

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİTOSAN NANOPARÇACIKLARININ SENTEZİ

Yavuz GÖKÇE

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2008**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Yavuz GÖKÇE tarafından hazırlanan “**Kitosan Nanoparçacıklarının Sentezi**” adlı tez çalışması 01/07/2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Zeki AKTAŞ

Jüri Üyeleri:

Başkan: Prof. Dr. Ayla ÇALIMLI
Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği ABD

Üye : Prof. Dr. Abdülkerim KARABAKAN
Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü

Üye : Prof. Dr. Zeki AKTAŞ
Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği ABD

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Orhan ATAKOL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KİTOSAN NANOPARÇACIKLARININ SENTEZİ

Yavuz GÖKÇE

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Zeki AKTAŞ

Bu çalışmada doğal bir biyopolimer olan kitosanın nanoboyutta sentezi ve karakterizasyonu incelenmiştir. Doğada en çok bulunan polimerlerden biri olan kitosan, kitinin deasetillenmesi sonucu elde edilmektedir. Günümüzde, sahip olduğu birçok önemli özeliğinden dolayı, farklı endüstrilerde kullanılmaktadır. Özellikle, kitosan parçacıklarının nanobüyükteki avantajları, kitosan üzerine olan ilgiyi giderek arttırmakta böylece, yeni uygulama alanları ortaya çıkmaktadır.

Sürelili yayınlarda, kitosan nanoparçacıkları (KNP)'nin sentezi için birçok sentez yöntemi yer almaktadır, ancak; bu çalışmada, KNP sadece iyonik jelleşme ve ters misel yöntemlerine göre sentezlenmiştir. Her iki yöntemde de KNP'yi sentezlemek için çapraz-bağlayıcı kullanılmıştır. İyonik jelleşme yönteminde çapraz-bağlayıcı tripolifosfat (TPP) iken ters misel yönteminde çapraz-bağlayıcı glutaraldehitir. İyonik jelleşme yöntemi ile sentezlenen KNP'nin oluşumu ve büyüklüklerine ortamın pH'si, kütlece kitosan/TPP oranı ve sesötesi dalga uygulama süresinin etkileri incelenmiştir. Ayrıca; iyonik jelleşme yönteminde dondurarak kurutma sonrası meydana gelebilen parçacık birleşmesini engellemek için trehaloz kullanılmış ve parçacık birleşmesini önlemedeki etkileri de incelenmiştir. Yapılan analizlerin sonuçları, en küçük KNP'lerin pH = 4.6-4.8 iken ve kitosan/TPP = 5 oranı kullanıldığında elde edildiğini göstermiştir. Sesötesi dalga uygulama süresi ile nanoparçacık büyüklüğünün değişimi incelendiğinde, 20 dk sesötesi dalga uygulama süresi sonunda en dar nanoparçacık dağılımının elde edildiği saptanmıştır. Sentezlenen KNP 50 nm ortalama parçacık büyüklüğüne sahiptir. Dondurarak kurutma sonrası gözlenen parçacık birleşmesi, trehaloz ve sesötesi dalga beraber uygulandığında önlenmektedir. Ters misel yöntemi ile çapraz-bağlayıcı derişimi, seyreltme derecesi ve farklı yüzey aktif madde tipinin KNP'nin oluşumu ve büyüklüğüne etkisi incelenmiştir. AOT (sodium bis (etilhekzil) sülfosüksinat) kullanılarak 52,89 nm ortalama büyüklüğe sahip KNP elde edilmiştir. Parçacık büyüklüğü glutaraldehit miktarının artması ile artmış, seyreltme derecesinin artması ile ise düşmüştür. TX-100 (polietilen glikol oktil-fenil eter) ile birlikte çapraz-bağlayıcı olarak NaOH kullanıldığında 54,09 nm ortalama büyüklüğe sahip KNP sentezlenmiştir.

Temmuz 2008, 81 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kitosan, nanoparçacık, iyonik jelleşme, ters misel, sesötesi etki

ABSTRACT

Master Thesis

SYNTHESIS OF CHITOSAN NANOPARTICLES

Yavuz GÖKÇE

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemical Engineering

Supervisor: Prof.Dr. Zeki AKTAŞ

In this study, it was investigated that the synthesis and characterization of chitosan, a natural biopolymer, at nanoscale. Chitosan is one of the most abundant polymer in nature which is obtained by deacetylation of chitin. Nowadays, chitosan is used in different industrial fields due to its great properties. Especially, advantages of chitosan particles at nanosize redound to interest on chitosan so new application areas have been developed.

Although there have been many synthesizing methods about synthesis of chitosan nanoparticles (CNP) in literature, in this work, CNP have only been synthesized according to ionic gelation and reverse micelle methods. Cross-linking agents were used for synthesizing CNP in both methods. While tripolyphosphate (TPP) was the cross-linker in the ionic gelation method glutaraldehyde was used as a cross-linker in the reverse micelle method. It was investigated that the effects of pH of medium, chitosan/TPP mass ratio and ultrasonication time on the formation and the sizes of CNP synthesized from ionic gelation method. Further, trehalose was used to prevent particle agglomeration which may occur after freeze-drying and its effects on agglomeration were investigated as well. Analysis results showed that the finest CNP were obtained at pH = 4,6-4,8 and chitosan/TPP = 5. When the nanoparticle size variation with ultrasonication time was examined, it was determined that the narrowest nanoparticle size distribution was obtained after 20 minutes ultrasonication period. Synthesized CNP had a mean particle size of 50 nm. Particle agglomeration occurring after freeze-drying can be prevented by applying ultrasonication in addition to use of trehalose. Effects of the concentration of cross-linker, the degree of dilution and the type of surfactants on the formation and the size of CNP were investigated by the reverse micelle method. CNP, having a mean size of 52,89 nm, were obtained using AOT (sodium bis(ethylhexyl) sulfosuccinate). Particle size increased with the concentration of glutaraldehyde but decreased with dilution of the suspension. When TX-100 (polyethylen glycol octyl-phenyl ether) used with NaOH as a cross-linker, the mean particle size of CNP synthesized was 54,09 nm.

July 2008, 81 pages

Keywords: Chitosan, nanoparticle, ionic gelation, reverse micelle, ultrasonication

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmamın her aşamasında bir arkadaş gibi yanımda olan, desteğini esirgemeyip bana yol gösteren ve yönlendiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Zeki AKTAŞ'a, yürüttüğümüz projede fikir ve önerilerini benimle paylaşıp yardımda bulunan hocalarım Prof. Dr. Ayla ÇALIMLI ve Doç. Dr. Nuray YILDIZ'a, çalışmam süresince her an birlikte olduğum en büyük destekçilerimden sevgili çalışma arkadaşım Burcu CENGİZ'e, TEM analizlerinin yapılmasında bana yardımcı olan hocam Doç. Dr. Burhanettin ÇİÇEK ve dostlarım Araç. Gör. Furkan SOYSAL ve İbrahim MUTLAY'a, TEM analizlerini yapan Lucian BARBU-TUDORAN'a, parçacık büyüklük analizlerini yapmam için laboratuvarlarını kullanmama izin veren Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliğı Bölümü'nden Prof. Dr. S. Ali Tuncel ve Araç. Gör. Berna SARACOĞLUNA'a, üzerime büyük emek harcayan ve hala harcamakta olan, hayatım boyunca benim için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan sevgili aileme ve bana manevi olarak en büyük desteğı veren Sıla BAL'a tüm içtenliğimle teşekkürü borç biliyorum.

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından 104M412 numaralı, "Nano Boyutta Hidroksiapatit, Kitosan ve Bunların Kompozitinin Sentezi ve Karakterizasyonu" konulu proje ile desteklenmiştir.

Yavuz GÖKÇE

Ankara, Temmuz 2008

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KİTİN ve KİTOSAN	3
2.1 Kitin ve Kitosanın Tarihi	3
2.2 Kitin ve Kitosanın Tanımı	4
2.3 Kitosanın Kimyası	5
2.4 Kitosanın Özellikleri	6
2.5 Kitosan Üretimi	9
2.5.1 Protein uzaklaştırılması (Deproteinizasyon)	11
2.5.2 Mineral uzaklaştırılması (Demineralizasyon)	11
2.5.3 Ağartma	12
2.5.1 Deasetilasyon	12
2.6 Kitosanın Endüstriyel Uygulamaları	13
2.7 Kitosan Parçacık Büyüklüğünün Küçültülmesi	17
2.7.1 Emülsiyon çapraz-bağlama yöntemi	18
2.7.2 Çöktürme/toplanma yöntemi	19
2.7.3 Sprey kurutma yöntemi	20
2.7.4 Emülsiyon-damlacık birleşme yöntemi	21
2.7.5 İyonik jelleşme yöntemi	22
2.7.6 Ters misel yöntemi	23
3. KAYNAK ÖZETLERİ	24
3.1 İyonik Jelleşme Yöntemiyle İlgili Çalışmalar	24
3.2 Ters Misel Yöntemiyle İlgili Çalışmalar	30
4. MATERYAL ve YÖNTEM	34
4.1 Materyal	34

4.2 Yöntem	34
4.2.1 İyonik jelleşme yöntemi ile kitosan nanoparçacıklarının sentezi	35
4.2.2 Ters misel yöntemi ile kitosan nanoparçacıklarının sentezi	38
4.3 Kitosan Nanoparçacıklarının Karakterizasyonu	41
4.3.1 Yapısal analizler	41
4.3.2 Büyüklüğe yönelik analizler	42
4.3.3 Morfolojiye yönelik analizler	44
5. DENEYSEL BULGULAR ve TARTIŞMA	45
5.1 İyonik Jelleşme Yöntemi	45
5.1.1 FTIR analizi	45
5.1.2 DLS analizi	46
5.1.2.1 Ortam pH'sinin KNP'nin oluşumu ve büyüklüğüne etkisi.....	46
5.1.2.2 Kütlece kitosan/TPP oranının KNP'nin oluşumu ve büyüklüğüne etkisi ..	48
5.1.2.3 Sesötesi dalga uygulama süresinin KNP'nin büyüklüğüne etkisi	50
5.1.3 TEM analizi	60
5.2. Ters Misel Yöntemi	63
5.2.1 FTIR analizi	63
5.2.2 DLS analizi	64
5.2.2.1 Glutaraldehit miktarının KNP'nin oluşumu ve büyüklüğüne etkisi	65
5.2.2.2 Seyreltme miktarının KNP'nin büyüklüğüne etkisi	67
5.2.2.3 Farklı yüzey aktif madde kullanımının KNP'nin oluşumuna etkisi	68
6. DEĞERLENDİRME	71
6.1 İyonik Jelleşme Yöntemi için Elde Edilen Sonuçlar	71
6.2 Ters misel Yöntemi için Elde Edilen Sonuçlar	74
7. ÖNERİLER	76
KAYNAKLAR	77
ÖZGEÇMİŞ	80

SİMGELER DİZİNİ

AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
AOT	Sodyum Bis (etilhekzil) sülfosüksinat
DEX	Dextran
DXR	Doxorubicin
DLS	Dynamic Light Scattering
FTIR	Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi
H-NMR	Hidrojen Nükleer Manyetik Rezonans
KNP	Kitosan Nanoparçacıkları
MMW	Medium Molecular Weight (Orta Molekül Ağırlıklı)
PD	Polidispersite
PDI	Polidispersite İndeksi
PEG	Poli etilen Glikol
SDS	Sodyum Dodesilsülfat
TEM	Geçirmeli Elektron Mikroskobu
TMC	N-trimetil Kitosan
TPP	Tripolifosfat
TX-100	Polioksi etilen (Triton X-100)
XRD	X Işını Kırınımı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Bazı kitin kaynaklarında kitinin yeri	5
Şekil 2.2 Selüloz, kitin ve kitosanın kimyasal yapıları	6
Şekil 2.3 Kitin ve kitosanın bazı türevleri.....	9
Şekil 2.4 Kabuklu deniz canlılarının kabuklarından kitosan üretimi prosesine ait akış şeması	10
Şekil 2.5 Emülsiyon çapraz-bağlama yönteminin şematik gösterimi	18
Şekil 2.6 Çöktürme/toplanma yönteminin şematik gösterimi.....	19
Şekil 2.7 Sprey kurutma yönteminin şematik gösterimi	20
Şekil 2.8 Emülsiyon-damlacık birleşme yönteminin şematik gösterimi.....	21
Şekil 2.9 İyonik jelleşme yönteminin şematik gösterimi	22
Şekil 2.10 Ters misel yönteminin şematik gösterimi	23
Şekil 3.1 Çeşitli kitosan ve TPP derişimlerinde KNP'nin oluşum bölgesi.....	25
Şekil 4.1 Kitosan ve TPP arasındaki iyonik jelleşme sonucu KNP'nin oluşumu.....	36
Şekil 4.2 Kitosanın TPP ile farklı pH değerlerinde etkileşimi	37
Şekil 5.1.a. kitosan, b. iyonik jelleşme yöntemi ile sentezlenen kitosan nanoparçacıklarının FTIR spektrumları.....	45
Şekil 5.2 Kitosan nanoparçacıklarının oluşumuna pH'nin etkisi.....	47
Şekil 5.3 Kitosan nanoparçacıklarının ortalama parçacık büyüklük dağılımı (pH = 4,7, kitosan/TPP = 5)	48
Şekil 5.4 Kitosan/TPP (w/w) oranının KNP'nin oluşumuna etkisi (pH = 4.7).....	49
Şekil 5.5 Kitosan nanoparçacıklarının dondurarak kurutma öncesi ve sonrasındaki parçacık büyüklük dağılımları (pH = 4,7, kitosan/TPP = 5, T = 25 °C).....	51
Şekil 5.6 Kitosan nanoparçacıklarının trehaloz eklendiği ve eklenmediği durumlara ait dondurarak kurutma işleminden sonraki parçacık büyüklük dağılımları (pH = 4,7, kitosan/TPP = 5, T = 25 °C).....	52
Şekil 5.7 Sesötesi dalga uygulama süresinin dondurarak kurutma öncesinde kitosan nanoparçacıklarının büyüklüğüne etkisi (pH = 4,7, kitosan/TPP = 5, T = 25 °C).....	53

Şekil 5.8 Sesötesi dalga uygulama süresinin trehaloz yokken dondurularak kurutulmuş kitosan nanoparçacıklarının büyüklüğüne etkisi (pH = 4,7, kitosan/TPP = 5, T = 25 °C).....	54
Şekil 5.9 Sesötesi dalga uygulama süresinin trehaloz kullanıldığında dondurularak kurutulmuş kitosan nanoparçacıklarının büyüklüğüne etkisi (pH = 4,7, kitosan/TPP = 5, T = 25 °C).....	54
Şekil 5.10 Sesötesi dalgaların ilk 15 dk boyunca KNP'nin büyüklüğüne etkisi.....	57
Şekil 5.11 Sesötesi dalgaların 15 dk'dan sonra KNP'nin büyüklüğüne etkisi.....	58
Şekil 5.12 Dondurarak kurutma varken ve yokken uygun sürede sesötesi dalga etkisi sonucu elde edilen en küçük KNP'ye ait parçacık büyüklük dağılımları	59
Şekil 5.13 Uygun koşullar altında sentezlenen kitosan nanoparçacıklarının farklı sürelerde ultrasonik banyoda bekletilmeleri ile alınan TEM görüntüleri	61
Şekil 5.14 Ters misel yöntemi ile sentezlenen kitosan nanoparçacıklarına ait FTIR spektrumları.....	63
Şekil 5.15 Ters misel yönteminde AOT kullanılarak sentezlenen KNP'nin büyüklük dağılımı	65
Şekil 5.16 Glutaraldehit miktarının değişimi ile KNP'nin büyüklüğünün değişimi... ..	66
Şekil 5.17 Seyreltme oranı ve glutaraldehit miktarı ile kitosan nanoparçacık büyüklüğünün değişimi.....	67
Şekil 5.18 Ters misel yöntemi kullanılarak sentezlenen kitosan nanoparçacıklarına ait büyüklük dağılımları	69
Şekil 5.19 TX-100 kullanılarak kitosan nanoparçacık sentezi sırasında glutaraldehit yerine NaOH kullanılması ile elde edilen parçacık büyüklük dağılımı grafiği	70

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Kitosanın bazı fiziksel özellikleri.....	8
Çizelge 2.2 Kitosanın endüstrideki bazı kullanım alanları ve uygulamaları	13
Çizelge 3.1 İyonik jelleşme yöntemi ile KNP'nin sentezlenmesi üzerine yapılan bazı çalışmalar	30
Çizelge 3.2 Ters misel yöntemi ile KNP'nin sentezlenmesi üzerine yapılan bazı çalışmalar	33

1. GİRİŞ

Günümüzde büyük ilerlemelerin kaydedildiği bilim dallarından biri olan biyomalzeme biliminde, biyolojik sistemlerle etkileştiğinde uyum sağlayabilecek yeni malzemelerin geliştirilmesi için yoğun çaba harcanmaktadır. Biyomalzemeler, insan vücudundaki canlı dokuların işlevlerini yerine getirmek ya da desteklemek amacıyla kullanılan doğal ya da sentetik malzemeler olup, sürekli olarak veya belli aralıklarla vücut akışkanlarıyla (örneğin kan) temas ederler. Bilimsel anlamda yeni bir alan olmasına karşın, uygulama açısından biyomalzeme kullanımı tarihin çok eski zamanlarına kadar uzanmaktadır. Mısır mumyalarında bulunan yapay göz, burun ve dişler bunun en güzel kanıtlarıdır. Altının diş hekimliğinde kullanımı, 2000 yıl öncesine kadar uzanırken, bronz ve bakır kemik implantlarının kullanımı milattan önceye kadar gitmektedir. Bakır iyonunun vücudu zehirleyici etkisine karşın 19. yüzyıl ortalarına kadar daha uygun malzeme bulunamadığından bu implantların kullanımı devam etmiştir. 19. yüzyıl ortasından itibaren yabancı malzemelerin vücut içerisinde kullanımına yönelik ciddi ilerlemeler kaydedilmiştir. Örneğin; 1880’de fildişi protezler vücuda yerleştirilmiş ve ilk metal protez, vityum (kobalt, krom ve molibden alaşımı) alaşımından 1938’de üretilmiştir. 1960’lara kadar kullanılan bu protezler, metal korozyona uğradığında ciddi tehlikeler yaratmıştır. 1972’de alümina ve zirkonya (zirkonyum oksit) isimli iki seramik yapı herhangi bir biyolojik olumsuzluk yaratmaksızın kullanılmaya başlanmış, ancak inert yapıdaki bu seramikler dokuya bağlanamadıklarından çok çabuk zayıflamışlar. Aynı yıllarda Hench tarafından geliştirilen biyoaktif seramikler, (örneğin biyocam ve hidroksiapatit) ile bu problem çözülmüştür (www.biltek.tubitak.gov.tr/bdergi/yeniufuk/icerik/biyomalzemeler.pdf, 2006).

Kemikler, dişler, deniz algleri ve deniz kabukları biyolojik olarak inorganik/organik kompozitlerden oluşur (Muzzarelli *et al.* 2002). Bu kompozitler genellikle, kollajen fiberlerden ve iğne şeklinde nanobüyükteki hidroksiapatit (HA , $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$)’ten oluşmaktadırlar. Kemiklerin ve dişlerin mineral bileşeni olan HA , dişçilik ve medikal araştırmalarda (ilaç taşıyıcı, oküler implant, kemik hatalarının kapatılması için kemik yerine kullanım vb.) önemli bir yere sahiptir (Mostafa 2005), ancak saf HA kırılabilir bir özellik gösterdiğinden modifiye edilmesi gerekir. Bu amaçla

polilaktik asit, kollajen, kitosan, polietilen gibi polimerler kullanılmaktadır. Bunlardan biyopolimerler, medikal uygulamalarda çok iyi uyumluluk göstermektedir. Doğada en fazla bulunan doğal biyopolimerden birisi de kitosandır. Kitosan, bir çeşit polisakkarit olup kitinin deasetillenmesinden elde edilebileceği gibi kabuklu canlıların kabuklarından da ekstraksiyon yöntemiyle elde edilebilir (Chen *et al.* 2002). Kitosan; kozmetik, ilaç salımı, yara iyileştirme, implantasyon, atıksu arıtımı, tarım, gıda, kağıt endüstrisi ve gen terapi uygulamalarında yoğun olarak kullanılır. Kitosan nanoparçacıkları (KNP) ise antibakteriyal, antimikrobiyal ve antifungal etkilere sahiptir. Midede ilaç tahrişini önleyen ya da azaltan asit giderici ve antiülser etkileri de vardır (Qi *et al.* 2004a). KNP'nin kontrollü ilaç salımı sistemlerindeki yararlarından dolayı kullanımı oldukça önem taşımaktadır. Kontrollü salım; kitosan jelleri, tabletleri, mikroküreleri ve mikrokapsülleri ile gerçekleştirilebilmektedir (Rao *et al.* 2005).

Bu çalışmanın amacı, nano büyüklükte kitosan parçacıklarının sentezlenmesi ve bu parçacıkların karakterizasyonunun yapılmasıdır. Çalışmanın kapsamında ise kitosan, uygulama alanları, üretim yöntemleri, seçilen yöntemlere yönelik kaynak araştırması, deneysel yöntem ve araştırma bulgularına yer verilmiştir.

2. KİTİN ve KİTOSAN

2.1 Kitin ve Kitosanın Tarihi

Kitosanın doğuşu, 1811 yılında Nancy, Fransa'daki botanik bahçesinin müdürü Profesör Henri Braconnot'un mantar hücre duvarlarından fungin adı verdiği kısmı izole etmesine dayanmaktadır. Selülozun izolasyonundan 30 yıl kadar önce, 1823 yılında, Odier böcekler üzerinde bir çalışma yapmış ve aynı yapının bitkilerin yapılarında olduğu gibi böceklerde de olduğunu görmüştür. Odier daha sonra fungine 'kitin' ismini vermiştir. Kitin, Yununcadan türemiş bir kelimedir ve zar, kılıf, zarf vs. anlamlarına gelmektedir (Beaulieu, 2005). Lassaigne'nin 1843 yılında kitinin yapısındaki azotun varlığını göstermesi ile kitin kavramı daha da anlaşılır hale gelmiştir. Kitinin keşfedilmesinden sonra 'kitosan' ismi ortaya çıkmıştır. Kitosan; ilk kez Rouget tarafından, 1859 yılında, derişik potasyum hidroksit çözeltisinde kitini ısıtması ile bulunmuştur. Rouget, kitinin kimyasal ve ısı işlem uygulanarak çözünür hale geldiğini gözlemlemiştir. Ledderhose, 1878 yılında kitinin glikozaminden meydana geldiğini tanımlamıştır. Hoppe-Seyler ise 1894 yılında kitosan terimini kitinden uyarlamıştır. 20. yy.'ın başlarında, kitosanı konu alan (kitinin kaynağı, yengeç kabukları, mantarlar gibi) birçok çalışma yapılmıştır. Rammelberg 1930'daki çalışması ile kitosanın bu kaynaklarda bulunduğunu ispatlamıştır. Ayrıca kitinin birçok yönde hidrolizi gerçekleştirilmiş ve bir glikozamin polisakkarit olduğu tespit edilmiştir. 1950'lerde x-ışını analizleri ile mantarlardaki kitin ve kitosanın oluşumu çalışmaları gelişmiştir. Braconnot'un ilk gözlemlerinden 140 sene sonra, kitosan üzerine yazılmış ilk kitap 1951 yılında yayınlanmıştır. 1960'ların başında kitosanın kırmızı kan hücrelerini bağlama yeteneği üzerinde incelemeler yapılmıştır. Aynı yıllarda ayrıca hemostatik ajan olarak da düşünölmüştür. Sonraki otuz senede ise, kitosan su arıtma tesislerinde suyun zehir etkisini giderici olarak kullanılmıştır. Son 20 yılda ise kitosan sahip olduğu birçok önemli özellikten dolayı, kitosan üzerine yapılan araştırmalar oldukça fazlalaşmıştır. Günümüzde kitosan birçok endüstriyel uygulamaya sahiptir ve ortaya konan yararlarından dolayı kitosana duyulan ihtiyaç giderek artmaktadır (Newton 2006).

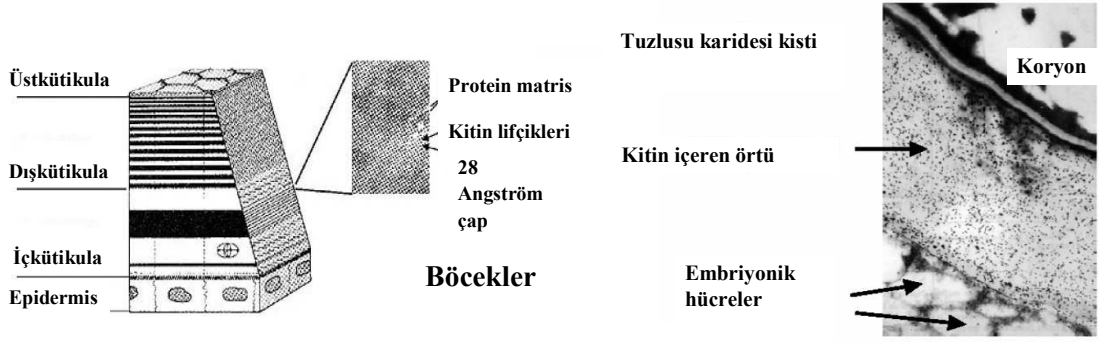
2.2 Kitin ve Kitosan Tanımı

Kitin, doğada selülozdan sonra en fazla bulunan ikinci biyopolimer ve $\beta(1\rightarrow4)$ 'e bağlı glikandır. N-asetil-D-glukozaminden oluşmuş en önemli polisakkaritlerden biridir. Yapı olarak selülozunkine oldukça benzer bir yapıya sahiptir. Kitin yenilenebilir bir kaynaktır, çünkü; böceklerin ve kabuklu deniz canlılarının iskelet yapılarının bileşiminde bulunur. Şekil 2.1'de kitinin bazı kitin kaynaklarındaki yeri görülmektedir. Kabuklu deniz canlıları kitinin başlıca kaynağıdır ve genellikle yapılarında, % 30-40 protein, % 30-50 kalsiyum karbonat ile kalsiyum fosfat ve % 20-30 kitin içerirler. Yapılarındaki kitin kaynağa bağlı olarak % 40'a çıkabilmektedir. Kitin doğada genellikle;

- deniz yosunları
- tek hücreliler (kamçılılar, amip kirpikliler vs.)
- selentereler
- yumuşakçalar
- eklembacaklılar
- halkalılar
- solucanlar
- bakteriler
- mantarlar
- böcekler
- bazı bitkilerde bulunur (<http://vefur.rf.is/TAFT2003/PPtskjol/Fyirlestrar/L70%20-%20Kristberg.pdf>).

En zengin kitin kaynakları ise;

- dungeness yengeci
- pasifik karidesi
- ıstakoz ve kerevit (tatlısu ıstakozu) kabuklarıdır.

