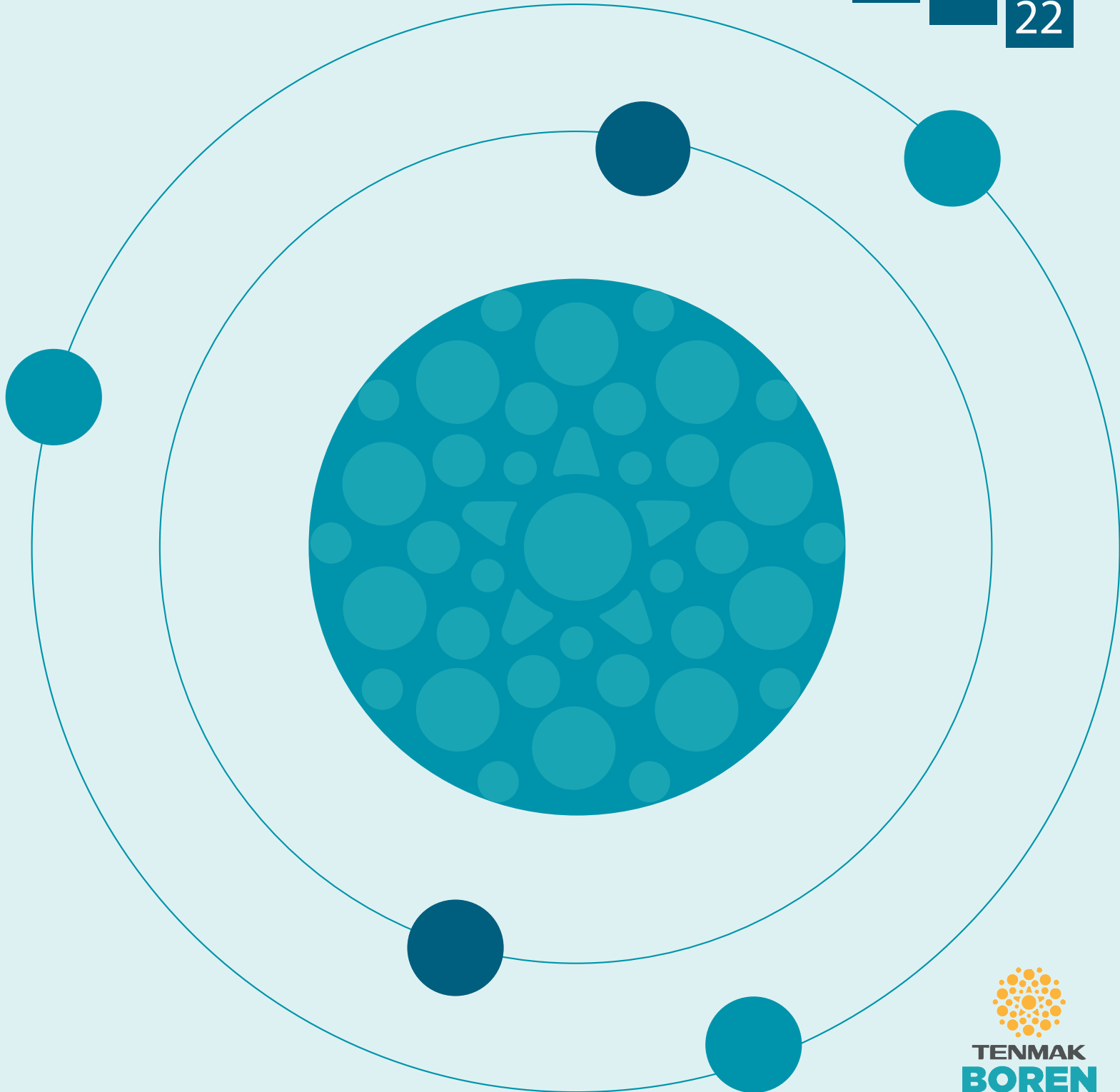


BOR DERGİSİ

JOURNAL OF BORON

CİLT/VOL	SAYI/ISSUE	YIL/YEAR
07	02	2022



BOR DERGİSİ

JOURNAL OF BORON

CİLT VOL 07 SAYI ISSUE 02 YIL YEAR 2022

**Türkiye Enerji Nükleer Maden Araştırma Kurumu (TENMAK) Adına İmtiyaz Sahibi
Owner on Behalf of Turkish Energy, Nuclear and Mining Research Authority (TENMAK)**

Başkan/President

Dr. Abdulkadir Balıkcı (Ankara, Türkiye)

Baş Editör/Editor in Chief

Dr. Zafer Evis (Ankara, Türkiye)

Editörler/Editors

Dr. Abdulkerim Yörükoğlu (Ankara, Türkiye)

Dr. Fatih Akkurt (Ankara, Türkiye)

Dr. Sedat Sürdem (Ankara, Türkiye)

DANIŞMA KURULU

ADVISORY BOARD

Dr. Ali Çırpan (Ankara, Türkiye)	Dr. İsmail Duman (İstanbul, Türkiye)
Dr. Arun K. Chattopadhyay (Pittsburgh, ABD)	Dr. İsmail Girgin (Ankara, Türkiye)
Dr. Atakan Peker (Washington, ABD)	Dr. Jamal Ahmad (Abu Dabi, BAE)
Dr. Ayşen Tezcaner (Ankara, Türkiye)	Dr. Mehmet Suat Somer (İstanbul, Türkiye)
Dr. Bilal Demirel (Kayseri, Türkiye)	Dr. Metin Gürü (Ankara, Türkiye)
Dr. Cahit Helvacı (İzmir, Türkiye)	Dr. Nalan Kabay (İzmir, Türkiye)
Dr. Çetin Çakanyıldırım (Çorum, Türkiye)	Dr. Nuran Ay (Eskişehir, Türkiye)
Derya Maraşlıoğlu (Ankara, Türkiye)	Dr. Olcay Şendil (Ankara, Türkiye)
Dr. Dursun Ali Köse (Çorum, Türkiye)	Dr. Onuralp Yücel (İstanbul, Türkiye)
Dr. Duygu Ağaoğulları (İstanbul, Türkiye)	Dr. Osman Okur (Kocaeli, Türkiye)
Dr. Emin Bayraktar (Paris, Fransa)	Dr. Rifaqat Hussain (Islamabad, Pakistan)
Dr. Erol Pehlivan (Konya, Türkiye)	Dr. Rasim Yarım (Friedrichshafen, Almanya)
Dr. Fatih Alçı (Aksaray, Türkiye)	Dr. Raşit Koç (Illinois, ABD)
Dr. Gülay Özkan (Ankara, Türkiye)	Dr. Sait Gezgin (Konya, Türkiye)
Dr. Gülhan Özbayoğlu (Ankara, Türkiye)	Dr. Şafak Gökhan Özkan (İstanbul, Türkiye)
Dr. Hatem Akbulut (Sakarya, Türkiye)	Dr. Şener Oktik (İstanbul, Türkiye)
Dr. Hüseyin Çelikkın (Ankara, Türkiye)	Dr. Taner Yıldırım (Maryland, ABD)
Dr. İhsan Efeoğlu (Erzurum, Türkiye)	Dr. Yuri Grin (Dresden, Almanya)
Dr. İsmail Çakmak (İstanbul, Türkiye)	

Editöryal Teknik Personel/Editorial Technical Staff

Dr. Abdulkadir Solak
Ayça Karamustafaoğlu
Sema Akbaba
Sinem Erdemir Guran

Sorumlu Yazı İşleri Müdürü

Manager of Publication
Dr. Sedat Sürdem
sedatsurdem@gazi.edu.tr

Yayıncı/Publisher

TENMAK BOREN Bor Araştırma Enstitüsü

Yayın İdare Adresi/Address of Publication Manager

Dumlupınar Bulvarı (Eskişehir Yolu 7. km), No:166, D Blok,
Ankara, 06530, Türkiye
Tel: (0312) 201 36 00
Fax: (0312) 219 80 55
E-posta: boren.journal@tenmak.gov.tr
Web: <https://dergipark.org.tr/boron>

Yayın Türü/Type of Publication: Yaygın süreli yayın

Yayın Aralığı/Range of Publication: 3 Aylık

Yayın Tarihi/Publication Date: 30/06/2022

Bor Dergisi uluslararası hakemli bir dergidir. Dergi, ULAKBİM TR Dizin tarafından indekslenmekte olup yılda dört defa yayımlanmaktadır. Derginin yazım kılavuzuna, telif hakkı devir formuna ve yayınlanan makalelere <https://dergipark.org.tr/boron> adresinden ulaşılabilir. / Journal of Boron is International refereed journal. Journal of Boron is indexed by ULAKBİM TR Indexed, published quarterly a year. Please visit the Journal website <https://dergipark.org.tr/boron> for writing rules, copyright form and published articles.

İÇİNDEKİLER/CONTENTS

- Toz enjeksiyon kalıplama tekniği için üretilen bor karbür besleme stoklarının reolojik ve bağlayıcı giderme özelliklerinin incelenmesi Sezer Bilketay, Batuhan Soruşbay, H. Özkan Gülsoy 453
- The effect of boric acid on copine-7 expression and bioactivity in dental pulp stem cells Serife Buket Bozkurt, Sema S. Hakki 461
- Synthesis, electrochemical characterization and biosensor application of a novel organoboron monomer ... Nimet Yildirim-Tirgil, Zeycan Kalkan, Soner Ozturk 467
- In vitro* biological activities of potassium metaborate; antioxidative, antimicrobial and antibiofilm properties..... Tuba Baygar, Nurdan Sarac, Ozgur Ceylan, Aysel Ugur, Rukiye Boran, Uydu Balci 475
- Bor sitrat uygulanan ratların serum ve plazmalarında bor tayini Ömer Faruk Koçak, Alptuğ Atila, Zekai Halıcı, Mevlüt Albayrak 482



BOR DERGİSİ

JOURNAL OF BORON

<https://dergipark.org.tr/boron>



Toz enjeksiyon kalıplama tekniği için üretilen bor karbür besleme stoklarının reolojik ve bağlayıcı giderme özelliklerinin incelenmesi

Sezer Bilketay¹, Batuhan Soruşbay², H. Özkan Gülsoy^{2,*}

¹Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 34722, Türkiye

²Marmara Üniversitesi, Teknoloji Fakültesi, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği, İstanbul, 34722, Türkiye

MAKALE BİLGİSİ

Makale Geçmişi:

İlk gönderi 20 Şubat 2022

Kabul 5 Nisan 2022

Online 30 Haziran 2022

Araştırma Makalesi

DOI: 10.30728/boron.1076544

Anahtar kelimeler:

Bor karbür

Reolojik ve bağlayıcı giderme özellikleri

Toz enjeksiyon kalıplama

ÖZET

Bu çalışmada, bor karbür (B_4C) tozu ve çeşitli polimerik bağlayıcılar kullanılarak toz enjeksiyon kalıplama (TEK) besleme stoğu hazırlanmıştır. B_4C tozu ilavesinin besleme stoğundaki kritik toz yükleme değeri, reolojik ve bağlayıcı giderme davranışları üzerindeki etkisi farklı sıcaklıklarda rotasyonel reometre cihazı kullanılarak incelenmiştir. Hacimce %2,5'lük artışla %50-60 toz yükleme aralığında gerçekleştirilen incelemeler sonucunda kritik toz yükleme değerinin %55 olduğu tespit edilmiş olup bu katı yükleme oranındaki B_4C tozu polimerik bağlayıcılar ile karıştırılarak besleme stoğu elde edilmiştir. Uygun besleme stokları kalıplama aşamasının ardından elde edilen numunelerden bağlayıcıları uzaklaştırmak için solvent ve ısı bağlayıcı giderme teknikleri kullanılmıştır. Bağlayıcı giderilen numuneler yüksek saflıktaki Ar atmosferi altında sinterlenmiştir. Başlangıç toz morfolojileri, kalıplanmış, bağlayıcıları giderilmiş ve sinterlenmiş numunelerin kırık yüzeyleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Deneysel sonuçlar hacimce %55 toz yükleme oranlarındaki besleme stokları başarılı şekilde kalıplanabilmekte ve 50-70°C sıcaklıklarında hasarsız solvent bağlayıcı giderme işlemine tabi tutulabilmekte olduğunu göstermiştir. 2200°C'de 1 saat sinterleme sonrasında numunelerin yoğunlukları yaklaşık 1,92 g/cm³ (bağıl yoğunluk %75), boyutsal çekme ise %15,23 olarak ölçülmüştür.

Investigation of rheological and debinding properties of boron carbide feedstocks for powder injection molding

ARTICLE INFO

Article history:

Received February 20, 2022

Accepted April 5, 2022

Available online June 30, 2022

Research Article

DOI: 10.30728/boron.1076544

Keywords:

Boron carbide

Rheology and debinding properties

Powder injection molding

ABSTRACT

In this study, powder injection molding (PIM) feedstock was prepared using boron carbide (B_4C) powder and various polymeric binders. The effects of B_4C powder addition on the attributes of feedstock, critical solid loading, rheological behavior and binder decomposition behavior device at different temperatures were investigated using rotational rheometer. As a result of the examinations carried out in the powder loading range of 50-60% with an increase of 2.5% in volume, it was determined that the critical powder loading value was 55%, and the feedstock was obtained by mixing the B_4C powder at this solid loading rate with polymeric binders. Solvent and thermal binder removal techniques were used to remove binders from samples obtained after the appropriate feedstock molding step. The debinded samples were sintered under a high purity Ar atmosphere. Initial powder morphologies, fractured surfaces of molded, debinded and sintered samples were investigated using scanning electron microscopy (SEM). Experimental results showed that feedstocks with powder loading rates of 55% by volume can be successfully molded and subjected to undamaged solvent binder removal at temperatures of 50-70°C. After sintering for 1 hour at 2200°C, densities of the samples were measured approximately 1.92 g/cm³ (relative density 75%), and the dimensional shrinkage was measured as 15.23%.

1. Giriş (Introduction)

Toz enjeksiyon kalıplama (TEK) yüksek hacimdeki küçük ve karmaşık şekilli metal veya seramik parçaların efektif bir biçimde üretilmesi için plastik en-

enjeksiyon kalıplamadan türetilmiş olan bir toz metalurjisi (TM) yöntemidir. Diğer geleneksel TM yöntemleri ile karşılaştırıldığında talaşlı işleme ihtiyaç duyulmaması, daha düşük maliyetli oluşu ve yüksek sertlikteki malze-

*Corresponding author: ogulsoy@marmara.edu.tr

melerden üretilecek olan parçalar için oldukça hassas boyutsal tolerans sağlaması temel avantajlarıdır. TEK sırasıyla; toz karışımına termoplastik bağlayıcı karıştırılarak besleme stoğunun oluşturulması, istenilen şeklin elde edilmesi için besleme stoğunun basınç altında kalıba enjeksiyonu, sıcaklık veya çözücü kullanılarak yapılan bağlayıcı giderme ve son olarak numuneleri yoğunlaştırmak için yapılan sinterleme işlemlerinden oluşmaktadır [1,2].

B_4C , elmas ve kübik bor nitrürden sonraki en sert üçüncü malzeme olmasının yanı sıra düşük yoğunluk, yüksek nötron absorpsiyonu, iyi kimyasal ve mekanik özelliklere sahiptir. Bu özelliklerinden ötürü yüksek aşınma dayanımı gerektiren uygulamalarda, yüksek sıcaklık termoelektrik uygulamalarında, hafif kişisel zırh, nükleer reaktörlerde kontrol çubuğu ve takviyeli seramik kompozitlerde elyaf olarak kullanılmaktadır [3-6]. Ancak sahip olduğu zayıf işlenebilirlik ve yüksek işleme maliyeti endüstriyel uygulamalarda B_4C 'ün karmaşık şekilli parçalarda kullanımını kısıtlamaktadır. Buna ek olarak yüksek ergime noktası, düşük öz-yayınım katsayısı, yüksek buhar basıncı ve ağırlıklı olarak kovalent bağlı olması özellikleri nedeniyle yoğunlaştırma işlemi için yüksek sıcaklık sinterlemesi gerektirmektedir. Literatürde yapılan bazı çalışmalarda Al_2O_3 , MgO , SiC , ZrO_2 , WC ve diğer seramik malzemelerin TEK tekniği ile üretimi ve özellikleri üzerine olan etkisine odaklanılmıştır [6-9]. B_4C 'ün TEK yöntemi ile üretilmesi üzerine az sayıda çalışma yapıldığı, yapılan çalışmalarda ise verilerin yetersiz ve geliştirmeye açık olduğu görülmüştür. Bu bağlamda, üstün özellikleri nedeniyle önemli bir mühendislik malzemesi olan B_4C seramiği bu çalışmada incelenmiştir.

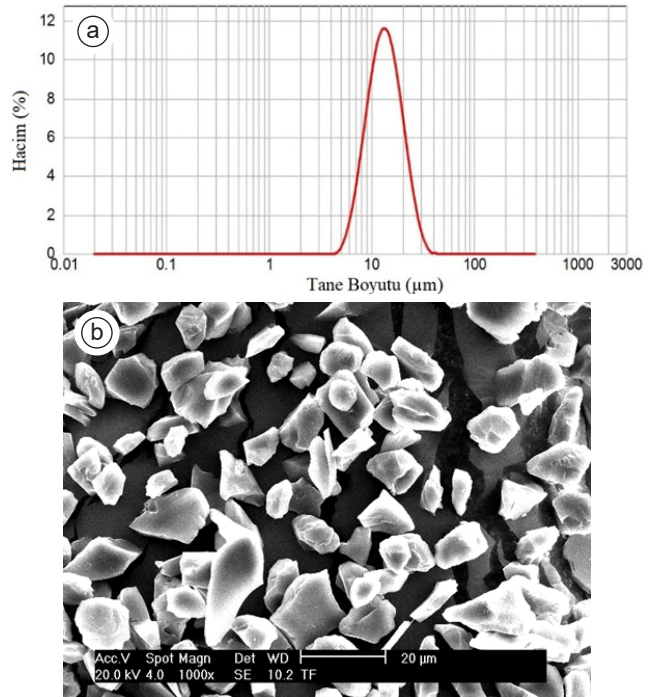
Bağlayıcı sistemi genellikle polimer karışımından oluşmakta olup TEK tekniğinin en önemli parçasıdır. Bağlayıcının, kalıplamaya uygun ve kolay uzaklaştırılabilmesi için düşük viskoziteye sahip olması gerekmektedir [10-13]. Gereğinden fazla bağlayıcı kullanımı, kalıplama sırasında bağlayıcıların tozlardan ayrışmasına ve homojen olmayan parçalara sebep olacağından istenmeyen bir durumdur. Diğer taraftan, aşırı toz yüklemesi yüksek besleme viskozitesi sebebiyle akışı kısıtlayarak enjeksiyon kalıplamanın başarısız olmasına neden olmaktadır [1,2,14,15]. Bu nedenle katı toz ve bağlayıcı hacim oranına bağlı olan akıcılık kalıplama aşaması için kritik öneme sahiptir. Besleme stoğunun viskozitesi, başarılı TEK prosesinde akış davranışını belirlemek için gerekli olan en önemli özelliktir [4,14,15].

Bu çalışmada TEK için besleme stoğunun hazırlanmasının yanı sıra B_4C 'ün reolojik ve solvent ile bağlayıcı giderme özellikleri üzerine de odaklanılmıştır. Besleme stoğunun reolojik özelliklerinin belirlenebilmesi için bağlayıcıların ısı bozunma sıcaklığı, katı toz oranı ve karıştırma sıcaklığı tayinleri gerçekleştirilmiştir. Bu anlamda, katı oranı ile sıcaklık arasındaki ilişki deneysel

değerlendirme için büyük önem taşımaktadır. Uygun özelliklerdeki besleme stoklarının belirlenmesi sonrasında solvent bağlayıcı giderme davranışlarının belirlenmesi bir diğer araştırma konusu yapılmıştır.

2. Malzemeler ve Yöntemler (Materials and Methods)

Besleme stoklarının hazırlanması için Absco Co. firmasından tedarik edilmiş olan ticari saflıktaki (%98,14) B_4C tozları kullanılmıştır. B_4C tozunun görünür ve vurğu yoğunlukları sırasıyla $0,65 \text{ g/cm}^3$ ve $1,12 \text{ g/cm}^3$ olarak ölçülmüştür. Şekil 1a'da Malvern Mastersizer cihazı ile analiz edilmiş olan B_4C tozunun parçacık boyut dağılım eğrisi verilmiştir. Tozların morfolojisinin belirlenmesi için SEM (FEI-Srion) ile görüntülenmiş ve Şekil 1b'de verilmiştir. B_4C tozunun toz boyut dağılımı D_{50} : $14,9 \mu\text{m}$ olarak belirlenmiştir. Ayrıca toz morfolojisinin köşeli ve düzensiz şekilli olduğu görülmektedir.



Şekil 1. (a) B_4C tozunun parçacık boyut dağılımı, (b) B_4C tozunun SEM görüntüsü ((a) Particle size distribution of B_4C powder, (b) SEM image of B_4C powder).

B_4C besleme stoğunun hazırlanmasında çok bileşenli polimerik bağlayıcı sistemi kullanılmış olup hacimce %69 paraffin mumu (PM), %20 carnauba mumu (CM), %10 polipropilen (PP) ve %1 stearik asit (SA) kullanılmıştır. Bağlayıcı bileşenlerinin karakteristik özellikleri Tablo 1'de verilmiştir. Literatürde ve daha önceki çalışmalarımızda sıklıkla ve başarı ile kullanılan çok bileşenli bağlayıcılar, kalıplama aşaması için düşük viskozite sergiledikleri ve bağlayıcı giderme aşamalarında kısa sürede uzaklaştırılabildikleri için tercih edilmiştir [16,17]. Bağlayıcıların ısı bozunma sıcaklıklarının tespiti, SII 6300 TGA-DTA (SII Nanaotechnology Inc., Japonya) markalı termogravimetrik analiz (TGA) cihazı

ile oda sıcaklığından 600°C'ye kadar 10°C/dk ısıtma hızında gerçekleştirilmiştir.

Tablo 1. Bağlayıcı bileşenlerinin özellikleri (Characteristics of binder components).

Bağlayıcı	Üretici	Ergime Sıcaklığı (°C)	Bozunma Sıcaklığı (°C)	Yoğunluk (g/cm ³)
PM	Merck	58	242-270	0,90
CM	Merck	85	340-380	0,99
PP	PETKİM	170	450-480	0,95
SA	Merck KGaA	66	260-300	0,96

Katı yükleme oranlarının besleme stoğu reolojik davranışları üzerindeki etkisini gözlemleyebilmek için %2,5'lik artışlarla hacimce %50-60 karışımları hazırlanmıştır. B₄C tozundaki nemi gidermek için tozlar etüvde 105°C'de 1 saat kurutulmuştur. Her hacim değerindeki besleme stoğu, homojen karışım elde edebilmek için 180°C'de bıçaklı karıştırıcıda hazırlanmıştır. Besleme stoğunun reolojik davranışları 10-1000s⁻¹ kayma hızı ve 130-150°C sıcaklık aralığında rotasyonel reometre (Anton Paar Physica MCR51, Avustralya) cihazı ile analiz edilmiştir. Viskozite değeri, Eş. 1 kullanılarak kayma gerilmesinin kayma hızına bölünmesiyle bulunmuştur. Eşitlikte η viskozite, τ kayma gerilmesi ve $\dot{\gamma}$ kayma hızıdır.

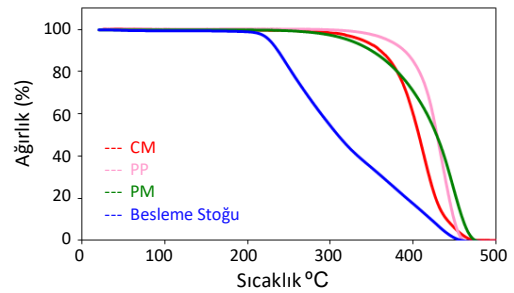
$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (1)$$

Kalıplama işlemi, bu çalışma için özel olarak üretilmiş 13 mm çap ve 6 mm uzunluğunda ölçülere sahip olan silindirik kalıp kullanılarak 10 MPa basınç altında özel yapım enjeksiyon kalıplama cihazında gerçekleştirilmiştir. Kalıplama işlemi 140°C'de 20 saniye kalıplama süresi ile gerçekleştirilirken, işlem boyunca kalıp sıcaklığı 40°C'de tutulmuştur. Kalıplama işlemi sırasında kalıbın ısıtılması ve aşırı ısınmaya karşın soğutulması su banyosu vasıtasıyla gerçekleştirilmiştir. Kalıplanmış numunelerin solvent bağlayıcı giderme işlemi 50, 60 ve 70°C'de heptan içerisinde 10 saat bekletilerek gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sonucunda PW, CW ve SA gibi solvent içerisinde çözünebilir bağlayıcılar ham numuneden uzaklaştırılmıştır ve yapı içerisinde PP ikame edilmiştir. Solvent içerisinde kompleks olmayan bağlayıcıların çözündürülerek uzaklaştırılması numunelerde oluşabilecek çarpılma ve şekil bozukluklarının önüne geçmekte etkili bir yöntem olarak bilinmektedir [1,2,16,17]. Solvent içerisinde bağlayıcıların çözünmesi ve kesit boyunca solvent nüfuziyeti düşük hızlarda olduğundan dolayı uzun solvent bağlayıcı giderme süreleri seçilmiştir [10,16-18]. Bağlayıcı giderme işleminin ardından numuneler 50°C'deki fırında her saat sonunda ağırlık ölçümleri yapılarak toplamda 10 saat kurutulup, gider-

ilen bağlayıcı miktarı yapılan ağırlık ölçümleri ile tespit edilmiştir. Solvent bağlayıcı giderme işleminin ardından numunede kalan PP'nin giderilmesi için yüksek saflıktaki Ar atmosferi altında 900°C'de ön sinterlemeye tabii tutulmuştur. B₄C tozlarının sinterleme işlemi genellikle 2200-2280°C sıcaklıkları arasında 30 dakika olarak yapılmaktadır [5]. Sinterleme işlemi, özel olarak tasarlanmış grafit rezistanslı fırın kullanılarak yüksek saflıktaki Ar atmosferi altında 2200°C'de gerçekleştirilmiştir. Fırın sırasıyla 50°C/dk hızla 1500°C'ye, 20°C/dk hızla 2000°C'ye ve son olarak 10°C/dk hızla 2200°C'ye ısıtılarak bu sıcaklıkta 1 saat bekletilmiştir. Sinterleme sıcaklıklarına çıkılırken toplam sinterleme süresinin azaltılması için yüksek hızlarda ısıtılan numuneler, sinterleme sıcaklıklarına yaklaşıldıkça homojen ısıtmanın sağlanması için ısıtma hızı kısmen düşük tutulmuştur. Soğutma işlemi ise fırının kendi rejiminde soğumasıyla yüksek hızlarda yapılmıştır [5,18,19]. Sinterlenen numunelerin yoğunlukları Arşimet prensibi ile ölçülmüştür. Metalografik incelemeler için numunelerden kesit alınarak zımparalama ve parlatma aşamalarının ardından elektrokimyasal olarak dağlanmıştır. Kalıplanmış, bağlayıcısı giderilmiş ve sinterlenmiş numunelerin kırık yüzeyleri Polaron-SC 7640 (Gala Instrumente GmbH) kaplama cihazı kullanılarak yaklaşık 40Å kalınlığında karbon ile kaplanmış, sonrasında 10-30 kV operasyon voltaj aralıklarında SEM (FEI-Sirion, İsviçre) kullanılarak görüntülenmiştir.

