

**PATOJENİK BAKTERİLERİN TANISI İÇİN NANOESASLI  
SENSOR PLATFORMLARI**

**NANOBASED SENSOR PLATFORMS FOR DETECTION  
OF PATHOGENIC BACTERIA**

**ALIAKBAR EBRAHİMİ**

**PROF. DR. ERHAN BİŞKİN**  
**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin  
Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü  
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

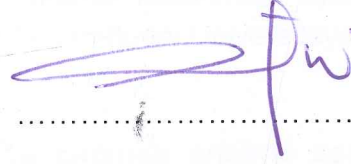
2017

**ALIAKBAR EBRAHİMİ'nin hazırladığı "Patojenik Bakterilerin Tanısı için Nanoesaslı Sensor Platformları" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından NANOTEKNOLOJİ ve NANOTIP ANABİLİM DALI'nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.**

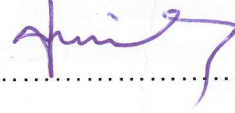
Prof. Dr. Tülin KUTSAL  
Başkan



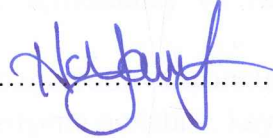
Prof. Dr. Erhan BIŞKIN  
Danışman



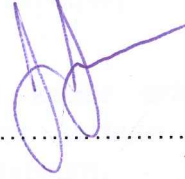
Prof. Dr. F. Yeşim EKİNCİ  
Üye



Prof. Dr. Handan YAVUZ  
Üye



Yrd. Doç. Dr. Sinan EĞRİ  
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

- Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

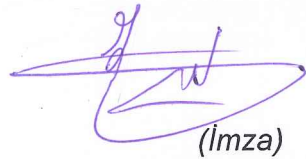
- Tezimin/Raporumun 11/09/2020 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- Tezimin/Raporumun ..... tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

15 / 09 / 2017

  
(İmza)

Aliakbar EBRAHİMİ

## ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü; tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı beyan ederim.

11.09.2017



ALIAKBAR EBRAHİM

## ÖZET

# PATOJENİK BAKTERİLERİN TANISI İÇİN NANOESASLI SENSOR PLATFORMLARI

**ALIAKBAR EBRAHİM**

**Doktora, NANOTEKNOLOJİ ve NANOTİP Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Erhan BİŞKİN**

**Eylül 2017, 110 sayfa**

Bu çalışmanın ilk kısmında Kitosan-g-PCL kopolimerleri ve PCL sentezlenmiştir. Oligo-PCL zincirlerinin kitosan zincirleri üzerinde graft edilmesi için kitosan azot atmosferi altında asidik ortamda (metansolfonik asit) çözüldükten sonra  $\epsilon$ -kaprolakton monomeri iki farklı oranda ortama ilave edilmiş ve iki farklı kitosan-graft-PCL kopolimerleri (CS-g-PCL I ve CS-g-PCL II) sentezlenmiştir. PCL sentezi için halka açılması polimerizasyonu kullanılmıştır.  $\epsilon$ -kaprolakton monomeri payreks tüp içinde 110 °C sıcaklığa kadar ısıtıldıktan sonra 5 dakika boyunca azot atmosferi altında tutulmuş, monomerin 1/1000 (ağırlıkça) oranında kalay oktoat katalizör olarak ilave edilmiştir. Elde edilen karışım vorteks ile homojenleştirilmiş, daha sonra 24 saat boyunca 120 °C'de bekletilerek PCL sentezi tamamlanmıştır. Sentezlenen polimerler FTIR, <sup>1</sup>H-NMR, TGA ve GPC yöntemleri ile karakterize edilmiş ve polimerlerin başarılı bir şekilde sentezlendiği saptanmış ve molekül ağırlıkları elde edilmiştir. Daha sonra PCL'nin kopolimerlerle ayrı ayrı farklı oranlarda kloroform ve N,N-dimetilformamid çözücü sisteminde karışımları oluşturulmuş ve bu karışımlar iki farklı yöntem kullanılarak elektroğirilmiş, PCL ve kitosan-graft-PCL-blend-PCL nanofiberleri oluşturulmuştur. Nanofiberlerin üretimi için kullanılan ilk yöntem geleneksel şiringalı elektroğirme yöntemidir. Kullanılan ikinci yöntem ise Elmarco şirketi tarafından üretilen Elmarco "Nanospider" cihazıdır. Nanofiberlerin yüzey kimyası, hidrofilik ve hidrofobik özellikleri, mekanik özellikler, morfolojileri ve fiberlerin çapları, sırasıyla XPS (X-ışını fotoelektron spektroskopisi), su temas açısı testi, mekanik test ve SEM ile incelenmiştir. Daha sonra nanofiberlerin antibakteriyel özellikleri gram pozitif ve gram negatif patojen bakteriler üzerinde incelenmiştir. Nanofiber matrisleri üzerinde biyofilm oluşumu deneyleri de gerçekleştirilmiştir. Son aşamada sonokimyasal indirgeme yöntemi ile nanofiber yüzeylerine farklı konsantrasyonlar kullanılarak altın ve gümüş partikülleri yüklenmiştir. Kıyaslama

amacı ile önceden sentezlenen altın nanopartikülleri de sonikasyon yardımıyla nanofiber matrisleri üzerine yüklemiştir. Nanofiberlerin SEM görüntüleri elde edilerek nanofiberlerin yüzeylerinde oluşan altın ve gümüş nanopartikülleri incelenmiştir. Farklı oranlarda nanofiber matrislerin yüzeylerine yüklenen altın ve gümüş nanopartiküllerin SERS etkileri raman spektrumları alınarak incelenmiştir. Daha sonra en yüksek SERS piklerine sahip altın ve gümüş yüklenmiş nanofiberin yüzeyleri flüoresan boya ile boyanmış ve bu yüzeylere E. coli ATCC 25922 süspansiyonu ilave edilerek yüzeylerin bakteri üzerinde etkileri değerlendirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kitosan, PCL, Kitosan-graft-PCL, Nanofiber, Elektroğirme, Sonokimyasal indirgeme, SERS, Flüoresan mikroskop.

## **ABSTRACT**

### **NANOBASED SENSOR PLATFORMS FOR DETECTION OF PATHOGENIC BACTERIA**

**ALIAKBAR EBRAHIMI**

**Doctor of Philosophy, Department of Nanotechnology and Nanomedicine**

**Supervisor: Prof. Dr. Erhan BIŞKİN**

**September 2017, 110 pages**

In the first part of this study, chitosan-graft-PCL (CS-g-PCL) copolymers and PCL polymer were synthesized. For grafting of PCL oligomers on the chitosan chains, chitosan was dissolved in acidic solvent (Methane sulfonic acid) under N<sub>2</sub> atmosphere, then ε-caprolactone monomers was added to the solution. Grafting reaction initiated in acidic condition and ended after 5 hours. In this part two different CS-g-PCL copolymers with different proportion of chitosan and ε-caprolactone were synthesized. Synthesizing of PCL polymer was carried out by use of the ring opening polymerization. ε-caprolactone in pyrex tube heated up to 110 °C under N<sub>2</sub> atmosphere, after that Sn(Oct)<sub>2</sub> was added as catalyzer and put in oven at 120 °C for 24 hours. Synthesized copolymers and PCL were characterized with FTIR, <sup>1</sup>HNMR, GPC and TGA. Results of characterization described that the synthesise procedures were done successfully. Molecular weights of copolymers and PCL were obtained. Then, different blends of PCL with each of the copolymers were prepared in the chloroform and N,N-dimethylformamide as a solvent system. PCL and Blend solutions were used to prepare nanofibers with electrospinning. Two different types of electrospinning system were used to prepare nanofibers. In the first part, conventional electrospinning system with syringe and rotating collector was used to produce nanofibers. In the second part, nanospider electrospinning machine produced with Elmarco Co. was used for electrospinning process. Surface chemistry, hydrophilic and hydrophobic character and mechanic strength of nanofiber matrices were characterized with XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy), water contact angle and mechanic tests respectively. Antibacterial activity of the nanofiber matrices were studied with use of two different bacteria as gram positive and gram negative bacteria. Also the formation of biofilm on the

surface of nanofiber matrices was studied. Sonochemical reduction method was used for reduction of gold and silver nanoparticles on the surface of the nanofiber matrices, and for comparison, deposition of synthesized gold nanoparticles on the surface of the nanofiber matrices with use of sonication was done in parallel with sonochemical reduction procedure. SEM image of prepared nanofiber matrices and nanofibers doped with gold and silver particles, were obtained and showed successful preparation of matrices. Raman spectroscopy was used to study the surface enhanced (SERS) properties of doped gold and silver nanoparticles on the surface of nanofiber matrices. Then the effect of nanofiber matrices with highest SERS peaks on gram negative bacteria (*E. coli* ATCC 25922) studied with fluorescence microscope.

**Keywords:** Chitosan, PCL, Chitosan-graft-PCL, Nanofiber, Electrospinning, Sonochemical reduction, SERS, fluorescence microscope.



## TEŞEKKÜR

*Kendisiyle çalışma fırsatı vererek, tez çalışmamın yürütülmesinde her türlü yardımı yapan, bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren, danışman hocam **Prof. Dr. Erhan Bişkin'e**;*

*Tez çalışmalarını boyunca laboratuvarlarının kapılarını her zaman sonuna kadar açan sayın hocam **Prof. Dr. Tülin Kutsal'a**;*

*Tez çalışmasının önemli bir kısmının yapılmasında bana büyük ölçüde destek veren Nankai üniversitesindeki değerli hocam **Prof. Dr. Deling Kong'a**;*

*Tez izleme komitesinde yer alıp tezin yapılmasında bana yol gösteren ve gerektiğinde yardım eden sayın hocalarım **Prof. Dr. F. Yeşim Ekinci'ye** ve **Yrd. Doç. Dr. Sinan Eğri'ye***

*Tez savunma jürimde yer alarak bana destek olan sayın hocalarım, **Prof. Dr. Handan Yavuz'a** ve **Prof. Dr. Mustafa Türk'e**;*

*Doktora süreci boyunca 1003 projesi kapsamında bana mali destekte bulunan **TÜBİTAK'a**;*

*Kısmi destekleri için **ABREM** projesine;*

*Hayatımın en kıymetlisi **aileme** ve özellikle her zaman, her yerde ve her şartta sabırla yanımda olan ve her zaman her koşulda bana destek olan canım **annem** ve **babam'a**;*

*Her ihtiyacım olduğunda ellerinden geldiğince bana yardım eden çalışma arkadaşlarım **Behzad Nasseri, Reza Didarian, Mehmet Yılmaz, Ahmed Salmanoglu, Araz Norouz, Erdem Haberal** ve **Metin Yezdani'ye**;*

*Sonsuz Teşekkürler.*

*Aliakbar EBRAHİMİ*

# İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
ÇİZELGELER .....	ix
ŞEKİLLER .....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xv
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Kitin ve Kitosan .....	4
2.1.1. Kitinin Morfolojisi .....	4
2.1.2. Kitosan .....	5
2.1.3. Kitosanın Karakterizasyonu ve Çözünürlüğü .....	6
2.1.4. Kitosan Esaslı Maddelerin İşlenmesi ve Ana Özellikleri .....	8
2.1.5. Kimyasal Yapı ve Biyolojik Aktiviteler Arasındaki İlişki .....	9
2.1.6. Kitosanın Antimikrobiyal Aktivitesi .....	10
2.2. Polikaprolakton (PCL) .....	12
2.2.1. PCL Sentezi ve Fiziko-Kimyasal Özellikleri .....	13
2.2.2. PCL'nin Biyodegradasyonu .....	15
2.2.3. PCL Nanofiberleri .....	16
2.3. PCL/Kitosan Nanofiberleri .....	17
2.4. Elektroçirme (Elektrostatik Çirme) .....	18
2.5. Sonokimyasal İndirgeme Yöntemiyle Yüzey Zenginleştirme .....	22
2.6. Yüzey Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (SERS) .....	24
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR .....	27
3.1. Çalışmanın Temeli ve Kapsamı .....	27
3.2. Kullanılan Malzemeler .....	27
3.3. Graft Kopolimerler ve PCL'nin Sentez ve Karakterizasyonu .....	28
3.3.1. Graft Kopolimerlerin (CS-g-PCL-I ve CS-g-PCL-II) Sentezi .....	28
3.3.2. Polikaprolaktonun (PCL'nin) Sentezi .....	29

3.3.3. Polimerlerin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Analizi .....	30
3.3.4. Polimerlerin Hidrojen Nükleer Manyetik Rezonans ( <sup>1</sup> H-NMR) Analizi .....	30
3.3.5. Polimerlerin Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC) Analizi .....	30
3.3.6. Polimerlerin Termogravimetrik Analizi (TGA).....	30
3.4. Elektroçirime ile PCL ve Kopolimerler Karışımı Fibelerin Üretilmesi.....	31
3.4.1. Şırıngalı Elektroçirime Sistemiyle Nanofiber Matris Üretimi.....	32
3.4.2. ELMARCO Nanospider Cihazı ile Nanofiber Matris Üretimi.....	35
3.4.3. Nanospider <sup>TM</sup> Teknolojisi .....	35
3.4.4. Nanofiber Matrislerin Su Temas Açısı Deneyleri.....	36
3.4.5. X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) ile Yüzey Kimya Analizi .....	37
3.4.6. Matrislerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Görüntülenmesi .....	38
3.4.7. Nanofiber Matrislerin Gerilme-Uzama Deneyi.....	39
3.5. Antimikrobiyal Testler.....	40
3.5.1. Agar Difüzyon Testleri.....	41
3.6. Biyofilm Oluşumu Deneyleri .....	41
3.6.1. <i>S. epidermidis</i> Biyofilm Oluşumu Deneyleri .....	42
3.6.2. <i>S. epidermidis</i> Biyofilminin Optik Mikroskop Görüntüleri .....	43
3.7. Turkevich Yöntemiyle Altın Nanopartikül (AuNP) Sentezi .....	43
3.7.1. AuNPlerin Morötesi-Görünür ( UV-Vis ) Analizi .....	44
3.7.2. AuNPlerin Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Görüntüleri .....	44
3.8. Sonikasyon Yöntemiyle Nanofiber Yüzeylerine Nanopartikül Yüklenmesi ...	44
3.8.1. Sonokimyasal İndirgeme ile Nanofiber Yüzeylerine AgNP Yüklenmesi .....	45
3.8.2. Sonokimyasal İndirgeme ile Nanofiber Yüzeylerine AuNP Yüklenmesi .....	46
3.8.3. AuNPlerin Sonikasyon ile Nanofiber Yüzeylerine Yüklenmesi .....	46
3.8.4. Yüzeylerine NP Yüklenen Nanofiberlerin SEM Görüntüleri.....	47
3.8.5. Yüzeylerine NP Yüklenen Nanofiberlerin Raman Analizi .....	48
3.9. NP Yüklenmiş Yüzeylerin Flüoresan Ölçümleri.....	48
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	50
4.1. Sentezlenen Graft Kopolimerler ve PCL'nin Karakterizasyonu .....	50
4.1.1. FTIR Sonuçları .....	50
4.1.2. <sup>1</sup> H-NMR Sonuçları.....	52
4.1.3. GPC Sonuçları .....	55
4.1.4. TGA analiz sonuçları.....	57
4.2. Nanofiberlerin Karakterizasyonu .....	59

4.2.1. Elektroğirme ile Üretilen Kopolimerler ve PCL Karışımı Fibeler .....	59
4.2.2. Su Değme Açısı Analiz Sonuçları .....	59
4.2.3. X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) ve Yüzey Kimya Analizi .....	62
4.2.4. Nanofiberlerin SEM Görüntüleri ve Morfolojileri .....	64
4.2.5. Mekanik Test (Gerilme-Uzama Deneyi) Sonuçları .....	68
4.3. Antimikrobiyal Test (Agar Difüzyon Test) Sonuçları .....	70
4.4. Biyofilm Oluşumu Deney Sonuçları.....	70
4.4.1. <i>S. epidermidis</i> Biyofilm Oluşumu .....	70
4.4.2. <i>S. epidermidis</i> Biyofilminin Optik Mikroskop Görüntüleri .....	71
4.5. Turkevich Yöntemiyle Sentezlenen AuNPLer Karakterizasyonu .....	72
4.5.1. AuNPLerin Morötesi-Görünür (UV-Vis) Spektrumu .....	72
4.5.2. AuNPLerin TEM Görüntüsü.....	73
4.6. Sonokimyasal İndirgeme ile Nanofiber Yüzeylerine Yüklenen NPLerin Optimizasyon Sonuçları:.....	73
4.6.1. İndirgeme Yöntemiyle Nanofiber Yüzeylerine AgNP Yüklenmesi .....	73
4.6.2. İndirgeme Yöntemiyle Nanofiber Yüzeylerine AuNP Yüklenmesi .....	76
4.6.3. AuNPLerinin Sonikasyon ile Nanofiber Yüzeylerine Yüklenmesi .....	78
4.7. Yüzeylerine NP Yüklenmiş Nanofiberlerin SEM Görüntüleri .....	80
4.7.1. AgNPLeri İndirgenmiş Nanofiberlerin SEM Görüntüleri.....	80
4.7.2. AuNPLeri İndirgenmiş Nanofiberlerin SEM Görüntüleri.....	83
4.7.3. Sonikasyon ile AuNPLeri Yüklenmiş Nanofiberlerin SEM Görüntüleri.....	85
4.8. NP Yüklenmiş Nanofiber Fimlerinin RAMAN Spektrumları .....	87
4.8.1. İndirgeme ile AgNP Yüklenen Nanofiberlerin RAMAN Spektrumları .....	87
4.8.2. İndirgeme ile AuNP Yüklenen Nanofiberlerin RAMAN Spektrumları .....	88
4.8.3. Sonikasyon ile AuNPLeri Yüklenen Nanofiberlerin RAMAN Spektrumları ....	89
4.8.4. NP Yükleme Sonuçlarının Değerlendirilmesi .....	90
4.9. Flüoresan Görüntüleme Sonuçları .....	91
5. GENEL SONUÇLAR.....	94
KAYNAKLAR.....	96
ÖZGEÇMİŞ .....	109

## ÇİZELGELER

	<u>Sayfa</u>
<b>Çizelge 2.1.</b> Elektroçirime için proses parametreleri [139].....	21
<b>Çizelge 3.1.</b> PCL ve kopolimerlerin (CS-g-PCL-I ve CS-g-PCL-II) farklı oranları ile Hazırlanan fiberler: .....	34
<b>Çizelge 4.1.</b> PCL ve CS-g-PCL kopolimerlerin karakterizasyonu.....	50
<b>Çizelge 4.2.</b> Hazırlanan nanofiberler:.....	59
<b>Çizelge 4.3.</b> Nanofiberlerin su değme açısı: .....	60
<b>Çizelge 4.4.</b> X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) ile belirlenen PCL ve CS-g-PCL/PCL nanofiber filmlerinin yüzeyinde karbon, azot ve oksijen atomlarının oranları: .....	64
<b>Çizelge 4.5.</b> Çekme-uzama test sonuçları. ....	69
<b>Çizelge 4.6.</b> Sonokimyasal indirgeme yöntemi kullanılarak yüzeylerinde AgNPleri yüklenmiş PCL nanofiberlerin optimizasyon sonuçları: .....	74
<b>Çizelge 4.7.</b> Sonokimyasal indirgeme yöntemi kullanılarak yüzeylerinde AgNPleri yüklenmiş CS-g-PCL-I/PCL (25:75) nanofiberlerin optimizasyon sonuçları:.....	75
<b>Çizelge 4.8.</b> Farklı AgNO <sub>3</sub> konsantrasyonları kullanılarak sonokimyasal indirgeme yöntemi ile yüzeylerinde AgNPleri yüklenmiş PCL nanofiberleri:.....	76
<b>Çizelge 4.9.</b> Sonokimyasal indirgeme yöntemi kullanılarak yüzeylerinde AuNPleri yüklenmiş PCL nanofiberlerin optimizasyon sonuçları: .....	77
<b>Çizelge 4.10.</b> Sonokimyasal indirgeme yöntemi kullanılarak yüzeylerinde AuNPleri yüklenmiş CS-g-PCL-I/PCL (25:75) nanofiberlerin optimizasyon sonuçları:.....	77
<b>Çizelge 4.11.</b> Farklı HAuCl <sub>4</sub> konsantrasyonları kullanılarak sonokimyasal indirgeme yöntemi ile yüzeylerinde AuNPleri yüklenmiş PCL nanofiberleri:.....	78
<b>Çizelge 4.12.</b> Sonikasyon yöntemi kullanılarak yüzeylerinde AuNPleri yüklenmiş PCL ve CS-g-PCL-I/PCL (25:75) nanofiberlerin optimizasyon sonuçları: .....	79
<b>Çizelge 4.13.</b> Sonikasyon yöntemi kullanılarak yüzeylerinde AuNPleri yüklenmiş PCL ve CS-g-PCL-I/PCL (25:75) nanofiberlerin optimizasyon sonuçları: .....	79
<b>Çizelge 4.14.</b> Farklı HAuCl <sub>4</sub> konsantrasyonları kullanılarak sonikasyon yöntemi ile yüzeylerinde AuNP'leri yüklenmiş PCL nanofiberleri: .....	80

## ŞEKİLLER

### Sayfa

<b>Şekil 2.1.</b> Kitin ve Kitosan [25]. .....	4
<b>Şekil 2.2.</b> $\alpha$ -kitin ve $\beta$ -kitin [29]. .....	5
<b>Şekil 2.3.</b> pH 4'de, T=85°C'de ve polimer konsantrasyonu 5 g/L'de D20'da DA = 0.06 olan kitosanın <sup>1</sup> H-NMR spektrumu. 4.9 ppm'lik sinyaller, D-glukozamin biriminin H-1'i için, 4.7 ppm'de H-1 N-asetil-D-glukosamin için, 3.2 ppm'de H-2 için ve 2.1 ppm'de -CH <sub>3</sub> için (DA elde etmeye izin veren asetil grubu) [25]. .....	7
<b>Şekil 2.4.</b> (A) <sup>13</sup> C NMR spektrumu (A) kitin ve kitosanlar; (B) homojen reasetilasyon ile elde edilen DA = 0.60; (C) Pronova'dan ticari kitosan DA = 0.2; (D) tamamen deasetillenmiş kitin [45]. .....	8
<b>Şekil 2.5.</b> Son 20 yılda Nisan 2010'a kadar, Biyomalzemeler veya Doku Mühendisliği alanında PCL'yi kullanan yayınlar. Tahmini 2010 verileri de dahil edilmiştir. [90]. .....	13
<b>Şekil 2.6.</b> $\epsilon$ -kaprolakonun halka açılması polimerizasyonu [91]. .....	14
<b>Şekil 2.7.</b> A) PCL'nin hidroliz vasıtasıyla parçalanması, 6-hidroksil kaproik asit ve asetil koenzim A'yı ara ürün haline getirir ve bunlar daha sonra sitrik asit döngüsüyle vücuttan atılır. B) Kristal parçalanmanın nasıl gerçekleşmiş olabileceğinin şematik gösterimi [99]. .....	16
<b>Şekil 2.8.</b> Elektroğirme teknolojisinde geliştirme için şematik gösterim: A) klasik elektroğirme sistemi [108]; B) 3D iskele imal etmek için yeni elektroğirme toplayıcısı [108]; C) nano-fibröz tüpleri imal etmek için yeni elektroğirme toplayıcısı [109] ve D) çok tabakalı iskelet imal etmek için çift emisyonlu elektroğirme sistemi [110]. .....	17
<b>Şekil 2.9.</b> Elektroğirme tekniğinin şeması [132]. .....	20
<b>Şekil 2.10.</b> Daha yüksek voltajlarda eğilme dengesizlikleri nedeniyle oluşan polistiren nanofiberlerin yumuşak ağları [133]. .....	20
<b>Şekil 2.11.</b> SERS, kuantum noktalar (QD, 710 nm'de yayan) ve Rhodamine 6G (R6G)'nin spektral özelliklerinin karşılaştırılması. SERS spektrumundan elde edilen keskin zirveleri ve zengin spektroskopik bilgilere dikkat edin [170]. .....	25
<b>Şekil 3.1.</b> Kitosan üzerinde oligo-PCL graftlama reaksiyonu.....	29
<b>Şekil 3.2.</b> Kitosana oligo-PCL graftlama reaksiyon sistemi. ....	29
<b>Şekil 3.3.</b> PCL'nin sentezi. ....	30

<b>Şekil 3.4.</b> Şırıngalı elektroğirme düzeneği.....	31
<b>Şekil 3.5.</b> Pilot ölçekli nanofiber matris (film) üretiminde kullanılan Nanospider® sistemi; (Çek cümhuriyeti). .....	32
<b>Şekil 3.6.</b> Polimer karışımı oluşturma ve elektroğirme Düzeneği ve toplayıcı üzerinde oluşan CS-g-PCL ve PCL karışımı nanofiber matrisleri. ....	33
<b>Şekil 3.7.</b> Elektroğirme işleminde kullanılan 21 gauge'lik paslanmaz çelik iğne..	34
<b>Şekil 3.8.</b> Elektroğirme sistemi ile polimer çözeltisinden nanofiber matris oluşturmak için kullanılan döner çelik silindir toplayıcı: A) Toplayıcının şematik resmi B) ve C) Tez çalışmasında kullanılan elektroğirme cihazı ve toplayıcı. ....	34
<b>Şekil 3.9.</b> Nanospider® sistemi ile elektroğirilmiş film üretimi A) Kontrol birimi; B) Çözelti püskürtme (altta) ve fiber toplama (üstte) bölümleri; C) İşletme sırasında oluşan nanofiberler; D) Toplama kumaşı (mavi renkli) üzerinde toplanan film (beyaz-kıvrılmış).....	36
<b>Şekil 3.10.</b> Harke-SPCA değme açısı analizörü.....	37
<b>Şekil 3.11.</b> Sessile Damla Yöntemi. ....	37
<b>Şekil 3.12.</b> Taramalı Elektron Mikroskopisi, FEI Quanta FEG 250, (ÇekCumhuriyeti). ....	38
<b>Şekil 3.13.</b> A) Gerilme-Uzama Grafiği B) 1,2- Malzemenin gerilme-uzama deneyinden önce ve elastik esneme esnasındaki durumu 3- Malzeme üzerindeki yükün en üst seviyeye ulaştığında daha fazla homojen uzama gerçekleşmediğinden malzemedeki boyun oluşumu meydana gelmesi, 4- Kopma anına kadar plastik bölge aralığında malzemenin boyun kısmında uzamasının devam etmesi, 5- Uzamanın sadece boyun kısmında gerçekleşmesinden sonra kopma gerçekleşmesi. ....	39
<b>Şekil 3.14.</b> Testometric M500-25CT malzeme test makinası (The Testometric Company Ltd, İngiltere). ....	40
<b>Şekil 3.15.</b> Biyofilm Oluşumu Testi: A) PCL, B) CS-g-PCL-b-I/PCL (25:75), C) CS-g-PCL-b-I/PCL (50:50) ve D) CS-g-PCL-b-I/PCL (75:25), 48 saat. ....	42
<b>Şekil 3.16.</b> 40×Zeiss lens ile donatılmış LEICA optik mikroskop (Leica, ABD). ...	43
<b>Şekil 3.17.</b> Sonokimyasal cihazı. ....	45
<b>Şekil 3.18.</b> Sonoplus 2200, Japonya. ....	45
<b>Şekil 3.19.</b> QUANTA 400F Field Emission SEM, Yüksek çözünürlüklü taramalı elektron mikroskobu: A) SEM cihazı, B) Yüzeylerin bilgisayarda görüntülenmesi, C) Yüzeyleri SEM ile görüntülemek için kaplanmış numuneler, D) Yüzeyleri kaplanmış matrislerin SEM cihazına yerleştirilmesi. ....	47

<b>Şekil 3.20.</b> Raman spektrometrisi: A) ExamineR™ yüksek performanslı raman mikroskopi, 785 Lazer Raman modülü, B) Raman spektrumların bilgisayar sistemde görüntülenmesi, C) Numunelerin raman mikroskopi altında görüntüsü.	48
<b>Şekil 3.21.</b> PSARON 1000, Tam Otomatik 3D Dijital Mikroskop Sistemi.	49
<b>Şekil 3.22.</b> Dino-Lite Digital Microscope, AM4115T-GRFBY.	49
<b>Şekil 4.1.</b> Örnek FTIR spektrumları: (A) Kitosan (CS); (B) Polikaprolakton homopolimeri (PCL); ve (C) Graft kopolimer (CS-g-PCL-I).	51
<b>Şekil 4.2.</b> A) CS'nin <sup>1</sup> H-NMR spektrumu: 4.5-5.5 ppm (1) D-glukozamin biriminin H-1'i; 3.4-4.25 ppm (2,3,4,5,6,6')'de H-2,3,4,5,6 ve 6'; 3-3.2 ppm (2')'de H-2' ve 2.05 ppm (7)'de -CH <sub>3</sub> . ve B) PCL'nin <sup>1</sup> H-NMR spektrumu: 2,2 ppm (a), 1,6 ve 1.7 ppm (b, d), 1.4 ppm (c) ve 4.15 ppm (e).	53
<b>Şekil 4.3.</b> Örnek <sup>1</sup> H-NMR spektrumları: (A) Graft kopolimer I (CS-g-PCL-I) (B) Graft kopolimer II (CS-g-PCL-II).	54
<b>Şekil 4.4.</b> PCL için GPC analiz sonucu (M <sub>n</sub> , M <sub>w</sub> , M <sub>p</sub> , M <sub>z</sub> , M <sub>z+1</sub> , Polidispersite/heterojenlik indisi).	55
<b>Şekil 4.5.</b> CS-g-PCL-I için GPC analiz sonucu (M <sub>n</sub> , M <sub>w</sub> , M <sub>p</sub> , M <sub>z</sub> , M <sub>z+1</sub> , Polidispersite / heterojenlik indisi: M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub> ).	56
<b>Şekil 4.6.</b> CS-g-PCL-II için GPC analiz sonucu (M <sub>n</sub> , M <sub>w</sub> , M <sub>p</sub> , M <sub>z</sub> , M <sub>z+1</sub> , Polidispersite / heterojenlik indisi: M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub> ).	56
<b>Şekil 4.7.</b> PCL için TGA termogramı; Kütle kaybı noktası 414.42 °C.	57
<b>Şekil 4.8.</b> CS için TGA termogramı; Kütle kaybı noktası 302.80 °C.	58
<b>Şekil 4.9.</b> CS-g-PCL-I TGA termogramı; Kütle kaybı noktaları 302.73 ve 411.90 °C.	58
<b>Şekil 4.10.</b> Değme açısı (θ)'nın genişliğine bağlı olarak değerlendirilen hidrofobik ve hidrofilik yüzeylerin farkı.	60
<b>Şekil 4.11.</b> PCL ve CS-g-PCL-I/PCL ve CS-g-PCL-II/PCL fiberlerin üzerindeki su damlacığının durumu.	61
<b>Şekil 4.12.</b> PCL, CS-g-PCL-I/PCL ve CS-g-PCL-II/PCL nanofiberlerin su değme açısı.	62
<b>Şekil 4.13.</b> CS-g-PCL-II/PCL (75:25)'in XPS grafikleri: A) C1s, B) N1s, C) O1s ve D) Geniş XPS grafiği.	63
<b>Şekil 4.14.</b> Şıngalı elektrodeğirme metodu ile üretilen nanofiberlerin üç farklı magfifikasyonda (50,20 ve 10 µm skalada) SEM görüntüleri: PCL (A,B,C), CS-g-PCL-I/PCL (25:75) (D,E,F) ve CS-g-PCL-II/PCL (25:75) (G,H,J).	65



<b>Şekil 4.15.</b> İki farklı PCL nanofiber filminin SEM görüntüsü A) Boncuk yapıları olan nanofiber, membran parametreleri; Akış Hızı: 4 ml/sa, Gerilim: 12 kV. B) Boncuk yapıları olmayan nanofiber, membran parametreleri; Akış Hızı: 2 ml/sa, Gerilim: 16 kV.....	66
<b>Şekil 4.16.</b> Elmarco nanospider cihazı ile elde edilen PCL ve CS-g-PCL-I/PCL nanofiberlerinin SEM görüntüsü: A) PCL, B) CS-g-PCL-I/PCL (25:75), C) CS-g-PCL-I/PCL (50:05) ve CS-g-PCL-I/PCL (75:25).....	67
<b>Şekil 4.17.</b> Elmarco nanospider cihazı ile elde edilen PCL ve CS-g-PCL-II/PCL nanofiberlerinin SEM görüntüsü: A) PCL, B) CS-g-PCL-II/PCL (25:75), C) CS-g-PCL-II/PCL (50:05) ve D) CS-g-PCL-II/PCL (75:25).....	68
<b>Şekil 4.18.</b> Çekme-uzama test sonuçları: A) PCL, B) CS-g-PCL-I/PCL (25:75) ve C) CS-g-PCL-II/PCL (25:75).....	69
<b>Şekil 4.19.</b> PCL, CS-g-PCL-I/PCL (25:75) (A1) ve CS-g-PCL-II/PCL (25:75) (B1) elektroğrılmış matrislerin antibakteriyel testleri. ....	70
<b>Şekil 4.20.</b> <i>S. epidermidis</i> biyofilminin 2 gün aralıklarla 24, 48 ve 72 saat UV absorbanları; Sonuçlarına bakıldığında neredeyse biyofilm oluşumu aynı hızda çoğalmaktadır.....	71
<b>Şekil 4.21.</b> 40×Zeiss lens ile donatılmış LEICA optik mikroskop ile görüntülenen <i>S.epidermidis</i> biyofilminin 2 gün aralıklarla oluşumu: A) 1. gün, B) 3. gün, ve C) 5. gün. ....	72
<b>Şekil 4.22.</b> koloidal altın çözeltisi UV-görünür emilim spektrumu ( $d \approx 20$ mil). ....	72
<b>Şekil 4.23.</b> Sentezlenen AuNP'lerin TEM görüntüsü ( $d \approx 15$ nm çapında). ....	73
<b>Şekil 4.24.</b> AgNPLeri yüklenmiş PCL nanofiber matrisin SEM görüntüsü: iki farklı megnifikasyonda (A: 20000x ve B: 50000x), temel gümüş dağılımı (base scatter) (C ve D) ile birlikte: AgNO <sub>3</sub> konsantrasyonu 10 mM, 2 saat ve yüksek şiddet.....	81
<b>Şekil 4.25.</b> AgNPLeri yüklenmiş PCL nanofiber matrisin SEM görüntüsü: iki farklı megnifikasyonda (A: 20000x ve B: 50000x), ve temel gümüş dağılımı (base scatter) (C ve D) ile birlikte: AgNO <sub>3</sub> konsantrasyonu 5 mM, 2 saat ve yüksek şiddet.....	81
<b>Şekil 4.26.</b> AgNPLeri yüklenmiş PCL nanofiberin SEM görüntüsü: iki farklı megnifikasyonda (A: 20000x ve B: 50000x), ve temel gümüş dağılımı (base scatter) (C ve D) ile birlikte: AgNO <sub>3</sub> konsantrasyonu 0,5 mM, 2 saat ve yüksek şiddet. ....	82
<b>Şekil 4.27.</b> AgNPLeri yüklenmiş PCL nanofiberin SEM görüntüsü: iki farklı megnifikasyonda (A: 20000x ve B: 50000x), ve temel gümüş dağılımı (base scatter) (C ve D) ile birlikte: AgNO <sub>3</sub> konsantrasyonu 0,1 mM, 2 saat ve yüksek şiddet. ....	82

<b>Şekil 4.28.</b> AuNPLeri yüklenmiş PCL nanofiberin SEM görüntüsü: iki farklı megnifikasyonda (A: 20000x ve B: 50000x), ve temel altın dağılımı (base scatter) (C ve D) ile birlikte: H <sub>AuCl</sub> <sub>4</sub> konsantrasyonu 0,1 mM, 2 saat ve yüksek şiddet. ....	83
<b>Şekil 4.29.</b> AuNP'leri yüklenmiş PCL nanofiberin SEM görüntüsü: iki farklı megnifikasyonda (A: 20000x ve B: 50000x), ve temel altın dağılımı (base scatter) (C ve D) ile birlikte: H <sub>AuCl</sub> <sub>4</sub> konsantrasyonu 0,05 mM, 2 saat ve yüksek şiddette. ....	84
<b>Şekil 4.30.</b> AuNPLeri yüklenmiş PCL nanofiberin SEM görüntüsü: iki farklı megnifikasyonda (A: 20000x ve B: 50000x), ve temel altın dağılımı (base scatter) (C ve D) ile birlikte: H <sub>AuCl</sub> <sub>4</sub> konsantrasyonu 0,01 M, 2 saat ve yüksek şiddet. ....	84
<b>Şekil 4.31.</b> AuNPLeri yüklenmiş PCL nanofiberin SEM görüntüsü: iki farklı megnifikasyonda (A: 20000x ve B: 50000x), ve temel altın dağılımı (base scatter) (C ve D) ile birlikte: H <sub>AuCl</sub> <sub>4</sub> konsantrasyonu 0,001 mM, 2 saat ve yüksek şiddet. ....	85
<b>Şekil 4.32.</b> AuNPLeri yüklenmiş PCL nanofiber SEM görüntüsü: iki farklı megnifikasyonda (A: 20000x ve B: 50000x), ve temel altın dağılımı (base scatter) (C ve D) ile birlikte: AuNP konsantrasyonu 0,1 mM, 2 saat ve yüksek şiddet. ....	86
<b>Şekil 4.33.</b> AuNPLeri yüklenmiş PCL nanofiberlerinin SEM görüntüsü iki farklı megnifikasyonda (A: 20000x ve B: 50000x), ve temel altın dağılımı (base scatter) (C ve D) ile birlikte: AuNP konsantrasyonu 0,05 mM, 2 saat ve yüksek şiddet. ....	86
<b>Şekil 4.34.</b> AuNPLeri yüklenmiş PCL nanofiber SEM görüntüsü: iki farklı megnifikasyonda (A: 20000x ve B: 50000x), ve temel altın dağılımı (base scatter) (C ve D) ile birlikte: AuNP konsantrasyonu 0,01 mM, 2 saat ve yüksek şiddet. ....	87
<b>Şekil 4.35.</b> Yüzeylerine AgNPLeri yüklenmiş PCL nanofiber matrislerin raman spektrumları.....	88
<b>Şekil 4.36.</b> Yüzeylerine AuNPLeri yüklenmiş PCL nanofiber matrislerinin raman spektrumları.....	89
<b>Şekil 4.37.</b> Yüzeylerine AuNPLeri yüklenmiş PCL nanofiber matrislerinin raman spektrumları.....	90
<b>Şekil 4.38.</b> Dino-Lite Digital microscope ile PCL ve altın ve gümüş indirgenmiş nanofiberlerin flüoresan görüntüleri. ....	92
<b>Şekil 4.39.</b> PSARON 1000, Tam Otomatik 3D Dijital Mikroskop Sistemi PCL ve altın ve gümüş indirgenmiş nanofiberlerin görüntüleri. ....	93

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<sup>1</sup> H-NMR	Hidrojen nükleer manyetik rezonans
AgNP	Gümüş nanopartikül
Ar	Argon
AuNP	Altın nanopartikül
CS	Kitosan
CS-g-PCL	Kitosan-graft-polikaprolakton
CS-g-PCL/PCL	Kitosan-graft-PCL-blend-PCL
DA	Asetilasyon derecesi
DMF	N,N-dimetilformamid
EG	Etilen glikol
Fe(acac) <sub>3</sub>	Demir (III) asetilasetonat
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi
GPC	Jel geçirgenlik kromatografisi
LbL	Katman-tabaka
MB	Metilen mavisi
MFR	Moleküler fraksiyon oranı
Mp	En yüksek tepe noktası molekül ağırlığı
MRI	Manyetik rezonans görüntüleme
MW	Molekül ağırlığı
Mw/Mn	Polidispersite/ heterojenlik indisi
Mz	Daha yüksek ortalama moleküler ağırlıkları
NMR	Nükleer manyetik rezonans
NP	Nanopartikül
PCL	Polikaprolakton
PEG	Polietilen glikol
PSO	Parçacık sürüsü optimizasyonu
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SERS	Yüzey zenginleştirilmiş raman spektroskopisi
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu
Tg	Camsı geçiş sıcaklığı
TGA	Termogravimetrik analizi

TSA	Triptik Soy Agar
TSB	Triptik Soy Broth
UV-Vis	Morötesi-görünür
XPS	X-ışını fotoelektron spektroskopisi
XRD	X-ışını kırınımı

# 1. GİRİŞ

Günümüzde antibakteriyel özelliğe sahip nanoyapılı matrisler ve patojen bakterilerin tanısı için immobilizasyon sağlama özelliği olan nanoesalı nanoyüzeylerin üretimi tıp, gıda ve gıda ambalajı alanlarında büyük önem taşımaktadır. Tanı uygulamalarında kullanılan polimerik matrisler çok farklı doğal veya sentetik polimerler, polimer karışımları ve kopolimerleri kullanarak üretilmektedir. Ayrıca bakteri veya bakteri tanısında kullanılacak ajanların immobilizasyonunu sağlamak için bu yüzeylerin katyonik yapıya sahip olmaları önemlidir. Immobilizasyon sağlamak için bu çalışmalarda kullanılan polimer veya polimer karışımlarının pozitif yük taşımaları önemli karakterlerdir [1]. Matrislerin hazırlanması için farklı polimer işleme teknikleri kullanılabilir ve matrisler film halinde oluşturulur. Bakterilerin, antibakteriyel özellik taşıyan gruplar veya ajanlarla etkili şekilde temas sağlaması için matrislerin yapıları çok önem taşımaktadır. Günümüzde nanoyapılı oluşumlar (çok yüksek yüzey/hacim oranları nedeniyle) güçlü etkileşim sağlamak açısından en yaygın çalışma konusudurlar. Nanoyapılı matrisler arasında nanofiberler en yaygın kullanılan matrislerdendirler. Nanofiber üretimi için bir çok yöntem (çizim yapmak, şablon sentezi, faz ayrımı, Kendiliğinden montaj ve elektroçirime gibi) kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında, çeşitli polimerlerden kontrol edilebilir morfoloji ile pürüzsüz nanofiberlerin hazırlanması için elektroçirime basit ve güvenilir bir teknik olarak kullanılmaktadır [2]. Elektroçirime prosesinde uygun polimer seçimi en önemli aşamadır. Sentetik polimerler arasında, polikaprolakton (PCL), tıp, gıda ve ambalaj alanında en çok kullanılan polimerlerdendir. PCL nanofiber matris üretimi için en uygun polimerlerdendir ve dünya genelinde bir çok araştırma gurubu tarafından nanofiber üretimi için kullanılmaktadır [3,4]. PCL'nin en büyük dezavantajı nötr bir yapıya sahip olmasıdır. Bu nedenle sadece PCL'den oluşan matrislerin kullanımı çok sınırlıdır [5]. Antibakteriyel özellik ve katyonik yapıya sahip önde gelen polimerlerden biri kitosan (CS)'dir. CS antibakteriyel özelliği ve katyonik yapısı nedeni ile tıp ve gıda alanında büyük ilgi görmektedir [6-8], ancak kırılkan yapısı nedeni ile nanofiber üretiminde tek başına kullanılmamaktadır. Bir çok çalışmada CS ve PCL'nin avantajlarını birleştirmek ve dezavantajlarını azaltmak veya ortadan kaldırmak amacı ile, bu iki polimer nanofiber üretimi için birlikte kullanılmıştır [9-13]. Bu çalışmalarda öne çıkan en büyük problem CS ve PCL için ortak çözücü bulmasıdır. CS sulu asidik

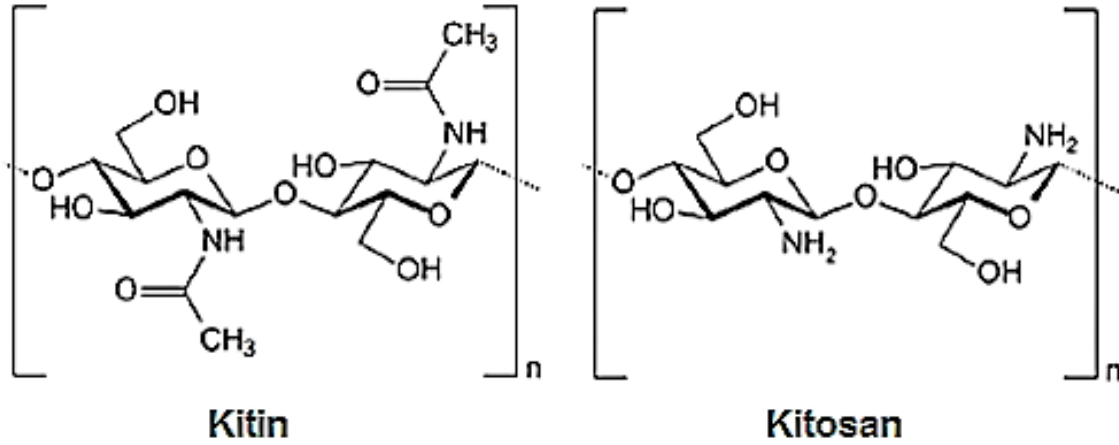
ortamlarda çözünürken PCL kloroform gibi organik çözücülerde çözünmektedir. Bu nedenle CS ve PCL karışımları oluşturmak için çok pahalı çözücü karışımları kullanılmıştır ki ekonomik açıdan büyük bir dezavantaj sayılır ve aynı zamanda bu çözücü karışımlarının toksik etkileri üretilen matrislerin kullanımını kısıtlamaktadır [5,12,13]. Çözücü problemini gidermek için kullanılan yaklaşım, graft kopolimerizasyon yöntemidir. Bu çalışmada graft kopolimerizasyon yöntemi kullanılarak CS zincirleri üzerine oligo-PCL zincirleri graft edilmiştir. Böylece elde edilen CS-graft-PCL (CS-g-PCL) kopolimerler, PCL ile aynı çözücülerde çözünür hale gelir ve çözücü sorunu ortadan kaldırılmış olur. Bu çalışmada kullanılan polimerlerin (Kitosan, PCL ve graft kopolimerler) kimyasal yapıları ve moleküler ağırlıkları (MW) ve molekül ağırlığı dağılımları, fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi, hidrojen nükleer manyetik rezonans (<sup>1</sup>H-NMR) spektroskopisi, termogravimetrik analiz (TGA) ve jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) yöntemleri ile incelenmiş ve karakterize edilmiştir. Bu analizlerden elde edilen sonuçlar oligo-PCL zincirlerinin kitosan üzerine başarılı bir şekilde graft edildiğini kanıtlamaktadır. İkinci aşamada PCL ve kopolimerlerin karışımları oluşturularak elektroğirme yöntemi ile nanofiberler üretilmiştir. Elektroğirme için genelde araştırma gruplarında geleneksel şırıngalı elektroğirme sistemi kullanılmaktadır. Bu sistem sadece deneysel amaçlı kullanılan bir sistemdir ve ticari amaç için kullanılmamaktadır. Son yıllarda bir çok firma tarafından hem ticari hem de deneysel kullanım için elektroğirme cihazları üretilmiştir. Elmarco şirketi tarafından üretilen pilot ölçekli nanospider cihazı laboratuvar ortamında kullanmak için en uygun yeni nesil elektroğirme cihazlarından ve bu çalışmada şırıngalı elektroğirme cihazının yanı sıra bu cihaz da nanofiber üretimi için kullanılmıştır. Nanofiber matrislerin yapıları ve fiber çapları, hidrofilik ve hidrofobik özellikleri, yüzey kimyası, mekanik özellikleri sırasıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM), su temas açısı testleri, X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) ve mekanik test cihazı ile incelenmiştir. Nanofiber matrislerin antibakteriyel özellikleri iki farklı (gram pozitif ve gram negatif) bakteri kullanarak araştırılmıştır. Bununla birlikte nanofiber matrislerin yüzeylerinde biyofilm oluşumu da incelenmiştir. Ayrıca bir alternatif olarak hazır matrislerin yüzeyinde farklı özelliklere sahip gruplar yüklemek için bazı kimyasal yöntemler mevcuttur. Sonokimyasal indirgeme yöntemi polimerik filmlerin yüzeylerinde nanopartikül (NP) yüklemek için kullanılan bir yaklaşımdır. Nanofiber matrislerin yüzeylerine altın ve gümüş NPLeri yüklemek için bu yöntem kullanılmıştır ve bu

yüzey zenginleştirmenin sonuçları raman spektroskopisi ile incelenmiştir. SERS etkisi ilk olarak pürüzlü gümüş elektrot yüzeylerine adsorbe edilmiş piridinin yüksek derecede güçlü Raman sinyalleri olarak gözlemlenmiştir [14-17]. Toplamda ortalama 1 milyon kat ( $10^6$ ) kadar arttırma olduğu bildirilmiştir, ancak arttırmaların yüzey boyunca oldukça heterojen olduğu bilinmekte olup, bazı yüzey alanlarının 1 milyar kat ( $10^9$ ) kadar arttırma faktörüne sahip olabileceğini düşündürmektedir [18-20]. Tez kapsamında yüzeylerine altın ve gümüş yüklenmiş nanofiberlerin SERS spektrumları elde edilmiş ve en yüksek SERS piklerine sahip yüzeyler flüoresan boya ile boyanarak *E. coli* ATCC 25922 bakteri suşu üzerinde etkileri incelenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kitin ve Kitosan

Kitin veya poli ( $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-N-asetil-D-glukozamin), ilk defa 1884'de tanımlanan, önemli bir doğal polisakarittir. Bu biyopolimer, çok sayıda canlı organizma tarafından sentezlenir [21] ve selülozdan sonra en çok bulunan doğal polimerdir. Kitin, eklem bacaklıların dış iskeletinde veya mantarların ve mayaların hücre duvarlarında yapısal bileşenleri oluşturan düzenli kristalin mikrofibriller şeklinde bulunur. Endüstriyel işlemede, kitinin ekstraksiyonu için asit işleme ile kabuktaki kalsiyum karbonat çözünür ve ardından proteinlerin çözünmesi için alkalın çözelti kullanılır. Kitin, farklı konformasyonlara dönüşürken ufalanır ve az çözünürdür. Çözünürlük sorunu, hem kitinin işlenmesinde, hem de kullanımında ve karakterizasyonunda çok önemli bir sorundur. Kitin, alkalın koşullar altında kısmi deasetilasyon yoluyla kitosana dönüştükten sonra daha fazla uygulama alanına sahip olur [22-24]. Kitosan,  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-N-asetil-D-glukosamin (molar fraksiyonu: DA), ve  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glukozamin (molar fraksiyonu (1-DA)), içeren rasgele bir kopolimerdir (Şekil 2.1) [25]. Kitosanın asetilasyon derecesi, N-asetillenmiş birimlerin molar fraksiyonu (DA) veya asetilasyonun yüzdesi (%DA) ile belirlenir.



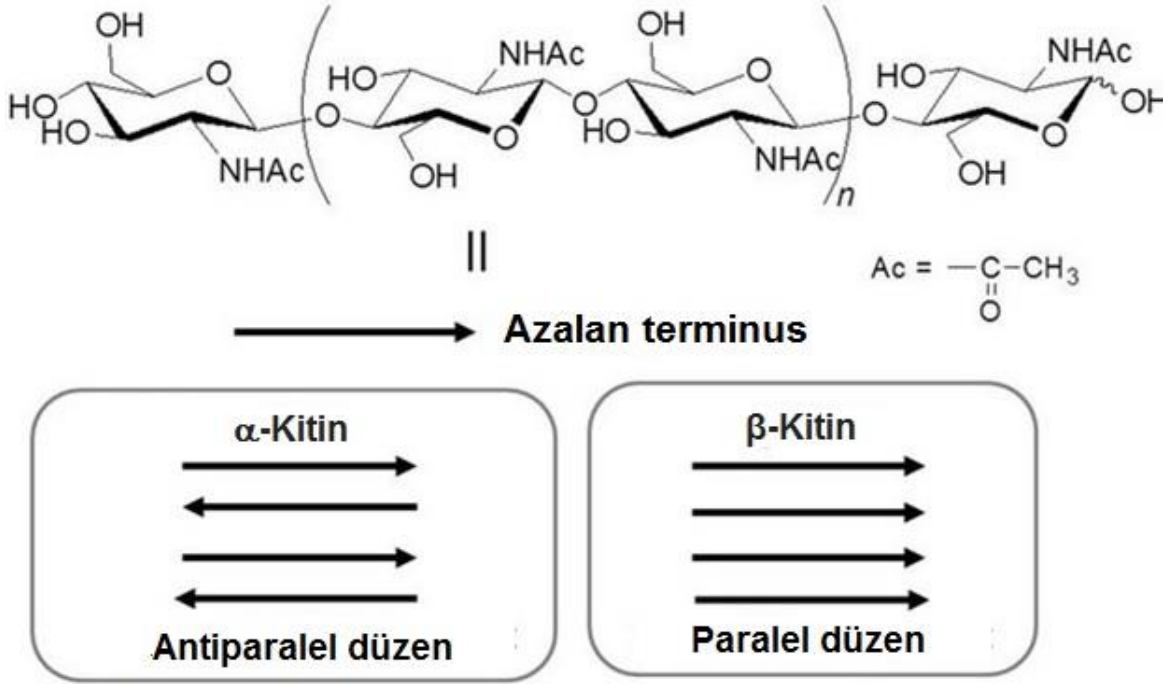
Şekil 2.1. Kitin ve Kitosan [25].