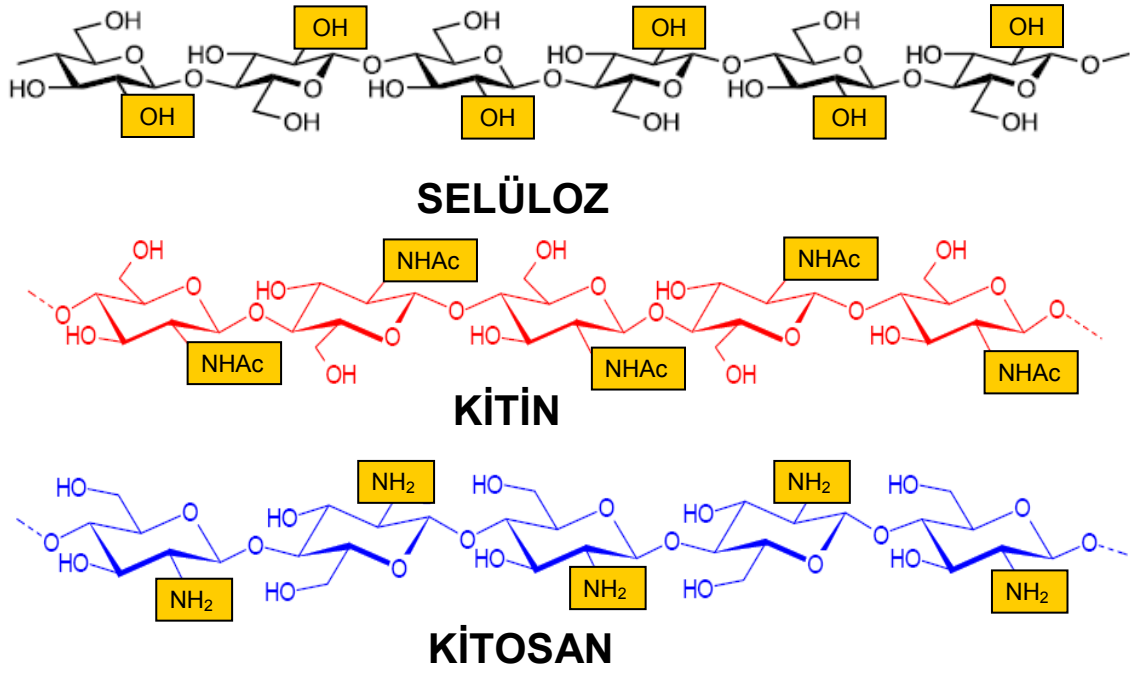


Şekil 2.1 Bazı kitin kaynaklarında kitinin yeri

Kitinin deasetillenmiş bir türevidir olan kitosan, katyonik bir polisakkarittir ve β - (1,4)- 2-asetoamido-2-deoksi-D-glikoz ve β -(1,4)-2-amino-2-deoksi-D-glikoz ünitelerinin bir kopolimeridir. Kitosan da yapı olarak selüloza benzemektedir ve selüloz gibi bir fiberdir. Kabuklu hayvanların ve mantarların hücre duvarlarında kendiliğinden bulunan bir bileşendir. Kabuklu hayvanların atıkları, kuru kütle temeli üzerinden % 14-35 kitosan içerir ve yenilebilir deniz ürünü işletim endüstrileri yıllık 1.2×10^5 tondan fazla atık üretirler. Kitosan her ne kadar bol bulunsa ve birçok uygulamalara sahip olsa da sudaki sınırlı çözünürlüğünden dolayı birçok yararı yeni bulunmuştur. Kitosan; formik asit, asetik asit ve laktik asit gibi bazı asit çözeltilerinde çözünür ve polikasyonik polimer haline gelir (Rao *et. al.* 2005-2006).

2.3 Kitosanın Kimyası

Deasetilasyon derecesine (DD) bağlı olarak kitosandaki azot içeriği % 5-8 arasındadır. Kitosan çoğunlukla birincil alifatik amino gruplarına sahiptir. Amino gruplarının bulunması, kitosanı kimyasal modifikasyon için uygun hale getirir. Şekil 2.2’de kitin, kitosan ve selülozun kimyasal yapıları verilmiştir. Şekil 2.2’den de görüleceği gibi kitosan ve selüloz arasındaki tek fark C-2 pozisyonundaki hidroksil grubu (-OH) yerine amin grubunun (-NH₂) bulunmasıdır. Kitin ile selüloz arasındaki tek fark ise; C-2 pozisyonundaki hidroksil grubu yerine asetamido (NHCH₃CO) grubunun bulunmasıdır.



Şekil 2.2 Selüloz, kitin ve kitosanın kimyasal yapıları
(<http://www.mpikg-golm.mpg.de/kc/scripts/Polysaccharide.pdf>)

2.4 Kitosanın Özellikleri

Kitosan ile kıyaslanınca kitinin uygulamaları oldukça sınırlıdır, çünkü; yapı olarak selüloza benzese de kimyasal olarak inerttir (Agnihotri *et al.* 2004). Kitinin çözünürlüğü oldukça sınırlıdır. LiCl, hegzafloaseton, hegzaflo-2-propanol ve dimetilasetamit gibi toksik özeliği yüksek çözücülerde çözünür. Bu kitinin endüstriyel uygulamalarda kullanımını kısıtlayan en önemli faktördür.

Kitosanın molekül ağırlığı 50-2000 kiloDalton (kDa) arasında değişebilmektedir. Molekül ağırlığına göre düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı kitosan diye sınıflandırılır. Kitinin deasetillenmesi sonucu elde edildiği için kitosanın deasetilasyon derecesinden de bahsedilir. DD, % 40-100 aralığında gerçekleştirilebilir. Kitosan suda çözünmez, ancak asidik ortamda (pH<6.5) oldukça iyi çözünür. Fosforik, sülfürik, sitrik ve sebasik asit gibi asidik çözeltiler kitosan için iyi çözücüler değildir, ancak kitosan; formik, sitrik ve asetik asitin seyreltik çözeltilerinde iyi çözünür. Standart çözücü olarak

genellikle asetik asit çözeltisi kullanılır. Çözünürlük DD'ye, derişime, asitin cinsine ve pH'ye bağlıdır. Asit derişiminin azalması ile çözünürlük azalmaktadır.

Kitosanın kitin ve selülozdan farklı olarak sahip olduğu amin gurubu, çözünme sırasında protonlanır ve bundan dolayı da kitosan pozitif yüklenmiş olur (Lee *et al.* 2004). Bu özellik, kitosanın katyonik bir polisakkarit olduğunu gösterir. Diğer polimerlerin aksine kitosan, pozitif yüklü (zayıf bazik gruplardan dolayı) hidrofilik bir polimerdir (Lopez-Leon *et al.* 2005). Sahip olduğu bu özelliklerden dolayı, negatif yüklü polimerlerle, makromoleküllerle, polianyonlarla vs. etkileşme yeteneğine sahiptir. Kitosan;

- lipitler, proteinler ve birçok biyoaktif madde ile bağlanabilir
- negatif yüklü polimerlerle (alginat gibi) aę veya matris oluşumu gerçekleştirebilir
- vücuttaki önemli fonksiyonel karbohidratlarla (hyalüronik asit, mukopolisakkaritler) uyumludur (Janes *et al.* 2001).

Bu özelliklerinin yanında su ve yağ bağlama kapasitesi oldukça fazla olup çok iyi film oluşturma özelliklerine sahiptir. Çizelge 2.1'de kitosanın bazı fiziksel özellikleri verilmiştir. Genel olarak bakıldığında kitosan aşağıda belirtilen özelliklerden dolayı birçok endüstriyel uygulamada kullanıma sahiptir;

- yenilenebilir özelihtedir, bol miktarda bulunmaktadır
- toksik değildir, biyouyumludur ve biyobozunurdur
- asit giderici, antiülser, antitümör, antimikrobiyal, antioksidant, antibakteriyel ve antifungal etki gibi biyoetkileri vardır
- çözünmesi için zararlı organik çözücülere gerek duyulmaz
- katyonik polimer olup negatif yüklü yüzeyler ile kolayca etkileşir
- kitosan mikro ve nanoparçacıklarını hazırlamak oldukça kolaydır.

Çizelge 2.1 Kitosanın bazı fiziksel özellikleri

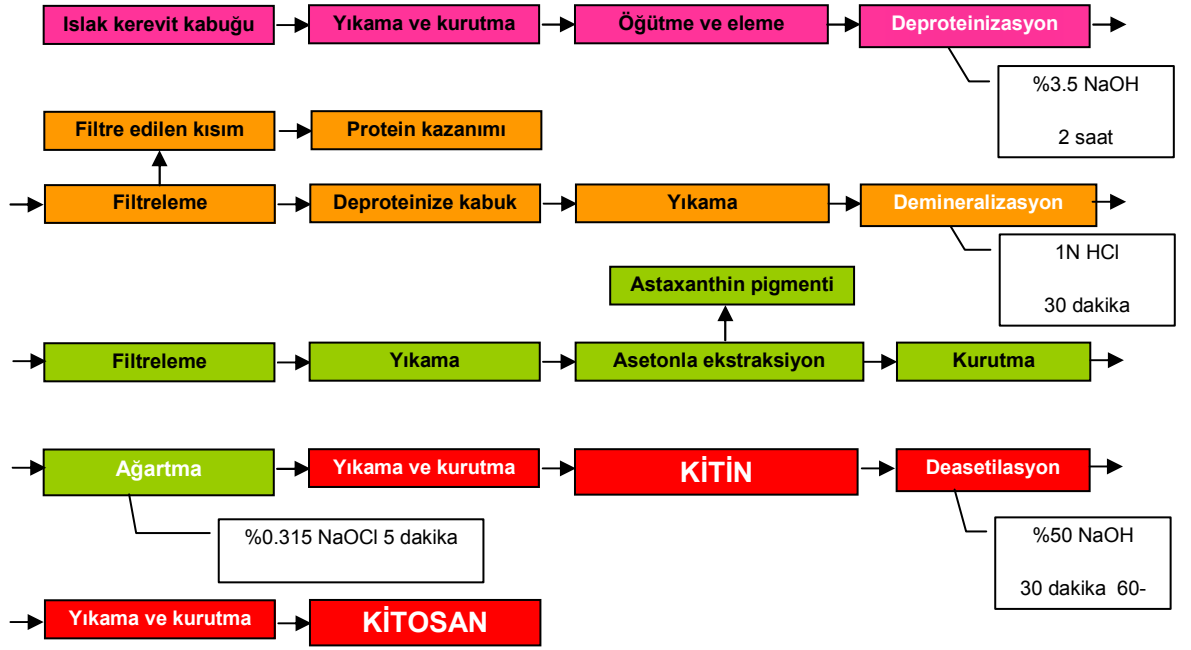
Özellik	Değer
Molekül ağırlığı	50-2000 kDa
DD	% 40-100
Viskozite	< 2000 mPaS
Su bağlama kapasitesi	% 450-1150
Yağ bağlama kapasitesi	% 314-535
Yığın yoğunluğu	0.06-0.39 g/cm ³
Renk	Donuk sarı-beyaz
Çözünürlük (suda)	pH<6.5

Kitosanın sahip olduğu bu özellikler araştırmacılar tarafından oldukça küçük kitosan parçacıkları hazırlanarak incelenmiştir. 1990'lı yıllara gelindiğinde kitosan üzerinde boyut küçültme çalışmaları sonucunda mikro ve nanoboyutta kitosan elde edilmiştir. Elde edilen parçacıklar üzerinde yukarıda bahsedilen özellikler incelendiğinde parçacık boyutunun azalmasıyla özelliklerin daha da iyileştiği görülmüştür. Özellikle kitosanın antimikrobiyal, antifungal, antitümör ve antibakteriyel özelliklerinde artma gözlenmiştir (Qi *et al.* 2004a).

KNP'lerin sahip oldukları yüzey alanı, deasetillenme sonucu oluşan kitosandan ve mikroboyutta üretilen kitosan parçacıklarından daha yüksektir, böylece; KNP daha fazla aktif yüzey alanına sahip olur. Yine, daha fazla yüzey alanına sahip olması kitosanın bağlama kapasitesinin artmasını sağlar. Kitosanın toksik olmaması, biyouyumlu ve biyobozunur olması özelliklerinin yanı sıra KNP'lerin boyutlarından dolayı sahip olduğu bu özellik, kitosanın ilaç salım sistemlerinde kullanılması sonucunu ortaya çıkarmıştır. Kitosanın nanoboyutta kullanılması ilaç-yüklü kitosanın kılcallara bile girebilmesini sağlamaktadır, böylelikle; hedeflenmiş ilaç salımı gerçekleştirilebilmektedir. Ayrıca, kitosan boyutunun küçülmesi adsorpsiyon kapasitesini de arttırmaktadır.

Bunlar;

- deproteinizasyon
- demineralizasyon
- ağartma
- deasetilasyon basamaklarıdır.



Şekil 2.4 Kabuklu deniz canlılarının kabuklarından kitosan üretimi prosesine ait akış şeması (Meyers *et al.* 1989)

Kitinin kabuklardan izolasyonu ilk iki basamak sonunda gerçekleştirilir. Bu iki basamağın gerçekleştirme sırası yer değiştirebilir, ancak birçok araştırmacı asidik dekalsifikasyon işlemini proteinin uzaklaştırılması işleminden sonra yapmaktadır (http://etd.lsu.edu/docs/available/etd-11102004-134343/unrestricted/Fernandez-Kim_thesis.pdf).

2.5.1 Protein uzaklaştırılması (Deproteinizasyon)

Kitin, doğal olarak birleşen polimerlerden (kitinopolimer) meydana gelmektedir. Bu proteinlerin bir kısmı kolayca ekstrakte edilebilmekteyken geri kalan kısım, kitinle kuvvetli kovalent bağ ile bağlandıklarından, hemen ekstrakte edilemez. Kabuk artıkları, proteinleri çözmek için seyreltik sodyum hidroksit çözeltisi (% 1-10) ile 65-100 °C'de muamele edilir. Hazırlama yöntemine bağlı olarak tepkime süresi 0.5-12 saat arasında değişmektedir. Deproteinizasyon işleminin optimum koşulları; kabukların katı (kabuk):çözücü oranı 1:10 (w/v) olacak şekilde % 3.5'luk sodyum hidroksit çözeltisi ile 65 °C'de 2 saat boyunca sürekli karıştırılarak etkileştirildiği şartlardır. Deproteinizasyon basamağı sırasında köpük oluşumu görülebilmektedir, ancak köpük oluşumu demineralizasyon sırasında oluşan kadar yoğun değildir. Protein ekstraksiyon veriminin artırılması için deproteinizasyon basamağı demineralizasyondan daha önce gerçekleştirilir.

2.5.2 Mineral uzaklaştırılması (Demineralizasyon)

Demineralizasyon işlemi genellikle, kalsiyum karbonatı kalsiyum klorür olarak çözmek için oda sıcaklığında çalkalama ve seyreltik hidroklorik asitle ekstraksiyon yapılarak gerçekleştirilir. Optimum koşullar; kurutulmuş kabukların 30 dakika 1N HCl ile oda sıcaklığında ve katı:çözücü oranı 1:15 (w/v) olacak şekilde sürekli karıştırılarak gerçekleştirildiği işlemdir. Demineralizasyon sonucu elde edilen kül içeriği % 31-36 kadardır. Bu da demineralizasyon basamağının etkisini çok iyi göstermektedir.

Demineralizasyon prosesi sırasında CO₂ üretiminden dolayı istenmeyen köpük oluşumu ile karşılaşılır ([CaCO₃ + 2HCl → CaCl₂ + CO₂ (↑) + H₂O]). Köpüğün kontrol edilmesi veya azaltılması amacıyla herhangi bir emülsiyon oluşturucu içermeyen % 10'luk aktif silikon polimer çözeltisi köpük giderici olarak kullanılır.

2.5.3 Ağartma

Deproteinize ve demineralize edilmiş kitin astaxanthin pigmentinin varlığından dolayı açık pembe renktedir. Kitinin ticari olarak kabul edilebilir olması için ağartma işleminin yapılması gerekmektedir. Ağartma işlemi sırasında kullanılacak kimyasalın kitinin ve kitosanın fizikokimyasal ve fonksiyonel özelliklerini etkilemeyecek bir madde olmasına dikkat edilmelidir. Aseton ile ekstraksiyon yapılarak beyaz kitin tozları elde edilir ve % 0.315 (v/v) sodyum hipoklorür çözeltisinde 5 dakika ağartmadan sonra oda sıcaklığında 2 saat kurutulur (katı:çözücü oranı 1:10 (w/v)). Ağartma işlemi bu sürede yetersiz olduğu takdirde, 1 saat daha bekletilerek beyaz renkli kitin tozları elde edilir.

2.5.4 Deasetilasyon

Deasetilasyon, kitinin yapısındaki asetil gruplarının uzaklaştırılarak kitosana dönüştürülmesi prosesidir. Genel olarak demineralize olmuş kabuktan elde edilen kitin; bazı asetil gruplarını veya tümünü uzaklaştırmak için derişik sodyum veya potasyum hidroksit çözeltisi (% 40-50) ile 100 °C'de yarım saat kadar etkileştirilmesi ile gerçekleştirilir (katı:çözücü oranı 1:10 (w/v)). DD'yi etkileyen birçok önemli faktör vardır. Bunlar;

- sıcaklık
- deasetilasyon süresi
- baz derişimi
- kitinin izolasyonundan önce uygulanan işlemler
- atmosfer (hava veya azot)
- kitin/baz oranı
- kitinin yoğunluğu
- parçacık boyutudur (http://etd.lsu.edu/docs/available/etd-11102004-134343/unrestricted/Fernandez-Kim_thesis.pdf).

2.6 Kitosanın Endüstriyel Uygulamaları

1990'ların başına kadar endüstride kitosan kullanımı, bitkilerin büyümesi ve su arıtımı gibi alanlarla sınırlı kalmışken, ilerleyen yıllarda kitosan üzerine yapılan çalışmaların artması ve sonuç olarak kitosanın sahip olduğu yenilenebilirlik, toksik olmama, biyobozunurluk, biyouyumluluk, antibakteriyel, antimikrobiyel, antitümör etki vs. gibi çok önemli özelliklerinin keşfedilmesi ile kitosan birçok alanda umut vaat eden bir polimer haline gelmiştir. Kitosanın kullanıldığı endüstriyel alanlar ve bu alanlardaki bazı uygulamaları Çizelge 2.2'de verilmiştir. Yapısında bulundurduğu fonksiyonel gruplar, katyonik polimer olma avantajı ve nanoboyutta kitosan parçacıklarının hazırlanabilmesi özellikle; biyomedikal, kozmetik, gıda, farmasötik sektöründe oldukça ilgi uyandırmıştır.

Çizelge 2.2 Kitosanın endüstrideki bazı kullanım alanları ve uygulamaları

(http://etd.lsu.edu/docs/available/etd-11102004-134343/unrestricted/Fernandez-Kim_thesis.pdf)

Endüstriyel Alan	Uygulama
Atık su iyileştirme	- Metal iyonlarının uzaklaştırılması - Protein, boya, aminoasit, organik bileşikler tutulması
Su arıtma	- Gıda prosesleri - Meşrubat / içme suyu
Çevresel temizleme	- Radyoaktif atıkların uzaklaştırılması
Tarım	- Tohum kaplama - Gübre - Kontrollü toprak kimyasalı salınım - Böcek öldürücüler - Parazit öldürücüler
Kağıt-Kağıt hamuru	- Yüzey iyileştirme - Fotoğrafik kağıt - Kaplama ve fiber

Çizelge 2.2 Kitosanın endüstrideki bazı kullanım alanları ve uygulamaları (devam)
(http://etd.lsu.edu/docs/available/etd-11102004-134343/unrestricted/Fernandez-Kim_thesis.pdf)

Endüstriyel Alan	Uygulama
Gıda endüstrisi	<ul style="list-style-type: none">- Besleyici ilaçlar- Boyar maddenin uzaklaştırılması- İçeceklerin temizlenmesi- Besin koruması- Renk dengesi- Koku ve tat dengesi- Besin dengesi- Yiyecek katkısı- Besin zar dokusu yapısı
Biyoteknoloji	<ul style="list-style-type: none">- Enzimin immobilizasyonu- Protein ayrılması- Hücre geri kazanımı- Kromatografi- Hücre immobilizasyonu
Kozmetik	<ul style="list-style-type: none">- Nemlendirici- Saç bakımı- Cilt bakımı- Ağız bakımı- Banyo losyonu
Membran	<ul style="list-style-type: none">- Geçirgenlik kontrolü- Ters osmoz
Ürün ayırımı ve geri kazanımı	<ul style="list-style-type: none">- Membran ayırımı- Koagülasyon- Kromatografik kolonlar- Kapsülleme adsorbentleri

Çizelge 2.2 Kitosanın endüstrideki bazı kullanım alanları ve uygulamaları (devam)
(http://etd.lsu.edu/docs/available/etd-11102004-134343/unrestricted/Fernandez-Kim_thesis.pdf)

Endüstriyel Alan	Uygulama
Biyomedikal	<ul style="list-style-type: none">- Yara iyileştirici- Antikanser tedavi uygulamaları- Kemik iyileştirici- Cerrahi dikişler- Diş uygulamaları- İlaç salım sistemleri- Göziçi ve kontakt lensler- Pıhtılaşma etkeni- Eczacılık

Bu kullanım alanlarından arıtma işlemlerinde kitosanın şelatlaşma özeliğinden yararlanır. Kitosan metal iyonları ile şelatlaşarak bu iyonların atık sulardan veya kirli akıntılardan uzaklaşmasını sağlar. Yine şelatlaşma özeliğinden yararlanarak besin işleme proseslerinden salınan atık sularda bulunan asılı haldeki boyar madde, aminoasit, protein, organik madde vs. gibi maddeler geri kazanılabilir. Kitosan kullanımı ile zaman tasarrufu ve yüksek geri kazanım sağlanabilmektedir. Kitosanın yapısında bulunan amino ve karboksilik grupları, atık nükleer sulardan uranyumun adsorplanması amacıyla da kullanılmaktadır. Kitosanın adsorplama kapasitesi parçacık boyutunun küçülmesi ile artmaktadır.

Kitosanın kozmetik alanında kullanımı özellikle saç bakımı konusunda yoğunlaşmıştır. Bu alanda kitosanın film oluşturabilme özeliğinden yararlanır. Kitosan proteinlerle kolayca film oluşturabildiği için saç köklerinin ihtiyaç duyduğu protein ve vitaminler film halinde hazırlanır. Benzer şekilde saç şekillendirici, cilt bakımı uygulamaları vs. gibi diğer kozmetik uygulamalara da sahiptir.

Hücre ve enzim tutuklanması işlemlerinde kitosan destek doku görevi görüp tutuklama matrisidir. Kitosan destek doku olarak kullanılarak enzim ve hücrelerin yüksek geri kazanımı ve daha fazla kullanımı sağlanır.

Kitosanın yara iyileştirici özeliği de vardır. Negatif yüklü heparin ile kararlı bir bileşik oluşturur; boncuk, jel, film ve fiber şeklinde hazırlanır. Bu özellikten yararlanarak iyonik bağlı kitosan-heparin bileşimini içeren sargı bezi veya yara bandı gibi ürünler kullanılmaya başlanmıştır. Bu ürünlerin kullanımı ile yara iyileşmesi sırasında epitel dokunun tekrar oluşum evresi hızlandırılmış olur.

Gıda endüstrisinde kitin ve türevleri; besleme, tedavi etme ve besinler için kaplama amacıyla kullanılır. Gıda endüstrisinde kullanım için kitosan da istenen özellikler;

- antimikrobiyal etki
- antifungal etki
- antioksidan etki
- film oluşturma özeliği
- su bağlama kapasitesi
- yağ bağlama kapasitesidir.

Kaplama uygulamalarında yine film oluşturma özeliğinden faydalanılır. Oluşan filmler hücre dışı solunumu yavaşlatır ve besinlerin raf ömrünü uzatır. Kitosan, kilo kontrolü amacıyla diyet haplarında kullanılır ve yağ tutma kapasitesinden yararlanır. Glukomannan ile birleştirilerek karaciğerden kolesterol uzaklaştırma işleminde de kullanımı vardır. Kitosan kırmızı kan hücrelerinin pıhtılaşmaya başlamalarını sağlar. Yağları ve kolesterolü bağlayarak bunların kan dolaşımında absorbe olmalarını engeller.

Dişçilikte yan ürün oluşumunu engellemek amacıyla kullanılır. Herhangi bir alerjik tepkime vermez ve enfeksiyon gözlenmez.

Kitosanın biyomedikal alanda;

- yapay deri
- gen tedavisi için ligand
- morfin ve aşilar için ilaç salım aracı

- lipit ve kolesterol tutucu araç
- ayırma kolonlarında kitin boncukları
- yapay böbrek membranı
- antitümör ilaç salım aracı
- kemik hasarlarının tamiri gibi kullanımları bulunmaktadır.

2.7 Kitosan Parçacık Büyüklüğünün Küçültülmesi

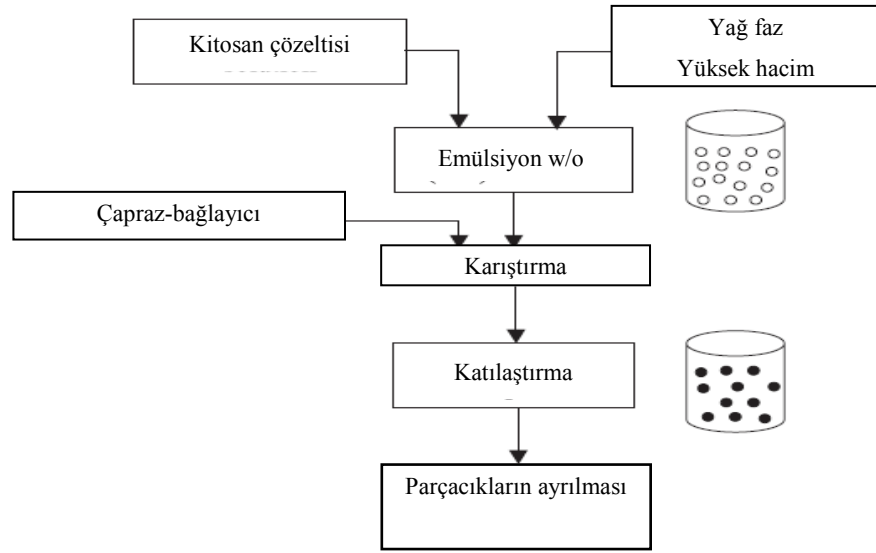
Kitinin deasetillenmesi sonucu elde edilen kitosanın boyutu genellikle 0.1-10 mm aralığındadır ve bu boyutlardaki kitosan yukarıda bahsedilen endüstriyel uygulamaların büyük çoğunluğunda kullanılabilmesi için uygun değildir. Kitosan parçacıklarının boyutu küçüldükçe sahip olduğu özellikler aksine artmaktadır (adsorpsiyon kapasitesi, antimikrobiyal etki, ilaç salım kapasitesi, antitümör etki, biyodağılım vs. gibi). Birçok önemli özeliğe sahip bol miktarda bulunan bu doğal biyopolimerden en verimli şekilde yararlanabilmek için araştırmacılar boyut küçültme çalışmalarına yönelmişlerdir.

Sürelili yayınlarda çok küçük (mikro ve nanoboyut) kitosan parçacıklarının üretilmesi üzerine genellikle aşağıdaki yöntemlerin geliştirildiği ve parçacıkların kullanım alanı ve amacına göre bu yöntemlerden birinin seçildiği görülmüştür. Sürelili yayınlarda yer alan boyut küçültme yöntemleri şöyledir (Agnihotri *et al.* 2004);

- emülsiyon çapraz-bağlama yöntemi
- çöktürme/toplanma yöntemi
- sprey kurutma yöntemi
- emülsiyon damlacık birleşme yöntemi
- iyonik jelleşme yöntemi
- ters misel yöntemi

2.7.1 Emülsiyon çapraz-bağlama yöntemi

Bu yöntem, kitosanın reaktif fonksiyonel amino gruplarının çapraz-bağlama ajanının aldehit gruplarıyla çapraz-bağlanması için kullanılır. Şekil 2.5'te yöntemin basit bir şematik gösterimi yer almaktadır. Bu yöntemde, kitosan çözeltisi yağ fazda emülsiyeye edilerek w/o (water-in-oil) emülsiyonu hazırlanır. Sulu damlacıklar uygun bir yüzey aktif madde kullanılarak kararlılaştırılırlar. Kararlı emülsiyon, parçacıkları katılaştırmak için glutaraldehit gibi bir çapraz-bağlayıcı kullanılarak çapraz-bağlanır. Mikroküreler filtre edilir ve n-hegzan ile yıkanır, daha sonra ise kurutulur.