3. Sonuçlar ve Tartışma (Results and Discussion)

Bağlayıcıların TGA eğrileri besleme stoğunun hazırlanması ve termal bağlayıcı giderme işlemlerinin tasarımına yardımcı olmaktadır. Şekil 2'de bağlayıcıların sıcaklığa bağlı ağırlık kaybı eğrileri verilmiştir.



Şekil 2. Bağlayıcıların TGA eğrileri (TGA curves of binders).

200°C'ye kadar bağlayıcılarda herhangi bir bozunma gözlenmezken 200°C üzerinde SA, 300°C'ye gelindiğinde ise diğer bağlayıcıların bozunmaya başladığı, 475°C üzerinde ise tüm bağlayıcıların tamamen bozulduğu görülmektedir. Bu durum bağlayıcı sistemindeki temel bir ayrışma mekanizmasıdır. Özellikle farklı polimerik bağlayıcılar kullanılarak bağlayıcıların sırasıyla bozunması ve bozunma sırasında kalıplanmış numunelerde herhangi bir hasara yol açmaması sinterleme öncesi önem arz etmektedir [2].

Besleme stoğunun reolojik özellikleri viskozitesinin, kayma hızı ve sıcaklık duyarlılığına dayanmaktadır. Besleme stoğunun farklı sıcaklık ve kayma hızındaki viskozite değerleri Tablo 2'de verilmiştir. Şekil 3'de tüm kayma hızlarındaki toz yüklemesi ile birlikte viskozite değerlerinin de arttığı görülmektedir. Bu durum besleme stoğunun akıcılığını zorlaştırmaktadır [2,14]. Toz yükleme oranının artması ile birlikte besleme stoklarının viskozite değerleri doğal olarak artmaktadır ve bu durum besleme stoklarının kalıplanabilirliğini güçleştirmektedir. Kayma hızı artış göstermesine rağmen artan toz besleme oranları akışı güçleştirmiş ve buna bağlı olarak viskozite değerleri artış göstermiştir. Toz besleme oranlarının artması partikül temas sayısını artırır ve doğal olarak tüm kayma hızlarında viskozite değerleri artar [2,10,20]. Bundan dolayı genel olarak TEK için arzu edilen besleme stoklarının 100 Pa.s değerlerini aşmaması istenmektedir [2]. Deneylerde elde edilen sonuçlara göre %57,5 ve %60 toz yükleme oranlarının yüksek viskozite değerlerinden dolayı kalıplanabilirliğinin güç olduğu kanısına varılmıştır. Her ne kadar kayma hızının artmasına bağlı olarak viskozi-

te değerleri düşüş gösterse de yüksek kayma hızlarında kalıplama yapılması pratikte pek mümkün değildir ve kalıplama sırasında kalıptan fıskırma problemlerini beraberinde getirmektedir [1,2]. Ayrıca Şekil 3c-e'den de görüleceği üzere artan toz yükleme oranları ve artan kayma hızlarına bağlı olarak toz ve bağlayıcı arasında ayrışmalar görülmektedir.

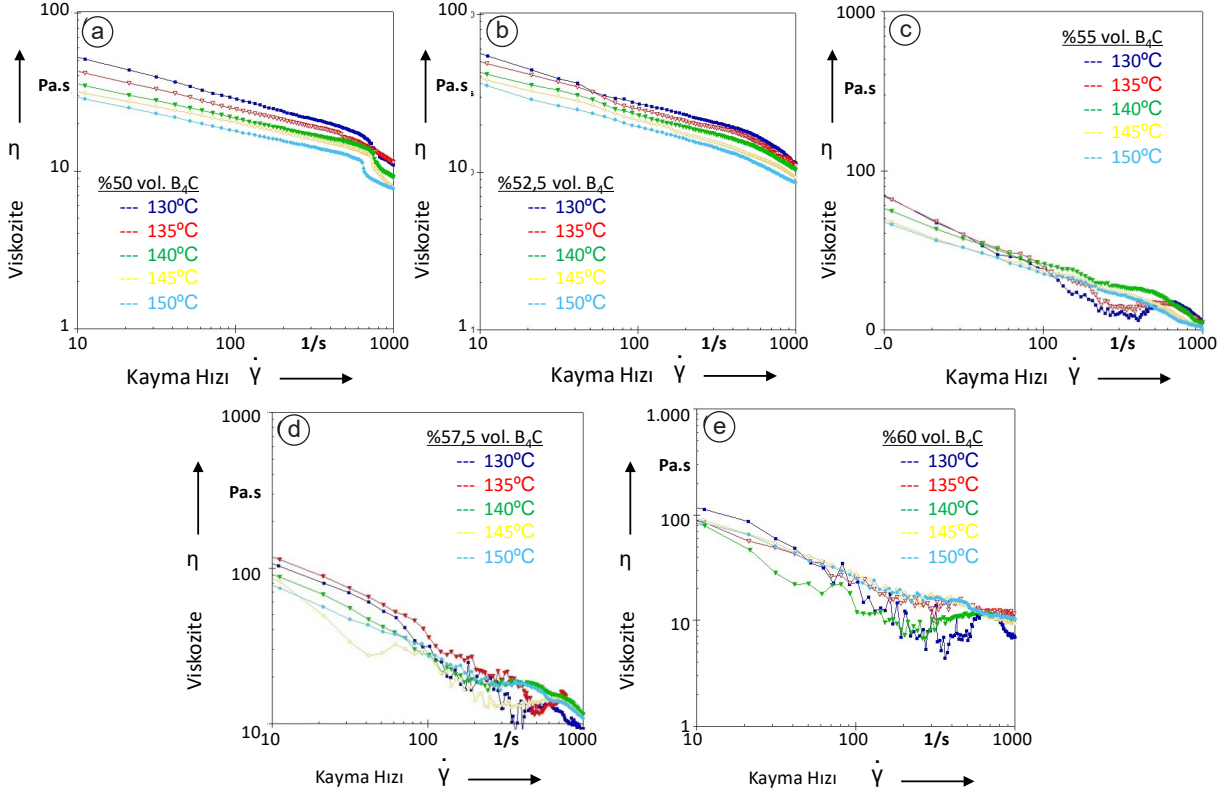
TEK besleme stoğu genellikle psödoplastik akışkan olarak kabul edilmektedir ve besleme stoklarının akış davranışlarının belirlenmesin için Eş. 2'de verilen Herschel-Bulkley modeli kullanılmıştır. Burada τ kayma gerilmesi, τ_0 akma gerilmesi, $\dot{\gamma}$ kayma hızı, k sabit ve n ise akış davranış indeksidir. n değeri kayma hassasiyetini göstermektedir.

$$\tau = \tau_0 + k(\dot{\gamma})^n \quad (2)$$

Eğer $n > 1$ ise Herschel-Bulkley akışkanı katı, aksi halde sıvı olarak davranmaktadır. $n < 1$ değerleri için akışkan incelmeye (shear-thinning) uğrarken, $n > 1$ değer-

Tablo 2. Farklı sıcaklık ve kayma hızı değerlerinde B₄C besleme stoğunun viskozite değerleri (Viscosities of B₄C feedstocks at different temperatures and shear rates).

Toz Miktarı (% v/v)	Sıcaklık (°C)	Kayma Hızı (s ⁻¹)					
		11	122	273	556	768	1000
50	130	51,12	27,41	22,14	18,05	13,73	11,09
	135	41,84	23,79	19,83	15,88	13,49	11,52
	140	34,79	20,76	17,48	15,10	11,57	9,28
	145	31,25	19,63	16,53	14,00	10,40	8,02
	150	28,91	17,33	14,73	12,35	8,82	7,85
52,5	130	54,84	26,24	21,48	17,31	14,32	11,62
	135	48,94	24,19	19,78	15,91	13,31	11,24
	140	42,04	21,90	18,09	14,61	12,32	10,49
	145	38,44	20,59	16,19	12,72	11,08	9,38
	150	39,76	23,19	19,40	16,18	10,43	8,80
55	130	66,69	20,89	13,12	14,93	14,10	11,34
	135	66,29	22,48	14,07	14,96	13,21	11,25
	140	56,24	24,92	19,26	16,52	13,42	11,32
	145	48,20	22,65	17,44	14,21	11,74	10,34
	150	46,29	21,96	17,19	13,41	11,35	10,11
57,5	130	105,05	25,30	18,90	13,54	10,77	9,45
	135	114,67	29,31	18,82	12,24	15,27	10,20
	140	88,53	21,32	18,60	16,80	14,66	11,55
	145	82,64	21,50	13,00	13,93	13,79	11,09
	150	74,24	26,30	18,05	15,98	13,58	10,93
60	130	113,05	16,87	5,46	10,58	10,43	7,02
	135	85,81	21,26	14,24	12,95	11,77	12,37
	140	79,81	11,65	6,91	11,51	11,02	10,07
	145	90,35	24,70	17,04	13,14	10,44	9,39
	150	84,81	20,35	16,84	12,52	11,25	10,27

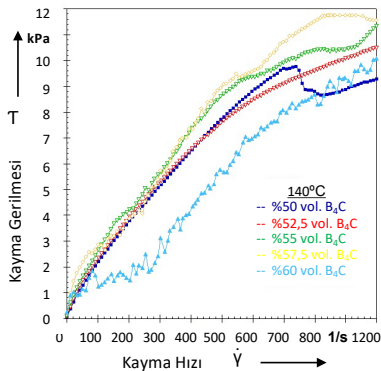


Şekil 3. Farklı sıcaklık ve kayma hızında B₄C besleme stoklarının viskozite eğrileri: (a) %50, (b) %52,5, (c) %55, (d) %57,5, (e) %60 (Viscosity curves of B₄C feedstocks at different temperatures and shear rates 50% (a), 52.5% (b), 55% (c), 57.5% (d), 60% (e)).

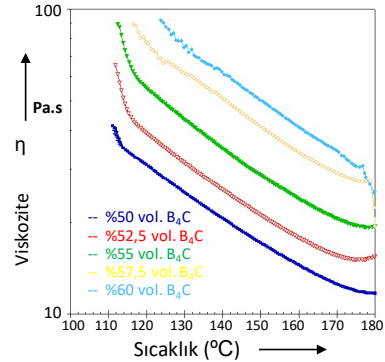
leri için kalınlaşmaya (shear-thickening) uğramaktadır. Eğer n değeri 1, τ değeri 0'a eşit ise model Newtonian tipi akış gösterir. n değeri ne kadar düşük ise viskozite kayma hızına o kadar hassasiyet gösterir. Kalıplama sırasında artan kayma hızı ile besleme stoğunun viskozitesinin hızla düşmesi arzu edilmektedir. Yüksek kayma hassasiyeti özellikle karmaşık şekilli parçaların üretimi için önemlidir fakat çok yüksek değerler de arzu edilmemektedir. Şekil 4'te hacimce farklı toz yükleme oranlarına sahip besleme stokları için 140°C'deki kayma gerilmesi-kayma hızı grafiği verilmiştir. Grafikten görüleceği gibi en düşük n değeri 0,97 olup %50 toz yükleme oranına sahip besleme stoğunda elde edilmiştir. n değeri toz yükleme oranının artışına bağlı ola-

rak artış göstermiştir. Kayma hızının artmasıyla birlikte besleme stoğunun akışının incelmesi (shear-thinning), partikül paketlenmesine ve bağlayıcı molekülünün akışla oryantasyonundan kaynaklanmaktadır [2,7].

Şekil 5'te besleme stoklarının, sabit kayma hızında sıcaklık-viskozite eğrileri verilmiştir. Tüm besleme stokları azalan viskozite ile beraber psödoplastik akış davranışı sergilemektedir. Bu davranış, sıvı bağlayıcının serbest kalarak partiküllerin parçalanmasından kaynaklanmaktadır [1,2,4]. Artan toz yükleme oranı ile birlikte viskozitenin de arttığı, viskoziteyi sabit tutmak için sıcaklığında artırılması gerektiği görülmektedir. Ayrıca besleme stoklarının katılma sıcaklıkları toz yükleme



Şekil 4. B₄C Besleme stoğunun 140°C'deki kayma gerilmesi-kayma hızı grafiği (Shear stress-shear rate plot at 140°C for B₄C feedstocks).

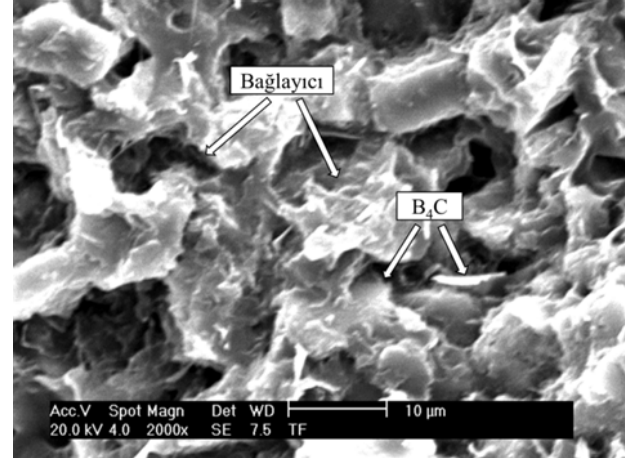


Şekil 5. Farklı toz oranlarında viskozitenin sıcaklığa bağlı değişimi (Correlation of viscosity and temperature at different powder ratios).

oranındaki artış ile birlikte artmaktadır. Sıcaklığın besleme stoğunun viskozitesine etkisi, besleme stoğunun kalıplanabilirliğini belirleyen en önemli değişkenlerden biridir. Artan sıcaklığın ise viskozitede düşüğe neden olduğu görülmüştür [3,4]. Isı uygulandığında daha büyük ısı genleşme katsayısına sahip olan bağlayıcının toz hacim oranını düşürmesi ve molekül zincirlerinin çözünmesiyle birlikte daha düzensiz moleküler yapının oluşması viskozitenin azalmasıdaki iki temel sebeptir. Bu durum, TEK prosesinde viskozitenin sıcaklığa bağlılığının ne kadar önemli olduğunu vurgulamaktadır. Viskozitenin sıcaklık değişimine karşı hassas oluşu, kalıplama sırasında meydana gelebilecek düşük sıcaklık değişimlerinin elde edilen parçalarda çatlak ve bozulmaların görülmesine neden olacaktır [10,12].

Şekil 6'da kalıplanmış ham numunelerin kırık yüzeylerinin SEM görüntüsü verilmiştir. Numunenin merkezinden alınan bu görüntüde, bağlayıcıların numune boyunca düzenli bir şekilde dağıldığı görülmektedir. Neredeyse tüm partiküllerin çevresinde görülmekte olan ince bağlayıcı tabakasının, kalıplama aşamasında akışı kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Kalıplanmış ham numunelerin yoğunlukları yaklaşık olarak 1,71 g/cm³ (bağıl yoğunluk: %68,3) olarak ölçülmüştür.

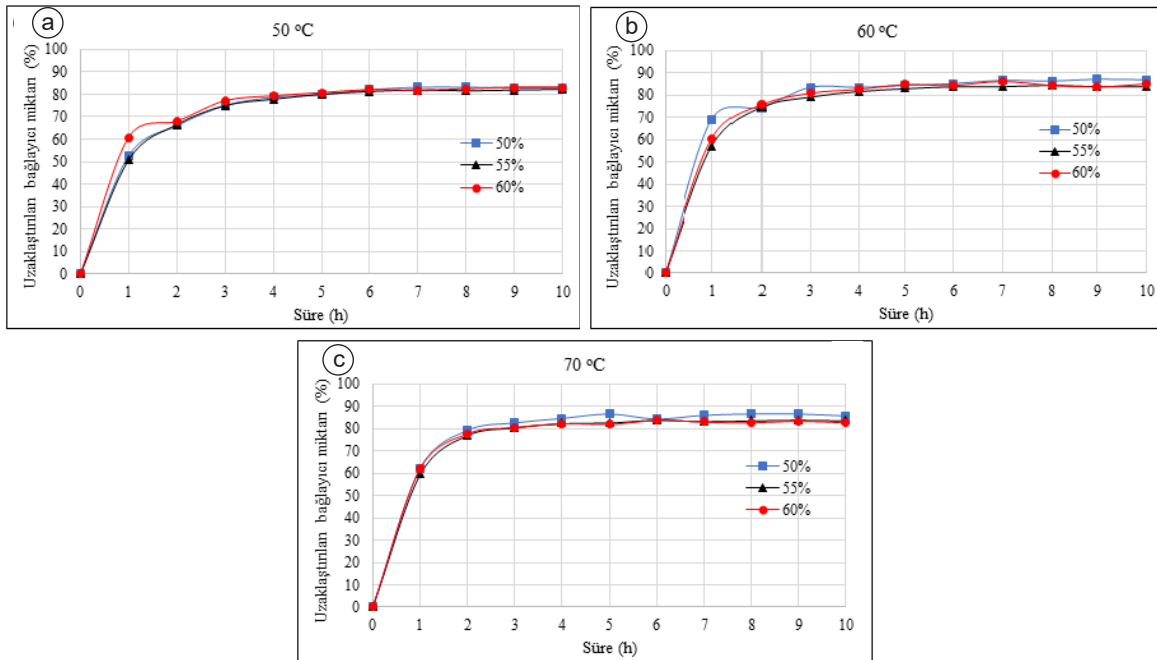
Solvent ile bağlayıcı giderme aşaması TEK prosesinin en önemli aşamalarından biridir [1,2]. Bu aşamada, organik çözücü içindeki düşük molekül ağırlıklı bağlayıcıların özelliklerinden yararlanılır [2]. Bağlayıcı giderme, moleküler hareketliliğe ve yüksek sıcaklığa bağlıdır. Solvent içerisinde bağlayıcının giderilmesi için uygun sıcaklık kullanılmalıdır. Düşük sıcaklıklarda çözücü sıvı bağlayıcının içerisine yayılacağı için numunede çatlama meydana gelebilmektedir. Ayrıca bağlayıcı-



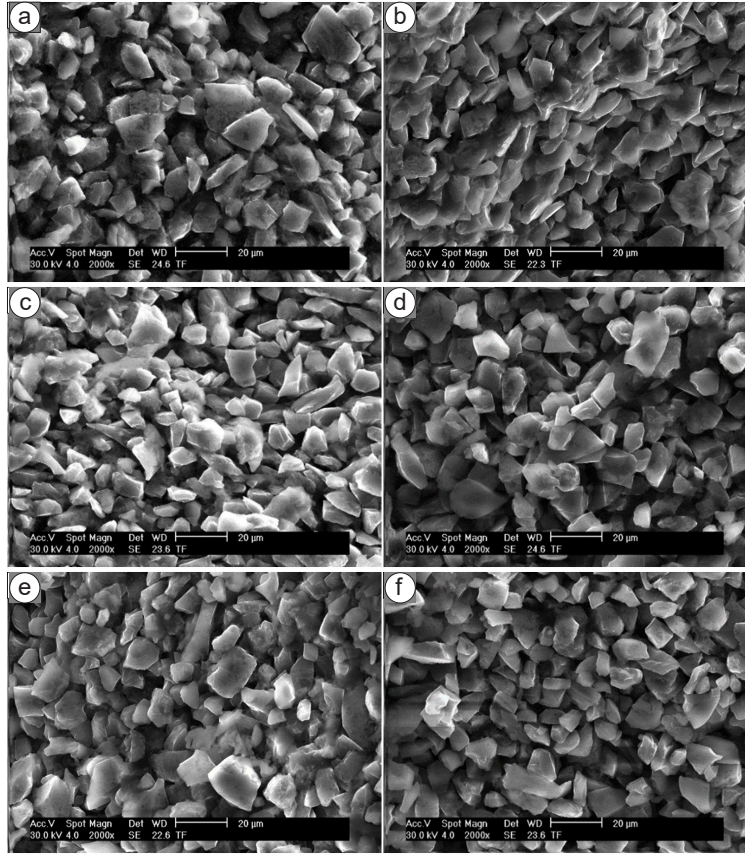
Şekil 6. Ham parçanın kırılma yüzeyinin merkezinden alınmış SEM görüntüsü (SEM micrograph taken from center of fracture surface of the raw piece).

nın çözücüye çok yavaş yayılması numunede şişme ve iç gerilmelere neden olmaktadır. Yüksek sıcaklıklarda ise bağlayıcıların erimesinden dolayı çökmeler gerçekleşmektedir [2-4].

Şekil 7'de kalıplanmış numunelerden uzaklaştırılan bağlayıcı miktarlarının sıcaklık ve zamana bağlı değişimleri gösterilmiştir. 50°C'de yapılan bağlayıcı giderme işleminde bağlayıcının %80'i 5 saatin sonunda giderilirken, sıcaklık 70°C'ye çıkarıldığında süre 2 saate düşmüştür. Bu durum, artan sıcaklıkla birlikte moleküler hareketliliğin ve difüzyonun artmasından kaynaklanmaktadır. Artan sıcaklık ve süre ile birlikte, uzaklaştırılan bağlayıcı miktarının bir noktaya kadar arttığı görülmektedir [1,2,17].



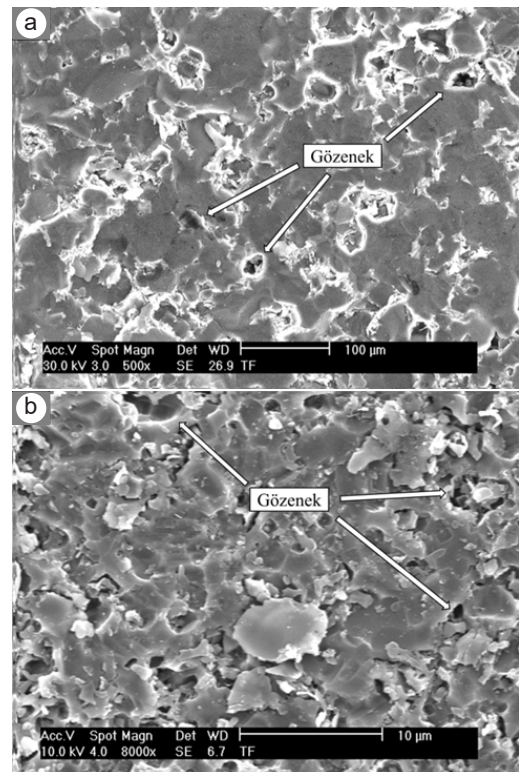
Şekil 7. Sıcaklık ve sürenin bağlayıcı giderme miktarlarına etkisi: (a) 50°C, (b) 60°C, (c) 70°C (Effect of extraction and time on amount of binder extracted: (a) 50°C, (b) 60°C, (c) 70°C).



Şekil 8. Farklı süre ve sıcaklıklarda solvent bağlayıcı giderme işlemi yapılmış numunelerin SEM görüntüleri: (a) 2 saat, 50°C, (b) 4 saat, 50°C, (c) 2 saat, 60°C, (d) 4 saat, 60°C, (e) 2 saat, 70°C ve (f) 4 saat, 70°C (SEM images of samples treated with solvent debinding at different times and temperatures: (a) 2h, 50°C, (b) 4h, 50°C, (c) 2h, 60°C, (d) 4h, 60°C, (e) 2h, 70°C, and (f) 4h, 70°C).

Şekil 8'de solvent bağlayıcı giderme işlemi sonrasında elde edilen ham numunelerin kırık yüzeyi SEM görüntüleri verilmiştir. Ana bağlayıcıların giderilmesinin ardından numunelerde oluşan açık gözenekler açık şekilde görülmektedir. Bu gözenekler, kalan bağlayıcıların termal bağlayıcı giderme sırasında herhangi bir çatlak veya kabarcık oluşmaksızın hızlı bir şekilde uzaklaştırılmasına imkân sağlamaktadır. Mum bazlı bağlayıcıların giderilmesinin ardından yapıda kalan PP, numuneyi bir arada tutacak yeterli mukavemeti sağlamaktadır [8].

Şekil 9'da %55 toz yükleme oranına sahip kalıplanmış ve bağlayıcısı giderilmiş (solvent ve ısıl) numunenin 2200°C'de 1 saat sinterlendikten sonraki kırık yüzeyi SEM fotoğrafları iki farklı büyütme ile verilmiştir. Yapı içerisindeki gözenekler özellikle düşük büyütmedeki SEM fotoğrafında net bir şekilde görülmekte olup her iki büyütmedeki görüntü üzerinde gösterilmiştir. Genel olarak gözeneklerin yapı içerisinde homojen dağılım gösterdiği görülmektedir. Bu durum toz hazırlama, kalıplama ve bağlayıcı giderme aşamalarının başarılı şekilde tamamlandığının göstergesidir. Sinterleme işleminin ardından yoğunluk 1,92 g/cm³ (bağıl yoğunluk %75), boyutsal çekme ise %15,23 olarak ölçülmüştür. Her ne kadar sinterleme sonrası bağıl yoğunluk değerleri düşük olsa da elde edilen değerler B₄C sinterleme pratikleri ve literatür bilgilerine uygunluk taşımaktadır.



Şekil 9. 2200°C'de 1 saat sinterlenmiş numunenin kırılma yüzeyi SEM görüntüleri: (a) 500X, (b) 8000X (SEM images of fracture surface of the sintered samples at 2200°C for 1 h: (a) 500X, (b) 8000X).

Sinterleme sonrası yüksek bağıl yoğunluk değerlerinin eldesi için basınç destekli sinterleme teknikleri veya başlangıç tozları içerisinde bazı ilavelerin yapılması kaçınılmazdır [1,6,8,9].

4. Sonuçlar (Conclusions)

Tüm toz-bağlayıcı sistemleri için kritik toz yüklemesinin hemen altında optimal bir toz yüklemesi vardır. Optimal toz yüklemesine sahip besleme stokları başarılı kalıplama şartlarının oluşması, uygun bağlayıcı giderme ve sinterleme davranışlarına bağlı olarak homojen mikroyapılı ve üstün mühendislik özelliklerine sahip TEK ürünlerinin eldesi için büyük bir öneme sahiptir. Yapılan bu çalışmada, besleme stoğunun farklı sıcaklık ve toz yükleme oranlarında farklı reolojik özellikler gösterdiği görülmüştür. Reolojik analizler sonucunda, toz yükleme artışının daha yüksek viskoziteye neden olduğu, %50 ve %60'lık toz yükleme oranlarının iyi karışım davranışı gösterdiği, yüksek toz yükleme oranlarının bağlayıcı giderme ve sinterleme işlemleri için avantajlı olduğu, ancak %55'lik toz yükleme oranının daha iyi bir seçenek olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda %55'lik toz yükleme oranına sahip besleme stoklarının kolay bir kalıplama ve uygun bağlayıcı giderme koşulları sergilediği görülmüştür.

