (56).

Addo Ntim ve ark. (143), piyasadan sağladıkları çeşitli malzemeler üzerinde % 3 asetik asit ve su ile aynı malzemeye tekrarlayan temasın incelendiği migrasyon testleri gerçekleştirmiştir. Araştırmacılar, her bir temas sürecinde bir önceki temas sürecine göre migrasyon miktarının azalmasını, migrasyon çalışmalarında ölçülen gıdaya geçen gümüş miktarının oldukça düşük olmasını (% 10'un altında) ve oksidasyon beklenmeyen gıda benzeri (su) içerisinde NP şeklinde gümüş

bulunamamasını bir arada değerlendirerek; migrasyonun difüzyon yoluyla değil yüzeyden oksidasyon yoluyla gerçekleştiği sonucuna varmışlardır (143).

Nanoparçacık boyutunun gıdaya geçiş üzerine etkisinin araştırıldığı çeşitli çalışmalarda; parçacıkların polimer ile kaplanmış olmaları durumunda poliolefinler için 3-4 nm, polietilen tetaftalat (PET) ve benzer polimerler için 1-2 nm'den büyük nanoparçacıkların difüzyonunun Fick'in difüzyon yasasına göre mümkün olmayacağı ve gıda ambalajlarında bu kadar küçük boyutta nanoparçacıkların kullanılmadığı belirtilmiştir (19, 135, 142, 146). Farklı bir çalışmada da 2-5 nm AgNP içeren polipropilen (PP) filmlerden gıdaya geçişin Fick'in difüzyon yasasına uyduğu bildirilmiştir (129). Bott ve ark. (147) tarafından, mekanik, ısıl ve kimyasal stres koşullarının ve katı gıda saklanmasına bağlı abrazyonun migrasyona etkisini incelemek amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada; düşük yoğunluklu polietilen (LDPE; *low density polyethylene*) filmlere mekanik abrazyon amacıyla quartz kum uygulaması, ısıtma, dondurma, çözücü ile şişirme ve germe uygulamaları sonucunda dahi polimerden gümüş NP salıverilmediği gösterilmiştir.

Bir diğer çalışmada, ısıya maruz kalan polimer kaplamalardan salıverilen NP miktarının belirlenmesi için migrasyon çalışmaları yerine titrasyon çalışmalarının daha uygun olduğu gösterilmiş ve naylon, polistiren, PET gibi kaplamalara uygulanan eski bir yöntem olan migrasyon yönteminin NP kaplama malzemeler için kullanıma uygun olmadığı sonucuna varılmıştır (148).

### ***Gümüş Nanoparçacık İçeren Gıda Ambalajlarına İlişkin Migrasyon Çalışmaları***

Literatürde, çeşitli sentez ve hazırlama yöntemleri ile nanokompozit gıda ambalajı üretimine ilişkin pek çok çalışma bulunmasına rağmen, bu maddelerin gıdaya geçişine ilişkin çalışma sayısı daha azdır. Ayrıca, polimer, nanoparçacık ve gıdaya bağlı etmenlerin migrasyona etkisi hala tam olarak anlaşılammıştır (149, 150).

Yapılan migrasyon çalışmalarının birçoğu piyasadan sağlanan gıda ambalaj malzemeleri ile yapılmış olmakla birlikte; bazı çalışmalar da laboratuvar ortamında sentezlenen ve kullanıma aday gümüş NP'leri içeren ambalaj malzemeleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (141, 142, 151-153).

Gerçek gıda veya gıda benzerleri ile gerçekleştirilen migrasyon çalışmalarında, gıda/gıda benzerlerine farklı miktarlarda geçiş olduğu belirlenmiştir. Gıdaya geçişe ilişkin çalışmaların büyük çoğunluğunun gıda benzerleri kullanılarak gerçekleştirildiği ve gerçek gıdalar kullanılarak yapılan çalışmaların yetersiz olduğu görülmektedir (132). Ambalaj malzemelerinden gıdaya geçişin değerlendirilmesinde en doğru yaklaşımın, karmaşık bileşimleri nedeniyle analizi daha zor olmakla birlikte, gerçek gıdalar üzerinde çalışılmasının olduğu açıktır (53). Bununla birlikte, ambalaj malzemesinden gıdaya gümüş NP geçişi gerçekleşip gerçekleşmediğine ilişkin çalışmalardan elde edilen sonuçlar çelişkilidir (132). Tez çalışması kapsamında yapılan literatür taraması sonucunda da, gıda ambalajlarından gıdaya gümüş NP geçişinin yasal düzenlemeler ile belirlenen sınırların altında veya üstünde olduğunu gösteren çalışmalar bulunduğu belirlenmiştir (141, 153-156).

Nanokil (kaolin) ve gümüş NP içeren ve biyoyıkılabilir çitosan filmler ile gerçekleştirilen bir çalışmada, gıda kalitesinin korunması yönünden iyi etkinlik gösteren filmlerden dilimlenmiş elma örneklerine geçen gümüş miktarı 0,05 mg/kg.dm<sup>2</sup> olarak ölçülmüştür. Ölçülen migrasyon değeri EFSA ve Avrupa Kimyasallar Ajansı (*European Chemicals Agency*, ECHA) tarafından belirlenen sınırların altında olduğu için söz konusu filmlerin kullanım potansiyeli taşıdığı bildirilmiştir (157).

Efatian ve ark. (158) tarafından yapılan bir çalışmada, balık eti örnekleri, 5 ve 10 gün süre ile gümüş NP'larının yanı sıra bakır ve titanyum oksit NP'ları içeren filmlere sarılı şekilde saklanmış ve 10 günün sonunda gıdadaki gümüş miktarı 0,5 ppb olarak belirlenmiştir. Ölçülen migrasyon değerinin, AB 450/2009 düzenlemesi çerçevesinde "izin verilmemiş" (*non authorized*) maddeler için belirlenen toplam 0,01 mg/kg limitini aşmadığı bildirilmiştir.

Taze erişte (*noodle*) saklama amacıyla kullanılacak gümüş ve çinko NP içerikli filmler ile yapılan bir çalışmada (159); yüksek miktarda gümüş NP içeren filmlerdeki toplam migrasyonun AB düzenlemesi ile belirlenen toplam migrasyon sınırını (10 mg/dm<sup>2</sup>) aştığı belirlenerek bu filmlerin gıda güvenliği açısından risk oluşturduğu bildirilmiştir.

Gerçek gıda örnekleri ile yapılan bir diğer çalışmada (160) ise; gümüş NP içeren polietilen (PE) gıda kabından Rus salatası örneklerine 50 ppm altında gümüş geçişi olduğu saptanmış ve gıda ambalaj malzemesinin kullanımının güvenli olduğu belirtilmiştir.

Pluta-Kubica ve ark. (161), iki çeşit peynir kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmalarında, gümüş NP içeren ambalaj malzemesinden gıdaya sağlık riski oluşturmayacak düzeyde gümüş geçişi gerçekleştiğini bildirilmiştir.

Nanoparçacık içeren PET şişeler kullanılarak yapılan bir diğer çalışma (162) sonucunda migrasyon belirlenmemesi, polimer içerisinde iyi şekilde hapsedilmiş ve sarılmış NP'lerin çok yavaş difüzyona uğraması ve test süresi sonunda ölçüm sınırına ulaşmaması ile açıklanmıştır.

Asl ve ark. (163) tarafından gümüş NP katkılı çitosan filmlerden gıdaya gümüş NP geçişini incelemek amacıyla gerçekleştirilen bir migrasyon çalışmasında, havyar örnekleri kullanılmıştır. 60 günlük temas süresi sonunda gıda örneklerine 0,165 ppm düzeyinde gümüş geçişi gerçekleştiği AAS yöntemiyle saptanmıştır.

Diğer taraftan; literatürde gümüş NP içerikli gıda ambalajlarından gıdaya tüketici için risk oluşturacak düzeyde gümüş NP (iyonize veya parçacık şeklinde) geçişi olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Majumder ve ark. (156) tarafından soya proteini esaslı filmlere gümüş NP ve tannik asit içeren nanokil ilavesi ile gıda saklama amaçlı film geliştirilmiş ve bu filmler kullanılarak tavuk eti varlığında migrasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda yüksek konsantrasyonda nano dolgu içeren filmlerden gıdaya yasal sınırların üzerinde gümüş geçişi gerçekleştiği, gıda renginde de değişim olduğu belirtilmiştir.

Ambalaj malzemelerinden gıdaya gümüş NP geçişinin incelenmesi amacıyla gerçekleştirilen kapsamlı bir migrasyon çalışmasında (141); dört çeşit gıda benzerinin yanı sıra üç çeşit et ürünü (ton balığı, domuz, hindi) kullanarak; kâğıt, saklama poşeti, gıda kabı ve kesme tahtası ile temas sonrasında gıdada gümüş NP varlığı değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda; gerçek gıda örneklerine (özellikle ton balığına) AgNP içeren gıda ambalaj kâğıdı ile temas durumunda risk oluşturacak kadar geçiş olduğu belirtilmiştir. Çalışmada sıcaklık ve ortam asiditesinin ve mikrodalga

uygulamasının gümüş geçişini arttırdığı gözlenmiştir. Deneyde ayrıca gıda benzerleri arasında zeytinyağı örneği için en kötü senaryoda (yüksek sıcaklık ve mikrodalga) dahi geçiş olmaması nedeniyle; zeytinyağının AgNP migrasyon testinde gıda benzeri olarak kullanıma uygun olmadığı sonucuna varılmıştır.

Yakın tarihli bir başka migrasyon çalışmasında (116), nişasta esaslı filmler biyolojik yöntemle sentezlenen gümüş NP ile kaplanmış ve bu filmlerden tavuk etine geçiş incelenmiştir. Çalışma sonunda gıdaya geçiş için EFSA tarafından belirlenen 0,05 mg/kg gümüş sınırının aşıldığı gösterilmiştir.

Hannon ve ark. (164) gümüş ve bakır NP içeren malzeme ile kaplama yapılan gıda ambalajları ile gerçekleştirdikleri bir migrasyon çalışmasında; Avrupa Komisyonunca izin verilmemiş maddeler için belirlenen 0,01 mg/kg düzeyinin aşılmış olduğunu göstermiştir. Ancak; araştırmacılar tarafından meyve suyu için kuramsal olarak hesapladıkları maruz kalma sınırı (MOE; *margin of exposure*) değerinin endişe yaratmayacak düzeyde olduğu bildirilmiştir.

Bebek ve çocukların kimyasal toksisiteye karşı yetişkinlerden daha duyarlı olduğu bilinmektedir (165). Bu nedenle; gümüş NP içeren ürünlerin bebek ürünlerinde kullanımı da dikkat çekmektedir. Choi ve ark. (151)'nin biberon, emzik ve anne sütü saklama torbası örnekleri üzerinde gıda benzeri olarak deiyonize su, asetik asit çözeltisi (% 4), alkol (% 50) kullanarak gerçekleştirdikleri migrasyon çalışmasında; gıdaya 1,05-2,25 ng/mL aralığında gümüş geçişi olduğu belirlenmiştir. Ölçülen gümüş miktarının büyük kısmı iyonize durumda olup çok küçük bir kısım non-iyonize nanoparçacık formundadır. Li ve ark. (166)'nın anne sütü saklama poşetleri ile gerçekleştirdikleri çalışmada ise en uç koşullarda dahi süt örneğine gümüş NP geçişi saptanmamıştır. Moreno-Gordaliza ve ark. (167)'nin gümüş NP'ları içeren silikon biberon ve gıda benzerleri ile çeşitli sıcaklık ve sürelerde mikrodalga uygulaması da yaparak gerçekleştirdiği bir migrasyon çalışmasında; silikon biberondan gıda benzerlerine ng/dm<sup>2</sup> düzeyinde gümüş NP geçişi olduğu saptanmıştır. Silikon yapıli biberondan gıdaya gümüş NP geçişinin, PP yapıli gıda kaplarından daha düşük düzeyde olduğu ve PP kaplardaki durumun tersine, asidik gıda benzerinde diğer gıda benzerlerinde gerçekleşenden daha düşük olduğu bildirilmiştir. Çalışma sonucunda,

ayrıca biberondan gıda örneklerine silikon mikroparçacık geçişinin de risk oluşturduğu belirtilmiştir.

### ***Gıda Ambalajlarından Gümüş Nanoparçacık Migrasyonu Üzerine Etkili Faktörler***

Gıda ambalajlarından gıdaya madde transferi olarak tanımlanan migrasyon üzerine etkili olan etmenler arasında temas yüzeyi büyüklüğü, sıcaklık, temas süresi, migrant ve gıdanın özellikleri gibi temel değişkenler sayılabilir (168).

Gümüş NP'lerin gıda ambalaj malzemelerinden gıdaya geçişine ilişkin çeşitli çalışmalarda migrasyona, sıcaklığın, kullanılan NP'nin polimer içerisindeki yoğunluğunun, polimerin ve gıda ortamının özelliklerinin, temas süresi ve sıklığının, mikrodalga fırında ısıtmanın, üretim sırasında uygulanan basıncın ve polimer yapısında bulunan antioksidanlar gibi diğer maddelerin etkisi incelenmiştir.

Gerçekleştirilen çalışmalar gıda ortamının asiditesinin gümüş NP migrasyonu üzerinde etkisi açısından benzer sonuçlar olduğunu göstermiştir. Gıda benzerleri kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda en yüksek geçiş miktarı, asidik gıda benzeri olan % 3'lük asetik asit ile saptanmıştır (137, 142, 169). Gerçek gıdalar ile gerçekleştirilen çalışmalarda da portakal suyu gibi asidik gıdalara geçişin diğer gıdalara gerçekleşen geçişten daha yüksek miktarda olduğu gözlenmiştir (170, 171).

Gümüş NP içeren ambalaj malzemeleri üzerinde gerçekleştirilen migrasyon çalışmalarında da gümüş NP migrasyonunun sıcaklık ile arttığı şeklinde sonuçlar elde edilmiştir (137, 172-174). Ancak; Cushen ve ark. (154) 2013 tarihli çalışmalarında, sıcaklığın migrasyonu azalttığı sonucuna ulaşmışlardır.

Temas süresinin gıdaya gümüş nanoparçacık geçişini arttırdığı bir çok çalışma ile gösterilmiştir (137, 154, 172, 173). Bazı çalışmalarda ise gıdaya geçişin belirli bir süre sonunda kararlı hale geldiği ve migrasyon grafiklerinde plato görünümü olduğu belirlenmiştir (172, 175).

Tek kullanımlık olmayan gıda ile temas eden malzemelerden tekrarlayan kullanım durumunda gıdaya gümüş NP geçişi de bazı çalışmalarda incelenmiştir. Von Goetz ve ark.(136)'nın gümüş nanoparçacık içeren gıda ambalajlarından tekrarlayan

temas durumunda gıdaya gümüş nanoparçacık geçişini araştırdıkları çalışmalarında, ikinci ve üçüncü temas döngülerinde gıdaya geçen miktarın 10 kata kadar azaldığı, üç temas döngüsü sonundaki kümülatif migrasyonun  $34 \text{ ng/cm}^2$  olduğu bildirilmiştir. Gümüş NP içeren PP yapılı gıda kapları ve silikon biberon ile gerçekleştirilen bir diğer çalışmada da ilk temastaki geçiş miktarının, sonraki iki temas durumundakinden daha yüksek olduğu bildirilmiştir (167).

Migrasyon miktarı üzerinde önemli olduğu gösterilen bir diğer etken de polimer matriks içindeki Ag NP yoğunluğudur. Birinci derece difüzyon kinetiğine uyduğu bildirilen gümüş migrasyonunun polimer içerisindeki AgNP konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı gösterilmiştir (154, 169).

Gümüş NP'lerin ambalaj malzemesine katılma şeklinin, bir başka deyişle Ag NP'lerin malzeme yüzeyine kaplanmış veya polimer matriks içerisine dağıtılmış olmasının, polimerin çapraz bağlanma durumunun veya kaplama yönteminin de migrasyon üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (110, 137, 176). Örneğin; spreyleme yöntemiyle kaplama uygulanan ambalaj malzemelerinden spreyleme uygulaması aşamasında polistiren blok-polietilen oksit gibi maddeler kullanılarak gıdaya gümüş NP geçişinin azaltılabileceği öne sürülmüştür (176).

Üretim aşamasındaki uygulamalar da gıda ambalajından gümüş migrasyonu üzerinde etkili olabilir. Zhu ve ark. (177) 2021 tarihli çalışmalarında, AgNP içeren PLA filmlere yüksek basınç uygulanmasının migrasyon üzerine etkisini incelemişlerdir. 0, 100, 200, 300 ve 400 MPa basınç uygulanan örneklerde en düşük migrasyon, 200 MPa basınç uygulanan filmde saptanmış; ancak 400 MPa basınçta migrasyonun hızlandığı görülmüştür. Bu durum, yeterli düzeyde bir basınç uygulamasının polimer yapısının sıklığı ve kristal yapısını etkileyerek migrasyonu azalttığı; ancak belirli bir miktarın üzerindeki basıncın yapıda bozulmaya yol açtığı şeklinde yorumlanmıştır. Bu çalışma, gıda ambalaj malzemesi olarak kullanılacak gümüş nanokompozitlerin migrasyon düzeyinin uygun basınç uygulaması ile en uygun hale getirilebileceğini düşündürmektedir. Cheng ve ark. (129)'nın PP-naylon film içerisine elektrospin uygulaması ile sabitlenen 2-5 nm boyuttaki gümüş NP'lerin migrasyonunun incelendiği çalışmaları ile ise; üretim aşamasında elektrospin uygulamasının migrasyonu azalttığı gösterilmiştir.

Ortam koşullarının yanı sıra; ambalaj malzemesi içerisinde bulunan diğer maddelerin de gıdaya gümüş NP geçişi üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Su ve ark. (178), 2015 tarihli çalışmalarında PE filmlerden gıda benzerlerine gümüş nanoparçacık geçişi üzerinde antioksidanların etkisini araştırmıştır. Çalışma sonucunda, antioksidan ve ışık stabilizanı eklenmesinin migrasyonu önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir. Bu durumun; gümüşün oksidasyona bağlı migrasyonunun antioksidan varlığı ile engellenmesine, büyük moleküller olan ışık stabilizanlarının gümüş iyonlarının hareketini kısıtlamasına veya gümüşün katkı maddeleri ile kimyasal bağ oluşturmaya bağlı olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Yine Su ve ark. (179)'nın 2017 tarihli çalışmalarında; katkı maddelerinin gümüş migrasyonu üzerinde oksidasyon sürecine etki ederek inhibitör veya arttırıcı etki yaratabileceğini saptamışlardır. Ayrıca; gümüş NP'lerin migrasyon sınırlarının aşılması için aynı yönde (*sinerjistik*) etki gösteren başka maddelerle birlikte kullanımı seçeneği de bulunmaktadır (116). Bu durum göz önünde bulundurulduğunda; gıda veya gıda ambalajı içerisinde yer alan diğer maddelerin gümüş NP'lerin migrasyon davranışına etkisi, araştırılması önemli bir alan olarak öne çıkmaktadır. Bu kapsamda; Abreu ve ark. (180)'nin 2015 tarihli çalışmalarında; yalnızca gümüş nanoparçacıklar, yalnızca organomodifiye MMT (Cloisite 30B) ve hem gümüş hem Cloisite 30B parçacıkları içeren nişasta bazlı filmler üretilmiş ve bu filmler üzerinde gerçekleştirilen migrasyon çalışması sonucunda gümüş NP'lerin birlikte ve tek başına kullanıldığı ambalaj örneklerinden farklı düzeyde gümüş migrasyonu gerçekleştiği belirlenmiştir. Fortunati ve ark. (153)'nin yüzey aktif madde ile değiştirilmiş veya değiştirilmemiş selüloz nanokristalleri (*cellulose nanocrystals*, CNC) ve % 1 (a/a) gümüş NP içeren PLA yapılı filmler üzerinde gerçekleştirdikleri çalışma sonucunda ise; CNC ilavesinin gümüş migrasyonunu arttırdığı saptanmış ve bu durumun PLA içerisine CNC ilavesinin hidrolitik yıkımı ve gümüş migrasyonunu arttırdığı yönündeki literatür bulgularıyla örtüştüğü belirtilmiştir.

Yang ve ark. (144) 2021 tarihli çalışmalarında indirgen özellikteki gıda bileşenlerinin, ortamdaki sıcaklık ve ışık maruziyetine de bağlı olarak, gıdaya toplam gümüş geçişini 7 kata kadar arttırdığını göstermiştir. Çalışmada gıda içerisinde bulunabilecek doğal şeker ve tatlandırıcıların yanı sıra yoğurt, meyve suyu, süt gibi içeceklerin ortamda yeniden gümüş NP oluşumuna neden olabileceği belirlenmiştir.

Araştırmacılar, kendileri indirgen özellikte olmamasına rağmen bazı gıda bileşenlerinin de ortamda yeniden gümüş NP oluşumuna katkı sağlayabilmesinin nanoparçacık maruziyeti yönünden göz önünde bulundurulması gerektiğini ortaya koymuştur (144). Yang ve ark. (150), yakın tarihli başka bir çalışmalarında ise gıda benzeri içerisinde gıda katkı maddesi olarak kullanılan titanyum dioksit varlığının ve gıda yapısındaki şekerin toplam gümüş migrasyonunu 10,3 kata kadar arttırdığını göstermiş ve gıdalarda yaygın bulunan bu gibi redoks aktif gıda bileşenlerinin gümüş migrasyonunu kolaylaştırabileceği hipotezlerini destekleyen sonuçlar elde etmiştir. Bu çalışma, Metak ve ark.'nın (170) portakal suyu örneğine yüksek miktarda gümüş migrasyonunun gıdanın yüksek karbonhidrat içeriğine bağlı olabileceği olasılığını destekler nitelikte bir bulgu olmuştur.

Jokar ve ark. (181), polietilen glikol (PEG) ile kararlı hale getirilmiş gümüş NP içeren polivinilpirolidon (PVP) gıda ambalaj malzemesi ile çeşitli gıda benzerleri ve az yağlı süt kullanılarak bir migrasyon çalışması yapmıştır. Çalışmada migrasyon çözeltisindeki gümüş NP'lerin kararlılığı incelenmiştir. Ortamda ölçülen gümüş NP miktarının NaCl ilavesi ile 4 saatlik inkübasyon sonrasında % 47 oranında azaldığı ve parçacık büyüklüğü dağılımının küçük parçacıklar yönüne kaydığı görülmüştür. Bu durum, araştırmacılar tarafından PEG-AgNP'lerin NaCl varlığında dissolüsyonunun arttığı ve gıdalar içerisinde yer alan sofra tuzunun da migrasyona uğrayan gümüş NP'lerin dissolüsyonunu arttıracığı yönünde yorumlanmıştır. Gümüş iyonlarının ortamdaki gıda benzeri tarafından indirgenerek gümüş nanoparçacık oluşup oluşmayacağına yönelik incelemelere dayanarak; ambalaj malzemesinden gıdaya geçen düşük miktardaki gümüşün gümüş nanoparçacık oluşumuna yol açmayacağı sonucuna varılmıştır (181). Ayrıca; süt örneğindeki migrasyon miktarı, süt ürünlerini temsil eden % 50 etanol çözeltisindeki migrasyon miktarı ile karşılaştırılmış; süt içerisindeki organik bileşenlerin AgNP kararlılığını arttırdığı belirtilmiştir. Bu çalışmalar; gıda bileşenleri ve gıda katkı maddelerinin gıda ambalajı ile etkileşimi ve gıda ortamındaki etkinliğinin gıdaya geçiş ve maruziyet yönünden üzerinde önemle durulması gereken unsurlar olduğunu göstermektedir.

Özellikle kullanıma hazır gıdaların ısıtılması için yaygın olarak kullanılan mikrodalga fırınların gıda ambalajlarından gümüş NP salımına etkisi konusunda da çalışmalar yapılmıştır. Echehoven ve Nerin (182), 2013 tarihli çalışmalarında,

mikrodalga fırında kullanıma uyumlu olduğu bildirilerek pazarlanan gümüş NP içeren LDPE gıda kabı ve PP poşetler üzerinde iki farklı gıda benzeri (% 3 asetik asit ve % 50 etanol) ile değişik koşul ve sürelerde (40°C’de 10 gün, 70°C’de 2 saat ve 700 W güçte çalıştırılan mikrodalga fırında 2 dakika) gıdaya gümüş geçişini (hem iyonik hem nanoparçacık formunda) değerlendirmişlerdir. Hem sp-ICP-MS hem de SEM-EDX görüntüleme yöntemleri ile nanoparçacık varlığı gösterilmiş, migrant parçacıklarının yaklaşık % 20’si kadarının NP formunda olduğu belirlenmiştir. Bütün koşul ve gıda benzerlerinde gümüş konsantrasyonu, AB standardı olan 0,05 mg/kg’ın altında belirlenmiştir. En yüksek migrasyon miktarı, migrasyonun asidite ile arttığını gösteren diğer çalışmalar (169, 170) ile uyumlu olarak, asetik asit çözeltisinde saptanmıştır. İki dakika süreyle mikrodalga fırında ısıtma durumunda migrasyon değerlerinin, geleneksel fırında 70°C’de 2 saat ısıtma durumundan daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Mikrodalga fırında ısıtmanın migrasyonu artırması, mikrodalga radyasyonun polimerik yapıyı değiştirmesine ve polimer içerisindeki gümüş NP’lerin mikrodalga enerjisiyi absorbe ederek sıcaklığı arttırmasına bağlanmıştır. Ayrıca, gıda benzerlerinde beklenmedik şekilde, üretim aşamalarından kaynaklı ve sodyum klorür olabileceği değerlendirilen farklı nanoparçacıkların da belirlendiği bildirilmiştir. Çalışmada migrasyon sürecinin yüzeyden ayrılma veya diğer çalışmalarda da belirtildiği şekilde gümüş iyonlarının oksidasyonu yoluyla olduğu sonucuna varılmıştır. Nano boyuttaki parçacık oranının etanol çözeltisinde asetik asitten daha yüksek oluşu, asidik koşullarda gerçekleşen oksidatif çözünmenin bu çözeltide daha yavaş gerçekleşmesine bağlanmıştır (182). Hannon ve ark. (183) tarafından yapılan bir çalışmada da; AgNP kaplamalı filmlerden gıda benzerine geçiş, aynı süre ve benzer sıcaklıklarda mikrodalga fırında ısıtma durumunda geleneksel fırında ısıtmaya göre önemli derecede yüksek bulunmuştur. Moreno-Gordaliza ve ark. (167)’nin daha yakın tarihli çalışmasında da piyasadan sağlanan gümüş NP içeren PP gıda kapları ve silikon biberonlardan gıdaya gümüş NP geçişi incelenmiştir. Tekrarlayan mikrodalga uygulaması altında gıda benzerleri kullanılarak migrasyon ölçülmüştür. Diğer örneklere oranla çok daha düşük gümüş içeren biberon örneğinde gümüş migrasyon oranı, beklendiği şekilde çok daha düşük miktarda ölçülmüştür. Bu çalışmada, Echegoyen ve Nerin (182)’in 2013 tarihli çalışmasından farklı şekilde, mikrodalga fırında 2 dakika süren ısıtmanın geleneksel fırında 70°C’de 2 saat uygulanan ısıtmadan

2-10 kat daha düşük gümüş migrasyonu ile sonuçlandığı da gösterilmiştir. Çalışmada, bazı koşullarda ECHA tarafından belirlenen günlük kabul edilebilir alım miktarının (ADI; *acceptable daily intake*) üstünde gümüş migrasyonu gerçekleşebildiği gösterilerek; tekrarlayan kullanım ve mikrodalga uygulama durumunda sürekli maruziyete bağlı risk oluşacağı yorumu yapılmıştır (167).

Çeşitli araştırmacılar tarafından, gümüş NP'lerin ambalaj malzemesine saf halde eklenmesinin yanı sıra çeşitli kimyasal maddeler ile kararlı hale getirilmiş veya titanyum parçacıklarının etrafına kaplanmış şekilde eklenmesi durumundaki migrasyon da incelenmiştir. Hosseini ve ark. (148) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, gümüş NP ile kaplanmış titanyum dioksit parçacıkları içeren nanokompozit gıda ambalajından titrasyon yöntemi kullanılarak migrasyon varlığı değerlendirilmiş ve % 5 gümüş NP içeren polimerden ilgili yasal düzenlemelerle belirlenen sınırların altında migrasyon gerçekleştiği gösterilmiştir. Gümüş NP'lerin hidroksiapatit gibi taşıyıcı moleküller kullanılarak da kararlı hale getirildiği bilinmektedir (184). Gümüş NP'lerin hidroksiapatit ve silika (SiO<sub>2</sub>) taşıyıcıları ile polimer matrisine eklendiği durumda da yasal sınırlar altında migrasyon saptanmıştır (185).

Migrasyon testi sonuçları üzerinde etkili olduğu bildirilen bir diğer etmen de ambalaj malzemesinin hangi kısmından örnek alınarak test yapıldığıdır. Artiaga ve ark. (172) tarafından yapılan bir çalışmada, ambalaj malzemesinin uç noktalarından alınan örneklerde gıdaya önemli şekilde daha fazla AgNP geçişi olduğu bildirilmiştir.

Deng ve ark. (174), çeşitli gıda benzerleri ile yapılan migrasyon çalışması sonucunda ölçülen gümüş iyonu migrasyon düzeyini, aynı çalışmada gümüş NP için belirlenen minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) ile karşılaştırmıştır. Araştırmacılar, alkol kullanılarak gerçekleştirilen migrasyon çalışmasında belirlenen gıdaya geçişin MBK'nin çok altında olması nedeniyle bu ambalaj malzemesinin alkol içeren gıdaların saklanması için uygun olmadığı; ancak MBK değerini aşan düzeyde migrasyon gözlenen asidik gıdalar için ve MBK değerine yakın migrasyon gerçekleşen sulu gıdalar için kullanılabileceği sonucuna varmıştır.

Çitosan-buğday gluteni esaslı gümüş nanoparçacık ve nanokil içeren filmler ile gerçekleştirilen bir migrasyon çalışması (186) sonucunda, bu filmlerin bütün gıdalar için kullanıma uygun olduğu; ancak antimikrobiyal etkinliğe ilişkin bulgular

doğrultusunda öncelikli olarak süt ürünleri için kullanılmasının yerinde olduğu bildirilmiştir.

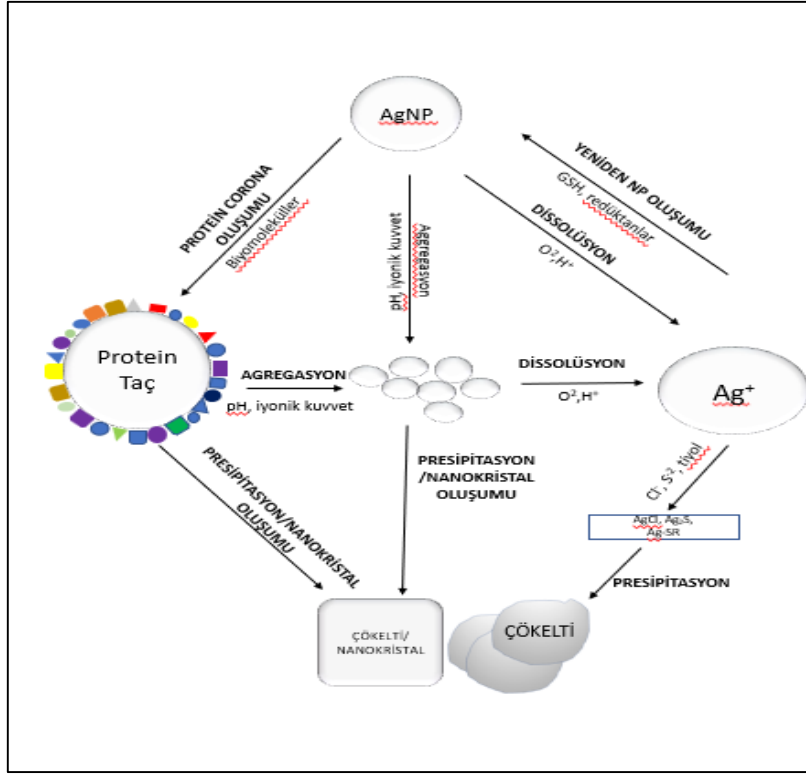
Amrutha ve ark. (110) da, yaptıkları bir çalışmada hazırlanan bir gümüş NP içeren nanofilmden n-heptan'a düşük düzeyde geçiş gerçekleştiğini belirlemişler ve bu nedenle, nanofilmin yağlı gıdalar ile birlikte kullanıma uygun olduğunu bildirmişlerdir.

#### **4.1.3. Gümüş Nanoparçacıkların Toksikolojik Açından İncelenmesi**

##### ***Gümüş Nanoparçacıkların Fizyolojik Ortamdaki Değişimleri ve Farmakokinetikleri***

Gümüş NP'ler fizyolojik koşullarda kolayca gümüş esaslı farklı kompleksler oluşturabilir veya partiküller oluşturabilen  $Ag^+$ 'ye iyonize olabilir, kimyasal modifikasyon, kümeleşme ve topaklanma gibi dönüşümlere uğrayabilir (181, 187). Topaklanma veya korona yapısındaki bozulma ise çökme (*presipitasyon*) ile sonuçlanabilir (188). Bu nedenle; olası toksik etkilerin aydınlatılması ve anlaşılabilmesi için öncelikle gümüş nanoparçacıkların bu yapı değişikliklerinin bilinmesi ve öngörülebilmesi önem taşımaktadır.

Gümüş NP'lerin mide-bağırsak sisteminde moleküler düzeyde uğradığı şekil değişimleri Qi ve ark. (189) tarafından beş ana başlık altında sınıflandırılmıştır. Bunlar topaklanma/topak dağılması, oksidatif çözünme, klor ile birleşme, sülfürlenme ve "protein taç" oluşumudur. Biyolojik ortamlarda gümüş NP'lerin uğrayacağı şekil değişimleri Pem ve ark. tarafından da benzer şekilde özetlenmiştir (188) (Bkz. Şekil 4.1.).



**Şekil 4.1.** Gümüş nanoparçacıkların biyolojik ortamlarda uğradığı biyotransformasyonlar (Pem ve ark. (188)'nin 2021 tarihli çalışmasından uyarlanmıştır).

Gümüş NP'lerin ağızda az miktarda topaklanma ve oksidasyona uğradığı ve kararlılığını büyük ölçüde koruduğu gösterilmiştir (190). Bu şekilde kararlılığı büyük ölçüde korunmuş şekilde mideye ulaşan gümüş NP'lerin mide-bağırsak sisteminde ana çözünme yerinin mide olduğu öne sürülmekle birlikte; gümüş NP'lerin, mide sıvısındaki yüksek klorür içeriğine bağlı olarak, tamamen çözülmeye uğramaması beklenmektedir (189).

Nanoparçacıkların çevresinde, ortamdaki protein yapıların öbekleşmesi ile "protein taç" olarak adlandırılan yapılar oluşabilir (77). Protein taç oluşumu, gıda bileşenleri ve gastrointestinal sıvıların protein içerikleri göz önünde bulundurulduğunda gümüş NP'lerin şekil değişimleri açısından önem taşımaktadır.

Ortamdaki klorür iyonu varlığının veya pH'nın, gümüş NP'lerin moleküller arası itici kuvvetlerini zayıflatarak topaklanma oranında artışa yol açabildiği bilinmektedir (189). Gümüş iyonları, pek çok biyolojik ortamda yoğun olarak bulunan klor varlığında gümüş klorür oluşturur. Ancak; oluşan gümüş klorür, biyolojik

sıvılarda olduğu gibi yüksek protein içeren ortamlarda da protein korona içerisinde hapsediği için nanoparçacık yapısı korunur. Biyolojik ortamda gümüş NP'lerin genel olarak, protein korona ile sarılmış ve dağılmış (*disperse*) biçimde nano gümüş klorür şeklinde bulunduğu gösterilmiştir (191). Mwilu ve ark. (192), yapay mide sıvısı içerisinde gümüş NP davranışını inceledikleri çalışmalarında topaklanmanın yanı sıra gümüş klorür oluşumuna bağlı olarak gümüş iyonu salımı gerçekleştiğini göstermiştir. Bununla birlikte; oluşan gümüş klorürün gümüş NP'lerin çevresini bir tabaka halinde sardığı da gösterilmiştir (193). Mide kanalı geçildikten sonra ise düşük oksijen miktarı ve nötral pH nedeniyle çözünme oranının daha da azalacağı öngörülmektedir. Bağırsaklarda ise bakteriler tarafından oluşturulan H<sub>2</sub>S ile tepkime sonucunda gümüş NP çözünmesine engel olacak bir koruyucu tabaka oluşturan Ag<sub>2</sub>S meydana geleceği belirtilmektedir (189). Laloux ve ark. tarafından da gümüş NP'lerin mide ortamında kümeleştiği bildirilmiştir (194). Yakın tarihte, nanoparçacıkların sindirim sistemi içerisinde uğrayabilecekleri değişikliklerin göz önünde bulundurulması amacıyla; yeni sentezlenmiş nanoparçacıklar yerine gastrointestinal lümeninde bekletilmiş veya yapay olarak eskitilmiş olan “eskitilmiş (*aged*) nanoparçacıklar”ın kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır (195).

Bağırsaklarda, mide ortamında oluşan kümeleşmelerin tekrar dağıldığı ancak “protein taç” yapısının korunduğu bildirilmiştir (194). Bağırsaklara ulaşan gümüş NP'lerin büyük kısmı feçes ile atılarak sistemik dolaşıma geçmezken; bir kısmı iyonize veya nanoparçacık şeklinde intestinal epitel hücreleri aracılığıyla veya hücreler arası boşluklardan dolaşım sistemine ulaştır (189).

Gümüş NP'ler için oral emilimin % 1-4,2 civarında olduğu ve farmakokinetikleri üzerinde parçacık tipi, yüzey yükü, yüzey kaplaması, proteine bağlanma ve doz gibi etmenlerin önemli olduğu bildirilmiştir (187). Zande ve ark. (196) tarafından da, oral alımda parçacık şeklindeki gümüş NP'lerin biyoyararlanımının iyonize gümüşten daha az olduğu gösterilmiştir.

Sindirim sisteminden emildikten sonra zayıf asidik özellikteki gümüş iyonları özellikle serum albümini gibi proteinlerin tiyol gruplarına ve redükte glutatyona bağlanabilir. Gümüş NP'ler ayrıca sülfürlenebilir veya selenyumla etkileşime girebilir

ve bu durum, gümüş NP'lerin biyodağılımı ve farmakokinetik çalışmaları için büyük belirsizlikler yaratır (187, 197).

Kim ve ark. (198), 2008 tarihli çalışmalarında gümüş NP'lerin 28 günlük oral maruziyet sonucunda sıçanlarda karaciğer, akciğer, beyin, testisler ve böbreklerde birikebildiğini göstermiştir. Gümüş NP'lere 90 günlük subkronik maruziyet ile ilişkili bir çalışmada ise ana hedef organın karaciğer olduğu gösterilmiştir (199).

Sıçanlar ile gerçekleştirilen 28 günlük bir oral maruziyet çalışmasında (196) gümüş NP'lerin ana hedef organlarının karaciğer ve dalak olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışma sonucunda, gümüş NP'ler pek çok organdan 8 haftalık bir süre sonrasında uzaklaştırılabilirken bu maddelerin beyin ve testislerde 2 ay sonra dahi yüksek konsantrasyonda ölçüldüğü gösterilmiş ve bu organlardaki uzun süreli birikime dikkat çekilmiştir. Wang ve ark.'nın 2022 tarihli çalışmasında 120 gün süreyle oral yolla gümüş NP uygulanan farelerin karaciğerlerinde doza bağlı bir birikim oluştuğu ve 21. günden sonra kararlı düzeye ulaşıldığı gözlenmiştir (200).

Bir diğer çalışmada, parenteral yolla 1 mg/kg dozunda gümüş NP uygulanan farelerin organlarında 10 dakika, 1 saat, 6 saat, 12 saat, 24 saat ve 168 saatlik (7 gün) süreler sonunda NP dağılımı ICO-OES kullanılarak ölçülmüştür (201). 6 saatlik süre sonunda kolon, ince bağırsak, kalp ve böbrekte Ag NP'leri saptanırken 168 saat sonunda en yüksek miktarın omurilik kanalında olduğu saptanmıştır. Gümüş NP'lerin serum yarılanma ömrü 45 dakika olarak belirlemiş; diğer organlardaki yarılanma ömrü çalışmaları sonucunda böbrek, dalak gibi organlardaki dokuya bağlanma oranları, kemik iliği, kolon, ince bağırsak gibi organlarda ölçülen düzeylerden daha yüksek bulunmuştur.

Gümüş NP'lerin serum proteinlerine bağlandıktan sonra kan-beyin engeline ulaşarak burada endotel hücreleri aracılığıyla transsellüler yolla beyne geçebileceği; küçük boyutlu gümüş NP'lerin ise 4-6 nm genişliğindeki boşluklardan parasellüler yolla da beyne erişebileceği bildirilmiştir (202).

Gebelikte maruz kalınan nanoparçacıkların etkileri de, fetüsün karşılaşabileceği toksisite dikkate alındığında endişe vericidir. Farelere intravenöz

veya oral yolla uygulanan gümüş NP'lerin plasenta ve fetüse de geçebildiği gösterilmiştir (203).

Gümüş NP'lerin vücuttaki dağılımının beklendiği üzere nanoparçacık boyutu ile ilişkili olduğu Park ve ark. (204) tarafından gösterilmiştir. Bu çalışmada, oral yolla 22 nm, 42 nm, 71 nm ve 323 nm boyutunda gümüş NP uygulanan farelerde; küçük boyutlu NP'ler, beyin, akciğer, karaciğer, testis ve böbreklerde saptanırken bu organlarda 323 nm boyutundaki NP'lerin varlığı belirlenememiştir.