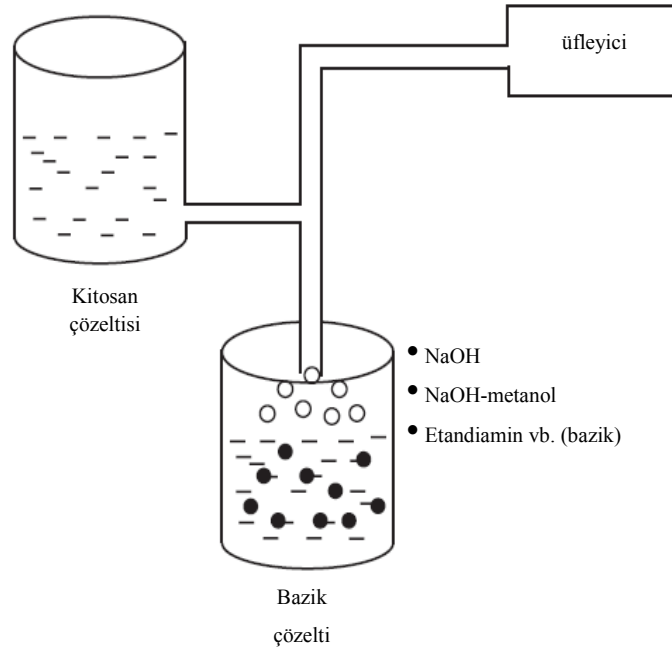


Şekil 2.5 Emülsiyon çapraz-bağlama yönteminin şematik gösterimi

Bu yöntem ile sulu damlacıkların boyutu kontrol edilerek parçacık boyutu da kontrol edilmiş olur. Son ürünün parçacık büyüklüğü çapraz-bağlayıcının derecesine bağlıdır.

2.7.2 Çöktürme/toplanma yöntemi

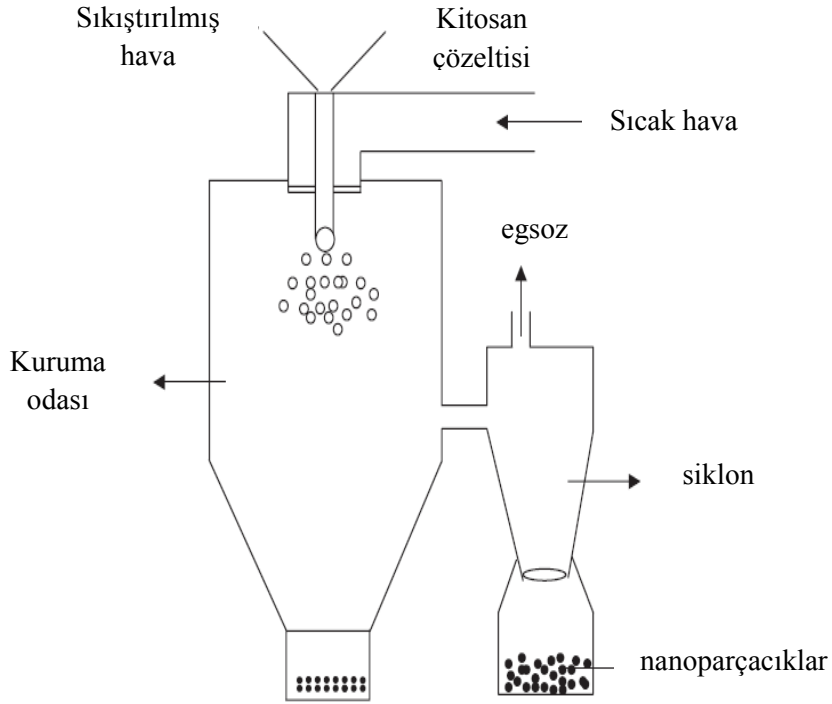
Bu yöntem kitosanın fizikokimyasal özeliğinden yararlanır. Kitosan bazik ortamda çözünmez, ancak bazik çözelti ile temas ederse çöker ve toplanır. Parçacıklar, toplanmış damlacıklar oluşturmak için bir nozzle kullanılarak sodyum hidroksit, NaOH-metanol veya etandiamin gibi bazik bir çözeltiye kitosan çözeltisinin püskürtülmesi ile üretilir. Parçacıkların ayrılıp saflaştırılması, sıcak ve soğuk suyla yıkama işleminden sonra gerçekleştirilen filtreleme ve santrifüjleme ile yapılır. Yöntem Şekil 2.6'da şematik olarak gösterilmiştir. Sıkıştırılmış hava basıncının değişimi ve sprej-nozzle çapı parçacık boyutunu kontrol eder. Bu yöntem kullanılarak genellikle kitosan-DNA nanoparçacıkları hazırlanmaktadır. Parçacıkların katılaştırılması için çapraz-bağlayıcı kullanımı, ilaç salımını kontrol eder.



Şekil 2.6 Çöktürme/toplanma yönteminin şematik gösterimi

2.7.3 Sprey kurutma yöntemi

İyi bilinen bir tekniktir. Yöntem, damlacıkların püskürtülerek sıcak bir hava akımında kurutulmasına dayanır. Bu yöntemde genellikle, ilaç yüklü kitosan parçacıklarının sentezi gerçekleştirilir. Önce kitosan asetik asit çözeltisinde çözünür. Hazırlanan çözeltiye ilaç eklenerek çözünür veya dağıtılır. Daha sonra ise uygun bir çapraz-bağlayıcı eklenir. Bu çözelti bir hava akımında atomize edilir. Atomizasyon küçük damlacıkların oluşmasını ve çözücünün uzaklaşmasını sağlar. Çözücünün uzaklaşması ile serbest hareket edebilen parçacıklar oluşur. Yöntem, Şekil 2.7’de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.7 Sprey kurutma yönteminin şematik gösterimi

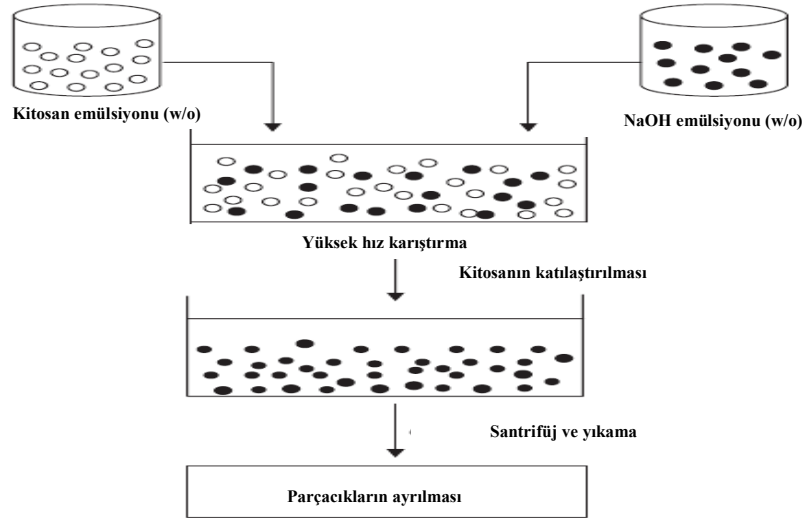
İstenen parçacık boyutu üzerine birçok proses parametresinin etkisi vardır. Parçacık boyutu;

- nozzle büyüklüğüne

- sprej akış hızına
- atomizasyon basıncına
- giriş sıcaklık değerine
- çapraz-bağlanma derecesine bağlıdır.

2.7.4 Emülsiyon-damlacık birleşme yöntemi

Emülsiyon ve çöktürme yöntemlerinin özelliklerinden yararlanarak uygulanan bir yöntemdir, ancak; kararlı damlacıkların çapraz-bağlanması yerine, kitosan damlacıkları ile NaOH damlacıkları birleştirilip çökme olayı azaltılır. Yöntemde, önce parafin içerisinde kitosan çözeltisini içeren bir emülsiyon hazırlanır, sonra da kitosan çözeltisi içeren NaOH çözeltisinin emülsiyonu aynı şekilde hazırlanır. Yüksek karıştırma hızında her iki emülsiyon birleştirilir; böylelikle, her iki taraftaki damlacıklar rastgele bir şekilde şiddetle çarpışırlar. Sonuç olarak, ufak parçacıklar elde edilmiş olur. Yöntem Şekil 2.8’de şematik olarak gösterilmiştir.

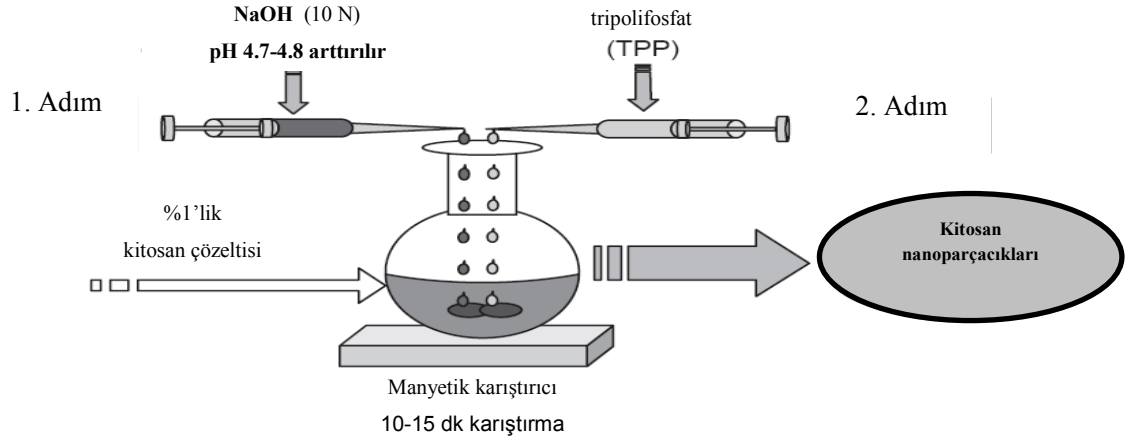


Şekil 2.8 Emülsiyon-damlacık birleşme yönteminin şematik gösterimi

Üretilen parçacıklar kitosanın tipine bağlıdır. DD azalırca tanecik boyutu artar, yüklenebilecek ilaç miktarı ise azalır. Bu yöntemle yüksek DD için ortalama parçacık boyutu 400 nm civarında olan ilaç-yüklü nanoparçacıklar üretilmektedir.

2.7.5 İyonik jelleşme yöntemi

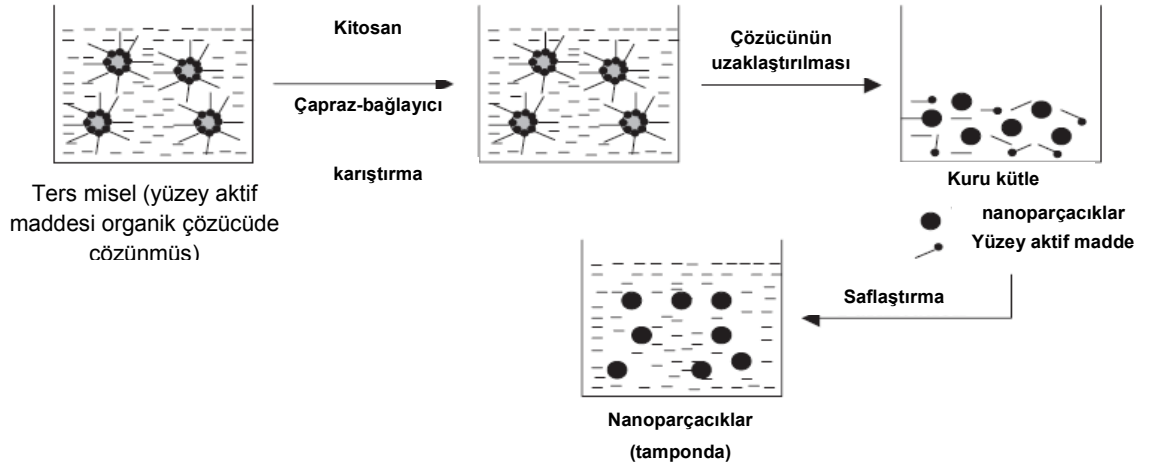
Kimyasalların olası zehirlilikleri ve diğer istenmeyen etkilerinden kaçınmak için kimyasal çapraz-bağlayıcılar yerine, kitosan ile elektrostatik etkileşimler sonucu tersinir fiziksel bağlanan çapraz-bağlayıcıların kullanıldığı oldukça basit bir yöntemdir. Çapraz-bağlayıcı olarak genellikle tripolifosfat kullanılır. Bu yöntemde öncelikle kitosan asetik asit çözeltisinde çözünür. Daha sonra tripolifosfat çözeltisi, sürekli karıştırma altında kitosan-asetik asit çözeltisine yavaşça eklenir. Bu eklenme ile kitosan nanoparçacıkları kendiliğinden oluşur. Oluşan bu parçacıklar küresel yapıdadır ve zayıf mekanik kuvvete sahiptirler. Şekil 2.9'da iyonik jelleşme yönteminin şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 2.9 İyonik jelleşme yönteminin şematik gösterimi

2.7.6 Ters misel yöntemi

Ters miseller termodinamik olarak kararlı su, yağ ve yüzey aktif maddelerin sıvı karışımıdır. Homojen ve izotropiktirler. En önemli yönlerinden biri dinamik davranışlarıdır. Ters misel damlacıklarının sulu çekirdeği parçacıkların oluşumunda nanoreaktör görevi görmektedir. Ters misel yöntemi kullanılarak 1-10 nm aralığında damlacıklar üretilir ve bu damlacıklar iyi dağılmış durumdadırlar. Şekil 2.10'da ters misel yöntemine ait şematik gösterim yer almaktadır. Bu yöntemde yüzey aktif maddesi organik bir çözücünde çözünerek ters misel ortamı hazırlanır. Sürekli karıştırılan ortama kitosan çözeltisi ve çapraz-bağlayıcı eklenir. Oluşan şeffaf çözümden çözücü buharlaştırılır ve geride yüzey aktif maddesini ve nanoparçacıkları içeren katı kütle kalır. Saflaştırma işlemi ile yüzey aktif maddesi de uzaklaştırılır ve daha sonra nanoparçacıklar elde edilir.



Şekil 2.10 Ters misel yönteminin şematik gösterimi

3. KAYNAK ÖZETLERİ

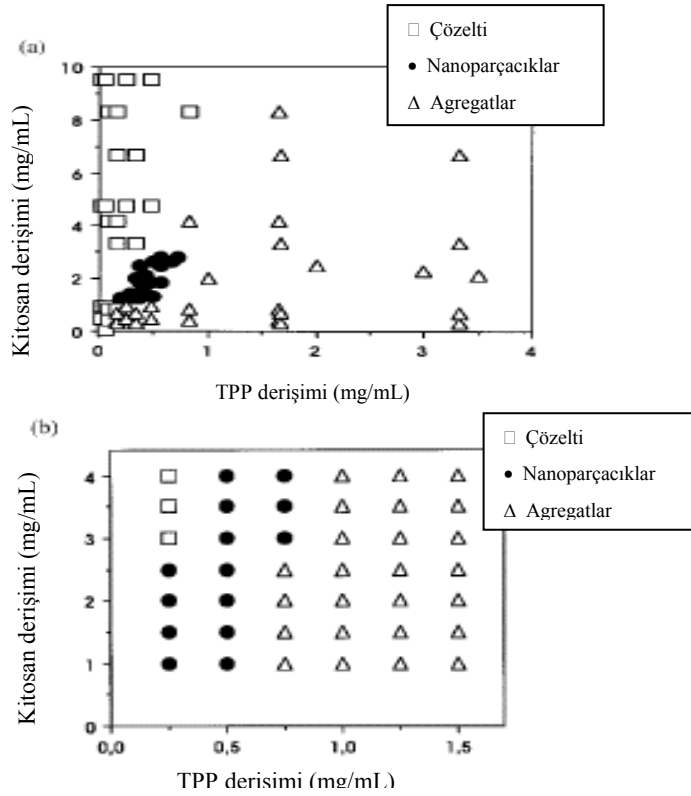
Bu çalışmada KNP'yi sentezleyebilmek için Bölüm 2.7'de verilen emülsiyon çapraz-bağlama, çöktürme-toplanma, sprey kurutma, emülsiyon-damlacık birleştirme, iyonik jelleşme ve ters misel yöntemlerinden iyonik jelleşme ve ters misel yöntemleri seçilmiştir. Bunun sebebi; iyonik jelleşme ile KNP'nin sentezinin oldukça basit olması ve ters misel yöntemi ile dar parçacık boyut dağılımına sahip çok küçük parçacıkların sentezlenebilmesidir. Son yıllara ait süreli yayınlar incelendiğinde de KNP sentezi için, daha çok iyonik jelleşme yöntemi olmak üzere, genellikle bu iki yöntemin uygulandığı görülmüştür. Seçilen bu iki yöntemle ilgili süreli yayınlardan seçilmiş bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

3.1 İyonik Jelleşme Yöntemiyle İlgili Çalışmalar

İyonik jelleşme yöntemi KNP'nin sentezlenmesi için en çok kullanılan sentez yöntemidir. Bu yöntemle nanoparçacık hazırlamak oldukça basit olup çapraz-bağlayıcılardan kalabilecek muhtemel zehirlilik etkisinden uzak durulmuş olur. Aşağıda süreli yayınlarda karşılaşılan bazı çalışmalar özetlenmiştir:

Calvo *et al.* (1997) yaptıkları çalışmada, yeni bir hidrofilik nano parçacık oluşturmuş ve proteinlerin tutulması ve kontrollü salımındaki yararlarını değerlendirmişlerdir. Polimerler arasından katyonik polisakkarit kitosan, yüksüz blok kopolimer polietilen oksit ve polietilen oksit (PEO) – polipropilen oksit (PPO) seçilmiştir. Parçacıkların oluşumu, kitosanın TPP gibi bir polianyon ile iyonik etkileşmesi sonucu sıvı-jel geçişine dayanmaktadır. Oluşan kitosan nano parçacıkları 250-1000 nm aralığındadır. Başlangıç deneylerini nanoparçacık oluşumunun meydana geldiği derişim aralığını bulmaya yönelik yapmışlardır. Bu amaçla kitosan, hazırlanan farklı derişimlerdeki asetik asit çözeltilerinde çözülmüştür (% 0.05, % 0.1, % 0.5 ve % 1 (w/v)). Asetik asit derişimi, tüm deneylerde, kitosaninkinden 1.75 kat fazla seçilmiştir. TPP çözeltisi ise kitosan çözeltisi ile aynı derişimlerde hazırlanmıştır (% 0.05, % 0.1, % 0.5 ve % 1 (w/v)). Hazırlanan TPP çözeltileri (0.25, 1.0, 2.0, 2.5 ve 3 ml) oda sıcaklığında manyetik karıştırma altında 5 mL'lik kitosan çözeltisine eklenmiştir. Elde edilen

örneklerde üç farklı sistemin oluştuğu gözlenmiştir. Bunlar; berrak çözelti, bulanık süspansiyon ve kümeleşmelerdir. Berrak çözelti, bulanık süspansiyon ve kümeleşmelerin oluşumu kitosan ve TPP derişimine bağılı olarak Şekil 3.1.a,b’de gösterilmiştir. Araştırmacılar en küçük parçacık büyüklüğünü en düşük derişimlerle çalışarak elde etmişlerdir (260 nm). Bu çalışma ile iyonik jelleşme yöntemi kullanılarak KNP hazırlanması ilk kez gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1 Çeşitli kitosan ve TPP derişimlerinde KNP'nin oluşum bölgesi (Calvo *et al.* 1997)

a. geniş derişim aralığında, b. nanoparçacıkların oluştuğu derişimlerde

Dyer *et al.* (2002) kompleksleşme ve iyonik jelleşme ile sentezledikleri iki farklı tipte KNP'yi kullanarak sıçan ve kuzu örneklerinde bir örnek ilacın (insan çinko insülin) burundan verilmesiyle absorpsiyon arttırma etkilerini karşılaştırmışlardır. Nanoparçacıkların etkisi, kitosan çözeltisi ve kitosan tozları ile birlikte burundan verilen insülinin adsorpsiyon arttırıcı etkisi ile karşılaştırılmıştır. Sentezlenen insülin yüklenmemiş parçacıkların ortalama büyüklüğü 250 nm ve zeta potansiyeli 28.8

mV'tur. İnsülin yüklenmiş nanoparçacıklar ise 751.8 nm ortalama parçacık büyüklüğüne sahiptir. Araştırmacılar bu çalışmadan elde ettikleri bulguları Fernando-Urrusuna *et al.* (1999) çalışmalarındaki bulgular ile kıyaslamış ve o çalışmanın aksine, hem kitosan çözeltisi hem de kitosan tozlarının adsorpsiyon artırma yeteneği bakımından elde edilen KNP'larına kıyasla daha yüksek olduğu sonucuna varmışlardır. Ayrıca, insülinin burundan verildiği ve hayvan örnekleri üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda kitosan tozlarının kitosan çözeltisine göre daha iyi sonuç verdiği sonucunu bulmuşlardır.

Qi *et al.* (2004a) KNP'nin antibakteriyel özelliklerini incelemişlerdir. KNP'ye bakır yüklemiş ve çeşitli organizmalara karşı, canlı vücut dışında yapay bir çevrede, bu parçacıkların antibakteriyel etkilerini değerlendirmişlerdir. KNP'yi, TPP anyonlarıyla kitosanın iyonik jelleşmesi yöntemi ile elde etmişlerdir. Nanoparçacıkların fizikokimyasal özellikleri; boyut, zeta potansiyeli, AFM, FTIR ve XRD analizleri yardımıyla belirlenmiştir. Elde edilen KNP'nin büyüklüğü 28.3 - 48.7 nm arasındadır.

Aynı araştırmacıların bir başka çalışmalarında (Qi and Xu 2004b) sulu çözeltiden KNP üzerine kurşun tutulması üzerinde de çalışmışlardır. TPP ile kitosanın iyonik jelleşmesi yöntemini uygulayarak 40-100 nm boyutları arasında parçacıklar hazırlamışlardır. Parçacık karakterizasyonu önceki çalışmalarında gerçekleştirilen yöntemlerle yapılmıştır. Kurşun iyonlarının KNP tarafından adsorplanma kapasitesi ve adsorpsiyon izotermi belirlenmiştir. Adsorplama kapasitesine; başlangıç derişimi, sıcaklık, adsorplayıcı miktarı ve boyutu, çalkalama süresi ve pH'nin etkisini incelemişlerdir. KNP'nin etkili bir şekilde kurşun iyonlarını tuttuğunu ve fosfor gruplarının yapıya girmesi ile kapasitenin arttığını saptamışlardır.

Lee *et al.* (2004) kitosani çeşitli fonksiyonel gruplarla modifiye ederek hidrofobik doğayı hidrofilik yapıya dönüştürmeyi ve parçacık yığılmasını engellemeyi amaçlamışlardır. Kitosani metanol ortamında homojen şartlar altında bütanoik, hegzanoik ve benzoik anhidrit ile N-açilleyerek açillenme derecesini Hidrojen Nükleer Manyetik Rezonans (H-NMR) ile belirlemişlerdir. N-açil KNP'yi, TPP anyonlarının eklenmesiyle hazırlamışlardır. N-açil KNP dondurularak kurutulmuş ve parçacık

boyutu, zeta potansiyeli ve kan uygunluğu analizlerini yapmışlardır. N-açıl KNP 160-200 nm boyut aralığında elde edilmiş ve parçacıkların biyouyumlu oldukları belirlenmiştir.

Zhang *et al.* (2004) iyonik jelleşme yöntemi kullanarak dar bir boyut dağılımında KNP sentezlemişlerdir. Sentezledikleri nanoparçacıklar 90-220 nm aralığındadır. Parçacık boyutu üzerine sıcaklık, pH ve kitosan/TPP oranını incelemişler, ayrıca yüksek deasetilasyon derecesi ve molekül ağırlığının parçacık boyutu kontrolüne etkisini de çalışmışlardır. pH ve sıcaklığın artmasıyla boyutun da arttığını, en küçük nanoparçacık büyüklüğünün kitosan/TPP oranı 5 iken elde edilebileceğini görmüşlerdir.

Lopez-Leon *et al.* (2005) çalışmalarında TPP ile çapraz bağlanmayla oluşan KNP'nin bazı fiziksel özelliklerini çalışmışlardır. Elektrokinetik özellikleri ve kolloidal kararlılığı, pH ve ortamın iyonik kuvvetinin bir fonksiyonu olarak incelemişlerdir. Çalışmalarda pH'nin ve bekleme süresinin parçacık büyüklüğüne etkisi araştırılmıştır. Asidik ortamda pH'nin artmasıyla parçacık boyutunun azaldığı, bazik ortamda ise değişmediği gözlenmiştir. Parçacık boyutunun asidik ortamda bekleme süresinin değişiminden etkilenmediği, bazik ortamda ise bekleme süresinin artmasıyla arttığı bulunmuştur. Elde edilen parçacıkların büyüklüğünün 200-300 nm aralığında olduğu saptanmıştır.

Grenha *et al.* (2005) çalışmalarında protein yüklü KNP'yi kullanarak, akciğere protein yüklü KNP'yi taşıyan mikrokürelere üretmişlerdir. Sonuç olarak protein yüklü nanoparçacıkların, akciğerin derinliklerine ulaşabilmek için, uygun özelliklere sahip mikrokürelere başarılı bir şekilde bağlandığını ve bu mikrokürelere sulu ortamla temasından sonra nanoparçacıkların salımının gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada kitosan/TPP oranının parçacık boyutuna etkisi incelenmiştir. Bu oran arttıkça boyutun arttığı ve parçacık boyutunun 280-420 nm arasında değiştiği gözlenmiştir.

Amidi *et al.* (2006) N-trimetil kitosan (TMC) nanoparçacıklarını kullanarak antijenlerin burundan verilmesi üzerine çalışmışlardır. Bu amaçla model ajan olarak seçtikleri ovalbümini nanoparçacıklarla kapsüllemişlerdir. Ovalbümin kapsüllenmiş

nanoparçacıklar bir saflaştırma işleminden geçirilmiştir, saflaştırılan ovalbümin yüklü parçacıkların ortalama büyüklüğü 479 ± 32 nm'dir. Araştırmacılar hazırladıkları ovalbümin-TMC nanoparçacıklarının burundan dağıtım sistemi olarak kullanılıp kullanılmayacağını belirlemek için in vitro (laboratuvar ortamında) ve in vivo (canlı ortamda) zehirlilik testleri yapmışlar ve eşodaklı lazer mikroskobu kullanarak TMC nanoparçacıklarının sıçanların burun epitelyal dokusuna alınmasını incelemişlerdir. Sentezlenen TMC nanoparçacıkları proteinler için mükemmel yükleme kapasitesine ve burun mukozasına bağlanabilmesini sağlayan pozitif yüzey yüküne sahiptirler. In vivo çalışmalar, albümin yüklü TMC nanoparçacıklarının burun boşluğuna verildiklerinde, mukozal tabakayı geçip fare burun epitelyası tarafından emilip alt-mukozal tabakaya aktarıldığını göstermiştir. Sonuç olarak, proteinlerin burundan dağıtılabilmesi için uygun olduğu belirlenen bu yöntem ile ilk kez canlı bir modelde (in vivo), protein yüklü TMC nanoparçacıklarının burun mukozal duvarını geçebilme yeteneğini göstermişlerdir.