Teşekkür (Acknowledgement)

Bu çalışma TÜBİTAK (Proje No: 213M196) ve Marmara Üniversitesi (Proje No: FEN-C-DRP-110215-0039) tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar (References)

- [1] Heaney, D. F. (Ed.). (2018). *Handbook of metal injection molding*. Woodhead Publishing.
- [2] Atre, S. V., Weaver, T. J., & German, R. M. (1998). *Injection molding of metals and ceramics* (No. 982417). SAE Technical Paper.
- [3] Wang, C., Lu, Z., & Zhang, K. (2012). Microstructure, mechanical properties and sintering model of B4C nozzle with micro holes by powder injection molding. *Powder Technology*, 228, 334-338.
- [4] Wang, C., Lu, Z., & Zhang, K. (2013). Evaluation of thermal debinding of injection-molded boron carbide in an ambient atmosphere. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 64(9), 1751-1757.
- [5] Roy, T. K., Subramanian, C., & Suri, A. K. (2006). Pressureless sintering of boron carbide. *Ceramics International*, 32(3), 227-233.
- [6] Zorzi, J. E., Perottoni, C. A., & Da Jornada, J. A. H. (2005). Hardness and wear resistance of B4C ceramics prepared with several additives. *Materials Letters*, 59(23), 2932-2935.
- [7] Yamada, S., Hirao, K., Yamauchi, Y., & Kanzaki, S. (2002). Densification behaviour and mechanical properties of pressureless-sintered B4C-CrB2 ceramics. *Journal of Materials Science*, 37(23), 5007-5012..
- [8] Yamada, S., Hirao, K., Yamauchi, Y., & Kanzaki, S. (2003). Mechanical and electrical properties of B4C-CrB2 ceramics fabricated by liquid phase sintering. *Ceramics International*, 29(3), 299-304.
- [9] Junlong, S., Changxia, L., Jin, T., & Baofu, F. (2012). Erosion behavior of B4C based ceramic nozzles by abrasive air-jet. *Ceramics International*, 38(8), 6599-6605.
- [10] Ahn, S., Park, S. J., Lee, S., Atre, S. V., & German, R. M. (2009). Effect of powders and binders on material properties and molding parameters in iron and stainless steel powder injection molding process. *Powder Technology*, 193(2), 162-169.
- [11] Li, Y., Li, L., & Khalil, K. A. (2007). Effect of powder loading on metal injection molding stainless steels. *Journal of Materials Processing Technology*, 183(2-3), 432-439.
- [12] Blanco, A., Azpilgain, Z., Lozares, J., Kapranos, P., & Hurtado, I. (2010). Rheological characterization of A201 aluminum alloy. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 20(9), 1638-1642.
- [13] Krauss, V. A., Pires, E. N., Klein, A. N., & Fredel, M. C. (2005). Rheological properties of alumina injection feedstocks. *Materials Research*, 8(2), 187-189.
- [14] Huang, B., Liang, S., & Qu, X. (2003). The rheology of metal injection molding. *Journal of Materials Processing Technology*, 137(1-3), 132-137.
- [15] Hausnerova, B., Marcanikova, L., Filip, P., & Saha, P. (2011). Optimization of powder injection molding of feedstock based on aluminum oxide and multicomponent water-soluble polymer binder. *Polymer Engineering & Science*, 51(7), 1376-1382.
- [16] Gülsoy, H. Ö., Özbek, S., & Baykara, T. (2007). Microstructural and mechanical properties of injection moulded gas and water atomised 17-4 PH stainless steel powder. *Powder Metallurgy*, 50(2), 120-126.
- [17] Özgün, Ö., Gülsoy, H. Ö., Yılmaz, R., & Findık, F. (2013). Microstructural and mechanical characterization of injection molded 718 superalloy powders. *Journal of Alloys and Compounds*, 576, 140-153.
- [18] German, R. M. (2014). *Sintering Theory and Practice* (Gülsoy, H. Ö., Trans.). ISBN 978-605-133-730-2. (Original work published in 1996).
- [19] Lee, H., & Speyer, R. F. (2003). Pressureless sintering of boron carbide. *Journal of the American Ceramic Society*, 86(9), 1468-1473.
- [20] Park, J. M., Han, J. S., Oh, J. W., & Park, S. J. (2021). Study on rheological behavior and mechanical properties of PMN-PZT ceramic feedstock. *Metals and Materials International*, 27(5), 1069-1082.



The effect of boric acid on copine-7 expression and bioactivity in dental pulp stem cells

Serife Buket Bozkurt ^{1,*}, Sema S. Hakki ^{2, 3}

¹Niğde Ömer Halisdemir University, Faculty of Medicine, Department of Biochemistry, Niğde, Turkey

²Selcuk University, Faculty of Dentistry, Department of Periodontology, Konya, Turkey

³University of Michigan, School of Dentistry, Ann Arbor, MI, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received February 7, 2022

Accepted April 17, 2022

Available online June 30, 2022

Research Article

DOI: 10.30728/boron.1069145

Keywords:

Boric acid

Cpne-7

Pulp mesenchymal stem cells

ABSTRACT

Boron has significant impact on the mineral composition of teeth. Copine-7 (Cpne-7) is secreted by pre-ameloblasts and induces dentin formation via differentiation of mesenchymal cells of dental. The goal of this study was to see how boric acid affected the bioactivity and expression of Cpne-7, collagen type I in dental pulp stem cell. The expression of Cpne-7, COL-I were assessed in the boric acid treated pulp cells by molecular method on 3 and 8 days exposure. When comparing the different boric acid concentrations to the control group in a proliferation experiment, no significant differences were noted. At 10 ng/mL boric acid, a rise in the number of mineralized nodules was observed. Boric acid concentrations (1 ng/mL, 10 ng/mL) increased the transcripts of Cpne-7 on day 3 and 8. Additionally, 1 ng/mL boric acid concentration significantly upregulated of Cpne-7 expression compared to control group on day 3 and 8. When the 1-10 ng boric acid was compared to control group COL-I expression remarkably enhanced in cell. According to the current findings that boric acid may be a potent regulator of Cpne-7, which is a promising candidate for new dentin formation in regenerative dentistry, in dental pulp stem cells and provide osteogenic efficacy in therapies aimed at dentin formation.

1. Introduction

Copine (Cpne) is a family of calcium-associated phospholipid-binding proteins that is expressed in numerous eukaryotic organisms [1]. Copine proteins constituent structures including two C2-part (C2A and C2B) at the N-section and an A-part at the C-section [2]. The N-terminal C2 domains are calcium-associated phospholipid-binding in protein kinase C and responsible for protein-protein interaction [3]. The C-terminal A-domain is a plasma and extracellular matrix protein and play function as protein-binding domain [4]. The Cpne family of proteins consist of nine members and it was widely expressed in the organism [5]. Except for cpne-1, -2, -3, which are expressed in all normal tissues, cpne-4 has limited expression in different tissues such as prostate gland, heart and cpne-6 is specific for brain function [2, 6]. Cpne-7, which is a diffusing signalling molecule, has an osteogenic differentiation potential of mesenchymal stem cells into odontoblasts [6]. Lee et al. [7] displayed that cpne-7 stimulated odontoblast differentiation and regulated hard tissue structure. Cpne-7 stimulated odontoblast differentiation *in vitro* and regulated hard tissue structure *in vivo*, according to Lee et al. [7]. Additionally, preameloblasts stimulate differentiation for odontogenic form dental pulp stem cells (DPSCs) in media containing dental epithelium-derived factors such as Cpne-7 [8].

Boron (B) is a trace element for organisms and plays an important function in metabolism of bone formation [9,10]. Also, B may associated with steroid hormones, and prevents bone demineralization by limiting calcium loss from bone [11,12]. Our previous study demonstrated that B plays vital key function via Ca, Mg, vitamin D on bone metabolism [13]. Hakki et al. [14] confirmed that B supplementation can be beneficial for bone and teeth creation, restoration, potency *in vitro* and *in vivo*. Whereas dietary B was effective on the mineral composition and alveolar bone mineral content, it did not stimulate teeth strength and hardness [15].

DPSCs have several important potentials such as maintaining tissue homeostasis, injury repair and tissue regeneration of teeth. [16]. In the literature, it was suggested that the origin of DPSCs may be associated with neural crest-derived cells [17]. Additionally, DPSCs are highly proliferative, clonogenic and are able to differentiate into odontoblast compared to mesenchymal stem cells derived from bone marrow [18,19]. DPSCs localize at perivascular and perineural pulp region connected in the root canal to the external environments and humoral regulators such as tumor necrosis factor alpha, preameloblast-derived factor [17,20]. In this regard, DPSCs functions are crucial for pulp regeneration, dentin protect, tooth vitality and homeosta-

*Corresponding author: buketbozkurt@yahoo.com

sis [17,21]. Oh et al. [22] revealed that Cpne-7 induces odontoblast differentiation and dentin formation from dental-derived mesenchymal stem cell or non-dental origin. Also, Choung et al. [8] identified that Cpne-7 is a candidate signaling molecule as dental epithelium-derived factor and a key player for odontoblastic form of DPSC of mesenchymal origin.

The goal of the present experiments was to examine the influences of the boric acid (BA) on the proliferation, mineralization and level of Cpne-7, COL-I genes in DPSCs.

2. Materials and Methods

2.1. Dental Pulp Stem Cell of mesenchymal Origin

DPSCs were isolated from healthy teeth via the explant culture techniques in *in vitro* cell cultivation. To obtain dental pulp, appropriate ethical approvals should be in place. We use dental pulp tissue samples from periodontally healthy person have given their informed consent using Ethics Committee of the Faculty of Dentistry (2015/04), Selcuk University-approved consent forms.

The dental pulp tissue is rinsed with cell culture media (DMEM; GIBCO; Grand Island, NY, USA), 10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO), L-glutamine (600 mg/ml; GIBCO;), penicillin (100 U/ml; GIBCO), streptomycin (125 mg/ml; GIBCO) to eliminate artifact and cut into small pieces mechanically. The dental pulp cell grew out from tissue pieces onto the culture dish area. Then, we observed the pulp cells can be proliferation under inverted-microscope. DPSC of mesenchymal origin characteristics were described according to International Society for Cellular Therapy [23].

To acquire a surface phenotype of DPSCs analysed with specific antibodies and immunofluorescence-based experiments, function of telomerase for mesenchymal stem cells characteristics of DPSCs [24].

2.2. Boric Acid (BA) Applications

BA (Merck Millipore, Germany) was dissolved in first in purified H₂O. The final concentrations of 0.1, 1, 10, 100, 1000, 10.000, 100.000 ng/mL BA in culture medium for various assays were made from 100 µg/mL stock solution.

2.3. Real-Time xCELLigence Impedance Analysis of Boric Acid on Proliferation of Dental Pulp Stem Cells

In this study, cell proliferation device (xCELLigence system, ACEA Biosciences, Inc., San Diego, CA, USA) was utilized to assess and BA on proliferation of DPSCs. Cell suspensions (200 µL, 10×10³ DPSCs/well) were transferred to cell culture plate for 24 h. After 24 hours, different BA (Merck) dosages was added to

each well (n=12), and the proliferative capacity (compared with untreated control cells) of the cells was assessed during 170 h.

2.4. Mineralization Assay

The cells were plated at 5×10⁴ cells/cm² in 24-well plates in cell culture media for 24 h and added to the following factors: [Mineralization Media (MM)= ascorbic acid (AA, 50 µg/mL) and β-glycerophosphate (BGP, 10 mM)]; a) negative control (cell culture media), b) positive control (cell culture media + MM), c) cell culture media + MM +1 ng BA, d) cell culture media + MM +10 ng BA, e) cell culture media + MM + 50 ng BA, f) cell culture media + MM + 100 ng BA. Mineralization potential of extracellular matrix was determined on day 14 by von Kossa-based assay. For this purpose, cells were fixed in descending alcohol concentrations to ddH₂O. Then suitable silver nitrate concentration was applied and the photos were acquired.

2.5. Real-Time Polymerase chain Reaction (RT-PCR)

Copine-7 and COL-I mRNA expressions were assessed by RT-PCR. Total RNA was isolated from DPSCs treated with BA dosages (0, 1, 10 ng/mL) on 3, 8 and 16 days utilizing a RNA isolation kit (Invitrogen, Camarillo, CA, USA). The quantitative properties of the total RNA were measured by specific spectrophotometer device. Complementary DNA was performed with 1 µg RNA using synthesis kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). For gene expression analysis, mix with SYBR Green dye, forward and reverse primers were supplement to the cDNA for PCR reaction mixture (25 µL) as recommended by the supplier. Glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase (GAPDH) was utilized as an housekeeping gene. The following genes were assessed Copine-7 (Cpne-7), COL-I and GAPDH. Their primer sequences are as follows: Cpne-7-(human) 5'-TGGAGCTCTACAGGGTCAA-3' and 5'-CCGGGTTTCAGGTTGTTCTT-3'; COL-I-(human)-5'-GCAACATTGGATTCCCTGGACC-3' and GTTCACCCTTTTCTCCCTTGCC; GAPDH- (human)-5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' and 5'-TC-CACCACCCTGTTGCTGTA-3'.

2.6. Statistical Analysis

A one-way analysis of variance (ANOVA) was utilized for proliferation assay and expression data. Subsequently, the results are presented as mean ± standard deviation. P values <0.05 were regarded statistically significant.

3. Results and Discussion

3.1. Boric Acid Did Not Affect Cell Proliferation of DPSCs

The *in vitro* proliferation activity of BA in DPSCs were

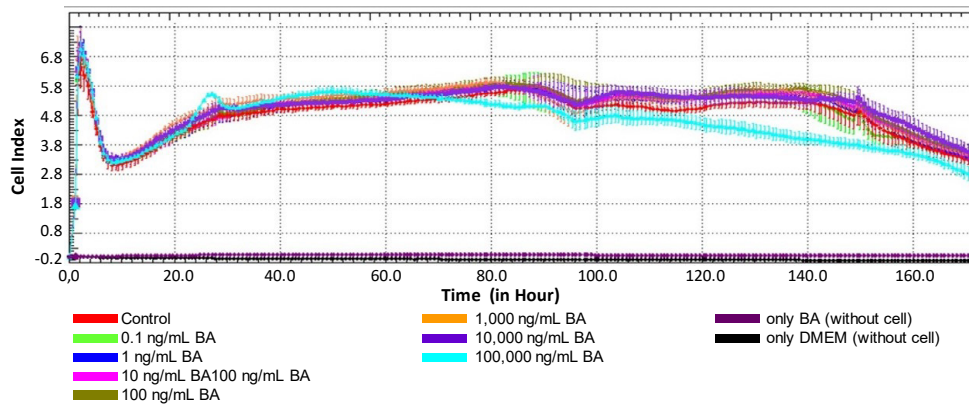


Figure 1. The effect of BA on the proliferation in DPSCs utilizing xCELLigence. The DPSCs were treated with BA dosages (0.1, 1, 10, 100, 1000, 10.000, 100.000 ng/mL). Untreated cells were used as a control (red curve) and only BA applied wells was shown as a purple curve (without cell). All cell proliferation of the DPSCs were monitored in real time for 170 hrs.

determined by utilizing real-time cell analyzer. DPSCs were treated with different BA solutions (0, 0.1, 1, 10, 100, 1000, 10.000 and 100.000 ng/mL) and cell proliferation was measured in real time for 170 h (Figure 1). When cells were exposed to 0.1-10.000 ng/mL BA, no changes in cell index were observed in real time. The control group and the six BA-treated groups had no important variations ($p > 0.05$). However, 100.000 ng/mL BA concentration decreased proliferation of DPSCs compared to control group at 80 hours ($p < 0.05$) (Figure 1).

3.2. Mineralization Capacity of BA on Dental Pulp Stem Cells In Vitro

The effect of different BA dosages (0, 1, 10, 50, 100 ng/mL) on mineralization potential of DPSCs was analyzed utilizing von Kossa method on day 14. Biomineralization enhancement was more significant in group applied with 10 ng/mL BA than in the untreated group (Figure 2).

3.3. Boric Acid Increased Expression Levels of *Cpne-7* and *COL-I*

Results of RT-PCR assays displayed that there were

significant differences in *Cpne-7* and *COL-I* mRNA expressions of DPSCs between the control and BA-treated groups (Figure 3 and Figure 4). To identify the effects of BA on *Cpne-7* and *COL-I* mRNA expression levels of DPSCs were treated with BA concentrations (1 ng/mL, 10 ng/mL) and total RNA was isolated from DPSCs on days 3 and 8 with or without BA concentrations. Both 1 ng/mL BA and 10 ng/mL BA increased *Cpne-7* levels on day 3 ($p < 0.001$) (Figure.3a). Additionally, all BA solutions induced *Cpne-7* mRNA expression on day 8 ($p < 0.001$) (Figure 3b). Whereas 1 ng/mL BA concentration displayed the same tendency mRNA expression of *Cpne-7* on day and 8 ($p < 0.01$), 10 ng/mL BA concentrations more expression levels showed on day 3 than on day 8 ($p < 0.01$).

Figure 4 shows that BA application, the expression levels of collagen type I (*COL-I*) in the DPSCs were significantly upregulated in a time- and dose-dependent manner when compared to the control group on 3 and 8 days ($p < 0.01$) (Figure 4). Additionally, 10 ng/mL BA concentration significantly increased *COL-I* mRNA expression as compared with 1 ng/mL BA concentration in DPSCs on day 3 and 8 ($p < 0.01$) (Figure 4a) (Figure 4b). These results indicate that 1 ng/mL BA concen-

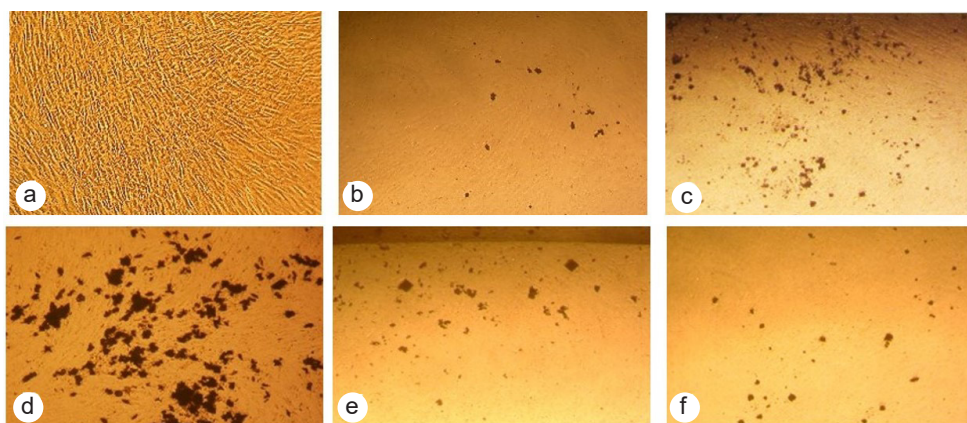


Figure 2. Biomineralization of DPSCs. Osteogenic differentiation was indicated by the formation of calcified nodules with von Kossa staining on day 14. (a) negative control (without mineralization media), (b) positive control [with mineralization media: ascorbic acid (AA, 50 µg/mL) and β-glycerophosphate (BGP, 10 mM)], (c) 1 ng/mL, (d) 10 ng/mL, (e) 50 ng/mL, (f) 100 ng/mL.

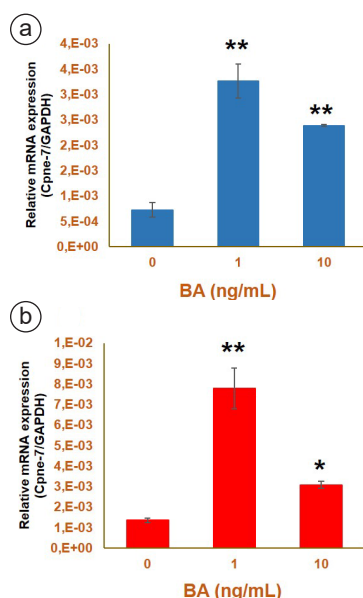


Figure 3. The expression of Cpne-7 gene in DPSCs from each group detected by quantitative RT-PCR (target genes were normalized to housekeeping genes) The cells were treated on 3 day (a) and 8 day (b) with different BA concentrations (1, 10 ng/mL). Graphical units were reflected as ($\times 10^{-4}$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, compared with the control.

tration more induces Cpne-7, while 10 ng/mL BA concentrations more stimulates COL-1 levels as compared to control group in DPSCs *in vitro*. BA is transformed of boron and an essential micronutrient for the human diet. In literature, there are a lot of results associated with the effect of boric acid on health outcomes *in vitro* and *in vivo*. Argument from researches have displayed that boron is a bioactive trace element for bone cells and mineralized tissue-associated genes of teeth [13-15]. Additionally, boron does not accumulate in soft tissue and is kept at a certain level in plasma, liver and brain due to homeostatic control mechanisms [25]. Cpne7 is a Ca^{2+} -dependent phospholipid associated protein that is found in the cytoplasm. Furthermore, Cpne7 is a soluble released agent produced by epithelial cells and its expression increased during tooth development. Especially, Cpne7 characterizes in pre-dentin and odontoblasts [26]. Based on the knowledge that epithelial-mesenchymal interactions play important roles in tooth development [27]. Also, Cpne-7 both induces odontoblast differentiation and promotes dentin formation [1,22]. Cpne7 is a promising candidate for new dentin formation in regenerative dentistry as it induces the transformation of non-dental mesenchymal stem cells into odontoblasts [6]. At the developmental stage of the tooth, Cpne-7 is synthesized by enamel epithelial cells and then observed in pre-dentin and odontoblasts and pre-dentin. In literature, the level of Cpne-7 at the early form of crown structure has been displayed but its level in the mesenchymal dental pulp tissue has not yet been documented [26]. Our RT-PCR results displayed that 1 ng/mL and 10 ng/mL BA concentrations importantly upregulated Cpne-7 mRNA expressions compared to control group (0 ng/mL BA)

($p < 0.001$). Also, both concentrations of BA (1 ng/mL, 10 ng/mL) importantly enhanced COL-1 level in DPSCs a time- and dose-dependent manner ($p < 0.001$).

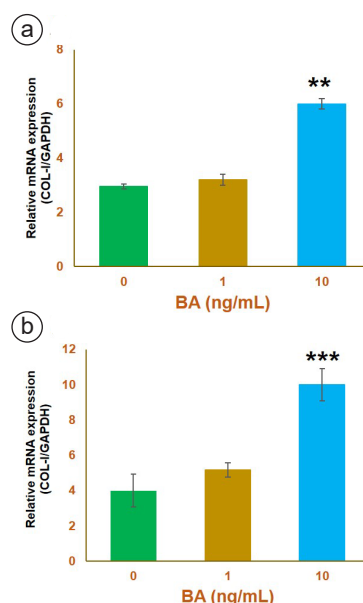


Figure 4. The expression of COL-1 gene in DPSCs from each group detected by quantitative RT-PCR (target genes were normalized to housekeeping genes) The cells were treated on 3 day (a) and 8 day (b) with different BA concentrations (1, 10 ng/mL). * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, compared with the control.

Human DPSCs are rich sources of adult stem cells situated within the tooth. DPSCs have been employed in tissue engineering and regenerative medicine because of their strong proliferative, self-renewal, and multi-lineage differentiation ability [28].

Oh et al. [22] demonstrated that Cpne7 was expressed in preameloblasts and secreted extracellularly during ameloblast development and controls the development of dental and non-dental mesenchymal cells into odontoblasts. In the present study, 1 ng/mL and 10 ng/mL BA concentrations induced Cpne-7 mRNA expression of DPSCs at different time points. This promoting effect was dose- and time-dependent. These results are in agreement with those of Seo et al. [6] who reported that Cpne-7 binding to its receptor, nucleolin, appears to play a crucial role in Cpne7 internalization into preodontoblasts in human dental pulp cells. Literature showed that conditioned medium for preameloblast such as Cpne-7 induce odontogenic transformation of human DPSCs and induce dentin structure [20].

CPNE7, a member of the Copine family comprising nine members, is found in all mammalian tissues and it has a mineralizing potential in odontoblasts as well as a high calcium ion-binding affinity *in vitro* [8]. Human dental pulp cells (hDPCs) have the ability to develop into a variety of cell types, including odontoblasts, adipocytes, chondrocytes, and osteoblasts. CPNE7

increases odontoblastic transformation of hDPCs and stimulates some structure of tooth including dentin, root via a paracrine activity utilizing nucleolin as its receptor [1]. Hakki et al. [14] displayed that boron treatments enhanced the dentin mineral density of maxillary incisor teeth *in vivo*. Our results reflected that 10 ng/mL BA concentration significantly increased COL-I mRNA expression in DPSCs ($p < 0.001$). Additionally, 10 ng/mL BA concentrations up-regulated both mineralized nodules and mRNA expressions of Cpne-7 and COL-I compared to control group ($p < 0.001$). Lee et al. [7] demonstrated that CDP4, which is CPNE7-derived peptide, stimulate bone and dentin formation via osteogenesis-associated genes and proteins in dental pulp cells. In a previous study, at 0.1, 1, 10, and 100 ng/ml boric acid concentrations, we found that boron as boric acid improved bone morphogenetic protein (BMP), BMP-4, -6, and -7 protein levels [13]. When compared to the control group, Cpne-7 and COL-I modulation appears to be more obvious in this experiment. This study also discovered that boric acid concentrations above 1 ng/ml have qualitative effects.

4. Conclusions

In conclusion, the upregulation of Cpne-7 mRNA in DPSCs adds to the growing body of evidence that boron, in either nutritional or physiological amounts, is required for the transformation of odontoblast-like cells from mesenchymal cells of dental source. This effect occurs at the molecular level, and as a result, it can have a variety of beneficial phenotypic effects, including regulating the differentiation of mesenchymal stem cells into odontoblasts. Since only Cpne-7 and COL-I were examined in this study, these findings should be revealed in odontoblast differentiation markers such as Dspp, nestin, and ALP to confirm that Cpne-7 expression is regulated by BA and its relevance on the dental pulp tissue are confirmed.

References

- [1] Park, Y-H., Lee, Y. S., Park, J-S., Kim, S. H., Bae, H. S., & Park, J-C. (2019). Expression of CPNE7 during mouse dentinogenesis. *Journal of Molecular Histology*, 50, 179-188.
- [2] Perestenko, P., Watanabe, M., Beusnard-Bee, T., Guna, P., & McIlhinney, J. (2015). The second C2-domain of copine-2, copine-6 and copine-7 is responsible for their calcium-dependent membrane association. *Febs Journal*, 282, 3722-3736.
- [3] Buccilli, M. J., Ilacqua, A. N., Han, M., Banas, A. A., Wight, E. M., Mao, H., Perry, S. P., Salter, T. S., Loisel, D. R., Haystead, T. A. J., & Damer, C. K. (2019). Copine A interacts with actin filaments and plays a role in chemotaxis and adhesion. *Cells*, 8, 758.
- [4] Whittaker, C. A., & Hynes, R. O. (2002). Distribution and evolution of von Willebrand/integrin a domains: Widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Molecular Biology of The Cell*, 13, 3369-3387.
- [5] Cowland, J. B., Carter, D., Bjerregaard, M. D., Johnsen, A. H., Borregaard, N., & Lollike, K. (2003). Tissue expression of copines and isolation of copines I and III from the cytosol of human neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 74, 379-388.
- [6] Seo, Y-M., Park, S-J., Lee, H-K., & Park, J-C. (2017). Copine-7 binds to the cell surface receptor, nucleolin, and regulates ciliogenesis and Dspp expression during odontoblast differentiation. *Scientific Reports*, 7, 11283.
- [7] Lee, D., Park, K-S., Yoon, G-J., Lee, H. J., Lee, J-Y., Park, Y-S., Park, J-C., Lee, G., Chung, C. P., & Park, Y. J. (2019). Identification of cell-penetrating osteogenic peptide from copine-7 protein and its delivery system for enhanced bone formation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 107, 2392-2402.
- [8] Choung, H. W., Lee, D. S., Lee, J. H., Shon, W. J., Lee, J-H., Ku, Y., & Park, J. C. (2016). Tertiary dentin formation after indirect pulp capping using protein CPNE7. *Journal of Dental Research*, 95, 906-912.
- [9] Nielsen F. H. (2004). Dietary fat composition modifies the effect of B on bone characteristics and plasma lipids in rats. *Biofactors*, 20, 161-171.
- [10] Gallardo-Williams, M. T., Maronpot, R. R., Turner, C. H., Johnson, C. S., Harris, M. W., Jayo, M. J., & Chapin, R. E. (2003). Effects of boric acid supplementation on bone histomorphometry, metabolism, and biomechanical properties in aged female F-344 rats. *Biological Trace Element Research*, 93, 155-169.
- [11] Beattie, J. H., & Peace, H. S. (1993). The influence of a low-boron diet and boron supplementation on bone, major mineral and sex steroid metabolism in postmenopausal women. *British Journal of Nutrition*, 69, 871-884.
- [12] Rondanelli, M., Faliva, M. A., Peroni, G., Infantino, V., Gasparri, C., Iannello, G., Perna, S., Riva, A., Petrangolini, G., & Tartara, A. (2020). Pivotal role of boron supplementation on bone health: A narrative review. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 62, 126577.
- [13] Hakki, S. S., Bozkurt, B. S., & Hakki, E. E. (2010). Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1). *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 24, 243-250.
- [14] Hakki, S. S., Götz, W., Dundar, N., Kayis, S. A., Malkoc, S., Hamurcu, M., Basoglu, A., & Nielsen, F. H. (2021). Borate and boric acid supplementation of drinking water alters teeth and bone mineral density and composition differently in rabbits fed a high protein and energy diet. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 67, 126799.
- [15] Hakki, S. S., Malkoc, S., Dundar, N., Kayis, S. A., Malkoc, S., Hamurcu, M., Basoglu, A., & Nielsen, F. H. (2015). Dietary boron does not affect tooth strength, micro-hardness, and density, but affects tooth mineral composition and alveolar bone mineral density in rabbits fed a high-energy diet. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 29, 208-215.
- [16] Shi, X., Mao, J., & Liu, Y. (2020). Pulp stem cells derived from human permanent and deciduous teeth: Biological characteristics and therapeutic applications. *Stem Cells*

Translational Medicine, 9(4), 445-464.