### ***Gümüş Nanoparçacıkların Hücresel Düzeydeki Toksikite Mekanizmaları***

Gümüş NP'lerin "Truva atı mekanizması" şeklinde tanımlanan ve hücre içine girdikten sonra iyonizasyon yoluyla meydana getirdikleri toksisite, çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (205, 206).

Gümüş NP'lerin toksisitesi genellikle sistemde oksidatif stres oluşumunun uyarılması veya ROT üretimine bağlı olarak gerçekleşir (104, 207). Gümüş iyonları,  $\gamma$ -glutamat sistein ligaz ve glutatyon sentetaz enzimleri ile etkileşerek hücrenin glutatyon (GSH) düzeyini azaltır, sülfür grupları içeren glutatyon-S-transferaz ve katalaz enzimleri ile etkileşerek ve glutatyona bağlanarak ve ROT oluşumunu arttırarak hücre içerisindeki oksidatif stresin artmasına yol açar (208-210).

Memeli hücre zarı modeli kullanılarak yapılan bir çalışma ile gümüş NP'lerin hücre zarında birikip dissolüsyona uğrayabileceği gösterilmiştir (211). Ayrıca; gümüş NP'lerin insan hepatokarsinoma hücrelerinde hücre zarında yapısal değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (212). Zhornik ve ark. (213) tarafından gümüş NP'lerin insan lenfosit hücrelerinde lipid peroksidasyonu yoluyla hücre zarında hasara ve yapısal (*morfolojik*) değişikliklere yol açtığı gösterilmiştir. Gümüş NP'ler ayrıca, hücre zarı geçirgenliği ve sinyal yollarında bozulmalara ve hücre ölümüne yol açabilir (214).

Gümüş NP'ler reaktif oksijen türleri aracılığıyla mitokondriyal zar potansiyelinde bozulmaya neden olurlar (215). Ayrıca; mitokondri iç zarına ulaşarak zarda şişmeye bağlı hasar oluşturur, mitokondriyal füzyon ve fisyonu bozar ve ATP üretimini azaltır (104). Düşük konsantrasyonda gümüş NP uygulamasının fare beyin

hücre mitokondrilerinde membran potansiyelinde düşüş, mitokondri şeklinde uzama, şişme ve iç zar kıvrımlarında bozulma oluşturduğu bildirilmiştir (216).

Gümüş NP'lerin hücrenin otofaji mekanizmasını bozarak da toksik etkiler oluşturduğu gösterilmiştir. Gümüş NP'lerin ubiquitin proteinlerinin oluşumunu etkileyerek otofaji yollarını bozduğu öne sürülmüştür. Buna ek olarak, hücre içerisine endositoz yoluyla giren ve sonrasında lizozomlara ulaşan gümüş NP'lerinin, asidik lizozom ortamında oksidatif dissolüsyon yoluyla gümüş iyonlarına dönüştüğü, lizozom zarında hasar oluşturduğu ve sitozole salındığı bildirilmiştir (217).

Gümüş NP'lerin endoplazmik retikulumu etkileyerek doğru protein katlanmasını engellediği ve katlanmamış veya hatalı katlanmış protein miktarını arttırdığı bildirilmiştir. Böylece endoplazmik retikulum stresini arttırarak bu organelin homeostazını bozduğu ve sonuçta hücre hasarı oluşturabildiği belirtilmiştir (104).

Gümüş NP'ler genetik materyal ile de etkileşime girebilir. Asharani ve ark. (218) tarafından gümüş NP'lerin DNA hasarı ve kromozomal bozukluklar oluşturmak yoluyla hücre döngüsünü durdurduğu gösterilmiştir.

### ***Gümüş Nanoparçacıkların Doku, Organ ve Sistem Düzeyindeki Toksisiteleri***

Gümüş NP'lerinin çeşitli doku, organ ve sistemler üzerinde toksik etkiler meydana getirdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Aşağıda bu çalışmalara ilişkin özet bilgilere yer verilmiştir.

#### **İntestinal Toksisite**

Yu ve ark.'nın (219) 2019 yılında yaptığı bir çalışmada; 1000 µg/ml konsantrasyonunda selüloz nanofibril ve gümüş NP'lerine maruz bırakılan Caco-2 hücreleri ve insan normal kolon epitel hücrelerinde (FHC-CRL 1831) 24 saat süre sonunda canlı hücre sayısında önemli düzeyde bir azalma olmadığı gözlenmiştir. Jia ve ark. (220)'nin kolon hücreleri ile yaptıkları bir diğer çalışmada, Ag NP'lerine maruziyetin 15 µg/mL'den yüksek konsantrasyonlarda ve doza bağlı olarak ROT oluşumu, oksidatif stres artışı ve apoptoz indüksiyonu yoluyla sitotoksisite oluşturduğu gösterilmiştir. Shahare ve ark. (221) tarafından oral yolla tekrarlayan

gümüş NP maruziyetinin farelerde bağırsak epitel hücrelerinde mikrovillüs hasarına ve buna bağlı olarak emilimde bozulmalara yol açtığı gösterilmiştir.

Bir başka çalışmada, oral yolla 4 hafta boyunca gümüş NP'leri uygulanan farelerde intestinal mukoza tabakasında incelleme, bağırsak hücrelerinde enflamatuvar reaksiyonlar, dentritik hücrelerde apoptoz ve intestinal mikrobiyotada bozulmalar olduğu bildirilmiştir (222). Orr ve ark. (223)'nın 2019 tarihli çalışmasında da oral gümüş NP'leri uygulanan sıçanlarda bağırsakta enflamasyon ve bağırsak geçirgenliğinde bozulma gözlemlendiği belirtilmiştir. Kadın ve erkeklerden alınan bağırsak hücre örnekleri üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise gümüş NP uygulanmasına bağlı olarak ortaya çıkan enflamatuvar reaksiyonların ve gümüş NP maruziyeti sonucunda hücreler arası bağlantıları düzenleyen mRNA ekspresyonunda gerçekleşen değişikliklerin cinsiyete göre değişkenlik gösterdiği saptanmıştır (224).

Bağırsak mikrobiyotasının canlıların sindirim işlevleri, enerji dengesi, glikoz ve lipid metabolizması ile bağışıklık sistemi üzerinde önemli etkileri olduğu bilinmektedir (225). Wang ve ark. (200) tarafından 120 gün süreyle oral yolla gümüş uygulamasının farelerin bağırsak mikrobiyotasında obezite ve irritabl bağırsak sendromuyla ilişkilendirilen bozulmalara yol açtığı gösterilmiştir. Farelere oral yolla 28 gün boyunca farklı dozlarda gümüş NP uygulanan bir başka çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiş; bağırsak mikrobiyotasında obezite gibi metabolik ve enflamatuvar hastalıklarda görülen değişikliklere benzer değişiklikler görüldüğü bildirilmiştir (226). Williams ve ark. (227), 13 hafta boyunca oral yolla gümüş NP uygulanan sıçanlarda, bağırsaklardaki bakteri dağılımında gram negatif bakteriler lehine belirgin değişiklikler ile bağışıklık sistemini düzenleyici genlerin ifadesinde azalma gerçekleştiğini; bu etkilerin ise cinsiyete göre değişebildiğini bildirmiştir. Öte yandan; Wilding ve ark. (228) tarafından oral yolla 28 gün boyunca çeşitli boyutta ve PVP veya sitratla kaplanmış gümüş NP'lere maruz kalan farelerin bağırsak mikrobiyotasında önemli değişiklik gözlenmediği bildirmiştir.

### **Hepatotoksisite**

Gümüş nanoparçacıkların toksisitesinin incelendiği bir çalışmada, toksisite açısından hedef organın karaciğer olduğu bildirilmiş ve olumsuz etki gözlenen en

düşük düzey (LOAEL, *the lowest observed adverse effect level*) değerinin 125 mg/kg olduğu belirlenmiştir (199). Zande ve ark. (196) da gümüş NP'lerin hedef organının karaciğer ve dalak olduğunu bildirmiştir.

İnsan pluripotent kök hücre kaynaklı hepatosit benzeri hücreler ile Gao ve ark. (229)'nın yaptığı bir çalışmada; hücre kültürlerine 24 saat süreyle 5–25 µg/ml aralığında dozlarda AgNP uygulamıştır. Sitotoksikite testlerinde, subtoksik dozlarda (1 ve 2 µg/ml) hücre proliferasyonunda artış, 5 µg/ml üzerindeki dozlarda ise doza bağlı olarak hücre canlılığında azalma gözlenmiştir. Araştırmacılar, gen ifadesinde değişiklikler olduğunu göstermişler; belirlenen gen ifade değişiklikleri ise kanser başta olmak üzere çeşitli hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir.

Patlolla ve ark. (230)'nın yapmış olduğu bir başka çalışmada, oral yolla gümüş NP'leri uygulanan sıçanların karaciğerlerinde reaktif oksijen türleri oluşumunda artış, alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), alkalen fosfataz (ALP) enzim düzeylerinde yükselme, lipid hidroperoksit konsantrasyonunda artış ile DNA hasarı ve çeşitli yapısal bozukluklar gösterilmiştir. Blanco ve ark. (231) tarafından yine sıçanlar ile gerçekleştirilen 90 günlük oral toksisite çalışmasında da ROT oluşumunda artış, otofaji ve insülin sinyal yollarında bozulma ile karaciğer hasarı olduğu gösterilmiştir.

### **Nefrotoksisite**

Gümüş nanoparçacıkların oral toksisitesinin araştırılması amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada oral yolla gümüş NP'leri uygulanan farelerin böbreklerinde, oksidatif stres biyogöstergelerinde ve kan üre konsantrasyonunda artış olduğu, ayrıca tübüllerde nekroze hücreler gözlendiği bildirmiştir (232).

Bir başka oral toksisite çalışmasında da oral yolla 14 gün boyunca gümüş NP uygulanan farelerde, oksidatif stres düzeyinde artış ve antioksidan enzim miktarında azalmaya bağlı olarak böbrek toksisitesi gözlenmiştir (233). Nosrati ve ark. tarafından 28 günlük oral maruziyet sonrasında fare böbreklerinde glomerüllerde dejeneratif değişiklikler, tübüler yapıda ve fırça kenar yapısında bozulmalar gibi histopatolojik değişiklikler meydana geldiği bildirilmiştir (234).

İntraperitoneal yolla 2.000 mg/kg dozda 48 saat arayla iki kez gümüş NP'leri uygulanan sıçanların son dozdan üç gün sonra renal tübül hücrelerinde şişme, bazal membranda kalınlaşma ve mitokondriyal krista yapısında bozulmalar gözlemlendiği bildirilmiştir (235).

Kim ve ark. (199), oral yolla ve değişik konsantrasyonlarda 90 gün süreyle gümüş NP'leri uygulanan farelerde böbrekte gümüş birikiminin, dişi farelerde erkek farelerdekinin iki katı olduğunu göstermiştir.

### **Kardiyotoksisite**

Gümüş NP'lerin kardiyofizyoloji üzerindeki etkileri henüz tam olarak açıklanamamıştır. Bu nedenle; bu parçacıkların kardiyotoksisitesinin belirlenmesi ve mekanizmasının aydınlatılabilmesi için daha fazla çalışmaya gerek bulunmaktadır. Lin ve ark. (236), gümüş NP maruziyetinin, parçacığa özgü bir etki gösterdiğini, sodyum ve potasyum kanallarının inhibisyonu yoluyla transmembran potansiyelini bozarak kardiyotoksisiteye yol açtığını göstermiştir. Ma ve ark. (237), gümüş NP'lerinin 21 günlük intratekal yoldan uygulanması sonrasında sıçanlarda kardiyak kasılmada azalma, diyastolik işlev bozukluğu ve miyofibril kaybı oluştuğunu ve bu etkilerin sodyum selenit uygulaması ile azaltılabileceğini bildirmiştir. Bir başka çalışmada da; oral yolla 8 hafta boyunca gümüş NP'leri uygulanan sıçanlarda miyokardiyal hasar göstergesi olan kardiyak troponin düzeyinde ve micro-RNA21 ekspresyonunda önemli bir artış olduğu belirlenmiştir. Bu kardiyotoksik etkiye, nitrik oksit üretiminde artış, DNA oksidasyonu ve enflamasyonun yol açıyor olabileceği düşünülmüştür (238).

### **Nörotoksisite**

Literatürde gümüş NP'lerin nörotoksik etkileri hakkında çok sayıda *in vivo* ve *in vitro* çalışma bulunmaktadır.

Tang ve ark. (239)'nın yaptıkları bir çalışmada, gümüş NP'lerinin kan-beyin engelini geçtiği ve nöron ölümüne yol açtığı gösterilmiş olup bu NP'lerin beyin hücrelerinde en az 24 hafta süreyle kaldığı bildirilmiştir.

Gümüş NP'lerin, kan-beyin engelini oluşturan endotel ve astrosit benzeri hücrelerde işlev bozukluğu ve hücre ölümüne yol açarak kan-beyin engelini

geçirgenliğini arttırdığı ve sinir sistemine ulaşan gümüş NP'lerinin miktarında artışa neden olduğu gösterilmiştir (240).

Liu ve ark. (241), embriyonik sinir kök hücreleri ile yaptıkları bir çalışmada; Ag NP'lerin mitokondriyal ROT artışına bağlı olarak gelişimsel nörotoksik etki meydana getirdiğini ve bu etkinin doz ve zamana bağlı olduğunu göstermiştir.

Gümüş NP'lerine maruziyetin, hipertermi kaynaklı kan-beyin engeli hasarı, ödem oluşumu, bilişsel hasar gibi etkileri şiddetlendirdiği gösterilmiştir. (242) Khan ve ark. (243), kan-beyin engeli modeli ile yaptıkları bir çalışmada, gümüş NP maruziyeti sonucunda zamana bağlı olarak öncelikle enflamasyon ile ilişkili yolakların çalıştığı, maruziyetin devamında ise koruyucu yolakların aktive olduğu gösterilmiştir.

Oral yolla düşük dozda (0,2 mg/kg) 14 gün süreyle gümüş NP'leri uygulanan farelerin beyin hücrelerinde apoptoz yolaklarının bozulduğu, mitokondri yapı ve işlevinde bozulmaya bağlı hasar oluştuğu bildirilmiştir (216).

Antsiferova ve ark. (244-246) tarafından gerçekleştirilen çeşitli çalışmalarda oral yolla gümüş NP uygulanmasının farelerin beyinlerinde yapısal değişikliklere, anksiyete, hafıza işlevlerinde bozulma ve davranışsal değişikliklere yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca; araştırmacılar, gümüş NP'lerinin nörotoksik etkilerine karşı yetişkin deneklerin, adaptif homeostaz (*hormesis*) nedeniyle daha dayanıklı olduklarını göstermiştir. Çalışma sonuçları, günlük olarak düşük dozda gümüş NP'lerine maruziyetin, uzun sürede beynin belirli bölgelerindeki birikim nedeniyle risk oluşturduğunu göstermiştir (246).

### **Üreme ve Gelişimsel Toksikite**

İnsan embriyonik testiküler karsinoma hücreleri ve fare primer testiküler hücreleri ile yapılan bir çalışmada, gümüş NP'lerine maruziyetin, doza bağlı sitotoksositeye yol açtığı gösterilmiştir (247).

Abdominal subkütan enjeksiyon yoluyla gümüş NP'leri uygulanan yenidoğan fareler üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada; gümüş NP'lerinin spermatojenez ve sperm kalitesi üzerinde olumsuz etkileri olduğu gösterilmiştir (248). Dişi farelere

gümüş NP'leri uygulanmasının, yumurtalıklarda folikül sayısında azalma, kanama, fibrozis ve hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir (249, 250).

Farelere gebelik döneminde oral yolla gümüş NP'leri uygulanması sonrasında, yavruların beyinlerinde çeşitli bölgelerde hasar meydana geldiği ve davranışsal değişiklikler gözlemlendiği belirtilmiş ve toksik etkilerin oksidatif stres yoluyla gerçekleştiği öne sürülmüştür (251-253). Diğer taraftan; Hong ve ark. (254) ise, çiftleşme öncesi, çiftleşme dönemi, gebelik ve doğum sonrası dönemlerde oral yolla gümüş NP'leri uygulanan farelerde istatistiksel olarak anlamlı bir toksisite gözlenmediğini yalnızca tüylerde dökülme gerçekleştiğini bildirmiştir.

Issa ve ark. (255) tarafından, gümüş NP'lerine perinatal maruziyetin yenidoğanda gıda alerjisine yol açabileceği öne sürülmüştür.

Gebe farelere nanoparçacık şeklinde ve iyonize olmuş şekilde gümüş uygulanan bir başka çalışmada ise anne hippocampusünde nöronal hasar gözlemlenirken, yavrularda herhangi bir histopatolojik değişiklik belirlenmemiştir (256).

### **Genotoksisite**

Bir çok *in vitro* çalışma ile gümüş NP'lerin genotoksik etkiler meydana getirdiği gösterilmiş olmakla birlikte; *in vivo* çalışmalarda henüz kesin bir sonuca ulaşılamamıştır (257).

Asharani ve ark. (218)'nın 2009 tarihinde gerçekleştirdikleri bir *in vitro* çalışmada, TEM görüntüleme yöntemi ile mitokondri ve hücre çekirdeği içerisinde gümüş NP varlığı saptanmış; gümüş NP'lerin DNA ve kromozom hasarı oluşturarak hücre döngüsünü durdurduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, gümüş NP'lerin düşük dozlarda dahi (çalışmada uygulanan en düşük konsantrasyon 25 µg/ml'dir) genotoksik etki gösterdiği vurgulanmıştır.

İnsan hepatoma hücre kültürlerine standart gümüş NP'leri veya PVP kaplı gümüş NP'leri (PVP-NP) uygulanarak gerçekleştirilen bir çalışmada, gümüş NP'lerinin PVP-NP'den daha yüksek düzeyde DNA hasarına yol açtığı, PVP-NP'lerin ise daha yüksek oranda kromozomal bozukluk oluşturduğu bildirilmiştir (258).

Narciso ve ark. (257) tarafından yapılan bir araştırmada; yukarıdaki çalışma sonuçlarından farklı olarak; oral uygulama sonrasında fare hücre sitoplazmalarında TEM görüntüleme yöntemi ile gümüş NP'leri belirlenmiş, çekirdek örneklerinde ise gümüş NP bulunmadığı bildirilmiştir. Araştırmacılar alışma sonucunda, bu bulguyla uyumlu şekilde, comet ve mikroçekirdek testleri ile istatistiksel olarak anlamlı düzeye toksisite saptanmadığını bildirmiştir.

Gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise Chen ve ark. (259), gümüş NP'lerin DNA metilasyon sürecine etki ettiğini ve epigenetik yollarla metabolik yollara, biyolojik düzene ve hücrenel süreçlere etki edebileceğini bildirmiştir.

### **Akciğer zerine Toksik Etkiler**

Gümüş nanoparçacıkların akciğer üzerine toksik etkilerine ilişkin çalışmaların çoğunluğunun inhalasyon yoluyla maruziyete ilişkin olduğu görülmüştür.

Zande ve ark. (196) tarafından yapılan bir çalışmada oral uygulama sonrasında gümüş NP'lerin hedef organının akciğer olduğu belirlenmiş ve bu parçacıkların akciğerlerde diğer organlara göre daha düşük miktarlarda biriktiği gösterilmiştir. Kim ve ark. (199)'nın Ag NP'ler ile gerçekleştirdikleri bir subkronik oral toksisite çalışmasında ise oral uygulama sonrasında akciğer histopatolojisinde değişiklik saptanmamıştır.

#### **4.1.4. Nanokillerin Genel zellikleri ve Gıda Ambalajlarında Kullanımı**

##### ***Nanokillerin Genel zellikleri***

Antik ağlardan beri bilinen ve kullanılan kil ve kil mineralleri, ucuz, kolay bulunan ve evre dostu olmaları nedeniyle doğrudan veya değiştirilmiş şekilleri ile 21. yüzyılın malzemeleri olarak tanımlanmaktadır (260). Killer, birincil olarak ince taneli minerallerden oluşan, içeriklerindeki kil mineralleri sayesinde su varlığında şekil verilebilir (plastik) zellik gösteren, kurutulduğu veya pişirildiğinde ise sertleşen doğal malzemeler olarak tanımlanır. Killerin içeriğinde, kil mineralleri dışında kuartz, kalsit, oksitler, kolloidal silika, demir hidroksit jelleri gibi farklı fazlar da bulunabilir. Günümüzde kile plastik özellik kazandıran mineraller olarak yalnızca filosilikatlar

(tabakalı silikatlar) bilindiği için; kile bu özellikleri kazandıran mineraller olarak tanımlanan “kil mineralleri” denildiğinde filosilikatlar anlaşılmaktadır (261).

Killer, yaklaşık 1 nm kalınlığında ve 8-10 mikrometreye ulaşabilen uzunluğa sahip olabilen platelet tabakalardan oluşur (262). Nanokil tabakaları ise, tetrahedral veya oktahedral yapılardan oluşur. Tetrahedral tabaka, silisyum, alüminyum veya demir gibi bir katyonun dört oksijen atomu ile çevrelenmesinden meydana gelirken; oktahedral tabaka, alüminyum veya magnezyum katyonunun altı oksijen atomu ile çevrelenmesiyle oluşmuştur. Killer, tetrahedral ve oktahedral tabakaların yerleşimine göre 1:1 tip, 2:1 tip, 2:1:1 tip silikatlar şeklinde sınıflandırılır. 1:1 tip silikatlar, kaolinit ve sulu bazik alüminyum silikat (haloysit, *halloysite*)’tır. Kaolinit içeren kaolin “Çin kili” olarak da bilinir. Aynı grupta yer alan haloysit, kaolinitten iki tabaka arasında bir su tabakası içermesi ve tübüler şekilde olması yönünden farklılık gösterir (263).

Silikatların 2:1 tipte olanları arasında gıda ambalajlarında en yaygın olarak kullanılanların smektit grubunda yer aldığı görülmektedir. Smektit grubunun en önde gelen üyeleri ise montmorillonit, beidelit, nontronit ve sapionittir. Bentonit ise % 98’den fazla oranda montmorillonit içeren saf olmayan bir alüminyum silikattır. Baskın elementin ne olduğuna göre sodyum bentonit, kalsiyum bentonit gibi isimlerle anılır (263).

Nanokillerin polimer film yapısına katılması yoluyla, daha ince filmlerden daha kalın filmlerin dayanıklılık ve engelleyici özellikleri elde edilebilir ve böylece katı atık miktarı da azaltılır. Ayrıca; organik katyonik sürfaktanlar ile nanokil yapısındaki değiştirilebilir katyonların yer değiştirmesi yoluyla nanokillerin polimer yapısı ile uyumlulukları arttırılabilir. Bu şekilde nanokil modifikasyonu sonucu elde edilen organomodifiye nanokillerin dolgu malzemesi olarak kullanıldığı nanokompozitler, toplam nanokompozit tüketiminin yarısından fazlasını oluşturmaktadır (264, 265).

### ***Nanokillerin Gıda Ambalajlarında Kullanımı***

Nanokiller, gıda ambalajlarında kullanılan ilk nanoparçacıklar olup, nanokil içerikli ambalaj malzemeleri ilk olarak 1990’lı yılların sonlarında geliştirilmiştir (266).

Günümüzde de dünya piyasasında nanokil içeren pek çok gıda ambalajı yer almaktadır (267)

Nanokiller polimerlere, esneklik, polimer sertliği ve engelleyici özellikleri iyileştirmek gibi amaçlarla eklenir ve nanokompozitler oluşturulur. Nanokillerin nanokompozit yapısına % 10'dan daha düşük konsantrasyonlarda eklenmesi, istenen özelliklere ulaşılması için genellikle yeterlidir. Hava geçirgenliği azaltıcı etki için ise en uygun konsantrasyonun % 5 olduğu bildirilmiştir (268). Gıda ambalajları üzerinde gerçekleştirilen pek çok çalışmada kullanılan nanokil konsantrasyonunun da % 5 civarında seçildiği görülmektedir (269-272).

Nanokil içeren nanokompozitler, nanokillerin gaz geçirgenliğini azaltıcı özelliğine bağlı olarak gıda raf ömrünü uzatabilmekte ve ayrıca bira ve karbonatlı içeceklerin ambalajlarında kullanım potansiyeli taşımaktadır (12, 13). Nanokillerin gaz geçirgenliğini azaltıcı özelliğinin, nanokilin katmanlı yapısı sayesinde gaz moleküllerinin geçmesi gereken yolu uzatması ve dolambaçlı hale getirmesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (54). Kil bazlı nanokompozitlerin antimikrobiyal etkileri üzerinde de pek çok çalışma yapılmıştır. Nanokillerin doğrudan veya dolaylı antimikrobiyal etki gösterebildikleri gibi polimer matriksin antimikrobiyal maddeleri tutuşunu veya salıverilmesini iyileştirebildikleri bildirilmiştir (273).

Nanokiller gıda ambalajlarına çeşitli bitkisel esansiyel yağlar ve antioksidan katkı maddeleri gibi maddelerin kontrollü salımını sağlamak amacıyla da eklenebilmektedir (274-277). Ayrıca, gümüş nanoparçacıkların MMT içerisine tekdüze şekilde dağıtılarak kontrollü gümüş iyonu salımı sağlandığı ve bu yolla antimikrobiyal etkinliğin 100-200 nm boyutundaki gümüş parçacıklarınkine göre dört kata kadar iyileştirilebildiği ve uzun süreli etki sağlandığı bildirilmiştir (278)

Çeşitli nanokillerin biyoyıkılabilir polimer özelliklerini iyileştirmek amacıyla polimer yapısına girmesinin, biyoyıkım üzerinde yavaşlatıcı veya hızlandırıcı etkileri olabildiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (131).

### ***Nanokillerin Nitel ve Nicel Analiz Yöntemleri***

Gıda ambalajlarına migrasyonun değerlendirildiği çalışmalarda; nanokillerin nitel incelemelerinde TEM ve TEM-X-Işını Enerji Dağılımlı Spektroskopisi (TEM-

EDS) yöntemlerinin kullanıldığı; nicel analizlerin ise genellikle nanokil yapısında bulunan alüminyum, silisyum ve magnezyum gibi atomların ICP-MS, asimetrik akış alanı-akış fraksiyonasyonu (AF<sup>4</sup>)-çok açılı ışık saçılma tespiti ve atomik absorpsiyon spektroskopisi ile ölçümüne dayandığı görülmüştür (264, 270, 279, 280). Bunun dışında Diaz ve ark. (281), migrasyon miktarının ölçümü için floresanla işaretli kil kullanımının da uygun olabileceğini öne sürmüştür.

#### **4.1.5. Nanokil İçeren Gıda Ambalajlarından Gıdalara Geçiş ve Migrasyon Çalışmaları**

Son yıllarda MMT esaslı nanokompozitlere ilişkin sonuçları onaylanmış araştırmalar yapılmış olmasına rağmen; bu ürünlerin güvenliliği yönünden, özellikle gıdaya difüzyon ve migrasyon açısından endişeler varlığını sürdürmektedir. Nanokompozitlerden MMT ve modifiye MMT geçişine ilişkin kapsamlı çalışma sayısı oldukça azdır (282).

Cloisite 30B içeren PLA esaslı nanokompozit filmlerden yağlı gıda benzeri olan % 95 etanol çözeltisine nanokil geçişinin araştırıldığı bir çalışmada, % 5 Cloisite 30B içeren PLA esaslı nanokompozit filmlerden yağlı gıda benzeri olan % 95 etanol çözeltisine nanokil geçişi incelenmiştir (270). Araştırmacılar, 40°C’de 10 gün süre ile tamamen batırma (*total immersion*) sonrasında gıdaya geçiş miktarlarını, asimetrik akış alanı- akış fraksiyonasyonu (AF<sup>4</sup>)-çok açılı ışık saçılma tespiti ve ICP-MS yöntemlerini birlikte kullanarak değerlendirmişlerdir. Sonuçta gıdaya toplam geçiş miktarının 6,7 mg/dm<sup>2</sup> olduğu ve gıda benzerine nanoparçacık geçişi olmadığı anlaşılmıştır.

Bir başka çalışmada, ticari olarak sağlanabilen iki farklı nanokil katkılı LDPE gıda poşeti üzerinde % 3 asetik asit ve % 10 etanol çözeltileri kullanarak farklı süre ve koşullarda (40°C’de 10 gün ve 70°C’de 2 saat süreyle) migrasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir (283). Çalışmada, poşetlerin tekrar kullanımı durumunun değerlendirilmesi için ise 70°C’de ve 2 saat süreli uygulamalar üçer kez tekrarlanmıştır. Deney sonucunda gıda benzeri çözeltilerine hem iyonik olarak hem de nanoparçacık şeklinde alüminyum geçişi olduğu gösterilmiştir. Etanol çözeltisine alüminyum geçişinin asetik asit çözeltisindekine göre 4-5 kat daha düşük olduğu ve

bütün koşullarda en yüksek geçişin 70°C’de ve 2 saatlik deney koşullarında gerçekleştiği saptanmıştır. Tekrarlayan uygulamalarda (özellikle ilk uygulama ile sonraki uygulamalar arasında) geçişi gerçekleştiren alüminyum miktarının arttığı, sonraki uygulamalarda ise geçiş miktarında sabitlenme eğilimi olduğu belirlenmiştir. Bu durum, nanoparçacıkların ambalaj malzemesinden ayrılması için zamana gereksinim olduğu ve ilk uygulamada belirlenen düşük alüminyum geçişinin ise metalin kısmi çözünmesi veya çok az miktarda nanoparçacık geçişine bağlı olarak gerçekleştiği şeklinde yorumlanmıştır. Migrasyon çözeltilerinde SEM ile yapılan görüntüleme çalışmasında, geçişi gerçekleştiren parçacıkların genelde 1 mikrometreden büyük olduğu, nadiren 500 nm’den küçük uzunluğa sahip nanoplateletlerin de görülebildiği bildirilmiştir. Çalışmada ambalaj malzemelerinde kullanılan nanokil çeşiti belirtilmemiş olup, ticari ürünlere ilişkin web kaynaklarında Debbie Meyers marka gıda poşeti için “doğal mineral” dışında tanımlayıcı bir bilgiye erişilememiştir. İnternet kaynaklarında Aisaika markalı üründe ise “oya taşı” kullanıldığı bildirilmiştir (284).

Maisanaba ve ark. (272), % 4 organomodifiye MMT dolgulu PLA esaslı nanokompozitler ile migrasyon ve toksisite çalışmaları gerçekleştirmiştir. Distile su kullanılarak gerçekleştirilen migrasyon testi sonuçlarına göre toplam migrasyonu ve kil migrasyonunu temsilen incelenen alüminyum, kalsiyum ve silisyum miktarlarının bazı örneklerde ölçüm limitlerinin altında ve bütün örneklerde AB düzenlemelerinde belirlenen sınırların altında olduğu saptanmıştır. Maisanaba ve ark. (285) 2018 tarihli benzer bir çalışmada ise; % 3 organomodifiye MMT dolgulu PP esaslı nanokompozit ile migrasyon ve toksisite çalışmaları gerçekleştirmiştir. Testlerde gıda benzeri olarak su, yağlı gıdaları temsilen izooktan ve sulu gıdaları temsilen % 10 etanol kullanılmıştır. Migrasyon testleri sonucunda izooktan çözeltisinde kil migrasyonu olduğunu gösteren metallere yalnızca magnezyum için kontrole göre yüksek miktar saptanırken; etanol çözeltisinde ise alüminyum, magnezyum ve silisyum metal miktarlarının kontrol grubuna göre önemli düzeyde yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada da; toplam migrasyon düzeyinin ve belirtilen metaller için tespit edilen miktarların AB düzenlemeleri ile belirlenen sınırların altında olduğu bildirilmiştir.

Cloisite 30B katkılı PLA filmlerden gıdaya geçişinin incelendiği bir başka çalışmada, toplam migrasyonun AB düzenlemesiyle belirlenen 10 mg/dm<sup>2</sup> değerinin

altında olduğu saptanmıştır (286). Nanokilin spesifik migrasyonunun değerlendirilmesi amacıyla gıda benzerinde ölçülen kalsiyum, silisyum, alüminyum ve sodyum miktarlarının Ca>Na>Si>Al şeklinde sıralandığı; ancak nanokilin kendi içeriğindeki sıralamanın Si>Al>Na>Ca şeklinde olduğu gösterilmiştir. Araştırmacılar bu sonucun, bazı kil minerallerinin gıda benzerine daha kolay geçiş yapabilmesine, nanokil eklenmesinin PLA dayanıklılığını bozmasına veya kalsiyumun gıda benzerine nano olmayan formda geçmesine bağlı olabileceğini bildirmişlerdir (286).

Tek başına gümüş nanoparçacıklar, tek başına Cloisite 30B ve hem gümüş hem Cloisite 30B içeren nişasta esaslı filmler üretilerek yapılan çalışmalarda (180), gümüş NP katkısının, kilin polimer içerisindeki dağılım özelliklerini iyileştirdiği gösterilmiştir. Bu filmler üzerinde % 3 asetik asit çözeltisi kullanarak 40°C’de 10 gün temas ile gıdaya geçiş testleri gerçekleştirilmiştir. Toplam migrasyon miktarının her üç film türünde Avrupa Birliği tarafından belirlenen toplam migrasyon sınırının (60 mg/kg) altında olması nedeniyle bu filmlerin gıda ambalajlarında kullanımlarının güvenli olacağı belirtilmiştir. Toplam migrasyonun yanı sıra, her üç film türü için de migrant çözeltilerinde ICP-OES yöntemi kullanılarak alüminyum, kalsiyum, demir ve gümüş iyonlarının miktarları ölçülmüş ve iyon miktarlarının önemli düzeyde olmadığı bildirilmiştir.

Farhoodi ve ark. (287), organomodifiye MMT (Cloisite 20A) içeren PET şişeler ile yaptıkları bir migrasyon çalışmasında, bu tip şişelerin olası kullanım alanı olan kola ve diğer karbonatlı içecekleri temsilen gıda benzeri olarak % 3 asetik asit çözeltisini kullanmışlardır. 25 ve 45°C sıcaklıklarda, 7 ila 90 gün süreyle maruziyet sonrasında; nanokil migrasyonu ICP yöntemi ile silisyum ve alüminyum miktarı ölçülerek incelenmiş ve gıda benzerinde temas süresi ve sıcaklık ile artan silisyum ve alüminyum varlığı belirlenmiştir. Çalışmada, nanokilin polimer içinde iyi dağılım göstermesi halinde nanokil hareketliliğinin azaldığı ve buna bağlı olarak daha düşük miktarda migrasyon oluştuğu bildirilmiştir.

Kuaterner amonyum tuzu ile değiştirilmiş bentonit içeren PLA nanokompozitler kullanılarak üretilen bir nanokompozit ile gerçekleştirilen bir migrasyon çalışması, söz konusu nanokompozit kozmetik ürün ambalajlamasında kullanılması amaçlanan bir malzeme olsa da, polimer malzemedan temas ettiği

ürünlere madde geçişini gösterebileceği için bu tez çalışması kapsamında incelenmiştir. *EU 10/2011* düzenlemesi doğrultusunda 40°C’de 10 gün süreyle yağlı gıda benzeri olarak bitkisel yağın kullanıldığı migrasyon çalışması sonucunda, toplam migrasyon yağlı gıda benzerinde 10 mg/dm<sup>2</sup> olan yasal sınırın altında ölçülmüştür (288).

Nanokilin polimer içerisinde daha iyi dağılımının sağlanması ve polimer özelliklerini iyileştirmek amacıyla nanokiller, silan, sürfaktanlar, kuaterner amonyum tuzları ile modifiye edilebilmektedir (289, 290). Ancak; organomodifikasyon, nanokillerin hem işlevleri hem toksisitesi açısından önemlidir (285). Killerin modifikasyonunda kullanılan sürfaktanların bazılarının insan, hayvan ve ekosistem üzerine toksik etkileri olduğu gösterilmiştir (265). Bu nedenle; söz konusu sürfaktanların salımı konusunda çalışmalar yapılmaktadır. Örneğin; modifiye edilmiş nanokil içeren nanokompozitlerden sürfaktan salımı, Xia ve ark. (264)’nın 2014 tarihli çalışmasında incelenmiştir. Çalışmada; organo-modifiye edilmiş MMT içeren PP ve poliamid-6 esaslı filmlerden nanokil ve MMT modifikasyonunda kullanılan sürfaktanların migrasyonu, % 100 alkol çözeltisi kullanılarak ve 70°C’de 10 gün süre temas sonrasında ASTM D4754-11 test yöntemi ile ölçülmüştür. Sonuçta hem nanokil parçacıklarının hem de sürfaktan moleküllerinin etanole geçtiği saptanmıştır. Nanokil parçacıklarına göre daha yüksek miktarda migrasyon gösteren sürfaktan moleküllerinin, parçacık büyüklüklerinin nanokillere göre çok daha küçük olması nedeniyle polimer içinde daha rahat hareket edecekleri ve geçişlerinin difüzyon yoluyla gerçekleşebileceği bildirilmiştir. Aynı nanopolimerler ve gıda benzeri ile aynı deney yöntemi (ASTM D4754-11) kullanarak 22°C, 40°C ve 70°C’de gerçekleştirilen bir başka migrasyon çalışması sonucunda, sürfaktan salımı Fick’in iki numaralı difüzyon yasası ile açıklanmış ve migrasyon parametrelerinin sürfaktan, polimer ve çözücü arasındaki afiniteyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (291). 2015 yılında yapılan bir başka çalışmada ise; gıda ambalajlarının yapısına giren organo-modifiye nanokillerden sürfaktan salımının, ortam sıcaklığından, farklı gıda benzerlerinden ve ses dalgası uygulanmasından etkilendiği gösterilmiştir (265).

Dimetildialkilamonyum klorit ile modifiye edilmiş MMT’nin kuru gıdalar ile uzun süre teması öngörülen polietilen ambalaj malzemelerinde kullanımı, EFSA tarafından değerlendirilmiştir. Söz konusu çalışmada; kil ve modifiye edici madde yanı

sıra modifiye edici kaynaklı olası kirlilikler için de migrasyon değerlendirmesi yapılmıştır. Kil ve modifiye edici maddenin migrasyonu, 40°C’de 10 gün süreyle ve gıda benzeri olarak polifenilen oksit (*Tenax*<sup>®</sup>) kullanılarak incelenmiştir. Deney sonucunda gıda benzeri içerisinde, gıda benzerinin kendi içeriğinde olan miktardan ayırt edilebilir düzeyde alüminyum saptanmamış, modifiye edici geçişi de saptanabilir sınırdan (6 µg/kg gıda) daha düşük olarak bulunmuştur. Modifiye edici madde kaynaklı bileşiklerden dimetilalkilamin yapısındaki dimetilheksadesilamin ve dimetiloktadesilaminin toplam gıdaya geçiş miktarı gıdanın kilogramı başına 50 µg’dan (50 µg/kg gıda) düşük bulunmuş; dimetilalkilamin yapısındaki maddeler için EU 10/2011 düzenlemesiyle 30 mg/kg gıda spesifik geçiş sınırı tanımlandığı için bu maddelerin toksikolojik açıdan endişe uyandırıcı düzeyde olmadığı bildirilmiştir. Yine ambalaj yapısında modifiye edici madde kaynaklı kirlilik olarak bulunabilecek olan 1-kloroalkanlar (1-klorokehsadekan ve 1-klorooktadekan) için ise sırasıyla 19,8 ve 78 µg/kg düzeyinde gıdaya geçiş belirlenmiş, bu maddelere ilişkin toksisite testleri de değerlendirilerek bu maddelerden gıdaya geçişin 0,05 mg/kg gıdayı aşmaması gerektiği bildirilmiştir. Elde edilen tüm veriler ışığında ve kil plateletlerinin ambalaj malzemesi yüzeyine paralel ve tamamen gömülü olması halinde migrasyon beklenmediği gerekçesiyle; dimetildialkil amonyum klorit ile modifiye edilmiş MMT’nin, oda ve buzdolabı sıcaklıklarında kuru gıda saklama amaçlı poliolefin gıda ambalajlarında % 12 (a/a)’den düşük yoğunlukta kullanılmasının güvenlik endişesi yaratmadığı bildirilmiştir. Bu doğrultuda dimetildialkil amonyum klorit ile modifiye edilmiş MMT, EC 10/2011 düzenlemesinin Ek-1’ine (*Union List*) 2017/752 tebliği ile EFSA görüşünde yer alan kullanım koşulları belirtilerek eklenmiştir (292).

Organo-modifiye edici maddelerin polimer yapısına giren nanokillerin yapı ve migrasyon davranışı üzerinde etkisinin incelendiği bir başka çalışmada; standart veya geri dönüştürülmüş PP gıda ambalaj malzemesi ve yağlı gıda benzeri ile migrasyon testleri gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda, nanokil ilavesinin toplam migrasyon miktarını azalttığı belirlenmiştir. Toplam migrasyonu azaltıcı bu etkinin daha hidrofilik bir yapı ile modifiye edilen kilde daha güçlü olduğu gözlenmiştir. Asidik ve asidik olmayan sulu gıda benzerlerinde ise hidrofilik modifikasyona uğramış kilin, hidrofobik grupla modifikasyona uğramış kile göre migrasyon eğilimini hafifçe arttırdığı belirlenmiştir. Bu durum, nanokompozit ve sulu gıda benzerleri arasındaki

afinitenin, gıda benzerinin polimer içerisine girişini (*penetrasyon*) arttırmasına bağlanmıştır. Yağlı gıda benzerleri ile yapılan çalışmalarda nanokompozitlerin toplam migrasyonunun AB düzenlemesi ile belirlenen sınırın üstünde olduğu ve hidrofobik modifikasyonun bu durumu arttırdığı belirtilmiştir (293).