Deng *et al.* (2006) ilk kez lizozim içeren kitosan nanoparçacıkların sentezini iyonik jelleşme yöntemini kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Kitosan molekül ağırlığının ve kitosan, TPP ve başlangıç lizozim içeriğinin kapsülleme verimliliği, yükleme kapasitesi, salım hızı ve KNP'lerdeki lizozim etkinliği üzerine etkileri üzerine durmuşlardır. 50-280 nm aralığında küresel KNP üretmişlerdir. Yüksek molekül ağırlıklı kitosan; yüksek lizozim kapsüllemesi verimliliği ve yüksek yükleme kapasitesi göstermiştir, ancak; salım hızı düşüktür. Kitosan içeriğinin azaltılması kapsülleme verimini önce arttırmış sonra azaltmış, yükleme kapasitesini ve salım hızını ise azaltmıştır. Yüksek TPP içeriği ile daha yüksek kapsülleme verimi ve yükleme kapasitesi elde edilirken salım hızı da artmıştır. Başlangıç lizozim derişiminin arttırılmasıyla kapsülleme verimi ve salım hızı azalmış ancak yükleme kapasitesi artmıştır. Lizozim yüklü nanoparçacıkların durumunun lizozim için çok iyi olduğunu, sonuç olarak; bağıl parametrelerin bazı kullanımlarda protein dağıtım ihtiyacını karşılamak için ayarlanabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Motwani *et al.* (2006) nanoparçacık süspansiyonların hazırlanmasında ve seyreltilmesinde kullanılan çözücülerin yabancı nanoparçacıklara neden olduğu ve

oluşturulmak istenenden farklı nanoparçacıkların oluşmasıyla nanoparçacıkların gerçek boyutu ve parçacık boyut dağılımını etkilediği hipotezine dayanarak kitosan nanoparçacıklarının parçacık boyutu ve polidispersitesi üzerine çözücü etkisini incelemişlerdir. Araştırmacılar, KNP'yi iyonik jelleşme yöntemini kullanarak elde etmişlerdir. Kitosan, hemen hemen hiçbir organik çözücüde ve nötral pH'de suda çözünmediğinden dolayı tercih edilmiş böylece, herhangi bir nanoparçacık yüzey – çözücü etkileşmesinin olmaması sağlanmıştır. Bu özeliğinden dolayı, çözücü ile seyreltme işleminden sonra KNP'nin ortalama parçacık büyüklüğü ve polidispersitesindeki herhangi bir değişimin, çözeltinin neden olduğu parçacıkların göstermiş olduğu parçacık dağılım şiddeti değişimi olarak yorumlanabileceğini belirtmişlerdir. Oluşturulan orjinal kitosan nanoparçacık süspansiyonu için ortalama parçacık büyüklüğü 285 ± 14 nm ve polidispersite indeksi 0.219 ± 0.011 'dir. Çalışmada birçok sulu ve susuz çözelti kullanılmıştır. Seyreltme oranının artmasıyla ortalama parçacık büyüklüğünde (posfat tamponu ve iki kez damıtılmış su hariç) azalma görülmüştür. Basit çözeltilerin kullanılması az sayıda çok küçük nanoparçacıklara neden olurken ortalama parçacık büyüklüğü azalmıştır, oysa; tamponların kullanılmasıyla önemli sayıda büyük nanoparçacıklar oluşmuş ve ortalama parçacık büyüklüğü artmıştır. Sonuç olarak; 0,45 µm membran filtreleri ile filtrelenmiş çok yüksek saflıktaki çözücülerin nanoparçacık hazırlanmasında veya karakterizasyonunda kullanılması gerektiğini ileri sürmüşlerdir.

Hu *et al.* (2006) iyonik jelleşme yöntemini kullanarak 10-100 nm aralığında KNP sentezlemişler ve bu nanoparçacıkları, sulu bir çözeltiden bir asit boyar maddesi olan Asit Yeşili 27'yi uzaklaştırmak için bir adsorplayıcı olarak kullanmışlardır. Adsorplama kapasitesini nanoparçacıklardaki kitosan ağırlığını kullanarak 2103.6 mg/g olarak hesaplamışlar ve bu değerin mikrobeyutlu kitosana göre oldukça fazla olduğunu vurgulamışlardır.

İyonik jelleşme ile KNP'nin sentezi ile ilgili süreli yayınlarda yer alan çalışmalardan bazılarında incelenen parametre ve özellikler Çizelge 3.1'deki gibi özetlenmiştir.

Çizelge 3.1 İyonik jelleşme yöntemi ile KNP'nin sentezlenmesi üzerine yapılan bazı çalışmalar

Kaynak	İncelenen parametreler	İncelenen Özellik	Parçacık Boyutu (nm)
Calvo <i>et al.</i> 1997	Kitosan ve TPP derişimleri	Parçacık büyüklüğü	250-1000
Dyer <i>et al.</i> 2002	Kitosan ve TPP derişimleri	Adsorpsiyon yeteneği	250-751.8
Qi <i>et al.</i> 2004a	--	Antibakteriyel etki	28.3-48.7
Qi and Xu 2004b	Başlangıç derişimi, sıcaklık, adsorplayıcı boyutu, adsorplayıcı miktarı, pH	Adsorpsiyon yeteneği	40-100
Lee <i>et al.</i> 2004	--	Kan uyumluluğu	260-300
Zhang <i>et al.</i> 2004	Sıcaklık, pH, kitosan/TPP oranı	--	90-200
Lopez <i>et al.</i> 2005	pH, iyonik kuvvet	Şişme-büzülme	200-300
Deng <i>et al.</i> 2006	Kitosan, TPP ve başlangıç lizozim derişimi	Kapsülleme verimliliği, yükleme kapasitesi, salım hızı	50-280
Motwani <i>et al.</i> 2006	--	Çözelti kalitesi	270-300
Hu <i>et al.</i> 2006	--	Adsorpsiyon yeteneği	10-100

3.2 Ters Misel Yöntemiyle İlgili Çalışmalar

Ters misel yöntemi, iyonik jelleşme yöntemine göre daha detaylı bir sentez yöntemi olup en büyük avantajı dar boyut dağılımına sahip çok iyi dağılmış KNP'nin sentezlenebilmesidir. Çapraz-bağlayıcı olarak kullanılan kimyasallardan veya organik çözücülerden kalan artıkların tam olarak uzaklaştırılamamasından kaynaklanabilecek zehirlilik etkisi olabileceği için hazırlanan KNP'nin iyi bir şekilde kalıntılardan arındırılması gerekmektedir. Aşağıda süreli yayınlarda karşılaşılan bazı çalışmalar özetlenmiştir :

Mitra *et al.* (2001) ters misel ortamı kullanarak 50-300 nm aralığında KNP elde etmişler ve Doxorubicin (DXR)-Dextran (DEX) antikanser ilacını KNP'ye kapsülleyerek

antitümör etkisini incelemişlerdir. Hazırlanan antikanser ilaç Bulb/c faresi üzerinde denenmiştir. KNP'ye yüklenmiş ilacın oluşturduğu etkiyi görmek için fareler üzerinde kontrolsüz, boş KNP, yalnız DXR, DXR-DEX ve DXR-DEX yüklü KNP gibi beş farklı durumu incelemişlerdir. Sırasıyla ilk üç durumda fareler ölmüştür. DXR-DEX verildiği durumda 90 gün sonunda tümör hacminde % 25 azalma olurken KNP'ye yüklenmiş durumda bu oranın % 50'ye çıktığını gözlemlemişlerdir.

Banerjee *et al.* (2002) glutaraldehit ile çapraz-bağlanan KNP'yi, AOT/n-hekzan ters misel yöntemi ile hazırlamışlardır. FTIR analizleri ile polimerik yapıdaki çapraz bağlanma doğrulanarak, parçacıkların yapışkan doğalarından dolayı, boyutlarının, sulu tampondaki parçacık yoğunluğuna ve çapraz bağlanma miktarına bağlı olduğunu saptamışlardır. TEM görüntüleri ile parçacıkların küresel şekilli ve kümelenmelerin olduğu gözlenmiştir. Ters misel yöntemiyle 30-110 nm boyut aralığında tanecikler elde edilmiştir.

Zhi *et al.* (2005) çalışmalarında asidik diüretik furosemidin nanoparçacık sistemlerindeki adsorpsiyon kapasitelerini araştırmış ve adsorpsiyonu gerçekleştirmek için sulu fazında kitosan bulunan yeni bir ters misel sistemi hazırlamışlardır. Nanoemülsiyonu oluşturmak için yüzey aktif maddesi olarak TX-100, yağ faz olarak siklohekzan, yardımcı yüzey aktif maddesi olarak ta n-hekzanol kullanmışlardır, sulu fazı ise kitosan içeren seyreltik asetik asit çözeltisi oluşturmaktadır. Bu şekilde hazırladıkları iki nanoemülsiyondan birine glutaraldehit diğerine ise NaOH ekleyerek çapraz-bağlı KNP'nin nanoemülsiyonda oluşmasını sağlamışlardır. Çöktürme amacıyla NaOH kullanıldığında iyi dağılmış, 30-150 nm büyüklüğe sahip KNP oluşmuşken, glutaraldehit kullanıldığında 22 nm ortalama çapa sahip parçacıklar elde etmişlerdir. Mikrobüyükteki kitosan parçacıklarına kıyasla, nanoparçacıkların adsorpsiyon dengesi daha hızlı olmuş ve adsorpsiyon miktarı oldukça artmıştır. Dengeye 10 dakikada ulaşılmış ve NaOH ile hazırladıkları KNP ile 270 mg/g derişiminde diüretik furosemit adsorplanmıştır. Mikrobüyükte ise adsorpsiyon derişimi 87 mg/g ve denge süresi 60 dakikadır.

Zhi *et al.* (2006) ters misel yöntemini kullanarak manyetik kitosan/Fe₃O₄ kompozit nanoparçacıklarını hazırlamışlardır. Hazırlanan 10-80 nm boyut aralığındaki kompozit nanoparçacıkların manyetik özellikleri ve kararlılıklarını incelemişlerdir. Çalışma sonucunda; demir oksit nanoparçacıklarının kitosan nanoparçacıkları tarafından sarılmış olduğunu, kompozit nanoparçacıkların doymuş mıknatıslığının 11.15 emu/g olduğunu, hazırlanan manyetik kitosan nanoparçacıkların süperparamanyetik özellik gösterdiklerini ve yüksek manyetik kararlılığa sahip olduklarını saptamışlardır.

Liu *et al.* (2007) su, Triton X-100, oktanol ve sikloheksan içeren ters mikroemülsiyonunu kullanarak çok ince kitosan parçacıkları sentezlemişlerdir. Bunun için, iki farklı parçacık hazırlama yöntemi uygulamış, TEM ve FTIR analizleri yaparak sentezlenen parçacıkların karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu yöntemlerin ilkinde iyonik jelleşme yöntemi ile çapraz-bağlama yöntemi birleştirilmiştir. Diğer yöntemde ise sadece çapraz-bağlama yapılmıştır. Araştırmacılar, uyguladıkları yöntemlere ait muhtemel parçacık oluşum mekanizmasını tasarlamışlardır. Ortalama uzunluğu 943 nm genişliği ise 188 nm olan ince uzun KNP'lerin sentezlendiği çapraz bağlama yöntemine kıyasla, iyonik jelleşme ile birleştirilmiş çapraz bağlama yöntemi kullanılarak iyi dağılmış tekdüze parçacıklar sentezlenebilmiştir. Bu yöntem ile sentezlenen parçacıkların ortalama çapı 92 nm'dir.

Ters misel yöntemi ile ilgili süreli yayınlarda karşılaşılan çalışmalardan bazılarında incelenen parametre ve özellikler Çizelge 3.2'deki gibi özetlenmiştir.

Çizelge 3.2 Ters misel yöntemi ile KNP'nin sentezlenmesi üzerine yapılan bazı çalışmalar

Kaynak	İncelenen parametreler	İncelenen Özellik	Parçacık Boyutu (nm)
Mitra <i>et al.</i> 2001	--	Antitümör etki	50-300
Banerjee <i>et al.</i> 2002	Çapraz-bağlanma	Biyodağılım	30-110
Zhi <i>et al.</i> 2006	--	Manyetik özellik	10-80
Liu <i>et al.</i> 2007	--	Üretim yöntemi	92 943 uzunluk-188 genişlik

4. MATERYAL ve YÖNTEM

4.1 Materyal

İyonik jelleşme yöntemi ile KNP sentezinde; kitosan [orta molekül ağırlıklı (medium molecular weight, MMW), Brookfield viskozitesi 200.000 cps, Sigma], sodyum tripolifosfat (TPP, Sigma), asetik asit (CH₃COOH, Merck, % 100) ve D (+) trehaloz dihidrat (Fluka, % 99,5) kullanılmıştır.

Ters misel yönteminde ise glutaraldehit, sodyum bis(etilhekzil) sülfosüksinat (AOT, Sigma % 98), polietilen glikol oktil-fenil eter (TX-100), sodyum dodesilsülfat (SDS, Sigma), n-hekzan (Merck, % 99), siklohekzan (Merck, % 99,5), hekzanol (Merck, % 99), hidroklorik asit (HCl, Merck, % 37), tris (hidroksi metil) amin metan (Sigma, % 99.9), amonyak çözeltisi (Riedel-de Haën, %), kitosan (orta molekül ağırlıklı MMW, Sigma) ve asetik asit (CH₃COOH, Merck, % 100) kullanılmıştır. Damıtık su ve deiyonize su kullanılarak tüm deneyler gerçekleştirilmiştir.

4.2 Yöntem

Parçacık hazırlama yönteminin seçimi, süreli yayınlarda incelenen çalışmalarda genellikle, aşağıda belirtilen faktörler göz önünde bulundurularak yapılmıştır;

- parçacık büyüklük gereksinimi
- aktif ajanın termal ve kimyasal kararlılığı
- salımın kinetik profilinin tekrarlanabilirliği
- son ürünün kararlılığı
- son ürünün zehirlilik derecesi

Bu çalışmanın amacı nanoboyutta kitosan sentezlemek olduğu için, en küçük parçacığın sentezlenebildiği ters misel yöntemi ve nanoparçacıkların en basit şekilde hazırlanabildiği ve yine çok küçük parçacıkların sentezlenebildiği iyonik jelleşme yöntemi seçilmiştir.

Sürelili yayınlarda, sentezlenen kitosan nanoparçacıklarının uygulamalarına yönelik oldukça fazla çalışma yapılmışken sentezlenen parçacıkların boyutu üzerine etki eden parametreleri konu alan az sayıda çalışma yer almaktadır. Bu çalışmada ters misel ve iyonik jelleşme yöntemleri kullanılarak;

- kitosanın çapraz bağlanma derecesi
- pH
- kitosan / iyonik-bağlayıcı oranı

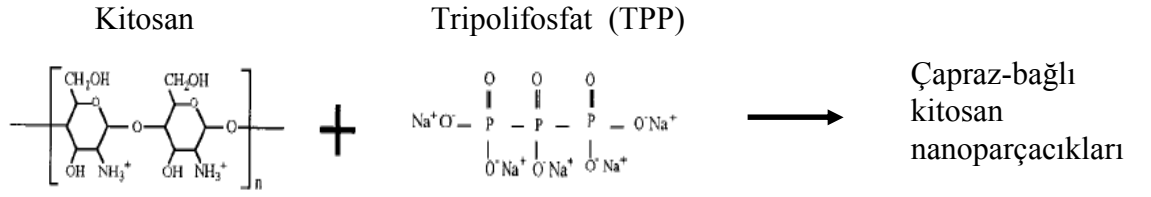
gibi parametreler yanında;

- yüzey aktif maddesi cinsi
- organik çözücü ve reaktif derişimleri
- sesötesi dalga etkisi

gibi parametrelerin de kitosan nanoparçacık sentezine etkisi incelenmiştir.

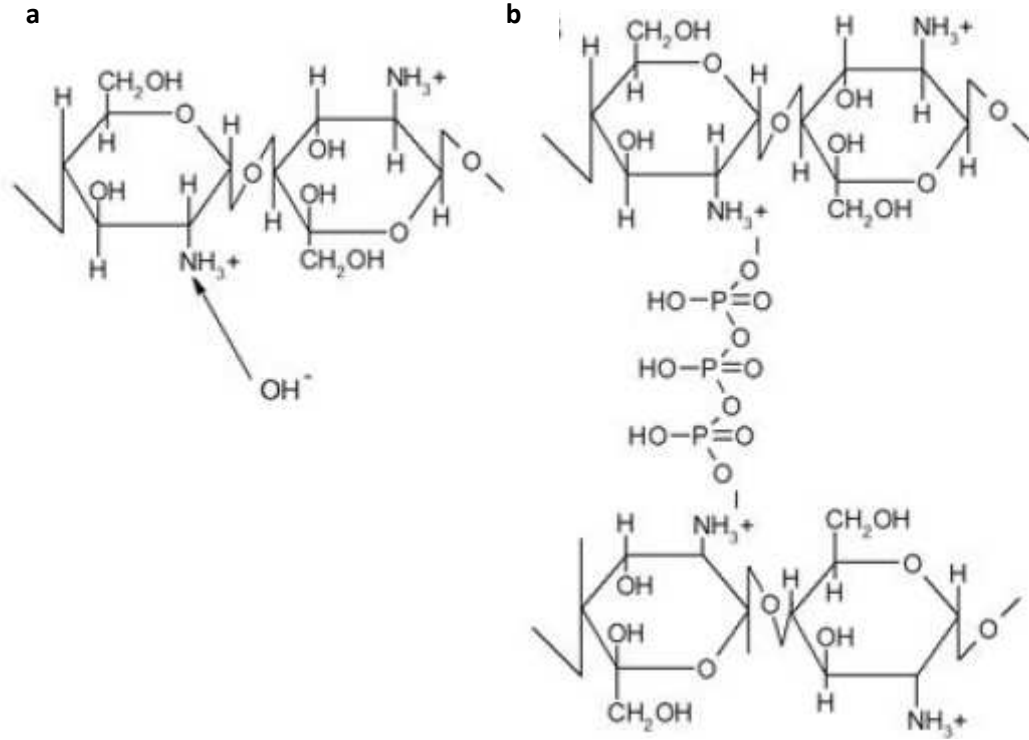
4.2.1 İyonik jelleşme yöntemi ile kitosan nanoparçacıklarının sentezi

İyonik jelleşme yöntemi ile KNP'nin sentezi ilk kez Calvo *et al.* (1997) tarafından gerçekleştirilmiştir. İyonik jelleşme yöntemi, pozitif yüklü kitosan ile negatif yüklü çapraz-bağlayıcının oda sıcaklığındaki iyonik jelleşme etkileşimine dayanmaktadır. Çalışmalarda en sık kullanılan çapraz-bağlayıcı TPP'dir. TPP içeren bazik faz (pH = 7-9) kitosan içeren asidik faza (pH = 4-6) eklendiğinde, kitosanın pozitif yüklü amino grupları ile TPP'nin negatif yüklü fosfor grupları arasında oluşan moleküliçi ve moleküllerarası bağlar sayesinde KNP oluşumu kendiliğinden gerçekleşmektedir. Asidik ve bazik çözeltilerin hacimleri değiştirilerek farklı özelliklerde nanoparçacıklar elde edilebilir (Janes *et al.* 2001). Şekil 4.1'de genel olarak kitosan ve TPP etkileşimi sonucu KNP oluşumu gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Kitosan ve TPP arasındaki iyonik jelleşme sonucu KNP'nin oluşumu

Kitosan ve TPP arasındaki elektrostatik etkileşme sonucu moleküliçi ve moleküllerarası bağların oluşumu, kationik ve anyonik bölgelerin oluşmasına bağlıdır. Bu durumda eklenen TPP'nin pH'si de büyük rol oynamaktadır. pH çapraz-bağlanma miktarında ve tipinde değişikliğe neden olabilir, çünkü; eklenen TPP derişimi düşük pH'de olduğunda (örneğin pH = 3) ortamda sadece fosfor iyonları bulunacaktır. Tam aksine; eklenen TPP yüksek pH'de ise (örneğin pH = 9) ortamda fosfor iyonlarının yanında OH⁻ iyonları da yer alacaktır. Bu durumda, hem OH⁻ hem de fosfor iyonları kitosanın -NH₃⁺ grubu ile birleşmeye çalışacaktır. Sonuç olarak; çapraz bağlanma tipi ve miktarı değişmiş olacaktır. OH⁻ ve P₃O₁₀⁵⁻ iyonları ile -NH₃⁺ iyonlarının etkileşimi ile çapraz-bağlanmanın değişimi Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2 Kitosanın TPP ile farklı pH değerlerinde etkileşimi.
a. deprotonasyon, b. iyonik çapraz-bağlama

OH⁻ iyonları kitosana çapraz-bağlanması deprotonasyon ile gerçekleşirken P₃O₁₀⁵⁻ iyonlarının kitosana bağlanması iyonik etkileşim ile olmaktadır (Bhumkar *et al.* 2006).

Çalışmada iyonik jelleşme yöntemi ile KNP'nin sentezi aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir:

- 10 ml % 1 (v/v)'lik asetik asit çözeltisi hazırlanır (0.1 ml asetik asit 9.9 ml damıtık suya eklenir).
- 30 mg kitosan (% 0.3, w/v) bu çözeltiliye katılır ve karıştırılarak çözülmesi sağlanır.
- Elde edilen 3 mg/ml derişimindeki bu çözelti öncelikle çözünmeyen kısımların ve safsızlıkların uzaklaştırılması için süzülür, daha sonra ise 10 N NaOH kullanarak pH = 4.6 - 4.8 aralığına ayarlanır.
- Diğer yandan 12 ml'lik TPP çözeltisi (0.55 mg/ml) hazırlanır ve oda sıcaklığında manyetik karıştırma altında kitosan çözeltisine eklenir.

- Oluşan süspansiyon 10000 rpm ve 4 °C’de 30 dakika santrifüjlenir.
- Çöken kısım ayrılır ve kalmış olabilecek NaOH’ı uzaklaştırmak için damıtık su ile 2-3 kez yıkama işlemi gerçekleştirilir.
- Yıkama işleminden sonra 5 mg trehaloz eklenerek – 50 °C’de dondurularak kurutulur.

Calvo *et al.* (1997) çalışmalarında KNP’nin yalnızca belirli kitosan ve TPP derişimlerinde sentezlenebildiği sonucuna ulaşmışlardır. Bu araştırmacıların sonuçlarına benzer olarak Dyer *et al.* (2002) ve Fernando-Urrusuna *et al.* (1999)’da KNP’nin sentezinin belirli derişimlere bağlı olduğunu destekleyen çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışmada uygun derişim aralığını bulmak için herhangi bir çalışma yapılmamış süreli yayınlarda belirlenen kitosan ve TPP derişim aralığında çalışılarak KNP sentezlenmiştir.

4.2.2 Ters misel yöntemi ile kitosan nanoparçacıklarının sentezi

Kitosan polimer zinciri, ters misel ortamı kullanılarak kimyasal olarak çapraz-bağlanabilirler. Ters misel ortamı su, yağ ve yüzey aktif madde karışımlarından oluşup monodispers, transparan, termodinamik olarak kararlı ve izotropik sistemlerdir. Ters misel damlacıkları, genellikle 1 nm ile 10 nm arasında monodispers yapılar oldukları için çok ince nanoparçacıklar oluştururlar. Misel damlacıkları Brownian hareketi içerisinde oldukları için, milisaniye ve mikrosaniye arasında değişen zaman ölçeğinde sürekli olarak birleşme ve daha sonra tekrar ayrılmaya maruz kalırlar. Bu damlacıkların büyüklük, polidisperslik ve termodinamik kararlılıkları sistemde hızlı bir dinamik denge ile korunur (Agnihotri *et al.* 2004). KNP’nin oluşumu, nanoreaktör gibi düşünülebilecek ters misel damlacıklarının sulu çekirdeklerinde dar bir boyut dağılımı sahip şekilde gerçekleşmektedir. Kovalent çapraz-bağlanma için genellikle aldehitler kullanılır ve en çok tercih edileni ise glutaraldehittir. Çapraz-bağlanmanın gerçekleşebilmesi için çapraz-bağlayıcı sabit karıştırma hızında kitosan sulu çözeltisi, yüzey aktif ve yardımcı yüzey aktif madde (yardımcı yüzey aktif madde kullanımı her ters misel ortamı için gerekli değildir) içeren sisteme eklenir ve 24 h karıştırılır. Ters misel yapıyı kırmak için organik fazın uzaklaştırılması gereklidir. Bu işlem genellikle organik fazın döner kurutucuda buharlaştırılması ile gerçekleştirilir. Organik faz sistemden

uzaklaştırıldıktan sonra geriye kalan katı kısım yüzey aktif madde ve KNP'den oluşur. Uygun bir ayırma işlemi ile yüzey aktif maddeler KNP'den ayrılır.

KNP'nin ters misel yöntemi ile sentezi Banerjee *et al.* (2002) çalışmasında olduğu gibi yapılmıştır. Bu çalışmada AOT / n-hekzan / su ters misel sistemi kullanılmıştır. KNP'nin ters misel yöntemi ile sentezi şu şekildedir:

- 0,711 g AOT 40 ml n-hekzanda çözülür (0,04 M).
- Hazırlanan çözeltiye sırasıyla 400 µl, % 6 (v/v) asetik asit içeren % 0,1 (w/v)'lik kitosan çözeltisi
- 176 µl Tris-HCl tamponu (pH = 8)
- 40 µl amonyak çözeltisi eklenir.
- Son olarak ise 4 µl glutaraldehit çözeltisi % 0,01 (v/v) eklenir ve 12 saat 600 rpm sabit karıştırma hızında karıştırılır.
- Karıştırma işlemi bittikten sonra döner buharlaştırıcı kullanılarak çözücü uzaklaştırılır.
- Çözücünün buharlaştırılmasından sonra geriye kalan katı; KNP ve yüzey aktif maddeden oluşmaktadır.
- Yüzey aktif maddenin (AOT) uzaklaştırılması için öncelikle kalan katıya 20 ml Tris-HCl tamponu (pH = 8) eklenir ve katı süspansiyon haline getirilir.
- Süspansiyon hazırlama işlemi sesötesi dalga eşliğinde gerçekleştirilir.
- 4 ml % 30'luk CaCl₂ çözeltisi, AOT'yi kalsiyum dietilhekzil sülfosüksinat tuzu şeklinde çöktürmek için, çökme bitene kadar süspansiyona damlatılır.
- Çöken kısmı ayırmak için 8500 rpm ve 4 °C'de 20 dk süre ile santrifüj işlemi gerçekleştirilir.
- Çöken kısım, adsorplanmış KNP olabileceği için 10 ml n-hekzanda çözülür ve çözelti her seferinde 1 ml Tris-HCl tamponu ile iki-üç kez yıkanır.
- n-hekzan fazı ve Tris-HCl fazı süzülerek ayrılır ve asıl KNP çözeltisine eklenir.
- Çözelti liyofilizatörde kurutulur katı KNP elde edilir.

Kendiliğinden yapışma özeliği olan polimerler sulu ortamda Brownian hareketleri sonucu birbirleri ile etkileşerek kümeler oluştururlar. Kitosan da yapışkan özeliği olan

bir hidrojel polimerdir. Bu özeliğe sahip tüm polimerler için hesaplanan ortalama parçacık büyüklüğü gerçek parçacık büyüklüğünden her zaman daha büyüktür. Banerjee *et al.* (2002) çalışmalarında seyreltme miktarının ve çapraz-bağlama derecesinin KNP'nin oluşumuna etkisini incelemişler ve seyreltme miktarının artması ile parçacıkların büyüklüğünün gerçek büyüklüklerine yaklaştıkları ve sonsuz seyreltmede tamamen aynı oldukları sonucunu bulmuşlardır. Çapraz-bağlanma derecesinin artmasının ise parçacık büyüklüğünü arttırdığı sonucuna ulaşmışlardır (Banerjee *et al.* 2002).

Ters misel yöntemi kullanılarak farklı türde yüzey aktif maddesinin nanoparçacık oluşumuna etkisini incelemek için AOT yerine TX-100 ve SDS kullanılmıştır. Yalnız TX-100 kullanımına ait deneysel yöntem Zhi *et al.* (2005) çalışmasından yararlanılarak aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir:

- 1 g kitosan içeren 100 ml (% 1 asetik asit, v/v)'lik çözelti hazırlanır.
- Sikloheksan, hekzanol ve kitosan çözeltisi 11:6:4 oranında karıştırılır ve emülsiyon oluşur.
- Emülsiyon karıştırılırken TX-100 emülsiyon transparan veya yarı-transparan olacak şekilde eklenir.
- Glutaraldehit içeren ancak kitosan içermeyen nanoemülsiyon aynı şekilde hazırlanır.
- Glutaraldehit içeren nanoemülsiyon kitosan nanoemülsiyonuna 4 saat süre ile 40 °C sabit sıcaklıkta ve karıştırma altında eklenir. Böylelikle, kitosan ve glutaraldehitin etkileşmesi sağlanır.
- Aynı işlem glutaraldehit yerine 2 mol/L NaOH kullanılarak gerçekleştirilebilir. Elde edilen parçacıklar 5000 rpm'de 30 dk santrifüjlenir.