#### 2.1.1. Kitinin Morfolojisi

Kaynağına bağlı olarak, kitin iki allomorf, yani  $\alpha$  ve  $\beta$  formları [26,27] olarak ortaya çıkar ve X-ışını kırınımı (XRD) ile birlikte kızılötesi (IR) ve katı hal nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopileri ile ayırt edilebilir. Katı halde, kitin zincirleri, şişme, çözünürlük ve reaktiviteyi kontrol eden hidrojen bağlarının oluşturduğu ağlar tarafından toplanır.



Kitin iki izomorfa sahiptir:  $\alpha$ -kitin ve  $\beta$ -kitin.  $\alpha$ -kitin izomorfuna kadar en bol miktarda bulunan kitin izomorfudur [28]; İki izomorfun kristalografik parametreleri,  $\alpha$ -kitinde birim hücre başına iki adet antiparalel molekülün olduğunu, ancak  $\beta$ -kitin içinde sadece bir tane molekülün paralel bir biçimde olduğunu göstermektedir (Şekil 2.2) [29]. Bu iki izomorf yapıda, zincirler levhalar şeklinde düzenlenmiş ve levha içi hidrojen bağları ile tutulmuştur.



**Şekil 2.2.**  $\alpha$ -kitin ve  $\beta$ -kitin [29].

Buna ek olarak,  $\alpha$ -kitinin kristal yapısında görünen tabakalar arası hidrojen bağları, küçük moleküllerin kristalin faza difüzyonunu önler.  $\beta$ -kitinin kristal yapısında tabakalar arası hidrojen bağları bulunmamaktadır. Sonuç olarak, hem  $\alpha$  hem de  $\beta$  formları tüm yaygın solventlerde çözünmez ve bu çözünmezlik, kitinlerin işlenmesi ve uygulamalarının geliştirilmesi için büyük bir sorundur.

### 2.1.2. Kitosan

Kitosan terimi genellikle, kitinin deasetilasyonundan sonra değişen derecelerde elde edilen bir polimer ailesini belirtir. Aslında, asetilasyon derecesi, iki kalıntı türü arasındaki dengeyi yansıtır (Şekil 1.1.), ve kitin ile kitosanı ayırt eder. DA (mol yüzdesi olarak ifade edilir) %50 mol'dan düşük olduğunda, ürün kitosan olarak adlandırılır ve asidik sulu solüsyonlarda çözünür hale gelir [30]. Deasetilasyon esnasında, asetil grupları çıkarılır fakat ayrıca, kitosanın MW'indeki değişikliklerle gösterilen, depolimerizasyon reaksiyonunda oluşur.

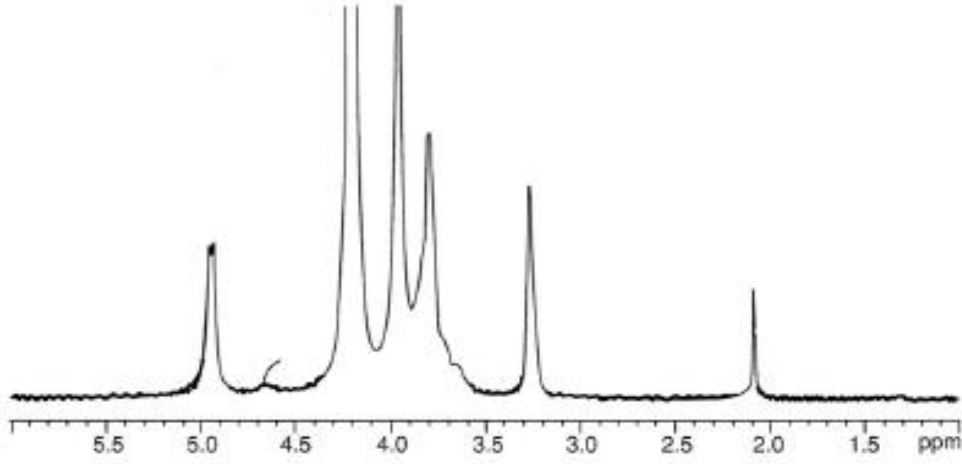
Kitin enzimatik preparatlar [31-33] veya kimyasal prosesler [34,35] ile kitosana dönüştürülebilir. Kimyasal yöntemler, maliyetlerinin düşük olması ve seri üretime uygun oldukları nedeniyle, kitosan üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadırlar [35].

### **2.1.3. Kitosanın Karakterizasyonu ve Çözünürlüğü**

Kitinin kısmen deasetilasyonu sonucu üretilen kitosan, sulu asidik ortamlarda (ortalama asetilasyon derecesi 0.5'in altında olduğunda) çözünür hale gelir. Aslında, bu sonuç asetil gruplarının kitosan zincirleri boyunca dağılımlarına bağlıdır. Bu aşamada, polimerin büyük ölçüde karakterizasyonunu incelemek mümkündür, ancak başlangıç kitin subestradından farklı olabilir, özellikle de güçlü alkalik ortamda deasetilasyon yapılması sırasında polimerin molekül ağırlığı azalmaktadır. Çözelti halinde olan kitosanın fiziksel özellikleri güçlü bir şekilde DA'ya ve zincirler üzerinde asetil grupların dağılımına bağlıdır. Katı kitin üzerinde gerçekleşen heterojen deasetilasyonu sonucu asetil gruplarının blok-bazlı dağılımı, seyrek çözeltilerde bile zincir birleşmesine, agregat oluşumuna ve yanısıra molekül ağırlığının belirlenmesindeki güçlüklerle sebep olmaktadır [36,37]. Ek olarak, asidik ortamlarda çözünen ve asetil gruplarının rastgele bir dağılımını elde etmek için (DA 0.6'ya kadar) tamamen deasetilenmiş kitosanın homojen fazda reasetilize edilmesi mümkündür [38]. Bu ortamlarda zincir boyunca D-glukozamin birimlerinin C-2 pozisyonunda bulunan serbest -NH<sub>2</sub> gruplarının varlığı, homojen ortamda spesifik reaksiyonlara izin verir [39-42]. Kitosanın karakterizasyonunda ilk adım, MW (çözünür halinde), daha sonra DA ve nihayet NMR ile zincir boyunca asetil grubunun dağılımının belirlenmesidir. Ek olarak, kitosanın çözünmesi için farklı asetik asit bazlı çözücüler önerilmiştir, örneğin: Sulu ortamdaki sodyum asetata (0.1 veya 0.2 M'ye kadar) 0.3 M asetik asit eklenmiştir. Yüklü zincirlerin arasındaki uzun mesafede etkili olan elektrostatik iticileri örtmek için harici bir tuzun varlığı gereklidir. Kitosan aynı zamanda asetik asit veya hidroklorik asit çözeltilerinin 6'dan düşük pH'larında çözünür hale gelir (iç pK değeri 6.5 civarındadır) [21].

Kitosanın ortalama DA değerini belirlemek için, infrared spektroskopisi [43], elementer analiz ve potansiyometrik titrasyon gibi farklı teknikler kullanılabilir, ancak sıvı hal <sup>1</sup>H-NMR [44] ve katı hal <sup>13</sup>C-NMR [45,46] tercih edilir. Kızılötesi spektroskopisi dikkatli bir şekilde kullanılmalıdır, zira sonuçların yorumu, uygun bir taban hattının benimsenmesindeki zorluklarla ilgilidir. Bu problem, daha önce farklı DA'lara sahip olan numuneler için de tartışılmıştır [43]. Halihazırda, <sup>1</sup>H-NMR, çözünebilir

numuneler için doğru DA bulmak için en uygun yöntem olarak gözükmektedir. Bir örnek, Şekil 2.3'de [25] verilmiştir. Buna ek olarak,  $^{13}\text{C}$  NMR, katı haldeki ve sıvı fazdaki ölçümler arasında iyi bir uyum sağlayarak, saf haldeki kitinden tamamen deasetile edilmiş kitosana kadar DA'nın saptanması için de uygundur (Şekil 2.4) [45]., Kitosan zincirleri boyunca asetil gruplarının dağılımını saptamak için yüksek alanlı  $^{13}\text{C}$ -NMR spektroskopisi çok önemlidir [47].

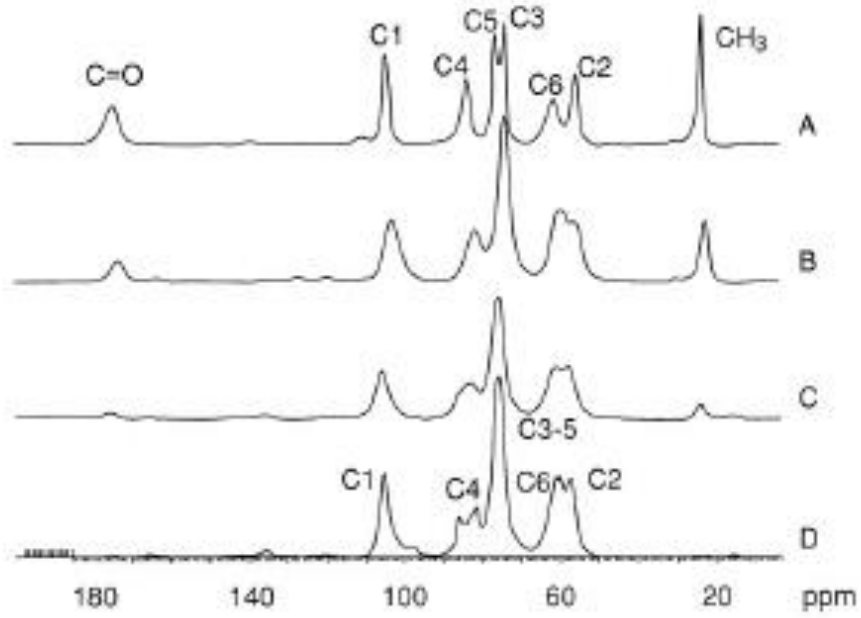


**Şekil 2.3.** pH 4'de, T=85°C'de ve polimer konsantrasyonu 5 g/L'de D20'da DA = 0.06 olan kitosanın  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu. 4.9 ppm'lik sinyaller, D-glukozamin biriminin H-1'i için, 4.7 ppm'de H-1 N-asetil-D-glukosamin için, 3.2 ppm'de H-2 için ve 2.1 ppm'de  $-\text{CH}_3$  için (DA elde etmeye izin veren asetil grubu) [25].

Ayrıca, kitosanın ortalama molekül ağırlığı (MW) ve molekül ağırlığı dağılımı ve içsel viskozitesi çok önemlidir. Ancak, kitosan çözeltisi agrega oluşturmamalıdır, ve bu nedenle kitosanın çözücüsü dikkatli bir şekilde seçilmelidir.

Kitosanın viskometrik ortalama molekül ağırlığı, içsel viskoziteden (agregatların küçük parçacıklarının daha düşük etkisi ile) Mark-Houwink ilişkisi ( $[\eta] = KM^a$ ) ile hesaplanmıştır [21]. K ve a parametrelerini belirlemek için, ışık saçma tekniği ile mutlak MW hesaplanmalıdır; yine de, hesaplanan değer agrega oluşumuna karşı yüksek hassasiyete nedeniyle genede fazla tahmin edilmektedir [36,37]. Bu eserler karışımda agrega oluşturmeyen çözücüler (örneğin 0.3M asetik asit / 0.2M sodyum asetat (pH = 4.5) çözücüsü) kullanılarak atlanabilir [48].

Bu koşullarda, mutlak MW değerleri, viskozimetre ve ışık saçılma dedektörü ile donatılmış, Mark-Houwink parametrelerini belirlemeye izin veren sterik dışlama kromatografisinden (SEC) elde edilmiştir ve ayrıca dönme yarıçapı ile moleküler ağırlık arasındaki ilişki de elde edilmiştir [49]. K (mL/g) ve a parametreleri 25°C'de sırasıyla  $7.9 \times 10^{-2}$  ve 0.796 elde edilmiştir.



**Şekil 2.4.** (A)  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu (A) kitin ve kitosanlar; (B) homojen reasetilasyon ile elde edilen DA = 0.60; (C) Pronova'dan ticari kitosan DA = 0.2; (D) tamamen deasetillenmiş kitin [45].

Burada a parametresi için elde edilen nispeten yüksek değerler, bu polisakkaritin boyutlarını, hidrodinamik hacmini ve viskometrik katkısını kontrol eden yarı-sert karakteriyle uyumludur. Sertlik, zincirin kalıcılık uzunluğu ( $L_t$ ) ile ilişkilidir: asidik ortamdaki kitosan bir polielektrolit gibi davranır, bu nedenle belli bir iyonik konsantrasyonda gerçek toplam kalıcılık uzunluğu  $L_t$ , içsel katkı uzunluğu ( $L_p$ ) ve elektrostatik katkı uzunluğu ( $L_e$ ) ile eşittir [50]. Farklı deasetilasyon derecelerine sahip kitinin konformasyon analizi, kitin ve kitosanın, molekülün asetilasyon derecesine orta derecede bağlı bir kalıcılık uzunluğu  $L_t$  ile karakterize edilen yarı sert polimerler olduklarını teyit etmiştir. Bu analizler sonucunda, asetil grupları olmayan kitosanın, tuz fazlalığında 9 nm'lik bir içsel kalıcılık uzunluğu ( $L_p$ ) olduğu belirlenmiştir [51]. DA yükseldiğinde (DA = 0.6'ya kadar)  $L_p$  12.5 nm'ye kadar artar, ve daha sonra 25°C'de saf kitine kadar sabit kalır. Bu tahminler, SEC [49] ile elde edilen değerlerle uyumludur.

#### 2.1.4. Kitosan Esaslı Maddelerin İşlenmesi ve Ana Özellikleri

Asidik ortamda elde edilen kitosan çözeltileri, gereken konformasyona göre işlenir (film için dökülür, lifler haline döndürülür, süngerler için dondurularak kurutulur v.b.), bir alkalın solüsyonuna (çökeltildiği yerde) daldırılır, yıkanır ve kurutulur. Kitosanın işlenmesi, kitinden daha kolaydır, ancak elde edilen malzemelerin stabilitesi, kitosanın daha yüksek hidrofilik özelliği ve özellikle pH hassasiyeti nedeniyle daha

düşüktür. Daha iyi kararlılık için, kitosan, epiklorohidrin, diizosiyanat, 1,4-bütandiol diglisidil eter veya glutaraldehit gibi reaktifler kullanılarak çapraz bağlanabilir [52,53]. Pek çok kitosan hidrojelleri oksalik asit [54,55] veya sitrik asit [56,57] veya tripolifosfat [58] gibi polivalan anyonlarla işlenerek elde edilmiştir. Karışımlar ve kompozitler bazen asidik ortamlarda kitosanın polikatyonik özelliklerinden faydalanarak elde edilir.

Aslında, polielektrolit özelliği olan kitosan, karşı yüklü makromoleküller ile ilginç elektrostatik kompleksler (hidrojeller) oluşturabilmektedir. Bu kompleks materyallerin özellikleri polimer konsantrasyonu, sıcaklık, pH ve iyonik konsantrasyona bağlıdır. Sentetik veya doğal polimerlerle kompleksleşmiş kitosan içeren elektrostatik polielektrolit kompleksler (PEC), literatürde belirtilmiştir [24]. Kitosan ile lipidik veziküller arasındaki elektrostatik etkileşimler, kitosanın biyoyapışkan ve geçirgen rolleri nedeniyle biyolojik ve farmasötik alanlarda da önemlidir [59-61]. Lipozomların kitosan ile kaplanması aynı zamanda biyoyumluluklarını da artırır ve bileşik membranını pH ve iyonik konsantrasyona karşı dengeler [60].

Günümüzde, bu elektrostatik etkileşimler, yüklü biyoyumlu polisakaritler veya kitosan / sentetik polielektrolitler temelli katmanlı polielektrolit kapsüller veya filmlerin hazırlanması için uygulanmaktadır [62,63]. Çekirdek-kabuk fosfolipid nanopartikülleri, anyonik alginat ve katyonik kitosan katmanları halinde, kendi kendiliğinden oluşma yoluyla, stabilize edilmiş ve protein salınımı için önerilmiştir [62].

### **2.1.5. Kimyasal Yapı ve Biyolojik Aktiviteler Arasındaki İlişki**

Kitosan ve türevlerinin, biyoyumluluk, biyobozunurluk, güvenlik ve ilginç biyolojik etkiler gibi birçok faydalı özelliğe sahip oldukları nedeniyle, özellikle biyomedikal, gıda, biyoteknoloji ve farmasötik alanlarındaki uygulamalarına büyük önem verilmektedir [63,64]. Cazip biyolojik faaliyetleri arasında antimikrobiyal, antioksidan ve antitümör faaliyetler en önemli biyolojik özelliklerindedir. Bu özellikler, kitosanın iyi film oluşturma özellikleri ile birlikte gıda muhafaza ve ambalajlama alanında (kimyasal koruyucuların kullanılmasını önlemek ve yenilebilir antimikrobiyal filmler üretmek için) kullanımlarını özel olarak önermektedir. İyi antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerine sahip bir polimerik bileşen olan kitosan, koruyucu filmde kolaylıkla çıkmaz ve daha iyi bariyer özelliklerine sahiptir [65-67].

Friedman ve ark. [65] tarafından solüsyonda, tozlarda ve yenilebilir filmlerde kitosanın antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir ve çeşitli gıda kategorilerinde gıda kaynaklı patojenlere, bozulma bakterilerine ve patojenik virüslere ve mantarlara karşı kaplama yapılmıştır. Bunlara meyve suları, yumurta ve süt, tahıl, et ve deniz ürünleri dahildir. Bu çalışmalar düşük moleküler ağırlıklı kitosanların, 6.0'in altındaki pH değerlerinde, sıvı ve katı gıdalarda istenilen antimikrobiyal ve antioksidatif koruyucu etkilere ulaşmak için en uygun ortamı sunduklarını önermektedir. Gıda endüstrisinde kitosan ve türevlerin kullanımı da ayrıca bir review makalesinde Kardas ve ark [66] tarafından anlatılmıştır. Bu biyopolimerlerin, gıdaların mikrobiyal bozunumdan ve biyolojik olarak parçalanabilir filmlerin oluşumundan korunması da dahil olmak üzere geniş bir ölçüde eşsiz uygulamalar sunduğunu gösterdiler. Alishahi ve Aider [67] ambalaj uygulamasındaki kitosan filmlerinin yağ difüzyonuna ve seçici gaz geçirgenliğine direnç gösterme eğiliminde olduğunu bildirmişlerdir. Fakat, su ve su buharı iletimine olan az dirençlerinden dolayı sakıncalar vardır. Bu davranış esas olarak kitosan gibi moleküllerde su molekülleri ile yüksek etkileşime yol açan güçlü hidrofilik özellikten kaynaklanmaktadır [68]. Bu nedenle, polimer karışımları oluşturmak veya biyolojik bileşimlerin ve çok tabakalı sistemlerin kullanılması, kitosana dayalı biyoaktif kaplamaların hazırlanması için potansiyel yaklaşımlardır.

#### **2.1.6. Kitosanın Antimikrobiyal Aktivitesi**

Kitosanın yüksek antimikrobiyal aktivite, çok geniş bir aktivite spektrumuna, yüksek bir öldürme hızına ve memeli hücrelerine karşı daha düşük toksisiteye sahip olması nedeniyle diğer dezenfektanlara göre çok daha avantajlı olduğu gösterilmiştir [69,70]. Birçok çalışma, kitosanın önemli bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, gerçek inhibisyon mekanizması henüz tam olarak anlaşılammıştır. En makul hipotez, pozitif yüklü polisakarit (pH 6.5'in altında kitosan) ile negatif yüklü membran arasındaki etkileşime bağlı olarak hücre geçirgenliğinde bir değişikliktir. Bakteriyel büyümenin engellenmesinin altında yatan mekanizma, pozitif yüklü polimerin, hücre yüzeyi üzerinde N-asetilmuramik asit, sialik asit ve nöraminik asit gibi anyonik bileşenlerle birleşmesi olmalıdır.

Öncelikle, kitosanın antibakteriyel aktivitesi ile ilgili olarak, kitosan ve türevlerinin olası eylemleri önerilmiştir. Kitosan (özellikle düşük MW partikülleri) bakterilerin hücre duvarına nüfuz edebilir, DNA ile birleşebilir ve mRNA sentezini ve DNA

transkripsiyonunu inhibe edebilir [71]. Yüksek MW'lı kitosan, hücre yüzeyi ile etkileşebilir ve dolayısıyla hücre geçirgenliğini değiştirebilir [72], ya da hücrenin etrafına geçirimsiz bir tabaka oluşturarak gerekli çözünen maddelerin hücre içine taşınmasını engelleyebilir [73,74]. Chung ve ark. [75], antibakteriyel mekanizmanın hidrofilitik özellik, hücre yüzeyinin negatif yükü ve bakteriyel hücre üzerine kitosanın adsorbe etmesini içerdiğini doğrulamıştır. Onlar hücre duvarının hidrofilitikliğinin ve hücre yüzeyinin negatif yükünün gram-negatif bakterilerde gram-pozitif bakterilere kıyasla daha yüksek olduğunu ve ek olarak negatif yüklerin hücre yüzeylerine dağılımının gram-pozitiflerden oldukça farklı olduğunu gösterdiler. Daha sonra, asidik koşullarda, daha negatif yüklü hücre yüzeyleri, pozitif yüklü kitosan ile daha fazla etkileşime girer. Sonuçlar, adsorbe edilen kitosan ile inhibisyon etkinliği arasında yüksek bir korelasyon katsayısı değeri olduğunu göstermektedir. Ayrıca, birçok başka araştırma, kitosanların gram negatif bakteriler için gram-pozitif bakterilere göre daha etkili olduklarını göstermektedir [76-78].

Üstelik adsorbe edilen kitosanın miktarı çevresel pH değerlerine (pH <6.5) ve kitosanın asetilasyon derecesine bağlı olduğu da bildirilmiştir [78-80]. Kitosan, deasetillenmiş grupların (1-DA) fraksiyonu ile ilişkili olarak, pozitif iyonik yükün artışından dolayı, daha düşük pH'larda bakteri hücreleri tarafından daha fazla absorbe edilir. Literatürde, kitosanın antibakteriyel aktivitesi ile özellikleri arasında, özellikle DA ile, açık bir şekilde doğrudan bir ilişki olduğu gösterilmiştir. DA'nın kitosanın antimikrobiyal aktivitesi üzerindeki etkisi açık bir şekilde gösterilmiştir [81]. Bu verilerde, daha düşük DA, daha düşük MW ve daha düşük pH'nın, daha büyük verimlilik sağladığı açıkça gösterilmektedir.

Buna ek olarak, MW'nin etkisi Zheng ve ark. [82] tarafından açıklanmıştır. Kitosan'ın *Staphylococcus aureus* (gram pozitif) ve *Escherichia coli* (gram negatif) üzerindeki etkisini ayırt edilmiştir. Gram-pozitif *S. aureus* için, kitosanın moleküler ağırlığının artmasıyla antimikrobiyal aktivitenin arttığı gösterilmiştir. Bunun aksine, gram-negatif *E. coli* için, antibakteriyel aktivitenin moleküler ağırlığın azalmasıyla arttığı gösterilmiştir. Sonuç olarak kitosanın antimikrobiyal aktivitesi için aşağıdaki iki mekanizmayı önermişler: *S. aureus* konusunda, hücrenin yüzeyindeki kitosan, besleyicilerin hücrenin içine girmesini engelleyen bir polimerik membran oluşturur ve *E. coli* için, daha düşük bir moleküler ağırlığına sahip kitosan yayılım yoluyla hücreye girer.

MW'nin etkisi Benhabiles ve ark. [83] Tarafından da kitin ve kitosan oligomerlerinin

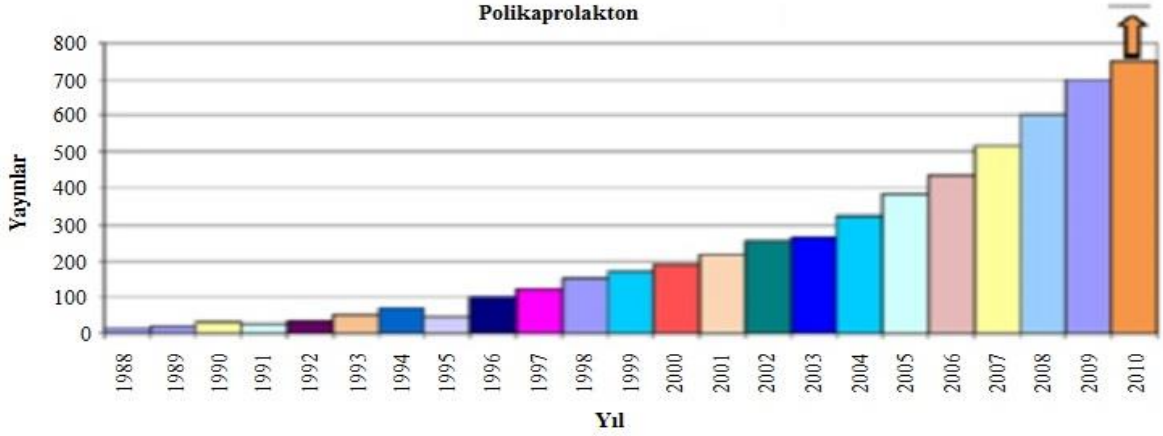
hazırlanması ile tartışılmıştır. Bu oligomerlerin antimikrobiyal aktiviteleri dört gram pozitif ve yedi gram negatif bakteriye karşı başlangıç kitosan ve kitin ile mukayese edilmiştir. Bu deneyler neticesinde kito-oligomerlerin, doğal polisakaritlere göre daha yüksek aktivite gösterdikleri ve daha fazla suda çözünürlükleri nedeniyle yeni antimikrobiyal ajanlar olarak avantajlara sahip oldukları sonucuna varmışlardır.

## **2.2. Polikaprolakton (PCL)**

Polikaprolakton (PCL), 1930'ların başında Carothers grubu tarafından sentezlenen en eski polimerlerdendir [84]. Mikroorganizmalar tarafından bozunabilen sentetik polimerlerin tespit edilmesine yönelik çalışmaların ardından piyasaya sürülmüştür [85]. PCL, çeşitli anyonik, katyonik ve koordinasyon katalizörleri kullanılarak  $\epsilon$ -kaprolaktonun halkal açılması polimerizasyonu ile ya da 2-metilen-1-3-dioksepanın serbest radikal halka açılması polimerizasyonu yoluyla hazırlanabilir [86]. PCL, hidrofobik, yarı kristalin bir polimerdir; Kristal yapısı molekül ağırlığı arttıkça azalma eğilimi gösterir. PCL'nin iyi çözünürlüğü, düşük erime noktası (59-64°C) ve olağanüstü karışım oluşturma uyumluluğu biyomedikal alanda potansiyel uygulamasına yönelik kapsamlı araştırmalara neden olmuştur [87-89]. Sonuç olarak, 1970'ler ve 1980'lerin yeniden emilebilir polimer patlaması sırasında, PCL ve onun kopolimerleri, bir dizi ilaç salım cihazında kullanılmıştır. Bu biyopolimerler, o sırada kullanılan diğer biyopolimerlere kıyasla, sayısız avantajları nedeniyle daha çok dikkat çektiler. Bu avantajlara, isteğe bağlı bozunma kinetikleri, mekanik özellikleri, doku içi büyümeye elverişli gözenek boyutlarını uygun hale getiren şekillendirme ve imalat kolaylıkları ve matrisleri içinde bulunan ilaçların kontrollü salım özellikleri de dahildir. Polimerin daha hidrofilik, yapışkan ya da biyolojik olarak uyumlu olmasını sağlamak için işlevsel gruplar eklenebilir, bu da uygun hücre tepkilerini sağlamaktadır. PCL, poliglaktid (PGA), poli d,l-laktit (PDLA) ve onun kopolimerlerinden daha yavaş bir hızda bozunması nedeniyle başlangıçta 1 yıldan fazla aktif kalan ilaç salım cihazlarında ve yavaş yavaş bozunan dikiş materyallerinde (Maxon™) kullanılmıştır. İlk dönemlerde bazı araştırmacıların ilgisini çekmesine rağmen, PCL kısa sürede polilaktitler ve poliglaktitler gibi emilebilir diğer polimerlerin popülerliği ile boğuldu; bu polimerler, polimer matrisine kapsüllenmiş ilaçlarda, günler veya haftalar içinde serbest bırakmasını talep eden ve implantasyondan 2-4 ay sonra eksiksiz rezorpsiyon uygulamalarında incelendiler. Tıbbi cihaz endüstrisi, biyolojik olarak parçalanabilir implantlar kullanarak metal



cihazların (plakalar, vidalar, çiviler, vb.) değiştirilmesi ile ilgileniyordu; Bununla birlikte PCL yüksek yük taşıması gereken uygulamalarda uygulanacak mekanik özelliklere sahip değildi. Ayrıca, hem tıbbi cihaz hem de ilaç salım topluluğu için daha çabuk emilebilir polimerlerin, uzun süreli bozunum (PCL için 3-4 yıla kadar) süresi olan polimerlerden daha az dezavantajları vardı; Sonuç olarak, PCL, neredeyse 20 yıldan daha uzun süre unutulmuştu.



**Şekil 2.5.** Son 20 yılda Nisan 2010'a kadar, Biyomalzemeler veya Doku Mühendisliği alanında PCL'yi kullanan yayınlar. Tahmini 2010 verileri de dahil edilmiştir. [90].

Doku mühendisliğinin doğuşu ve ilginin yeniden canlandırılması, PCL'i Şekil 2.5'de [90] grafiksel olarak gösterilen bir eğilim ile biyomalzeme alanına geri döndürdü. 1990'lı ve 2000'li yıllardaki bu büyük ilgi artışı, PCL'nin yeniden emilebilir polimer muadillerine göre daha üstün reolojik ve viskoelastik özelliklere sahip olduğunun farkına varılmasından kaynaklanmıştır. Gerçekte, PCL çok sayıda iskele üretim teknolojisinde kullanılabilir ve nispeten ucuz üretim yolları onu diğer alifatik poliesterlere göre oldukça avantajlı hale getirir. Ayrıca, PCL ile imal edilen bir dizi ilaç salım cihazının halihazırda FDA onayına ve CE işareti kaydına sahip olması pazarlamanın daha hızlı olmasını sağlıyor. İlginçtirki, açık avantajlarına rağmen, PCL yaygın olarak klinik uygulamalara girmemiştir.

### 2.2.1. PCL Sentezi ve Fiziko-Kimyasal Özellikleri

PCL, siklik monomer  $\epsilon$ -kaprolaktonun halka açılması polimerizasyonu ile sentezlenir ve 1930'lu yılların başlarından kullanılmaktadır [84]. Kalay oktoat gibi katalizörler  $\epsilon$ -kaprolaktonun polimerizasyon için kullanılmaktadır ( Şekil 2.6) [91,92] ve polimerin molekül ağırlığını kontrol etmek için düşük molekül ağırlıklı alkoller kullanılabilir [93].



**Şekil 2.6.**  $\epsilon$ -kaprolaktonun halka açılması polimerizasyonu [91].

PCL'nin polimerizasyonunu etkileyen çeşitli mekanizmalar vardır ve bunlar anyonik, kationik, koordinasyon ve radikal mekanizmalardır. Bu yöntemler elde edilen moleküler ağırlık (MW), molekül ağırlığı dağılımı, uç grup kompozisyonu ve kopolimerlerin kimyasal yapılarını etkilemektedir [88]. PCL,  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  camsı geçiş sıcaklığı (Tg) ve  $59\text{-}64\text{ }^{\circ}\text{C}$  arasında değişen erime noktasına sahip ve nispeten düşük sıcaklıklarda kristal yapısına sahip olduğundan dolayı kolay şekillendirilebilirlik sağlayan yarı kristalimsi bir polimerdir. PCL numunelerinin ortalama molekül ağırlığı genel olarak  $3000$  ila  $80.000\text{ g/mol}$  arasında değişebilir ve moleküler ağırlığına göre derecelendirilebilir [94]. PCL oda sıcaklığında kloroform, diklorometan, karbon tetraklorür, benzen, toluen, sikloheksanon ve 2-nitropropan içinde çözünür. PCL, aseton, 2-bütanon, etil asetat, N,N-dimetilformamid (DMF) ve asetonitril içinde düşük bir çözünürlüğe sahiptir ve alkol, petrol eteri ve dietil eterde çözünmez [95]. PCL, stres çatlama direnci, boyanabilirliği ve yapışmayı iyileştirme özelliklerinden dolayı diğer polimerlerle karışım oluşturamk kabiliyetine sahiptir ve selüloz propiyonat, selüloz asetat bütirat, polilaktik asit ve polilaktik asit-ko-glikolik asit gibi polimerler ile kombinasyon halinde mikrokapsüllerde ilaç salınım oranını değiştirmek için kullanmıştır [87]. 1970'lerde, PCL'nin özellikle karışım oluşturmaya elverişli olduğu ve PCL'e dayalı polimer karışımlarının üç uyumluluk tipi ile kategorize edildiği kabul edilmiştir [96]:

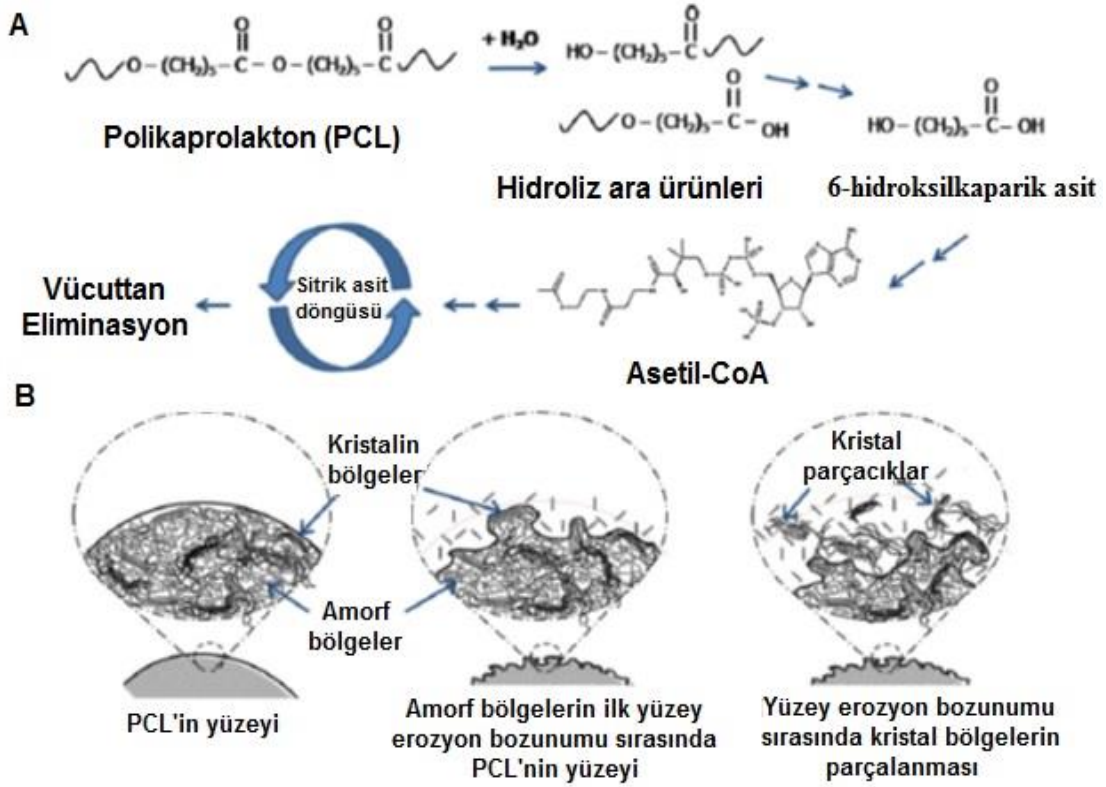
- 1- Yalnızca tek bir Tg sergileyen karışımlar;
- 2- Mekanik olarak uyumlu, her bileşenin Tg değerlerini sergilemekle birlikte üstün mekanik özelliklere sahip karışımlar;
- 3- Birbiriyle uyumsuz olarak, faz ayrılmış maddenin geliştirilmiş özelliklerini sergileyen karışımlar;

PCL'nin diğer polimerlerle uyumluluk oranı kullanılan oranlara bağlıdır ve genellikle salınım sistemlerinin geçirgenliği üzerinde daha iyi kontrol sahibi olmak için

kullanılır. PCL'nin kopolimerleri (blok ve rastgele), etilenoksit, polivinilklorür, kloropren, polietilen glikol, polistiren, diizosiyanatlar (üretanlar), tetrahidrofuran (THF), diglikolit, dilakit,  $\delta$ -valerlactone, ikame edilmiş kaprolaktonlar, 4-vinil anisol, stiren, metil metakrilat ve vinil asetat gibi birçok monomerler ile hazırlanabilir [88]. Engelberg ve Kohn tarafından, PCL ile birlikte çeşitli bozunabilir polimerlerin termal özellikler (Tg, kristalleşme, erime ve ayrışma noktaları), çekme mukavemeti, Young modülü, gerilme mukavemeti ve çekme esneme ve kırılma değeri ve mukavemet özellikleri gibi fiziko-mekanik özellikleri, inceleme ve karşılaştırma yöntemleri kullanılarak, araştırılmıştır [97].

### **2.2.2. PCL'nin Biyodegradasyonu**

PCL, fizyolojik koşullarda ester bağlarının hidrolizi (insan vücudunda olduğu gibi) ile bozunur ve bu nedenle, implant edilebilir bir biyomateryal olarak kullanımı için çok dikkat çekmiştir. Özellikle, uzun süreli implantatif cihazların hazırlanması için, polilaktid'den daha yavaş bozulması nedeniyle ilginçtir. Literatürde sunulan bozulma araştırmalarından, PCL'nin iki aşamalı bozunma sürecine girdiği sonucuna varılabilir: Öncelikle ester gruplarının enzimatik olmayan hidrolitik bölünmesi ve ikincisi ise, polimerin daha çok kristal yapıya ve düşük bir moleküler ağırlığa (3000'den az) sahip olduğunda, PCL fragmanlarının makrofajların ve dev hücrelerin fagosomlarında ve fibroblastlar içinde tutulumunun deneyleri sırasında gözlemlendiği üzere, polimerin hücre içi bozunuma uğradığı gösterilmiştir [98]. Bu sonuçlar, molekül ağırlığı 3000 veya daha düşük bir miktara düşürüldükten sonra PCL'nin hücre içi bir mekanizma yoluyla tamamen emilebilirliği ve parçalanabileceği teorisini destekler. İlk aşamada, PCL'nin bozunma hızının, 40°C'de in vitro hidroliz ile özdeş olduğu ve birinci dereceden kinetiklere uyduğu kaydedilmiştir (Şekil 2.7) [99]. PCL bozunum mekanizmasının, moleküler ağırlığın azalmasına neden olan ester bağlarının rastgele hidrolitik zincir kesilmesine atfedilebileceği sonucuna varılmıştır. PCL Homopolimeri, cihazın veya implantın başlangıç moleküler ağırlığına bağlı olarak 2-4 yıl arası bir bozunma derecesine sahiptir [100,101]. Hidroliz hızı, diğer laktonlar veya glikolitler/laktitler ile kopolimer oluşturarak değiştirilebilir. Şaşırtıcı bir şekilde, PCL tabanlı iskeleler kullanan biyomalzemeler ve doku mühendisliği literatürlerinde son on yılda 1000'in üzerinde makale yayınlanmıştır. Bu çalışmalar arasında, PCL iskeletlerinin parçalanma ve emilim kinetikleri üzerine çok az sayıda grup dahil edilmiştir [90, 102].

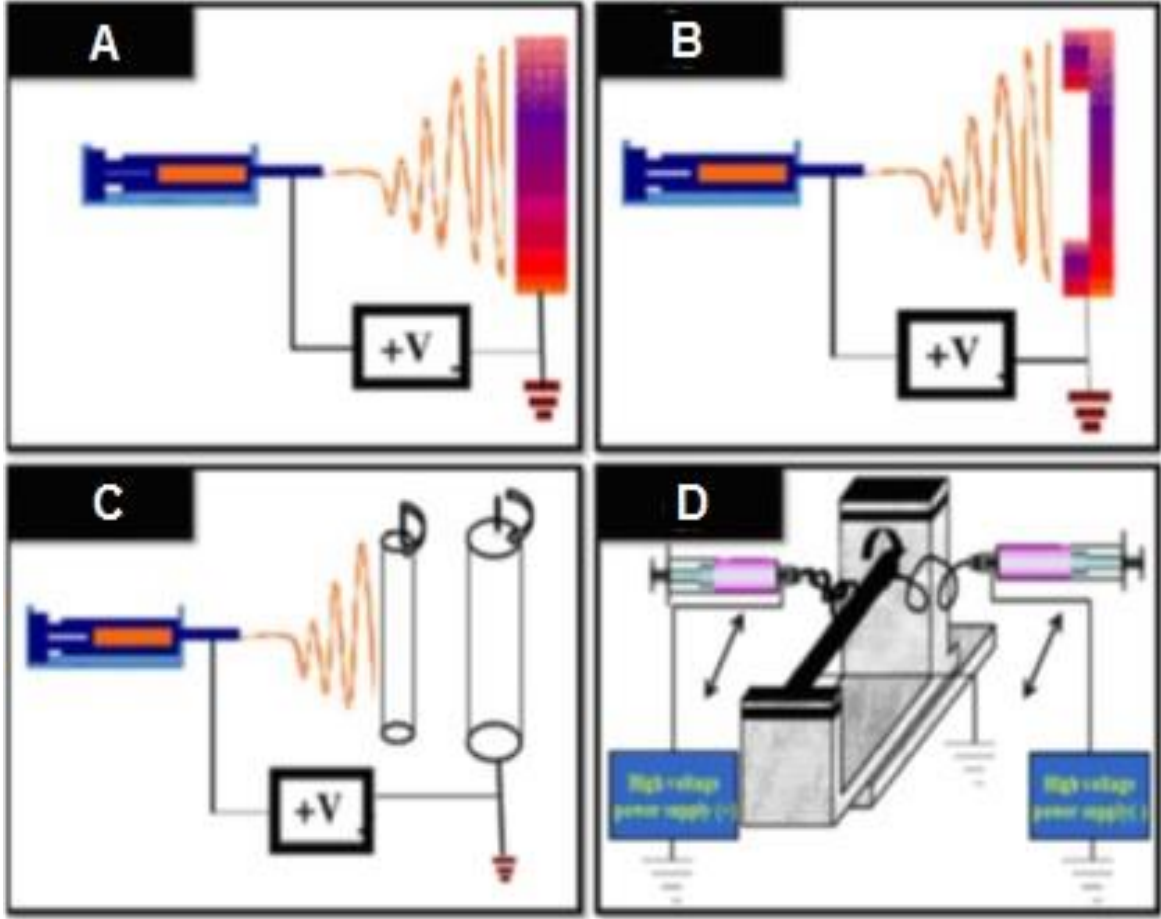


**Şekil 2.7.** A) PCL'nin hidroliz vasıtasıyla parçalanması, 6-hidroksil kaproik asit ve asetil koenzim A'yı ara ürün haline getirir ve bunlar daha sonra sitrik asit döngüsüyle vücuttan atılır. B) Kristal parçalanmanın nasıl gerçekleşmiş olabileceğinin şematik gösterimi [99].

### 2.2.3. PCL Nanofiberleri

PCL elektroçizme teknolojisi ile dokumasız membranlar [103-107] ve 3D iskelelere [108-110] (Şekil 2.8.A ve 2.8.B) konvansiyonel elektroçizme toplayıcısı modifiye edilerek dönüştürülebilir [108]. Elektroçizme, PCL ve Alüminyum Oksit (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) gibi diğer seramik malzemelerden oluşan nanofibrus iskele şeklinde nano-kompozit malzemeleri imal etmek için de kullanılmıştır [111].

Biyomedikal uygulamalarda farklı yapılar üretmek için elektroçizme kullanılmıştır. Huang ve ark., farklı polimerleri, aksenel doğrultuları boyunca yüksek hizalı nanofiberler ile kesintisiz boru şekilli iskeleye elektrospinleştirmek için yeni bir toplayıcı (Şekil 2.8.C'de gösterildiği gibi) geliştirmiştir [109]. Nguyen ve Lee, yapay kan damarlarında, PCL-jelatin/PLGA-jelatin/PLGA-kitosandan oluşan çok tabakalı iskele imal etmek için çift şırıngalı elektroçizme sistemi kullanmışlardır (Şekil 2.8.D). Çapraz bağlı PCL-jelatin/PLGA-Jelatin/PLGA-CS'dan oluşan yapay kan damar iskelesi mükemmel esneklik göstererek, yüksek basınçlara dayanabilmiştir ve hücre büyümesini hızlandırmıştır. Bu nedenle, bu yeni malzeme yapay kan damarlarında nihai kullanım için büyük avantaj göstermektedir [110].



**Şekil 2.8.** Elektroçirime teknolojisinde geliştirme için şematik gösterim: A) klasik elektroçirime sistemi [108]; B) 3D iskele imal etmek için yeni elektroçirime toplayıcısı [108]; C) nano-fibröz tüpleri imal etmek için yeni elektroçirime toplayıcısı [109] ve D) çok tabakalı iskelet imal etmek için çift emisyonlu elektroçirime sistemi [110].

### 2.3. PCL/Kitosan Nanofiberleri

Kitosan (CS), tamamen veya kısmen deasetillenmiş kitin olarak, yüksek biyolojik uyumluluk, düşük toksisite ve antimikrobiyal özellikleri nedeniyle ilaç taşıyıcı sistemler, yara örtüleri ve sinir yenilenmesi ajanları olarak biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır [6-8]. Kitosanın umut verici potansiyeline rağmen, tek başına elektroçirime prosesinde kullanılmazlığı [112-115], yaygın organik çözücülerde çözünmezliği ve yüksek kırılma yapıya sahip olması [116], temel araştırma ve uygulamalarda kullanımına engel olmuştur. Poli ( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL), yarı kristalin biyobozunur polyester olarak, insanlar için çeşitli klinik uygulamalarda ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onayını almıştır, ve yüksek biyolojik uyumluluk, mekanik özellikleri ve toksik olmaması nedeniyle doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılan iskelelerdendir [3,4]. Bu avantajlarla birlikte, güçlü hidrofobik özelliği, yavaş bozulma kinetiği ve biyoaktif fonksiyon eksikliği gibi dezavantajları,

PCL'nin büyük ölçüde kullanımını sınırlamaktadır [5]. Bu sakıncalar nedeniyle, yeni biyohibrit malzeme üretmek için PCL (iyi mekanik özelliklere sahip) ve kitosan (biyolojik olarak aktif fonksiyonlara sahip) bileşenleri karıştırılır, elde edilen biyohibrit malzeme ilk maddelerle karşılaştırıldığında, biyolojik, mekanik ve bozulma özelliklerinde iyileşme göstermektedir [6-13]. Trifloroasetik asit ve heksafluoro-2-propanol gibi çözücü sistemleri CS/PCL nanofibröz iskeleleri imal için kullanılmıştır. Fakat bu çözücülerin tümü, geleneksel çözücü sistemleri ile karşılaştırıldığında nispeten pahalıdır ve doğaları nedeniyle polimerlerin daha hızlı bozulması ile sonuçlanabilirler [5,12,13]. Bu çalışmada, Kitosan-graft-polikaprolakton-blend-polikaprolakton (CS-g-PCL/PCL) nanofiberleri elde etmek için ilk önce halka açılması polimerizasyonu ile kitosanın hidroksil gruplarının üzerine  $\epsilon$ -kaprolakton oligomerlerinin graft edilmesi ile Kitosan-graft-polikaprolakton (CS-g-PCL) kopolimeri hazırlanmıştır ve daha sonra PCL ile karışımları oluşturulmuştur. Hipoteze göre CS-g-PCL ve PCL karışımı ortak bir çözücü sistemi içinde kolayca elektrospin olacaktır. Ayrıca, kitosanın greftleme modifikasyonu sonucu PCL fiber matrisinde daha iyi arayüzey yapışması beklenmektedir [117,118]. Aynı çözücüde çözünebilen CS-g-PCL ve PCL polimerleri elektroğirme yöntemi kullanarak nanofiber oluşturabilir ve böylece PCL ve kitosanın avantajlarını aynı anda taşıyabilen ve iki polimerinde dezavantajları azalmış veya tamamen ortadan kalkmış olan matrislerin üretilmesi gerçekleştirilebilir. Matrislerin mekanik özellikleri kitosan ile kıyaslandığında çok yüksek seviyede ilerlemiş olur. PCL'nin hidrofobik yapısı ile kıyaslandığında elde edilen matrisler hidrofilik özelliğe sahip olabilir. Ayrıca matrisler üzerine farklı nanopartiküller ve nanoyapılar yüklenmesi ile daha avantajlı yapılar elde edilebilir.

#### **2.4. Elektroğirme (Elektrostatik Eğirme)**

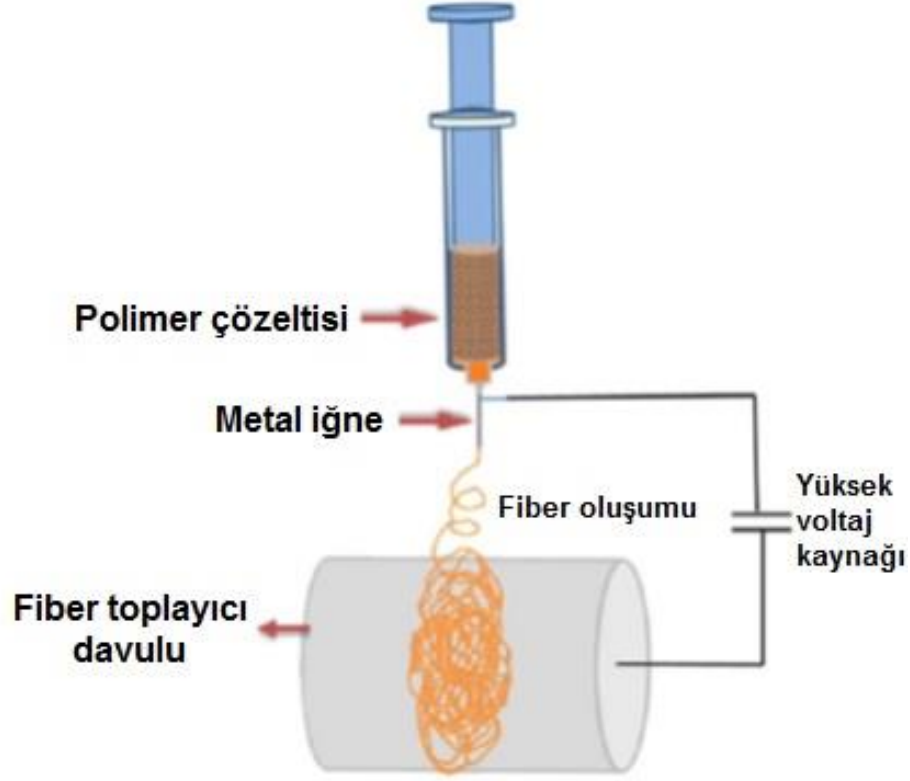
Nanofiberler, nanometrik çapları ve geniş boy oranlarına bağlı olarak ilginç özellikler taşıyan eşsiz bir nanomalzeme sınıfındırlar. Mükemmel mekanik özelliklere sahiptirler ve yüzeyleri, yüksek yüzey alanı/hacim oranlarına bağlı olarak kolayca değiştirilebilir [119]. Nanofibrler çizim yapmak [120,121], şablon sentezi [122,123], faz ayrımı [124,125], Kendiliğinden montaj ve elektroğirme [126-128] gibi farklı tekniklerle üretilir. Bunların arasında, çeşitli polimerlerden kontrol edilebilir morfoloji ile pürüzsüz nanofiberlerin hazırlanması için elektroğirme basit ve güvenilir bir teknik olarak hızla ortaya çıkmaktadır [129-131]. Elektroğirme, yüklü bir polimer çözeltisi

veya mermisinde nanofiberlerin üretilmesi için yüksek bir elektrik alanının uygulanmasını içerir. Elektroëğirme prosesinin bir şeması Şekil 2.9'da [132] gösterilmiştir.

Elektroëğirme, çalışma parametrelerini ve polimer çözeltisi özelliklerini değiştirilerek, farklı morfolojiler üretmek için kullanılabilir. Reneker araştırma grubu Şekil 2.10'de [133] gösterildiği gibi, 'çelenk' ya da birbirleri üzerinde kapalı döngü oluşturan polimer nano-sütun ağları oluşturmak için elektroëğirme voltajının değiştirilmesiyle yüklü polimer jetinin kontrollu bükülmesine ve dallanmasına imkan sağlamıştır [133,134]. Diğer araştırma grupları, yuvarlak fiberler yerine düz kurdele oluşturmak için elektroëğirme yöntemini kullanmışlardır [135,136]. Çalışma koşullarının ve çözelti parametrelerinin dikkatli kontrolü, pürüzsüz, kusursuz dokumasız nanofiber zarların gözenekli yapılarının üretilmesine neden olabilir [137].

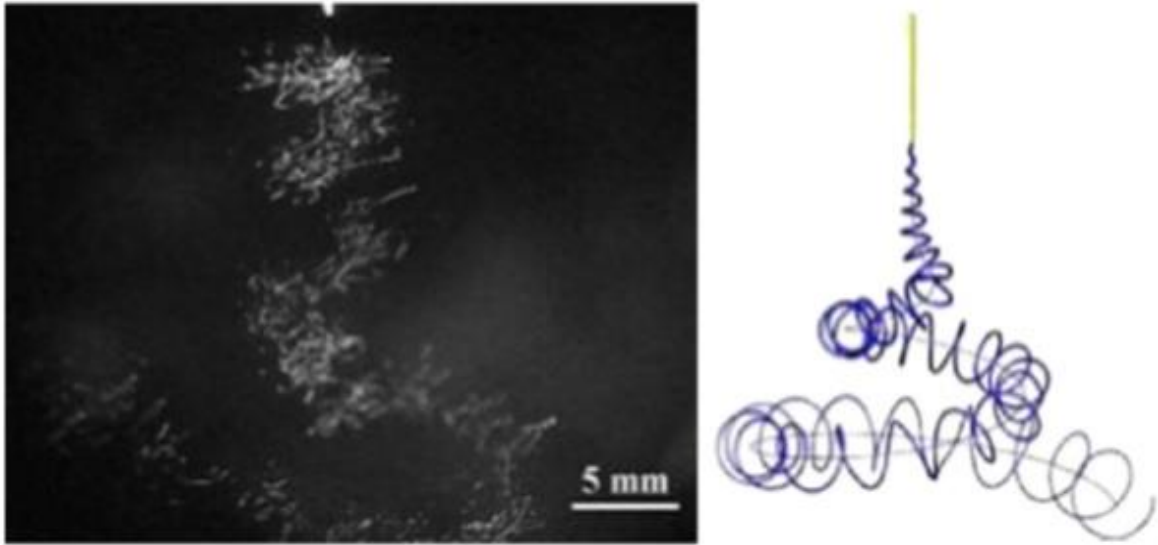
Elektroëğirme prosesinde fiber oluşumu, itici elektrostatik kuvvetler tarafından tahrik edilmektedir. Yüklü akışkan jetinde Coulomb etkileşimleri, elyafların son mimarisini belirleyen jet istikrarsızlıklarına neden olur [138]. Bu istikrarsızlıklar, polimer jetinin iğne ucunda "Taylor konisi" oluşturmasına neden olur. Üzerinde etkili olan kuvvetler nedeniyle, jet eninde sonunda iğneden çıkar ve inceltme meydana gelir. Püskürtme inceltilirken, çözücü buharlaşarak polimer elyafların arkasında bırakılarak, topraklanmış bir toplayıcı üzerine çöker. Polimer akışkanının reolojik davranışından kaynaklanan jet istikrarsızlıkları, fiber oluşumunun belirlenmesinde çok önemlidir [139].

Çoğu istikrarsızlıklar kırıkların oluşumuna neden olur ve sürekli lif oluşumunu engeller. Bununla birlikte, bükülme kararsızlığı nanofiber oluşumu için çok önemlidir: yüklü polimer jeti genişmekte olan döngülerde kıvrıldığı zaman nanofiber oluşur ve daha sonra bir substrat üzerinde toplanır [139]. Fiberlerin yüzey topoğrafyası, morfolojisi ve oryantasyonunun büyük oranda çözelti özellikleri ve çalışma koşulları tarafından etkilendiği nedeniyle elektroëğirme yöntemi, çok yönlü bir tekniktir. Polimer çözeltisinin reolojisi fiber oluşum süreci için hayati önem taşıdığı için, polimerin MW ve konsantrasyonu gibi çözelti özellikleri, elyaf özelliklerini doğrudan etkiler. Polimer çözeltisinin iletkenliği, elde edilen fiberlerin özelliklerini değiştirdiği bilinmektedir. Elyaf özellikleri ayrıca, uygulanan voltaj, çözelti akış hızı ve uç-toplayıcı mesafesi gibi çalışma koşullarından doğrudan etkilenmektedir.



**Şekil 2.9.** Elektroğirme tekniğinin şeması [132].

Elektroğirme odasının sıcaklığı ve nemi gibi ortam koşulları da fiber morfolojisini değiştirebilir. Elektroğirme işlemi etkileyen işleme parametreleri çizelge 2.1'de [139] listelenmiştir. Bu bölüm, literatürde bulunan bu parametreler ile elde edilen fiberlerin özellikleri arasındaki korelasyonları özetlemektedir.



**Şekil 2.10.** Daha yüksek voltajlarda eğilme dengesizlikleri nedeniyle oluşan polistiren nanofiberlerin yumuşak ağları [133].



**Çizelge 2.1.** Elektroğirme için proses parametreleri [139].

<b>Çözelti parametreleri</b>	<b>Proses parametreleri</b>	<b>Çevre koşulları</b>
Konsantrasyon	Elektrostatik potansiyel	Sıcaklık
Viskozite	Elektrik alan kuvveti	Nem
Yüzey gerilimi	Elektrostatik alan şekli	Yerel atmosfer akışı
İletkenlik	Çalışma mesafesi	Atmosferik kompozisyon
Dielektrik sabiti	İlerleme hızı	Basınç
Çözücü uçuculuğu	Orifis çapı	

Çok düşük çözelti konsantrasyonunda, çözeltilin viskozitesi düşüktür ve fiber oluşumu için yeterli polimer dolaşımı olmaz. İstikrarsızlıklar nedeniyle, fiber yerine parçacıkların oluştuğu "elektrosprey" denilen bir fenomen oluşur [137]. Costa ve ark., DMF çözeltilinde poli (viniliden florid) (PVDF)'in elektrospreyleme ve elektroğirme arasındaki geçiş üzerine solüsyon konsantrasyonunun etkisini araştırmışlardır [140]. Ayrıca oluşturulan fiberlerde kristal fazların oluşumunu da incelemişlerdir. %5 w/w PVDF'nin düşük konsantrasyonunda damlacıkların oluşumunu keşfettiler. Bununla birlikte, %10 ve %15 w/w PVDF'de, pürüzsüz elyaflar görülmekle birlikte, % 15 w/w çözeltilen üretilen fiberlerler daha büyük çaplara sahiptir. Ayrıca DMF ve asetonun ikili solüsyonunun tek başına DMF'den daha küçük fiber çaplarına yol açtığı görünmüştür.

Çözücünün uçuculuğu, ortaya çıkan zarın morfolojisi üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Düşük uçuculuğu olan bir çözücü kullanıldığında, hızlı ve ıslak fiberler oluştuğundan çözücü kaybı gerçekleşmez. Öte yandan, çözücü uçuculuğu çok yüksekse, polimer jetinin iğne ucundan çıkmasıyla birlikte katılaşır ve fiber oluşumunu engeller. Aynı zamanda uygulanan elektrostatik potansiyel de fiber morfolojisi üzerinde önemli rol oynamaktadır. Sener ve ark. Poli (vinil alkol) ve sodyum alginatın elektroğirilmiş fiberleri için voltajı 28 kV ve 35 kV arasında değiştirmişlerdir [141]. 28 kV'de kırık fiberlerin oluştuğu görünürken, 35 kV ve daha yüksek gerilimlerde fiber uzunluğu daha sürekli olduğu görünmüştür. Uygulanan voltaj ve fiber çapı arasında herhangi bir korelasyon bulunmamıştır. Bazı gruplar ayrıca daha ince fiberlerin yüksek uygulanan voltajla oluşturulduğunu ileri sürmüşlerdir [139]. Gerilim ve fiber çapı arasındaki tam ilişki hala belirsizdir ve

çözelti konsantrasyonu ve uç-toplayıcı mesafesi gibi diğer parametrelere bağlıdır. Bununla birlikte, daha yüksek voltajlar boncuk oluşumunu arttırmaktadır [141]. Göreli nem (RH) çözücü buharlaşmasını ve dolayısıyla fiber yüzeyinde gözeneklerin oluşmasını etkiler. Casper ve ark. THF çözeltisinde polistren (PS) fiberlerinin oluşumunda nemin etkisini araştırmışlardır [142]. Düşük nemde (%25) üretilen pürüzsüz elyafların yüzeylerinin gözeneksiz olduğu bulunmuştur. %30 dan yüksek RH olduğunda fiberlerde gözenekler görülmeye başlamıştır. Gözeneklilik ve gözenek çapının nemin artması ile birlikte arttığı görünmüştür. Vrieze ve ark. , iki farklı polimerin (selüloz asetat (CA) ve poli (vinilpirolidon) (PVP)) elyaf özellikleri üzerinde nem ve sıcaklığın etkisini incelemişlerdir [143]. CA için ortalama fiber çapı nem arttıkça artarken, PVP fiberlerinin ortalama çapı azalır. Bununla birlikte, % 60'lık yüksek bir RH'de, PVP nanofiberlerinin daha büyük çapların oluşmasından dolayı kaynaşmaya başladığı görünmüştür. CA'da, RH arttıkça, suyun daha fazla emilmesi daha hızlı çökelmeye ve dolayısıyla daha büyük fiber çaplarına neden olur. İki malzemenin (polimer ve çözücü karışımı) su buharı ile farklı etkileşimleri, zıt eğilimleri izler ve çözücü buharlaştırma ve polimer katılma hızlarının farklı tepki vermesine neden olur.

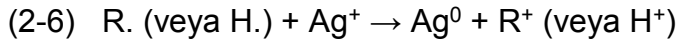
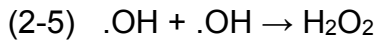
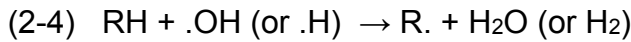
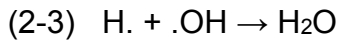
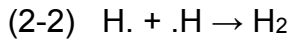
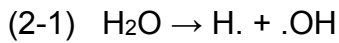
Faz inversiyonunun geleneksel membran imalat yöntemleri tersine, elektroçirme, nispeten üniform gözenek boyut dağılımına, yüksek bağlanabilirliği olan gözeneklerin ve nispeten daha yüksek poroziteye (tipik olarak% 80 civarında) sahip membranların oluşumuna yol açmaktadır [144,145]. Bunun bir sonucu olarak, electrospun fiberler bu özellikleri tercih edilir olduğundan dolayı yaygın olarak ayırma işlemlerinde, tekstil, tıp, sensörler ve kozmetik gibi diğer alanlarda önem kazanmaktadır [132].

## **2.5. Sonokimyasal İndirgeme Yöntemiyle Yüzey Zenginleştirme**

Nanoyapılı materyaller, genel olarak gaz fazı teknikleri, sıvı faz yöntemleri ve karışık faz yaklaşımı gibi çeşitli sentetik yöntemlerle hazırlanmıştır. Uygun bir sentetik yaklaşımın seçilmesi nanoyapılı materyal sentezinin nihai başarısını veya başarısızlığını belirler, çünkü nanoyapılı materyallerin fiziksel özellikleri ve uygulamaları ağırlıklı olarak nasıl hazırlandığına bağlıdır. Aslında, bu, çeşitli nanoyapılı materyallerin hazırlanması için kolaylıkla uyarlanabilen çok yönlü ve geliştirilmiş sentetik yöntemlerin geliştirilmesi bilim insanlarının ilgisini çekmiştir [146]. Çeşitli yaklaşımların arasında, sonokimyasal indirgeme yöntemi,

malzemelerin sentezi için uzun yıllar boyunca kapsamlı bir şekilde incelenmiş ve artık nanoyapılı materyal sentezindeki en güçlü yaklaşımlardan biri olarak tanımlanmıştır [147-153]. Sonokimya, kaplanmış parçacıkların hazırlanması için kullanılabilir güçlü bir tekniktir. Güçlü ultrason ışınlaması, sıvıdaki kabarcıkların oluşması, büyümesi ve kabarcık çöküşünü içeren kavitasyon olayı nedeniyle kimyasal değişikliklere neden olur. Prekürsörün silis küreleri gibi bir inorganik destek varlığında sonikasyon, aktif destekli heterojen katalizörler üreten, nanometre kümelerini yakalamak için alternatif bir yol sağlar. Bu fenomen, çeşitli metal nanopartikülleri ve oksit nanorodları hazırlamak için kullanılmıştır [154].

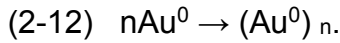
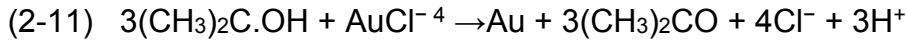
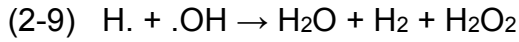
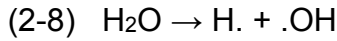
Gümüş nanoparçacıkların polimer matrislere çökeltmesi için interkalasyon, laminasyon, döküm ve püskürtme gibi farklı yöntemler kullanılmıştır [155,156]; Ultrason yöntemi çok yönlü yöntemlerden biridir. Sonokimya, çeşitli nanomalzemeleri seramik ve polimerik malzemelerin yüzeylerine biriktirmek için kullanılır. Alt tabakanın yüzeyinde homojen bir kaplama tabakası oluşur. Nanoparçacıklar kimyasal bağlarla veya substratla kimyasal etkileşimlerle yüzeye bağlanır ve yıkama ile uzaklaştırılmaz [152]. Sonokimyasal radyasyonun nanometrik boyuttaki parçacıkların sentezi için [152] ve nanoparçacıkların farklı substratlara çökmesi için etkili bir yardımcı olduğu kanıtlanmıştır [157-160]. Sonokimyasal yöntemle gümüş indirgemesinde beklenen reaksiyonlar şöyle sıralanabilir:



Au nanopartikülleri, analitik problemler, katalizörler, sensörler ve doğrusal olmayan optik malzemeler gibi çeşitli işlevsel materyallere yaygın olarak uygulanmıştır. Au<sup>3+</sup>'un Au<sup>0</sup>'a sonokimyasal indirgemesi üzerine birçok rapor bulunmaktadır. Bununla birlikte, sonokimyasal indirgeme mekanizması halen belirsizdir. Özellikle organik köklerin Au<sup>3+</sup>'ın indirgemesi üzerindeki rolü belirsizdir. Organik radikallerin rolünü

ayırt etmek için, organik katkı maddelerinin geniş konsantrasyonları aralığında Au<sup>3+</sup>'un indirgeme oranları araştırılmıştır. Organik katkı maddelerinin ve suyun piroliz reaksiyonundan oluşan indirgeme radikalleri ve kararsız ürünleri esas olarak Au<sup>3+</sup> 'un indirgemesini etkiledikleri bulunmuştur [161].

Nagata ve arkadaşları, AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup> iyonlarının sonokimyasal indirgeme mekanizmasını ve sudaki küçük Au parçacıklarının oluşumunu önermişlerdir [162]. İzopropil alkol, organik radikal kaynağı olarak kullanılan organik maddelerden biridir. AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup> iyonlarının indirgenmesi ve altın parçacıklarının çekirdeklenmesi ve toplanması gibi işlemler, esasen küçük Au partiküllerinin oluşumundan sorumlu olabilir. Beklenen reaksiyonlar sırasıyla aşağıda verilmiştir:

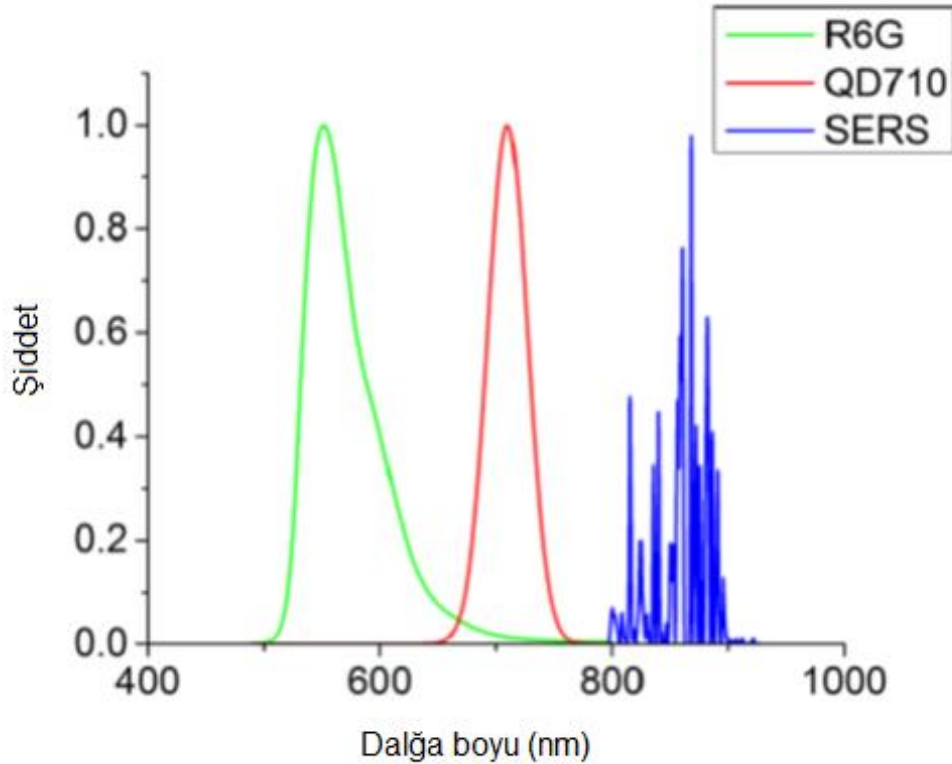


H. ve ·OH radikalleri, reaksiyon (2-8) 'de gösterildiği gibi yoğun lokal ısıtma ve yüksek basınçlarla H<sub>2</sub>O'nun termal ayrışması nedeniyle ortaya çıkmıştır. Reaksiyon (2-10) izopropanolden H. ve ·OH hidroksil radikallerinin hidrojen soyutlamasıyla güçlü indirgeyici radikallerin (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C·OH oluşumunu gösterir. Gözeneklerdeki AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup> iyonları, çok basamaklı radikal reaksiyonları ile hızlı şekilde indirgenir ve ardından Au atomları (2-11) ve (2-12) reaksiyonlarda gösterildiği gibi toplanır [163]. Bu çalışmada sonokimyasal indirgeme yöntemiyle nanofiber matrisin yüzeyinde gümüş ve altın nanoparçacıkların yüklenmesi yapılmıştır. Bu yöntemde, gümüş ve altın iyonlarının indirgenmesi ve yeni oluşturulan gümüş ve altın nanoparçacıkların nanofiber filmlerin yüzeyine yüklenmesi aynı anda gerçekleşir. Hidrofobik polimer olarak polikaprolakton (PCL) ve hidrofilik polimer olarak kitosan aşılınmış polikaprolakton (CS-g-PCL-I/PCL), kullanılan polimerlerdir. Gümüş ve altın içeren substratlar, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve Raman spektroskopisi ile analiz edilmiştir.

## 2.6. Yüzey Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (SERS)

Biyomedikal uygulamalar için tanısal ve terapötik nanoparçacıkların geliştirilmesi, bilim, mühendislik ve tıpta günümüzde büyük ilgi görmektedir. Bu konunun temeli,

nanometre boyutlu parçacıkların, ayrı ayrı moleküller ya da yığın malzemelerden elde edilebilmeyecek yapısal ve işlevsel özelliklere sahip olmalarıdır. SERS etkisi ilk olarak pürüzlü gümüş elektrot yüzeylerine adsorbe edilmiş piridin yüksek derecede güçlü Raman sinyalleri olarak gözlemlenmiştir [14,15]. Raman saçılım şiddetlerinin bu amplifikasyonu ilk olarak Jeanmaire ve Van Duyne [15] tarafından elektromanyetik (EM) alan geliştirmelerine ve Albrecht ve Creighton [16] tarafından kimyasal geliştirmelerine atfedilmiştir. Bu iki mekanizma arasında, elektromanyetik alan artırma, SERS sinyallerinin genel geliştirilmesine en büyük katkı sağlayanıdır [17-19]. Toplamda ortalama 1 milyon kat ( $10^6$ ) kadar artırma olduğu bildirilmiştir, ancak arttırmaların yüzey boyunca oldukça heterojen olduğu bilinmekte olup, bazı yüzey alanlarının 1 milyar kat ( $10^9$ ) kadar artırma faktörüne sahip olabileceğini düşündürmektedir [20]. 1997'de, tek molekül / tek nanopartikül SERS, deneysel olarak iki bağımsız grup tarafından gösterilmiştir; burada intrinsik iyileştirme faktörlerinin  $10^{14}$ - $10^{15}$  kadar yüksek olduğu tahmin edilmektedir [164,165]. Bu çalışmalar, SERS'in flöresan düzeyinde veya ötesinde hassasiyetlere sahip olabileceğini ortaya koymuştur.



**Şekil 2.11.** SERS, kuantum noktalar (QD, 710 nm'de yayan) ve Rhodamine 6G (R6G)'nin spektral özelliklerinin karşılaştırılması. SERS spektrumundan elde edilen keskin zirveleri ve zengin spektroskopik bilgilere dikkat edin [170].

SERS tabanlı platformlar, biyomedikal görüntüleme ve algılama için diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında birkaç farklı avantaj sunar. Flöresansın aksine, Raman saçılımı hemen hemen ani olur ve böylece uyarma enerjisini daha hızlı oranlarda rahatlatır. Sonuç olarak, SERS sinyalleri, fotodedgradasyona veya photobleaching'e karşı daha karardır [166]. Raman sinyallerinin zirve genişliği, organik boyalar veya kuantum noktalarından gelen flöresans emisyonundan yaklaşık 10-100 kat daha dar olan yaklaşık 1-2 nm'dir (yarım maksimumda veya fwhm'de tam genişlikte) ( Şekil 2.11.) [167-170].

Ayrıca, SERS nanoparçacıkları, aynı partikül boyutu, yüzey kaplaması ve hemen hemen aynı in vivo farmakokinetik özellikleri ile hazırlanabilir. Değişik SERS imzalarının parçacıkları, tek bir lazer ışını ile eşzamanlı uyarı için tasarlanabilir ve yayılan sinyaller yaklaşık 200 ila 3500 cm<sup>-1</sup> arasında değişen lazer çizgisinden küçük frekans kaymalarına sahip olan aynı spektral bölgeyi kapsar. Böylece, SERS nanoparçacıkları çok basit enstrümantasyon kullanılarak çoğaltılabilir. SERS, dokulardan ışık zayıflaması ve otofloresansın düşük olduğu yakın kızılötesi (NIR) ortamında son derece etkilidir. Ayrıca, kızıl ötesi spektroskopinin aksine, Raman spektroskopisi, sudan çok az etkileşime girdiği için biyolojik görüntüleme için çok uygundur [171]. Femtomolar (fM veya 10<sup>-15</sup> M) parçacık konsantrasyonlarından elde edilen yoğun SERS sinyalleri, manyetik rezonans görüntüleme (MRG), pozitron emisyon tomografisi (PET) ve X-ışını Tomografi (CT) gibi yaygın kullanılan medikal görüntüleme teknolojilerinin algılama limitlerinin oldukça üstünde performans gösterir. Tez kapsamında yüzeylerine altın ve gümüş indirgenmiş nanofiber matrislerin SERS özellikleri incelenmiş ve daha sonra en yüksek SERS piklerine sahip matrisler GFP boya ile boyanarak E. coli (ATCC 25922) suşu üzerinde etkileri flüoresan mikroskop ile incelenmiştir.

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1. Çalışmanın Temeli ve Kapsamı

Tez kapsamında yapılan çalışmalar belirtilen şekilde sıralanmaktadır:

- Graft kopolimerler Kitosan-graft-polikaprolakton I ve II (CS-g-PCL-I ve CS-g-PCL-II) ve PCL'nin sentez ve karakterizasyonu.
- Elektroçirime yöntemi ile PCL ve kitosan içeren nanofiberlerin:
  - A. Üretimi ve karakterizasyonu
  - B. Biyofilm oluşumu
  - C. Sonikasyon ile yüzey zenginleştirme ve SERS etkileri
  - D. Altın ve gümüş indirgenerek zenginleştirilmiş yüzeylerin flüoresan boya ile boyanarak bakteri üzerinde etkilerinin izlenmesi

Çalışmaların ilk bölümü (Graft kopolimer sentezi ve karakterizasyonu ve şırıngalı elektrostatik çirime sistemi ile nanofiber üretim ve karakterizasyonu Prof. Dr. Deling KONG'un araştırma grübü laboratuvarlarında (Nankai Üniversitesi, Tianjin, Çin halk cumhuriyeti) yapılmıştır.

#### 3.2. Kullanılan Malzemeler

PCL sentezi için monomer olarak  $\epsilon$ -kaprolakton (Sigma, % 99, Almanya), ve katalizör olarak Tin (II) 2-etilheksanoat (Sigma, %99, Almanya) kullanılmıştır. Graft kopolimer sentezi için Kitosan (Sigma, Düşük viskoziteli, %75-85 aminleme derecesi, Japonya) kullanılmıştır. Nanopartikül sentezi için tetrakloro aurik asit ( $\text{HAuCl}_4, 3\text{H}_2\text{O}, \% 98$ , Sigma, Almanya) ve Gümüş nitrat ( $\text{AgNO}_3$ , Sigma, Almanya) kullanılmıştır. Sonikasyon ile indirgeme reaksiyonunda dengeleyici ajan olarak Poli (etilen glikol) (PEG, Mw = 400, Merck, Almanya), kullanılmıştır. Metansülfonik asit ( $\text{MeSO}_3\text{H}, \% 99$ , Sigma, Almanya), Kloroform ( $\text{CHCl}_3$  %99, Merck, Almanya), N,N-dimetilformamit (DMF, %99, Merck, Almanya) ve Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ , Sigma, Almanya) çözücü olarak, izopropil alkol (%99, Merck, Almanya) ve Etilen glikol (EG, %99, Merck, Almanya) organik radikal kaynağı olarak, ve monopotasyum fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Sigma, Almanya), sodyum hidroksit ( $\text{NaOH}$ , Sigma, Almanya), amonyak ( $\text{NH}_3$ , %24, Merck, Almanya), tri-Sodyum sitrat dihidrat ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Sigma, Almanya), deneylerde kullanılmıştır. Antibakteriyel deneyler için gram-negatif bakteri *E. coli* (ATCC 25922) ve gram-pozitif bakteri *S. aureuse* (ATCC 25923) kültürleri, Dr. Farzin ASGARI SANA tarafından ısmarlanmıştır. Biyofilm oluşumu

deneyleri için kullanılan *S. epidermidis* bakteri hücreleri Kuru Üniversitesi/Hastanesi mikrobiyoloji laboratuvarından tamin edilmiştir.

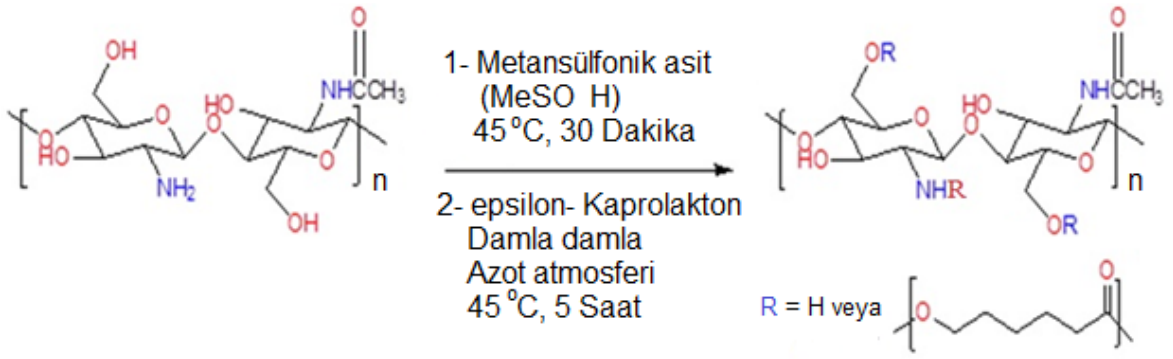
### **3.3. Graft Kopolimerler ve PCL'nin Sentez ve Karakterizasyonu**

Tez kapsamında, nanofiberlerden oluşacak taşıyıcı matris elektroeğirme ile üretilmiştir. Kullanılan ana polimer "polikaprolakton" (PCL) dır. Pozitif yük kazandırmak için kitosan (CS) üzerine graft edilmiş oligo-PCL (Kitosan-graft-PCL: CS-g-PCL) sentezlenerek PCL ile blendleri (Kitosan-graft-PCL-blend-PCL: CS-g-PCL/PCL) hazırlanmıştır. Buradaki asıl amac kitosan ve PCL'in aynı çözücü karışımında çözünmesini sağlamaktır. Graft kopolimer Kloroform Dimetilformamid çözücü karışımında kolaylıkla çözünmektedir. PCL'nin kolaylıkla elektrospin edilebilirliği, kitosan için bunun zor olduğu not edilmiştir, bu nedenle blendlerin kullanılması uygun bulunmuştur. Aşağıda önce graft kopolimer ve PCL'nin sentezi ve daha sonra PCL ve Kitosan-graft-PCL-blend-PCL'nin (CS-g-PCL/PCL) elektroeğirme ile ilgili yapılan çalışmalar anlatılmıştır.

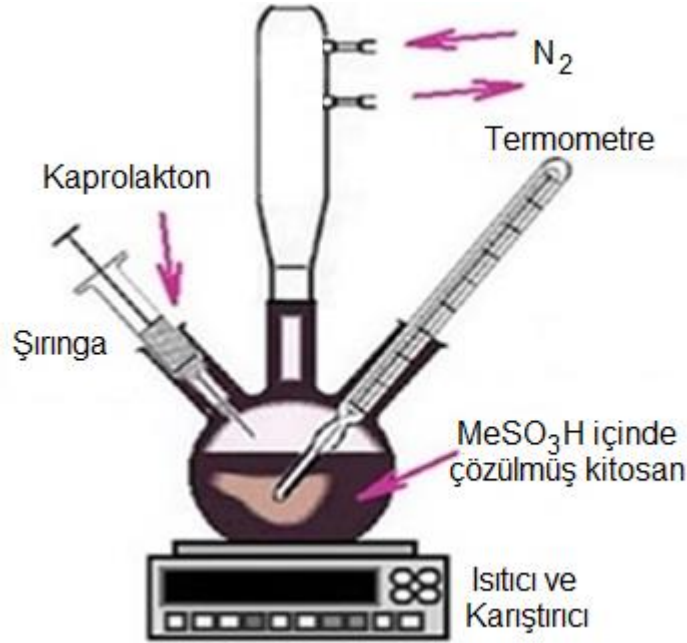
#### **3.3.1. Graft Kopolimerlerin (CS-g-PCL-I ve CS-g-PCL-II) Sentezi**

CS (Düşük viskoziteli, %75-85 aminleme derecesi) satın alma yoluyla temin edilmiştir. Şekil 3.1'de şematik olarak gösterildiği gibi  $\epsilon$ -kaprolakton halka açılması polimerizasyonu ile oligomer boyutlarında kitosan üzerinde graft edilmiştir. Bunun için izlenen yöntem kısaca şöyledir: CS (1.0 g, glukozamin birimleri 6 mmol) ve metansülfonic asit ( $\text{MeSO}_3\text{H}$ , 20 ml), bir teflon kaplı karıştırma çubuğu ve gaz adaptörü ile donatılmış 50 mL'lik yuvarlak dipli bir reaksiyon kabına konulmuştur (Şekil 3.2). Karışım, CS'nin tamamen çözünmesini sağlamak için  $45^\circ\text{C}$ 'de yaklaşık 30 dakika boyunca karıştırılmıştır. Ardından  $\epsilon$ -kaprolakton (CL) monomeri (iki farklı graft kopolimer sentezi için: 16.58 g (146 mmol) CS-g-PCL-I için veya 8.29 gr, 73 mmol, CS-g-PCL-II için) karışıma yavaş yavaş damlacıklar halinde enjekte edilmiştir. Reaksiyon karışımı,  $45^\circ\text{C}$ 'de azot atmosferi altında 5 saat boyunca karıştırılmış, daha sonra flitre edilmiş ve flitre ürün 250mL, 0.2M monopotasyum fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) + 40 mL, 10M sodyum hidroksit (NaOH) + 100 gr kırılmış buz karışımına damla damla ilave edilmiştir. Çöktürülen kopolimer birkaç kez distile su ile yıkanmış, ve 3 gün boyunca  $-56^\circ\text{C}$ 'de vakum altında dondurularak kurutulmuştur [117].





**Şekil 3.1.** Kitosan üzerinde oligo-PCL graflama reaksiyonu.

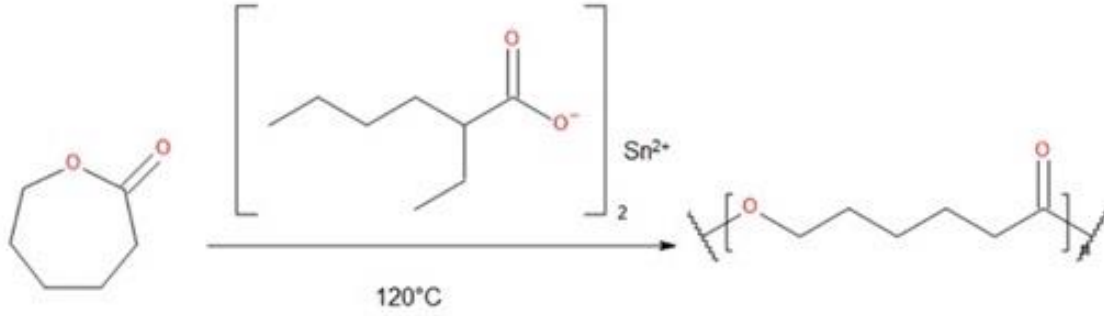


**Şekil 3.2.** Kitosana oligo-PCL graflama reaksiyon sistemi.

Burada iki farklı graft kopolimer CS-*g*-PCL-I (kaprolaktonu yüksek) ve CS-*g*-PCL-II (kaprolaktonu düşük) sentezi yapılmıştır. Bunların MFR (Moleküler fraksiyon oranı) ve polimerizasyon verimleri (elde edilen numunenin ağırlığının kullanılan kitosan ve ε-kaprolaktonun toplam ağırlığına oranı) elde edilmiştir.

### 3.3.2. Polikaprolaktonun (PCL'nin) Sentezi

PCL sentezi için halka açılması polimerizasyonu yöntemi kullanılmıştır (Şekil 3.3). 10 gr ε-kaprolakton (ε-CL) monomeri bir payreks tüp içine ilave edilerek 15 dakika boyunca 110°C'a kadar ısıtılmıştır. Daha sonra aynı sıcaklıkta 5 dakika boyunca azot atmosferi altında tutulmuştur ve sonunda ε-kaprolakton (CL)'nin 1/1000 (ağırlıkça) oranında kalay oktoat (tin (II) oktoat, Sn (O<sub>2</sub>C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>)<sub>2</sub>) ilave edilerek 24 saat boyunca 120°C'da etüvde bekletilmiştir. Elde edilen beyaz renkte PCL polimeri oda sıcaklığına kadar sğutulduktan sonra fiber oluşumu için kullanılmıştır [91,92].



**Şekil 3.3.** PCL'nin sentezi.

### 3.3.3. Polimerlerin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Analizi

PCL ve Graft kopolimerlerin yapısal karakterizasyonu için önce FTIR (Bio-rad, FTS 6000, ABD) analizi yapılmıştır. Örnekler KBr ile karıştırılmış, preslenmiş ve 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyu aralığında spektrumlar çizilmiştir. FTIR analizi ile kitosan, PCL ve graft kopolimerlerin FTIR spektrumları elde edilmiştir.

### 3.3.4. Polimerlerin Hidrojen Nükleer Manyetik Rezonans ( $^1\text{H-NMR}$ ) Analizi

Kitosan, PCL ve Graft kopolimerlerin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumları bir NMR cihazı (400M, Burker, Almanya) kullanılarak elde edilmiştir.  $^1\text{H-NMR}$  spektrumları elde etmek için PCL ve graft kopolimerlerin (CS-g-PCL-I ve CS-g-PCL-II),  $\text{CDCl}_3$  çözücüsünde ve kitosanın,  $\text{D}_2\text{O}$  çözücüsünde (CS'nın  $\text{D}_2\text{O}$ 'da çözünmesini sağlamak için hidroklorik asit (HCl) gaz fazı halinde çözeltiye ilave ederek) 0.5 mgr/ml çözeltileri hazırlanarak NMR cihazı ile analiz edilmiştir.

### 3.3.5. Polimerlerin Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC) Analizi

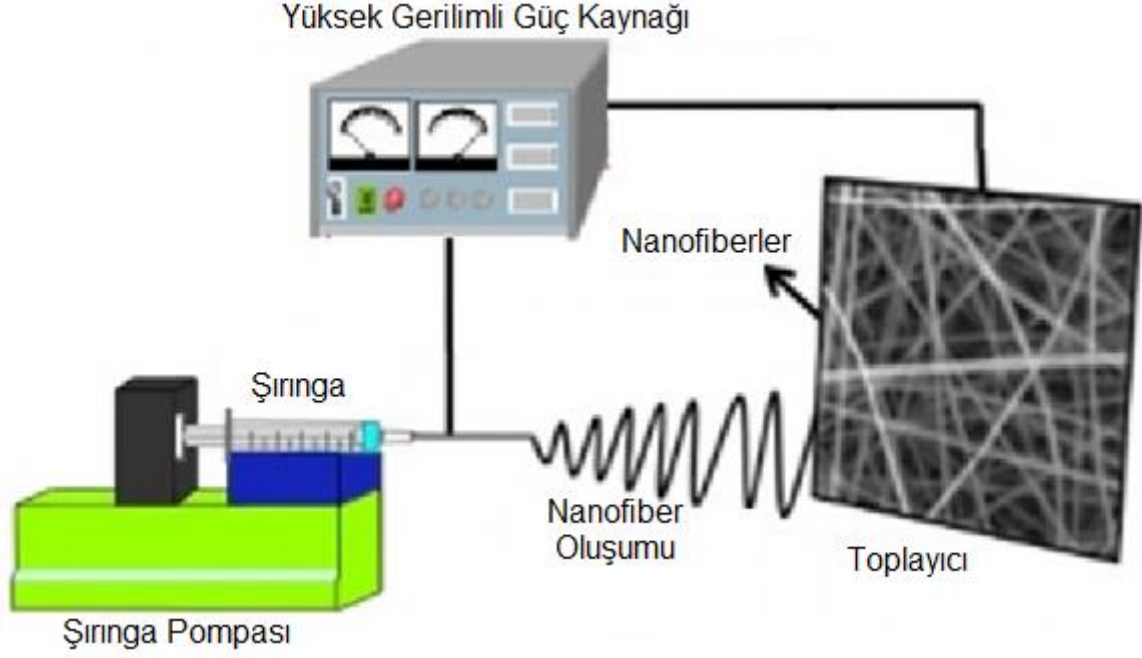
Sentezlenen polimerlerin (PCL, CS-g-PCL-I ve CS-g-PCL-II) moleküler ağırlığını elde etmek için GPC analizi yapılmıştır. Numune hazırlamak için 0.5 mgr polimer (PCL, CS-g-PCL-I veya CS-g-PCL-II) 1 ml THF çözücüsüne eklenmiştir ve polimerin tamamen çözünmesini sağlamak için karışım 24 saat boyunca çalkalamadan oda sıcaklığında bekletilmiştir ve daha sonra bir GPC cihazı ile (Shimadzu, Japonya) analiz edilmiştir.

### 3.3.6. Polimerlerin Termogravimetrik Analizi (TGA)

CS, PCL ve CS-g-PCL-I'in bir TGA cihazı (PERKIN ELMER SII Exstar 6000 TG-DTA6300, ABD) kullanılarak termogramlar elde edilmiştir. Bu analiz için azot ortamında ( $\text{N}_2$ ),  $10^\circ\text{C}$  artmalar ile polimerlerin  $50-400^\circ\text{C}$  arasında termogramları elde edilmiştir.

### 3.4. Elektroğirme ile PCL ve Kopolimerler Karışımı Fibelerin Üretilmesi

Elektroğirme (Elektrostatik eğirme), doğal veya sentetik polimerler kullanılarak hazırlanmış çözeltilere elektrostatik kuvvetler uygulanması ile, çapları 2 nm'den birkaç mikrometreye kadar uzanan kalınlıklarda polimer fiberler üretme tekniğidir. En temel elektroğirme düzeneği üç ana parçadan oluşmaktadır:



**Şekil 3.4.** Şırıngalı elektroğirme düzeneği.

Yüksek voltajlı güç kaynağı, elektriksel iletkenliğe sahip bir jet düzesi (spinneret) ve belirli bir uzaklıkta bulunan toplayıcı (Şekil 3.4). Elektroğirme için iki farklı yöntem kullanılmıştır. İlk olarak şekil 3.4'de de görüldüğü gibi basit şırıngalı elektroğirme sistemi kullanılmıştır. İkinci kullanılan sistem ise şekil 3.5'te gösterilen ELMARCO nanospider elektroğirme cihazıdır.



**Şekil 3.5.** Pilot ölçekli nanofiber matris (film) üretiminde kullanılan Nanospider® sistemi; (Çek cumhuriyeti).

### **3.4.1. Şırıngalı Elektroeğirme Sistemiyle Nanofiber Matris Üretimi**

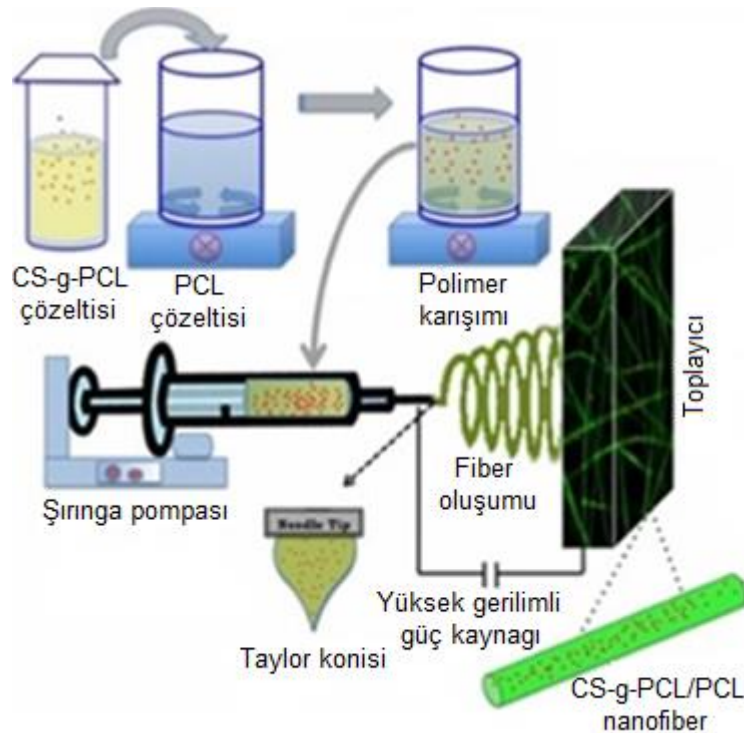
Nanofiber matris üretimi için ilk olarak literatür verileri ışığında [6-13,117,118], biyobozunur ve biyouyumlu bir polimer olan PCL'den uygun niteliklerde nanofiberler üretimini gerçekleştirebilmek amacıyla elektroeğirme sisteminin parametreleri denemeler yaparak optimize edilmiştir.

kullanılan optimize parametreler voltaj 16 kV, akış hızı 2 ml/saat ve iğne ile toplayıcı arası mesafe 15 cm olarak seçilmiştir. Çözelti başlangıç viskozitesi önemli bir parametre olduğundan, PCL polimeri için uygun çözücü karışımı 4:1 oranında Kloroform/Metanol karışımı, uygun çözelti derişimi ise ağırlıkça %15 ( %15 w ) PCL olarak belirlenmiştir [6-13, 117, 118]. CS-g-PCL/PCL karışımı için en uygun çözücü

karışımı 4:1 oranında Kloroform/DMF karışımı ve polimer karışımının derişimi ise ağırlıkça %15 ( %15 w, iki polimerin toplam ağırlığı) belirlenmiştir [117]. PCL ve CS-g-PCL kopolimerleri karışımları ve PCL karışımının elektroğirme (şekil 3.6) prosüdüğü için aşığıda belirtilen yöntem kullanılmıştır:

Elektroğirme için, PCL veya CS-g-PCL/PCL çözeltileri 21G paslanmaz çelik iğne (Şekil 3.7) ile donatılmış bir 5 ml standart şırınga içine yerleştirilmiştir. PCL %15 w derişim ile 4:1 oranında Kloroform/Metanol çözücü karışımında çözülmüştür. CS-g-PCL/PCL karışımı hazırlamak için graft kopolimerler ve PCL ayrı ayrı %15 w derişim ile 4:1 oranında Kloroform/DMF çözücü karışımında çözülmüştür ve daha sonra kopolimerler çözeltileri PCL çözeltisi ile farklı oranlarla (Çizelge 3.1) karıştırılarak farklı karışımlar oluşturulmuştur. Fiber oluşturmak için 16 KV uygulanan bir voltajda 2.0 ml/saat akış hızı ile bir şırınga pompası kullanılmıştır. Bir Döner silindir (Şekil 3.8) üzerine konulmuş alüminyum levha fiberleri toplamak için şırınga iğne ucuna 15 cm mesafede konulmuştur [117].

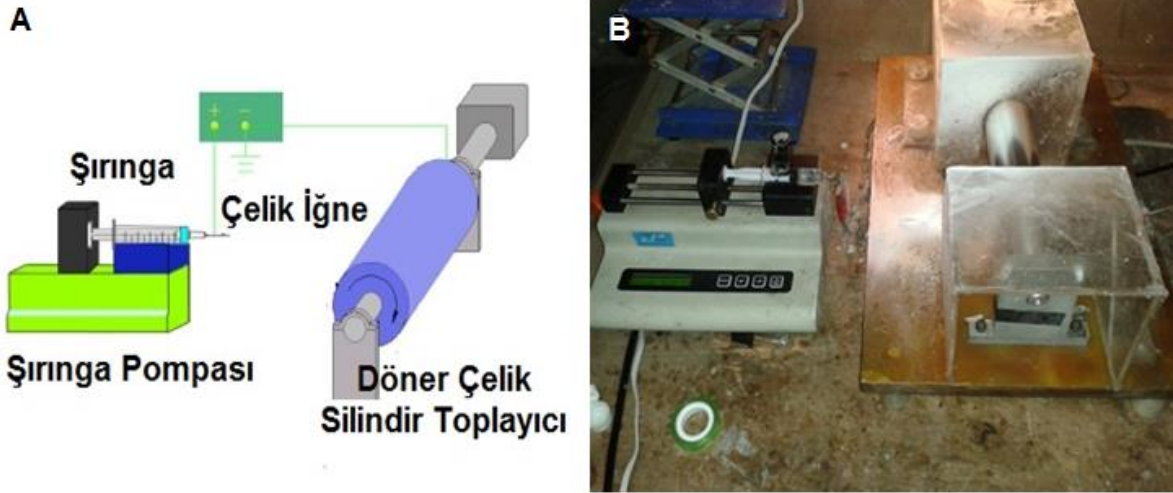
Elektroğirme yöntemi ile elde edilen fiberler, çözücü madde kalıntılarını uzaklaştırmak için, 3 gün süreyle vakumda bekletilmiştir. Bu çalışmada elektroğirme yöntemi kullanarak üretilen nanofiber matrisler çizelge 3.1'de gösterilmiştir.



**Şekil 3.6.** Polimer karışımı oluşturma ve elektroğirme Düzenegi ve toplayıcı üzerinde oluşan CS-g-PCL ve PCL karışımı nanofiber matrisleri.



**Şekil 3.7.** Elektroğirme işleminde kullanılan 21 gauge'lik paslanmaz çelik iğne.



**Şekil 3.8.** Elektroğirme sistemi ile polimer çözeltilisinden nanofiber matris oluşturmak için kullanılan döner çelik silindir toplayıcı: A) Toplayıcının şematik resmi B) Tez çalışmasında kullanılan elektroğirme cihazı ve toplayıcı.

**Çizelge 3.1.** PCL ve kopolimerlerin (CS-g-PCL-I ve CS-g-PCL-II) farklı oranları ile Hazırlanan fiberler:

No.	Nümüne	PCL oranı	Kopolimer oranı
1	PCL	100	0
2	CS-g-PCL-I/PCL	<b>75</b>	<b>25</b>
3	CS-g-PCL-I/PCL	50	50
4	CS-g-PCL-I/PCL	25	75
5	CS-g-PCL-II/PCL	<b>75</b>	<b>25</b>
6	CS-g-PCL-II/PCL	50	50
7	CS-g-PCL-II/PCL	25	75

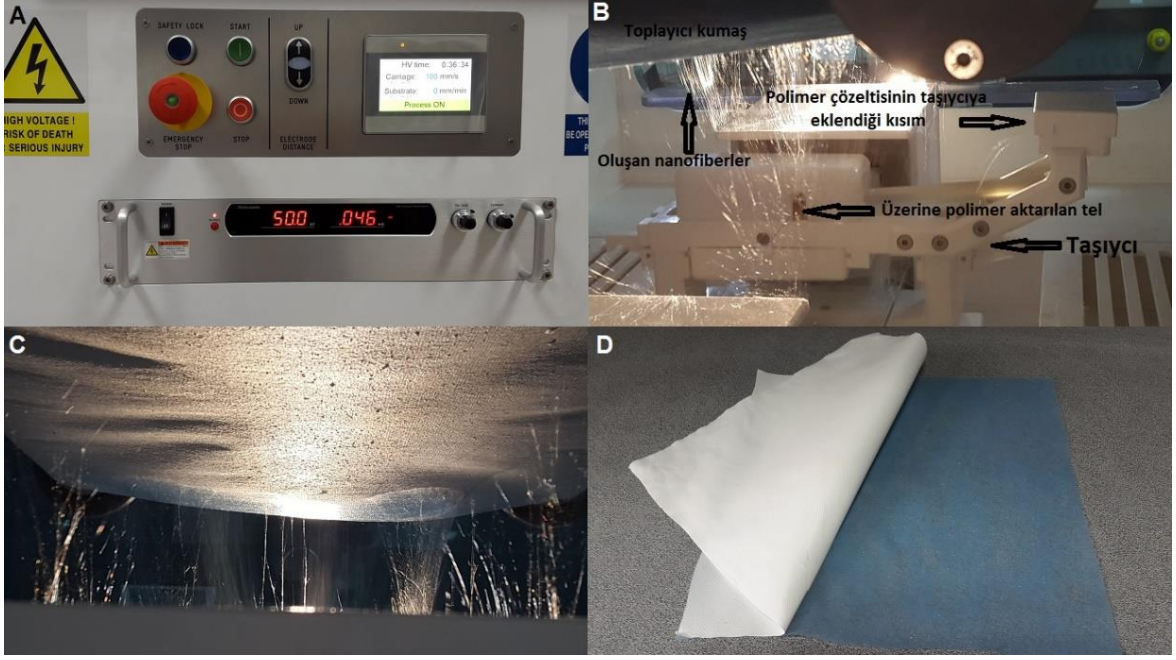


### **3.4.2. ELMARCO Nanospider Cihazı ile Nanofiber Matris Üretimi**

İkinci aşama çalışmalarda nanofiber matrislerin üretimi için Şekil 3.5’da görüntülenen cihaz kullanılmıştır. Cihaz, Elmarco firmasından temin edilmiştir. Bir Çek Cumhuriyeti firması olan Elmarco tarafından patentlenen bu Nanospider® cihazı teknolojik olarak üretim yapılabilecek farklı boyutlardaki cihazların en küçüğüdür. 40 cm enine kadar nanofiber film üretimi yapılabilmektedir. Nanospider™ teknolojisi patentli, iğnesiz, yüksek voltajlı, serbest sıvı yüzey elektroçizme prosesidir. Teknoloji, Taylor Konileri’ni ve ardından malzeme akışını yaratmanın sadece bir kapiler ucundan değil aynı zamanda bir polimer çözeltisinin ince bir filminden de mümkün olduğunu keşfetmeye dayanır. Teknoloji, Elmarco'nun püskürtme nozulları, iğneler veya iplik tesisatları olmaksızın endüstriyel ölçekli üretim ekipmanı kurmasını sağlamıştır. Nanospider™ teknolojisi su, asit veya bipolar solventlerde çözülen polimerlerden nanofiber üretimine izin verir ve organik yüksek kaliteli fiberlerin üretimi için uygundur. Bu çok yönlü teknoloji, üretilen nanofiberlerin spesifik özelliklerini optimize etmek için çeşitli proses parametrelerine kolayca adapte edilebilir.

### **3.4.3. Nanospider™ Teknolojisi**

Nanospider sisteminin özellikleri Şekil 3.9’da verilmiştir. Sistem kısaca şöyle tanımlanabilir: Nanofiber film üretimi cihazı içinde toplama film rulosu (kumaş) üzerine polimer çözeltisinin püskürtülerek birikmesiyle elde edilmektedir. İki tel arasında yüksek gerilim uygulanarak püskürtme gerçekleştirilmektedir. Teller arasındaki uzaklık bir sistem parametresidir ve kolaylıkla duyarlı bir şekilde ayarlanabilmekte/kontrol edilebilmektedir. Alt kısımda yerleşen tel üzerine bir taşıyıcı yardımı ile polimer çözeltisi aktarılmaktadır. Bu taşıyıcının hareket hızı ayarlanabilir ve böylece tel üzerine aktarılabilecek çözelti miktarı kontrol edilmektedir. Polimer çözeltisi taşıyıcı içerisinde depolanır ve taşıyıcının hareketi ile birlikte tel üzerine aktarılır. Üst kısımda yerleşen telin önünde ayarlanabilir bir uzaklıkta bir toplayıcı film (kumaş) hareket etmektedir. İki tel arasında gerilim uygulandığında, alt kısımda yer alan tel üzerindeki polimer çözeltisi üst kısımdaki tele doğru spin hareketi ile incelerek nanofiberleri oluşturur ve bu fiberler üst kısımdaki tele varmadan toplayıcı kumaş üzerinde toplanır ve böylece toplayıcı film üzerinde nanofiberlerden oluşan film oluşturulur. İşlem süreklidir, istenilen hız ve kalınlıkta film üretimi yapılabilmektedir.



**Şekil 3.9.** Nanospider® sistemi ile elektroögrilmiş film üretimi A) Kontrol birimi; B) Çözelti püskürtme (altta) ve fiber toplama (üstte) bölümleri; C) İşletme sırasında oluşan nanofiberler; D) Toplama kumaşı (mavi renkli) üzerinde toplanan film (beyaz-kıvrılmış).

Sistemdeki tüm parametrelerin kontrolü “kontrol panosundan” yapılmaktadır (Şekil 3.9.A). Şekil 3.9.B’de polimer çözeltisinin konulduğu/beslendiği bölüm (altta) ve hareketli toplama filmi (kumaşı) (üstte) görülmektedir. Şekil 3.9.C’de ise gerilimin uygulanması ile oluşan ve üstteki kumaş üzerinde film halinde biriken fiberler görülmektedir. PCL nanofiberlerinin üretimi için belirlenen optimum koşullar şöyledir: uygulanan gerilim: 50 kV; toplayıcı ve tel arsaında uzaklık: 16 cm; taşıyıcının hareket hızı: 100 mm/s; ve toplayıcı kumaş ve toplayıcı tel arasındaki uzaklık 25 mm. CS-g-PCL/PCL kopolimer karışımı için bu değerler sırasıyla 40 kV, 16 cm, 80 mm/s ve 25 mm olarak belirlenmiştir. Bu optimum koşullarda Nanospider sistemi ile yapılan üretimlerde elde edilen filmlerin bir örneği Şekil 3.9.D’da (mavi renkli toplama kumaşı ve beyaz renkli film) verilmiştir.

#### 3.4.4. Nanofiber Matrislerin Su Temas Açısı Deneyleleri

Fiberlerin ıslanabilirliği onalrın biyolojik bir ortamda kullanılabimesi için en önemli karakterlerden birdir. Üretilen fiberlerin ıslanabilirliğini göstermek için “su değme açısı” testi kullanılmıştır. Su değme açısı testi için yukarıda belirtilen fiberler (PCL ve CS-g-PCL-I ve II’nin PCL ile farklı oranlarda karışımları) kullanılmıştır. Film halinde oluşan fiberlerin sesil damla yöntemiyle üzerlerine su damlası damlatılarak ölçüm gerçekleştirilmiştir. Ölçüm için Harke-SPCA (Beijing, Çin) değme açısı

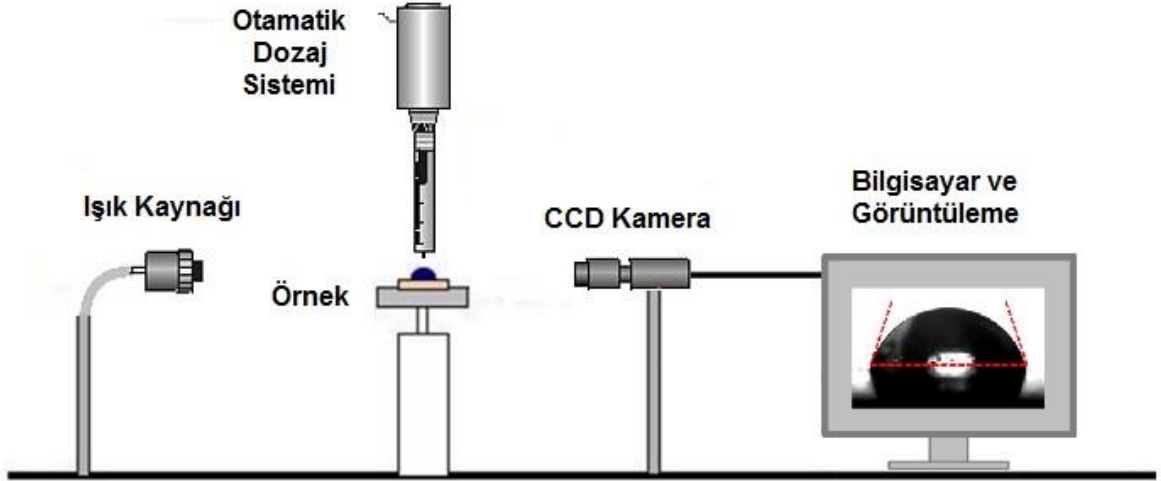


analizörü (Şekil 3.10 ve 3.11) kullanılarak saniye saniye su damlasının değişimi ile ilgili görüntüler alınmıştır.



**Şekil 3.10.** Harke-SPCA değme açısı analizörü (Beijing, Çin).

Bu görüntüler "wettability pro classic" yazılımı ile analiz edilmiştir. Sonuçlara dayanarak CS-g-PCL kopolimerlerinin PCL yüzeylerin hidrofilitesi üzerindeki etkisi ve buna bağlı olarak da biyouyumluluğunu nasıl etkilediği yorumlanmıştır.



**Şekil 3.11.** Sessile Damla Yöntemi.

### 3.4.5. X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) ile Yüzey Kimya Analizi

Electrospun fiberlerin yüzey kimyası bir X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) (Kratos Axis Ultra DLD, Al-K $\alpha$  radyasyonu ( $h\nu=14866$  eV), İngiltere) kullanılarak belirlenmiştir. Doymuş hidrokarbonun C1s piki için bağlanma enerjisi 283,0 eV olarak referans edilmiştir.

### 3.4.6. Matrislerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Görüntülenmesi

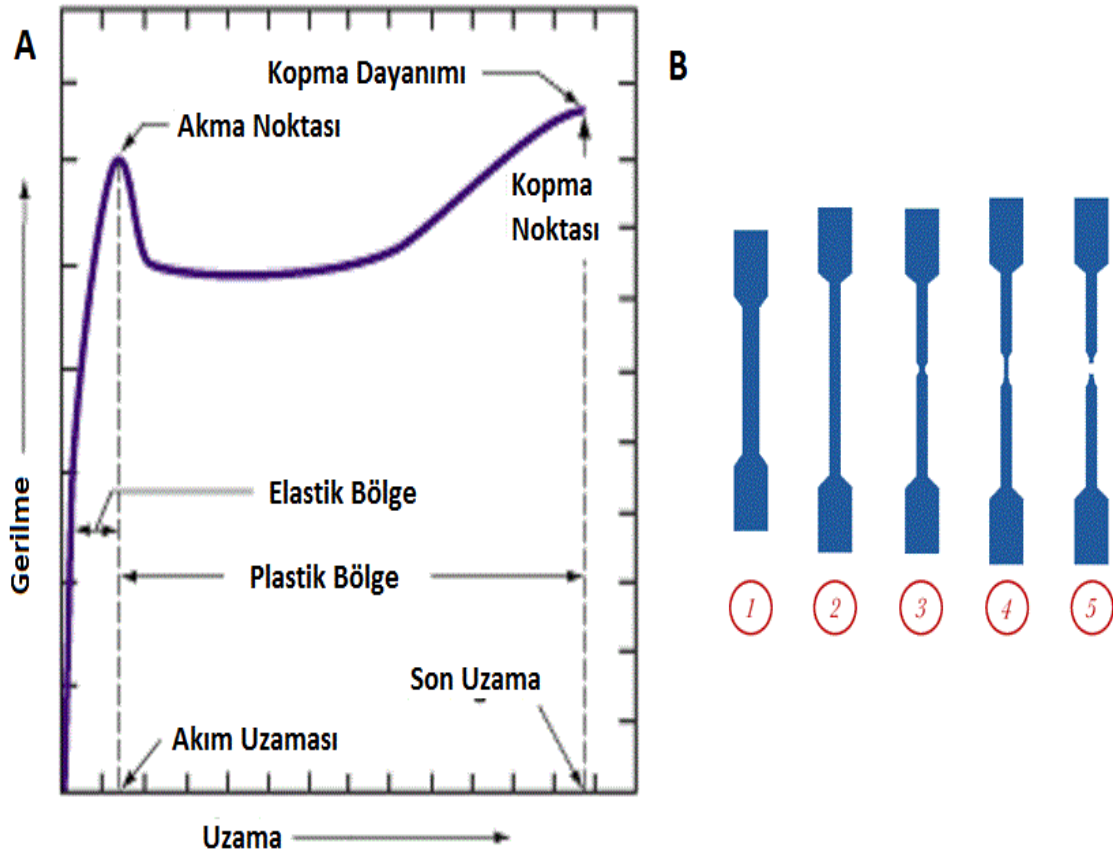
Tez çalışmasında oluşturulan PCL ve CS-g-PCL/PCL filmlerinin yüzey morfolojileri hakkında bilgi edinebilmek için bir taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntüleme gerçekleştirilmiştir. Çinde yapılan çalışmalar ve şıringalı elektrostatik eğirme cihazı ile elde edilen numuneler FEI Quanta FEG 250 SEM cihazı (Çek Cumhuriyeti, Şekil 3.12) ile analiz edilmiştir. Elmarco nanospider cihazı kullanarak hazırlanan nanofiber numuneleri yüksek çözünürlüklü taramalı elektron mikroskobu (QUANTA 400F Field Emission SEM, ABD) ile görüntülenmiştir. Öncelikle, hazırlanmış PCL ve CS-g-PCL/PCL filmleri küçük parçalar halinde numune tablası üzerine tutturulmuş uygun şekilde kaplama yapıldıktan sonra analiz edilerek görüntüleri elde edilmiştir. Elde edilen SEM görüntüleri ImageJ yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.



**Şekil 3.12.** Taramalı Elektron Mikroskopisi, FEI Quanta FEG 250, (ÇekCumhuriyeti).

### 3.4.7. Nanofiber Matrislerin Gerilme-Uzama Deneyi

Gerilme-uzama deneyi ile malzemelerin statik yük altındaki elastik ve plastik davranışları belirlenmektedir. Malzemeye kuvvet uygulandığında malzemede meydana gelen uzamalar elastik sınırlar içinde gerilmelerle orantılıdır. Bu durum "Hooke Kanunu" ile ifade edilmektedir. Hooke kanunundan faydalanılarak malzemenin elastisite modülü bulunabilir. Şekil 3.13.A'da görülen çekme-uzama grafiğinin eğrisi (elastik bölgesi içerisinde kalan) elastisite modülünü vermektedir. Elastik bölge malzemenin geriye dönemeyecek şekilde deformasyona uğradığı andır. Bu andan sonra plastik deformasyona uğramaya başlar. Malzemeyi plastik deformasyona uğratabilmek için gereken minimum gerilim miktarı akma noktası olarak ifade edilir. Çekme-Uzama testi esnasında malzemede oluşan değişimler Şekil 3.13.B'de gösterilmiştir.



ASTM E4 (Şekil 3.14) standartlarına uygun gerilme-uzama testi (Testometric M500-25CT malzeme test makinası, İngiltere) ile gerçekleştirilerek her örnekten 5 adet fiberin mekanik özellikleri hakkında veriler elde edilmiştir. Fiberler 1 cm en, 3 cm boy ve 80 µm kalınlığında olup, 5 kN çekme kuvveti ve 5 mm/dak. sabit çekme hızıyla oda sıcaklığında test edilerek bir gerilme-uzama grafiği oluşturulmuştur. Grafiğin eğiminden nanofiber filmlerinin elastisite modülü elde edilmektedir.



**Şekil 3.14.** Testometric M500-25CT malzeme test makinası (The Testometric Company Ltd, İngiltere).

### 3.5. Antimikrobiyal Testler

Üretilen nanofiberlerin antibakteriyel özelliklerini belirlemek için iki bakteri suşu biri gram pozitif ve diğeri gram negatif seçilerek bu bakteriler varlığında PCL ve CS-g-PCL-b-I-PCL nanofibelerin antibakteriyel özellikleri incelenmiştir. Gram-negatif bakteri olarak *Escherichia coli* (ATCC 25922) kullanılmıştır. Bu organizma, antimikrobik duyarlılık testi için bir CLSI kontrol suşudur.

LT toksini üretiminde negatif kontrol olarak medya testi için ve Abbott, API, Autobac, BBL, bioMerieux Vitek, Biosynth, Difco, IDS, MicroMedia, MicroScan™, Roche Diagnostics ve Sensititre ürünleri için kalite kontrolü yapan bir suş olarak kullanılır. Gram-pozitif bakteri ise *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) seçilmiştir. Bu organizma CAMP testi için kalite kontrol suşu, odun duman konsantrat tayini, MuellerHinton agarın değerlendirilmesi, süt ürünlerinin incelenmesi, ortam testi, CLSI disk difüzyonu ve Abbott, API ve Autobac ürünleri için kullanılır. Film örneklerinin antimikrobiyal etkisi agar difüzyon yöntemine göre değerlendirilmiştir [172,174].

Bakteri kültürleri, kullanılmadan önce arda arda iki kez Triptik Soy Broth (TSB) (Merck, Almanya) içerisinde 37°C' de 18 saat süreyle aktifleştirilmiştir. Kültürler - 80°C de içerisinde gliserol (%20) bulunan uygun ortamda depolanmıştır. Deneylerde kullanılan başlangıç hücre sayısı,  $10^7$  - $10^8$  cfu/ml (OD<sub>600</sub>) olarak ayarlanmış ve TSA üzerine ekim yapılarak başlangıç sayısı doğrulanmıştır.

### **3.5.1. Agar Difüzyon Testleri**

Üretilen fiberler seçilen bakteriler üzerindeki antimikrobiyal etkilerini belirlemek amacıyla aseptik koşullarda kesilmiş örnekler (1 cm çapında) başlangıç bakteri sayısı  $10^7$  - $10^8$  cfu/ml olan TSA üzerine yerleştirilerek 37°C'de 72 saat süreyle inkübe edilmiştir. Antibakteriyel etki 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda film örneklerinin etrafında oluşan inhibisyon zonu mm olarak ölçülerek belirtilmiştir. Çalışmalar 2 paralel ve 2 tekrarlı olarak yapılmıştır.

### **3.6. Biyofilm Oluşumu Deneyleri**

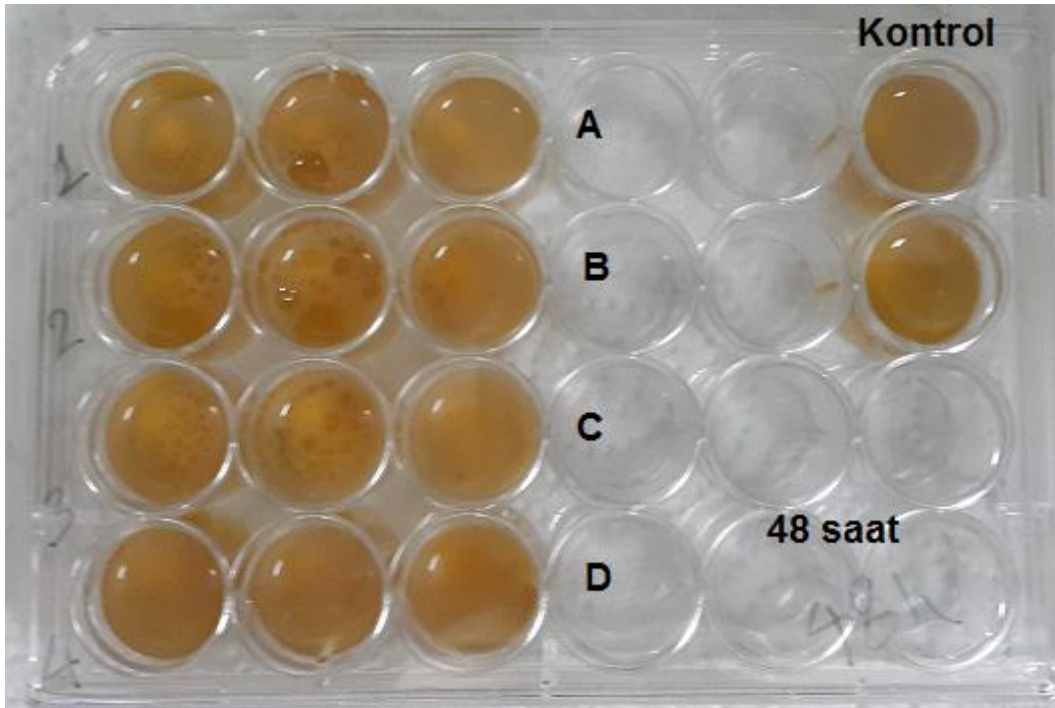
Nanofiberlerin yüzeyinde biyofilm oluşumunu incelemek için biyofilm oluşumu testleri yapılmıştır. Bu deneyler için kullanılan bakteri *S. epidermidis* seçilmiştir. *S. epidermidis* bakteri hücreleri Kocaeli Üniversitesi/Hastanesi mikrobiyoloji laboratuvarından mannitol tuz agar ortamlarda laboratuvarımıza aktarılmıştır. *S. epidermidis* hücrelerinin ekimi, 121°C'da otoklavda sterilize edilmiş, bir cam asyon ile başlatılmıştır. Besi ortamı, 3 gr TSB granülleri 100 ml distile suya eklenerek hazırlanmıştır. TSB çözeltisi otoklavda sterilize edilmiştir. Otoklavlanmış TSB ortamı yaklaşık 37°C'ye ulaşmasına kadar soğutulmuştur. *S. epidermidis* bakteriyel hücreleri İnce platin tel halkası ile hazır bakteriyel hücreler kaynağından hasat edilmiştir. Bakteriyel hücrelerin bir null miktarı, 100 ml sterilize edilmiş TSB ortamına daldırılarak, 37°C'de su banyosu ile donatılmış bir çalkalayıcıya yerleştirilmiştir

[174]. Hücreleri içeren erlenmeyer şişesi, 24 saat süreyle kontrollü sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Hücrelerin büyüme/çarpma kolorimetrik kontrolü 24 saat sonra gerçekleştirilmiştir. Bulutlu ortam bakteri hücrelerinin çoğalmasını göstermektedir. Bakteriyel hücrelerin bir tümböleni miktarı hasat edilmiştir ve sonraki ekim aşamalarına gerekli hücre konsantrasyonunu elde etmek için 37 ° C'de steril su ile karıştırılmıştır. Bu aşama için bakteri hücrelerinin ihtiyaç olan konsantrasyonu OD faktörü ile ayarlanmıştır. 600 nm dalga boyunda morötesi-görünür (UV-Vis) spektrumu 0.075 absorbans yoğunluğu Mcfarland ölçeğinde OD = 0.05 ile eşittir. OD = 0.05 de eşittir CFU:1.5× 10<sup>8</sup> bakteri hücresi/ml. Hücreler dağılımı stok kaynağı olarak kabul edilmiştir.

### 3.6.1. *S. epidermidis* Biyofilm Oluşumu Deneyleleri

Hücreler dağılımı 100 uL orijinal kaynağından alınmıştır. 100 ml Bakteriyel hücreler 24 kuyucuklu kültür plakalarının 3 kuyucuğna ilave edilmiştir. Ekim aşamaları 1.99 ml sterilize TSB'nin kontrol grubu olarak *S.epidermidis* biyofilmi oluşturmak için, kuyucuklara yerleştirilen hücrelere, eklenerek devam edilmiştir.

Nanofiber filmler (10 mm çapında) kuyucuklara yerleştirilmiştir. 100 ml bakteri hücreleri kuyucuklara yerleştirilen nanofiberler yüzeyine ilave edilerek inkübatör içinde 24 saat boyunca 37°C'da tutulmuştur (Şekil 3.15).



**Şekil 3.15.** Biyofilm Oluşumu Testi: A) PCL, B) CS-g-PCL-b-I/PCL (25:75), C) CS-g-PCL-b-I/PCL (50:50) ve D) CS-g-PCL-b-I/PCL (75:25), 48 saat.

Birinci gün için Besleme ortam plaka kuyucuklardan 24 saat sonra atılmıştır. Birinci grup *S. epidermidis* biyofilm 1 x PBS çözeltisi ile en az üç kez yıkanmıştır. Sonra kuyucuklar önce kristal viyole çözeltisi (%1 etil alkol içinde) ile doldurularak 2 dakika sonra Kristal viyole çözeltisi kuyucuklardan atılmıştır ve steril distile su ile iki kez yıkanılmıştır. Biyofilmler, etil alkol (%75) içinde çözüldükten sonra UV-Vis absorbans yoğunlukları 600 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Aynı işlem, 2. ve 3. günlerin plakaları üzerinde de gerçekleştirilmiştir.

### 3.6.2. *S. epidermidis* Biyofilminin Optik Mikroskop Görüntüleri

*S.Epidermidis* biyofilm oluşumunu zaman içinde görüntülemek için mikroskopik görüntüleri farklı günlerde Optik mikroskop (Leica, ABD) ile elde edilmiştir (Şekil 3.16) .



**Şekil 3.16.** 40×Zeiss lens ile donatılmış LEICA optik mikroskop (Leica, ABD).

### 3.7. Turkevich Yöntemiyle Altın Nanopartikül (AuNP) Sentezi

İlk başta tetrakloroaurik asit ( $\text{HAuCl}_4$ , 300 mi, 0.5 mM), reaksiyon öncüsü olarak yuvarlak tabanlı bir şişede (cam reaktör) hazırlanmıştır. Çözelti kaynama derecesine kadar ısıtılmıştır. Isıtmaya devam ederken trisodyum sitrat (30 mL, 38.8 mM), manyetik karıştırıcı ile kuvvetli karıştırma altında, reaksiyon çözeltisine ilave edilmiştir. Kaynama aşaması indirgeme maddesi ilave edildikten sonra 15 dakika daha ( şeffaf kırmızı şarap çözelti görünene kadar) sürdürülmüştür. Isıtma durdurularak kuvvetli karıştırma reaksiyon şişesi yavaş yavaş söğütülana kadar 30



dakika boyunca devam ettirilmiştir. Çözelti 12,000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır ve çöken kısmı 50 ml plastik tüp içine toplanmıştır [175,176].

### **3.7.1. AuNPlerin Morötesi–Görünür ( UV-Vis ) Analizi**

Sentezlenen altın nanopartiküllerinin ortalama boyutlarını elde etmek amacı ile bu nanopartiküllerin Morötesi–görünür spektrumu elde edilmiştir. Analiz için altın nanopartiküllerin çözeltisi seyreltilerek morötesi–görünür cihazı (UV-Vis, Jasca V-530, ABD) ile 400-1100 nm dalğa boyu arasında spektrumu elde edilmiştir. Bu spektrumun 520-550 nm civarındaki piki nanopartiküllerin ortalama boyutlarını ve pikin keskinliği ise nano partiküllerin boy dağılımı konusunda önemli bilgiler vermektedir.

### **3.7.2. AuNPlerin Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Görüntüleri**

Turkevich yöntemiyle sentezlenen AuNP'lerin şekil ve boyutlarını incelemek ve NP'lerin ortalama boyutlarını belirlemek için NP'lerin TEM görüntüleri elde edilmiştir. Bu amaç için AuNP'lerin seyrek çözeltilerini bir ependorf içinde uygun sıvıda süspansiyona alındıktan ve ultrasonik banyoda karıştırdıktan sonra, ince uçlu şırıngaya çekilerek, numune uygun bakır ızgara üstüne bir damla damlatılıp, 24 saat bekletilerek kurutulmuştur ve daha sonra bir geçirimli elektron mikroskobu (TEM, FEI, Tacnai) ile nanopartiküllerin görüntüleri elde edilmiştir.

### **3.8. Sonikasyon Yöntemiyle Nanofiber Yüzeylerine Nanopartikül Yüklenmesi**

Sonokimyasal yöntemi ile NP sentezlemek ve polimeri ve seramik yüzeylere NP yüklemek için genelde ayarlanabilir yüksek şiddetli sonokimyasal cihazlar kullanılmaktadır (Şekil 3.17). Bu tez çalışmasında da nanofiber matrislerinin yüzeylerine gümüş nanopartikülleri (AgNP'leri) ve AuNP'leri yüklemek ve yüzeyleri zenginleştirmek için ilk adımda sonokimyasal cihaz kullanılmıştır (Sonoplus 2200, Japonya, Şekil 3.18). Ama sonokimyasal cihazlarının yüksek şiddetlerinde nanofiber matrislerin düşük dayanıklılıklarından dolayı nanofiber yapıları büyük ölçüde hasar görmüş ve bu cihaz nanofiber matrislerin yüzeylerini zenginleştirmek için kullanılamamıştır. Daha sonra bu amaç için sonikasyon banyosu kullanılmıştır ve bu ortamda özellikle PCL nanofiber matrislerin yapılarında herhangi bir hasar görünmemiştir ve bu nedenle yüzey zenginleştirmek için sonikasyon banyosu kullanılmıştır.





Şekil 3.17. Sonokimyasal cihazı.



Şekil 3.18. Sonoplus 2200, Japonya.

### 3.8.1. Sonokimyasal İndirgeme ile Nanofiber Yüzeylerine AgNP Yüklenmesi

Nanofiberlerin yüzeyinde gümüş nanopartiküllerinin (AgNP'lerin) yüklenmesi için sonokimyasal yöntem kullanılmıştır. PCL ve CS-g-PCL-I/PCL nanofiber filmler yüzeylerine AgNP'lerinin indirgenerek yüklenmesi için, 1 cm<sup>2</sup>'lik nanofiber filmi, 10 ml 0.05 M gümüş nitrat (AgNO<sub>3</sub>) sulu (% 90 su : % 10 etilen glikol (EG)) çözeltisi ihtiva eden bir 50 ml sonikasyon şişesine yerleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı daha sonra O<sub>2</sub> / hava izlerini gidermek için 1 saat süre ile, argon (Ar) ile temizlenerek daha sonra, Ar akışını muhafaza etmekle birlikte ultrasonik sonikasyon cihazı ile sonike edilmiştir. Sonikasyonun ilk 5 dakikası boyunca %24 hacim oranı sulu amonyak çözeltisi (NH<sub>3</sub>:AgNO<sub>3</sub>=2:1) reaksiyon ortamına ilave edilmiştir. sonikasyon

esnasında, Nanofiber filmlerin yüzeyinin rengi beyazdan açık griye değişmeye başlamıştır. Sonikasyon bittikten sonra, nanofiber film üzerinden amonyak izlerini gidermek için, önce distile su ile ve daha sonra etanol ile iyice yıkanılmıştır ve 24 saat boyunca oda sıcaklığında kurutulmuştur [157-160]. Gümüş nanopartiküllerinin (AgNPler) stabilizasyonu için 3 g/L polietilen glikol (PEG) sonikasyon başlamadan önce reaksiyon ortamına ilave edilmiştir. Farklı  $\text{AgNO}_3$  konsantrasyonları ve ultrason radyasyon şiddetleri ve süreleri incelenmiştir.

### **3.8.2. Sonokimyasal İndirgeme ile Nanofiber Yüzeylerine AuNP Yüklenmesi**

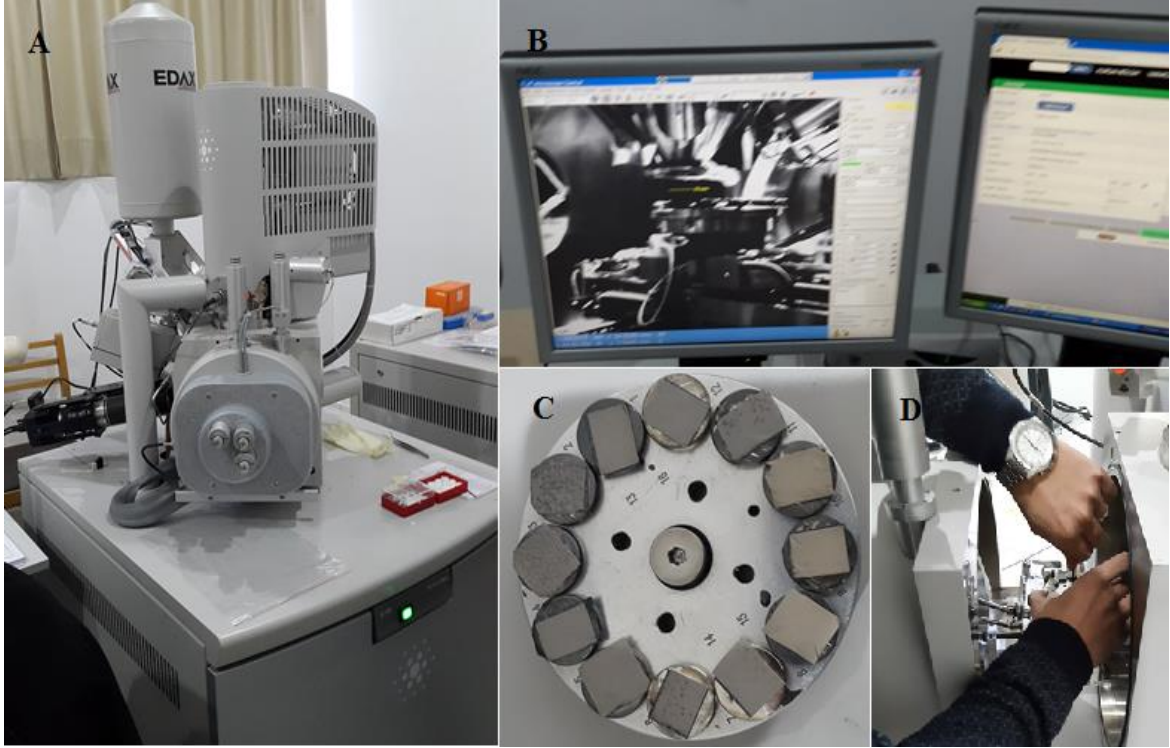
Nanofiberlerin yüzeyinde altın nanopartiküllerin (AuNP'lerin) yüklenmesi için sonokimyasal yöntem kullanılmıştır. PCL ve CS-g-PCL-I/PCL nanofiber filmler yüzeyine AuNP'lerin indirgenerek yüklenmesi için, 1  $\text{cm}^2$ 'lik nanofiber filmi 10 ml 0.5 mM altın tuzu ( $\text{HAuCl}_4$ ) sulu (% 70 su: %30 izopropil alkol) çözeltisi ihtiva eden bir 50 ml sonikasyon şişesine yerleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı daha sonra  $\text{O}_2$ /hava izlerini gidermek için 1 saat süre ile, argon (Ar) ile temizlendikten sonra Ar akışını muhafaza etmekle birlikte ultrasonik cihazı ile sonike edilmiştir. Sonikasyonun ilk 5 dakikası boyunca %24 hacim oranında sulu amonyak çözeltisi reaksiyon ortamına ilave edilmiştir. sonikasyon esnasında, Nanofiber filmlerin yüzeyinin rengi değişmeye başlamıştır. Sonikasyon bittikten sonra, nanofiber film üzerinden amonyak izlerini gidermek için, önce su ile daha sonra etanol ile iyice yıkanılmıştır ve 24 saat boyunca oda sıcaklığında kurutulmuştur [161-163]. AuNP'lerinin stabilizasyonu için 3 g/L polietilen glikol (PEG) sonikasyon başlamadan önce reaksiyon ortamına ilave edilmiştir. Farklı  $\text{HAuCl}_4$  konsantrasyonları ve ultrason radyasyon şiddetleri ve süreleri incelenmiştir.

### **3.8.3. AuNPlerin Sonikasyon ile Nanofiber Yüzeylerine Yüklenmesi**

Nanofiberlerin yüzeyinde önceden sentezlenmiş AuNP'lerin yüklenmesi için sonokimyasal yöntem kullanılmıştır. PCL ve CS-g-PCL-I/PCL nanofiber filmler yüzeyine AuNP'lerin yüklenmesi için, 1  $\text{cm}^2$ 'lik nanofiber filmi 0.5 mM AuNP çözeltisi ihtiva eden bir 50 ml sonikasyon şişesine yerleştirilmiştir. NP çözeltisi ultrasonik sonikasyon cihazı ile sonike edilmiştir. Sonikasyon bittikten sonra nanofiber film önce su ile daha sonra etanol ile iyice yıkanılmıştır ve 24 saat boyunca oda sıcaklığında kurutulmuştur [161-163]. Farklı AuNP konsantrasyonları ve ultrason radyasyon şiddetleri ve süreleri incelenmiştir.

### 3.8.4. Yüzeylerine NP Yüklenen Nanofiberlerin SEM Görüntüleri

Yüzeyleri sonikasyonla indirgeme yöntemi ile zenginleştirilmiş (Au veya Ag NP'leri yüklenmiş) nanofiber matrisler ve önceden sentezlenen AuNP'ler yüklenmiş nanofiber matrislerin yapılarını görüntülemek için SEM görüntüleri çekilmiştir. Yüzeyleri zenginleştirilmiş matrislerin yüzey morfolojileri hakkında bilgi edinebilmek için yüksek çözünürlüklü taramalı elektron mikroskobu (QUANTA 400F Field Emission SEM, ABD) ile görüntüleme gerçekleştirilmiştir.

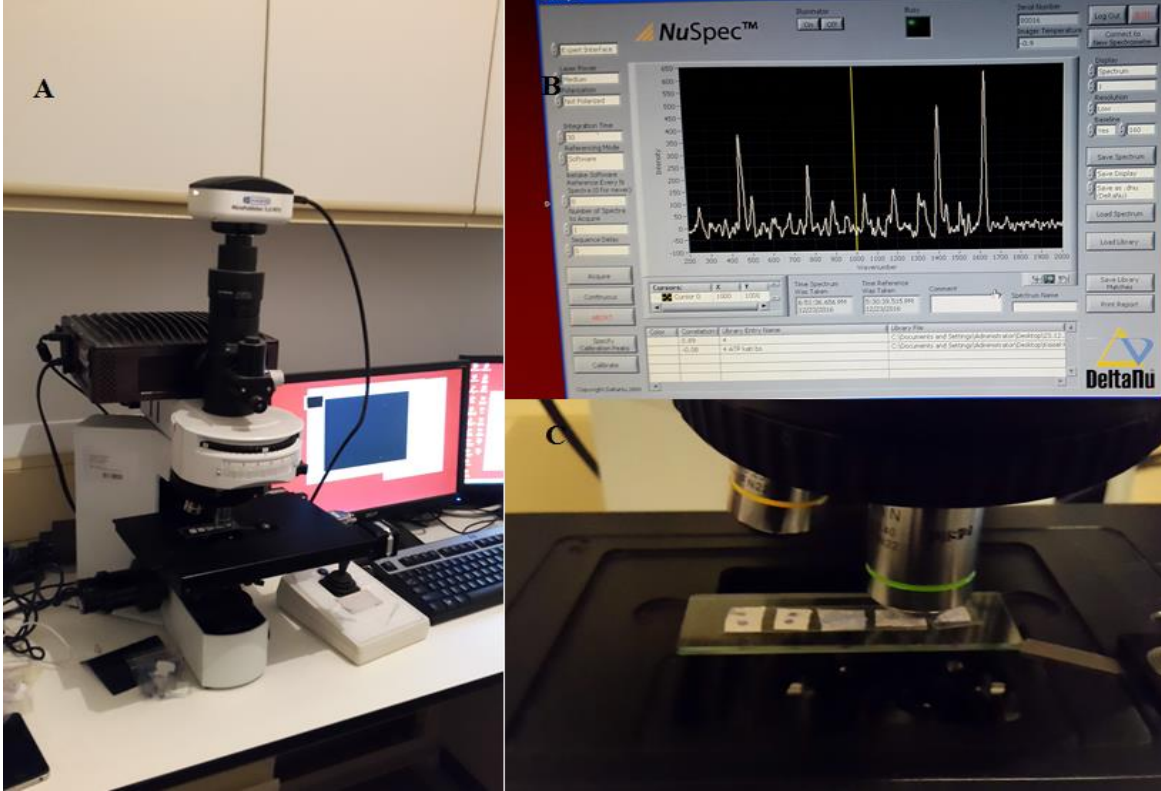


**Şekil 3.19.** QUANTA 400F Field Emission SEM, Yüksek çözünürlüklü taramalı elektron mikroskobu: A) SEM cihazı, B) Yüzeylerin bilgisayarda görüntülenmesi, C) Yüzeyleri SEM ile görüntülemek için kaplanmış numuneler, D) Yüzeyleri kaplanmış matrislerin SEM cihazına yerleştirilmesi.

Öncelikle, yüzeyleri zenginleştirilmiş matrislerin küçük parçalar halinde numune tablası üzerine tutturulmuş uygun şekilde kaplama yapıldıktan sonra analiz edilerek görüntüleri elde edilmiştir. QUANTA 400F Field Emission SEM cihazının çözünürlüğü 1.2 nm dir. Elde edilen SEM görüntüleri ImageJ yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Şekil 3.19 QUANTA 400F Field Emission SEM cihazını, Yüzeylerin SEM görüntülerinin bilgisayarda görüntülenmesini, yüzeyleri SEM ile görüntülemek için kaplanmış numuneleri ve yüzeyleri kaplanmış matrislerin SEM cihazına yerleştirilmesini göstermektedir.

### 3.8.5. Yüzeylerine NP Yüklenen Nanofiberlerin Raman Analizi

Yüzeyleri sonikasyonla indirgeme yöntemi ile zenginleştirilmiş (AuNP'leri veya AgNP'leri yüklenmiş) nanofiber matrisler ve önceden sentezlenen AuNPIler sonikasyon ile yüklenmiş nanofiber matrislerin yüzey zenginleştirilmiş raman spektrumları (SERS) bir yüksek performanslı raman mikroskobu (ExamineR™ High Performance Raman Microscope, 785 Lazer Raman modülü, Kanada) kullanarak elde edilmiştir.



**Şekil 3.20.** Raman spektrometrisi: A) ExamineR™ yüksek performanslı raman mikroskobu, 785 Lazer Raman modülü, B) Raman spektrumlarının bilgisayar sistemde görüntülenmesi, C) Numunelerin raman mikroskobu altında görüntüsü.

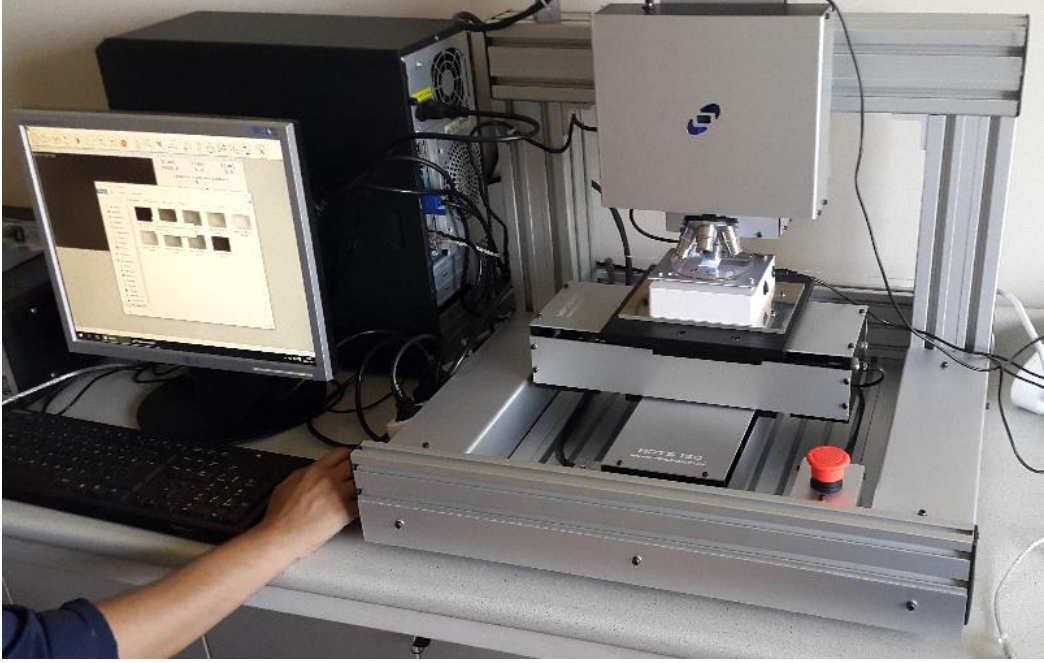
Bu amaç için cam yüzeyler üzerinde çift taraflı bant kullanarak sabitleşmiş nanofiber yüzeylerine metilen mavisi (MB) damlatıldıktan sonra raman spektrometresi ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar  $1610 \text{ nm}^{-1}$ 'de MB pikinin şiddetleri kıyaslanarak değerlendirmiştir (Şekil 3.20).

### 3.9. NP Yüklendi Yüzeylerin Flüoresan Ölçümleri

Altın ve gümüş yüklenmiş yüzeylerin bakteri üzerinde etkilerini belirlemek için flüoresan ölçümleri yapılmıştır. Bu deneylerde E. coli ATCC 25922 suşu süspansiyonu kullanılmıştır. PCL ve altın ve gümüş yüklenmiş nanofiberler üzerine 10 µl GFP (Green Floresan Protein) boya ilave edilmiştir. Boya nanofiber yüzeyine



ilave edildikten sonra flüoresan mikroskop ile görüntü alınmıştır. Daha sonra yüzeye 10 µl E. coli ATCCC 25922 ilave edilerek görüntü alınmıştır. 12 saat bekledikten sonra tekrar görüntü alınmıştır. Görüntü almak için iki farklı flüoresan mikroskop cihazı (PSARON 1000, Tam Otomatik 3D Dijital Mikroskop Sistemi, Türkiye, ve Dino-Lite Digital Microscope, AM4115T-GRFBY, Taiwan) (Şekil 3.21. ve 3.22.) kullanılmıştır.



**Şekil 3.21.** PSARON 1000, Tam Otomatik 3D Dijital Mikroskop Sistemi, Türkiye.



**Şekil 3.22.** Dino-Lite Digital Microscope, AM4115T-GRFBY, Taiwan.

## 4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Sentezlenen Graft Kopolimerler ve PCL'nin Karakterizasyonu

Bu tez çalışmasında iki farklı graft kopolimer CS-g-PCL-I (kaprolaktonu yüksek) ve CS-g-PCL-II (kaprolaktonu düşük) sentezi yapılmıştır. Bunların MFR (Moleküler fraksiyon oranı) ve polimerizasyon verimleri (elde edilen numunenin ağırlığının kullanılan kitosan ve kaprolaktonun toplam ağırlığına oranı) sırasıyla 24 ve 12 ve %76 ve %84 dir (Çizelge 4.1). Sentezlerin oldukça başarılı bir şekilde gerçekleştiğini söylemek mümkündür.

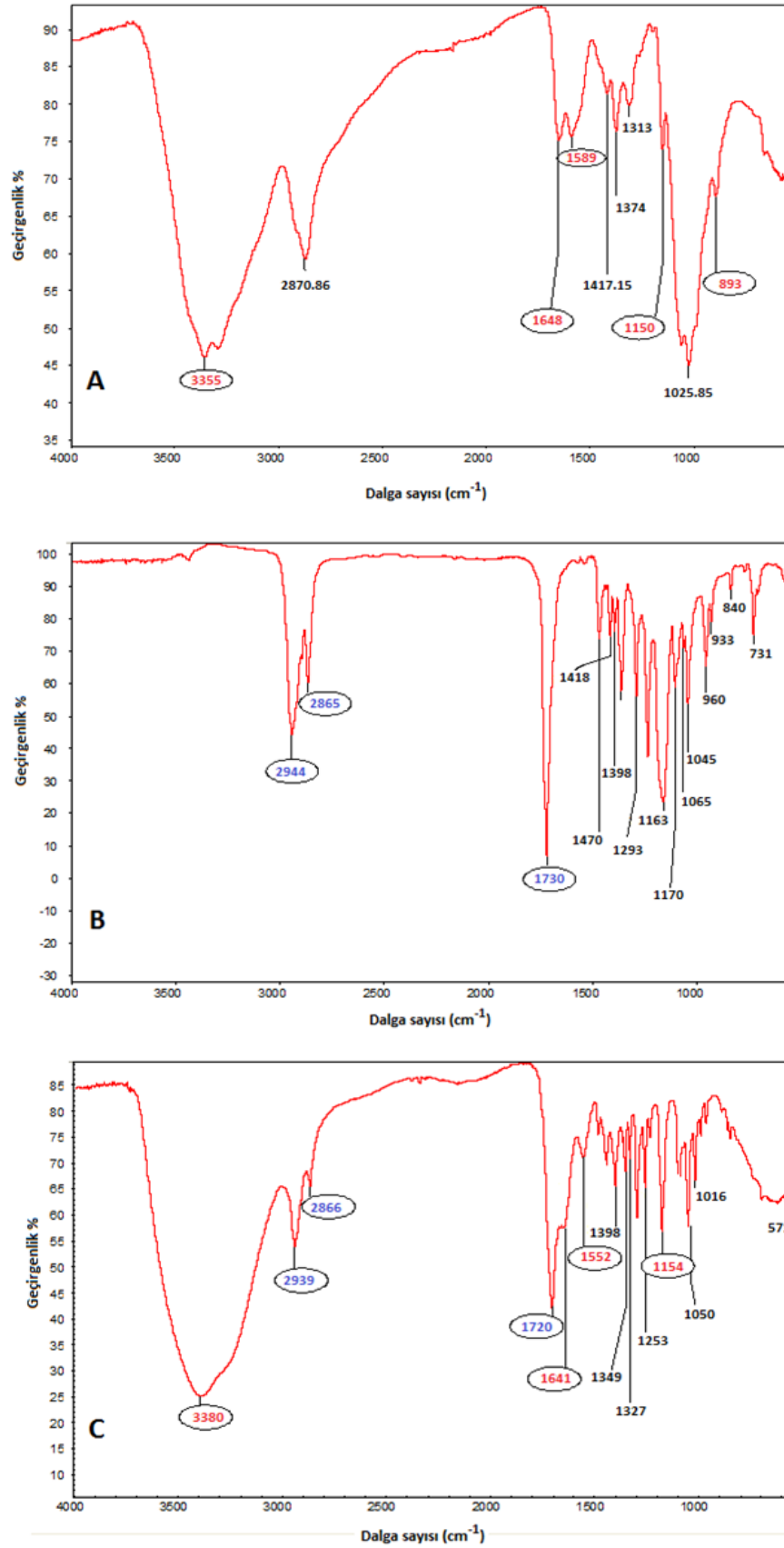
**Çizelge 4.1.** PCL ve CS-g-PCL kopolimerlerin karakterizasyonu

Numune	PCL	CS-g-PCL-I	CS-g-PCL-II
MFR <sup>a</sup>	-	24	12
Verim (%) <sup>b</sup>	-	76	84
MW (kDalton) <sup>c</sup>	86.650	11.633	10.822

Notlar: a:  $\epsilon$ -CL'in glukuzamin gruplarına molar fraksiyon oranı (Moral feed ratio), b: Verim (%) =  $[(WCS-PCL)/(WCL + WCS)] \times 100\%$ , c: GPC ile ölçülmüştür.

#### 4.1.1. FTIR Sonuçları

Kitosan (CS), PCL ve CS-g-PCL-I'in FTIR analiz sonuçları şekil 4.1'de verilmiştir. Şekil 4.1.A'da CS'in polisakkarit yapısını temsil eden karakteristik pikler 893 ve 1150  $cm^{-1}$  de, ve amit I bandı ve amino gruplarının absorpsiyonu sırasıyla 1648 ve 1589  $cm^{-1}$ 'de gösterilmiştir. Şekil 4.1.B'de 1730  $cm^{-1}$ 'deki pik PCL homopolimerinin esteri gerilmesini göstermektedir ve karakteristiktir. Şekil 4.1.C'de verilen CS-g-PCL-I graft kopolimerine ait spektrumda 1720, 1641 ve 1552  $cm^{-1}$ 'deki pikler sırasıyla PCL'nin karakteristik ester bantı ve CS'nin amit I ve amino gruplarını temsil etmektedir. Piklerden ve bağıl şiddetlerinden grafitlamanın başarıyla yapıldığını söylemek mümkündür [117].



**Şekil 4.1.** Örnek FTIR spektrumları: (A) Kitosan (CS); (B) Polikaprolakton homopolimeri (PCL); ve (C) Graft kopolimer (CS-*g*-PCL-I).

#### 4.1.2. <sup>1</sup>H-NMR Sonuçları

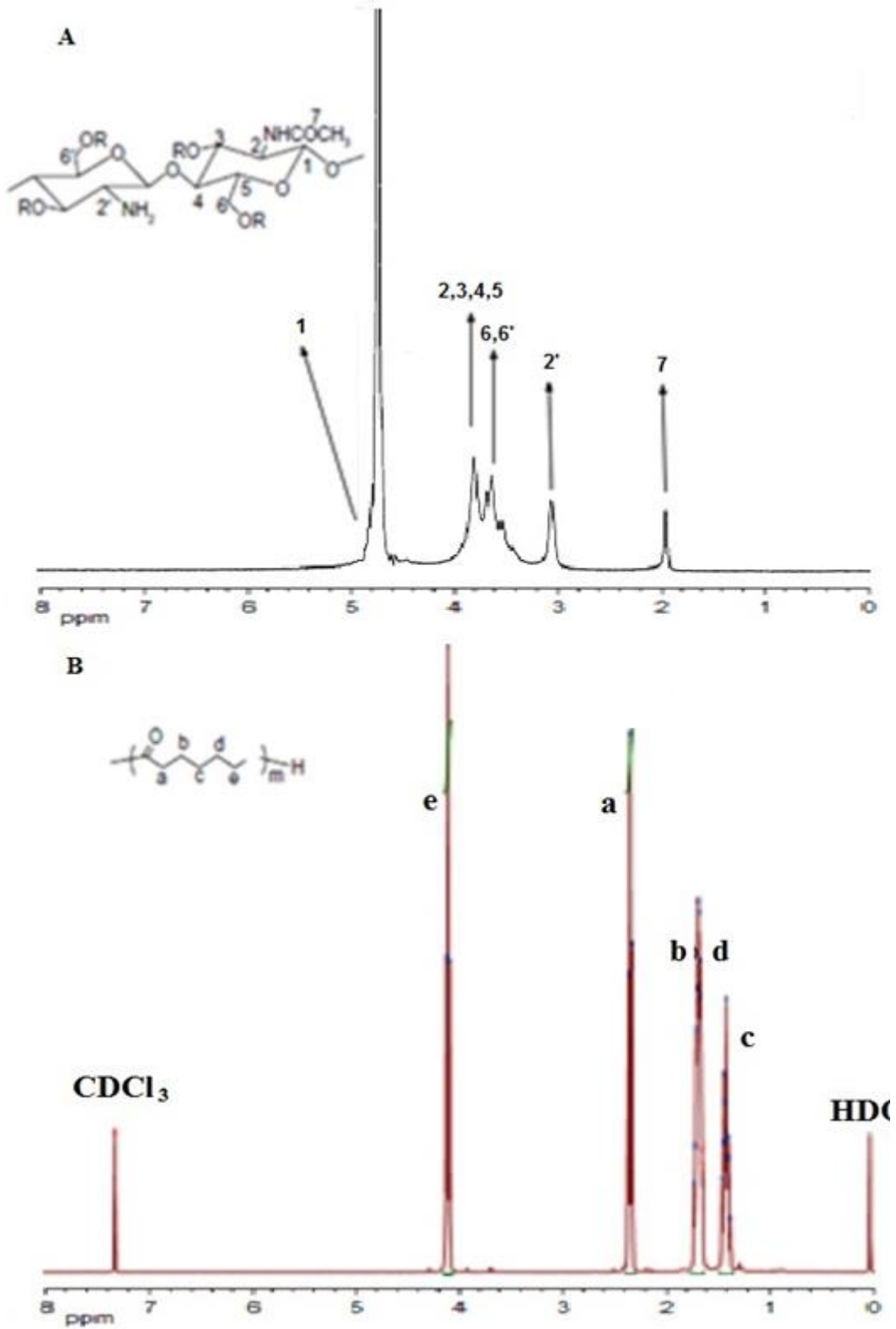
CS, PCL ve graft kopolimerlerin <sup>1</sup>H-NMR spektrumları sırasıyla şekil 4.2 ve şekil 4.3'de verilmiştir. Kitosanın ait olan karakteristik pikler genel bilgiler kısmında şekil 2.3'de verildiği gibi 4.5-5.5 ppm (1) D-glukozamin biriminin H-1'i için; 3.4-4.25 ppm (2,3,4,5,6,6')'de H-2,3,4,5,6 ve 6' sakarin birimleri için; 3-3.2 ppm (2')'de H-2' için ve 2.05 ppm (7)'de -CH<sub>3</sub> için görülmektedir (Şekil 4.2). PCL'e ait karakteristik pikler ise 2.2 ppm (a), 1.6 ve 1.7 ppm (b, d), 1.4 ppm (c) ve 4.15 ppm (e)'de yer almaktadır (Şekil 4.2.). CS ve PCL'e ait pikler graft kopolimer I ve II (Şekil 4.3. A ve B)'nin spektrumlarında gösterilmiştir. Bu bulgular da FTIR sonuçlarıyla paraleldir ve graft kopolimer oluşumunu kanıtlamaktadır [25,117].

CS üzerinde graft edilen oligo-PCL zincirlerinin ortalama uzunluğu (D-glukozamin birim başına) denklem (4-1)'den elde edilmektedir [17].

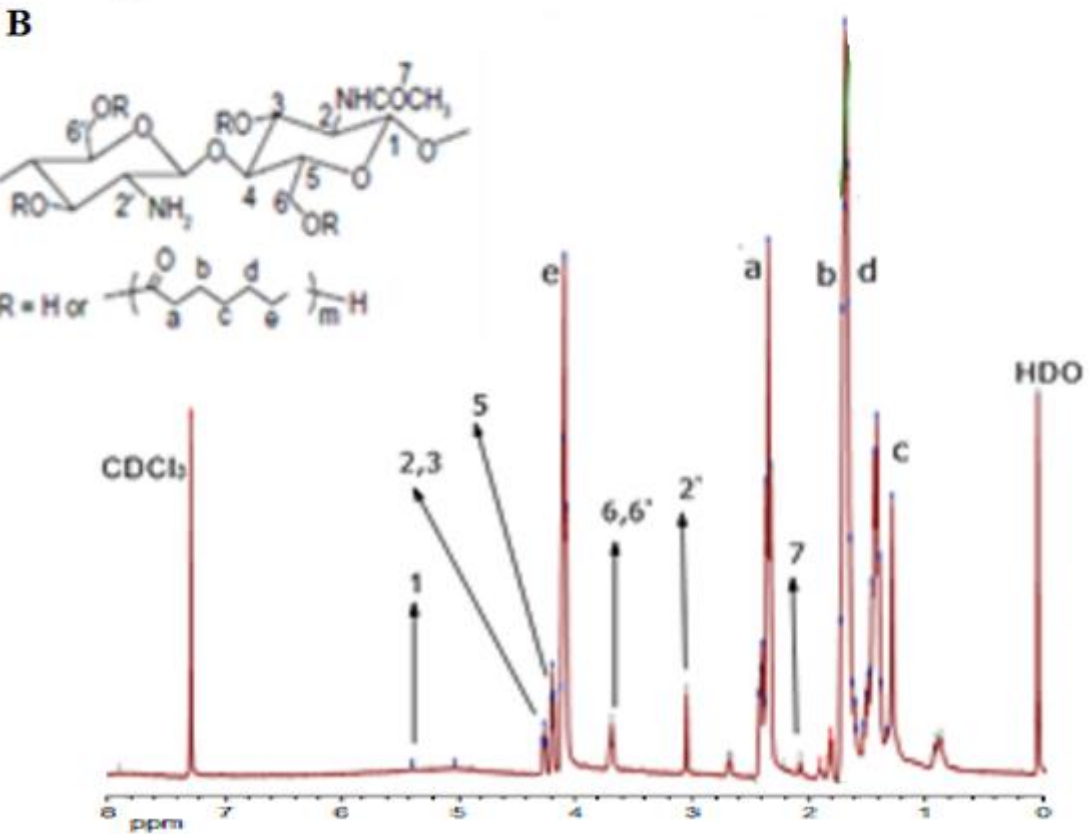
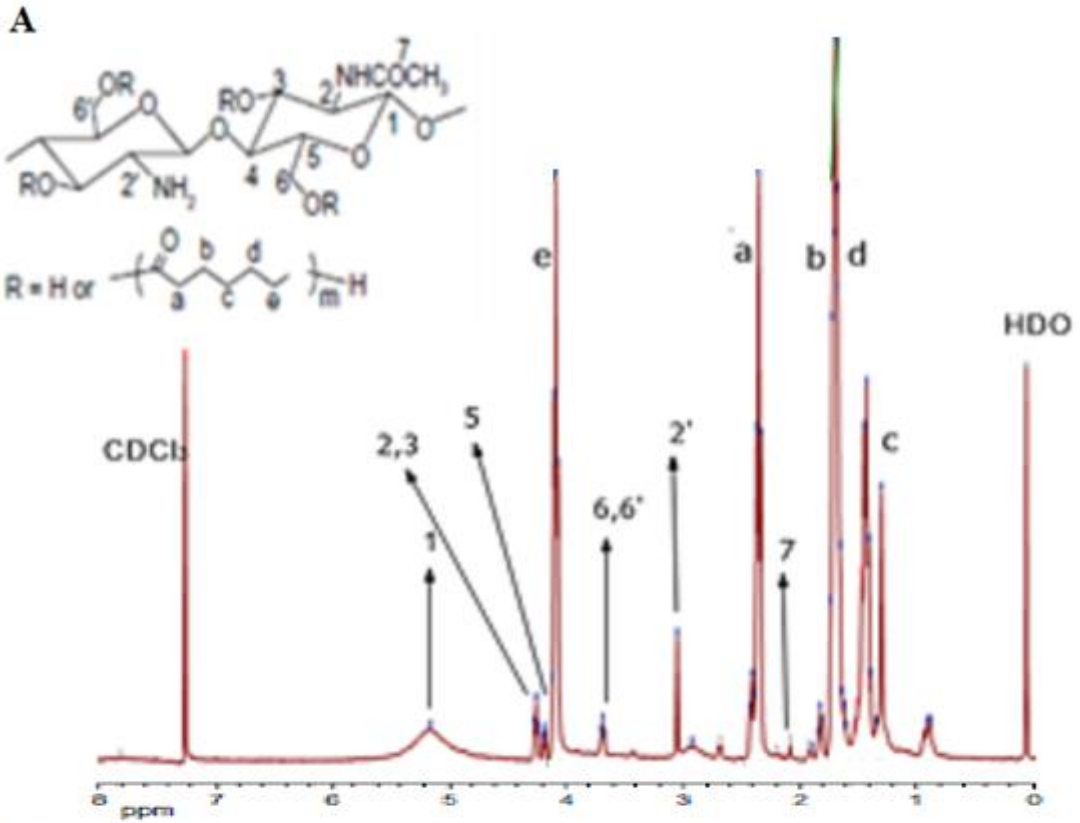
$$(4-1) \quad CL_n = A_{[(a)/2]} / A_{[(3, 4, 5, 6, 6')/5]}$$

Burada CL<sub>n</sub> oligo-PCL zincirlerinin CS'nin D-glukozamin birim başına ortalama uzunluğunu göstermektedir. A<sub>[(a)/2]</sub> 2.2 ppm'deki PCL ünitelerindeki protonların integral alanının yarısını temsil eder. A<sub>[(3, 4, 5, 6, 6')/5]</sub> 3.4-4.25 ppm'deki CS'nin sakarin birimlerinin protonlarının (3, 4, 5, 6 ve 6' 'nın) toplam integral alanının beşte birini temsil eder. Bu hesaplamalar sonucu CS-g-PCL-I için CL<sub>n</sub> 27 ve CS-g-PCL-II için CL<sub>n</sub> 14 elde edilmiştir. Bu sonuçlarda da gösterildiği gibi reaksiyon ortamında ε-kaprolakton (CL) monomeri miktarının çoğalması ile birlikte grafitleme sonucu CS zincirleri üzerinde oluşan oligo-PCL zincirlerinin uzunluğu orantılı bir şekilde artmaktadır.





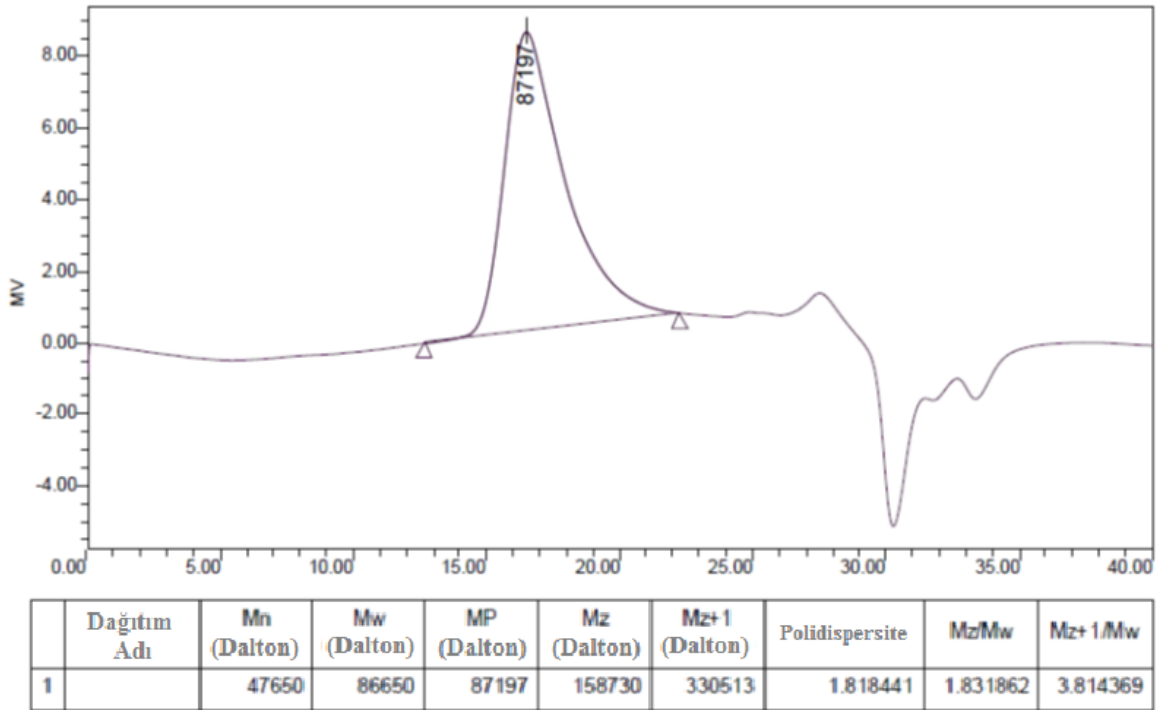
**Şekil 4.2.** A) CS'nin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu: 4.5-5.5 ppm (1) D-glukozamin biriminin H-1'i; 3.4-4.25 ppm (2,3,4,5,6,6')'de H-2,3,4,5,6 ve 6'; 3-3.2 ppm (2')'de H-2' ve 2.05 ppm (7)'de  $-\text{CH}_3$ . ve B) PCL'nin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu: 2,2 ppm (a), 1,6 ve 1,7 ppm (b, d), 1,4 ppm (c) ve 4,15 ppm (e).



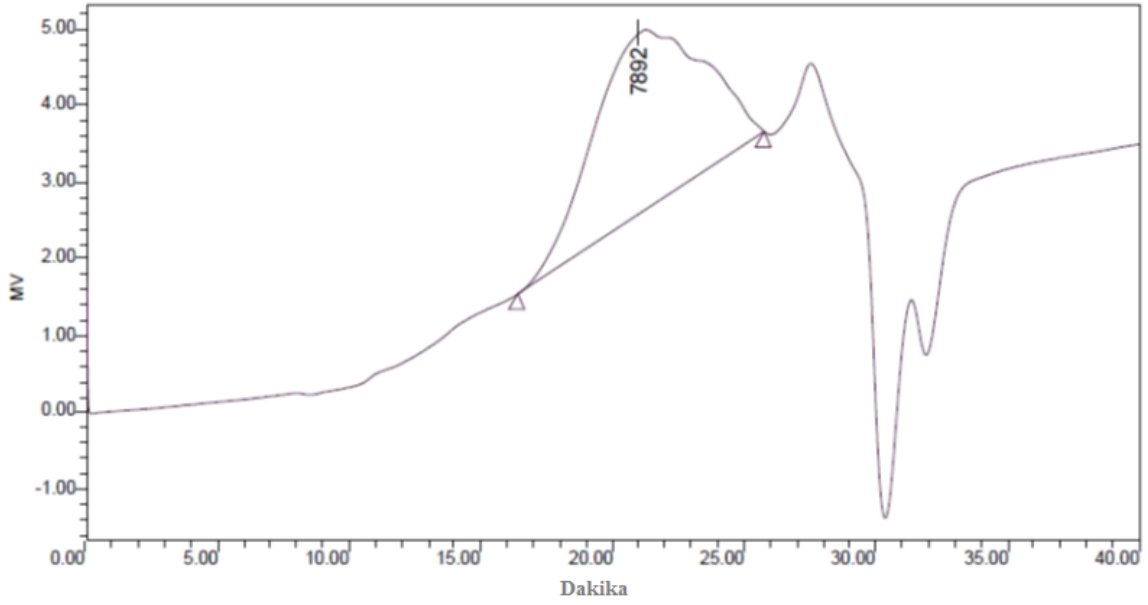
**Şekil 4.3.** Örnek  $^1\text{H-NMR}$  spektrumları: (A) Graft kopolimer I (CS-g-PCL-I) (B) Graft kopolimer II (CS-g-PCL-II).

### 4.1.3. GPC Sonuçları

Şekil 4.4, şekil 4.5 ve şekil 4.6 sırasıyla PCL, CS-g-PCL-I ve CS-g-PCL-II'nin GPC analiz sonuçlarını gösterilmiştir. Polimerler için  $M_n$  = Sayıca-ortalama molekül ağırlığı,  $M_w$  = ağırlıkca ortalama molekül ağırlığı,  $M_p$  = en yüksek tepe noktası molekül ağırlığı,  $M_z$  = Daha yüksek ortalama moleküler ağırlıkları,  $M_{z+1}$  ve Polidispersite =  $M_w/M_n$  verilmiştir. GPC analiz sonuçlarına göre sentezlenen PCL'nin ortalama molekül ağırlığı ( $M_w$ ) 86650 dalton elde edilmiştir. Litaratürde [6-13] genellikle PCL ve karışımlarından nanofiber üretiminde kullanılan PCL'nin molekül ağırlığı 80000 daltondur ve elektroçirme için en uygun molekül ağırlığı olarak kayd edilmiştir. Bu nedenle sentezlenen PCL'nin molekül ağırlığının ( $M_w$ ) 80000 daltonun üzerinde olması onun nanofiber üretimi için uygun olduğunu göstermektedir. CS-g-PCL-I ve CS-g-PCL-II için (şekil 4.5 ve şekil 4.6)  $M_w$  sırasıyla 11633 ve 10812 dalton elde edilmiştir.

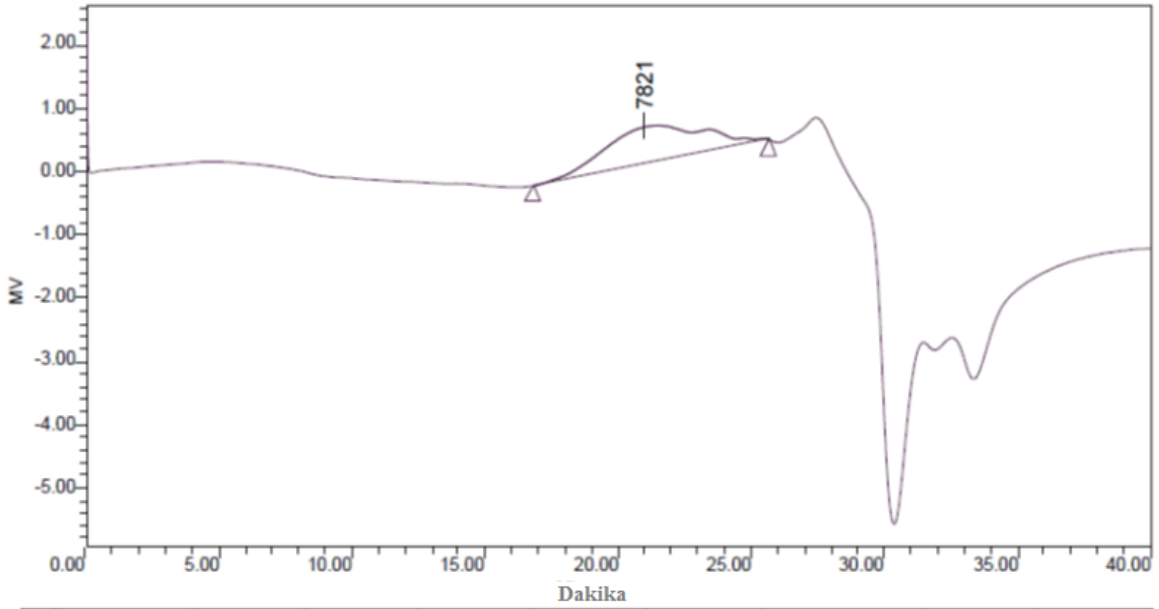


**Şekil 4.4.** PCL için GPC analiz sonucu ( $M_n$ ,  $M_w$ ,  $M_p$ ,  $M_z$ ,  $M_{z+1}$ , Polidispersite/heterojenlik indisi).



	Dağıtım Adı	Mn (Dalton)	Mw (Daltons)	MP (Dalton)	Mz (Dalton)	Mz+1 (Dalton)	Polidispersite	Mz/Mw	Mz+1/Mw
1		7238	11633	7892	19480	29006	1.607276	1.674602	2.493477

**Şekil 4.5.** CS-g-PCL-I için GPC analiz sonucu ( $M_n$ ,  $M_w$ ,  $M_p$ ,  $M_z$ ,  $M_{z+1}$ , Polidispersite / heterojenlik indisi:  $M_w/M_n$ ).

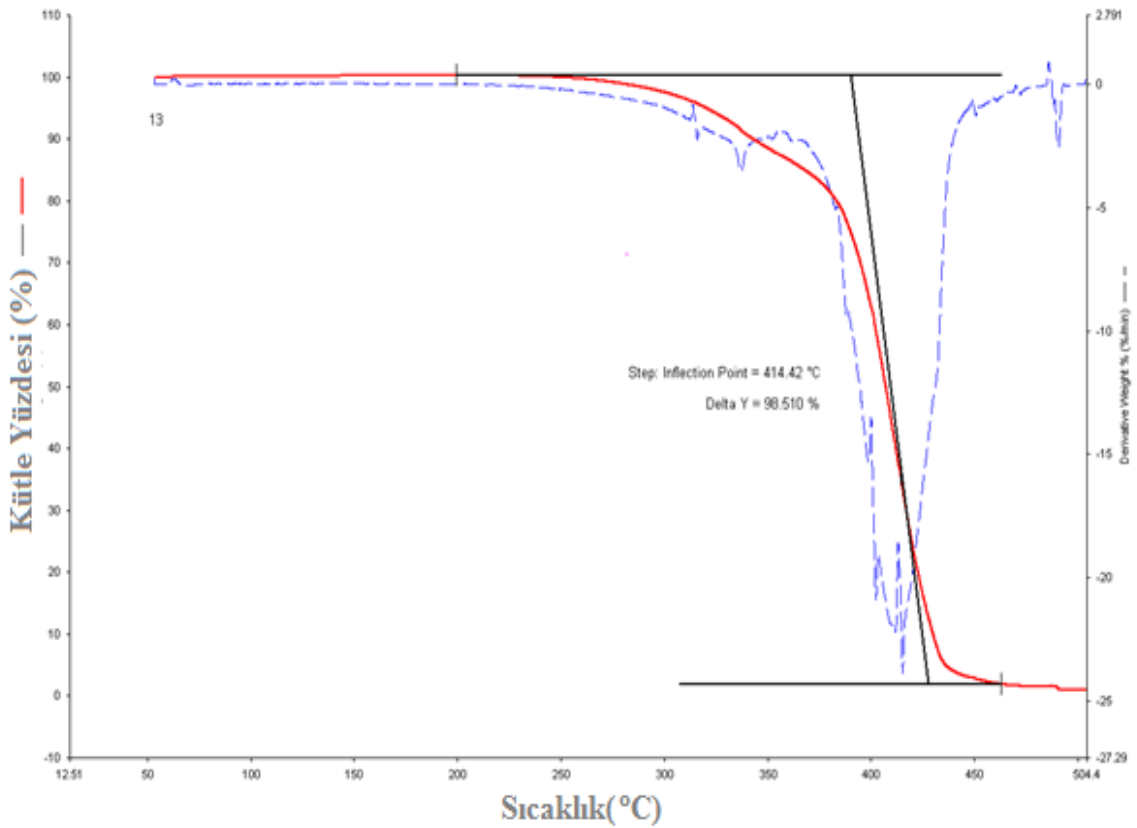


	Dağıtım Adı	Mn (Dalton)	Mw (Dalton)	MP (Dalton)	Mz (Dalton)	Mz+1 (Dalton)	Polidispersite	Mz/Mw	Mz+1/Mw
1		7122	10822	7821	17145	24859	1.519498	1.584280	2.297068

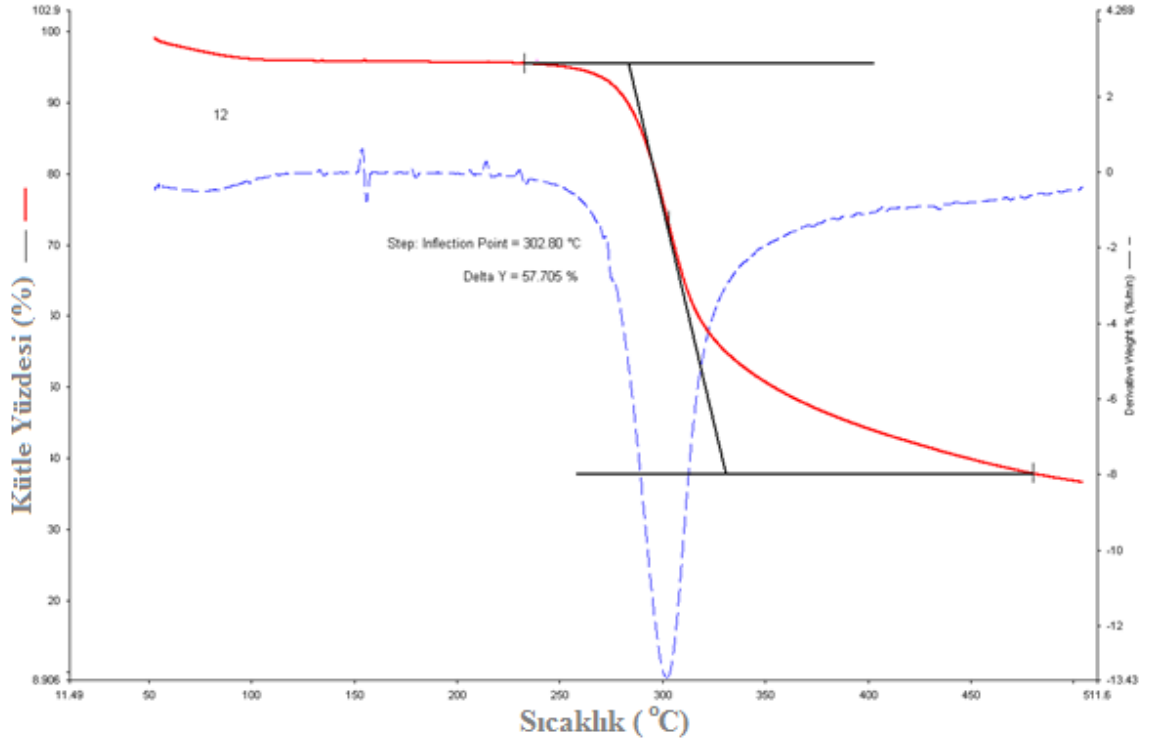
**Şekil 4.6.** CS-g-PCL-II için GPC analiz sonucu ( $M_n$ ,  $M_w$ ,  $M_p$ ,  $M_z$ ,  $M_{z+1}$ , Polidispersite / heterojenlik indisi:  $M_w/M_n$ ).

#### 4.1.4. TGA analiz sonuçları

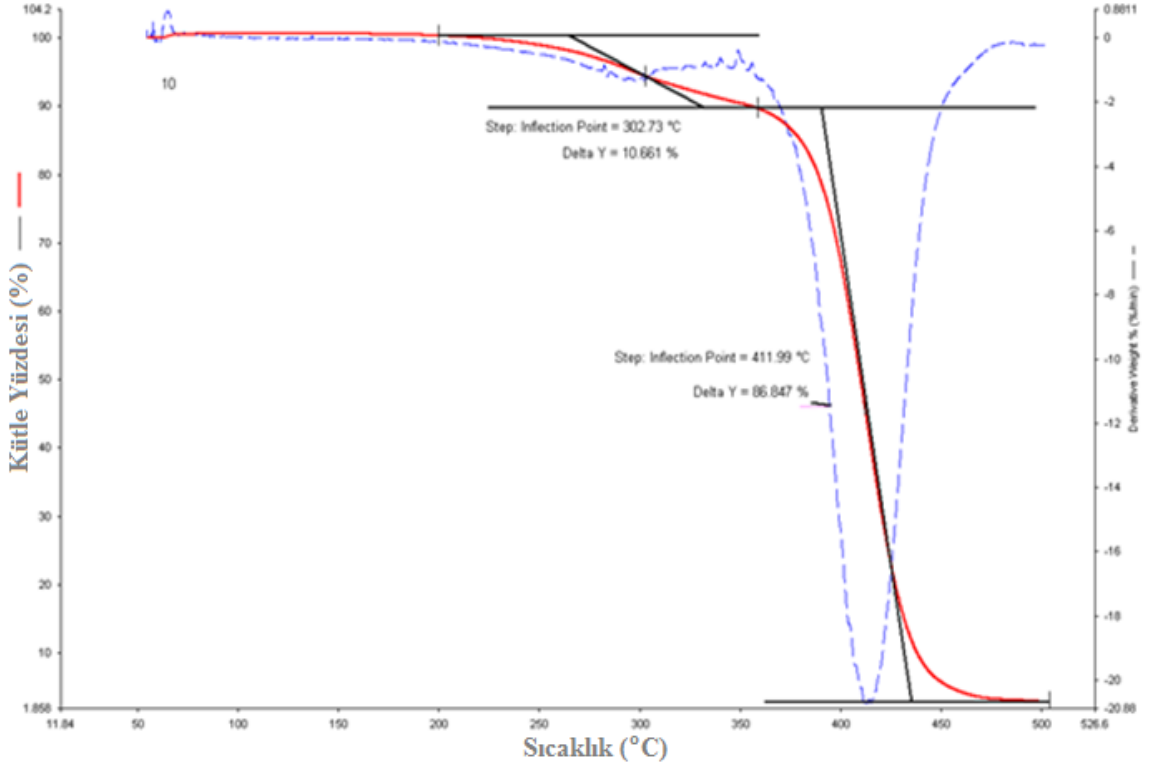
Şekil 4.7, şekil 4.8 ve şekil 4.9'da sırasıyla PCL, CS ve CS-g-PCL-I'in termogramları verilmiştir. TGA termogramları graft kopolimerin yapısında CS ve oligo-PCL'nin varlığını tesbit etmek için kullanılmıştır. CS ve PCL farklı sıcaklık derecelerinde kütle kaybı göstermektedirler ve kopolimerin yapısında CS ve oligo-PCL zincirleri olduğu için her iki kütle kaybı noktasının varlığı beklenilmektedir. Termogramlarda gösterildiği gibi PCL ve CS için kütle kaybı noktası sırasıyla 414 ve 302 °C elde edilmiştir. Şekil 4.9.'da CS-g-PCL-I termogramında 302 ve 414 °C kütle kaybı noktaları görünmektedir ve bu sonuç kopolimer yapısında oligo-PCL ve kitosanın varlığını göstermektedir.



Şekil 4.7. PCL için TGA termogramı; Kütle kaybı noktası 414.42 °C.



**Şekil 4.8.** CS için TGA termogramı; Kütle kaybı noktası 302.80 °C.



**Şekil 4.9.** CS-g-PCL-I TGA termogramı; Kütle kaybı noktaları 302.73 ve 411.90 °C.

## 4.2. Nanofiberlerin Karakterizasyonu

### 4.2.1. Elektroğirme ile Üretilen Kopolimerler ve PCL Karışımı Fibeler

Bu çalışmada PCL ve CS-g-PCL-I ve CS-g-PCL-II kopolimerlerinin PCL ile farklı oranlarda karışımlarından elektroğirme yöntemi kullanarak çizelge 4.2'de verilen nanofiberler (nanofiber matrisler) oluşturulmuştur. Bu nanofiberler hem şırıngalı elektroğirme metodu ile hem de ELMARCO Nanospider cihazı kullanarak üretilmiştir. Her iki yöntem ile de 7 farklı nanofiber matrisi elde edilmiştir.

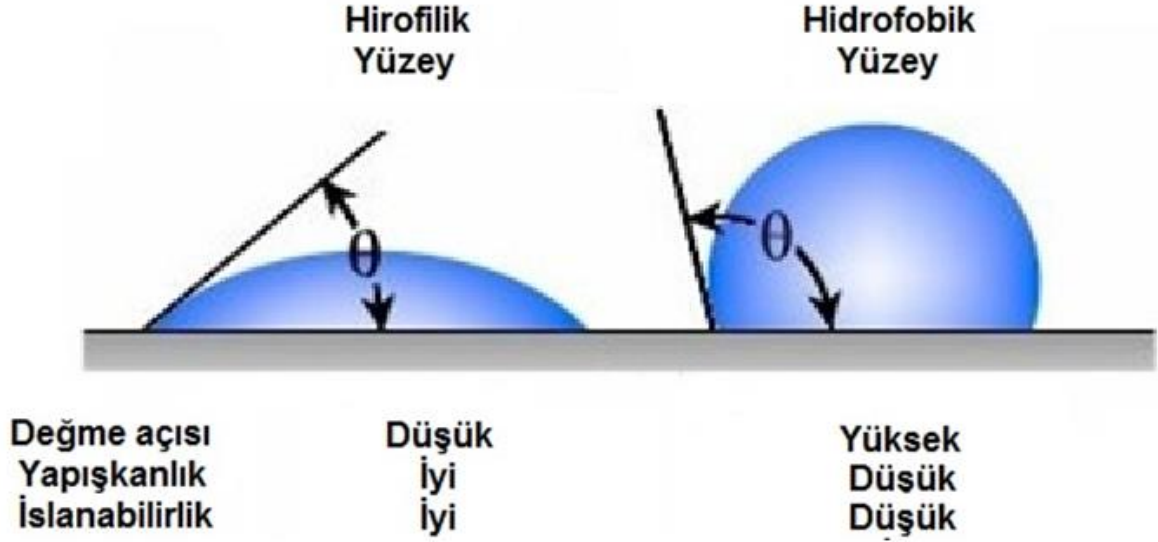
**Çizelge 4.2.** Hazırlanan nanofiberler:

No.	Nümüne	PCL oranı	Kopolimer oranı
1	PCL	100	0
2	CS-g-PCL-I/PCL	75	25
3	CS-g-PCL-I/PCL	50	50
4	CS-g-PCL-I/PCL	25	75
5	CS-g-PCL-II/PCL	75	25
6	CS-g-PCL-II/PCL	50	50
7	CS-g-PCL-II/PCL	25	75

### 4.2.2. Su Değme Açısı Analiz Sonuçları

Fiberlerin ıslanabilirliği onların biyolojik bir ortamda kullanılabilmesi için en önemli karakterlerden biridir. Üretilen fiberlerin ıslanabilirliğini göstermek için “su değme açısı” testi kullanılmıştır. Şekil 4.10'da hidrofilik ve hidrofobik yüzeylerin su değme açılarının farklarını göstermektedir. Sonuçlara dayanarak CS-g-PCL-I ve CS-g-PCL-II kopolimerlerinin PCL yüzeylerin hidrofilitesi üzerindeki etkisi ve buna bağlı olarak da biyouyumluluğunu nasıl etkilediği yorumlanmıştır. Tez çalışmasında nanofiber matris oluşturmak için tercih edilen PCL polimeri hidrofobik karakterdedir. Bakteri immobilizasyonu için gerekli olan yüzey aktif grupları bakımından yetersizdir. Bu dezavantajını gidermek, pozitif yük ve hidrofilik bir karakter kazandırmak amacıyla PCL, CS-g-PCL-I ve CS-g-PCL-II ile karışım oluşturularak elektrospin edilmiştir. Test sonuçları aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir (Şekil 4.11, Çizelge 4.3 ve Şekil 4.12). PCL şekil 4.11'de gösterildiği gibi büyük su değme açısına sahiptir ki bu PCL'nin

hidrofobik bir yapısının olduunu göstermektedir. Şekillerde görüldüğü gibi nanofiberlerde Cs-g-PCL-I ve CS-g-PCL-II kopolimerin oranının artması ile birlikte su değme açısı azalmakta olduğu ve fiberlerin hidrofilik bir yapıya dönüştüğü görüntülenmiştir. Bu değişim CS-g-PCL kopolimerin yapısındaki hidrofilik özelliğe sahip olan kitosana ayit hidroksil ve amino gruplarının nanofiberlerin yüzeylerinde varolmasından kaynaklanmıştır.

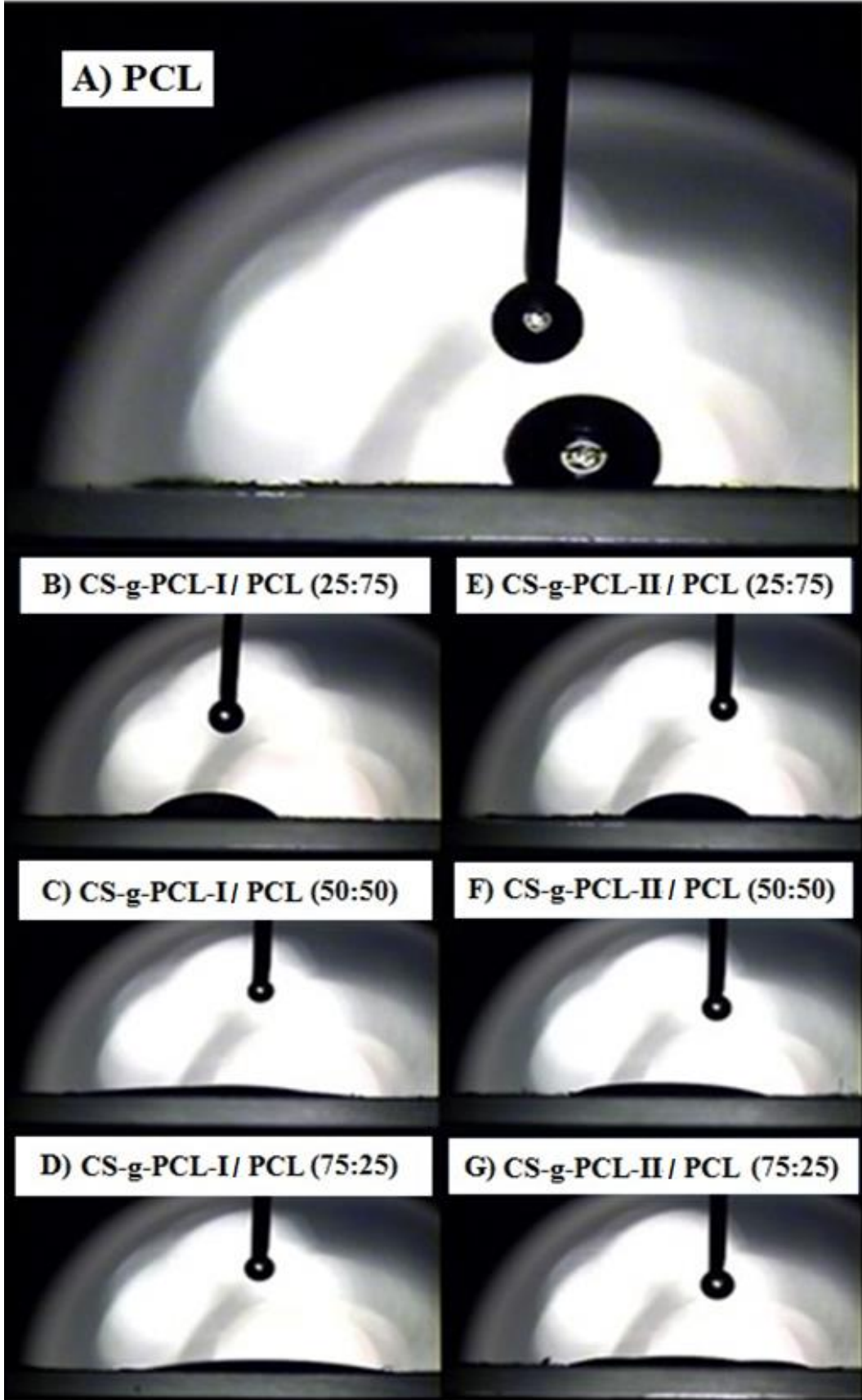


**Şekil 4.10.** Değme açısı ( $\theta$ )'nın genişliğine bağılı olarak değerlendirilen hidrofobik ve hidrofilik yüzeylerin farkı.

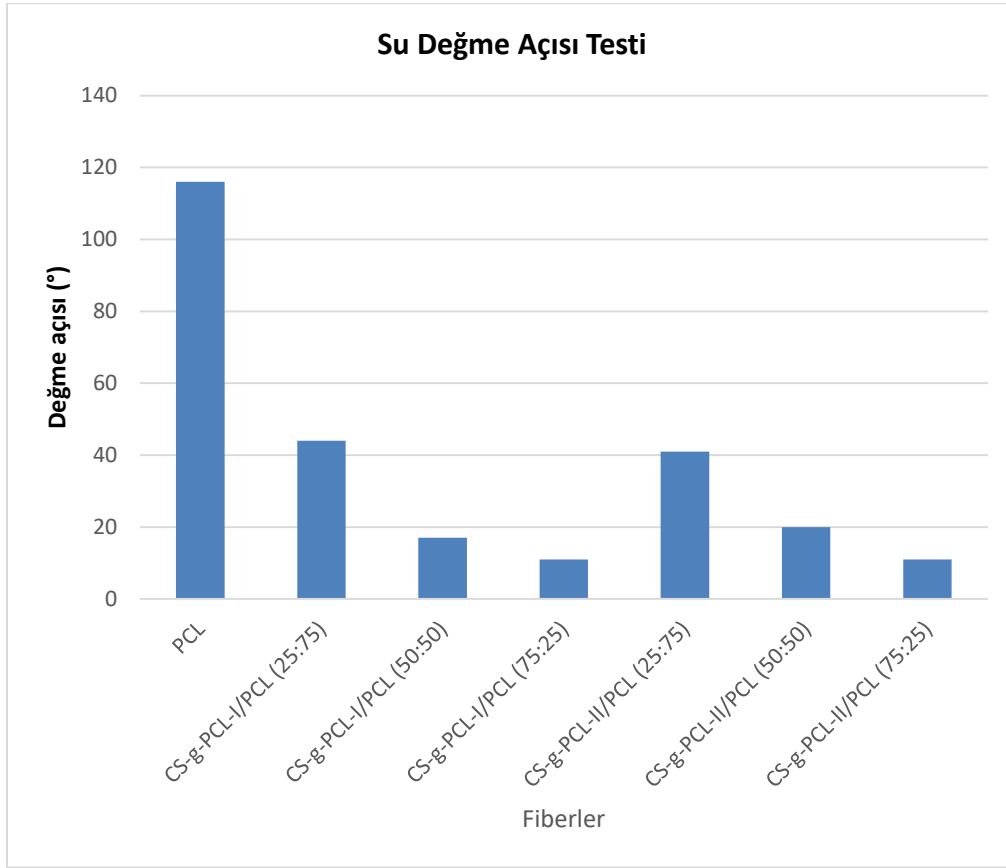
**Çizelge 4.3.** Nanofiberlerin su değme açısı:

No.	Nümüme	PCL oranı	Kopolimer oranı	Su değme açısı
1	PCL	100	0	116
2	CS-g-PCL-I/PCL	<b>75</b>	<b>25</b>	<b>44</b>
3	CS-g-PCL-I/PCL	50	50	17
4	CS-g-PCL-I/PCL	25	75	11
5	CS-g-PCL-II/PCL	<b>75</b>	<b>25</b>	<b>41</b>
6	CS-g-PCL-II/PCL	50	50	20
7	CS-g-PCL-II/PCL	25	75	11





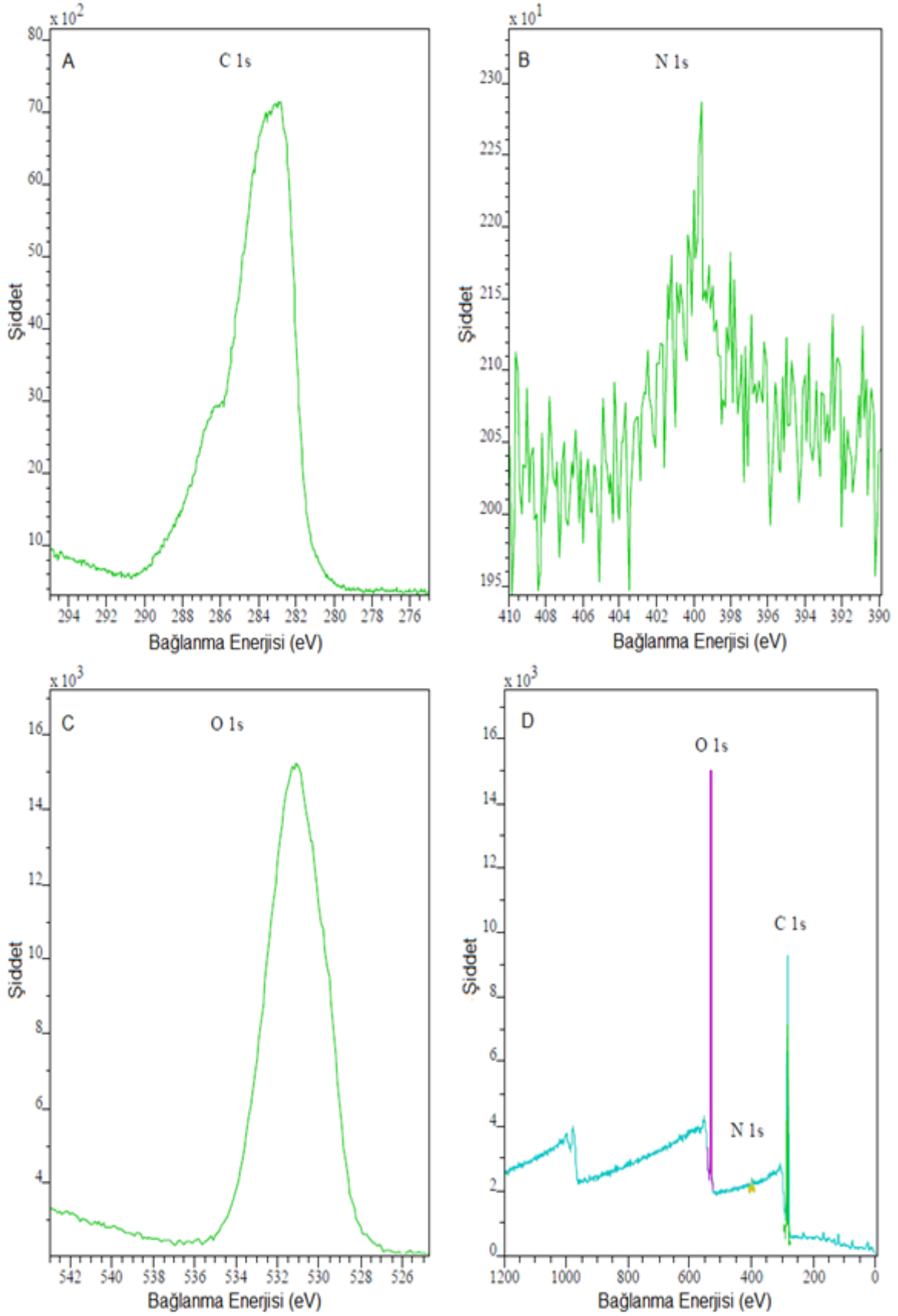
**Şekil 4.11.** PCL ve CS-g-PCL-I/PCL ve CS-g-PCL-II/PCL fiberlerin üzerindeki su damlacığının durumu.



**Şekil 4.12.** PCL, CS-g-PCL-I/PCL ve CS-g-PCL-II/PCL nanofiberlerin su değme açısı.

#### 4.2.3. X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) ve Yüzey Kimya Analizi

Çizelge 4.4 CS-g-PCL-I/PCL, CS-g-PCL-II/PCL ve PCL nanofiber filmlerinin yüzeylerinde karbon (C1s), azot (N1s) ve oksijen (O1s) atom oranlarını (%) göstermektedir. fiberlerin yüzeyinde azot yüzdesi elektroçerme solüsyonunda CSg-PCL-I veya CS-g-PCL-II'nin miktarının artması ile yükselmiştir. Azot atomları, PCL nanofiberlerinin kimyasal bileşimi içinde mevcut değil oysa CS-g-PCL-I/PCL ve CS-g-PCL-II/PCL filmlerinde kitosan varlığından dolayı mevcuttur. CS-g-PCL/PCL nanofiber filmlerinin yüzey üzerinde azot atomlarının varolması bu filmlerin yüzeyinde CS-g-PCL moleküllerinin varlığını kanıtlamaktadır. CS-g-PCL/PCL nanofiber filmlerinin XPS spektrumlarında 399,0 eV N1s zirvesinin varlığı bunu doğrulamaktadır. PCL filmlerinin XPS spektrumlarının yüzey taramasında azot piki gözlenmemiştir. XPS sonuçları amino gruplarının CS-g-PCL-I/PCL ve CS-g-PCL-II/PCL filmlerinin yüzeyinde mevcut olduğunu belirtmektedir. Bu sonuçlar CS-g-PCL/PCL filmlerinin su temas açısı testlerinde gösterilen yüksek hidrofilik özellik ile tutarlıdır. CS-g-PCL-II/PCL (75:25)'in XPS grafikleri örnek olarak şekil 4.13'te verilmiştir.



**Şekil 4.13.** CS-g-PCL-II/PCL (75:25)'in XPS grafikleri: A) C1s, B) N1s, C) O1s ve D) Geniş XPS grafiği.

**Çizelge 4.4.** X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) ile belirlenen PCL ve CS-g-PCL/PCL nanofiber filmlerinin yüzeyinde karbon, azot ve oksijen atomlarının oranları:

Nanofiber	Karbon (%)	Azot (%)	Oksijen (%)
<b>PCL</b>	71.42	0.00	28.58
<b>CS-g-PCL-I/PCL (25:75)</b>	<b>75.69</b>	<b>0.56</b>	<b>23.75</b>
CS-g-PCL-I/PCL (50:50)	76.18	0.63	23.19
CS-g-PCL-I/PCL (75:25)	73.51	0.74	25.75
<b>CS-g-PCL-II/PCL (25:75)</b>	<b>77.28</b>	<b>0.63</b>	<b>22.09</b>
CS-g-PCL-II/PCL (50:50)	77.66	0.90	21.43
CS-g-PCL-II/PCL (75:25)	70.34	1.11	28.55

#### 4.2.4. Nanofiberlerin SEM Görüntüleri ve Morfolojileri

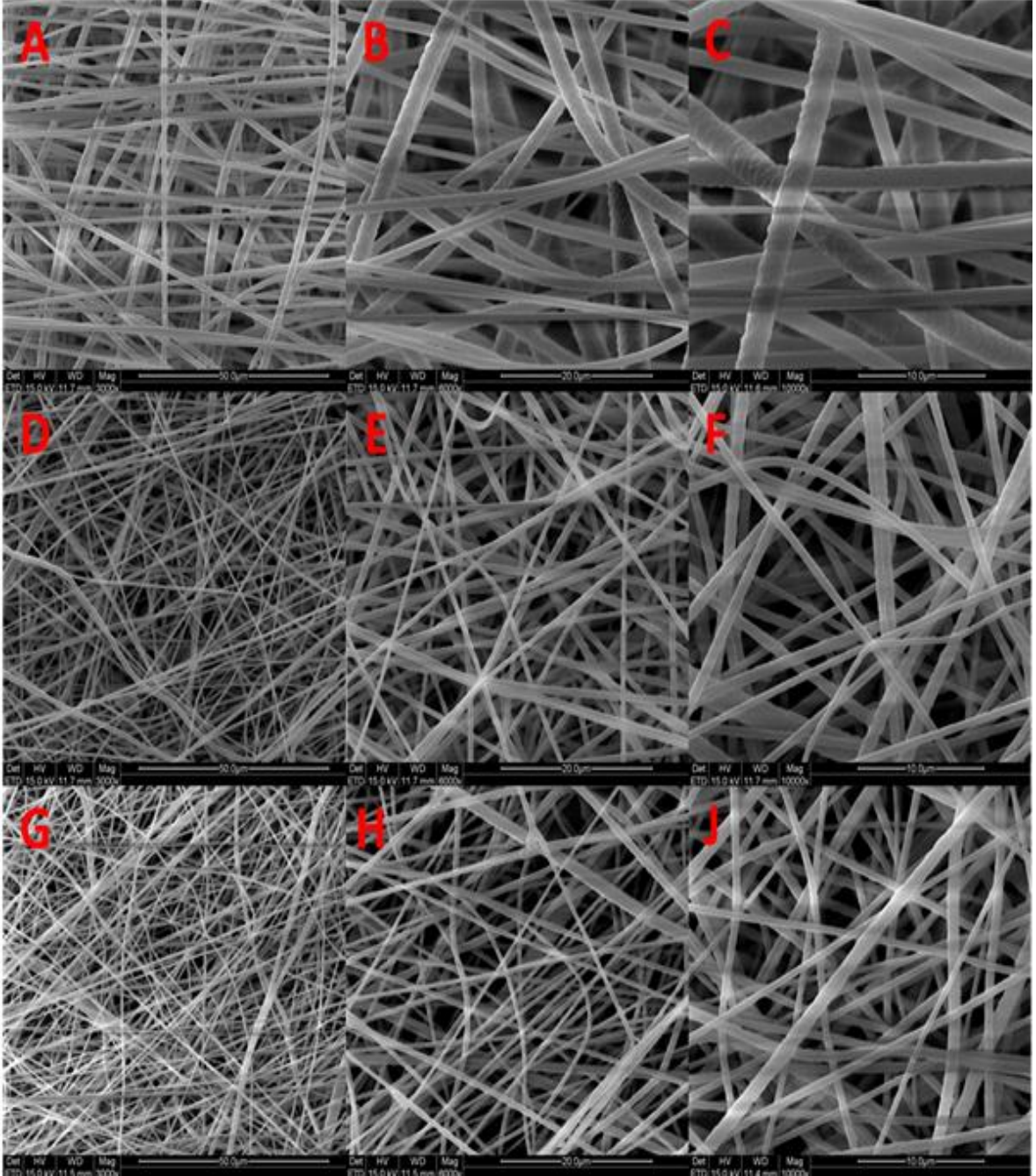
##### 4.2.4.1 Şıngalı Elektroçirime Cihazı ile Hazırlanan Nanofiberler

Şıngalı elektroçirime metodu ile hazırlanan nanofiberlerin SEM görüntüleri Şekil 4.14'te verilmiştir. SEM görüntüleri ImageJ yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. PCL, CS-g-PCL-I/PCL (25:75) ve CS-g-PCL-II/PCL (25:75) (PCL:Kopolimer oranı (75:25) olanlar) ait SEM fotoğrafları 3 farklı magnifikasyonda verilmiştir (Şekil 4.14). Filmleri oluşturan fiberler, benzer çap ve yapıda olmaları, boncuk oluşumlarının bulunmaması ve yapının homojen oluşu kriterlerine göre değerlendirilmiştir.

Örneklerin ortalama fiber çapı değeri, görüntü üzerinden 15 adet fiberin kalınlığı ölçülüp ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Filmleri oluşturan fiberlerin ortalama çapı PCL için 900 nm, CS-g-PCL-I/PCL (25:75) için 458 nm ve CS-g-PCL-II/PCL (25:75) için ise 427 nm hesaplanmıştır. Fiberlerin SEM görüntüsü boncuk olmadığını göstermektedir.

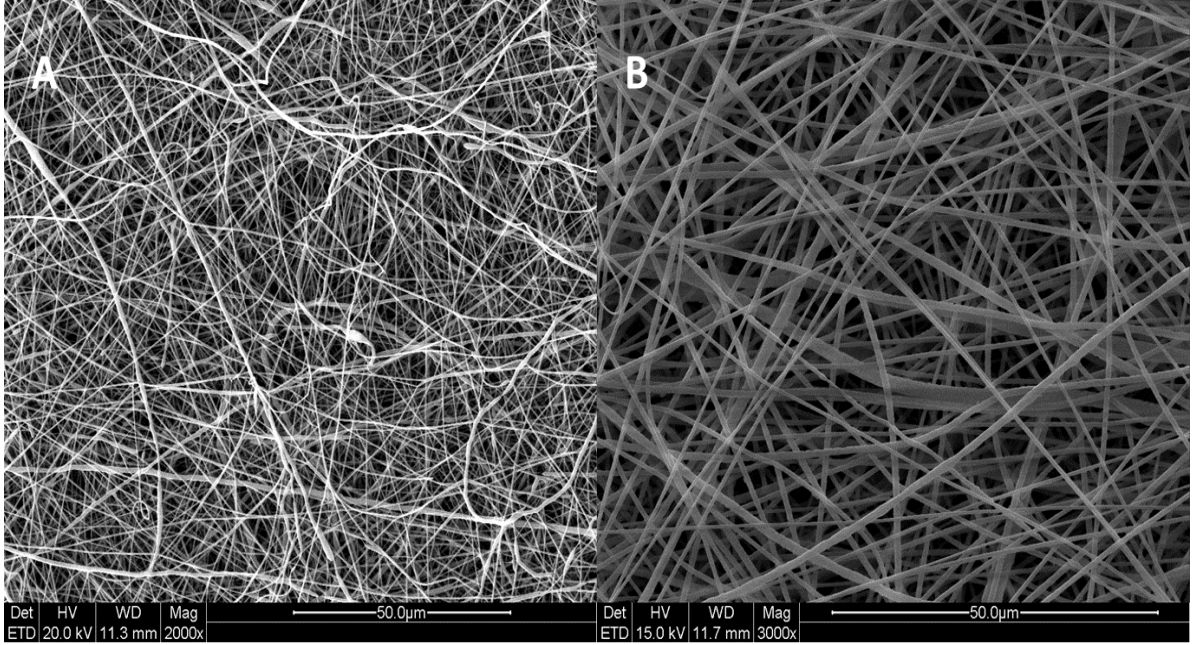
Şekil 4.15'de boncuk oluşumu örnek olarak gösterilmiştir. Tez çalışmasında oluşturulmuş olan filmlerin bakteri immobilizasyonu için yeterli yüzey alanını sağlaması, bunun yanında filmin fiziksel özelliklerini muhafaza etmesi açısından düzenli bir yapıya sahip olması önemlidir. Bu yüzden boncuk oluşumu nanofiber yapısında istenmeyen bir etmendir. Aşağıdaki SEM fotoğraflarında farklı parametreler ile oluşturulan iki ayrı fibröz membranın yapısı arasındaki fark ve net

bir şekilde boncuk oluşumları gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar olarak fiberlerin başarılı bir şekilde hazırlandığını göstermektedir.



**Şekil 4.14.** Şırngalı elektroöğürme metodu ile üretilen nanofiberlerin üç farklı magfifikasyonda (50,20 ve 10  $\mu\text{m}$  skalada) SEM görüntüleri: PCL (A,B,C), CS-g-PCL-I/PCL (25:75) (D,E,F) ve CS-g-PCL-II/PCL (25:75) (G,H,J).





**Şekil 4.15.** İki farklı PCL nanofiber filminin SEM görüntüsü A) Boncuk yapıları olan nanofiber, membran parametreleri; Akış Hızı: 4 ml/sa, Gerilim: 12 kV. B) Boncuk yapıları olmayan nanofiber, membran parametreleri; Akış Hızı: 2 ml/sa, Gerilim: 16 kV.

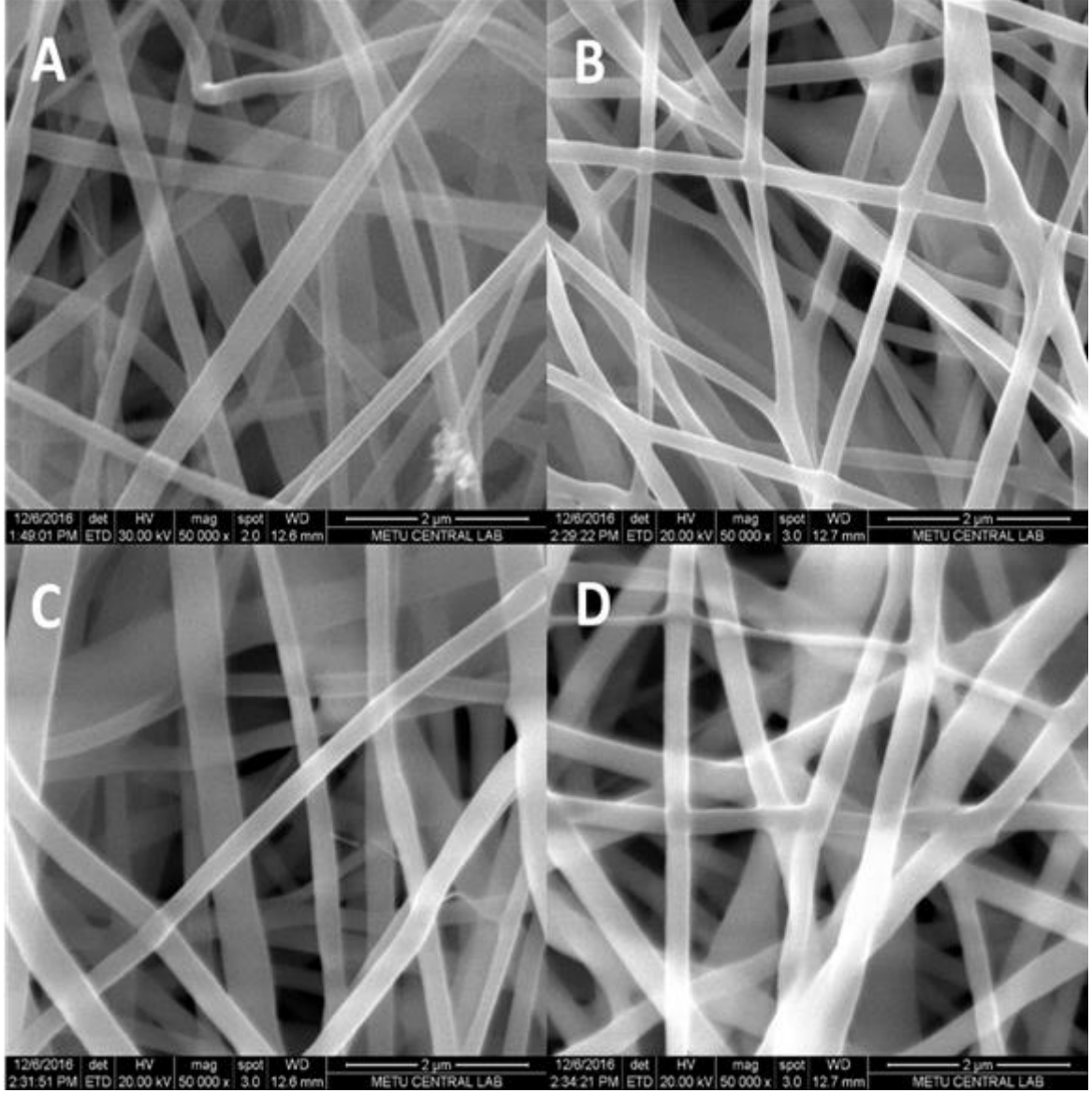
#### 4.2.4.2 ELMARCO Nanospider Cihazı ile Hazırlanan Nanofiberler

ELMARCO Nanospider cihazı ile hazırlanan nanofiberlerin SEM görüntüleri şekil 4.16 ve şekil 4.17'de verilmiştir. Şekil 4.16. A'da PCL'nin SEM görüntüsü verilmektedir. PCL nanofiberlerin çapı 200 nm civarındadır ve şırıngalı elektrospining cihazı ile elde edilen PCL nanofiberleri ile kıyasda nanofiberlerin çapı büyük miktarda düşüş göstermektedir ki bunun nedeni ELMARCO Nanospider cihazında kullanılan çok yüksek gerilim miktarlarıdır (PCL nanofiberleri için 50 kV). Şekil 4.16. B, C ve D'de sırasıyla CS-g-PCL-I/PCL'nin (25:75), (50:50) ve (75:25), oranları ile elde edilen nanofiberlerin SEM görüntüsü verilmiştir. Bu nanofiberlerin hazırlanması için kullanılan gerilim 40 kV'tır.

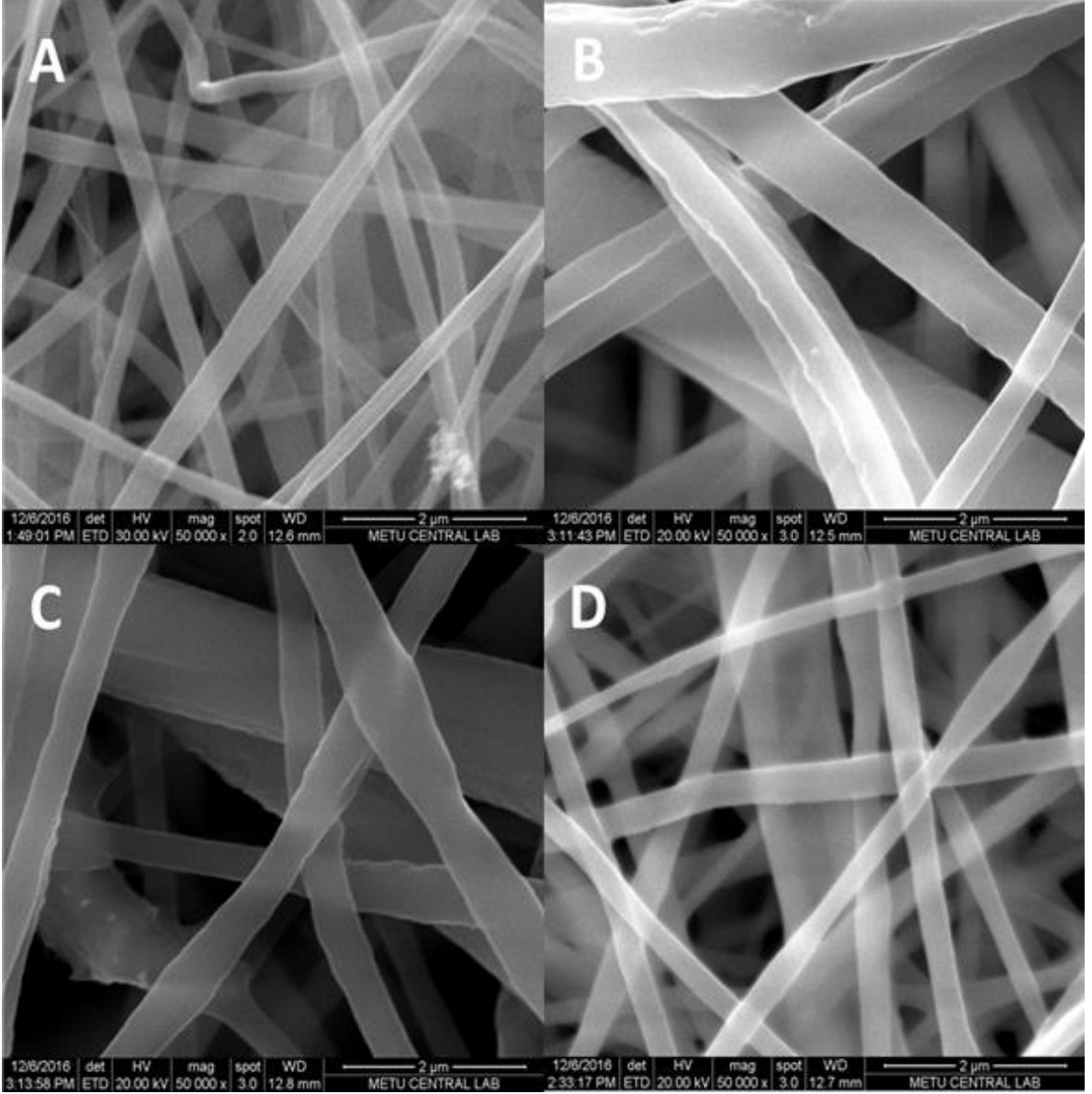
PCL nanofiber matrisi ile kıyasda üretimlerinde daha düşük gerilim kullanıldığı nedeni ile nanofiber çapları CS yapısının varlığına rağmen (Şırıngalı elektrospining sisteminde elde edilen PCL nanofiberlerin çapı CS içeren nanofiberlerin 2 katından daha yüksektir.) neredeyse PCL matrisi ile aynı seviyededir (200 nm civarında).

Şekil 4.17'da CS-g-PCL-II/PCL'nin (25:75), (50:50) ve (75:25) oranları ile elde edilen nanofiberlerin SEM görüntüsü verilmiştir. Görüntülerde belirgin bir şekilde görüldüğü gibi CS bazlı kopolimer içeren nanofiberlerin çapı (özellikle %25 ve %50 kopolimer içeren filmlerde) homojen bir karakter göstermemektedir ve nanofiber çapları 200

nm ve 500 nm arasında değişmektedir. Bunun nedeni bu nanofiberlerin daha düşük gerilim miktarında (30 kV) oluşmasıdır. Bu sonuçlara göre CS-g-PCL-I/PCL nanofiberleri en uygun yapıya sahiptirler.



**Şekil 4.16.** Elmarco nanospider cihazı ile elde edilen PCL ve CS-g-PCL-I/PCL nanofiberlerinin SEM görüntüsü: A) PCL, B) CS-g-PCL-I/PCL (25:75), C) CS-g-PCL-I/PCL (50:05) ve CS-g-PCL-I/PCL (75:25).



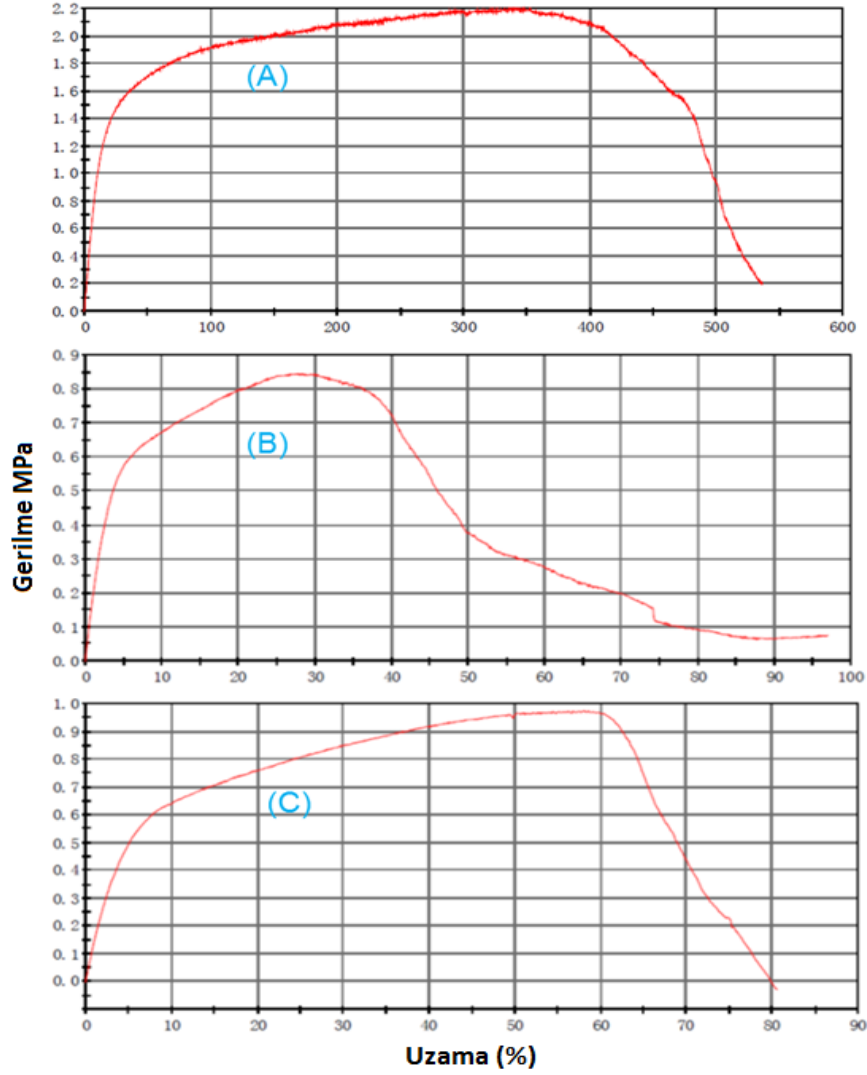
**Şekil 4.17.** Elmarco nanspider cihazı ile elde edilen PCL ve CS-g-PCL-II/PCL nanofiberlerinin SEM görüntüsü: A) PCL, B) CS-g-PCL-II/PCL (25:75), C) CS-g-PCL-II/PCL (50:05) ve D) CS-g-PCL-II/PCL (75:25).

#### 4.2.5. Mekanik Test (Gerilme-Uzama Deneyi) Sonuçları

Çizelge 4.5 ve Şekil 4.18'de gerilme-uzama testi sonuçlarını ve grafiklerini göstermektedir. CS-g-PCL-I/PCL ve CS-g-PCL-II/PCL nanofiberleri PCI ile kıyaslandığında, filmlerin elastisitesinin düşük miktarda olduğu tesbit edilmiştir. CS-g-PCL-I/PCL ve CS-g-PCL-II/PCL filmlerinin elastisitesinin düşüşü ile birlikte kopma anında uzama miktarında da PCL ile kıyasla büyük ölçüde düşüş görülmüştür. Kitosanın kötü mekanik özellikleri ve onun fiber oluşturmasının mümkün olmadığı göz önüne alındığında, elde edilen filmlerin mekanik test sonuçları, PCL'nin filmlerin mekanik özelliklerinin iyileştirilmesinde çok büyük etkisi olduğunu kanıtlamaktadır.



Sonuç olarak CS ve PCL'nin avantajlarını kullanarak hem hidrofobik ve katyonik özelliği olan ve hem de iyi mekanik özelliklere sahip olan nanofiberler üretilmiştir.



**Şekil 4.18.** Çekme-uzama test sonuçları: A) PCL, B) CS-g-PCL-I/PCL (25:75) ve C) CS-g-PCL-II/PCL (25:75).

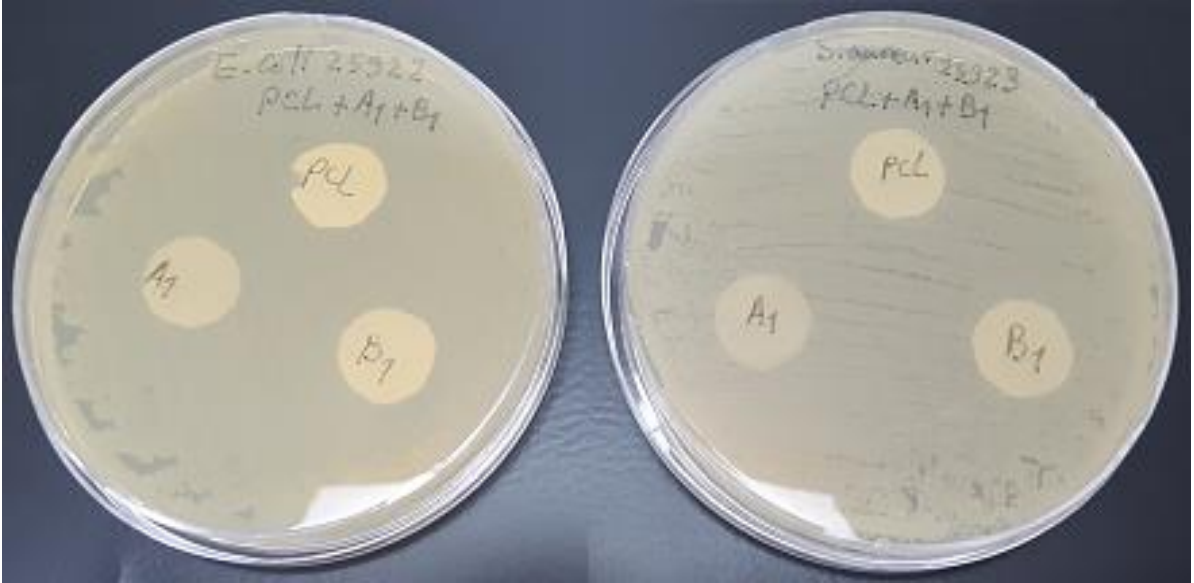
**Çizelge 4.5.** Çekme-uzama test sonuçları.

Numune	Elastisite Modülü (MPa)	Kopma Anında Uzama Miktarı (%)	Azami Gerilme Gücü (MPa)
PCL	10.21 MPa	457.66	2.23 MPa
CS-g-PCL-I/PCL (25:75)	19.585 MPa	104.74	0.92 MPa
CS-g-PCL-II/PCL (25:75)	14.18 MPa	83.41	1.02 MPa

### 4.3. Antimikrobiyal Test (Agar Difüzyon Test) Sonuçları

Üretilen nanofiberlerin antibakteriyel özelliklerini belirlemek için iki farklı gram pozitif ve gram negatif bakteri seçilmiştir ve bu bakteriler varlığında PCL ve CS-g-PCL/PCL nanofibelerin antibakteriyel özellikleri incelenmiştir. Gram-negatif bakteri olarak *escherichia coli* (ATCC 25922) seçilmiştir. Gram-pozitif bakteri ise *staphylococcus aureus* (ATCC 25923) seçilmiştir.

Fiberlerin *E. coli* ve *S. aureus* üzerinde 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresinin sonrasında herhangi bir antibakteriyel etkileri görünmemiştir (Şekil 4.19). Deney sonuçları göstermektedir ki graft edilmiş kitosan (CS-g-PCL) graft edilme sonucu yapısal olarak değişime uğradığından, genel bilgiler kısmında belirlenen kitosana özgü antibakteriyel özelliğe sahip değildir.



**Şekil 4.19.** PCL, CS-g-PCL-I/PCL (25:75) (A1) ve CS-g-PCL-II/PCL (25:75) (B1) elektroçirilmiş matrislerin antibakteriyel testleri.

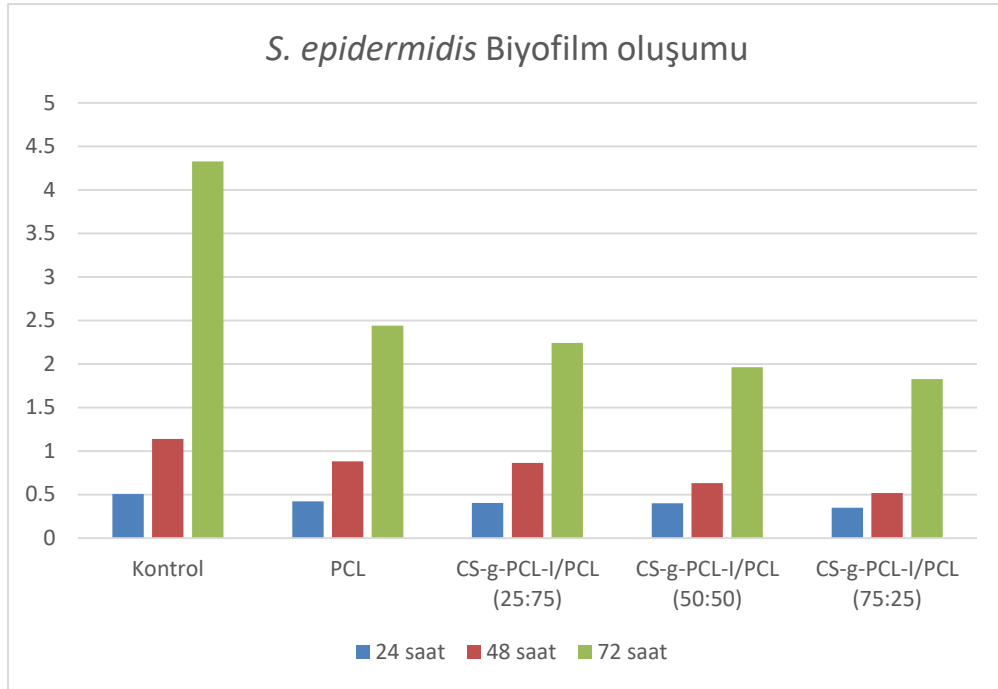
### 4.4. Biyofilm Oluşumu Deney Sonuçları

Nanofiberlerin yüzeyinde biyofilm oluşumunu incelemek için biyofilm oluşumu testleri yapılmıştır. Bu deneyler için bakteri olarak *S. epidermidis* seçilmiştir.

#### 4.4.1. *S. epidermidis* Biyofilm Oluşumu

Nanofiberler üzerinde *S. epidermidis* biyofilm oluşumu sonuçları şekil 4.20'da verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre PCL hidrofobik yapısından dolayı ilk günde en çok biyofilm oluşumunu göstermektedir. %25, %50 ve %75 kitosanlı kopolimer I içeren nanofiberlerde ise biyofilm oluşumu ilk günde (24 saat) PCL ile kıyaslandığında daha düşüktür ve kitosan miktarının artması ile birlikte daha da azalmaktadır, bu sonuç kitosan içeren nanofiberlerin hidrofilik yapılarına bağlamak

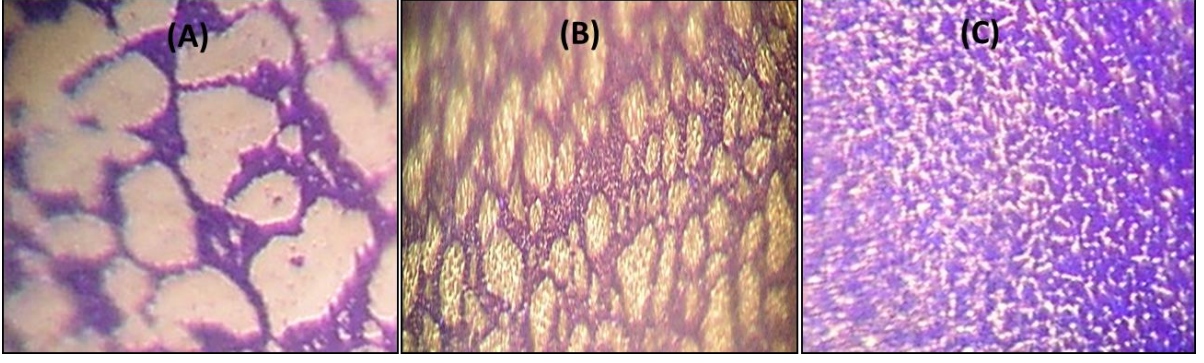
olur. Kontrol gurubu ile kiyaslandığında ise her üç nanofiber filmlerinde biyofilm oluşumu ilk günde kontrol grubundan daha düşüktür ki kontrol grubunun tamamen hidrofobik yapısından kaynaklanmaktadır. 48 ve 72 saat sonuçlarına bakıldığında neredeyse aynı hızda çoğalmakta ve 24, 48 Ve 72 saat sonuçlarına bakıldığında biyofilm oluşumunun aynı oranda ilerlediğini göstermekte ve yapının hidrofilik özelliğinin artması ile biyofilm oluşumunun azalmasını kanıtlamaktadır. Bu sonuçlar hidrofobik yapıların biyofilm oluşumu için çok daha uygun olduklarını göstermektedir, bu nedenle PCL matrisleri yapısında kitosanın çoğalması ile birlikte biyofilm oluşuma kitosan miktarı ile doğrudan bağlantılı olarak azalmaya başlamıştır.



**Şekil 4.20.** *S. epidermidis* biyofilminin 2 gün aralıklarla 24, 48 ve 72 saat UV absorbansları; Sonuçlarına bakıldığında neredeyse biyofilm oluşumu aynı hızda çoğalmaktadır.

#### 4.4.2. *S. epidermidis* Biyofilminin Optik Mikroskop Görüntüleri

Şekil 4.21'de görüldüğü gibi, *S. epidermidis* biyofilminin ilerleme aşamalarının görüntüleri anlaşılabilir şekilde sergilenmiştir. Optik görüntüler biyofilm oluşumunun zaman içinde artırılır olduğunu göstermektedir. *S. epidermidis* biyofilminin polisakkarit özelliği yavaş yavaş belli yapısal yoğunluk artışı ile görüntülerde gösterilmektedir.



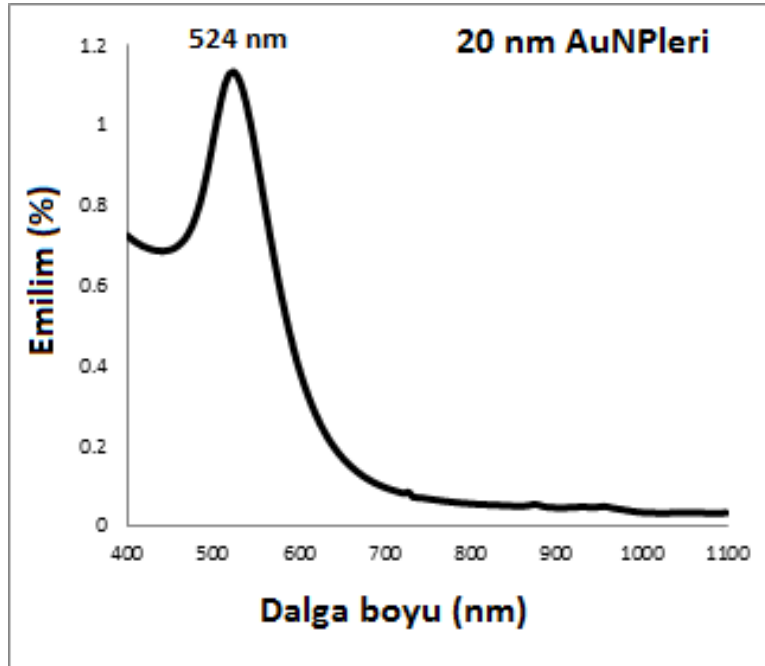
**Şekil 4.21.** 40×Zeiss lens ile donatılmış LEICA optik mikroskop ile görüntülenen *S.epidermidis* biyofilminin 2 gün aralıklarla oluşumu: A) 1. gün, B) 3. gün, ve C) 5. gün.

#### 4.5. Turkevich Yöntemiyle Sentezlenen AuNPLer Karakterizasyonu

Bu kısımda Turkevich yöntemiyle sentezlenen altın nanopartiküllerin karakterizasyon sonuçları yer almaktadır. Karakterizasyon sonuçları dar bir boyut aralığında başarılı bir şekilde AuNPLerin sentezlendiğini göstermektedir.

##### 4.5.1. AuNPLerin Morötesi-Görünür (UV-Vis) Spektrumu

Turkevich yöntemi ile sentezlenen altın nanopartiküllerinin (AuNPLeri) morötesi-görünür (UV-Vis) spektrumu şekil 4.22’de verilmiştir. 524 nm’de görünen UV-Vis emilimi piki altın nanopartiküllerinin başarılı bir şekilde sentezlendiğini ve nanopartikül boyutlarının yaklaşık 20 nm olduğunu göstermektedir [177].

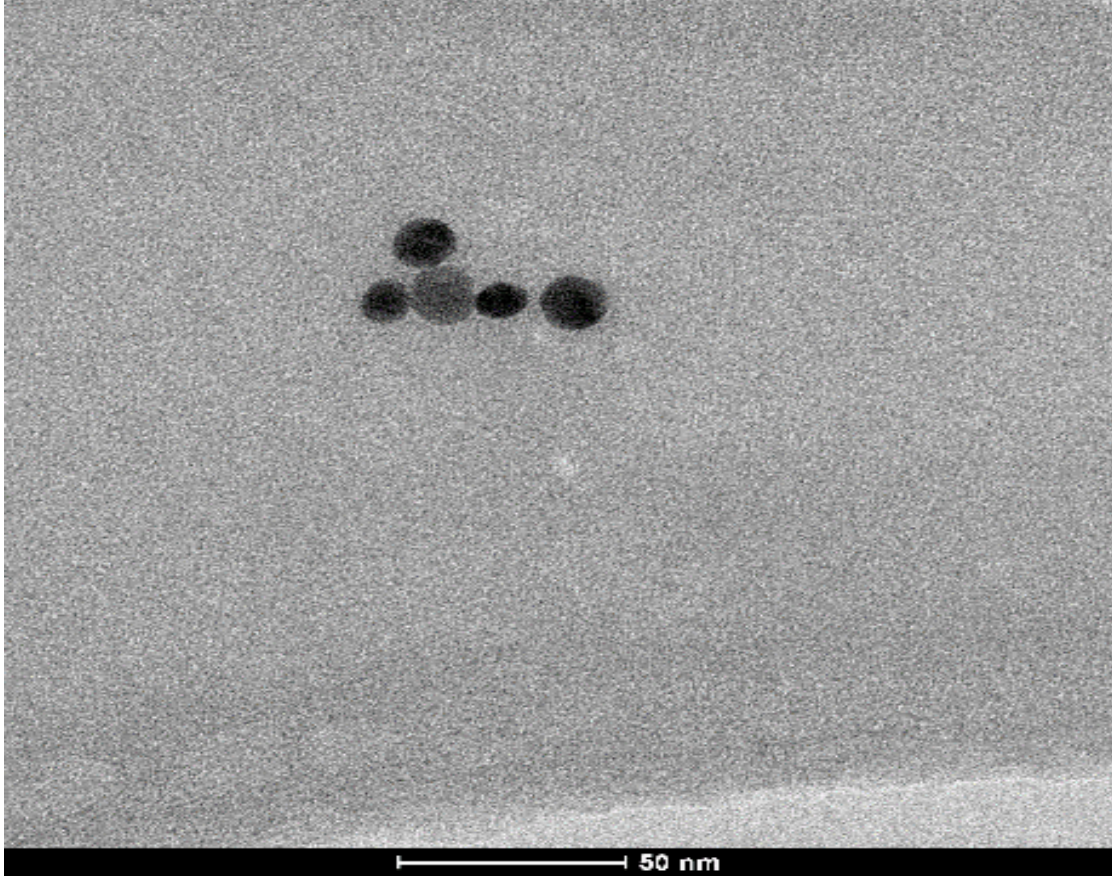


**Şekil 4.22.** koloidal altın çözeltisi UV-görünür emilim spektrumu ( $d \approx 20$  mil).



#### 4.5.2. AuNPLerin TEM Görüntüsü

Altın nanopartiküllerinin (AuNPLeri) TEM görüntüsü şekil 4.23'de verilmiştir. TEM görüntüsünde de belirgin bir şekilde görüldüğü gibi AuNPLerinin boyutları yaklaşık 10-20 nm (ortalama 15 nm) aralığında olduğu tesbit edilmiştir.



**Şekil 4.23.** Sentezlenen AuNP'lerin TEM görüntüsü ( $d \approx 15$  nm çapında).

#### 4.6. Sonokimyasal İndirgeme ile Nanofiber Yüzeylerine Yüklenen NPLerin Optimizasyon Sonuçları:

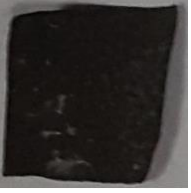














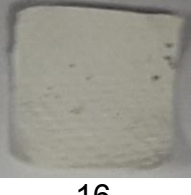

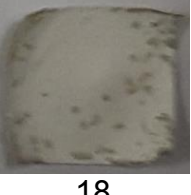
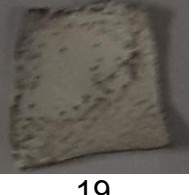
Sonokimyasal yöntemiyle nanofiber matrislerinin yüzeylerine nanopartikül yüklenme işleminin optimizasyon süreci ve sonuçları ve optimizasyon sonucu elde edilen matrisler bu kısımda anlatılmıştır.

##### 4.6.1. İndirgeme Yöntemiyle Nanofiber Yüzeylerine AgNP Yüklenmesi







Nanofiberlerin yüzeyinde gümüş nanopartiküllerinin (AgNP'lerinin) yüklenmesi için sonokimyasal yöntem kullanılmıştır. Yüksek  $\text{AgNO}_3$  konsantrasyonları ve sonikasyon şiddeti ve uzun reaksiyon süreleri kullandığında tamamen siyah renkte yüzeyler elde edilmiştir. Bu durum çok yüksek miktarda AgNP'leri yüzeyde biriktirilmiş olduğunu ve yüzeyin tamamen AgNP'leri ile kapandığını ve aglomere olduğunu göstermektedir.  $\text{AgNO}_3$  konsantrasyonunu azaltmak ile birlikte farklı

sonikasyon şiddetleri ve reaksiyon süreleri kullanılarak açık renkte yüzeyler elde edilmiştir. Optimizasyon sürecinde hazırlanan örneklerin detayları çizelge 4.6 ve 4.7’de verilmiştir.

**Çizelge 4.6.** Sonokimyasal indirgeme yöntemi kullanılarak yüzeylerinde AgNPLeri yüklenmiş PCL nanofiberlerin optimizasyon sonuçları:

<b>PCL Nanofiberleri için AgNO<sub>3</sub> Konsantrasyonu, Sonikasyon Süresi ve Sonikasyon Şiddetleri</b>				
10 mM 2 Saat Yüksek	5 mM 2 Saat Yüksek	5 mM 4 Saat Düşük	1 mM 5 Saat Düşük	1 mM 5 Saat Yüksek
				
1	2	3	4	5
1 mM 4 Saat Düşük	1 mM 4 Saat Yüksek	1 mM 6 Saat Düşük	1 mM 6 Saat Yüksek	0.5 mM 6 Saat Düşük
				
6	7	8	9	10
1 mM 6 Saat Yüksek	0.25 mM 6 Saat Düşük	0.25 mM 6 Saat Düşük	0.1 mM 6 Saat Düşük	0.1 mM 6 Saat Yüksek
				
11	12	13	14	15
0.05 mM 6 Saat Düşük	0.05 mM 6 Saat Yüksek	0.025 mM 6 Saat Düşük	0.025 mM 6 Saat Yüksek	
				
16	17	18	19	


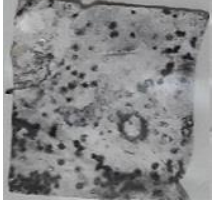



**Çizelge 4.7.** Sonokimyasal indirgeme yöntemi kullanılarak yüzeylerinde AgNPleri yüklenmiş CS-g-PCL-I/PCL (25:75) nanofiberlerin optimizasyon sonuçları:

<b>CS-g-PCL-II/PCL Nanofiberleri için AgNO<sub>3</sub> Konsantrasyonu, Sonikasyon Süresi ve Şiddetleri</b>		
1 mM 6 Saat Düşük  1	0.5 mM 6 Saat Yüksek  2	0.25 mM 6 Saat Düşük  3
0.1 mM 6 Saat Düşük  4	0.05 mM 6 Saat Düşük  5	0.025 mM 6 Saat Düşük  6

Optimizasyon deneyleri sonuçlarına dayanarak kitosan bazlı nanofiber filmlerinin sonikasyon sürecinde hidrofilik özelliklerine göre yüzey yapılarında az miktarda bozulma görünmüştür ve aynı zamanda sonikasyon şiddeti ve süreside nanofiber yapılarında farklı etkiler ortaya koymaktadır. Bu nedenlere göre sonikasyon ile yüzeylere gümüş partikülleri indirgemek için, PCL nanofiberleri kullanılmış ve sabit süre ve sabit sonikasyon şiddetinde sadece AgNO<sub>3</sub> konsantrasyonunu değiştirerek gümüş nanopartikülleri yüklenmiş yüzeyler elde edilmiştir. Elde edilen yüzeylerin görüntüleri çizelge 4.8'de verilmiştir.

Bu sonuçlar sabit sonikasyon süresi, sabitsonikasyon şiddeti kullandığından dolayı nanofiber filmlerinin yüzey yapılarında farklı değişikliklerin görülmemiştir ve sadece AgNO<sub>3</sub>'ün farklı konsantrasyonlarından dolayı yüzeyde yüklenen AgNP'lerinin miktarında farklılıklar görülmüştür ve konsantrasyonun düşmesi ile birlikte aglomerasyon azalmış ve açık renkte yüzeyler elde edilmiştir.

**Çizelge 4.8.** Farklı  $\text{AgNO}_3$  konsantrasyonları kullanılarak sonokimyasal indirgeme yöntemi ile yüzeylerinde  $\text{AgNPL}$ eri yüklenmiş PCL nanofiberleri:

<b>PCL Nanofiberleri:</b> Sonikasyon Süresi: <b>2 Saat</b> , Sonikasyon Şiddeti: <b>Yüksek</b>		
0.01M $\text{AgNO}_3$  1	0.005 M $\text{AgNO}_3$  2	0.001 M $\text{AgNO}_3$  3
0.0005 M $\text{AgNO}_3$  4	0.0001 M $\text{AgNO}_3$  5	









#### 4.6.2. İndirgeme Yöntemiyle Nanofiber Yüzeylerine AuNP Yüklenmesi

Nanofiber matrislerin yüzeyinde altın nanopartiküllerinin yüklenmesi için sonokimyasal yöntem kullanılmıştır. Yüksek  $\text{HAuCl}_4$  konsantrasyonları ve sonikasyon şiddeti ve uzun reaksiyon süreleri kullanıldığında geniş ölçüde siyah renkte yüzeyler elde edilmiştir. Bu durum çok yüksek miktarda altın nanopartiküllerinin yüzeyde biriktirilmiş olduğunu ve yüzeyin geniş ölçüde altın nanopartikülleri ile kapandığını ve aglomere olduğunu göstermektedir.  $\text{HAuCl}_4$  konsantrasyonunu azaltmak ile birlikte farklı sonikasyon şiddetleri ve reaksiyon süreleri kullanılarak açık renkte yüzeyler elde edilmiştir. Optimizasyon sürecinde hazırlanan örneklerin detayları çizelge 4.9 ve 4.10'da verilmiştir.


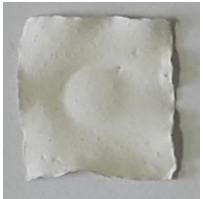






Optimizasyon deneyleri sonuçlarına dayanarak kitosan bazlı nanofiber filmlerinin sonikasyon sürecinde hidrofilik özelliklerine göre yüzey yapılarında az miktarda bozulma görünmüştür ve aynı zamanda sonikasyon şiddeti ve süreside nanofiber yapılarında farklı etkiler ortaya koymaktadır. Bu nedenlere göre sonikasyon ile yüzeylere altın partikülleri indirgemek için, PCL nanofiberleri kullanılmış ve sabit süre ve sabit sonikasyon şiddetinde sadece  $\text{HAuCl}_4$  konsantrasyonunu değiştirerek AuNP'leri yüklenmiş yüzeyler elde edilmiştir. Elde edilen yüzeylerin görüntüleri çizelge 4.11'de verilmiştir.








**Çizelge 4.9.** Sonokimyasal indirgeme yöntemi kullanılarak yüzeylerinde AuNPLeri yüklenmiş PCL nanofiberlerin optimizasyon sonuçları:

<b>PCL Nanofiberleri için HAuCl<sub>4</sub> Konsantrasyonu, Sonikasyon Süresi ve Sonikasyon Şiddetleri:</b>			
0.1 mM 4 Saat Yüksek  1	0.1 mM 2 Saat Yüksek  2	0.1 mM 2 Saat (tekrar) Yüksek  3	0.05 mM 4 Saat Yüksek  4
0.05 mM 2 Saat Yüksek  5	0.05 mM 2 Saat (tekrar) Yüksek  6	0.025 mM 4 Saat Yüksek  7	0.025 mM 2 Saat Yüksek  8

**Çizelge 4.10.** Sonokimyasal indirgeme yöntemi kullanılarak yüzeylerinde AuNPLeri yüklenmiş CS-g-PCL-I/PCL (25:75) nanofiberlerin optimizasyon sonuçları:

<b>CS-g-PCL-I/PCL (25:75) Nanofiberleri için HAuCl<sub>4</sub> Konsantrasyonu, Sonikasyon Süresi ve Sonikasyon Şiddetleri</b>			
0.1 mM 4 Saat Yüksek  1	0.1 mM 2 Saat Yüksek  2	0.1 mM 2 Saat (tekrar) Yüksek  3	0.05 mM 4 Saat Yüksek  4
0.05 mM 2 Saat Yüksek  5	0.025 mM 4 Saat Yüksek  6	0.025 mM 2 Saat Yüksek  7	0.025 mM 2 Saat (tekrar) Yüksek  8

**Çizelge 4.11.** Farklı H<sub>AuCl<sub>4</sub></sub> konsantrasyonları kullanılarak sonokimyasal indirgeme yöntemi ile yüzeylerinde AuNPLeri yüklenmiş PCL nanofiberleri:

<b>PCL Nanofiberleri:</b> Sonikasyon Süresi: <b>2 Saat</b> , Sonikasyon Şiddeti: <b>Yüksek</b>		
1mM  1	0.5 mM  2	0.25 mM  3
0.1 mM  4	0.05 mM  5	

Bu numunelerde sabit sonikasyon süresi ve sabit sonikasyon şiddeti kullanıldığına göre, nanofiber filmlerinin yüzey yapılarında farklı değişiklikler görülmemiştir ve sadece H<sub>AuCl<sub>4</sub></sub>'ın farklı konsantrasyonlarından dolayı yüzeyde yüklenen altın nanopartiküllerinin miktarında farklılıklar görülmektedir ve konsantrasyonun düşmesi ile birlikte aglomerasyon azalmış ve açık renkte yüzeyler elde edilmiştir.


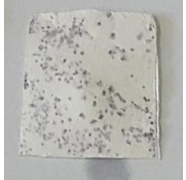

#### **4.6.3. AuNPLerinin Sonikasyon ile Nanofiber Yüzeylerine Yüklenmesi**

Nanofiber matrislerin yüzeyinde turkevich yöntemiyle sentezlenen altın nanopartiküllerinin yüklenmesi için sonokimyasal yöntem kullanılmıştır. İlk deneylerde Yüksek AuNP konsantrasyonları ve sonikasyon şiddeti ve uzun reaksiyon süreleri kullanıldığında siyah renkte yüzeyler elde edilmiştir. Bu durum çok yüksek miktarda AuNP'lerinin yüzeyde biriktirilmiş olduğunu ve yüzeyin geniş ölçüde altın nanopartikülleri ile kapandığını ve aglomere olduğunu göstermektedir. AuNP konsantrasyonunu azaltmak ile birlikte farklı sonikasyon şiddetleri ve reaksiyon süreleri kullanılarak açık renkte yüzeyler elde edilmiştir. Optimizasyon sürecinde hazırlanan bazı örneklerin detayları çizelge 4.12 ve 4.13'de verilmiştir.

**Çizelge 4.12.** Sonikasyon yöntemi kullanılarak yüzeylerinde AuNPLeri yüklenmiş PCL ve CS-g-PCL-I/PCL (25:75) nanofiberlerin optimizasyon sonuçları:

<b>PCL Nanofiberleri için AuNP Konsantrasyonu, Sonikasyon Süresi ve Sonikasyon Şiddetleri</b>		
0.1 mM AuNP 2 Saat Yüksek	0.1 mM AuNP 4 Saat Yüksek	0.05 mM AuNP 6 Saat Yüksek
		
1	2	3

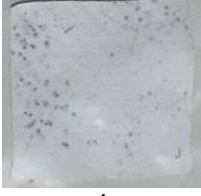

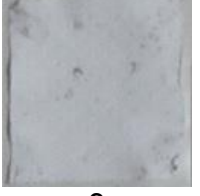
**Çizelge 4.13.** Sonikasyon yöntemi kullanılarak yüzeylerinde AuNPLeri yüklenmiş PCL ve CS-g-PCL-I/PCL (25:75) nanofiberlerin optimizasyon sonuçları:

<b>CS-g-PCL-I/PCL (25:75) Nanofiberleri için AuNP Konsantrasyonu, Sonikasyon Süresi ve Şiddetleri</b>		
0.05 mM AuNP 4 Saat Yüksek Şiddet	0.1 mM AuNP 4 Saat Yüksek Şiddet	0.1 mM AuNP 6 Saat Yüksek Şiddet
		
1	2	3

Optimizasyon deneyleri sonuçlarına dayanarak kitosan bazlı nanofiber filmlerinin sonikasyon sürecinde hidrofilik özelliklerine göre yüzey yapılarında az miktarda bozulma görünmüştür ve aynı zamanda sonikasyon şiddeti ve süreside nanofiber yapılarında farklı etkiler ortaya koymaktadır. Bu nedenlere göre sonikasyon ile yüzeylere AuNP'leri yüklemek için PCL nanofiberleri kullanılmıştır ve sabit süre ve sabit sonikasyon şiddetinde sadece AuNP konsantrasyonunu değiştirilerek AuNPLeri yüklenmiş yüzeyler elde edilmiştir. Elde edilen yüzeylerin görüntüleri çizelge 4.14'da verilmiştir.

Bu numunelerde sabit sonikasyon süresi ve sabit sonikasyon şiddeti kullandığına göre nanofiber filmlerin yüzey yapılarında farklı değişiklikler görülmemiştir ve sadece AuNPLerin farklı konsantrasyonlarından dolayı yüzeyde yüklenen AuNP'lerin miktarında farklılıklar görünmektedir ve konsantrasyonun düşmesi ile birlikte aglomerasyon azalmış ve açık renkte yüzeyler elde edilmiştir.

**Çizelge 4.14.** Farklı H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> konsantrasyonları kullanılarak sonikasyon yöntemi ile yüzeylerinde AuNP'leri yüklenmiş PCL nanofiberleri:

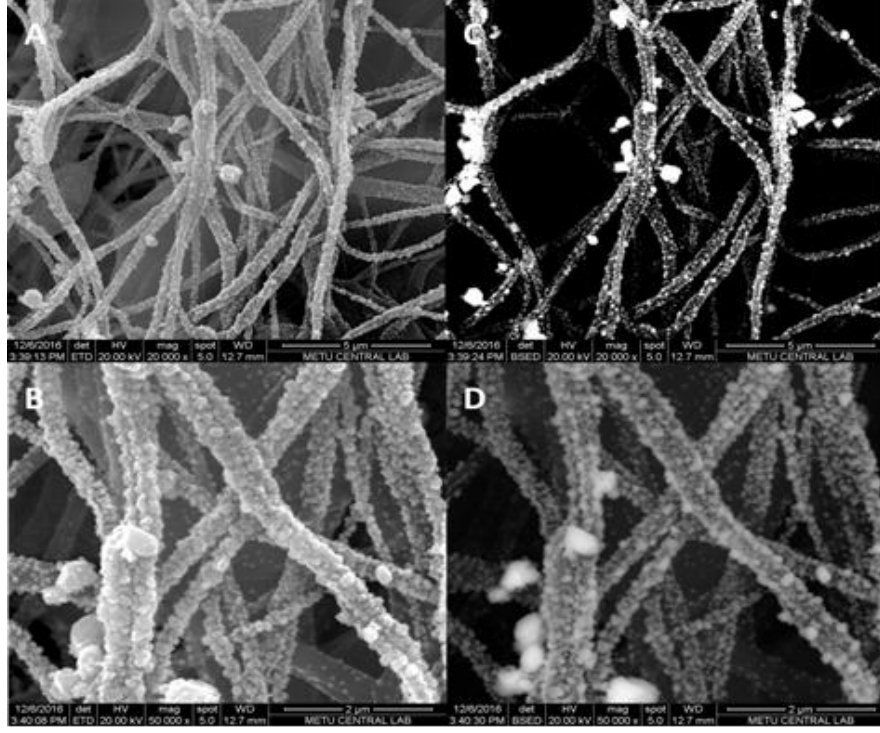
<b>PCL Nanofiberleri:</b> Sonikasyon Süresi: <b>2 Saat</b> , Sonikasyon Şiddeti: <b>Yüksek</b>		
0.1 mM AuNP  1	0.05 mM AuNP  2	0.01 mM AuNP  3

#### 4.7. Yüzeylerine NP Yüklenmiş Nanofiberlerin SEM Görüntüleri

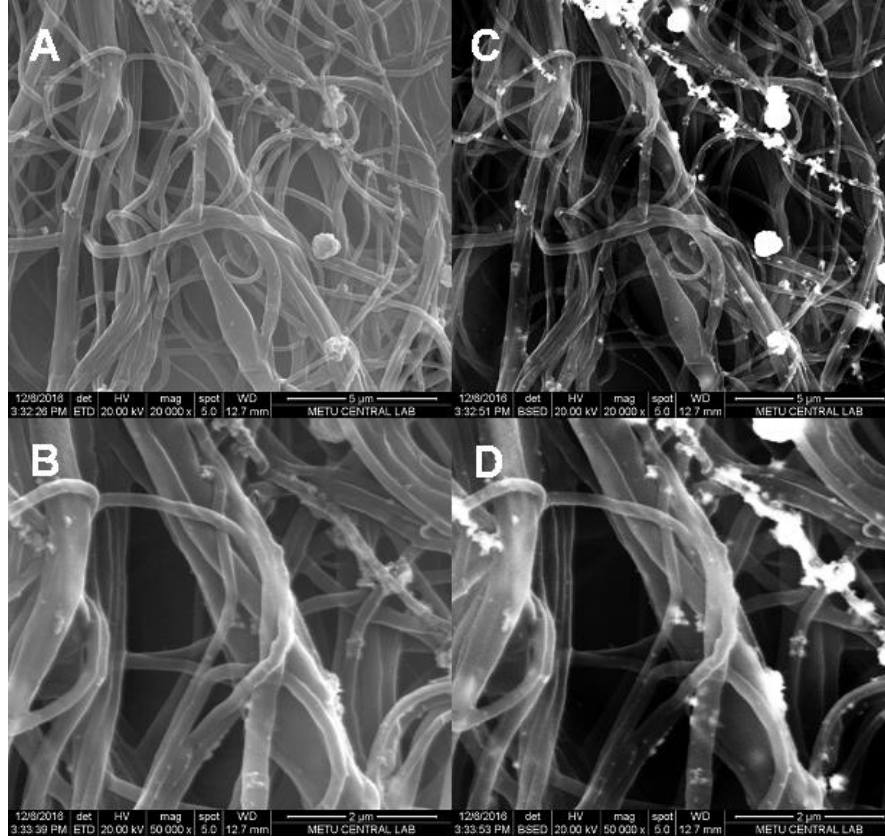
Yüzeylerine NP yüklenmiş matrislerin SEM görüntüleri alınarak matris üzerinde NP dağılımı ve bu dağılımın konsantrasyon ve NP türü ve kullanılan yükleme yöntemine göre değerlendirilmiştir. SEM görüntüleri yükleme işlemin konsantrasyona ve yüklenen partikül türüne bağlı olarak başarılı bir şekilde yapıldığını göstermektedir.

##### 4.7.1. AgNPleri İndirgenmiş Nanofiberlerin SEM Görüntüleri

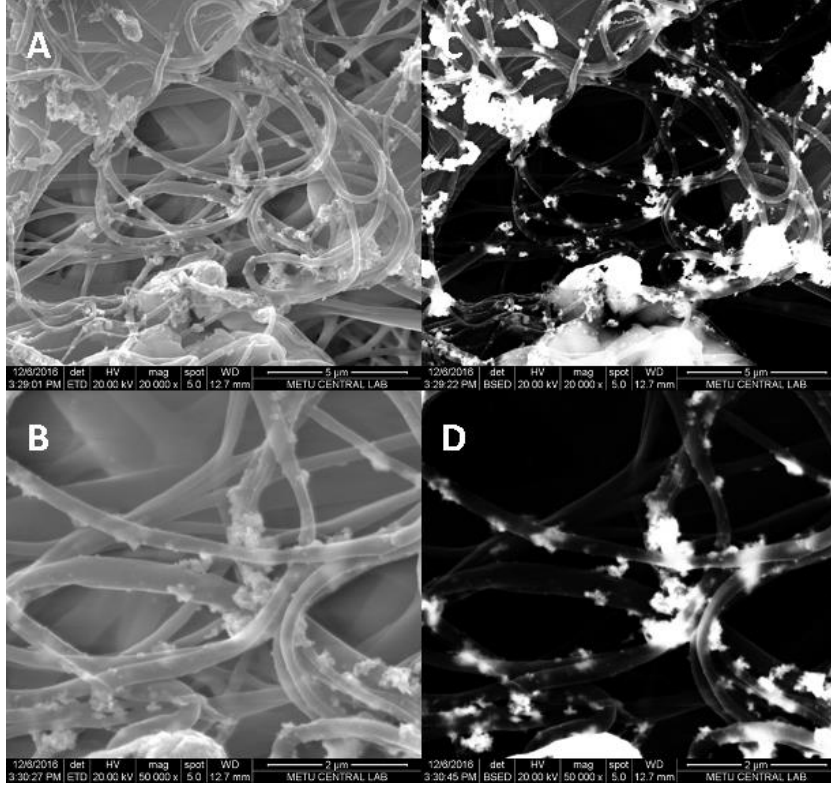
Şekil 4.24, 4.25, 4.26 ve 4.27'de 4 farklı AgNO<sub>3</sub> konsantrasyonu (sırasıyla 10, 5, 0,5 ve 0,1 mM) kullanılarak yüzeylerine gümüş nanopartikülleri (AgNP'leri) yüklenmiş PCL nanofiber matrislerin 2 farklı magnifikasyonda (20000x ve 50000x) SEM görüntüleri verilmiştir. Konsantrasyonun düşmesi ile birlikte fiberlerin yüzeylerinde AgNPlerinin azaldığı görülmektedir. 10 mM AgNO<sub>3</sub> konsantrasyonunda neredeyse fiberlerin yüzeyleri tamamen AgNPleri ile kaplanmış haldedir. 5 mM AgNO<sub>3</sub> konsantrasyonunda da nanofiberlerin yüzeyleri büyük ölçüde AgNP'leri ile kaplanmış durumdadır. 0,5 ve 0,1 mM AgNO<sub>3</sub> konsantrasyonlarında nanofiber yüzeylerinde çok az miktarda ve dağınık bir şekilde gümüş partikülleri bulunmaktadır. Elde edilen sonuçlar göstermektedir ki sonokimyasal indirgeme yöntemi ile nanofiber yüzeylerine AgNPlerinin yüklenmesinde en etkin parametre AgNO<sub>3</sub>'ün konsantrasyondur ve en yüksek yüklenme miktarı 10 mM'da elde edilmiştir.



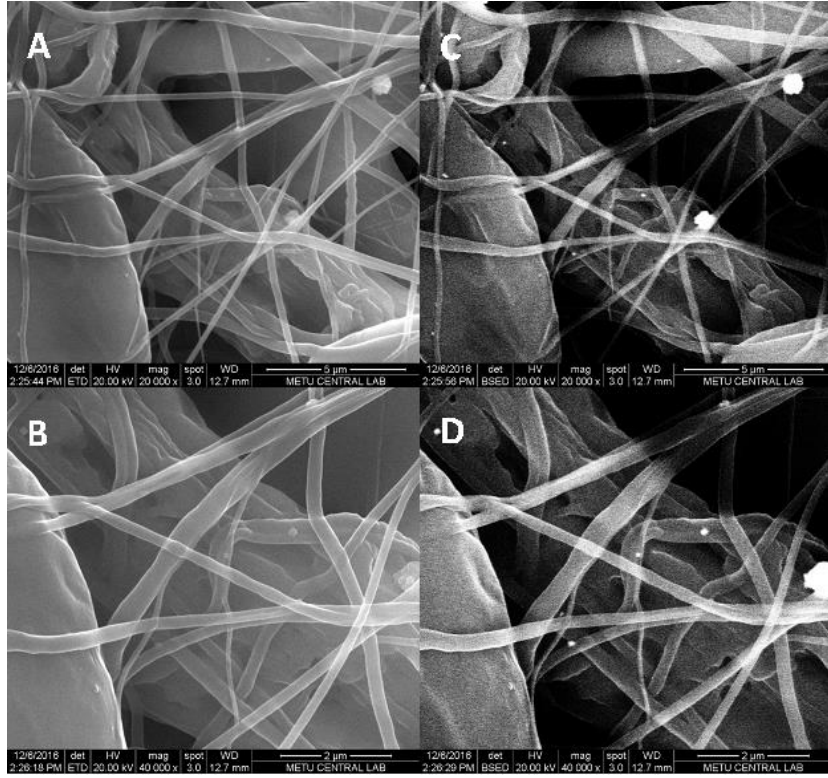
**Şekil 4.24.** AgNPLeri yüklenmiş PCL nanofiber matrisin SEM görüntüsü: iki farklı megnifikasyonda (A: 20000x ve B: 50000x), temel gümüş dağılımı (base scatter) (C ve D) ile birlikte: AgNO<sub>3</sub> konsantrasyonu 10 mM, 2 saat ve yüksek şiddet.



**Şekil 4.25.** AgNPLeri yüklenmiş PCL nanofiber matrisin SEM görüntüsü: iki farklı megnifikasyonda (A: 20000x ve B: 50000x), ve temel gümüş dağılımı (base scatter) (C ve D) ile birlikte: AgNO<sub>3</sub> konsantrasyonu 5 mM, 2 saat ve yüksek şiddet.



**Şekil 4.26.** AgNPIleri yüklenmiş PCL nanofiberin SEM görüntüsü: iki farklı megnifikasyonda (A: 20000x ve B: 50000x), ve temel gümüş dağılımı (base scatter) (C ve D) ile birlikte: AgNO<sub>3</sub> konsantrasyonu 0,5 mM, 2 saat ve yüksek şiddet.

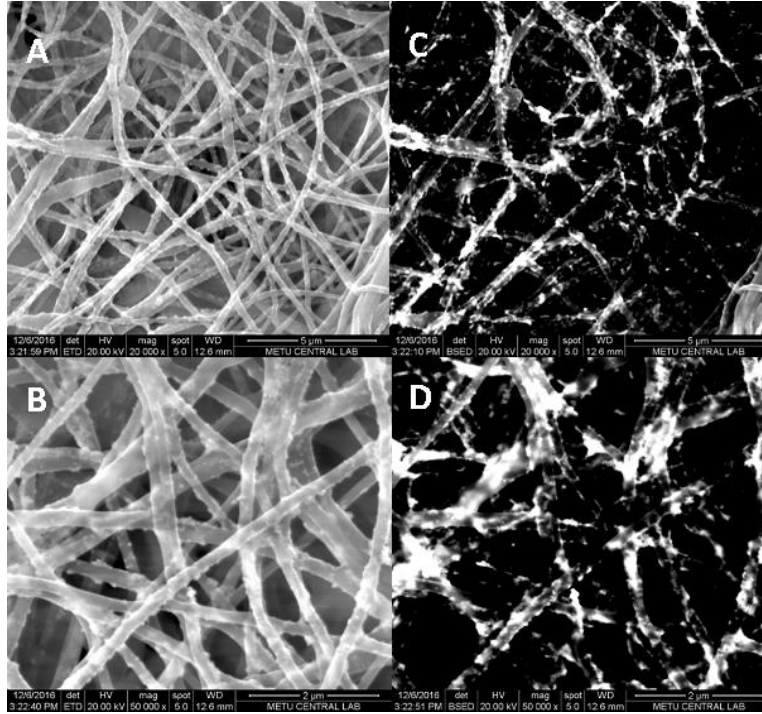


**Şekil 4.27.** AgNPIleri yüklenmiş PCL nanofiberin SEM görüntüsü: iki farklı megnifikasyonda (A: 20000x ve B: 50000x), ve temel gümüş dağılımı (base scatter) (C ve D) ile birlikte: AgNO<sub>3</sub> konsantrasyonu 0,1 mM, 2 saat ve yüksek şiddet.

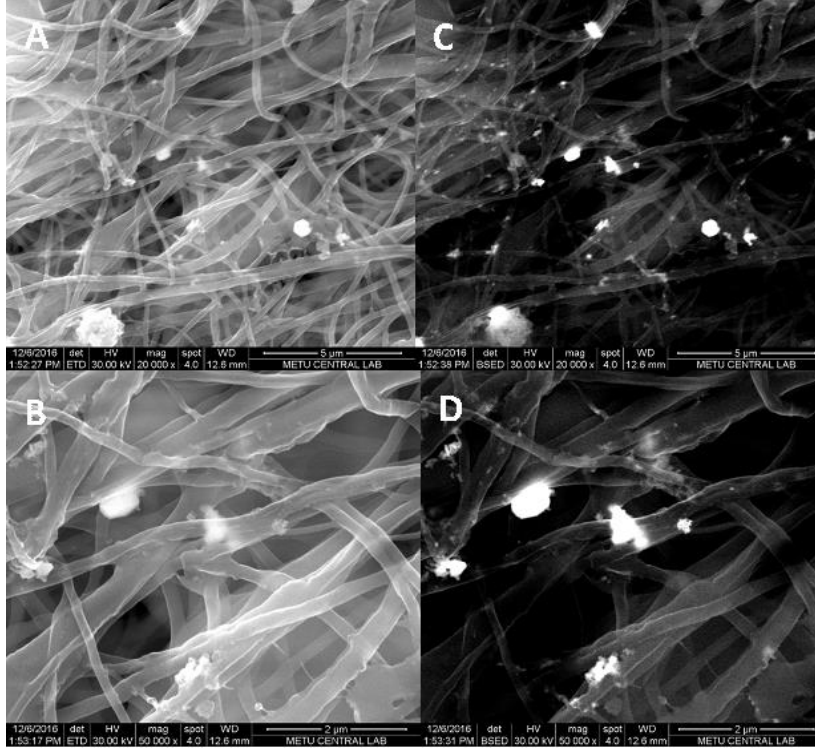


#### 4.7.2. AuNPLeri İndirgenmiş Nanofiberlerin SEM Görüntüleri

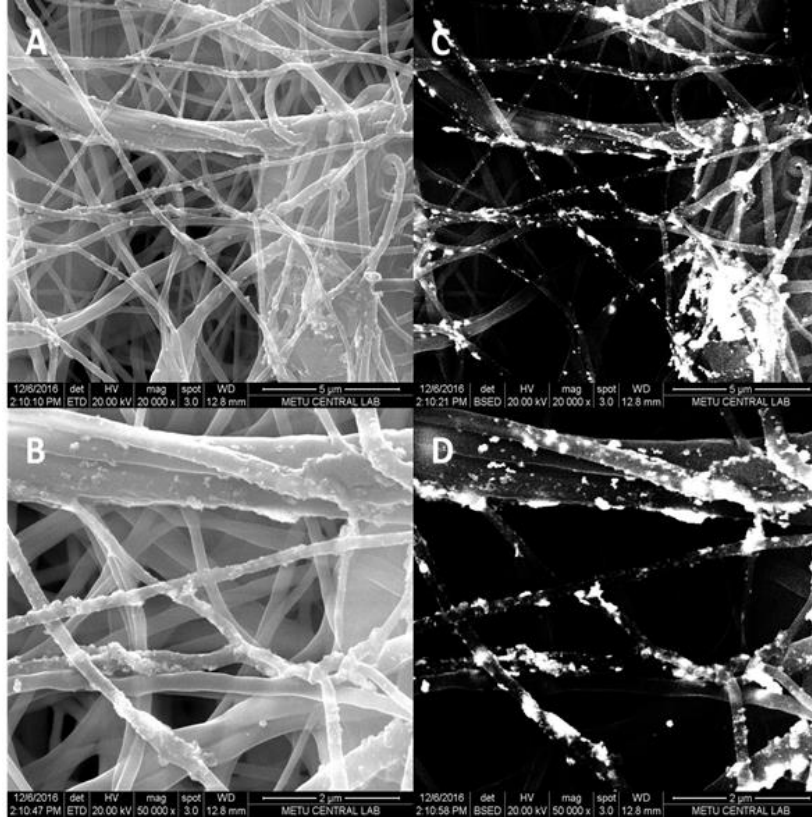
Şekil 4.28, 4.29, 4.230 ve 4.31’de 4 farklı H<sub>AuCl<sub>4</sub></sub> konsantrasyonu (sırasıyla 0,1, 0,05, 0,01 ve 0,001 mM) kullanılarak yüzeylerine AuNPLeri yüklenmiş PCL nanofiber matrislerinin 2 farklı magnifikasyonda (20000x ve 50000x) SEM görüntüleri verilmiştir. Şekillerde görüldüğü gibi H<sub>AuCl<sub>4</sub></sub> konsantrasyonunun düşmesi ile birlikte fiberlerin yüzeylerinde AuNP’lerinin azaldığı görülmektedir. 0,1 mM H<sub>AuCl<sub>4</sub></sub> konsantrasyonunda neredeyse fiberlerin yüzeyleri tamamen AuNP’leri ile kaplanmış şekildedir. 0,05 mM H<sub>AuCl<sub>4</sub></sub> konsantrasyonunda da nanofiberlerin yüzeyleri büyük ölçüde AuNPLeri ile kaplanmış durumdadır. 0,01 mM H<sub>AuCl<sub>4</sub></sub> konsantrasyonunda nanofiber yüzeylerinde çok az miktarda, dağınık ve aglomere olmuş bir şekilde AuNP’leri bulunmaktadır. 0,001 mM H<sub>AuCl<sub>4</sub></sub> konsantrasyonunda beklenmedik bir halde yüzeylerin aglomerasyonun olmadığından dolayı iyi derecede AuNP’leri ile kaplandığı görünmektedir. Elde edilen sonuçlar göstermektedir ki sonokimyasal indirgeme yöntemi ile nanofiber yüzeylerine AuNP’lerinin yüklenmesinde çok düşük konsantrasyonlara rağmen AuNP’leri dağılımı yüksek miktardadır ve konsantrasyona bağlı olmakla birlikte konsantrasyonun düşüşüne rağmen yüzeyler iyi derecede kaplanmış haldedirler.



**Şekil 4.28.** AuNPLeri yüklenmiş PCL nanofiberin SEM görüntüsü: iki farklı magnifikasyonda (A: 20000x ve B: 50000x), ve temel altın dağılımı (base scatter) (C ve D) ile birlikte: H<sub>AuCl<sub>4</sub></sub> konsantrasyonu 0,1 mM, 2 saat ve yüksek şiddet.

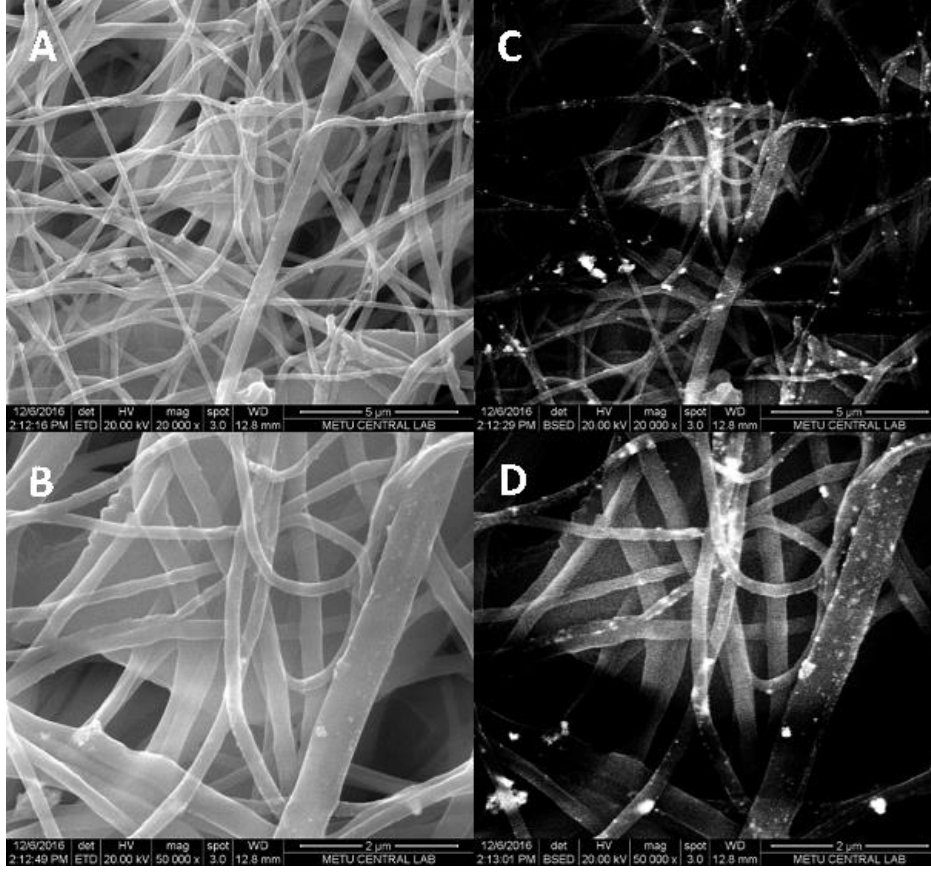


**Şekil 4.29.** AuNP'leri yüklenmiş PCL nanofiberin SEM görüntüsü: iki farklı megnifikasyonda (A: 20000x ve B: 50000x), ve temel altın dağılımı (base scatter) (C ve D) ile birlikte: H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> konsantrasyonu 0,05 mM, 2 saat ve yüksek şiddette.



**Şekil 4.30.** AuNP'leri yüklenmiş PCL nanofiberin SEM görüntüsü: iki farklı megnifikasyonda (A: 20000x ve B: 50000x), ve temel altın dağılımı (base scatter) (C ve D) ile birlikte: H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> konsantrasyonu 0,01 M, 2 saat ve yüksek şiddet.

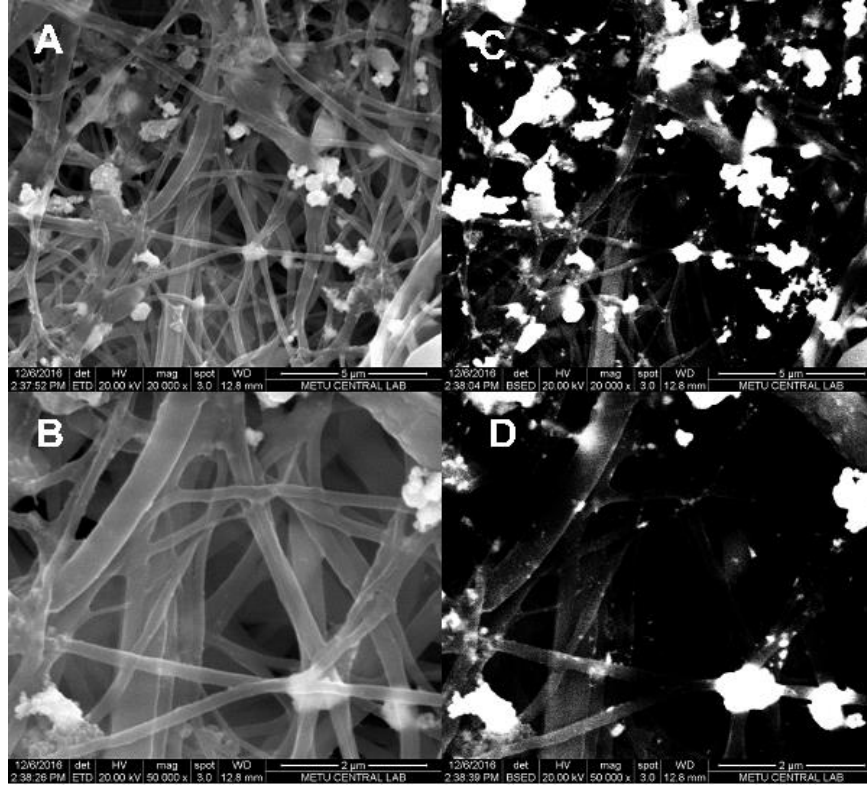




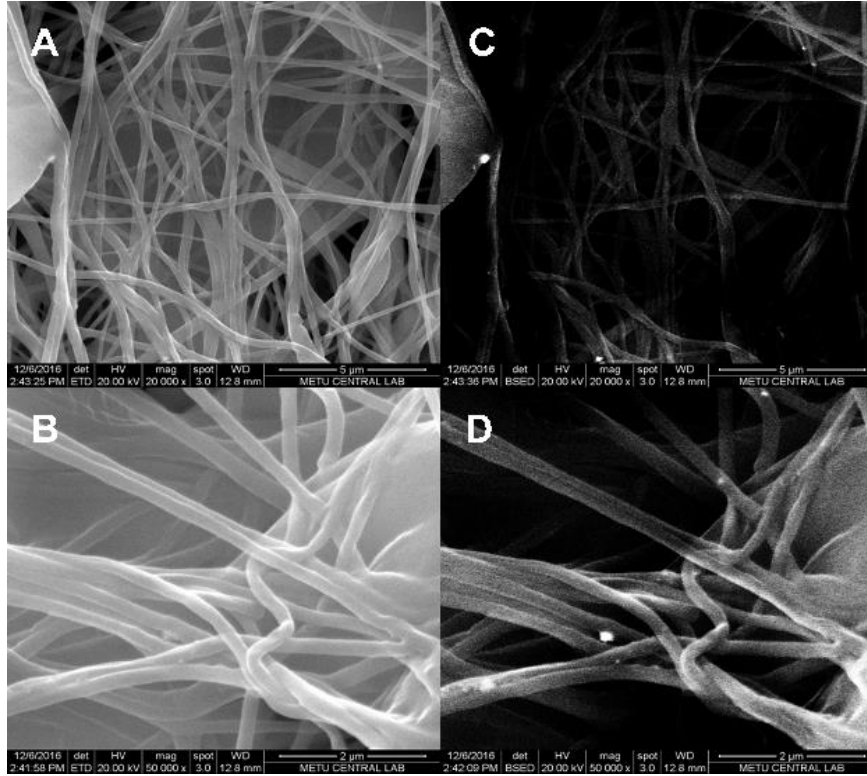
**Şekil 4.31.** AuNPleri yüklenmiş PCL nanofiberin SEM görüntüsü: iki farklı megnifikasyonda (A: 20000x ve B: 50000x), ve temel altın dağılımı (base scatter) (C ve D) ile birlikte: H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> konsantrasyonu 0,001 mM, 2 saat ve yüksek şiddet.

#### 4.7.3. Sonikasyon ile AuNPleri Yüklenmiş Nanofiberlerin SEM Görüntüleri

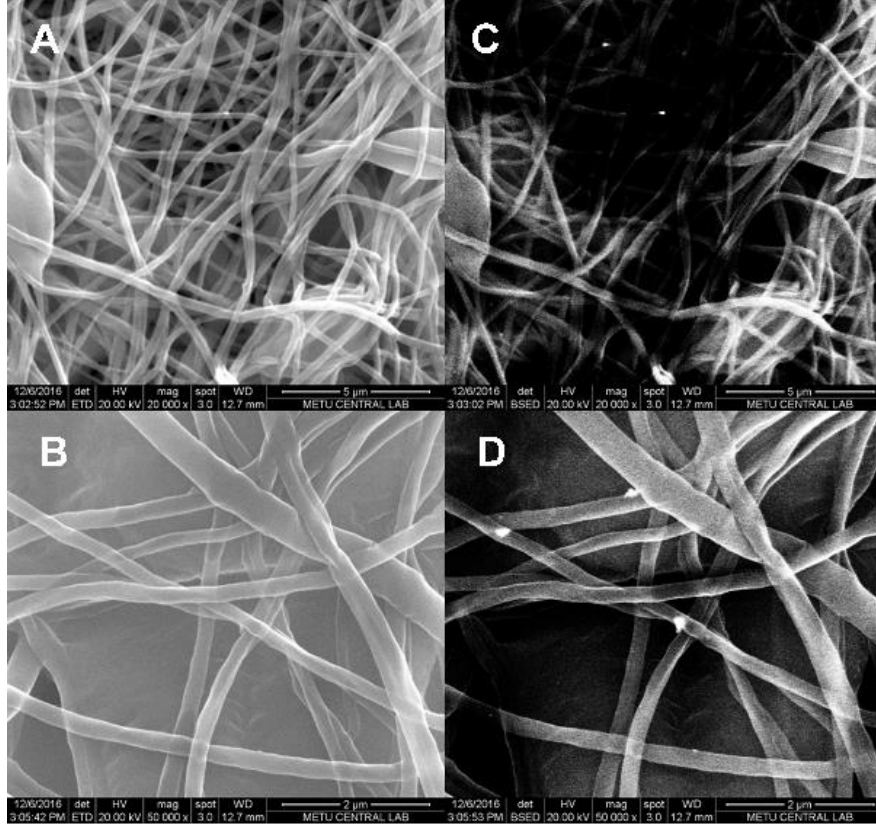
Şekil 4.32, 4.33 ve 4.34'de 3 farklı AuNP konsantrasyonu (sırasıyla 0,1, 0,05 ve 0,01 mM) kullanılarak yüzeylerine AuNP'leri yüklenmiş PCL nanofiber matrislerin 2 farklı magnifikasyonda (20000x ve 50000x) SEM görüntüleri verilmiştir. Konsantrasyonun düşmesi ile birlikte fiberlerin yüzeylerinde AuNP'lerinin azaldığı görülmektedir. 0,1 mM AuNP konsantrasyonunda neredeyse fiberlerin yüzeyleri büyük ölçüde AuNPleri ile kaplanmış şekildedir ve AuNPler nanofiber matrislerin yüzeyinde aglomere olmuştur. 0,01 mM AuNP konsantrasyonunda nanofiber yüzeylerinde çok az miktarda ve dağınık bir şekilde AuNPler bulunmaktadır.



**Şekil 4.32.** AuNPleri yüklenmiş PCL nanofiber SEM görüntüsü: iki farklı megnifikasyonda (A: 20000x ve B: 50000x), ve temel altın dağılımı (base scatter) (C ve D) ile birlikte: AuNP konsantrasyonu 0,1 mM, 2 saat ve yüksek şiddet.



**Şekil 4.33.** AuNPleri yüklenmiş PCL nanofiberlerinin SEM görüntüsü iki farklı megnifikasyonda (A: 20000x ve B: 50000x), ve temel altın dağılımı (base scatter) (C ve D) ile birlikte: AuNP konsantrasyonu 0,05 mM, 2 saat ve yüksek şiddet.



**Şekil 4.34.** AuNPLeri yüklenmiş PCL nanofiber SEM görüntüsü: iki farklı megnifikasyonda (A: 20000x ve B: 50000x), ve temel altın dağılımı (base scatter) (C ve D) ile birlikte: AuNP konsantrasyonu 0,01 mM, 2 saat ve yüksek şiddet.

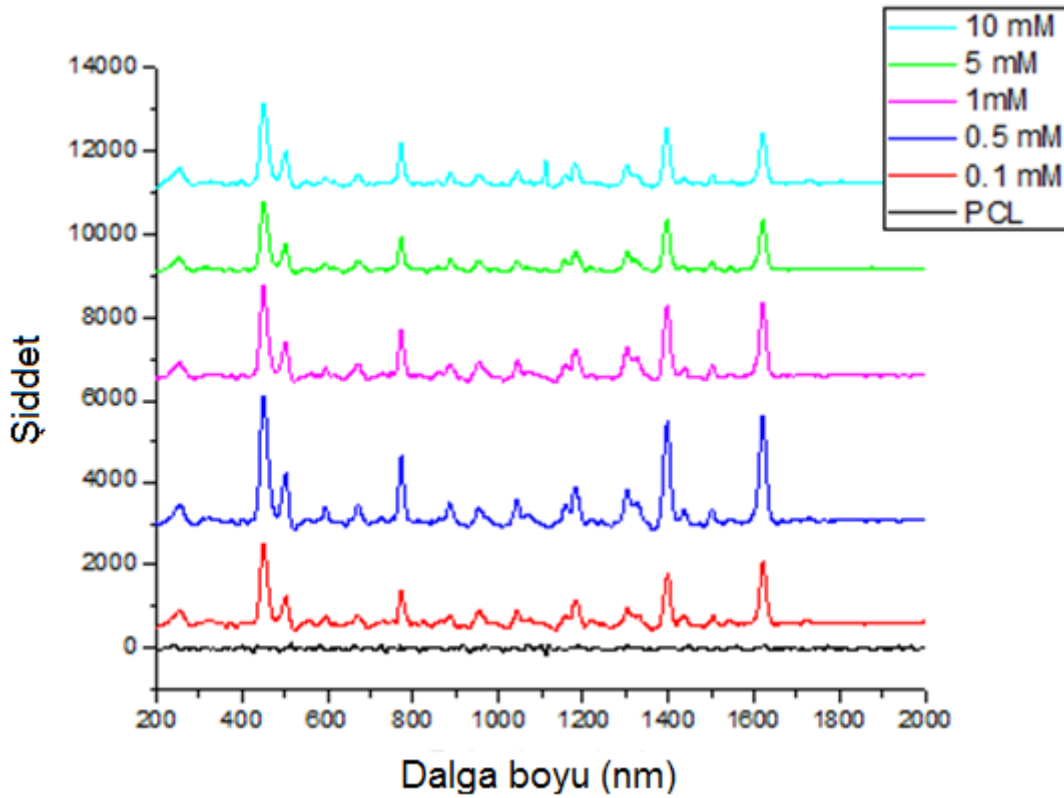
#### 4.8. NP Yüklenmiş Nanofiber Fimlerinin RAMAN Spektrumları

Tez kapsamında SERS molekülü olarak metilen mavisi (Methylene Blue, MB) kullanılmış ve NP'lerin yüzeyinde SERS etkisinden dolayı metilen mavisinin (MB) raman piklerinin şiddetlerinin çoğalması incelenmiştir. 2014'de Dr. Mehmet Yılmaz'ın SERS üzerine yaptığı doktora tez çalışmasında [178] en uygun raman molekülü (Raman reporter molecule) olarak metilen mavisi (MB) seçilmiştir ve bu tez çalışmasında da benzer yaklaşım kullanılmıştır. zenginleştirilmiş yüzeylerin SERS etkilerinin karşılaştırmasını sağlamak amacı ile MB için  $1610\text{ cm}^{-1}$ 'deki pikin şiddeti temel alınmıştır.

##### 4.8.1. İndirgeme ile AgNP Yüklenen Nanofiberlerin RAMAN Spektrumları

Nanofiber matrislerin yüzeylerine indirgeme yöntemi ile gümüş nanopartikülleri (AgNP'leri) yüklendikten sonra, bu partiküllerin nanofiber üzerinde yüzey zenginleştirme özellikleri (SERS) raman spektrumları alınarak incelenmiştir ve farklı konsantrasyonlara ait raman spektrumları şekil 4.35'de ( Sırasıyla  $\text{AgNO}_3$ 'ün 10, 5, 1, 0.5 ve 0,1 mM konsantrasyonlarına ait) verilmiştir. Sonuçlara bakıldığında yüksek  $\text{AgNO}_3$  konsantrasyonlarında nanopartiküllerin büyük çaplara sahip olması ve

aglomere olduğundan dolayı (SEM görüntüleri Şekil 3.24. ve 3.25) SERS özellikleri daha düşük miktarlardadır ( $1610 \text{ nm}^{-1}$  MB pikinin şiddetleri kıyaslanarak).  $\text{AgNO}_3$  konsantrasyonunun azalması ile birlikte aglomerasyon ve partikül boyutlar azalmakta ve bu nedenle SERS özellikleri daha belirgin hale gelmektedir. Sonuçlara göre  $\text{AgNO}_3$ 'ün 0,5 mM konsantrasyonunda (Şekil 4.35) en yüksek SERS özelliği görünmüştür ve konsantrasyonun azalması ile birlikte ( $\text{AgNO}_3$ : 0,1 mM, şekil 4.35) tekrar raman piklerinin şiddetleri düşüş göstermiştir. Şekil 4.35'de görüldüğü gibi  $\text{AgNO}_3$ ' 0.5 M konsantrasyonunda  $1610 \text{ nm}^{-1}$ 'de MB'ye ait en yüksek pik şiddeti elde edilmiştir.

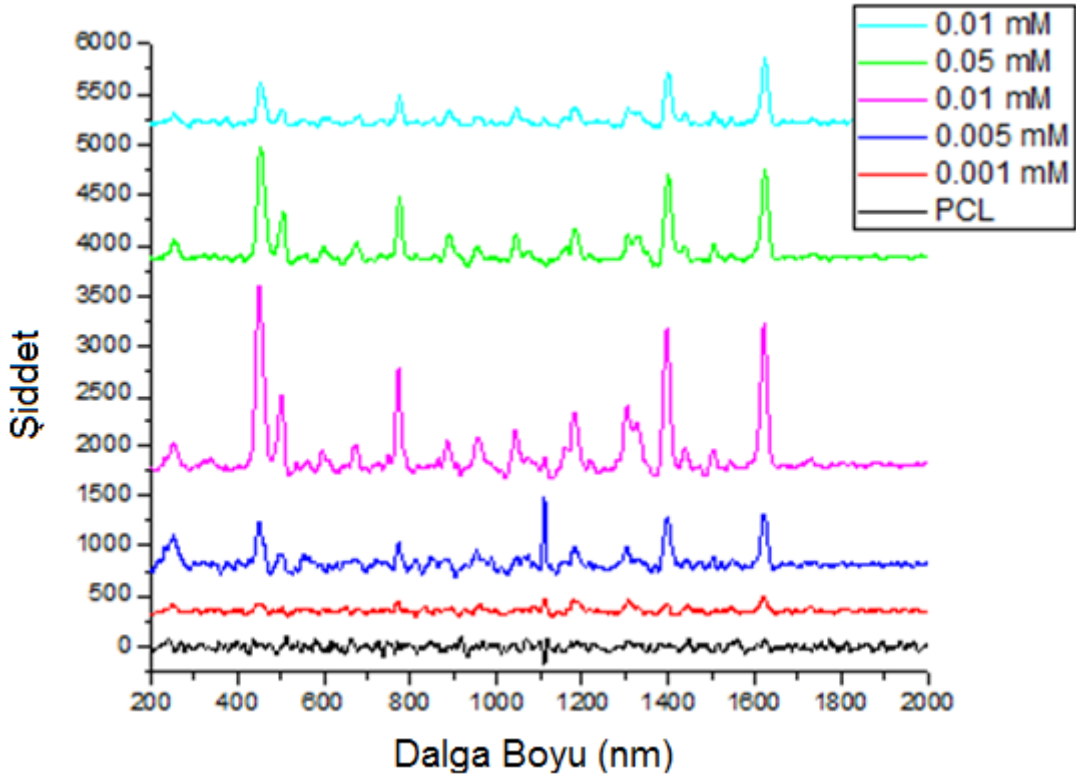


**Şekil 4.35.** Yüzeylerine AgNPLeri yüklenmiş PCL nanofiber matrislerin raman spektrumları.

#### 4.8.2. İndirgeme ile AuNP Yüklenen Nanofiberlerin RAMAN Spektrumları

Nanofiber matrislerin yüzeylerine indirgeme yöntemi ile altın nanopartikülleri (AuNP'leri) yükledikten sonra, bu partiküllerin nanofiber üzerinde yüzey zenginleştirme özellikleri (SERS) raman spektrumları alınarak incelenmiştir ve farklı konsantrasyonlara ait raman spektrumları şekil 4.36'da ( Sırasıyla  $\text{HAuCl}_4$ 'ün 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 ve 0,001 mM konsantrasyonlarına ait) verilmiştir. Sonuçlara bakıldığında yüksek  $\text{HAuCl}_4$  konsantrasyonlarında (0,1 ve 0,05 mM)

nanopartiküllerin büyük çapları ve aglomere olduğundan dolayı (SEM görüntüleri şekil 3.28. ve şekil 3.29.) SERS özellikleri ( $1610 \text{ nm}^{-1}$  MB pikinin şiddetleri kıyaslanarak) daha düşük miktarlardadır.  $\text{HAuCl}_4$  konsantrasyonunun azalması ile birlikte aglomerasyon ve partikül çapları azalmakta ve bu nedenle SERS özellikleri daha belirgin hale gelmektedir ( $\text{HAuCl}_4$  0.01 mM konsantrasyonunda  $1610 \text{ nm}^{-1}$  en yüksek MB raman piki). Sonuçlara göre  $\text{HAuCl}_4$ 'ün 0,01 mM konsantrasyonunda en yüksek SERS özelliği görünmüştür ( $1610 \text{ nm}^{-1}$ 'de MB raman piki) ve konsantrasyonun azalması ile birlikte (0,005 ve 0,001 mM) tekrar raman piklerinin şiddetleri düşüş göstermiştir. Şekil 4.36'da farklı konsantrasyonlara ait raman spektrumları görüldüğü gibi  $\text{HAuCl}_4$ ' 0,01 mM konsantrasyonunda  $1610 \text{ nm}^{-1}$ 'de MB'ye ait en yüksek pik şiddeti elde edilmiştir.

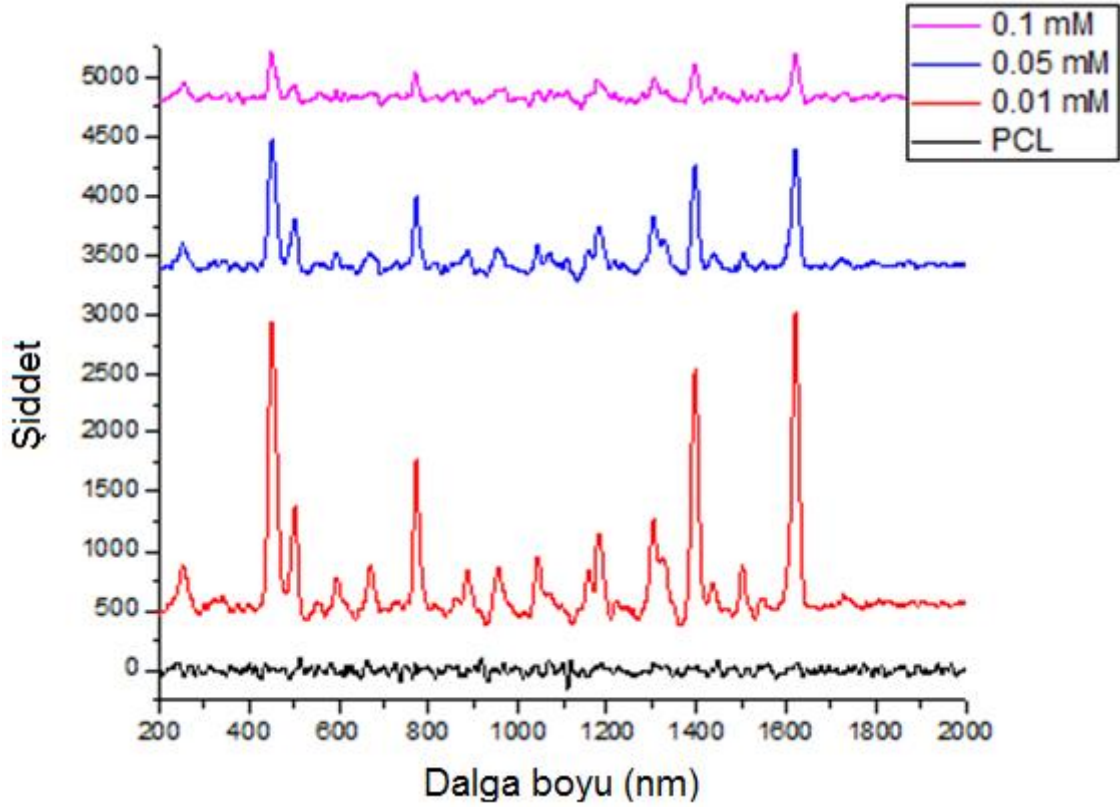


**Şekil 4.36.** Yüzeylerine AuNPleri yüklenmiş PCL nanofiber matrislerinin raman spektrumları.

#### 4.8.3. Sonikasyon ile AuNPleri Yüklenen Nanofiberlerin RAMAN Spektrumları

Nanofiber matrislerin yüzeylerini sonikasyon yöntemi ile AuNP'ler yüklendikten sonra, bu partiküllerin nanofiber üzerinde yüzey zenginleştirme özellikleri (SERS) raman spektrumları alınarak incelenmiştir ve farklı konsantrasyonlara ait raman spektrumları şekil 4.37'de (Sırasıyla  $\text{HAuCl}_4$ 'ün 0,1, 0,05, 0,01 mM konsantrasyonlarına ait) verilmiştir. Sonuçlara bakıldığında yüksek AuNP

konsantrasyonunda (0,1 mM) NP'lerin aglomere olduğundan dolayı (SEM görüntüsü şekil 4.32) SERS özellikleri ( $1610\text{ nm}^{-1}$  MB pikinin şiddetleri kıyaslanarak) daha düşük miktarlardadır. AuNP konsantrasyonunun azalması ile birlikte aglomerasyon azalmakta ve bu nedenle SERS özellikleri daha berlirgin hale gelmektedir (AuNP 0,01 mM konsantrasyonunda  $1610\text{ nm}^{-1}$  en yüksek MB raman piki) ve en yüksek SERS özelliği görünmüştür ( $1610\text{ nm}^{-1}$ 'de MB raman piki). Şekil 4.37'de farklı konsantrasyonlara ait raman spektrumlarında görüldüğü gibi H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> 0,01 mM konsantrasyonunda  $1610\text{ nm}^{-1}$ 'de MB'ye ait en yüksek pik şiddeti elde edilmiştir.



**Şekil 4.37.** Yüzeylerine AuNPLeri yüklenmiş PCL nanofiber matrislerinin raman spektrumları.

#### 4.8.4. NP Yükleme Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Nanopartikül yüklenmiş PCL nanofiberler ile ilgili elde edilen sonuçların genel değerlendirmesi şöyledir: Yüksek konsantrasyonlar kullanıldığında nanofiberlerin yüzeyleri tamamen nanopartiküllerle kaplanmış vaziyete olur ve konsantrasyonun düşmesi ile birlikte kaplanma miktarı azalmaktadır. Bununla birlikte yüksek konsantrasyonlar aglomerasyona ve büyük partikül çaplarına neden olur ve nanofiberlerin yüzeyleri tamamen siyah renkte olur ve SEM görüntülerinde görüldüğü gibi nanofiber yüzeyleri tamamen Npler ile kaplanmış olur. SERS

sonuçlarına bakıldığında yüksek konsantrasyonlarda çok iyi yüzey kaplanmasına rağmen raman piklerin şiddetleri çok düşüktür ve bunun nedeni yüzeylerde yüksek şekilde oluşan aglomerasyondur. Konsantrasyonun azalması ile birlikte hem aglomerasyon hem de partikül çapları azalır ve raman piklerinin şiddetlerinin çoğalmasına neden olur. Belirli bir konsantrasyon dan sonra nanofiber film yüzeylerin kaplanma oranı büyük ölçüde azalmaktadır ve bu nedenle SERS etkisinde düşüş görünmesine neden olarak raman piklerinin şiddetleri büyük ölçüde azalır.

Sonokimyasal indirgeme yöntemi ile altın ve gümüş nanopartikülleri yükleme sonuçları incelendiğinde başarılı bir şekilde gümüş nanopartikülleri yüklemek ve yüksek derecede SERS etkisi elde etmek için daha yüksek  $AgNO_3$  konsantrasyonlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Altın nanopartikülleri yüklemek için ise çok düşük  $H AuCl_4$  konsantrasyonlarına ihtiyaç vardır.

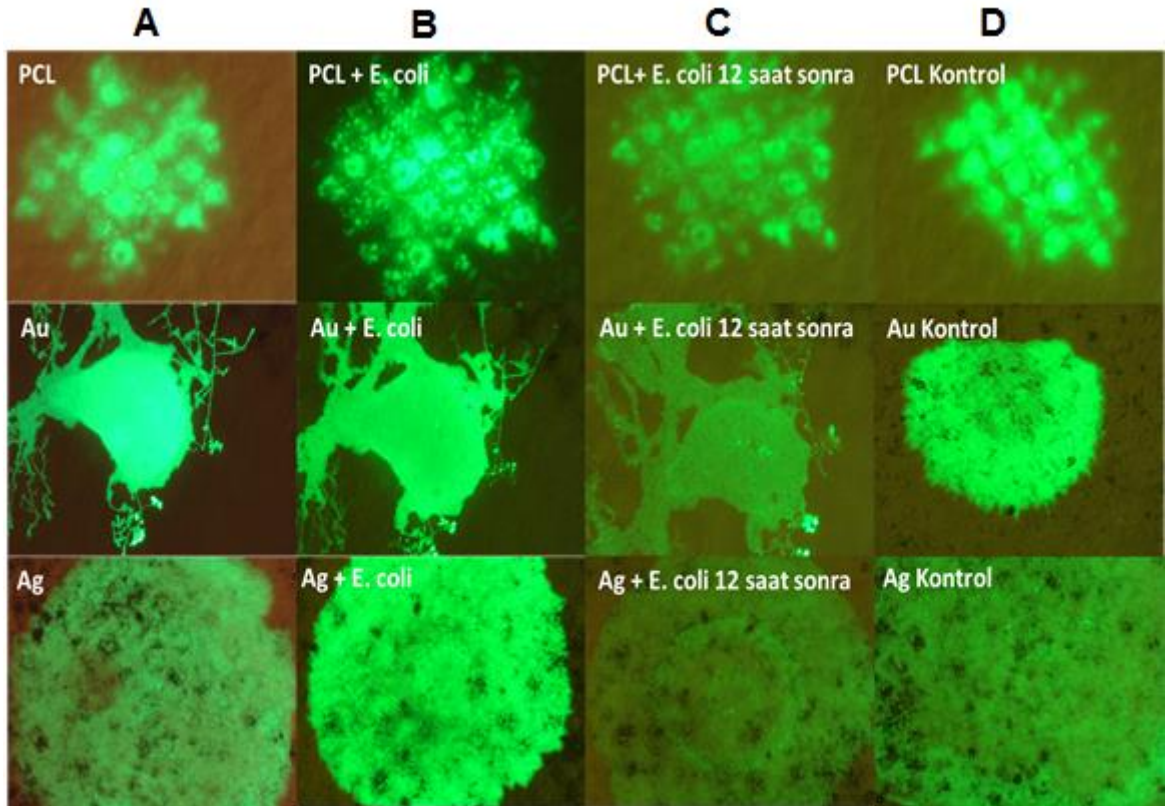
Altın nanopartiküllerin sonokimyasal indirgeme yöntemi ile direkt sentezlenmiş AuNPLeri kullanarak sonikasyon ortamında yüklemeyi gerçekleştirme proseslerine bakıldığında her iki proses için de düşük konsantrasyonlar gerekmektedir. İndirgeme yönteminde aglomerasyon daha yüksektir ve konsantrasyonun düşmesine rağmen yüzeylerde büyük ölçüde AuNPLeri görünmektedir. Önceden sentezlenen AuNPLerinin yüzeylere yüklenmesinde ise yüksek konsantrasyonda aglomerasyon şiddeti çok yüksektir ve konsantrasyonun düşmesi ile birlikte kaplanma miktarı azalmaktadır. Sentezlenen AuNPLerin düşük konsantrasyonlarında yüklenmiş SEM görüntüleri incelendiğinde yüzeylerde AuNPLeri belirgin bir şekilde görünmemektedir, bunun nedeni küçük çapta olan AuNPLerin (10 nm aralığında) yüzeylerde yüklenmesidir. Bu boyutta olan partikülleri SEM görüntülerinde görmek çok zordur, ama SERS sonuçlarına bakıldığında AuNPLer yüklenmiş nanofiber film yüzeylerinde düşük konsantrasyonlarda raman piklerin şiddetleri çok yüksektir ve aynı konsantrasyon aralığında indirgenme ile yüklenen AuNPLerinden daha yüksektir.

#### **4.9. Flüoresan Görüntüleme Sonuçları**

Flüoresan görüntüleme sonuçları şekil 4.38 ve 4.39'de verilmiştir. Bu şekillerde gösterildiği gibi saf PCL ve altın veya gümüş yüklenmiş nanofiber matrislerin üzerine GFP boya damlatıldıktan sonra flüoresan görüntüleri elde edilmiştir. Daha sonra yüzeylerin üzerine 10 µl *E. coli* ATCCC 25922 bakteri süspansiyonu ilave edilmiştir ve şekil 5.50'de görüldüğü gibi flüoresan şiddetinde yükselme kaydedilmiştir (Şekil



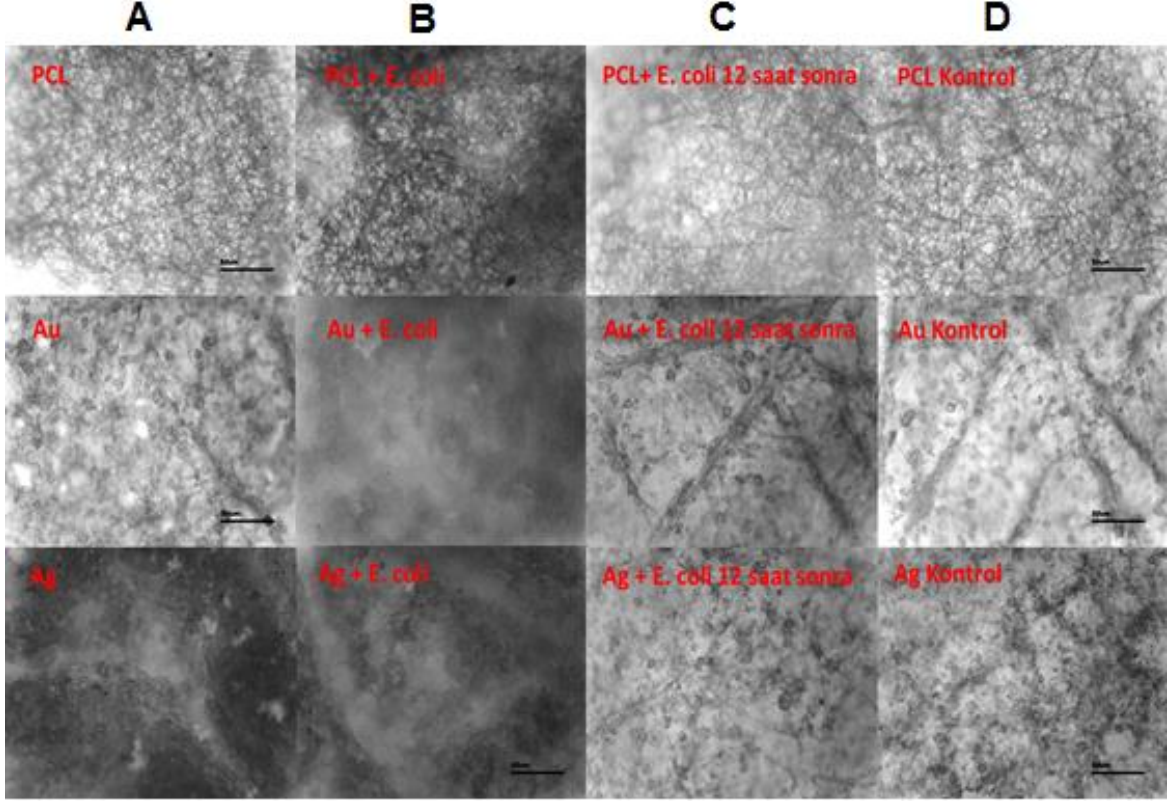
4.38). 12 saat bekletildikten sonra tekrar yüzeylerden flüoresan görüntüleri alınmıştır ve sonuçlarda görüldüğü gibi flüoresan şiddetinde büyük ölçüde bir düşüş kaydedilmiştir. PCL nanofiber yüzeylerinde diğer altın ve gümüş yüklenmiş yüzeyler ile kıyaslandığında düşüş şiddeti daha azdır. Bu sonuçlar altın ve gümüş yüklenmiş yüzeylerin bakteri üzerinde etkili olduklarını ve bakterinin daha hızlı bir şekilde ölümüne sebep olduklarını göstermektedir. Kontrol numunelerine bakıldığında flüoresan şiddetinde düşüş görülmemektedir. Bu sonuçlar bakteri süspansiyonu damlatılan yüzledeki flüoresan şiddetindeki 12 saat sonraki şiddetli azalmanı bakterilerin ölümü ile bağlantılı olduğunu göstermektedir. Saf PCL nanofiber matrisinde flüoresan şiddetindeki düşü diğer iki matrise kıyasla ( AuNP ve AgNP yüklenmiş yüzeyler) daha azdır ki bu sonuç PCL'in antinakteriyel özelliğe sahip olmaması ile birlikte flüoresan şiddetlerindeki azalmanı bakteri ölümü ile bağlantılı olduğunu desteklemektedir. Sonuç olarak AuNP ve AgNP yüklenmiş PCL nanofiber matrislerin tanı işlemlerinde büyük bir potansiyele sahip olduklarını göstermektedir.



**Şekil 4.38.** Dino-Lite Digital microscope ile PCL ve altın ve gümüş indirgenmiş nanofiberlerin flüoresan görüntüleri: A) Nanofiber yüzeyleri GFP boya ile byandıktan sonra, B) *E. coli* ATCC 25922 süspansiyonu damlatıldıktan sonra, C) Bakteri süspansiyonu damlatıldıktan 12 saat sonra, D) Kontrol grubu 12 saat sonra.



PSARON 1000, Tam Otomatik 3D Dijital Mikroskop Sistemi ile elde edilen görüntülerde (Şekil 4.39) yüzeyler arasında bakterilerin etkilerine dair bir sonuç görünmemektedir. Bu görüntülerde PCL nanofiberindeki fiberlerin mikro yapıları görünmektedir. Altın ve gümüş Npleri yüklenmiş yüzlerde ise kaplamna sonucu olarak bu yapı görünmemektedir.



**Şekil 4.39.** PSARON 1000, Tam Otomatik 3D Dijital Mikroskop Sistemi PCL ve altın ve gümüş indirgenmiş nanofiberlerin görüntüleri: A) Nanofiber yüzeyleri GFP boya ile boyandıktan sonra, B) *E. coli* ATCC 25922 süspansiyonu damlatıldıktan sonra, C) Bakteri süspansiyonu damlatıldıktan 12 saat sonra, D) Kontrol grubu 12 saat sonra.

## 5. GENEL SONUÇLAR

- Tez kapsamında ilk aşamada polikaprolakton (PCL) ve kitosan zincirleri üzerine oligo-polikaprolakton graft edilmiş kopolimerler (CS-g-PCL) başarılı bir şekilde sentezlenmiştir. Sentezlenen polimerler GPC, FTIR, <sup>1</sup>HNMR ve TGA ile karakterize edilmiştir. Karakterizasyon sonuçları PCL, CS-g-PCL-I ve CS-g-PCL-II sentezlerinin başarılı olduğunu göstermektedir. GPC analizi ile polimerlerin molekül ağırlığı (MW) elde edilmiştir ve PCL'nin sentezlendiği ve graft kopolimerizasyonun gerçekleştiği FTIR, NMR ve TGA sonuçları ile spatlanmıştır.
- Tezin ikinci aşamasında sentezlenen kopolimerler (CS-g-PCL-I ve CS-g-PCL-II) PCL ile farklı oranlarda karıştırılarak karışımlar oluşturulmuştur. Karışımlar iki farklı yöntemiyle (basit şırıngalı elektroeğirme sistemi ve ELMARCO nanospider cihazı) elektroeğirlerek nanofiber matrisleri üretilmiştir. Elde edilen nanofiber matrislerin SEM görüntüleri alınarak fiberlerin yapısı ve çapları incelenmiştir. Nanofiberlerin yüzey kimyası XPS ile karakterize edilmiştir ve kitosanın varlığı ve miktarının değişimi azot (N) miktarının değişimi ile incelenmiştir. Nanofiberlerin hidrofilik ve hidrofobik özellikleri su değme açısı ile incelenmiştir ve PCL nanofiberinin hidrofobik yapıya sahip olduğu ve kitosan varlığı ile nanofiber matrislerinin hidrofilik yapıya sahip olduğu ve kitosan miktarının artması ile hidrofilik yapının arttığı ispatlanmıştır. Nanofiber matrislerinin mekanik özellikleri çekme-uzama testi ile incelenmiştir. PCL nanofiber matrisi ile kıyaslandığında CS-g-PCL-I/PCL (25:75) ve CS-g-PCL-II/PCL (25:75)'de kitosanın kırılma yapısından dolayı elastisite modülü çöğalmaktadır. Elastisite modülünün tersine kopma anında uzama miktarı CS-g-PCL-I/PCL (25:75) ve CS-g-PCL-II/PCL (25:75)'de PCL nanofiberleri ile kıyasda büyük ölçüde azalmaktadır. Kopma anında uzama miktarının azalma nedeni kitosanın varlığından dolayı nanofiber matrisinin elastik özelliğinin azalmasıdır.
- Tezin üçüncü aşamasında nanofiber matrislerin Antibakteriyel özellikleri incelenmiştir. İki farklı gram pozitif ve gram negatif bakteri kullanarak nanofiberlerin Antibakteriyel özellikleri araştırılmıştır. Matrislerde kitosan varlığına rağmen herhangi bir antibakteriyel etki görünmemiştir. Bu sonuçun nedeni büyük ihtimal ile kitosanın graft edildiğinden kaynaklanmaktadır.

Ayrıca nanofiber matrislerin yüzeylerinde biyofilm oluşumu da araştırılmıştır. Deneysel sonuçlarına göre yapıların hidrofilik özelliğinin artması ile birlikte biyofilm oluşumu azalmaktadır. Bunun nedeni bakterilerin hidrofobik yapıya daha çok kolay tutunabilmesinden kaynaklanmaktadır.

- Tezin dördüncü aşamasında nanofiber matrislerin yüzeylerine indirgeme yöntemi ile sonikasyon ortamında altın ve gümüş NP'leri yüklenmiştir ve yüzeylerin SEM görüntüleri alınarak NP'lerin varlığı yüzeylerde görüntülenmiştir. Altın ve gümüş ile zenginleştirilmiş yüzeylerin raman spektrumları elde edilerek SERS etkileri incelenmiştir ve yöntemin nanofiberlerin yüzeylerini zengileştirmek için başarılı olduğu ispatlanmıştır. Kıyaslamak amacıyla Turkevich yöntemi ile AuNP'leri sentezlenmiş ve TEM görüntüleri alınarak NP boyutları elde edilmiş ve bu NP'ler sonikasyon ortamında nanofiber yüzeylerine yüklenmiş ve SEM görüntüleri alınmış ve raman spektrumları alınarak SERS özellikleri incelenmiş ve bu yöntem ile zenginleştirilen yüzeylerin raman piklerinin şiddetleri daha yüksek miktarda elde edilmiştir.
- Tezin son kısmında en yüksek SERS pik şiddetlerine sahip altın ve gümüş yüklenmiş nanofiber matrisler GFP boya ile boyanarak flüoresan mikroskop ile görüntülenmiş ve E. coli ATCC 25922 suşu üzerinde nanofiberlerin etkileri flüoresan mikroskop ile incelenmiştir. Bu bölümdeki çalışmalar bakteri süspansiyonu eklenmiş matrislerin 12 saat sonra flüoresan şiddetlerindeki düşüşü (kontrol numunelerindeki flüoresan şiddetlerinin sabit kalmasına dayanarak) bakterilerin ölümü ile bağlantılı olduğunu ve AuNP ve AgNP yüklenmiş matrislerin PCL ile kıyasla daha hızlı bakteri ölümüne sebep olduklarını göstermektedir.

## KAYNAKLAR

- [1] Carmona-Ribeiro, A.M., Melo-Carrasco, L.D., Cationic antimicrobial polymers and their assemblies, *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 5, 9906-9946, **2013**.
- [2] Wee-Eong Teo, Ryuji Inai, Seeram Ramakrishna, Technological advances in electrospinning of nanofibers, *Science and Technology of Advanced Materials*, 12, 1, 013002, **2011**.
- [3] Van der Schueren, L., De Schoenmaker, B., Kalaoglu, O.I., De Clerck, K., An alternative solvent system for the steady state electrospinning of polycaprolactone, *European Polymer Journal*, 47, 1256–1263, **2011**.
- [4] Moghe, A. K., Hufenus, R., Hudson, S. M., Gupta, B. S., Effect of the addition of a fugitive salt on electrospinnability of poly ( $\epsilon$ -caprolactone), *Polymer*, 50, 3311–3318, **2009**.
- [5] Prabhakaran, M.P., Venugopal, J.R., Chyan, T.T., Hai, L.B., Chan, C.K., Lim, A.Y., Electrospun biocomposite nanofibrous scaffolds for neural tissue engineering, *Tissue Engineering Part A*, 14, 1787–1797, **2008**.
- [6] Patale, R.L., Patravale, V.B., O, N-carboxymethyl chitosan-zinc complex: a novel chitosan complex with enhanced antimicrobial activity, *Carbohydrate Polymers*, 85, 105–110, **2011**.
- [7] Quiñones, J.P., Szopko, R., Schmidt, C., Covas, C.P., Novel drug delivery systems: chitosan conjugates covalently attached to steroids with potential anticancer and agrochemical activity, *Carbohydrate Polymers*, 84, 858–864, **2011**.
- [8] Singh, J., Dutta, P.K., Dutta, J., Hunt, A.J., Macquarrie, D.J., Clark, J.H., Preparation and properties of highly soluble chitosan-l-glutamic acid aerogel derivative, *Carbohydrate Polymers*, 76, 188–195, **2009**.
- [9] Bhattarai, N., Li, Z., Gunn, J., Leung, M., Cooper, A., Edmondson, D., Natural-Synthetic polyblend nanofibers for biomedical applications, *Advanced Materials*, 21, 2792–2797, **2009**.
- [10] Cooper, A., Bhattarai, N., Zhang, M., Fabrication and cellular compatibility of aligned chitosan–pcl fibers for nerve tissue regeneration, *Carbohydrate Polymers*, 85, 149–156, **2011**.
- [11] Hong, S., Kim, G., Fabrication of electrospun polycaprolactone biocomposites reinforced with chitosan for the proliferation of mesenchymal stem cells, *Carbohydrate Polymers*, 83, 940–946, **2011**.
- [12] Shalumon, K.T., Anulekha, K.H., Girish, C.M., Prasanth, R., Nair, S.V., Jayakumar, R., Single Step electrospinning of chitosan/poly (caprolactone) nanofibers using formic acid/acetone solvent mixture, *Carbohydrate Polymers*, 80, 413–419, **2010**.
- [13] Yang, H., Chen, X., & Wang, H., Acceleration of osteogenic differentiation of preosteoblastic cells by chitosan containing nanofibrous scaffolds, *Biomacromolecules*, 10, 2772–2778, **2009**.

- [14] Fleischmann, M., Hendra, P., McQuillan, A., Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode, *Chemical Physics Letters*, 26, 163–166, **1974**.
- [15] Jeanmaire, D. L., Van Duyne, R.P., Surface raman spectroelectrochemistry: part i. heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 84, 1–20, **1977**.
- [16] Albrecht, M.G., Creighton, J.A., Anomalously intense raman spectra of pyridine at a silver electrode, *Journal of American Chemical Society*, 99, 5215–5217, **1977**.
- [17] King, F.W., Van Duyne, R.P., Schatz, G.C., Theory of raman scattering by molecules adsorbed on electrode surfaces, *Journal of Chemical Physics*, 69, 4472–4481, **1978**.
- [18] *Moskovits, M.*, Surface roughness and the enhanced intensity of raman scattering by molecules adsorbed on metals, *Journal of Chemical Physics*, 69, 4159–4161, **1978**.
- [19] Schatz, G.C., Van Duyne, R.P., *Electromagnetic Mechanism of Surface-Enhanced Spectroscopy*, John Wiley and Sons: New York, 1, **2002**.
- [20] Gersten, J., Nitzan, A., Electromagnetic theory of enhanced raman scattering by molecules adsorbed on rough surfaces, *Journal of Chemical Physics*, 73, 3023–3037, **1980**.
- [21] Rinaudo, M., Chitin and chitosan: properties and applications, *Progress in Polymer Science*, 31, 603–632, **2006**.
- [22] Rinaudo, M., Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials, *Polymer International*, 57, 397–430, **2008**.
- [23] Rinaudo, M., *Physical Properties of Chitosan and Derivatives in Sol and Gel States. in Chitosan-Based Systems for Biopharmaceuticals: Delivery, Targeting and Polymer Therapeutics*, (eds: Sarmiento, B., Das Neves, J.), John Wiley & Sons: Chichester, UK, 23–44, **2012**.
- [24] Rinaudo, M., *Materials Based on Chitin and Chitosan. in Bio-Based Plastics: Materials and Applications*, (eds: Kabasci, S.), John Wiley & Sons: Chichester, UK, 63–80, **2014**.
- [25] Younes, I., Rinaudo, M., Chitin and chitosan preparation from marine sources. structure, properties and applications, *Marine. Drugs*, 13, 1133–1174, **2015**.
- [26] Rudall, K.M., Kenchington, W., The chitin system, *Biological Reviews*, 40, 597–636, **1973**.

- [27] Blackwell, J., *Chitin in Biopolymers*, (eds: Walton, A.G., Blackwell, J.), Academic Press: New York, NY, USA, 474–489, **1973**.
- [28] Helbert, W., Sugiyama, J., High-resolution electron microscopy on cellulose II and  $\alpha$ -chitin single crystals, *Cellulose*, *5*, 113–122, **1998**.
- [29] Kadokawa, J.I., Ionic liquid as useful media for dissolution, derivatization, and nanomaterial processing of chitin, *Green and Sustainable Chemistry*, *3*, 2A, 31971–31977, **2103**.
- [30] Roberts, G.A.F., *Structure of Chitin and Chitosan in Chitin Chemistry*, (eds: Roberts, G.A.E.), Palgrave Macmillan: London, UK, 85–91, **1992**.
- [31] Kafetzopoulos, D., Martinou, A., Bouriotis, V., Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *90*, 2564–2568, **1993**.
- [32] Ilyina, A.V., Tatarinova, N.Y., Varlamov, V.P., The preparation of low-molecular-weight chitosan using chitinolytic complex from *Streptomyces kurssanovii*, *Process Biochemistry*, *34*, 875–878, **1999**.
- [33] Tokuyasu, K., Mitsutomi, M., Yamaguchi, I., Hayashi, K., Mori, Y., Recognition of chitooligosaccharides and their *n*-acetyl groups by putative subsites of chitin deacetylase from a deuteromycete, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Biochemistry*, *39*, 8837–8843, **2000**.
- [34] Kurita, K., Sannan, T., Iwakura, Y., Studies on chitin, 4: Evidence for formation of block and random copolymers of *N*-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine by hetero- and homogeneous hydrolyses, *Macromolecular Chemistry and Physics*, *178*, 3197–3202, **1977**.
- [35] No, H.K., Meyers, S.P., Preparation and characterization of chitin and chitosan, A review, *Journal of Aquatic Food Product Technology*, *2*, 27–52, **1995**.
- [36] Philippova, O.E., Volkov, E.V., Sitnikova, N.L., Khokhlov, A., Desbrières, J., Rinaudo, M., Two types of hydrophobic aggregates in aqueous solutions of chitosan and its hydrophobic derivative, *Biomacromolecules*, *2*, 483–490, **2001**.
- [37] Philippova, O.E., Korchagina, E.V., Volkov, E.V., Smirnov, V.A., Khokhlov, A.R., Rinaudo, M., Aggregation of some water-soluble derivatives of chitin in aqueous solutions: role of the degree of acetylation and effect of hydrogen bond breaker, *Carbohydrate Polymers*, *87*, 687–694, **2012**.
- [38] Maghami, G.G., Roberts, G.A.F., Evaluation of the viscometric constants for chitosan, *Makromolekulare Chemie and Physics*, *189*, 195–200, **1988**.
- [39] Auzely, R., Rinaudo, M., Controlled chemical modifications of chitosan characterization and investigation of original properties, *Macromolecular Bioscience*, *3*, 562–565, **2003**.

- [40] Rinaudo, M., Auzely, R., Vallin, C., Mullagaliev, I., Specific interactions in modified chitosan systems, *Biomacromolecules*, *6*, 2396–2407, **2005**.
- [41] Recillas, M., Silva, L.L., Peniche, C., Goycoolea, F.M., Rinaudo, M., Argelles-Monal, W.M., Thermoresponsive behavior of chitosan-*g-n*-isopropylacrylamide copolymer solutions, *Biomacromolecules*, *10*, 1633–1641, **2009**.
- [42] Rinaudo, M., New way to crosslink chitosan in aqueous solution, *European Polymer Journal*, *46*, 1537–1544, **2010**.
- [43] Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F.M., Arguelles-Monal, W., Desbrieres, J., Rinaudo, M., An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization, *Polymer*, *42*, 3569–3580, **2001**.
- [44] Kono, H., Two-dimensional magic angle spinning nmr investigation of naturally occurring chitins: precise <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C resonance assignment of  $\alpha$ - and  $\beta$ -chitin, *Biopolymers*, *75*, 255–263, **2004**.
- [45] Heux, L., Brugnerotto, J., Desbrieres, J., Versali, M.F., Rinaudo, M., Solid state nmr for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan, *Biomacromolecules*, *1*, 746–751, **2000**.
- [46] Raymond, L., Morin, F.G., Marchessault, R.H., Degree of deacetylation of chitosan using conductometric titration and solid-state NMR, *Carbohydrate Research*, *246*, 331–336, **1993**.
- [47] Varum, K.M., Anthonsen, M.W., Grasdalen, H., Smisrød, O., <sup>13</sup>C-NMR studies of the acetylation sequences in partially *n*-deacetylated chitins (chitosans), *Carbohydrate Research*, *217*, 19–27, **1991**.
- [48] Rinaudo, M., Milas, M., le Dung, P., Characterization of chitosan. influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion, *International Journal of Biology Macromolecules*, *15*, 281–285, **1993**.
- [49] Brugnerotto, J., Desbrieres, J., Roberts, G., Rinaudo, M., Characterization of chitosan by steric exclusion chromatography, *Polymer*, *42*, 9921–9927, **2001**.
- [50] Odijk, T., On the ionic-strength dependence of the intrinsic viscosity of DNA, *Biopolymers*, *18*, 3111–3113, **1979**.
- [51] Mazeau, K., Perez, S., Rinaudo, M., Predicted influence of *n*-acetyl group content on the conformational extension of chitin and chitosan chains, *Journal of Carbohydrate Chemistry*, *19*, 1269–1284, **2000**.
- [52] Welsh, E.R., Price, R.R., Chitosan cross-linking with a water-soluble, blocked diisocyanate. 2. solvates and hydrogels, *Biomacromolecules*, *4*, 1357–1361, **2003**.
- [53] Arguelles-Monal, W., Goycoolea, F.M., Peniche, C., Higuera-Ciapara, I., Rheological study of the chitosan/glutaraldehyde chemical gel system, *Polymer Gels and Networks*, *6*, 429–440, **1998**.
- [54] Hirano, S., Yamaguchi, R., Fukui, N., Iwata, M., A chitosan oxalate gel: its conversion to an *N*-acetylchitosan gel via a chitosan gel, *Carbohydrate Research*, *201*, 145–149, **1990**.

- [55] Yamaguchi, R., Hirano, S., Arai, Y., Ito, T., Chitosan salt gels thermally reversible gelation of chitosan, *Agricultural and Biological Chemistry*, 42, 1981–1982, **1978**.
- [56] Shen, X., Tong, H., Jiang, T., Zhu, Z., Wan, P., Hu, J., Homogeneous chitosan/carbonate apatite/citric acid nanocomposites prepared through a novel in situ precipitation, *Composites Science and Technology*, 67, 2238–2245, **2007**.
- [57] Hsieh, S.H., Chen, W.H., Wei, L.L., A spectroscopic analysis of the reaction mechanism of polycarboxylic acid crosslinking with chitosan and cotton fabric, *Cellulose Chemistry and Technology*, 37, 359–369, **2003**.
- [58] Desai, K.G.H., Park, H.J., Encapsulation of vitamin c in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying, *Journal of Microencapsulation*, 22, 179–192, **2005**.
- [59] Quemeneur, F., Rinaudo, M., Maret, G., Pepin-Donat, B., Decoration of lipid vesicles by polyelectrolytes: mechanism and structure, *Soft Matter*, 6, 4471–4481, **2010**.
- [60] Rinaudo, M., Quemeneur, F., Pepin-Donat, B., Stabilization of liposomes against stress using polyelectrolytes: interaction mechanisms, influence of ph, molecular weight, and polyelectrolyte structure, *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 14, 667–677, **2009**.
- [61] Bordi, F., Sennato, S., Truzzolillo, D., Polyelectrolyte-induced aggregation of liposomes: a new cluster phase with interesting applications, *Journal of Physical Condensation Matter*, 21, 203102:1–203102:26, **2009**.
- [62] Haidar, Z.S., Hamdy, R.C., Tabrizian, M., Protein release kinetics for core-shell hybrid nanoparticles based on the layer-by-layer assembly of alginate and chitosan on liposomes, *Biomaterials*, 29, 1207–1215, **2008**.
- [63] Farkas, V., Fungal cell walls: their structure, biosynthesis and biotechnological aspects, *Acta Biotechnology*, 10, 225–238, **1990**.
- [64] Fleet, G.H., Phaff, H.J., Fungal glucans-structure and metabolism, *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series*, 13B, 416–440, **1981**.
- [65] Friedman, M., Juneja, V.K., Review of antimicrobial and antioxidative activities of chitosans in food, *Journal of Food Protection*, 73, 1737–1761, **2010**.
- [66] Kardas, I., Struszczyk, M.H., Kucharska, M., van den Broek, L.A.M., van Dam, J.E.G., Ciechańska, D., *Chitin and Chitosan as Functional Biopolymers for Industrial Applications*, In *The European Polysaccharide Network of Excellence (EPNOE). Research Initiatives and Results*, (eds: Narvard. P.), Springer-Verlag: Wien, Austria, 329–374, **2012**.
- [67] Alishahi, A., Aider, M., Applications of chitosan in the seafood industry and aquaculture: A review, *Food Bioprocess Technology*, 5, 817–830, **2012**.
- [68] Bordenave, N., Grelier, S., Cama, V., Water and moisture susceptibility of chitosan and paper-based materials: structure-property relationships, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9479–9488, **2007**.



- [69] Franklin, T.J., Snow, G.A., *Biochemistry of Antimicrobial Action*, 3rd edition, Chapman and Hall: London, UK, 217, **1981**.
- [70] Synowiecki, J., Al-khatteb, N.A.A., Production, properties and some new applications of chitin and its derivatives, *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, *43*, 144-171, **2003**.
- [71] Sudarshan, N.R., Hoover, D.G., Knorr, D., Antibacterial action of chitosan, *Food Biotechnology*, *6*, 257–272, **1992**.
- [72] Leuba, S., Stossel, P., *Chitosan and Other Polyamines: Antifungal Activity and Interaction with Biological Membranes*, In *Chitin in Nature and Technology*, (eds: Muzzarelli, R.A.A., Jeuniaux, C., Gooday, C.), Plenum Press, New York, NY, USA, 217, **1985**.
- [73] Choi, B.K., Kim, K.Y., Yoo, Y.J., Oh, S.J., Choi, J.H., Kim, C.Y., In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against actinobacillus actinomycetemcomitans and streptococcus mutans, *International Journal of Antimicrobial Agents*, *18*, 553–557, **2001**.
- [74] Eaton, P., Fernandes, J.C., Pereira, E., Pintado, M.E., Malcata, F.X., Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on *escherichia coli* and *staphylococcus aureus*, *Ultramicroscopy*, *108*, 1128–1134, **2008**.
- [75] Chung, Y.C., Su, Y.P., Chen, C.C., Jia, G., Wang, H.L., Wu, J.G., Lin, J.G., Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall, *Acta Pharmacologica Sinica*, *25*, 932–936, **2004**.
- [76] Jeon, Y.J., Park, P.J., Kim, S.K., Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor, *Carbohydrate Polymers*, *44*, 71–76, **2001**.
- [77] Muzzarelli, R., Tarsi, R., Filippini, O., Giovanetti, E., Biagini, G., Varaldo, P.E., Antimicrobial properties of n-carboxybutyl chitosan., *antimicrobial agents and chemotherapy*, *34*, 2019–2023, **1990**.
- [78] Rhoades, J., Roller, S., Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods, *Applied and Environmental Microbiology*, *66*, 80–86, **2000**.
- [79] Helander, I.M., Nurmiäho-Lassila, E.L., Ahvenainen, R., Rhoades, J., Roller, S., Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria, *International Journal of Food Microbiology*, *71*, 235–244, **2001**.
- [80] No, H.K., Young Park, N., ho Lee, S., Meyers, S.P., Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights, *International Journal of Food Microbiology*, *74*, 65–72, **2002**.
- [81] Younes, I., Sellimi, S., Rinaudo, M., Jellouli, K., Nasri, M., Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities, *International Journal of Food Microbiology*, *185*, 57–63, **2014**.
- [82] Zheng, L.Y., Zhu, J.F., Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights, *Carbohydrate Polymers*, *54*, 527–530, **2003**.

- [83] Benhabiles, M.S., Salah, R., Lounici, H., Drouiche, N., Goosen, M.F.A., Mameri, N., Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste, *Food Hydrocolloids*, 29, 48–56, **2012**.
- [84] Van Natta, F.J., Hill, J.W., Carruthers WH., Polymerization and ring formation,  $\epsilon$ -caprolactone and its polymers, *Journal of American Chemical Society*, 56, 455–459, 1934.
- [85] Huang, S., *Biodegradable Polymers*, (eds: Mark, F., Bikales, N., Overberger, C., Menges, G., Kroshwitz, J.), Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, New York, John Wiley and Sons, 220–43, **1985**.
- [86] Pitt, C.G., *Poly-  $\epsilon$ -Caprolactone and its Copolymers*, (eds: Chasin M, Langer R.), Biodegradable Polymers As Drug Delivery Systems, New York, Marcel Dekker, 71–120, **1990**.
- [87] Chandra, R., Rustgi, R., Biodegradable polymers, *Progress in Polymer Science*, 23, 1273–335, **1998**.
- [88] Okada, M., Chemical syntheses of biodegradable polymers, *Progress in Polymer Science*, 27, 87–133, **2002**.
- [89] Nair, L.S., Laurencin, C.T., Biodegradable polymers as biomaterials, *Progress in Polymer Science*, 32, 762–98, **2007**.
- [90] Woodruff, M.A., Hutmacher, D.W., The return of a forgotten polymer polycaprolactone in the 21st century, *Progress in Polymer Science*, 35, 10, 1217–1256, **2010**.
- [91] Azimi, B., Nourpanah, P., Rabiee, M., Arbab, S., Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) fiber: an overview, *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, 9, 3, 74-90, **2014**.
- [92] Labet, M., Thielemans, W., Synthesis of polycaprolactone: a review, *Chemical Society Reviews*, 38, 3484–3504, **2009**.
- [93] Storey, R.F., Taylor, A.E., Effect of stannous octoate concentration on the ethylene glycol-initiated polymerization of epsilon-caprolactone, *Abstract of Papers of American Chemical Society*, 211, 114–20, **1996**.
- [94] Hayashi, T., Biodegradable polymers for biomedical use, *Progress in Polymer Science*, 19, 663–702, **1994**.
- [95] Coulembier, O., Degee, P., Hedrick, J.L., Dubois, P., From controlled ring-opening polymerization to biodegradable aliphatic polyester: especially poly(beta-malic acid) derivatives, *Progress in Polymer Science*, 31, 723–47, **2006**.
- [96] Koleske, J., *Blends Containing Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) and Related Polymers*, (eds: Paul, D., Newman, S.), Polymer Blends, New York, Academic Press Inc., 369–89, **1978**.
- [97] Engelberg, I., Kohn, J., Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications a comparative study, *Biomaterials*, 12, 292–304, **1991**.

- [98] Woodward, C.S., The intracellular degradation of poly (epsilon-caprolactone), *Journal of biomedical materials research*, 19, 437-44, **1985**.
- [99] Williams, D.F., On the mechanisms of biocompatibility, *Biomaterials*, 29, 2941-53, **2008**.
- [100] Gunatillake, P.A., Adhikari, A., Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering, *European Cells and Materials*, 5, 1-16, **2003**.
- [101] Middleton, J.C., Tipton, A.J., Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices, *Biomaterials*, 21, 2335-46, **2000**.
- [102] Felfel, R.M., Pooza, L., Gimeno-Fabra, M., Milde, T., Hildebrand, G., Ahmed, I., Scotchford, C., Sottile, V., Grant, D.M., Liefelth, K., *In vitro* degradation and mechanical properties of PLAPCL copolymer unit cell scaffolds generated by two-photon polymerization, *Biomedical Materials*, (2016) 015011, **2016**.
- [103] Yoshimoto, H., Shin, Y.M., Terai, H., Vacanti, J.P., A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 24, 2077\_2082, **2003**.
- [104] Qin, X.H., Wu, D.Q., Effect of different solvents on poly (caprolactone) (pcl) electrospun nonwoven membranes, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 107, 1007\_1013, **2012**.
- [105] Zheng, W., Wang, Z., Song, L., Zhao, Q., Zhang, J., Li, D., Wang, S., Han, J., Zheng, X.L., Yang, Z., Kong, D., Endothelialization and patency of rgd-functionalized vascular grafts in a rabbit carotid artery model, *Biomaterials*, 33, 2880\_2891, **2011**.
- [106] Zander, N.E., Orlicki, J.A., Rawlett A.M., Beebe, T.P., Quantification of protein incorporated into electrospun polycaprolactone tissue engineering scaffolds, *Applied Materials & Interfaces*, 4, 2074\_2081, **2012**.
- [107] Mountziaris, P.M., Tzouanas, S.N., Mikos, A.G., Dose effect of tumor necrosis factor- $\alpha$  on in vitro osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on biodegradable polymeric microfiber scaffolds, *Biomaterials*, 31, 1666\_1675, **2010**.
- [108] Hong, J.K., Madhally, S.V., Three-dimensional scaffold of electrospayed fibers with large pore size for tissue regeneration, *Acta Biomaterialia*, 6, 4734\_4742, **2010**.
- [109] Huang, C., Ke, Q.F., Mo, X.M., *International Forum on Biomedical Textile Materials*, Donghua University, Shanghai, P.R. China, 236, **2011**.
- [110] Nguyen, T.H., Lee, B.T., The effect of cross-linking on the microstructure, mechanical properties and biocompatibility of electrospun polycaprolactone-gelatin/plga-gelatin/plga-chitosan hybrid composite, *science and technology of advanced materials*, 13, 035002, **2012**.
- [111] Dong, Z.X., Wu, Y.Q., Wang, Q., Xie, C., Ren, Y.F., Clark, R.L., Reinforcement of electrospun membranes using nanoscale  $al_2o_3$  whiskers for improved tissue scaffolds, *Journal of Biomedical Materials Research A*, 100, 903\_910, **2012**.

- [112] Cooper, A., Bhattarai, N., Kievit, F.M., Rossol, M., Zhang, M.Q., Electrospinning of chitosan derivative nanofibers with structural stability in an aqueous environment, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13, 9969–9972, **2011**.
- [113] De Vrieze, S., Westbroek, P., Van Camp, T., Van Langenhove, L., Electrospinning of chitosan nanofibrous structures: feasibility study, *Journal of Materials Science*, 42, 8029–8034, **2007**.
- [114] Jayakumar, R., Prabakaran, M., Nair, S. V., Tamura, H., Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications, *Biotechnology Advances*, 28, 142–150, **2010**.
- [115] Su, P., Wang, C.J., Yang, X.Y., Chen, X.Y., Gao, C.Y., Feng, X.X., Electrospinning of chitosan nanofibers: the favorable effect of metal ions, *Carbohydrate Polymers*, 84, 239–246, **2011**.
- [116] Wu, L., Li, H., Li, S., Li, X., Yuan, X., Li, X., Composite fibrous membranes of PLGA and chitosan prepared by coelectrospinning and coaxial electrospinning, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 92A, 563–574, **2010**.
- [117] Chen, H., Fan, X., Xia, J., Chen, P., Zhou, X., Huang, J., Yu, J., Gu, P., Electrospun chitosan-graft-poly ( $\epsilon$ -caprolactone)/ poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanofibrous scaffolds for retinal tissue engineering, *International Journal of Nanomedicine*, 6, 453–461, **2011**.
- [118] Zoppe J.O., Peresin M.S., Habibi Y., Venditti R.A., Rojas O.J., Reinforcing poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanofibers with cellulose nanocrystals, *Applied Material & Interfaces*, 1, 9, 1996–2004, **2009**.
- [119] Huang, Z.M., Zhang, Y.Z., Kotaki, M., Ramakrishna, S., A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites, *Composites Science and Technology*, 63, 2223–2253, **2003**.
- [120] Suzuki, A., Mikuni, T., Hasegawa, T., Nylon 66 nanofibers prepared by co<sub>2</sub> laser supersonic drawing, *Journal of Applied Polymer Science*, 131, 6, 4015 (1-11), **2014**.
- [121] Suzuki, A., Arino, K., Polypropylene nanofiber sheets prepared by co<sub>2</sub> laser supersonic multi-drawing, *Europeane Polymer Journal*, 48, 1169–1176, **2012**.
- [122] Wang, S., Zhang, Y., Wang, W., Li, G., Ma, X., Li, X., Zhang, Z., Qian, Y., Template-assisted synthesis of porous molybdenum dioxide nanofibers and nanospheres by redox etching method, *Journal of Crystal Growth*, 290, 96–102, **2006**.
- [123] Tao, S.L., Desai, T.A., Aligned arrays of biodegradable poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanowires and nanofibers by template synthesis, *Nano Letters*, 7, 1463–1468, **2007**.
- [124] Ichimori, T., Mizuma, K., Uchida, T., Yamazaki, S., Kimura, K., Morphological diversity and nanofiber networks of poly(p-oxybenzoyl) generated by phase separation during copolymerization, *Journal of Applied Polymer Science*, 128, 1282–1290, **2013**.
- [125] Shao, J., Chen, C., Wang, Y., Chen, X., Du, C., Early stage evolution of structure and nanoscale property of nanofibers in thermally induced phase separation process, *Reactive and Functional Polymers*, 72, 765–772, **2012**.

- [126] Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W.E., Lim, T.C., Ma, Z., *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*, World Scientific, **2005**.
- [127] Smith, L.A., Ma, P.X., Nano-fibrous scaffolds for tissue engineering, *Colloids Surface B: Biointerfaces*, 39, 125–131, **2004**.
- [128] Subbiah, T., Bhat, G.S., Tock, R.W., Parameswaran, S., Ramkumar, S.S., Electrospinning of nanofibers, *Journal of Applied Polymer Science*, 96, 557–569, **2005**.
- [129] Valizadeh, A., Farkhani, S.M., Electrospinning and electrospun nanofibres, *IET Nanobiotechnology, Institution of Engineering and Technology*, 83–92, **2014**.
- [130] Supaphol, P., Suwantong, O., Sangsanoh, P., Srinivasan, S., Jayakumar, R., Nair, S., *Electrospinning of Biocompatible Polymers and Their Potentials in Biomedical Applications*, (eds: Jayakumar, R., Nair, S.), *Biomedical Applications of Polymeric Nanofibers*, Springer Berlin Heidelberg, 213–239, **2012**.
- [131] Lin, J., Wang, X., Ding, B., Yu, J., Sun, G., Wang, M., Biomimicry via electrospinning, *Critical Reviews in Solid State and Material Sciences*, 37, 94–114, **2012**.
- [132] Ahmed, F.E., Lalia, B.S., Hashaikeh, R., A review on electrospinning for membrane fabrication: challenges and applications, *Desalination*, 356, 15–30, **2015**.
- [133] Xin, Y., Reneker, D.H., Garland formation process in electrospinning, *Polymer*, 53, 3629–3635, **2012**.
- [134] Reneker, D.H., Kataphinan, W., Theron, A., Zussman, E., Yarin, A.L., Nanofiber garlands of polycaprolactone by electrospinning, *Polymer*, 43, 6785–6794, **2002**.
- [135] Du, Q., Harding, D.R., Yang, H., Helical peanut-shaped poly(vinyl pyrrolidone) ribbons generated by electrospinning, *Polymer*, 54, 6752–6759, **2013**.
- [136] Koombhongse, S., Liu, W., Reneker, D.H., Flat polymer ribbons and other shapes by electrospinning, *Journal of Polymer Science B Polymer Physics*, 39, 2598–2606, **2001**.
- [137] Li, Z., Wang, C., Effects of working parameters on electrospinning, one-dimensional nanostructures, *Springer Berlin Heidelberg*, 15–28, **2013**.
- [138] Wendorff, J.H., Agarwal, S., Greiner, A., *Electrospinning: materials, processing, and applications*, Wiley, **2012**.
- [139] Stranger, J., Tucker, N., Staiger, M., *Electrospinning*, Ismithers Rapra Publishing, Shawbury, Shrewsbury, Shropshire, UK, **2009**.
- [140] Costa, L.M.M., Bretas, R.E.S., Gregorio, R., Effect of solution concentration on the electrospay/electrospinning transition and on the crystalline phase of PVDF, *Materials Sciences and Applications*, 1, 247–252, **2010**.
- [141] Sener, A.G., Altay, A.S., Altay, F., Effect of voltage on morphology of electrospun nanofibers, *Electrical and Electronics Engineering (ELECO), 7th International Conference*, I-324–I-328, **2011**.

- [142] Casper, C.L., Stephens, J.S., Tassi, N.G., Chase, D.B., Rabolt, J.F., Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers: effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process, *Macromolecules*, 37, 573–578, **2003**.
- [143] Vrieze, S., Camp, T., Nelvig, A., Hagström, B., Westbroek, P., Clerck, K., The effect of temperature and humidity on electrospinning, *Journal of Material Science*, 44, 1357–1362, **2009**.
- [144] Cloete, T.E., *Nanotechnology in Water Treatment Applications*, Caister Academic Press, **2010**.
- [145] Xiong, J., Huo, P., Ko, F.K., Fabrication of ultrafine fibrous polytetrafluoroethylene porous membranes by electrospinning, *Journal of Material Reserch*, 24, 2755–2761, **2009**.
- [146] Bang, J.H., Suslick, K.S., Applications of ultrasound to the synthesis of nanostructured materials, *Advanced Materials*, 22, 1039–1059, **2010**.
- [147] Xu, H., Zeiger, B.W., Suslick, K.S., Sonochemical synthesis of nanomaterials, *Chemical Society Reviews*, 42, 2555-2567, **2013**.
- [148] Manoiu, V-S., Aloman, A., Obtaining silver nanoparticles by sonochemical methods, *Universitatea Politehnica Bucuresti Scientific Bulletin, Series B*, 72, 2, 179-186, **2010**.
- [149] Darroudi, M., Khorsand Zak, A., Muhamad, M.R., Huang, N.M., Hakimi, M., Green synthesis of colloidal silver nanoparticles by sonochemical method, *Material Letters*, 66, 117–120, **2012**.
- [150] Byeon, J.H., Kim, Y-W., A Novel polyol method to synthesize colloidal silver nanoparticles by ultrasonic irradiation, *Ultrasonics Sonochemistry*, 19, 209–215, **2012**.
- [151] Zhanjiang Z., Jinpei, L., Synthesis and characterization of silver nanoparticles by a sonochemical method, *Rare Metal Materials and Engineering*, 41, 10, 1700-1705, **2012**.
- [152] Gedanken, A., Using sonochemistry for the fabrication of nanomaterials, *Ultrasonics Sonochemistry*, 11, 47–55, **2004**.
- [153] Ohayon, E., Gedanken, A., The application of ultrasound radiation to the synthesis of nanocrystalline metal oxide in a non-aqueous solvent, *Ultrasonics Sonochemistry*, 17, 173–178, **2010**.
- [154] Pol, V. G., Gedanken, A., Calderon-Moreno, J., Deposition of gold nanoparticles on silica spheres: a sonochemical approach, *Chemical Materials*, 15, 1111-1118, **2003**.
- [155] Matsumoto, A., Ishikawa, T., Odani, T., Oikawa, H., Okada, S., Nakanishi, H., An organic/inorganic nanocomposite consisting of polyuconate and silver nanoparticles, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 207, 361, **2006**.

- [156] Sánchez-Valdes, S., Ortega-Ortiz, H., Ramos-de Valle, L.F., Medellín-Rodríguez, F.J., Guedea-Miranda, R., Mechanical and antimicrobial properties of multilayer films with a polyethylene/silver nanocomposite layer, *Journal of Applied Polymer Science*, 111, 953, **2009**.
- [157] Avila-Alfaro, J.A., Sa´nchez-Valdes, S., Ramos-deValle, L.F., Ortega-Ortiz, H., Me´ndez-Nonell, J., Patin˜o-Soto, A.P., Narro-Cespedes, R.I., Perera-Mercado, Y.A., Avalos-Belmontes, F., Ultrasound irradiation coating of silver nanoparticle on abs sheet surface, *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, **2013**, DOI 10.1007/s10904-013-9832-y
- [158] Perkas, N., Amirian, G., Dubinsky, S., Gazit, S., Gedanken, A., Ultrasound-assisted coating of nylon 6,6 with silver nanoparticles and its antibacterial activity, *Journal of Applied Polymer Science*, 104, 1423, **2007**.
- [159] Perkas, N., Shuster, M., Amirian, G., Kolytyn, Y., Gedanken, A., Sonochemical immobilization of silver nanoparticles on porous polypropylene, *Journal of Polymer Science, Part A*, 46, 1719, **2008**.
- [160] Gedanken, A., Sonochemistry and its application to nanochemistry, *Current Science*, 85, 12, 1720, **2003**.
- [161] Okitsu, K., Nishimura, R., Sonochemical reduction method for controlled synthesis of metal nanoparticles in aqueous solutions, *Proceedings of 20th International Congress on Acoustics, ICA*, **2010**.
- [162] Okitsu, K., Mizukoshi, Y., Bandow, H., Maeda, Y., Yamamoto, T., Nagata, Y., Formation of nobel metal particles by ultrasonic irradiation, *Ultrasonics Sonochemistry*, 3, 249-251, **1996**.
- [163] Chen, W., Cai, W., Zhang, L., Wang, G., Zhang, L., Sonochemical processes and formation of gold nanoparticles within pores of mesoporous silica, *Journal of Colloid and Interface Science*, 238, 291–295, **2001**.
- [164] Nie, S., Emory, S.R., Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced raman scattering, *Science*, 275, 1102–1106, **1997**.
- [165] Kneipp, K., Wang, Y., Kneipp, H., Perelman, L.T., Itzkan, I., Dasari, R.R., Feld, M.S., Single molecule detection using surface- enhanced raman scattering (sers), *Physical Review Letters*, 78, 1667, **1997**.
- [166] Doering, W.E., Nie, S., Spectroscopic tags using dye-embedded nanoparticles and surface-enhanced raman scattering, *Analytical Chemistry*, 75, 6171–6176, **2003**.
- [167] McCreery, R.L., Raman spectroscopy for chemical analysis, *John Wiley & Sons: New York*, 225, **2005**.
- [168] Schlücker, S., Sers microscopy: nanoparticle probes and biomedical applications, *ChemPhysChem*, 10, 1344–1354, **2009**.
- [169] Bantz, K.C., Meyer, A.F., Wittenberg, N.J., Im, H., Kurtuluş, Ö., Lee, S.H., Lindquist, N.C., Oh, S.H., Haynes, C.L., Recent progress in sers biosensing, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13, 11551–11567, **2011**.
- [170] Lane, L.A., Qian, X., Nie, S., SERS nanoparticles in medicine: from label-free

detection to spectroscopic tagging, *Chemical Reviews*, 115, 10489–10529, **2015**.

- [171] Aroca, R.F., Ross, D.J., Domingo, C., Surface-enhanced infrared spectroscopy, *Applied Spectroscopy*, 58, 324A–338A, **2004**.
- [172] Higuera, L., López-Carballo, G., Hernández-Muñoz, P., Gavara, R., Rollini, M., Development of a novel antimicrobial film based on chitosan with lae (ethyl-*n*-dodecanoyl-l-arginate) and its application to fresh chicken, *International Journal of Food Microbiology*. 165, 339–345, **2013**.
- [173] Iseppi, R., Pilati, F., Marini, M., Toselli, M., de Niederhäusern, S., Guerrieri, E., Messi, P., Sabia, C., Manicardi, G., Anacarso, I., Bondi, M.. Anti-*listerial* activity of a polymeric film coated with hybrid coatings doped with enterocin 416k1 for use as bioactive food packaging, *International Journal of Food Microbiology*. 123, 281–287, **2008**.
- [174] D Mack, W Fischer, A Krokotsch, K Leopold, R Hartmann, H Egge, and R Laufs, The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis, *Journal of bacteriology*, 178, 1, 175-183, **1996**.
- [175] Turkevich, J., Stevenson, P.C., A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discussions of Faraday Society* 11, 55-75, **1951**.
- [176] Frens, G., Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions, *Nature Physical Science*, 241, 20-22, **1973**.
- [177] Haiss, W., Thanh, N.T.K., Aveyard, J., Fernig, D.G., Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV–Vis spectra, *Analytical Chemistry*, 79, 11, 4215-4221, **2007**.
- [178] Yılmaz, M., *Yüzey Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (sers)*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2014**.



## ÖZGEÇMİŞ

### Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Aliakbar EBRAHİMİ

Doğum Yeri : Tebriz-İRAN

Medeni Hali : Bekar

E-posta : Aliakbar@hacettepe.edu.tr ve Ebrahimi.aliakbar@gmail.com

Adresi : No: 49/2, S.H. Abdullahoğlu Caddesi, Nasuh Akar Mahallesi,  
Çankaya, Ankara.

### Eğitim

Lisans : 2001-2005 Payame Noor Üniversitesi, Kimya bölümü, Tebriz-İRAN

Yüksek Lisans: 2005-2007 Şerif Teknik Üniversitesi, Organik Kimya, Tahran-İRAN

Doktora : 2012-2017 Hacettepe Üniversitesi, Nanoteknoloji ve Nanotıp,  
Ankara-Türkiye

### Yabancı Dil ve Düzeyi:

İngilizce (İyi)

### İş Deneyimi:

TÜBİTAK 1003 No: 113O864 projesi (30 ay)

Avrupa birliği ABREM (Advanced biomaterials for regenerative medicine – ABREM, “FP7-PEOPLE-2009-IRSES (International Research Staff Exchange Scheme”, China-Europe, -Marie Curie Actions) Projesi- Çin cumhuriyeti Nankai Üniversitesi ortaklığıyla (9 ay)

### Deneyim Alanları:

Polimer sentezi, Eletroeğirme, Nanofiber, Sonokimyasal indirgeme, Nanobiyomalzemeler, Nanopartikül sentezi, Hidrojel sentezi, İlaç salımı.

### Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi:

-

### Tezden Üretilmiş Yayınlar:

-

**Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar:**

1. Ebrahimi, A., Kai, W., Kong, D., Piskin, E., “Production of electrospun cationic chitosan grafted poly( $\epsilon$ -caprolactone) /polycaprolactone (CS-g-PCL/PCL) hybrid nanofibers”, *4th Nanomedicine World Congress & 2. International NanoBioTechnology Symposium, Köyceğiz-Muğla, Turkey, September 8-12, 2015.*

2. Ekinci, Y., Kayra, N., Ebrahimi, A., Piskin, E., “Antibacterial properties of electrospun chitosan/polycaprolactone matrices”, *4th Nanomedicine World Congress & 2. International NanoBioTechnology Symposium, Köyceğiz-Muğla, Turkey, September 8-12, 2015.*



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih 12/09/2017

Tez Başlığı / Konusu: **PATOJENİK BAKTERİLERİN TANISI İÇİN NANOESASLI SENSOR PLATFORMLARI.**

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 97 sayfalık kısmına ilişkin, 12/09/2017 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 3'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/dâhil
- 3- 5 kelimededen daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

15.09.2017

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Aliakbar EBRAHİMİ

Öğrenci No: N11247775

Anabilim Dalı: Nanoteknoloji ve nanotip

Programı: Nanoteknoloji ve nanotip

Statüsü:  Y.Lisans  Doktora  Bütünleşik Dr.

**DANIŞMAN ONAYI**

UYGUNDUR.

(Prof. Dr. Erhan PİŞKİN )