

BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ❖ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**N-HALAMİN ESASLI KLOR DEPOLAYABİLEN KRİYOJELLERİN SENTEZİ
VE KARAKTERİZASYONU**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zeynep AKSOY

Lif ve Polimer Mühendisliği Anabilim Dalı

TEMMUZ 2019

BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ❖ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**N-HALAMİN ESASLI KLOR DEPOLAYABİLEN KRİYOJELLERİN SENTEZİ
VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Zeynep AKSOY
(162080906)**

Lif ve Polimer Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hasan Basri KOÇER

TEMMUZ 2019

BTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 162080906 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Zeynep AKSOY, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "N-HALAMİN ESASLI KLOR DEPOLAYABİLEN KRIYOJELLERİN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Hasan Basri KOÇER**
Bursa Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Dr. Öğr. Üyesi Meral AKKOYUN**
Bursa Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Halil İbrahim AKYILDIZ.....
Bursa Uludağ Üniversitesi

Savunma Tarihi : 22 Temmuz 2019

FBE Müdürü : **Doç. Dr. Murat ERTAŞ**
Bursa Teknik Üniversitesi/...../.....

İNTİHAL BEYANI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belgelediğimi, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Zeynep AKSOY

İmzası :

X X X X



Eşime ve Aileme,

ÖNSÖZ

Eđitim hayatım boyunca gösterdiğim azmin ve kararlılığın yegâne sebebi olan aileme ve lisansüstü bilimsel çalışmalarımda gerek bana yol gösteren gerekse deneysel faaliteyleri gerçekleştirmemde yardımını esirgemeyen başta danışmanım Prof. Dr. Hasan Basri KOÇER olmak üzere iyi niyetini her daim gösteren tüm Bursa Teknik Üniversitesi öğretim elemanı ve araştırmacılarına teşekkürü bir borç bilir, şükranlarımı sunarım.

Temmuz 2019

Zeynep AKSOY

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	viii
SEMBOLLER	ix
ÇİZELGE LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
SUMMARY	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1 Bakteriler	3
1.2 Antibakteriyel Ajanlar ve İnaktivasyon Mekanizmaları	4
1.2.1 Biguanidler	6
1.2.2 Metal ve metal oksit bileşikleri	7
1.2.3 Kitosan	7
1.2.4 Kuaterner amonyum bileşikleri	8
1.2.5 N-halamin bileşikleri	8
1.3 Makrogözenekli Polimerik Jeller	10
1.4 Kriyojelleşme	11
1.5 Kriyojellerin Özellikleri	15
1.5.1 Şişme davranışı ve mekanik özellikleri	15
1.5.2 Kriyojellerin geometrik ve morfolojik özellikleri	15
1.6 Kriyojellerin Kullanım Alanları	17
1.7 Antibakteriyel Kriyojel Uygulamaları	18
2. MALZEME VE METOD	21
2.1 Kullanılan Malzemeler	21
2.2 Kriyojel Sentezi	21
2.3 Kriyojellere Antibakteriyel Fonksiyon Kazandırılması	22
2.4 Kriyojellerin Karakterizasyonu	23
2.4.1 Su absorpsiyonu ölçümleri	23
2.4.2 Su desorpsiyonu hızının tespiti	23
2.4.3 Oksidadif klor miktarının tespiti	23
2.4.4 Tekrarlı klorklama	24
2.4.5 UV stabilite testi	24
2.4.6 Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi	24
2.4.7 Termal analizler	25
2.4.8 Taramalı elektron mikroskop analizi	25
2.4.9 Mekanik testler	25
3. BULGULAR ve TARTIŞMA	26
3.1 Sentez Parametreleri	26
3.2 Klorklama Parametreleri	27

3.3 Su Absorpsiyon-Desorpsiyon Davranışının Belirlenmesi.....	31
3.4 N-Halamin Yapının Kararlılığı	33
3.5 FT-IR Analizi	36
3.6 Mekanik Ölçümler.....	37
3.7 Yüzey Karakterizasyonu	38
4. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	41
KAYNAKLAR	43
ÖZGEÇMİŞ.....	54



KISALTMALAR

AMPS-Na	: 2-akrilamido 2-metilpropan sülfonik asit sodyum tuzu
AA	: Akrilamid
DMAPMA	: N-[3-(Dimetilamino)propil] metakrilamid
APS	: Amonyum per sülfat
MBAm	: N-N'-metilen bis akrilamid
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
PHMB	: Polihekzametilenbiguanid
DNA	: Deoksiribonükleik asit
RNA	: Ribonükleik asit
<i>E. coli</i>	: Escherichia coli
<i>S. aureus</i>	: Staphylococcus aureus
MRSA	: Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
UV	: Morötesi(Ultraviöle)
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskopu
EDS	: Enerji dağılımlı X-Işınları Dedektörü
FT-IR	: Fourier Geçirimli Infrared Spektrofotometresi
TGA	: Termal Gravimetrik Analiz
PEG	: Polietilen glikol
PVA	: Polivinil alkol
Ağ/hac	: Ağırlık/hacim

SEMBOLLER

pH	: Ortamın asit baz ölçüsü
µm	: Mikrometre
mm	: Milimetre
mL	: Mililitre
g	: Gram
°C	: Santigrad
rpm	: Dakikada devir sayısı
dk	: Dakika
sn	: Saniye
M	: Molarite
N	: Newton
%	: Yüzde
Cl⁺	: Oksidatif klor
kPa	: Kilopascal
cm⁻¹	: Dalga sayısı

ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1 : Üretim parametrelerinin etkisi.....	27
Çizelge 3.2 : Su absorpsiyonuna klor etkisi.....	31
Çizelge 3.3 : UV ışığının klor üzerindeki etkisi	35
Çizelge 3.4 : Kriyojellerin gözenek çapları	38



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 : Küresel (sol) ve çubuk (sağ) görünümlü bakteri hücresi	4
Şekil 1.2 : Gram-pozitif ve Gram-negatif hücre duvarı yapıları	4
Şekil 1.3 : İnaktivasyon Mekanizmaları	5
Şekil 1.4 : PHMB'in kimyasal yapısı	7
Şekil 1.5 : Kitosanın kimyasal yapısı	7
Şekil 1.6 : Kuaterner amonyum bileşiklerinin kimyasal yapısı	8
Şekil 1.7 : N-X Bağının stabilite-inaktivasyon hız ilişkisi	9
Şekil 1.8 : Alfa dehidrohalejenasyon	10
Şekil 1.9 : N-halamin bileşiğinin yenilenebilir özelliği	10
Şekil 1.10 : Kriyojelleşme tekniği adımları	12
Şekil 1.11 : Soğutma hızının gözenek yapısına etkisi	13
Şekil 1.12 : Gözenek duvarının durumu	14
Şekil 1.13 : Farklı formlarda kriyojel örnekleri	16
Şekil 1.14 : Küre yapıdaki kriyojellerin doldurularak kullanıldığı sütun	16
Şekil 2.1 : Kriyojel sentez düzeneği	22
Şekil 2.2 : Yıkama işlemi (A), Kurutma işlemi (B)	22
Şekil 2.3 : Klorlama sürecinin şematik gösterimi	23
Şekil 3.1 : Kuru (sol), şişmiş (sağ) küre formda kriyojeller	28
Şekil 3.2 : Klorlama-inaktivasyon reaksiyonu	28
Şekil 3.3 : Kriyojellerin klor depolama kapasitesi	29
Şekil 3.4 : Klor salınım hızı	31
Şekil 3.5 : Klorlanmamış(sol) ve klorlanmış(sağ) kriyojellerin şişme hızı	32
Şekil 3.6 : Su absorpsiyon davranışı	32
Şekil 3.7 : Su desorpsiyon davranışı	33
Şekil 3.8 : Tekrarlı klorlama kabiliyeti	34
Şekil 3.9 : Kriyojellere ait TGA grafiği	35
Şekil 3.10 : Kriyojellere ait FT-IR spektrumu	36
Şekil 3.11 : Kriyojellerin bası direnci	37
Şekil 3.12 : Bası testi öncesi (A), %70 Deformasyon (B), Bası testi sonrası (C) klorlanmamış kriyojelden emilen suyun çıkışı ve geri emilimi	38
Şekil 3.13 : Farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri	39
Şekil 3.14 : Klorlanmamış kriyojelin EDS spektrumu	40
Şekil 3.15 : Klorlanmış kriyojelin EDS spektrumu	40

N-HALAMİN ESASLI KLOR DEPOLAYABİLEN KRİYOJELLERİN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Kriyojeller, matris boyunca heterojen şekilde dağıtılmış bir polimerik zincir ağı oluşturmak için, düşük sıcaklıklarda monomerik veya polimerik prekürsörlerin çapraz bağlanması, polimerizasyonu veya fiziksel dolanması veya jelleşmesi ile oluşur. Donmuş çözücü, çözüldükten sonra, gazların, sıvı ve mikron altı parçacıkların çok fazla zorlanmadan serbestçe hareket etmesine izin veren yüksek gözenekli ara bağlantıya sahip, yüksek derecede makro gözenekli bir yapı ortaya çıkar. Kriyojellerin en dikkat çekici özelliği sahip oldukları birbiri ile bağlantılı makro gözenekleri sayesinde absorpladıkları suyu bir kuvvet altında çok hızlı desorpsiyon etmeleridir. Bu sebepten biyoteknolojik ve biyomedikal alanlarda kullanımları oldukça yaygındır. Kullanım alanları gereği antibakteriyel özellik göstermeleri ise kriyojelleri daha efektif malzemeler haline getirebilmektedir. Bu amaca yönelik olarak bu çalışmada en etkili antibakteriyel biyositlerden olan N-halamin bileşikleri tercih edilmiştir. Yapılarında buldukları azot-klor veya azot-brom bağları ile N-halamin bileşikleri halojen stabilizatörleri olarak da ifade edilmektedir. Bu bağ mikroorganizmalar ile temas sonucunda kırılır ve oksidatif klor veya brom atomu mikroorganizmanın hücre zarına transfer olur. Hücre zarındaki proteinlerin okside edilmesiyle çok kısa süre içinde mikroorganizma inaktivasyonu gerçekleşir. N-halaminler, yüksek stabilite, düşük toksisite ve yeniden şarj edilebilir gibi üstün özelliklere sahiptirler. Çalışma kapsamında, antibakteriyel potansiyele sahip klor depolayabilen kriyojeller N,N'-metilen bis akrilamid çapraz bağlayıcısı varlığında N-halamine prekürsörleri olan 2-akrilamido-2-metil-1-propan sülfonik asit sodyum tuzu, akrilamid ve N-[3-(Dimetilamino)propil] metakrilamid monomerlerinin kopolimerizasyonu ile elde edilmiştir. Sentezlenen kriyojeller seyreltik sodyum hipoklorit çözeltisi ile muamele edilerek klor yüklenmiştir. Aynı zamanda klorlama işlemi için klorlama süresi ve pH parametreleri optimize edilmiştir. Kriyojellerin su absorplama miktarına, absorpsiyon ve desorpsiyon hızına klor yüklemesinin etkisi incelenmiştir. Elde edilen kriyojel örneklerindeki fonksiyonel gruplar FT-IR ile tanımlanmıştır. N-Halamin yapının kararlılığı ısı ve UV ışığına oldukça duyarlı olduğundan kriyojellerin TGA analizi ile termal davranışı ve UV ışığına maruz bırakılarak klor tutma kabiliyetinin değişimi gözlemlenmiştir. Mekanik test cihazı ile şişmiş haldeki kriyojellerin mekanik özellikleri tespit edilmiştir. SEM görüntüleme tekniği ile kriyojellerdeki gözenek yapısında meydana gelen değişim ve EDS analizi ile yapıya klor atomunun bağlanma durumu ortaya konulmuştur. Sonuç olarak, oldukça hızlı ve yüksek oranda su absorplayabilen ve klor depolayabilen kriyojeller üretilmiştir. Geliştirilen küre formdaki kriyojeller özellikle biyomedikal ve biyoteknolojik endüstrisinin çeşitli alanlarında kullanılmak için büyük bir potansiyele sahiptir.

Anahtar kelimeler: N-halamin, kriyojel, antibakteriyel, süspansiyon polimerizasyonu

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF N-HALAMINE BASED CHLORINE STORAGE CRYOGELS

SUMMARY

Cryogels are formed by crosslinking, polymerizing or physical entanglement or gelling of monomeric or polymeric precursors at low temperatures to form a polymeric chain network heterogeneously distributed throughout the matrix. After dissolving of the frozen solvent, a highly macroporous structure is formed with a high porous interconnection that allows gases, liquid and submicron particles to move freely without too much strain. The most attractive feature of cryogels is that they release the absorbed water very quickly under a force by means of their interconnected macro pores. Therefore, they are widely used in biotechnological and biomedical fields. Because of their antibacterial properties due to their usage areas, cryogels can become more effective materials. For this purpose, N-halamine compounds which are among the most effective bacterial biocides were preferred in this study. Nitrogen-chlorine or nitrogen-bromine bonds and N-halamine compounds in their structures are also referred to as halogen stabilizers. This bond is broken by contact with microorganisms and the oxidative chlorine or bromine atom is transferred to the cell membrane of the microorganism. The oxidation of the proteins in the cell membrane causes inactivation of the microorganisms in a very short time. N-halamines have superior properties such as high stability, low toxicity and rechargeability. In the scope of the study, cryogels with antibacterial potential which can store chlorine were obtained by copolymerization of N-halamine precursors, which are 2-acrylamido-2-methyl-1-propane sulfonic acid sodium salt, acrylamide and N-[3-(Dimethylamino) propyl] methacrylamide monomers, in the presence of N, N'-methylene bis acrylamide as cross-linker. The synthesized cryogels were treated with dilute sodium hypochlorite solution and charged with chlorine. At the same time, chlorination time and pH parameters were optimized for chlorination process. The effect of chlorine loading on water absorption rate, absorption and desorption rate of cryogels were investigated. Functional groups in the obtained cryogel samples were identified by FT-IR. Since the stability of the N-Halamine structure is very sensitive to heat and UV light, the thermal behavior of the biogels by TGA analysis and the changing in chlorine retention ability by exposure to UV light were observed. The mechanical properties of chlorinated and non-chlorinated cryogels in the swollen state were determined by mechanical test device. The change in pore structure in cryogels by SEM imaging technique and the binding state of chlorine atom to the structure were determined by EDS analysis. As a result, cryogels were produced which were able to absorb water rapidly and store chlorine at a fast rate. The developed spherical cryogels have great potential for use in various fields of the biomedical and biotechnological industries.

Keywords: N-halamine, cryogel, antibacterial, suspension polymerization

1. GİRİŞ

Patojenik mikroorganizmaların neden olduğu bulaşıcı hastalıklar her yıl çok sayıda ölümlerle sonuçlanmakta ve bu nedenle insan sağlığına büyük ölçüde tehdit oluşturmaktadır. İnsanların refah ve huzurunu bozan bu hastalıkların virüs, bakteri veya mantarlar gibi patojenlerden kaynaklandığı bilinmektedir. Bu tehdide karşı koymak için gümüş iyonları, amonyum bileşikleri, aktif klor yüzeyleri veya triklosan gibi biyositler yaygınca kullanılmaktadır ve bahsi geçen tüm bu biyositler zararlı mikroorganizmaların bertarafı konusunda başarılıdır. Fakat kapsamı oldukça geniş olan antibiyotiklerin kullanımının bile artık etkisiz kaldığı durumlara rastlanmaktadır. Gittikçe artan antibiyotik direnci her yıl dünya çapında tahminen 700.000 insanın hayatını kaybetmesine sebep olmaktadır. Bu direnci azaltmak veya yeni biyositler geliştirmek için çaba gösterilmediği takdirde 2050 yılına kadar bu sayının 10 milyona ulaşabileceği öngörülmektedir [1].

Patojenik mikroorganizmalar tıbbi cihazlar, ilaçlar, hastane yüzeyleri, diş restorasyon ve cerrahi ekipmanları, sağlık bakım ürünleri ve hijyenik uygulamalar, su/hava arıtma sistemleri, tekstil ürünleri, gıda paketlenme ve depolama vb. alanlarda kullanılan ürünlerin yüzeylerinde kolaylıkla büyümekte dolayısıyla kirlenme ve çürüme sonucunda istenmeyen sonuçlara neden olmaktadır [2]. Günümüze kadar mikroorganizma kaynaklı kontaminasyon oluşumlarının azaltılması geleneksel yöntemlerle sağlanmıştır. Bu yöntemlerde genellikle ısı, iyonize edici radyasyon ya da dezenfekte edici kimyasal maddeler kullanılmış ve sterilizasyon işlemi yapılarak mikroorganizmaları öldürmek amaçlanmıştır. Ancak bu yöntemler mikroorganizmalara karşı kısa süreli etkinlik gösterdiğinden bahse konu yüzey tekrar patojene maruz kaldığında kontaminasyon tekrarlanmaktadır. Üstelik dezenfektan kullanımı hem çevresel açıdan olumsuz etkilere sebep olmakta hem de mikroorganizmaların direnç kazanmasını kolaylaştırmaktadır. Tüm bu sınırlamalar dikkate alındığında, mikroorganizmalara doğrudan temas ederek hızlıca ortadan kaldıran ve bu işlemi tekrarlı olarak yapabilen materyallerin geliştirilmesi zorunluluk haline gelmiştir. Kullanılan biyositlerden uzun süre etkinliğini yitirmeyen, pek çok

mikroorganizma çeşidine karşı etki gösterebilen, tüketiciye, üreticiye ve çevreye karşı zararsız olma gibi özellikler göstermesi beklenmektedir [3, 4].

Son yıllarda çevresel değişkenlere karşı duyarlı ve suda şişme gibi üstün özellikleri sayesinde, arıtma ve saflaştırma sistemleri, biyoteknolojik ve biyomedikal gibi birçok farklı alanda kullanımları sıkça tercih edilen hidrojellerin antibakteriyel özellik göstermeleri de hidrojellere fonksiyonellik bakımından önemli ölçüde avantaj sağlayacaktır [5].

Hidrojellerin su absorplama yetenekleri polimer iskeletine bağlı hidrofilik fonksiyonel gruplar ile sağlanırken, çözünmeye karşı dirençleri polimer zincirlerini birbirine bağlayan, fiziksel ya da kimyasal çapraz bağlardan kaynaklanmaktadır ve dolayısıyla yüksek miktarda su absorplayabilmektedirler. Bununla birlikte, hidrojellerin şişmiş halde kuvvete karşı verdikleri cevap hızları yavaştır ve mekanik dayanımları oldukça düşüktür. Bu olumsuz özellikleri hidrojellerin kullanımlarını nispeten sınırlandırmaktadır. Literatürdeki çalışmalara bakıldığında içiçe geçmiş ağ yapılı hidrojellerin sentezi veya hidrojelin inorganik yüzeylere aşılması gibi çözümlerin sunulduğu görülmektedir [6–8]. Bu yöntemlerden farklı olarak kriyojenik şartlarda jel sentezi ile mekanik dayanımını yüksek ve daha hızlı cevap verebilen hidrojeller elde edilebildiği görülmüştür [9]. Kriyojenik şartlarda elde edilen bu hidrojeller kriyojel olarak adlandırılmaktadır. Kriyojelasyon tekniğinde düşük sıcaklıklarda çözücü kristallerinin donması ve polimerleşmenin donmamış bölgelerde gerçekleşmesi sonucunda birbirine bağlı gözenekleri olan yapılar oluşmaktadır. Bu bağlamda polimer konsantrasyonu gözenek duvarlarında fazla olmakta ve kriyojelin mekanik dayanımını da artırmaktadır. Bu tezin amacı daha çok saflaştırma ve ayrıştırma amaçlı alanlarda kullanılmak üzere, pandemik ve epidemikleri minimize eden küre formda antibakteriyel potansiyele sahip halojen (klor) depolayabilen kriyojeller elde etmektir. Serbest radikal katılma polimerizasyonu yöntemi ile non-iyonik yapıdaki akrilamid monomeri ile mekanik dayanımı yüksek, iyonik ve tuz formundaki 2-akrilamido 2-metilpropan sülfonik asit sodyum (AMPS-Na) monomeri ile de yüksek ve hızlı su absorpsiyonu gösteren kriyojellerin sentezlenmesi hedeflenmiştir. Küre formda kriyojel elde edebilmek için de süspansiyon polimerizasyon tekniğinden yararlanılmıştır. Literatürde N-halamin bileşiklerinin etkin antibakteriyel özellik gösterdiklerini kanıtlayan birçok çalışma bulunmaktadır [10–12]. Bu tez, N-halamin

bileşikleri kullanılarak küre formdaki kriyojellere antibakteriyel fonksiyon kazandırılması yönüyle özgündür ve literatüre katkıda bulunacaktır.

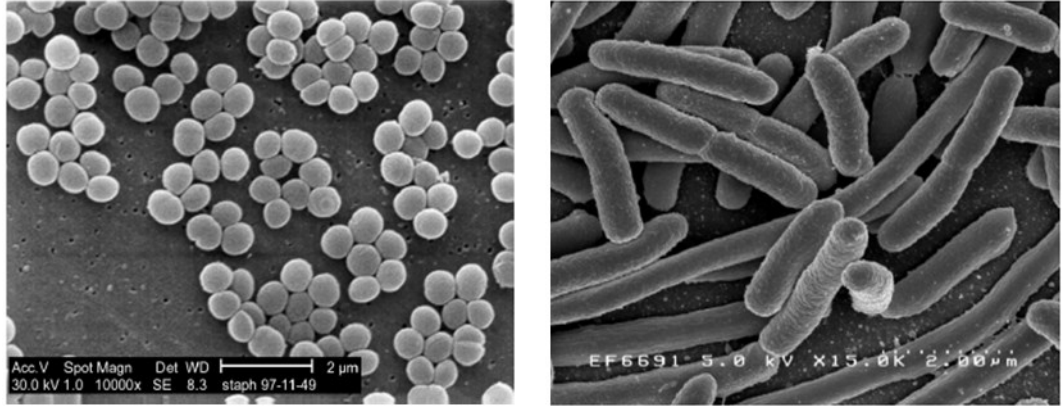
1.1 Bakteriler

Bakteriler mikroskopla görülebilen, çeşitli çevre koşullarında çoğalıp gelişebilen, tek hücreli organizmalardır. Doğadaki varlıkları ilk kez 17. yüzyıl başlarında Antony van Leeuwenhoek'un mikroskobu keşfetmesiyle saptanmıştır. Fakat buna rağmen bilim adamları tarafından incelenerek nitelendirilmesi uzunca bir zaman almıştır. 19. yüzyıl ortalarına doğru Alman botanikçisi Ferdinand Julius Cohn'un mikroskop kullanarak elde ettiği bilgiler neticesinde ise latince küçük çubuk anlamına gelen "bacterium" sözcüğü ile literatürde yer almıştır.

Mikroorganizmalar sınıfında yer alan bu canlılar toprakta, havada, okyanuslarda hatta insan bağırsaklarında dahi var olabilmektedir. Bakteriler insanlarla tümleşik bir ilişkiye sahiptir. Bazen yoğurt vb. yediğimiz besinleri elde etmede yahut bu besinlerin vücutta sindirilmesinde yardımcı olurken bazen de zatüre, MRSA gibi hastalıklara yol açarak yıkıcı etkilere sebep olabilmektedir.