Liu *et al.* (2007) çalışmasında uygulanan TX-100 ile birlikte NaOH-SDS çözeltisi kullanılarak ters misel ortamında KNP sentezine ait basamaklar aşağıda gösterildiği gibidir:

- 0,5 g kitosan içeren 100 ml (% 1 asetik asit, v/v)'lik çözelti hazırlanır.
- Hazırlanan bu çözeltiden ve az miktarda SDS içeren NaOH çözeltisinden 6'şar ml alınarak iki farklı 24 ml'lik TX-100/oktanol/sikloheksan (7/8/9, v/v/v) karışımına eklenir.
- Her iki çözeltiye de 30 dakika süre ile karıştırma altında sesötesi dalga uygulanır. Böylelikle kitosan mikroemülsiyonu ve SDS-NaOH mikroemülsiyonu elde edilir.
- SDS-NaOH mikroemülsiyonu pH = 7 olana kadar kitosan mikroemülsiyonuna eklenir ve 30 dakika daha karıştırılarak kitosan parçacıklarının çökmesi sağlanır.
- Elde edilen kitosan süspansiyonuna 1,5 ml glutaraldehit eklenerek çaprazbağlama işlemi gerçekleştirilir. Bu işlem 40 °C'de 2 saat süre ile gerçekleştirilir.
- Oluşan KNP'yi tepkimeye girmeyen maddelerden ayırmak için süspansiyon 5000 rpm'de 30 dakika süre ile santrifüj edilir.
- Çöken kısım, 12 saat vakumda kurutmadan önce aseton ve etanol ile 2-3 kez yıkanır.

4.3 Kitosan Nanoparçacıklarının Karakterizasyonu

İyonik jelleşme ve ters misel yöntemleri kullanılarak sentezlenen KNP'nin karakterizasyonu yapı, büyüklük ve morfolojileri üzerine yapılmıştır.

4.3.1 Yapısal analizler

Sentezlenen KNP örnekleri, Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi (FTIR) analizi ile yapısal olarak karakterize edilmiştir. Analizler Shimadzu FTIR-8040 marka spektrofotometrede KBr-kitosan oranı 50:1 olacak şekilde tabletler hazırlanarak 4000 – 400 cm⁻¹ dalga sayısında, 16 çözünürlükte ve 30 kez taranarak gerçekleştirilmiştir.

4.3.2 Büyüklüğe yönelik analizler

Nanoparçacıkların büyüklük dağılımlarını belirlemek üzere Zeta sizer (MALVERN Zetasizer Nano Series Nano-S) cihazı kullanılmıştır. Sistem, ışık saçılması (Dynamic Light Scattering, DLS) prensibine dayanmaktadır.

DLS, mikronaltı bölgedeki parçacıkların büyüklüklerini belirlemek için kullanılan bir tekniktir. Süspansiyondaki parçacıklar, emülsiyonlar ve moleküller Brownian hareketi yaparlar. Bu hareket, termal enerjilerinden dolayı kendiliğinden hareket eden çözücü moleküllerinin bombardımanıyla gerçekleşen bir harekettir. Eğer parçacık veya moleküller lazerle etkileştirilirse; saçılan ışığın şiddeti, parçacıkların büyüklüklerine bağlı bir hızda dalgalanır. Çünkü; küçük parçacıklar çözücü molekülleri tarafından itilirler ve daha hızlı bir şekilde hareket ederler.

DLS tekniğiyle ölçülen çapa, hidrodinamik çap denir ve parçacığın bir sıvı içerisinde nasıl difüzlendiği ile ilgilidir. Bu teknikle belirlenen çap, ölçülen parçacıkla aynı difüzyon katsayısına sahip kürenin çapına eşittir. Difüzyon katsayısı sadece parçacık çekirdeğinin büyüklüğüne değil; parçacığın yüzey yapısı, ortamdaki iyonların tipi ve derişimine de bağlıdır. Başka bir ifadeyle; parçacık büyüklüğü elektron mikroskobu ile ölçülenden daha büyük değerlerde ölçülebilir. Doğal ortamından uzaklaştırılan parçacıklar bu duruma örnek olarak verilebilirler (http://www.malvern.com/labeng/technology/dynamic_light_scattering/dynamic_light_scattering.htm).

Nanoparçacıkların büyüklüğü Stoke-Einstein eşitliği kullanılarak parçacıkların difüzyonundan hesaplanır. Stoke-Einstein eşitliği aşağıda gösterildiği gibidir:

$$d_h = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (1)$$

Yukarıdaki eşitlikte;

- k : Boltzman sabiti,
T : mutlak sıcaklık,
 η : ortamın viskozitesi,
D : difüzyon katsayısı,
 d_h : parçacıkların hidrodinamik çapıdır.

D, düşük derişim değerlerinde;

$$D = D_0.(1 + \alpha\phi) \quad (2)$$

şeklinde yazılabilir (Banerjee *et al.* 2002). Eşitlik 2’de;

- D_0 : parçacıklararası etkileşimin sıfır olduğu sonsuz seyreltmedeki gerçek difüzyon sabiti,
 α : viral difüzyon sabiti,
 Φ : parçacıkların ortamdaki hacim kesridir.

KNP’nin büyüklüğü, farklı kitosan/TPP oranı, ortam pH’si ve sesötesi dalga uygulama süreleri için belirlenmiştir. Farklı kitosan/TPP oranı ve ortam pH’sinin nanoparçacık büyüklüğüne etkisini incelemek için hazırlanan çözeltilerin 1’er ml’si analiz için kullanılmıştır. Sesötesi dalgaların KNP’nin büyüklüğüne etkisini incelemek için dondurularak kurutulan KNP’nin ise 1 mg’ı 50 ml saf su ile seyreltilmiştir. Farklı sürelerde sesötesi dalgalar ile etkileştirilen çözeltiden her süre sonunda 3’er ml örnek alınmış ve 1 ml’si analiz için kullanılmıştır.

DLS analizleri ile ortalama parçacık büyüklüğü ve parçacık büyüklük dağılımı belirlenecek olan örnekler için elde edilen sonuçlar her bir örnek için 10 kez tekrarlanmıştır. Alınan sonuçlar, ortalama sonuçlardır.

4.3.3 Morfolojiye yönelik analizler

Sentezlenen kitosan nanoparçacık örneklerinin morfolojileri TEM (JEOL JEM-1010 Jeol with Mega View III CCD Camera, Transmission Electron Microscope) ile belirlenmiştir. Dondurarak kurutulmuş nanoparçacıkların bir kısmı 3 ml etilalkolde sesötesi dalgalar ile dağıtılmıştır. Örnek çözeltinin bir damlası karbon grid üzerine damlatılıp oda sıcaklığında kuruması sağlanmıştır. Kuruma işleminden sonra analiz gerçekleştirilmiştir.

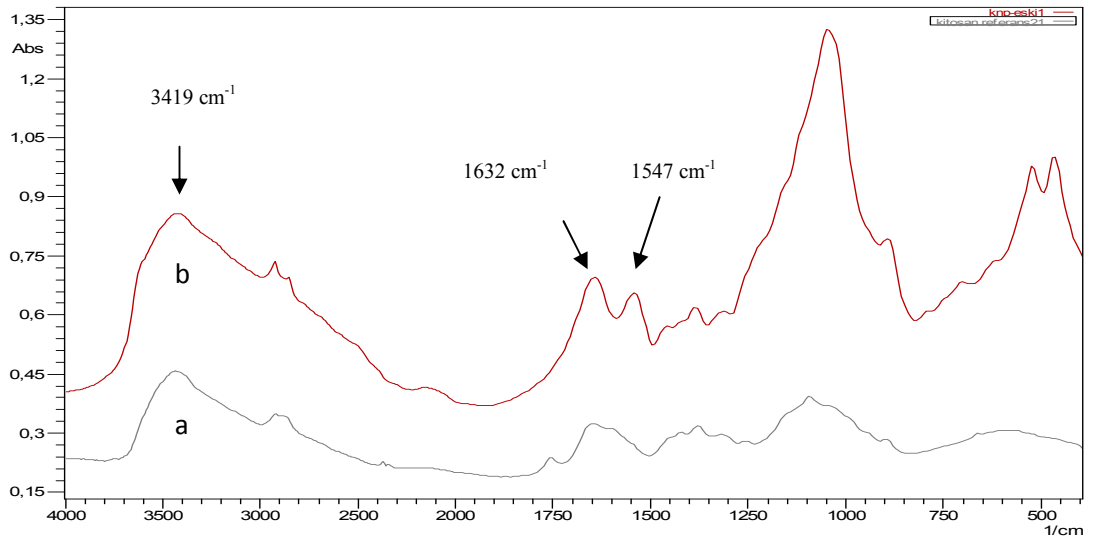
5. DENEYSEL BULGULAR ve TARTIŞMA

5.1 İyonik Jelleşme Yöntemi

İyonik jelleşme yöntemi ile KNP'nin sentezinde süreli yayınlarda denenilen kütlece kitosan/TPP oranı ve ortam pH'sinin yanısıra, sesötesi dalga uygulama süresinin de nanoparçacık oluşumu ve büyüklüğüne etkileri incelenmiştir. Elde edilen parçacıkların FTIR, DLS ve TEM analizlerine ait bulgular aşağıda verilmiştir.

5.1.1 FTIR analizi

Kitosan ve kitosanın TPP ile etkileşmesinden elde edilen çapraz-bağlı KNP'nin FTIR spektrumları Şekil 5.1.a,b'de gösterilmiştir. Kitosanın TPP ile çapraz-bağlandığını söyleyebilmek için KNP'ye ait spektrumda (Şekil 5.1.b) fosforik grup ile amonyum grubunun etkileştiğini göstermek gerekmektedir. Şekil 5.1'de de görüldüğü gibi 3419 cm^{-1} deki pik, hidroksil ve moleküler içi hidrojen bağlarına karşılık gelmektedir. Birincil aminler de $3500\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ 'de pik vermektedir. Bu sebeple 3419 cm^{-1} 'deki geniş pik NH_2 , O-H gerilimi ve hidrojen bağlarının birleşmiş pikidir. KNP'de bu pik 3419 cm^{-1} den 3427 cm^{-1} 'e kaymıştır. Bu hidrojen bağının arttığını göstermektedir. 1383 cm^{-1} 'de



Şekil 5.1.a. kitosan, b. iyonik jelleşme yöntemi ile sentezlenen kitosan nanoparçacıklarının FTIR spektrumları

yer alan pik asetil grubuna aittir. 960-1100 cm^{-1} civarında ise C-O-C simetrik gerilimine ait pik yer almaktadır. Saf kitosanda 1657 cm^{-1} 'de bulunan CONH_2 ve 1598 cm^{-1} de bulunan NH_2 bantlarının şiddetleri KNP için azalmış ve 1632 ve 1547 cm^{-1} de iki yeni pik belirlemiştir. Bu amonyum gruplarının TPP molekülü ile çapraz-bağlandığını göstermektedir (Xu and Du 2002, Qi *et al.* 2004a). Bu sonuçtan yola çıkarak, sodyum polifosfatın polifosforik grubunun kitosanın amonyum grubu ile etkileştiği söylenebilir.

5.1.2 DLS analizi

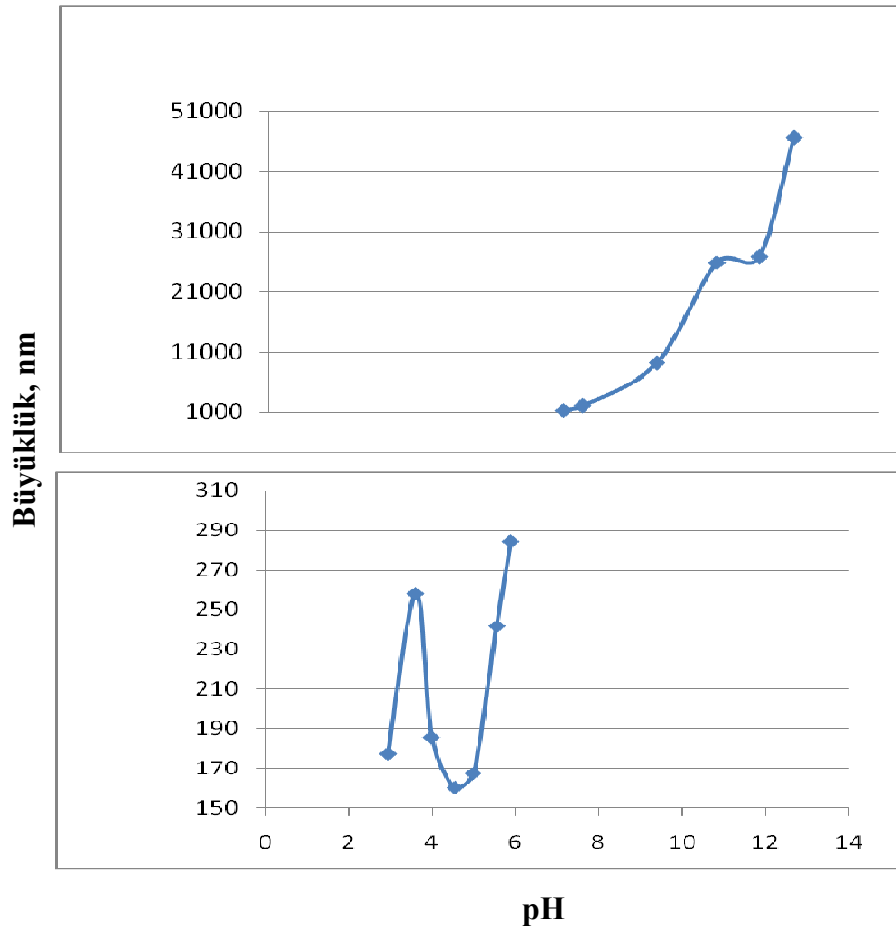
Kitosan nanoparçacıklarının oluşumuna ortamın pH'si, kitosan/TPP (w/w) oranı, kitosanın molekül ağırlığı, deasetilasyon derecesi gibi parametrelerin etki ettiği belirtilmiştir (Zhang *et al.* 2004, Gan *et al.* 2005). Bu tez kapsamında ise orta molekül ağırlıklı (medium molecular weight, Sigma Aldrich Co.) ve deasetilasyon derecesi % 84.7 olan kitosan kullanılarak pH, kitosan/TPP oranı ve ses ötesi dalga uygulama süresinin nanoparçacık oluşumuna etkisi incelenmiştir. DLS analizi ile elde edilen KNP için parçacık büyüklük dağılımları ve ortalama parçacık büyüklükleri belirlenmiştir.

5.1.2.1 Ortam pH'sinin KNP'nin oluşumu ve büyüklüğüne etkisi

Kitosan, her disakkarit birimi başına 0,837 ortalama amino grubu yoğunluğuna sahip olan, zayıf bazlı bir polisakkarittir, ayrıca ; nötral ve bazik pH değerlerinde çözünür değildir. Asidik bir ortamda, amin grupları pozitif yüklenir ve bu polisakkarite (kitosana) yüksek bir yük yoğunluğu sağlar. Bundan dolayı, kitosan molekülünün yüzey yük yoğunluğu çözelti pH'sine son derece bağlıdır, yani ; kitosan-TPP nanoparçacıklarının oluşturulduğu iyonik çapraz-bağlanma yöntemi pH-duyarlıdır. Bu özellik kullanılarak ortam pH'sinin değiştirilmesi ile KNP'nin oluşumu ve özellikleri ayarlanabilir.

Ortam pH'sinin değişimiyle nanoparçacık oluşumu Şekil 5.2'de verilmiştir. Şekildeki büyüklük değerleri cihaz tarafından verilen ortalama büyüklük değerleridir. Asidik ortamda tüm pH değerlerinde nanoparçacık oluşumu gözlenmiş, ancak ; en küçük parçacıklar (160 nm) pH = 4.6 – 4.8 aralığında elde edilmiştir. Asidik ortamda elde

edilen bu sonuçların aksine, bazik ortamda nanoparçacık oluşumu söz konusu değildir. pH'nin 6.5'ten 12'ye artırılmasıyla parçacıklar 1 μm büyüklükten 46 μm büyüklüğe ulaşmıştır. Araştırma bulguları incelenecek olursa; en küçük parçacıkların elde edildiği pH değeri ve pH'nin değişimi ile ortalama parçacık büyüklüğünün izlediği yol süreli yayınlardakilerle uyumaktadır (Calvo *et al.* 1997, Lee *et al.* 2004, Qi *et al.* 2004a, Grenha *et al.* 2005, Hu *et al.* 2006, Katas and Alpar 2006).

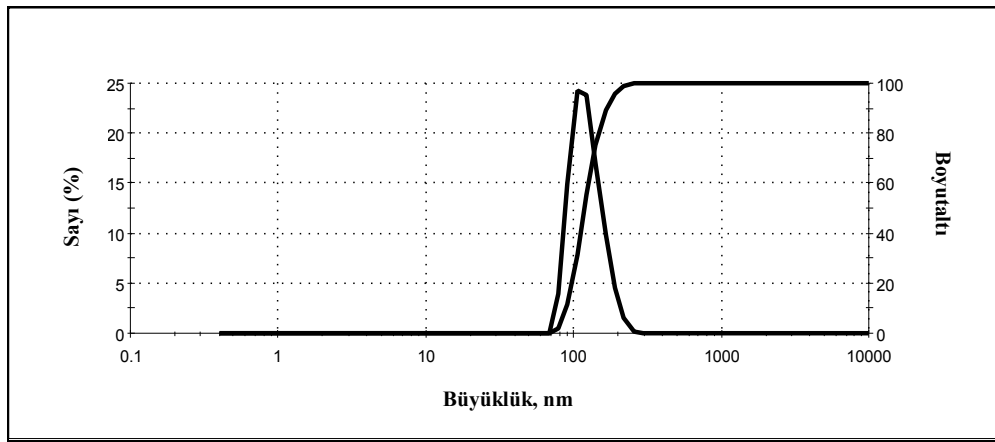


Şekil 5.2 Kitosan nanoparçacıklarının oluşumuna pH'nin etkisi

Parçacık büyüklüğünün ortam pH'sinin değişimine oldukça duyarlı olduğu Şekil 5.2'de açıkça görülmektedir. Ölçülen ortalama parçacık büyüklüğündeki artış, başlangıç oluşumundan sonra her parçacığın daha fazla büyümesinden ziyade, büyük ölçüde ortam pH değerinin artması ile oluşan parçacık birleşmesinden kaynaklanmaktadır. Parçacık büyüklüğünün $\text{pH} > 6$ 'daki ani artışı, parçacıkların yüzeyindeki protonlanma derecesinin düştüğünü göstermektedir, parçacıklar arasındaki elektrostatik itmenin

azalması ile parçacık birleşme olasılığı artmaktadır (Zhang *et al.* 2004). Başka bir deyişle; pH'nin 2'den 5'e artması ile amino gruplarının deprotonlanması artar, sonuçta; amino gruplarının deprotonlanması, amino grupları ve TPP anyonları arasında daha zayıf iyonik etkileşime neden olur. İyonik etkileşme sonucu görülen nanoparçacık oluşumu iyonik etkileşmenin azalması ile yerini parçacık birleşmesine bırakır.

En uygun pH ortamında (pH = 4.6-4.8) KNP'nin ortalama büyüklük dağılımı Şekil 5.3'te verilmiştir. Parçacıklar için PDI = 0.277 ve % PD = 52.73 olarak bulunmuştur.

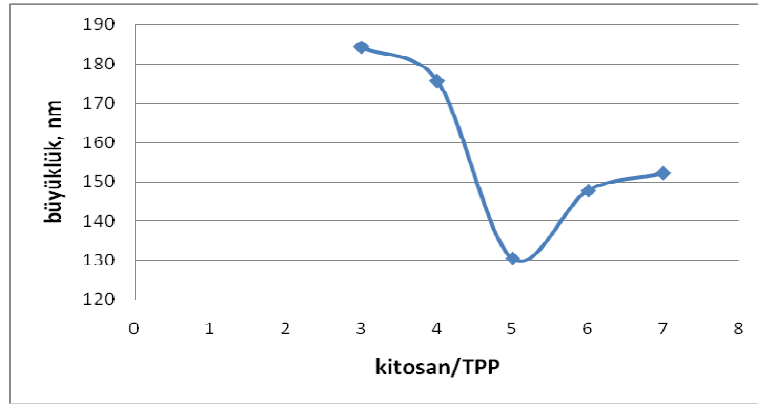


Şekil 5.3 Kitosan nanoparçacıklarının ortalama parçacık büyüklük dağılımı (pH = 4,7, kitosan/TPP = 5)

5.1.2.2 Kütlece kitosan/TPP oranının KNP'nin oluşumu ve büyüklüğüne etkisi

Calvo *et al.* (1997) çalışmalarında KNP'nin hazırlanabilmesinin belli kitosan ve TPP derişimlerinde mümkün olabildiğini göstermişlerdir. Belirlenen uygun derişimlerin altında ve üstündeki değerlerde ya parçacık birleşmesi meydana gelmiş ya da hiç nanoparçacık oluşmamıştır. Farklı ticari kitosan çeşidi kullanıldığında belirlenen uygun derişim aralığının değişebileceği görülmüştür (Calvo *et al.* 1997, Dyer *et al.* 2002). Calvo *et al.* (1997) en küçük nanoparçacıkların (260 nm) hazırlanabilmesi için kitosan ve TPP derişimlerinin belirlenen en düşük derişimlerde (kitosan 1,25 mg/mL ve TPP 0,28 mg/mL) kullanılması gerektiğini vurgulamışlar ve en küçük parçacıkları hazırladıkları bu derişimlerde kitosan/TPP oranının 5 olduğunu belirtmişlerdir.

Bu tez kapsamında kitosan/TPP oranının (w/w) nanoparçacık oluşumu ve büyüklüğüne etkisini incelemek için parçacıklar, kitosan miktarı sabit tutulurken bu oranın 3 ile 7 arasında değiştirilmesi ile sentezlenmiştir. Şekil 5.4'te görüldüğü gibi, süreli yayınlardakine benzer olarak (Calvo *et al.* 1997, Zhang *et al.* 2004), en küçük parçacıkları sentezleyebilmek için en uygun kitosan/TPP oranının 5 olduğu bulunmuştur.



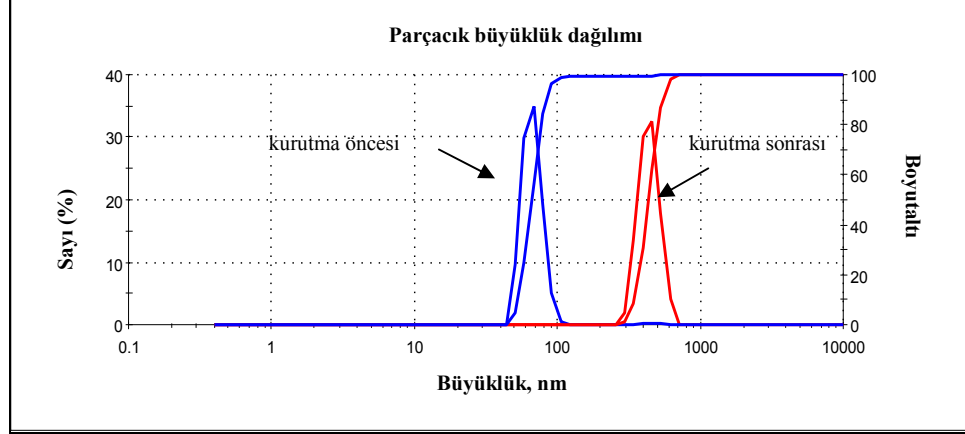
Şekil 5.4 Kitosan/TPP (w/w) oranının KNP'nin oluşumuna etkisi (pH = 4,7)

Şekil 5.4 incelendiğinde kitosan/TPP oranının KNP'nin oluşumu için kritik olduğu görülmektedir. Oran 5'in üzerine çıktığı veya indiğinde ortalama parçacık büyüklüğü artmaktadır. Bu çalışmada gerçekleştirilen deneylerde kullanılan kitosan derişimi 3 mg/mL ve TPP derişimi 0,55 mg/mL'dir. Parçacık büyüklüğünün kitosan/TPP = 5'teki azalmasını Zhang *et al.* (2004) şu şekilde açıklamıştır: Polifonksiyonel bir çapraz-bağlayıcı olan TPP, kitosanın amino grupları ile 5 iyonik çapraz-bağlanma noktası yapabilir. TPP'nin kitosana 5/1 kütle oranında katılması ile amino grupları en etkili şekilde çapraz-bağlanarak muhtemel en yoğun parçacık yapısı oluşur. Oysa, oran 6 iken çapraz-bağlanma daha az etkilidir ve nanoparçacık büyüklüğünde artışa neden olur. Kitosan/TPP = 4 için, kitosan parçacıklarının TPP ile kısmi bağlanması ortalama büyüklükte bir artış ile sonuçlanır.

5.1.2.3 Sesötesi dalga uygulama süresinin KNP'nin büyüklüğüne etkisi

İyonik jelleşme yöntemi uygulanarak sentezlenen KNP santrifüj işleminden sonra kalabilecek NaOH kalıntılarını uzaklaştırmak için deiyonize su ile 2-3 kez yıkanıp tekrar santrifüjlenmiştir. Herhangi bir safsızlık içermeden nanoparçacıklar elde edilebilse bile polimerik nanoparçacıkların kullanımlarını kısıtlayan en önemli engel, nanoparçacıkların sulu süspansiyonlarının uzun süreli depolanmalarındaki fiziksel (birleşme/parçacık füzyonu) ve/veya kimyasal (nanoparçacığı oluşturan polimerin hidrolizi, nanoparçacıklardan ilaç sızıntısı ve ilacın yükleme sırasındaki kimyasal reaktivitesi) kararsızlıklarıdır. Fiziksel ve kimyasal kararlılıkların korunabilmesi için yapılarındaki suyun uzaklaştırılması gerekmektedir. Çözelti veya süspansiyonların yeterli kararlılıktaki katılara dönüştürülmesini sağlayan en yaygın proses liyofilizasyon olarak bilinen dondurarak kurutma işlemidir. Donmuş bir örnekten suyun vakum altında süblimleşme ve desorpsiyon ile uzaklaşmasını sağlayan bu işlem ise, dondurma ve kurutma basamaklarında çeşitli gerilimler üretir. Donma ve kuruma (dehidrasyon) gerilimleri nanoparçacıkların koloidal süspansiyonlarını kararsızlaştırabilirler. Kararsızlaşma durumu; nanoparçacıklar, yüzey aktifler, tamponlar ve yüklenmemiş ilaçlardan oluşan koloidal nanoparçacık süspansiyonlar kullanıldığı zaman birleşme veya bazı durumlarda tersinmez parçacık füzyonu olarak görülebilir. Ayrıca; buzun kristallenmesi, nanoparçacıklar üzerinde kararsızlaşmalarına neden olacak mekanik bir gerilime neden olabilir. Bu nedenlerden dolayı, kolay kırılabilen nanoparçacık süspansiyon sistemlerini korumak için dondurma işleminden önce özel katkı maddeleri (cryoprotectants ve lyoprotectants) eklenir. Böylelikle, donma (cryoprotectants) ve kuruma (lyoprotectants) gerilimlerinden koruma sağlanır. Süreli yayınlarda dondurarak kurutulan nanoparçacıklar için en çok karşılaşılan dondurucukoruyucular (cryoprotectants) trehaloz, sukroz, glukoz ve mannitol gibi şekerlerdir. Biyomoleküller için en çok tercih edileni ise trehalozdur. İyonik jelleşme yöntemi ile KNP hazırlanırken meydana gelebilecek parçacık birleşmesi, bu tez çalışmaları sırasında, trehaloz kullanarak engellemeye çalışılmıştır. Bunun nedeni; diğer şekerlere göre daha az higroskopluk, iç hidrojen bağlarının yokluğu ile dondurarak kurutma sırasında nanoparçacıklarla daha esnek oluşumlara izin verme, çok düşük kimyasal reaktivite gibi bir çok üstün özeliğe sahip olmasıdır (Abdelwahed *et al.* 2006).

Yıkama işlemlerinden sonra elde edilen KNP analizlerde kullanılmak üzere dondurarak kurutulmuş ve dondurarak kurutma işlemi sonucunda parçacıkların birleştikleri, parçacık boyut analizleri ile saptanmıştır (Şekil 5.5).