Nanokil içeren tabakanın koruyucu bir başka tabakanın arkasında kalacak şekilde kullanımı da söz konusudur. Örneğin, nanokil içeren PLA bir tabakanın saf PLA tabakaları arasına yerleştirildiği çok katmanlı filmler geliştirilmiştir (294).

Chaudry ve ark. (295)'nin iki tabaka PET arasında sıkıştırılmış kil nanokompozitten oluşan ve Birleşik Krallık piyasasından sağlanabilen şişeler ile gerçekleştirdiği bir çalışmada; gıda benzeri olarak % 3 asetik asit çözeltisi kullanılmış ve tamamen batırma yöntemi ile migrasyon test edilmiştir. Sonuçta saptanabilir düzeyde migrasyon tespit edilemediği için gerçek gıda ile herhangi bir çalışma gerçekleştirilmemiştir. Ancak; bu çalışmada nanokil parçacıklarının gıdaya geçiş için öncelikle arasında sıkıştırılmış durumda olduğu PET tabakasını difüzyon ile geçmesi gerekmekte olduğu için, nanokilin doğrudan gıda ile temas eden yüzeyde bulunduğu durumları yansıtan sonuçlar elde edilmemiştir. Bu çalışmada ayrıca, araştırmacılar tarafından kullanılan malzemenin PET geri dönüşümü sonucunda gıda ile temas eden yüzeylerde de yer alabilme olasılığına sahip olduğu belirtilmiştir.

Benzer şekilde EFSA tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada; % 4 konsantrasyonda kaolin içeren etilen vinil alkol (EVOH) kopolimerinin bir işlevsel engel arkasında kalacak şekilde gıda ambalajlamasında kullanımı değerlendirilmiştir. Bu kapsamda; % 10 etanol ve % 3 asetik asit gıda benzeri ile 40°C'de 10 gün ve izooktan gıda benzeri ile 20°C'de 2 gün süreyle temasının sağlandığı bir migrasyon deneyi gerçekleştirilmiştir. TEM görüntülemesi ile gıda ile temas eden tabakalara kaolin geçişi saptanmamış ve gıdaya kaolin geçişi belirteci olarak kullanılan alüminyum ve magnezyumun gıdaya ölçülebilir miktarda geçişinin gerçekleşmediği belirtilmiştir (Ölçüm limiti sırasıyla 0,07 mg/kg ve 2,2 mg/kg'dır). Sonuçta EFSA tarafından kaolinin EVOH kopolimeri içerisinde % 12 konsantrasyonuna kadar ve gıda ile doğrudan teması engelleyen işlevsel bir engel tabaka arkasında kalmak kaydıyla polimerler içeriğinde kullanılması uygun bulunmuş ve bu kullanım koşulları EU 10/2011 düzenlemesinde yer almıştır (296).

Gıda ambalajlarının yapısında kullanılan nanokillerin, gıda ambalajı yapısında yer alan diğer maddelerin gıdaya geçişini ne şekilde etkilediği, 2010 tarihli bir çalışmada incelenmiştir. Kütlece % 5 nanokil (Cloisite 30 B) içeren poliamid-6 nanokompozit filmlerden farklı koşullar altında (20°C, 25°C, 40°C, 60°C ve 70°C sıcaklık) ve farklı gıda benzerleriyle (% 3 asetik asit, su, izooktan, % 10 etanol ve % 95 etanol) gerçekleştirilen migrasyon testlerinde; film yapısına katılan test migrantlarının (triklosan, kaprolaktam ve trans,trans-1,4-difenil-1,3-bütadien) geçişinin nanokil varlığından nasıl etkilendiği araştırılmıştır. Test migrantlarının gıdaya geçişinin nanoparçacık varlığında 6 kata kadar azaldığını gösteren deney sonuçları, Fick'in 2 numaralı difüzyon yasası çerçevesinde değerlendirilmiştir. Migrasyon miktarının nanokil varlığı ile azalması durumunun, nanoparçacıkların diğer maddelerin gıdaya geçişine karşı fiziksel bir engel oluşturmasından ve bu maddelerin nanoparçacıklara tutunmasından kaynaklanabileceği belirtilmiştir (297). Nasiri ve ark. (298)'nın 2016 tarihli çalışmasında da LLDPE (lineer düşük yoğunluklu polietilen, *linear low-density polyethylene*) filmlerde nanokil bulunmasının ambalaj malzemesinde kullanılan katkı maddelerinin gıdaya geçişi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Nanokil eklenmesinin % 10 etanol ve % 3 asetik asit gıda benzerlerinde difüzyon katsayısını iyileştirdiği; ancak izooktan ve % 95'lik etanole geçişte bu şekilde bir azaltıcı etki göstermediği belirlenmiştir. Bu nedenle; nanokil ilavesinin ambalaj yapısındaki katkı maddelerinin gıdaya migrasyonunu etkileyip etkilemeyeceğinin, gıda benzeri ve polimer arasındaki afiniteye bağlı olduğu sonucuna varılmıştır. Lajarrige ve ark. (299) biyo-yıkılabilir polimerler ile gerçekleştirdikleri benzer bir çalışmada; nanokil ilavesinin diğer katkı maddelerinin gıdaya geçişi üzerinde migrant ve gıda benzerinin doğasına göre değişken şekilde etki yapabildiğini göstermişlerdir. Araştırmacılar, elde edilen sınırlı veriler ışığında, nanokil ilavesinin düşük molekül ağırlıklı katkı maddelerinin difüzyon katsayısı üzerine etkisini tanımlayacak kurallar geliştirmenin mümkün olmayacağını belirtmişlerdir. Bir başka çalışmada da; LDPE polimere nanokil ilavesinin polimerden Irganox 1010 isimli katkı maddesinin salımını azalttığı ve nanokilin nanosilika ile birlikte kullanımında bu etkide artış olduğu gösterilmiştir (300). Chaudry ve ark. (295)'nin 2008 tarihli çalışmasında ise, nanokil içeriğinin nano olmayan parçacıkların gıdaya geçişi üzerinde herhangi bir etki meydana getirmediği saptanmıştır.

Iglesias ve ark. (279) tarafından buğday gluteni ve MMT içerikli biyoyıkılabilir film üzerinde su, % 3 asetik asit, % 15 etanol, zeytinyağı ve katı gıda benzerleri (agar ve modifiye polipropilen oksit) kullanılarak 10 gün süreyle ve 40°C'de gerçekleştirilen migrasyon testleri sonucunda; nanokil migrasyonunu gösteren alüminyum ve silikon miktarları birbiri ile orantısız bulunmuştur. Distile su örneğinde nanokil migrasyon belirteci olarak alüminyum yerine silikonun kullanılması durumunda 12 kat fazla migrasyon ölçülmüş olacağı belirtilmiştir. Bu durumun, nanoparçacıkların gıdaya geçmeden önce gıda benzerine bağlı olarak uğrayacağı iyon değişiminden veya nanokompozit hazırlanırken uygulanan yüksek basınca bağlı yapısal değişikliklerden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür. Başka bir çalışmada ise yüksek basınç uygulanmasının MMT yapısını değiştirdiği doğrulanmış ve yüksek basınçlı işlemlerden geçirilecek MMT içerikli nanokompozitlere ilişkin toksisite çalışmalarında bu durumun göz önünde bulundurularak duruma özel değerlendirme yapılması önerilmiştir (301).

Nanokompozitlerden gıdaya nanokil geçişinin yanı sıra; nanoparçacık ilavesinin toplam migrasyon ve polimer yıkımına etkisi de araştırılmıştır. Di Maio ve ark. (271), Cloisite 30B içeren PLA nanokompozit filmlerden gıdaya toplam migrasyon miktarı ve PLA (laktik asit monomer dimer ve trimerlerinin) geçişi üzerinde nanokil dolgu kullanılması ve dolgu konsantrasyonunun etkisini incelemiştir. Deneyle farklı konsantrasyonlarda (% 3 ve % 6) kil içeren ve kil içermeyen PLA filmler üzerinde, % 3 asetik asit ve % 50 etanol kullanılarak 40°C ve 10 günlük temas sürelerinde gerçekleştirilmiştir. Deney sonucunda nanokil dolgu uygulamasının PLA filmlerden toplam migrasyonu ölçülebilir düzeyde arttırmadığı ve her koşulda toplam migrasyonun AB tarafından belirlenen sınırın altında kaldığı saptanmıştır. Laktik asit spesifik migrasyonu incelendiğinde ise yalnızca % 6 nanokil içeren filmde % 50 etanol çözeltilisine geçişte önemli artış gerçekleştiği; bu değer de yine spesifik migrasyon limitinin altında kaldığı ve zaman ile migrasyonun arttığı bildirilmiştir. Bu durum, nanokil dolgu varlığının polimerik matriks yapısının tekdüzeliğini bozarak gıda benzerinin matrikse girişini arttırmasına bağlanmıştır. Benzer bir başka çalışmada ise iki PLA tabaka arasına Cloisite 30B katkılı nanokompozit PLA tabaka sıkıştırılarak üretilen filmde polimerde şişme etkisi yaratan % 50 etanol gıda benzeri kullanılarak gıdaya laktik asit geçişi değerlendirilmiş ve yine nanokompozit yapı tabaka içeren

örneklerde gıdaya laktik asit geçişinin zamana göre artış eğilimi gösterdiği belirlenmiştir. Bu durumun nedenlerinin nanokompozit üretiminde kullanılan eritme işlemi esnasında PLA molekül ağırlığının azalması, etanolün polimerde yarattığı şişme veya nanokilin PLA hidrolizini katalize etme özelliği olabileceği belirtilmiştir (294). Marinoni ve ark. (286)'nın 2018 tarihli çalışmasında da nanokilin polimer yapısına eklenmesi işlemlerinin, polimer yapısını bozarak migrasyonu arttırabileceği belirtilmiştir.

Dardmeh ve ark. (302), modifiye MMT (Cloisite 15A) içeren PET yapılı filmlerden ayran örneğine migrasyonu değerlendirdikleri bir çalışmada, gıda benzeri olarak kullanılan % 3'lük asetik asite çeşitli sıcaklık ve sürelerde tetraftalik asit (TPA) migrasyonunu incelemişler ve migrasyonun, AB tarafından belirlenen 7,5 mg/kg sınırının altında kaldığını saptamışlardır. Çalışmada, nanokil ilavesiz polimer ile karşılaştırıldığında TPA migrasyonunun, % 3 oranında nanokil ilavesi ile azaldığı ancak % 5 oranında nanokil kullanımında, yapıda meydana gelen bozulma nedeniyle arttığı sonucuna varmışlardır.

Migrasyon çalışmalarının genelinin MMT üzerinde yoğunlaştığı görülmekle birlikte; az miktarda da olsa diğer nanokillerin değerlendirildiği çalışmalar da bulunmaktadır. Bott ve ark. (303), laponit içeren LDPE filmler üzerinde gıda benzeri olarak laponit kararlılığını sağlayabilmek için seçilen sürfaktan çözeltisi ile gerçekleştirdikleri migrasyon çalışmasında 22 µg/kg gıda olan ölçüm sınırının altında migrasyon belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda; 1 nm kadar az bir kalınlığa sahip olan ve en küçük kil çeşitlerinden olan laponitin migrasyonunun gözlenmemesinden yola çıkılarak, polimer içine iyi şekilde hapsedildiği durumlarda daha büyük kil çeşitlerinin migrasyonunun da olası olmayacağı düşünülmüştür.

“Anyonik killer” olarak da bilinen katmanlı çift hidroksitler (*Layered Double Hydroxides*, LDH) laboratuvar ortamında sentezlendiği için, doğal killerde bulunabilen eser element miktarı bu yapılarda kontrol altında tutulabilir ve LDH'lerin nanokompozitlerde dolgu maddesi olarak kullanımı son yıllarda ilgi çekmektedir. Mg-Al katmanlı ve laurat ile modifiye edilmiş LDH içeren polilaktit nanokompozit filmlerden gıdaya LDH, kalay, PLA oligomerleri ve laurat geçişi Schmidt ve ark. (304) tarafından incelenmiştir. Çalışmaya konu film örnekleri gıda benzeri olarak kullanılan

% 95 etanol ve % 1 su örnekleri içerisinde tamamen batırılarak 40°C’de 10 gün süreyle birbirleriyle temas etmeleri sağlanmıştır. Gıda benzerinde bulunan ve LDH kaynaklı olduğu düşünülen magnezyumun ICP-MS yöntemi ile ölçümü yoluyla polimerdeki konsantrasyonla orantılı olarak artan miktarda LDH migrasyonu gerçekleştiği gösterilmiş, gıda benzerine geçen parçacıkların 50 nm boyutunda olduğu TEM ile belirlenmiştir. Bu boyutta parçacıkların gıdaya geçişi, Simon ve Bott’un teorilerine uymamaktadır (58, 146). Çalışmada gıda benzerine laurat geçişinin çok düşük miktarlarda olduğu belirlenmiş ve bu durum, laurat anyonlarının LDH katmanları içerisinde iyonik kuvvetlerle sıkı biçimde tutunmasına bağlanmıştır. Ayrıca, gıda benzerine PLA oligomerleri ve PLA üretimi sırasında kullanılan organokalay katalizörlerinden kaynaklanan kalay geçişi saptanmıştır (304).

Demirle modifiye edilmiş bentonitin oksijen tutucu etki sağlaması amacıyla poliolefin gıda ambalajlarında kullanımının güvenliliği EFSA tarafından incelenmiştir. Komisyon, demir, bor ve alüminyum iyonlarının gıdaya geçişinin toksikolojik açıdan önemli olduğunu ifade ederek % 3 asetik asit ile yapılan migrasyon testi sonuçlarına göre değerlendirmelerde bulunmuştur. Değerlendirme raporunda, demir ve bor için belirlenen migrasyon değerlerinin bu maddeler için EU 10/2011 düzenlemesiyle belirlenen spesifik migrasyon sınırlarının altında olduğu; alüminyum migrasyonunun ise EFSA-AFC Paneli tarafından belirlenen kabul edilebilir haftalık alım miktarının (*the tolerable weekly intake*, TWI) altında olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak; demirle modifiye edilmiş bentonitin % 3 (a/a) konsantrasyonda gıdayla doğrudan temas edebilecek biçimde, daha yüksek konsantrasyonlarda ise arada koruyucu bir bariyer tabaka bulunması şartıyla kullanımının risk teşkil etmediği sonucuna varmıştır (305). Busololo ve ark. (306) da 2012 yılında demirle modifiye edilmiş kaolinit içeren HDPE filmlerden gıdaya geçişi, su ve izooktan kullanarak incelemiştir. Araştırmacılar, gıda benzerlerinde ölçülen demir ve alüminyum miktarlarının ihmal edilebilir düzeyde olduğunu bildirmiştir (306).

Nanokil içeren gıda ambalajlarının çeşitli etkenlerle yıpranması sonucunda bu durumun gıdaya geçişi ne şekilde etkileyeceği de önem taşımaktadır. Han ve ark. (307)’nin 2018 tarihinde gerçekleştirdiği bir çalışmada; UV ve ozon ile yıpratılan Cloisite 20A içeren LDPE yapısındaki nanokompozit filmlerin ses dalgası uygulanarak suya maruz bırakılmaları sonucunda nanokil salımının gerçekleştiği

belirlenmiştir. Bu çalışma ile polimere nanokil eklenmesinin, polimerin kararlılığını, engelleyici işlevini ve termal özelliklerini iyileştirdiği; ancak LDPE'nin UV maruziyetine bağlı oksidasyonunu ise hızlandırdığı gösterilmiştir. Bu durumun, nanokil içeriğindeki mineral oksit iyonlarının foto oksidasyonu kolaylaştırması nedeniyle meydana gelmiş olabileceği ileri sürülmüştür (307).

Nanokil içeren ambalaj malzemelerine ilişkin çalışmalar incelendiğinde, özellikle gerçek gıdaya geçişin değerlendirildiği çalışma sayısı oldukça azdır. Erişilen dört adet çalışmanın sonuçları aşağıda özetlenmiştir:

Avella ve ark. (42)'nin gerçekleştirdiği bir çalışmada; patates nişastasından üretilmiş ve MMT katkılı nanokompozit filmlerden ıspanak ve lahana örneklerine olası NP geçişi ölçülmüştür. Çalışma sonucunda doğrudan nanoparçacık migrasyonu ölçülmemiş olmasına rağmen, nanokompozit filmler ile temas eden gıdalarda standart nişasta filmlerdeki ile karşılaştırıldığında daha yüksek düzeyde silisyum saptanmıştır. Silisyum konsantrasyonunda artış olması, kil içeriğinde bulunan silisyum ile ilişkilendirilmiştir. Bu bulgu, gıdaya bir miktar kil geçişi olduğunu göstermektedir. Aynı çalışma kapsamında vakumla kurutulmuş veya kurutulmamış nanokompozit film örnekleri ile gerçekleştirilen incelemede ise kurutulmuş filmlerde Avrupa Birliği düzenlemeleriyle belirlenen 60 mg/kg toplam migrasyon sınırının aşılmadığı belirlenmiştir (42).

Antioksidan etkili alfa tokoferol ve modifiye MMT içeren çitosan bazlı filmlerin somon balığı ile teması sonucunda olası migrasyonun incelendiği bir çalışmada (308), değişik konsantrasyonlarda alfa tokoferol ve MMT-15A içeren çitosan filmlere sarılan somon balığı örnekleri 8 gün süre ile 4°C'de saklanmış ve bütün örneklerde nanokil migrasyonunu gösteren silisyum ve magnezyum miktarı ölçülmüştür. Nanokil katkılı filmlerle temas eden örneklerde silisyum miktarında önemli bir yükseklik belirlenmemiş, magnezyum miktarında ise önemli düzeyde artış olduğu gösterilmiştir. Avella ve ark. (42)'nin üstte sözü edilen çalışmasında nanokompozit ambalaj malzemesiyle temas eden sebzelerde önemli düzeylerde silisyum saptanmış; ancak magnezyum ve demir düzeylerinde önemli bir artış olmadığı belirlenmiştir. Dias ve ark. (308), mineral ölçümlerindeki bu uyumsuzluğun,

çalışmalarda kullanılan gıda maddelerinin özellikleri ile ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir.

Karides örnekleri kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada (309), değişik konsantrasyonlarda nanokil ve nanogümüş içeren LDPE filmlere 6 gün süreyle maruz bırakılan örneklerde silisyum ve alüminyum varlığı ICP-MS yöntemi ile ölçülmüş, ancak sonuçta herhangi bir geçiş olmadığı saptanmıştır.

Gerçek gıda örnekleri ile gerçekleştirilen farklı bir çalışmada; MMT ve karanfil yağı içeren soya proteini izolatu esaslı nanokompozit filmler ile ambalajlanmış orkinos balığı filetosu örnekleri, 2°C'de 17 gün süreyle buzdolabında saklanmıştır. Balık örneklerine nanokil geçişinin incelendiği bu çalışmada, temas süresi sonunda gıda örneklerinde silisyum ve alüminyum miktarlarında önemli bir artış olmadığı saptanmıştır. Bu sonuç, geliştirilen nanokompozit filmin kullanımı açısından teşvik edici bulunmuştur. Bu çalışmada ayrıca, ambalaj materyaline esansiyel yağ eklenmesinin silisyum migrasyonunu hafifçe azalttığı da belirtilmiştir (52).

#### **4.1.6. Nanokillerin Toksikolojik Açıdan İncelenmesi**

##### ***Nanokillerin Toksikokinetik Özellikleri***

Nanokillerin toksik etkilerinin incelenmesi amacıyla çeşitli *in vivo* çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda, nanokillerin absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve eliminasyonları araştırılmıştır.

Nanokillerin içerdiği elementlerin farelerin organlarındaki dağılımlarının ölçüldüğü Mascolo ve ark. (310) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, farelere 3 gün süreyle oral yolla 450 mg/kg dozda üç çeşit kil uygulanmıştır. Uygulama sonrasında farelerin organlarında arsenik, kadmiyum, civa gibi çeşitli elementlerin miktarları ölçülmüş ve böbrek, karaciğer, kalp ve beyinde bu elementlerin bulunduğu belirlenmiştir. Araştırmacıların eski tarihli bir başka çalışmasında da oral yolla kil uygulanan farelerin idrarlarında kil kaynaklı toksik elementlerin (arsenik ve kadmiyum gibi) saptanmış olduğu belirtilmiştir (311).

Oral yolla besin miktarının % 2'si oranında MMT uygulanan gebe sıçanlar üzerinde gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise; gebeliğin 16. gününde gebe

hayvanlar ve embriyolarında alüminyum, demir, seryum gibi çeşitli metallerin miktar ve kinetiği değerlendirilmiştir. Nötron aktivasyon analizi yöntemi kullanılarak çeşitli organlarda yapılan ölçümler sonucunda; kil uygulanan farelerin beyinlerinde rubidyum miktarında anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiş, bu element dışında herhangi bir elementin miktarlarında önemli bir değişiklik bildirilmemiştir. İncelenen dokuların hiçbirisinde veya embriyolarda kontrol grubundakine göre önemli düzeyde yüksek alüminyum elementi belirlenmemiştir. Çalışma kapsamında, beyin dokusunda ölçüm sınırı daha düşük olan ICP-MS yöntemiyle yapılan ölçümlerde de alüminyum saptanmamıştır (312).

Baek ve ark. (313)'nın 2012 yılında gerçekleştirdiği bir çalışmada; oral yolla değişik dozlarda MMT uygulanan farelerde plazma ve çeşitli organlardaki alüminyum konsantrasyonları indüktif eşleşmiş plazma atomik emisyon spektroskopisi (*Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometer, ICP-AES*) yöntemiyle ölçülmüş, alüminyum yarılanma ömrü ve maksimum konsantrasyon ve benzeri biyoyararlanım parametreleri hesaplanmıştır. Hayvanlara alüminyum uygulaması sonrası iki saat içerisinde emilim ve emilim sonrasında plazma konsantrasyonunda hızlı bir düşüş görülürken; uygulamadan sekiz saat sonra yapılan ölçümlerde spesifik bir organda birikme gözlenmemiştir.

Oral yolla LDH ve MMT uygulanan fareler ile yapılan bir çalışmada bu maddelerin kan plazma konsantrasyonları ölçülmüştür (314). LDH ve MMT uygulanan farelerde kan plazma konsantrasyonları ölçülmüştür. LDH'nin oldukça düşük oranda absorbe edildiği ve vücuttan 4 saat içerisinde atıldığı; MMT'nin ise uygulanan doza bağlı olarak en yüksek doz olan 1000 mg/kg dozda 1 saate kadar maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşabildiği ve 2 saat içerisinde vücuttan atıldığı belirlenmiştir. İncelenen organlarda magnezyum ve alüminyum düzeyleri ICP-OES ile ölçülmüş ve herhangi bir organda birikim olmadığı bildirilmiştir. LDH'nin büyük kısmının feçes ile; çok az kısmının ise, büyük olasılıkla metabolizasyona uğradıktan sonra, idrar ile atıldığı belirlenmiştir. Çalışmada 50 ve 100 nm boyutlarındaki LDH'nin hücre içi hareketleri de floresan boya ile işaretlenerek incelenmiştir. LDH parçacıklarının uygulamadan sonra yarım saat kadar kısa bir sürede hücre içerisine girebildiği ve 24 saat kadar hücre içerisinde kaldığı; ancak hücre çekirdeğine ulaşmadığı belirlenmiştir (314).

Magana ve ark. (315) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, polistirenle modifiye edilmiş ve edilmemiş haloysit kile oral ve inhalasyon yoluyla tek doz (1 mg/kg, 2,5 mg/kg ve 5 mg/kg) maruz bırakılan farelerde böbrek ve akciğerlerde alüminyum birikimi olduğu bildirilmiştir. Bir başka çalışmada ise; farelere 30 gün süreyle intragastrik yolla alüminyum ve silisyum içeren haloysit nanotüp uygulanması sonucunda ana hedef organın akciğer olduğu ve bu malzemenin akciğerde biriktiği belirlenmiştir. Çalışmada, akciğerde belirlenen alüminyum miktarının, silisyuma göre daha fazla olduğu belirtilmiş ve bu durum, çözünme eğilimi daha fazla olan silisyumun akciğerden tekrar sistemik dolaşıma geçmesine bağlanmıştır (316).

Oral yolla ve 24 saat aralıklarla iki kez Cloisite 30B uygulanan sıçanlar ile gerçekleştirilen bir çalışmada (317), hayvanların karaciğer, böbrek ve feçeslerinde ICP-MS ile alüminyum düzeyleri ölçülmüş ve sadece feçes örneklerinde alüminyum saptanmıştır. Bu durum, hayvanlarda Cloisite 30B'nin oral yolla uygulanması sonucunda sistemik maruziyet oluşmadığı şeklinde yorumlanmıştır. Ancak; araştırmacılar aynı çalışmada yüksek konsantrasyonda Cloisite 30B uygulanan sıçanların organlarında HPLC kullanarak yaptıkları analizde, kilin modifikasyonunda kullanılan 3 farklı kuaterner amonyum analogu belirlemişlerdir.

### ***Nanokillerin Toksik Etkilerine İlişkin Çalışmalar***

Nanokillerin toksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar yapılmıştır. Aşağıda bu çalışmalara ait bazı örneklere yer verilmiştir:

Cloisite 20 A ve yeni geliştirilmiş iki kil ile gerçekleştirilen bir çalışmada Caco-2 ve HepG2 hücre kültürleri, 24 ve 48 saat süre ile kil örneklerine maruz bırakılmıştır. Kullanılan iki yeni kilden Kil-1, hekzadesil trimetil amonyum bromür (HDTA) ile modifiye edilmiş; Kil-2 ise hem HDTA hem de asetilkolin klorit (ACO) ile modifiye edilmiş Cloisite yapısındadır. Çalışma sonucunda, Kil-2'nin sitotoksik ve genotoksik etkiler meydana getirdiği ve GSH düzeyinde azalmaya yol açtığı belirlenmiştir. Çalışma sonucunda araştırmacılar, değişik hücre türlerinin sitotoksikite ve oksidatif strese duyarlılıklarının farklı olduğunu; kil türü ve konsantrasyonun toksisite üzerinde belirleyici olduğunu belirtmişlerdir (318).

Modifiye edici maddelerin toksik etkilerinin incelendiği bir çalışmada; modifiye edilmemiş ve farklı maddelerle modifiye edilmiş üç MMT çeşidinin küçük ve büyük boyutlu serileri kullanarak çeşitli hücre kültürleri üzerinde hücre canlılığı ve nanoparçacıkların hücre içerisine alımı incelenmiştir (319). Modifiye edilmiş killerde IC<sub>50</sub> değerinin modifiye edilmemiş kile göre daha düşük olduğu, modifiye edilmemiş kilin toksitesinde apoptozun rol oynadığı, toksisitenin modifiye edici maddeye göre değişiklik gösterdiği, toksisite açısından aynı kilin parçacık boyutunun önemli farklılık yaratmadığı ve toksik etkilerin modifiye edici maddenin üretim aşamalarından kalan fazla kısmının yıkamayla uzaklaştırılarak azaltılabileceği bildirilmiştir. Çalışmada ayrıca; incelenen killerin modifiye edilmemiş MMT’de daha etkin olmak üzere, hücre içine alındığı gösterilmiştir (319).

Li ve ark. (320), MMT’den ayrıştırılan nanosilikat plaklarının genotoksik etkilerini fare yumurtalık hücrelerinde mikronükleus testi, comet testi ve gen mutasyon testi ile; sitotoksitesini ise MTT ve laktat dehidrojenaz testi ile incelemişlerdir. Yapılan testlerde genotoksik etki saptanmamış; fare yumurtalık hücrelerinde 1000 µg/ml konsantrasyon düzeyinde 12 saatlik inkübasyon ile hafif sitotoksisite ve 24 saatlik inkübasyon ile doza bağımlı sitotoksik etki gözlenmiştir. Fareler ile gerçekleştirilen 14 günlük oral toksisite çalışmasında ise, 5700 mg/kg konsantrasyonda dahi ölüm gözlenmemiş ve araştırmacılar sonuçları, test edilen nanosilikat plaklarının biyomedikal uygulamalar açısından güvenli olduğu şeklinde yorumlamışlardır.

Polistirenle modifiye edilmiş ve modifiye edilmemiş haloysit nanokilin makrofaj hücreleri üzerindeki etkilerinin incelendiği bir başka çalışmada; inkübasyon sonrasında sitotoksisite meydana gelmediği, yalnızca en yüksek dozda hafif proenflamatuar sitokin artışı ve bunun ardından da anti-enflamatuar yanıt oluştuğu belirlenmiştir (321). Deney sonucunda haloysit üzerine uygulanan modifikasyonun toksisiteyi azalttığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada, test edilen maddelere oral yolla veya hem oral hem parenteral yolla akut (24 saat) ve 30 günlük maruziyet sonrasında farelerin genel sağlık durumuna ilişkin vücut ağırlığı, vücut sıcaklığı, tüylerin sağlıklı olup olmadığı vb. belirteçler değerlendirilmiş ve herhangi bir değişiklik saptanmamıştır. Araştırmacılar, uygulanan maddelerin karaciğer ve böbrekler üzerine etkilerini

izlemek amacıyla inceledikleri ALT, AST, kreatinin, üre bilirubin ve toplam protein değerlerinin tamamının normal aralıkta olduğunu bildirmişlerdir (321).

Oral yolla uygulanan haloysit nanotüplerin akciğere ulaşabildiği ve geniş yüzey alanına sahip maddelere karşı en hassas organ olması nedeniyle akciğerin bu maddelerin ana hedef organı olduğu bildirilmiştir (316). Verma ve ark. (322)'nin 2012 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada da floresan rodamin boyasıyla işaretlenen Cloisite Na'nın insan akciğer epitel hücreleri (A549) içine alındığı, hücre çekirdeği etrafında yoğunlaştığı; ancak çekirdek içerisine girmediği gösterilmiştir. Bu çalışma ile nanokil parçacıklarının akciğer epitel hücreleri içerisine girebilecek özellikte olduğu kanıtlanmıştır. Aynı çalışmada farklı nanokillerin sitotoksik etkileri incelenerek sitotoksitenin, parçacıkların spesifik yüzey alanı ile orantılı ve doza bağımlı olduğu ve tabakalı yapıdaki nanokillerin tübüler yapıdakilerden daha sitotoksik olduğu sonucuna varılmıştır.

Wagner ve ark. (323), organomodifiye nanokompozitlere üretimlerinden (üretim aşamalarında görev alan işçilerde), imhalarına (ısıl yıkım sonucu atmosfere salınan maddeler nedeniyle) kadar geçen yaşam döngüleri boyunca solunum yoluyla maruziyetin söz konusu olabileceğinden yola çıkarak; hem işlem görmemiş hem organomodifiye nanokil içeren nanokompozitlerin toksisitelerini iki farklı çalışma ile araştırmışlardır. İşlem görmemiş veya farklı maddelerle modifiye edilmiş kil nanokompozitlerin ısıl yıkım öncesindeki durumları ve ısıl yıkım ürünleri ile; bronş epitel hücreleri (BEAS-2B) ve küçük hava yolu epitel hücreleri (SAEC hücreleri) üzerindeki toksisite deneyleri (minimum inhibitör konsantrasyon belirlenmesi, hücre morfolojisinin incelenmesi ve reaktif oksijen türlerinin ölçümü) gerçekleştirilmiştir. Deneyler sonucunda ısıl yıkım ürünlerinin ana nanokillere göre daha az, organomodifiye olanların ise işlem görmemiş nanokillere göre daha yüksek toksisite gösterdiği, toksisitenin ise kullanılan modifiye ediciye göre değiştiği belirlenmiştir. Farklı kimyasal maddelerle modifiye edilmiş nanokillerin toksisitelerindeki farklılık, modifiye edicilerden gelen farklı işlevsel gruplara (hidroksil, amin gibi); ısıl yıkım ürünlerinin daha az toksik olması ise ısı uygulaması ile modifiye edici maddelerin, demirin ve silanol gruplarının kaybedilmesi ve platelet yapısının bozulmasına bağlanmıştır. İşlem görmemiş ve modifiye edilmiş kil içeren nanokompozitler ve bunların ısıl yıkıma uğramış şekillerinin insan akciğer epitel hücreleri üzerindeki

toksisitelerinin değerlendirildiği bir diğer çalışmada da; benzer şekilde nanokillerin (modifiye kilde daha yüksek olmak üzere) sitotoksik etki gösterdiği, ısıl yıkım ile toksisitenin azaldığı belirlenmiştir (324). Yukarıda belirtilen iki çalışma, akciğer hücre kültürleri üzerinde gerçekleştirilmiş olmakla birlikte; hem nanokil toksisitesi üzerinde modifiye edici maddelerin etkisini vurgulaması hem de gıda ambalajı olarak kullanılan nanokompozitlerin üretim aşamaları ve ısı ile imhası durumlarında solunum yoluyla maruziyetin yaratabileceği riskler açısından önemlidir.

Nanokillerin farklı maddelerle modifiye edilmesi ile oluşturulan farklı kil çeşitlerinin (Kil-1 ve Kil-2) farklı sitotoksik etki meydana getirdiği Jorda-Beneyto ve ark. (325) tarafından da bildirilmiştir. Araştırmacılar, Caco2 ve HepG2 hücre kültürleri üzerinde iki çeşit organomodifiye MMT ile 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrasında nötral kırmızı testi ile lizozomal sitotoksisiteyi değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda birinci kil örneği uygulanan Caco-2 hücrelerinde sitotoksik etki gözlenmezken; çalışılan en yüksek konsantrasyon ile HepG2 hücrelerinde önemli düzeyde toksik etki meydana geldiği saptanmıştır. İkinci kil örneği ise her iki hücre tipinde de daha yüksek toksisite meydana getirmiştir. İki kil türünden yalnızca Kil-2 için  $EC_{50}$  değeri saptanabilmiş ve Kil 2 için hesaplanan  $EC_{50}$  değerlerine göre ise Caco 2 hücrelerinin HEPG2 hücrelerine göre toksisiteye daha duyarlı olduğu belirtilmiştir. Bu bulgu, intestinal ve hepatik hücre kültürlerinin toksisiteye duyarlılıkları açısından Maisanaba ve ark. (326)'nın 2013 tarihli çalışmalarında elde edilen bulgular ile uyumludur.

Gıda ambalajlarında doğal silanla modifiye edilmiş doğal silikatların kullanımına AB düzenlemeleri ile izin verilmiş olup bu durum, güvenlik açısından endişe vericidir (285). İki farklı silan (4 sübstitüentli silisyum) çeşidi ile modifiye edilmiş MMT bazlı killer (Kil-3 ve Kil-4) kullanılarak Caco-2 hücreleri üzerinde bir dizi toksisite çalışması gerçekleştirilmiştir. Araştırmaya konu iki kil çeşidinden sitotoksik etki meydana getiren bir tanesinin (Kil-4) toksisite yolaklarını aydınlatmak üzere gerçekleştirilen deneylerde, maruziyete bağlı hücre ölümünün hem apoptozis hem nekrozis ile gerçekleştiği, reaktif oksijen türleri oluşumunun zamana bağlı olarak önemli düzeyde arttığı, comet testinde ise DNA zincir kırıklarının gözlenmediği bildirilmiştir. Sitotoksik hasara yol açmadığı gösterilen ve migrasyon testinde AB düzenlemelerinin altında migrasyon tespit edilen modifiye kil (Kil-3), nanokompozit

gıda ambalajlarında kullanıma uygun olabilecek bir malzeme olarak değerlendirilmiştir (285).

Lordan ve ark. (327), Cloisite Na<sup>+</sup> ve bu kilin modifiye şekli olan Cloisite 93A ile Hep2G hücreleri üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmalarında; iki nanokilin de doza bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiğini, maruziyet sonucunda hücre ölümünün apoptoz değil, nekroz yoluyla meydana geldiğini, hücrelerde zar bütünlüğünde bozulma gerçekleştiğini, hücre içi reaktif oksijen türleri oluşumunun yalnızca modifiye olmamış Cloisite maruziyetiyle gerçekleştiğini belirlemiş ve ROT oluşumundaki farklı etkileri, araştırmaya konu kil çeşitlerinin topaklanma açısından farklı eğilimlerine bağlamışlardır (327).

Cloisite Na<sup>+</sup> (non-modifiye MMT) ve bu kilin modifiye şekli olan Cloisite 30B ile Caco-2 hücre kültürlerinde gerçekleştirilen bir çalışmada (328); çalışılan konsantrasyonlarda (1-1000 µg/ml) iki kilden sadece Cloisite 30B'nin önemli sitotoksikite meydana getirdiği belirlenmiştir. Cloisite 30B'ye 40 µg/ml konsantrasyonda maruziyetin, Caco-2 hücrelerinde ROT oluşumunu arttırdığı ve hücre içi GSH miktarını azalttığı; comet testi sonuçlarına göre ise genotoksikiteye yol açmadığı bildirilmiştir. Hücre kültürlerinin Cloisite 30B'ye maruziyeti sonucunda hücre içindeki yapısal değişiklikler incelendiğinde ise; mitokondride hasar, yağ damlacıklarının sayısında artış, golgi aygıtının kenarlarında genişleme ve çekirdek ayrılması (*nucleolar segregation*) gözlemlendiği bildirilmiştir. Aynı killer kullanılarak bu defa HepG2 hücre kültürleri ile gerçekleştirilen çalışmada, 1-500 µg/mL aralığındaki konsantrasyonlarda işlem görmemiş kil ile herhangi bir sitotoksik etki meydana gelmemiştir. Bu konsantrasyon aralığında sitotoksikite gözlenen Cloisite 30B için ise nötral kırmızı testi ile belirlenen EC<sub>50</sub> değeri (88 µg/ml) maksimum konsantrasyon olarak seçilerek mekanistik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Mekanistik çalışmalar sonucunda; ROT miktarında artış belirlenmemesine rağmen GSH miktarında, ROT süpürülmesine bağlı olabileceği değerlendirilen önemli düzeyde azalma gözlenmiştir. Comet testi ile 88 µg/ml konsantrasyonda 48 saat süreli maruziyet sonucunda önemli genotoksikite gözlenmiş, genotoksik hasarın, ROT miktarında değişme gözlenmemesi nedeniyle, oksidatif stres ile ilişkili olmadığı şeklinde yorumlanmıştır. Apoptoz ile ilişkili kaspaz-3/7 aktivitesinde ve enflamasyon ile ilişkili interlökin-6 miktarında ise artış meydana gelmemiştir. Hücrelerde gerçekleşen yapısal değişimlerden en önemli

olanlar; mitokondriyal hasar, hücrelerin iç zarlarında genişleme, heterofagozom oluşumu, otofaji ile ilişkilendirilen yağ damlaları ve çekirdekte yağ birikmeleri görülmüştür. Ayrıca; araştırmacılar tarafından hepatik hücre kültürünün toksisiteye duyarlılığının, intestinal hücre kültüründe görülen duyarlılıktan daha düşük olduğu bildirilmiştir (326).

Nanokillerin genotoksisite değerlendirmesi amacıyla mikronükleus testi uygulanarak ve toksisite mekanizması hakkında fikir verebilecek bazı genlerin ekspresyonu incelenerek toksisite mekanizması hakkında ayrıntılı bilgi sağlanması amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Maisanaba ve ark. (329), işlem görmemiş MMT'nin (Cloisite Na<sup>+</sup>) insan hepatoma hücreleri (HepG2) üzerindeki toksisitesini çok yönlü olarak araştırdıkları çalışmaları kapsamında; öncelikle sitotoksik olmayan iki konsantrasyonu, MTS testi ile belirlemiş ve ileri testlere bu konsantrasyonlar ile devam etmişlerdir. Genotoksisitenin ölçülmesini amaçlayan sitokinez engelli mikronükleus testi (CBMN) ile; çalışılan en yüksek konsantrasyonda (65 µg/ml) mikronükleus sayısında ve mikronükleus içeren hücrelerde önemli artış saptanırken, nükleoplasmik köprü ve çekirdek tomurcuk sayısında artış ve çekirdek bölünme indeksinde değişiklik gözlenmemiştir. CBMN testinin yanı sıra, metabolizma enzimleri ile ilişkili genlerin, DNA hasar yanıt genlerinin, orta/erken cevap genlerinin, apoptozdan sorumlu genlerin ve oksidatif stres ile ilişkili genlerin ekspresyonundaki değişiklikler incelenmiştir. Araştırmacılar, çalışma sonuçlarından yola çıkarak Cloisite Na'nın genotoksik etki potansiyeli taşıdığını belirtmiş, etki mekanizmasının aydınlatılması için daha fazla çalışma gerektiğini bildirmişlerdir (329). Benzer test yöntemlerinin gıda ambalajlarında kullanılması planlanan iki farklı organomodifiye kil üzerinde uygulandığı başka bir çalışmada, her iki kil için de CBMN testi sonucunda genotoksik etki gözlenmediği belirtilmiştir. Bununla birlikte, DNA hasar genleri ve apoptoz ilişkili gen ekspresyonlarında yine önemli değişiklikler gözlenmiştir (330). Farklı bir organomodifiye kil ile gerçekleştirilen benzer bir çalışmada da çalışmaya konu organomodifiye kilin CBMN testi sonuçlarına göre genotoksisite potansiyeline sahip bir madde olduğu, metabolizma ile ilişkili genler, erken yanıt sinyal genleri, DNA hasar yanıt genleri gibi çok çeşitli genlerin ifadesinde değişikliklere yol açtığı belirlenmiş; genotoksik hasar oluşturma potansiyeline rağmen apoptoz ile ilişkili genlerin ifadesinde değişikliğe yol açmaması ise karsinojenik etkiye neden

olabileceğini düşündürmüştür (331). Farklı bir çalışmada ise gıda ambalajında kullanılmaya aday iki farklı organomodifiye kilden oluşturulan PLA bazlı polimerlerin suya geçişi değerlendirilmiş ve migrasyon çözeltilsinin Caco2 ve HepG2 hücreleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkileri incelenmiştir. Çalışma sonucunda her iki kil ve iki hücre tipinde önemli sitotoksik etki saptanmamış olup; Ames testi sonuçları da test edilen killerin genotoksisiteye yol açmadığını göstermiştir (272).