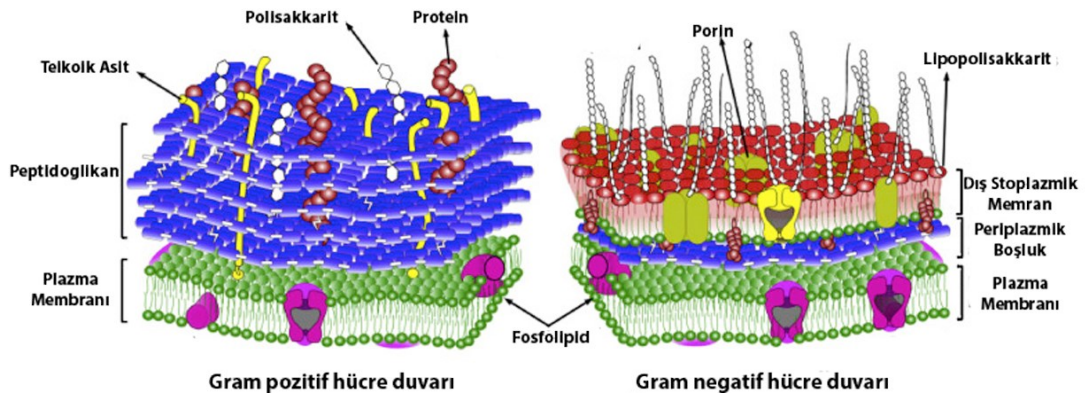
Hücre yapılarına göre bir çekirdek ve hücre zarına ait organelleri bulunan canlılara ökaryot canlılar denirken, herhangi bir çekirdek ve organelle sahip olmayan canlılara prokaryot canlılar denir. Prokaryot canlılar sınıfında yer alan bakteriler plasmid adı verilen deoksiribonükleik asit (DNA) benzeri yapıya sahiptirler. Bakterilerin büyüklüğü türüne, üreme evresine, beslenme durumuna ve çevre koşullarına bağlı olarak değişmektedir. Bakterilerin genişliği 0,2 ile 2 mikrometre arasında, boyları 2 ile 10 mikrometre arasında olabilmektedir. Genellikle bakteriler şekil bakımından çubuk, küresel, spiral olmak üzere, genetik oluşumlarındaki farklılıklara veya hücre duvarı yapısına göre sınıflandırılmaktadır.

İlk kez 1884 yılında Hans Christian Gram tarafından geliştirilen bir boyama tekniği aracılığıyla hücre duvarındaki yapısal kompozisyona göre Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteri tanımlaması yapılmıştır. Bu teknik kapsamında hücre duvarında polipeptigon adı verilen aminoasit ve şeker içeren Gram-pozitif bakteriler mor renk, iki katmanlı hücre duvarına sahip olup yağ asidi içermeyen Gram-negatif bakteriler ise kırmızı (pembe) renk ile boyanmıştır. Bu boyama tekniği bakterileri birbirinden ayırmak için uzun yıllardır kullanılan temel bir teknik halini almıştır.



Şekil 1.1 : Küresel (sol) ve çubuk (sağ) görünümlü bakteri hücresi [13].

Günümüzde sıkça adını duyduğumuz gıda zehirlenmesi, şarbon, mide ve bağırsak iltihabı gibi hastalıklara sebep olan *Staphylococcus* ve *Bacillus* Gram-pozitif; *Salmonella* ve *Escherichia coli* ise Gram-negatif bakteriler grubunda yer almaktadır.



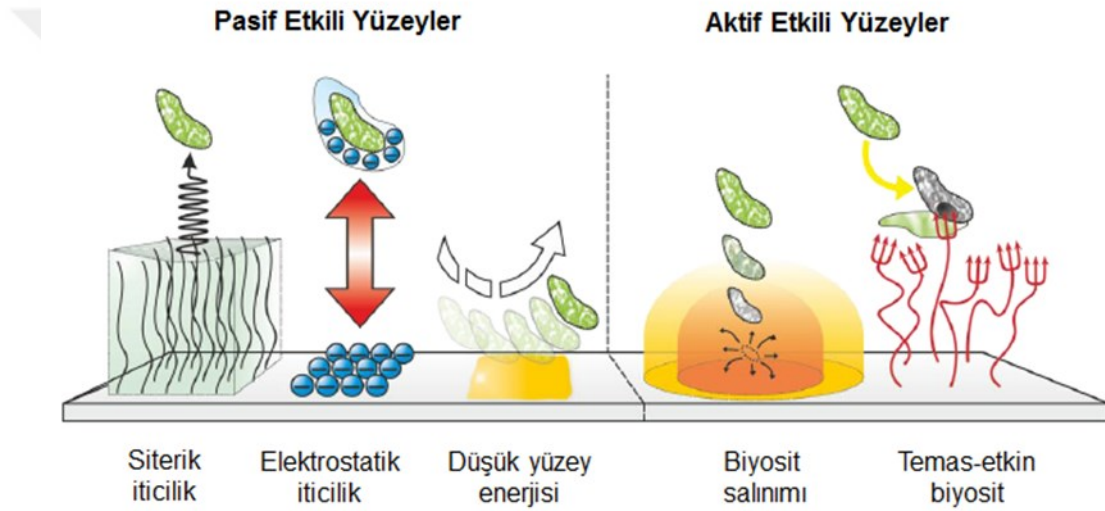
Şekil 1.2 : Gram-pozitif ve Gram-negatif hücre duvarı yapıları [14].

1.2 Antibakteriyel Ajanlar ve İnaktivasyon Mekanizmaları

Bakterilerin bertaraf edilmesi konusunda ilk yaklaşım bakterilerin yüzeye tutunmasını önleyecek süperhidrofobik malzemelerin (temas açısı $> 150^\circ$) geliştirilmesi olmuştur [2, 15, 16]. İkinci yaklaşım ise aktif yüzeyler ile ilgilidir. Antibakteriyel ajanın malzeme yüzeyine bağlanmasıyla, çevreye herhangi bir biyosit salınımı olmadan bakteri hücresini ortadan kaldırması prensibine dayanmaktadır [17–21]. Antibakteriyel ajan serbest bırakılmadığından, aktif yüzeyler çevreye zarar vermemekte ve tekrarlı kullanımdan sonra bile etkilerini korumaktadır. Bu nedenle, bu yaklaşım mikroorganizmaların büyümesini önlemek için ihtiyaç duyulan aktif madde miktarını minimuma indirmektedir [22, 23]. Çevreci olması ve uygulama kolaylığının sağladığı avantajlardan dolayı bu konuda çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir [24–28]. Antibakteriyel ajanın malzeme yüzeyine kovalent bağ

[29–31], hidrojen bağı [32, 33], hidrofobik etkileşimler, ve elektrostatik etkileşim [34] gibi modeller ile bağlandığı daha önce farklı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. Kovalent bağlanma, stabil ve güvenilir yüzey aktif antimikrobiyal materyallerin oluşumu için en etkili yaklaşımlardan birini temsil eder [35, 36]. Güçlü kovalent bağ, biyomedikal, su arıtma ve gıda uygulamaları için son derece önemli olan biyoaktif bileşiğin çevreye salınmasını engellemektedir [37, 38].

Antibakteriyel ajanlar için pasif ve aktif davranış olmak üzere iki tip inaktivasyon mekanizması vardır. Bunlardan birincisi, bakteri hücresinin gelişmesini veya üremesini durduran pasif davranış, ikincisi ise bakteri hücresinin direkt öldürerek ortadan kaldıran aktif davranış inaktivasyon mekanizmasıdır.



Şekil 1.3 : İnaktivasyon Mekanizmaları [39].

Pasif davranış mekanizmasında biyosit hücre duvarındaki protein adsorpsiyonunu azaltarak bakterinin yüzeye tutunmasını önlemektedir. Esasen bakteriler hidrofobik ve negatif yüklü yüzey özelliği gösterdiğinden, biyosidin hidrofilik negatif yükü ya da düşük yüzey enerjisi bakterinin yüzeye yapışmasını engellemektedir. Ancak pasif yüzey, bakteri ile kimyasal bir etkileşime girmemekte ve bakteriyi doğrudan öldürmemektedir.

Aktif davranışta, biyosidin bakteri hücre duvarına bağlanması söz konusudur. Hücre duvarına penetre olan biyosit, dış hücre zarı ile yer değiştirerek son hedef bölge ile teması sonucunda antibakteriyel eylem gerçekleşmektedir. Biosidin bakterilere nüfuz etmesi sıcaklık, pH ve organik maddelerin varlığı gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Genel olarak bakterilerdeki hedef bölgeler hücre duvarı, sitoplazmik

membran ve sitoplazma yapıları olmaktadır. Aktif davranış gösteren biyositler bakterilerle iki farklı türde etkileşim göstermektedir [40, 41].

Bunlardan ilki fiziksel etkileşimdir. Fiziksel etkileşimde hedef bölge olan hücre zarını tahrip eden biyosit enzim, nükleotit ve nükleosit gibi bileşenlerin sızmasına yol açmaktadır. Nihayetinde sitoplazmik bileşenlerinin yokluğu bakterinin ölümüne sebep olmaktadır. Kuaterner amonyum tuzları, fenol bileşikleri ve biguanidler fiziksel iyonik etkileşimler sonucu hücreyi parçalayan inaktivasyon mekanizmasına sahip biyositlerdir [42–44].

Diğer etkileşim ise kimyasal etkileşimdir. Bu etkileşimde protein, DNA, RNA gibi sitoplazmik bileşenlerle etkileşime geçen biyosit bakterinin biosentezini ve çoğalmasını engellemektedir [45].

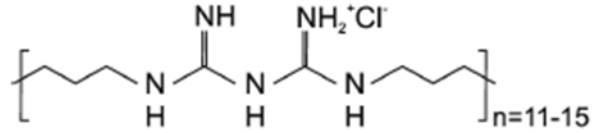
Örneğin bir biyosit olan kloramin, sistein, sistin, metionin ve triptofan olmak üzere dört farklı protein ile reaksiyona girerek DNA aktivitesini olumsuz yönde etkiler [46–48].

Antibakteriyel ajan kullanımı, uygulama alanına ve etkinliğine göre belirlenmektedir. En sık kullanılan antibakteriyel ajanlara metal ve metal oksit iyonları, kitosan, kuaterner amonyum bileşikleri, biguanidler, N-halaminler ve antimikrobiyal peptitler örnek olarak verilebilir. Son yıllarda biyoyumluluk ve çevre dostu olmaları sebebiyle doğal biyoaktif bileşiklerin kullanımı da yaygınlaşmaktadır.

1.2.1 Biguanidler

Polihekzametilenbiguanid (PHMB) en çok kullanılan biguanid biyositlerinden biridir. Yüzme havuzlarında dezenfektan, hastanelerde yara enfeksiyonlarını engellemek için antiseptik madde, kozmetik ve kişisel bakım ürünlerinde koruyucu olarak kullanılmaktadır [49]. Özellikle de tekstil endüstrisinde selülozik materyallerde antibakteriyel yüzeylerin elde edilmesinde tercih edilmektedir. PHMB katyonik bir yapıda olduğundan dolayı hidrojen bağlarının yanında selüloz ile iyonik bağ oluşturur.

Antibakteriyel etkinlik PHMB'deki pozitif yükün bakteri hücre zarında bulunan fosfolipid ile etkileşime girmesi sonucunda hücre duvarına zarar vererek gerçekleşmektedir.



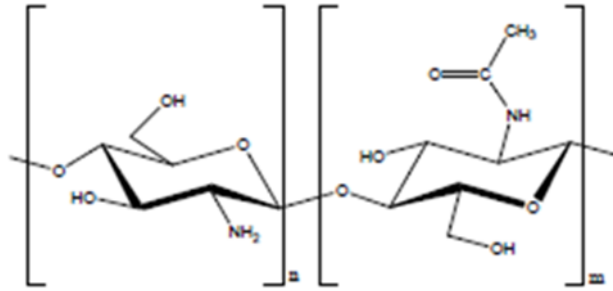
Şekil 1.4 : PHMB'in kimyasal yapısı [50].

1.2.2 Metal ve metal oksit bileşikleri

Gümüş başta olmak üzere çinko, bakır, kobalt gibi metaller ve bileşiklerinin mikroorganizmaların çoğalmasına engel olmada efektif oldukları görülmektedir [50, 51]. Bu bileşiklerdeki antibakteriyel mekanizma, metal iyonlarının hücre duvarını aşarak bakteri hücrelerindeki enzimlerde bulunan tiyol grupları ile bağ yapması ile oluşmaktadır. Bu bağ sonucunda bakterinin besin kaynağı ile irtibatı kesilmektedir. Enzimatik aktivitenin azalması, hedef hücrenin zayıflamasına ve metabolizmasında değişime neden olmaktadır. Ayrıca, metal iyonları bakterilerin moleküler yapısını oksitleyen oksijen radikallerinin üretimini de katalize eder. Böylece hücrenin büyümesi engellenerek bakterinin inaktivasyonu sağlanmış olmaktadır [52].

1.2.3 Kitosan

Bir biyopolimer olan kitinden elde edilen kitosan, doğal polisakkarit olup etkin derecede antimikrobiyel özellik göstermektedir. Kitosan, 2-acetamino-2-deoxy-β-Dglucosic monomerinin birbirine β-1,4-glikozidik bağlarla bağlanmış lineer bir polisakkarit halindedir.



Şekil 1.5 : Kitosanın kimyasal yapısı.

Kitosanın bakteri, mantar ve virüs öldürme yetisi asidik ortamda meydana gelen amonyum tuzlarındaki amino gruplarıyla ilişkilidir [53]. Kitosanın antibakteriyel etkisi için aktif amino gruplarının miktarının önemini vurgulayan iki mekanizma vardır. Birinci mekanizma kitosanın polikatyonik doğası gereği hücre yüzeyine istiflenerek bakteriyel metabolizmaya müdahale etmesi ile olur. Diğer mekanizma ise kitosanın RNA sentezini engellemek için DNA'ya bağlanması sonucunda gerçekleşir.

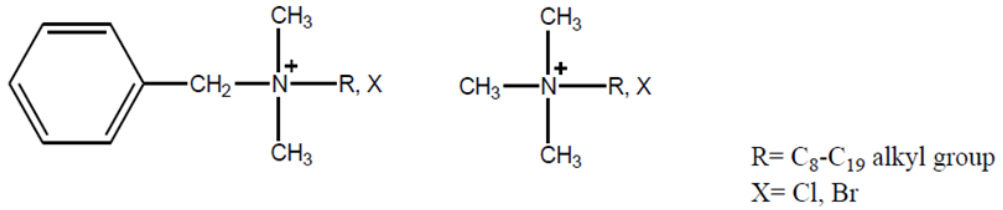
Deasetilasyon derecesi, moleküler ağırlığı, protonlanmış ve protanlanmamış amino gruplarının oranı kitosanın antibakteriyel kapasitesini etkileyen önemli yapısal parametrelerdir [54].

1.2.4 Kuaterner amonyum bileşikleri

Kuaterner amonyum bileşikleri birçok ilaca dirençli türler de dahil olmak üzere çeşitli bakterilere karşı oldukça güçlü antibakteriyel potansiyele sahiptirler [55–58].

Kuaterner amonyum bileşiklerinin antibakteriyel etkisi, kuaterleşme reaksiyonu sonucunda oluşan kalıcı pozitif yüklü kuaterner nitrojeni ile mikroorganizma zarındaki asidik fosfolipidlerin negatif yüklü kafa grupları arasındaki güçlü afinite ve zarar verici etkileşimlerle ilgilidir [3, 59].

Buna ek olarak, polarite ve sterik özelliklerinin yanısıra sahip oldukları 12-18 karbon uzun alkil zincirinin kuaterner amonyum bileşiklerinin antimikrobiyal fonksiyonunu arttırdığı tespit edilmiştir [55].



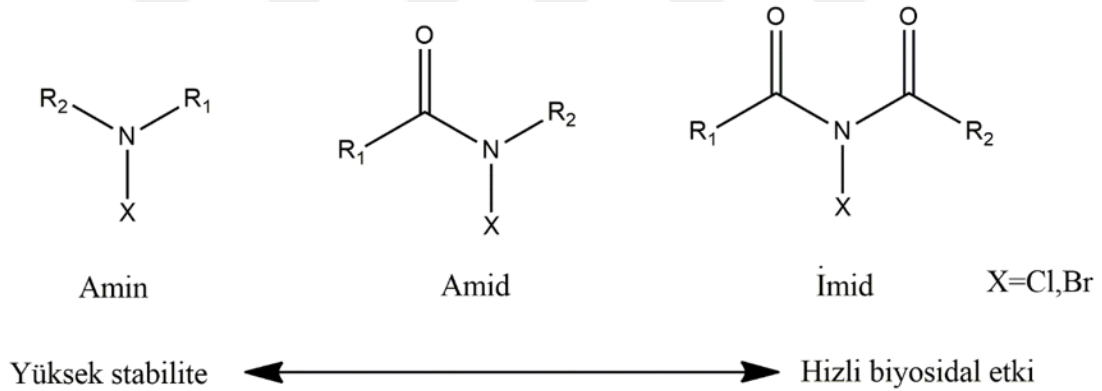
Şekil 1.6 : Kuaterner amonyum bileşiklerinin kimyasal yapısı.

Kuaterner amonyum bileşiklerinin materyal yüzeyine kimyasal olarak bağlanması ile yüzey aktif antibakteriyel malzemeler elde edilmiştir. Böylece antibakteriyel malzemelerin toksitesi ve çevresel zararı en aza indirilmiştir. Bu bileşikler sayesinde bakteri direnci ile mücadele için etkili bir yol izlenmiş olmaktadır. Ayrıca yüksek değişkenlikleri, düşük maliyeti ve hızlı antibakteriyel aktiviteleri nedeniyle oldukça fazla ilgi görmektedirler [57, 60–62].

1.2.5 N-halamin bileşikleri

Amin, amid ve imid gruplarının halojenleşmesi sonucu azota bağlı bir veya daha fazla kovalent bağlanabilen halojen içeren (N – X) organik bileşiklerdir [28]. Genellikle halojen stabilizatörleri iyot, brom ve sık kullanılan klor elementidir. Azot halojen bağı geçici bir bağlanmadır ve bu bağ mikroorganizmalar ile temas sonucunda kırılır ve

açığa çıkan oksidatif halojen hücre zarına transfer olur. Böylece hücre zarındaki proteinlerin okside olmasıyla çok kısa süre içerisinde mikroorganizmanın inaktivasyonu sağlanmaktadır [63]. N-halamin bileşikler bilinen herhangi bir toksik etki göstermeyen ve diğer antimikrobiyal bileşiklere göre oldukça yüksek stabiliteye sahip bileşiklerdir [64–66]. N-halamin bileşiğinin, lipofilik bir yapıya sahip olan bakteri dış membranına benzerliği ve N-X bağının stabilitesi antibakteriyel etkinliği belirleyici en temel etkenlerdir [67–69]. Amin, amid ve imid olmak üzere 3 tip N-X içeren N-halamin bileşiği vardır. Kimyasal konfigürasyon sebebiyle sterik engel ve polariteden etkilenen N-X bağının ayrışma sabiti değişmektedir. N-X bağının stabilitesi ise antibakteriyel etkinliği belirlemektedir [70–74]. N-X grubunun yanındaki elektron çeken gruplar (yani karbonil), N-X kovalent bağını zayıflatır. Öte yandan, N-X grubuna bitişik karbon atomu üzerine ikame edilmiş elektron veren gruplar (yani alkil), N-X kovalent bağını güçlendirir [75]. Bu bağlamda, amin esaslı N-halamin bileşiklerin yüksek stabilite ve daha yavaş antibakteriyel etkinlik gösterdikleri, imid esaslı N-halamin bileşiklerin ise düşük stabilite ve çok daha hızlı biyosidal aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir [75, 76].

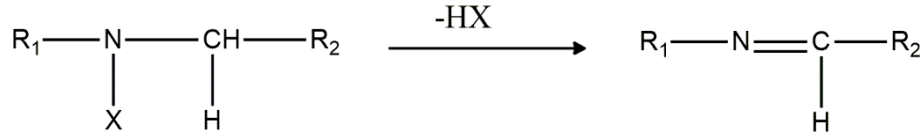


Şekil 1.7 : N-X Bağının stabilite-inaktivasyon hız ilişkisi.

Neticede malzemenin kullanılacağı uygulama alanı göz önünde bulundurularak hızlı antibakteriyel aktivite ya da yüksek stabiliteye sahip olacak N-halamin bileşiklerinin kullanımı tercih edilmektedir. Genelde hem iyi stabilite hem de güçlü antibakteriyel etki gösteren amid grubu içeren N-halamin bileşikler tercih edilmektedir [77].

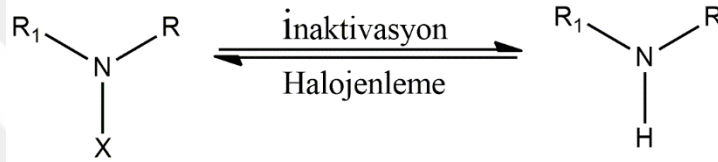
N-halamin bileşikler hidantoin, oxazolidinonlar ve imidazolidinonlar gibi halkalı yapıda ya da akrilamid, metakrilamid içeren alifatik yapıda olabilmektedir. Çoğunlukla çok daha stabil olmaları nedeniyle halkalı yapıya sahip N-halamin bileşikler tercih edilir. Çünkü halkalı yapılarda ısı veya ultraviole (UV) ışığına maruz

kalındığında dehidrohalojenasyona sebep olan alfa-hidrojeni bulunmamaktadır. Birkez dehidrohalojenasyon olursa N-halamin bileşiği tekrar halojenleşme özelliğini kaybetmektedir [78].



Şekil 1.8 : Alfa dehidrohalojenasyon.

N-halamin bileşiklerinin benzersiz özelliklerinden biri deaktivasyon reaksiyonun tersinir olmasıdır. Bu özellik bakteri ile temas sonrası yüzeyde azalan oksidatif klor miktarının, yüzeyin tekrar seyreltik sodyum hipoklorit muamele edilmesiyle klor miktarının ilk değerlere gelebilmesine olanak sağlamaktadır [79].



Şekil 1.9 : N-halamin bileşiğinin yenilenebilir özelliği.

1.3 Makrogözenekli Polimerik Jeller

Akışkan bir fazın içinde kovalent veya fiziksel çapraz bağlanma ile ağ yapıya sahip polimer bir fazdan meydana gelen ve en az iki bileşenden oluşan yarı-katı sistemlere polimerik jel denilmektedir [80]. Polimerik jeller yüksek molekül ağırlığına sahip olmakla beraber akışkan yapı içinde çözünme ve ergime göstermeme, üç boyutlu ağ yapı sayesinde ağırlıklarının yaklaşık 100 katı kadar akışkan absorplayabilme gibi özelliklere sahiplerdir [81]. Bu malzemelerde absorpsiyon eylemi tersinir olup ağ yapıdaki sıvı uzaklaştırıldığında orjinal haline dönebilmektedir [82]. Polimerik jeller absorpladıkları akışkana (polar ya da apolar), polimer cinsine (doğal ya da sentetik esaslı), çapraz bağlanma türüne (fiziksel ya da kimyasal) göre sınıflandırılmaktadır [83]. Hidrojel, organojel [84], aerojel [85], kriyojel [86] bunlardan başlıcalarıdır. Yapısında bulunan hidrofilik gruplar sayesinde su varlığında şişme gösteren polimerik jeller hidrojel olarak adlandırılmaktadır. Yüksek miktarda su içeriğine sahip olmaları nedeniyle biyoyumlu malzemelerdir [87]. Bu sebepten biyomedikal uygulamalarda kullanımı tercih edilmektedir. Kullanım alanı gereği polimerik jellerin dış uyarılara hızlı cevap vermeleri ve mekanik olarak dayanıklı malzemeler olması gerekmektedir [88, 89]. Son yıllarda yapılan makrogözenekli yapılara sahip jeller sayesinde jellerin

dış etkenlere hızlı cevap verme yetileri ve mekanik dayanımları oldukça iyileştirilmiştir [90].