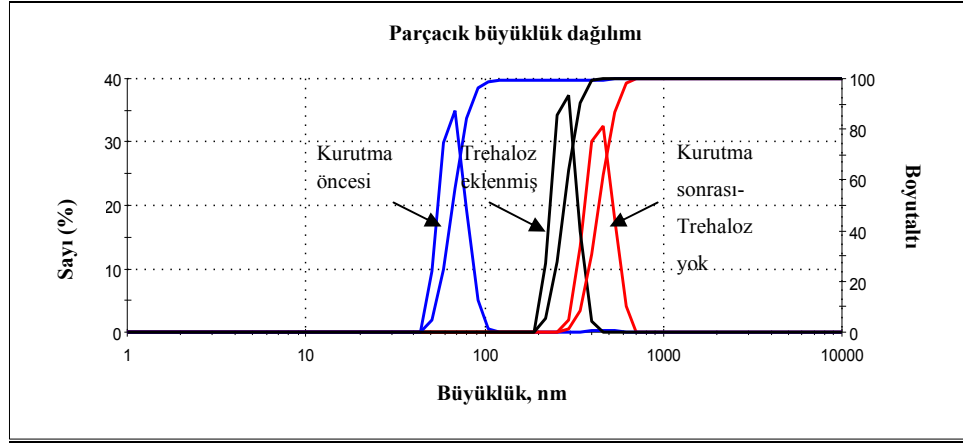


Şekil 5.5 Kitosan nanoparçacıklarının dondurarak kurutma öncesi ve sonrasındaki parçacık büyüklük dağılımları (pH = 4,7, kitosan/TPP = 5, T = 25 °C)

Şekil 5.5 incelenecek olursa kurutma öncesi KNP'nin büyüklükleri 40-110 nm aralığında iken kurutmadan sonra 250-720 nm aralığına yükselmiştir. Kurutma öncesinde oluşan nanoparçacıkların sayıca % 96'sı 90 nm'nin altında bir büyüklüğe sahipken kurutma sonrasında parçacıkların sayıca % 96'sı 600 nm altındadır. Bu sonuç, parçacıkların kuruma işleminin etkisi ile birleştiklerini açıkça göstermektedir. Oluşan parçacık birleşmesini engellemeye yönelik, yukarıda belirtilen özelliklerinden dolayı, süreli yayınlarda oldukça fazla tercih edilen trehaloz (cryoprotectant) kullanılarak birleşmeyi nasıl etkilediği incelenmiştir.

Trehaloz eklenmesinin parçacık birleşmesini nasıl etkilediğine ait elde edilen sonuçlar Şekil 5.5'te verilen parçacık büyüklük dağılımlarına ek olarak Şekil 5.6'da verilmiştir. Dondurarak kurutma öncesinde trehaloz eklenmesinin parçacık birleşmesinin önlemesi üzerine kısmen etkili olduğu Şekil 5.6'da görülmektedir. Trehaloz eklenmesi ile KNP'nin birleşmesi tamamen önlenememiş, trehaloz kullanılmadığında oluşan 250-720 nm aralığında büyüklüğe sahip parçacık kümelerinin büyüklükleri ancak 190-460 nm aralığına indirilebilmiştir. Trehaloz kullanımından sonra dondurarak kurutma sonucu

oluşan parçacık birleşmelerinin % 96'sı 380 nm'nin altındadır. Trehaloz eklenmeden dondurarak kurutulan, trehaloz eklenip dondurularak kurutulan ve hiç dondurarak kurutma yapılmayan örnekler için PDI değerleri sırasıyla; 0,732, 0,723 ve 0,546'dır. Görüldüğü gibi parçacık birleşmelerinin olması ile PDI değeri artmaktadır.



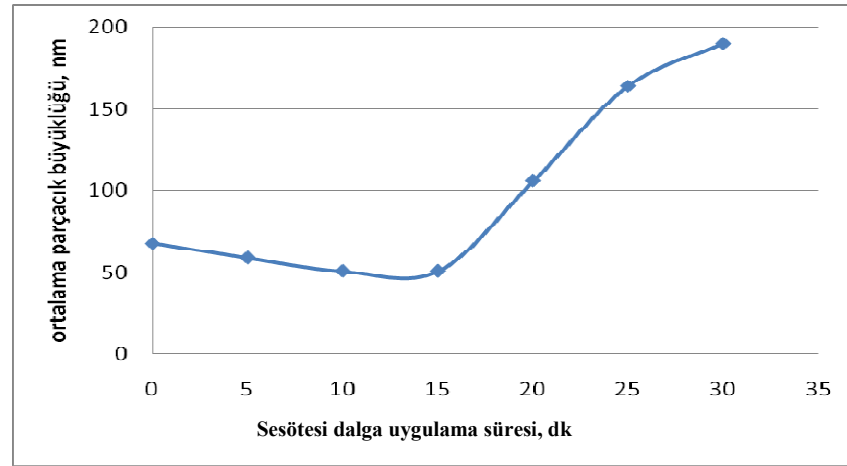
Şekil 5.6 Kitosan nanoparçacıklarının trehaloz eklendiği ve eklenmediği durumlara ait dondurarak kurutma işleminden sonraki parçacık büyüklük dağılımları (pH = 4,7, kitosan/TPP = 5, T = 25 °C)

Yukarıdaki sonuçlar dikkate alındığında, parçacık birleşmesini önlemede yalnızca trehalozun yeterli olmadığı görülmektedir. Çizelge 3.1'de süreli yayınlarda karşılaşılan bazı çalışmalar sonucu elde edilen KNP'nin sahip oldukları ortalama parçacık büyüklükleri ve incelenen bazı özellikleri (kan uyumluluğu, adsorpsiyon yeteneği vs. gibi) verilmişti. Trehaloz kullanımı sonrasında elde edilen 190-460 nm aralığında parçacık büyüklüğüne sahip KNP'nin bazı çalışmalar için kullanılabilir aralıkta olduğu görülmektedir, ancak; özellikle ilaç salımı gibi uygulamalarda daha küçük, daha kararlı ve daha dar büyüklük dağılımına sahip nanoparçacıklar tercih edilmektedir. Bu sebeple, trehalozun KNP'nin büyüklükleri üzerine dondurarak kurutma işleminden sonraki etkisine ek olarak sesötesi dalgaların etkisi incelenmiş ve bunun için iki farklı uygulama yapılmıştır.

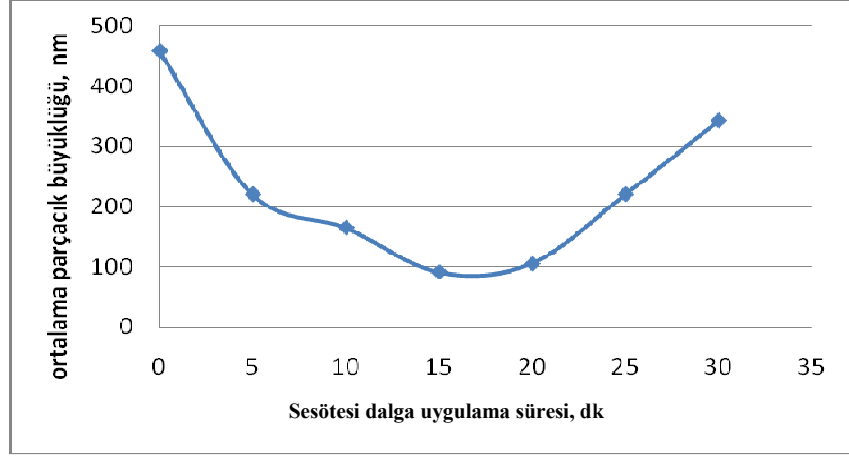
İlk uygulamada, santrifüj işleminden sonra elde edilen çökeleğin (dondurarak kurutma yok) sulu çözeltisi hazırlanmıştır. Diğerinde ise dondurarak kurutulan parçacıkların iki sulu çözeltisi hazırlanarak sesötesi dalgaların etkisi incelenmiştir. Sulu çözeltilerin ilki

hiçbir parçacık birleşmesini önleyici madde eklenmeden elde edilen KNP'yi, ikinci çözelti ise trehaloz eklenerek elde edilen KNP'yi içermektedir. Sesötesi dalgaların parçacık büyüklüğü üzerine olan etkilerini belirlemek için dondurarak kurutma öncesi ve sonrasında hazırlanan toplam üç farklı çözeltiye 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 dk süre ile sesötesi dalga etki edilmiştir. Sesötesi dalgalarla etkileşim süresi boyunca ortalama parçacık büyüklüğündeki değişim her iki uygulama için de sırasıyla Şekil 5.7 ve 5.8 ve 5.9'da görüldüğü gibidir.

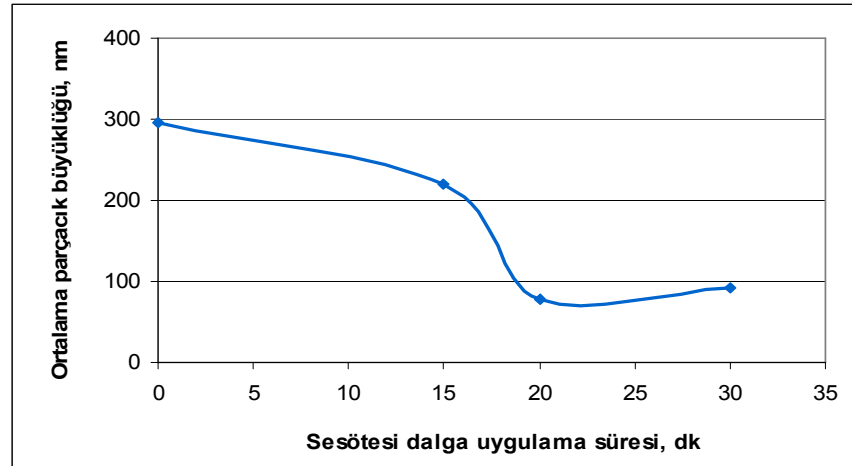
Şekil 5.7 ve 5.8'de görüldüğü gibi, dondurarak kurutma yapılmamış ve koruyucu madde olmadan dondurarak kurutulmuş örneklerle 15 dk sesötesi dalga etkisinin uygulanması ile en küçük parçacık büyüklüğüne ulaşılabildiği görülmektedir.



Şekil 5.7 Sesötesi dalga uygulama süresinin dondurarak kurutma öncesinde kitosan nanoparçacıklarının büyüklüğüne etkisi (pH = 4.7, kitosan/TPP = 5, T = 25 °C)



Şekil 5.8 Sesötesi dalga uygulama süresinin trehaloz yokken dondurularak kurutulmuş kitosan nanoparçacıklarının büyüklüğüne etkisi (pH = 4.7, kitosan/TPP = 5, T = 25 °C)



Şekil 5.9 Sesötesi dalga uygulama süresinin trehaloz kullanıldığında dondurularak kurutulmuş kitosan nanoparçacıklarının büyüklüğüne etkisi (pH = 4.7, kitosan/TPP = 5, T = 25 °C)

Hazırlanan parçacıklara trehaloz eklenip dondurarak kurutma işleminden sonra sesötesi dalga uygulandığında, 20. dk sonunda parçacıkların başlangıçtaki birleşmiş hallerinin dağıtılarak en küçük büyüklüklerine ulaştıkları tespit edilmiştir. Çalışma sonunda elde edilen sonuçlar Şekil 5.9'da gösterildiği gibidir. 0, 15, 20 ve 30. dk'larda gerçekleştirilen analizler sonucu alınan PDI değerleri sırasıyla; 0,723, 0,677, 0,520 ve 0,569'dur. PDI değerleri incelenecek olursa, parçacıkların ortalama büyüklüklerinin değişimi ile PDI değerlerinin değişimi arasında benzerlik bulunduğu görülmektedir. 20.

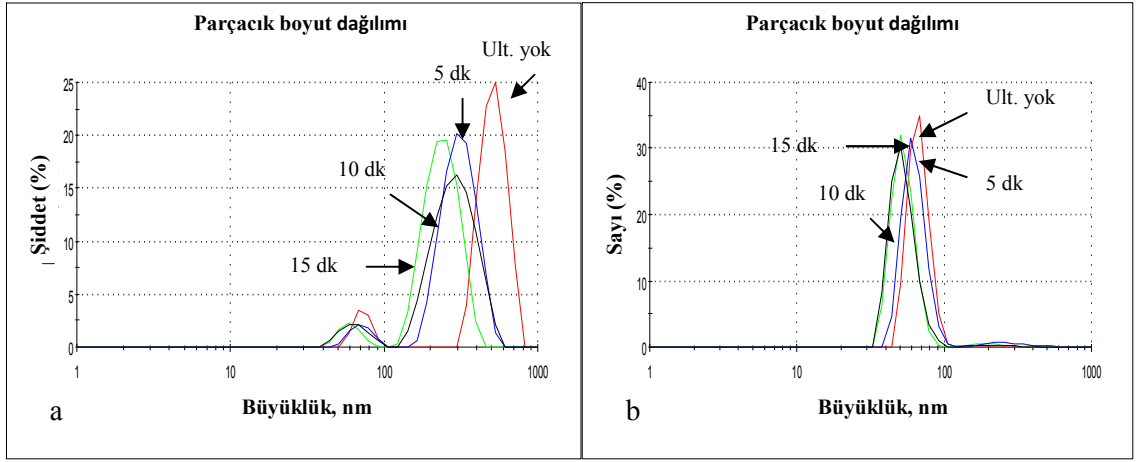
dk'da en düşük PDI değeri elde edilmişken bu değer, 30. dk'da parçacık büyüklüğünün artması ile paralel olarak artmıştır.

Sürelili yayınlarda ses ötesi dalgaların uygulanma süresinin kitosan nanoparçacıklarının büyüklüğüne etkisi üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde, Tang *et al.* (2003) ve Tsaih *et al.* (2008) çalışmalarının bu konudaki en kapsamlı çalışmalar olduğu belirlenmiştir. Tang *et al.* (2003) çalışmalarında, KNP'yi iyonik jelleşme yöntemi ile hazırlamışlar ve sesötesi dalga uygulama süresi ve şiddetini arttırarak parçacık büyüklüğüne etkisini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, bu tez kapsamında elde edilen sonuçlardan farklı olarak, 10 dk'lık sesötesi dalga uygulama süresinin yeterli olduğu ve sürenin artırılması ile ortalama parçacık büyüklüğünde azalma olmadığını saptamışlardır. Tsaih *et al.* (2008) çalışmalarında ise, iyonik jelleşme ile hazırlanan KNP'nin büyüklükleri ve kararlılıkları üzerine; sırasıyla sesötesi ışınması ve mekanik karıştırmadan kaynaklanan farklı kaviteasyon ve gerilme etkilerini, farklı enerji girdisi, çözelti sıcaklıkları, uygulama süreleri ve kitosan derişimlerinin etkilerini incelemişlerdir. Ancak, bu araştırmacılar da en fazla 4 dk'lık sesötesi ışınma uygulamış ve bu süre sonunda parçacık büyüklüğünün azaldığını gözlemlemişlerdir. Sesötesi ışınmanın 4 dk'dan sonraki etkilerine ait herhangi bir sonuca yer vermemişlerdir. Bu tez kapsamında yarım saat süre ile sesötesi ışınmanın KNP'nin büyüklüklerine etkisi incelenmiş ve en uygun sesötesi dalga uygulama süresinin 15 dk olduğu bulunmuştur. 15 dk'lık süre artırıldığında parçacık büyüklüğünün de arttığı belirlenmiştir.

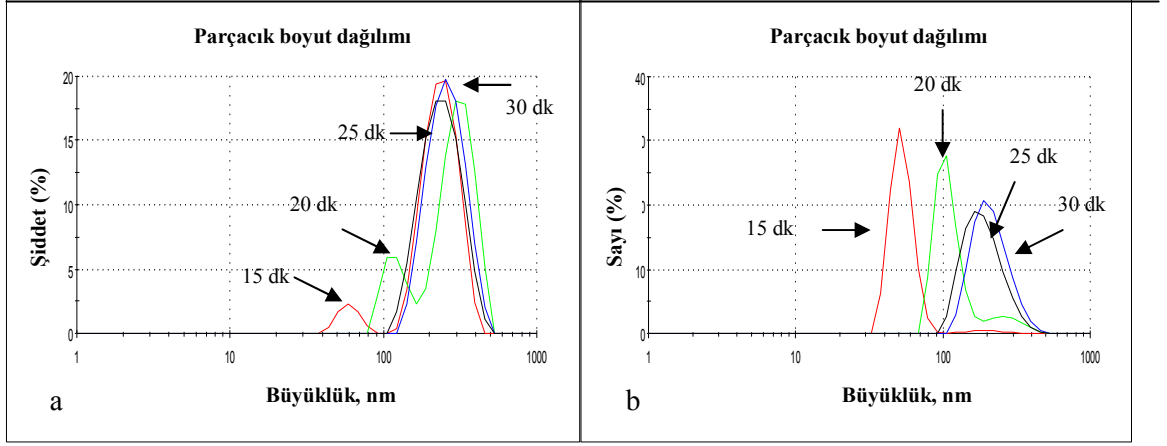
Sesötesi dalga uygulama süresinin artması ile KNP'nin büyüklüğünün artması üzerine süreli yayınlarda herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır, ancak; böyle bir bilgiye farklı türde nanoparçacıkların hazırlandığı bir çalışmada ulaşılmıştır. Xiao *et al.* (2005) çalışmalarında çöktürme yöntemi kullanarak diğer sentez yöntemlerine göre daha zayıf bir şekilde birleşen hidroksiapatit nanoparçacıklarını sentezlemeyi başarmışlardır. Parçacık birleşmesini iki farklı yöntem ile azaltmayı denemişler, bunun için; hazırladıkları çözeltilerin birine sadece sesötesi dalga uygulamış, diğerine ise çözeltinin hazırlanışı sırasında polimer bir dağıtıcı olan PEG 2000'i ekleyip sesötesi dalga ile beraber bir uygulama gerçekleştirmişlerdir. Çalışmaları sonucunda; sesötesi dalgaların parçacık birleşmesini önlemede tek başına yeterli olmadığını ileri sürmüşlerdir.

Araştırmacılar, Tang *et al.* (2003) ve Tsaih *et al.* (2008) çalışmalarından farklı olarak sesötesi enerji verme işleminin parçacık birleşmesi üzerine olan etkisini daha iyi anlayabilmek için etki süresini arttırmışlardır. Hidroksiapatit nanoparçacıklarına uyguladıkları sesötesi dalga süresini ele aldıklarında, parçacık birleşmesinin etkili bir şekilde azaltılabildiği uygun bir çalışma aralığının olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Sesötesi dalga uygulamasının devam ettirilmesi parçacık büyüklüğünde sürekli bir düşüş oluşturmayıp bir noktadan sonra parçacıkların yeniden birleşmesine neden olmuştur. Bu sonuç, parçacık birleşmesi ve dağılması arasında bir denge olduğunu göstermektedir. Sesötesi dalgalar, dengenin sağlandığı çalışma aralığının altında çok etkili değilken, sınırın üstünde parçacıkların tekrar birleşmesine neden olurlar. Xiao *et al.* (2005) bu durumu şöyle açıklamışlardır: Sesötesi enerji uygulandığında kümeleşmiş parçacıklar küçük parçalara ayrılırlar, ancak diğer taraftan; küçük parçacıklar tekrar birleşme eğilimi gösterirler. Parçacıkların birleşme ve dağılma hızları birbirine eşit olduğunda denge gerçekleşir ve bu dengede, en yüksek yüzey alanına sahip en küçük parçacıklar elde edilir. Araştırmacılar, bu tür bir dengenin varolmasından dolayı, yalnızca sesötesi dalga uygulayarak çok iyi dağılmış toz elde etmenin zor olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bunun da iki nedene dayandığını vurgulamışlardır. Birincisi, denge noktası hesaplanmasının çok kolay olmaması, ikincisi ise denge sağlanmış olsa bile sesötesi etki durdurulduğunda parçacıkların yüksek spesifik yüzey enerjilerinin parçacıkları tekrar kümeler oluşturmaya itmesidir. Araştırmacılar, sesötesi etkinin fazla verilmesi ile tekrar oluşan kümelenmelerin eskisinden daha sıkı ve daha büyük olduğunu da belirtmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlar, bu tez kapsamında elde edilen sonuçlar ile benzerlik göstermektedir. Şekil 5.7 ve 5.8 incelendiğinde, dondurarak kurutma yapılmamış KNP'nin 30 dk sesötesi dalga verildiğinde başlangıçtakinden daha fazla bir büyüklükte olduğu görülmektedir. Aynı zamanda, trehaloz kullanılmadan dondurarak kurutma yapılan KNP için 30 dk sonunda başlangıç büyüklüğünün geçilmediği; ancak, sesötesi etki süresinin artmasıyla bu eğilimde olduğu da gözlenmiştir. Trehaloz eklenen örnekler bakılacak olursa, Şekil 5.9'da görüldüğü gibi 20. dk'dan sonra parçacıklar tekrar birleşmeye başlamışlardır. 20. dk'dan sonraki artış, trehaloz eklenmeden dondurularak kurutulmuş örneklerde olduğu gibi devam edecek sesötesi dalga uygulama süresince, ortalama parçacık büyüklüğünün başlangıç büyüklüğünü geçeceği yönünde fikir vermektedir.

Parçacık büyüklüğünün sesötesi dalgaların etkisi ile olan değişimi Şekil 5.10 ve 5.11’de daha iyi anlaşılmaktadır. Şekil 5.10 sesötesi dalgaların KNP’nin birleşmesi üzerine etkili olduğu ilk 15 dk’lık bölüme ait parçacık büyüklük dağılımı, Şekil 5.11 ise 15 dk’dan sonra sesötesi dalganın uygulandığı periyoda ait parçacık büyüklük dağılımı grafiğidir. Şekil 5.10.a,b ile Şekil 5.11.a,b’de sırasıyla, parçacık büyüklüğünün % şiddet ve % sayı cinsinden dağılımı görülmektedir.



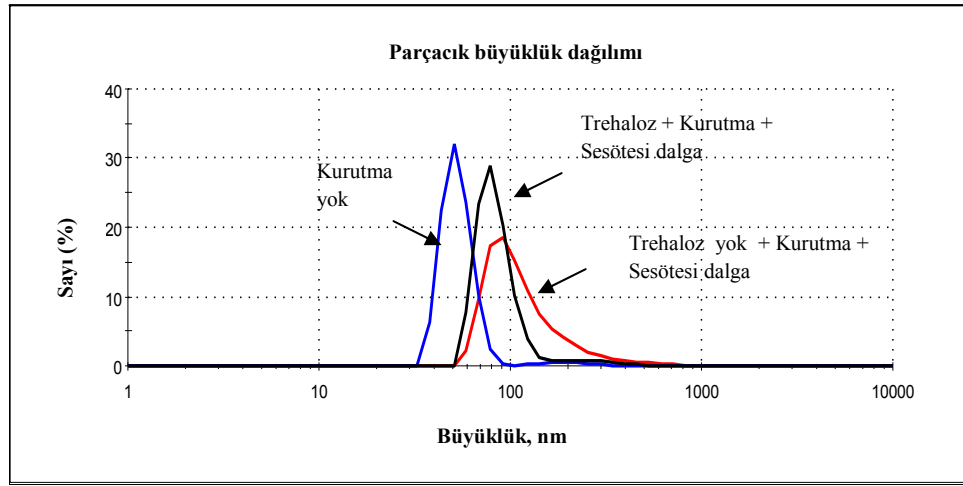
Şekil 5.10 Sesötesi dalgaların ilk 15 dk boyunca KNP’nin büyüklüğüne etkisi
a. % şiddet cinsinden, **b.** % sayı cinsinden



Şekil 5.11 Sesötesi dalgaların 15 dk'dan sonra KNP'nin büyüklüğüne etkisi
a. % şiddet cinsinden, **b.** % sayı cinsinden

Şekil 5.10 ve 5.11 hem % şiddet hem % sayı cinsinden incelenecek olursa, sesötesi dalga etki süresi ilk 15 dk boyunca arttırıldığında parçacık büyüklük dağılımının sola kaydığı (ortalama parçacık büyüklüğünün azalması) ikinci 15 dk da ise sağa kaydığı (ortalama parçacık büyüklüğünün artması, parçacıkların tekrar birleşmesi) görülmektedir. Şekil 5.10.a'da parçacıklar başlangıçta iki kısımdan oluşmaktadır. Büyük parçacıkların oluşturduğu dağılım (100 nm üzeri) daha şiddetlidir, bunun nedeni; büyük parçacıkların ışığı daha küçük açı ile kırmalarıdır. 5. dk sonunda pik sola doğru genişlediği için dağılımın % değeri azalmış ve 100 nm altındaki ve üstündeki kısımlar birleşmişlerdir. Dağılımdaki sola kayma 10. ve 15 dk'larda da devam etmiş, bu sürelerde 100 nm altındaki kısım da genişleyerek en küçük parçacıklar elde edilmiştir. Belirlenen 15 dk denge süresinin ardından ise, 20. dk'da ani bir birleşme göze çarpmaktadır. Bu birleşme 25. dk'da da hızlı bir biçimde devam etmiş 30. dk'da birleşme hızı azalmıştır. 20. dk sonunda alınan dağılım grafiğinde parçacıkların hala iki kısımdan oluştuğu, daha küçük kısmı oluşturan parçacıkların ise 25. dk sonunda birleşerek yüksek şiddetli tek bir dağılım verdiği söylenebilir (Şekil 5.11.a). % sayı cinsinden inceleme yapılacak olursa, dondurarak kurutma yapılmamış örneklerde parçacık birleşmesi dondurularak kurutulan örneklerdeki birleşmeye oranla oldukça azdır (Şekil 5.7 ve Şekil 5.10.b). Dondurarak kurutma işlemi yapılmamış olduğu için donma ve kuruma işlemlerinden kaynaklanan parçacık birleşmesi söz konusu değildir.

Sesötesi dalgaların parçacık büyüklük dağılımları üzerine olan etkisine genel olarak bakıldığında, santrifüj sonrasında oluşan çökelekteki parçacıklar en küçük parçacıklardır. Oluşan çökelekteki nanoparçacıklar uygulamalarda, o şekliyle kullanılamayacakları için ya dondurularak kurutulur ya da uygun bir tampon içerisinde saklanırlar. Böylece, KNP'nin şişme özeliğinden dolayı parçacıkların büyüklüğünün artması da önlenir. Sonuç olarak; trehaloz kullanımı parçacık birleşmesini önlemede tek başına yeterli olmadığı için sesötesi dalga etkisinden de yararlanmak gerekmektedir. Sesötesi enerji uygulanması sonucu üç durum için de elde edilen en küçük parçacıkların büyüklük dağılımları Şekil 5.12'de verilmiştir.