Sharma ve ark., modifiye olmamış (Cloisite Na<sup>+</sup>) ve organomodifiye kilin (Cloisite 30B) Caco-2 hücre kültürleri üzerindeki genotoksik etkilerini inceledikleri çalışmalarında; kil çözeltilerini hücelere hem doğrudan hem de çözeltiyi 0,2 µm'lik filtreden geçirerek uygulamışlardır. İşlem görmemiş kilin Salmonella/mikrozom testi ve comet testi sonuçlarına göre genotoksisiteye neden olmadığı; organomodifiye kilin ise Salmonella/mikrozom testinde negatif, comet testinde ise pozitif sonuç verdiği bildirilmiştir. Cloisite 30 B ile gerçekleştirilen comet testinde filtreden geçirilmiş ve içeriğinde nanokil bulunmadığı ICP-MS analizi ile doğrulanmış örneğin de benzer şekilde genotoksisiteye neden olması, organomodifiye kilin genotoksisitesinde modifikasyonda kullanılan kuaterner amonyum tuzunun rolü olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Ayrıca, yapılan çalışmalarda ROT düzeyinde artış gözlenmemesi de genotoksisitenin ROT kaynaklı olmadığını düşündürmüştür (332). Cloisite 30B'nin genotoksik etkilerinin *in vivo* deneyler ile değerlendirildiği bir çalışmada ise 24 saat aralıklarla oral yolla iki kez ve değişen konsantrasyonlarda Cloisite 30B uygulanan sıçanların kolon, karaciğer ve böbrek hücrelerinde DNA zincir kırığı olmadığı comet testi ile belirlenmiş; ayrıca kan örneklerinde enflamatuar sitokin miktarlarında önemli bir değişiklik saptanmamıştır (317).

Baek ve ark. (313) tarafından bağırsak hücre kültürleri (INT-407) ile yapılan bir çalışmada; 10 güne kadar MMT maruziyeti sonrasında hücre bölünmesi, koloni oluşturma kapasitesi, zar hasarı ve ROT düzeylerinin ölçülmesini içeren incelemeler yapılmıştır. Sitotoksisitenin belirlenmesi amacıyla yapılan 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum (WST) analizi sonuçlarına göre 24, 48 ve 72 saatlik maruziyette doz ve süreye bağlı şekilde hücre proliferasyonunda azalma belirlenmiştir. En düşük dozda dahi 10 gün süreli maruziyet sonrasında koloni oluşturma kapasitesinde azalma, 48 saat ve sonrasında zar hasarı, 50 µg/mL üzeri konsantrasyonlarda ROT artışı tespit edilmiştir. Ancak; 24 saatlik uygulamada 500

$\mu\text{g/mL}$  dozda dahi hücre zarı hasarı veya ROT oluşumu gözlenmemiştir. Sonuçlar araştırmacılar tarafından, sitotoksitenin nanoparçacıkların genelde davrandığı şekilde plazma zarından geçerek değil, mikroparçacık boyutunda hücre yüzeyini kaplayarak gerçekleştirildiği; akut hücre ölümünden daha çok hücre proliferasyonunu önleme şeklinde ortaya çıktığı şeklinde yorumlanmıştır. Araştırma kapsamında yürütülen oral toksisite çalışmasında 1000 mg/kg'a kadar MMT uygulamasına bağlı olarak vücut ağırlığı değişimi, anormal davranış veya farklı belirtiler görülmemiş ve incelenen kilin 1000 mg/kg dozuna kadar toksik olmadığı sonucuna varılmıştır. INT-407 intestinal hücreleri ve A549 akciğer epitel hücrelerinde gerçekleştirilen benzer bir çalışmada ise, LDH ve MMT'nin hücre proliferasyonunu azalttığı ve ROT miktarını arttırdığı ve LDH'nin nanoparçacık boyutuna bağlı olarak enflamatuvar sitokin salımına yol açtığı belirlenmiştir (314).

Isoda ve ark. (333)'nin gerçekleştirdiği bir çalışmada, farelere intravenöz yolla nanokil uygulanmasından 24 saat sonra ALT ve AST ölçümü ile karaciğer hasarı, kan-üre azotu (BUN) ölçümü ile böbrek hasarı ve histopatolojik incelemelerle akciğer hasarı değerlendirilmiştir. 10 mg/kg ve 20 mg/kg konsantrasyonda nanokil uygulanması sonucunda farelerde karaciğer ve akciğer dokusunda hasar gözlenirken böbrek hasarı saptanmamıştır.

Bir diğer çalışmada; hayvan yemlerinde topaklanmayı önleyici olarak kullanılan MMT içerikli nanokil yapısındaki bir ürüne 28 haftalık oral maruziyetin fareler üzerindeki etkisi incelenmiştir. MMT maruziyeti, 28 haftanın sonunda toplam gıda alımında, vücut ağırlığında, hematolojik ve serum biyokimyasına ilişkin parametrelerde ve kanda ölçülen belirli mikroblesinlerin miktarında değişikliğe yol açmamıştır. Ayrıca; organ ağırlıkları veya büyüklüklerinde bir değişiklik veya histopatoloji tespit edilmemiştir (334).

Sıçanlar üzerinde MMT'nin toksisitesinin, 72 saatlik toksisite testi ile değerlendirildiği bir çalışmada (335) hayvanlara, 70 kg'lık bir insanın günlük 100 mg MMT'ye maruz kalacağı varsayılarak bunun 100 katına karşılık gelecek konsantrasyonda MMT oral yolla uygulanmıştır. Uygulama sonrasında kanda hemoglobin, hematokrit ve kırmızı kan hücresi düzeylerinde artış olduğu belirlenmiştir. Plazmada sodyum ve klor iyonlarında azalma görülürken, plazma

kalsiyum düzeyinde çok ciddi düzeyde düşüş olduğu bildirilmiştir. Bu bulgu, kalsiyum ve sodyum iyonların MMT tarafından tutulması olasılığı ile ilişkilendirilmiştir. Çalışma sonucunda; yüksek doz MMT'nin toksik olmadığı sonucuna varılmıştır.

Organomodifiye MMT'nin oral toksisitesinin incelendiği bir başka çalışmada; organomodifiye MMT'ye 90 gün süreyle maruz kalan farelerde böbrek ve karaciğer dokularında antioksidan enzim düzeylerinin (katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon-S-transferaz, glutatyon peroksidaz) ölçülmesi yoluyla bu kilin oksidatif strese neden olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışma sonucunda; böbrekte katalaz aktivitesinin ve gen ekspresyonunun artması dışında değişiklik gözlenmemiştir (336). Aynı organomodifiye kil ile sıçanlar üzerinde gerçekleştirilen 90 günlük *sub-kronik* toksisite çalışmasında ise; karaciğer, böbrek, dalak gibi organlarda herhangi bir histopatoloji veya biyokimyasal parametrelerden GSH/GSSG oranı ve IL-6 salımında herhangi bir değişim saptanmamıştır (337). Maisanaba ve ark. (338)'nin bir diğer çalışmasında ise; yine aynı organomodifiye kili % 4 oranında içeren PLA bazlı nanokompozit kullanılarak migrasyon çalışması yapılmış; elde edilen ekstrakt, 90 gün boyunca oral yolla sıçanlara uygulanmıştır. Çalışma sonucunda klinik biyokimyasal parametreler ile oksidatif stres ve enflamasyon belirteçlerinde herhangi bir değişiklik saptanmamıştır.

Ezkhova ve ark. (339)'nin bentonit ile sıçanlar üzerinde gerçekleştirdikleri bir oral toksisite çalışmasında; bentonitin 0,1 ve 0,2 g/kg konsantrasyonlarının güvenli olduğu, uygulanan 0,3 g/kg'da intoksikasyon belirtilerinin gözlenmeye başladığı, 0,5 g/kg ile ise sıçanların % 20'sinin hayatını kaybettiği bildirilmiştir. Elde edilen sonuçlar ile bentonit nanoparçacıklarının düşük toksisiteye sahip olduğu gösterilmiştir.

Oral yolla 28 gün boyunca haloysit nanotüp uygulanan fareler ile Wang ve ark. (316)'nin 2018 yılında gerçekleştirdikleri bir çalışmada farelerin akciğerlerinde oksidatif stres, enflamatuar yanıt ve fibrozis olduğu bildirilmiştir.

Bentonit maruziyetinin bağırsağın koruyucu tabakası üzerindeki etkileri sıçanlar üzerinde gerçekleştirilen 92 günlük *sub-akut* toksisite çalışması ile incelenmiştir. Deneyler sonucunda sıçanların ince bağırsaklarında intestinal mukus salgısının artmasına bağlı olarak enterositlerin fırça yapılı kenarlarında yoğun mukoz bir tabaka oluşması, protein emiliminin baskılanması ve villus yapısında immün

reaksiyon belirtilerinin eşlik ettiği bozulmalar gibi yapısal değişiklikler saptanmış; sıçanlarda vücut ağırlığında artış gözlenmiştir. Araştırmacılar; villus yapısında gözlenen değişikliklerin toksik enteropatiye, tübül salgı bezlerinde (*kript*) ve villuslarda hiperplaziye ve bunun sonucunda malabsorbsiyon sendromuna yol açabileceğini belirterek, gıda ambalajlarında kullanılan nanokillerin risk değerlendirmelerinin önem taşıdığını vurgulamışlardır (340).

#### **4.2. Gıda Ambalajlarında Nanoparçacık Kullanımına İlişkin Ülkemizde ve Dünyadaki Yasal Düzenlemeler**

Nanoparçacıkların gıdalarda kullanımına ilişkin bilgi eksikliği ve belirsizlikler, sağlık ve güvenlilik yönünden endişeler yaratmaktadır. Bu endişeler, iyi tanımlanmış düzenleme ve standartlar getirilmesi ile ortadan kaldırılabilir. Gıdalarda nanoteknoloji kullanımının güvenliliğine ilişkin endişelerin ortadan kaldırılması, tüketicinin nanoteknoloji ilişkili gıdaları kabulü açısından da önem taşıyan bir noktadır (87). Gıda sektöründe nanoteknoloji uygulanmasına ilişkin yasal düzenlemelerin getirilmesi, gıdalarda NP kullanımına yönelik sosyal güveni ve kabulü arttıracaktır (341). Tüketicilerin gıda sektöründe nanoteknoloji kullanımı hakkında yeterli bilgi sahibi olmadıkları, nanoteknoloji uygulanan gıdaları satın alma isteklerinin az olduğu ve ambalajlama yönünden kullanımının diğer gıda ilişkili kullanımlara oranla daha kabul edilebilir görüldüğüne ilişkin çalışmalar bulunmaktadır (342).

Tüm dünyada düzenlemeler yapılarak gıda endüstrisinde nanoteknolojinin güvenle kullanımını sağlamak konusunda çaba harcanmaktadır. Otoritelerce geliştirilecek düzenleme, rehber ve öneriler gıdalarda nanoteknoloji kullanımının güvenliliğinin sağlanması ve risk değerlendirmesi için yararlanılacak çok önemli araçlardır (87).

Nanoparçacıkların risk değerlendirmelerine ilişkin Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (*Organisation for Economic Co-operation and Development*, OECD) ve EFSA gibi kuruluşların risk değerlendirme rehberleri bulunmaktadır. NP'lerin güvenlik değerlendirmeleri için maruziyet değerlendirmesi, toksisite değerlendirilmesi, NP hareketlerinin değerlendirilmesi, NP'lerin organizmada bulunma ve yer değiştirme kapasitesinin değerlendirilmesi ile geri dönüşüm ve

sürdürülebilirlik unsurları göz önüne alınmaktadır. NP'lerin risk değerlendirmesinde en önemli basamak NP'lerin tanımlanmasıdır (87). Ayrıca, daha önce de özetlendiği üzere; NP'lerin gıda içerisindeki etkileşim ve girişimler nedeniyle belirlenmeleri zor olup, analiz öncesinde gıda matrisinden ayrılmaları gereklidir. Yanı sıra; memelilerin sindirim sistemi ortamlarının karmaşıklığı ve NP'lerin bu ortamlarda uğrayacağı çözünme topaklanma, kümeleşme gibi değişimler de NP'lerin tanımlanmaları açısından bir engeldir (343).

Nanoparçacıkların analitik değerlendirmeleri için Avrupa Komisyonu (*European Commission, EC*), EFSA, FDA, Doğa Koruma Ajansı (*Environmental Protection Agency, EPA*), Dünya Sağlık Örgütü (*World Health Organisation, DSÖ*.) gibi kuruluşlar tarafından analitik yöntemler önerilmiştir. OECD tarafından da mevcut test rehberlerinin NP'lere uyarlanması ve test yöntemlerinin geliştirilmesi için çalışmalar yürütülmektedir (344).

#### **4.2.1. Avrupa Birliği Ülkelerindeki Yasal Düzenlemeler**

Gıdalarda NP kullanımına ilişkin en kapsamlı düzenlemeler AB tarafından uygulanmaktadır (345). Avrupa Birliği ülkelerinde gıda ile temas eden malzemelere ilişkin ana düzenleme 1935/2004 numaralı çerçeve mevzuattır. Bu düzenlemede plastikler, seramik, cam, aktif-akıllı ambalajlar gibi 17 grup için gruplarına özel yasal düzenlemeler yapılacağı hükme bağlanmış olmakla birlikte, bu grupların hepsi için mevzuat düzenlemeleri henüz hayata geçirilmiş değildir. NP'lerin gıda ambalajlarında kullanımı konusu; belirtilen özel düzenlemeler arasından 2 grup içerisinde yer bulmaktadır. Bunlardan birincisi NP'lerin kullanıldığı bilinen “aktif ve akıllı ambalaj malzemeleri”ne ilişkin düzenleme, diğeri ise gıda ambalaj malzemelerinde NP kullanımının en yaygın olduğu alan plastik nanokompozitler olduğu için “gıda ile temas eden plastik malzemeler”e ilişkin düzenlemedir.

Avrupa Komisyonu'nun 14/01/2011 tarihli gıda ile temas eden plastik malzemeler tebliği (EU 10/2011), gıda ile teması öngörülen plastik malzemelere ilişkin düzenlemeleri içermektedir ve bu malzemelerin içerisinde bulunmasına izin verilen maddeler, Tebliğ eki Birleştirilmiş Liste'de belirtilmiştir (*Union List*). Tebliğin 9 numaralı maddesinde nanoparçacıkların gıda ile temas eden plastiklerin yapısında

kullanımının, ancak nano şeklinin kullanımına izin verildiğinin *Union List*'te açıkça belirtilmesi koşulu ile uygun olduğu hükmüne bağlanmıştır. NP'lerin işlevsel bir engel arkasında veya çok tabakalı bir yapı içerisinde gıda ile doğrudan temas etmeksizin kullanımı dahi, duruma özel izin bulunmadığı takdirde uygun görülmemiştir. Bu listeye yeni maddelerin ilavesi 1935/2004 numaralı çerçeve mevzuatta belirtildiği usul ile gerçekleştirilir. Bu kapsamda; gıda ambalajlarında kullanımına izin verilmesi talep edilen maddelerin izin alarak pozitif listeye eklenebilmesi için öncelikle EU 1935/2004 düzenlemesinin 8 ve 9. maddeleri uyarınca EFSA görüşünün alınması gerekmektedir. Bu kapsamda, gıda ile temas edecek malzemelerde kullanılacak herhangi bir madde için endüstri tarafından ilgili üye ülkedeki otoriteye Gıda Bilimsel Komisyonu (SCF, *Scientific Committee on Food*) rehberlerine uygun olarak hazırlanan teknik dosya sunulur. EFSA'ya ulaştırılan bu teknik dosya EFSA tarafından 6 ay içerisinde sonuçlandıracağı incelemeye tabi tutulur ve inceleme sonrasında EFSA'nın konuya ilişkin görüşü rapor halinde ilan edilir. EFSA tarafından bu 6 aylık süre, bir 6 ay daha uzatılabilir (346).

Avrupa Gıda Güvenliği Ajansı, 2009 yılında nanoteknoloji ve nanobilimin gıda ve gıda güvenliği açısından oluşturduğu potansiyel riskler üzerine Avrupa Komisyonunun talebi doğrultusunda bir bilimsel komisyon raporu oluşturmuştur. Bu raporda, nanoparçacıkların toksikokinetiklerini ve toksisitelerini etkileyen değişik fizikokimyasal özellikler taşıdığı; bu maddelerin gıda ve biyolojik ortamlarda belirlenme, tanımlanma ve ölçümlerinin zor olduğu; toksikokinetikleri ve toksisiteleri ile olası maruziyet düzeyleri konusunda kısıtlı veri bulunduğu ve nanoteknolojinin gıda sektöründe halihazırdaki kullanım düzeyinin bilinmediği vurgulanarak gerçekleştirilecek risk değerlendirmelerinde bu belirsizlik faktörlerinin göz önünde bulundurulması gerekliliği bildirilmiştir. Bu raporda, belirli NP'lere oral maruziyet durumu ve bu durumun toksik etkileri konusunda aşırı derecede az veri olduğu ve NP'lerin kendilerine özgü fizikokimyasal özellikleri nedeniyle nano olmayan formlar üzerinden uyarılma yolu ile risk belirlenmesi uygun olmayacağı için NP'lerin risk değerlendirmelerinin "olguya özgü-teker teker" olarak yapılması gerektiği görüşü bildirilmiştir. NP'lerin risk değerlendirmelerinde geleneksel maddelerin risk değerlendirme yaklaşımları başlangıç noktası olarak kullanılabilir olmakla birlikte, NP'lerin kendine özgü özellikleri nedeniyle, bu yöntemlerde değişiklikler

gerçekleştirilmesi gerektiği ve yine bu maddelerin geniş yüzey alanı vb. özellikleri nedeniyle kütle dışında yüzey alanı ve parçacık sayısı gibi farklı dozimetrelere araştırılması gerektiği vurgulanmıştır (59). “Yeni Ortaya Çıkan veya Yeni Tanımlanan Risklere İlişkin Bilimsel Komisyon” (SCHENIR, *Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks*) tarafından da mevcut bilimsel verilerin nanoparçacıkların toksisite profillerinin değerlendirilmesinde kullanılabilecek genel kurallar oluşturulması için henüz yeterli düzeyde olmadığı bildirilmiştir (60).

Avrupa Gıda Güvenliği Ajansı gıda sektöründe kullanılan nanoparçacıkların risk değerlendirilmesine ilişkin ilk olarak 2011 yılında bir rehber yayımlamış ve yeni bilimsel gelişmeler ışığında 2018 ve 2021 yıllarında bu rehberi güncellemiştir (347). EFSA 2021 yılında, bahse konu risk değerlendirmesi rehberinin yanı sıra, nanoparçacıkların ve NP tanımına uymamakla birlikte küçük parçacık büyüklüğüne bağlı olarak nanospesifik değerlendirme gereği olabilecek parçacıkların ne şekilde belirlenebileceğini açıklayan bir rehber daha yayımlamıştır (348). Bu rehberde, gıdalarda doğal olarak, üretim aşamalarının yan ürünü, saklama veya işleme aşamalarında ortaya çıkabilecek bu parçacıkların varlığının belirlenmesi ve nanospesifik risk değerlendirmesi gerekip gerekmediğinin saptanmasına yönelik bilgiler sunulmuştur. Bu rehberde göre 33,3 g/L’den yüksek çözünürlüğe sahip maddeler, 30 dakika içerisinde % 88’den fazla oranda çözünen maddeler, ilgili gıda matrisi içerisinde tamamen çözünebilen maddeler, içerdiği parçacıkların % 10’dan azı 500 nm altında olan maddeler ve 500 nm altı parçacık içeriğinin % 10’dan daha azı 250 nm’den küçük olan maddeler nanospesifik değerlendirme gerektirmemektedir (348).

Avrupa Gıda Güvenliği Ajansı’nın 2021 tarihli gıda ve gıda zincirinde nanoparçacık kullanımına ilişkin risk değerlendirme rehberine göre başvuru sahipleri, rehber çerçevesinde gerekli olan test serisini sunmakla yükümlüdür. Sadece NP içeren maddeleri değil ilgili rehberde göre nanospesifik değerlendirme gerektiren maddelerin değerlendirmesi de bu rehber kapsamındadır. Aynı maddenin farklı şekil, boyut, kristal yapısı gibi her bir formu için ayrı değerlendirme gerçekleştirilmesi gereklidir. Parçacıkların tanımlanması için gerekli parametreler söz konusu rehberde belirlenmiştir. Bunlardan bazıları; parçacık şekli, yapısı, yüzey alanı, üretim

yöntemidir. Bu aşamada ayrıca; safsızlıkların ve yüzey kaplaması gibi maddelerin de tanımlanması gerekmektedir (347).

Fizyolojik koşullarda veya gıda matrisi içerisinde çözünen maddeler ile gıda ambalajı matrisine iyice gömülü olan maddeler için bu rehber kapsamında değerlendirme yapılması gerekmediği bildirilmiştir (347).

Rehberde, bazı NP'ler üzerindeki değerlendirmelerde başka NP'lere ilişkin verilerden de yararlanılması uygun bulunmuş ve bu uygulama "çapraz okuma" (*read across*) şeklinde tanımlanmıştır. Ancak, bu uygulama için kaynak ve hedef NP'nin toksikolojik etkilerinin benzer olacağı beklentisinin yeterli veri ile desteklenmiş olması şarttır (347).

Maruziyet değerlendirmesi aşaması, nano olmayan maddelerdekine benzer esaslara göre gerçekleştirilir. Bu aşamada NP veya yıkım ürünlerinin gıda içerisinde bulunmaya devam edip etmediğinin belirlenmesi gereklidir. Ancak; belirleme yapılamayan durumlarda en kötü durum senaryosu olarak oral yolla alınan tüm maddenin nano formda olduğu kabul edilmelidir (347).

Maruziyet değerlendirmesini takiben NP'ler için gerçekleştirilecek toksikolojik risk belirleme aşamasına geçilir. Bu aşama 4 basamakta özetlenebilir (347) (Bkz. Şekil 4.2.):

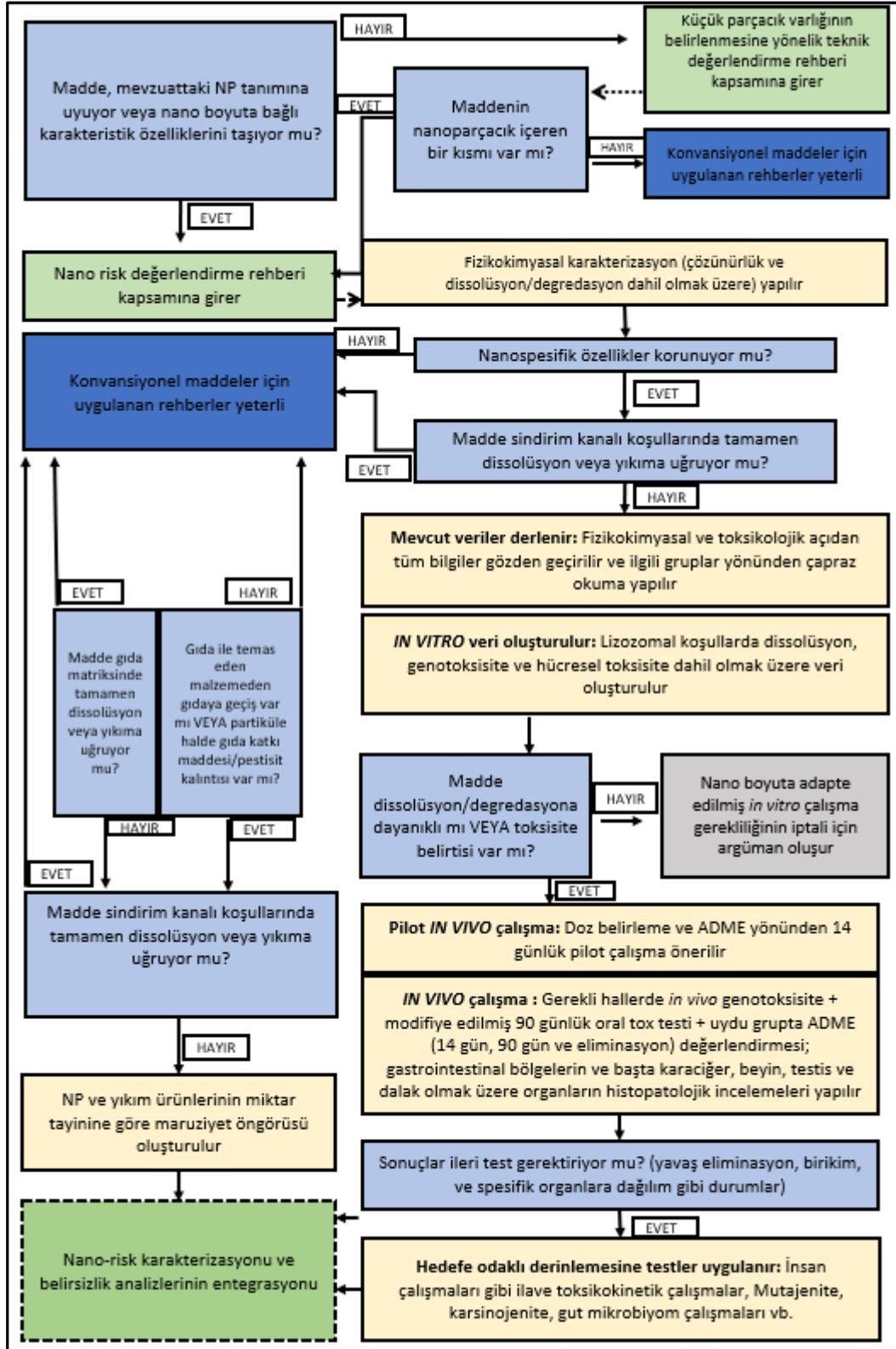
- 1- Nanoparçacık mide-bağırsak sisteminde yıkıma uğruyor ise nano olmayan maddelere yönelik testlere dönülür. Yıkıma uğramıyor ise testlere devam edilir.
- 2- Sitotoksisite, hücre canlılığı testleri, genotoksisite testleri, oksidatif stres, proenflamasyon ve mide-bağırsak engelinin (gastrointestinal bariyer) bozulmasına ilişkin *in vitro* testler gerçekleştirilir. Eğer toksisite gözlenmez ve maddenin dissolüsyonu yüksek ise *in vivo* testlerin uygulanması talep edilebilir.
- 3- 90 günlük oral toksisite testi ile doz aralığı belirlenir. 14-90 gün aralığında dokulardaki NP miktarında artış veya eliminasyonun yavaş olduğu gözlenirse bir sonraki basamağa geçilir.

- 4- Gelişimsel toksisite, immünotoksisite, insan toksikokinetik çalışması gibi testler uygulanır.

Tüm bu verilerin ve belirsizlik analizlerinin de tamamlanması ile risk tanımlanması yapılır (347).

Halihazırda EU 10/2011 tebliği eki Birleştirilmiş Liste'de (*Union List*) yer verilen diğer nanoparçacıklar şunlardır: Titanyum nitrit, karbon karası (*carbon black*), silikon dioksit, kaplanmamış çinko oksit, [3-(metakriloksi)propil] trimetoksisilan ile kaplı çinko oksit nanoparçacıkları, çeşitli ajanlarla modifiye edilmiş MMT türleri, kaolin, bentonit, florla modifiye alüminyum ile yüzey işleme yapılmış titanyum dioksit, divinil benzen ile modifiye edilmiş veya edilmemiş (bütadien, etil akrilat, metil metakrilat, stiren) kopolimeri, 1,3-bütanediol dimetilakrilat ile çapraz bağlı (bütadien, etil akrilat, metil metakrilat, stiren) kopolimeri; (metakrilik asit, etil akrilat, n-bütül akrilat, metil metakrilat, bütadien) kopolimeri.

Avrupa Gıda Güvenliği Ajansı tarafından 2021 tarihinde yayımlanan bir raporda, polimer içerisinde % 0,025 (a/a) konsantrasyonunda kullanılan gümüş NP'lerin polimer içinde hapsolmuş şekilde kaldığı ve toksikolojik açıdan endişe yaratmadığı; yüzeyden dissolüsyon yoluyla gıdaya geçen iyonize formun da yasal sınırlar içerisinde olduğu belirtilmiştir. EFSA Gıda İle Temas Eden Malzemeler Paneli tarafından bahse konu inceleme sonucunda; % 0,025 konsantrasyonunda gümüş NP kullanımının tüketici açısından risk oluşturmadığı şeklinde yorumda bulunulmuştur. Ancak gümüş halihazırda EU 10/2011 tebliği eki Birleşik Listeye ilave edilmemiştir (138).



**Şekil 4.2.** Avrupa Gıda Güvenliği Ajansı tarafından gıda ambalajlarında kullanılan nanoparçacıklar için uygulanması öngörülen risk değerlendirme algoritması (EFSA'nın 2021 tarihli risk değerlendirme rehberinden (347) uyarlanmıştır).

#### 4.2.2. Amerika Birleşik Devletleri’ndeki Yasal Düzenlemeler

Amerika Birleşik Devletleri’nde gıda ambalaj malzemeleri ve bu malzemelerin yapısına giren maddeleri, Federal Gıda, İlaç ve Kozmetik Kanunu kapsamında düzenlenmektedir.

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından NP’lerin gıda ambalajları dahil olmak üzere gıda endüstrisinde kullanımına ilişkin 2014 yılında bir rehber hazırlanmış ve bu rehberde nano boyuttaki parçacıkların yeni özellikler gösterebildiği ve güvenliliğine ilişkin değişik test yöntemleri geliştirilmesi gerektiği belirtilmiştir. Ancak, bu rehber yasal olarak bağlayıcı nitelikte olmayıp tavsiye niteliği taşımaktadır (349). Yasal düzenleme yönünden bırakılan bu boşluk eleştirilere konu olmuştur (350).

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından 2014 yılında yine endüstriye yönelik olarak ürünlerin nanoteknoloji içerip içermediğine ilişkin değerlendirme esaslarını belirleyen farklı bir rehber yayımlanmıştır. Bu rehberde nanoteknoloji kullanılan alanlarda, o alandaki mevcut düzenlemelere göre güvenlilik değerlendirmesi yapılabileceği ve mevcut düzenlemelerin bu yeni alanda yeterli düzeyde güçlü ve esnek olduğu bildirilmiştir (351).

Federal Gıda, İlaç ve Kozmetik Kanunu’nun tanımları içeren 2. Alt Bölümünün 321. Kısımında (21 *U.S.C.* 321) gıda katkı maddesi tanımı gıda ambalaj malzemelerini de kapsayacak şekilde yapılmış olup (352); gıda ile temas eden maddeler için mevzuatta “dolaylı gıda katkı maddesi” ifadesi de kullanılmaktadır (353). Anılan kanunun gıda katkı maddelerine ilişkin düzenlemeleri içeren 4. Alt Bölümünün 348. Kısımında (21 *U.S.C.* 348) düzenlemelere uygun olmayan maddeler, “güvenli olmayan gıda katkı maddesi” olarak nitelendirilir (354). Güvenli olmayan gıda katkı maddelerini içeren ürünler, aynı kanunun 4. Alt Bölümünün 342. Kısımında (21 *U.S.C.* 342) ise “hileli ürün” olarak değerlendirilir (355).

Federal Gıda, İlaç ve Kozmetik Kanunu’nun 4. Alt Bölümü 348 numaralı kısmının (21 *U.S.C.* 348) (h) bendi gereğince gıda ile temas etmesi planlanan malzemeler için piyasaya sunulmadan en az 120 gün önce FDA’ya başvuruda bulunulması gereklidir. Başvurunun FDA’ya ulaşmasından itibaren 120 gün içerisinde

FDA tarafından ürünün güvenli olmadığına ilişkin herhangi bir itiraz ortaya konmadığı takdirde ürün kullanıma sunulabilmektedir (354).

Amerika Birleşik Devletleri'nde federal kuruluşların kurallarını kaydettiği "Federal Düzenlemeler Kanunu" (*The Code of Federal Regulations, CFR*)'nın 21 numaralı başlık, birinci bölüm, B alt bölümünde gıdayla temas edecek maddeler için FDA'nın düzenlemeleri ortaya konmuştur (356). Düzenlemenin 170. maddesine göre, gıda ambalajlarında kullanılan bazı maddeler "eşik limit" altında olarak tanımlanır ve düzenlemeden muaf tutulur. Karsinojen olmayan veya karsinojen safsızlık içermeyen, 1,5 µg/gün'den daha az maruziyet öngörülen maddeler, belirlenen ADI değerinin % 1'inden az bir maruziyet oluşacağı öngörülen maddeler, gıda üzerinde teknik bir etki göstermeyen maddeler, çevresel risk oluşturmaması durumunda "eşik limit altında" kabul edilir ve düzenlemeden muaf tutulur. Bu maddeler Yasal Düzenleme Sınırı Listesi (*The Threshold of Regulation, TOR*) listesinde kayıtlıdır (357). Düzenlemenin 182. maddesinde ise Genellikle Güvenli Kabul Edilen Maddeler Listesinde (*Generally Regarded as Safe, GRAS*) maddeler tanımlanmıştır (358). Düzenlemenin "indirekt gıda maddesi" olarak tanımlanan gıda ile temas eden maddelere ilişkin 174. maddesine göre; iyi üretim uygulamalarına uygun üretilmiş olması koşuluyla, gıda veya gıda ambalajlaması uygulamaları açısından Genellikle GRAS listesinde yer verilen maddeler, CFR'nin ilgili bölümünde kullanımına izin verildiği belirtilen maddeler, daha önce kullanımına onay almış maddeler veya gıda temas bildirimini (*Food contact notification, FCN*) bulunan maddeler gıda ambalajlarında güvenli olarak kullanılabilir (359).

Gıda temas bildirimini uygulaması, FDA'in gıda ambalajları için kullandığı temel pazarlama öncesi inceleme yöntemidir. FCN uygulamasının usul ve esasları CFR'nin 21 numaralı başlığının 1. Bölümünün B Alt Bölümüne bağlı 170. Kısım D Alt Kısımında belirlenmiştir. Buna göre gıdaya temas edecek malzemeleri piyasaya sunmak isteyen üretici veya tedarikçiler FDA'a FCN sunarlar. Aynı ürünü piyasaya farklı üretici veya tedarikçiler sunacak dahi olsa her biri ayrı başvuru yapmak durumundadır. Başvuruların içeriği, hangi durumlarda başvuru gerekmediği ve benzeri konular CFR içeriğinde ayrıntılı şekilde belirlenmiştir (360)

Genellikle Güvenli Kabul Edilen Maddeler Listesi, FCN ve TOR listeleri internet veri tabanı üzerinden incelendiğinde; nanoparçacık içeren bazı maddelerin bu listelerde yer aldığı belirlenmiştir. Bentonit direkt gıda katkı maddeleri GRAS listesinde, Clay (kaolin) indirekt gıda katkı maddeleri GRAS listesinde yer almaktadır. Ancak; FDA, GRAS listelerinde yer alan maddelerin nano formunun da güvenli olduğu sonucuna varılamayacağını belirtmektedir (345).

Gıda Temas Bildirimleri listesinde yer alan bazı nanoparçacıklar; silika-nano gümüş, çeşitli ajanlarla modifiye edilmiş MMT ve kurşun-kalay oksittir. TOR listesinde gümüş içeren *Bactiblock* isimli (% 0,5'e kadar gümüş içeren polimerlerde) bir adet polimer katkı maddesine yer verilmiştir (361).

Amerika Birleşik Devletleri'nde Doğa Koruma Ajansı (*Environmental Protection Agency, EPA*) tarafından da nanoparçacık içeren ürünler tek tek incelenmekte olup (345); 2014 yılında ABD piyasasında satılan gümüş NP katkılı bazı gıda saklama kaplarının EPA kararıyla satışı durdurulmuş ve büyük perakende satıcılara bu ürünlerin pazarlanmaması yönünde uyarı mektupları yazılmıştır (362).

#### 4.2.3. Kanada'daki Yasal Düzenlemeler

Kanada'nın gıda ambalaj malzemelerine ilişkin düzenlemeleri ABD ile benzerlik göstermektedir. Gıda ambalaj malzemeleri, Kanada Gıda ve İlaç Kanununun 23. Bölümü çerçevesinde değerlendirilmektedir. Belirtilen kısmın ilk maddesinde, kişilerin sağlığına zararlı olabilecek hiçbir maddeyi içeren gıda ambalajlarının satılamayacağı belirtilmiştir. Kanada mevzuatında gıda ambalajlarında bulunabilecek maddelerin yer verildiği bir pozitif liste uygulaması yoktur. İlgili firmalarca gönüllülük esasını ile Gıda Bölümü'ne pazarlama öncesi değerlendirme talebinde bulunulabilir. Gıda Bölümü tarafından uygun görülen gıda ile temas eden malzemeler için "*no object letter*" isimli uygunluk belgesi düzenlenir; ancak bu belgenin bulunması kişilerin ürünün güvenliliğine ilişkin yasal sorumluluklarını ortadan kaldırmaz (363).

Kanada Sağlık Bakanlığı internet sitesinde nanoparçacık içeren sağlık ve gıda ürünleri için özel bir düzenleme bulunmadığı, nanoparçacık içeren gıda ürünlerinin

geleneksel (*konvansiyonel*) ürünlere uygulanan mevcut düzenlemeler çerçevesinde ürüne özel bire bir incelemeye tabi tutulduğu belirtilmiştir (364).

#### 4.2.4. Brezilya'daki Yasal Düzenlemeler

Brezilya, nanoteknoloji araştırmaları yönünden Güney Amerika'nın en aktif ülkesidir (87). Brezilya'da nanoparçacıkların gıda ambalajlarında kullanımına ilişkin denetleyici otorite Sağlık Düzenleme Kurumu (*Agência Nacional de Vigilância Sanitária*, ANVISA)'dur.

Brezilya'da yürürlükte bulunan 326 nolu Üniversite Kurul Kararı (*Resolução Da Diretoria Colegiada*, RDC) ise gıda ile temas edecek plastik malzemelere ilişkin düzenlemeler getirmekte ve nanoparçacıklara ilişkin içeriği AB'nin *EU* 10/2011 düzenlemesi ile benzerlikler göstermektedir. Düzenlemede içerdiği parçacıkların % 50 ve daha fazlası 0-100 nm aralığında olan parçacıklar NP olarak tanımlanmıştır (365).

Düzenlemede, gıda ile temas edecek plastik malzemelerde nano yapılı katkı maddelerinin yalnızca açıkça belirtildiği durumda kullanılabileceği belirtilmiştir. Söz konusu düzenleme, plastik gıda ambalajlarında kullanılabilecek katkı maddeleri için kullanım koşullarının da belirtildiği bir pozitif liste içermektedir. Bu liste incelendiğinde listede bazı nanoparçacıkların bulunduğu belirlenmiştir. Listede titanyum nitrat; (bütadien, etil akrilat, metil metakrilat, stiren) kopolimeri; (metakrilik asit, etil akrilat, n-bütül akrilat, metil metakrilat, bütadien) kopolimeri; 1,3-bütanediol dimetakrilat ile çapraz bağlı (bütadien, etil akrilat, metil metakrilat, stiren) kopolimeri; çinko oksit (kaplamasız); [3-(metakriloksi)propil] trimetoksisilan ile kaplı çinko oksit nanoparçacıkları mevcuttur.

Bununla birlikte Brezilya'da 2023 yılında yayımlanan 839/2023 sayılı RDC ile nanoparçacıkların risk değerlendirmelerine özel düzenlemeler yapılmıştır (366).

#### 4.2.5. Japonya'daki Yasal Düzenlemeler

Japonya'da Gıda Sağlığı Kanunu'nda yapılan düzenleme ile 1 Haziran 2020 itibariyle, gıda ile temas eden malzemeler için pozitif liste uygulamasına geçilmiş ve uygulamanın detayları "*Public Notice of the MHLW* No. 196, April 28, 2020" ile ilan

edilmiştir. Gıda ile temas eden malzemelere ilave edilen katkı ve kaplama maddeleri Ek-2 listede yer almaktadır (367).

Japon mevzuatına göre ambalaj malzemesinden herhangi bir etki göstermek üzere salımı beklenen maddeler “gıda katkı maddesi” olarak değerlendirilir ve gıda katkı maddelerine ilişkin mevzuata tabidir. Bu maddelerin gıda ile temas eden malzeme içerisinde kalması bekleniyor ise de; gıda ile temas eden malzemeler için kullanılacak hammaddeler çerçevesinde değerlendirme yapılır (368, 369).

Gıda ile teması uygun bulunan malzemelerde kullanımına izin verilen madde listelerine ilave başvurusunda bulunurken, Japon Gıda Güvenliği Komisyonu’nun belirlediği rehber doğrultusunda dosya sunulur. Listelerde, toplanan talepler değerlendirildikçe güncellemeler yapılır.

İzin verilen polimer katkı maddelerinin yer aldığı Tablo 2’de, bentonit, kaolin yer almakta iken bu maddelerin pozitif liste uygulaması kapsamında olmadığı değerlendirilerek “listeden silinecekler” grubuna alındığı görülmüştür. Ancak; listelerde herhangi bir madde için nanomateryal formuna ilişkin özel bir ifade belirtilmediği görülmüş ve herhangi bir kaynaktan nanoparçacıklara ilişkin özel bir değerlendirme yöntemi uygulanacağına ilişkin bir bilgiye ulaşılamamıştır (370). Mohammadi ve ark. (371) tarafından da; Japonya’nın gıda mevzuatında nanoparçacıklara özel bir düzenleme bulunmadığı belirtilmiştir.