Makrogözenekli jeller Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği'nin yapmış olduğu tanıma göre gözenek boyutu 50 nm ila 1 µm aralığında değişen porlu yapılarla sahip jellerdir [91]. Kriyojelleşme tekniği yani dondurulmuş koşullarda buzun porojen olarak kullanılması ile üretilen kriyojeller bu sınıfta yer almaktadır. Kriyojellerin gözenek boyutu 1 µm ilâ 100 µm arasında değişebilmektedir. Hatta 100 µm'den fazla da olabilmektedir. Bu durumda süper makro gözenekli jel olarak nitelendirilmektedir. Bu tip jeller çok çeşitli monomerler, polimerler, çapraz bağlayıcılar ve sentez koşulları ile sentezlenebilmektedir. Büyük gözenek boyutları kriyojellerin biyoteknolojik ve biyomedikal alanlarda ayrıştırıcı, taşıyıcı ve biyoreaktör gibi çok farklı amaçlarla kullanılan bir malzeme olmasına olanak sağlamaktadır [92].

Makrogözenekli jeller dondurarak kurutma [93], gözeneklendirme [94], mikroemülsiyon oluşumu [95], köpük metodu [96], faz ayrımı [97] ve kriyojelleşme [98] gibi farklı birçok teknik kullanılarak elde edilebilmektedir. Kontrollü gözenek boyutu elde etme, gözeneklerin açık ve birbirine bağlı kanallar ile oluşumunu sağlayan kriyojelleşme tekniği makrogözenekli jel elde etmek için en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Bu teknik ile üretilen kriyojellerin gözenek boyutu 0,1 µm'den 200 µm'ye kadar değişiklik göstermektedir [99].

1.4 Kriyojelleşme

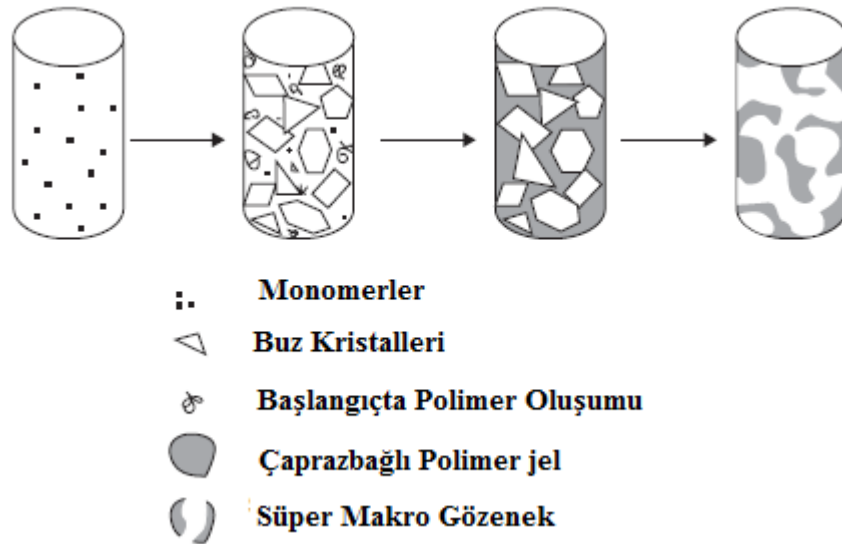
Kriyojelleşme, jelleşme potansiyeline sahip sistemlerin kriyojenik şartlarda yani sıfırın altındaki bir sıcaklıkta işlem görmesi sonucu meydana gelen spesifik bir jelleşme türüdür. Bu teknik ilk kez Lozinsky ve araştırma grubu tarafından makrogözenekli polimerik jel elde etme amaçlı kullanılmıştır [100]. Kriyojelleşme tekniği; çözücünün donma sıcaklığının altında yürütülen polimerleşme reaksiyonu esnasında, çözücü moleküllerin katı forma dönüşmesi ve çözücü kristallerin kalıp vazifesi yaparak gözenekli bir yapı oluşturması esasına dayanmaktadır. Dolayısıyla bu yöntemin en belirgin özelliği çözücünün kritallenebilme özelliğinin olması gerekliliğidir. Kriyojelleşme tekniği birbirini takip eden üç temel adımdan oluşmaktadır. Şekil 1.10'da kriyojelleşme tekniğinin adımları gösterilmiştir.

Bu adımlardan ilki monomer veya polimer çözeltisinin hazırlanması ve dondurulmasıdır. Çapraz bağlayıcı varlığında hazırlanan monomer yada polimer reaksiyon karışımı, çözücünün donma sıcaklığının altında bir sıcaklığa soğutulmaktadır.

Sonrasında ise ikinci adım olarak donmuş faz içerisinde jel inkübasyonu gerçekleşmektedir. Jelleşme reaksiyonu başlatıcı ilavesiyle başlatılır ve reaksiyon donmamış faz boyunca ilerlerken çözücü kristallerinin büyümesi donmuş bir faz meydana getirerek heterojen bir yapı oluşturmaktadır.

Son adım ise donmuş sistemin çözülmesini kapsamaktadır. Jelleşme reaksiyonunun belirli süre sonrasında tamamlanması ile karışım ısıtılarak donmuş polimer solüsyonu içerisindeki çözücü kristallerin erimesi sağlanmaktadır. Böylece birbirine bağlı gözenekli yapılar elde edilmektedir [101].

Kriyojelleşme dondurulmamış sistemelerde sentezlenen jellere göre farklı morfolojilere sahip yapıların elde edilmesini mümkün kılar. Tekrarlanabilir yapılar sentezleyebilmek için tüm deneysel polimerizasyon parametrelerinin kontrollü yürütülmesi gerekmektedir. Dondurma sıcaklığı ve hızı, monomer kompozisyonu ve konsantrasyonu, çözücü seçimi, reaksiyon karışımının termal geçmişi, jelleşme ajanı vb. parametreler polimerik jel sistemdeki kriyojen yapılaşmanın oluşumunu belirlemektedir[102].

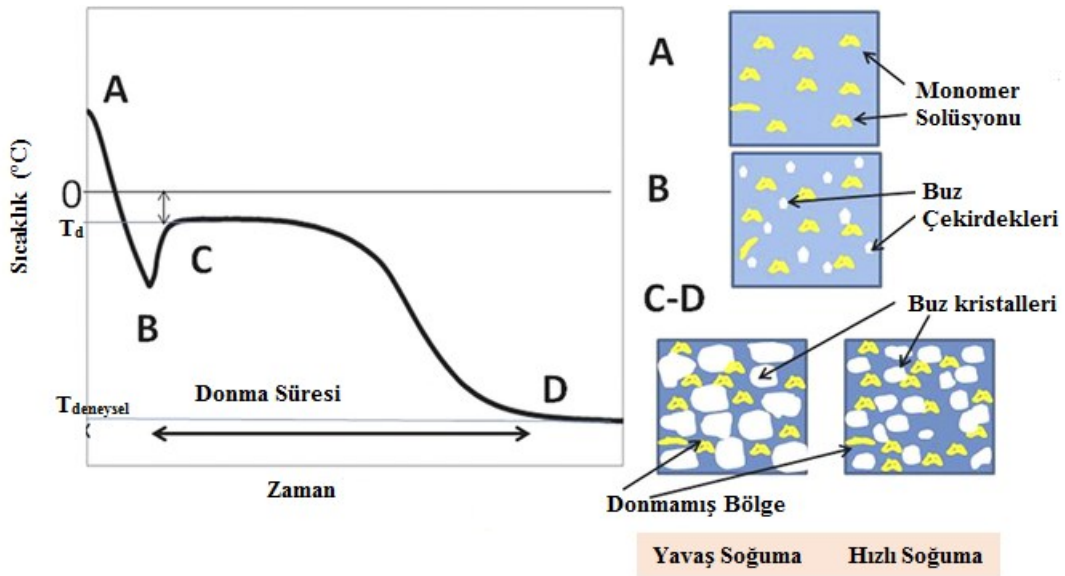


Şekil 1.10 : Kriyojelleşme tekniği adımları [103].

Donma sıcaklığı ve hızı porlu yapı oluşturmak için en kritik parametrelerdendir [100]. Gözenek boyutu kriyojenik rejime göre değişmektedir. Donma sıcaklığı çözücünün

donma sıcaklığı referans alınarak belirlenmelidir. Düşük donma sıcaklıklarında daha küçük çözücü kristalleri meydana gelmekte ve böylece daha küçük gözenek boyutları oluşmaktadır. Bunun sebebinin solüsyon içinde kristallenmelerin her noktada başlaması ve nükleasyonun artması olduğu söylenmektedir [102]. İlaveten düşük sıcaklıklarda sıvı fazın hacmi azalmakta ve daha ince ama yoğun gözenek duvarları oluşmaktadır. Genelde makro gözenekli malzeme sentezinde sulu sistemler için çözücü kristallerin büyümesini sağlamak adına -10 ile -25°C arasında çalışma sıcaklıkları kullanılmaktadır. Donma hızı ise çekirdeklenme bölgelerinin sayısını ve buz kristali boyutunu etkilemektedir. Çünkü, büyük bir numune için yavaş donma hızında ısı ve kütle transferi esas gereği orta bölgede kenar kısımlara göre daha geç kristallenme gerçekleştiğinden bu durum farklı morfolojilere ve gözenek boyutuna sahip jellerin oluşumuna neden olmaktadır [104]. Sonuç olarak donma hızının hızlı veya yavaş olması daha kontrollü gözenek oluşumunu yani daha homojen yapıların oluşmasını sağlamaktadır.

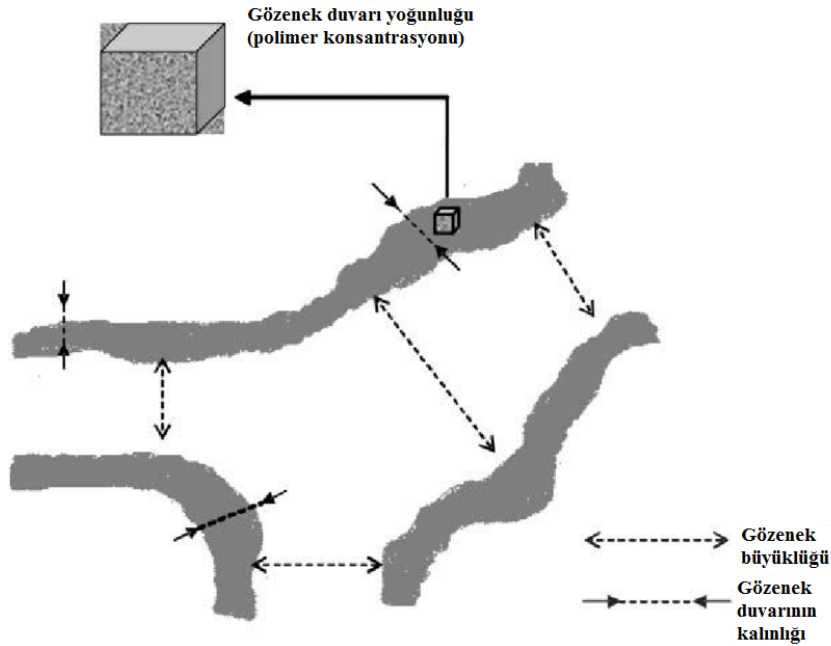
Kriyojellerin hazırlanmasındaki bir diğer önemli parametre monomer kompozisyonu ve konsantrasyonudur. Kriyojellerin, biyomedikal alanlarda kullanım potansiyeli olduğundan dolayı biyoyumluluk amacıyla kriyojel sentezinde doğal esaslı polimerler kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra mekanik dayanımları doğal polimerlere göre daha iyi ve biyoyumlulukları nispeten yüksek olmasından dolayı sentetik monomerlerden akrilamid türevlerinin kullanımı tercih edilmektedir.



Şekil 1.11 : Soğutma hızının gözenek yapısına etkisi [105].

Hidrofilik karakterdeki monomer seçimi ve farklı oranlarda çapraz bağlayıcı kullanımı ile yüksek su absorpsiyonu-desorpsiyonu gösterebilen kriyojel üretilmektedir. Yüksek monomer konsantrasyonu bir taraftan kriyojelin mekanik dayanımını doğrudan etkilerken diğer taraftan gözenek boyutlarının küçülmesine ve birbirine bağlı gözenek sayısının azalmasına neden olmaktadır. Çoğunlukla akrilamid türevi monomerler ve çapraz bağlayıcı olarak metilen bisakrilamid monomerinin kullanımı tercih edilmektedir. Deneysel çalışmalarda ideal gözenek boyutu ve kalınlığı için kritik monomer konsantrasyon aralığı %5 ilâ %20 (ağ/hac) olarak verilmiştir.

Su biyolojik sistemlere benzerliği, ucuz ve zararsız bir çözücü olması sebebiyle en sık kullanılan çözücülerden biridir. Bunun yanı sıra hidrofobik kriyojeller üretmek istenildiğinde nispeten daha yüksek donma noktasına sahip dimetil sülfoksit, dioksan, formamid, benzen ve sikloheksan gibi çözücülerin kullanımı tercih edilmektedir. Su, saf bir madde olduğu için donma ve erime sıcaklığı aynıdır ve 0 °C'dir. Suyun kristallenmesi için çekirdeklenme gereklidir. Çekirdeklenme sıcaklığı, ilk kristal çekirdeğin sıvı içinde olduğu sıcaklığı ifade eder ve çok düşük partikül içeriğine sahip su için bu değer -20 °C kadardır [106]. Genellikle çekirdeklenme, sistemi düşük sıcaklıklara soğutarak yada çekirdeklenmeyi tetiklemek için toz partikül ekleyerek başlatılabilir. Saf çözücü olmayan durumlarda durum değişmektedir.



Şekil 1.12 : Gözenek duvarının durumu [107].

Örneğin; sistemde tuz (sodyum klorür, kalsiyum klorür) yada monomerlerin çözünmediği bir solvent (aseton, metanol) varlığı donmamış mikro-fazdaki toplam çözünme konsantrasyonunu değiştirir ve böylece jellerin gözeneklilik, gözenek duvarı kalınlığı ve mekanik performans gibi özelliklerini etkiler. Kirsebom ve arkadaşları çözücü etkisini incelemek amacıyla 0,3 M sodyum klorür ve 0,6 M aseton ilavesiyle kriyojel sentezleyip gözenek boyutu ve gözenek duvarı kalınlığının dağılımını incelemiştir. Yapılan çalışmada elde edilen taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülerine göre tuz ilavesi yapılan kriyojellerde daha küçük gözenek ve daha kalın gözenek duvarı olduğu ve bunun donmamış fazda gerçekleşen monomer konsantrasyonunun artmasından kaynaklandığı anlaşılmıştır. Ayrıca aseton ilave edilerek yapılan kriyojel sentezinde ise buz kristallerinin oluşturduğu gözeneklerin yanı sıra gözenek duvarlarında çok daha küçük gözenekler oluştuğunu ve bunun sebebinin donmamış fazda gerçekleşen polimerizasyon esnasında çözünmeyen çözücünün kapladığı hacimden kaynaklandığını tespit etmişlerdir [108].

1.5 Kriyojellerin Özellikleri

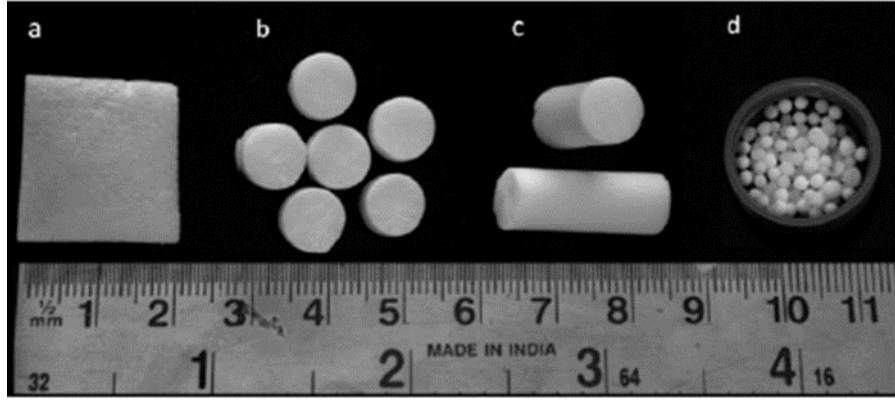
1.5.1 Şişme davranışı ve mekanik özellikleri

Kriyojellerde çok sayıda gözenek bulunması yüzey / hacim oranını etkin bir şekilde artırmaktadır. Kriyojellerde hidrojellerdeki difüzyon olayının aksine, birbirine bağlantılı gözenekler boyunca ozmotik basıncın sıvı akışı üzerindeki etkisi ile daha hızlı su absorpsiyonu ve desorpsiyonu gözlemlenmektedir [109]. Aynı zamanda donmamış fazda jelleşme meydana gelmesinden dolayı kriyojellerin gözenek duvarları hidrojellere göre daha yüksek bir polimer konsantrasyonuna sahiptir. Bu iki durum, kriyojelin kuvvet altında %80 ilâ %100'e varan oranlarda sıkıştırıldığında bünyesinde bulunan çözücüyü dışarı vermesini sağlamak ve ardından kuvvet kaldırılıp çözücü ilave edildiğinde ise anında başlangıç konumuna geri dönebilmesine imkan sunmaktadır [90].

1.5.2 Kriyojellerin geometrik ve morfolojik özellikleri

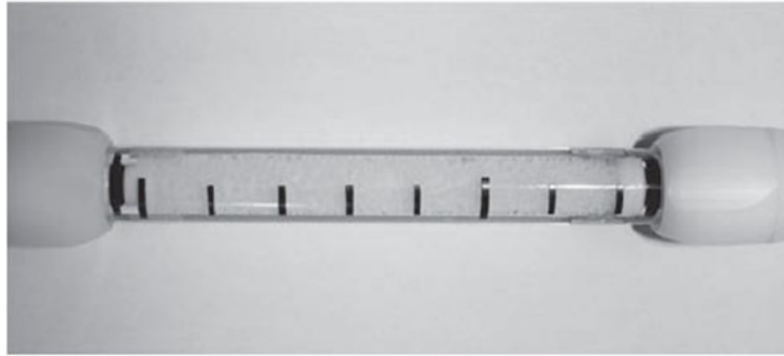
Kriyojel kriyojenik şartlarda polimerizasyon gerçekleştirilerek çapraz bağlanma sonucu elde edilen gözenekli polimerdir. Mikron mertebedeki ve birbirine bağlantılı gözeneklere sahip olmaları nedeniyle geçirgenlik özellikleri oldukça yüksektir. Geçirgenlik özellikleri sayesinde kromotografik absorban, destek malzemesi, yapay

hücre dokuları ve ilaç taşıma sistemlerinde tercih edilmektedir [86, 87, 92, 101, 102, 104, 110–112]. Kullanım alanlarına göre blok, plaka, disk ve küre gibi birçok farklı formda kriyojel hazırlanabilmektedir [113–115].



Şekil 1.13 : Farklı formlarda kriyojel örnekleri [14].

Endüstriyel ayrıştırma ve saflaştırma amaçlı kromatografik uygulamalarda monolitik formdaki kriyojeller kullanılmaktadır. Ancak bu formdaki kriyojel örnekleri kendisi ile aynı çapa sahip bir sütuna doldurulması gerektiğinde ölçeklendirme zor olmakta ve bu durum kriyojelin kullanımını sınırlamaktadır. Bu sebepten hangi çapta olursa olsun küre formdaki kriyojel örnekleri farklı ebatlardaki sütunlarda depolanarak bu sınırlamalar ortadan kaldırılabilir.



Şekil 1.14 : Küre yapıdaki kriyojellerin doldurulduğu sütun [116].

Süspansiyon polimerizasyon prensibi esas alınarak kriyojellere küre form verilebilmektedir. Bu teknikte polimerizasyonda kullanılan çözücülerden farklı ve birbirini içinde çözünmeyen ikinci bir akışkan örneğin parafin yağı kullanılmaktadır. Polimerizasyon çözücüsü içerisinde çözünmeyen akışkan ile doldurulmuş bir cam kap, soğutucu cihaz içerisine yerleştirilerek bir mikro pipet yardımıyla monomer solüsyonu damlatılmaktadır. Farklı pipet uçları kullanılarak istenen çaplarda küresel jeller elde etmek mümkün olmaktadır [117]. Mikro pipet kullanımı yanı sıra enjektör yardımıyla

bir kanal (microchannel liquid-flow) boyunca monomer solüsyonun akışı sağlanabilmektedir. Böylece daha kontrollü miktarlarda damlatma sağlanacağından küre çap değerleri daha homojen olmaktadır. İkinci akışkanın viskozitesini etkilediğinden monomer solüsyonun damlatılmaya başlandığı sıcaklık ve ikinci akışkanın karışma hızı küre çapını belirleyen iki temel unsurdur. Yüksek akışkan hızlarında kürecikler biribiri ile birleşerek düzensiz şekillerin, düşük hızlarda ise aglomera yapıların oluşmasına neden olabilmektedir [118]. Yuan ve arkadaşları ikinci akışkan hızı 2 ilâ 6,5 cm/dk aralığında belirtilen p(AAm-co-Phema) ile yapmış oldukları çalışmada küre çaplarının 500-2000 µm aralığında değişmekte olduğunu tespit etmişlerdir. Bu unsurlara ilave olarak monomer konsantrasyonunun da küre formu oluşuma etkisi görülmüştür.

Kriyojelelerin birbirinden farklı bir çok uygulamada kullanılmasının nedeni gözenekli yapılarıdır. Ancak gözenekli jel malzemeler için gözenek boyutunun belirlenmesi için herhangi bir standart mevcut değildir. Kriyojellerin morfolojik yapılarını analiz etmek için merkür gözenek ölçümü, azot adsorpsiyonu ve taramalı elektron mikroskobu gibi teknikler kullanılmaktadır. Ancak bu tekniklerden yararlanarak sadece kuru haldeki kriyojelleri inceleyebilmek mümkün olmaktadır. Suyu uzaklaştırmak gözenekli bütünlük yapıda yıkıcı etkilere sebebiyet verebilmektedir. Bu nedenle son yıllarda konfokal lazer taramalı mikroskop veya çoklu foton mikroskop kullanılarak gözenek boyutu kalınlığı ve yüzey alanı incelenmektedir [119].

1.6 Kriyojellerin Kullanım Alanları

Makrogözenekli polimerler gözenekli morfolojik yapıları sayesinde iyi bir mekanik dayanıma ve geniş yüzey alanına sahiptir. Bu malzemeler gözenek boyutlarının istenen nano ve mikron seviyelerde, farklı boyut ve şekillerde üretilebilir olmasının yanı sıra hidrofilik esaslı polimerlerden elde edilebildiklerinden çok iyi biyouyumluluk göstermektedir. Bu sebeple biyoteknoloji ve biyomedikal alanlarda sıkça tercih edilen malzemelerdir. Genel olarak doku mühendisliğinde yapı iskelesi ve doku nakli, kontrollü ilaç taşınım ve salınım sistemleri, biyoreaktör, kromatografi destek materyali olmak üzere farklı amaçlarla kullanılabilir.