- [17] Sui, B., Wu, D., Xiang, L., Fu, Y., Kou, X., & Shi, S. (2020). Dental pulp stem cells: From discovery to clinical application. *Journal of Endodontics*, 46, 46-55.
- [18] Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, 97, 13625-13630.
- [19] Gronthos, S., Brahimi, J., Li, W., Fisher, L. W., Cherman, N., Boyde, A., DenBesten, P., Robey, P. G., & Shi, S. (2002). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *Journal of Dental Research*, 81, 531-535.
- [20] Lee, J. H., Lee, D. S., Choung, H. W., Shon, W. J., Seo, B. M., Lee, E. H., ... & Park, J. C. (2011). Odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells induced by preameloblast-derived factors. *Biomaterials*, 32(36), 9696-9706.
- [21] Kim, S. G., Zheng, Y., Zhou, J., Chen, M., Embree, M. C., Song, K., Jiang, N., & Mao, J. J. (2013). Dentin and dental pulp regeneration by the patient's endogenous cells. *Endodontic Topics*, 28, 106-117.
- [22] Oh, H. J., Choung, H. W., Lee, H. K., Park, S. J., Lee, J. H., Lee, D. S., ... & Park, J. C. (2015). CPNE7, a preameloblast-derived factor, regulates odontoblastic differentiation of mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 37, 208-217.
- [23] Dominici, M. L. B. K., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., ... & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317.
- [24] Hakki, S. S., Kayis, S. A., Hakki, E. E., Bozkurt, S. B., Duruksu, G., Unal, Z. S., Turaç, G., & Karaoz, E. (2015). Comparison of mesenchymal stem cells isolated from pulp and periodontal ligament. *Journal of Periodontology*, 86, 283-291.
- [25] Nielsen F. H. (2008). Is boron nutritionally relevant? *Nutrition Reviews*, 66, 183-191.
- [26] Choung, H. W., Lee, D. S., Park, Y. H., Lee, Y. S., Bai, S., Yoo, S. H., ... & Park, J. C. (2019). The effect of CPNE7 on periodontal regeneration. *Connective Tissue Research*, 60(5), 419-430.
- [27] Lee, Y. S., Park, Y. H., Lee, D. S., Seo, Y. M., Lee, J. H., Park, J. H., ... & Park, J. C. (2020). Tubular dentin regeneration using a CPNE7-derived functional peptide. *Materials*, 13(20), 4618.
- [28] Rodríguez-Lozano, F. J., Bueno, C., Insausti, C. L., Meseguer, L., Ramirez, M. C., Blanquer, M., ... & Moraleda, J. M. (2011). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues. *International Endodontic Journal*, 44(9), 800-806.



Synthesis, electrochemical characterization and biosensor application of a novel organoboron monomer

Nimet Yildirim-Tirgil^{1,2,*}, Zeycan Kalkan¹, Soner Ozturk³

¹Ankara Yıldırım Beyazıt University, Faculty of Engineering and Natural Sciences, Department of Materials Engineering, Ankara, 06020, Turkey

²Ankara Yıldırım Beyazıt University, Faculty of Engineering and Natural Sciences, Department of Biomedical Engineering, Ankara, 06020, Turkey

³Turkish Energy, Nuclear and Mineral Research Agency, Boron Research Institute, Ankara, 06530, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

Received December 8, 2021

Accepted April 24, 2022

Available online June 30, 2022

Research Article

DOI: 10.30728/boron.1034189

Keywords:

Boron

Catechol analysis

Conducting polymers

Electrochemistry

Enzymatic biosensors

ABSTRACT

In this work, a novel organoboron-based monomer was synthesized and applied to enzymatic biosensor systems. Utilizing the direct electropolymerization (one-step) method, an enzymatic and electrochemical biosensor system was developed by a novel organoboron polymer film-coated platinum screen-printed electrode/glassy carbon electrode. Electropolymerization of novel organoboron monomer was carried out through several electropolymerization situations, and the most suitable conditions for biosensing systems were concluded. Organoboron polymer-based enzymatic and electrochemical analysis developed in work was used to determine catechol, which is one of the most analyzed phenolic compounds in the chemistry and agriculture industry. The established biosensing system tested the phenolic components in the linear range between 5 μM to 300 μM with different electrodes. After the biosensor performance conditions optimization, real sample analysis was also achieved for spiked green tea samples with 3% to 10% range of standard deviation results.

1. Introduction

Organoboron-based polymers are among the highly biocompatible polymeric materials that are molecules that can serve the purpose of the proposed enzymatic biosensor system. Organoboron compounds, especially organoboranes, such as their stability to water and air, their ability to react with functional groups, the high stereoselectivity of their reactions, and the environmentally friendly boric acid of the by-product [1,2]. Organoboranes obtained by adding BH_3 to alkenes and alkynes by H. Brown are compounds containing C-B bonds and have been used mostly in organic synthesis to date [3]. Although its applications have not been tested in many other fields, there are promising studies. Organoboron polymers, which are the result of combining organoboron compounds with polymeric materials, are essential molecules that need to be studied due to the extra benefits they can add to the mentioned application areas. Organoboron polymers also have known optical and fluorescent properties and lesser-known properties such as conductivity and sensor signal amplification in electrochemical applications [2]. By combining these advantages that organoboron polymers provide to electrochemical systems

and the biocompatibility features possible in the enzyme immobilization step, the requirements for electrochemical enzyme biosensors will be completed.

Organoboron compounds play a significant role in organic conversion as catalysts and cocatalysts, involving polymerization reactions. However, the synthesis of organoboron polymers has been a difficult task that has solely recently been accomplished, leading to the discovery of new assisted reagents and immobilized catalysts. In synthesizing functionalized polymers with polar side groups, boron-containing polymers often act as intermediates and are used as preceramic and photoluminescent materials [4-8].

The incorporation into polymer structures of electron-deficient boron centers is especially interesting as it provides, for example, an opportunity to manipulate the polymers by donor-acceptor bonding. For the design of new assisted reagents, immobilized catalysts, and highly selective sensor materials, the attachment of nucleophiles to organoboron polymers can be exploited [9].

Organoboron polymers are flexible and high-performance platforms for realizing functional materials with

*Corresponding author: nyildirimtirgil@ybu.edu.tr

multifunctions. The majority of boron compounds have adequate stability to be handled under ordinary conditions, and the complexes of organoboron have flexibility in their molecular structure [2].

Furthermore, In the area of sensor materials, the inclusion of Lewis acidic organoboron moieties into conjugated polymers was indicated to cause sensor signal amplification influences such as improved stability and recoverability [1]. Nowadays, conductive polymers and organoboron-based polymers by electropolymerization have recently taken the scientific community's consideration, and they have also studied them in recent years.

The purpose of this study is to use organoboron-based polymers as immobilization material in enzymatic biosensors for the determination of phenolic components and to examine their effects on parameters affecting biosensor performance. In addition to the advantages of electrochemical test systems such as low-cost, portable use, and fast response, a more sensitive and selective biosensor system has been designed using organoboron polymers, known for their biocompatibility enzyme immobilization step, allowing use with longer-term stability.

Organoboron components to be used as immobilization materials within the project's scope were explicitly synthesized by the TENMAK, Boron Research Institute and given to be used in this study. First, the determining enzyme was immobilized on the electrode surface with organoboron polymers, and enzymatic-based electrochemical phenolic compound determination was performed using this prepared organoboron polymer + enzyme surface. Some parameters affecting the biosensor performance (enzyme immobilization, pH, temperature, substrate concentration, interference effect of organic solvents and other similar compounds, etc.) were investigated, the stability of enzyme electrodes, and the usefulness of organoboron polymers to the biosensor system was examined. One or more organoboron components with different structures were tested, and the component that could be used most effectively within the scope of the electrochemical-enzymatic biosensor system was determined.

By including some groups in conductive polymers with functional organic structures, especially in the molecule's design phase, the product's properties obtained can be improved by addressing different purposes. More efficient polymers were synthesized and used in the biosensor application phase, thanks to organoboron polymer synthesis reactions, which have advantages such as high yield, lack of by-products, high tolerance to functional groups, and simple product isolation. With the advantageous synthesis properties of organoboron polymers and the superior properties of polymers related to their use in electrochemical sys-

tems, the new modified surfaces that will be obtained will be used in materials science and biotechnology.

Analysis of phenolic compounds (e.g., catechol) for which tyrosinase enzyme was used as the sample detection system was developed. The phenolic component in natural foods was verified in the direct range of 10-80 μM to 5-60 μM with similar systems [10]. Considering these references, it is aimed to make determinations at similar intervals with the proposed biosensor system. Therefore, diluted and controlled catechol added food samples were analyzed with at least a margin of error [11]. The developed biosensor system's responses with the catechol determination to be made with conventional analytical devices will be compared, and the accuracy of the organoboron-based system was determined. Finally, it should be noted that the developed biosensor system can be designed and commercialized as a portable end product that allows real-time detection.

Novel organoboron monomer, synthesized by TENMAK, Boron Research Institute for the first time within the proposed project's scope, was used in enzymatic biosensor systems. Therefore, it could be a pioneering work and contribute scientifically by making a patent application. The contribution of these specific organoboron polymers to the electrochemical enzymatic biosensor for the determination of phenolic components was examined, and analyses were made with the highest sensitivity under optimum conditions. The biosensor parameters were developed from the important results obtained. The developed biosensor was used to quantify catechol in green tea samples after optimizing biosensor performance conditions. It had better not be forgotten that using the portable potentiostat and these electrodes, this established enzymatic biosensing system has the potential for on-site analysis of catechol analysis in real samples. Therefore, the future perspective of the study can be developing an easy-to-use and portable prototype invention for real sample detection.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents

Catechol, acetonitrile (ACN), Tyrosinase enzyme from mushroom (Tyr, EC:1.14.18.1), Sodium fluoride (NaF), 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylammonium tetrafluoroborate (TBTU), Tetra butyl ammonium hexafluorophosphate (TBAHFP) and chitosan were purchased from Sigma Aldrich. Also, a novel organoboron monomer (2-phenyl-1,3,2-dioxaborolane) was synthesized by BOREN for the first time within the proposed project's scope and was used in enzymatic biosensor systems. All the chemicals were used under the laboratory grade. MilliQ TKA-Lab pure water and Dichloromethane (DCM) were used for the wet process.

2.2. Synthesis of Novel Organoboron Monomer

Phenyl boronic acid (0.01 mol, 1.21 g) and catechol (0.01 mol, 1.10 g) were added into 100 mL of round flask bottom flask attached with dean-stark apparatus. Toluene was used as a solvent (115 mL). The reaction medium was set to 95°C after the dean-stark apparatus obtained the side product. The reaction was finished after 15 hours. The synthesis mechanism of the novel organoboron monomer is represented in Figure 1. The NMR analysis results for the synthesized novel monomer were observed as ^1H NMR(CDCI₃) 7.75-7.3 (m, 5H) 4.07 (t, 4H, J=15.12, 15.13).

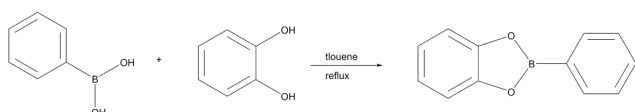


Figure 1. The synthesis mechanism of the novel organoboron monomer.

2.3. Electropolymerization of Novel Organoboron Monomer

GCE: The electrochemical measurements were recorded using a conventional three-electrode system consisting of a glassy carbon electrode as a working electrode (WE), platinum wire as an auxiliary electrode/counter electrode (CE), and Ag/AgCl as a reference electrode. With this three-electrode system, electrochemical measurements were performed through a potentiostat controlled by IviumSoft, software for control and data acquisition.

Pt SPE: The electrochemical measurements were recorded using platinum screen printed electrodes (SPE) that the SPE three-electrode system consisted of a Pt coated plate as CE, Pt coated plate as WE, and Ag/AgCl as the reference electrode (RE). Electrochemical measurements were carried out using a potentiostat controlled by IviumSoft.

GCE and Pt SPE electrodes were immersed in the solution containing different ionic solutions: NaF, LiClO₄, TBTU, and TBAHFP, respectively, and mM level of novel boron-containing monomer in the 10 mL ACN solution. Later, cyclic voltammetry (CV) scans were performed between -0.5 V to 1.2 V within the GCE and Pt SPE electrodes' potential ranges until stable curves of CV profiles were obtained. Finally, the surface of GCE and SPEs were washed by using distilled water.

After electropolymerization, CVs were recorded at a different scan rate of 10 mV.s⁻¹, 25 mV.s⁻¹, 50 mV.s⁻¹, 75 mV.s⁻¹, 100 mV.s⁻¹, 125 mV.s⁻¹, and 150 mV.s⁻¹, respectively that the surface activity and conductivity of the electrode are ascertained with K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] system which were carried out between -0.2 V to 0.8 V in 0.1 M KCl solution containing 5 mM

Fe(CN)₆³⁻/Fe(CN)₆⁴⁻.

2.4. Surface Characterization

For Scanning Electron Microscope (SEM), HITACHI SU 5000 was used to analyze the electrodes' surfaces after the electropolymerization. Surface characterization of Pt-SPE electrodes was evaluated for the novel organoboron monomer's electropolymerization in different salt solutions.

2.5. Preparation and Optimization of the Biosensor Performance Conditions

Afterward, the novel organoboron monomer modification of the electrodes enzyme immobilization was done using chitosan as an immobilization agent. A combination of 40 μL of 1 mg/mL Tyr and 2% chitosan in acetic acid was produced for enzyme immobilization. Following that, part of the mixture dispersion was cast onto the surface of these electrodes, allowing the solvent to evaporate at room temperature while the mixture was allowed to dry on the surface.

An electrochemical enzymatic biosensor system was developed using the direct electropolymerization procedure to immobilize Tyr enzyme into the organoboron polymer film in conjunction with chitosan, resulting in a very stable and effective catechol biosensor. Both for GCE (in PBS solution at pH 8) and Pt SPEs, the biosensor was used to determine catechol by voltammetric measurements in the steady-state condition at an applied potential of -0.9 V to 0.8 V in different concentrations of catechol (from 1 μM to 400 μM) respectively (in pH 7.5 PBS solution).

To identify the optimal conditions, the enzymatic biosensor system was tested in several pH solutions of PBS (pH 6 to 8), including 200 μM catechol and PBS solutions at pH 6, pH 6.5, pH 7, pH 7.5, and pH 8.

At a concentration level of 200 μM, several phenolic compounds such as 4-hydroxybenzoic acid, gallic acid, hydroquinone, 4-nitrophenol, and phenol were tested to assess the specificity of the proposed enzymatic biosensor for catechol detection.

To assess the possible matrix influence of actual samples on biosensor performance, spiked green tea samples with varying catechol (50 μM, 100 μM, and 200 μM) were evaluated after the working parameters of the designed biosensor system were optimized.

3. Results and Discussion

3.1. Electropolymerization of Novel Organoboron Monomer on Different Conditions by Using Different Electrodes

GCE and Pt SPEs were immersed in the solution containing different salts: NaF, LiClO₄, TBTU, and TBAH-

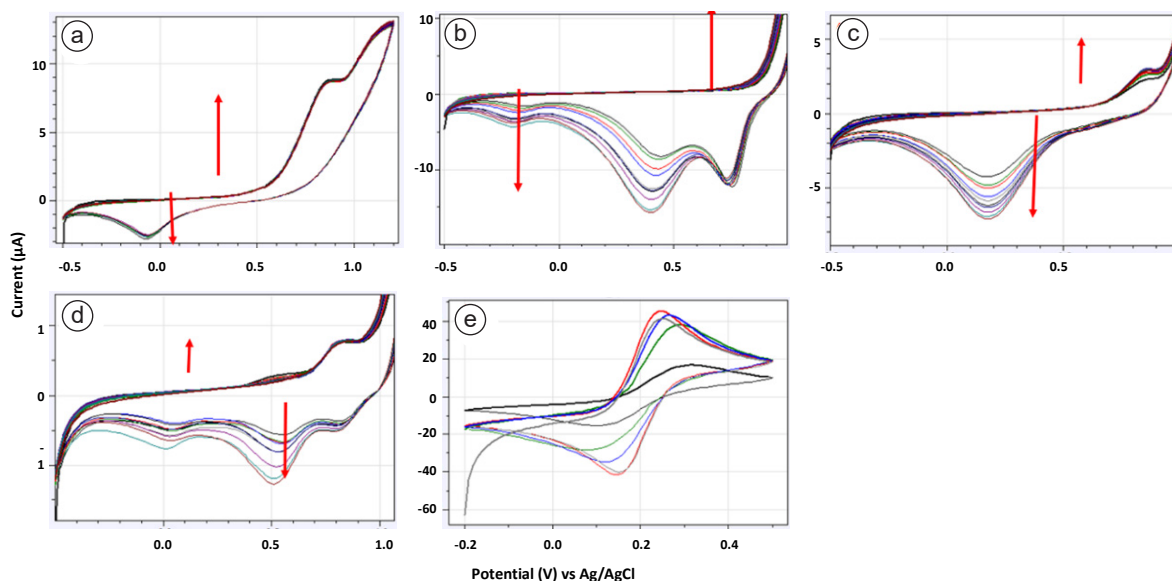


Figure 2. Electropolymerization of novel boron containing monomer on different conditions using GCE (a) in NaF (b) in LiClO₄ (c) in TBTU (d) in TBAHFP (e) Fe(CN)₆³⁻/Fe(CN)₆⁴⁻ redox molecule CV after electropolymerization (black: blank, green: in NaF, red: in LiClO₄, blue: in TBTU, gray: in TBAHFP).

FP, respectively, and novel boron-containing monomer in the ACN solution. Since ACN is an organic solvent and does not have an ionic content, the ionic solvent addition was needed to perform the electropolymerization process. Therefore, different salts were added to the solution each time to form ions. Electrodes were scanned in the potential range of 0.5 V to 1.2 V for GCE and Pt SPEs during the electropolymerization process until steady CV curves were produced, as illustrated in Figures 2 and 3. The new boron-containing monomer solution's anodic and cathodic peak currents grew dramatically with each scan until the tenth scan. Therefore, these results proved that electropolymer-

ization of this novel organoboron monomer was carried out successfully.

After the electropolymerization, the electrode's surface activity and conductivity were ascertained by the potential range between -0.2 V and 0.5 V in the solution of KCl containing Fe(CN)₆³⁻/Fe(CN)₆⁴⁻ redox molecule. As shown in Figures 4 and 5, CVs were recorded at a different scan rate of 150 mV.s⁻¹, 125 mV.s⁻¹, 100 mV.s⁻¹, 75 mV.s⁻¹, 50 mV.s⁻¹, 25 mV.s⁻¹, and 10 mV.s⁻¹ respectively in FeCN. It should be noted that according to the results, the cathodic peak current increased with the scan rates for CV profiles. As seen in Figure 5c, af-

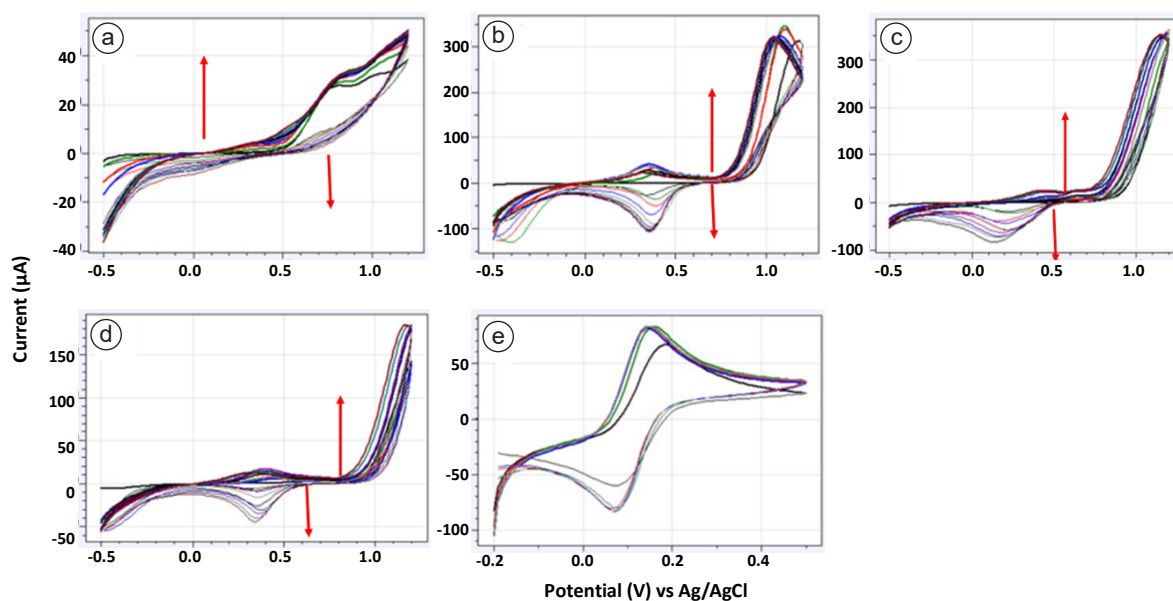


Figure 3. Electropolymerization of novel boron containing monomer on different conditions using Pt SPE (a) in NaF (b) in LiClO₄ (c) in TBTU (d) in TBAHFP (e) Fe(CN)₆³⁻/Fe(CN)₆⁴⁻ redox molecule CV after electropolymerization (black: blank, green: in NaF, red: in LiClO₄, blue: in TBTU, gray: in TBAHFP).

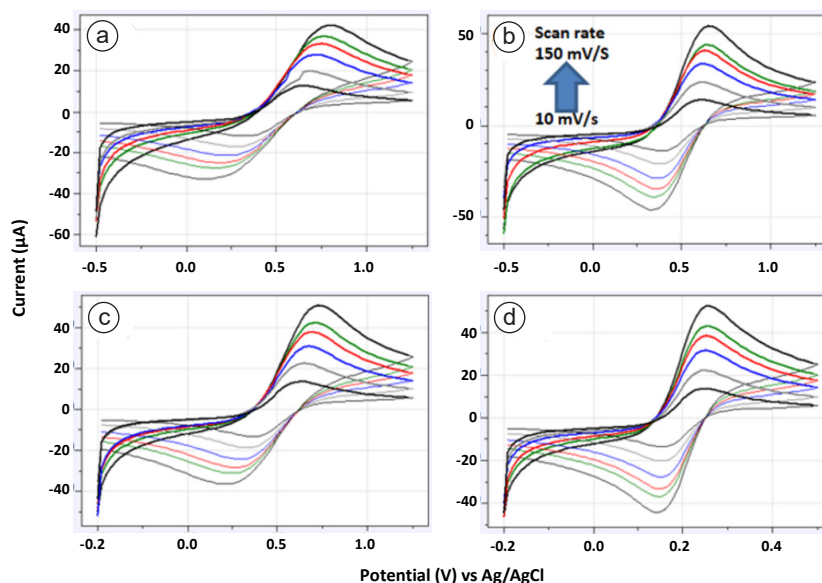


Figure 4. After electropolymerization of novel boron containing monomer, CVs were recorded at different scan rate of 10 mV s^{-1} , 25 mV s^{-1} , 50 mV s^{-1} , 75 mV s^{-1} , 100 mV s^{-1} , 125 mV s^{-1} , 150 mV s^{-1} as different peak height in FeCN for GCE (a) NaF (b) LiClO_4 (c) TBTU (d) TBAHFP.

ter the electropolymerization in TBTU salt, the highest voltammogram peak height is evidence of high surface conductivity, and this TBTU curve is the best. These results proved that increasing scan rate means there is something active on the surface; the more conductive the surface becomes, the better the FeCN peaks, even at the empty electrode, and electropolymerization has occurred on the surface.

SEM analyses were used to analyze the surface morphology of the bare and new organoboron monomer modified SPEs based on various salt solutions (Figure 6a-e). Depending on the SEM images for these electrodes, it should be noted that novel boron monomer

containing LiClO_4 salt, the surface of Pt SPE is the densest and uniform one, as seen in Figure 6c.

3.2. Biosensor Performance Development

pH Optimization: The enzymatic biosensor system was evaluated in PBS solution at multiple pH values (pH 6 to 8) to find the best circumstances, including $200 \mu\text{M}$ catechol. As shown in Figure 7a, Pt SPEs were submerged in a solution comprising various salts based on electropolymerized Pt SPE, and the best pH was found to be pH 7.5. Similarly, the GCE electrode was treated in the same way. The GCE electrode containing the new monomer and LiClO_4 salt was submerged in solutions with various pH values, as shown in Figure

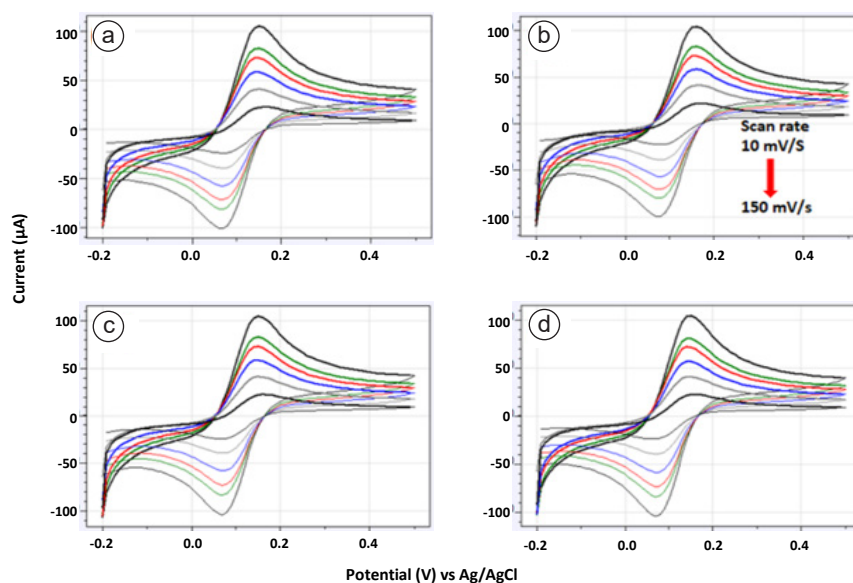


Figure 5. After electropolymerization of novel boron containing monomer, CVs were recorded at different scan rate of 150 mV.s^{-1} , 125 mV.s^{-1} , 100 mV.s^{-1} , 75 mV.s^{-1} , 50 mV.s^{-1} , 25 mV.s^{-1} , and 10 mV.s^{-1} as different peak height in FeCN for Pt SPE (a) NaF (b) LiClO_4 (c) TBTU (d) TBAHFP.