#### **4.2.6. Avustralya ve Yeni Zelanda’daki Düzenlemeler**

Avustralya ve Yeni Zelanda’da piyasaya sunulacak her gıda ürününün Avustralya-Yeni Zelanda Gıda Standartları Enstitüsü (*Australian-New Zealand Food Standards*, FSANZ) tarafından onaylanması zorunludur. Avustralya Gıda Standartları Kodu 3.3.2 başlığı altında 9. Bölümde gıda ambalajlarının hedeflenen kullanıma uygun ve kontaminasyonu önleyecek standartta olması gerektiği hükme bağlanmıştır (372).

Yeni Zelanda Gıda Standartları Enstitüsü tarafından 2016 yılında NP’lerin gıda ambalajlarında kullanımının güvenliliği konusunda bir rapor yayımlanmıştır. Raporda; NP’lerin gıda ambalajlarında kullanımı sonucunda oluşacak maruziyet olasılığının

düşük olduğu, NP formunda migrasyon gerçekleşse dahi metal oksit NP'lerin de mide asidine bağlı olarak okside olacağı belirtilmiştir (8).

Yeni Zelanda Gıda Standartları Enstitüsü, gıda ambalajlarına yönelik yeni düzenlemeler oluşturulması yönündeki teklifin değerlendirilmesi konusunda araştırmalar gerçekleştirmiş ve gıda ambalajlarından gıdaya geçişin risk oluşturmayacağı sonucuna ulaşarak, 12 Ekim 2017'de bir "*abandonment letter*" yayımlanarak bu alanda yeni bir düzenleme yapılması gerekmediğini bildirmiştir. Ancak; raporda nanoparçacıkların, yeni düzenlemeye gerek olmadığı yönündeki karara dayanak olan çalışma kapsamı dışında olduğu ve sonraki bir çalışmada ayrıca ele alınacağı belirtilmesi dikkat çekicidir (373).

Yeni Zelanda Gıda Standartları Enstitüsü Bilimsel Nanoteknoloji Tavsiye Kurulu oluşturmuş olup bu kurul, nanoteknolojinin gıda ve gıda ambalajlarında kullanımının geleceği ile politika ve yasal düzenleme geliştirilmesi konusunda rehber hazırlanması alanında faaliyet gösterecektir (374).

#### **4.2.7. Ülkemizdeki Yasal Düzenlemeler**

Ülkemizde gıda ile temas eden malzemelere ilişkin düzenlemeler, 'Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanunu'nun 23. maddesinde belirtildiği üzere; Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından hazırlanan ve 19.02.2020 tarihinde yayımlanan "Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği" doğrultusunda oluşturulan "Türk Gıda Kodeksi" ile belirlenmiştir.

Ülkemizin gıda ile temas eden malzemelere yönelik mevzuat düzenlemeleri incelendiğinde Avrupa Birliği ülkelerindeki düzenlemelerle büyük ölçüde benzerlik olduğu görülmektedir. Şöyle ki; gıda ile temas eden madde ve malzemelere ilişkin ayrıntılı düzenlemelere yer verilen 05.04.2018 Resmî Gazete'de yayımlanan 'Türk Gıda Kodeksi Gıda ile Temas Eden Madde ve Malzemelere Dair Yönetmelik'te de bu yönetmeliğin 27/10/2004 tarihli ve (AT) 1935/2004 sayılı Gıda ile Temas Eden Madde ve Malzemeler Hakkında Avrupa Parlamentosu ve Konseyi Tüzüğü dikkate alınarak Avrupa Birliği mevzuatına uyum çerçevesinde hazırlandığı belirtilmiştir. Bahse konu yönetmeliğin 5. maddesinde gıda ile temas eden malzemelerden gıdaya insan sağlığını tehlikeye sokacak, gıdanın bileşiminde istenmeyen değişimlere neden olacak veya

duyusal özelliklerinde bozulmaya neden olacak miktarda geçiş olamayacağı hükme bağlanmıştır. Ancak; aktif gıda ambalajlarından gıdaya, gıda bileşimi veya duyusal özelliklerinde değişiklik olacak düzeyde geçiş olabileceği belirtilerek bu maddelerin de “Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği” çerçevesinde değerlendirilmesi gerektiği ifade edilmiştir. Ayrıca, aktif veya akıllı ambalaj malzemelerinin tüketiciyi bilgilendirecek şekilde etiketlenmesi de zorunlu kılınmıştır (375).

Gıda ile temas eden madde ve malzemelere ilişkin başvuruların kabulü, bilimsel görüş alınması ve değerlendirilmesi hususları AB mevzuatı ile benzer düzenlenmiştir. Gıda ile temas eden malzemelerde kullanılacak madde ve malzemeler için ilgili firma tarafından Tarım ve Orman Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğüne başvuru yapılır. Başvuru, ilgili kılavuzlara uygun olması durumunda değerlendirilmek üzere bilimsel komisyona sunulur (375). Bilimsel komisyon, “Risk Değerlendirme Komite ve Komisyonların Çalışma Usul ve Esasları Hakkında Yönetmelik” hükümleri çerçevesinde en az 9 üyeden oluşacak şekilde oluşturulur. Gıda ile Temas Eden Madde ve Malzemeler Komisyonu’nun kimya, fizikokimya, toksikoloji ve ambalaj alanlarında çalışan, konusunda uzman 9 üyesi bulunmaktadır (376). Bilimsel Komisyon altı ay içerisinde maddenin kullanıma uygunluğuna ilişkin görüşünü oluşturur. Bu altı aylık sürenin yeterli olmaması durumunda ilave bir altı ay süre uzatımı yapılabilir. Bilimsel komisyon görüşleri tavsiye niteliğinde olup, sonuca Tarım ve Orman Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü tarafından komisyon görüşü ve diğer hususlar değerlendirilerek karar verilir (375).

“Türk Gıda Kodeksi Gıda ile Temas Eden Madde ve Malzemelere Dair Yönetmelik”ten dayanakla gıda ile temas eden plastik malzemelere ilişkin “Türk Gıda Kodeksi Gıda ile Temas Eden Plastik Madde ve Malzemeler Tebliği” yayımlanmıştır. Gıda ile temas etmesi amaçlanan nanokompozitler için bahse konu tebliğ düzenlemelerine uyulması gerekmektedir. Söz konusu tebliğ, genel yapısı itibarıyla *EU* 10/2011 düzenlemesiyle önemli düzeyde benzerlik göstermektedir. Tebliğin 8. maddesi ile plastik madde ve malzemelerin bileşenlerinin gıda benzerlerine geçişi için üst sınır, gıda ile temas eden yüzeyin her desimetrekaresi için 10 miligram (10 mg/dm<sup>2</sup>) olarak belirlenmiş olup bu değer *EU* 10/2011 ile belirlenen total migrasyon limiti ile aynıdır. Yine AB mevzuatı ile örtüşür şekilde; Yönetmeliğin 6. maddesi

ikinci fıkrasında nanoformdaki maddelerin yalnızca tebliğ eki Ek-1’de yer alan özel kurallarda izin verilmişse kullanılabileceği hükme bağlanmıştır. Yine *EU/10/2011*’de olduğu gibi; tebliğ eki Ek-1’de yer verilmeyen nanoformdaki malzemelerin çok katmanlı plastik malzemelerde gıda ile doğrudan temas etmese dahi kullanımı yasaktır (377).

Tebliğ eki Ek-1 listesi incelendiğinde listenin de *EU/10/2011* eki *Union Liste* yer alan nanoparçacıkları içerdiği; listede silikon dioksit, kaolin, karbon karası, titanyum nitrit, divinil benzen ile çapraz bağlanmış (bütadien, etil akrilat, metil metakrilat, stiren) kopolimeri, çapraz bağlanmamış (bütadien, etil akrilat, metil metakrilat, stiren) kopolimeri, (metakrilik asit, etil akrilat, n-bütül akrilat, metil metakrilat, bütadien) kopolimeri, çeşitli ajanlarla modifiye edilmiş MMT türleri, 1,3-bütandiol dimetilakrilat ile çapraz bağlı (bütadien, etil akrilat, metil metakrilat, stiren) kopolimeri, kaplanmamış çinko oksit, [3-(metakriloksi)propil] trimetoksisilan ile kaplı çinko oksit nanoparçacıklarının bulunduğu görülmektedir (377).

## 5. TARTIŞMA

Tez çalışması kapsamında; nanoparçacıkların gıda ambalajlarında kullanımının toksik etki gösterme potansiyeli taşıyıp taşımadığının ve ülkemizde ve dünyada yürürlükte bulunan yasal düzenlemelerin toksikolojik açıdan risklere karşı yeterli düzeyde koruyuculuk sağlayıp sağlamadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Tez çalışması çerçevesinde; gıda ambalajlarında en yaygın olarak kullanıldığı belirtilen ve bu alanda en çok sayıda bilimsel çalışmaya konu olduğu belirlenen gümüş nanoparçacıklar ve nanokiller özelinde incelemeler yapılmıştır. Seçilen bu iki nanoparçacığın genel özelliklerine, gıda ambalajlarında kullanım amaçlarına, gıda ambalajlarından gıdaya geçişlerine ve toksik etkilerine ilişkin çalışmalar araştırılarak derlenmiştir.

Nanoparçacıklar, Avrupa Komisyonu tarafından "Sayı-boyut dağılımına göre % 50 veya daha fazlası 1-100 nm aralığında bir veya birden fazla dış boyuta (uzun biçimli parçacıklar için en az iki dış boyut, tabaka şekilli parçacıklar için en az bir dış boyut) sahip katı parçacıklardan oluşan; doğal, tesadüfi veya üretim sonucunda ortaya çıkan; bağımsız, küme veya yığın halinde bulunabilen maddeler" şeklinde tanımlanmaktadır (4).

Nanoteknolojiden yenilenebilir enerji, kozmetik, tekstil, inşaat, bilişim, tıp, eczacılık gibi pek çok alanda yararlanılmaktadır (378). Gıda endüstrisi de nanoteknolojinin yaygın olarak kullanıldığı bir alan olup, 2022 yılı itibariyle dünya çapında yaklaşık 400 gıda firmasının nano esaslı ürün üreterek faaliyet gösterdiği tahmin edilmektedir (18). Gıdaların ambalajlanması ve gıda ortamının izlenmesi, gıda sektöründeki ana odak noktalarındandır ve nanoteknoloji esaslı gıda ambalajlaması, nanoteknoloji araştırmaları arasında en hızlı gelişen alanlardan bir tanesidir (48). Nanoteknoloji esaslı gıda ambalajı endüstrisi, gelişme potansiyeli yönünden "henüz bebeklik çağında" olarak tanımlanmaktadır (109). Dünyadaki en büyük ambalaj firmaları dahil olmak üzere pek çok firma, gıda ambalajlarında kullanılan nanopolimerler üzerindeki çalışmalara yönelmiş durumdadır ve sektör günümüzde hızla büyümektedir (18).

Nanoparçacıklar, günümüze kadar geliştirilmiş/iyileştirilmiş gıda ambalajları, aktif gıda ambalajları ve akıllı gıda ambalajlarının yapımında kullanılmıştır (10, 45). Geliştirilmiş gıda ambalajı uygulamaları çerçevesinde; NP'lerden yararlanılarak ambalajın ısı ve mekanik dayanıklılığı, gaz geçirgenliği gibi özellikleri iyileştirilebilmektedir. Örneğin; nanokil ilave edilen polimerlerin gaz geçirgenliği azalmakta ve polimerin engelleyici işlevi güçlendirilmektedir (273). Ayrıca; nanoparçacıklardan, çevre kirliliğine yol açan petrol esaslı plastiklere alternatif olan biyoyıkılabilir polimerlerin (nişasta ve PLA gibi) gaz ve nem geçirgenliklerinin ve mekanik özelliklerinin iyileştirilmesi amacıyla da yararlanılabilir (45, 48, 49). Aktif gıda ambalajı uygulamaları, gıda ambalajına eklenen çeşitli aktif maddelerin (oksijen tutucu, nem emici, antimikrobiyal) gıda veya gıda ortamı ile etkileşime girmesi yoluyla gıdaların etkin şekilde korunmasını sağlar (10, 379). Nanoparçacıkların kullanıldığı aktif gıda ambalajlarına, gümüş veya bakır oksit nanoparçacıkların kullanıldığı antimikrobiyal özellikli ambalajlar ile etilen yakalayıcı titanyum dioksit nanoparçacıklarının kullanıldığı ambalaj malzemeleri örnek gösterilebilir (380, 381). Akıllı gıda ambalajları ise gıda ambalajının iç ve dış ortamındaki değişikliklerin izlenmesi ve kaydedilmesini sağlayan ambalaj türü olup bu amaçla tek duvarlı karbon nanotüpler gibi nanosensörlerden yararlanılmaktadır. (54, 382, 383)

Nanoparçacıklar, küçük boyutlara ve birim kütle başına yüksek yüzey alanına sahiptir ve manyetik, elektriksel, optik, mekanik açılarından aynı maddelerin nano olmayan biçimlerine göre çok farklı özellikler göstermektedir (103). Bu nedenle; NP'lerin kinetik profilleri ve toksik etkileri hakkında, maddenin nano olmayan formlarına ilişkin verilerin uyarlanması yoluyla tam olarak bilgi edinilmesi mümkün değildir (59). Kaldı ki; aynı nanoparçacığın şekil, büyüklük, yüzey yükü, atom dizilişi, topaklanma özelliği, kaplama durumu, üretim yöntemi ve benzeri özellikleri açısından farklı şekillerinin dahi toksik etki profilleri birbirinden farklıdır (384-387). Örneğin; nanoparçacıkların parçacık büyüklüğü, şekil, yüzey yükü gibi özelliklerinin hücre içerisine alımlarını etkilediği gösterilmiştir (388). Belirtilen nedenlerle; nanoparçacıkların şekli, kristal yapısı, büyüklük dağılımı, gözeneklilik, yüzey kimyası gibi özelliklerin belirlenmesini kapsayan karakterizasyon işlemleri, toksikolojik çalışmalar için hayati önem taşıyan bir basamaktır (389).

Nanoparçacıklar, bulunduğu ortamın özelliklerine bağlı olarak çeşitli değişimlere uğramaktadır (59). Nanoparçacıklar, Van der Waals gibi zayıf kuvvetler ile kümeleşerek, sabit bir yapı göstermeyen ve ortam koşullarına göre şekil ve büyüklük değiştirebilen kümeleşmeler veya metalik bağlar gibi daha kuvvetli bağlar ile bir araya gelerek yüzey alanında değişikliklerle sonuçlanabilen topaklanmalar oluşturabilir (59, 67). NP'lerin toksik etkileri üzerinde topaklanma ve kümeleşme durumlarının da etkili olduğu bilinmektedir (385, 390). Ayrıca; biyolojik sıvılar içerisinde, NP'lerin çevresi “protein taç” olarak adlandırılan protein yapılarla çevrelenir. Bu durum, NP'lerin membran geçişleri, vücutta dağılımları ve birikimleri açısından önem taşıyan bir başka noktadır (75, 77). Taç yapısı içerisinde hapsolan nanoparçacıklar, hücre tarafından tanınan proteinlerle çevrelenmiş şekilde hücre içerisine daha kolay giriş yaparlar (78, 79).

İnsan ve çevre sağlığı açısından risk oluşturduğuna ilişkin azımsanmayacak miktarda kanıt bulunan nanoparçacıklara uzun süreli ve tekrarlayan temasın oluşturacağı sağlık etkileri hala bilinmemektedir (391). Hatta; nanoparçacıklara maruziyetin olası etkileri tam olarak aydınlatılmadan bu yapıların kullanımı durumunda gelecekte bir nanotoksosite krizinin gerçekleşebileceği belirtilmektedir (392). En büyük miktarda maruziyete sebep olan gıda kirleticisi kaynağının, gıda ambalajları olduğu ve hatta diğer kirleticilerden yüzlerce kat daha fazla maruziyete yol açtığı öne sürülmektedir (393). Bu iki durum bir arada değerlendirildiğinde; önemli bir maruziyet kaynağı oluşturan gıda ambalajlarının yapısında, toksik etkileri henüz tam olarak aydınlatılmamış olan nanoparçacıkların kullanılmasının endişe verici olduğu açıktır.

Gıda ambalajlarından gıdaya, ambalajın gıda ile temas eden yüzeyinden kopma, yüksek yoğunluktan düşük yoğunluğa madde göçü, nanoparçacıkların çözünmesi veya ambalajın yıkımı sonucunda nanoparçacık geçebileceği bildirilmiştir (56, 57).

Gümüş nanoparçacıklar, gıda ambalajlarında geçirgenliği azaltmak, ambalajın mekanik özelliklerini iyileştirmek veya antimikrobiyal etkinlik sağlamak için kullanılır (106, 112). Gümüş nanoparçacıklar, hücre zarı veya hücre duvarının işlev veya yapısını bozarak, hücre içerisinde proteinlerin/enzimlerin yapı ve işlevlerini

olumsuz etkileyerek, DNA hasarına yol açarak ve reaktif oksijen türleri oluşturarak antimikrobiyal etki gösterirler (111, 121, 125).

Gümüş NP'lerine ilişkin çalışmalarda NP'lerin tanımlanması amacıyla SEM, TEM ve AFM gibi yüksek çözünürlüklü görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır. Gümüş NP'lerin nicel analizleri için ise ICP-MS ve ICP-OES uygun yöntemlerdir. ICP-MS yönteminin diğer tekniklerle birlikte kullanımının daha yerinde sonuçlar verdiği gösterilmiştir. (132-134). ICP-MS yönteminin tek parçacık modunda çalışılması (sp-ICP-MS) yoluyla da elementel ve iyonize formdaki gümüşün ayırt edilmesi mümkün olmaktadır (112, 136). Gümüş NP'lerin karmaşık gıda ortamı içerisinde belirlenmesi ve ölçümü de teknik açıdan ayrı bir sorun oluşturmaktadır (394). ICP-MS ve ICP-OES yöntemlerinin uygulanması öncesinde; organik moleküller atomizasyona engel olabileceği için ölçüm öncesi uzaklaştırılmaları amacıyla hazırlık işlemleri yapılması gerekmektedir (13)

Gümüş NP'lerin sentezlenme ve gıda ambalajlarında uygulanmasına ilişkin çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen, gümüş NP içeren ambalajlardan gıdaya zararlı maddelerin geçişine ilişkin çalışma sayısı azdır. (132).

Tez çalışması kapsamında yapılan literatür taraması sonucunda gümüş NP'lerin gıda ambalaj malzemelerinden gıdaya geçişine ilişkin çalışmaların önemli bir kısmının gıda benzerleri kullanılarak gerçekleştirildiği görülmektedir. Çalışmalar genellikle AB düzenlemesi 10/2011 (EC 2011)'de plastik malzemedeki geçiş test etmek için kullanımı öngörülen gıda benzerleri ile gerçekleştirilmiştir. Bu gıda benzerleri farklı gıda ortamlarını temsil etmek üzere belirlenmiş olan % 10'luk, % 20'lik ve % 50'lik etanol çözeltileri, % 3'lük asetik asit çözeltisi, bitkisel yağ ve poli-(2,6-difenil-p-fenilenoksit)'tir.

Nanoparçacıkların, içerik açısından oldukça karmaşık olan gıdalar içerisine eklendiklerinde değişime uğrayabildiği; bu şekilde hem gıda bileşenlerinin hem NP'lerin fizikokimyasal özelliklerinin değişebildiği bilinmektedir (145, 395). Örneğin; NP'lerin çevresinde bu parçacıkların antimikrobiyal etkinliğine ve toksisitesine etki eden ve "protein taç" olarak adlandırılan yapılar oluşabilir (77). Gerçek gıda içerisinde bulunan diğer makromoleküller de NP'ler ile benzer etkileşimlere girmekte; ancak bu protein ve makromoleküller, gıda benzerleri

içerisinde yer almamaktadır (396, 397). Gerçek gıdalar yerine gıda benzerleri kullanılarak yapılan migrasyon testlerinin gerçek durumu daha az yansıtacağı bilinmektedir (398). Belirtilen nedenlerle, NP'lerin migrasyon testleri için, standart test koşulları, yeterli gıda benzerleri, zaman-sıcaklık koşulları ve en kötü senaryo durumları da belirlenerek bu maddelere özel test yöntemleri oluşturulması gerektiği açıktır (399).

Gümüş NP içeren gıda ambalajlarından gıdaya gümüş NP geçişinin bazı çalışmalarda mevcut yasal düzenlemeler ile belirlenen sınırların altında olduğu saptansa da bu sınırların üzerinde geçiş gerçekleştiğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (141, 153-156).

Gümüş nanoparçacıklarının gıda ambalajlarından gıdaya geçişi üzerine etkili olan etmenler arasında; temas süresi, polimer yapısında yer alan gümüş NP konsantrasyonu, gıda bileşiminde bulunan maddeler, gümüş NP'nin ambalaja yerleştirilme şekli (kaplama veya polimer içine dağıtma), ambalaj malzemesindeki diğer maddeler, sıcaklık, gıdanın asiditesi, mikrodalga uygulaması sayılabilir.

Migrasyon sürecinin esas olarak difüzyona dayanması nedeniyle sıcaklık artışının molekül hareketliliğine bağlı olarak migrasyonu arttırması beklenmektedir (400). Gümüş NP içeren ambalaj malzemeleri ile gerçekleştirilen birçok migrasyon çalışmasında da gümüş NP migrasyonunun sıcaklık ile arttığı gösterilmiştir (137, 172-174). Ancak; Cushen ve ark. (154)'nın 2013 tarihli çalışmalarında, sıcaklığın migrasyonu azalttığını belirlenmiş ve araştırmacılar tarafından, bu durumun nanoparçacıkların yüksek sıcaklıklarda polimer zincirleri ile çapraz bağlanmasından kaynaklanabileceği öne sürülmüştür.

Gıda ambalaj malzemesi içeriğindeki maddelerin gıdaya geçişinin temas süresinden etkilendiği bilinmektedir (401). Birçok çalışmada, temas süresinin - beklendiği üzere- AgNP migrasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (137, 154, 172, 173). Bununla birlikte; çeşitli çalışmalarda, geçişin belirli bir süre sonunda kararlı hale geldiği ve migrasyon grafiklerinde plato görünümü gözleendiği belirlenmiştir (172, 175). Migrasyon miktarının bir süreden sonra sabit kalma eğilimi göstermesi, ambalaj malzemesi ve gıda benzeri arasındaki geçişte bir denge noktası bulunduğu ve bu

noktadan sonra dengenin plastik malzeme yönüne kaydığı şeklinde yorumlanmıştır (172).

Temas süresinin yanı sıra gıda ile temas eden gıda kaplarının tekrar kullanımlarının migrasyona etkisi de pek çok çalışmada incelenmiştir. Bu kapsamda tekrarlayan temaslarda; en yüksek migrasyonun ilk temas sonrasında gerçekleştiği ve tekrar eden temaslarda önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (136). Bu durum, Moreno-Gordaliza ve ark. (167) tarafından yapılan bir başka çalışmada da belirlenmiş olup, ilk temas döngüsünde yüzeyde bulunan gümüş NP'lerin ayrılmasına bağlanmıştır. En yüksek migrasyonun ilk temas sonrasında oluştuğunu gösteren söz konusu çalışmalardan yola çıkılarak, tüketicilerin gıda ile temas eden nanoparçacık içerikli malzemeleri kullanmadan önce yıkama, silme gibi temizleme işlemlerinin uygulanmasının yararlı olabileceği düşünülebilir.

Plastik malzemelerden gıdaya migrasyonun genellikle Fick'in difüzyon yasasına uyumlu olarak gerçekleştiği bilinmekte olup, difüzyonun malzeme içerisindeki migrant konsantrasyonuna bağlı olarak artış göstermesi beklenir (402). Gümüş NP'lerin migrasyonunun da Fick'in difüzyon yasalarına uygun şekilde gerçekleştiği bildirilmiştir (129). İncelenen çeşitli migrasyon çalışmalarında da, daha yüksek konsantrasyonda gümüş NP içeren ambalaj malzemelerinden daha yüksek miktarda gıdaya geçiş olduğu belirlenmiştir (137, 154).

Gümüş NP'lerin ambalaj malzemesi içeriğine kaplama yoluyla eklenmesinin de polimer içerisine dağıtılarak uygulanmasından daha yüksek miktarda gıdaya geçişe yol açtığı bildirilmiştir (137). Bununla birlikte; gümüş NP'lerin ambalaj malzemesine polimer içerisine dağıtılarak eklendiği gıda ambalajlarında, üretim aşamasında uygulanan basıncın veya elektrospin uygulamalarının migrasyona etkisi de araştırılmıştır (129, 177). Çalışmalar, uygun düzeyde basınç ve elektrospin uygulamalarının gıdaya NP geçişi üzerinde etkisini ortaya koymuş olup; ambalaj malzemesinin üretim aşamalarının da ambalaj malzemesi kaynaklı gümüş NP maruziyeti üzerinde etkili olabileceği görülmektedir.

Ambalaj malzemesinden gıdaya gümüş NP geçişi üzerindeki önemli bir etkenin de gıdanın asiditesi olduğu çok sayıda çalışma ile gösterilmiştir. Asidik özellikteki gıda ve gıda benzerlerinde belirlenen gıdaya geçiş miktarı daha yüksek

pH'ya sahip gıda veya gıda benzerlerindekiinden daha yüksek olmuştur (137, 141, 142, 169). Yalnızca, Moreno-Gordaliza ve ark. (167) tarafından gerçekleştirilen bir migrasyon çalışmasında silikon yapılı biberondan gıdaya gümüş NP geçişinin asidik gıda benzerinde diğer gıda benzerlerinde gerçekleşenden daha düşük olduğu bildirilmiştir.

Gıda ortamında bulunan indirgen özellikteki şeker ve tatlandırıcı gibi gıda bileşenlerin ve gıda katkı maddesi olarak kullanılan titanyum dioksitin gıdaya gümüş NP geçişini arttırdığı gösterilmiştir (144, 150). Ayrıca; gıda ortamına sodyum klorür (NaCl) eklenmesinin ortamdaki gümüş NP miktarını ve NP boyutunu azalttığı (181), bazı gıda bileşenlerinin ise ortamdaki gümüş iyonlarından tekrar gümüş NP oluşumuna yol açabileceği (144) bildirilmiştir. Gıda bileşenlerinin gümüş NP'lerinin gıdaya geçişi ve gıda ortamındaki kararlılığı üzerindeki etkisini gösteren bu çalışmalar, gümüş NP içeren gıda ambalaj malzemelerinin belirli tipteki gıda maddeleri ile temas halinde kullanımının maruziyet riskini arttırabileceğini göstermesi ve gıda içeriğinde gümüşün iyonize ve nanoparçacık şekilleri arasında dinamik bir değişim yaşandığını göstermesi açısından önem taşımaktadır.

Bölüm 4.1.2'de sözü geçen çalışmalardan anlaşılacağı üzere, gıdanın bileşimi ve pH değeri gümüş NP migrasyonu üzerinde önemli etkiye sahip olduğu için gıda ile temas edecek gümüş NP içerikli malzemelerin hangi gıdaların saklanması için uygun ve güvenli olacağı konusunda çok sayıda çalışma yapılması gerekmektedir. Ticari olarak satın alınabilen gümüş NP içerikli gıda ambalajları için tüketiciye bu yönde bir bildirim yapıldığı görülmemiştir.

Gıda ambalajında yer alan antioksidan, ışık stabilizanı, nanokil, CNC gibi farklı katkı maddelerinin de gıdaya gümüş NP geçişi üzerinde etkili olduğu çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir (153, 178-180). Bu nedenle; gıda ambalajı kaynaklı gümüş NP maruziyetinin kontrol altında tutulması ve belirlenmesi amacıyla diğer ambalaj katkı maddeleri de dikkate alınmalıdır.

Gıda ısıtma amacıyla mikrodalga fırın kullanımının geleneksel fırın kullanımı ile karşılaştırıldığı iki çalışmada mikrodalga fırında ısıtılan gıdalara daha fazla geçiş gerçekleştiği belirlenirken; başka bir çalışmada ise konvansiyonel fırında gıdaya geçiş miktarı mikrodalga fırındaki geçiş miktarından daha yüksek bulunmuştur (167, 182,

183). Çalışmaların sonucu, ısıtma işlemlerinin gıdaya gümüş NP geçişi üzerinde etkili olduğunu göstermekle birlikte; bu etkiye yönelik başka çalışmalar yapılması etkinin şekli ve düzeyi hakkında daha çok bilgi edinilmesi için önemlidir.

Tüketicilerin pazarlama aşamasında eksik veya yanlış bilgilendirilmesine bağlı olarak bilinçsiz şekilde gıda ambalajı kaynaklı nanoparçacık maruziyeti de söz konusu olabilecektir. Piyasadan sağlanan ve gümüş NP içerdiği beyanı bulunan gıda ile temas eden malzemeler ile gerçekleştirilen bazı çalışmalarda, bu malzemelerde titanyum dioksit nanoparçacıkları da bulunduğu belirlenmiştir (155, 171). Tez çalışması kapsamında, bu çalışmalarda kullanılan ürünlerin ticari internet siteleri incelenmiş olup; internet sitelerinde yalnızca gümüş NP içeriğinin bildirildiği ve titanyum dioksit içeriğine ilişkin tüketiciye herhangi bir bilgi sunulmadığı görülmüştür. Bu durum, tüketicilerin bilinçli veya bilinçsiz olarak üretici tarafından beyan edilmeyen nanoparçacıklara da maruz kalabileceğini göstermesi açısından endişe vericidir. Migrasyon çalışmalarında piyasadan sağlanan ürünlerin kullanılması halinde; bu ürünlerin içerik bilgilerine ilişkin araştırmaların da yapılarak çalışma içeriğinde sunulması, bu gibi durumların yaşanabileceğine ilişkin öngörünün bilimsel olarak kanıtlanması için yararlı olacaktır.

Yukarıda özetlenen migrasyon çalışmalarından da anlaşılacağı üzere, gıdalara ambalaj malzemesi kaynaklı gümüş NP geçişi söz konusu olup tez çalışması kapsamında gıda ambalaj malzemesi kaynaklı gümüş NP maruziyetinin toksik etkileri incelenmiştir.

Oral yolla alınan gümüş NP'lerin sindirim kanalında topaklanma/topakların dağılması, oksidatif çözünme, klor ile birleşme, sülfürlenme ve protein taç oluşumu gibi yapı değişikliklerine uğradığı; az bir kısmının bağırsaklardan emilerek sistemik dolaşıma geçtiği ve oral emiliminin % 1-4,2 civarında olduğu gösterilmiştir (187, 189, 190). Oral yolla maruz kalınan gümüş NP'lerin pek çok organa dağıldığı ve bazı organlarda uzun süre kalabildiği belirlenmiştir. Konu ile ilgili çalışmalarda ana hedef organın karaciğer olduğu, gümüş NP'lerin uygulama sonrasında kolon, ince bağırsak, kalp ve böbreğe de ulaşabildiği, kan-beyin engelini geçebildiği, plasenta ve fetüse ulaştığı, beyin ve testislerde maruziyetten iki ay sonra dahi yüksek konsantrasyonda

bulunmaya devam ettiği, beyin hücrelerinde 24 hafta süreyle kaldığı gösterilmiştir (196, 199, 201-203, 239).

Gümüş NP'lerin toksik etki mekanizmalarının aydınlatılması amacıyla gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda; bu parçacıkların reaktif oksijen türleri oluşturduğu, hücre içerisindeki oksidatif stresi arttırdığı, hücre zarının ve çeşitli organellerin yapı ve işlevinde bozulmalara yol açtığı, hücrenin otofaji mekanizmasını bozduğu, DNA hasarı ve kromozom bozuklukları oluşturarak hücre döngüsünü durdurduğu belirtilmiştir (208-210, 213-218, 403).

Gümüş NP'lerin bağırsak hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin incelenmesi amacıyla gerçekleştirilen *in vitro* bir çalışmada, gümüş NP ve selüloz nanofibril içeren nanokompozit uygulanan hücre kültüründe canlı hücre sayısında önemli azalma gözlenmezken; gümüş NP'lerin endositoz mekanizması ile hücre içerisine alındığı belirlenmiştir (219). Bir diğer hücre kültürü çalışmasında ise; 15 µg/ml'den yüksek konsantrasyonlarda gümüş NP uygulanan insan kolon hücre kültürlerinde ROT oluşumu, oksidatif stres düzeyinde artış ve apoptoz indüksiyonu yolu ile sitotoksik etki meydana geldiği bildirilmiştir (220). Deney hayvanları ile gerçekleştirilen oral toksisite çalışmaları sonucunda da gümüş NP'lerin, bağırsak epitel hücrelerinde mikrovillüs hasarına, emilim bozukluklarına, intestinal mukoza tabakasında incelmeye, dentritik hücrelerde apoptoza, enflamasyona ve bağırsak geçirgenliğinde bozulmaya yol açabildiği gösterilmiştir (221-224). Bununla birlikte; gümüş NP'lerin sindirim işlevleri, enerji dengesi ve metabolizma üzerinde önemli etkisi olduğu bilinen bağırsak mikrobiyotasında bozulmaya neden olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (200, 222, 225). Gümüş NP'lerin bağırsak mikrobiyotası üzerinde etkisinin incelendiği bir çalışmada, PVP veya sitratla kaplanmış gümüş NP'lerin farelerin bağırsak mikrobiyotasında önemli bir değişikliğe yol açmadığı belirtilmiştir (228).

Gümüş NP'lerin hedef organı olduğu bildirilen karaciğer üzerindeki toksik etkilerinin hücre kültürü çalışmaları yoluyla incelenmesi sonucunda, gümüş NP maruziyetinin hepatosit benzeri hücreler üzerinde doza bağlı olarak hücre canlılığında azalma ve kanser gibi hastalıklarla ilişkilendirilen gen ifade değişikliklerine neden olduğu belirlenmiştir (196, 198). Gümüş NP'lerin hepatotoksik etkilerinin incelendiği

hayvan deneylerinde ise, oral yolla gümüş NP maruziyeti sonucunda karaciğerde ROT düzeylerinde artış, karaciğer enzim düzeylerinde artış, DNA hasarı, karaciğer hücrelerinde biçimsel bozukluklar, otofaji ve insülin sinyal yollarında bozulma gerçekleştiği bildirilmiştir (230, 231).

Oral yolla gümüş NP uygulanan farelerin böbreklerinde ise oksidatif stres göstergelerinde artış, antioksidan enzim düzeylerinde azalma, tübül hücrelerinde nekroz, çeşitli histopatolojik değişiklikler ve kan üre konsantrasyonunda artış gözlemlendiği belirtilmiştir (232-234). Oral yolla uygulanan gümüş NP'lerin dişi farelerin böbreklerinde erkek farelerin böbreklerinden iki kat daha fazla oranda biriktiği gösterilmiştir. Bu çalışma, dişi bireylerin nefrotoksisite yönünden gümüş NP maruziyetine erkek bireylerden daha duyarlı olabileceğini göstermesi yönünden dikkat çekicidir.

Gümüş NP'lerin, kan-beyin engelinin geçirgenliğini, engelin yapısındaki hücrelerde işlev bozukluğu ve ölüme yol açarak attırdığı ve bu engeli aşabildiği; ayrıca beyinde uzun süre kalabildiği bilinmektedir (239, 240, 246). Literatürde gümüş NP'lerin nörotoksisitesine ilişkin çok sayıda *in vitro* ve *in vivo* çalışma yer almaktadır. Bu çalışmalarda özetle; gümüş NP'lerin nöron ölümüne, beyinde yapısal değişikliklere, anksiyeteye, hafıza işlevlerinde bozulmaya, davranışsal değişikliklere yol açtıkları ve hipertermi kaynaklı beyin hasarını ağırlaştırdıkları gösterilmiştir (216, 239, 242, 244-246). Gümüş NP'lerin mitokondriyal ROT artışı ile mitokondriyal yapı ve işlev bozukluklarına yol açtığı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla gösterilmiştir (216, 241). Gümüş NP'lerin nörotoksik etkilerine karşı yetişkin hayvanların daha dayanıklı, genç hayvanların ise daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (246). Bu bulgu, biberon, anne sütü saklama poşeti gibi bebeklerin maruziyetine yol açacak ürünlerde gümüş NP kullanımının yaratabileceği riskler açısından endişe uyandıracak niteliktedir.

Deney hayvanlarında, oral yolla uygulanan gümüş NP'lerin kardiyotoksik etkilerine ilişkin çok az sayıda veri bulunmaktadır. Örneğin; sekiz hafta süreyle ve oral yolla gümüş NP'lere maruziyetin sıçanlarda, nitrik oksit üretiminde artış, DNA oksidasyonu ve enflamasyona bağlı olabileceği öne sürülen kardiyotoksik etkiler meydana getirdiği gösterilmiştir (238).

Gebelik döneminde oral yolla gümüş NP uygulanan farelerin yavrularında, bağırsak mikrobiyotasında bozulma, beyin hasarı ve davranışsal değişiklikler görüldüğü bildirilmiştir (251-253). Diğer taraftan, söz konusu çalışmalardan daha yüksek dozda ve daha düşük boyutlu nanoparçacıklar uygulamasına rağmen Hong ve ark. (254) tarafından, çiftleşme öncesi, çiftleşme dönemi, gebelik ve doğum sonrasındaki NP maruziyetinin sıçan yavrularında anlamlı bir toksisiteye yol açmadığı belirlenmiştir. Ayrıca söz konusu araştırmada (254), literatürde yer alan çalışmaların (247-250) aksine, gümüş NP uygulamasının üreme sistemi toksisitesi oluşturmadığı bildirilmiştir.

Gümüş NP'lerin genotoksik etkilerine ilişkin olarak yapılan pek çok *in vitro* çalışmada bu NP'lerin genotoksik etkiler meydana getirdiği belirlenmiştir. Ancak; *in vivo* çalışmalarda kesin bir sonuca ulaşılamamıştır (257). Gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalarda, gümüş NP'lerin mitokondri ve çekirdek içerisine girebildiği, düşük konsantrasyonlarda bile DNA ve kromozom hasarı oluşturduğu, hem DNA hasarı hem de epigenetik yollarla metabolik düzene ve hücresel süreçlere etki edebildiği ve hücre döngüsünü durdurabildiği gösterilmiştir (218, 258, 259). Belirtilen genotoksik etkiler, oral yolla gümüş NP'lere maruz bırakılan fare ve sıçanlar ile gerçekleştirilen *in vivo* çalışmalarda ise önemli düzeyde gözlenmemiştir (198, 257).

Yukarıda özetlenen *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar, oral yolla gümüş NP maruziyetinin çeşitli organ ve sistemlerde toksik etkilere neden olabileceğini göstermektedir. Nanoparçacıklara ana maruziyet yollarının oral, dermal ve inhalasyon yolları olduğu bilinmekle birlikte (131); konu gıda endüstrisi özelinde ele alındığında, solunum ve cilt yoluyla maruziyet neredeyse tamamen bu endüstride çalışanların mesleki maruziyeti ile sınırlıdır ve son tüketicinin ana maruziyet yolu oral yoldur (404). Bu nedenle, tez çalışması kapsamındaki toksisite odaklı araştırmalarda oral yolla maruziyete ilişkin çalışmalara ağırlık verilmiştir. Nanoparçacıklara gıda ambalaj endüstrisinde kullanım nedeniyle mesleki maruziyet veya tüketicilerin cilt yoluyla maruziyeti konuları, tez çalışması kapsamında yer almamaktadır. Ancak; mesleki maruziyet de üzerinde önemle durulması gereken bir konudur (405) ve tüketicilerin cilt yolu ile maruziyetinin de söz konusu olabileceği düşünülmektedir. Bu durum, tez çalışmasının eksik bir yönü olarak değerlendirilebilecek olmakla birlikte; daha geniş nüfusu etkileyeceği öngörülen gıda kaynaklı maruziyet konusu, öncelikli olarak ve

oral maruziyet odaklı şekilde ele alınmıştır. İlerleyen tarihlerde gıda ambalajlarında nanoparçacık kullanımına bağlı mesleki maruziyet ve tüketicilerin cilt yoluyla maruziyeti alanlarında çalışma yapılması da planlanmaktadır.

Tez çalışması kapsamında yapılan araştırmalar sonucunda nanoparçacık içerikli gıda ambalaj malzemelerinde gümüş NP'ler dışında en yaygın olarak kullanılan nanoparçacıkların nanokiller olduğu görülmüştür.

Killer, tetrahedral ve oktahedral tabakaların bir araya gelmesiyle oluşan, yaklaşık 1 nm kalınlığında ve 8-10 µm'ye ulaşabilen uzunlukta nanoparçacıklardır (262, 263). Gıda ambalajlarında kullanılan nanokillere ilişkin literatür taramaları sonucunda bu alanda en çok kullanılan nanokil çeşitlerinin MMT, MMT'nin organik katyonik sürfaktanlarla modifiye edilmiş şekli olan kloisit çeşitleri, bentonit, kaolinit, halosit, sapionit olduğu görülmüştür.

Nanokiller polimer yapısına, esneklik, polimer sertliği ve engelleyici özellikleri iyileştirmek amacıyla eklenebilmektedir (268). Nanokiller, yapısına girdikleri polimerlerin gaz geçirgenliğini azaltır, antimikrobiyal etki gösterebilir veya esansiyel yağ ve antioksidanlar gibi maddelerin kontrollü salıverilmesini sağlar (54, 273-277).

Nanokillerin nitel incelemelerinde TEM, TEM-X-Ray Enerji Dispersiyon Spektroskopisi (TEM-EDS); nicel analizlerinde ise genellikle ICP-MS, AF<sup>4</sup> ve AAS yöntemleri kullanılmaktadır (52, 264, 270, 279).

Ambalaj malzemelerinden gıdaya nanokil geçişinin araştırıldığı spesifik migrasyon çalışmalarında nicel analizlerin, nanokil yapısında yer alan metallerin miktarının ölçümüne dayandığı görülmektedir (272, 283, 285, 286).