Makrogözenekli polimerler sınıfında yer alan kriyojeller ilk kez 3-flouro-L-tyrosine aminoasit üretimi için bakteri hücrelerinin immobilizasyonunda matris elamanı olarak kullanılmıştır [120]. Akabinde yapılan çalışmalarda büyük ve biribiri ile bağlantılı

gözenekli yapıların biyolojik moleküllerin taşınımı veya yakalanması gibi kriyojellerin reseptör yada biyoreaktör görevi görebileceği ortaya konulmuştur [121–123]. Başka bir çalışmada Veronose ve arkadaşları glikoz miktarının tespiti için polivinilalkol (PVA) esaslı kriyojel yapıda polietilenglikol (PEG) ve glikoz oksidaz kullanarak çeşitli pH ve sıcaklıklarda çalışabilen biosensör malzemeler üretmişlerdir [124]. Kriyojellerin ozmotik ve mekanik bakımdan stabil olmaları kemik gibi sert ve organ dokuları gibi yumuşak olmalarını sağlamaktadır. Bu özellikleri kriyojellerin doku mühendisliğinde de kullanılmasına imkan tanımıştır [125–127].

Bu uygulamaların yanısıra kriyojellerin çevresel alanda biyoteknolojik bir ürün olarak da uygulanabilir olduğuna dair bir çok çalışma yapılmıştır.

Lozinsky'in araştırma grubu laboratuvar şartlarında yaptıkları deneylerde petrol türevleri ile kirlenmiş toprak ve suda %70 ilâ %100 oranlarda iyileştirme gerçekleştiğini raporlamışlardır [111, 128]. İçme sularındaki metal bileşiklerin uzaklaştırılmasına yönelik benzer bir çalışma Mattiasson ve arkadaşları tarafından yapılmıştır [129]. Polivinil piridin-divinil benzen kopolimeri esaslı hidrofobik bir kolon sistemi kullanılarak oldukça kansorejen olan poli aromatik karbonlar uzaklaştırılarak %70'e varan olumlu sonuçlar gözlemlenmiştir.

Başka bir araştırma grubu demir-alüminyum oksit içeren kriyojel kolon sisteminden düşük konsantrasyonlarda bile çok zararlı olan toksik özellikteki arsenik içeren atık su geçirip değerlendirmeye almıştır. Bu kolon sistemi ile atık sulardaki arsenik başarılı bir şekilde elimine edilerek Avrupa Birliği'nin ilgili yönergesinde belirtilen limit değerlerin altına düşürüldüğü bildirilmiştir [129, 130].

Kumar ve arkadaşları süper makro gözenekli kriyojel matrislerin sigarada filtre amaçlı kullanılabileceği üzerine denemeler yapmış ve bunun sonucunda nikotin içeriğini etkilemeksizin sigara dumanından %95 oranında katranın filtre edilebildiğini tespit etmişlerdir [131].

Tüm bu örneklerde de görüldüğü üzere kriyojeller çok farklı alanlarda kullanılma potansiyeli olan bir malzeme grubudur.

1.7 Antibakteriyel Kriyojel Uygulamaları

Son yıllarda biyomedikal ve biyoteknolojik alanda antibakteriyel malzemelere duyulan ihtiyaç giderek artmakta hatta bir gereklilik halini almaktadır. Yüksek

mekanik dayanım ve hızlı su adsorpsiyonu/desorpsiyonu özelliklerinden dolayı bu alanlarda yaygın olarak kullanılan kriyojellere antibakteriyel özellik kazandırılması, bu malzemelerin çok daha verimli ürünlere dönüştürülmesini sağlayacaktır.

Antibakteriyel kriyojel genel olarak ajanın çapraz bağlanma reaksiyonu öncesi monomer solüsyonu için katkılama yapılarak, kovalent bağlanma veya fiziksel adsorpsiyon ile matris yapıya immobilize olması ile veya jel yapının yüzey modifikasyonu ile kaplama, kimyasal işlem vb. uygulamalar sonucunda elde edilmektedir. Literatürde polipeptitler, kuaterner amonyum bileşikleri, metal oksit bileşikleri, kitosan gibi etkinliği kanıtlanmış ajanların kullanılmasıyla antibakteriyel kriyojel üretilmesine dair birçok sayıda çalışma bulunmaktadır

Siew-Leng Loo ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları çalışmada antibakteriyel ajan olarak en çok tercih edilen gümüş nanopartiküllerini kullanarak polisodyum akrilat esaslı kriyojel sentezlemişlerdir. Sentezlenen kriyojellerin 15 saniye kadar kontak süresinde bile 3 log bakteri hücrelerini inaktive ettiğini tespit etmiş ve su dezenfeksiyonunda kullanılabileceğini öngörmüşlerdir [132].

Archana Chaturvedia ve arkadaşları benzer bir ajan olan bakır nanopartiküllerini katkılama yoluyla biyouyumluluğu oldukça yüksek olan polivinil alkol matris yapısına dahil etmişler ve nano kompozit kriyojel yapıları elde etmişlerdir [133].

Bunun yanısıra yara örtücü olarak kullanılmak üzere polivinil alkol esaslı kriyojellere çinko oksit ilave edilerek yapılan çalışmada, çinko oksit katkılı kriyojellerin güçlü antibakteriyel etkinlik gösterdiği saptanmıştır. Aynı zamanda su adsorpsiyonu miktarının çinko oksit miktarı arttıkça artarken bir noktadan sonra azalmasına sebep olduğu gözlemlenmiştir [134].

2016 yılında Steven J. Shirbin tarafından potansiyel su arıtma uygulamaları için doğal antimikrobiyal özellikliğe sahip polipeptit esaslı kriyojeller hazırlanmıştır. Çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanılan kriyojel sentezinde polikasyonik polilisin-b-polvalin blok kopolimerin amin tortusu ile bağlanmış ve kriyojeller makro gözenekli yapısı sayesinde mükemmel su şişmesi ve yüksek oranda sıkıştırılabilir mekanik özellikler sergilemiştir. Antibakteriyel performans, *E.coli* yaşayabilirliği esas alınarak değerlendirilmiş ve hidrojel örneklerine göre *E.coli*'de %95.6'ya varan azalma gözlemlenmiştir. Hidrojel kontrolüne kıyasla, kriyojellerin mekanik dayanımı ve

gözenek bütünlüğünün yanı sıra artan yüzey alanının antibakteriyel aktivite için belirleyici olduğu kanısına varılmıştır [135].

Xueqing Zou ve arkadaşları kendiliğinden antibakteriyel özellik gösteren kitosan ve polietilen glikolden in-situ polimerizasyon yöntemiyle kompozit kriyojel sentezlemiş ve kriyojele gümüş nanopartikülleri ilave ederek antibakteriyel etkinliğini incelemişlerdir. Inhibition zone yöntemiyle antibakteriyel özellikleri incelenen kriyojel örneklerinin %95'e varan oranlarda *E.coli* bakterisini inaktive ettiğini ve yüksek su absorpsiyonu göstermelerinden dolayı biyomedikal alanda kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir [136].

Açık literatür taramalarında N-halamin esaslı kriyojel çalışmasına rastlanmamıştır. Bu tezin hipotezi, diğer jellere göre çok özel gözenek yapılarından dolayı kriyojellerin ana zincirine katılacak N-halamin monomerleri çok hızlı ve tekrar klorlanabilir yüzeyler oluşturacaktır. Ayrıca bu gözenekler azot-klor kovalent bağı UV ışığından koruyabileceği için oldukça stabil yüzeyler elde edilebilecektir.

2. MALZEME VE METOD

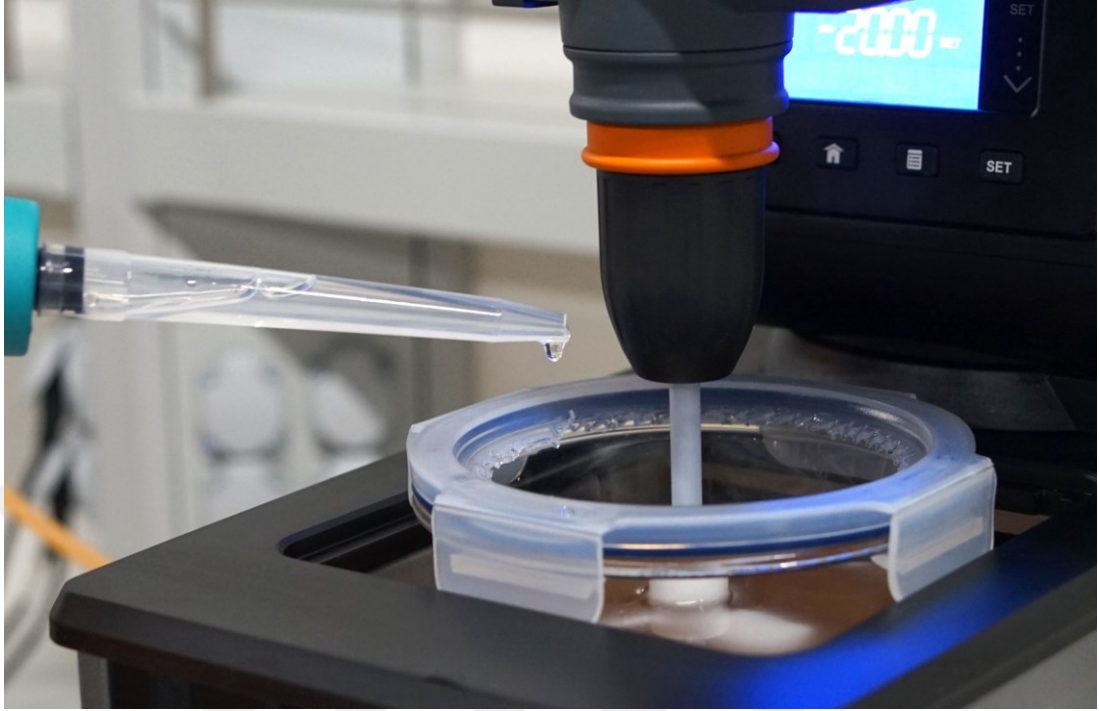
2.1 Kullanılan Malzemeler

Bu çalışmada; akrilamid (AAM, Sigma-Aldrich, %99 saflıkta), 2-metilpropan sülfonik asit sodyum tuzu (AMPS-Na, Sigma-Aldrich, %50'lik sulu çözeltisi), N-[3-(dimetilamino)propil] metakrilamid (DMAPMA, Sigma-Aldrich, %99 saflıkta) olmak üzere üç farklı monomer ile N,N'-metilen bis akrilamid (MBA, Sigma-Aldrich, %99 saflıkta) monomeri çapraz bağlayıcı, amonyum per sülfat (APS, Acros Organics, %98 saflıkta) başlatıcı ve tetrametil etil diamin (TEMED, Sigma-Aldrich, %99 saflıkta) hızlandırıcı olarak kullanılmıştır. İkinci akışkan parafin yağı (Acros Organics) tercih edilmiştir. Kullanılan tüm kimyasallar hiçbir ön işlem yapılmadan kullanılmıştır.

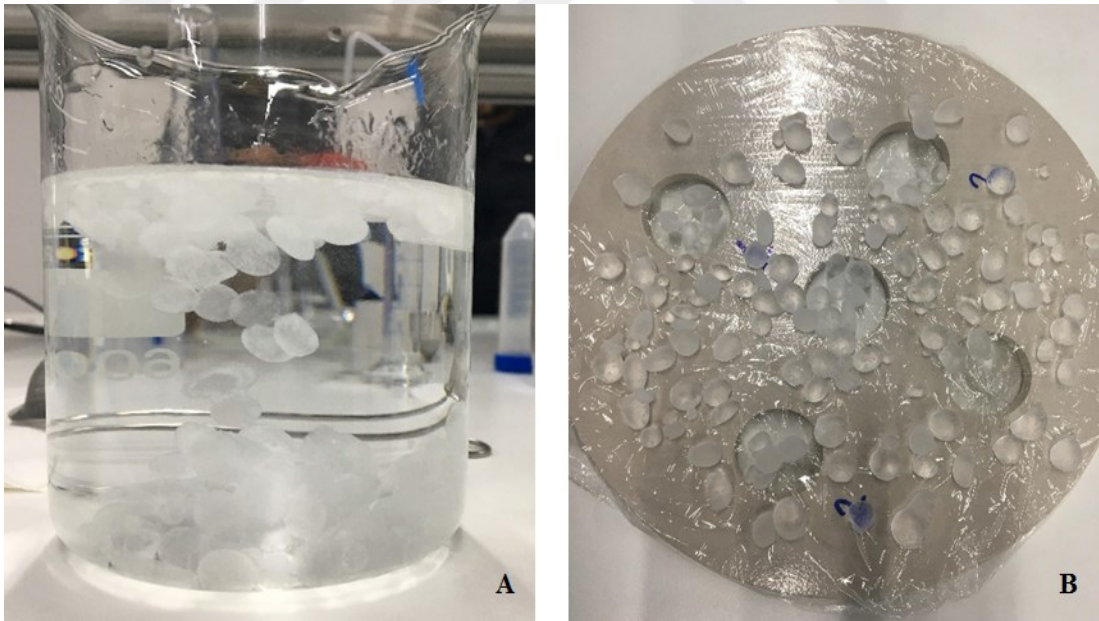
2.2 Kriyojel Sentezi

Kriyojenik şartlarda polimerizasyonu gerçekleştirmek için -50 °C ilâ 50 °C aralığında çalışabilen Lauda marka sirkülasyon cihazı ve Heidolph marka mekanik karıştırıcı aracılığıyla deney düzeneği kurulmuştur. Parafin yağı ile doldurulmuş ağzı geniş bir cam kap soğutucu cihaz içine yerleştirilmiştir. Mekanik karıştırıcı 50 rpm hız ile çalıştırılmıştır. Bir taraftan -8 °C olarak belirlenen monomer damlatma sıcaklığı için sistem soğutulmaya başlanmıştır. Diğer taraftan reaksiyon karışımı deiyonize su içerisinde tüm monomerlerin belirlenen miktarlarda ilave edilmesi ile hazırlanmıştır. Akabinde monomer solüsyonu 10 dakika boyunca azot (N₂) gazına maruz bırakılarak, çözelti içinde bulunan oksijen (O₂) gazı uzaklaştırılmıştır. Ardından oda sıcaklığında TEMED ve APS ilavesi yapılarak reaksiyon başlatılmıştır. Hızlı bir şekilde 10 ml'lik mikropipet yardımıyla monomer solüsyonu parafin yağı içerisine damlatılmıştır. Sıcaklık -20 °C'ye ayarlanarak üç gün polimerizasyon reaksiyonunun tamamlanması için beklenmiştir. Kurulan sentez düzeneği Şekil 2.1'de gösterilmiştir. Üçüncü günün sonunda parafin yağ içinden alınan kriyojel numuneleri aseton-su karışımı içinde tekrarlı olarak yıkanmış ve ardından yağın tamamen uzaklaşması için hekzan ile

ekstraksiyon yapılmıştır. Daha sonra da vakumlu desikatörde kurumaya bırakılmıştır. Şekil 2.2’de ise yıkama ve kurutma işlemleri gösterilmektedir.



Şekil 2.1 : Kriyojel sentez düzenneđi.



Şekil 2.2 : Yıkama işlemi (A), Kurutma işlemi (B).

2.3 Kriyojellere Antibakteriyel Fonksiyon Kazandırılması

Kuru haldeki kriyojel örnekleri %8 aktif klor içeren sodyum hipoklorit çözeltisinden %10 konsantrasyonda hazırlanan klor banyosuna alınıp nötr (pH 7) ortamda

karıştırılmaksızın 5 dk, 15 dk ve 30 dk süre boyunca klorlanmıştır. İlâveten, asidik (pH 4) ve bazik (pH 11,5) olmak üzere farklı pH değerli ortamlarda da klorlama işlemi uygulanmıştır.

Klor yüklemesi yapılan kriyojellerden reaksiyona girmeyen serbest haldeki kloru uzaklaştırmak amacıyla iki defa çeşme suyu ve iki defa da saf su olmak üzere toplam 4 kez yıkama yapılmıştır. Daha sonra etüvde 50 °C sıcaklıkta iki saat kurumaya bırakılmıştır. Bu işlemler Şekil 2.3'te şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 2.3 : Klorlama sürecinin şematik gösterimi.

2.4 Kriyojellerin Karakterizasyonu

2.4.1 Su absorpsiyonu ölçümleri

Her bir kriyojel numunesi denge şişme değerine ulaşana kadar 2 saat deiyonize suda bekletilerek su absorpsiyon ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Ardından şişmiş haldeki kriyojel numuneleri filtre edilerek hassas terazi üzerinde tartılmıştır. Su absorpsiyon dereceleri Denklem 2.1 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Su absorpsiyon oranı} = \frac{\text{Şişen kriyojelin ağırlığı} - \text{Kuru kriyojelin ağırlığı}}{\text{Kuru kriyojelin ağırlığı}} \quad (2.1)$$

2.4.2 Su desorpsiyonu hızının tespiti

Kriyojellerin su desorpsiyon hızları termal gravimetrik analizör (TGA) cihazı kullanılarak ölçülmüştür. 2 saat suda bekletilen kriyojel örneği 25°C/dk ısıtma hızıyla fırın sıcaklığı 80°C'ye çıkartılarak 60 dk sabit sıcaklığa maruz bırakılmıştır. Böylece zamana bağlı olarak kriyojelin kütle kaybındaki azalış gözlemlenmiştir.

2.4.3 Oksidatif klor miktarının tespiti

Klor miktarı yüzde olarak iyodometrik titrasyon ile belirlenmiştir. Titrasyon çözeltisini hazırlamak için erlene 50 mL deiyonize su içerisine 0,25 g potasyum iyodat,

%0,5 konsantrasyonda nişasta (indikatör) ve 4 M derişimli asetik asit ilave edilmiştir. Hemen ardından kriyojeller erlen içerisine koyularak karıştırılmaya başlanmıştır. Kriyojellerin eklenmesiyle ortaya çıkan koyu mavi renk klor etkileşimini göstermektedir. Karışmakta olan çözeltiye otomatik titratör yardımıyla daha önce hazırlanmış 0,00375 N sodyum tiyosülfat çözeltisinden az miktarlarda hassas ilaveler yapılmıştır. Titrasyon çözeltisi ilk etapdaki şeffaf rengine geri dönene kadar sodyum tiyosülfat çözeltisi damlatılmaya devam edilmiş ve sonrasında yüzde olarak oksidatif klor miktarı (%Cl⁺) Denklem 2.2'ye göre hesaplanmıştır [85].

$$\%Cl^{+} = \left(\frac{35,45 * N * V}{2 * W} \right) * 100 \quad (2.2)$$

Burada N, sodyum tiyosülfatın normalitesini (0,00375), V, titre edilen sodyum tiyosülfatın hacmini (mL), W, kriyojel numunesinin ağırlığını (g) göstermektedir.

2.4.4 Tekrarlı klorlama

Kriyojellerin yeniden kullanılabilirliklerini belirlemek için tekrarlı klorlama testi yapılmıştır. Bakteri ile teması sonrasında bünyesinde bulunan kloru kaybetmesi kriyojelin antibakteriyel fonksiyonelliğini yitirmesine yol açmaktadır. Bu fonksiyonitenin yeniden kazanımı için yeniden klorlama işleminin yapılması gerekmektedir. Tekrar klorlama ile kriyojellerin bünyesinde klor tutma özelliğini hangi oranda koruduğu tespit edilmiştir.

2.4.5 UV stabilite testi

UV ışığı stabilitesi, sık sık güneş ışığına maruz kalan malzemeler için en önemli gereksinimlerden biridir. N-Cl bağı ise UV ışığına karşı çok hassastır. Kriyojellerin UV stabilitesini tespit etmek için ATLAS marka UV floresan yaşlandırma cihazı kullanılmıştır. Kriyojeller 30°C'de UVB-313 ışığına maruz bırakılmıştır. 1, 2, 3 ve 6 saat olmak üzere farklı sürelerde kriyojel örnekleri alınıp titrasyon ile yüzde klor miktarları tespit edilmiştir. 6 saat sonunda tekrar klorlama yapılarak kriyojelin yeniden klorlanabilir davranışındaki değişim gözlemlenmiştir.

2.4.6 Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FT-IR)

Sentezlenen küre formdaki kriyojel numunelerindeki fonksiyonel gruplar ATR modülüne sahip Thermo Nicolet iS50 FTIR spektrometresi kullanılarak 400-4000 cm⁻¹

¹ dalga boyları arasında 4 cm⁻¹ hassasiyette 16 tekrar taramalı ölçümler neticesinde belirlenmiştir.

2.4.7 Termal analizler

TA Instrument SDT 650 TGA cihazı ile azot ortamında 10°C/min ısıtma hızı ile kriyojel numunelerinin termal davranışı incelenmiştir.

2.4.8 Taramalı elektron mikroskop analizi

Kriyojel örneklerinin morfolojik analizi için bilgisayar kontrollü taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. Carl Zeiss Gemini 300 model mikroskop ile yapılan yüzey morfolojisi tespiti 25, 100 ve 500 kez büyütme sağlanarak gerçekleştirilmiştir. Ölçüm öncesi her bir küre formdaki kriyojel numunesine 30 mA ve 5x10⁻² mbar vakum altında 15nm kalınlıkta altın paladyum kaplama yapılmıştır.

2.4.9 Mekanik testler

Kriyojellerin mekanik davranışı Shimadzu AGS-X model mekanik test cihazı yardımıyla belirlenmiştir. Bası testi öncesi kriyojeller 2 saat suda bekletilerek denge şişme değerine ulaşması sağlanmıştır. Bası teti 50 N yük hücresi, 10 mm/dk hız ve oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Bası testi klorlanmış ve klorlanmamış olmak üzere 3'er adet kriyojel örneği üzerinden yapılmış ve elde edilen bası direnci değerleri hesaplanmıştır.

3. BULGULAR ve TARTIŞMA

3.1 Sentez Parametreleri

Konvansiyonel kovalent jellerin oluşumuna benzer şekilde, kovalent kriyojeller, monomerik öncüllerin çapraz bağlanması, polimerizasyonu veya polikondenzasyonu yoluyla hazırlanabildiği gibi yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerin çapraz bağlanması (kimyasal olarak veya radyasyon ile) yoluyla da hazırlanmaktadır.

Tüm bu durumlarda, kriyojel sentezi monomer veya polimer çözeltisinin hazırlanması ve dondurulması, hemen akabinde donmuş faz içerisinde jel inkübasyonu ve son olarak donmuş sistemin çözülmesi gibi temel aşamaları içermektedir.

Belirli öncüllerin özellikleri de dahil olmak üzere bu üç aşamadaki koşullar, kriyotropik jel oluşumunun verimliliğini, dolayısıyla da ortaya çıkan kriyojel malzemelerinin özelliklerini ve yapısını çok önemli ölçüde etkilemektedir.

Kriyojelleşme, jel yapıda gözenek oluşturmak için suyun donma özelliğinden yararlanıldığından bu sentez düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilmektedir. Gözenek yapısını belirleyen en temel parametre reaksiyon sıcaklığıdır. Literatür incelendiğinde akrilamid esaslı monomerlerden kriyojel sentezinde -24°C ilâ -16°C deki çalışma sıcaklıklarının ideal makro gözenek yapının oluşması için yeterli olduğu görülmüştür [110, 137–139].

Jel yapının doğası gereği oluşumu esnasında başlangıç konsantrasyonu kriyojellerin fizikokimyasal özelliklerini ve gözenekli morfolojik yapısını belirler. Kriyojeller, geleneksel jellere kıyasla çok daha düşük konsantrasyonlarda hazırlanabilmektedir. Bununla birlikte, çok düşük konsantrasyonda oluşan kriyojeller mekanik olarak zayıf olduğu için, ideal konsantrasyon aralığı %2 ila 20 (ağ/hac) olduğu tespit edilmiştir [140–142].