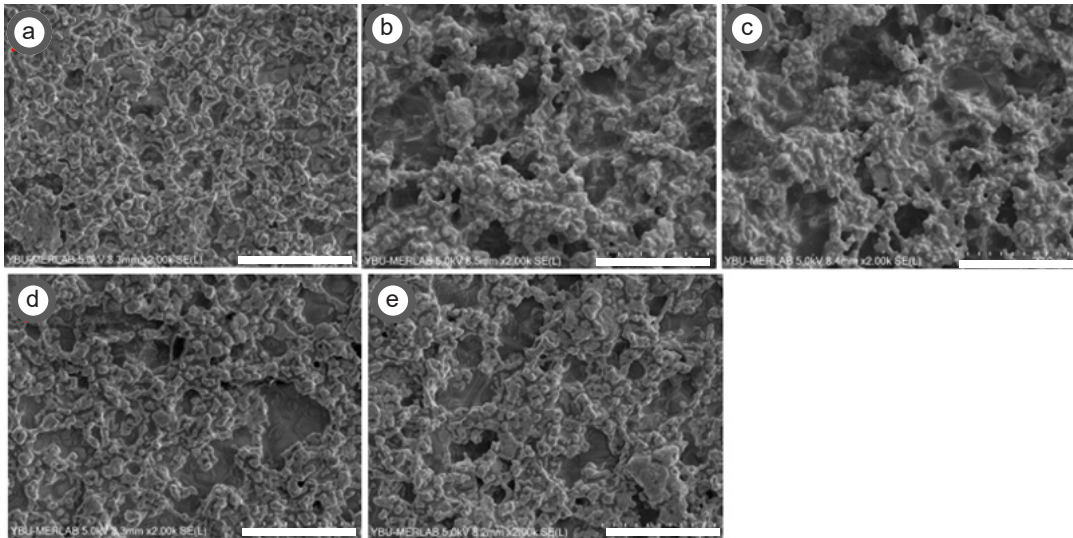


Figure 6. SEM images of boron monomer modified SPE Platinum electrodes electropolymerized in ACN and various salts: (a) Blank, (b) NaF, (c) LiClO₄, (d) TBTU, and (e) TBAHFP (Scale bar:20 μm) .

7b, and pH 8 was the best value.

Dose-response curve: Voltammetric measurements were performed for both GCE and Pt SPEs in the applied potential range of -0.9 V to 0.8 V using different concentrations of catechol (0 μM to 400 μM) in a 10 mL pH 8 buffer solution. The reduction peak for catechol's enzymatic reaction's o-quinone product was observed, and the peak heights for each concentration were cal-

culated. Based on unique boron monomer modified electrodes, the linear range for both GCE and Pt SPEs in various salt solutions was determined between 5 μM and 300 μM for GCE (Figure 8) and between 5 μM and 100 μM (Figure 9a). In addition, when catechol concentration grew, the decreased (cathodic) peak current of the new boron-containing monomer increased. The limit of detections (LOD) for both electrode systems were calculated with the 3 times the standard deviation of the signals obtained from the blank standards rule [13], and the results were 2.25 μM and 1.8 μM, respectively for Pt SPE and CGE systems.

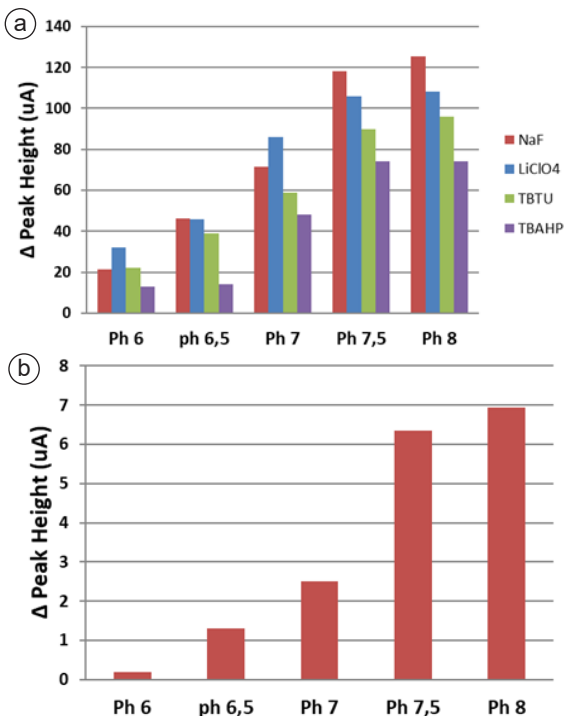


Figure 7. (a) The influence of pH on biosensor performance was investigated by incubating Pt SPE electrodes with various salts in 200 μM catechol solution buffered (10 ml PBS) at the pH range of 6-8. (b) By incubating the GCE electrodes containing the new boron monomer LiClO₄ in 200 μM catechol solution buffered (10 ml PBS) at pH 6-8, the influence of pH on the performance of the biosensor was investigated.

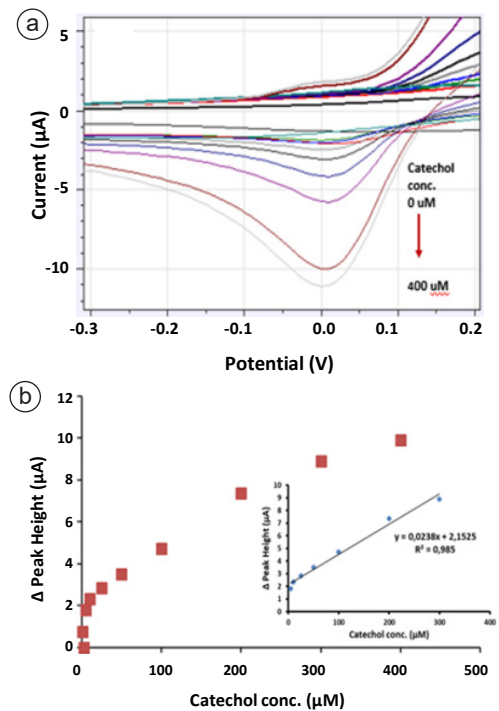


Figure 8. (a) Catechol detection for the GCE containing novel boron monomer and LiClO₄ salts in PBS at pH 8, (b) Dose-response curve for catechol concentration between 5 μM to 300 μM, and the inner figure is the linear range.

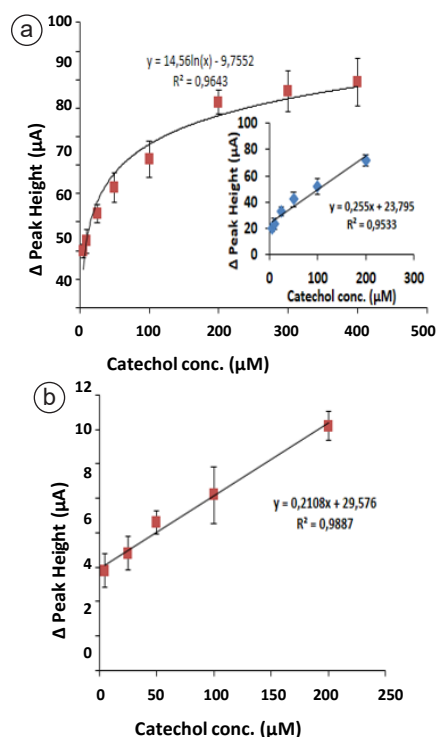


Figure 9. (a) Catechol detection for Pt SPE containing novel boron monomer in NaF and dose calibration curve for catechol concentrations between 5 M and 100 M, (b) Catechol detection for Pt SPE containing novel boron monomer in LiClO_4 and dose calibration curve for catechol concentrations between 5 μM and 200 μM .

At a concentration level of 200 μM , several phenolic compounds such as 4-hydroxybenzoic acid, gallic acid, hydroquinone, 4-nitrophenol, and phenol were tested to assess the specificity of the proposed enzymatic biosensor for catechol detection. The biosensor system's reactions to these compounds were compared to catechol detection results at 200 μM . Figures 10 showed that non-specific phenolic compounds did not produce any significant peaks at the voltage where the O-reduction quinone's peak is located on the GCE system. However, on the Pt SPE system, we could observe that non-specific phenolic compounds still had some background signals, and they were potential for interference to the target molecule signal (Figures 11a and 11b). Thus we can conclude that the GCE system was more selective than the Pt SPE system for catechol detection.

As seen here, when looking at the selectivity for these phenol compounds, it was seen that the Tyrosinase enzyme worked only for catechol with a large and significant difference. Therefore, the Tyr-GCE/Pt SPE-based biosensor's sensitivity is the biggest for determining phenol derivatives.

3.3. Real Sample Assessment

To show that the biosensor could detect catechol in tea samples under ideal conditions. Table 1 summarizes the results of using proven enzymatic biosensor

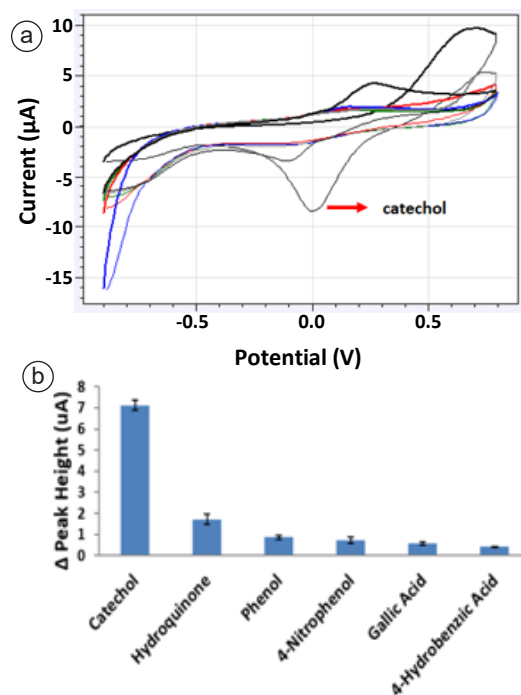


Figure 10. The sensitivity (a) and selectivity (b) of the biosensor device for various phenol compounds (200 μM) on GCE with PBS at pH 8 (black: catechol).

equipment to evaluate 50 μM , 100 μM , and 200 μM spiked tea samples. In parallel testing, LiClO_4 recovery was between 113% and 118%, and NaF recovery was between 116% and 121%, with the percentage of standard deviation (sd) between 4.2% and 1.7% for LiClO_4 and between 2.5% and 5.1% for NaF. According to these data, the potential influence from the

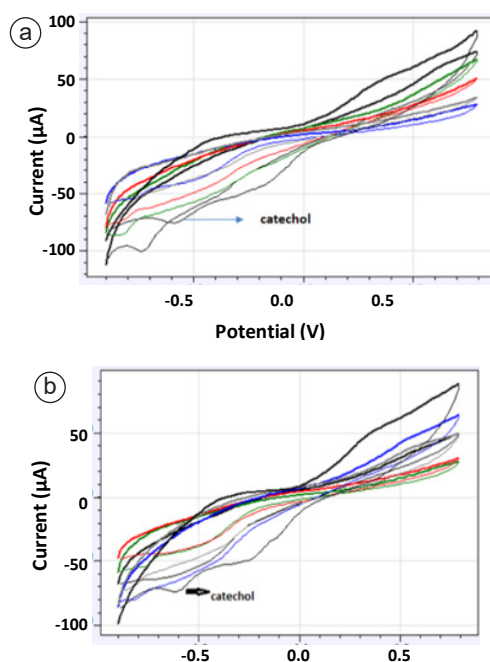


Figure 11. (a) Pt SPE containing novel boron monomer other phenolic compounds in LiClO_4 . (b) Pt SPE containing novel boron monomer with other phenolic compounds in NaF.

varied background composition of authentic samples was less than 5%, which is acceptable for food quality monitoring tests.

Table 1. Real green tea assessment with novel boron monomer modified Pt SPE with LiClO₄ and NaF, as an electropolymerization salt, respectively.

Added Catechol Conc. (µM)	Found Catechol Conc. (µM)	Recovery %	sd %
50	56.8	113.6	1.7
100	118.7	118.7	9.1
200	234.2	117.1	4.2
50	58	116	5.1
100	122.2	122.2	2.5
200	242	121	4.1

4. Conclusions

In this study, using the direct electropolymerization (one-step) method, an electrochemical enzymatic biosensor system was developed with novel organoboron polymer film-coated Pt SPEs/GCE. Electropolymerization of novel organoboron monomer was performed and developed using different electropolymerization conditions. It should be noted that this novel boron-containing monomer, which Boron Research Institute synthesized for the first time within the proposed project's scope, was used in enzymatic biosensor systems. Therefore, it could be a pioneering work and contribute scientifically by making a patent application.

The film surface morphologies were prepared with different processes, and the surface morphology was characterized by Scanning Electron Microscope (SEM). Immobilizing tyrosinase (Tyr) enzymes into the conducting polymer film, and chitosan resulted in a stable and effective catechol biosensor. The phenolic components were examined in the linear range between 1 µM and 200 µM with various electrode systems in this study using the proposed biosensor system. Following the tuning of biosensor performance settings, actual sample analysis was carried out on controlled catechol added green tea samples with standard deviations ranging from 3% to 10%. Furthermore, it should be noted that the developed biosensor system can be designed and commercialized as a portable end product that allows real-time detection. Phenolic compounds, which are determined to determine natural foods' antioxidant and antimicrobial activities, are partly made within the scope of quality control analysis. The developed organoboron polymer-based biosensor system will allow faster, cheaper, precise, and real-time tests. Furthermore, this designed enzymatic biosensor system may theoretically test catechol detection in actual samples utilizing the portable potentiostat and screen-printed electrodes. As a result, the study's long-term goal might be to create a por-

table, easy-to-use prototype device for real-world testing.

Acknowledgement

This work was supported by TENMAK-Boron Research Institute Scientific Project (Project no: 2020-31-06-20B-002).

References

- [1] Jäkle, F. (2006). Lewis acidic organoboron polymers. *Coordination Chemistry Reviews*, 250(9-10), 1107-1121.
- [2] Tanaka, K., & Chujo, Y. (2012). Advanced luminescent materials based on organoboron polymers. *Macromolecular Rapid Communications*, 33(15), 1235-1255.
- [3] Vedejs, E. (1980). The 1979 Nobel Prize for Chemistry. *Science*, 207(4426), 42-44.
- [4] Yamamoto, H. (1999). *Lewis acid reagents: A practical approach*. Oxford University Press, .
- [5] Chung, T. C., & Janvikul, W. (1999). Borane-containing polyolefins: synthesis and applications. *Journal of Organometallic Chemistry*, 581(1-2), 176-187.
- [6] Boffa, L. S., & Novak, B. M. (2000). Copolymerization of polar monomers with olefins using transition-metal complexes. *Chemical Reviews*, 100(4), 1479-1494.
- [7] Kondo, Y., García-Cuadrado, D., Hartwig, J. F., Boen, N. K., Wagner, N. L., & Hillmyer, M. A. (2002). Rhodium-catalyzed, regiospecific functionalization of polyolefins in the melt. *Journal of the American Chemical Society*, 124(7), 1164-1165.
- [8] Qin, Y., Cheng, G., Sundararaman, A., & Jäkle, F. (2002). Well-defined boron-containing polymeric lewis acids. *Journal of the American Chemical Society*, 124(43), 12672-12673.
- [9] Jäkle, F. (2006). Lewis acidic organoboron polymers. *Coordination Chemistry Reviews*, 250(9-10), 1107-1121.
- [10] Zoral, F., & Turgay, Ö. (2014). A Research on Total Phenolic Content, Antioxidant Activity and Antimicrobial Effects of Various Food Wastes. *Journal of Agriculture and Nature*, 17(2), 24-33.
- [11] Sadeghi, S., Fooladi, E., & Malekaneh, M. (2015). A new amperometric biosensor based on Fe₃O₄/polyaniline/laccase/chitosan biocomposite-modified carbon paste electrode for determination of catechol in tea leaves. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(3), 1603-1616..
- [12] Kalkan, Z., Yence, M., Turk, F., Bektas, T. U., Ozturk, S., Surdem, S., & Yildirim-Tirgil, N. (2022). Boronic Acid Substituted Polyaniline Based Enzymatic Biosensor System for Catechol Detection. *Electroanalysis*, 34(1), 33-42.
- [13] Armbruster, D. A., & Pry, T. (2008). Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *The Clinical Biochemist Reviews*, 29(Suppl 1), S49.



In vitro biological activities of potassium metaborate; antioxidative, antimicrobial and antibiofilm properties

Tuba Baygar^{1,*}, Nurdan Sarac², Ozgur Ceylan³, Aysel Ugur⁴, Rukiye Boran⁵, Uydu Balci²

¹Muğla Sıtkı Koçman University, Research Laboratories Center, Material Research Laboratory, Muğla, 48000, Turkey

²Muğla Sıtkı Koçman University, Faculty of Science, Department of Biology, Muğla, 48000, Turkey

³Muğla Sıtkı Koçman University, Vocational School of Ula Ali Koçman, Food Quality Control and Analysis Program, Muğla, 48000, Turkey

⁴Gazi University, Faculty of Dentistry, Department of Basic Sciences, Section of Medical Microbiology, Ankara, 06490, Turkey

⁵Aksaray University, Vocational School of Health Service, Medical Laboratory Program, Aksaray, 68100, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

Received February 21, 2022

Accepted April 30, 2022

Available online June 30, 2022

Research Article

DOI: 10.30728/boron.1076636

Keywords:

Antibiofilm

Antimicrobial

Antioxidant

Boron

Potassium metaborate

ABSTRACT

Antioxidant, antimicrobial and antibiofilm activities of potassium metaborate (KBO₂) was investigated within the present study. Antioxidant capacity of potassium metaborate was determined by β -carotene bleaching (BCB) assay and hydroxyl radical scavenging activity. Potassium metaborate was evaluated for its antimicrobial effects against a yeast (*Candida albicans*), Gram-negative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) and Gram-positive (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) bacteria via broth dilution method. The inhibition capability of potassium metaborate on the microbial biofilm formation of tested microorganisms was measured by microplate biofilm method using MTT (3-[4, 5-dimethyl-2-thiazolyl]-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromide). Biofilm inhibition capacity of potassium metaborate was also observed by Scanning Electron Microscope (SEM). Potassium metaborate was found to have the ability to scavenge hydroxyl radicals with an inhibition rate of 71.13% at 100 mM concentration. Antioxidant activity of potassium metaborate as determined by BCB assay gave higher result with an inhibition rate of 86.96% at the same concentration. According to the MIC (minimum inhibition concentration) values, the potassium metaborate inhibited the growth of *C. albicans*, *S. aureus* and *E. coli* at 62.5 mM concentrations while it was 31.25 mM for *B. subtilis* and 125 mM for *P. aeruginosa*. The highest antibiofilm activity was determined at the MIC of potassium metaborate with the reduction rate of 90.18% against *C. albicans*. It was concluded that, potassium metaborate has strong biological activities and can be effectively used for biomedical and environmental solutions.

1. Introduction

The structural diversity and biological activity potentials of the non-toxic and natural products conducted to the discovery of new drugs by 21st century's scientists. Due to the increased incidence of microbial resistance, highly active molecules are needed against microbial infections and biofilm formations. Such resistance presents a serious challenge to human health, as well as the costs for the treatment of infections. Due to their biocidal activity, metals are commonly used as antimicrobial agents in agriculture, healthcare, and industry.

The boron element, which takes place in group 3A of the periodic table, has semi-metallic and semi-conductive properties. The boron element, which forms compounds with various metals or non-metal elements, is never found free in nature. That's why most of the boron compounds are utilized in different industrial sectors. Boron, which is at the borderline of metals and

non-metals in the periodic table, is known as an appropriate element for various industries such as automotive, environment and medicine [1]. It is known that there are almost 230 different boron minerals all around the world [2]. Boron is a popular element for thin films and coatings in biomedical and biotribological applications [3]. As being an essential element for plants, boron may also be required by humans and animals [4]. Boron is also known to be related with bone metabolism which interacts with calcium, magnesium and vitamin D [5]. Recently, boron has attracted attention with its effective role in the field of nutrition and biochemistry. Researchers of pharmaceutical industry are designing new molecules by adding boron atoms to molecules for prevention, diagnosis and therapy of various diseases [6]. There are some studies about the antioxidant [7], hepatoprotective [8], antibacterial [9] and antigenotoxic effects [10] of boron compounds.

On the basis of boron trioxide content, Turkey's share

*Corresponding author: tubaygar@mu.edu.tr

of the boron reserve is 72.3% while the rates are 8.5% and 6.8% for Russia and USA, respectively. The lifespan of Turkey's boron reserves is 567 years, whereas it is 67 years in Russia, as being the second richest country with the reserves [11]. The biological, chemical and physical features of boron open a new perspective for researchers who are focusing on new chemotherapeutics. As far as our knowledge, there is no study about the antimicrobial and antioxidative properties of potassium metaborate.

Within the present study, one of the effective borate compounds, potassium metaborate, has been evaluated for its biological activities in terms of antioxidative capacity and antimicrobial/antibiofilm properties.

2. Materials and Methods

2.1. Antioxidant Activity

2.1.1. Hydroxyl radical scavenging activity

Antioxidative potential of potassium metaborate was measured by Fentons reaction method with slight modifications [12]. A reaction mixture containing Hydrogen peroxide (H_2O_2) (0.1 mL), Ferrous sulfate ($FeSO_4$) (0.1 mL), ethanolic solution of salicylic acid (0.1 mL), deionized water (2 mL) and varying concentrations of potassium metaborate (10 nM, 100 nM, 1 mM, 10 mM and 100 mM) (1 mL) was used as test material.

Deionized water and ascorbic acid was used as the negative (blank) and positive control, respectively. After incubation period at 37°C for 30 min, hydroxyl radical scavenging rate (%) was calculated according to Eq. 1. Where $A_{510(blank)}$ was the absorbance of the control, $A_{510(sample)}$ was the absorbance of the tested potassium metaborate concentration mixed with reaction solution. The experiments were repeated for four times and the standard deviations were calculated.

$$\text{Scavenging rate (\%)} = \left[\frac{A_{510(blank)} - A_{510(sample)}}{A_{510(blank)}} \right] \times 100 \quad (1)$$

2.1.2. β -caroten-linoleic acid bleaching assay

The antioxidant activity of potassium metaborate using the β -carotene-linoleic acid assay was measured according to Rauter et al. [13] with slight modifications. Deionized water was used as the negative control and alpha-tocopherol/butylated hydroxyl toluene (BHT) were used as the positive controls. Antioxidant activity of potassium metaborate was calculated using Eq. 2. Where R_{blank} and R_{sample} are the oxidation rates of negative control and tested potassium metaborate concentrations, respectively. The experiments were repeated for four times and the standard deviations were calculated.

$$AA (\%) = \left[R_{blank} - \frac{R_{extract}}{R_{blank}} \right] \times 100 \quad (2)$$

2.2. Antioxidant Activity

2.2.1. Microorganisms

Antimicrobial activity of potassium metaborate was tested against a group of microorganisms including; *Bacillus subtilis* ATCC (American Type Culture Collection) 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Candida albicans* ATCC 10239. The tested strains which are known to be clinically important were provided from Muğla Sıtkı Koçman University Culture Collection (MUKK). After activating the strains, the turbidities of the broth mediums were adjusted to equal turbidity of a 0.5 McFarland standard to prepare the microbial inocula.

2.2.2. Broth microdilution method

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Lethal Concentration (MLC) values of potassium metaborate were calculated by using broth microdilution method [14]. Due to our pilot studies, potassium metaborate were prepared at ranging concentrations between 1-521 mM and screened for antimicrobial activity. The MICs were evaluated as the lowest concentration of potassium metaborate displaying no visible growth of microorganism (no turbidity) To determine the MLC values, cell suspensions (100 μ L) were taken from the tubes with no turbidity and poured onto Mueller-Hinton Agar (MHA) plates. After overnight incubation, the lowest concentration of potassium metaborate was defined as the MLC, at which microorganisms did not grow on agar media.

2.3. Antibiofilm Activity

Antibiofilm activity of potassium metaborate against tested microorganisms was evaluated by using MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay [15]. MIC and MIC/2 of potassium metaborate were used to determine the antibiofilm capacity. The experiments were repeated for three times and the standard deviations were calculated.

Inhibitory effect of potassium metaborate on microbial biofilm formation was also screened by SEM. For SEM visualization, tested microbial strains were grown in 5% D-Glucose-supplemented Tryptone Soy Broth (TSB) medium. Tubes inoculated with microbial strains were prepared with the potassium metaborate concentration that had highest antibiofilm activity. Then, sterilized glass cover slips were put into the tubes and incubated overnight. After the incubation period at appropriate temperatures, coverslips were removed and washed with phosphate buffered saline (0.1 M, pH 7.4), fixed in 2.5% glutaraldehyde solution and dehydrated with ethanol. Coverslips were air-dried and coated with gold using a sputter coater (Emitech, UK) and visualized using SEM (Jeol, Japan) [16].

2.4. Statistical Analysis

Data was analyzed by One Way Analysis of Variance (ANOVA) using statistical software Statistical Package for Social Science (SPSS, Version 22.0, IBM corporation, NY). Tukey's test was used to compare the means of all concentrations and control groups. A value of $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

3. Results and Discussion

3.1. Antioxidant Activity

Potassium metaborate was found to have the ability to scavenge hydroxyl radicals with an inhibition rate of 70.4% and 71.13% at 10 and 100 mM concentrations, respectively ($p < 0.05$) (Figure 1). There was not a statistically significant difference between the control group (ascorbic acid) and potassium metaborate for other tested concentrations (0.00001 mM, 0.0001 mM and 1 mM) ($p > 0.05$).

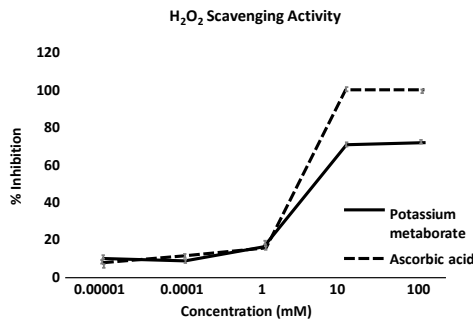


Figure 1. Antioxidant activity of potassium metaborate by hydroxyl scavenging activity.

Antioxidant activity of potassium metaborate as determined by beta-carotene bleaching assay gave higher result with an inhibition rate of 86.96 % at 100 mM concentration ($p < 0.05$) (Figure 2). There was a significant difference between the 0.0001 mM and 1 mM potassium metaborate concentrations and control groups (alpha-tocopherol and BHT) ($p < 0.05$). A significant difference was not found for 10 mM potassium metaborate concentration among the other tested concentrations and control groups ($p > 0.05$).

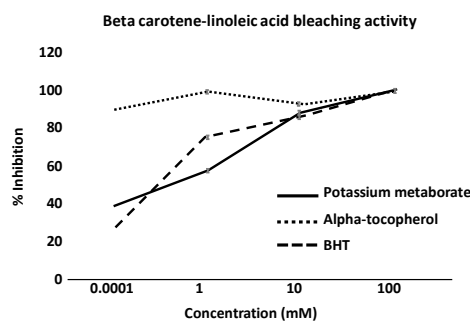


Figure 2. Antioxidant activity of potassium metaborate by beta carotene-linoleic acid bleaching activity.

The antioxidant action mechanism of boron has not been clarified yet. It was suggested that boron compounds reveal their antioxidative effect by increasing the antioxidant enzyme activity and preventing the lipid peroxidation (LPO) [17]. Boron compounds were also reported to demonstrate their activity by Deoxyribonucleic acid (DNA) damage preventing and hepatoprotective effects [8,18]. In addition, it was found that boron compounds (boric acid, borax, colemanite and ulexite) may increase the antioxidant enzyme activities in human peripheral blood cells [10].

3.2. Antimicrobial Activity

According to the MIC (Minimum Inhibition Concentration) values, potassium metaborate inhibited the growth of *C. albicans*, *S. aureus* and *E. coli* at 62.5 mM concentrations while it was 31.25 mM for *B. subtilis* and 125 mM for *P. aeruginosa* (Table 1). According to the antimicrobial activity results, *B. subtilis* was found to be the most sensitive microorganism against the lowest potassium metaborate concentration. MLC values were found to be 500 mM for *S. aureus* and *C. albicans*; 250 mM for *E. coli* and *P. aeruginosa*; 125 mM for *B. subtilis* (Table 1).

Table 1. Antimicrobial activity of potassium metaborate against tested microorganisms.

Microorganisms	MIC (mM)	MLC (mM)
<i>C. albicans</i>	62.5	500
<i>S. aureus</i>	62.5	500
<i>E. coli</i>	62.5	250
<i>B. subtilis</i>	31.25	125
<i>P. aeruginosa</i>	125	250

The antimicrobial activity investigations about boron compounds has gained great interest lately and have been studied by researchers [9,19-21]. In the study of Yılmaz [9], the MICs of boric acid were calculated as 7.60 mg/mL, 7.60 mg/mL and 3.80 mg/mL, against *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*, respectively. Sayın et al. [22] reported the MICs of boric acid and disodium octaborate tetrahydrate against selected strains of clinical cultures ranged from 0.77-3.09 mg/ml and 0.644-10.312 mg/ml, respectively. Argın et al. [23] who incorporated disodium octaborate tetrahydrate, sodium pentaborate and boric acid to gelatin films indicated that biodegradable gelatin films containing disodium octaborate may be used as antimicrobial packaging materials.

3.3. Antibiofilm Activity

The results of the antibiofilm activity performed using MTT analysis are shown in Figure 3. It was clearly observed that potassium metaborate inhibited the biofilm formation of *E. coli*, *S. aureus* and *C. albicans* effectively. On the other hand, it did not inhibit the biofilm

formation of *B. subtilis* and *P. aeruginosa*. The highest inhibition value was obtained for *C. albicans* biofilm at MIC. The MIC/2 concentration was also effective for *C. albicans* biofilm formation. It was observed that, there were not significant differences between MIC and MIC/2 concentrations for *C. albicans* and *B. subtilis* biofilm inhibition ($p>0.05$) while they were statistically significant for *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus* biofilm inhibition ($p<0.05$).

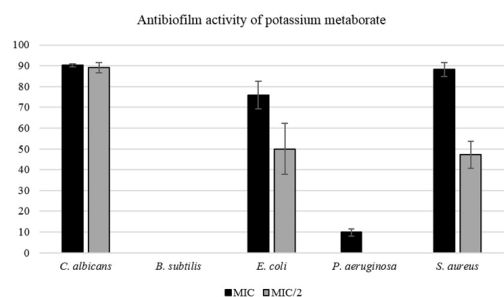


Figure 3. Antibiofilm activity of MIC and MIC/2 of potassium metaborate against tested microorganisms.

The results of the biofilm inhibition assay were also evaluated using SEM (Figure 4). There was a compact biofilm layer, probably an exopolysaccharide layer, for *C. albicans* at control group (Figure 4a) while the biofilm layer was weak for the potassium metaborate-applied group (Figure 4b). Similar images were obtained for *S. aureus* biofilm (Figure 4 i-j).

When compared to other elements, the use of boron-containing compounds for medicinal use seems to be lagging behind. However, there are considerable studies to investigate the use boron-containing products in medicine, such as cancer drugs, oral pharmaceuticals against diabetes and anticoagulant agents [24]. One of these studies which is called as boron neutron capture therapy (BNCT) is primarily intended to the treatment of high-grade gliomas, melanoma, most recently, head, neck and liver cancers [25]. Paraboronophenylalanine that is an important component for BNCT is known to be the first boron-containing compounds approved for human use [26].

Dembitsky and Srebnik [27] reported that carboxyboranes were shown to have antifungal, anticancer and hypolipidemic activities. Diazaborines have been reported to have antimalarial activity [28,29]. Jabbour et al. [30] reported that oxazaborolidines have encouraging antibacterial activity against *Streptococcus mutans*. The antimicrobial activity results of the present study indicated that *B. subtilis* was the most sensitive microorganism to the lowest potassium metaborate concentration. On the other hand, potassium metaborate did not inhibited the biofilm formation of *B. subtilis*. Differently from killing the microorganism directly, potassium metaborate performed an antibiofilm mechanism on *B. subtilis*. Similar result was also expressed by Sánchez-Gómez et al. [31] who studied the anti-

microbial and antibiofilm activities of synthetic cationic peptides and lipopeptides derived from human lactoferrin. They resulted that antimicrobial and antibiofilm activities of a compound should be separately evaluated.

Recently, it was concluded that boron compounds show their action by impairing protein synthesis and the activities of amino-acyl tRNA synthetase, β -lactamase and serine-protease enzymes in the microorganism [24,32-34]. Similar to De Seta et al. [22] who concluded that boric acid is fungistatic to fungicidal depending on concentration and temperature, potassium metaborate also inhibited the 90.18% of *C. albicans* biofilm formation. Boron is known to be the part of quorum sensing (QS) mechanism, which plays a vital role for microorganisms and is affected by increased boron concentrations [35,36]. Ceylan et al. [37] studied the anti-quorum sensing and cytotoxic properties of potassium metaborate. They reported that potassium metaborate can inhibit QS and QS-related virulence processes in pathogenic bacteria. This finding may open up a new approach to prevent antibiotic resistance. Benkovic et al. [20] demonstrated that borinic esters, a class of boron-containing compounds, have antibacterial activity and might be used to develop specific inhibitors against essential bacterial enzymes.

4. Conclusions

According to the obtained results, the biological activities that have been exhibited by potassium metaborate are considerable and are creating a new perspective to discover novel approaches for pharmaceutical industry. The findings of the activity tests indicate that potassium metaborate may be a good candidate for the development of new antimicrobial compound against pathogenic bacteria and can be effectively used for biomedical and environmental solutions. Based on the present study, further studies might be designed to figure out the biological activities of boron-containing compounds.

Acknowledgement

This study was presented at the "Symposium on Euroasian Biodiversity, May 23-26, 2016, Antalya, TURKEY" as an oral presentation titled "The Biological Activities of Potassium Metaborate; a Boron Compound Belong to the National Wealth of Mineral Diversity in Turkey".

References

- [1] Ciani, L. & Ristori, S. (2012). Boron as a platform for new drug design. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 7(11), 1017-1027.
- [2] Anovitz, L. M., & Grew, E. S. (1996). An introduction in mineralogy, petrology and geochemistry of boron. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 33(1), 1-40.

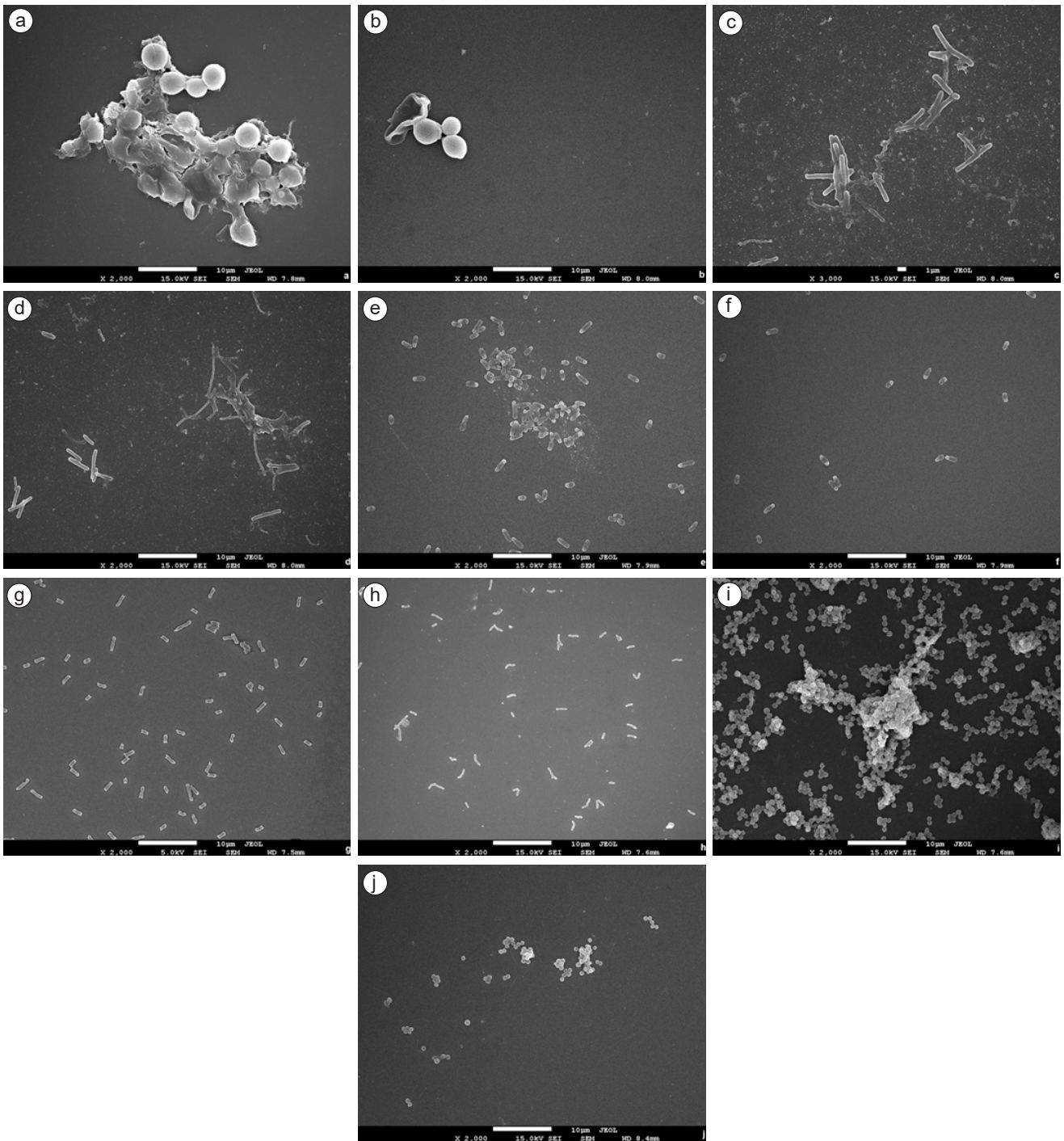


Figure 4. SEM images of the biofilm inhibition of potassium metaborate at MIC. a) *C. albicans* control group, b) *C. albicans* potassium metaborate-treated group; c) *B. subtilis* control group, d) *B. subtilis* potassium metaborate-treated group e) *E. coli* control group, f) *E. coli* potassium metaborate-treated group; g) *P. aeruginosa* control group, h) *P. aeruginosa* potassium metaborate-treated group; i) *S. aureus* control group, j) *S. aureus* potassium metaborate-treated group (Scale bar: 10µm).

[3] Shah, F. U., Glavatskih, S. & Antzutkin, O. N. (2013). Boron in tribology: From borates to ionic liquids, *Tribology Letters*, 51, 281-301.

[4] Nielsen, F. H. (1988). Boron-an overlooked element of potential nutritional importance, *Nutrition Today*, 23(1), 4-7.

[5] Devirian, T. A., & Volpe, S. L. (2003). The physiological effects of dietary boron, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(2), 219-231.

[6] Soriano-Ursúa, M. A. (2019). Chemico-biological activity and medicinal chemistry of boron-containing compounds. *Current Medicinal Chemistry*, 26(26), 5003-5004.

[7] Murray, F. J. (1998). A comparative review of the pharmacokinetics of boric acid in rodents and humans, *Biological Trace Element Research*, 66, 331-341.

[8] Ince, S., Kucukkurt, I., Demirel, H. H., Acaroz, D. A., Akbel, E., & Cigerci I. H. (2014). Protective effects of boron on cyclophosphamide induced lipid peroxidation and genotoxicity in rats, *Chemosphere*, 108, 197-204.

- [9] Yilmaz, M. T. (2012). Minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations of boron compounds against several bacterial strains, *Turkish Journal of Medical Sciences*, 42(Sup. 2), 1423-1429.
- [10] Türkez, H., Geyikoğlu, F., Tatar, A., Keleş, S., & Özkan, A. (2007). Effects of some boron compounds on peripheral human blood, *Zeitschrift für Naturforschung C*, 62(11-12), 889-896.
- [11] Yenmez, N. (2009). The importance of boron minerals in Turkey as a strategic mine. *Journal of Geography*, 0(19), 59-94..
- [12] Zhang, C. H., Yu, Y., Liang, Y. Z., & Chen, X. Q. (2015). Purification, partial characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Glycyrrhiza uralensis*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 681-686.
- [13] Rauter, A. P., Dias, C., Martins, A., Branco, I., Neng, N. R., Nogueira, J. M., & Waltho, J. P. (2012). Non-toxic *Salvia sclareoides* Brot. extracts as a source of functional food ingredients: Phenolic profile, antioxidant activity and prion binding properties, *Food Chemistry*, 132(4), 1930-1935.
- [14] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2006). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, *Sixteenth Informational Supplement. Document M100-S16*, Wayne, PA.
- [15] Walencka, E., Sadowska, B., Rozalska, S., Hryniewicz, W., & Rózalska, B. (2005). Lysostaphin as a potential therapeutic agent for staphylococcal biofilm eradication, *Polish Journal of Microbiology*, 54(3), 191-200.
- [16] Baygar, T., Ugur, A., Sarac, N., Balci, U., & Ergun, G. (2018). Functional denture soft liner with antimicrobial and antibiofilm properties, *Journal of Dental Sciences*, 13(3), 213-219.
- [17] Ince, S., Kucukkurt, I., Cigerci, I. H., Fidan, A. F., & Eryavuz, A. (2010). The effects of dietary boric acid and borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant activity, and DNA damage in rats, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 24(3), 161-164.
- [18] Ince, S., Keles, H., Erdogan, M., Hazman, O., & Kucukkurt, I. (2012). Protective effect of boric acid against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice, *Drug and Chemical Toxicology*, 35(3), 285-292.
- [19] Soares, M. M. S. R., & Cury, A. E. (2001). In vitro activity of antifungal and antiseptic agents against dermatophyte isolates from patients with tinea pedis, *Brazilian Journal of Microbiology*, 32(2), 130-134.
- [20] Benkovic, S. J., Baker, S. J., Alley, M. R. K., Woo, Y. H., Zhang, Y. K., Akama, T., & Shapiro, L. (2005). Identification of borinic esters as inhibitors of bacterial cell growth and bacterial methyltransferases, CcrM and MenH, *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(23), 7468-7476.
- [21] De Seta, F., Schmidt, M., Vu, B., Essmann, M., & Larsen, B. (2009). Antifungal mechanisms supporting boric acid therapy of *Candida* vaginitis, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(2), 325-336.
- [22] Sayın, Z., Ucan, U. S., & Sakmanoglu, A. (2016). Antibacterial and antibiofilm effects of boron on different bacteria, *Biological Trace Element Research*, 173(1), 241-246.
- [23] Argin, S., Gülerim, M., & Şahin, F. (2019). Development of antimicrobial gelatin films with boron derivatives, *Turkish Journal of Biology*, 43(1), 47-57.
- [24] Baker, J., Ding, Z. C., Zhang, Y. K., Hernandez, V., & Xia, Y. (2009). Therapeutic potential of boron-containing compounds, *Future Medicinal Chemistry*, 1(7), 1275-1288.
- [25] Barth, R. F., Coderre, J. A., Vicente, M. G. H., & Blue, T. E. (2005). Boron neutron capture therapy of cancer: Current status and future prospects, *Clinical Cancer Research*, 11(11), 3987-4002.
- [26] Henriksson, R., Capala, J., Michanek, A., Lindahl, S. A., Salford, L. G., Franzén, L., & Bergenheim, A. T. (2008). Boron neutron capture therapy (BNCT) for glioblastoma multiforme: A phase II study evaluating a prolonged high-dose of boronophenylalanine (BPA), *Radiotherapy and Oncology*, 88(2), 183-191.
- [27] Dembitsky, V. M., & Srebnik, M. (2003). Synthesis and biological activity of r-aminoboronic acids. amine-carboxyboranes and their derivatives, *Tetrahedron*, 59(5), 579-593.
- [28] Baldock, C., de Boer, G. J., Rafferty, J. B., Stuitje, A. R., & Rice, D. W. (1998). Mechanism of action of diazaborines, *Biochemical Pharmacology*, 55(10), 1541-1549.
- [29] Surolia, N., RamachandraRao, S. P., & Surolia, A. (2002). Paradigm shifts in malaria parasite biochemistry and anti-malarial chemotherapy, *Bioessays*, 24, 192-196.
- [30] Jabbour, A., Steinberg, D., Dembitsky, V. M., Mousaieff, A., Zaks, B., & Srebnik, M. (2004). Synthesis and evaluation of oxazaborolidines for antibacterial activity against *Streptococcus mutans*, *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(10), 2409-2410.
- [31] Sánchez-Gómez, S., Ferrer-Espada, R., Stewart, P. S., Pitts, B., Lohner, K., & de Tejada, G. M. (2015). Antimicrobial activity of synthetic cationic peptides and lipopeptides derived from human lactoferricin against *Pseudomonas aeruginosa* planktonic cultures and biofilms, *BMC Microbiology*, 15(1), 137.
- [32] Mah, T. F., & O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents, *Trends in Microbiology*, 9(1), 34-39.
- [33] Mansour, T. S., Bradford, P. A., & Venkatesan, A. M. (2008). Recent developments in β -lactamases and inhibitors, *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, 43, 247-267.
- [34] Hernandez, V., Crépin, T., Palencia, A., Cusack, S., Akama, T., Baker, S. J., ... & Plattner, J. J. (2013). Discovery of a novel class of boron-based antibacterials with activity against gram-negative bacteria, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(3), 1394-1403.
- [35] Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorsselaer, A.,

- & Pelczar, I. (2002). Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron, *Nature*, 415, 545-549.
- [36] Lowery, C. A., Salzameda, N. T., Sawada, D., Kaufmann, G. F., & Janda, K. D. (2010). Medicinal chemistry as a conduit for the modulation of quorum sensing, *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(21), 7467-7489.
- [37] Ceylan, Ö., Saraç, N., Uğur, A., & Baygar, T. (2019) Assessment of the anti-quorum sensing activity and cytotoxicity of potassium metaborate, *International Symposium on Boron* (p.1065), Türkiye.

Bor sitrat uygulanan ratların serum ve plazmalarında bor tayini

Ömer Faruk Koçak¹, Alptuğ Atıla^{2,*}, Zekai Halıcı³, Mevlüt Albayrak⁴

¹Atatürk Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Kimya ve Kimyasal İşleme Teknolojileri Bölümü, Erzurum, 25240, Türkiye

²Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, 25240, Türkiye

³Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Erzurum, 25240, Türkiye

⁴Atatürk Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Erzurum, 25240, Türkiye

MAKALE BİLGİSİ

Makale Geçmişi:

İlk gönderi 24 Şubat 2022

Kabul 3 Mayıs 2022

Online 30 Haziran 2022

Araştırma Makalesi

DOI: 10.30728/boron.1078402

Anahtar kelimeler:

Bor sitrat
ICP-MS
Plazma
Rat
Serum

ÖZET

Bor, hayvan ve insan biyolojisi için çok önemli olan dinamik bir eser elementtir. Bor sitrat, borun metabolizmaya alımındaki en yaygın formlardan biridir. Bu çalışmada oral olarak bor sitrat uygulanan ratların hem plazmalarında hem de serumlarında ICP-MS yöntemi ile bor miktarı tayin edilmiştir. Oral olarak 20 mg/kg bor sitrat uygulanan ratlardan farklı zamanlarda alınan serum ve plazma numunelerindeki bor konsantrasyonları tayin edilerek zamana göre değişim grafiği incelenmiştir. Bor sitrat uygulandıktan 0,25 saat sonra serum ve plazma bor seviyesinin maksimuma ulaştığı ve 6 saat sonra bor seviyesinin normal plazma ve serum seviyesine indiği görülmüştür. Bu çalışmanın bor analizleri ve borun farmakokinetik özellikleri açısından temel teşkil edeceğini düşünmekteyiz.

Boron determination in serum and plasma of rats administered boron citrate

ARTICLE INFO

Article History:

Received February 24, 2022

Accepted May 3, 2022

Available online June 30, 2022

Research Article

DOI: 10.30728/boron.1078402

Keywords:

Boron citrate
ICP-MS
Plasma
Rat
Serum

ABSTRACT

Boron is a dynamic trace element that is very important for animal and human biology. Boron citrate is one of the most common forms of boron uptake into metabolism. In this study, the amount of boron was determined by ICP-MS method in both plasma and serum of rats administered boron citrate orally. Boron concentrations in serum and plasma samples taken at different times from rats administered orally 20 mg/kg boron citrate were determined and the graph of change over time was examined. It was observed that the serum and plasma boron levels reached the maximum 0.25 hours after boron citrate was applied, and the boron level decreased to normal plasma and serum levels after 6 hours. We think that this study will form the basis for boron analysis and pharmacokinetic properties of boron.

1. Giriş (Introduction)

Bor, hayvan ve insan biyolojisi için çok önemli olan dinamik bir eser elementtir. Bor, esas olarak okyanuslarda ve topraklarda inorganik boratlar formunda bulunur ve kendiliğinden birleşen RNA molekülünün önemli bir bileşeni olan ribozu stabilize eder [1]. Borun fizyolojik miktarları, büyüme ve gelişme ile ilgili çeşitli maddelerin metabolizmasını ve tüketimini değiştirebilir [2]. Bu nedenle bor, genellikle deri, beyin, iskelet yapısı, sindirim ve bağışıklık sistemleri dahil olmak üzere çeşitli organları ve vücut sistemlerini etkiler. Bor, omurgalılar-

da benzersiz bağlanma ve yapısal özellikleri için gereklidir [3]. Hayvanlarda yapılan çalışmalarda, borun bu özelliğinin artrit, osteoporoz ve koroner kalp hastalığı gibi belirli koşulları hafifletmeye yardımcı olduğu belirtilmiştir [4,5]. Yapılan çalışmalar incelendiğinde, borun mineral ve steroid hormon metabolizmasını düzenlediği [6], kemik gelişimine katkıda bulunduğu [7-9], antioksidan etki gösterdiği [10], immün sistemi güçlendirdiği, enerji metabolizmasını düzenlediği [11], yara iyileşmesini hızlandırdığı [12], kanser riskini azalttığı [13], zihinsel performansı artırdığı [14], anemiyi

*Corresponding author: alptug@atauni.edu.tr

düzeltiltiği [15] ve kilo alımını azalttığı [16] görülmüştür.

Bor sitrat borun metabolizmaya alımında sodyum borat, bor glisinat ve bor aspartatla birlikte en yaygın formlarındandır. Bor bileşiklerinin hepsi vücuda girdikten sonra vücut sıvılarından pasif difüzyon ile absorbe edilen borik asite dönüşür [17]. Borik asit kendi kendine metabolizmaya dahil olamaz ancak idrardan değişime uğramadan elimine edilir. Aynı zamanda ter, safa ve solunum da borun elimine edilmesine yardımcı olmaktadır. İlave olarak alınan borun fazlasının kemiklerde depolandığı bilinmektedir [18]. Ayrıca kalsiyum, D vitamini ve magnezyum ile etkileşimi nedeniyle farklı organlar için faydalıdır. Bu nedenle boratlar, farklı diyet takviyeleri ve ilaçlarda endüstriyel ölçekte kullanılmaktadır [1,19,20]. Ancak yüksek dozda ki borun, farklı hayvanlarda ve insanlarda hücre hasarını ve toksisiteyi ortaya çıkardığı ve farklı hayvanlarla ilgili daha fazla çalışmanın optimum bor seviyesini belirlemek için gerekli olduğu bildirilmiştir [1].

Yapılan literatür araştırmalarında, organ ve dokularda [21], plazmada [22,23], serumda [24,25] ve idrarda [26,27] bor seviyesinin incelenmesi ile ilgili birkaç çalışmaya rastlanmıştır. Ancak, bu çalışmalarda vücudumuza borun alım formlarından biri olan bor sitrat uygulaması sonucu biyolojik materyallerde bor ölçümüne dayalı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Sonuç olarak; bu çalışmada oral olarak bor sitrat uygulanan ratların hem plazmalarında hem de serumlarında ICP-MS yöntemi ile bor miktarı tayin edilmiş ve oral olarak 20 mg/kg bor sitrat uygulanan ratlardan farklı zamanlarda alınan serum ve plazma numunelerindeki bor konsantrasyonları tayin edilerek zamana göre değişim grafiği incelenmiştir.

2. Malzemeler ve Yöntemler (Materials and Methods)

2.1. Reaktifler ve Kimyasallar (Reagents and Chemicals)

Hidrojen peroksit (%30), hidroklorik asit (%36,5-38,0) ve Nitrik asit (%69,0-70,0) Merck, Almanya'dan temin edilmiştir. Tüm standartları ve numuneleri hazırlamak için bir Millipore Direct-Q-UV su arıtıcısından elde edilen (Millipore) ultra saf su (25°C'de 18.2 MΩ.cm) kullanılmıştır. Argon plazma gazı ve helyum çarpışma gazının saflığı %99,999'dur.

2.2. Deney Hayvanları (Experiment Animals)

Bu çalışmada 200-210 g ağırlığında 60 adet Sprague-Dawley cinsi erkek rat kullanılmıştır. Deneyler, Deney Hayvanları Eğitim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu tarafından onaylanan etik normlara göre gerçekleştirilmiştir (No: 75296309-050.01.04-E.2000163505). Ratlar, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (ATADEM) temin edilmiştir. Doğal bir aydınlık ve karanlık döngüsü altında standart laboratuvar koşullarında tutulmuşlardır. Hayvanlara su

verildi ve normal bir diyetle beslenmişlerdir. Ratlar 10 gruba bölünüp (gruplar ratların kanlarının toplandığı saate göre belirlenmiştir, her bir grup 6 rattan oluşmaktadır, bir grup kontrol (0. saat) grubudur) oral olarak bor sitrat (20 mg/kg) içeren tablet verilmiştir. Ratların kanları 0; 0,25; 0,50; 0,75; 1; 3; 6; 12; 24 ve 48. saatte toplanmıştır. Serum eldesi için jel içeren tüplere, plazma eldesi için Etilendiamin tetraasetik asit'li (EDTA) tüplere aktarılmıştır. 3000 rpm'de 15 dk santrifüj yapıldıktan sonra üst fazlar ICP-MS sistemi ile analiz yapılmaya kadar -80°C'de saklanmıştır.

2.3. Numune Hazırlama (Sample Preparation)

Serum ve plazma örneklerinden 0,5 ml alınarak teflon kaplar içerisine aktarılmıştır. Üzerlerine 9 ml HNO₃ ve 1 ml H₂O₂ çözeltisi ilave edildikten sonra sistemi oluşturan kaplar ve segmentler kapatılarak mikrodalgaya yerleştirildi. 15 dakika 150°C T1 sıcaklığı, 15 dakika 190°C T2 sıcaklığa ayarlı sistemde bozundurma işlemi yapıldı (1800 MW). Bozundurma sonucunda 10 ml olan örnekler 5 ml ultra saf su ilave edilerek seyreltilti. Örnekler 0,45 µm filtre kullanılarak filtrelendi ve cihaza ikinci bir seyreltilme yapılmadan verilerek analiz yapıldı. Her bir analiz 3 farklı ölçümün ortalaması alınarak hesaplandı.

2.4. Enstrümantasyon (Instrumentation)

Çözeltide bulunan elementlerin konsantrasyonlarının belirlenmesinde "İndüktif Olarak Eşleştirilmiş Plazma-Kütle Spektrometresi (ICP-MS-Agilent 7800 serisi, Agilent Teknolojileri, Japonya)" kullanıldı. Analize başlamadan önce cihaza, helyum gazı ile 45 dakika süre ile arındırma işlemi yapıldı. Cihaz parametreleri ayarlandıktan sonra cihaz aktifleştirildi (Tablo 1). Daha sonra ayarlama solüsyonu (1µg/L Ce, Co, Li, Mg, Tl, Y) ile cihazın kalibrasyon işlemi gerçekleştirildi. Ayarlama işlemi sonucunda alınan değerler kontrol edilerek cihazda herhangi bir sapmanın olup olmadığı belirlendi. Otomatik örnekleyici ve boru sistemi %2'lik HNO₃ ve ultra saf suyla, sonda kısmı %1'lik HCl çözeltisi ile yıkanarak bir sonraki enjeksiyon için hazır hale getirildi.

Tablo 1. ICP-MS çalışma koşulları (ICP-MS operation conditions).

Parametreler	
Radyo frekans gücü (W)	1200
Örnek alım hızı (mL/dk)	0,40
Ar Plazma gazı akış hızı (L/dk)	15
Ar Yardımcı gaz akış hızı (L/dk)	1
Taşıyıcı gaz akış hızı (L/dk)	1
He akış hızı (mL/dk)	4,3
Düzenleme/seyreltme gazı (L/dk)	1
Nebulizatör pompa hızı (rps)	0,30
Taşıyıcı gaz basıncı (kPa)	1,45
Analiz edilen element	Bor

LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 1,398 ve 4,659 olarak belirlendi. Ölçümlerin hesaplanması için "Mass Hunter 4.2 Workstation Software 7800 ICP-MS Top C.01.02" yazılımı kullanıldı.

3. Sonuçlar ve Tartışma (Results and Discussion)

Bu çalışmada bor sitrat uygulanan ratların hem serumlarında hem de plazmalarında ayrı ayrı bor seviyesi ölçülmüştür. Çalışmada kontrol grubu olarak bor sitrat verilmeyen ratlar kullanılmıştır. Canlılar esansiyel olarak farklı ortamlardan bor aldıkları için serumlarında ve plazmalarında bor tespit edilmiştir (serum, plazma: 97,68 ppb, 187,32 ppb). 0,25; 0,50; 0,75; 1; 3; 6; 12; 24 ve 48. saatte toplanan kanlardan elde edilen hem serumda hem de plazma bor elementine ait miktarlar ppb olarak aşağıdaki tabloda sunulmuştur (Tablo 2).

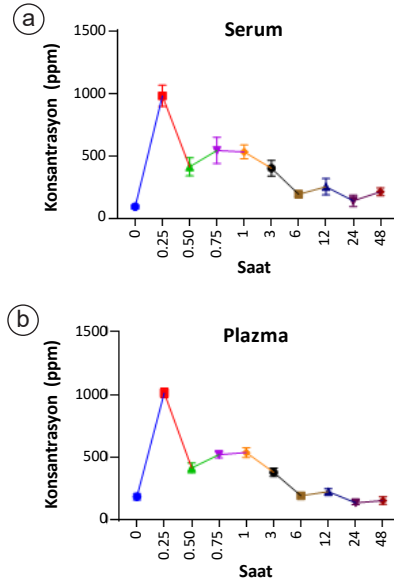
Tablo 2. Bor sitrat uygulanan ratların serum ve plazmalarında borun farmakokinetik dağılımı. (Pharmacokinetic distribution of boron in serum and plasma of rats administered boron citrate).

Saat	Serum (ppm)	Plazma (ppm)
0	97,68 ± 16,73	187,32 ± 25,09
0,25	980,52 ± 85,11	1012,53 ± 38,57
0,50	415,09 ± 71,83	415,94 ± 38,60
0,75	546,11 ± 104,25	521,81 ± 25,92
1	534,91 ± 54,89	537,97 ± 38,64
3	404,36 ± 61,87	381,08 ± 32,85
6	197,12 ± 20,08	193,89 ± 10,21
12	257,42 ± 65,05	227,34 ± 22,07
24	144,69 ± 44,70	138,34 ± 14,12
48	216,54 ± 31,46	155,49 ± 30,07

Burada görüldüğü gibi bor sitrat uygulandıktan sonra 0,25. saatte bor serum ve plazma seviyesi pik yapmış vücuttan atılımı ile zamana bağlı olarak düşmüştür. 6. saatten sonra bor seviyesi kontrol grubunun seviyesine yaklaşmıştır (Şekil 1).

Boron kalsiyum, D vitamini ve bazı minerallerin düzenlenmesinde büyük önemi vardır. Ca ve Mg kayıplarını azaltarak bağ yapısını korur. İn vitro, hayvan ve insan deneyleri, borun belirli konsantrasyonlarda biyoaktif ve faydalı olabilen bir element olduğunu göstermiştir [4,10]. Ancak yüksek dozda ki borun, farklı hayvanlarda ve insanlarda hücre hasarını ve toksisiteyi ortaya çıkardığı ve farklı hayvanlarla ilgili daha fazla çalışmanın optimum bor seviyesini belirlemek için gerekli olduğu bildirilmiştir [1]. Borun bildirilen faydalı etkileri arasında merkezi sinir sistemi fonksiyonunu ve bağışıklık tepkisini güçlendirmek, artritli semptomları ve iltihabı hafifletmek, oksidatif stresi modüle etmek ve hormon hareketini kolaylaştırmak yer alır. Dahası, kemik büyümesi ve bakımı ile ilişkilidir [28]. Borun sağlık üzerindeki olumlu etkilerinin yanı sıra, vücut sıvılarında artan bor düzeylerinin olumsuz etkilere sahip olabileceği de

belirtilmiştir. Bor, düşük akut toksisite sergiler. Bununla birlikte, tekrarlanan doz çalışmaları, borun hem doğurganlığı hem de gelişimi bozabileceğini göstermiştir; erkek üreme sistemi, sıçan, fare ve köpek gibi bazı hayvan türlerinde toksik etkileri nedeniyle hedef olarak tanımlanmıştır. Bor, Avrupa Kimyasallar Ajansı tarafından üreme için toksik olarak kabul edilmiştir [29]. Bu durum alınan bor miktarı ile serum ve plazma bor konsantrasyonlarının nasıl değiştiğini ortaya koymanın zorunluluğunu göstermektedir.



Şekil 1. Ratların plazma ve serumlarındaki bor konsantrasyonlarının zamana göre değişimi (Time variation of boron concentrations in plasma and serum of rats).

Boron sağlığa olan birçok faydasından dolayı gıda takviyesi olarak alımı oldukça artmıştır. Amerika Gıda Takviyesi Veri Tabanı'na (The Dietary Supplement Label Database) göre; sodyum borat, kalsiyum fruktoborat, bor glisinat şelatları, bor aspartat, bor askorbat ve bor sitrat içeren iki binden fazla farklı gıda takviyesi bulunmaktadır [11].

Bor takviyesi sonrası plazma veya serumda borun farmakokinetik dağılımı ile ilgili birkaç çalışma mevcuttur. Green ve ark. [22] yaptıkları çalışmada erkek vücut geliştiricilerde bor takviyesinin etkisini araştırmışlardır. On erkek vücut geliştiriciye 2,5 mg bor takviyesi, dokuz erkek vücut geliştiriciye 7 hafta boyunca plasebo verilerek incelenmiştir. Bor takviyesi alan on denekten altısının plazma borunda artış olduğunu bulmuşlardır. Bir diğer çalışmada Kan Usuda ve ark. [30] ise oral olarak sodyum tetraborat verilen sıçanların serum ve idrarlarında zamana göre bor dağılımını incelemiştir. Çalışma sonucunda serumda ki maksimum bor miktarına 1,76 saatte ulaşıldığını bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda ise bor sitrat uygulaması sonucu serumdaki maksimum seviyeye 0,25 saatte ulaşıldığı bulunmuştur. Bu durum bor sitratın, sodyum tetraborata göre oral yoldan alındığında kana daha çabuk geçtiğini göstermektedir. Lee ve ark. [31] doğurganlık, testis

ve epididimal histoloji; testis ve prostatik enzimlerin spesifik aktiviteleri; FSH, LH ve testosteronun plazma konsantrasyonları ile plazma ve testislerin bor içeriği değerlendirilmesi için ratlar 30 ile 60 gün boyunca standart laboratuvar yemine boraks olarak ilave edilen 500, 1000 ve 2000 ppm bor ile beslenmişlerdir. Çalışma sonucunda testis konsantrasyonunun plazmayı aştığı, bunu da tedavi edilen sıçanların testislerinde bor birikiminin hem doz hem de maruziyet süresi ile arttığı bulunmuştur. Bu durum bor uygulamalarında ki doz çalışmalarının önemini göstermektedir. Borun hamilelikle ilişkisi üzerine yapılan bir çalışmada [32] hamile olmayan ve hamile (16. gebelik günü) sıçanlara tek doz 30 mg/kg borik asit sonda ile verilmiş ve 2-3 saat aralıklarla plazma örnekleri alınmıştır. Borun plazma yarı ömrü gebe olmayan ve gebe sıçanlarda sırasıyla $2,9 \pm 0,2$ ve $3,2 \pm 0,3$ saat olarak bulunmuştur. Ayrıca çalışmada hamileliğin borun yarılanma ömrüne etkisi olmadığı belirtilmiştir. Nielsen ve ark. [33] menopoz başlangıcındaki 43 kadına 60 gün boyunca 2,5 mg bor içeren sodyum borat kapsüllerini vermiştir ve bor takviyesi alan kadınların plazmalarında ki bor miktarının önemli derecede arttırdığı sonucuna varmışlardır. Görüldüğü gibi bor takviyesi sonrası plazma veya serumda borun farmakokinetik dağılımı ile ilgili çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Bor mineralinin fazla veya eksik tüketimiyle birlikte insan vücudunda birçok anormallik görülmektedir. Bor kalsiyum metabolizması, kemikler ve bağışıklık sistemi başta olmak üzere beyin gelişimi, hormonal sistem ve gastrointestinal sistemi etkilemektedir. Yetersiz bor alımının kemik sağlığının bozulmasına, osteoporoz riskinin artmasına, beyin fonksiyonlarında bozulmalara ve bağışık cevabının zayıflamasına neden olduğu bilinmektedir [34]. Bu durum borun takviye olarak oral yoldan kullanılabilmesinin önemini göstermektedir. Yaptığımız araştırmalarda, vücudumuza borun alım formlarından biri olan bor sitrat uygulaması sonrası biyolojik materyallerde bor ölçümü ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ayrıca, hem serum hem de plazmada eş zamanlı olarak bor tayininin yapılabilmesi yönünden de çalışmamızın üstün yönleri görülmektedir.

4. Sonuçlar (Conclusions)

Sonuç olarak bu çalışmada oral yoldan bor sitrat uygulanan ratların serum ve plazmalarında bor seviyelerini ICP-MS yöntemi ile ölçüldü. Ayrıca bor sitrat uygulanan ratların serum ve plazmalarındaki bor konsantrasyonlarının zamana göre değişimi incelendi. Bor sitrat uygulandıktan sonra 0,25. saatte serum ve plazma bor seviyesinin maksimuma ulaştığı, 6. saatte sonra bor seviyesinin normal plazma ve serum seviyesine indiği görülmüştür. Çalışmamızın bor temelli olarak üretilecek farmasötik formülasyonların (kapsül, pediatrik şurup, bor temelli dermatolojik krem vb.) canlı sistemlere uygulandıktan sonra biyolojik materyallerde bor analizi ve farmakokinetik çalışmalar açısından temel teşkil edeceğini düşünmekteyiz.

Kaynaklar (References)

- [1] Khaliq, H., Juming, Z., & Ke-Mei, P. (2018) The physiological role of boron on health. *Biological Trace Element Research*, 186(1), 31-51.
- [2] Kot, F.S. (2009) Boron sources, speciation and its potential impact on health. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 8(1), 3-28.
- [3] Briggs, M. (2000). Boron oxides, boric acid, and borates. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 4, 241-294.
- [4] Mogoşanu, G. D., Biţă, A., Bejenaru, L. E., Bejenaru, C., Croitoru, O., Rău, G., ... & Scorei, R. I. (2016). Calcium fructoborate for bone and cardiovascular health. *Biological Trace Element Research*, 172(2), 277-281.
- [5] Armstrong, T. A., Spears, J. W., Crenshaw, T. D., & Nielsen, F. H. (2000). Boron supplementation of a semi-purified diet for weanling pigs improves feed efficiency and bone strength characteristics and alters plasma lipid metabolites. *The Journal of Nutrition*, 130(10), 2575-2581.
- [6] Pizzorno, L. (2015). Nothing boring about boron. *Integrative Medicine: A Clinician's Journal*, 14(4), 35.
- [7] Toker, H., Ozdemir, H., Yuce, H. B., & Goze, F. (2016). The effect of boron on alveolar bone loss in osteoporotic rats. *Journal of Dental Sciences*, 11(3), 331-337.
- [8] Hakki, S. S., Malkoc, S., Dunder, N., Kayis, S. A., Hakki, E. E., Hamurcu, M., ... & Götz, W. (2015). Dietary boron does not affect tooth strength, micro-hardness, and density, but affects tooth mineral composition and alveolar bone mineral density in rabbits fed a high-energy diet. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 29, 208-215.
- [9] Hakki, S. S., Bozkurt, B. S., & Hakki, E. E. (2010). Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1). *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 24(4), 243-250.
- [10] Coban, F. K., Ince, S., Kucukurt, I., Demirel, H. H., & Hazman, O. (2015). Boron attenuates malathion-induced oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 38(4), 391-399.
- [11] Kuru, R., & Yarat, A. (2017). Bor ve sagligimize olan etkilerine guncel bir bakis [Boron and a current overview of its effects on health]. *Clinical and Experimental Health Sciences*, 7(3), 107-115.
- [12] Demirci, S., Doğan, A., Karakuş, E., Halıcı, Z., Topçu, A., Demirci, E., & Sahin, F. (2015). Boron and poloxamer (F68 and F127) containing hydrogel formulation for burn wound healing. *Biological Trace Element Research*, 168(1), 169-180.
- [13] Nielsen, F. H. (2014). Update on human health effects of boron. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 28(4), 383-387.
- [14] Penland, J. G. (1994). Dietary boron, brain function, and cognitive performance. *Environmental Health Perspectives*, 102(suppl 7), 65-72.
- [15] Nielsen, F. H., Mullen, L. M., & Nielsen, E. J. (1991).

- Dietary boron affects blood cell counts and hemoglobin concentrations in humans. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 4, 211-223.
- [16] Aysan, E., Sahin, F., Telci, D., Erdem, M., Muslumanoğlu, M., Yardımcı, E., & Bektaşoğlu, H. (2013). Mechanism of body weight reducing effect of oral boric acid intake. *International Journal of Endocrinology*, 2013, 1-5.
- [17] Murray, F. J. (1998). A comparative review of the pharmacokinetics of boric acid in rodents and humans. *Biological Trace Element Research*, 66(1), 331-341.
- [18] Kelly, G. S. (1997). Boron: A review of its nutritional interactions and therapeutic uses. *Alternative Medicine Review*, 2(1), 48-56.
- [19] Volpe, S. L., Taper, L. J., & Meacham, S. (1993). The relationship between boron and magnesium status and bone mineral density in the human: A review. *Magnesium Research*, 6(3), 291-296.
- [20] Ghanizadeh, G., Babaei, M., Naghii, M. R., Mofid, M., Torkaman, G., & Hedayati, M. (2014). The effect of supplementation of calcium, vitamin D, boron, and increased fluoride intake on bone mechanical properties and metabolic hormones in rat. *Toxicology and Industrial Health*, 30(3), 211-217.
- [21] Tsygankova, A. R., Kanygin, V. V., Kasatova, A. I., Zav'yalov, E. L., Gusel'nikova, T. Y., Kichigin, A. I., & Mukhamadiyarov, R. A. (2020). Determination of boron by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy. Biodistribution of ¹⁰B in tumor-bearing mice. *Russian Chemical Bulletin*, 69(3), 601-607.
- [22] Green, N. R., & Ferrando, A. A. (1994). Plasma boron and the effects of boron supplementation in males. *Environmental Health Perspectives*, 102(suppl 7), 73-77.
- [23] Ferrando, A. A., Green, N. R., Barnes, K. W., & Woodward, B. (1993). Microwave digestion preparation and ICP determination of boron in human plasma. *Biological Trace Element Research*, 37(1), 17-25.
- [24] Atila, A., Halici, Z., Cadirci, E., Karakus, E., Palabiyik, S. S., Ay, N., ... & Yilmaz, S. (2016). Study of the boron levels in serum after implantation of different ratios nano-hexagonal boron nitride-hydroxy apatite in rat femurs. *Materials Science and Engineering: C*, 58, 1082-1089.
- [25] Mahmood, N. M. A., Barawi, O. R., & Hussain, S. A. (2016). Relationship between serum concentrations of boron and inflammatory markers, disease duration, and severity of patients with knee osteoarthritis in Sulaimani city. *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*, 6(1), 27-31.
- [26] Korkmaz, M., Şaylı, U., Şaylı, B. S., Bakırdere, S., Titretir, S., Ataman, O. Y., & Keskin, S. (2007). Estimation of human daily boron exposure in a boron-rich area. *British Journal of Nutrition*, 98(3), 571-575.
- [27] Sun, D. H., Ma, R. L., McLeod, C. W., Wang, X. R., & Cox, A. G. (2000). Determination of boron in serum, plasma and urine by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Use of mannitol-ammonia as diluent and for eliminating memory effect. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 15(3), 257-261.
- [28] Nielsen, F. H., & Meacham, S. L. (2011). Growing evidence for human health benefits of boron. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 16(3), 169-180.
- [29] Demircan, B., & Veliöğlü, Y. S. (2020). Toxicological evaluation of boron compounds taken from food and environment. *Akademik Gıda*, 18(3), 312-322.
- [30] Usuda, K., Kono, K., Orita, Y., Dote, T., Iguchi, K., Nishimura, H., ... & Shirai, Y. (1998). Serum and urinary boron levels in rats after single administration of sodium tetraborate. *Archives of Toxicology*, 72(8), 468-474.
- [31] Lee, I. P., Sherins, R. J., & Dixon, R. L. (1978). Evidence for induction of germinal aplasia in male rats by environmental exposure to boron. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 45(2), 577-590.
- [32] Vaziri, N. D., Oveisi, F., Culver, B. D., Pahl, M. V., Andersen, M. E., Strong, P. L., & Murray, F. J. (2001). The effect of pregnancy on renal clearance of boron in rats given boric acid orally. *Toxicological Sciences*, 60(2), 257-263.
- [33] Nielsen, F. H., & Penland, J. G. (1999). Boron supplementation of peri-menopausal women affects boron metabolism and indices associated with macromineral metabolism, hormonal status and immune function. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 12(3), 251-261.
- [34] Eseceli, H., Aydın, T., & Gönen, B. (2018). The effect of boron on human health and nutrition. *Suleyman Demirel University The Journal of Health Science*, 9(2), 119-122.

YAZAR KILAVUZU

1. KAPSAM

Bor Dergisi, bor alanında aşağıda nitelikleri açıklanmış makaleleri Türkçe ve İngilizce olarak kabul etmektedir.

Araştırma Makalesi: Orijinal bir araştırmayı bulgu ve sonuçlarıyla yansıtan yazılardır. Çalışmanın özgün ve mutlaka uluslararası bilime katkısı olmalıdır.

Tarama Makalesi: Yeterli sayıda bilimsel makaleyi tarayıp, konuyu bugünkü bilgi ve teknoloji düzeyinde özetleyen, değerlendirme yapan ve bulguları karşılaştırarak yorumlayan yazılardır.

Her makale, konusu ile ilgili en az iki hakeme gönderilerek şekil, içerik, özgün değer, uluslararası literatüre ve bilime/teknolojiye katkı bakımından incelenir. Hakem görüşlerinde belirtilen eksikler tamamlandıktan sonra, dergide yayınlanabilecek nitelikteki yazılar, son baskı formatına getirilir ve yazarlardan makalenin son halinin onayı alınır. Dergide basıldığı haliyle makale içinde bulunabilecek hataların sorumluluğu yazarlara aittir.

Kabul edilen makaleler, ücretsiz olarak dergi internet sayfasında (online) ve/veya basılı şekilde yayınlanmaktadır.

2. BAŞVURU FORMLARI

Makale; Kapak Sayfası, Makale Kontrol Listesi Formu, Makale Metni, Telif Hakkı Devir Formu ve Benzerlik Oran Dosyası olmak üzere beş ayrı formdan oluşmalıdır. Başvurular da iletişimde bulunulacak yazar ve diğer yazarların iletişim bilgileri (adres, e-posta, cep ve sabit telefon no) kapak sayfasında verilmelidir.

3. GÖNDERİ KONTROL LİSTESİ

Başvuru sürecinde yazarlar gönderilerinin aşağıdaki listede bulunan tüm maddelere uygunluğunu kontrol etmelidirler, bu rehbere uymayan başvurular değerlendirmeye alınmayacaktır.

1. Gönderilecek makale daha önceden yayınlanmadı ve/veya yayımlanmak üzere herhangi bir dergiye sunulmadı.
2. Makale Microsoft Office Word 2010 ve üzeri bir kelime işlemci ile hazırlandı.
3. Makale A4 sayfasında, kenar boşlukları, üstbilgi ve altbilgi boşlukları ve satır aralığı dergi formatına uygun olarak ayarlandı.

4. Ana başlıklar ve alt başlıklar İngilizceleriyle birlikte dergi formatına uygun olarak düzenlendi.
5. Tablolar dergi formatına uygun olarak hazırlandı, metin içerisinde bahsedildi, makalenin metin bölümüne yerleştirildi.
6. Şekiller dergi formatına uygun olarak hazırlandı, metin içerisinde bahsedildi, makalenin metin bölümüne yerleştirildi.
7. Eşitlik ve Reaksiyon numaralandırmaları sıralı olarak dergi formatına uygun olarak verildi.
8. Orijinal şekiller bütünüyle yazım kurallarına uygun hazırlandı.
9. Şekil boyutları formata uygun olacak biçimde düzenlendi.
10. Metin içinde şekiller ardışık numaralandı.
11. Kaynaklar yazım kurallarına uygun yazıldı.
12. Kaynaklar metin içinde ardışık sıralandı.
13. Kaynaklar metin sonunda, metin içinde verildiği sırada listelendi.
14. Türkçe makale başlığı/Özet/Anahtar kelimeler/Bölüm başlıkları/Tablo ve Şekil adlandırmaları ile İngilizce makale başlığı/Özet/Anahtar kelimeler/Bölüm başlıkları/Tablo ve Şekil adlandırmalarının birbirleri aynı olduğu kontrol edildi.
15. "Kapak Sayfası" oluşturuldu.
16. Telif Hakkı Devir Formu imzalandı ve gönderildi.
17. Muhtemel yazım hataları kelime işlemcinin "Yazım ve Dilbilgisi" denetimi ile kontrol edildi.
18. "Editöre Not" alanına makalenin özgün yönü ve makalenin bilime somut katkısı yazıldı.

4. TELİF HAKLARI

Makalelerin telif hakkı devri, dergi internet sayfasında sunulan Telif Hakkı Devir Formu doldurulup imzalanmak suretiyle alınır. Form imzalandıktan sonra "ek dosyaları yükle" bölümünde PDF olarak yüklenmelidir. Bu formu göndermeyen yazarların makaleleri basılamaz.

5. GİZLİLİK BEYANI

Bu dergi sitesindeki isimler ve elektronik posta adresleri bu derginin belirtilen amaçları doğrultusunda kullanılacaktır ve diğer amaçlar veya başka bir bölüm için kullanılmayacaktır.

YAZIM KURALLARI

GENEL BİLGİ

Makale; Kapak Sayfası, Makale Kontrol Listesi Formu, Makale Metni, Telif Hakkı Devir Formu ve Benzerlik Oran Dosyası olmak üzere beş ayrı formdan oluşmalıdır. Başvurularında iletişimde bulunulacak yazar ve diğer yazarların iletişim bilgileri (adres, e-posta, cep ve sabit telefon no) kapak sayfasında verilmelidir.

KAPAK SAYFASI

Başvuru esnasında yazar isimleri ayrı bir dosya olarak yüklenen Kapak Sayfası hazırlanmalı ve online olarak dergimizin internet sayfasına ayrı bir dosya olarak yüklenmelidir. İlk başvuru esnasında yazarları sadece dergi editörlerimiz görebilecektir.

Makalenin başlığının ilk harfi büyük ve diğerleri küçük harflerle sayfaya ortalı olarak yazılmalıdır. Başlık metne uygun, kısa ve açık olmalıdır. Başlığın altına, makalenin yazar ya da yazarlarının adı, soyadı, e-posta adresleri, posta adresleri, posta kodu ve ORCID numaraları yazılmalıdır.

İngilizce makale başlığı: Makaleyi kapsayıcı ve anlaşılır bir başlık kullanılmalıdır. Başlık büyük harfle başlamalı ve diğer tüm harfleri küçük yazı karakterinde yazılmalıdır. Başlık, gerektiğinde standart kısaltmalarla birlikte en çok 15 kelimedenden oluşmalıdır.

Türkçe makale başlığı: İngilizce makale başlığıyla uyumlu olmalıdır.

Yazar adları ve adres bilgileri: Yazar adlarının ve soyadlarının ilk harfleri büyük diğer tüm harfleri küçük olacak şekilde yazılmalıdır. Çalışmanın yürütülmüş olduğu yer yazar isimlerinden sonra gelmelidir. Yazarı ve çalışmanın yürütüldüğü yeri ilişkilendirebilmek amacıyla yazarın soyadından sonra ve çalışmanın yürütülmüş olduğu yerden önce üstsimge (1, 2, 3 vb.) ile numaralandırılmalıdır. Sorumlu yazar, soyadından sonra " * " simgesi ile belirtilmelidir. Adres bilgileri içerisinde çalışmanın yürütüldüğü yer, şehir, posta kodu ve ülke adı yer almalıdır. Adres bilgilerinden sonraki satıra her bir yazarın e-posta adresi yazar isimlerinin sırasına uygun olarak verilmelidir.