Simon ve ark. (58)'nin 2008 tarihli teorik çalışması sonucunda, yalnızca düşük dinamik viskoziteli matriks içerisinde çok küçük parçacıkların (1 nm'den küçük çapta) gıdaya geçiş yapabileceği bildirilmiştir. Duncan ve ark.(56) tarafından ise en/boy oranı oldukça büyük olan nanokillerin ambalaj malzemesinden gıdaya difüzyon ile geçişinin beklenmediği belirtilmiştir. Söz konusu çalışmalar, boyutlarından biri 8-10 µm uzunluğa kadar ulaşabilen nanoparçacıkların ambalaj malzemesinden gıdaya geçemeyeceğini düşündürse de; incelenen migrasyon

çalışmalarında nanokillerin gıdaya geçtiği kanıtlanmıştır. Söz konusu çalışmalar bir arada değerlendirildiğinde; nanokillerin gıdaya geçişinde difüzyon dışında mekanizmaların rol oynayabileceğini veya tek bir boyutun nano ölçekte olmasının geçiş için yeterli olabileceği düşünülmektedir. Tekrarlayan kullanımlarda gümüş NP'lerin gıdaya en yüksek miktarda migrasyonu ilk temas sonucunda gerçekleşirken (136); kil nanoparçacıklarında tekrarlayan temaslarda gıdaya geçiş miktarının arttığı görülmüştür. Bu durum da, iki nanoparçacığın gıdaya geçiş mekanizmalarının farklı olduğunu akla getirmektedir.

Tez çalışması kapsamında incelenen ve nanokil içerikli ambalaj malzemelerinden gıdaya nanokil geçişine yönelik araştırmaların genelinde, toplam migrasyonun yasal düzenlemeler ile belirlenen sınırların altında olduğu sonucuna varılmıştır. Diğer taraftan, nanokil katkılı gıda ambalaj malzemelerinden belirli koşullar altında toplam migrasyonun yasal sınırları aşabildiğine ilişkin bilgilere de ulaşılmıştır (293).

Nanokillerin işlevleri ve polimer içerisindeki dağılımı gibi özelliklerini iyileştirmek amacıyla silan, sürfaktanlar veya kuaterner amonyum tuzları kullanılarak modifikasyon işlemi gerçekleştirilebilir. Bu işlemin, killerin toksisitesi üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (285, 289, 290). Modifiye nanokil içeren gıda ambalajlarından nanokil modifikasyonunda kullanılan maddelerin gıdaya geçebildiği ve modifiye edici ajanın cinsinin migrasyon miktarı üzerinde etkili olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (264, 265, 291, 293).

Nanokillerin ambalaj malzemesindeki diğer maddelerin gıdaya geçişini azalttığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (293, 297, 300). Bu durum; ambalaj malzemesine nanokil eklenmesinin olumlu bir etkisi olarak düşünülebilecek olmakla birlikte; bazı çalışmalarda, nanokillerin diğer maddelerin gıdaya geçişini azaltıcı etkisi olmadığı (295), migrasyon azaltıcı etkinin bazı gıda benzerlerinde gözlenmediği (298) veya nanokillerin, örneğin, PLA filmlerden laktik asitin spesifik migrasyonunu arttırabildiği (294) yönünde bulgulara da ulaşılmıştır. Ayrıca; PET esaslı polimerlerde kullanılan nanokil konsantrasyonunun da polimer migrasyonunu azaltıcı veya arttırıcı yönde etki edebileceği de bildirilmiştir (302). Bu durum, kullanılacak nanokil konsantrasyonunun optimum düzeyde tutulmasının önemli olduğunu göstermektedir.

Nanokil içeren katmanın gıda ile doğrudan temas etmeyeceği şekilde koruyucu bir tabaka arkasına yerleştirildiği ambalaj malzemeleri de geliştirilmiştir (294, 296). Bu uygulama, gıdaya nanoparçacık geçişi gerçekleşmeyeceğini garantileyemeyecek olmakla birlikte; riski azaltmak için yararlı bir seçenek olarak değerlendirilebilir.

Nanokillerin toksikokinetiğine ilişkin çalışmaların çoğunluğu MMT ile gerçekleştirilmiştir. Deney hayvanlarına oral yolla uygulama sonrasında plazmada MMT yapısında bulunan metallerin konsantrasyonları ölçülerek MMT emiliminin gerçekleştiği gösterilmiştir (313, 314). Oral yolla, modifiye edilmiş veya edilmemiş MMT uygulaması sonrasında kil yapısında bulunan metallerin herhangi bir organda birikmediği belirlenmiştir (312-314); ancak deney hayvanlarının iç organlarında MMT modifikasyonunda kullanılan kuaterner amonyum tuzlarının tespit edilmiş olması dikkat çekicidir. Migrasyon çalışmaları sonucunda, kuaterner amonyum tuzlarının gıda benzerlerinde de bulunabileceği belirlenmiştir (264, 265). Bu modifiye edici ajanların kil yapısında kirlilik olarak bulunabileceği veya kilin sindirim kanalında gerçekleşen yıkımı sonucu ortaya çıkabileceği düşünülebilir. Deney hayvanlarına oral yolla uygulanan haloysit nanotüplerin ise, MMT'den farklı olarak, karaciğer, böbrek ve akciğerlerde birikebildiği belirlenmiştir (315, 316). LDH ile yapılan bir toksikokinetik çalışmada ise haloysit nanotüplerin plazma yarılanma ömürlerinin oldukça kısa olduğu ve büyük kısmının feçes ile atıldığı, bu yapıların 4 saat içerisinde vücuttan uzaklaştırıldığı gösterilmiştir (314).

Ezkhova ve ark. tarafından (339) sıçanlar üzerinde bentonitin oral toksisitesinin incelendiği bir çalışmada, bentonitin 0,1 ve 0,2 mg/kg konsantrasyonlarının güvenli olduğu, 0,5 g/kg konsantrasyonda ise sıçanların % 20'sinin öldüğü belirtilmiştir. Lee ve ark.'nın MMT'nin akut toksisitesini inceledikleri ve sıçanlara, 70 kg'lık bir insanın 100 mg MMT'ye maruz kalabilecek olmasından hareketle bu miktarın 100 katı MMT (yaklaşık 0,142 mg/kg) uyguladıkları çalışmada da toksisite gözlenmemiştir. Bentonit içeriğinin büyük ölçüde MMT'den oluştuğu (263) göz önünde bulundurulduğunda; sonuçların Ezkhova ve ark.(339)'nın çalışmasında elde edilen sonuçlar ile uyumlu olduğu değerlendirilebilir. Diğer taraftan; bir başka çalışmada MMT'den ayrıştırılan nanosilikat plakların oral yolla uygulandığı farelerde 5700 mg/kg dozda dahi ölüm gözlenmemiştir (320). Bu durum, Ezkhova ve ark. (339)'nın 0,5 g/kg dozda sıçanların % 20'sinin öldüğü yönündeki

bulgusu ile uyumlu görünmemektedir. Bu farklı sonuçların, türler arası farklılıktan veya MMT plaklarına ayrıştırma uygulanmış olmasından kaynaklanabileceği düşünülebilir.

Nanokillerin toksik etkilerinin incelenmesi amacıyla birçok *in vitro* çalışma da gerçekleştirilmiştir. Modifiye edilmemiş veya organomodifiye MMT (*Cloisite* çeşitleri) ile gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmaları sonucunda; bu maddelerin çeşitli hücre türleri üzerinde sitotoksositeye neden olabildiği (318, 320), hücre türlerinin sitotoksik etkilere karşı duyarlılıklarının birbirinden farklı olduğu (318, 326), toksisite üzerinde kil çeşidinin (325, 328) ve uygulanan konsantrasyonun (327) etkili olduğu gösterilmiştir. Sitotoksik etkilere karşı kolon ve karaciğer hücrelerinin duyarlılığının karşılaştırıldığı çalışmalarda HDTA ve ACO ile modifiye edilmiş MMT'nin sitotoksik etkilerine karşı bağırsak hücrelerinin karaciğer hücrelerine göre daha duyarlı olduğu gösterilmiş (318, 325), farklı ajanlarla modifiye edilmiş iki diğer MMT çeşidinde ise karaciğer hücrelerinin duyarlılığı kolon hücrelerinden daha yüksek bulunmuştur (325, 326). Bu durum, modifiye edici ajanın, nanokilin hedef organının belirlenmesi üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Maisanaba ve ark.'nın karaciğer ve kolon hücre kültürleri ile gerçekleştirdiği çalışmalarda, organomodifiye MMT türlerinin, modifiye edilmemiş MMT'den daha fazla sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir (326, 328). Ayrıca; organomodifiye MMT üretiminde kullanılan modifiye edici ajan kalıntılarının da risk oluşturabileceği bildirilmiştir. Janer ve ark. (319) da modifiye edilmiş MMT toksisitesine ilişkin olarak gerçekleştirdikleri hücre kültürü çalışmaları sonucunda, üretim aşamalarından kalan fazla modifiye edici miktarının uzaklaştırılması yönünde öneride bulunmuştur. Bu öneri, modifiye edici kaynaklı riskin azaltılması için yararlı görülmektedir. Bu durum, organomodifiye MMT içeren gıda ambalaj malzemelerinin üretim basamaklarına, fazla modifiye edici ajandan arındırma işleminin dahil edilmesinin uygun olacağını düşündürmektedir.

Modifiye edilmemiş MMT'nin genotoksik etkilerine ilişkin Li ve ark. (320) tarafından hem *in vivo* hem *in vitro* incelemelerin yapıldığı bir çalışmada, genotoksosite gösteren bir bulgu belirlenmemesine rağmen; Maisanaba ve ark. (329)'nın karaciğer hücre kültürü ile gerçekleştirdiği bir çalışmada MMT'nin

genotoksisite potansiyeli taşıdığı sonucuna varılmıştır. MMT'nin genotoksik etkisi açısından birbirinden farklı sonuçlar elde edilmesinin nedeninin, kullanılan farklı yöntemlerle ilişkili olabileceği veya Li ve ark.'nın çalışmasında (320) MMT'nin nanosilikat plakalara ayrılarak uygulanmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür.

Organomodifiye MMT çeşitleri ile gerçekleştirilen *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda da bazı kil çeşitlerinin genotoksik etki gösterdiği belirlenmişken, bazı kil çeşitlerinin ise genotoksik etki meydana getirmediği gösterilmiştir (317, 330, 331). Sharma ve ark.(332)'nin karaciğer hücre kültürü ile gerçekleştirdikleri bir çalışmada, organomodifiye bir nanokil çözeltisi ve bu çözeltilen nanokilin filtrelenerek uzaklaştırılmış şeklinin her ikisinin de genotoksisiteye yol açması nedeniyle genotoksik etkinin modifiye edici ajan ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Janer ve ark.(319)'nın sitotoksisite yönünden elde ettiği sonuçlara benzer bir durumun bu çalışma sonucunda da belirlenmesi, modifiye edici ajanların toksik etkiler açısından oluşturduğu tehlikeye dikkat çekmesi nedeniyle önem taşımaktadır .

Modifiye edilmiş ve edilmemiş MMT (Cloisite 30B) ile gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalarda (329, 332) genotoksik etki tespit edilirken *in vivo* çalışmalarda (317, 320) genotoksik etkinin belirlenmemesi, nanokillerin düşük oral biyoyararlanımı ile ilişkilendirilebilir.

Halositin toksik etkilerinin araştırılması amacıyla gerçekleştirilen 30 günlük *in vivo* toksisite çalışmasında oral ve parenteral yollardan uygulanması ile hayvanların genel durumunda herhangi bir değişiklik veya karaciğer ve böbrek üzerinde toksisite gözlenmemiştir (315). Ancak; oral yolla uygulanan halositin farelerin akciğerlerinde oksidatif stres, enflamasyon ve fibrozise neden olduğu gösterilmiştir (316).

Akciğer hücreleri üzerinde nanokillerin ve nanokillerin ısıl yıkım ürünlerinin toksik etki gösterdiği çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir. (322-324). Wagner ve ark. (324) tarafından da dikkat çekildiği üzere nanokil içeren ambalaj malzemelerinin üretim ve imhası işlemlerine bağlı mesleki maruziyet gerçekleşmesi söz konusudur. Bu nedenle; bu maddelere mesleki maruziyetin yaratabileceği risklerin daha ayrıntılı şekilde incelenmesi de önem taşımaktadır.

Toksikolojik özellikleri henüz tam olarak aydınlatılamamış olan nanoparçacıkların gıda endüstrisinde güvenli şekilde kullanımı ancak nanoparçacık özellik ve toksisitesinin tam olarak anlaşılması ile mümkün olabilecektir. Gıda endüstrisinde artan kullanımları dikkate alındığında bu parçacıkların daha iyi şekilde tanımlanması ve kullanımlarına yönelik mevzuat düzenlemeleri yapılması gerektiği görülmektedir (22).

Bu parçacıkların gıda ambalajlarında kullanımına ilişkin sınırlama ve kurallar ise ülkeden ülkeye değişiklik göstermektedir. Tez çalışması kapsamında, çeşitli ülkelerde ve Türkiye’de gıda ambalaj malzemelerinde nanoparçacık kullanımına ilişkin mevzuatın güncel durumu incelenmiştir.

Nanoparçacıkların analizi ve test yöntemlerinin geliştirilmesi amacıyla EC, EFSA, FDA, EPA, DSÖ, OECD gibi kuruluşlar tarafından çalışmalar yürütülmektedir (344).

Avrupa Birliği ülkelerinde gıda ile temas eden malzemelere yönelik ana düzenleme 1935/2004 numaralı çerçeve mevzuattır. Çerçeve yönetmeliğe bağlı olan ve belirli ürün grupları için uygulanan alt mevzuattan “aktif ve akıllı ambalaj malzemeleri” ile “gıda ile temas eden plastik malzemeler” tebliğleri nanoparçacıklara ilişkin düzenlemeleri içermektedir. Gıda ile temas eden plastik malzemeler içerisinde sadece, tebliğ eki Birleştirilmiş Listede açıkça belirtilen nanoparçacıkların kullanımı mümkündür. Söz konusu listeye madde eklenmesi ise üreticiler tarafından yapılan başvuruların, EU 1935/2004 düzenlemesinin 8. ve 9. maddeleri uyarınca, EFSA görüşü alınarak değerlendirilmesi sonucunda gerçekleştirilebilir.

Avrupa Gıda Güvenliği Ajansı tarafından ilk olarak 2009 yılında nanoparçacıkların gıda ve gıda güvenliği açısından oluşturduğu riskler üzerine bir rehber yayımlanmış ve bu rehberde nanoparçacıkların geleneksel maddelerden önemli farklılıklara sahip olmaları nedeniyle “olguya özgü-teker teker” değerlendirilmesi gerektiği vurgulanmıştır. (59).

Avrupa Gıda Güvenliği Ajansı tarafından 2011, 2018 ve 2021 yıllarında ise gıda sektöründe kullanılan nanoparçacıkların risk değerlendirmelerine ilişkin kılavuzlar yayımlanmıştır (347). Ayrıca 2021 yılında EFSA tarafından, nano ölçekteki

maddelere özel değerlendirme gereken maddelerin belirlenmesine yönelik olarak da bir kılavuz yayımlanmıştır (348). Söz konusu kılavuzlar çerçevesinde gıda ambalaj malzemelerinde kullanımı EFSA tarafından değerlendirilen ve uygun görülen nanoparçacıklara, “gıda ile temas eden plastik malzemeler” ekindeki Birleştirilmiş Listede yer verilir ve bu nanoparçacıklar gıda ambalaj malzemelerinde listede belirtilen koşullar çerçevesinde kullanılabilir. (346).

Brezilya’da da AB mevzuatına benzer bir pozitif liste uygulaması yürütüldüğü ve ilgili tebliğin ek listesinde açık şekilde belirtilen nanoparçacıkların gıda ambalajlarında kullanımına izin verildiği görülmektedir. 326 nolu RDC ise gıda ile temas edecek plastik malzemelere ilişkin düzenlemeler getirmekte ve nanoparçacıklara ilişkin içeriği AB’nin *EU 10/2011* düzenlemesi ile benzerlikler göstermektedir (365).

Amerika Birleşik Devletleri’nde gıda ambalaj malzemeleri ve bu malzemelerin yapısına giren maddeler, Federal Gıda, İlaç ve Kozmetik Kanunu kapsamında düzenlenmektedir. FDA tarafından NP’lerin gıda ambalajları dahil olmak üzere gıda endüstrisinde kullanımına ilişkin olarak 2014 yılında, bağlayıcı bir nitelikte olmayıp tavsiye niteliği taşıyan bir kılavuz yayımlanmıştır (349). FDA 2014 yılında yine endüstriye yönelik olarak ürünlerin nanoteknoloji içerip içermediğine ilişkin değerlendirme esaslarını belirleyen farklı bir kılavuz yayımlanmıştır (351). Nanoparçacıkların tanımlanması ve kullanımına ilişkin iki farklı kılavuz bulunması, EFSA’nın iki rehberli uygulamasına benzer olmakla birlikte; EFSA rehberlerinin ve AB mevzuatının daha bağlayıcı olduğu dikkat çekmektedir.

Federal Gıda, İlaç ve Kozmetik Kanunu’nun 4. Alt Bölümü 348 numaralı kısmının (21 *U.S.C.* 348) (h) bendi gereğince gıda ile temas etmesi planlanan malzemeler için piyasaya sunulmadan en az 120 gün önce FDA’ya başvuruda bulunulması gereklidir. Başvurunun FDA’ya ulaşmasından itibaren 120 gün içerisinde FDA tarafından ürünün güvenli olmadığına ilişkin herhangi bir itiraz ortaya konmadığı takdirde ürün kullanıma sunulabilmektedir (354).

Amerika Birleşik Devletleri’nde federal kuruluşların kurallarını kaydettiği CFR’nin 21 numaralı başlık, birinci bölüm, B alt bölümünde, gıdyla temas edecek maddeler için FDA’nın düzenlemeleri ortaya konmuştur. Düzenlemenin “dolaylı

(*indirekt*) gıda maddesi” olarak tanımlanan gıda ile temas eden maddelere ilişkin 174. maddesine göre; iyi üretim uygulamalarına uygun üretilmiş olması koşuluyla, gıda veya gıda ambalajlaması uygulamaları açısından GRAS listesinde yer verilen maddeler, CFR’nin ilgili bölümünde kullanımına izin verildiği belirtilen maddeler, daha önce kullanımına onay almış maddeler veya FCN bildirimini bulunan maddeler gıda ambalajlarında güvenli olarak kullanılabilir. Düzenlemenin 170. maddesine göre ise karsinojen olmayan veya karsinojen safsızlık içermeyen, 1,5 µg/gün’den daha az maruziyeti öngörülen maddeler, belirlenen ADI değerinin % 1’inden az bir maruziyet oluşacağı öngörülen maddeler, gıda üzerinde teknik bir etki göstermeyen maddeler, çevresel risk oluşturmaması durumunda “eşik limit altında” kabul edilir ve düzenlemeden muaf tutulur. Bu maddeler Yasal Düzenleme Sınırı Listesi (*The Threshold of Regulation, TOR*)’inde kayıtlıdır.

Gıda Temas Bildirimi uygulamasının usul ve esasları, CFR’nin 1. Bölüm B alt bölümü 170. Kısımında belirlenmiştir. Buna göre gıdaya temas edecek malzemeleri piyasaya sunmak isteyen üretici veya tedarikçiler FDA’ya FCN sunarlar. Aynı ürünü piyasaya farklı üretici veya tedarikçiler sunacak dahi olsa her biri ayrı başvuru yapmak durumundadır. Başvuruların içeriği, hangi durumlarda başvuru gerekmediği ve benzeri konular CFR içeriğinde ayrıntılı şekilde belirlenmiştir (360).

Bentonit direkt gıda katkı maddeleri GRAS listesinde, kil (kaolin) ise dolaylı gıda katkı maddeleri GRAS listesinde yer almaktadır. Ancak; FDA, GRAS listelerinde yer alan maddelerin nano formunun da güvenli olduğu sonucuna varılamayacağını belirtmektedir (345). Gıda Temas Bildirimleri listesinde yer alan bazı nanoparçacıklar; silika-nano gümüş, çeşitli ajanlarla modifiye edilmiş MMT ve kurşun-kalay oksittir. TOR listesinde gümüş içeren *Bactiblock* isimli (% 0,5’e kadar gümüş içeren polimerlerde) bir adet polimer katkı maddesine yer verilmiştir (361).

Avusturalya’da nanoparçacıkların gıda ambalajlarında kullanımına yönelik henüz özel bir mevzuat düzenlemesi bulunmadığı (373); ancak bu kapsamda mevzuat ve politika çalışmaları yürütülmesinin planlandığı görülmektedir (374).

Kanada Sağlık Bakanlığı internet sitesinde, gıda ambalajlarında kullanılan nanoparçacıklara özel bir mevzuat bulunmamasıyla birlikte; bu maddeler için geleneksel

maddeler hakkında yürürlükte bulunan düzenlemeler çerçevesinde bire bir inceleme yapıldığı bilgisi paylaşılmıştır (364).

Japonya’da da gıda ambalaj malzemelerinde kullanılabilecek maddeler için pozitif liste uygulaması yürütüldüğü; ancak nanoparçacıklara ilişkin özel bir düzenlemeye yer verilmediği görülmüştür (370).

Nanoparçacıkların gıda ambalajlarında kullanımı açısından ülkemizdeki yasal düzenlemeler incelendiğinde ise; mevzuatın AB ülkelerindeki ile büyük ölçüde benzerlik gösterdiği dikkati çekmektedir.

“Türk Gıda Kodeksi Gıda ile Temas Eden Madde ve Malzemelere Dair Yönetmelik”ten dayanakla gıda ile temas eden plastik malzemelere ilişkin “Türk Gıda Kodeksi Gıda ile Temas Eden Plastik Madde ve Malzemeler Tebliği” yayımlanmıştır. Söz konusu tebliğ, Avrupa Birliği ülkelerinde uygulanan *EU/10/2011* mevzuatı ile büyük ölçüde benzerlik göstermektedir. Zaten; sözü geçen tebliğin 15. maddesinde de, tebliğin 10/2011 sayılı Gıda ile Temas Eden Plastik Madde ve Malzemelere İlişkin Komisyon Tüzüğü dikkate alınarak Avrupa Birliği mevzuatına uyum çerçevesinde hazırlandığı belirtilmiştir. “Türk Gıda Kodeksi Gıda ile Temas Eden Madde ve Malzemelere Dair Yönetmelik”in 6. maddesi ikinci fıkrası gereğince nanoformdaki maddeler yalnızca tebliğ eki Ek-1’de yer alan özel kurallarda izin verilmişse kullanılabilir. *EU/10/2011*’de olduğu gibi; tebliğ eki Ek-1’de yer verilmeyen nanoformdaki malzemelerin çok katmanlı plastik malzemelerde gıda ile doğrudan temas etmese dahi kullanımı yasaktır (377).

Tebliğ eki Ek-1 listesi incelendiğinde, listenin de *EU/10/2011* eki *Union Liste*’de yer alan nanoparçacıkları içerdiği; listede silikon dioksit, kaolin, karbon karası, titanyum nitrit, divinil benzen ile çapraz bağlanmış (bütadien, etil akrilat, metil metakrilat, stiren) kopolimeri, çapraz bağlanmamış (bütadien, etil akrilat, metil metakrilat, stiren) kopolimeri, (metakrilik asit, etil akrilat, n-bütül akrilat, metil metakrilat, bütadien) kopolimeri, çeşitli ajanlarla modifiye edilmiş MMT türleri, 1,3-bütandiol dimetilakrilat ile çapraz bağlı (bütadien, etil akrilat, metil metakrilat, stiren) kopolimeri, kaplanmamış çinko oksit, [3-(metakriloksi)propil] trimetoksisilan ile kaplı çinko oksit nanoparçacıklarının bulunduğu görülmektedir (377).

Ülkemizde de nanokompozit gıda ambalaj malzemelerinin yapısına girmesine izin verilen maddelerin yer aldığı “Türk Gıda Kodeksi Gıda ile Temas Eden Plastik Madde ve Malzemeler Tebliği” eki EK-1 listesine yeni madde girişi için ilgili üretici firmalarca başvuru yapılmakta; başvurular Tarım ve Orman Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü tarafından değerlendirilmeden önce konu hakkında bilimsel komisyon görüşü alınmaktadır. Bu uygulama da, AB ülkelerinde EFSA tarafından yapılan değerlendirme çalışmaları ile benzerlik göstermektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yüzyılın çığır açan teknolojilerinden bir tanesi olan nanoteknolojiden, tıp, eczacılık, bilişim, tekstil gibi pek çok alanın yanı sıra gıdaların üretim ve saklamasında da yararlanılmaktadır. Gıda endüstrisinde nanoteknoloji kullanımı içerisinde gıda ambalajlamasının önemli bir yere sahip olduğu ve bu sektörün hızla gelişen bir alan olduğu belirlenmiştir. Öte yandan, yeni bir alan olan nanoteknolojinin gıda endüstrisinde kullanımının sağlık üzerinde yaratacağı riskler endişe vericidir.

Nanoparçacıkların, sahip oldukları fizikokimyasal, optik ve benzeri özellikleri nedeniyle geleneksel maddelerden çok farklı toksikolojik özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Tez çalışması kapsamında doğal ve insan yapımı nanoparçacıkları temsilen seçilen gümüş NP'ler ve nanokillerin de canlılar üzerinde toksik etki gösterme potansiyeli taşıdığı ve bu etkilerin henüz tam olarak aydınlatılamamış olduğu görülmüştür.

Nanokiller ve gümüş NP'lerin ambalaj malzemesinden gıdaya geçişinin incelenmesi amacıyla yapılan migrasyon çalışmaları incelendiğinde de, bu maddelerin gıdaya geçişinin mümkün olduğu ve bu nedenle tüketiciler için oral maruziyetlerinin söz konusu olabileceği anlaşılmaktadır. Yapılan çalışmaların bir kısmında nanoparçacıkların gıdalara yasal düzenlemeler ile belirlenen sınırları aşan miktarda geçtiği gösterilmiştir. Gıda ambalajlarından gıdaya yasal sınırların altında NP geçişi gerçekleşen gıda ambalajlarının kullanımının da, az miktarda olsa dahi sürekli bir maruziyet oluşturarak sağlık açısından risk oluşturabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Geleneksel maddelerden oldukça farklı fizikokimyasal ve optik özelliklere ve davranış biçimine sahip olan nanoparçacıkların ambalaj malzemesinden gıdaya geçişine ilişkin çalışmalar ile bu maddelerin toksik etkilerinin incelendiği araştırmalarda ve nitel/nicel analizlerde zorluklarla karşılaşıldığı bilinmektedir. Bu nedenle; bu maddelerin belirlenmeleri, ölçümleri ve toksisite testleri için özel ve bu maddelere özgü standardize test yöntemlerinin geliştirilmesi gerektiği görülmektedir.

Yeni bir teknolojinin kullanıma girmesi aşamasında, öncelikle güvenliliğinin güçlü kanıtlar ile ortaya konması ve taşıdığı risklerin, kullanımının zorunluluğu ve

sağlayacağı fayda ile bir arada değerlendirilmesi gerekmektedir. Örneğin; yeni bir teknolojinin karşılanmamış bir tıbbi ihtiyaca yönelik kullanımı durumunda kabul edilebilecek risk miktarı ile zaten belirli bir ölçüye kadar karşılanabilmekte olan bir ihtiyaca yönelik kullanımı durumunda kabul edilebilecek risk miktarı birbirinden farklı olacaktır. Bu çerçeveden bakıldığında; eldeki teknolojiler ile temel işlevleri sağlanabilen gıda ambalajlarında, güvenliliği tam olarak ortaya konmamış bir teknolojinin kullanımının gerekliliği tartışmalıdır. Gıda ambalajlarında nanoparçacıklardan yararlanılmasının, gıda savurganlığının azaltılması, gıda kalitesinin korunması ve gıda kaynaklı bazı hastalıkların engellenmesine hizmet edeceği açık olmakla birlikte; bu teknolojinin hızlı ve yaygın bir şekilde kullanıma girmesi için yeterli veri bulunup bulunmadığı konusunun ilgili otoritelerce titizlikle incelenmesi gerekmektedir. Düzenleyici ve yönlendirici otoritelerin nanoteknoloji esaslı gıda ambalajlarının oluşturduğu riskler konusunda gerekli incelemeleri yaparak, ilgili rehberleri ve yasal düzenlemeleri hazırlaması büyük önem taşımaktadır.

Nanoteknoloji esaslı gıda ambalajlarının güvenliliği konusunda yeterli miktarda ve nitelikte bilimsel araştırmanın yapılması, konu hakkında bilimsel araştırmalar sonucunda oluşturulan verilerin ilgili otoritelerce değerlendirilmesi ve yetkili organlarca bu değerlendirmeler ışığında gerekli yasal düzenlemelerin hayata geçirilmesi önemlidir. Avrupa Birliği ülkelerinde gıda ambalajlarında nanoparçacık kullanımına yönelik çeşitli kılavuzlar oluşturulduğu ve yasal düzenlemelerin yürürlüğe konmuş olduğu; ülkemizde de Avrupa Birliği müktesebatına uyum çerçevesinde benzer yasal düzenlemeler yapıldığı görülmektedir. Henüz Kanada ve Japonya gibi gelişmiş ülkelerde nanoteknoloji esaslı gıda ambalajlarına yönelik özel düzenlemeler bulunmazken ülkemizde bu alanda mevzuat hazırlanmış olması olumlu bir durumdur. Öte yandan; yasal düzenlemelerin yürürlüğe girmesi tek başına yeterli olmayıp, bu düzenlemelere uyulup uyulmadığının da yetkili kurum ve kuruluşlarca titizlikle denetlenmesi gerekmektedir. AB ülkeleri ve ülkemizde, gıda ambalajlarında kullanılacak plastiklerde yer almasına izin verilen nanoparçacıkların ilgili tebliğ ekinde yer alan pozitif liste ile sınırlı olduğu görülmüştür. Bununla birlikte; nanoparçacıkların fizikokimyasal ve dolayısıyla toksikolojik özellikleri, sentez yöntemi ve içerisinde bulunduğu ortama göre dahi değişiklik gösterebilmektedir. Bu düzeyde çeşitlilik ve belirsizlik taşıyan nanoparçacıkların güvenli kullanımının,

yalnızca nanoparçacık ismi, boyutu ve kullanım şekli belirtilen pozitif liste uygulaması ile sağlanmasının mümkün olmayacağı düşünülmektedir. Ayrıca, ülke sınırları dışında üretilerek ithalat yoluyla iç pazara giren ürünlerin de varlığı göz önüne alındığında, ülkelerin vatandaşlarını yalnızca gıda ambalajı üretimine ilişkin mevzuat düzenlemeleri yoluyla koruyamayacağı açıktır.

İncelenen bazı çalışmalarda; gıda ambalaj malzemesinde yer aldığı beyan edilmeyen bazı nanoparçacıkların gıda ambalaj malzemelerinde yer aldığı tespit edilmiştir. Bu durum, tüketicilerin, bilinçsiz bir şekilde de gıda ambalajı kaynaklı NP maruziyeti ile karşı karşıya kalabileceğini göstermesi açısından önemlidir.

Nanoparçacık içeren gıda ambalajlarından gıdaya NP geçişinin sıcaklık, temas süresi, mikrodalga fırında ısıtma gibi uygulamalardan etkilendiği birçok çalışma ile ortaya konmuştur. Bu nedenle piyasaya sunulan NP içerikli gıda ambalajlarının hangi gıda malzemeleri ile temas halinde ve hangi koşullarda kullanılabileceği ile ilgili olarak da duruma özgü değerlendirme yapılması ve tüketicinin bu yönde bilgilendirilmesinin sağlanması gerekmektedir.

Yapılan incelemelerde bebek ve çocukların kullanımına yönelik anne sütü saklama poşeti ve biberon gibi malzemelerde de NP kullanımı olduğu görülmüştür. Kimyasal kaynaklı risklere karşı daha duyarlı olan bebek ve çocukların kullanımı için geliştirilen ürünlerde, güvenliliği tam olarak ortaya konmamış olan yeni bir teknolojinin kullanımı endişe verici olarak değerlendirilmektedir.

Geliştirilen bazı gıda ambalajlarında, ambalajın NP içeren kısımların gıda ile temasının koruyucu bir tabaka kullanılarak engellendiği görülmüştür. Bu uygulama, gıdaya NP geçişi ve maruziyeti azaltmak açısından yarar sağlayabilecek olmakla birlikte maruziyet riskini tamamen ortadan kaldırmadığı düşünülmektedir.

Gıda ambalajlarında nanoparçacık kullanımının sadece gıda tüketicilerinin oral yolla maruziyeti ile kısıtlı olmayacağı dikkate değer bir başka konudur. Bu maddelere tüketicilerin kullanım aşamasında cilt yoluyla, üretimde ve imhasında görev alan işçilerin ise oral, inhalasyon ve dermal yolla maruziyetinin söz konusu olabileceğinin de göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

Nanoparçacık içeren gıda ambalajlarının uygun şekilde imha edilmemesi durumunda çevreye NP salıverilmesine neden olabileceği; bu şekilde besin zinciri yolu ile de NP maruziyeti gerçekleşebilmesi ve bu maddelerin ekosisteme zarar verme potansiyeli de endişe vericidir.

Ayrıca; gümüş ve metal oksit NP'ler gibi antimikrobiyal özellikteki NP'ler, antibiyotik direncinin önemli bir sorun olmaya başladığı günümüzde değerli bir seçenek oluşturmaktadır. Ancak; bu maddelerin gıda sektörü gibi tüketimin yüksek olduğu alanlarda yaygın kullanımının, uzun vadede bu antimikrobiyalere de direnç gelişmesiyle sonuçlanabileceği ve insanoğlunun mikroorganizma kaynaklı hastalıklarla mücadelesi için önemli bir silahının kaybına yol açabileceği de düşünülmelidir.

Özetle;

- Gıda ambalajlarından gıdaya NP geçişinin ve bu maddelerin toksik etkilerinin aydınlatılması amacıyla kanıt değeri yüksek bilimsel çalışmaların yapılması gerektiği,
- Nanoparçacıkların karmaşık gıda ortamı içerisinde belirlenmesi ve ölçümü ile NP'lerin toksik etkilerinin incelenmesi için uygun standardize test yöntemlerinin geliştirilmesinin ve bu şekilde gerçek gıdalar ile gerçekleştirilecek migrasyon çalışmalarının sayısının artırılmasının gerektiği,
- Nanoparçacıkların gıda ambalajlarında kullanımının oluşturacağı riskleri en aza indirmek için düzenleyici ve denetleyici otoritelerin, bilimsel veriler ışığında gerekli düzenlemeleri yapması ve yeterli denetim mekanizmalarını işleterek düzenlemelere uyulmasını sağlaması gerektiği,
- Gıda ambalajlarında NP kullanımının yaratabileceği risklerin yalnızca tüketici odaklı olarak değil, mesleki ve çevresel toksisite gibi konular da dikkate alınarak kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesinin gerektiği,
- Göreceli olarak yeni bir teknoloji olan nanoteknolojinin bu teknolojinin yaratabileceği riskler tam olarak aydınlatılmadan gıda ambalajlarında kullanımına karşı mesafeli bir duruş sergilenmesinin yerinde olacağı,

değerlendirilmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Sozer N, Kokini JL. Nanotechnology and its applications in the food sector. *Trends Biotechnology*. 2009;27(2):82-9.
2. Rauscher H, Rasmussen K, Sokull-Klüttgen B. Regulatory Aspects of Nanomaterials in the EU. *Chemie Ingenieur Technik*. 2017;89(3):224-31.
3. Landsiedel R, Ma-Hock L, Kroll A, Hahn D, Schnekenburger J, Wiench K, et al. Testing metal-oxide nanomaterials for human safety. *Advanced Materials*. 2010;22(24):2601-27.
4. Rasmussen K, Riego Sintes J, Rauscher H. How nanoparticles are counted in global regulatory nanomaterial definitions. *Nature Nanotechnology*. 2024;19(2):132-8.
5. Peters RJB, Bouwmeester H, Gottardo S, Amenta V, Arena M, Brandhoff P, et al. Nanomaterials for products and application in agriculture, feed and food. *Trends Food Science and Technology*. 2016;54:155-64.
6. Janjarasskul T, Suppakul P. Active and intelligent packaging: The indication of quality and safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2018;58(5):808-31.
7. Hannon JC, Kerry J, Cruz-Romero M, Morris M, Cummins E. Advances and challenges for the use of engineered nanoparticles in food contact materials. *Trends in Food Science and Technology*. 2015;43(1):43-62.
8. Hagen M, Drew R. Nanotechnologies in food packaging: an exploratory appraisal of safety and regulation. *Food Standards Australia New Zealand*. 2016;75(1).
9. Majid I, Ahmad Nayik G, Mohammad Dar S, Nanda V. Novel food packaging technologies: Innovations and future prospective. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 2018;17(4):454-62.
10. Silvestre C, Duraccio D, Cimmino S. Food packaging based on polymer nanomaterials. *Progress in Polymer Science*. 2011;36(12):1766-82.
11. Sekhon BS. Food nanotechnology—an overview. *Nanotechnology, science and applications*. 2010:1-15.
12. Bumbudsanpharoke N, Choi J, Ko S. Applications of Nanomaterials in Food Packaging. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2015;15(9):6357-72.
13. Bumbudsanpharoke N, Ko S. Nano-food packaging: an overview of market, migration research, and safety regulations. *Journal of Food Science*. 2015;80(5):R910-23.
14. Shankar VS, Thulasiram R, Priyankka A, Nithyasree S, Sharma AA. Applications of Nanomaterials on a Food Packaging System—A Review. *Engineering Proceedings*. 2024;61(1):4.
15. Peters R, Brandhoff P, Weigel S, Marvin H, Bouwmeester H, Aschberger K, et al. Inventory of nanotechnology applications in the agricultural, feed and food sector. *EFSA Supporting Publications*. 2014;11(7):621E.

16. Antunovic B, Barlow S, Chesson A, Flynn A, Hardy A, Jany KD, et al. Guidance on the risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain EFSA Scientific Committee. *Efsa Journal*. 2011;9(5).
17. Adeyeye SAO, Ashaolu TJ. Applications of nano-materials in food packaging: A review. *Journal of Food Process Engineering*. 2021;44(7).
18. Chadha U, Bhardwaj P, Selvaraj SK, Arasu K, Praveena S, Pavan A, et al. Current Trends and Future Perspectives of Nanomaterials in Food Packaging Application. *Journal of Nanomaterials*. 2022;2022(1).
19. Franz R, Bott J, Stormer A. Considerations for and Guidance to Testing and Evaluating Migration/Release of Nanoparticles from Polymer Based Nanocomposites. *Nanomaterials (Basel)*. 2020;10(6).
20. Souza VGL, Fernando AL. Nanoparticles in food packaging: Biodegradability and potential migration to food-A review. *Food Packaging and Shelf Life*. 2016;8:63-70.
21. Paidari S, Tahergorabi R, Anari ES, Nafchi AM, Zamindar N, Goli M. Migration of Various Nanoparticles into Food Samples: A Review. *Foods*. 2021;10(9).
22. Onyeaka H, Passaretti P, Miri T, Al-Sharify ZT. The safety of nanomaterials in food production and packaging. *Current Research in Food Science*. 2022;5:763-74.
23. Trinetta V. OBSOLETE: Definition and Function of Food Packaging. Reference Module in Food Science. 2018.
24. Kokangül H, Fenercioğlu H. Gıda Endüstrisinde Akıllı Ambalaj Kullanımı. *Electronic Journal of Food Technologies*. 2012;7(2):31-43.
25. Mihindukulasuriya SDF, Lim LT. Nanotechnology development in food packaging: A review. *Trends in Food Science and Technology*. 2014;40(2):149-67.
26. Berger K. A Brief History of Packaging. University of Florida IFA Extension. 2002.
27. Risch SJ. Food packaging history and innovations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009;57(18):8089-92.
28. Brody AL, Bugusu B, Han JH, Sand CK, McHugh TH. Scientific status summary. Innovative food packaging solutions. *Journal of Food Science*. 2008;73(8):R107-16.
29. Sharma C, Dhiman R, Rokana N, Panwar H. Nanotechnology: An Untapped Resource for Food Packaging. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8.
30. Robertson GL. *Food Packaging and Shelf Life: A Practical Guide*: CRC Press; 2009.
31. Yam KL, Takhistov PT, Miltz J. Intelligent packaging: concepts and applications. *Journal of Food Science*. 2005;70(1):R1-R10.
32. Sanchez Garcia MD, Lagaron JM. *Nanocomposites for Food and Beverage Packaging Materials*. Food Materials Science and Engineering: Blackwell Publishing Ltd; 2012.

33. Marsh K, Bugusu B. Food packaging--roles, materials, and environmental issues. *Journal of Food Science*. 2007;72(3):R39-55.
34. Pereira de Abreu DA, Cruz JM, Paseiro Losada P. Active and Intelligent Packaging for the Food Industry. *Food Reviews International*. 2012;28(2):146-87.
35. Sen C, Das M. Trends in Food packaging technology. *Food Process Engineering: Apple Academic Press*; 2016. p. 37-58.
36. Huff K. Active and intelligent packaging: innovations for the future. Department of Food Science & Technology Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Va. 2008:1-13.
37. Espeau P, Mondieig D, Haget Y, Cuevas-Diarte M. 'Active'package for thermal protection of food products. *Packaging Technology and Science: An International Journal*. 1997;10(5):253-60.
38. Ahvenainen R. Novel Food Packaging Techniques. Ahvenainen R, editor: CRC Press; 2000.
39. McMillin KW. Where is MAP Going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat. *Meat Science*. 2008;80(1):43-65.
40. Sivertsvik M, Rosnes JT, Bergslien H. Minimal Processing Technologies in the Food Industries. In: Ohlsson T, Bengtsson N, editors. *Minimal Processing Technologies in the Food Industries*: CRC Press; 2000.
41. Rhim J-W, Park H-M, Ha C-S. Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Progress in Polymer Science*. 2013;38(10-11):1629-52.
42. Avella M, De Vlieger JJ, Errico ME, Fischer S, Vacca P, Volpe MG. Biodegradable starch/clay nanocomposite films for food packaging applications. *Food Chemistry*. 2005;93(3):467-74.
43. Ghanbarzadeh B, Oleyaei SA, Almasi H. Nanostructured Materials Utilized in Biopolymer-based Plastics for Food Packaging Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2015;55(12):1699-723.
44. Wyser Y, Adams M, Avella M, Carlander D, Garcia L, Pieper G, et al. Outlook and Challenges of Nanotechnologies for Food Packaging. *Packaging Technology and Science*. 2016;29(12):615-48.
45. Azeredo HMCd. Nanocomposites for food packaging applications. *Food Research International*. 2009;42(9):1240-53.
46. Chaudhry Q, Scotter M, Blackburn J, Ross B, Boxall A, Castle L, et al. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. *Food Additives and Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure an Risk Assessment*. 2008;25(3):241-58.
47. Bradley EL, Castle L, Chaudhry Q. Applications of nanomaterials in food packaging with a consideration of opportunities for developing countries. *Trends in Food Science and Technology*. 2011;22(11):604-10.
48. Kuswandi B. Environmental friendly food nano-packaging. *Environmental Chemistry Letters*. 2017;15(2):205-21.