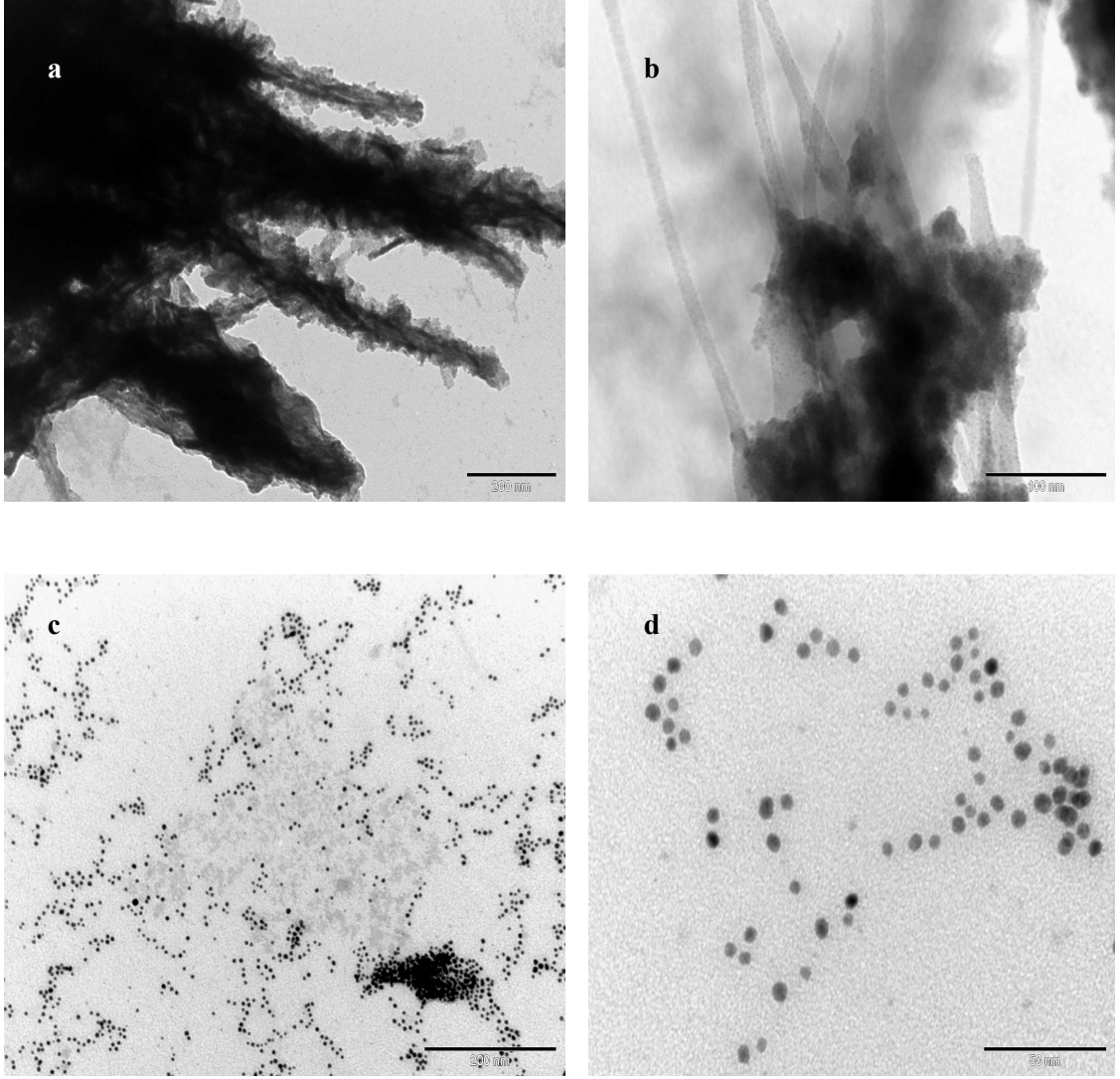


Şekil 5.12 Dondurarak kurutma varken ve yokken uygun sürede sesötesi dalga etkisi sonucu elde edilen en küçük KNP'ye ait parçacık büyüklük dağılımları

Şekil 5.12'de de görüldüğü gibi trehaloz kullanılıp dondurularak kurutulan parçacıklar üzerine sesötesi dalgalar uygulandığında elde edilen KNP, trehaloz yokken elde edilenlerden daha küçüktür, ancak; sadece sesötesi dalga vererek te en küçük parçacıkları hazırlamak mümkün olmamaktadır. Bu yüzden; KNP'yi parçacık birleşmesine karşı korumak için dondurarak kurutma sırasında trehaloz eklenmeli ve herhangi bir uygulamada parçacıklar kullanılacakken 20 dk sesötesi dalgalar ile etkileştirilmelidir.

5.1.3 TEM analizi

Bölüm 4.2.1’de belirtildiği gibi Calvo *et al.* (1997) çalışmasına dayanılarak iyonik jelleşme yöntemi ile NK parçacıkları sentezlenmiştir. İyonik jelleşme ile elde edilen KNP için en büyük sorunun parçacıkların birleşmesi olduğu, süreli yayınlarda parçacık birleşmesini önlemek amacı ile trehaloz kullanıldığı (Calvo *et al.* 1997, Lopez-Leon *et al.* 2005, Borges *et al.* 2005) ve oluşan birleşmeleri dağıtmak için sesötesi dalgaların uygulandığı daha önce belirtilmişti. Bu tez kapsamında en küçük KNP’yi sentezleyebilmek için kullanılması gereken en uygun pH (4.6-4.8) ve kitosan/TPP (5) oranında çalışılıp parçacık birleşmesinin önüne geçebilmek için trehaloz kullanılmıştır. Dondurarak kurutma işleminden sonra ise sesötesi dalga ile KNP kullanılabilen en uygun duruma getirilmiştir. Sentezlenen örnekler için TEM görüntüleri Şekil 5.13.a,b,c,d’de verilmiştir. TEM görüntülerinin alınması sırasında dondurularak kurutulan parçacıkların dağıtılması için ‘ultrasonik probe’ yerine ultrasonik banyo kullanılmıştır. Bu durum analizlerin yurt dışında yapılması ve gerçekleştiği yerde ultrasonik probe bulunmamasından kaynaklanmaktadır. Ultrasonik probe yardımıyla parçacık birleşmeleri dağıtılmış örnekler yurt dışına gönderilse bile, geçen zaman içerisinde uygulanan sesötesi dalga etkisini kaybedecektir. Bundan dolayı, analiz için dondurularak kurutulmuş katı örnekler tercih edilmiştir. Ultrasonik banyonun kullanımı parçacık birleşmelerinin dağıtılması üzerine ultrasonik probe kadar etkili değildir. Çünkü ultrasonik probe ile KNP’yi içeren çözeltiye içeriden bir etki verilmekte ve böylelikle parçacık birleşmeleri daha etkili bir şekilde dağıtılabilmektedir. Bu sebeple, ultrasonik banyo kullanımının ultrasonik probe gibi 20 dk sonunda parçacık birleşmelerini dağıtmada yeterli olması beklenemez. Bunun yerine daha uzun bir uygulama süresi sonucunda parçacık birleşmeleri dağıtılabılır. Ultrasonik banyo uygulama süresinin parçacık birleşmesi üzerine olan etkisi Şekil 5.13’te açıkça görülmektedir. Şekil 5.13.a,b, TEM analizi için hazırlanan kitosan nanoparçacık çözeltisinin 5 dk süre ile ultrasonik banyo da bekletilmesi sonrasında çekilen TEM görüntüleridir.



Şekil 5.13 Uygun koşullar altında sentezlenen kitosan nanoparçacıklarının farklı sürelerde ultrasonik banyoda bekletilmeleri ile alınan TEM görüntüleri
a, b. 5 dk bekletilmiş örnekler, **c, d.** 1 saat bekletilmiş örnekler

Şekil 5.13.c,d ise KNP'yi içeren çözeltinin ultrasonik banyoda bekleme süresi 1 saate çıkarıldığı zaman elde edilmiştir. Görüntülerden de anlaşılacağı gibi 5 dk bekleme süresi sonunda dondurarak kurutma sonucu meydana gelen parçacık birleşmeleri dağıtılamamıştır. Birleşerek büyük yığınlar meydana getirmiş olan parçacıklar oluşturdukları yapıyı 5. dk sonunda hala korumaktadırlar. DLS analizi ile elde edilen sonuçlarla kıyaslama yapılırsa, ultrasonik banyo kullanımının 5 dk'lık etkisinin aynı sürede ultrasonik probe kullanımına göre parçacık birleşmesi üzerinde daha az etkili olduğu söylenebilir. Şekil 5.9'da 5 dk sonunda ultrasonik probe ile parçacık büyüklüğünün 280 nm civarına düşürüldüğü görülmektedir. Bu sonuçlar Şekil

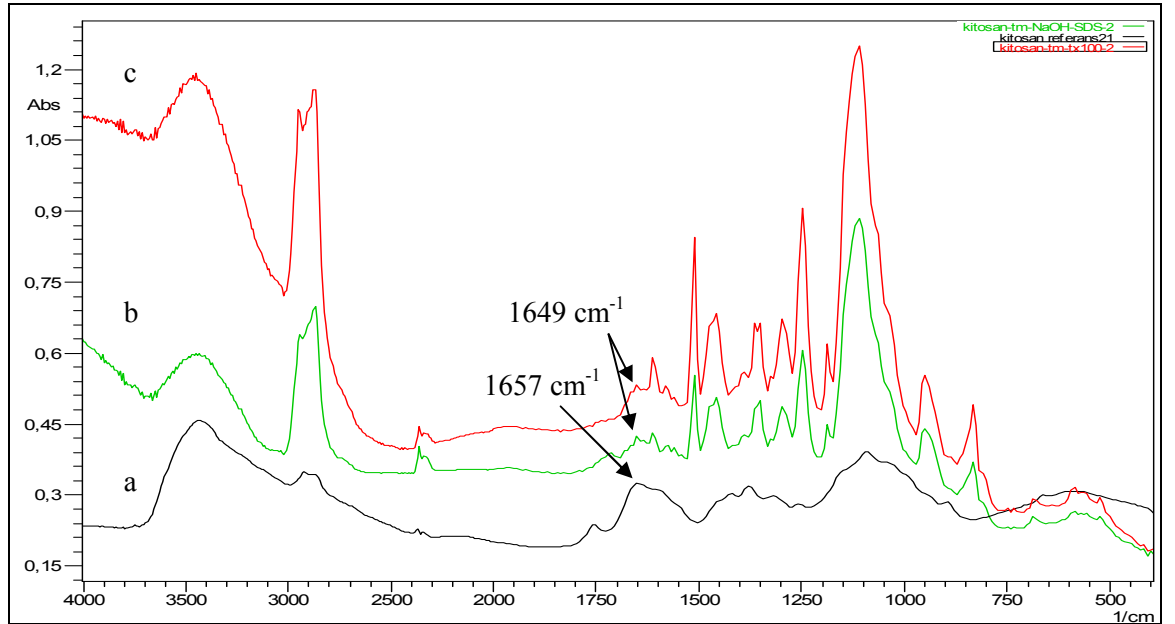
5.13.a,b'de görülen sonuçlarla uyuşmamaktadır. Bu da ultrasonik banyo hakkında yapılan yorumun doğruluğunu göstermektedir. Ultrasonik probe ile 20 dk sonunda en küçük parçacık büyüklük dağılımını ultrasonik banyo kullanımı sonucu elde etmek mümkün olmadığı için 1 saatlik uygulama süresi denenmiş ve alınan TEM görüntüleri Şekil 5.13.c,d'de verilmiştir. Görüldüğü gibi, oluşan kitosan nanoparçacıkları küresel ve hemen hemen düzgün bir şekilde dağılmış durumdadır. Ayrıca, Şekil 5.13.c,d'de KNP'ye ait kümelenmeler de görülmektedir. Oluşan kümelenmelerin ultrasonik banyoda bekletme süresinin uzatılması sonucu dağıtılabileceği düşünülmektedir. Bu arada, ilk 5 dk sonunda görülen kümelenmeler ile 1 saat sonraki kümelenmeler arasındaki fark dikkat çekicidir. 5 dk sonunda parçacıkların birbirleri ile tamamen birleşerek büyük yığınlar oluşturdukları, 1 saatlik etkileşimden sonra ise parçacıkların neredeyse tamamının dağıldığı çok az miktarda görülen kümelenmelerin bile tek tek küresel kitosan nanoparçacıklarından meydana geldiği görülmektedir. Bu görüntüler ultrasonik probe ile aynı derecede olmasa bile ultrasonik banyo kullanılarak ta iyi bir şekilde dağılmış kitosan nanoparçacıklarının elde edilebileceğini göstermektedir. Şekil 5.13.c,d'de görülen KNP'nin büyüklükleri 10 nm'den küçüktür. TEM görüntüleri ve DLS analizleri ile alınan parçacık büyüklük dağılımları karşılaştırılacak olursa, TEM görüntülerinde yer alan parçacıkların büyüklüklerinin parçacık büyüklük dağılımlarında gözlenenenden daha küçük olduğu açıkça görülür. Bunun nedeni; parçacıkların sulu ortamda birleşmeleri ve parçacık büyüklük analizörü tarafından daha büyük parçacıklar olarak algılanmalarıdır. Sulu ortamda görülen birleşme ile dondurarak kurutma sonrası meydana gelen parçacık birleşmesi karıştırılmamalıdır. Dondurarak kurutma sonrasında nanoparçacıklar donma ve kuruma basamaklarında meydana gelen gerilmeler sonucunda kararlılıklarını kaybederek daha büyük kümeler oluşturma eğilimine girerler.

5.2 Ters Misel Yöntemi

Ters misel yöntemi ile KNP'nin sentezinde süreli yayınlarda denenen çapraz-bağlayıcı miktarı ve seyreltme oranının yanısıra, farklı cinsten yüzey aktif maddesi kullanımının da nanoparçacık oluşumu ve büyüklüğü üzerine olan etkileri incelenmiştir. Elde edilen parçacıkların FTIR ve DLS analizlerine ait bulgular aşağıda verilmiştir.

5.2.1 FTIR analizi

Ters misel yöntemi ile kitosan ve glutaraldehit kovalent olarak çapraz-bağlanıp kitosan nanoparçacıklarını oluştururlar. Glutaraldehit ile çapraz-bağlanmış KNP'ye ait FTIR spektrumları Şekil 5.14'te görülmektedir. Şekil 5.14.a'da ticari olarak satın alınan kitosanın karakteristik spektrumu yer almaktadır.



Şekil 5.14 Ters misel yöntemi ile sentezlenen kitosan nanoparçacıklarına ait FTIR spektrumları

a. kitosan, b. TX-100 kullanıldığında, c. TX-100/SDS/NaOH kullanıldığında

3419 cm^{-1} 'deki pik, hidroksil ve moleküliçi hidrojen bağlarına karşılık gelmektedir. Birincil aminler de $3500\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ 'de pik vermektedir. Bu yüzden, 3419 cm^{-1} 'deki

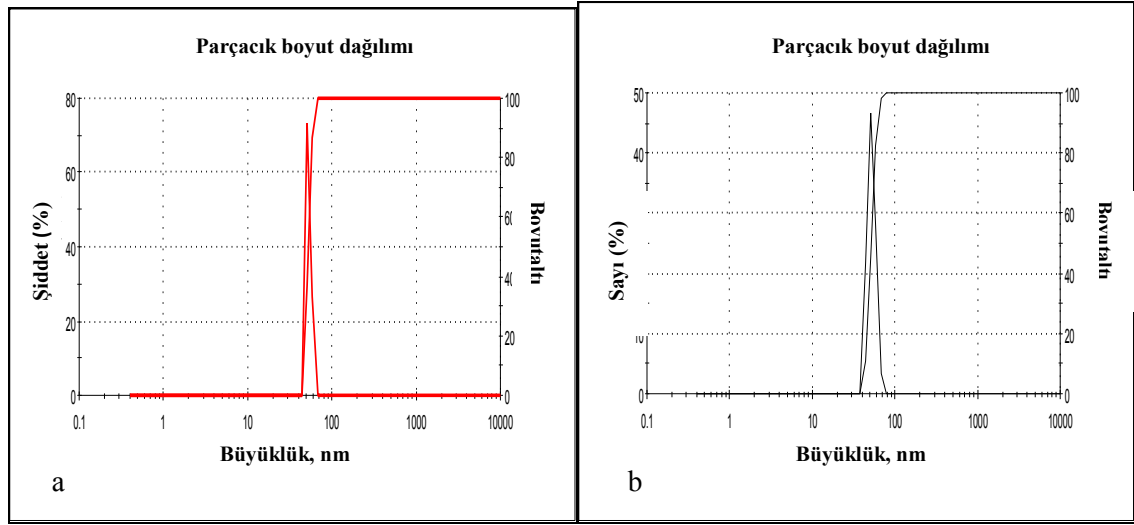
geniş pik NH_2 , O-H gerilimi ve hidrojen bağlarının birleşmiş piki olduğu söylenebilir. 2877 cm^{-1} ve 2927 cm^{-1} 'de C-H, 1657 cm^{-1} de CONH_2 , 1155 cm^{-1} 'de O-köprüsü ve $960\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ civarında ise C-O-C simetrik gerilimlerine ait pikler yer almaktadır. Şekil 5.14.b,c sırasıyla; KNP'yi sentezlemek için yalnız TX-100 kullanıldığı ve TX-100/SDS/NaOH'ın beraber kullanıldığı durumda sentezlenen KNP'ye ait FTIR spektrumlarıdır. Çapraz-bağlanmış KNP için 1657 cm^{-1} de bulunan NH_2 bantına ait pik 1573 cm^{-1} 'ye kaymış ve 1649 cm^{-1} 'de yeni bir pik belirlemiştir. Bu OH^- ve NH_3^+ grupları arasında bir bağlanma olduğunu anlamına gelmektedir. 1649 cm^{-1} 'de C=N bağının titreşimine ait pik, glutaraldehitin karbonil grupları ile kitosanın amin grupları arasındaki tepkimenin bir sonucu olarak Schiff bazının oluşumunu gösterir. Elde edilen sonuçlar Liu *et al.* (1997) ve Banerjee *et al.* (2002) çalışmaları ile de uyum göstermektedir.

5.2.2 DLS analizi

Banerjee *et al.* (2002) çalışmalarında ters misel ortamını kullanmış ve dar bir boyut dağılımına sahip KNP'yi sentezlemiştir. Araştırmacılar çalışmalarında, çapraz bağlanma derecesinin ve hazırlanan kitosan çözeltisindeki parçacık yoğunluğu değişiminin hazırlanan parçacıkların büyüklüğüne etkisini incelemişlerdir. Bu proje kapsamında süreli yayınlarda incelenen bu iki parametre dışında yüzey aktif madde türünün parçacık büyüklüğüne etkisi incelenmiştir.

Çok küçük parçacıkların hazırlanmasında etkili bir yöntem olan ters miseller (W/O, su/yağ, ters mikroemülsiyon); transparan, izotropik ve termodinamik olarak kararlı sentez ortamlarıdır. Ters misel ortamı, su/yağ arayüzeyinde yüzey aktif molekülleri ile kararlı hale getirilmiş ve bir yağ fazında dağıtılmış küçük sulu damlacıklardan oluşmaktadır. Bu küçük damlacıklar, parçacıkların şekil ve büyüklük dağılımlarını kontrol etmek için sınırlandırılmış bir tepkime ortamı oluşturur. Hazırlanan ters misel nanokürecikleri, nanoparçacıkların oluşması için nanoreaktör görevi görürken (Banerjee *et al.* 2002) aynı zamanda parçacıkların aşırı aglomerasyonunu da engellerler (Liu *et al.* 2007). Şekil 5.15'de ters misel yöntemi kullanılarak sentezlenen KNP'ye ait parçacık büyüklük dağılımı görülmektedir. Banerjee *et al.* (2002) çalışmalarında kullandıkları

düşük glutaraldehit miktarında çalışılarak elde edilen KNP'ye ait bu dağılım grafiğinde ortalama parçacık büyüklüğü 52,89 nm olup parçacıkların tamamı 70 nm'nin altındadır. Şekil 5.15.a,b, KNP'nin % şiddet ve % sayı cinsinden ortalama parçacık büyüklük dağılımlarını göstermektedir. Her iki şekilde de nanoparçacıkların dar bir büyüklük aralığında sentezlendiği görülmektedir. Ortalama parçacık büyüklük dağılımına ait elde edilen sonuçlar araştırmacıların sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

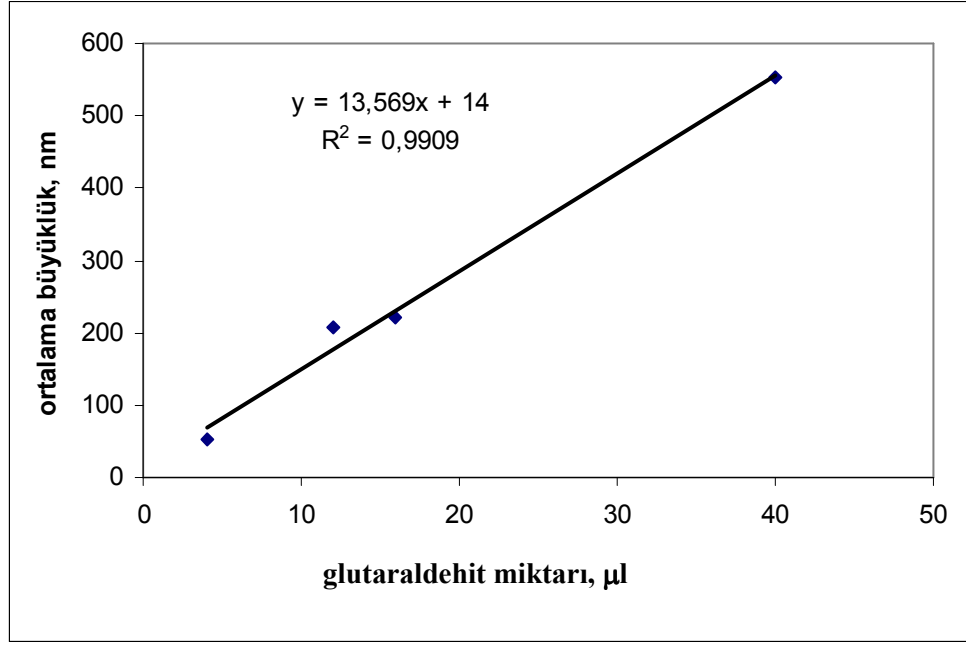


Şekil 5.15 Ters misel yönteminde AOT kullanılarak sentezlenen KNP'nin büyüklük dağılımı

a. % şiddet cinsinden, b. % sayı cinsinden

5.2.2.1 Glutaraldehit miktarının KNP'nin oluşumu ve büyüklüğüne etkisi

Ters misel ortamında polimer çapraz-bağlayıcı olarak kullanılan glutaraldehitin ortam içerisindeki derişiminin değişimi ile nanoparçacık büyüklüğünün değişimi incelenmiş, bunun için; 4, 12, 16 ve 40 µl glutaraldehit çözeltileri kullanılmıştır. Şekil 5.16'da görüldüğü gibi parçacık büyüklüğünün değişimi ile glutaraldehit derişimi arasında doğrusala yakın bir ilişki söz konusudur.

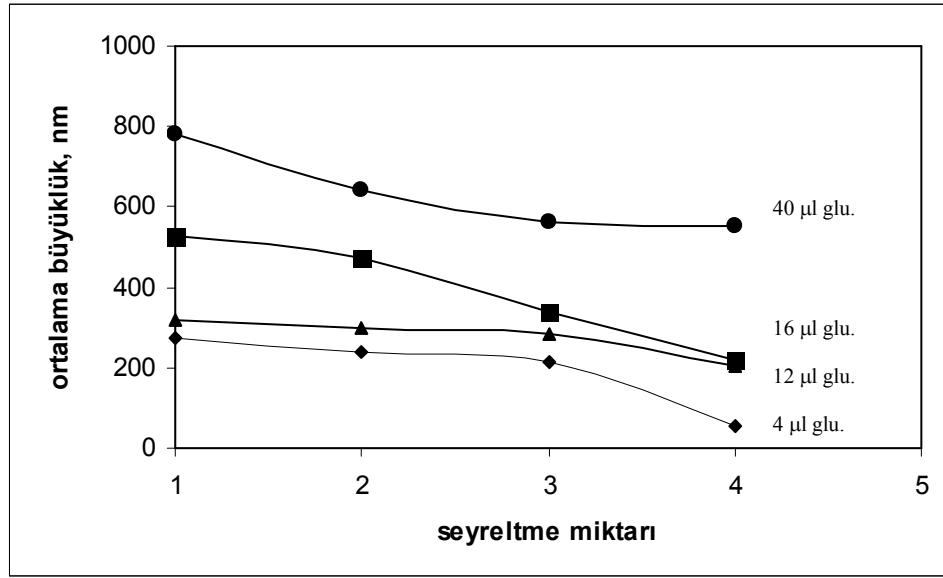


Şekil 5.16 Glutaraldehit miktarının değişimi ile KNP'nin büyüklüğünün değişimi

Kullanılan tüm glutaraldehit derişimlerinde KNP oluşumu gerçekleşmiş, artan derişimlerde ise oluşan nanoparçacıkların ortalama parçacık büyüklükleri artmıştır. Sonuçlar incelenecek olursa, en küçük parçacıkların çalışılan en düşük glutaraldehit derişiminde elde edildiği görülmektedir. Glutaraldehit derişimi en düşükken parçacıklar arasında yalnızca kitosanın yapışkan doğasından kaynaklanan birleşmeler söz konusudur ve ortalama parçacık büyüklüğü 52,89 nm'dir. Daha yüksek derişimler de ise kendiliğinden yapışmadan kaynaklanan birleşmelerden ziyade daha şiddetli birleşmeler oluşmuştur. Banerjee *et al.* (2002) bu sonucu, glutaraldehit miktarının artması ile glutaraldehit ile parçacıklararası çapraz-bağlanma olasılığının daha yüksek olmasına bağlamaktadırlar. Yani; glutaraldehit miktarı arttırılırsa oluşan parçacıklar da glutaraldehit varlığından dolayı birbirleri ile bağ oluşturacaklardır.

5.2.2.2 Seyreltme miktarının KNP'nin büyüklüğüne etkisi

Seyreltmenin etkisi, ters misel yöntemi ile elde edilen KNP'nin hazırlanan çözeltisi kullanarak belirlenmiştir. Hazırlanan çözelti damıtık su kullanılarak hacimce 2, 3 ve 4 kat seyreltilmiş ve Şekil 5.17'de görüldüğü gibi glutaraldehit miktarı ile birlikte değişimi verilen sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 5.17 Seyreltme oranı ve glutaraldehit miktarı ile kitosan nanoparçacık büyüklüğünün değişimi

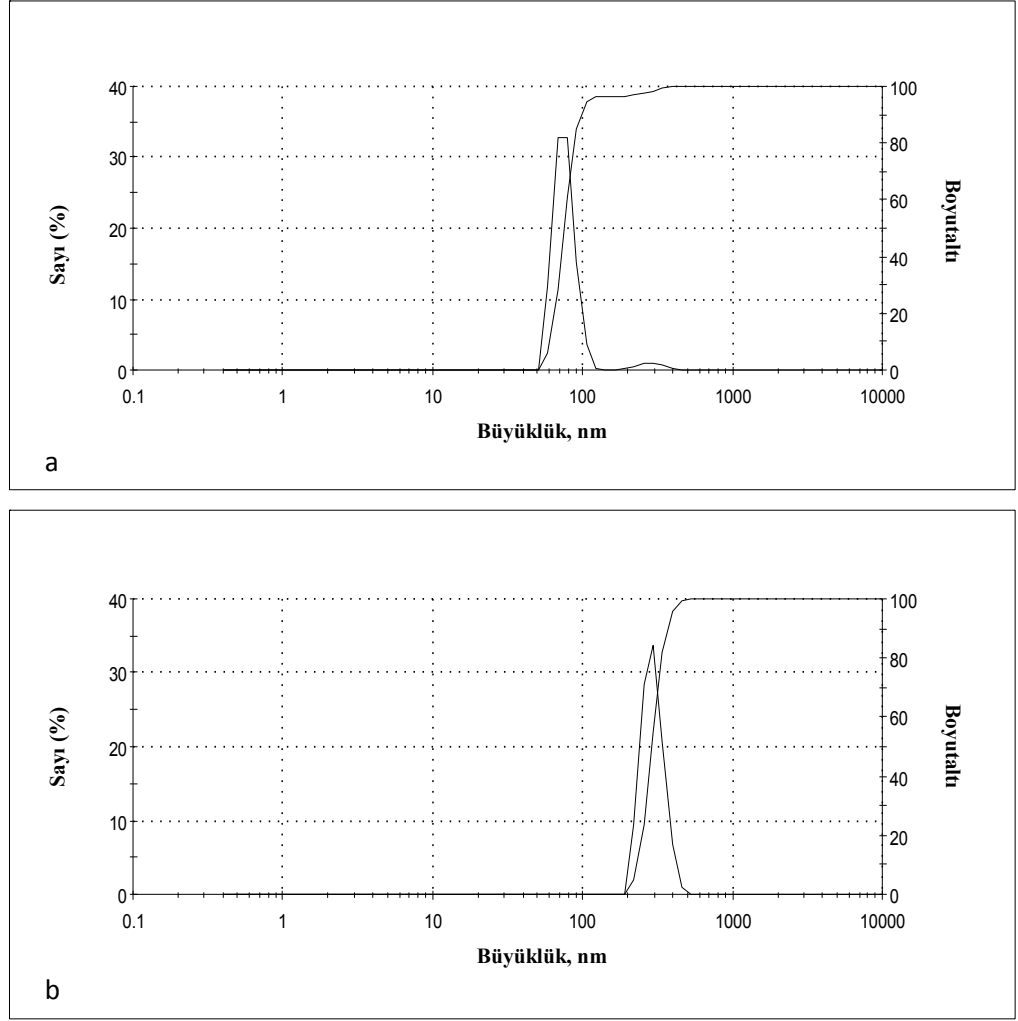
Parçacık büyüklüğüne glutaraldehit miktarının değişiminin daha önce bahsedilen etkisinin yanısıra, seyreltme miktarının da etkisi Şekil 5.17'de açıkça görülmektedir. Seyreltme miktarının artması ile tüm glutaraldehit derişimleri için parçacık büyüklüğünde azalma meydana gelmektedir. Parçacık büyüklüğündeki azalmanın, seyreltme ile parçacık-parçacık etkileşiminin düşürülmesi ve bunun sonucunda da parçacıkların serbest kalmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Seyreltmenin ardından, hazırlanan çözeltide parçacık birleşmeleri bir bakıma azaltılmış olur. Ancak; yüksek glutaraldehit derişimlerinde parçacık büyüklüğünün artmış olmasının asıl sebebinin parçacıkların yapışması olmadığı açıkça görülmektedir. Seyreltmenin artması parçacık birleşmesini bir noktaya kadar azaltmıştır. Bu sonuç, daha yüksek derişimde glutaraldehit kullanımı ile parçacıklararası çapraz-bağlanmanın olduğu sonucunu

desteklemektedir. Seyreltme miktarının 4 kata çıkarılmasına rağmen artan glutaraldehit derişimi ile parçacık büyüklüğü 52,98 nm'den 554,4 nm'ye yükselmiştir.