Bu yüzden bu çalışmada 2,79 mmol (1,28 g, %50'lik) AMPS-Na, 0,58 mmol (0,1 g) DMAPMA ve 2,81 mmol (0,2 g) AA monomerleri kullanılarak başlangıç monomer konsantrasyonu %9,5 ağ/hac değerine karşılık gelen monomer solüsyonu

hazırlanmıştır. Toplam monomer miktarının molce %1,36'sı kadar (0,013 g) MBAm, 0,0205 g APS ve 60 µL TEMED kullanılarak -20 °C'de kriyojel sentezleri gerçekleştirilmiştir. Tüm kriyojel sentezlerinde belirlenen bu parametreler kullanılmıştır.

Kriyojellerin küre formda üretilmesi hedeflendiğinden süspansiyon polimerizasyonu düzeneği hazırlanarak monomer solüsyonunun parafin yağına damlatma sıcaklıkları incelenmiş ve -4°C, -6°C, -8°C'de sentez denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bunun yanı sıra küre form oluşumunu etkileyen parafin yağı karıştırma hızı da incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.1'de verilmiştir.

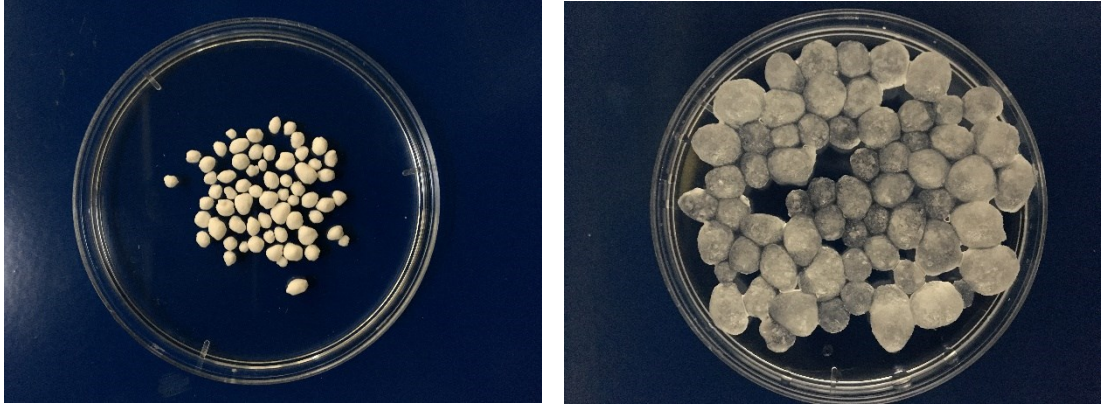
Çizelge 3.1 : Üretim parametrelerinin etkisi.

Monomer Damlatma Sıcaklığı (°C)	Karıştırma Hızı (rpm)		
	30	50	70
-4	Topaklanma, dibe çökme	Dibe çökme	Düzensiz şekilli jel
-6	Topaklanma, dibe çökme	Partikül halinde jel	Düzensiz şekilli jel
-8	Topaklanma, dibe çökme	Küre formunda jel	Düzensiz şekilli jel

Yapılan denemeler sonucunda -8°C ve 50 rpm karıştırma hızı kriyojellere istenen küre formu verilmesinde optimum parametreler olarak belirlenmiştir. Düşük karıştırma hızlarında jel parçacıkların topaklanarak dibe çökmesi, yüksek karıştırma hızlarında ise donmuş parçacıkların birbirine çarpışmasından dolayı düzensiz şekilli partiküllerin meydana geldiği gözlemlenmiştir. Diğer taraftan 50 rpm karıştırma hızında sıcaklığın etkisiyle başlangıçta mikropipetle küre formda damlatılan monomer solüsyonunun kullanılan parafin yağı viskozitesinin sıcaklığa bağlı değişiminden kaynaklı olarak yüksek sıcaklıklarda partikül halinde jel yapıların veya daha da yüksek sıcaklıkta dibe çökmelerin olduğu gözlemlenmiştir.

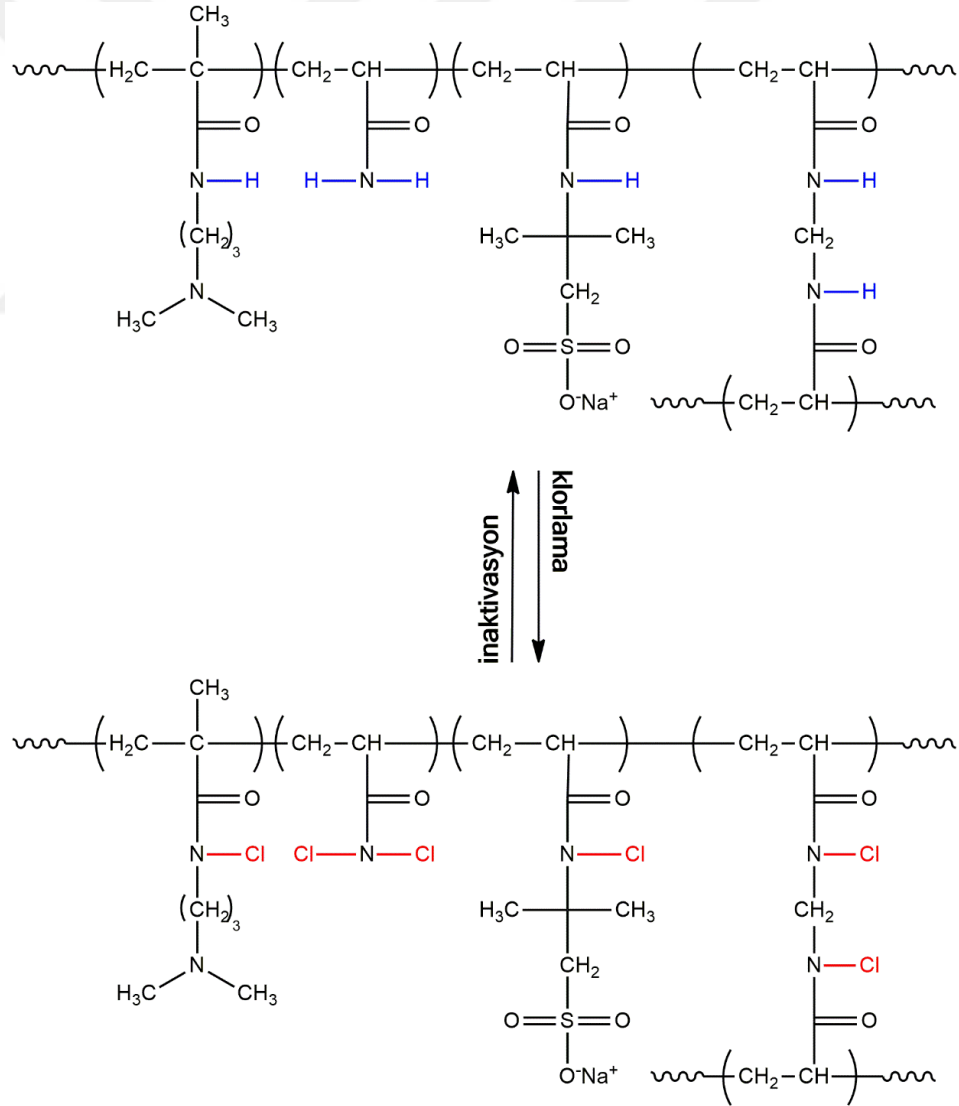
3.2 Klorlama Parametreleri

Klorlama öncesi kriyojeller 2 saat suda bekletilmiştir. Şekil 3.1'de kuru ve şişmiş formdaki kriyojeller gösterilmektedir.



Şekil 3.1 : Kuru (sol), şişmiş (sağ) küre formda kriyojeller.

Klor depolama kapasitesini tayin edebilmek amacıyla sentezlenen kriyojeller %10 konsantrasyona sahip sodyum hipoklorit çözeltisi ile muamele edilmiştir. Sentezlenen kriyojellerin klorlama ve inaktivasyon mekanizması Şekil 3.2’de verilmiştir.

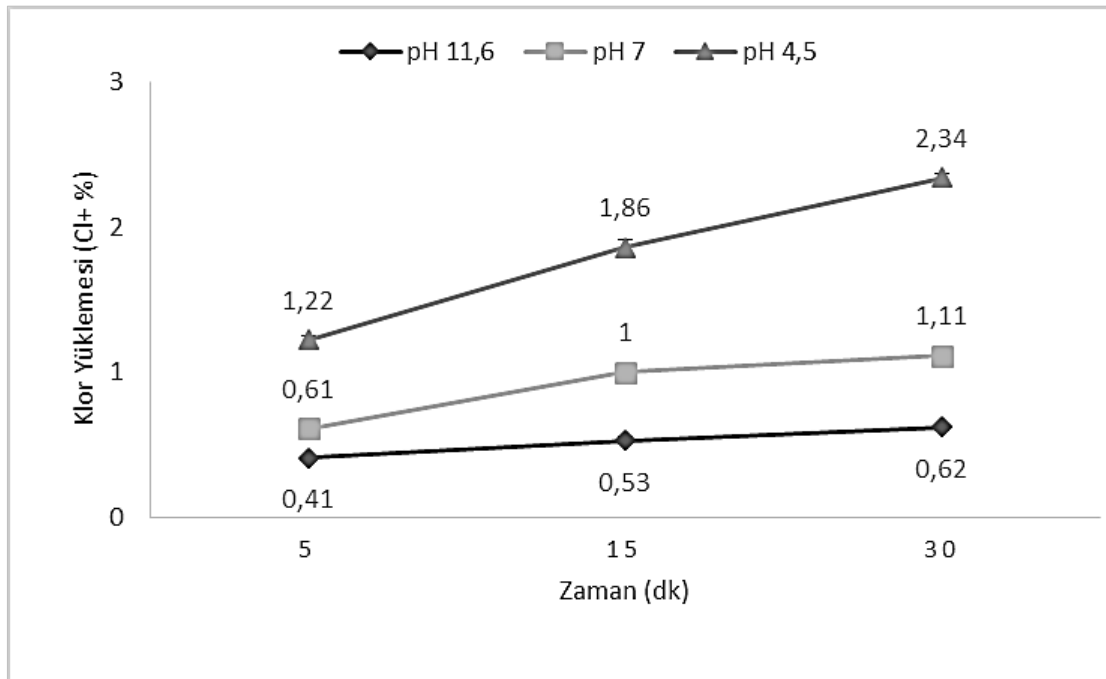


Şekil 3.2 : Klorlama-inaktivasyon reaksiyonu.

Halojenleşme reaksiyonunun süresi ve pH ortamı klor depolama kapasitesini önemli ölçüde etkilemektedir [143, 144]. Buna istinaden kriyojellere farklı pH'larda ve sürelerde klorlama işlemi uygulanmış ve hedeflenen yüzde klor miktarı elde edilmeye çalışılmıştır.

Şekil 3.3'te kriyojellerin klor depolama kapasitesi verilmiştir. Beklenildiği gibi tüm pH değerlerinde artan klorlama süresi ile % depolanan klor miktarı artmıştır. Sentezlenen kriyojellerde Şekil 3.2'de görüldüğü gibi klor bağlanabilecek çok sayıda azot grubu bulunmaktadır. Artan uygulama süresi ile jel yapının şişmesi sonucunda zincirlerin hareketi kolaylaşmış ve serbest klor jel yapının içlerine kadar nüfus edebilmiştir. Bu sayede serbest klor çok daha fazla sayıda azot atomu ile etkileşime geçebilmiştir. Klorlama banyosunun pH değeri, klor depolama miktarını etkileyen bir başka önemli faktördür. Şekil 3.3'te görüldüğü üzere pH değeri düştükçe kriyojellerdeki aktif klor miktarında artış gözlemlenmiştir. Sodyum hipoklorit sulu ortamda pH 7'nin altında hipokloröz asit (HOCl), pH 7'nin üstünde klorit iyonu (OCl^-) halinde bulunur. HClO asidik koşullar altında daha iyi bir halojenleştirme ajanı olup daha fazla N-H bağına etkin bir şekilde N-Cl bağlarına dönüştürülebilmektedir[145].

Sonuç olarak tüm pH değerlerinde 5 dk klorlama işlemi ile 30 dk da depolanabilen klorun yaklaşık yarısından fazlasını depolanabilmesi, gözenekli yapının etkisini bariz bir şekilde ortaya koymaktadır.



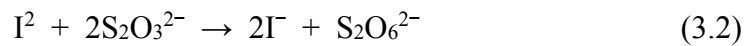
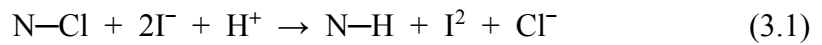
Şekil 3.3 : Kriyojellerin klor depolama kapasitesi.

Yüzeyin biyosidal fonksiyon gösterebilmesi için yapıda yer alması gereken N-halamin ajanlarının bir minimum seviyesi vardır. Literatürde yer alan çalışmalarda % 0,1-0,30 Cl⁺ etkin antibakteriyel etkinlik göstermesi için yeterli olduğu belirtilmiştir [146, 147]. Klor oranının fazla olması durumunda hidrofobisite etkisi ile bakteri ile temas zorlaşmakta ve dolayısıyla antibakteriyel etkinlik zayıflamaktadır [148]. Örneğin; %1,4 Cl⁺ içeren poli (stiren-ko-N- (t-Bu) -N-kloro-akrilamid) reçinesinin 1 dk temas süresi sonucunda yaklaşık 7.95-log *E. coli* ve 3 dk temas süresi sonunda yaklaşık 7.81-log *S. aureus* bakteri inaktivasyonu gerçekleşirken [149], %6,2 Cl⁺ ihtiva eden polistiren boncuk (bead) yapıların 5 dk temas süresi sonunda yaklaşık 4 log *S. aureus* bakterisinin ölümüne yol açtığı tespit edilmiştir [150]. Yüzey düşük klor miktarı ve uzun temas süreleri sonunda güçlü antibakteriyel etkinlik gösterirken artan klor miktarı mikroorganizmalar ile etkileşimi olumsuz etkilemekte ve inaktivasyonu yavaşlatıp süresini uzatmaktadır.

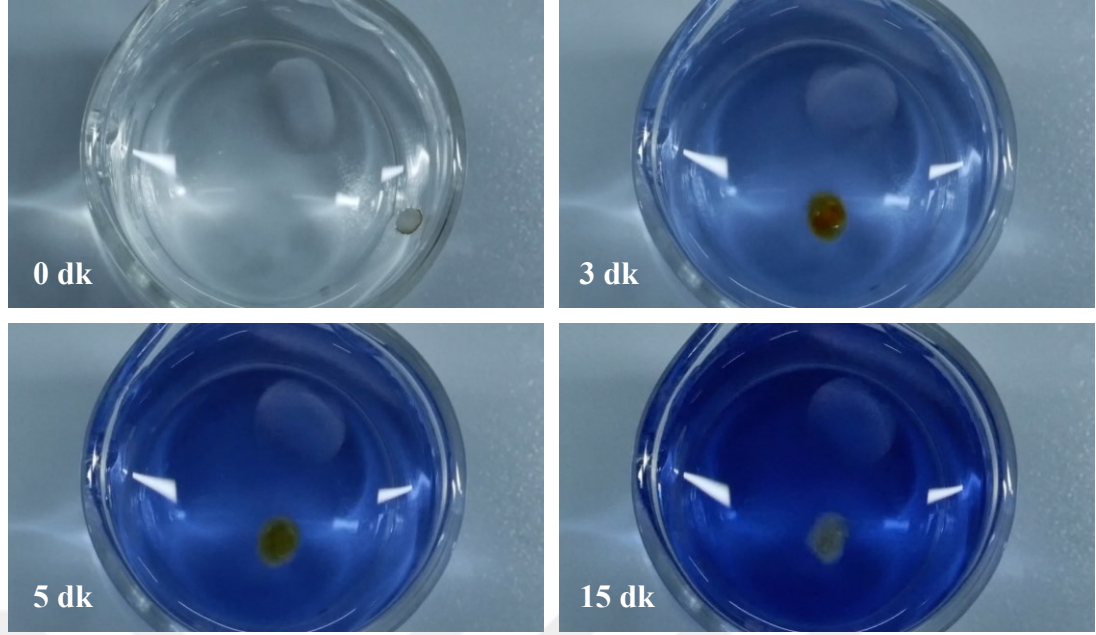
Yapılan çalışmalar neticesinde pH 7 ve 15 dk klorlama süresi sonunda %1 klor içeren kriyojellerin güçlü biyosidal etki göstereceği öngörülmüştür. Bu sebeple pH 7 ve 15 dk klorlama işlemi optimum klorlama parametresi olarak uygun bulunmuş ve bu çalışmada tüm test ve analizlerde %1 Cl⁺ depolanmış kriyojel örnekleri kullanılmıştır.

Üretilen kriyojellerin bakteri inaktivasyon hızı hakkında bilgi edinebilmek için Şekil 3.4'te görüldüğü gibi titrasyon banyosundaki %1 aktif klor içeren kriyojellerin yapısındaki klor 3 dk, 5 dk ve 15 dk zaman aralığındaki salınımı gözlemlenmiştir.

Titrasyon banyosunda Denklem 3.1 ve 3.2'de verilen 2 adımda yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonu gerçekleşir. N-halamin etkileşimi ile yükseltgenen iyodür nişasta varlığında mavi renge dönüşür. Mavi renge dönüşüm klorun varlığını göstermektedir.



Klor salınımı arttıkça çözeltinin rengi maviye dönmüş, kriyojelin sarı rengi ise giderek açılmış ve 15 dk sonunda beyaza geri dönmüştür. 15 dk gibi oldukça kısa bir sürede kriyojel, yapısında bağlı olan tüm klorun neredeyse tamamını salabilmiştir. Sonuç olarak üretilen kriyojellerin gözenekli yapıları nedeniyle yapılarına kloru hem çok hızlı alabildikleri hem de antibakteriyel etkinlik göstermek için çok hızlı bir şekilde salabildikleri ortaya konulmuştur.



Şekil 3.4 : Klor salınım hızı

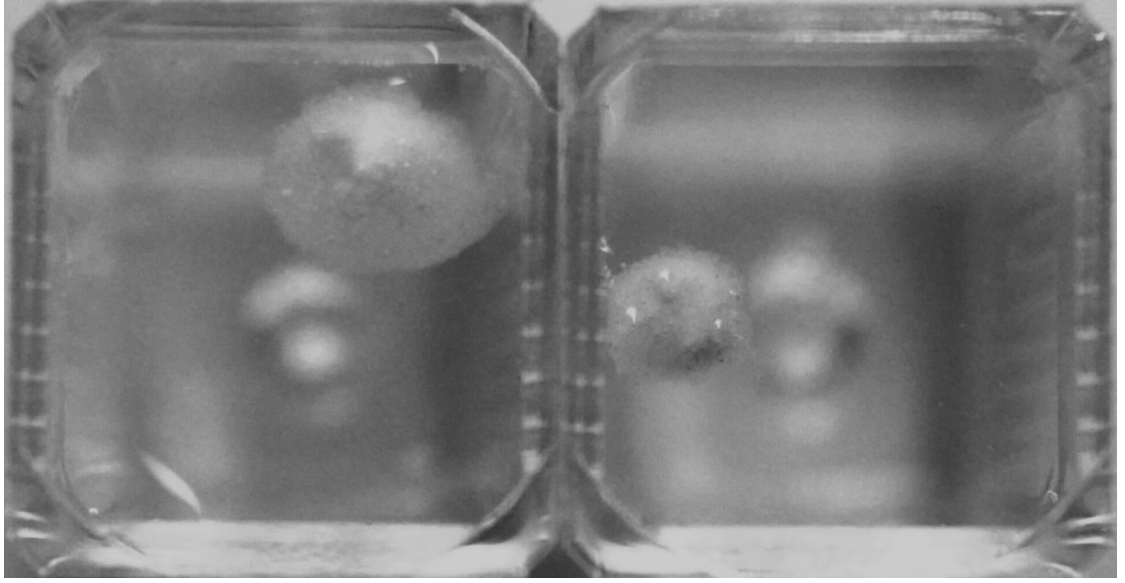
3.3 Su Absorpsiyon-Desorpsiyon Davranışının Belirlenmesi

Optimum klorlama parametresi belirlendikten sonra kriyojellerin su absorpsiyonu davranışı incelenmiştir. Klorlu ve kloruz 3'er adet küre formundaki kriyojel örneklerinin ilk ağırlıkları ve suda bekletildikten sonraki son ağırlıkları hassas terazi ile ölçülmüştür. Çizelge 3.2'de kriyojellerin ağırlıkça şişme oranları verilmiştir. Klorlanmış kriyojellerin klorlanmamış kriyojellere göre su absorpsiyon değerinde azalma meydana gelmiştir. Bu durum azot gruplarına klorun bağlanması ile yapıda bulunan hidrojen atomlarının sayıca azalması ve dolayısıyla hidrojen bağının azalmasından kaynaklanmaktadır.

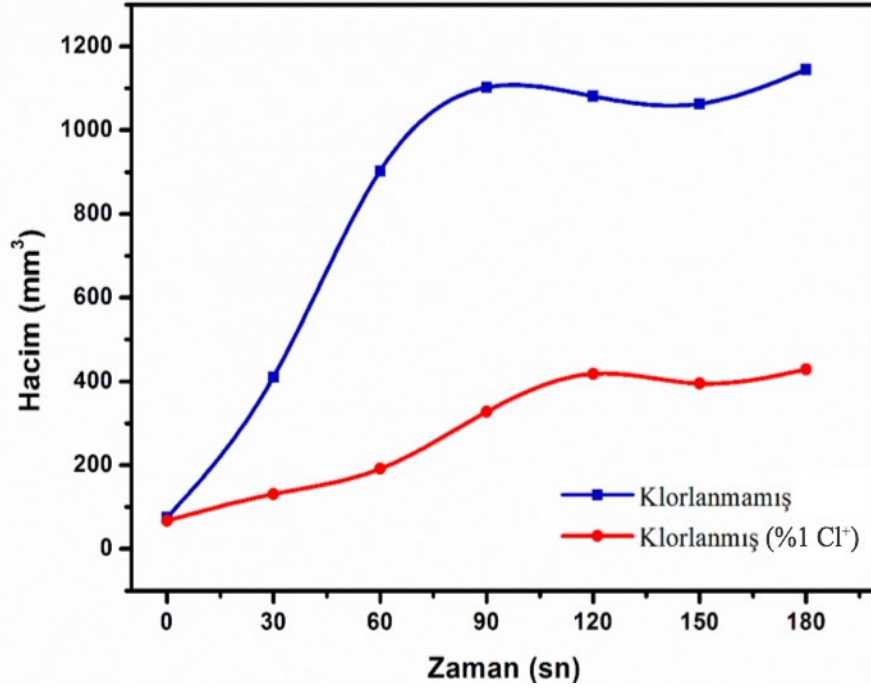
Çizelge 3.2 : Su absorpsiyonuna klor etkisi.

	Ağırlıkça şişme oranı (g/g)
Klorlanmamış kriyojel	47±8,99
Klorlanmış Kriyojel	43±7,71

Kriyojellerin saf su ortamında şişme sonucundaki hacimce değişimleri Şekil 3.5'te gösterilmiş ve hacimsel değişimin zamana bağlı değişimi Şekil 3.6'da verilmiştir. Klorlanmamış örnek çok daha hızlı şişerken klorlanmış kriyojel daha yavaş ve hacimce daha az su absorplamıştır.