49. Cheng J, Gao R, Zhu Y, Lin Q. Applications of biodegradable materials in food packaging: A review. *Alexandria Engineering Journal*. 2024;91:70-83.
50. Llorens A, Lloret E, Picouet PA, Trbojevič R, Fernandez A. Metallic-based micro and nanocomposites in food contact materials and active food packaging. *Trends in Food Science and Technology*. 2012;24(1):19-29.
51. Honarvar Z, Hadian Z, Mashayekh M. Nanocomposites in food packaging applications and their risk assessment for health. *Electronic Physician*. 2016;8(6):2531-8.
52. Echeverría I, López-Caballero ME, Gómez-Guillén MC, Mauri AN, Montero MP. Active nanocomposite films based on soy proteins-montmorillonite-clove essential oil for the preservation of refrigerated bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) fillets. *International Journal of Food Microbiology*. 2018;266:142-9.
53. Huang J-Y, Li X, Zhou W. Safety assessment of nanocomposite for food packaging application. *Trends in Food Science and Technology*. 2015;45(2):187-99.
54. Duncan TV. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2011;363(1):1-24.
55. Sekhon. Food nanotechnology –an overview. *Nanotechnology, Science and Applications*. 2010(2010):1-15.
56. Duncan TV, Pillai K. Release of engineered nanomaterials from polymer nanocomposites: diffusion, dissolution, and desorption. *ACS Applied Materials and Interfaces*. 2015;7(1):2-19.
57. Noonan GO, Whelton AJ, Carlander D, Duncan TV. Measurement methods to evaluate engineered nanomaterial release from food contact materials. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2014;13(4):679-92.
58. Šimon P, Chaudhry Q, Bakoš D. Migration of engineered nanoparticles from polymer packaging to food--a physicochemical view. *Journal of Food & Nutrition Research*. 2008;47(3).
59. EFSA. The potential risks arising from nanoscience and nanotechnologies on food and feed safety. *Efsa Journal*. 2009;7(3):958.
60. Puolamaa M., The appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies. [Internet]. 2006 [Erişim Tarihi 26.09.2024]. Erişim adresi: The appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious product | Policy Commons.
61. Fubini B, Ghiazza M, Fenoglio I. Physico-chemical features of engineered nanoparticles relevant to their toxicity. *Nanotoxicology*. 2010;4:347-63.
62. Ettliger R, Lächelt U, Gref R, Horcajada P, Lammers T, Serre C, et al. Toxicity of metal-organic framework nanoparticles: from essential analyses to potential applications. *Chemical Society Reviews*. 2022;51(2):464-84.
63. Shin SW, Song IH, Um SH. Role of physicochemical properties in nanoparticle toxicity. *Nanomaterials*. 2015;5(3):1351-65.

64. Hillyer JF, Albrecht RM. Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2001;90(12):1927-36.
65. Park MV, Neigh AM, Vermeulen JP, de la Fonteyne LJ, Verharen HW, Briedé JJ, et al. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials*. 2011;32(36):9810-7.
66. Biener J, Wittstock A, Baumann TF, Weissmüller J, Bäumer M, Hamza AV. Surface chemistry in nanoscale materials. *Materials*. 2009;2(4):2404-28.
67. Forschungsgemeinschaft D. *Nanomaterials : Novel Approaches*: Wiley-VCH; 2014.
68. Dhawan A, Sharma V. Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010;398(2):589-605.
69. Jiang J, Oberdörster G, Biswas P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research*. 2008;11(1):77-89.
70. Zook JM, Maccuspie RI, Locascio LE, Halter MD, Elliott JT. Stable nanoparticle aggregates/agglomerates of different sizes and the effect of their size on hemolytic cytotoxicity. *Nanotoxicology*. 2011;5(4):517-30.
71. Wick P, Manser P, Limbach LK, Dettlaff-Weglikowska U, Krumeich F, Roth S, et al. The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. *Toxicology Letters*. 2007;168(2):121-31.
72. Albanese A, Chan WC. Effect of gold nanoparticle aggregation on cell uptake and toxicity. *ACS Nano*. 2011;5(7):5478-89.
73. Shang L, Nienhaus K, Nienhaus GU. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *Journal of Nanobiotechnology*. 2014;12:5.
74. Nel AE, Madler L, Velegol D, Xia T, Hoek EM, Somasundaran P, et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature Materials*. 2009;8(7):543-57.
75. Saptarshi SR, Duschl A, Lopata AL. Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *Journal of Nanobiotechnology*. 2013;11:26.
76. Aggarwal P, Hall JB, McLeland CB, Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009;61(6):428-37.
77. Duran N, Silveira CP, Duran M, Martinez DS. Silver nanoparticle protein corona and toxicity: a mini-review. *Journal of Nanobiotechnology*. 2015;13:55.
78. Lynch I, Salvati A, Dawson KA. Protein-nanoparticle interactions: What does the cell see? *Nature Nanotechnology*. 2009;4(9):546-7.
79. Lynch I, Dawson KA. Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today*. 2008;3(1-2):40-7.

80. Maiorano G, Sabella S, Sorce B, Brunetti V, Malvindi MA, Cingolani R, et al. Effects of cell culture media on the dynamic formation of protein– nanoparticle complexes and influence on the cellular response. *ACS Nano*. 2010;4(12):7481-91.
81. McClements DJ, Xiao H. Is nano safe in foods? Establishing the factors impacting the gastrointestinal fate and toxicity of organic and inorganic food-grade nanoparticles. *NPJ Science of Food*. 2017;1:6.
82. Go M-R, Bae S-H, Kim H-J, Yu J, Choi S-J. Interactions between food additive silica nanoparticles and food matrices. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8:1013.
83. Cao Y, Li J, Liu F, Li X, Jiang Q, Cheng S, et al. Consideration of interaction between nanoparticles and food components for the safety assessment of nanoparticles following oral exposure: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2016;46:206-10.
84. Di Silvio D, Rigby N, Bajka B, Mackie A, Bombelli FB. Effect of protein corona magnetite nanoparticles derived from bread in vitro digestion on Caco-2 cells morphology and uptake. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2016;75:212-22.
85. Lichtenstein D, Ebmeyer J, Knappe P, Juling S, Böhmert L, Selve S, et al. Impact of food components during in vitro digestion of silver nanoparticles on cellular uptake and cytotoxicity in intestinal cells. *Biological Chemistry*. 2015;396(11):1255-64.
86. Wang Y, Yuan L, Yao C, Ding L, Li C, Fang J, et al. A combined toxicity study of zinc oxide nanoparticles and vitamin C in food additives. *Nanoscale*. 2014;6(24):15333-42.
87. Tarhan Ö. Safety and regulatory issues of nanomaterials in foods. *Handbook of Food Nanotechnology*. 2020:655-703.
88. Enescu D, Cerqueira MA, Fucinos P, Pastrana LM. Recent advances and challenges on applications of nanotechnology in food packaging. A literature review. *Food and Chemical Toxicology*. 2019;134:110814.
89. Nakamoto M. Focusing Points on FSCJ's Guideline Recently Established: Risk Assessment of Food Contact Materials. *Food Safety*. 2022;10(2):57-69.
90. Hosseiniara R. General comparison of scientific databases of Scopus, PubMed, and Web of Science. *Journal of Preventive and Complementary Medicine*. 2023;2(3):168-9.
91. Falagas ME, Pitsouni EI, Malietzis GA, Pappas G. Comparison of PubMed, Scopus, web of science, and Google scholar: strengths and weaknesses. *The FASEB Journal*. 2008;22(2):338-42.
92. AlRyalat SAS, Malkawi LW, Momani SM. Comparing bibliometric analysis using PubMed, Scopus, and Web of Science databases. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2019(152):e58494.
93. El-Gammal MA, Mohammed MS, Hawary SA, Youssef DG, Aly FM, Fahmy HM. Nanomaterials in food contact materials. *Handbook of Nanomaterials, Volume 22024*. p. 715-44.

94. Lansdown AB. Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. *Biofunctional Textiles and The Skin*. 2006;33:17-34.
95. Medici S, Peana M, Nurchi VM, Zoroddu MA. Medical Uses of Silver: History, Myths, and Scientific Evidence. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2019;62(13):5923-43.
96. Chen X, Schluesener HJ. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicology Letters*. 2008;176(1):1-12.
97. Nowack B, Krug HF, Height M. 120 years of nanosilver history: implications for policy makers. *Environmental Science and Technology*. 2011;45(4):1177-83.
98. Lee SH, Jun B-H. Silver nanoparticles: synthesis and application for nanomedicine. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(4):865.
99. Natsuki J, Natsuki T, Hashimoto Y. A Review of Silver Nanoparticles: Synthesis Methods, Properties and Applications. *International Journal of Materials Science and Applications*. 2015;4(5):325-32.
100. Dhaka A, Chand Mali S, Sharma S, Trivedi R. A review on biological synthesis of silver nanoparticles and their potential applications. *Results in Chemistry*. 2023;6: 1-21.
101. Lekha DC, Shanmugam R, Madhuri K, Dwarampudi LP, Bhaskaran M, Kongara D, et al. Review on Silver Nanoparticle Synthesis Method, Antibacterial Activity, Drug Delivery Vehicles, and Toxicity Pathways: Recent Advances and Future Aspects. *Journal of Nanomaterials*. 2021;2021:1-11.
102. Prabhu S, Poulouse EK. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters*. 2012;2:1-10.
103. Baig N, Kammakakam I, Falath W. Nanomaterials: A review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. *Materials Advances*. 2021;2(6):1821-71.
104. Nie P, Zhao Y, Xu H. Synthesis, applications, toxicity and toxicity mechanisms of silver nanoparticles: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2023;253:114636.
105. Kostic D, Vukasinovic-Sekulic M, Armentano I, Torre L, Obradovic B. Multifunctional ternary composite films based on PLA and Ag/alginate microbeads: Physical characterization and silver release kinetics. *Material Science and Engineering: C Materials for Biological Applications*. 2019;98:1159-68.
106. Carbone M, Donia DT, Sabbatella G, Antiochia R. Silver nanoparticles in polymeric matrices for fresh food packaging. *Journal of King Saud University - Science*. 2016;28(4):273-9.
107. Castro-Mayorga JL, Randazzo W, Fabra MJ, Lagaron J, Aznar R, Sánchez G. Antiviral properties of silver nanoparticles against norovirus surrogates and their efficacy in coated polyhydroxyalkanoates systems. *LWT-Food Science and Technology*. 2017;79:503-10.

108. Zhao X, Wang K, Ai C, Yan L, Jiang C, Shi J. Improvement of antifungal and antibacterial activities of food packages using silver nanoparticles synthesized by iturin A. *Food Packaging and Shelf Life*. 2021;28:100669.
109. Barage S, Lakkakula J, Sharma A, Roy A, Alghamdi S, Almeahmadi M, et al. Nanomaterial in Food Packaging: A Comprehensive Review. *Journal of Nanomaterials*. 2022;2022(1).
110. Amrutha NR, Dhale MA, Job A, Divyalakshmi K, Jeevan Prasad Reddy D, Keshava Murthy PS. Silver Nanoparticles Incorporated PVA-MC Blends: A Systematic Approach To Understand Its Properties For Food Packaging Applications. *ChemistrySelect*. 2023;8(27).
111. Ahmad SS, Yousuf O, Islam RU, Younis K. Silver nanoparticles as an active packaging ingredient and its toxicity. *Packaging Technology and Science*. 2021;34(11-12):653-63.
112. Istiqola A, Syafiuddin A. A review of silver nanoparticles in food packaging technologies: Regulation, methods, properties, migration, and future challenges. *Journal of the Chinese Chemical Society*. 2020;67(11):1942-56.
113. Trotta F, Da Silva S, Massironi A, Mirpoor SF, Lignou S, Ghawi SK, et al. Silver Bionanocomposites as Active Food Packaging: Recent Advances & Future Trends Tackling the Food Waste Crisis. *Polymers (Basel)*. 2023;15(21).
114. Thongboon S, Muenchanama C, Chanthanumatt R, Charoenchaitrakool M, Sudsakorn K, Prapainainar P, et al. Efficient Cellulose/Nano-silver Composite Sheet Derived from Pineapple Leaves for Hydrogen Sulfide Detection. *ChemNanoMat*. 2023;10(1):1-10 doi: doi.org/10.1002/cnma.202300429.
115. Wu Z, Deng W, Luo J, Deng D. Multifunctional nano-cellulose composite films with grape seed extracts and immobilized silver nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*. 2019;205:447-55.
116. das Neves MDS, Scandorieiro S, Pereira GN, Ribeiro JM, Seabra AB, Dias AP, et al. Antibacterial Activity of Biodegradable Films Incorporated with Biologically-Synthesized Silver Nanoparticles and the Evaluation of Their Migration to Chicken Meat. *Antibiotics (Basel)*. 2023;12(1),178. doi: 10.3390/antibiotics12010178. PMID: 36671379; PMCID: PMC9854460.
117. Ash M, Raza MB, Roy A, Golui D. Role of green synthesized nanoparticles in food packaging. *Microbial synthesis of Nanoparticles Nova Science Publishers*. 2021:180-99.
118. Ediyilyam S, George B, Shankar SS, Dennis TT, Waclawek S, Černík M, et al. Chitosan/gelatin/silver nanoparticles composites films for biodegradable food packaging applications. *Polymers*. 2021;13(11):1680.
119. Mathew S, Snigdha S, Mathew J, Radhakrishnan E. Biodegradable and active nanocomposite pouches reinforced with silver nanoparticles for improved packaging of chicken sausages. *Food Packaging and Shelf Life*. 2019;19:155-66.
120. Radzig MA, Nadtochenko VA, Koksharova OA, Kiwi J, Lipasova VA, Khmel IA. Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: influence

on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*. 2013;102:300-6.

121. Slavin YN, Asnis J, Hafeli UO, Bach H. Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *Journal of Nanobiotechnology*. 2017;15(1):65:1-20.

122. Durán N, Durán M, De Jesus MB, Seabra AB, Fávaro WJ, Nakazato G. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2016;12(3):789-99.

123. Souza LRR, da Silva VS, Franchi LP, de Souza TAJ. Toxic and Beneficial Potential of Silver Nanoparticles: The Two Sides of the Same Coin. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2018;1048:251-62.

124. Stabryla LM, Johnston KA, Millstone JE, Gilbertson LM. Emerging investigator series: it's not all about the ion: support for particle-specific contributions to silver nanoparticle antimicrobial activity. *Environmental Science: Nano*. 2018;5(9):2047-68.

125. Tripathi N, Goshisht MK. Recent Advances and Mechanistic Insights into Antibacterial Activity, Antibiofilm Activity, and Cytotoxicity of Silver Nanoparticles. *ACS Applied Bio Materials*. 2022;5(4):1391-463.

126. Ansari MA, Alzohairy MA. One-pot facile green synthesis of silver nanoparticles using seed extract of Phoenix dactylifera and their bactericidal potential against MRSA. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2018;2018(1):1860280.

127. McQuillan JS, Groenaga Infante H, Stokes E, Shaw AM. Silver nanoparticle enhanced silver ion stress response in Escherichia coli K12. *Nanotoxicology*. 2012;6(8):857-66.

128. Liu X, Yao H, Zhao X, Ge C. Biofilm Formation and Control of Foodborne Pathogenic Bacteria. *Molecules*. 2023;28(6):2432. doi: doi.org/10.3390/molecules28062432.

129. Cheng T-H, Lin S-B, Chen L-C, Chen H-H. Studies of the antimicrobial ability and silver ions migration from silver nitrate-incorporated electrospun nylon nanofibers. *Food Packaging and Shelf Life*. 2018;16:129-37.

130. Kamat S, Kumari M. Emergence of microbial resistance against nanoparticles: Mechanisms and strategies. *Frontiers in Microbiology*. 2023;14:1102615.

131. Zhou X, Zhou X, Zhou L, Jia M, Xiong Y. Nanofillers in novel food packaging systems and their toxicity issues. *Foods*. 2024;13(13):2014.

132. Ahari H, Lahijani LK. Migration of Silver and Copper Nanoparticles from Food Coating. *Coatings*. 2021;11(4):380. doi: doi.org/10.3390/coatings11040380.

133. Kuorwel KK, Cran MJ, Orbell JD, Buddhadasa S, Bigger SW. Review of Mechanical Properties, Migration, and Potential Applications in Active Food Packaging Systems Containing Nanoclays and Nanosilver. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2015;14(4):411-30.

134. Patil RB, Chougale AD. Analytical methods for the identification and characterization of silver nanoparticles: A brief review. *Materials Today: Proceedings*. 2021;47:5520-32.
135. Störmer A, Bott J, Kemmer D, Franz R. Critical review of the migration potential of nanoparticles in food contact plastics. *Trends in Food Science and Technology*. 2017;63:39-50.
136. von Goetz N, Fabricius L, Glaus R, Weitbrecht V, Gunther D, Hungerbühler K. Migration of silver from commercial plastic food containers and implications for consumer exposure assessment. *Food Additives and Contaminants Part A*. 2013;30(3):612-20.
137. Jokar M, Abdul Rahman R. Study of silver ion migration from melt-blended and layered-deposited silver polyethylene nanocomposite into food simulants and apple juice. *Food Additives and Contaminants: Part A*. 2014;31(4):734-42.
138. EFSA Panel on Food Contact Materials E, Processing A, Lambre C, Barat Baviera JM, Bolognesi C, Chesson A, et al. Safety assessment of the substance silver nanoparticles for use in food contact materials. *EFSA Journal*. 2021;19(8):e06790.
139. Lok CN, Ho CM, Chen R, He QY, Yu WY, Sun H, et al. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2007;12(4):527-34.
140. Gallochio F, Cibir V, Biancotto G, Roccato A, Muzzolon O, Carmen L, et al. Testing nano-silver food packaging to evaluate silver migration and food spoilage bacteria on chicken meat. *Food Additives and Contaminants Part A*. 2016;33(6):1063-71.
141. Trbojevič RA, Khare S, Lim JH, Watanabe F, Gokulan K, Krohmaly K, et al. Assessment of silver release and biocidal capacity from silver nanocomposite food packaging materials. *Food Chemical Toxicology*. 2020;145:111728.
142. Bott J, Störmer A, Franz R. A Comprehensive Study into the Migration Potential of Nano Silver Particles from Food Contact Polyolefins. *Chemistry of Food, Food Supplements, and Food Contact Materials: From Production to Plate*. ACS Symposium Series. 2014. p. 51-70.
143. Addo Ntim S, Thomas TA, Begley TH, Noonan GO. Characterisation and potential migration of silver nanoparticles from commercially available polymeric food contact materials. *Food Additives and Contaminants: Part A*. 2015;32(6):1003-11.
144. Yang T, Paulose T, Redan BW, Mabon JC, Duncan TV. Food and beverage ingredients induce the formation of silver nanoparticles in products stored within nanotechnology-enabled packaging. *ACS Applied Materials and Interfaces*. 2021;13(1):1398-412.
145. McClements DJ, Xiao H, Demokritou P. Physicochemical and colloidal aspects of food matrix effects on gastrointestinal fate of ingested inorganic nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2017;246:165-80.

146. Bott J, Störmer A, Franz R. A model study into the migration potential of nanoparticles from plastics nanocomposites for food contact. *Food Packaging and Shelf Life*. 2014;2(2):73-80.
147. Bott J, Franz R. Investigations into the potential abrasive release of nanomaterials due to material stress conditions—part b: silver, titanium nitride, and laponite nanoparticles in plastic composites. *Applied Sciences*. 2019;9(2):221.
148. Hosseini R, Ahari H, Mahasti P, Paidari S. Measuring the migration of silver from silver nanocomposite polyethylene packaging based on (TiO<sub>2</sub>) into *Penaeus semisulcatus* using titration comparison with migration methods. *Fisheries Science*. 2017;83(4):649-59.
149. Ortega F, Sobral P, Jios JL, Arce VB, García MA. Starch nanocomposite films: Migration studies of nanoparticles to food simulants and bio-disintegration in soil. *Polymers*. 2022;14(9):1636.
150. Yang T, Adhikari L, Paulose T, Bleher R, Duncan TV. Titanium dioxide and table sugar enhance the leaching of silver out of nanosilver packaging. *Environmental Science: Nano*. 2023;10(6):1689-703.
151. Choi JI, Chae SJ, Kim JM, Choi JC, Park SJ, Choi HJ, et al. Potential silver nanoparticles migration from commercially available polymeric baby products into food simulants. *Food Additives and Contaminants Part A*. 2018;35(5):996-1005.
152. Moreno-Gordaliza E, Marazuela MD, Gómez-Gómez MM. Risk assessment of silver and microplastics release from antibacterial food containers under conventional use and microwave heating. *Food Chemistry*. 2023;420:136097.
153. Fortunati E, Peltzer M, Armentano I, Jiménez A, Kenny JM. Combined effects of cellulose nanocrystals and silver nanoparticles on the barrier and migration properties of PLA nano-biocomposites. *Journal of Food Engineering*. 2013;118(1):117-24.
154. Cushen M, Kerry J, Morris M, Cruz-Romero M, Cummins E. Migration and exposure assessment of silver from a PVC nanocomposite. *Food Chemistry*. 2013;139(1-4):389-97.
155. Mackevica A, Olsson ME, Hansen SF. Silver nanoparticle release from commercially available plastic food containers into food simulants. *Journal of Nanoparticle Research*. 2016;18(1):1-11.
156. Majumder S, Huang S, Zhou J, Wang Y, George S. Tannic acid-loaded halloysite clay grafted with silver nanoparticles enhanced the mechanical and antimicrobial properties of soy protein isolate films for food-packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life*. 2023;39. doi: doi.org/10.1016/j.fpsl.2023.101142.
157. Mouzahim ME, Eddarai EM, Eladaoui S, Guenbour A, Bellaouchou A, Zarrouk A, et al. Effect of Kaolin clay and *Ficus carica* mediated silver nanoparticles on chitosan food packaging film for fresh apple slice preservation. *Food Chemistry*. 2023;410:135470.
158. Efatian H, Ahari H, Shahbazzadeh D, Nowruzi B, Yousefi S. Fabrication and characterization of LDPE/silver-copper/titanium dioxide nanocomposite films for

application in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) packaging. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2021;15(3):2430-9.

159. Yana L, Yutong C, Qinghui H. Antibacterial films based on polylactide and polybutylene adipate terephthalate loaded with zinc oxide or silver nanoparticles: Characterization and application in fresh noodles packaging. *Journal of Food Engineering*. 2024;367:111889. doi: Antibacterial films based on polylactide and polybutylene adipate terephthalate loaded with zinc oxide or silver nanoparticles: Characterization and application in fresh noodles packaging.

160. Valipour Motlagh N, Aghazamani J, Gholami R. Investigating the Effect of Nano-silver Contained Packaging on the Olivier Salad Shelf-life. *BioNanoScience*. 2021;11(3):838-47.

161. Pluta-Kubica A, Jamroz E, Khachatryan G, Florkiewicz A, Kopel P. Application of Furcellaran Nanocomposite Film as Packaging of Cheese. *Polymers (Basel)*. 2021;13(9):1428. doi: doi.org/10.3390/polym13091428.

162. Braun S, Ilberg V, Blum U, Langowski H-C. Release of silver from silver doped PET bottles. *Food Packaging and Shelf Life*. 2020;25:100517. doi: doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100517.

163. Asl NM, Ahari H, Moghanjoghi AAM, Paidari S. Assessment of nanochitosan packaging containing silver NPs on improving the shelf life of caviar (*Acipenser persicus*) and evaluation of nanoparticles migration. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2021;15(6):5078-86.

164. Hannon JC, Kerry JP, Cruz-Romero M, Azlin-Hasim S, Morris M, Cummins E. Human exposure assessment of silver and copper migrating from an antimicrobial nanocoated packaging material into an acidic food simulant. *Food and Chemical Toxicology*. 2016;95:128-36.

165. Scheuplein R, Charnley G, Dourson M. Differential sensitivity of children and adults to chemical toxicity. I. Biological basis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2002;35(3):429-47.

166. Li B, Chua SL, Yu D, Chan SH, Li A. Detection, Identification and Size Distribution of Silver Nanoparticles (AgNPs) in Milk and Migration Study for Breast Milk Storage Bags. *Molecules*. 2022;27(8):2539. doi: doi.org/10.3390/molecules27082539.

167. Moreno-Gordaliza E, Dolores Marazuela M, Milagros Gomez-Gomez M. Risk assessment of silver and microplastics release from antibacterial food containers under conventional use and microwave heating. *Food Chemistry*. 2023;420:136097.

168. Kato LS, Conte-Junior CA. Safety of Plastic Food Packaging: The Challenges about Non-Intentionally Added Substances (NIAS) Discovery, Identification and Risk Assessment. *Polymers (Basel)*. 2021;13(13):2077. doi: doi.org/10.3390/polym13132077.

169. Cushen M, Kerry J, Morris M, Cruz-Romero M, Cummins E. Silver migration from nanosilver and a commercially available zeolite filler polyethylene composites to food simulants. *Food Additives and Contaminants Part A*. 2014;31(6):1132-40.

170. Metak AM, Nabhani F, Connolly SN. Migration of engineered nanoparticles from packaging into food products. *LWT - Food Science and Technology*. 2015;64(2):781-7.
171. Metak A, Ajaal T. Investigation on polymer based nano-silver as food packaging materials. *International Journal of Chemical and Molecular Engineering*. 2013;7(12):1103-9.
172. Artiaga G, Ramos K, Ramos L, Camara C, Gomez-Gomez M. Migration and characterisation of nanosilver from food containers by AF(4)-ICP-MS. *Food Chemistry*. 2015;166:76-85.
173. Huang Y, Chen S, Bing X, Gao C, Wang T, Yuan B. Nanosilver Migrated into Food-Simulating Solutions from Commercially Available Food Fresh Containers. *Packaging Technology and Science*. 2011;24(5):291-7.
174. Deng J, Ding QM, Li W, Wang JH, Liu DM, Zeng XX, et al. Preparation of Nano-Silver-Containing Polyethylene Composite Film and Ag Ion Migration into Food-Simulants. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2020;20(3):1613-21.
175. Song H, Li B, Lin QB, Wu HJ, Chen Y. Migration of silver from nanosilver-polyethylene composite packaging into food simulants. *Food Additives and Contaminants Part A*. 2011;28(12):1758-62.
176. Hannon JC, Kerry JP, Cruz-Romero M, Azlin-Hasim S, Morris M, Cummins E. Migration assessment of silver from nanosilver spray coated low density polyethylene or polyester films into milk. *Food Packaging and Shelf Life*. 2018;15:144-50.
177. Zhu B, Fan C, Cheng C, Lan T, Li L, Qin Y. Migration kinetic of silver from polylactic acid nanocomposite film into acidic food simulant after different high-pressure food processing. *Journal of Food Science*. 2021;86(6):2481-90.
178. Su QZ, Lin QB, Chen CF, Wu YM, Wu LB, Chen XQ, et al. Effect of antioxidants and light stabilisers on silver migration from nanosilver-polyethylene composite packaging films into food simulants. *Food Additives and Contaminants Part A*. 2015;32(9):1561-6.
179. Su QZ, Lin QB, Chen CF, Wu LB, Wang ZW. Effect of organic additives on silver release from nanosilver-polyethylene composite films to acidic food simulant. *Food Chemistry*. 2017;228:560-6.
180. Abreu AS, Oliveira M, de Sa A, Rodrigues RM, Cerqueira MA, Vicente AA, et al. Antimicrobial nanostructured starch based films for packaging. *Carbohydrate Polymers*. 2015;129:127-34.
181. Jokar M, Correia M, Loeschner K. Behavior of silver nanoparticles and ions in food simulants and low fat cow milk under migration conditions. *Food Control*. 2018;89:77-85.
182. Echegoyen Y, Nerin C. Nanoparticle release from nano-silver antimicrobial food containers. *Food and Chemical Toxicology*. 2013;62:16-22.
183. Hannon JC, Kerry JP, Cruz-Romero M, Azlin-Hasim S, Morris M, Cummins E. Assessment of the migration potential of nanosilver from nanoparticle-coated low-

density polyethylene food packaging into food simulants. *Food Additives and Contaminants Part A*. 2016;33(1):167-78.

184. Çetin H. Production of nano silver coated hydroxyapatite and antibacterial surface applications. Sakarya: Sakarya University; 2016.

185. da Costa Brito S, Pereira VAC, Prado ACF, Tobias TJ, Paris EC, Ferreira MD. Antimicrobial potential of linear low-density polyethylene food packaging with Ag nanoparticles in different carriers (Silica and Hydroxyapatite). *Journal of Microbiological Methods*. 2024;217-218:106873.

186. Baysal G, Demirci C, Ozpinar H. Properties and Synthesis of Biosilver Nanofilms for Antimicrobial Food Packaging. *Polymers (Basel)*. 2023;15(3).

187. Lin Z, Monteiro-Riviere NA, Riviere JE. Pharmacokinetics of metallic nanoparticles. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2014;7(2):189-217.

188. Pem B, Curlin M, Domazet Jurasin D, Vrcek V, Barbir R, Micek V, et al. Fate and transformation of silver nanoparticles in different biological conditions. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 2021;12:665-79.

189. Qi M, Wang X, Chen J, Liu Y, Liu Y, Jia J, et al. Transformation, Absorption and Toxicological Mechanisms of Silver Nanoparticles in the Gastrointestinal Tract Following Oral Exposure. *ACS Nano*. 2023;17(10):8851-65.

190. Ngamchuea K, Batchelor-McAuley C, Compton RG. The fate of silver nanoparticles in authentic human saliva. *Nanotoxicology*. 2018;12(4):305-11.

191. Loza K, Sengstock C, Chernousova S, Köller M, Epple M. The predominant species of ionic silver in biological media is colloiddally dispersed nanoparticulate silver chloride. *RSC Advances*. 2014;4(67): 35290–97.

192. Mwilu SK, El Badawy AM, Bradham K, Nelson C, Thomas D, Scheckel KG, et al. Changes in silver nanoparticles exposed to human synthetic stomach fluid: Effects of particle size and surface chemistry. *Science of The Total Environment*. 2013;447:90-8.

193. Li X, Lenhart JJ, Walker HW. Dissolution-Accompanied Aggregation Kinetics of Silver Nanoparticles. *Langmuir*. 2010;26(22):16690-8.

194. Laloux L, Kastrati D, Cambier S, Gutleb AC, Schneider YJ. The food matrix and the gastrointestinal fluids alter the features of silver nanoparticles. *Small*. 2020;16(21):1907687.

195. Bouwmeester H, van der Zande M, Jepson MA. Effects of food-borne nanomaterials on gastrointestinal tissues and microbiota. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2018;10(1):e1481.

196. Van der Zande M, Vandebriel RJ, Van Doren E, Kramer E, Herrera Rivera Z, Serrano-Rojero CS, et al. Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure. *ACS Nano*. 2012;6(8):7427-42.

197. Liu J, Wang Z, Liu FD, Kane AB, Hurt RH. Chemical transformations of nanosilver in biological environments. *ACS Nano*. 2012;6(11):9887-99.

198. Kim YS, Kim JS, Cho HS, Rha DS, Kim JM, Park JD, et al. Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhalation Toxicology*. 2008;20(6):575-83.
199. Kim YS, Song MY, Park JD, Song KS, Ryu HR, Chung YH, et al. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology*. 2010;7:20:1-11.
200. Wang XL, Yu N, Wang C, Zhou HR, Wu C, Yang L, et al. Changes in Gut Microbiota Structure: A Potential Pathway for Silver Nanoparticles to Affect the Host Metabolism. *ACS Nano*. 2022;16(11):19002-12.
201. Salim EI, Abdel-Halim KY, El-Mahalawy ME, Badr HA, Ahmed H. Tissue Distribution, Pharmacokinetics, and Effect of Hematological and Biochemical Parameters of Acute Intravenous Administration of Silver Nanoparticles in Rats. *Nanomaterials*. 2023;14(1):29.doi: doi.org/10.3390/nano14010029.
202. Wang K, Wang S, Yin J, Yang Q, Yu Y, Chen L. Long-term application of silver nanoparticles in dental restoration materials: potential toxic injury to the CNS. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2023;34(11):52.
203. Fennell TR, Mortensen NP, Black SR, Snyder RW, Levine KE, Poitras E, et al. Disposition of intravenously or orally administered silver nanoparticles in pregnant rats and the effect on the biochemical profile in urine. *Journal of Applied Toxicology*. 2017;37(5):530-44.
204. Park EJ, Bae E, Yi J, Kim Y, Choi K, Lee SH, et al. Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2010;30(2):162-8.
205. Park EJ, Yi J, Kim Y, Choi K, Park K. Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. *Toxicology In Vitro*. 2010;24(3):872-8.
206. Hsiao IL, Hsieh YK, Wang CF, Chen IC, Huang YJ. Trojan-horse mechanism in the cellular uptake of silver nanoparticles verified by direct intra- and extracellular silver speciation analysis. *Environmental Science and Technology*. 2015;49(6):3813-21.
207. Ahmad SA, Das SS, Khatoon A, Ansari MT, Afzal M, Hasnain MS, et al. Bactericidal activity of silver nanoparticles: A mechanistic review. *Materials Science for Energy Technologies*. 2020;3:756-69.
208. Piao MJ, Kang KA, Lee IK, Kim HS, Kim S, Choi JY, et al. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicology Letters*. 2011;201(1):92-100.
209. Xu M, Yang Q, Xu L, Rao Z, Cao D, Gao M, et al. Protein target identification and toxicological mechanism investigation of silver nanoparticles-induced hepatotoxicity by integrating proteomic and metallomic strategies. *Particle and Fibre Toxicology*. 2019;16(1):46.
210. Liu W, Worms I, Slaveykova VI. Interaction of silver nanoparticles with antioxidant enzymes. *Environmental Science: Nano*. 2020;7(5):1507-17.
211. Hu P, Zhang X, Li Y, Pichan C, Chen Z. Molecular interactions between silver nanoparticles and model cell membranes. *Topics in Catalysis*. 2018;61:1148-62.

212. da Costa TS, da Silva MR, Barbosa JCJ, Neves UDSD, de Jesus MB, Tasic L. Biogenic silver nanoparticles' antibacterial activity and cytotoxicity on human hepatocarcinoma cells (Huh-7). *RSC Advances*. 2024;14(4):2192-204.
213. Zhornik EV, Baranova LA, Drozd ES, Sudas MS, Chau NH, Buu NQ, et al. Silver nanoparticles induce lipid peroxidation and morphological changes in human lymphocytes surface. *Biophysics*. 2014;59(3):380-6.
214. Waktole G. Toxicity and Molecular Mechanisms of Actions of Silver Nanoparticles. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*. 2023;14(03):53-70.
215. Guo D, Zhu L, Huang Z, Zhou H, Ge Y, Ma W, et al. Anti-leukemia activity of PVP-coated silver nanoparticles via generation of reactive oxygen species and release of silver ions. *Biomaterials*. 2013;34(32):7884-94.
216. Skalska J, Dabrowska-Bouta B, Frontczak-Baniewicz M, Sulkowski G, Struzynska L. A Low Dose of Nanoparticulate Silver Induces Mitochondrial Dysfunction and Autophagy in Adult Rat Brain. *Neurotoxicity Research*. 2020;38(3):650-64.
217. Zhang J, Wang F, Yalamarty SSK, Filipczak N, Jin Y, Li X. Nano Silver-Induced Toxicity and Associated Mechanisms. *International Journal of Nanomedicine*. 2022;17:1851-64.
218. AshaRani P, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveetil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*. 2009;3(2):279-90.
219. Yu Z, Wang W, Kong F, Lin M, Mustapha A. Cellulose nanofibril/silver nanoparticle composite as an active food packaging system and its toxicity to human colon cells. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;129:887-94.
220. Jia M, Zhang W, He T, Shu M, Deng J, Wang J, et al. Evaluation of the Genotoxic and Oxidative Damage Potential of Silver Nanoparticles in Human NCM460 and HCT116 Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(5):1618. doi: doi.org/10.3390/ijms21051618.
221. Shahare B, Yashpal M. Toxic effects of repeated oral exposure of silver nanoparticles on small intestine mucosa of mice. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2013;23(3):161-7.
222. Ren Q, Ma J, Li X, Meng Q, Wu S, Xie Y, et al. Intestinal Toxicity of Metal Nanoparticles: Silver Nanoparticles Disorder the Intestinal Immune Microenvironment. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2023;15(23):27774-88.
223. Orr SE, Gokulan K, Boudreau M, Cerniglia CE, Khare S. Alteration in the mRNA expression of genes associated with gastrointestinal permeability and ileal TNF-alpha secretion due to the exposure of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Journal of Nanobiotechnology*. 2019;17(1):63.
224. Gokulan K, Williams K, Orr S, Khare S. Human Intestinal Tissue Explant Exposure to Silver Nanoparticles Reveals Sex Dependent Alterations in Inflammatory Responses and Epithelial Cell Permeability. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;22(1):9. doi: doi.org/10.3390/ijms22010009 .
225. Ma Y, Zhang J, Yu N, Shi J, Zhang Y, Chen Z, et al. Effect of Nanomaterials on Gut Microbiota. *Toxics*. 2023;11(4):384. doi: doi.org/10.3390/toxics11040384.

226. van Den Brule S, Ambroise J, Lecloux H, Levard C, Soulas R, De Temmerman P-J, et al. Dietary silver nanoparticles can disturb the gut microbiota in mice. *Particle and Fibre Toxicology*. 2015;13:1-16.
227. Williams K, Milner J, Boudreau MD, Gokulan K, Cerniglia CE, Khare S. Effects of subchronic exposure of silver nanoparticles on intestinal microbiota and gut-associated immune responses in the ileum of Sprague-Dawley rats. *Nanotoxicology*. 2015;9(3):279-89.
228. Wilding LA, Bassis CM, Walacavage K, Hashway S, Leroueil PR, Morishita M, et al. Repeated dose (28-day) administration of silver nanoparticles of varied size and coating does not significantly alter the indigenous murine gut microbiome. *Nanotoxicology*. 2016;10(5):513-20.
229. Gao X, Li R, Sprando RL, Yourick JJ. Concentration-dependent toxicogenomic changes of silver nanoparticles in hepatocyte-like cells derived from human induced pluripotent stem cells. *Cell Biology and Toxicology*. 2021;37(2):245-59.
230. Patlolla AK, Hackett D, Tchounwou PB. Silver nanoparticle-induced oxidative stress-dependent toxicity in Sprague-Dawley rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2015;399(1-2):257-68.
231. Blanco J, Tomas-Hernandez S, Garcia T, Mulero M, Gomez M, Domingo JL, et al. Oral exposure to silver nanoparticles increases oxidative stress markers in the liver of male rats and deregulates the insulin signalling pathway and p53 and cleaved caspase 3 protein expression. *Food and Chemical Toxicology*. 2018;115:398-404.
232. Ranjbar A, Firozian F, Soleimani Asl S, Ghasemi H, Taheri Azandariani M, Larki A, et al. Nitrosative DNA damage after sub-chronic exposure to silver nanoparticle induces stress nephrotoxicity in rat kidney. *Toxin Reviews*. 2017;37(4):327-33.
233. Shrivastava R, Kushwaha P, Bhutia YC, Flora S. Oxidative stress following exposure to silver and gold nanoparticles in mice. *Toxicology and Industrial Health*. 2016;32(8):1391-404.
234. Nosrati H, Hamzepoor M, Sohrabi M, Saidijam M, Assari MJ, Shabab N, et al. The potential renal toxicity of silver nanoparticles after repeated oral exposure and its underlying mechanisms. *BMC Nephrology*. 2021;22(1).
235. Sarhan OMM, Hussein RM. Effects of intraperitoneally injected silver nanoparticles on histological structures and blood parameters in the albino rat. *International Journal of Nanomedicine*. 2014:1505-17.
236. Lin C-X, Yang S-Y, Gu J-L, Meng J, Xu H-Y, Cao J-M. The acute toxic effects of silver nanoparticles on myocardial transmembrane potential, INa and IK1 channels and heart rhythm in mice. *Nanotoxicology*. 2017:1-11.
237. Ma W, He S, Xu Y, Qi G, Ma H, Bang JJ, et al. Ameliorative Effect of Sodium Selenite on Silver Nanoparticles-Induced Myocardocyte Structural Alterations in Rats. *International Journal of Nanomedicine*. 2020; 15:8281-92.
238. Abdelrazzak DE, Ibrahim ME-d, Arafa MH, Ahmed SM. Ginkgo Biloba Alleviates Silver Nanoparticles Induced Cardiotoxicity in Adult Male Albino Rats;

- Role of 8-OHdG and Microrna-21 Expression. *Tobacco Regulatory Science (TRS)*. 2022;3076-92.
239. Tang J, Xiong L, Wang S, Wang J, Liu L, Li J, et al. Influence of silver nanoparticles on neurons and blood-brain barrier via subcutaneous injection in rats. *Applied Surface Science*. 2008;255(2):502-4.
240. Chen IC, Hsiao IL, Lin HC, Wu CH, Chuang CY, Huang YJ. Influence of silver and titanium dioxide nanoparticles on in vitro blood-brain barrier permeability. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2016;47:108-18.
241. Liu F, Mahmood M, Xu Y, Watanabe F, Biris AS, Hansen DK, et al. Effects of silver nanoparticles on human and rat embryonic neural stem cells. *Frontiers of Neuroscience*. 2015;9:115.
242. Sharma HS, Sharma A. Nanoparticles aggravate heat stress induced cognitive deficits, blood-brain barrier disruption, edema formation and brain pathology. *Progress in Brain Research*. 2007;162:245-73.
243. Khan AM, Korzeniowska B, Gorshkov V, Tahir M, Schroder H, Skytte L, et al. Silver nanoparticle-induced expression of proteins related to oxidative stress and neurodegeneration in an in vitro human blood-brain barrier model. *Nanotoxicology*. 2019;13(2):221-39.
244. Antsiferova A, Kopaeva M, Kashkarov P. Effects of Prolonged Silver Nanoparticle Exposure on the Contextual Cognition and Behavior of Mammals. *Materials*. 2018;11(4):558. doi: doi.org/10.3390/ma11040558.
245. Antsiferova AA, Kopaeva MY, Kochkin VN, Kashkarov PK, Kovalchuk MV. Disturbance in Mammalian Cognition Caused by Accumulation of Silver in Brain. *Toxics*. 2021;9(2):30. doi: 10.3390/toxics9020030.
246. Antsiferova AA, Kopaeva MY, Kochkin VN, Reshetnikov AA, Kashkarov PK. Neurotoxicity of Silver Nanoparticles and Non-Linear Development of Adaptive Homeostasis with Age. *Micromachines (Basel)*. 2023;14(5):987. doi: doi.org/10.3390/mi14050984.
247. Asare N, Instanes C, Sandberg WJ, Refsnes M, Schwarze P, Kruszewski M, et al. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. *Toxicology*. 2012;291(1-3):65-72.
248. Zhang X-F, Gurunathan S, Kim J-H. Effects of silver nanoparticles on neonatal testis development in mice. *International Journal of Nanomedicine*. 2015;6243-56.
249. Han JW, Jeong JK, Gurunathan S, Choi YJ, Das J, Kwon DN, et al. Male- and female-derived somatic and germ cell-specific toxicity of silver nanoparticles in mouse. *Nanotoxicology*. 2016;10(3):361-73.
250. Azmy OM, Elshal AOI. Study of the effects of silver nanoparticles exposure on the ovary of rats. *Life Science Journal*. 2013;10(2):1887-94.
251. Fatemi M, Roodbari NH, Ghaedi K, Naderi G. The effects of prenatal exposure to silver nanoparticles on the developing brain in neonatal rats. *Journal of Biological Research*. 2013;20:233.