5.2.2.3 Farklı yüzey aktif madde kullanımının KNP'nin oluşumuna etkisi

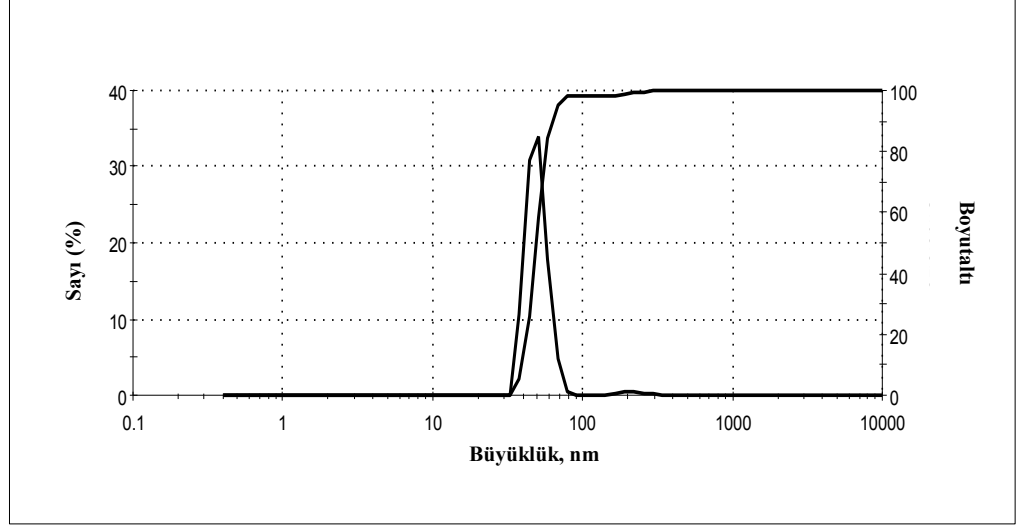
Farklı türde yüzey aktif madde kullanarak KNP'nin sentezini gerçekleştirmek için AOT yerine TX-100 kullanılmıştır. Bölüm 4.2.2'de açıklandığı gibi iki farklı deney ortamında TX-100 kullanılarak KNP üretilmiştir. TX-100 ile sentezlenen KNP'ye ait parçacık büyüklük dağılımları Şekil 5.18.a,b'de verilmiştir. TX-100 kullanıldığında (Şekil 5.18.a) ortalama parçacık büyüklüğü 70 nm iken TX-100'ün NaOH ve SDS ile birlikte kullanıldığı durumdaki (Şekil 5.18.b) ortalama parçacık büyüklüğü ise 295,3 nm'dir. TX-100 kullanıldığı durumda daha ince parçacıklar elde edilmiş olmasına rağmen parçacık büyüklük dağılımı, TX-100/NaOH/SDS kullanıldığı durumdakine göre daha geniştir. Bu örneklerle ait PDI değerleri sırasıyla 0,727 ve 0,575'tir. Sadece TX-100 kullanılarak sentezlenen parçacıkların PDI değerinin büyük olması farklı büyüklükte parçacıkların daha fazla oranda sentezlendiğini göstermektedir. Bu yüzden dağılım daha geniştir. Şekil 5.18.a da görüleceği gibi sadece TX-100 kullanıldığında sentezlenen parçacıklar iki farklı kısımdan oluşmakta ve iki farklı dağılım piki vermektedir. Oluşan nanoparçacıkların sayıca daha fazla olan kısmı (büyük pik) 51-125 nm aralığında iken sayıca az olan kısım (küçük pik) 180-400 nm aralığındadır.

Görüldüğü gibi AOT dışında farklı yüzey aktif maddelerin kullanımı ile de kitosan nanoparçacık sentezi mümkündür. AOT kullanılarak 52,89 nm ortalama büyüklüğe sahip KNP'nin sentezlenebildiği Şekil 5.15'te gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucu, AOT kullanımı sonrası elde edilenler kadar küçük olmasa da TX-100 kullanımı ile % 85'i 91,28 nm'nin altında olan kitosan nanoparçacıkları sentezlenebilmiştir. Sonuçlar gözönünde bulundurulduğunda AOT kullanımına ek olarak TX-100 kullanımı da KNP'nin sentezi için tercih edilebilir.



Şekil 5.18 Ters misel yöntemi kullanılarak sentezlenen KNP'ye ait büyüklük dağılımları
a. yalnız TX-100 kullanıldığı durum, **b.** TX-100 ile birlikte NaOH-SDS kullanıldığı durum

Bölüm 4.2.2'de bahsedildiği gibi TX-100 kullanılarak KNP sentezlenirken glutaraldehit yerine çapraz-bağlanma için NaOH'de tercih edilebilir. NaOH kullanıldığında sentezlenen KNP'ye ait parçacık büyüklük dağılımı Şekil 5.19'da verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi sadece TX-100 kullanıldığı durumda glutaraldehit yerine NaOH kullanıldığında elde edilen parçacıklar oldukça küçük ve AOT ile sentezlenene oldukça yakındır. Sentezlenen parçacıkların ortalama büyüklüğü 54,09 nm'dir. Glutaraldehit kullanımına kıyasla NaOH kullanımı daha etkili olmuş daha küçük parçacıklar sentezlenebilmiştir.



Şekil 5.19 TX-100 kullanılarak kitosan nanoparçacık sentezi sırasında glutaraldehit yerine NaOH kullanılması ile elde edilen parçacık büyüklük dağılımı grafiği

Çapraz-bağlayıcı olarak NaOH kullanıldığı zaman sentezlenen kitosan nanoparçacıkları 33-80 nm aralığındadır. Oluşan parçacıkların % 96'sı ise 70 nm'nin altında yer almaktadır.

6. DEĞERLENDİRME

Bu yüksek lisans çalışması kapsamında iyonik jelleşme ve ters misel yöntemleri kullanılarak kitosan nanoparçacıklarının sentezi gerçekleştirilmiş, elde edilen sonuçlar aşağıda sırasıyla her iki yöntem içinde özetlenmiştir:

6.1 İyonik Jelleşme Yöntemi için Elde Edilen Sonuçlar

- İyonik jelleşme yönteminde çapraz-bağlayıcı olarak TPP kullanılmış, alınan FTIR spektrumundan yararlanarak TPP'nin fosfat grubunun kitosanın amonyum grubu ile çapraz-bağlandığı belirlenmiştir.
- Ortam pH'sinin değişiminin KNP'nin oluşumu ve büyüklüğü üzerine olan etkileri incelenmiş, asidik ortamda nanoparçacık sentezlenebilmişken bazik ortama geçildiğinde ($\text{pH} > 6$) parçacık büyüklüğünde ani bir artış gözlenmiştir. İyonik jelleşme yönteminde bazik ortamda nanoparçacık oluşumu söz konusu değildir.
- En küçük parçacık büyüklüğüne (160 nm) sahip KNP, $\text{pH} = 4,6 - 4,8$ aralığında çalışıldığında sentezlenmiş, sentezlenen parçacıklar için $\text{PDI} = 0,277$ ve $\% \text{PD} = 52,73$ olarak bulunmuştur.
- Kütlece kitosan/TPP oranının KNP'nin oluşumu ve büyüklüğü üzerine olan etkileri incelenmiş, kitosan miktarı sabit tutulurken TPP miktarı değiştirilmiştir. Kitosan/TPP oranı 3 ile 7 aralığında değiştirilerek en küçük parçacıkların sentezlenebildiği en uygun oranın 5 olduğu tespit edilmiştir. Sentezlenen parçacıklar 131 nm ortalama büyüklüğe sahiptir.
- İyonik jelleşme yönteminde santrifüj işleminden sonra elde edilen KNP'nin dondurularak kurutulması sonucu parçacıkların birleştiği saptanmıştır.

- Kurutma öncesinde parçacık büyüklük dağılımı 40 - 110 nm aralığında iken kurutma sonunda dağılım 250 - 720 nm aralığına yükselmiştir. Kurutma öncesinde parçacıkların sayıca % 96'sı 90 nm'nin altında iken kurutma sonrasında parçacıkların % 96'sı 600 nm'nin altında yer almaktadır.
- Dondurarak kurutma sonucu görülen parçacık birleşmesi trehaloz kullanılarak önlenmeye çalışılmıştır.
- Trehaloz kullanımının parçacık birleşmesini önlemediği ve oluşan parçacıkların 190 – 460 nm aralığında olduğu gözlenmiştir.
- Parçacık birleşmesi kısmen önlenmiş, parçacıkların sayıca % 96'sı 600 nm'den 380 nm'nin altına dağıtılabilmektedir.
- Trehaloz eklenmeden dondurarak kurutulan, trehaloz eklenip dondurularak kurutulan ve hiç dondurarak kurutma yapılmayan örnekler için PDI değerleri sırasıyla; 0,732, 0,723 ve 0,546'dır.
- Parçacık birleşmesini önlemek için sesötesi dalga uygulama süresinin etkisi incelenmiştir. Bunun için; ilk olarak santrifüj sonrası elde edilen çökeleğin, ikinci olarak trehaloz kullanılmadan dondurarak kurutma yapılan parçacıkların ve son olarak ta trehaloz kullanılarak dondurarak kurutulan parçacıkların hazırlanan sulu çözeltilerine yarım saat süre ile sesötesi dalga etkisi verilmiştir.
- İlk iki durumda 15 dk sesötesi uygulama süresi sonunda en küçük parçacıkların elde edilebildiği gözlenmiştir. Üçüncü durumda ise en küçük parçacıkların elde edildiği uygulama süresi 20 dk'dır.
- Sesötesi uygulama süresinin arttırılması ile dağılan parçacıkların tekrar birleşmeye başladığı gözlenmiştir. Sürenin artması ile dondurarak kurutma yapılmamış örnekler için ortalama parçacık büyüklüğü ilk durumdaki büyüklüğün üzerine çıkmıştır. Trehaloz kullanılarak ve kullanılmadan

dondurarak kurutulmuş örnekler için parçacık büyüklükleri 30 dk sonunda ilk birleşmiş haldeki büyüklükleri geçmemiş olmasına rağmen devam edecek sesötesi uygulama süresi sonucunda ilk büyüklükleri geçme eğiliminde oldukları ileri sürülmüştür.

- Kurutma yapılmamış örneklerin ortalama parçacık büyüklükleri diğer iki durumdan daha küçük olsa bile KNP'nin daha sonraki kullanımları göz önüne alınarak dondurarak kurutma işlemi veya uygun bir tamponda saklama işlemi yapılmalıdır.
- Trehaloz kullanılıp sesötesi dalga ile etkileştirilen parçacıklar, trehaloz kullanılmadan dondurularak kurutulup sesötesi dalga ile etkileştirilen parçacıklardan daha küçüktür. Bu yüzden, en küçük kitosan nanoparçacıklarını elde edebilmek için uygun pH ve kitosan/TPP oranının yanısıra dondurarak kurutma sırasında trehaloz kullanıp KNP'yi içeren çözeltinin 20 dk sesötesi dalgalar ile etkileştirilmesi gerektiği düşünülmektedir.
- TEM fotoğraflarından yararlanarak sentezlenen parçacıkların 10 nm'den daha küçük oldukları saptanmıştır. DLS analizi ile TEM fotoğrafları arasındaki farkın parçacıkların sulu ortamda birbirleri ile yapışmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir.
- TEM analizi yapılırken dondurularak kurutulmuş parçacıklar ultrasonik probe yerine ultrasonik banyo kullanarak dağıtılmıştır. Bu yüzden en küçük parçacıkların ultrasonik probe kullanımını sonucu olduğu gibi 20 dk sonunda elde edilemeyeceği düşünülmektedir. TEM analizleri de bu düşüncüyü desteklemektedir. Ultrasonik banyoda 5 dk bekletilmiş örneklerde çok yoğun bir birleşmenin olduğu görülmekte iken bu birleşmenin ancak 1 saat bekletme süresi sonunda dağıtılabileceği anlaşılmıştır. 1 saat sonunda çekilen fotoğraflarda yine, az miktarda parçacık birleşmesi görülmektedir.

6.2 Ters Misel Yöntemi için Elde Edilen Sonuçlar

- FTIR spektrumundan yararlanarak çapraz-bağlayıcı glutaraldehitin karbonil grupları ile kitosanın amin gruplarının bağlandığı belirlenmiştir.
- Yüzey aktif madde olarak AOT kullanıldığında 52,89 nm ortalama parçacık büyüklüğüne sahip dar bir boyut dağılımı aralığında KNP sentezlenebilmiştir.
- Glutaraldehit miktarının değişiminin nanoparçacık oluşumu üzerine olan etkisi incelenmiş, artan derişimler sonucunda daha büyük KNP sentezlenmiştir. Glutaraldehit miktarı ile parçacık büyüklüğü arasında yaklaşık olarak doğrusal bir ilişki olduğu gözlenmiştir.
- Glutaraldehit miktarındaki artma sonucu parçacıklararası çapraz-bağlanmalar oluştuğu ve böylece daha büyük parçacıkların sentezlendiği sonucuna varılmıştır.
- Seyreltme miktarının KNP'nin büyüklüğü üzerine olan etkileri incelenmiş, bunun için sentezlenen parçacıkların hazırlanan çözeltileri hacimce 2, 3 ve 4 kat seyreltilerek boyut analizi gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucunda seyreltme miktarının artması ile parçacık büyüklüğünde azalma olduğu belirlenmiştir. Birim hacimde bulunan parçacık sayısının azalması sonucu parçacıkların kendiliğinden yapışma eğilimlerinin de azaldığı ve bunun parçacık büyüklüğünde azalmaya sebep olduğu düşünülmektedir.
- Farklı türde yüzey aktif madde kullanımının KNP'nin oluşumu ve büyüklüğü üzerine iki farklı çalışma yapılmış, ilk durumda sadece TX-100 ikinci durumda ise TX-100 ile birlikte NaOH ve SDS'de kullanılmıştır.
- DLS analizleri sonucu, TX-100 kullanıldığında ortalama parçacık büyüklüğü 70 nm iken TX-100'ün NaOH ve SDS ile birlikte kullanıldığı durumdaki ortalama parçacık büyüklüğünün ise 295,3 nm olduğu belirlenmiştir.

- Hazırlanan örneklere ait PDI değerleri sırasıyla 0,727 ve 0,525'tir.
- TX-100 kullanıldığında sentezlenen parçacıklar iki farklı kısımdan oluşmakta ve iki farklı dağılım piki vermektedir. Oluşan nanoparçacıkların sayıca daha fazla olan kısmı 51-125 nm aralığında iken sayıca az olan kısım 180-400 nm aralığındadır. Dağılımın geniş olması TX-100 için PDI değerinin daha büyük çıkmasına neden olmuştur.
- TX-100 kullanıldığı durumda glutaraldehit yerine çapraz-bağlayıcı olarak NaOH kullanıldığında 54,09 nm ortalama büyüklüğe sahip KNP sentezlenmiştir.

7. ÖNERİLER

Farklı türde kitosan kullanımı ile bu tez kapsamında elde edilen sonuçlardan farklı sonuçlarla karşılaşılabılır. Süreli yayınlarda bunun birçok örneği ile karşılaşılmaktadır. Bu yüzden kullanılacak kitosanın özellikleri (molekül ağırlığı, deasetilasyon derecesi vb.) iyi bilinmeli ve uygun çalışma koşulları kullanılacak kitosana göre seçilmelidir. İyonik jelleşme yönteminde parçacık birleşmesi yoğun bir şekilde görülmektedir. En küçük parçacıkların elde edilmesi birçok parametreye bağlı durumdadır. Tüm parametrelerin en uygun şekilde ayarlanmış olması önemlidir. Kurutma sonrası görülen birleşmeleri için özellikle sesötesi dalga etkisi verilmesi tavsiye edilmektedir.

Ters misel yöntemi ile daha küçük, daha dar büyüklük aralığında ve daha kararlı parçacıklar elde edebilmek mümkündür. Ancak, elde edilen parçacıkların glutaraldehitin tamamen arındırılmış olması gerekmektedir. Aksi takdirde vücutta kullanım sonrası kalabilecek glutaraldehitin zehirlilik etkisi söz konusudur.

AOT ile sentezlenenler kadar küçük olmasa da TX-100 kullanımı ile de küçük KNP sentezlemek mümkündür. Ancak, glutaraldehit yerine NaOH kullanıldığında neredeyse AOT kullanımında sentezlenenler kadar küçük parçacıklar elde edilebildiği ve kalabilecek glutaraldehitin zehirlilik özeliğinden dolayı NaOH kullanımı da tercih edilebilir.

KAYNAKLAR

- Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S. and Fessi, H. 2006. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 1688-1713.
- Agnihotri, S.A., Mallikarjuna, N.N. and Aminabhavi, T.M. 2004. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 100, 5–28.
- Amidi, M., Romeijn, S.G., Borchard, G., Junginger, H.E., Hennink, W.E. and Jiskoot, W. 2006. Preparation and characterization of protein-loaded *N*-trimethyl chitosan nanoparticles as nasal delivery system, *Journal of Controlled Release*, Vol. 111, 107-116.
- Anonim. 2006. Web sitesi: www.biltek.tubitak.gov.tr/bdergi/yeniufuk/icerik/biyomalzemeler.pdf, 2006. Erişim Tarihi: 06/10/2006.
- Anonymous. 2003. Web Sitesi: <http://vefur.rf.is/TAFT2003/PPtskjol/Fyrirlestrar/L70%20-%20Kristberg.pdf>. Erişim Tarihi: 29/08/2006.
- Anonymous. 2004. Web sitesi: http://etd.lsu.edu/docs/available/etd-11102004-134343/unrestricted/Fernandez-Kim_thesis.pdf. Erişim Tarihi: 27/10/2006.
- Anonymous. 2006. Web sitesi: <http://www.mpikg-golm.mpg.de/kc/scripts/Polysaccharide.pdf>. Erişim Tarihi: 15/10/2006.
- Anonymous. 2008. Web sitesi: http://www.malvern.com/labeng/technology/dynamic_light_scattering/dynamic_light_scattering.htm. Erişim Tarihi: 16/05/2008.
- Banerjee, T., Mitra, S., Singh, A.K., Sharma, R.K. and Maitra, A. 2002. Preparation, Characterization and Biodistribution of Ultrafine Chitosan Nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 243, 93-105.
- Beaulieu, C. 2005. Chitin and Chitosan, <http://www.plasticstrends.net>. Erişim Tarihi: 11/11/2006.
- Bhumkar, D.R. and Varsha, B.P. 2006. Studies on Effect of pH on Cross-linking of Chitosan With Sodium Tripolyphosphate: A Technical Note, *AAPS PharmSciTech*, 7 (2) Article 50.
- Borges, O., Borchard, G., Verhoef, J.C., de Sousa, A. and Junginger, H.E. 2005. Preparation of coated nanoparticles for a new mucosal vaccine delivery system, *International Journal of Pharmaceutics*, 299, 155–166.
- Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J.L. and Alonso, M.J. 1997. Novel Hydrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers, *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 63, 125-132.
- Chen, F., Wang, Z.C. and Lin, C.J. 2002. Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite particles and hydroxyapatite/chitosan nano-composite for use in biomedical materials, *Materials Letters*, 57, 858-861.
- Deng, Q.Y., Zhou, C.R. and Luo, B.H. 2006. Preparation and Characterization of Chitosan Nanoparticles Containing Lysozyme, *Pharmaceutical Biology*, 44, 336–342.
- Dyer, A.M., Hinchcliffe, M., Watts, P., Castile, J., Jabbal-Gill, I., Nankervis, R., Smith, A. and Illum, L. 2002. Nasal delivery of insulin using novel chitosan based formulations: a comparative study in two animal models between simple chitosan formulations and chitosan nanoparticles, *Pharm. Res.* 19, 998-1008.

- Fernandez-Urrusuna, R., Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J.L. and Alonso, M.J. 1999. Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharm. Res.* 16, 1576–1581.
- Gan, Q., Wang, T., Cochrane, C. and McCarron, P. 2005. Modulation of Surface Charge, Particle Size and Morphological Properties of Chitosan–TPP Nanoparticles Intended for Gene Delivery, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 44, 65–73.
- Grenha, A., Seijo, B. and Remunan-Lopez, C. 2005. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25, 427-437.
- Hu, Z.G., Zhang, J., Chan, W.L. and Szeto, Y.S. 2006. The sorption of acid dye onto chitosan nanoparticles, *Polymer*, 47, 5838-5842.
- Janes, K.A., Calvo, P. and Alonso, M.J. 2001. Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47, 83-97.
- Katas, H. and Alpar, O. 2006. Development and Characterisation of Chitosan Nanoparticles for siRNA Delivery, *Journal of Controlled Release*, 115, 216–225.
- Lee, D.W., Powers, K. and Baney, R. 2004. Physicochemical properties and blood compatibility of acylated chitosan nanoparticles, *Carbohydrate Polymers*, 58, 371-377.
- Liu, G., Shao, L., Gea, F. and Chen, J.F. 2007. Preparation of ultrafine chitosan particles by reverse microemulsion, *China Particuology*, 5, 384–390.
- Lopez-Leon, T., Carvalho, E.L.S., Seijo, B., Ortega-Vinuesa, J.L. and Bastos-Gonzalez, D. 2005. Physicochemical Characterization of Chitosan Nanoparticles: Electrokinetic and Stability Behavior, *Journal of Colloid and Interface Science*, 283, 344-351.
- Meyers, S.P., No, H.K. and Lee, K.S. 1989. Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste, *J. Agric. Food Chem.* 37, 575.
- Mitra, S., Gaur, U., Ghosh, P.C. and Maitra, A.N. 2001. Tumour targeted delivery of encapsulated dextran–doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier, *Journal of Controlled Release*, 74, 317–323.
- Mostafa, N.Y. 2005. Characterization, thermal stability and sintering of hydroxyapatite powders prepared by different routes, *Materials Chem. and Physics*, 94, 333-341.
- Motwani, S.K., Khar, R.K., Ahmad, F.J. and Chopra, S. 2006. Effect of solvents quality on determination of particle size and polydispersity of nanoparticles, *Journal of Experimental Nanoscience*, 1, 307–316.
- Muzzarelli, C. and Muzzarelli, R.A.A. 2002. Natural and artificial chitosan-inorganic composites, *J. Inorganic Biochemistry*, 92, 89-94.
- Newton, T. 2006. The History of Chitosan, <http://ezinearticles.com/?The-History-Of-Chitosan&id=208039>. Erişim Tarihi: 26/10/2006.
- Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C. and Zou, X. 2004a. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles, *Carbohydrate Research*, 339, 2693-2700.
- Qi, L. and Xu, Z. 2004b. Lead sorption from aqueous solutions on chitosan nanoparticles, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspect*, 251, 183-190.

- Rao, M.S., Kanat, S.R., Chander, R. and Sharma, A. Dec 2005-Jan 2006. What makes radiation processed chitosan a novel food preservative, *Times Food Processing Journal*.
- Tang, E.S.K., Huang, M. and Lim, L.Y. 2003. Ultrasonication of chitosan and chitosan nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 201, 51-58.
- Tsaih, M.L., Bai, S.W. and Chen, R.H. 2008. Cavitation effects versus stretch effects resulted in different size and polydispersity of ionotropic gelation chitosan-sodium tripolyphosphate nanoparticle, *Carbohydrate Polymers*, 71, 448-457.
- Xiao, F., Ye, J., Wang, Y. and Rao, P. 2005. Deagglomeration of During the Precipitation Synthesis, *Journal of Materials Science*, 40, 5439 – 5442.
- Xu, Y.M. and Du, Y.M. 2002. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 250, 215-226.
- Zhi, J., Wang, Y.J. and Luo, G.S. 2005. Adsorption of diuretic furosemide onto chitosan nanoparticles prepared with a water-in-oil nanoemulsion system, *Reactive & Functional Polymers*, 65, 249-257.
- Zhi, J., Wang Y.J., Lu, Y.C, Ma, J.Y and Luo, G.S. 2006. In situ preparation of magnetic chitosan/Fe₃O₄ composite nanoparticles in tiny pools of water-in-oil microemulsion, *Reactive & Functional Polymers*, 66, 1552–1558.
- Zhang, H., Oh, M., Allen, C. and Kumacheva, E. 2004. Monodisperse chitosan nanoparticles for mucosal drug delivery, *Biomacromolecules*, 5, 2461-2468.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Yavuz GÖKÇE
Doğum Yeri : Kelkit – Gümüşhane
Doğum Tarihi : 02.02.1982
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

- **Lise** : Samsun Tülay Başaran Anadolu Lisesi (2000)
- **Lisans** : Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi (2004)
Kimya Mühendisliği Bölümü
- **Yüksek Lisans** : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (Eylül 2005-
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı Temmuz 2008)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl :

Ocak 2005 - Ekim 2005 : Engin Geri Kazanım Ltd. Şti., Ankara
Saha Sorumlusu ve Üretim Mühendisi
Ekim 2005 - Mart 2008 Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, “Nano Yapıdaki
Kitosan, Hidroksiapatit ve Kompozitlerinin Sentezi ve Parçacık
Karakterizasyonu”, 104M412 No.’lu TÜBİTAK Projesi
Mart 2007 - : Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Kimyasal Teknolojiler Anabilim Dalı Asistanı

Yayımları (SCI):

1. Cengiz B., Gökçe Y., Yıldız N., Aktaş Z., Çalıklı A., 2008. ‘Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite Nanoparticles’, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 322, 29-33.

Bildirileri:

1. Ulusal:

4. Gökçe Y., Cengiz B., Yıldız N., Aktaş Z., Çalıklı A., ‘The Use of Ultrasonication for the Synthesis of Ionically Cross-linked Ultrafine Chitosan Nanoparticles’, NanoTR IV Nanobilim ve Nanoteknoloji Konferansı, 9-13 Haziran 2008, İstanbul Teknik Üniversitesi (Poster Sunumu).
3. Gökçe Y., Cengiz B., Yıldız N., Aktaş Z., Çalıklı A., ‘Synthesis of Chitosan Nanoparticles’, NanoTR III Nanobilim ve Nanoteknoloji Konferansı, 11-14 Haziran 2007, Bilkent Üniversitesi (Sözlü Sunum).

2. Cengiz B., Gökçe Y., Yıldız N., Aktaş Z., Çalimli A., ‘Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite Nanoparticles’ Somer Symposium Series I, 14-15 Mayıs 2007, ODTÜ, Ankara (Poster Sunumu).
1. Cengiz B., Gökçe Y., Yıldız N., Aktaş Z., Çalimli A., ‘Synthesis of and Characterization of Hydroxyapatite Nanoparticles’ NanoTR II Nanoteknoloji Konferansı, 3-5 Mayıs 2006, ODTÜ, Ankara (Poster Sunumu).

2. Uluslararası:

1. Gökçe Y., Cengiz B., Yıldız N., Aktaş Z., Çalimli A., ‘Effects of Ultrasonication on the Chitosan Nanoparticles’, 8th International Conference of European Chitin Society, 8-11 Eylül 2007, Antalya (Poster Sunumu).

Projeleri:

1. ‘Nano Yapıdaki Kitosan, Hidroksiapatit ve Bunların Kompozitlerinin Sentezi ve Parçacık Karakterizasyonu’, 104M412 No.’lu TÜBİTAK Projesi, Eylül 2005 - Mart 2008.