Özet: Ana metne atfı yapmadan makalenin konusu anlaşılır bir şekilde özetlemelidir. Özet 220 kelimeyi geçmemelidir. Standart olmayan kısaltmalar ilk kullanıldığında tam olarak yazılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Özette hemen sonra gelmelidir. En fazla 5 anahtar kelime, harf sırasıyla verilmelidir. Anahtar Kelimeler konuyu açıklayıcı kelimelerden seçilmelidir. Her bir anahtar kelime ", " ile ayrılmalıdır. Anahtar kelimeler cümle içermemelidir.

Abstract: Özette verilen metnin İngilizceye çevrilmesiyle oluşturulmalıdır. Ondalık sayılar kullanılıyorsa bu sayıların Türkçe Özette " , " İngilizce özetinde " . " olmasına dikkat edilmelidir.

Key Words: İngilizce özette sonra verilmelidir. Türkçe anahtar kelimelerle uyumlu olmalıdır. Konu ile ilgili en çok 5 anahtar kelime alfabetik olarak yazılmalıdır.

MAKALE KONTROL LİSTESİ FORMU

Makalenin metin bölümünün dergi yazım kurallarına uygunluğunun kabul edildiğini gösteren formdur. Başvurular yapılmadan önce Makale Kontrol Formunun doldurulması gerekmektedir. Kontrol formu makalenin ilk sayfası olarak verilmelidir. Dergi formatına uygun olmayan veya kontrol listesi doldurulmamış olan başvuru değerlendirilmeye alınmayacaktır.

MAKALE METNİ

Makale Kontrol Listesi Formundan hemen sonra Makale Metni başlamalıdır. Makaleler aşağıda verilen detaylar göz önünde alınarak hazırlanmalıdır.

- Makalenin metin bölümü Times New Roman 12 punto Yazı Tipi karakterinde, Microsoft Office Word 2010 ve üzeri bir kelime işlemci ile hazırlanması ve Microsoft Office Word'un Yazım ve Dilbilgisi bölümünden yazım hatalarının kontrol edilmesi ve düzeltilmesi gerekmektedir.
- Makale tek sütun halinde mümkün olduğunca yalın olarak, 2,5 cm kenar boşlukları kullanılarak A4 sayfasında oluşturulmalıdır.
- Makale düzenlenirken sayfa düzeninin değiştirilmemesi gerekmektedir.
- Satır aralıkları 1,5 olarak ayarlanmalı ve paragraflar arasında bir satır boşluk bırakılmalıdır. Paragraflar öncesi veya sonrasında otomatik aralık bırakılmamalıdır.
- Sayfa geçişlerinde bölüm sonları eklenmemeli ve tüm Makale tek bir bölümden oluşmalıdır.
- Tüm başlıkların yanında İngilizce karşılıkları parantez içerisinde yazılmalıdır.
- Makale metni referanslar dahil araştırma makaleleri için 14.000 kelimeyi tarama makaleleri için ise 22.000 kelimeyi geçmemelidir.
- Tablolar ve Şekiller Dergimizin istemiş olduğu formata uygun olarak hazırlanmalıdır.
- Makale metni, ana başlıklarla bölümlere ayrılmalı ve her bölüm başlığı numaralandırılmalıdır. Numaralandırma işlemleri ana bölümler için 1.'den başlamalı ve tüm ana başlıklar (Özet, Teşekkür, Kaynaklar ve Ekler bölümleri hariç) için devam etmelidir. İkincil başlıklar ana bölüm numaralandırılmasına uygun olarak 1.1., 1.2., 1.3., ... şeklinde devam etmelidir. Üçüncü başlıklar ikinci başlıklara uygun olarak 1.1.1., 1.1.2., 1.1.3., ... şeklinde devam etmelidir.

Örnek bir makale formatı aşağıda verilmiştir:

Kapak sayfası

1. Giriş (Introduction)
2. Malzemeler ve Yöntemler (Materials and Methods)
3. Sonuçlar ve Tartışma (Results and Discussion)
4. Sonuçlar (Conclusions)
5. Simgeler (Symbols)
- Teşekkür (Acknowledgment)
- Kaynaklar (References)
- Ekler (Appendices)

1. Giriş (Introduction)

Detaylı bir literatür özeti, çalışmanın amacını ve kurulmuş olan hipotezi içermelidir. Kaynaklar toplu olarak ve aralıklı verilmemelidir (örnek [1-5] veya [1, 2, 3, 5, 8]), her kaynağın çalışmaya katkısı irdelenmeli ve metin içerisinde belirtilmelidir.

2. Malzemeler ve Yöntemler (Materials and Methods)

Yürütülmüş olan çalışma deneysel bir çalışma ise deney prosedürü/metodu anlaşılır bir şekilde açıklanmalıdır. Teorik bir çalışma yürütülmüşse teorik metodu detaylı bir şekilde verilmelidir. Yapılan çalışmada kullanılan metod daha önce yayınlanmış bir metod ise diğer çalışmaya atıf yapılarak bu çalışmanın diğer çalışmadan farklı belirtmelidir.

3. Sonuçlar ve Tartışma (Results and Discussion)

Elde edilen veriler açık ve öz bir şekilde verilmelidir. Elde edilen tüm veriler literatür ile karşılaştırılmalıdır.

4. Sonuçlar (Conclusions)

Elde edilen veriler açık ve öz bir şekilde verilmelidir. Elde edilen tüm veriler literatür ile karşılaştırılmalıdır.

5. Simgeler (Symbols)

Makalede kullanılan imgeler açıklamalarıyla birlikte alfabetik sıraya uygun olarak düzenli bir şekilde verilmelidir. Kullanılan diğer imgeler alfabetik sıralamadan sonra gelebilir. Gerektiğinde "Yunan Harfleri", "Alt İndis" gibi alt başlıklar kullanılabilir.

Teşekkür (Acknowledgment)

Makalenin sonunda ve kaynaklar bölümünden önce verilir.

Kaynaklar (References)

- Basılmış kaynakların DOI ve ISBN numarası belirtilmelidir.
- İnternet sitesi adresleri (URL) kaynak olarak verilmemelidir. Ancak metin içerisinde verinin geçtiği yerde veriden sonra belirtilebilir.
- Kaynaklar listesi metin içerisinde kullanılmaya sırasına uygun olarak numaralandırılmalıdır.
- Kaynaklar, "APA Publication Manual, Seventh Edition" kurallarına uygun olarak hazırlanmalıdır.
- Kaynaklar İngilizce olarak hazırlanmalıdır. Türkçe kaynakların İngilizce karşılıkları köşeli parantez içerisinde belirtilmelidir.

Kaynaklar için örneklere <https://apastyle.apa.org/style-grammar-guidelines/references/examples> adresinden ulaşılabilir.

Kaynaklar için örnekler aşağıda verilmiştir:

- **Kaynak bir makale ise:** Yazarın soyadı, Adının baş harfi. (Yıl). Makalenin tam başlığı. *Derginin Tam Adı, Cilt no* (Sayı no), makalenin başlangıç ve bitiş sayfa no.

Uysal, İ., Yılmaz, B., & Evis, Z. (2020). Boron doped hydroxyapatites in biomedical applications. *Journal of Boron*, 5(4), 192-201.

- **Kaynak yazarı verilen bir kitap ise:** Yazarın soyadı, Adının baş harfi. (Yıl). *Kitabın Adı*. (cilt no, varsa editörü). Yayınevinin adı. ISBN veya DOI numarası.

Yünlü, K. (2019). *Bor: Bileşikleri, Sentez Yöntemleri, Özellikleri, Uygulamaları*. [Boron: Its Compounds, Synthesis Methods, Properties and Applications] (2nd Ed.). Aydilli Advertising Agency. ISBN 978-605-5310-93-6.

- **Kaynak editörü verilen bir kitap ise:** Editörün soyadı, Adının baş harfi (Eds.). (Yıl). *Kitabın Adı*. (cilt no). Yayınevinin adı. ISBN veya DOI numarası.

Korkmaz, M. (Eds.). (2020). *Bor ve İnsan Sağlığı [Boron and Human Health]*. Kuban Printing and Publishing. ISBN 978-605-9516-69-3.

- **Kaynak kitaptan bir bölüm ise:** Bölüm yazarının soyadı, Adının baş harfi. (Yıl). *Kitabın Adı*. In bölüm editörünün Soyadı, Adının baş harfi (Eds.), *Bölümün Adı* (Varsa cilt no, alıntılanan sayfalar). Yayınevinin adı.

Hakkı, S., & Nielsen, F. N. (2020). Boron and Human Health., Anti-Inflammatory and Anti-Microbial Potentials of Boron in *Medicine and Dentistry* (pp. 67-82). Nobel Academical Publishing, Education, Consultancy Ltd.

- **Kaynak basılmış tez ise:** Yazarın soyadı, Adının baş harfi. (Yıl). *Tez Başlığı* [Tezin kategorisi, Üniversite]. Tezin kayıtlı olduğu arşiv. Varsa tezin bağlantısı.

Akbaba, S. (2018). *Biopolymer modified polypropylene mesh for hernia treatment* [M. Sc. thesis, Middle East Technical University]. Council of Higher Education Thesis Center (Thesis Number 527833).

- **Kaynak kongreden alınmış bir tebliğ ise:** Yazarın soyadı, Adının baş harfi. (Yıl). Tebliğin adı. *Kongrenin Adı*, Yapıldığı yer, Tebliğin başlangıç ve bitiş sayfa no.

Akbaba, S., Atila, D., Tezcaner, T., & Tezcaner A. (2018). BIOMED2018-TR 23. *Biyomedikal Bilim ve Teknoloji Sempozyumu [BIOMED2018-TR 23rd Biomedical Science and Technology Symposium]*, Turkey, p. 43.

Ekler (Appendices)

Makaledeki ekler EK A (Appendix A), EK B (Appendix B) ve EK C (Appendix C) vb. olarak adlandırılmalıdır. Ekler içerisindeki denklem numaralandırmaları A1, A2, A3 vb. olarak, Tablo ve Şekil numaralandırmaları Tablo A1, Tablo A2, Şekil A1, Şekil A2 vb. olarak adlandırılmalıdır.

Diğer Hususlar

Eşitlik Numaraları: Metin içerisinde eşitlikler Eş. 1, Eş. 2 şeklinde verilmelidir. Eşitlik numaralandırmaları parantez içerisinde (1), (2), (3) vb. olarak, reaksiyon numaralandırmaları (R1), (R2), (R3) vb. olarak numaralandırılmalıdır.

Birimler: Metin, şekil ve tablo içerisinde SI birim sistemi kullanılmalıdır.

Şekiller ve Tablolar:

- Tablo içermeyen bütün görüntüler (fotoğraf, çizim, diyagram, grafik, harita vs.) şekil olarak belirtilir.
- Tablo ve şekiller metin içinde geçişlerine göre numaralandırılmalı, bütün tablo ve şekiller ilgili paragraftan hemen sonra verilmelidir. Tablo ve şekillerin her birinin metin içerisinde bahsedildiğinden emin olunmalıdır.
- Tablo başlıkları tablonun üstüne ve şekil başlıkları şeklin altına konulmalıdır. Tabloların ve Şekillerin Türkçe başlıklarından sonra İngilizce başlıkları parantez içerisinde verilmelidir.
- Makaleye eklenecek şekiller (fotoğraf, çizim, diyagram, grafik, harita vs.) mutlaka yüksek çözünürlükte (300dpi veya üstü) olmalıdır. Kabul edilen görüntü formatları jpeg, png, tiff, bmp, eps, wmf, emf veya pdf'dir. Dosya boyutları 1 Mb'tı geçmemelidir.
- Boyutlandırma işlemi orijinal veri üzerinde yapılmalıdır. Eksen başlıkları, etiketlendirme ve açıklamaları (metin kutusu, oklar, üste resim vb. şekilde) Word içerisinde yapılmamalıdır. Grafik, Word belgesine tek bir öge halinde eklenmelidir.
- Tablolar resim olarak verilmemelidir. Büyük tabloların tek bir sayfaya sığması tercih edilir. Şekillerde el yazısı kullanılmamalıdır. Renkli fotoğraflar kabul edilebilir ancak baskı siyah-beyaz formata olacaktır. Grafiklerin siyah-beyaz baskıda belirgin olabilmesi için uygun simgelerin kullanılmasına özen gösterilmelidir.

Yapısal Diyagramlar ve Matematiksel Denklemler: Molekül yapılarının yanı sıra matematiksel denklemler metin içinde ait oldukları yerde çizilmiş veya yazılmış olmalı ve ayrı bir satırda gösterilmelidir. Bu molekül yapıları veya matematiksel denklemler sağ yanında ve parantez içinde numaralandırılarak daha sonraki kullanımlarda bu numaralara atıf yapılmalıdır.

Eşitlikler ve denklemler için MS Word Equation Editor fonksiyonu, simgeler için ise MS Word'de Insert/Symbol fonksiyonu kullanılmalıdır.

TELİF HAKKI DEVİR FORMU

Yazıların telif hakkı devri, dergi internet sayfasında sunulan form doldurulup imzalanmak suretiyle alınır. İmzalı Telif Hakkı Devir Formunu göndermeyen yazarların yayınları değerlendirilmeye alınmaz.

BENZERLİK ORAN DOSYASI

Makalenizin referanslar bölümü dahil Tam Metni "iThenticate" veya "Turnitin" programları ile taranmalıdır. İlgili programdan alacağınız benzerlik oranı sonucunun PDF formatında sistemimize yüklenilmesi gerekmektedir.

AUTHOR'S GUIDE

1. SCOPE

Journal of Boron; accepts articles in the field of boron, whose qualifications are explained below, in Turkish and English.

Research Article: These are articles that reflect an original research with its findings and results. The study must be original and must contribute to international science.

Scan Article: These are articles that scan a sufficient number of scientific articles, summarize the subject at the current knowledge and technology level, evaluate and compare the findings.

Each article is sent to at least two referees on its subject and has it examined in terms of form, content, original value, contribution to international literature and science / technology. After the deficiencies stated in the referee opinions are completed, the articles that can be published in the journal are brought to the final print format and the approval of the final version of the article is obtained from the authors. The responsibility of the errors that may be found in the article as it is printed in the journal belongs to the authors.

Accepted articles are published free of charge on the journal's website (online) and/or in print.

2. APPLICATION FORMS

It should consist of five separate forms: Cover Page of Article, Article Checklist Form, Article Text, Copyright Form and Similarity Ratio File. Contact information (address, e-mail, mobile and fixed phone number) of the author and other authors to be contacted during the applications must be given on the cover page.

3. SUBMISSION CHECKLIST

During the application process, authors must check the compliance of their submissions with all the items in the list below, applications that do not comply with this guideline will not be evaluated.

1. The article to be sent has not been published before and/ or has not been submitted to any journal for publication.
2. The article was prepared using Microsoft Office Word 2010 or higher word processor.
3. Margins, header and footer spacing and line spacing on the A4 page of the article have been adjusted according to the journal format.

4. Main headings and sub-headings were arranged in accordance with the journal format, together with their English translations.

5. The tables were prepared in accordance with the journal format, they were mentioned in the text and placed in the text section of the work.

6. Figures were prepared in accordance with the journal format, they were mentioned in the text, and placed in the text section of the work.

7. Equation and Reaction numbers were given in order in accordance with the journal format.

8. Original figures were prepared entirely in accordance with the spelling rules.

9. Figure sizes are arranged to fit the format.

10. Figures in the text are numbered consecutively.

11. References are written according to the spelling rules.

12. References are listed consecutively in the text.

13. References are listed at the end of the text, in the order given in the text.

14. It was checked that Turkish Article Title / Abstract / Keywords / Section Titles / Table and Figure titles and English Article Title / Abstract / Keywords / Section Titles / Table and Figure titles are the same.

15. The "Cover Page" containing the title of the work, the names of the authors and contact information was created.

16. The Copyright Form was signed and sent.

17. Possible spelling errors were checked with the word processor's "Spelling and Grammar" check.

18. The original aspect of the article and its concrete contribution to science are written in the "Note to the Editor" field.

4. COPYRIGHTS

The copyright transfer of the articles is taken by filling and signing the Copyright Transfer Form presented on the journal website. After the form is signed, it should be uploaded as PDF in the "upload additional files" section. Works of authors who do not submit this form cannot be published.

5. PRIVACY NOTICE

Names and e-mail addresses on this journal site will be used in line with the stated purposes of this journal and will not be used for other purposes or any other section.

WRITING RULES

GENERAL INFORMATION

An article is composed of 5 individual forms which are cover page, article checklist form, article manuscript, copyright transfer form and plagiarism score file. Contact information (address, e-mail address and phone number) of the corresponding author must be given in cover letter.

COVER PAGE

A cover page must be prepared and submitted to journal's webpage as an individual file. Author information will be visible only to journal editors during initial application.

Title of the article must start with a capital letter and centered to the page. The title must be brief, clear and appropriate for the manuscript. Name, surname, e-mail, affiliation, postal code, city and ORCID number of author(s) must be given below the title.

Title of the article in English: An inclusive and understandable title must be used. The title must start with a capital letter and the rest must be lowercase. The title must be no longer than 15 words including required standard abbreviations.

Title of the article in Turkish: Must be in concordance with the Turkish title.

Author Names and Address Information: Authors' names and surnames must start with a capital letter. Author names are followed by the institution where the author is affiliated. Uppercase numbers must be used in order to relate the author to the institution. Corresponding author must be denoted with the asterisk sign "*", after their surname. Address information must include institution, city, postal code and country name. E-mail address must be added after the address line for all authors, according to author order.

Abstract: Topic of the article must be summarized without citing the article. An abstract must not exceed 220 words. Non-standard abbreviations must be explained when used for the first time.

Keywords: Must be placed after abstract. Maximum 5 words must be given with alphabetical order. Keywords must be chosen from explanatory words about the topic. Every keyword must be separated from each other with ", ". Keywords must not include full sentences.

Abstract in English: Must be formed by translating the text in abstract. If decimal are used, " , " must be used for Turkish abstract and " . " must be used for English numbers.

Keywords in English: Must be placed after Abstract in English. Must be in concordance with Turkish keywords. Maximum of 5 words must be written with the alphabetical order, about the topic.

ARTICLE CHECKLIST FORM

It is the form that shows approval of the article manuscript to the journal's writing rules. Article Checklist Form must be filled before submission. Article Checklist Form must be given as the first page of the manuscript. Applications that are not in accordance with the journal's format or submitted without Article Checklist Form will not be evaluated.

ARTICLE MANUSCRIPT

Article Manuscript must be placed after Article Checklist Form. Article manuscript must be prepared by considering details given below.

- Article manuscript must be prepared with Times New Roman font and 12 font size by using Microsoft Office Word 2010 or later version word processor. Misspellings and grammatical errors must be checked and corrected by using Microsoft Office Word's proofing errors section.
- Article manuscript must be prepared in A4 size page with 2.5 cm margins from each side, as a single column.
- Page order must not be changed when article is reviewed.
- Line and paragraph spacing must be set to 1.5 and there must be 1 line space between paragraphs. There must be no automatic line spacing before and after paragraphs.
- There must be no page breaks between pages and whole manuscript must consist of a single section.
- In case the article is in Turkish, translation of all headings must be given in parentheses.
- The manuscript must not exceed 14,000 words for research articles and 22,000 for review articles including references.
- Tables and figures must be prepared according to the journal's requirements.
- The manuscript must be divided into main sections and each section must be numbered. Numbering must start from 1 and go on for all main sections (Except for Abstract, Acknowledgements, References and Appendices sections). Secondary headings must be numbered as 1.1., 1.2., 1.3., etc. in concordance with main headings. Tertiary headings must be numbered as 1.1.1., 1.1.2., 1.1.3., etc. in concordance with secondary headings.

Manuscript format sample is given below:

Cover page
1. Introduction
2. Materials and Methods
3. Results and Discussion
4. Conclusions
5. Symbols
Acknowledgments
References
Appendices

1. Introduction

Must include detailed literature review, purpose and hypothesis of the conducted study. Contribution of a reference must be examined and placed individually in the manuscript, must not be given collectively.

2. Materials and methods

If the manuscript is for a research article, experimental methods must be explained in an understandable and detailed manner. Theoretical approach must be explained in detail, if a theoretical study was conducted. If the method that was used is already published, related source must be cited and differences must be pointed.

3. Results and discussion

Obtained data must be presented clearly. Data interpretation and literature comparison must be done.

4. Conclusions

Main conclusions of the conducted study must be given briefly.

5. Symbols

Symbols that are used in the manuscript must be given with an alphabetical order. Other symbols can be given after the alphabetical order. Greek letters and subscripts can be used, if required.

Acknowledgment

Acknowledgements is given after the manuscript and before the references.

References

- DOI or ISBN numbers of published sources must be given.
- Webpages (URL) must not be used as a reference. They can be used only in manuscript after data.
- References must be numbered with the same order as mentioned in the manuscript.
- References must be prepared according to "APA Publication Manual, Seventh Edition" rules.
- References must be prepared in English. English translation of Turkish sources must be denoted with square brackets.

Sample references can be found from the URL address <https://apastyle.apa.org/style-grammar-guidelines/references/examples>

- **If the source is an article:** Author's Last Name, Initial of Author's First Name. (Year). Article's full title. *Journal's Full Title*, Volume number (Issue number), Page numbers.

Uysal, İ., Yılmaz, B., & Evis, Z. (2020). Boron doped hydroxyapatites in biomedical applications. *Journal of Boron*, 5(4), 192-201.

- **If the source is a book with author:** Author's Last Name, Initial of Author's First Name. (Year). *Book's Name*. (Volume number, Editor, if present). Publisher. ISBN or DOI number.

Yünlü, K. (2019). *Bor: Bileşikleri, Sentez Yöntemleri, Özellikleri, Uygulamaları*. [Boron: Its Compounds, Synthesis Methods, Properties and Applications] (2nd Ed.). Aydıllı Advertising Agency. ISBN 978-605-5310-93-6.

- **If the source is a book with editor:** Editor's Last Name, Initial of Editor's First Name (Eds.). (Year). *Book's Name*. (Volume number). Publisher. ISBN or DOI number.

Korkmaz, M. (Eds.). (2020). *Bor ve İnsan Sağlığı [Boron and Human Health]*. Kuban Printing and Publishing. ISBN 978-605-9516-69-3.

- **If the source is a chapter from a book:** Chapter Author's Last Name, Initial of Chapter Author's First Name. (Year). Book's Name. In Last Name of Chapter's Editor, First Name of Chapter's Editor (Eds.), *Chapter's Name* (Volume number if present, Pages). Publisher.

Hakkı, S., & Nielsen, F. N. (2020). Boron and Human Health., *Anti-Inflammatory and Anti-Microbial Potentials of Boron in Medicine and Dentistry* (pp. 67-82). Nobel Academical Publishing, Education, Consultancy Ltd.

- **If the source is a published thesis:** Author's Last Name, Initial of Author's First Name. (Year). *Thesis title* [Thesis category, University]. Archive that the thesis is registered (Thesis Number). Link to the thesis, if present.

Akbaba, S. (2018). *Biopolymer modified polypropylene mesh for hernia treatment* [M. Sc. thesis, Middle East Technical University]. Council of Higher Education Thesis Center (Thesis Number 527833).

- **If the source is from a conference proceeding:** Author's Last Name, Initial of Author's First Name. (Year). Name of the proceeding. *Name of the Conference*, Place of the Conference, Proceeding page numbers.

Akbaba, S., Atila, D., Tezcaner, T., & Tezcaner A. (2018). BIOMED2018-TR 23. *Biyomedikal Bilim ve Teknoloji Sempozyumu [BIOMED2018-TR 23rd Biomedical Science and Technology Symposium]*, Turkey, p. 43.

Appendices

Appendices in the manuscript must be named as AP A (Appendix A), AP B (Appendix B) and AP C (Appendix C) etc. Equation numbering within the appendix must be as A1, A2, A3 etc., whereas Table and Figure numbering must follow as Table A1, Table A2, Figure A1, Figure A2 etc.

Other Issues

Equality Numbers: Equations in the manuscript must be given as Eq. 1, Eq. 2. Equations must be numbered in brackets as (1), (2), (3), etc., and reaction numbers as (R1), (R2), (R3), etc.

Units: The SI unit system must be used in the text, figures and tables.

Figures and Tables:

- All images (photographs, drawings, diagrams, graphs, maps, etc.) that do not contain tables are considered as figures.
- Each table and figure must be numbered according to their transition in the text, and all tables and figures must be given right after mentioned paragraph in manuscript. It must be made sure that each table and figure was mentioned in the text.
- Table captions must be placed above the table and figure captions must be placed under the figure. Table and figure captions must also be noted in English and given in parentheses if the manuscript is in Turkish.
- Figures (photograph, drawing, diagram, graphic, map, etc.) to be added to the article must be at high resolution (300dpi or higher). Accepted image formats are jpeg, png, tiff, bmp, eps, wmf, emf or pdf. File sizes must not exceed 1 Mb.
- The sizing process must be done on the original data. Axis titles, labelling and explanations (such as text box, arrows, picture on top, etc.) must not be added with Word. The plot must be added to the Word document as a single element.
- Tables must not be added as pictures. Large tables are preferred to be fit in a single page. Handwriting must never be used in figures. Although colorized figures are acceptable, printing will be done in black-white format. Appropriate symbols must be used in order for figures to be prominent in black-white printing.

Structural Diagrams and Mathematical Equations: Mathematical equations as well as molecular structures must be drawn or written where they belong in the text and displayed on a separate line. These molecular structures or mathematical equations must be numbered on the right side and in parentheses for later referring.

MS Word Equation Editor function must be used for equations, and Insert/Symbol function in MS Word for symbols.

COPYRIGHT FORM

Copyright transfer of the articles is taken by filling and signing the form presented on the journal website. The publications of the authors who do not send the signed Copyright Form will not be evaluated.

SIMILARITY RATIO FILE

The manuscript, excluding the references section, must be scanned using the "iThenticate" or "Turnitin" programs. The similarity ratio result received from the relevant program must be uploaded to system in PDF format. It is expected that similarity ratio is not more than 10%.

İÇİNDEKİLER/CONTENTS

Toz enjeksiyon kalıplama tekniği için üretilen bor karbür besleme stoklarının reolojik ve bağlayıcı giderme özelliklerinin incelenmesi	Sezer Bilketay, Batuhan Soruşbay, H. Özkan Gülsoy	453
The effect of boric acid on copine-7 expression and bioactivity in dental pulp stem cells	Serife Buket Bozkurt, Sema S. Hakki	461
Synthesis, electrochemical characterization and biosensor application of a novel organoboron monomer ...	Nimet Yildirim-Tirgil, Zeycan Kalkan, Soner Ozturk	467
<i>In vitro</i> biological activities of potassium metaborate; antioxidative, antimicrobial and antibiofilm properties.....	Tuba Baygar, Nurdan Sarac, Ozgur Ceylan, Aysel Ugur, Rukiye Boran, Uydu Balci	475
Bor sitrat uygulanan ratların serum ve plazmalarında bor tayini	Ömer Faruk Koçak, Alptuğ Atıla, Zekai Halıcı, Mevlüt Albayrak	482

TENMAK BOREN Bor Araştırma Enstitüsü

A: Dumlupınar Bulvarı (Eskişehir Yolu 7. km), No:166, D Blok, 06530, Ankara

T: (0312) 201 36 00

F: (0312) 219 80 55

E: boren.journal@tenmak.gov.tr

İ: <https://dergipark.org.tr/boron>