252. Danila OO, Berghian AS, Dionisie V, Gheban D, Olteanu D, Tabaran F, et al. The effects of silver nanoparticles on behavior, apoptosis and nitro-oxidative stress in offspring Wistar rats. *Nanomedicine*. 2017;12(12):1455-73.
253. Lyu Z, Ghoshdastidar S, Rekha KR, Suresh D, Mao J, Bivens N, et al. Developmental exposure to silver nanoparticles leads to long term gut dysbiosis and neurobehavioral alterations. *Scientific Reports*. 2021;11(1):6558.
254. Hong JS, Kim S, Lee SH, Jo E, Lee B, Yoon J, et al. Combined repeated-dose toxicity study of silver nanoparticles with the reproduction/developmental toxicity screening test. *Nanotoxicology*. 2014;8(4):349-62.
255. Issa M, Riviere G, Houdeau E, Adel-Patient K. Perinatal exposure to foodborne inorganic nanoparticles: A role in the susceptibility to food allergy? *Frontiers in Allergy*. 2022;3:1067281.
256. Chareh Saz M. Toxicologic Evaluation Of Silver Nanoparticles [Doktora Tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2014.
257. Narciso L, Coppola L, Lori G, Andreoli C, Zjino A, Bocca B, et al. Genotoxicity, biodistribution and toxic effects of silver nanoparticles after in vivo acute oral administration. *NanoImpact*. 2020;18:100221.
258. Wang X, Li T, Su X, Li J, Li W, Gan J, et al. Genotoxic effects of silver nanoparticles with/without coating in human liver HepG2 cells and in mice. *Journal of Applied Toxicology*. 2019;39(6):908-18.
259. Chen Y, Sheng F, Wang X, Zhang Z, Qi S, Chen L. Early Epigenetic Responses in the Genomic DNA Methylation Fingerprints in Cells in Response to Sublethal Exposure of Silver Nanoparticles. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022;10:927036.
260. Bergaya F, Lagaly G. Chapter 1 General Introduction: Clays, Clay Minerals, and Clay Science. *Handbook of Clay Science. Developments in Clay Science*. 2006. p. 1-18.
261. Guggenheim S, Martin RT. Definition of clay and clay mineral: Joint report of the AIPEA nomenclature and CMS nomenclature committees. *Clays and Clay Minerals*. 1995;43:255-6.
262. Lewkowitz-Shpuntoff HM, Wen MC, Singh A, Brenner N, Gambino R, Pernodet N, et al. The effect of organo clay and adsorbed FeO(3) nanoparticles on cells cultured on Ethylene Vinyl Acetate substrates and fibers. *Biomaterials*. 2009;30(1):8-18.
263. Kumari N, Mohan C. Basics of clay minerals and their characteristic properties. *Clay and Clay Minerals*. 2021;24(1). doi: 10.5772/intechopen.97672.
264. Xia Y, Rubino M, Auras R. Release of nanoclay and surfactant from polymer-clay nanocomposites into a food simulant. *Environmental Science and Technology*. 2014;48(23):13617-24.
265. Xia Y, Rubino M, Auras R. Release of surfactants from organo-modified montmorillonite into solvents: Implications for polymer nanocomposites. *Applied Clay Science*. 2015;105-106:107-12.

266. Parameswaranpillai J, Krishnankutty RE, Jayakumar A, Rangappa SM, Siengchin S. Nanotechnology-enhanced food packaging: John Wiley & Sons; 2021.
267. Deshmukh RK, Hakim L, Akhila K, Ramakanth D, Gaikwad KK. Nano clays and its composites for food packaging applications. *International Nano Letters*. 2022;13(2):131-53.
268. Fernandes C, Benfeito S, Fonseca A, Oliveira C, Garrido J, Garrido EM, et al. Photodamage and photoprotection: toward safety and sustainability through nanotechnology solutions. *Food preservation: Elsevier*; 2017. p. 527-65.
269. de Abreu DAP, Cruz JM, Angulo I, Losada PP. Mass transport studies of different additives in polyamide and exfoliated nanocomposite polyamide films for food industry. *Packaging Technology and Science: An International Journal*. 2010;23(2):59-68.
270. Schmidt B, Petersen JH, Bender Koch C, Plackett D, Johansen NR, Katiyar V, et al. Combining asymmetrical flow field-flow fractionation with light-scattering and inductively coupled plasma mass spectrometric detection for characterization of nanoclay used in biopolymer nanocomposites. *Food Additives and Contaminants Part A*. 2009;26(12):1619-27.
271. Di Maio L, Scarfato P, Milana MR, Feliciani R, Denaro M, Padula G, et al. Bionanocomposite Polylactic Acid/Organoclay Films: Functional Properties and Measurement of Total and Lactic Acid Specific Migration. *Packaging Technology and Science*. 2014;27(7):535-47.
272. Maisanaba S, Pichardo S, Jorda-Beneyto M, Aucejo S, Camean AM, Jos A. Cytotoxicity and mutagenicity studies on migration extracts from nanocomposites with potential use in food packaging. *Food and Chemical Toxicology*. 2014;66:366-72.
273. Afsharian Z, Khosravi-Darani K. Application of nanoclays in food packaging. *Biointerface Research in Applied Chemistry*. 2020;10(1):4790-4802.
274. Ramos M, Fortunati E, Beltran A, Peltzer M, Cristofaro F, Visai L, et al. Controlled Release, Disintegration, Antioxidant, and Antimicrobial Properties of Poly (Lactic Acid)/Thymol/Nanoclay Composites. *Polymers (Basel)*. 2020;12(9):1878.doi: doi.org/10.3390/polym12091878.
275. Giannakas A. Na-Montmorillonite vs. Organically Modified Montmorillonite as Essential Oil Nanocarriers for Melt-Extruded Low-Density Poly-Ethylene Nanocomposite Active Packaging Films with a Controllable and Long-Life Antioxidant Activity. *Nanomaterials (Basel)*. 2020;10(6):1027.doi: doi.org/10.3390/nano10061027.
276. Gutiérrez TJ, Ponce AG, Alvarez VA. Nano-clays from natural and modified montmorillonite with and without added blueberry extract for active and intelligent food nanopackaging materials. *Materials Chemistry and Physics*. 2017;194:283-92.
277. Cheikh D, Majdoub H, Darder M. An overview of clay-polymer nanocomposites containing bioactive compounds for food packaging applications. *Applied Clay Science*. 2022;216.

278. Girase B, Depan D, Shah J, Xu W, Misra R. Silver–clay nanohybrid structure for effective and diffusion-controlled antimicrobial activity. *Materials Science and Engineering: C*. 2011;31(8):1759-66.
279. Mauricio-Iglesias M, Peyron S, Guillard V, Gontard N. Wheat gluten nanocomposite films as food-contact materials: Migration tests and impact of a novel food stabilization technology (high pressure). *Journal of Applied Polymer Science*. 2010;116(5):2526-35.
280. Echeverria I, Lopez-Caballero ME, Gomez-Guillen MC, Mauri AN, Montero MP. Active nanocomposite films based on soy proteins-montmorillonite- clove essential oil for the preservation of refrigerated bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) fillets. *International Journal of Food Microbiology*. 2018;266:142-9.
281. Diaz CA, Xia Y, Rubino M, Auras R, Jayaraman K, Hotchkiss J. Fluorescent labeling and tracking of nanoclay. *Nanoscale*. 2013;5(1):164-8.
282. Bangar SP, Whiteside WS, Chaudhary V, Akhila PP, Sunooj KV. Recent functionality developments in montmorillonite as a nanofiller in food packaging. *Trends in Food Science and Technology*. 2023;140:104148.
283. Echegoyen Y, Rodriguez S, Nerin C. Nanoclay migration from food packaging materials. *Food Additives and Contaminants Part A*. 2016;33(3):530-9.
284. Ticari ürün sitesi [Internet]. 2024 [Erişim Tarihi 26.09.2024]. Erişim adresi: <https://gohinode.com/vegetable-wrapping-storage-bags-aisaika-series-l-size/>.
285. Maisanaba S, Guzman-Guillen R, Puerto M, Gutierrez-Praena D, Ortuno N, Jos A. In vitro toxicity evaluation of new silane-modified clays and the migration extract from a derived polymer-clay nanocomposite intended to food packaging applications. *Journal of Hazardous Materials*. 2018;341:313-20.
286. Marinoni L, Montes S, Jubete E, Palenzuela J, Cid G, Aguilera D, et al. Incorporation Of Nanoclay And Orange Peels Extract Into PLA For Food Applications: Migration Assessment. *Journal of Applied Packaging Research*. 2018(10):N/A-N/A.
287. Farhoodi M, Mousavi SM, Sotudeh-Gharebagh R, Emam-Djomeh Z, Oromiehie A. Migration of Aluminum and Silicon from PET/Clay Nanocomposite Bottles into Acidic Food Simulant. *Packaging Technology and Science*. 2013;27(2):161-8.
288. Connolly M, Zhang Y, Brown DM, Ortuño N, Jordá-Beneyto M, Stone V, et al. Novel polylactic acid (PLA)-organoclay nanocomposite bio-packaging for the cosmetic industry; migration studies and in vitro assessment of the dermal toxicity of migration extracts. *Polymer Degradation and Stability*. 2019;168.
289. Çelik Erbaş S, Baştürk SB. Fabrication and characterization of nanoclay-reinforced thermoplastic composite films. *Materiali in Tehnologije*. 2019;53(1):87-94.
290. Shah KJ, Shukla AD, Shah DO, Imae T. Effect of organic modifiers on dispersion of organoclay in polymer nanocomposites to improve mechanical properties. *Polymer*. 2016;97:525-32.
291. Xia Y, Rubino M, Auras R. Modeling of surfactant release from polymer-clay nanocomposites into ethanol. *Polymer Testing*. 2016;50:57-63.

292. Safety assessment of the substance montmorillonite clay modified by dimethyldialkyl(C16-C18)ammonium chloride for use in food contact materials. *EFSA Journal*. 2015;13(11). doi: doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4285 .
293. Velasquez E, Espinoza S, Valenzuela X, Garrido L, Galotto MJ, Guarda A, et al. Effect of Organic Modifier Types on the Physical-Mechanical Properties and Overall Migration of Post-Consumer Polypropylene/Clay Nanocomposites for Food Packaging. *Polymers (Basel)*. 2021;13(9):1502. doi: doi.org/10.3390/polym13091502.
294. Scarfato P, Di Maio L, Milana MR, Giamberardini S, Denaro M, Incarnato L. Performance properties, lactic acid specific migration and swelling by simulant of biodegradable poly (lactic acid)/nanoclay multilayer films for food packaging. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2017;34(10):1730-42.
295. Chaudhry Q, Castle L, Bradley E, Blackburn J, Aitken R, Boxall A. Assessment of current and projected applications of nanotechnology for food contact materials in relation to consumer safety and regulatory implications. UK Food Standards Agency, London. 2008.
296. Scientific Opinion on the safety assessment of the substances, kaolin and polyacrylic acid, sodium salt, for use in food contact materials. *EFSA Journal*. 2014;12(4).doi: doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3637.
297. de Abreu DAP, Cruz JM, Angulo I, Losada PP. Mass transport studies of different additives in polyamide and exfoliated nanocomposite polyamide films for food industry. *Packaging Technology and Science*. 2009;23(2):59-68.
298. Nasiri A, Peyron S, Gastaldi E, Gontard N. Effect of nanoclay on the transfer properties of immanent additives in food packages. *Journal of Materials Science*. 2016;51(21):9732-48.
299. Lajarrige A, Gontard N, Gaucel S, Samson M-F, Peyron S. The mixed impact of nanoclays on the apparent diffusion coefficient of additives in biodegradable polymers in contact with food. *Applied Clay Science*. 2019;180.
300. Zabihzadeh Khajavi M, Ahmadi S, Abedi A-S, Mohammadi R, Farhoodi M. A model study on the migration of Irganox 1010 from low density polyethylene into a fatty food simulant as a function of incorporated spherical and plate-like nanoparticles. *Food Packaging and Shelf Life*. 2019;22.
301. Mauricio-Iglesias M, Gontard N, Gastaldi E. Impact of high pressure treatment on the structure of montmorillonite. *Applied Clay Science*. 2011;51(1-2):174-6.
302. Dardmeh N, Khosrowshahi A, Almasi H, Zandi M. Study on Effect of the Polyethylene Terephthalate/Nanoclay Nanocomposite Film on the Migration of Terephthalic Acid into the Yoghurt Drinks Simulant. *Journal of Food Process Engineering*. 2015;40(1):1-8.
303. Bott J, Franz R. Investigation into the Potential Migration of Nanoparticles from Laponite-Polymer Nanocomposites. *Nanomaterials (Basel)*. 2018;8(9).
304. Schmidt B, Katiyar V, Plackett D, Larsen EH, Gerds N, Koch CB, et al. Migration of nanosized layered double hydroxide platelets from polylactide nanocomposite films. *Food Additives and Contaminants Part A*. 2011;28(7):956-66.

305. Scientific Opinion on safety assessment of the active substance, iron (0) modified bentonite as oxygen absorber, for use in active food contact materials. *EFSA Journal*. 2013;11(10). doi: doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3400.
306. Busolo MA, Lagaron JM. Oxygen scavenging polyolefin nanocomposite films containing an iron modified kaolinite of interest in active food packaging applications. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2012;16:211-7.
307. Han C, Zhao A, Varughese E, Sahle-Demessie E. Evaluating Weathering of Food Packaging Polyethylene-Nano-clay Composites: Release of Nanoparticles and their Impacts. *NanoImpact*. 2018;9:61-71.
308. Dias MV, Azevedo VM, Santos TA, Pola CC, Lara BRB, Borges SV, et al. Effect of active films incorporated with montmorillonite clay and  $\alpha$ -tocopherol: Potential of nanoparticle migration and reduction of lipid oxidation in salmon. *Packaging Technology and Science*. 2018;32(1):39-47.
309. Paidari S, Ahari H. The effects of nanosilver and nanoclay nanocomposites on shrimp (*Penaeus semisulcatus*) samples inoculated to food pathogens. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2021;15(4):3195-206.
310. Mascolo N, Summa V, Tateo F. In vivo experimental data on the mobility of hazardous chemical elements from clays. *Applied Clay Science*. 2004;25(1-2):23-8.
311. Mascolo N, Summa V, Tateo F. Characterization of toxic elements in clays for human healing use. *Applied Clay Science*. 1999;15(5-6):491-500.
312. Wiles MC, Huebner HJ, Afriyie-Gyawu E, Taylor RJ, Bratton GR, Phillips TD. Toxicological evaluation and metal bioavailability in pregnant rats following exposure to clay minerals in the diet. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 2004;67(11):863-74.
313. Baek M, Lee J-A, Choi S-J. Toxicological effects of a cationic clay, montmorillonite in vitro and in vivo. *Molecular & Cellular Toxicology*. 2012;8(1):95-101.
314. Choi S-J. Cytotoxicity and Biokinetic Evaluation of Clay Minerals. *Clays and Clay Minerals*. 2024;67(1):91-8.
315. Toledano-Magaña Y, Flores-Santos L, Montes de Oca G, González-Montiel A, García-Ramos J-C, Mora C, et al. Toxicological evaluations in macrophages and mice acutely and chronically exposed to halloysite clay nanotubes functionalized with polystyrene. *ACS Omega*. 2021;6(44):29882-92.
316. Wang X, Gong J, Rong R, Gui Z, Hu T, Xu X. Halloysite Nanotubes-Induced Al Accumulation and Fibrotic Response in Lung of Mice after 30-Day Repeated Oral Administration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018;66(11):2925-33.
317. Sharma AK, Mortensen A, Schmidt B, Frandsen H, Hadrup N, Larsen EH, et al. In-vivo study of genotoxic and inflammatory effects of the organo-modified Montmorillonite Cloisite(R) 30B. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2014;770:66-71.
318. Houtman J, Maisanaba S, Puerto M, Gutiérrez-Praena D, Jordá M, Aucejo S, et al. Toxicity assessment of organomodified clays used in food contact materials on human target cell lines. *Applied Clay Science*. 2014;90:150-8.

319. Janer G, Fernandez-Rosas E, Mas del Molino E, Gonzalez-Galvez D, Vilar G, Lopez-Iglesias C, et al. In vitro toxicity of functionalised nanoclays is mainly driven by the presence of organic modifiers. *Nanotoxicology*. 2014;8(3):279-94.
320. Li PR, Wei JC, Chiu YF, Su HL, Peng FC, Lin JJ. Evaluation on cytotoxicity and genotoxicity of the exfoliated silicate nanoclay. *ACS Applied Materials and Interfaces*. 2010;2(6):1608-13.
321. Toledano-Magana Y, Flores-Santos L, Montes de Oca G, Gonzalez-Montiel A, Garcia-Ramos JC, Mora C, et al. Toxicological Evaluations in Macrophages and Mice Acutely and Chronically Exposed to Halloysite Clay Nanotubes Functionalized with Polystyrene. *ACS Omega*. 2021;6(44):29882-92.
322. Verma NK, Moore E, Blau W, Volkov Y, Ramesh Babu P. Cytotoxicity evaluation of nanoclays in human epithelial cell line A549 using high content screening and real-time impedance analysis. *Journal of Nanoparticle Research*. 2012;14(9):1137. doi: <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1137-5>.
323. Wagner A, White AP, Stueckle TA, Banerjee D, Sierros KA, Rojasakul Y, et al. Early Assessment and Correlations of Nanoclay's Toxicity to Their Physical and Chemical Properties. *ACS Applied Materials and Interfaces*. 2017;9(37):32323-35.
324. Wagner A, Eldawud R, White A, Agarwal S, Stueckle TA, Sierros KA, et al. Toxicity evaluations of nanoclays and thermally degraded byproducts through spectroscopical and microscopical approaches. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2017;1861(1 Pt A):3406-15.
325. Jorda-Beneyto M, Ortuno N, Devis A, Aucejo S, Puerto M, Gutierrez-Praena D, et al. Use of nanoclay platelets in food packaging materials: technical and cytotoxicity approach. *Food Additives and Contaminants Part A*. 2014;31(3):354-63.
326. Maisanaba S, Puerto M, Pichardo S, Jordá M, Moreno FJ, Aucejo S, et al. In vitro toxicological assessment of clays for their use in food packaging applications. *Food and Chemical Toxicology*. 2013;57:266-75.
327. Lordan S, Kennedy JE, Higginbotham CL. Cytotoxic effects induced by unmodified and organically modified nanoclays in the human hepatic HepG2 cell line. *Journal of Applied Toxicology*. 2011;31(1):27-35.
328. Maisanaba S, Gutierrez-Praena D, Pichardo S, Moreno FJ, Jorda M, Camean AM, et al. Toxic effects of a modified montmorillonite clay on the human intestinal cell line Caco-2. *Journal of Applied Toxicology*. 2014;34(6):714-25.
329. Maisanaba S, Hercog K, Filipic M, Jos A, Zegura B. Genotoxic potential of montmorillonite clay mineral and alteration in the expression of genes involved in toxicity mechanisms in the human hepatoma cell line HepG2. *Journal of Hazardous Materials*. 2016;304:425-33.
330. Maisanaba S, Jorda-Beneyto M, Camean AM, Jos A. Effects of two organomodified clays intended to food contact materials on the genomic instability and gene expression of hepatoma cells. *Food and Chemical Toxicology*. 2016;88:57-64.

331. Maisanaba S, Hercog K, Ortuno N, Jos A, Zegura B. Induction of micronuclei and alteration of gene expression by an organomodified clay in HepG2 cells. *Chemosphere*. 2016;154:240-8.
332. Sharma AK, Schmidt B, Frandsen H, Jacobsen NR, Larsen EH, Binderup ML. Genotoxicity of unmodified and organo-modified montmorillonite. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2010;700(1-2):18-25.
333. Isoda K, Nagata R, Hasegawa T, Taira Y, Taira I, Shimizu Y, et al. Hepatotoxicity and Drug/Chemical Interaction Toxicity of Nanoclay Particles in Mice. *Nanoscale Research Letters*. 2017;12(1):199.
334. Afriyie-Gyawu E, Mackie J, Dash B, Wiles M, Taylor J, Huebner H, et al. Chronic toxicological evaluation of dietary NovaSil clay in Sprague-Dawley rats. *Food Additives and Contaminants*. 2005;22(3):259-69.
335. Lee Y-H, Kuo T-F, Chen B-Y, Feng Y-K, Wen Y-R, Lin W-C, et al. Toxicity assessment of montmorillonite as a drug carrier for pharmaceutical applications: yeast and rats model. *Biomedical Engineering: Applications, Basis and Communications*. 2005;17(02):72-8.
336. Maisanaba S, Puerto M, Gutierrez-Praena D, Llana-Ruiz-Cabello M, Pichardo S, Mate A, et al. In vivo evaluation of activities and expression of antioxidant enzymes in Wistar rats exposed for 90 days to a modified clay. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*. 2014;77(8):456-66.
337. Maisanaba S, Gutiérrez-Praena D, Puerto M, Moyano R, Blanco A, Jordá M, et al. Effects of the subchronic exposure to an organomodified clay mineral for food packaging applications on Wistar rats. *Applied Clay Science*. 2014;95:37-40.
338. Maisanaba S, Gutierrez-Praena D, Puerto M, Llana-Ruiz-Cabello M, Pichardo S, Moyano R, et al. In vivo toxicity evaluation of the migration extract of an organomodified clay-poly(lactic) acid nanocomposite. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*. 2014;77(13):731-46.
339. Ezhkova AM, Yapparov AK, Ezhkov VO, Yapparov IA, Sharonova NL, Degtyareva IA, et al. Fabrication of nanoscale bentonite, study of its structure and toxic properties, and determination of safe doses. *Nanotechnologies in Russia*. 2015;10(1-2):120-7.
340. Shipelin VA, Gmshinski IV, Sarkisyan VA, Khotimchenko SA, Nikityuk DB. Influence of Bentonite Nanoclay on the State of the Rat Intestine Protective Barrier in the Experiment. *Nanotechnologies in Russia*. 2021;15(7-8):492-9.
341. Siddiqui SA, Zannou O, Bahmid NA, Fidan H, Alamou A-F, Nagdalian AA, et al. Consumer behavior towards nanopackaging-A new trend in the food industry. *Future Foods*. 2022;6:100191.
342. Giles EL, Kuznesof S, Clark B, Hubbard C, Frewer LJ. Consumer acceptance of and willingness to pay for food nanotechnology: a systematic review. *Journal of Nanoparticle Research*. 2015;17(12):467.
343. Szakal C, Roberts SM, Westerhoff P, Bartholomaeus A, Buck N, Illuminato I, et al. Measurement of nanomaterials in foods: integrative consideration of challenges and future prospects. *ACS Nano*. 2014;8(4):3128-35.

344. Rasmussen K, Rauscher H, Kearns P, Gonzalez M, Riego Sintes J. Developing OECD test guidelines for regulatory testing of nanomaterials to ensure mutual acceptance of test data. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2019;104:74-83.
345. Garcia CV, Shin GH, Kim JT. Metal oxide-based nanocomposites in food packaging: Applications, migration, and regulations. *Trends in Food Science and Technology*. 2018;82:21-31.
346. Avrupa Komisyonu gıda güvenliğine ilişkin web sayfası [Internet]. 2024 [Erişim tarihi 26.09.2024]. Erişim adresi: [https://food.ec.europa.eu/safety/chemical-safety/food-contact-materials/authorisations\\_en](https://food.ec.europa.eu/safety/chemical-safety/food-contact-materials/authorisations_en).
347. Committee ES, More S, Bampidis V, Benford D, Bragard C, Halldorsson T, et al. Guidance on risk assessment of nanomaterials to be applied in the food and feed chain: human and animal health. *EFSA Journal*. 2021;19(8):e06768.
348. Committee ES, More S, Bampidis V, Benford D, Bragard C, Halldorsson T, et al. Guidance on technical requirements for regulated food and feed product applications to establish the presence of small particles including nanoparticles. *EFSA Journal*. 2021;19(8):e06769.
349. FDA. Guidance for industry: Assessing the effects of significant manufacturing process changes, including emerging technologies, on the safety and regulatory status of food ingredients and food contact substances, including food ingredients that are color additives. Book *Guidance for Industry: Assessing the Effects of Significant Manufacturing Process Changes, Including Emerging Technologies, on the Safety and Regulatory Status of Food Ingredients and Food Contact Substances, Including Food Ingredients that are Color Additives-Draft Guidance*. 2014.
350. Center for Food Safety web sayfası [Internet]. 2024 [Erişim tarihi 26.09.2024]. Erişim adresi: <https://www.centerforfoodsafety.org/press-releases/3262/fda-releases-final-guidance-on-nanotechnology-in-food>.
351. FDA, Guidance for Industry Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology [Internet]. 2014 [Erişim tarihi 26.09.2024]. Erişim adresi: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/considering-whether-fda-regulated-product-involves-application-nanotechnology>.
352. Authenticated U.S. Government Information [Internet]. 2023 [Erişim tarihi 26.09.2024]. Erişim adresi: <https://www.govinfo.gov/content/pkg/USCODE-2023-title21/pdf/USCODE-2023-title21-chap9-subchapII-sec321.pdf>.
353. Food Ingredient & Packaging Terms [Internet]. 2018 [Erişim tarihi 26.09.2024]. Erişim adresi: <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/food-ingredient-packaging-terms#:~:text=Indirect%20Food%20Additive%20%2D%20In%20general,in%20or%20on%20the%20food>.
354. Authenticated U.S. Government Information [Internet]. 2024 [Erişim tarihi 26.09.2024]. Erişim adresi: <https://www.govinfo.gov/content/pkg/USCODE-2023-title21/pdf/USCODE-2023-title21-chap9-subchapIV-sec348.pdf>.

355. Authenticated U.S. Government Information [Internet]. 2024 [Erişim tarihi 26.09.2024]. Erişim adresi: <https://www.govinfo.gov/content/pkg/USCODE-2023-title21/pdf/USCODE-2023-title21-chap9-subchapIV-sec342.pdf>.
356. National Archives and Records Administration [Internet]. 2024 [Erişim tarihi 26.09.2024]. Erişim adresi: <https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-B>.
357. National Archives and Records Administration [Internet]. 2024 [Erişim tarihi 26.09.2024]. Erişim adresi: <https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-B/part-170>.
358. National Archives and Records Administration [Internet]. 2024 [Erişim tarihi 26.09.2024]. Erişim adresi: <https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-B/part-182>.
359. National Archives and Records Administration [Internet]. 2024 [Erişim tarihi 26.09.2024]. Erişim adresi: <https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-B/part-174>.
360. Authenticated U.S. Government Information [Internet]. 2024 [Erişim tarihi 26.09.2024]. Erişim adresi: <https://www.govinfo.gov/content/pkg/CFR-2024-title21-vol3/pdf/CFR-2024-title21-vol3-part170-subpartD.pdf>.
361. Bactiblock Threshold of Regulation (TOR) Exemption [Internet]. 2024 [Erişim tarihi 26.09.2024]. Erişim adresi: <https://www.hfpappexternal.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=TOR&id=2011-001>.
362. EPA, EPA Takes Action to Protect Public from an Illegal Nano Silver Pesticide in Food Containers; Cites NJ Company for Selling Food Containers with an Unregistered Pesticide Warns Large Retailers Not to Sell These Products [Internet]. 2024 [Erişim tarihi 26.09.2024]. Erişim adresi: [https://www.epa.gov/archive/epapages/newsroom\\_archive/newsreleases/6469952cdbc19a4585257cac0053e637.html](https://www.epa.gov/archive/epapages/newsroom_archive/newsreleases/6469952cdbc19a4585257cac0053e637.html).
363. Government of Canada Packaging Materials Food Packaging Regulations [Internet]. 2024 [Erişim tarihi 26.09.2024]. Erişim adresi: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/food-safety/packaging-materials.html>.
364. Government of Canada Food and Food Packaging [Internet]. 2024 [Erişim tarihi 26.09.2024]. Erişim adresi: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/science-research/emerging-technology/nanotechnology/food-food-packaging.html>.
365. Resolução Da Diretoria Colegiada - Rdc N° 326, De 3 De Dezembro De 2019 [Internet]. 2024 [Erişim tarihi 26.09.2024]. Erişim adresi: [https://bvs.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2019/RDC\\_326\\_2019\\_.pdf](https://bvs.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2019/RDC_326_2019_.pdf).
366. Resolução Da Diretoria Colegiada - Rdc N° 839, De 14 De Dezembro De 2023 [Internet]. 2024 [Erişim tarihi 26.09.2024]. Erişim adresi: [https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6582266/RDC\\_839\\_2023\\_.pdf/a064b871-55dd-44b9-ab40-16ca7672497d](https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6582266/RDC_839_2023_.pdf/a064b871-55dd-44b9-ab40-16ca7672497d).

367. Inquiries about new substances: Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare [Internet]. 2024 [Erişim tarihi 26.09.2024]. Erişim adresi: [https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage\\_13052.html](https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage_13052.html).
368. Japan Ministry of Health, Questions and Answers [Internet]. 2024 [Erişim tarihi 26.09.2024]. Erişim adresi: <https://www.mhlw.go.jp/content/000819339.pdf>.
369. The guide to submitting application about the new draft of the Positive List [Internet]. 2024 [Erişim tarihi 26.09.2024]. Erişim adresi: <https://www.mhlw.go.jp/content/000944140.pdf>.
370. Inviting application for requests about the draft of the Positive List [Internet]. 2024 [Erişim tarihi 26.09.2024]. Erişim adresi: [https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage\\_25287.html#link1](https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage_25287.html#link1).
371. Mohammadi Z, Jafari SM. Regulatory principles on food nanoparticles legislated by Asian and Oceanian countries. Safety and Regulatory Issues of Nanoencapsulated Food Ingredients 2021. p. 201-38.
372. Australia New Zealand Food Standards Code - Standard 3.2.2 - Food Safety Practices and General Requirements (Australia Only) [Internet]. 2024 [Erişim tarihi 26.09.2024]. Erişim adresi: <https://www.legislation.gov.au/F2008B00576/latest/text>.
373. Abandonment Report – Proposal P1034 [Internet]. 2024 [Erişim tarihi 26.09.2024]. Erişim adresi: <https://www.foodstandards.gov.au/sites/default/files/food-standards-code/proposals/Documents/P1034%20Abandonment.pdf>.
374. Australia FS., Nanotechnology and Food [Internet]. 2022 [Erişim tarihi 26.09.2024]. Erişim adresi: <https://www.foodstandards.gov.au/consumer/foodtech/nanotech>.
375. Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği [Internet]. 2018 [Erişim tarihi 26.09.2024]. Erişim adresi: <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2018/04/20180405-2.htm>.
376. Bilimsel Risk Değerlendirme Komisyonları [Internet]. 2024 [Erişim tarihi 26.09.2024]. Erişim adresi: <https://www.tarimorman.gov.tr/Konu/1957/bilimsel-risk-degerlendirme-komisyon>.
377. Türk Gıda Kodeksi Gıda ile Temas Eden Plastik Madde ve Malzemeler Tebliği [Internet]. 2019 [Erişim tarihi 26.09.2024]. Erişim adresi: <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2019/12/20191225M1-10.htm>.
378. Malik S, Muhammad K, Waheed Y. Nanotechnology: A Revolution in Modern Industry. *Molecules*. 2023;28(2).
379. Imran M, Revol-Junelles A-M, Martyn A, Tehrany EA, Jacquot M, Linder M, et al. Active food packaging evolution: transformation from micro-to nanotechnology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2010;50(9):799-821.
380. Gopinath K, Sathishkumar G, Xu L. An Overview of the Copper Oxide Nanofillers Integrated in Food Packaging Systems. *Coatings*. 2024;14(1):81.

381. Siripatrawan U, Kaewklin P. Fabrication and characterization of chitosan-titanium dioxide nanocomposite film as ethylene scavenging and antimicrobial active food packaging. *Food Hydrocolloids*. 2018;84:125-34.
382. Thirumalai A, Harini K, Pallavi P, Gowtham P, Girigoswami K, Girigoswami A. Nanotechnology driven improvement of smart food packaging. *Materials Research Innovations*. 2023;27(4):223-32.
383. Caon T, Martelli SM, Fakhouri FM. New trends in the food industry: application of nanosensors in food packaging. *Nanobiosensors: Elsevier*; 2017. p. 773-804.
384. Sukhanova A, Bozrova S, Sokolov P, Berestovoy M, Karaulov A, Nabiev I. Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. *Nanoscale Research Letters*. 2018;13(1):44.
385. Abbasi R, Shineh G, Mobaraki M, Doughty S, Tayebi L. Structural parameters of nanoparticles affecting their toxicity for biomedical applications: a review. *Journal of Nanoparticle Research*. 2023;25(3):43.
386. Ramanathan A. Toxicity of nanoparticles\_ challenges and opportunities. *Applied Microscopy*. 2019;49(1):2.
387. Ispas C, Andreescu D, Patel A, Goia DV, Andreescu S, Wallace KN. Toxicity and developmental defects of different sizes and shape nickel nanoparticles in zebrafish. *Environmental Science & Technology*. 2009;43(16):6349-56.
388. Zhang D, Wei L, Zhong M, Xiao L, Li HW, Wang J. The morphology and surface charge-dependent cellular uptake efficiency of upconversion nanostructures revealed by single-particle optical microscopy. *Chemical Science*. 2018;9(23):5260-9.
389. Fadeel B, Fornara A, Toprak MS, Bhattacharya K. Keeping it real: The importance of material characterization in nanotoxicology. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015;468(3):498-503.
390. Liu Y, Zhu S, Gu Z, Chen C, Zhao Y. Toxicity of manufactured nanomaterials. *Particuology*. 2022;69:31-48.
391. Xuan L, Ju Z, Skonieczna M, Zhou PK, Huang R. Nanoparticles-induced potential toxicity on human health: applications, toxicity mechanisms, and evaluation models. *MedComm*. 2023;4(4):e327.
392. Amini SM, Gilaki M, Karchani M. Safety of nanotechnology in food industries. *Electronic Physician*. 2014;6(4):962.
393. Grob K, Biedermann M, Scherbaum E, Roth M, Rieger K. Food contamination with organic materials in perspective: packaging materials as the largest and least controlled source? A view focusing on the European situation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2006;46(7):529-35.
394. Tiede K, Boxall AB, Tear SP, Lewis J, David H, Hasselov M. Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment. *Food Additives and Contaminants Part A*. 2008;25(7):795-821.

395. Moradi M, Razavi R, Omer AK, Farhangfar A, McClements DJ. Interactions between nanoparticle-based food additives and other food ingredients: A review of current knowledge. *Trends in Food Science and Technology*. 2022;120:75-87.
396. Burcza A, Gräf V, Walz E, Greiner R. Impact of surface coating and food-mimicking media on nanosilver-protein interaction. *Journal of Nanoparticle Research*. 2015;17(11).
397. Pareek V, Bhargava A, Bhanot V, Gupta R, Jain N, Panwar J. Formation and Characterization of Protein Corona Around Nanoparticles: A Review. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2018;18(10):6653-70.
398. Lerch M, Fengler R, Mbog G-R, Nguyen KH, Granby K. Food simulants and real food—What do we know about the migration of PFAS from paper based food contact materials? *Food Packaging and Shelf Life*. 2023;35:100992.
399. Morais LdO, Macedo EV, Granjeiro JM, Delgado IF. Critical evaluation of migration studies of silver nanoparticles present in food packaging: A systematic review. *Critical Reviews in Food Science*. 2020;60(18):3083-102.
400. Lerch M, Fengler R, Mbog G-R, Nguyen KH, Granby K. Food simulants and real food – What do we know about the migration of PFAS from paper based food contact materials? *Food Packaging and Shelf Life*. 2023;35.
401. Muncke J, Andersson A-M, Backhaus T, Boucher JM, Carney Almroth B, Castillo Castillo A, et al. Impacts of food contact chemicals on human health: a consensus statement. *Environmental Health*. 2020;19:1-12.
402. Begley T, Castle L, Feigenbaum A, Franz R, Hinrichs K, Lickly T, et al. Evaluation of migration models that might be used in support of regulations for food-contact plastics. *Food Additives and Contaminants*. 2005;22(1):73-90.
403. Dos Santos CA, Seckler MM, Ingle AP, Gupta I, Galdiero S, Galdiero M, et al. Silver nanoparticles: therapeutic uses, toxicity, and safety issues. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014;103(7):1931-44.
404. Dimitrijevic M, Karabasil N, Boskovic M, Teodorovic V, Vasilev D, Djordjevic V, et al. Safety aspects of nanotechnology applications in food packaging. *Procedia Food Science*. 2015;5:57-60.
405. Naseer B, Srivastava G, Qadri OS, Faridi SA, Islam RU, Younis K. Importance and health hazards of nanoparticles used in the food industry. *Nanotechnology Reviews*. 2018;7(6):623-41.

## 8. EKLER

EK-1: Orjinallik Raporu

TEZİN TAM BAŞLIĞI: Gıda ile Temas Eden Ambalaj Malzemelerinde Nanoparçacıkların Kullanımının Toksikolojik Açıdan İncelenmesi ve Konuya İlişkin Türkiye ve Dünyadaki Yasal Düzenlemelerin Değerlendirilmesi

ÖĞRENCİNİN ADI SOYADI: Aysel Sezer

DOSYANIN TOPLAM SAYFA SAYISI: 163



### Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Aysel Sezer  
 Ödev başlığı: GIDA İLE TEMAS EDEN AMBALAJ MALZEMELERİNDE NANOPA...  
 Gönderi Başlığı: GIDA İLE TEMAS EDEN AMBALAJ MALZEMELERİNDE NANOPA...  
 Dosya adı: AYSEL\_SEZER-TEZ\_29ocak2025.docx  
 Dosya boyutu: 1,001.55K  
 Sayfa sayısı: 163  
 Kelime sayısı: 43,278  
 Karakter sayısı: 307,817  
 Gönderim Tarihi: 29-Oca-2025 06:52ÖS (UTC+0300)  
 Gönderim Numarası: 2574489594



## GIDA İLE TEMAS EDEN AMBALAJ MALZEMELERİNDE NANOPARÇACIKLARIN KULLANIMININ TOKSİKOLOJİK AÇIDAN İNCELENMESİ VE KONUYA İLİŞKİN TÜRKİYE VE DÜNYADAKİ YASAL DÜZENLEMELERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ORJENALLIK RAPORU

<b>%5</b> BENZERLİK ENDEKSİ	<b>%4</b> İNTERNET KAYNAKLARI	<b>%3</b> YAYINLAR	<b>%3</b> ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
--------------------------------	----------------------------------	-----------------------	-------------------------------

BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	<b>%2</b>
<b>2</b>	diatek.com.tr İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>
<b>3</b>	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>
<b>4</b>	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>
<b>5</b>	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>
<b>6</b>	hdl.handle.net İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>
<b>7</b>	www.plastik-ambalaj.com İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>
<b>8</b>	openaccess.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>

## 9. ÖZGEÇMİŞ