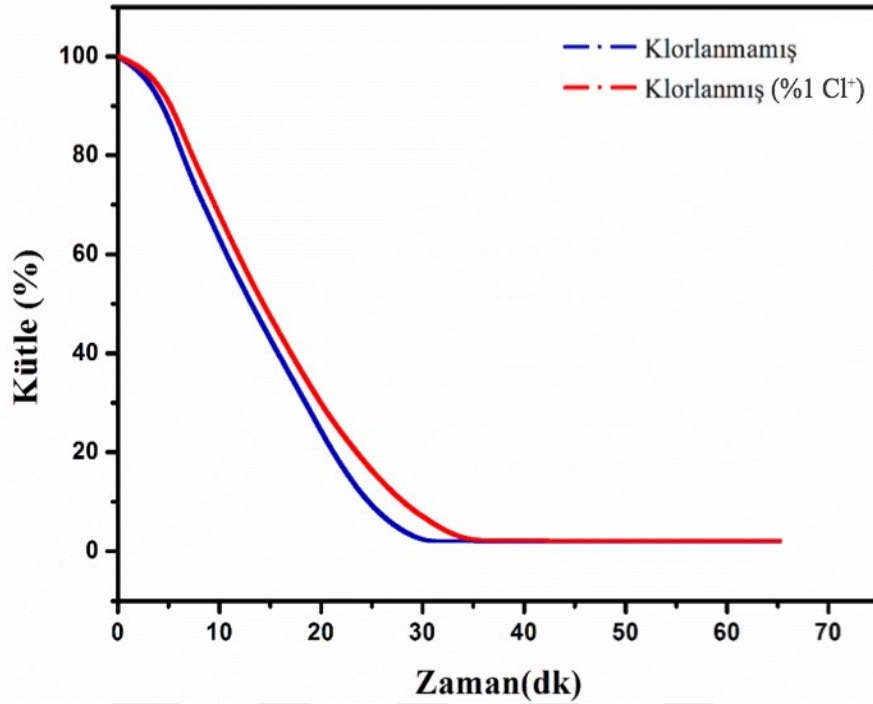
Şekil 3.5 : Klorlanmamış(sol) ve klorlanmış(sağ) kriyojellerin şişme hızı (30 sn).



Şekil 3.6 : Su absorpsiyon davranışı.

Kriyojellerin su desorpsiyon davranışını incelemek için TGA eğrilerinden yararlanılmıştır. İki saat suda bekletilen klorlu ve klorsuz kriyojeller 25°C/dk hızla 80°C'ye ısıtılmış 60 dk boyunca 80°C'de bekletilmiştir. Şekil 3.7'da görüldüğü üzere klorlanmamış kriyojellerin jel yapıdaki suyu daha hızlı desorpsiyon ettiği görülmektedir. Klorlanmış kriyojellerin daha az hidrojen bağı yapmasından dolayı su desorpsiyonunun daha hızlı gerçekleşmesi beklenirken tam tersi bir durum ortaya çıkmıştır. Bu durumun, SEM sonuçlarında açıkça görülebilen klorlanmış kriyojelin

yüzeğe yakın bölgelerindeki gözenekli yapının kaybolmasından kaynaklı olduğu düşünölmektedir.

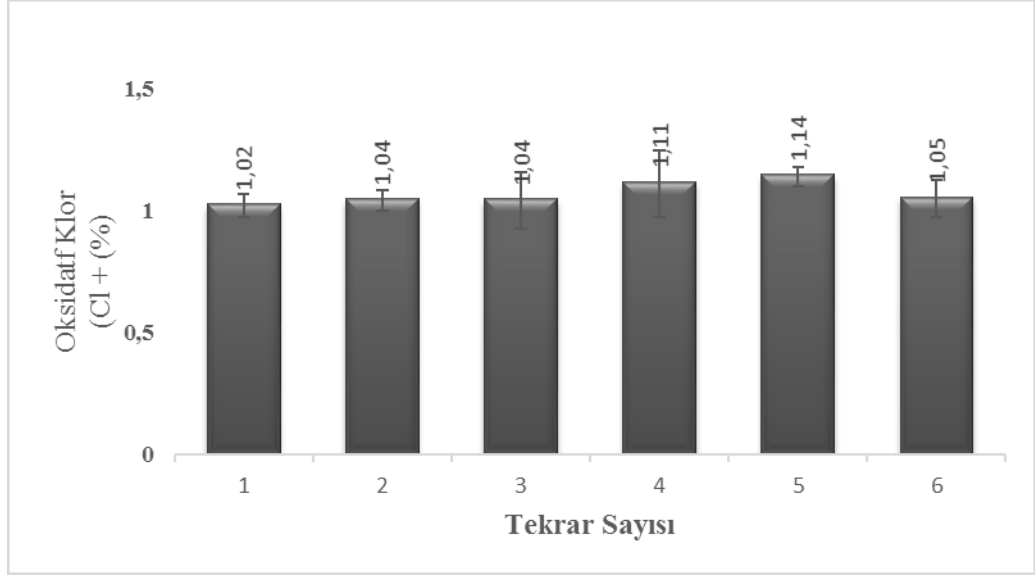


Şekil 3.7 : Su desorpsiyon davranışı.

3.4 N-Halamin Yapının Kararlılığı

N-halaminlerin stabilitesi antibakteriyel etkinlikleriyle güçlü bir şekilde ilişkilidir. Bu ajanların kararlılıkları yapı, ısı, ışık, pH, su, kimyasallar ve bakterilerden önemli ölçüde etkilenir. Bu nedenle, N-halaminlerin sentezlenmesi öncesinde bazı koşullarda (yani ısı, ışık, pH, su, bakteri vb.) stabiliteyi önceden değerlendirmek çok önemlidir.

N-halamin ajanının çalışma prensibi gereği malzemenin halojenleşmeden sonra gösterdiği güçlü antibakteriyel özellik, bakteri ile etkileşiminden sonra zayıflamaktadır [151, 152]. Bu zayıflama oksidatif halojen (klor) atomlarının bakteri hücresine transfer olmasıyla gerçekleşir. Antibakteriyel etkinliğini yitiren malzemenin fonksiyonel gruplarının tekrar aynı özelliği gösterebilmesi için yeniden klorlanması gerekmektedir. Bu nedenle kriyojellerin fonksiyonel olarak aktifleşme kabiliyetinin ölçülmesi adına tekrarlı klorlama testi yapılmıştır. Tekrarlı klorlama testi pH 7'de 15 dk klorlama süresi esas alınarak 5 adet küre formdaki kriyojele uygulanmıştır. Elde edilen veriler Şekil 3.8'de gösterilmektedir.



Şekil 3.8 : Tekrarlı klorlama kabiliyeti.

6 döngü "söndürme-yeniden halojenleme" işleminden sonra, klor içeriğinin yaklaşık %1 oranında stabil olduğu görülmüştür. Kriyojellerin kullanım ömrünü açıkça ortaya koyan bu test, kriyojellerin ilk klor yükleme değerlerine ulaşabilmesinin mümkün olduğunu ve biyosidal aktiviteye sahip olacağını doğrulamıştır.

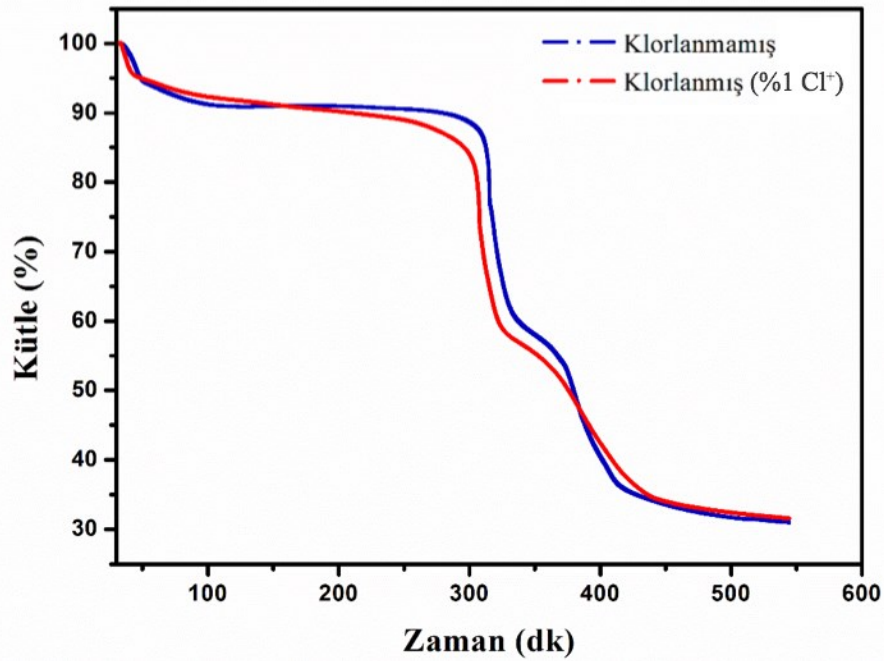
Pratik uygulamalarda özellikle UV ışığında N-halaminlerin stabilitesini incelemek önemlilik arz etmektedir. UV ışığına maruz kalan N-halaminler genellikle ayrışmaya meyillidir, oysa klor içermeyen yapılar kolayca bozulmazlar [153, 154]. Bunun sebebi alifatik N-halamin bileşiğinin alfa hidrojenine sahip olması ve UV ışığına maruz kaldığında dehidrohalojelasyon olup halejenleşme özelliğini kaybetmesidir. Kriyojel sentezinde kullanılan akrilamid monomerlerinin yapısında sayıca fazla alfa hidrojeni bulunmaktadır. Bu sebeple kriyojeller 1, 2, 3 ve 6 saat olmak üzere UV ışığına maruz bırakılmıştır. Çizelge 3.3'te klorlanmış kriyojellerin UV ışık stabilitesinin sonuçlarını göstermektedir. 6 saat UV ışığına maruz kalan kriyojellerin başlangıç klor miktarının yaklaşık %50'sini kaybettiği ancak tekrar klorlama işlemi sonrasında yüklenen klor miktarının ilk klor miktarına ulaştığı görülmüştür.

N – Cl bağı sıcaklığa çok duyarlı olduğundan N-halaminlerin kararlılığını belirleyen diğer bir etken sıcaklıktır [155, 156]. Bu yüzden N-halaminlerin termal özelliklerinin belirlenmesi için ısı varlığında stabilitesinin kontrol edilmesi önemlidir. N-halaminler moleküller arası hidrojen bağına sahip değildir. Bu nedenle, N-halamin oluşumunda klor atomlarının kullanılması, termal stabilitesini azaltmaktadır [148, 156, 157].

Çizelge 3.3 : UV ışığının klor üzerindeki etkisi.

Maruz kalma süresi (saat)	Cl ⁺ (%)
0	1,06 ±0,128
1	1,02 ±0,021
2	0,68 ±0,039
3	0,67 ±0,018
6	0,58 ±0,044
Tekrar Klorlama	1,05 ±0,013

Şekil 3.9’da klorlanmamış ve klorlanmış kriyojellerin TGA grafikleri gösterilmektedir. Başlangıçta her iki kriyojel örneğinde de nem kaybından dolayı ağırlık kaybının olduğu ancak beklenildiği üzere klorlu kriyojelde bu kaybın daha az miktarda olduğu gözlemlenmiştir. Klorlanmış kriyojel örneğinde zincirler arasında daha az hidrojen bağı olmasından dolayı bozunma nispeten daha düşük bir sıcaklıkta başlamıştır. Klorlanmış kriyojelin kül miktarının yaklaşık %1 oranında daha fazla olması kütlece %1 klor yüklendiğini teyit etmektedir.

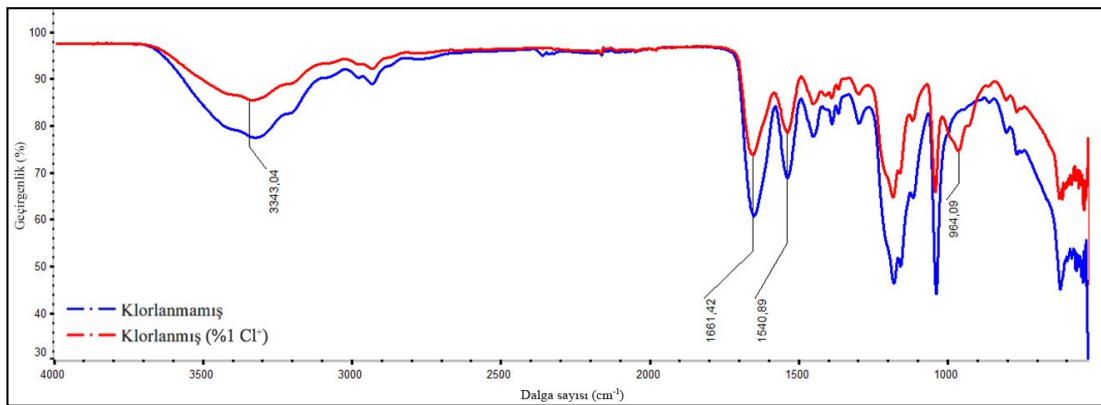


Şekil 3.9 : Kriyojellere ait TGA grafiği.

3.5 FT-IR Analizi

Sentezlenen kriyojellerin FT-IR analizi ile kimyasal yapıları karakterize edilmiştir. Kriyojel numunesine ait spektrumda 3 farklı monomerin de karakteristik titreşim bantları gözlemlenmiştir. Şekil 3.10'da görüldüğü üzere yaklaşık 1600cm^{-1} 'lerde amid yapısında bulunan C=O grubuna ait titreşim bandına, 1540cm^{-1} 'lerde N-H gruplarına ait eğilme [72], 3302 ve 3305cm^{-1} 'lerde N-H gruplarına ait gerilme ve 1039cm^{-1} 'de S=O grubuna ait gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir [71]. Buna ilaveten vinil gruplarına ait olan gerilme titreşimlerinin görülmemesi ve monomer yapısında görülen karakteristik titreşimlerin yayvanlaşması çift bağların açılarak polimerleşmenin tamamlandığını desteklemektedir.

Klorlama işlemiyle N-H gruplarının bir kısmı N-Cl grubuna dönüştüğü için 3200cm^{-1} ve 3400cm^{-1} aralığındaki bandın şiddeti azalmıştır. Benzer şekilde klorlanmış kriyojel spektrumunda 1540cm^{-1} 'de görülen N-H eğilme titreşimlerinin şiddetinin klorlanmamış kriyojel spektrumuna göre daha zayıf olması yine N-H yapısının N-Cl yapısına dönüştüğünü desteklemektedir. Bununla birlikte amid karbonil gruplarına ait olan gerilme titreşimlerinin klorlamadan sonra daha yüksek dalga boyuna 1661cm^{-1} 'e kaydığı görülmektedir. Bu durum N-halamin bileşiklerinde yaygınca görülüp, klor ile yüklenen azot atomu üzerindeki elektron yoğunluğunun azalması ile rezonans yapısına olan etkisinin zayıflamasının sonucudur [47].



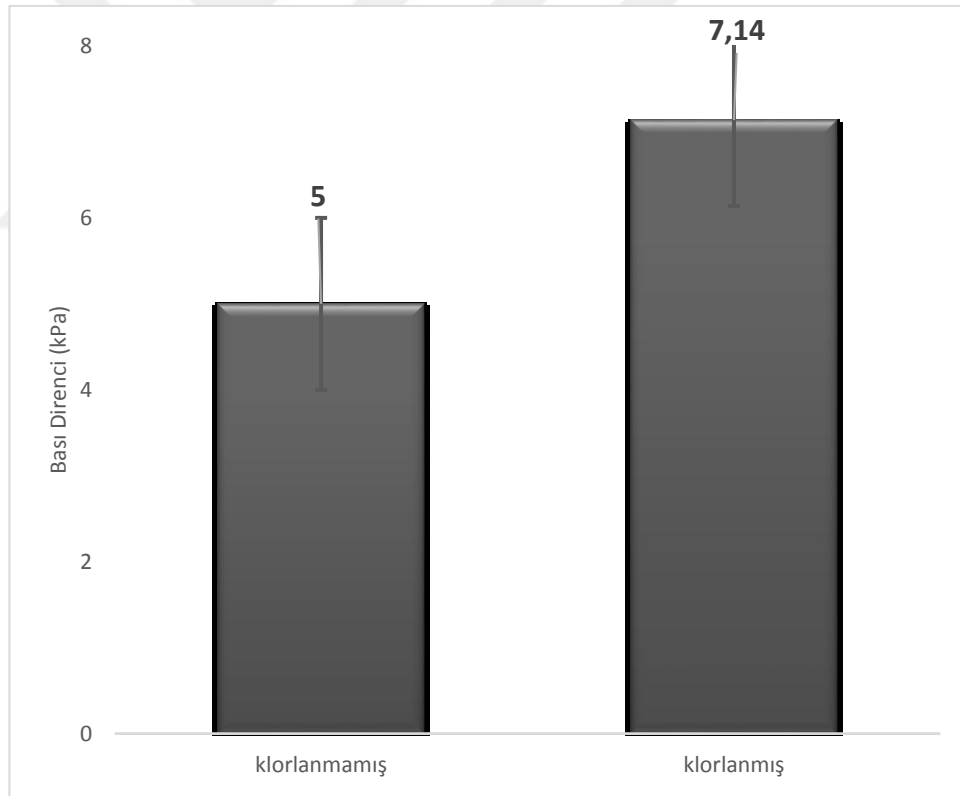
Şekil 3.10 : Kriyojellere ait FT-IR spektrumu.

Buna ilaveten klorlanmış numunede 964 ve 910cm^{-1} dalga boyunda iki adet yeni pik oluşumu gözlenmektedir. Literatüre göre bu pikler halkasız yapıdaki N-halamin gruplarının bozunmaya yatkınlığının bir sonucudur. Nitekim tekrarlı klorlama işlemleri sonucunda numune miktarının azalması ve SEM görüntülerindeki gözenek yapısının değişimi bir miktar bozunmanın gerçekleştiğini doğrulamaktadır [158, 159].

Sonuç olarak, FT-IR spektrumları, kriyojelin başarılı bir şekilde sentezlendiğini ve ardından klor yüklemesi ile klorun yapıya bağlandığını desteklemektedir.

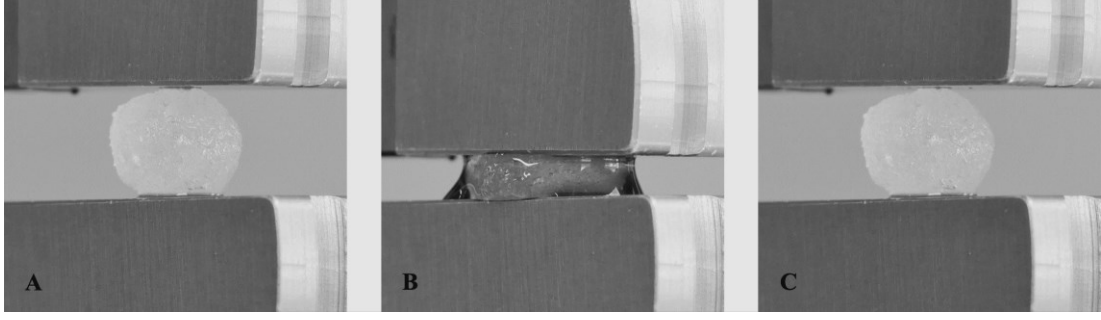
3.6 Mekanik Ölçümler

Klorlanmış ve klorlanmamış kriyojeller bası testine tabi tutulmuştur ve elde edilen sonuçlar Şekil 3.11’de verilmiştir. Tüm kriyojeller suda şiştikten sonra bası dirençleri ölçülmüştür. Testten önce suda bekletilen numunelerin çapları 5 mm ile 9 mm arasında değişmektedir. Kriyojellerin her birinin hacimce %70 deformasyona uğradığı andaki direnç değerleri karşılaştırılmıştır. Klorlanmamış kriyojellerin ortalama bası direnci 5 kPa olarak ölçümlenirken, klorlanmış olanlar için ise bu değer 7,14 kPa’dır. Klorlanmış numunenin bası direncindeki artışın daha az su absorblamasından ve SEM görüntülerinde açıkça görülen gözenek yapısındaki deformasyon sonucunda oluşan kabuklaşmadan kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 3.11 : Kriyojellerin bası direnci.

Kuvvet altındaki kriyojelin içinde bulunan su devamlı gözenek yapısından dolayı yapıyı hızlı bir şekilde terk ederek, kriyojellerin parçalanmasına engel olmaktadır. Bu durum Şekil 3.12’de verilen bası testi esnasında alınan görsellerle doğrulanmıştır.



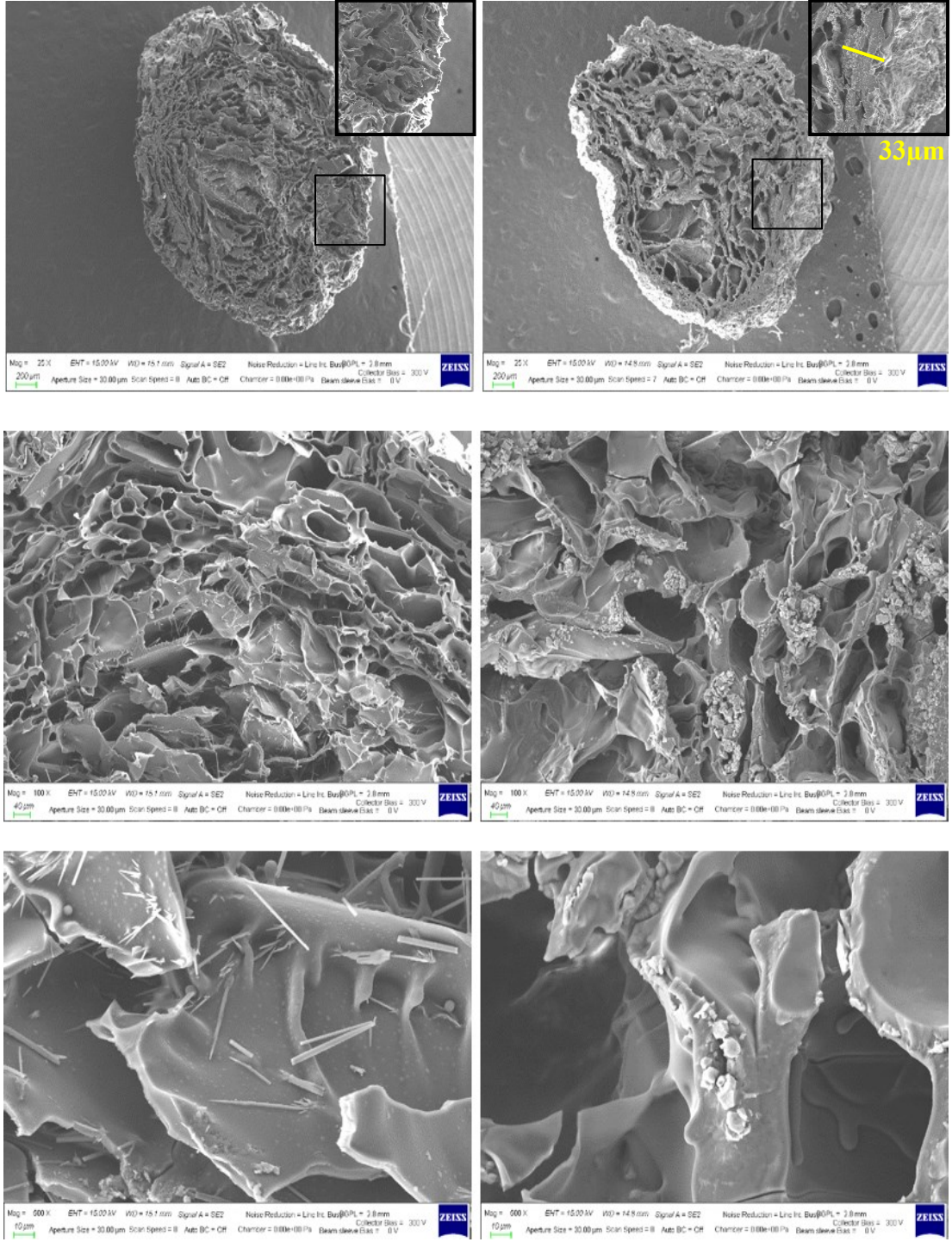
Şekil 3.12 : Bası testi öncesi (A), %70 Deformasyon (B), Bası testi sonrası (C) klorlanmamış kriyojelden emilen suyun çıkışı ve geri emilimi.

3.7 Yüzey Karakterizasyonu

Kriyojellerinin morfolojik özelliklerini incelemek için taramalı elektron mikroskopuyla (SEM) görüntüleri çekilmiştir. SEM analizleri, kuru durumdaki jel numunelerinin altın-paladyum ile kaplanmasının ardından gerçekleştirilmiştir. Elde edilen görüntüler 3 farklı büyütme oranıyla (x25, x100 ve x500) Şekil 3.13'te verilmiştir. Aynı zamanda EDS analizleri yapılmıştır. Beklenildiği üzere klorlanmamış ve klorlu kriyojelerle ait SEM görüntülerinde 3 boyutlu ağ yapı içinde birbirine bağlı gözeneklerin heterojen şekilde dağılmış olduğu görülmüştür. Klorlanmış kriyojel örneklerinin üzerinde klorun yapıya bağlandığı açık bir şekilde görülmektedir. Klorlama işlemi sonrası küre formdaki kriyojel örneğinin dış çeperdeki gözeneklerinde yaklaşık 33 μm kapanma ve iç gözeneklerde ise daha büyük çapta gözeneklerin olduğu tespit edilmiştir. Bu morfolojik değişimin bozunmadan kaynaklanmış olabileceği öngörülmektedir. Ayrıca taramalı elektron mikroskopu analizi ile kalitatif olarak gözenek yapısı hakkında bilgi almanın yanı sıra gözenek çapları da ölçülmüştür. SEM görüntülerinden 10 farklı gözenek çapı ölçülerek ortalama bir gözenek boyutu belirlenmiştir. Elde edilen bu gözenek çapları μm cinsinden standart sapma değerleriyle birlikte Çizelge 3.4'te verilmiştir.

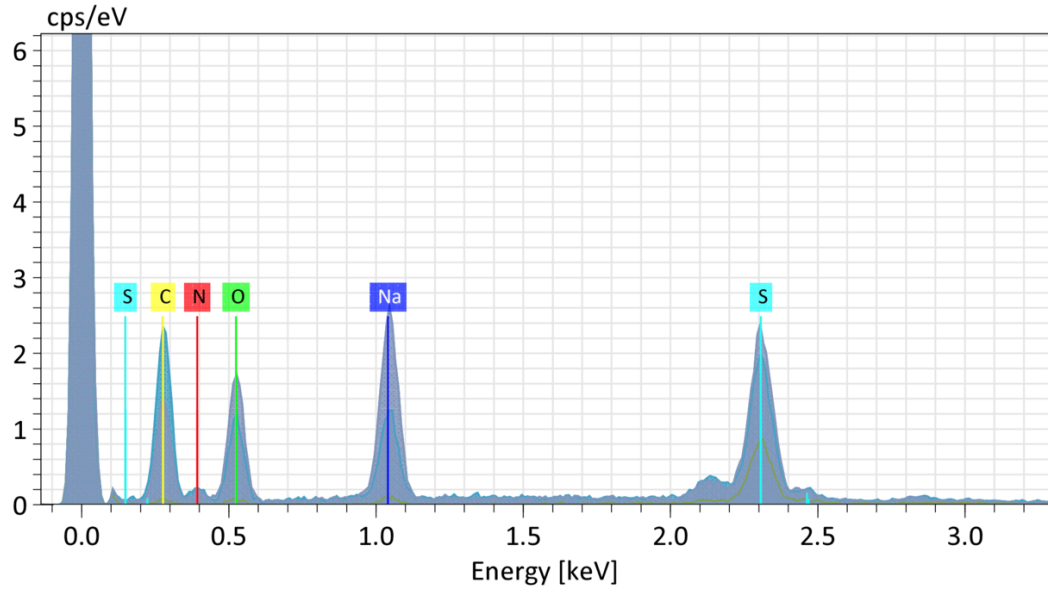
Çizelge 3.4 : Kriyojellerin gözenek çapları.

	Gözenek Boyutu (μm)
Klorlanmamış kriyojel	60,99±21,05
Klorlanmış Kriyojel	131,24±47,50

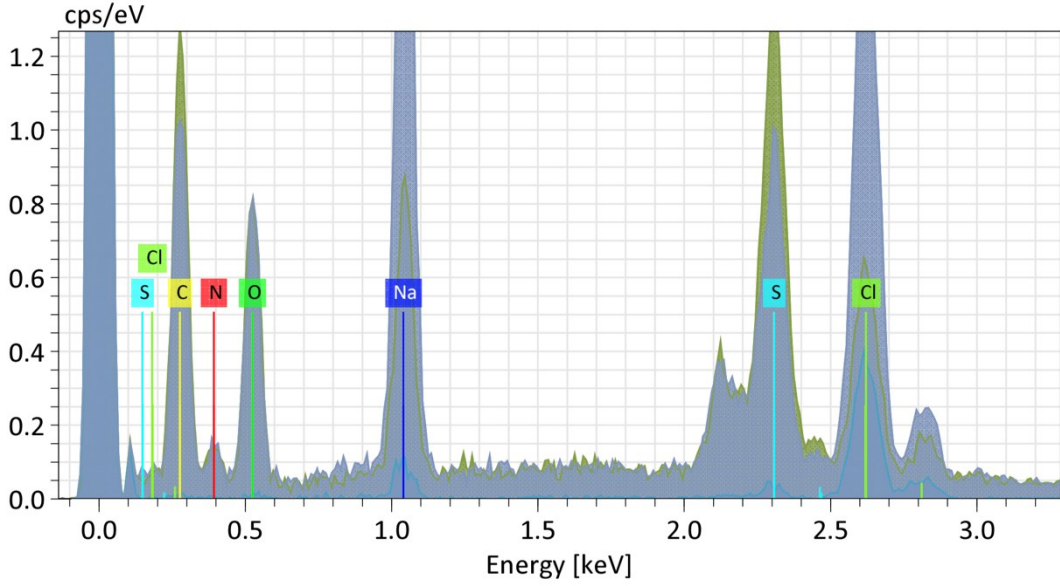


Şekil 3.13 : Farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri.

Diğer taraftan EDS yardımıyla kriyojellerin gelişi güzel seçilen bazı noktadaki elementel bileşimi karakterize edilerek klorlanmış ve klorlanmamış kriyojellerin sonuçları sırasıyla Şekil 3.14 ve Şekil 3.15'te gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre klorlanmış numunelerde klor atomuna ait kırınımlar yer almaktadır.



Şekil 3.14 : Klorlanmamış kriyojelin EDS spektrumu.



Şekil 3.15 : Klorlanmış kriyojelin EDS spektrumu.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında küre formunda, çok hızlı su absorplayabilen ve klor depolayabilen kriyojeller başarılı bir şekilde üretilmiştir. Kriyojellerin üretimi sırasında karıştırma hızının ve sıcaklığın küre formu oluşumu üzerindeki etkileri incelenerek 50 rpm karıştırma hızı ve -8 °C sıcaklık optimum üretim şartları olarak belirlenmiş ve tez çalışmasındaki tüm testlerde bu şartlarda üretilen kriyojeller kullanılmıştır.

Literatürdeki çalışmalardan faydalanılarak biyosidal etkinlik açısından kriyojellerde %1'lik klor depolama kapasitesi hedeflenmiştir. Üretilen kriyojellerin klor depolama kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla farklı pH ve sürelerde klorlama işlemi uygulanmış, pH 7 ve 15 dk klorlama sonrasında kriyojellere %1 klor depolanabildiği tespit edilmiş ve bu değerler optimum klorlama şartları olarak belirlenmiştir. Biyosidal etkinliğin hızı hakkında bilgi edinebilmek amacıyla üretilen kriyojellerin klor salınımları titrasyon yöntemiyle gözlemlenmiş ve kriyojellerin gözenekli yapıları nedeniyle 15 dk gibi kısa bir sürede yapılarındaki klorun neredeyse tamamını salabildikleri tespit edilmiştir. Sentezlenen kriyojellerin hem hızlı bir şekilde klorlanıp hem de yapılarındaki kloru hızlı bir şekilde salabilmeleri tez hipotezimizi doğrular niteliktedir.

Klorlanmış ve klorlanmamış kriyojellerin su absorpsiyon ve desorpsiyon davranışları incelenerek klorlama işleminin etkisi incelenmiştir. Yapılan testler sonucunda klorlama işlemi yapılmış kriyojellerin yapısındaki hidrojen bağı yapabilecek grup sayısı azaldığından su absorplama kapasitesinin düştüğü görülmüştür. SEM sonuçları ile de doğrulanan yüzeye yakın bölgelerdeki gözenek defomasyonu nedeniyle klorlanmış kriyojellerin su absorpsiyon ve desorpsiyon hızlarının düştüğü belirlenmiştir.

N-halamin esaslı kriyojellerin tekrarlı klorlanabilme, UV ve sıcaklık dayanımı özellikleri test edilmiştir. Yapılan tekrarlı klorlama işlemi ile 6 döngü halojenleme işlemine dayanabilecek kriyojellerin sentezlenebildiği ve ayrıca 6 saat uv ışığına maruz bırakılan kriyojellerin depoladıkları kloru %50 oranında kaybetmesine rağmen

tekrar klorlama ile başlangıçtaki klor miktarına ulaştığı yani yeniden klorlanabilme özelliği olduğu bulgusuna varılmıştır. Ancak klorlama işleminin malzemenin sıcaklık dayanımını yapıdaki hidrojen bağı oranını azalttığından olumsuz etkilediği görülmüştür.

Kriyojellerin mekanik davranışları bası testleri ile analiz edilmiştir. Klorlanmış numunlerin daha az su absorplamaları ve gözenek yapılarındaki deformasyon nedeniyle klorlanmamış numunelere göre bası direncinin arttığı görülmüştür.

Üretilen kriyojellerin kimyasal yapıları ve morfolojik özellikleri sırasıyla FT-IR ve SEM analizleri ile incelenmiştir. Yapının klor depolayabildiği EDS ve FT-IR analizleri ile doğrulanmıştır. Klorlama işleminin kriyojellerin dış çeperdeki gözenek yapılarını deforme ettiği ayrıca klorlamanın iç kısımdaki gözenek boyutlarında artışa ve jel yapıda bir miktar bozunmaya sebep olduğu SEM görüntüleri ve FT-IR analizleriyle ortaya konulmuştur.

Elde edilen sonuçlar ışığında yapılacak olan bilimsel çalışmalarda farklı monomerler kullanılarak yapının kararlılığı arttırılabilir. Kriyojellerin antibakteriyel etkinlik göstermedeki başarısı test edilebilir. Ayrıca kullanım alanına göre mekanik özellikler geliştirilebilir.

KAYNAKLAR

- [1] **O’neill, J.**, (2016). Review on antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. 2014, *HM Gov. London*.
- [2] **Pechook, S., Sudakov, K., Polishchuk, I., Ostrov, I., Zakin, V., Pokroy, B., & Shemesh, M.**, (2015). Bioinspired passive anti-biofouling surfaces preventing biofilm formation, *J. Mater. Chem. B*.
- [3] **Asri, L. A. T. W., Crismaru, M., Roest, S., Chen, Y., Ivashenko, O., Rudolf, P., Tiller, J. C., Van Der Mei, H. C., Loontjens, T. J. A., & Busscher, H. J.**, (2014). A Shape-adaptive, Antibacterial-coating of immobilized Quaternary-ammonium compounds tethered on hyperbranched polyurea and its mechanism of action, *Adv. Funct. Mater.*
- [4] **Isquith, A. J., Abbott, E. A., & Walters, P. A.**, (1972). Surface-bonded antimicrobial activity of an organosilicon quaternary ammonium chloride., *Appl. Microbiol.*
- [5] **Zohuriaan, M. J. & Kabiri, K.**, (2008). Superabsorbent Polymer Materials: A Review, *Iran. Polym. J.*
- [6] **Matsuda, T., Nakajima, T., Fukuda, Y., Hong, W., Sakai, T., Kurokawa, T., Chung, U. Il, & Gong, J. P.**, (2016). Yielding Criteria of Double Network Hydrogels, *Macromolecules*.
- [7] **Kopeček, J.**, (2007). Hydrogel biomaterials: A smart future?, *Biomaterials*.
- [8] **Haque, M. A., Kurokawa, T., & Gong, J. P.**, (2012). Super tough double network hydrogels and their application as biomaterials, *Polymer*. 2012.
- [9] **Topuz, F. & Okay, O.**, (2009). Macroporous hydrogel beads of high toughness and superfast responsivity, *React. Funct. Polym.*
- [10] **Yu, H., Zhang, X., Zhang, Y., Liu, J., & Zhang, H.**, (2013). Development of a hydrophilic PES ultrafiltration membrane containing SiO₂@N-Halamine nanoparticles with both organic antifouling and antibacterial properties, *Desalination*.
- [11] **Li, R., Hu, P., Ren, X., Worley, S. D., & Huang, T. S.**, (2013). Antimicrobial N-halamine modified chitosan films, *Carbohydr. Polym.*
- [12] **Hui, F. & Debiemme-Chouvy, C.**, (2013). Antimicrobial N-halamine polymers and coatings: A review of their synthesis, characterization, and applications, *Biomacromolecules*. 2013.
- [13] **NIAID**, (2006). Staphylococcus aureus (spherical) and Escherichia coli (rod) looking bacteria, 2006. <https://www.niaid.nih.gov>. [Erişim Tarihi: 22-Jul-2019].
- [14] **Tripathi, A. & Kumar, A.**, (2011). Multi-Featured Macroporous Agarose–Alginate Cryogel: Synthesis and Characterization for Bioengineering

Applications, *Macromol. Biosci.*, vol. 11, no. 1, pp. 22–35.

- [15] **Zhang, X., Wang, L., & Levänen, E.**, (2013). Superhydrophobic surfaces for the reduction of bacterial adhesion, *RSC Advances*. 2013.
- [16] **Yuan, Y., Hays, M. P., Hardwidge, P. R., & Kim, J.**, (2017). Surface characteristics influencing bacterial adhesion to polymeric substrates, *RSC Adv*.
- [17] **Murata, H., Koepsel, R. R., Matyjaszewski, K., & Russell, A. J.**, (2007). Permanent, non-leaching antibacterial surfaces-2: How high density cationic surfaces kill bacterial cells, *Biomaterials*.
- [18] **Fuchs, A. D. & Tiller, J. C.**, (2006). Contact-active antimicrobial coatings derived from aqueous suspensions, *Angew. Chemie - Int. Ed*.
- [19] **Miller, D. J., Dreyer, D. R., Bielawski, C. W., Paul, D. R., & Freeman, B. D.**, (2017). Surface Modification of Water Purification Membranes, *Angewandte Chemie - International Edition*. 2017.
- [20] **Campoccia, D., Montanaro, L., & Arciola, C. R.**, (2013). A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces, *Biomaterials*. 2013.
- [21] **Wiarachai, O., Thongchul, N., Kiatkamjornwong, S., & Hoven, V. P.**, (2012). Surface-quaternized chitosan particles as an alternative and effective organic antibacterial material, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*.
- [22] **Kenawy, E. R., Worley, S. D., & Broughton, R.**, (2007). The chemistry and applications of antimicrobial polymers: A state-of-the-art review, *Biomacromolecules*. 2007.
- [23] **Ganewatta, M. S., Miller, K. P., Singleton, S. P., Mehrpouya-Bahrami, P., Chen, Y. P., Yan, Y., Nagarkatti, M., Nagarkatti, P., Decho, A. W., & Tang, C.**, (2015). Antibacterial and Biofilm-Disrupting Coatings from Resin Acid-Derived Materials, *Biomacromolecules*.
- [24] **Larson, A. M. & Klibanov, A. M.**, (2013). Biocidal Packaging for Pharmaceuticals, Foods, and Other Perishables, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng*.
- [25] **Zhang, Z., Wang, J., Tu, Q., Nie, N., Sha, J., Liu, W., Liu, R., Zhang, Y., & Wang, J.**, (2011). Surface modification of PDMS by surface-initiated atom transfer radical polymerization of water-soluble dendronized PEG methacrylate, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*.
- [26] **Gao, J., Huddleston, N. E., White, E. M., Pant, J., Handa, H., & Locklin, J.**, (2016). Surface Grafted Antimicrobial Polymer Networks with High Abrasion Resistance, *ACS Biomater. Sci. Eng*.
- [27] **Nogueira, F., Granadeiro, L., Mouro, C., & Gouveia, I. C.**, (2016). Antimicrobial and antioxidant surface modification toward a new silk-fibroin (SF)-l-Cysteine material for skin disease management, *Appl. Surf. Sci*.
- [28] **Wischerhoff, E., Badi, N., Laschewsky, A., & Lutz, J. F.**, (2010). Smart polymer surfaces: Concepts and applications in biosciences, *Adv. Polym. Sci*.
- [29] **Perelshtein, I., Applerot, G., Perkash, N., Guibert, G., Mikhailov, S., & Gedanken, A.**, (2008). Sonochemical coating of silver nanoparticles on textile fabrics (nylon, polyester and cotton) and their antibacterial activity, *Nanotechnology*.

- [30] **Shimanovich, U., Cavaco-Paulo, A., Nitzan, Y., & Gedanken, A.**, (2012). Sonochemical coating of cotton and polyester fabrics with “antibacterial” BSA and casein spheres, *Chem. - A Eur. J.*
- [31] **Tzhayik, O., Lipovsky, A., & Gedanken, A.**, (2017). Sonochemical fabrication of edible fragrant antimicrobial nano coating on textiles and polypropylene cups, *Ultrason. Sonochem.*
- [32] **Dong, H., Wang, D., Sun, G., & Hinestroza, J. P.**, (2008). Assembly of metal nanoparticles on electrospun nylon 6 nanofibers by control of interfacial hydrogen-bonding interactions, *Chem. Mater.*
- [33] **Sato, K. & Anzai, J. I.**, (2013). Dendrimers in layer-by-layer assemblies: Synthesis and applications, *Molecules*. 2013.
- [34] **Kim, H. W., Kim, B. R., & Rhee, Y. H.**, (2010). Imparting durable antimicrobial properties to cotton fabrics using alginate-quaternary ammonium complex nanoparticles, *Carbohydr. Polym.*
- [35] **Yatvin, J., Gao, J., & Locklin, J.**, (2014). Durable defense: Robust and varied attachment of non-leaching poly"-onium" bactericidal coatings to reactive and inert surfaces, *Chem. Commun.*
- [36] **Tian, F., Decker, E. A., & Goddard, J. M.**, (2013). Controlling lipid oxidation of food by active packaging technologies, *Food and Function*. 2013.
- [37] **Appendini, P. & Hotchkiss, J. H.**, (2002). Review of antimicrobial food packaging, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*
- [38] **Zhao, L., Chu, P. K., Zhang, Y., & Wu, Z.**, (2009). Antibacterial coatings on titanium implants, *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*. 2009.
- [39] **Siedenbiedel, F. & Tiller, J. C.**, (2012). Antimicrobial polymers in solution and on surfaces: overview and functional principles, *Polymers (Basel)*., vol. 4, no. 1, pp. 46–71.
- [40] **Kroll, R. G. & Patchett, R. A.**, (1991). Biocide-induced perturbations of aspects of cell homeostasis: intracellular pH, membrane potential and solute transport, *Soc. Appl. Bacteriol. Tech. Ser.*, vol. 27, pp. 189–202.
- [41] **Singer, S. J. & Nicolson, G. L.**, (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science (80-)*.
- [42] **Denyer, S. P. & Stewart, G. S. A. B.**, (1998). Mechanisms of action of disinfectants, in *International Biodeterioration and Biodegradation*, 1998.
- [43] **Kou, L.**, (2009). Preparation and Application of Regenerable N-halamine Biocidal Materials. 2009.
- [44] **Wu, R.**, (2004). *Preparation, bioactivity, and application of novel biocidal materials*. 2004.
- [45] **Maillard, J. Y.**, (2002). Bacterial target sites for biocide action., *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.*
- [46] **Sun, Y. & Sun, G.**, (2004). Novel Refreshable N -Halamine Polymeric Biocides: N-Chlorination of Aromatic Polyamides, *Ind. Eng. Chem. Res.*
- [47] **Jacangelo, J. G., Olivieri, V. P., & Kawata, K.**, (1987). Oxidation of

sulfhydryl groups by monochloramine, *Water Res.*

- [48] **Mara, D. & Horan, N.**, (2003). *Handbook of Water and Wastewater Microbiology*. 2003.
- [49] **Mulder, G. D., Cavorsi, J. P., & Lee, D. K.**, (2007). Polyhexamethylene Biguanide (PHMB): An Addendum to Current Topical Antimicrobials., *Wounds a Compend. Clin. Res. Pract.*
- [50] **Gao, Y. & Cranston, R.**, (2008). Recent Advances in Antimicrobial Treatments of Textiles, *Text. Res. J.*
- [51] **Belyaev, E. Y.**, (2000). New medical materials based on modified polysaccharides, *Pharm. Chem. J.*, vol. 34, no. 11, pp. 607–612.
- [52] **El-Rafie, M. H., Mohamed, A. A., Shaheen, T. I., & Hebeish, A.**, (2010). Antimicrobial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on cotton fabrics, *Carbohydr. Polym.*
- [53] **Ravi Kumar, M. N. V.**, (2000). A review of chitin and chitosan applications, *Reactive and Functional Polymers*. 2000.
- [54] **Lim, S. H. & Hudson, S. M.**, (2003). Review of chitosan and its derivatives as antimicrobial agents and their uses as textile chemicals, *Journal of Macromolecular Science - Polymer Reviews*. 2003.
- [55] **Tischer, M., Pradel, G., Ohlsen, K., & Holzgrabe, U.**, (2012). Quaternary ammonium salts and their antimicrobial potential: Targets or nonspecific interactions?, *ChemMedChem*. 2012.
- [56] **Thorsteinsson, T., Másson, M., Kristinsson, K. G., Hjálmarsdóttir, M. A., Hilmarsson, H., & Loftsson, T.**, (2003). Soft antimicrobial agents: Synthesis and activity of labile environmentally friendly long chain quaternary ammonium compounds, *J. Med. Chem.*
- [57] **Muñoz-Bonilla, A. & Fernández-García, M.**, (2012). Polymeric materials with antimicrobial activity, *Progress in Polymer Science (Oxford)*. 2012.
- [58] **Jiao, Y., Niu, L. na, Ma, S., Li, J., Tay, F. R., & Chen, J. hua**, (2017). Quaternary ammonium-based biomedical materials: State-of-the-art, toxicological aspects and antimicrobial resistance, *Progress in Polymer Science*. 2017.
- [59] **Buffet-Bataillon, S., Tattevin, P., Bonnaure-Mallet, M., & Jolivet-Gougeon, A.**, (2012). Emergence of resistance to antibacterial agents: The role of quaternary ammonium compounds - A critical review, *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2012.
- [60] **Gozzelino, G., Romero Tobar, D. E., Chaitiemwong, N., Hazeleger, W., & Beumer, R.**, (2011). Antibacterial Activity of Reactive Quaternary Ammonium Compounds in Solution and in Nonleachable Coatings, *J. Food Prot.*
- [61] **Saif, M. J., Anwar, J., & Munawar, M. A.**, (2009). A novel application of quaternary ammonium compounds as antibacterial hybrid coating on glass surfaces, *Langmuir*.
- [62] **Huang, J., Koepsel, R. R., Murata, H., Wu, W., Lee, S. B., Kowalewski, T., Russell, A. J., & Matyjaszewski, K.**, (2008). Nonleaching antibacterial glass surfaces via “grafting onto”: The effect of the number of quaternary ammonium

groups on biocidal activity, *Langmuir*.

- [63] **Jiang, Z., Liu, Y., Li, R., Ren, X., & Huang, T. S.**, (2016). Preparation of antibacterial cellulose with a monochloro-s-triazine-based N-halamine biocide, *Polym. Adv. Technol.*
- [64] **Fan, X., Ren, X., Huang, T. S., & Sun, Y.**, (2016). Cytocompatible antibacterial fibrous membranes based on poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and quaternarized N-halamine polymer, *RSC Adv.*
- [65] **Cerkez, I., Kocer, H. B., Worley, S. D., Broughton, R. M., & Huang, T. S.**, (2016). Antimicrobial functionalization of poly(ethylene terephthalate) fabrics with waterborne N-halamine epoxides, *J. Appl. Polym. Sci.*
- [66] **Gottardi, W., Debabov, D., & Nagl, M.**, (2013). N-Chloramines, a Promising Class of Well-Tolerated Topical Anti-Infectives, *Antimicrob. Agents Chemother.*
- [67] **Tiedje, K. E. & Weaver, D. F.**, (2008). Deducing the bioactive face of hydantoin anticonvulsant drugs using NMR spectroscopy, *Can. J. Neurol. Sci.*
- [68] **Scholl, S., Koch, A., Henning, D., Kempter, G., & Kleinpeter, E.**, (1999). The Influence of Structure and Lipophilicity of Hydantoin Derivatives on Anticonvulsant Activity, *Struct. Chem.*
- [69] **Nakae, T.**, (1976). Outer membrane of Salmonella. Isolation of protein complex that produces transmembrane channels, *J. Biol. Chem.*
- [70] **Kocer, H. B.**, (2009). Synthesis, Structure-Bioactivity Relationship, and Application of Antimicrobial Materials. 2009.
- [71] **Nagar, R.**, (1989). Structural and microbial studies of some transition metal complexes, *J. Inorg. Biochem.*
- [72] **Chen, Z. & Sun, Y.**, (2006). N-halamine-based antimicrobial additives for polymers: Preparation, characterization, and antimicrobial activity, in *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 2006.
- [73] **Liu, W., Liu, X., Knaebel, D., Luck, L., & Li, Y.**, (1998). Synthesis and antibacterial evaluation of novel water-soluble organic peroxides, *Antimicrob. Agents Chemother.*
- [74] **Kocer, K. B., Akdag, A., Ren, X., Broughton, R. M., Worley, S. D., & Huang, T. S.**, (2008). Effect of alkyl derivatization on several properties of N-halamine antimicrobial siloxane coatings, *Ind. Eng. Chem. Res.*
- [75] **Akdag, A., Okur, S., McKee, M. L., & Worley, S. D.**, (2006). The stabilities of N-Cl bonds in biocidal materials, *J. Chem. Theory Comput.*
- [76] **Qian, L. & Sun, G.**, (2003). Durable and regenerable antimicrobial textiles: Synthesis and applications of 3-methylol-2,2,5,5-tetramethylimidazolidin-4-one (MTMIO), *J. Appl. Polym. Sci.*
- [77] **Worley, S. D., Williams, D. E., & Crawford, R. A.**, (1988). Halamine water disinfectants, *Crit. Rev. Environ. Control*, vol. 18, no. 2, pp. 133–175.
- [78] **Kaminski, J. J., Bodor, N., & Higuchi, T.**, (1976). N-halo derivatives III: Stabilization of nitrogen-chlorine bond in N-chloroamino acid derivatives, *J. Pharm. Sci.*, vol. 65, no. 4, pp. 553–557.

- [79] **Liang, J., Chen, Y., Ren, X., Wu, R., Barnes, K., Worley, S. D., Broughton, R. M., Cho, U., Kocer, H., & Huang, T. S.**, (2007). Fabric treated with antimicrobial N-halamine epoxides, *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 46, no. 20, pp. 6425–6429.
- [80] **Almdal, K., Dyre, J., Hvidt, S., & Kramer, O.**, (1993). Towards a phenomenological definition of the term “gel,” *Polym. Gels Networks*.
- [81] **Rathod, H. J. & Mehta, D. P.**, (2015). A Review on Pharmaceutical Gel, *Acta Sci. Int. J. Pharm. Sci. Cit. Int. J. Pharm. Sci.*
- [82] **Osada, Y. & Khokhlov, A.**, (2001). *Polymer gels and networks*. CRC Press, 2001.
- [83] **Dubin, P., Osada, Y., & Bohidar, H. B.**, (2003). *Polymer gels: fundamentals and applications*. American Chemical Society, 2003.
- [84] **Sahoo, S., Kumar, N., Bhattacharya, C., Sagiri, S. S., Jain, K., Pal, K., Ray, S. S., & Nayak, B.**, (2011). Organogels: Properties and applications in drug delivery, *Designed Monomers and Polymers*. 2011.
- [85] **García-González, C. A., Alnaief, M., & Smirnova, I.**, (2011). Polysaccharide-based aerogels - Promising biodegradable carriers for drug delivery systems, *Carbohydrate Polymers*. 2011.
- [86] **Lozinsky, V. I.**, (2002). Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and application, *Russ. Chem. Rev.*
- [87] **Galaev, I. & Mattiasson, B.**, (2007). *Smart polymers: applications in biotechnology and biomedicine*. CRC Press, 2007.
- [88] **Suzuki, M. & Hirasa, O.**, (1993). An approach to artificial muscle using polymer gels formed by micro-phase separation, in *responsive gels: volume transitions II*, Springer, 1993, pp. 241–261.
- [89] **Urban, G. A. & Weiss, T.**, (2009). Hydrogels for biosensors, in *Hydrogel sensors and actuators*, Springer, 2009, pp. 197–220.
- [90] **Ak, F., Oztoprak, Z., Karakutuk, I., & Okay, O.**, (2013). Macroporous silk fibroin cryogels, *Biomacromolecules*, vol. 14, no. 3, pp. 719–727.
- [91] **Sing, K. S. W.**, (1985). Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity (Recommendations 1984), *Pure Appl. Chem.*, vol. 57, no. 4, pp. 603–619.
- [92] **Mattiasson, B., Kumar, A., & Galeaev, I. Y.**, (2009). *Macroporous polymers: production properties and biotechnological/biomedical applications*. CRC Press, 2009.
- [93] **Patel, V. R. & Amiji, M. M.**, (1996). Preparation and characterization of freeze-dried chitosan-poly (ethylene oxide) hydrogels for site-specific antibiotic delivery in the stomach, *Pharm. Res.*, vol. 13, no. 4, pp. 588–593.
- [94] **Cooper, A. I.**, (2000). Polymer synthesis and processing using supercritical carbon dioxide, *Journal of Materials Chemistry*. 2000.
- [95] **Palkovits, R., Althues, H., Ruplecker, A., Tesche, B., Dreier, A., Holle, U., Fink, G., Cheng, C. H., Shantz, D. F., & Kaskel, S.**, (2005). Polymerization of w/o microemulsions for the preparation of transparent SiO₂/PMMA

nanocomposites, *Langmuir*.

- [96] **Kabiri, K., Omidian, H., & Zohuriaan-Mehr, M. J.**, (2003). Novel approach to highly porous superabsorbent hydrogels: Synergistic effect of porogens on porosity and swelling rate, *Polym. Int.*
- [97] **Nam, Y. S. & Park, T. G.**, (1999). Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by thermally induced phase separation, *J. Biomed. Mater. Res.*
- [98] **Bölgen, N., Plieva, F., Galaev, I. Y., Mattiasson, B., & Pişkin, E.**, (2007). Cryogelation for preparation of novel biodegradable tissue-engineering scaffolds, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 18, no. 9, pp. 1165–1179.
- [99] **Lozinsky, V. I., Plieva, F. M., Galaev, I. Y., & Mattiasson, B.**, (2001). The potential of polymeric cryogels in bioseparation, *Bioseparation*. 2001.
- [100] **Lozinsky, V. I., Vainerman, E. S., & Rogozhin, S. V.**, (1982). Study of cryostructurization of polymer systems, *Colloid Polym. Sci.*
- [101] **Plieva, F. M., Kirsebom, H., & Mattiasson, B.**, (2011). Preparation of macroporous cryostructured gel monoliths, their characterization and main applications, *Journal of Separation Science*. 2011.
- [102] **Plieva, F. M., Kumar, A., Galaev, I. Y., & Mattiasson, B.**, (2010). Design of Supermacroporous Biomaterials via Gelation at Subzero Temperatures-Cryogelation, in *Advanced Biomaterials: Fundamentals, Processing, and Applications*, 2010.
- [103] **Plieva, F. M., Andersson, J., Galaev, I. Y., & Mattiasson, B.**, (2004). Characterization of polyacrylamide based monolithic columns, *J. Sep. Sci.*
- [104] **Plieva, F. M., Galaev, I. Y., & Mattiasson, B.**, (2007). Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate-containing fluids and cell culture applications, *Journal of Separation Science*. 2007.
- [105] **Savina, I. N., Ingavle, G. C., Cundy, A. B., & Mikhalovsky, S. V.**, (2016). A simple method for the production of large volume 3D macroporous hydrogels for advanced biotechnological, medical and environmental applications, *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 21154.
- [106] **Flickinger, M. C., Lam, P., & Moore, J.**, (2010). Freezing, Biopharmaceutical Products, in *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, 2010.
- [107] **Saylan, Y. & Denizli, A.**, (2019). Supermacroporous Composite Cryogels in Biomedical Applications, *Gels*, vol. 5, no. 2, p. 20.
- [108] **Kirsebom, H., Topgaard, D., Galaev, I. Y., & Mattiasson, B.**, (2010). Modulating the porosity of cryogels by influencing the nonfrozen liquid phase through the addition of inert solutes, *Langmuir*.
- [109] **Omidian, H., Rocca, J. G., & Park, K.**, (2005). Advances in superporous hydrogels, *J. Control. release*, vol. 102, no. 1, pp. 3–12.
- [110] **Kirsebom, H. & Mattiasson, B.**, (2011). Cryostructuration as a tool for preparing highly porous polymer materials, *Polym. Chem.*, vol. 2, no. 5, pp. 1059–1062.
- [111] **Kuyukina, M. S., Ivshina, I. B., Serebrennikova, M. K., Krivorutchko, A.**

- B., Podorozhko, E. A., Ivanov, R. V, & Lozinsky, V. I.**, (2009). Petroleum-contaminated water treatment in a fluidized-bed bioreactor with immobilized *Rhodococcus* cells, *Int. Biodeterior. Biodegradation*, vol. 63, no. 4, pp. 427–432.
- [112] **Gun'ko, V. M., Savina, I. N., & Mikhalovsky, S. V.**, (2013). Cryogels: morphological, structural and adsorption characterisation, *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 187, pp. 1–46.
- [113] **Çetin, K. & Denizli, A.**, (2015). 5-Fluorouracil delivery from metal-ion mediated molecularly imprinted cryogel discs, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*.
- [114] **Orakdogan, N., Karacan, P., & Okay, O.**, (2011). Macroporous, responsive DNA cryogel beads, *React. Funct. Polym.*
- [115] **Plieva, F. M., Galaev, I. Y., Noppe, W., & Mattiasson, B.**, (2008). Cryogel applications in microbiology, *Trends in Microbiology*. 2008.
- [116] **Kumar, A.**, (2016). *Supermacroporous Cryogels: Biomedical and biotechnological applications*. CRC Press, 2016.
- [117] **Orakdogan, N., Karacan, P., & Okay, O.**, (2011). Macroporous, responsive DNA cryogel beads, *React. Funct. Polym.*, vol. 71, no. 8, pp. 782–790.
- [118] **Yun, J., Tu, C., Lin, D.-Q., Xu, L., Guo, Y., Shen, S., Zhang, S., Yao, K., Guan, Y.-X., & Yao, S.-J.**, (2012). Microchannel liquid-flow focusing and cryo-polymerization preparation of supermacroporous cryogel beads for bioseparation, *J. Chromatogr. A*, vol. 1247, pp. 81–88.
- [119] **Savina, I. N., Gun'ko, V. M., Turov, V. V, Dainiak, M., Phillips, G. J., Galaev, I. Y., & Mikhalovsky, S. V.**, (2011). Porous structure and water state in cross-linked polymer and protein cryo-hydrogels, *Soft Matter*, vol. 7, no. 9, pp. 4276–4283.
- [120] **Lozinsky, V. I., Faleev, N. G., Zubov, A. L., Ruvinov, S. B., Antonova, T. V, Vainerman, E. S., Belikov, V. M., & Rogozhin, S. V.**, (1989). Use of PVA-cryogel entrapped *Citrobacter intermedium* cells for continuous production of 3-fluoro-L-tyrosine, *Biotechnol. Lett.*, vol. 11, no. 1, pp. 43–48.
- [121] **Kumar, A. & Srivastava, A.**, (2010). Cell separation using cryogel-based affinity chromatography, *Nat. Protoc.*, vol. 5, no. 11, p. 1737.
- [122] **Hajizadeh, S., Kirsebom, H., Leistner, A., & Mattiasson, B.**, (2012). Composite cryogel with immobilized concanavalin A for affinity chromatography of glycoproteins, *J. Sep. Sci.*, vol. 35, no. 21, pp. 2978–2985.
- [123] **Jain, E. & Kumar, A.**, (2013). Disposable polymeric cryogel bioreactor matrix for therapeutic protein production, *Nat. Protoc.*, vol. 8, no. 5, p. 821.
- [124] **Doretto, L., Ferrara, D., Gattolin, P., Lora, S., Schiavon, F., & Veronese, F. M.**, (1998). PEG-modified glucose oxidase immobilized on a PVA cryogel membrane for amperometric biosensor applications, *Talanta*, vol. 45, no. 5, pp. 891–898.
- [125] **Mishra, R., Goel, S. K., Gupta, K. C., & Kumar, A.**, (2013). Biocomposite cryogels as tissue-engineered biomaterials for regeneration of critical-sized cranial bone defects, *Tissue Eng. Part A*, vol. 20, no. 3–4, pp. 751–762.

- [126] **Sharma, A., Bhat, S., Vishnoi, T., Nayak, V., & Kumar, A.**, (2013). Three-dimensional supermacroporous carrageenan-gelatin cryogel matrix for tissue engineering applications, *Biomed Res. Int.*, vol. 2013.
- [127] **Gupta, A., Bhat, S., Jagdale, P. R., Chaudhari, B. P., Lidgren, L., Gupta, K. C., & Kumar, A.**, (2014). Evaluation of three-dimensional chitosan-agarose-gelatin cryogel scaffold for the repair of subchondral cartilage defects: an in vivo study in a rabbit model, *Tissue Eng. Part A*, vol. 20, no. 23–24, pp. 3101–3111.
- [128] **Cunningham, C. J., Ivshina, I. B., Lozinsky, V. I., Kuyukina, M. S., & Philp, J. C.**, (2004). Bioremediation of diesel-contaminated soil by microorganisms immobilised in polyvinyl alcohol, *Int. Biodeterior. Biodegradation*, vol. 54, no. 2–3, pp. 167–174.
- [129] **Önnby, L., Giorgi, C., Plieva, F. M., & Mattiasson, B.**, (2010). Removal of heavy metals from water effluents using supermacroporous metal chelating cryogels, *Biotechnol. Prog.*, vol. 26, no. 5, pp. 1295–1302.
- [130] **Önnby, L., Svensson, C., Mbundi, L., Busquets, R., Cundy, A., & Kirsebom, H.**, (2014). γ -Al₂O₃-based nanocomposite adsorbents for arsenic (v) removal: Assessing performance, toxicity and particle leakage, *Sci. Total Environ.*, vol. 473, pp. 207–214.
- [131] **Kumar, A., Sami, H., Srivastava, A., & Ghatak, A.**, (28-Jun-2012). Cryotropic hydrogels and their use as filters. Google Patents, 28-Jun-2012.
- [132] **Loo, S.-L., Fane, A. G., Lim, T.-T., Krantz, W. B., Liang, Y.-N., Liu, X., & Hu, X.**, (2013). Superabsorbent cryogels decorated with silver nanoparticles as a novel water technology for point-of-use disinfection, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 47, no. 16, pp. 9363–9371.
- [133] **Chaturvedi, A., Bajpai, A. K., Bajpai, J., & Sharma, A.**, (2015). Antimicrobial poly (vinyl alcohol) cryogel–copper nanocomposites for possible applications in biomedical fields, *Des. Monomers Polym.*, vol. 18, no. 4, pp. 385–400.
- [134] **Chaturvedi, A., Bajpai, A. K., Bajpai, J., & Singh, S. K.**, (2016). Evaluation of poly (vinyl alcohol) based cryogel–zinc oxide nanocomposites for possible applications as wound dressing materials, *Mater. Sci. Eng. C*.
- [135] **Shirbin, S. J., Lam, S. J., Chan, N. J. A., Ozmen, M. M., Fu, Q., O’Brien-Simpson, N., Reynolds, E. C., & Qiao, G. G.**, (2016). Polypeptide-Based Macroporous Cryogels with Inherent Antimicrobial Properties: The Importance of a Macroporous Structure, *ACS Macro Lett.*
- [136] **Zou, X., Deng, P., Zhou, C., Hou, Y., Chen, R., Liang, F., & Liao, L.**, (2017). Preparation of a novel antibacterial chitosan-poly (ethylene glycol) cryogel/silver nanoparticles composites, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 28, no. 13, pp. 1324–1337.
- [137] **Ivanov, R. V, Lozinsky, V. I., Noh, S. K., Han, S. S., & Lyoo, W. S.**, (2007). Preparation and characterization of polyacrylamide cryogels produced from a high-molecular-weight precursor. I. Influence of the reaction temperature and concentration of the crosslinking agent, *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 106, no. 3, pp. 1470–1475.

- [138] **Lozinsky, V. I., Solodova, E. V., Zubov, A. L., & Simenel, I. A.**, (1995). Study of cryostructuration of polymer systems. XI. The formation of PVA cryogels by freezing–thawing the polymer aqueous solutions containing additives of some polyols, *J. Appl. Polym. Sci.*
- [139] **Ozmen, M. M., Dinu, M. V., & Okay, O.**, (2008). Preparation of macroporous poly (acrylamide) hydrogels in DMSO/water mixture at subzero temperatures, *Polym. Bull.*, vol. 60, no. 2–3, pp. 169–180.
- [140] **Ozmen, M. M. & Okay, O.**, (2006). Superfast responsive ionic hydrogels: Effect of the monomer concentration, *J. Macromol. Sci. Part A Pure Appl. Chem.*, vol. 43, no. 8, pp. 1215–1225.
- [141] **Ceylan, D. & Okay, O.**, (2007). Macroporous polyisobutylene gels: a novel tough organogel with superfast responsivity, *Macromolecules*, vol. 40, no. 24, pp. 8742–8749.
- [142] **Lozinsky, V. I., Vainerman, E. S., Titova, E. F., Belavtseva, E. M., & Rogozhin, S. V.**, (1984). Study of cryostructurization of polymer systems, *Colloid Polym. Sci.*, vol. 262, no. 10, pp. 769–774.
- [143] **Worley, S. D. & Burkett, H. D.**, (1984). The Stability In Water Of A New Chloramine Disinfectant As A Function Of pH, Temperature, and Water Quality 1, *JAWRA J. Am. Water Resour. Assoc.*, vol. 20, no. 3, pp. 365–368.
- [144] **Amiri, F., Mesquita, M. M. F., & Andrews, S. A.**, (2010). Disinfection effectiveness of organic chloramines, investigating the effect of pH, *Water Res.*, vol. 44, no. 3, pp. 845–853.
- [145] **Huang, C., Chen, Y., Sun, G., & Yan, K.**, (2019). Disinfectant Performance of a Chlorine Regenerable Antibacterial Microfiber Fabric as a Reusable Wiper, *Materials (Basel)*, vol. 12, no. 1, p. 127.
- [146] **Ma, K., Liu, Y., Xie, Z., Li, R., Jiang, Z., Ren, X., & Huang, T.-S.**, (2013). Synthesis of novel N-halamine epoxide based on cyanuric acid and its application for antimicrobial finishing, *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 52, no. 22, pp. 7413–7418.
- [147] **Li, X., Liu, Y., Liu, Y., Du, J., Li, R., Ren, X., & Huang, T.-S.**, (2015). Biocidal activity of n-halamine methylenebisacrylamide grafted cotton, *J. Eng. Fiber. Fabr.*, vol. 10, no. 2, p. 155892501501000220.
- [148] **Sun, Y. & Sun, G.**, (2002). Durable and regenerable antimicrobial textile materials prepared by a continuous grafting process, *J. Appl. Polym. Sci.*
- [149] **Yan, S., Yan, X., Shao, X., & Liang, J.**, (2015). Porous polymeric antimicrobial resin containing N-halamine functional groups, *React. Funct. Polym.*
- [150] **Chen, Y., Worley, S. D., Huang, T. S., Weese, J., Kim, J., Wei, C. I., & Williams, J. F.**, (2004). Biocidal Polystyrene Beads. III. Comparison of N-halamine and Quat Functional Groups, *J. Appl. Polym. Sci.*
- [151] **Yao, J. & Sun, Y.**, (2008). Preparation and characterization of polymerizable hindered amine-based antimicrobial fibrous materials, *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 47, no. 16, pp. 5819–5824.
- [152] **Cao, Z. & Sun, Y.**, (2009). Polymeric N-halamine latex emulsions for use in

- antimicrobial paints, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 1, no. 2, pp. 494–504.
- [153] **Kocer, H. B., Cerkez, I., Worley, S. D., Broughton, R. M., & Huang, T. S.**, (2011). Polymeric antimicrobial N-halamine epoxides, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 3, no. 8, pp. 2845–2850.
- [154] **Cerkez, I., Worley, S. D., Broughton, R. M., & Huang, T. S.**, (2013). Rechargeable antimicrobial coatings for poly (lactic acid) nonwoven fabrics, *Polymer (Guildf)*, vol. 54, no. 2, pp. 536–541.
- [155] **Kocer, H. B.**, (2012). Residual disinfection with N-halamine based antimicrobial paints, *Prog. Org. Coatings*, vol. 74, no. 1, pp. 100–105.
- [156] **Sun, Y. & Sun, G.**, (2001). Durable and refreshable polymeric N-halamine biocides containing 3-(4'-vinylbenzyl)-5, 5-dimethylhydantoin, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 39, no. 19, pp. 3348–3355.
- [157] **Sun, Y. & Sun, G.**, (2003). Novel refreshable N-halamine polymeric biocides: Grafting hydantoin-containing monomers onto high performance fibers by a continuous process, *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 88, no. 4, pp. 1032–1039.
- [158] **Wang, Z., Lam, W. Y., & Pelton, R.**, (2013). N-Chlorinated Poly (N-isopropylacrylamide) Microgels, *Langmuir*, vol. 29, no. 42, pp. 12924–12929.
- [159] **Hoare, T. & Pelton, R.**, (2004). Functional group distributions in carboxylic acid containing poly (N-isopropylacrylamide) microgels, *Langmuir*, vol. 20, no. 6, pp. 2123–2133.

ÖZGEÇMİŞ



Ad-Soyad : Zeynep AKSOY
Doğum Tarihi ve Yeri : 07.04.1988 - Bursa
E-posta : zeynep.aksoy@btu.edu.tr

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2010, Kocaeli Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya