

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

YEŞİL VE ÖLÇEKLENEBİLİR BİR YÖNTEM KULLANILARAK
KARRAGENAN KAPLI GÜMÜŞ NANOPARÇACIKLARIN SENTEZİ VE
KARAKTERİZASYONU

Mine KARAYEL

MAYIS 2020

Biyomühendislik Anabilim Dalında Mine KARAYEL tarafından hazırlanan **YEŞİL VE ÖLÇEKLENEBİLİR BİR YÖNTEM KULLANILARAK KARRAGENAN KAPLI GÜMÜŞ NANOPARÇACIKLARIN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU** adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Yüksek Lisans Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU
Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : Doç. Dr. Nuri ÜNLÜ _____
Üye (Danışman) : Prof Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU _____
Üye : Dr. Öğretim Üyesi Murat GÖKGÖZ _____

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

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. RECEP ÇALIN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

YEŞİL VE ÖLÇEKLENEBİLİR BİR YÖNTEM KULLANILARAK KARRAGENAN KAPLI GÜMÜŞ NANOPARÇACIKLARIN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU

KARAYEL, Mine

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU

Mayıs 2020, 66 Sayfa

Bu tez çalışmasında, geleneksel yöntemlere alternatif olarak yeni ve basit bir yöntem olan yeşil sentez metodu kullanılarak gümüş nanoparçacık sentezlenmesi hedeflenmiştir. Aynı zamanda, kullanılan gümüş konsantrasyonunun reaksiyona, elde edilen nanoparçacık büyüklüğüne ve dağılımına nasıl etki ettiği ve sudaki kararlılığını nasıl değiştirdiği incelenerek ileriki çalışmalarda potansiyel kullanımı değerlendirilmiştir. Yeşil bir yöntem ile farklı konsantrasyonlarda gümüş çözeltisi kullanılarak karragenan kaplı gümüş nanoparçacıklar (KA-AgNPs) elde edilmiştir. Çözeltideki karragenan miktarı sabit tutularak farklı derişimlerde gümüş çözeltisi içeren deney grupları oluşturulmuştur. 300-700 nm dalga boyunda karakteristik pikler görülmüş, böylece elde edilen KA-AgNPs'lerin varlığı öncelikle UV-Vis spektroskopisi ile kanıtlanmıştır. X-Ray difraksiyon analizi (XRD) ile herhangi bir safsızlık olmaksızın nanoparçacıklara ait kristalik yapı gösterilmiştir. Termogravimetrik analiz (TGA) ile KA-AgNPs'lerin sıcaklığa bağlı kütle değişimi incelenmiştir. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi analiziyle

AgNPs'lerin ile karragenan etkileşimi irdelenmiştir. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi görüntüleri ile parçacık ve boyut dağılımı gözlemlenmiş, artan gümüş derişimiyle parçacık boyutu küçüldüğü görülmüştür. Nanopartiküllerin enerji dağılımlı X ışını spektroskopisi (EDS) ile elemental dağılımı açıklanmış ve gümüş varlığı gösterilmiştir. Nanoparçacıkların tamamının zeta potansiyeli negatif çıkmış, aynı zamanda sudaki ve NaCl içeren ortamdaki kararlılıkları incelenmiştir. Elde edilen KA-AgNPs'lerin antimikrobiyal aktivitesi sıvı ve katı kültür yöntemleri ile ayrı ayrı incelenmiş ve her iki karakterizasyon testi ile kullanılan gram negatif *Escherichia coli* ve gram pozitif *Staphylococcus aureus* bakterileri türleri için antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Karragenan, gümüş nanoparçacık, yeşil yöntem, antimikrobiyal aktivite

ABSTRACT

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF CARRAGEENAN CAPPED SILVER NANOPARTICLES USING A GREEN AND SCALABLE METHOD

KARAYEL, Mine

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Bioengineering, Master Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU

May 2020, 66 pages

In this study, it is aimed to synthesize silver nanoparticle using green synthesis method which is a new and simple method as an alternative to traditional methods. At the same time, potential use of silver nanoparticle were evaluated for future studies by examining how the concentration of silver on syntnesis reaction, nanoparticle size and distribution and how it changes its stability in water. Carrageenan capped silver nanoparticles (CA-AgNPs) were obtained using a green sythesis method with different concentrations of silver solution. AgNPs were formed by keeping the amount of carrageenan in the solution and experimental groups containing different concentrations of silver solution. The characteristic peaks were emerged at about 300-700 nm wavelengths, so the presence of the AgNPs obtained was firstly proven by UV-Vis spectroscopy. The crystalline structure of the nanoparticles were shown with X-Ray diffraction analysis (XRD) without any impurities. Temparature dependent mass change of CA-AgNPs was investigated with thermogravimetric analysis (TGA). Interaction of carrageenan and AgNPs were examined by fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR) analysis. Particle and size distribution were observed with scanning electron microscopy (SEM) images,

and the particle size decreased with increasing silver concentration. The elemental distribution is explained by energy dispersive spectroscopy (EDS) and the presence of silver was shown. The zeta potential of all nanoparticles were negative, and their stability in water and NaCl solution was investigated. The antimicrobial activity of the nanoparticles were obtained with characterization tests for both liquid and solid culture methods and it was found that they have antibacterial activity for gram negative *Escherichia coli* and gram positive *Staphylococcus aureus* bacteria species.

Key Words: Carrageenan, silver nanoparticles, green method, antimicrobial activity



TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanması esnasında hiçbir yardımcı esirgemeyen, bana gerekli koşulları sağlayan ve destek olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa YIĞİTOĞLU'na, tez çalışmalarım esnasında, bilimsel konularda ve laboratuvar çalışmalarımda yardımcıyı gördüğüm hocalarım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Murat İNAL'a, Sayın Arř. Gör. Zehra GÜN GÖK'e ve Sayın Öğr. Gör. Ogün BOZKAYA'ya, tezimi hazırlamam esnasında yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarıma ve en çok da büyük fedakarlıklarla bana destek olan babam Adnan KARAYEL'e ve annem Elif KARAYEL'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	iix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Nanoparçacıklar (NPs)	1
1.1.1. NPs'lerin Uygulama Alanları	2
1.1.2. NPs'lerin Sentez Yöntemleri	3
1.1.2.1. Kimyasal Yöntem	4
1.1.2.2. Fiziksel Yöntem	5
1.1.2.3. Biyolojik Yöntem.....	5
1.1.2.4. Yeşil Yöntem Yaklaşımı	6
1.1.2.5. Top-Down Yaklaşımı.....	6
1.1.2.6. Bottom-up ya da Moleküler Nanoteknoloji Yaklaşımı	7
1.1.3. NPs'lerin Toksik Etkileri	7
1.2. AgNPs	9
1.2.1. AgNPs'lerin Kullanım Alanları	10
1.2.1.1. Medikal Uygulamalar	10

1.2.1.2. Kataliz	11
1.2.1.3. Elektronik	11
1.2.1.4. Tüketici Ürünleri	11
1.2.2. AgNPs'lerin Antimikrobiyal Aktivitesi	12
1.2.3. AgNPs'lerin Kullanımının Avantajları	13
1.2.4. AgNPs'lerin Kullanımının Dezavantajları	14
1.3. Karragenan	15
1.3.1. Karragenanın Özellikleri	17
1.3.1.1. Kimyasal Yapısı ve Karakteristiği	17
1.3.1.2. Karragenanın Biyolojik Aktivitesi	20
1.3.2. Karragenan Kaynakları	22
1.3.3. Karragenan Eldesi	22
1.3.4. Karragenanın Kullanım Alanları	24
2. MATERYAL VE YÖNTEM	28
2.1. Materyaller	28
2.2. Kullanılan Cihazlar	28
2.3. Yöntem	29
2.3.1. Karragenan Çözeltisinin Hazırlanması	29
2.3.2. Gümüş Nitrat (AgNO ₃) Çözeltisinin Hazırlanması	29
2.3.3. KA-AgNPs'lerin Sentezlenmesi	29
2.4. KA-AgNPs'lerin Karakterizasyonu	27
2.4.1. KA-AgNPs Oluşumunun Makroskopik Olarak Gözlemlenmesi	27
2.4.2. UV/Vis Spektrofotometre Analizi	27
2.4.3. XRD Analizi	28
2.4.4. SEM Analizi	28
2.4.5. FTIR Analizi	28
2.4.6. Zeta Potansiyeli Ölçümü	28

2.4.7. Termal Analizler	28
2.4.8. EDS Analizi	29
2.4.9. Stabilite Testi	29
2.5. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri.....	29
2.5.1. Agar Kuyucuk Difüzyon Testi.....	29
2.5.2. Sıvı Kültür Testi.....	30
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	32
3.1. Makroskopik Gözlem	32
3.2. UV-Vis Spektroskopisi Analizi.....	32
3.3. XRD Sonuçları	33
3.4. SEM Analizi	38
3.5. EDS Analizi.....	39
3.6. FTIR Analizi.....	41
3.7. Zeta Potansiyel Analizi	42
3.8. TGA Analizi	45
3.9. Stabilite Testi.....	47
3.10. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri.....	49
3.10.1. Agar Kuyucuk Difüzyon Testi.....	49
3.10.2. Sıvı Kültür Testi.....	51
4. SONUÇLAR	57
5. KAYNAKÇA	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. NPs'lerin kullanım alanları	3
1.2. NPs Sentez Yöntemleri	4
1.3. Top down ve bottom up yaklaşımı.....	7
1.4. NPs'lerin bazı toksik etkileri.....	8
1.5. NPs'lerin etkileşime girdiği organlar	9
1.6. AgNPs kullanım alanları	12
1.7. a) <i>Eucheuma denticulatum</i> - (spinosum-) ι -KA. b) <i>Kappaphycus alvarezii</i> - (cottonii-) κ -KA. c) <i>Gigartina rodula</i> - κ / λ -KA. d) <i>Chondrus crispus</i> - κ / λ -KA	16
1.8. κ -karragenanın fiziksel görünümü	17
1.9. Karragenan çeşitlerinin kimyasal yapısı	19
1.10. Karragenan eldesi.....	23
1.11. Karragenanın kullanım alanları.....	24
2.1. KA-AgNPs hazırlanması.....	27
2.2. Agar kuyucuk difüzyon testinin şematik görünümü	35
2.3. Sıvı kültür testi	31
3.1. KA-AgNPs oluşumunun makroskopik gözlenmesi ((a) 1 mM, (b) 5 mM, (c)10 mM).....	32
3.2. Farklı derişimlerde hazırlanan KA-AgNPs'lerin UV-Vis spektrumları	33
3.3. (a) Yalnızca KA ve (b) KA AgNPs'ye ait XRD verileri	34
3.4. KA ve farklı derişimlerde hazırlanan KA-AgNPs'lerin SEM görüntüleri (x5000 büyütme); (a) KA, (b) 1 mM KA-AgNPs, (c) 5 mM KA- AgNPs, (d) 10 mM KA-AgNPs.....	35
3.5. KA ve farklı derişimlerde hazırlanan KA-AgNPs'lerin SEM görüntüleri (x20000 büyütme); (a) KA, (b) 1 mM KA-AgNPs, (c) 5 mM KA- AgNPs, (d) 10 mM KA-AgNPs.....	36
3.6. Farklı derişimlerde hazırlanan KA-AgNPs'lerin ((a) 1 mM, (b) 5 mM, (c) 10 mM) EDS analiz sonuçları	37

3.7. Farklı derişimlerde hazırlanan KA-AgNPs'lerin ve yalnızca KA'nın FTIR spektrumları	39
3.8. Farklı derişimlerde hazırlanan KA-AgNPs'lerin zeta-potansiyel dağılımları ..	40
3.9. Farklı derişimlerde hazırlanan KA-AgNPs'lerin zeta-boyut dağılımları.....	41
3.10. (a) KA ve (b) KA-AgNPs'lerin TGA analiz sonuçları	43
3.11. Farklı derişimlerde hazırlanan KA-AgNPs'lerin farklı derişimlerde NaCl içerisindeki stabilite sonuçları	45
3.12. Farklı derişimlerde hazırlanan KA-AgNPs'lerin <i>S.aureus</i> ve <i>E.coli</i> bakterisi kullanılarak yapılan agar kuyucuk difüzyon testi sonuçları (SU: Steril su, A: Antibiyotik, 1 mM: 1 mM KA-AgNPs; 5 mM: 5 mM KA-AgNPs, 10 mM: 10 mM KA-AgNPs)	47
3.13. <i>S.aureus</i> bakterisi için yapılan sıvı ortamda antimikrobiyal test sonuçları.....	49
3.14. <i>E.coli</i> bakterisi için yapılan sıvı ortamda antimikrobiyal test sonuçları	49
3.15. <i>S. aureus</i> bakterisine ait optik yoğunluk ölçüm sonuçları ve katı besiyerine aktarılan örneğin agar görüntüleri.....	51
3.16. <i>E. coli</i> bakterisine ait optik yoğunluk ölçüm sonuçları ve katı besiyerine aktarılan örneğin agar görüntüleri	52

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Karragenanın genel yapısı.....	20
3.1. KA-AgNPs'lerin zeta potansiyel ve zeta boyut dağılımları.....	42
3.2. <i>E.coli</i> ve <i>S.aureus</i> 'a ait inhibisyon çapları.....	48



SİMGELER DİZİNİ

ι	Iota
κ	Kappa
λ	Lambda
μ	Mu
η	Nu
θ	The-ta

KISALTMALAR DİZİNİ

AFM	Atomic force microscopy
AgNO ₃	Gümüş nitrat
AgNPs	Gümüş nanoparçacık
Ca	Kalsiyum
CO ₂	Karbondioksit
Cs	Sezyum
D ünitesi	4-bağlantılı X-D galaktopiranoz
DA ünitesi	4-bağlantılı 3,6 anhidro-α-D-galaktopiranoz
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleikasit
<i>E.coli</i>	<i>Esherichia coli</i>
EDS	Energy Dispersive Spectroscopy
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
G ünitesi	β-D galaktopiranoz
g	Gram
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IC	Integrated circuit

JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
K	Potasyum
KA	Karragenan
KA-AgNPs	Karragenan kaplı gümüş nanoparçacık
KCl	Potasyum klorür
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram
KOH	Potasyum hidroksit
L	Litre
LB	Luria Broth
Li	Lityum
LPS	Lipopolisakkarit
M	Molar
MDR	Multi drug resistance
mg	Miligram
MHB	Müller Hinton Broth
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
μ g	Mikrogram
μ l	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
Na	Sodyum
NaOH	Sodyum hidroksit
NK	Negatif kontrol
nm	Nanometre
NPs	Nanoparçacık
OH ⁻	Hidroksil grubu
pH	Hidrojen derişiminin negatif logaritması
Rb	Rubidyum
RNA	Ribonükleikasit
ROS	Reaktif oksijen çeşitleri

Rpm	Revolutions per minute (devir/dakika)
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
S	Sülfür
SEM	Scanning electron microscopy
STM	Scanning tunneling microscopy
TEM	Transmission electron microscopy
TGA	Thermogravimetric analysis
UV	Ultraviyole
v/v	Hacim/hacim
w/v	Ağırlık/hacim
w/w	Ağırlık/ağırlık
XRD	X-Ray Diffraction
Z _{ort}	Hidrokinamik ap
ZP	Zeta potansiyeli

1. GİRİŞ

Nanoteknoloji, son yüzyılın en hızlı gelişen bilimsel alanlarından biri olarak kabul edilmektedir. Mühendislik alanındaki gelişimle birlikte biyosensörlerde, tıpta tanı ve tedavide NPs kullanımı yaygınlaşmıştır. Burada özellikle kimyasal, biyolojik ve optik özelliklerinden dolayı gümüş nanoparçacıklar dikkat çekmektedir (Deshmukh vd., 2019).

Karragenan; yapısında çapraz bağlanmaya uygun fonksiyonel gruplar bulunduran, negatif yüzey yüküne, yüksek biyoyoumluluğa sahip doğal, ucuz maliyetli ve çevre dostu bir polimerdir. İdeal fizikokimyasal özelliklerinden dolayı ilaç salımında, nanotaşıyıcılarda, doku yenilenmesinde ve gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Zia vd., 2017).

Kırmızı alglerden elde edilen karragenan, gümüş nanoparçacıklar ile etkileştirildiğinde hem indirgeyici hem de stabilize edici ajan olarak görev almaktadır. Diğer yandan, son yıllarda sentez sırasında karragenan kullanılmasıyla verimli ve çevre dostu bir yöntem olan yeşil yöntemin önemine dikkat çekilmektedir. Aynı zamanda bu yöntem ile biyoyoumlu ve stabil AgNPs'ler elde edilmektedir.

1.1. Nanoparçacıklar (NPs)

Malzemeler çok eski zamanlardan beri insanlar için büyük bir ilgi alanıdır. Birkaç milyon yıl önce, kayaların çıplak elle kırılması imkansızken şekillendirme yolları bulunmuş ve araç olarak kullanılmıştır. Halen de mutfaklarda ve laboratuvarlarda çeşitli biçimlerde kullanılmaktadır (Berlatsky vd., 2014). 5000-6000 yıl önce, bakır içeren bir kayanın ateşe konularak eritilmesiyle metal cevherleri, kılıçlardan süs eşyalarına kadar çeşitli alanlarda kullanılmıştır. Böylece taştan daha sert ve daha uzun süre kullanılan yeni malzemeler üretilebileceği görülmüştür. Teknolojinin gelişmesiyle metallerin ve metalurjinin gelişmesi de paralel ilerlemiştir (Murty vd., 2013).

Nanoteknolojinin keşfiyle birlikte nanoparçacıkların çeşitli alanlarda uygulamaları geliştirilmiştir. Yeni teknolojiler, üstün fiziksel, kimyasal ve mekanik özelliklere sahip yeni malzemeler bulunmasına yol açmıştır (Binns vd., 2010). Malzeme bilimi ve mühendisliği bize çok çeşitli malzemelerin var olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte termokimyasal-mekanik yöntemler kullanılarak bileşimin değiştirilmesi veya mikro-yapının değiştirilmesi ile malzeme çeşitleri genişletilmiştir. Sonuç olarak, mikroyapı mühendisliği ve çalışma yapı-özellik korelasyonu çok önemli hale gelmiştir (Ramsden vd., 2016). Atomik kuvvet mikroskobu ve elektron mikroskopisi gibi yüksek çözünürlüklü mikroskopi tekniklerinin de gelişmesiyle yapıların daha küçük alt birimleri anlaşılabilir ve buna yön verilmiştir (Kulkarni, 2015).

Nanoparçacık (NPs) kelimesi 100 nm'ye eşit ya da daha küçük parçacıkların adlandırılmasında kullanılmaktadır. NPs'ler büyük boyutlu materyallerden sertlik, mukavemet, süneklik, elastik modül, erime noktası, yoğunluk, termal iletkenlik, termal genişleme katsayısı gibi noktalarda farklılık göstermektedir (Mahalik, 2006). Örneğin; nanokristalin seramikler seramiklerle karşılaştırıldığında daha sert ve güçlüdür. Nano boyutlu metaller, akma dayanımlıdır (Drexler vd., 1986).

1.1.1. NPs'lerin Uygulama Alanları

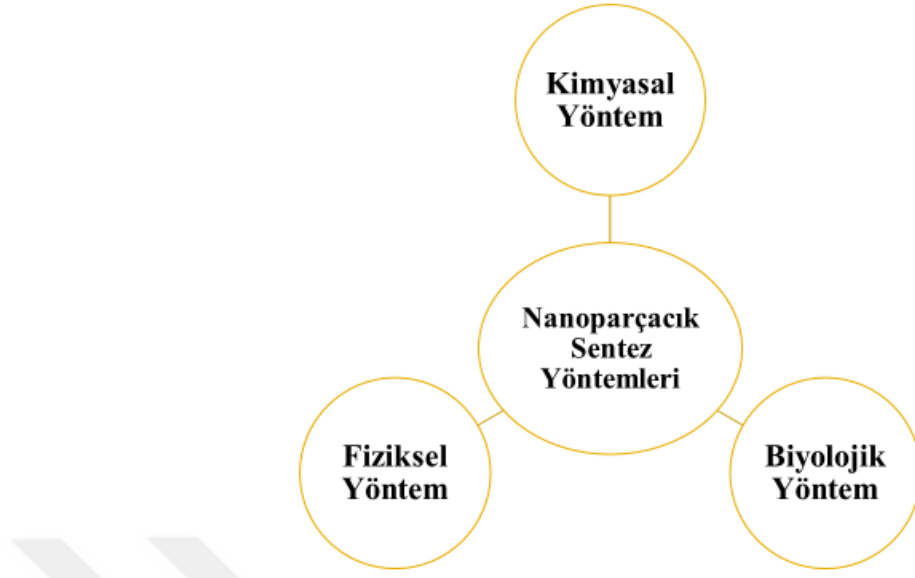
Nanomalzemeler benzersiz kimyasal, fiziksel ve mekanik özelliklere sahip olduğundan, dış macunundan uydulara kadar çok çeşitli uygulamalar için kullanılmaktadır. Nanoteknoloji bilimden mühendisliğe kadar neredeyse tüm alanlarda uygulama bulmaktadır. Tüketici dünyası "Nanoteknoloji ile geliştirilmiş" birçok ürün ile su altındaki canlılar hakkında dahi bilgiye sahip olmaktadır (Murty vd., 2013). Nanomalzemeler kozmetikte, tekstilde, sağlık alanlarında, doku mühendisliğinde, fonksiyonel kaplamalarda, tıbbi teşhis ürünlerinde ve terapötiklerde, sensörlerde, iletişim mühendisliğinde, su arıtımı ve hava kirliliğinin giderilmesi gibi birçok alanda uygulama bulmaktadır (Murty vd., 2013). Bu uygulamalardan bazıları aşağıda örneklendirilmiş ve Şekil 1.1'de şematize edilmiştir.



Şekil 1.1. NPs’lerin kullanım alanları

1.1.2. NPs’lerin Sentez Yöntemleri

NPs sentezlemek maksadıyla birçok yöntem ortaya koyulmuştur. Bu yöntemleri temel olarak üç kategoriye ayırmak mümkündür. Bunlar Şekil 1.2’de belirtildiği gibi; fiziksel sentez yöntemi, kimyasal sentez yöntemi ve biyolojik sentez yöntemidir. Bunların yanı sıra, son zamanlarda çevresel bilincin gelişmesiyle birlikte “Yeşil yöntem” adında bir yaklaşım da ortaya çıkmıştır. Diğer bir yaklaşım ise, “Top-down” ve “Bottom-up” yöntemidir (Daniel ve Astruc 2004; Swihart 2003).



Şekil 1.2. NPs Sentez Yöntemleri

1.1.2.1. Kimyasal Yöntem

Kimyasal indirgeme, su ya da organik çözücüler kullanılarak NPs sentezlenmesinde en sık uygulanan yöntemdir. Kendi içerisinde krişokimyasal sentez, lazer ablasyon, litografi, elektrokimyasal indirgeme, lazer ışını, sono ayrışma, termal ayrışma ve kimyasal indirgeme şeklinde sıralanabilmektedir. Çoğunlukla indirgeyici olarak borohidrid, sitrat, askorbat, elementer hidrojen, tio-gliserol ve 2-merkaptolanol kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda indirgeyici olarak borohidrit gibi güçlü indirgeyiciler kullanıldığında küçük parçacıklar elde edildiği, sitrat gibi daha zayıf bir indirgeyicinin kullanıldığında ise, boyut dağılımının farklı şekillerde olduğu bildirilmiştir (Ahmad vd., 2003). Genel olarak kimyasal yöntemler, yüksek hacimli çalışmalar için düşük maliyetlidir ancak öncül kimyasalların kullanılması nedeniyle kirlenmeye, tehlikeli yan ürünlerin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Bunların yanı sıra, üretilen partiküllerin yüzeylerinde kimyasallar tortulaştırıldığı için saflıkları da düşüktür (Thakkar vd., 2010).

1.1.2.2. Fiziksel Yöntem

Fiziksel yöntemlerde, kimyasal yöntemlerin aksine çevreye zarar veren toksik kimyasallar yerine buhar kondenzasyonu, yüksek enerjili bilyeli öğütme ve tavlama yöntemi, ark deşarj yöntemi, magnetron saçırma yöntemi kullanılmaktadır (Kholoud vd., 2010). Fiziksel yöntemlerde NPs'ler atmosfer basıncında bir tüp fırını kullanılarak buharlaştırma-yoğunlaştırma ile sentezlenmektedir. NPs sentezinde konvansiyonel kıvılcım deşarjı, aşındırma ve piroliz gibi fiziksel yöntemler kullanılabilir (Tien vd., 2008). Buna ek olarak, makro ölçekli veya mikro ölçekli parçacıkların boyutlarını küçültmek için öğütme de yapılabilir. Fiziksel yöntemlerin avantajları hızlı olması, indirgeyici ajan olarak radyasyon kullanılması, elde edilen parçacık boyutlarının birbirine yakın dağılımlı olması ve tehlikeli kimyasallar içermemesidir. Ancak düşük verim ve yüksek enerji tüketimi, solvent kontaminasyonu, parçacıkların içeriğinde yüksek enerji barındırması gibi olumsuz yanları vardır. Ayrıca bu yöntemler maliyet ve enerji kullanımı fazla olan yöntemlerdir (Asanithi vd., 2012).

1.1.2.3. Biyolojik Yöntem

Son yıllarda, NPs'lerin üretiminde çevre dostu süreçleri geliştirmek amacıyla toksik kimyasallar kullanmayan sentez yöntemleri geliştirilmektedir. Burada kimyasal ve fiziksel yöntemlere alternatif proteinler, karbonhidratlar, antioksidan maddeler, mikroorganizma, bitki veya bitki özütü kullanarak NPs sentezlenen yöntemler olan biyolojik yöntemler dikkat çekmektedir (Nair ve Pradeep, 2002). Diğer alternatif materyaller ise *Aloe vera*, deniz yosunları, çay, lotus çiçeği gibi bitkisel kaynaklı sistemlerdir. Biyolojik yöntemlerde temel mekanizma enzimatik ve enzimatik olmayan indirgeme şeklindedir. Bu yöntemde, özellikle bitkisel sistemlerin kullanılması en çevre dostu yöntem olarak kabul edilmektedir. Diğer süreçlerle karşılaştırıldığında, özellikle çevresel açıdan yarar sağlamaktadır (Shankar vd., 2004).

1.1.2.4. Yeşil Yöntem Yaklaşımı

Kimyasal yöntemlerin eksikliklerini gidermek için bir başka seçenek olan biyolojik yöntemler olarak ortaya çıkmıştır. Son zamanlarda, nanopartiküllerin biyolojik araçlarla sentezinin uygun maliyetli, güvenilir ve çevre dostu ve basit bir yöntem olduğu görülmüştür. Bakteri, mantar, bitki özleri, vitaminler ve amino asitler gibi küçük biyomoleküller dahil çeşitli biyolojik sistemler kullanılarak uygun büyüklükte NPs'lerin eldesinde kimyasal yöntemlere alternatif bir yöntem olarak biyolojik yöntemlerin kullanılabileceği gösterilmiştir. Birkaç çalışmada, yeşil yöntemle üretilen NPs'lerin, maliyeti düşük, toksik kimyasallar kullanılmayan etkili ve biyoyumlu olduğu bildirilmiştir. Yeşil kimya yaklaşımında, *Pseudomonas stutzeri* AG259, *Lactobacillus suşları*, *Bacillus licheniformis*, *E. coli*, *Brevibacterium casei* gibi bakteriler, *Fusarium oxysporum*, *Ganoderma neo-japonicum* gibi mantarlar, *Allophylus cobbe*, *Artemisia princeps* ve *Typha angustifolia* gibi bitki özütleri kullanılabilmektedir. Buna ek olarak biyopolimerler, nişasta, fibrinolitik enzim ve amino asitler gibi çeşitli biyomoleküller de kullanılabilmektedir. Nanopartiküllerin biyolojik sentezi, aşağıdakileri içeren üç faktöre bağlıdır: (a) çözücü; (b) indirgeyici ajan ve (c) toksik olmayan malzemelerdir. Biyolojik yöntemlerin en büyük avantajları sentezde amino asitlerin, proteinlerin veya ikincil metabolitlerin kullanılması, partikül agregasyonunun önlenmesi için gerekli ekstra adımın ortadan kaldırılması ve çevre dostu, kirlilik içermeyen biyolojik moleküllerin kullanımınıdır. Biyolojik yöntemlerle üretilen NPs'lerde partikül boyutu ve şekli kontrol edilebilmektedir. Bu sebeple bu yöntemle üretilen NPs'ler çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılabilmektedir. İndirgeyici ajan olarak bakteriyel protein veya bitki özütleri kullanmak NPs'lerin şeklini, boyutunu ve monodispersitesini kontrol etmeye de yardımcı olmaktadır. Biyolojik yöntemlerin diğer avantajları çok çeşitli biyolojik kaynakların mevcudiyeti, zamandan tasarruf, yüksek yoğunluk, stabilite ve hazırlanan NPs'lerin suda çözünürlüğüdür (Murty vd., 2013).

1.1.2.5. Top-Down Yaklaşımı

Bu teknikte mikro ve nano boyutta oyma yapılmaktadır. Burada, büyük boyutlu materyaller çeşitli yollarla oyularak, kazılarak ya da öğütülerek nano boyuta

getirilmektedir. Böyle materyaller nano boyuta getirildikçe farklı özellikleri ortaya çıkarılarak kuantum mekaniği ve fiziksel özellikleri modifiye edilmektedir (He vd., 2017).

1.1.2.6. Bottom-up ya da Moleküler Nanoteknoloji Yaklaşımı

Bu teknikte organik ya da inorganik yapılar atom-atom ya da molekül-molekül şekline getirilmektedir. Bu yapılar için sıklıkla “Kendi kendine birleşen” yapılar terimi kullanılmaktadır. Kendi kendine birleşebilen yapılara örnek olarak biyolojik sistemlerden DNA molekülü, karbon nanotüpler verilebilir. Ayrıca bu yöntem, top-down yaklaşımına göre daha ucuz maliyetli bir yöntemdir (He vd., 2017).

Top down ve bottom up yaklaşımları şematik olarak Şekil 1.3’te gösterilmiştir.



Şekil 1.3. Top down ve bottom up yaklaşımı

1.1.3. NPs’lerin Toksik Etkileri

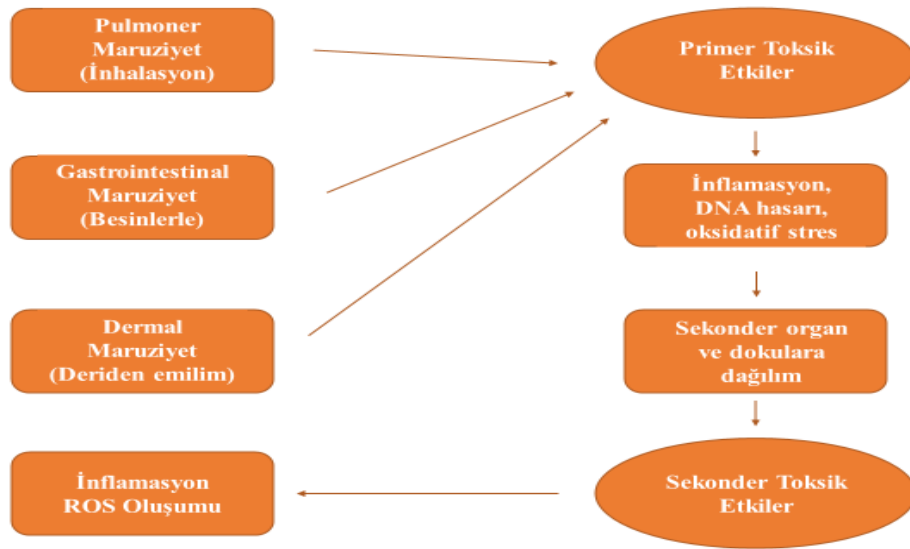
NPs’ler, hastalıkların teşhisinde, tedavisinde, medikal görüntülemelerde, ilaç salımında, gen terapide ve birçok endüstriyel uygulamada yer bulmasına karşın insan ve hayvan sağlığı üzerinde bazı olumsuz etkilere sahiptirler. Fakat toksik etkileri henüz kesin olarak anlaşılmamıştır. Bu etkilerin önüne geçmek ve çevresel etkileri azaltmak için gerekli önlemlerin alınması gerekmektedir (Kim vd., 2008).

Toksik etkinin anlaşılması maksadıyla çalışmalar yapılsa da bu çalışmalar klinik seviyede yetersiz olduğundan kesin bilgiler bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalardan

yola çıkıldığında, katyonik NPs'lerin küçük parçacık boyutundan dolayı dokularda ve hücrelerde penetre olmasına rağmen, hızla biyodegrede olduğu bildirilmiştir (Nel vd., 2006).

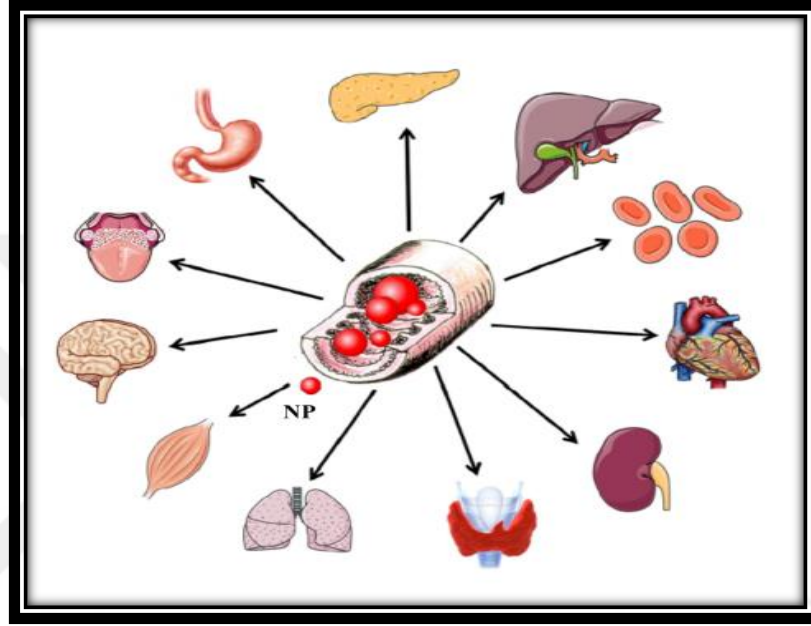
Katyonik NPs'lerin toksik etkisi az anlaşılmasına rağmen diğer NPs çeşitleriyle kullanıldığında toksik etkisinin nasıl olacağı bilinmemektedir. Diğer yandan insanlarda NPs kullanımına ilişkin toksik etkiler de henüz keşfedilmemiştir. Bazı NPs çeşitleri için yüksek pulmoner enflamatuvar cevaba sebep olduğu çalışmalarla gösterilmiştir. Dahası, birçok NPs oksidatif strese sebep olmakta ve yüzey alanı/parçacık oranı arttığından hücrel makromoleküllerle etkileşime girmektedir. NPs'lerin büyüklük ve yüzey özellikleri gibi diğer biyofiziksel özellikleri de dağılımı, birikimi, etki ettiği hücrel ve organ fonksiyonları üzerinde etki göstermektedir (Nel vd., 2006; Skebo vd., 2007; Wallace vd., 2007).

NPs'ler mide, enjeksiyon, solunum ve deri ile etkileşime girebilmekte ve çoğu kimyasal gibi farklı miktarda maruziyete bağlı olarak farklı organlar üzerinde toksik etki göstermektedir. Şekil 1.4'te olası toksik etkiler gösterilmiştir (Wided vd., 2012).



Şekil 1.4. Nanoparçacıkların bazı toksik etkileri

NPs'lerin farklı hedef organlarda potansiyel toksik etkileri farklı mekanizmalarla açıklanmaktadır. Şekil 1.5'te NPs'lerin etkileşime girdiği hedef organlar gösterilmiştir. Bu mekanizmalardan bazıları oksidatif stres, reaktif oksijen çeşitleri (ROS), DNA hasarı, protein yapıların değişimi, parçalanması, bozulması ve membran yapısındaki değişimlerdir (Asharani vd., 2009).



Şekil 1.5. Nanoparçacıkların etkileşime girdiği organlar (Goebel ve Muller, 1973)

NPs'lerin toksik etkisi dozuna, yapısına, boyut, yüzey alanı ve yüzey yükü gibi fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır. Fizikokimyasal özelliklerdeki değişimler NPs'lerin protein ve diğer hedefler ile etkileşimine etki etmekte ve bu da NPs'lerin organ sistemlerindeki yeri ve dağılımını değiştirmektedir. Buradan yola çıkıldığında NPs küçük boyutlu olduğundan dokuda daha fazla yayılımı olmakta ve aynı bileşenlerle üretilen büyük boyutlu parçacıklarla karşılaştırıldığında daha ciddi toksik etkiye sebep olmaktadır (Asharani vd., 2009; Foldbjerg vd., 2009; Liu vd., 2010).

1.2. AgNPs

Elementel AgNPs varlığı eski zamanlardan beri bilinmektedir. Örneğin; Ag^+ iyonlarının bakterisidal etkisi İsviçreli botanikçi K. Nägeli tarafından 19. yüzyılda

bulunmuştur. Bununla birlikte, 20. yüzyılın ikinci yarısında gümüşün antibakteriyel aktivitesi hakkında daha ayrıntılı çalışmalar yapılmıştır (Barber ve ark. 1990).

Teknolojideki gelişmelerle birlikte AgNPs'lerin antibakteriyel aktivite mekanizması incelenmiş, bu özelliğin bakteri hücrelerindeki morfolojik ve yapısal değişiklikler nedeniyle olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, bu etkinin derecesinin, AgNPs'lerin boyutuna ve şekline önemli ölçüde bağlı olduğu da belirlenmiştir. Diğer yandan, son on yılda birçok çalışmada, gümüş dahil olmak üzere elemental metal NPs'lerin etkisinin boyutu, morfolojisi, stabilitesi ve hem kimyasal hem de fiziksel özellikleri gibi parametrelere bağlı olduğu da anlaşılmıştır. Bu parametreler ise, doğrudan NPs'lerin spesifikasyonları ile ilgilidir. Bunları da metal iyonlarının indirgeyici ajanlarla etkileşimi, stabilize edici ajanlarla reaksiyonları etkilemektedir. Genel olarak, elde edilen AgNPs'nin şekli, boyutu ve dağılımının kontrolü, sentez yöntemi ile alakalıdır. AgNPs sentezi için koşulları değiştirerek, renk, erime noktası, manyetik özellikler, redoks potansiyeli de oldukça geniş bir aralıkta değiştirilip kontrol edilebilmektedir (Kora vd., 2012).

1.2.1. AgNPs'lerin Kullanım Alanları

1.2.1.1. Medikal Uygulamalar

Nano gümüşün tanı, tedavi, ilaç salımı gibi birçok tıbbi uygulaması vardır. Bunların yanı sıra cerrahi, anesteziyoloji, kardiyoloji ve üroloji alanlarında kullanılan tıbbi araç ve malzemelerin kaplanması da kullanılmaktadır. Aynı zamanda yara örtüleri, doku iskeleleri, hastanelerde sterilizasyon malzemeleri, tıbbi tekstiller ve tıbbi kateterler de buna dahildir. AgNPs diş hekimliğinde yapay dişlerde, kontakt lenslerin bakımında kullanılmaktadır. Gümüş, kanser tedavisinde de olası uygulamalara sahiptir (Murty, 2013).

1.2.1.2. Kataliz

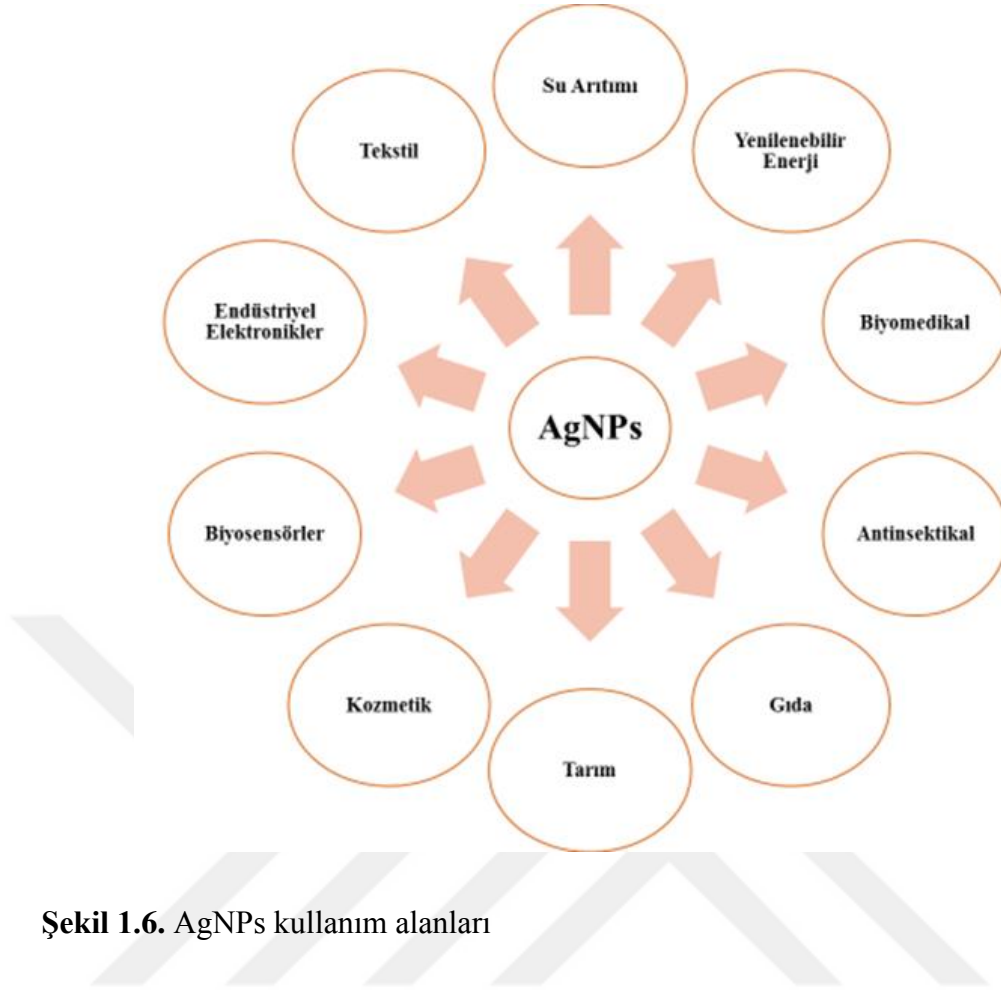
Gümüş nano materyaller büyük yüzey alanı/hacim oranından dolayı yüksek yüzey enerjisi sağlamaktadır. Bu da CO-oksidasyonu, p-nitrofenolün p-aminofenole indirgenmesi gibi endüstriyel işlemlerde gümüş nano malzemelerinin ve gümüş nano kompozitlerin kullanılmasına öncülük etmektedir (Murty, 2013).

1.2.1.3. Elektronik

Nano gümüşün yüksek elektriksel ve termal iletkenliği ile gelişmiş optik özellikleri elektronikteki çeşitli uygulamalarda dikkat çekmektedir. Nano gümüş, gümüş nanotellerde, nano-elektronik cihazların tasarlanmasında, elektronik ekipmanlarda, nano konnektörlerde ve nano elektrotların imalatında kullanılır. Diğer uygulamaları arasında veri depolama cihazları, doğrusal olmayan optikler, entegre devreler (IC), entegre kapasitörler ve optoelektronikler bulunmaktadır (Murty, 2013).

1.2.1.4. Tüketici Ürünleri

AgNPs'ler, spreyler, çoraplar, yastıklar, terlikler, yüz maskeleri, ıslak mendiller, deterjan, sabun, şampuan, diş macunu, plastik ürünler, hava filtreleri, buzdolabı kaplamaları, elektrik süpürgeleri, çamaşır makineleri, gıda depolama kapları, cep telefonları gibi birçok alanda dikkat çekmektedir. Bugüne kadar, nano gümüş teknolojileri çeşitli üretim süreçlerinde ve son ürünlerde yaygın olarak kullanılmıştır. Nano gümüş, kolloid (kaplama ve sprey) gibi sıvı bir formda kullanılabilir veya bir şampuan (sıvı) içinde de yer alabilir. Ayrıca polimer sabunu gibi bir katıya gömülü olarak da görülebilmektedir. Nano gümüş, tekstil endüstrisinde lif içine (bükülmüş) dahil edilerek veya su arıtma sistemlerinin filtrasyon membranlarında kullanılabilir (Murty, 2013). Şekil 1.6'da AgNPs kullanım alanları şematize edilmiştir.



Şekil 1.6. AgNPs kullanım alanları

1.2.2. AgNPs'lerin Antimikrobiyal Aktivitesi

Gümüşün bakteriler üzerinde toksik etkiye sahip olduğu bilinmekte ve tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır. Nanoteknolojinin gelişmesiyle birlikte optik, biyoloji ve kimyasal özelliklerinin daha iyi olmasından dolayı bunun yerini AgNPs'ler almıştır (Yuan vd., 2017). AgNPs'lerin tıpta kullanımında ise özellikle bakteriler üzerindeki etkisi önem arz etmektedir. AgNPs'ler bakteriyel membran ile etkileşime girdiğinde membran hasarı gibi bazı fiziksel değişimler meydana gelmekte, böylece hücre duvarından bakteri içerisine parçacık geçişi olmaktadır. NPs'ler geniş yüzey alanına sahip olduğundan, hücre içerisinde rahatlıkla ilerleyebilmekte ve sitoplazmaya ulaşabilmektedir. Burada NPs'ler protein, lipid ve DNA gibi biyomoleküllerle penetre olmaktadır (Van Der Wal vd., 1997). AgNPs'lerin ribozom ile etkileşmesi sonucu protein sentezi durmakta, biyomoleküllerin hasar görmesiyle bakteri temel fonksiyonlarını yerine getirememekte ve ölmektedir (Abbaszadegan vd., 2015; Mandal vd., 2016).

Tetrasiklin ve streptomisin gibi geleneksel antibiyotikler bakteriyel enfeksiyonları inhibe etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu antibakteriyel ajanlar ilaca dirençli türleri inhibe etme konusunda yetersizdir. Bunun nedeni, bu tür bakterilerin antibiyotik moleküllerinin biyosidal etkisine karşı daha dirençli hale gelmesidir. Bu nedenle, ilaca dirençli bakterileri hedefleyen biyomalzemeler geliştirmek gerekmektedir. Bu bağlamda, geniş yüzey alanlarına sahip AgNPs'lerin kullanımı bakterilerle etkileşim için daha iyi bir temas sağlayabilmektedir. Ayrıca AgNP'lerin hem gram negatif hem de gram pozitif bakteri suşlarını yok etmekte etkili olduğu bildirilmiştir (Nowack vd., 2011). Bununla birlikte, AgNPs'ler gram negatif bakteri suşlarının yok edilmesinde daha etkilidir. Bunun sebebi gram-pozitif bakterilerin bir sitoplazmik membranı ve birkaç peptidoglikan katmanından (20-80 nm) oluşan kalın hücre duvarına sahip olmasıdır. Gram negatif bakteriler ise, harici bir lipopolisakkarit (LPS) tabakasına, ince bir peptidoglikan tabakasına ve en içte plazma zarına sahiptir. AgNPs'ler ayrıca bakterilerin savunma mekanizmalarına müdahale ederek çoklu ilaç direncini (MDR) ortadan kaldırmaktadır. AgNPs'ler tek başına veya antibiyotiklerle birlikte kullanılabilirler: Gurunathan vd. (2018) sentezledikleri AgNPs'leri MDR bakterileri *Prevotella melaninogenica* ve *Arcanobacterium pyogenes*'in öldürülmesinde kullanmıştır. Katva vd. (2018) AgNPs'lerin gentamisin ve kloramfenikol ile birlikte kullanıldığında birçok antibiyotiğe karşı dirençli bir MDR bakterisi olan *Enterococcus faecalis*'e karşı iki antibiyotiğin tek başına kullanımına göre daha çok etki ettiğini bildirmişlerdir. AgNPs'lerin antibakteriyel aktivitesinin şekil, boyut, yük ve doza bağlı olduğu da bildirilmiştir. Xia vd. (2012) bunu göstermek amacıyla, farklı tuz kombinasyonları kullanılarak kontrollü şekillerde ve boyutlarda bir dizi Ag nanokristali sentezlemişlerdir. Son çalışmalarda, Hosseinidoust vd. (2016) toksik kimyasallar kullanmadan üçgen, altıgen ve dendritik şekillere sahip kolloidal olarak kararlı AgNPs'lerin sentezlendiği tek potlu yeşil bir sentez yöntemi bildirmişlerdir.

1.2.3. AgNPs'lerin Kullanımının Avantajları

AgNPs'ler birçok uygulama alanında kullanılmaktadır, çünkü makro ölçekli benzerlerine kıyasla benzersiz fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri sahiptir.

AgNPs'ler, yüksek elektriksel ve termal iletkenlik, yüzey zenginleştirilmiş Raman saçılması, kimyasal kararlılık, katalitik aktivite ve optik davranış gibi ayırt edici fizikokimyasal özelliklere sahiptir. Aynı zamanda nanometre ölçeğinde gümüş, büyük yüzey alanı/ hacim oranına sahip olduğundan yüksek antimikrobiyal özelliği sahiptir. Bu sebeple, nano gümüşün en güçlü kullanımlarından biri bakteri, mantar ve virüsler için toksik olan antimikrobiyal ajan olarak kullanımınıdır. Geniş yüzey alanı, aynı kimyasal bileşimin daha büyük parçacıklarına kıyasla tipik olarak daha büyük biyolojik aktivite, kimyasal reaktivite ve katalitik davranış anlamına gelmektedir (Sharma vd., 2012).

Geçmiş yıllara bakıldığında nano gümüş aslında yeni bir keşif değildir; 100 yılı aşkın bir süredir bilinmektedir ve o yıllarda genellikle nano gümüş süspansiyonları koloidal gümüş olarak adlandırılmaktadır. Penisilin icadından önce, yani 1928'li yıllarda, birçok enfeksiyon ve hastalığı tedavi etmek için koloidal gümüş kullanılmıştır. Daha sonra dökme gümüşün, nano boyutta gümüşe dönüştürülerek bakterileri ve virüsleri kontrol etme etkinliği çalışılmış, sonuçta yüzey/hacim oranı artmış, böylece bakteri ve mantarlarla temas alanı da artırılmış olduğundan etkinliğinin arttığı da görülmüştür (Turkevich vd., 1951). Turkevich vd. (1951) gümüş iyonu kaynağı olarak gümüş nitrat ve ilk kez indirgeyici ajan olarak sodyum-sitrat kullanarak nano gümüş sentezlemek için ıslak bir kimya tekniği rapor etmiştir.

1.2.4. AgNPs'lerin Kullanımının Dezavantajları

AgNPs'ler tekstil, gıda, paketlenme, çamaşır makineleri, elektronik, plastik, vb. gibi çeşitli tüketici ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Frattini vd., 2005; Lorenz vd., 2011; Walser vd., 2011; Blaser vd., 2008). Bilim ve teknoloji gelişip ilerledikçe, çevre ve ekolojik sistemlerde doğal dengede sapma meydana geldiği için büyük risk faktörleri vardır. Bazı nano-üretim yöntemleri toksik hammaddeler kullanılmakta veya toksik yan ürünler çıkmaktadır. Bu noktada mühendislik ürünü nano malzemelerin ne kadar zarar verebileceğinin, etki çeşitlerinin araştırılması gerekmektedir. Nanoteknolojinin güvenli kullanımı için kullanılan malzemelerin risk

değerlendirmesi yapılmalı, güvenlik sınırları değerlendirilmelidir (Gaillet ve Rouanet, 2014).

AgNPs'ler, sentez sırasında, endüstriyel üretimde, ürünlerinin kullanımında çevreye zarar verebilme olasılığına sahiptir. İnsan vücuduna ise; bitkiler, hayvanlar, balıklar atık sular ve gıdalar yardımı ile nüfuz etmesi mümkündür. Özellikle gıda paketlemesinde kullanımı yüksek risk içermektedir (Simon vd., 2008). Parçacıkların büyük ölçekli üretimi ve kullanımında önemli bir kısmının atık sulara karışma olasılığı vardır. Bu noktada AgNPs'lerin doğal çevreye katılmasını önlemek için su arıtımı sırasında ayrılması ve bunun nasıl yapılması gerektiği üzerinde durulmalıdır. Aksi takdirde suların tarım arazilerinde uygulanması sırasında bazı tehlikeler meydana gelebilmektedir. Bu gibi bir durumun engellenmemesi sonucu parçacıkların yüzey sularına salınma olasılığı mevcuttur (Griffitt vd., 2009).

Sentetik NPs'lerin artan kullanımı nedeniyle, bu tür parçacıkların konsantrasyonunun çevre ortamında, yani toprak, su ve havada gelecekte artması beklenmektedir. Benzer şekilde doğal olarak oluşan NPs'lerinde de şekilsel, bileşimsel ve büyüklük olarak değişmesi söz konusudur. Ayrıca kasten olumsuz özelliklere sahip NPs'lerin üretilmesi de olasıdır (Karn vd., 2009; Gao vd., 2009).

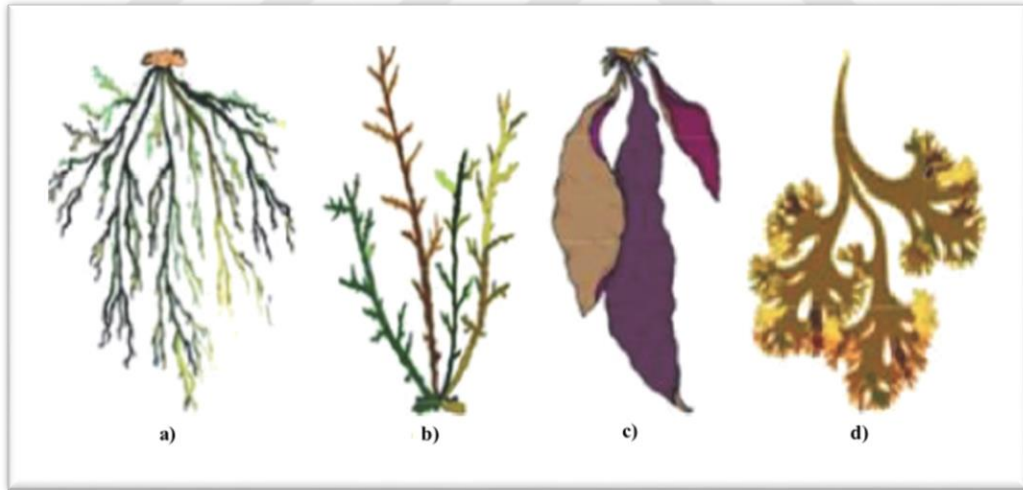
1.3. Karragenan

Algler, fotosentez yeteneğine sahip organizmalardır. İki temel çeşit alg bulunmaktadır. Bunlar; mikroalgler ve makro alglerdir (deniz yosunları). Mikroalgler, küçük boyutlu, plankton gibi deniz kıyılarında ve diplerinde bulunan alg çeşitleridir (M.R. Hasan vd., 2009). Deniz yosunları ise, çok hücreli fotosentetik mikroorganizmalardır ve biyokimyasal ürünler ya da biyoyakıt üretimi için kullanılan, tamamıyla ürüne dönüşebilen ya da üretilen ürünün bir kısmında kullanılan biyokütle kaynaklarıdır (Jung vd., 2013). Algal biyokütle, yüksek miktarda karbonhidrat, düşük miktarda lignin içermesi, karbondioksit fiksasyonu için potansiyel oluşturma, yüksek fotosentetik üretkenlik, yüksek büyüme hızı gibi

özelliklerinden dolayı mükemmel bir yenilenebilir enerji kaynağı adayıdır (Drosg vd., 2015; Matsumoto vd., 2003).

Deniz yosunu algler, hücre duvarında, depolarında yüksek miktarda polisakkarite ve mikopolisakkarite sahiptir (Murata vd., 2001). Algal polisakkaritler, diğer organizmalarda bulunmayan kimyasal bileşimlerin fazla miktarda bulundurması ve sürdürülebilirliği açısından dikkat çekmektedir. Bu polisakkaritler, karragenan gibi kırmızı, aljinat gibi kahverengi, ulvan gibi yeşil deniz yosunlarından oluşan geniş bir yelpazeye sahiptir (Kraan vd., 2012).

Karragenan çeşitleri, Rhodophyta türleri olan; *Gigartina*, *Chondrus crispus*, *Eucheuma* ve *Hypnea*'dan elde edilmektedir. Bu çeşitler Şekil 1.7'de gösterilmiştir. Farklı kaynaklardan elde edilen karragenan polimerleri altı temel forma ayrılmaktadır. Bunlar; iota (ι), kappa (κ), lambda (λ), mu (μ), nu (η) ve the-ta (θ) karragenandır. Bu gruplar kimyasal sınıflandırmalarına ve üretimlerine göre isimlendirilmektedir (Stanley,1987).



Şekil 1.7. a) *Eucheuma denticulatum*- (spinosum-) ι -KA. b) *Kappaphycus alvarezii*- (cottonii-) κ -KA. c) *Gigartina rodula*- κ / λ -KA. d) *Chondrus crispus*- κ / λ -KA (Stanley vd., 1987; Anderson vd., 1969).

κ -karragenan, *Kappaphycus alvarezii* adlı tropikal deniz yosunundan elde edilmektedir ve Şekil 1.8'de gösterilmiştir (Rudolph, 2000). *Eucheuma denticulatum* ise ι -karragenan elde etmek için kullanılan temel kaynaktır. κ ve ι -karragenan formu,

deniz yosunlarının genellikle yüksek sıcaklıkta alkali ile muamelesinden edilerek biyolojik prekürsörler olan μ ve η -karragenan formunun dönüştürülmesiyle elde edilmektedir. λ -karragenan ise, *Gigartina* ve *Chondrus*'un farklı türlerinden elde edilmektedir. Ayrıca deniz yosunlarının sporofit bitkileri λ -karragenan üretirken, gametofit bitkileri α , κ/ι -hibrit karragenan çeşidini üretmektedir. κ/ι -hibrit karragenan çeşidi, kappa 2-karragenan ya da κ ve ι ünitelerini içeren “zayıf jelleşme özelliğine sahip karragenan” olarak bilinmektedir (McCandless vd., 1982).



Şekil 1.8. κ -karragenanın fiziksel görünümü

1.3.1. Karragenanın Özellikleri

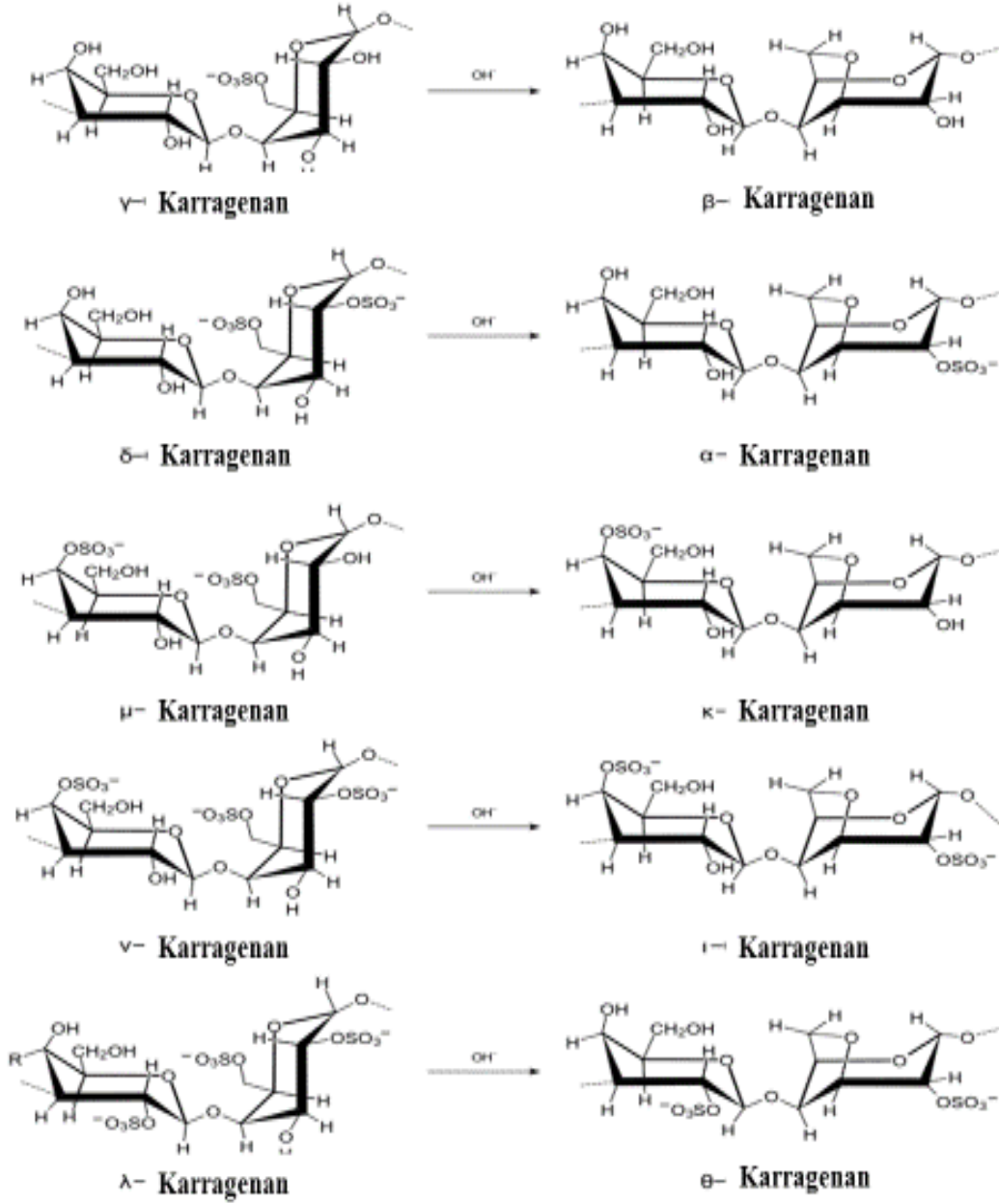
1.3.1.1. Kimyasal Yapısı ve Karakteristiği

Karragenanlar, hidrofilik doğrusal sülfatlanmış galaktanlar grubunda bulunan bir polisakkarittir. Genellikle 3- β -D galaktopiranoz (G ünitesi) ve 4-X-D galaktopiranoz (D ünitesi) ya da 4-bağlantılı 3,6 anhidro- α -D-galaktopiranozdan (DA ünitesi) oluşmakta ve tekrar eden disakkarit karragenan üniteleri içermektedir (Knutsen vd., 1994). Sülfatlanmış galaktanlar, 3,6-anhidro-köprüsü üzerindeki 4-bağlantılı galaktoz rezidüleri, sülfat gruplarının pozisyonu ve bu grupların sayısına göre sınıflandırılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan karragenanlar, genellikle 100-1000 kDa arasında kütleyle sahiptir. Galaktoz ve sülfatın yanı sıra, ksiloz, glikoz ve üronik

asit gibi diğer karbonhidrat rezidüleri de karragenan üretiminde kullanılabilir (Van de Velde vd., 2002).

κ - ι - ve λ -karragenan dimerleri bir, iki ve üç sülfat ester grubuna sahiptir ve sırayla %20, %33 ve %41 (w/w) sülfat içermektedir. Benzer olarak κ -karragenan %22 (w/w), ι -karragenan %32(w/w), λ -karragenan %38(w/w) sülfat içermektedir. Sonuçta, her doğal karragenan kompleks galaktoz temelli bir polisakkarittir ve farklı miktarlarda sülfat ester içermekle birlikte, farklı miktarlarda, dağılımlarda, pozisyonlarda tekrar eden disakkarit ünitelerinden oluşmaktadır (Van de Velde vd., 2002; Rochas vd., 1986; Knutsen vd., 2002). Bazı karragenan çeşitleri ek gruplar içermektedir. Bunlardan en yaygını, D ünitesinin 6. Pozisyonunda bulunan *O*-metil grubudur ve *Kappaphycus alvarezii*'den elde edilen κ -karragenanda bulunmaktadır. Çok düşük miktarlarda terminal ksiloz da vardır fakat yeri henüz kesin olarak belirlenmemiştir (Chiovitti vd., 1998).

Bütün karragenan çeşitleri suda çözünür, inorganik çözücülerde, yağlarda çözünmez formdadır. Suda çözünürlüğe etkiyen faktör sülfat gruplarının varlığı ve üzerinde bağlı olan katyonlardır. Karragenanda bulunan temel katyonlar; sodyum, potasyum, kalsiyum ve magnezyumdur. Fakat düşük miktarlarda da olsa diğer iyonlar da bulunmaktadır. Sülfat fraksiyonları ve sulu çözeltilerde dengede bulunan katyonlar, çözeltilinin viskozitesi, jelleşme kuvveti, gıda ve farmasötik alanda jelleştirici, kalınlaştırıcı ve stabilize edici olarak kullanılabilmesine ilişkin bilgi vermektedir (Pardonche, 1985).



Şekil 1.9. Karragenan çeşitlerinin kimyasal yapısı (Barbeyron vd., 2000).

κ-karragenan genellikle %25-30 oranında ester sülfat grupları içermekle birlikte %28-35 arası D-galaktoz ve 3,6-anhidro-galaktoz(3,6-AG) gruplarının α-1,3 ve β-1,4-glikozidik bağlarına katılmasından oluşmaktadır. Bu grupların varlığı karragenana güçlü jelleşme özelliği vermektedir. Lambda karragenan ise, %32-39 arası ester grubu içermekle birlikte 3,6-AG grubu içermemektedir.

Çizelge 1.1. Karragenanın genel yapısı

Kimyasal Yapısı	α -D-1,3 ve β -D-1,4 galaktoz rezidüleri sülfat bağı ile bağlanmış ve koloidal bir yapı oluşturmuştur. Bu yapı, normal pH (Tuz çözeltisi) şartlarında negatif yüke sahiptir.
Kaynakları	Kırmızı deniz yosunu çeşitleri olan, <i>Gigartina</i> , <i>Chondrus crispus</i> , <i>Eucheuma</i> ve <i>Kappaphycus alvarezii</i> 'den elde edilmektedir.
Molekül Ağırlığı	Genellikle 100-1000 kDa arasındadır.
Çözünürlük	λ -karragenan sıcak ya da soğuk çözeltilerde çözünür. κ -karragenan yalnızca sıcak çözeltilerde çözünür.
Jelleşme Özelliği	λ -karragenan jel özellik göstermez. κ -karragenan KCl çözeltisi jelleşme özelliğini artırır. ι -karragenan Ca^{+2} çözeltisi jelleşme özelliğini artırır.
Metabolizması	Düşük pH koşullarında (Özellikle <3.0) yapısında bulunan glikozidik bağlar hidrolize uğrar. Aynı zamanda sülfat bağları da bozulur.
Viskozitesi	Çözelti konsantrasyonu arttıkça viskozite logaritmik olarak artar.
Başlıca Kullanım Alanları	Süt ürünleri, işlenmiş et ve et ürünleri, diyet gıdalar, yenidoğan gıdaları, diş macunu, kozmetik, pestisitler, laktasifler.

1.3.1.2. Karragenanın Biyolojik Aktivitesi

Deniz alglerinden elde edilen sülfatlanmış polisakkaritler immünomodülatör, antikoagülant, antitrombotik, antiviral ve antitümör ajan olarak kullanılmaktadır (Morris Christopher,2003).

Bütün karragenan çeşitlerinin tümör hücreleri üzerindeki aktivitesi de bilinmektedir. Lambda karragenan yüksek antioksidan aktivite göstermektedir. Aynı zamanda anti oksidan aktivite ile sülfat bağları arasında doğrudan ilişki vardır. Yapılan çalışmalarda karragenanın kolesterol üzerinde de olumlu etkileri olduğu görülmüştür.

Kandaki kolesterol ve lipit seviyesini düşürdüğü gözlemlenmiştir. Karragenanlar enflamasyon ve enflamasyonun sebep olduğu ağrılar üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda da kullanılmaktadır. Antikoagülant aktivite, antihiperlipidemik aktivite, antitümör aktivite gibi çeşitli farmasötik özellikleri de bulunmaktadır. Birkaç *in-vitro* çalışmada ise herpes ve hepatit A virüsüne karşı antiviral aktivitesi olduğu da bildirilmiştir (Caceres vd., 2000).

Karragenanın, seksüel olarak taşınan insan papillomavirüsü gibi hastalıklarda da güçlü bir inhibitör olduğu gözlemlenmiştir. Diğer yandan, yine insan papillomavirüsünün transmisyonunu engellemek maksadıyla karragenan temelli jeller de kullanılmaktadır (Carlucci vd., 1999).

Tobacman ve diğerlerinin yaptığı son çalışmada, vücuda karragenan alındıktan sonra, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında insan intestinal epitelyal hücrelerinde hücre ölümü, hücre proliferasyonunda azalma ve hücre siklusunda blok meydana geldiği görülmüştür. Bu verilere göre, karragenanın gıda katkı maddesi olarak geniş çaplı kullanımı göz önüne alınmalıdır (Tobacman vd., (2001).

κ , ι ve λ karragenanın antioksidan aktivesi olduğu da yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. λ -karragenanın serbest radikalleri yok ettiği ve yüksek antioksidan aktivite gösterdiği, bu özelliğin de sülfat gruplarıyla alakalı olduğu bildirilmiştir. Bazı karragenan çeşitlerinin maktofaj aktivasyonuna etki ettiği de yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Gıdalara karragenan katılmasıyla kanda kolesterol ve yağ seviyesinde düşüş gözlemlenmiştir (JECFA, 2007).

Karragenanın gıda katkı maddesi olarak kullanımı 57. JECFA-Avrupa Ülkeleri Ortak Gıda ve Tarım Organizasyonu/Dünya Sağlık Örgütü Gıda Katkı Maddesi Uzman Komitesi Toplantısında görüşülmüştür. JECFA'ya göre, yalnızca indirgenmiş karragenanlar olumsuz etki yaratmakta ve gıda katkı maddesi olarak kullanılmaması önerilmektedir (JECFA, 2007).

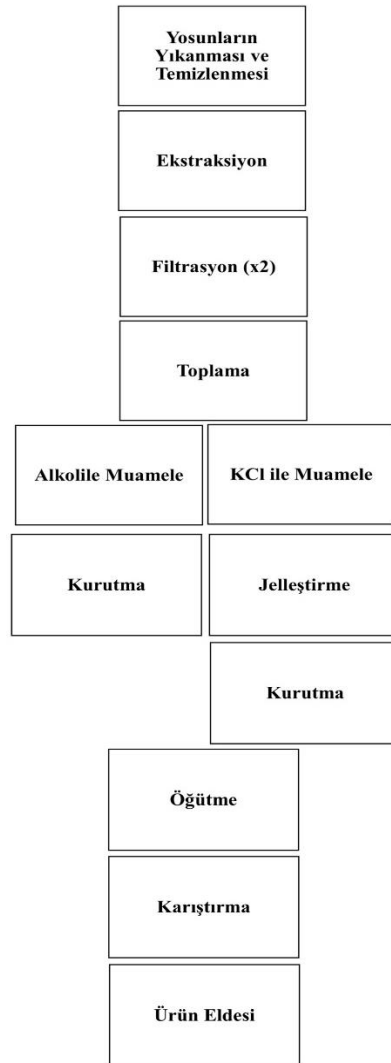
1.3.2. Karragenan Kaynakları

Karragenan ismi, M.S. 400 yıllarında İrlanda'da doğmuştur. İlk karragenan çeşidi medikal amaçla kullanılan Irish moss deniz yosunundan elde edilmiştir. II. Dünya Savaşı sırasında özellikle gıda endüstrisinde *Chondus crispus* ve *Gigartina* deniz yosunları doğal besin kaynağı olmuştur. *Chondus crispus* çeşidi, doğal olarak Kanada, İrlanda, Fransa, İspanya ve Portekiz'de yetişmekte, *Gigartina* yatakları ise Güney Afrika ve Güney Avrupa'da bulunmaktadır (Valderrama vd., 2013). 1940'larda özellikle Kanada'da bulunan karragenan yatakları ülkeyi dünyanın en büyük karragenan üreticisi konumuna getirmiş ve bu yaklaşık 30 yıl sürmüştür (Loureiro vd., 2017; Loureiro vd., 2017). Fakat, *Eucheuma* türleri gibi alternatif karragenan çeşitlerinin Filipinler'de bulunmasıyla birlikte yüksek miktarda üretim amacıyla çiftlikler kurulmuş ve en büyük üretici ünvanı Filipinler'e geçmiştir. 20 yıl sonra, *Kappaphycus* ve *Eucheuma* deniz yosunlarından karragenan elde eden Endonezya Filipinler'in yerini almıştır. (Hurtado vd., 2015; Valderrama vd., 2013). Şu an, dünyada karragenan üretiminin neredeyse %90'ı bu çeşitlerden elde edilmekte ve bunlar özellikle Doğu-Güney Asya, Pasifik Adaları, Doğu Afrika, Güney Amerika'da üretilmektedir. Dünyada karragenan üretiminin git gide artmasıyla birlikte gelecek açısından sürdürülebilir endüstriyel üretim desteklenmektedir (Hayashi vd., 2017; Kim vd., 2017).

1.3.3. Karragenan Eldesi

Temel üç karragenan çeşidinin elde edilmesinde benzer prosesler kullanılmaktadır. Proses, safsızlıkların giderilmesi, karragenan ve diğer materyallerin sulu ortamdan ayrılması ve kurutulması aşamalarından oluşmaktadır. Karragenan elde edilmesi aşamaları Şekil 1.10'da verilmiştir. κ-karragenan elde etmek için, *Eucheuma*, *Chondrus*, *Hypnea*, *Iridaea* ve *Furcellaria* çeşitleri kullanılmaktadır (McHugh, 2003; Prajapati vd., 2014). Bu çeşitler kullanıldığında, kurutulmuş deniz yosunu istenmeyen materyallerin ayrılması için kurutulmakta ve diğer bütün partiküllerin ayrılması için KOH, NaOH gibi solüsyonlar kullanılarak sıcak alkali ile muamele edilmektedir. Aynı zamanda bu işlem ile 3,6-AG miktarı arttırılmakta, böylece jelleşme özelliği de arttırılmaktadır. Karragenan sulu formdan bulamaç haline gelene

kadar kaynatılmakta, soğuyup jelleşmeden önce evaporasyon ile hacmi azaltılmaktadır. Daha sonra jelleşen karragenan kurutulmakta ve toz haline getirilmektedir. *Eucheuma* ve *Furcellaria* çeşitleri için de aynı basamaklar tekrarlanmakta fakat presipitasyon için KCl kullanılmaktadır (Stanley, 1987). Sonrasında sıcak su ekstraksiyonu, bulamaç presleme ve jel formunu alması için soğuk KCl çözeltisi bulunan kaba aktarılması, dehidre edilmesi, kurutma ve toz haline getirme aşamaları bulunmaktadır. λ -karragenan eldesi için, *Gigartina* ve *Chondrus* çeşitleri kullanılmakta, λ -karragenan jelleşme özelliğine sahip olmadığı için dehidratasyon prosesi propanol ya da etanol gibi bir alkol kullanılarak yapılmaktadır (Prajapati vd., 2014).

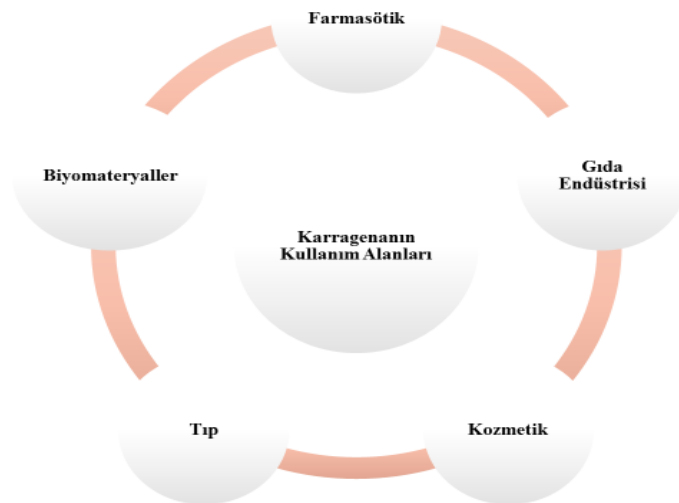


Şekil 1.10. Karragenan eldesi.

1.3.4. Karragenanın Kullanım Alanları

Karragenan, gıda ve diğer birçok endüstride kullanılmaktadır. Bu alanlardan bazıları Şekil 1.11’de verilmiştir. Gıda endüstrisinde, fiziksel ve fonksiyonel niteliklerinden dolayı stabilizatör, jelleştirici ve kalınlaştırıcı olarak; şekerlerde, tatlılarda ve peynirde ürün kalitesini arttırmak için kullanılmaktadır. Et üretiminde oksijen bariyeri, düşük kalorili sandviç üretimi, börek ve soslarda bağlayıcı olarak yer almaktadır. Bunların yanı sıra, sulu gıdalarda, evcil hayvan ürünlerinde, gıda takviyelerinde ve bebek mamalarında da kullanılmaktadır.

Karragenan çeşitleri, yangın söndürücü köpüklerde, hava tazeleyici spreylerde, ayakkabı parlaticılarda kullanılmaktadır. İnsanlarda karotenle etkileştiği için vücut şampuanlarında daha yumuşak saçlar için; losyonlarda, diş macunlarında stabilizatör, yara örtü materyallerinde vücut sıvılarını absorbe edici olarak kullanılmaktadır (Bhardwaj vd., 2000). Sağlamlığından, biyouyumluluğundan ve viskoelastik özelliğinden dolayı sürdürülebilir salım tabletlerinde kullanılmaktadır. Son yüzyılda, karragenanın farklı farmasötik amaçlarla biyomateryal olarak kullanımı da söz konusudur. Yakın zamanda, kontrollü salım sistemlerinde gerek antioksidan olarak, gerekse çözünme özelliği düşük örneklerin çözünmesinde önemli rol oynadığı çalışmalar mevcuttur (Zhang vd., 2004; Hoffman vd., 2002; Dai vd., 2007).



Şekil 1.11. Karragenanın kullanım alanları.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyaller

MHB (Müller Hinton Broth) besiyeri, gümüş nitrat (AgNO₃) MERCK-Almanya, κ-karragenan, LB (Luria Broth) besiyeri ve agar agar Sigma-Amerika'dan temin edilmiştir. *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) ve *Escherichia coli* (ATCC 25922) Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (KÜBTUAM) temin edilmiştir. Bütün sıvı solüsyonlar çift distile su ile hazırlanmıştır.

2.2. Kullanılan Cihazlar

Otoklav: Nüve OT 4060 (Türkiye)

İnkübatör: Bakteri izolasyonu ve çoğalması çalışmalarında Hood TH 15 (Edmund Bühler GmbH, Almanya) inkübatör kullanılmıştır.

UV/Vis Spektrofotometre: Libra S70 UV/Vis Spektrofotometrisi (Biochrom, İngiltere)

Çalkalamalı Su Banyosu: BS-21 (JeioTech, Kore)

Manyetik Karıştırıcı: PC-420 (Corning, Amerika)

Analitik Terazisi: XB 220A (Precisa, Amerika)

Ultrasonik Sonikatör: Sonorex Digital 10 P (BANDELİN Electronic GmbH&Co. KG, Almanya)

2.3. Yöntem

2.3.1. Karragenan Çözeltisinin Hazırlanması

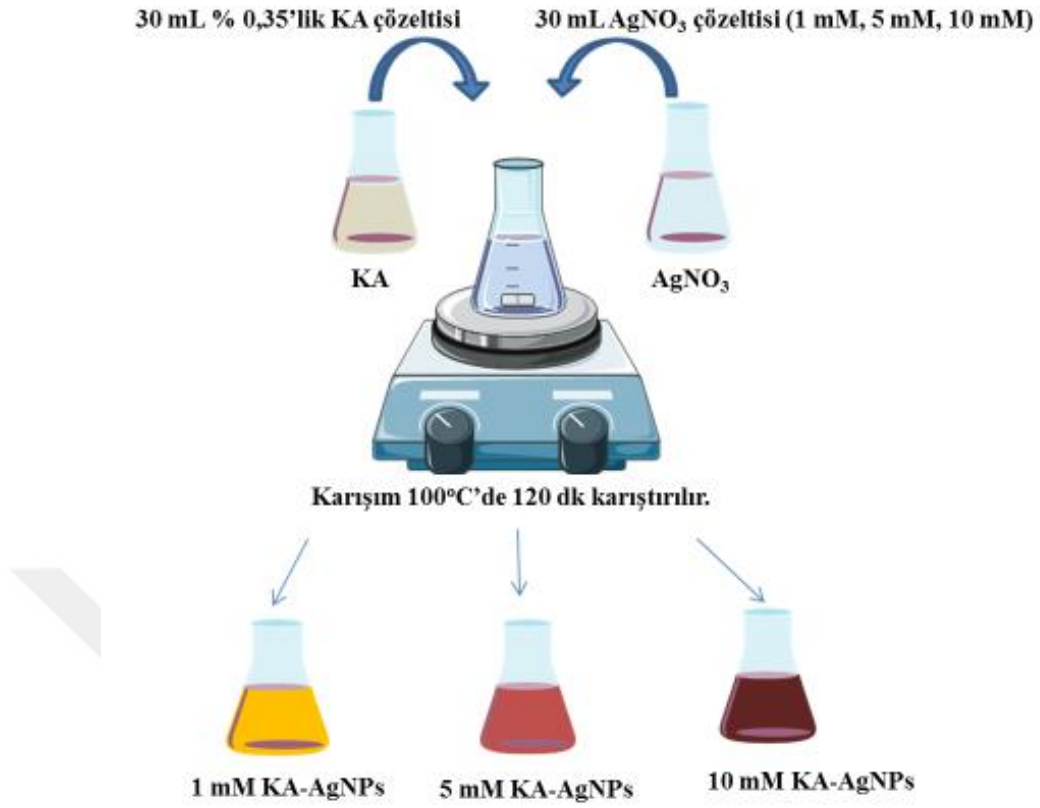
Karragenan çözeltisi hazırlamak için kappa-karragenan kullanıldı. İlk olarak %0,35'lik (ağırlık/hacim) 100 mL karragenan çözeltisi hazırlamak için 0,35 g karragenan tartılarak 100 mL distile suya eklendi. Homojen bir çözelti elde etmek amacıyla manyetik karıştırıcı kullanılırken bir miktar ısı verildi.

2.3.2. Gümüş Nitrat (AgNO_3) Çözeltisinin Hazırlanması

Gümüş nitrat derişiminin etkisini gözlemlmek amacıyla 1 mM, 5mM ve 10 mM olmak üzere üç farklı derişimde çözelti hazırlandı. 10 mM stok çözelti hazırlamak için yaklaşık 0,17 g gümüş nitrat tartılarak 100 mL suya eklendi ve manyetik karıştırıcıda bir süre homojenize edildi. Hazırlanan stok çözeltiden dilüsyon ile 1 mM ve 5 mM 'lık çözeltiler elde edildi.

2.3.3. KA-AgNPs'lerin Sentezlenmesi

AgNPs'leri karragenan ile kaplamak için her grupta 1:1 (hacim:hacim) oranda karragenan ve gümüş çözeltisi kullanıldı. Hazırlanan karragenan çözeltisinden 30 mL alınarak 100 mL'lik erlene aktarılıp, karregenan karışımı manyetik karıştırıcılı bir ısıtıcıda yaklaşık 100 °C sıcaklıkta karıştırılmaya başlandı. Çözelti kaynamaya başladığında, daha önceden hazırlanmış farklı konsantrasyonlarda (1 mM, 5 mM, 10 mM) gümüş nitrat çözeltileri yüksek hızda (800 rpm) karıştırılan karragenan çözeltilerine kontrollü olarak eklendi. Bu çözeltilerin rengi şeffaf renkten turuncu-kahverengi arasındaki renklere dönüştüğü anda Ag^+ iyonu $\text{Ag} (0)$ 'a indirgenerek KA-AgNPs'lerin oluştuğu gözlemlendi. Bu renk değişimi gözlemlenene ve renk sabitlenene kadar (120 dakika) çözeltileri yüksek hızda karıştırıldı. Örnekler saklamadan önce 0,45 μm 'lik filtreden geçirildi. KA-AgNPs'lerin homojen dağılmasını sağlamak için sonikasyon uygulandı. KA-AgNPs hazırlanması Şekil 2.1'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.1. KA-AgNPs hazırlanması

2.4. KA-AgNPs'lerin Karakterizasyonu

2.4.1. KA-AgNPs Oluşumunun Makroskopik Olarak Gözlemlenmesi

NPs oluşumunun dışarıdan fark edilebilen en belirgin göstergesi, reaksiyon ortamında meydana gelen gözle görülür renk değişimidir. Bu sebeple, KA-AgNPs oluşumu öncelikle bu şekilde gözlemlenmiştir.

2.4.2. UV/Vis Spektrofotometre Analizi

KA-AgNPs gruplarının 300 ile 700 nm arasındaki absorbans spektrası UV-Vis spektrofotometre (Libra S70 UV/Vis Spektrophotometer, Biochrom, İngiltere) ile KÜBTUAM'da ölçülmüştür. Kullanılan dalga boyu aralığında gözlemlenen karakteristik tepe noktaları AgNPs oluşumunun göstergesi olmuştur.

2.4.3. XRD Analizi

Yalnızca karragenan ve KA-AgNPs'lerin moleküler ve kristal yapılarını belirlemek amacıyla XRD analizi yapılmıştır. Bu analiz, Orta Doğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan Rigaku Ultima-IV marka cihaz kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.4.4. SEM Analizi

Sentezlenen KA-AgNPs'lerin parçacık büyüklüklerinin, boyut dağılımlarının, yüzey morfolojisinin çözülmesi amacıyla SEM analizi yapılmıştır. Bu analiz, ODTÜ Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan QUANTA 400 F Field Emission marka SEM cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

2.4.5. FTIR Analizi

Sentezlenen KA-AgNPs'lerin kimyasal yapısı FTIR analizleri ile KÜBTUAM'da analiz edilmiştir. Her bir spektrum, ZnSe ATR kristal hücresi üstünde yapılan ölçümlerle 4 cm^{-1} çözünürlük ve 16 tarama sayısı kullanılarak $4000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$ spektral aralıkta % transmittans'a karşı dalga sayısı (cm^{-1}) olarak çizilmiştir.

2.4.6. Zeta Potansiyeli Ölçümü

Sentezlenen KA-AgNPs'lerin ortalama hidrodinamik çapları (Z_{ort}) ve zeta potansiyel (ZP) değerleri KÜBTUAM'da bulunan Malvern ZetaSizer Nano ZS aleti (Malvern Instruments, Malvern-UK) marka zetasizer cihazı kullanılarak belirlenmiştir.

2.4.7. Termal Analizler

Karragenanın ve KA-AgNPs'lerin sıcaklığa bağlı olarak kütlelerinde meydana gelen değişimin izlenmesi amacıyla KÜBTUAM'da bulunan Q500 (HITACHI-Japonya) termogravimetrik analiz cihazı kullanılarak TGA analizi yapılmıştır.

2.4.8. EDS Analizi

Örnek içeriğinde bulunan elementlerin kalitatif mikroanalizi EDS analizi ile tespit edilmiştir. Bu analiz, ODTÜ Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan QUANTA 400 F Field Emission marka SEM cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

2.4.9. Stabilite Testi

KA-AgNPs'lerin farklı tuz derişimindeki (%10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 0 ağırlık/hacim) kararlılığına, bir gün süre ile inkübe edildikten sonra (37°C, 200 rpm) UV-Vis spektroskopisi kullanılarak 300 ile 700 nm aralığındaki spektrum ölçümleriyle incelenmiştir.

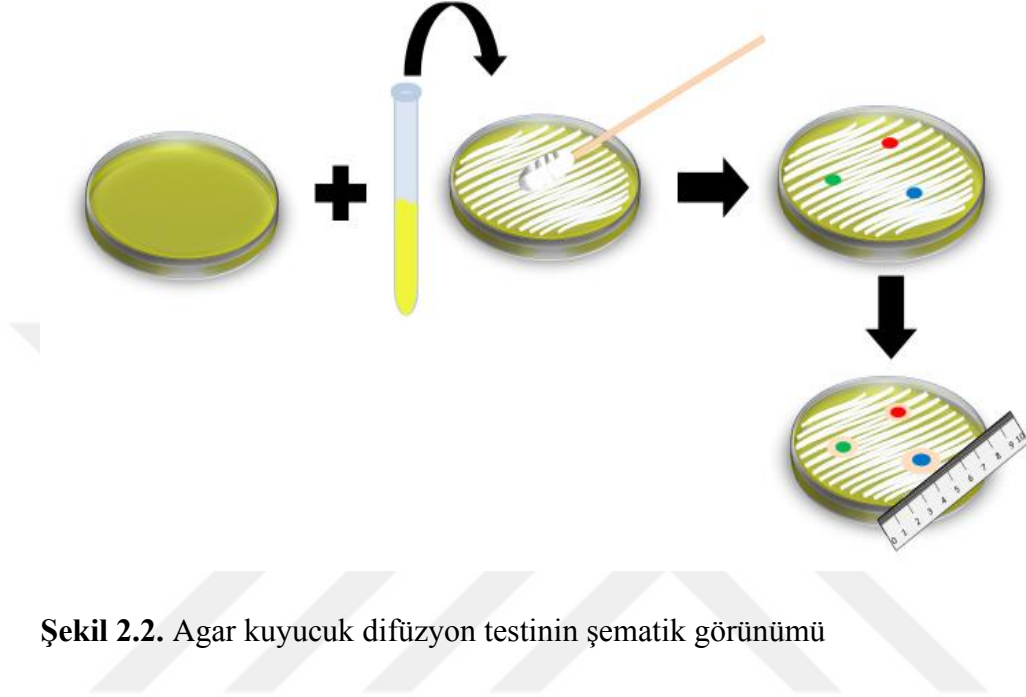
2.5. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

2.5.1. Agar Kuyucuk Difüzyon Testi

Elde edilen örneklerin antimikrobiyal etkisinin gözlemlenmesi amacıyla agar kuyucuk difüzyon testi uygulanmış ve inhibisyon çapları (zone) belirlenmiştir. Test mikroorganizması olarak gram pozitif *S. aureus* (ATCC 29213) ve gram negatif *E. coli* (ATCC 25922) bakterisi kullanılmıştır. Bakteriler 20'şer mL LB besiyeri kullanılarak 37 °C'de, 24 saat boyunca çalkalamalı su banyosunda inkübe edilmiştir. Bu test için her bakteri çeşidinde Mcfarland Standardının sağlanması gerekmektedir. Dolayısıyla yoğunluk 0,5 (10^8 mikroorganizma/mL) olacak şekilde ayarlanmış ve istenilen bulanıklık oluşturulmuştur.

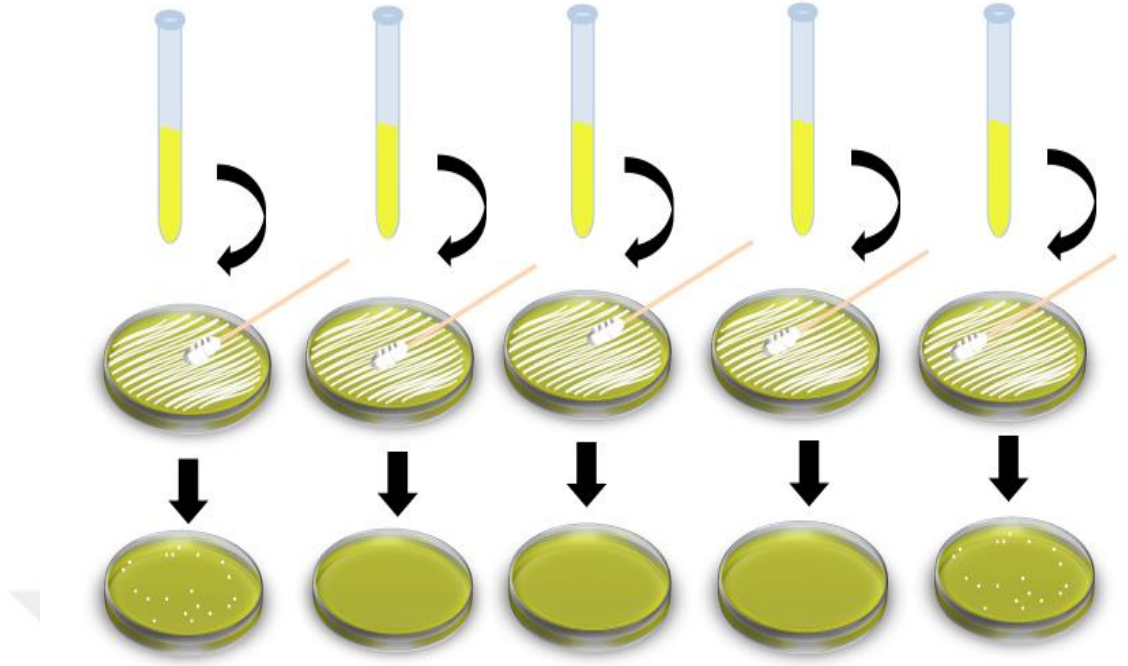
Agar üzerine yapılacak analiz işleminde standart prosedür izlenmiştir. Her bakteri grubu için 4'er tane olmak üzere toplam 8 petri kabında çalışılmıştır. Bunun için 160 mL Muller Hinton Agar kullanılarak çözelti hazırlanmış ve petri kaplarına eşit miktarda paylaştırılmıştır. Agarlar istenilen yoğunluğa geldikten sonra bakteri çözeltilisinden 100 µL alınarak petrilere eküvyon çubuğu ile yayılmıştır. Agar üzerinde Şekil 2.2'de belirtilen şekilde 7'şer mm çapında kuyucuklar açılmıştır. Oluşturulan kuyucuklara 100'er µL örnek eklenmiş. Agar kuyucuk testinde, negatif kontrol olarak sreil su, pozitif kontrol olarak Streptomisin (1 mg/mL), örnek olarak

karragenen çözeltisi ve KA-AgNPs çözeltileri kullanılmıştır. Petri kapları 34 °C’de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Süre sonunda zone çapları ölçülerek inhibisyon değerleri kaydedilmiştir (CLSI, 2006). Yapılan agar kuyucuk difüzyon testinin şematik görünümü Şekil 2.2’de verilmiştir.



2.5.2. Sıvı Kültür Testi

Sıvı kültür testi ile sentezlenen KA-AgNPs’lerin antimikrobiyal özellikleri sıvı besiyerinde test edilmiştir. Bu test için de negatif kontrol olarak besiyerine steril su, pozitif kontrol olarak Streptomisin çözeltisi ve örnek olarak karragenan ve KA-AgNPs çözeltileri eklenmiştir. Deneyler falkon tüplerde yapılmış ve her falkon için 4 mL LB, 0,5 mL steril su, antibiyotik, karragenan ya da KA-AgNPs örneği ve 0,5 mL 10^6 hücre/mL mikroorganizma çözeltisi eklenmiştir. Örnekler çalkalamalı su banyosunda 37 °C’de 125 rpm’de 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, her örnek için 600 nm’de optik yoğunluk ölçümü yapılmıştır. Bunun yanı sıra, sıvı kültür ortamlarından alınan örnek 10 seyreltilerek katı ortama ekilmiş ve bir günlük inkübasyon sonunda, katı ortamda üreyen koloniler gözlemlenmiştir (CLSI, 2006). Yapılan antimikrobiyal testi Şekil 2.3’te şematize edilmiştir.

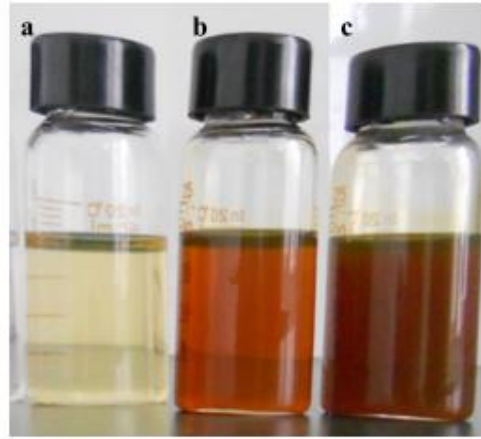


Şekil 2.3. Sıvı kültür testi

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Makroskopik Gözlem

AgNPs'ler kahverengi tonlu renkli çözeltilerdir. Buradan yola çıkarak solüsyon renginde meydana gelen değişimler ile KA-AgNPs'lerin oluştuğu makroskopik olarak gözlemlenmiştir. Farklı derişimlerde sentezlenen KA-AgNPs'ler Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Yapılan çalışmada 1 mM'lık grupta renk değişimi çok az olduğu için, bu derişimde AgNPs oluşumunun düşük olduğu görülmüştür.

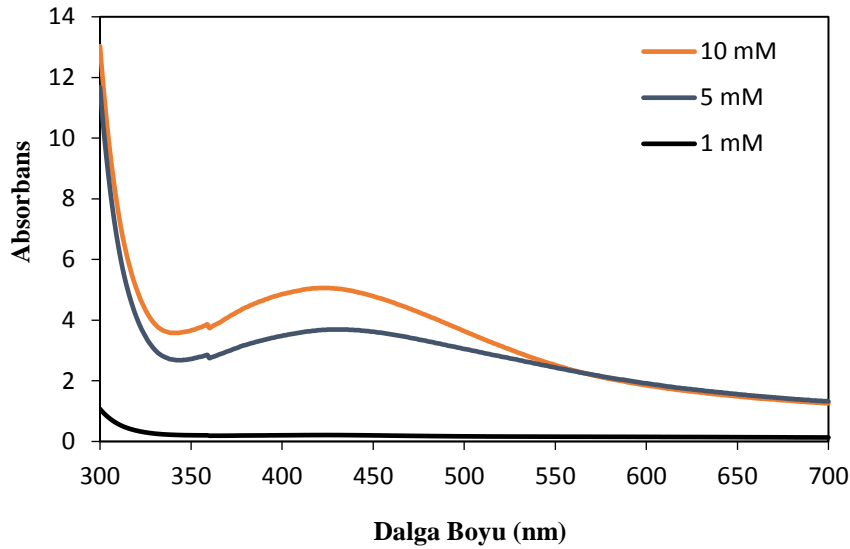


Şekil 3.1. KA-AgNPs oluşumunun makroskopik gözlenmesi ((a) 1 mM, (b) 5 mM, (c)10 mM)

3.2. UV-Vis Spektroskopisi Analizi

UV-Vis spektrofotometrisi, AgNPs oluşumunu doğrulamak için kullanılan yaygın yöntemlerden bir tanesidir. KA-AgNPs oluşumunun tespiti, farklı Ag derişimleri kullanılarak hazırlanan grupların UV-Vis spektrumlarında karakteristik tepe noktalarının gözlemlenmesi ile yapılmıştır ve elde edilen bulgular Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Oluşan AgNPs'ler yüzey plazmon rezonansından dolayı görünür bölgedeki ışığı absorbe etmektedir. Mie'nin Teorisine göre NPs'ler küresel ya da yarı küresel formda olduğundan tek bir pik noktası vermektedir (Heath vd., 1989). Aynı

zamanda tek bir pik noktası küçük ve monodispers yapıda NPs elde edildiğini göstermektedir. KA-AgNPs 1 mM grubunda spektral tarama ile tespit edilebilir düzeyde AgNPs sentezlenmemiştir. Diğer gruplarda (5 mM ve 10 mM) işlem sonunda NPs elde edildiği görsel olarak da görülmüştür. 5 mM'lık AgNPs grubu, 420 nm dalga boyunda NPs oluşumunu işaret eden karakteristik tepe noktası vermiştir. 10 mM'lık AgNPs grubu ise, 417 nm dalga boyunda NPs oluşumunu işaret eden karakteristik tepe noktası görülmektedir. 5 mM ve 10 mM grupları karşılaştırıldığında, 10 mM grubuna ait pik daha belirgindir. Bu daha yoğun NPs oluşumunu işaret etmektedir. Remita vd. (2007) tarafından yapılan çalışmada da 402 ve 420 nm dalga boyunda tepe noktası görülmesiyle NPs oluşumunun doğrulandığı görülmüştür.

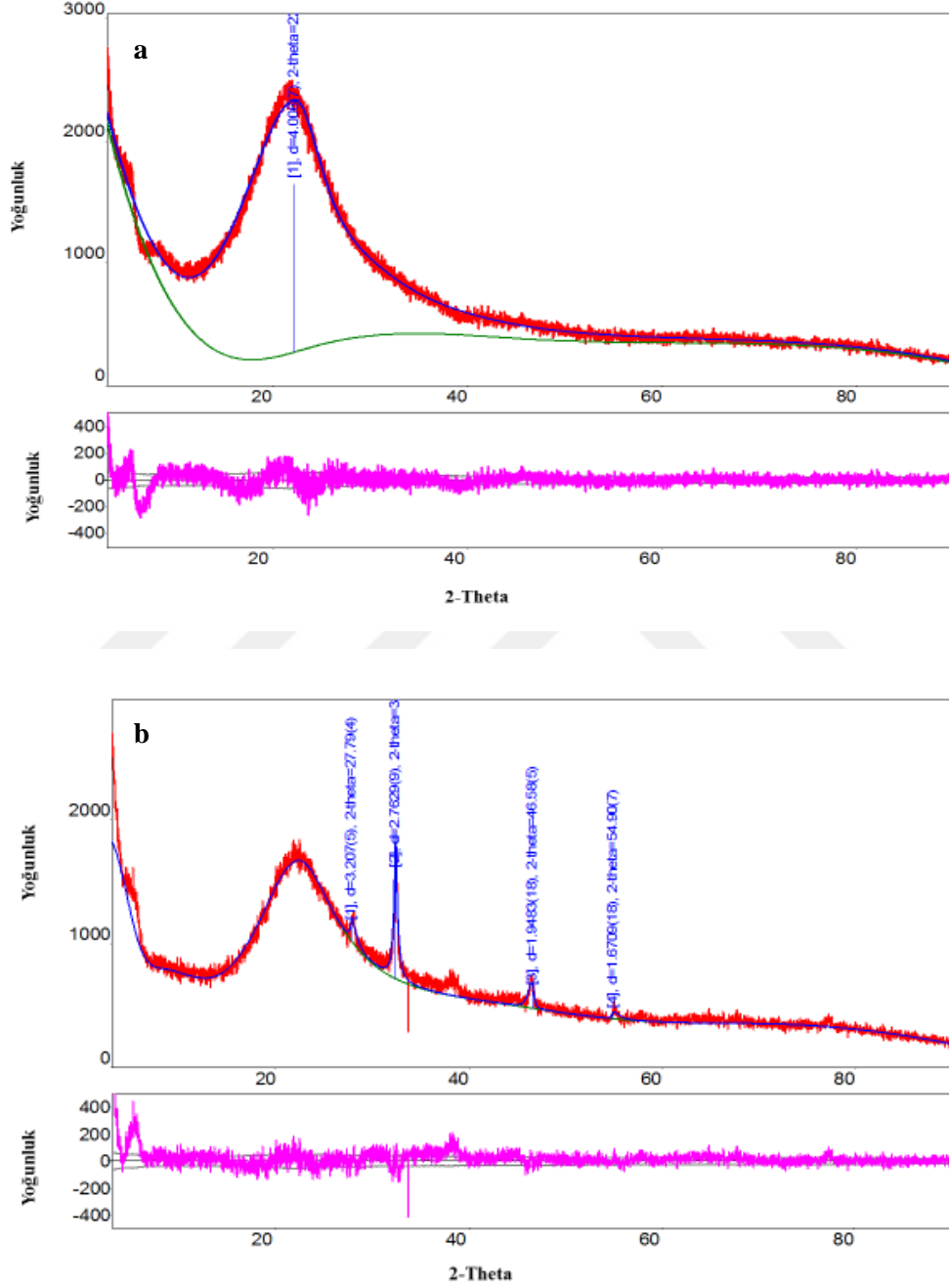


Şekil 3.2. Farklı derişimlerde hazırlanan KA-AgNPs'lerin UV-Vis spektrumları

3.3. XRD Sonuçları

Yalnızca karragenana ait ve KA-AgNPs'lere ait XRD sonuçları Şekil 3.3. a'da verilmiştir. Yalnızca karragenana ait 2θ açısında XRD piki $22,17^\circ$ dir. Buradaki geniş tepecik şeklindeki pik, karragenanın semikristalin yapıda olduğunu göstermektedir (Liew vd., 2017). KA-AgNPs'lerde ise 2θ açısında XRD pikleri (111), (200), (220) ve (311) kristalografik düzlemlerine karşılık $27,79^\circ$, $32,37^\circ$,

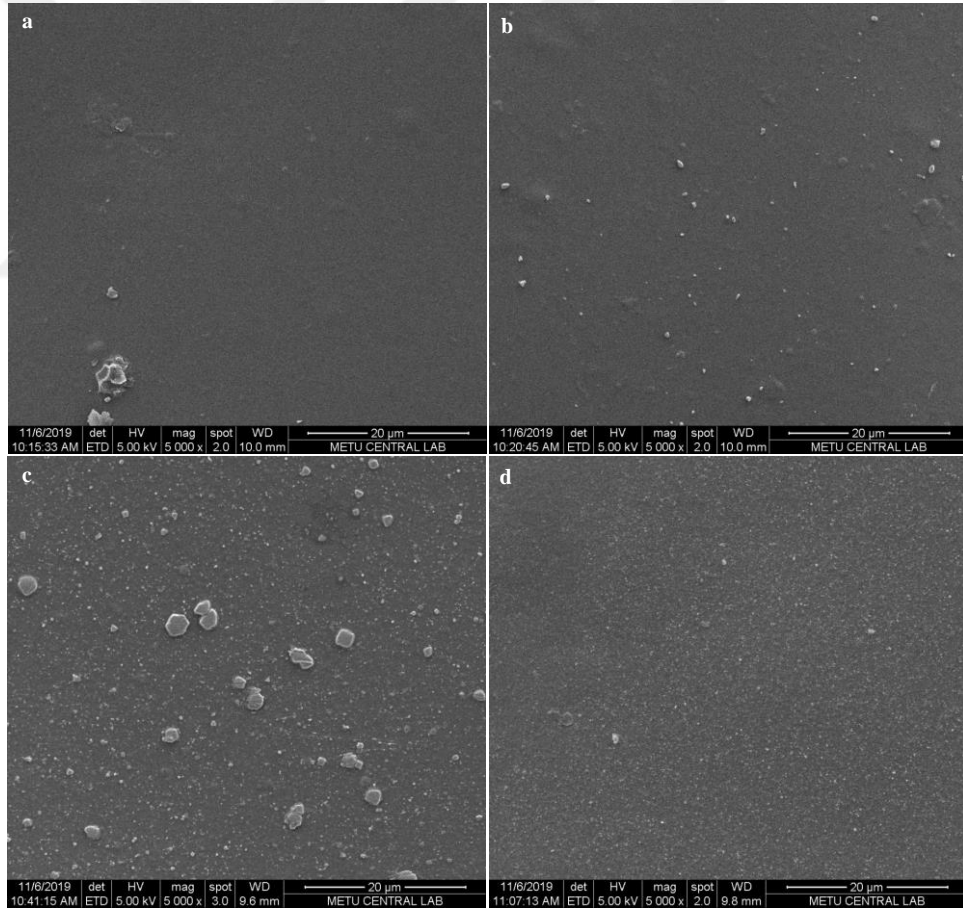
46,58° ve 54,90°'dedir. XRD ile sentezlenen KA-AgNPs'lerin yüzey merkezli kübik kristal yapıda olduğu görülmüştür (Elsupikhe vd., 2015). Shameli vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir.



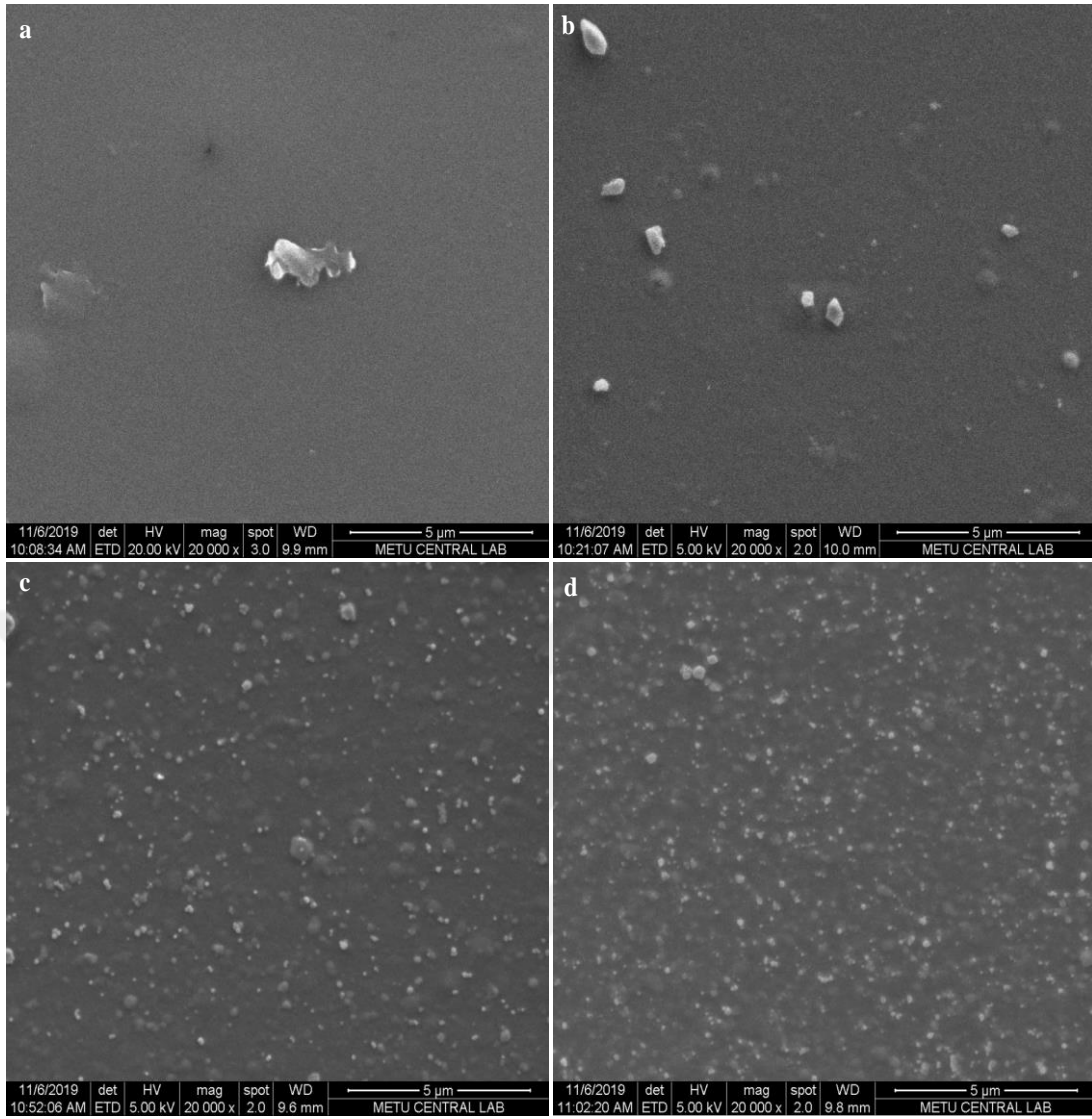
Şekil 3.3. (a) Yalnızca KA ve (b) KA AgNPs'ye ait XRD verileri

3.4. SEM Analizi

SEM görüntülemeleri ile farklı konsantrasyonlarda AgNO_3 içeren solüsyonlara karragenan eklenerek elde edilen NPs'ler incelenmiş ve KA-AgNPs'lerin SEM görüntüleri Şekil 3.4. ve 3.5'te verilmiştir. SEM görüntüleri incelendiğinde sentezlenen AgNPs'lerin homojen büyüklükte dağıldığı görülmektedir. AgNPs'ler çoğunlukla küre şeklindedir. 20000 büyütme görüntüleri incelendiğinde; Ag derişimi arttıkça parçacık boyutunun azaldığı görülmektedir. Aynı zaman da yine Ag derişimi arttıkça parçacık sayısı da artmıştır. Elsupikhe ve ark. tarafından yapılan çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Elsupikhe vd., 2015).



Şekil 3.4. KA ve farklı derişimlerde hazırlanan KA-AgNPs'lerin SEM görüntüleri (x5000 büyütme); (a) KA, (b) 1 mM KA-AgNPs, (c) 5 mM KA-AgNPs, (d) 10 mM KA-AgNPs

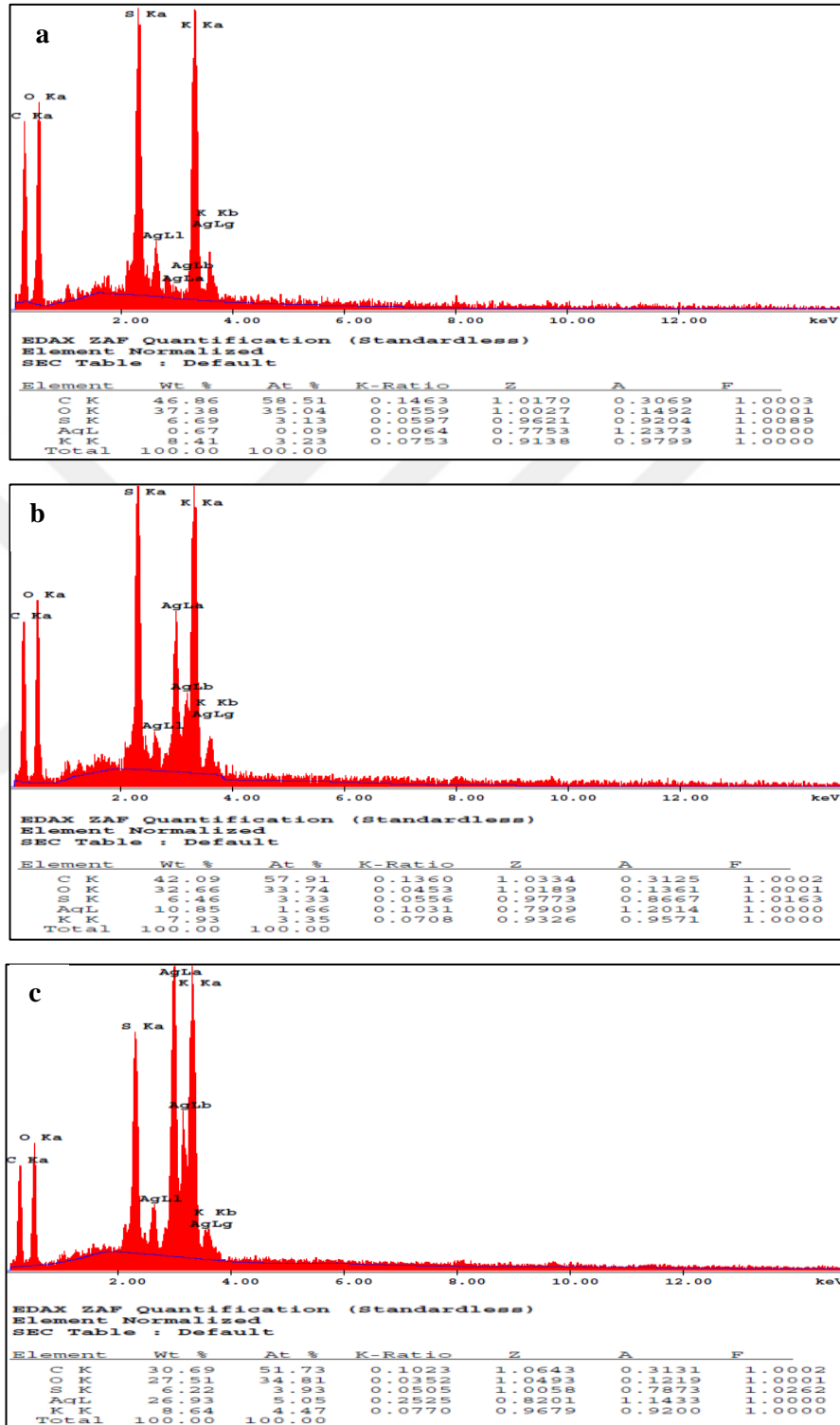


Şekil 3.5. KA ve farklı derişimlerde hazırlanan KA-AgNPs'lerin SEM görüntüleri (x20000 büyütme); (a) KA, (b) 1 mM KA-AgNPs, (c) 5 mM KA-AgNPs, (d) 10 mM KA-AgNPs

3.5. EDS Analizi

KA-AgNPs'lerde bulunan belirli elementler EDS analizleri ile belirlenmiş ve sonuçlar Şekil 3.6'da verilmiştir. NPs'lere ait EDS spektrumları Ag ve beklenen bütün elementlerin varlığını göstermiştir. Özellikle güçlü sinyaller incelendiğinde bunlar Ag atomlarına ait olduğu ve metal AgNPs elde edildiğinin tipik göstergesidir (Apte vd., 2013). Ayrıca AgNPs'lerin herhangi bir yabancı madde içermediği de gösterilmiştir. C, O ve S pikleri ise, AgNPs sentezi sırasında KA kullanıldığının

kanıtıdır. Roy ve ark. tarafından yapılan çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Roy vd., 2019).

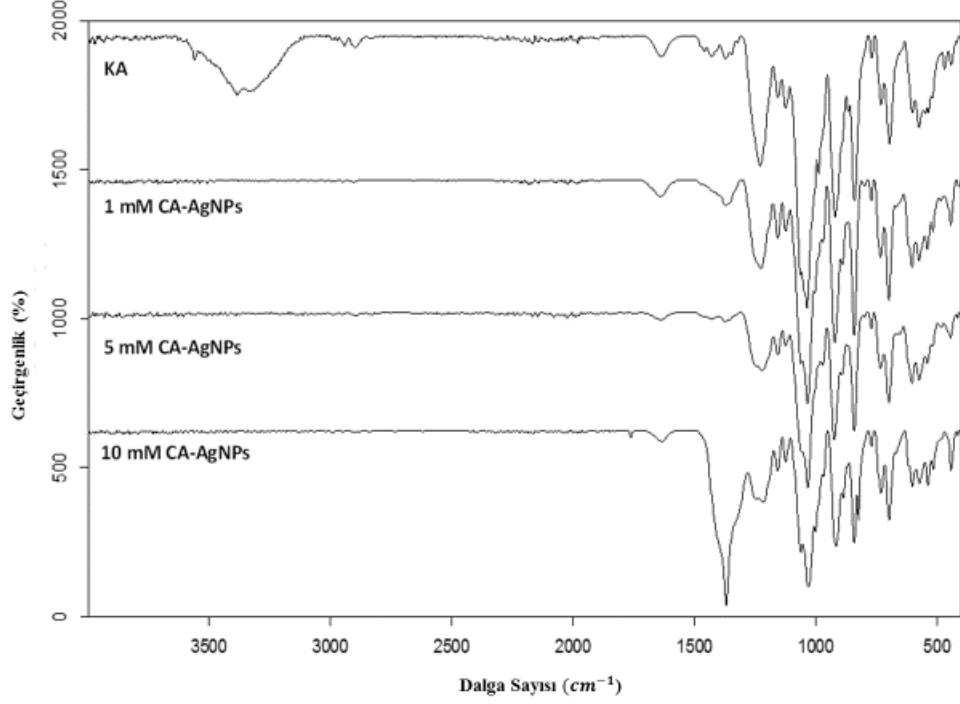


Şekil 3.6. Farklı derişimlerde hazırlanan KA-AgNPs'lerin ((a) 1 mM, (b) 5 mM, (c) 10 mM) EDS analiz sonuçları

3.6. FTIR Analizi

KA ve KA-AgNPs'lere ait FTIR spektrumları Şekil 3.7 'de gösterilmiştir. KA'nın FTIR spektrumunda gözlemlenen $3385,16\text{ cm}^{-1}$ 'deki pik OH gerilimine yani hidroksil grubuna aittir. Sırasıyla, $2897,26\text{ cm}^{-1}$ 'deki pik C-H gruplarına, $1636,12\text{ cm}^{-1}$ 'deki pik suya, $1459,75\text{ cm}^{-1}$ 'deki pik sülfat grubuna, $1230,51\text{ cm}^{-1}$ 'deki pik ester sülfat grubuna, $1036,54\text{ cm}^{-1}$ 'deki pik glikozidik bağa, $867,26\text{ cm}^{-1}$ 'deki pik 3,6-anhidro-D-galaktoza, $841,42\text{ cm}^{-1}$ 'deki pik C-O-S C-4-galaktoz üzerinde bulunan sekonder sülfata aittir (Pereira vd., 2009; Pourjavadi vd., 2004). $1500-800\text{ cm}^{-1}$ aralığında KA'ya ait karakteristik bantlaşma mevcuttur.

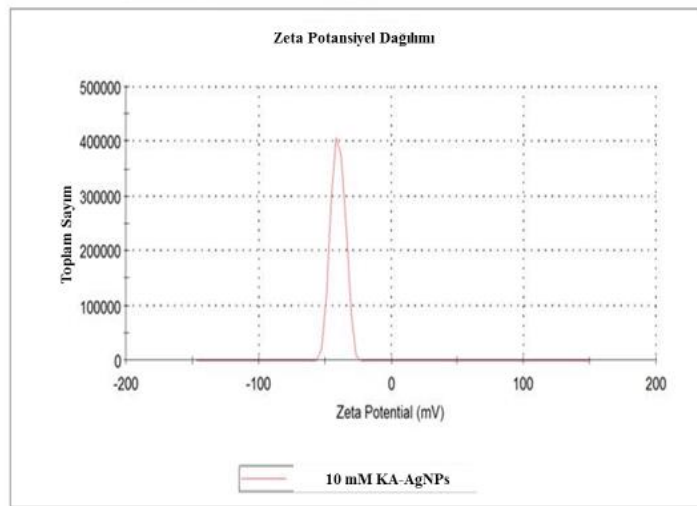
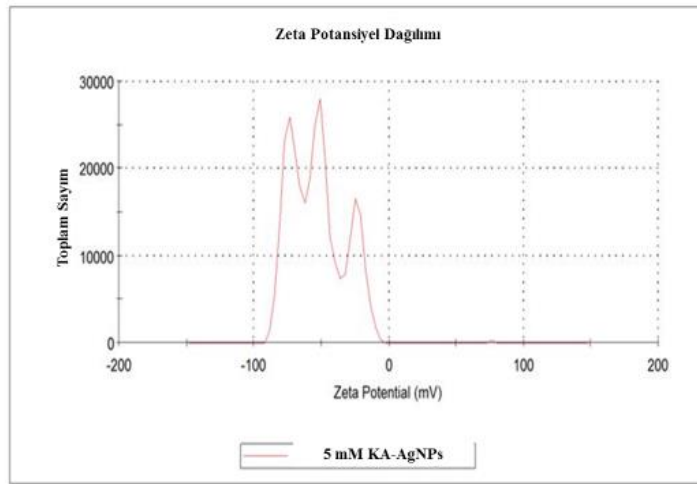
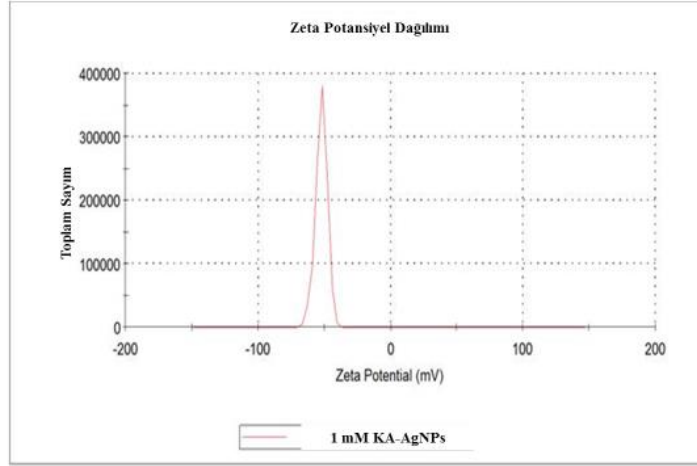
KA-AgNPs'lerin FTIR spektrumları ile yalnızca KA'ya ait FTIR spektrumları karşılaştırıldığında, spektrumların benzer olduğu görülmektedir. Karragenan polimerinde bulunan karbonhidrat radikallerinin oksidasyonu ile karbonil grupları oluşmuştur (Shameli vd., 2012). $100-500\text{ cm}^{-1}$ arasında görülen absorpsiyon pikleri ise karragenan zincirinin hidroksil grubunda bulunan oksijen ile AgNPs arasındaki etkileşim sonucu meydana gelmiştir. AgNO_3 'ün eklenmesiyle $1369,83\text{ cm}^{-1}$ 'de yeni bir absorpsiyon piki ortaya çıkmıştır. Bu etkileşim pozitif yüklü AgNPs'ler ile negatif yüklü karragenan arasındaki Van Der Waals bağları ile oluşmuştur (Shameli vd., 2012; Li vd., 2015; Luo vd., 2015). KA'ya ait $-\text{SO}_2$ ve $-\text{COO}^-$ 'ye ait piklerin AgNPs yapısında da görülmesinin polimerden kaynaklandığı barizdir. Fakat bu piklerin aynı yoğunlukta olmamasının sebebi polimerin Ag^+ ile etkileşmesi ve KA'nın oksidasyona uğramasıdır. Pereira vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 3.7. Farklı derişimlerde hazırlanan KA-AgNPs'lerin ve yalnızca KA'nın FTIR spektrumları

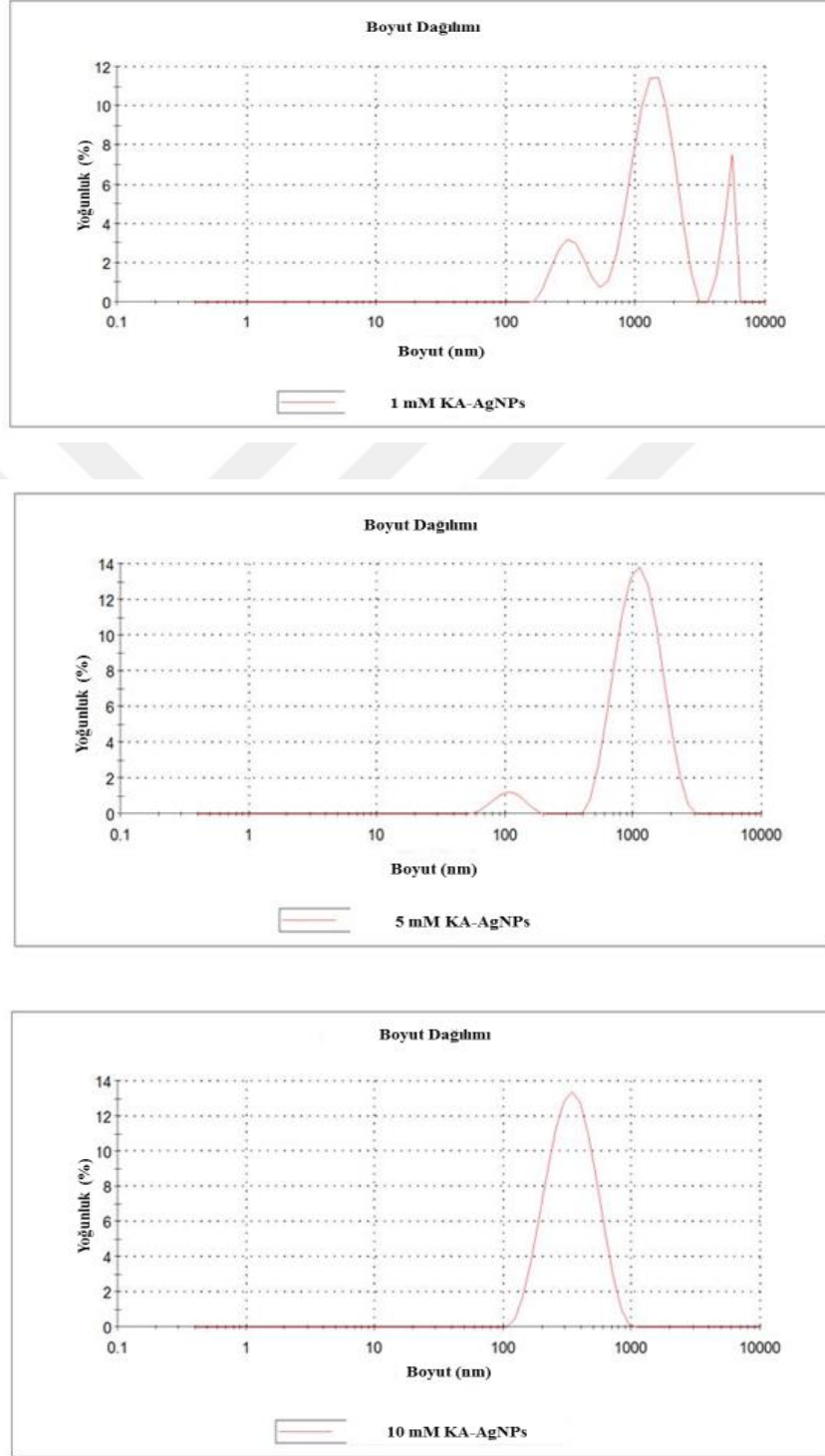
3.7. Zeta Potansiyel Analizi

Sentezlenen KA-AgNPs gruplarının zeta potansiyeli Şekil 3.8'de verilmiştir. Buna göre bütün grupların zeta potansiyelinin negatif olduğu anlaşılmıştır. Bu da nanoparçacıkların yüksek negatif yüzey yüküne sahip olduklarını göstermektedir. Aynı zamanda negatif yüzey yükü parçacıkların homodispers dağılmasını da sağlamaktadır (Haider vd., 2014). Bunun yanı sıra, parçacıklar birbirini ittiği için sıvı bir solüsyon içerisinde de yüksek stabiliteye sahiptir (Farhadi vd., 2017).



Şekil 3.8. Farklı derişimlerde hazırlanan KA-AgNPs'lerin zeta-potansiyel dağılımları

Zeta boyut dağılımı sonuçları Şekil 3.9’de gösterilmiştir. Hidrodinamik çaplar incelendiğinde, Ag derişimi arttıkça hidrodinamik çapın azaldığı görülmüştür. Yani, Ag derişimi arttıkça NPs boyutu azalmış, dolayısıyla agregasyon da azalmıştır.



Şekil 3.9. Farklı derişimlerde hazırlanan KA-AgNPs’lerin zeta-boyut dağılımları

Zeta potansiyel ve zeta boyut dağılımına ait veriler Çizelge 3.1’de verilmiştir. Zeta potansiyelinin negatif olması kaplama materyalinin stabilizatör etkisinin olumlu olduğunu göstermektedir. Negatif yüzey yükü her bir polimer zincirinin birbirini ittiğini ve parçacıkların homodispers yapıda olduğunu göstermektedir. Bundan dolayı, NPs’ler homojen dağılım sağlamış ve sıvı çözelti içerisinde topaklanma yapmamıştır. Aynı zamanda negatif yüzey yükü doğrudan antibakteriyel aktivitenin de var olduğunu ifade etmektedir (Halder vd., 2014; Farhadi vd., 2017; Salvioni vd., 2017).

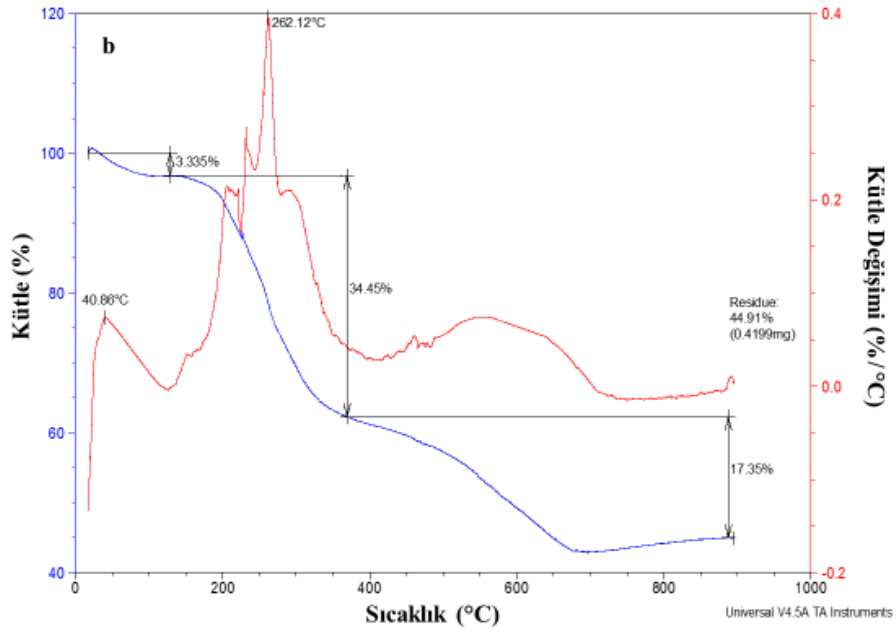
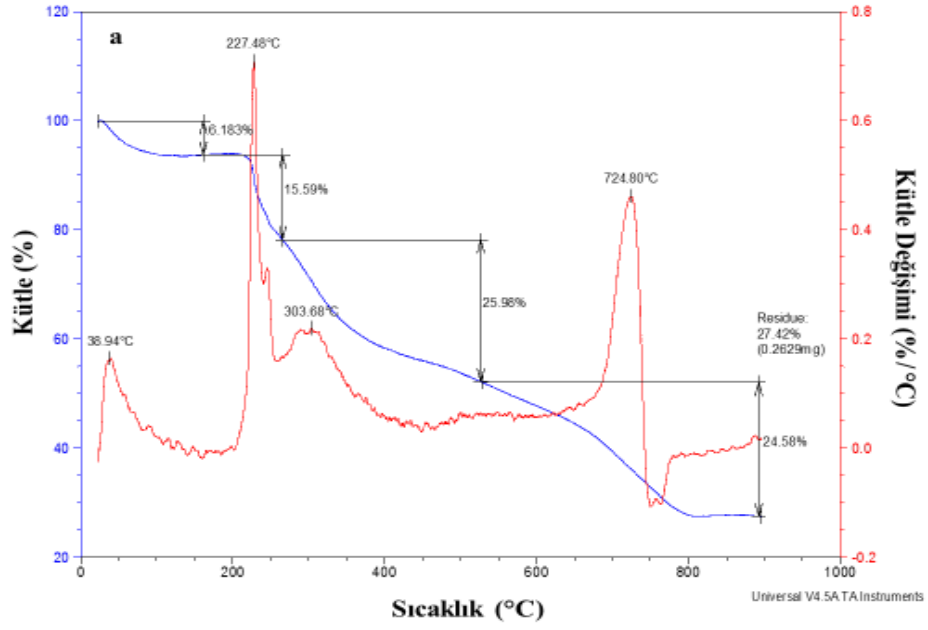
Çizelge 3.1. KA-AgNPs’lerin zeta potansiyel ve zeta boyut dağılımları

Örnekler	Zeta Potansiyel (mV)	Zeta Boyutu (nm)
1 mM KA-AgNPs	-52.1	1012
5 mM KA-AgNPs	-53	713
10 mM KA-AgNPs	-40	284.7

3.8. TGA Analizi

KA ve KA-AgNPs’lere ait termogramlar termal dekompozisyon sırasında kaybedilen kütleyi göstermektedir ve Şekil 3.10’da verilmiştir. Her termal dekompozisyon molekülde bulunan suyun evaporasyonu ve polimer matriksinin bozulmasından kaynaklanmaktadır. KA ve AgNPs’lere ait termogramlar incelendiğinde, çok aşamalı bir dekompozisyon olduğu görülmektedir. Yalnızca KA’ya ait termogram incelendiğinde, ilk kütle kaybı 38 °C civarında yapıda bulunan nemin evaporasyonu sonucu olmuş ve bu da kütlenin yaklaşık %3’ünün kaybedildiğini göstermektedir. Termal dekompozisyonun ikinci aşaması 227 °C civarında olmuştur ve bu aşamada polimer yapısında bulunan sülfürdioksitler bozunmuş ve polimer matriks degrade olduğundan KA dekompozisyona uğramıştır. AgNO₃ eklenmesiyle yapıda bulunan nemin buharlaşması 40 °C civarında olmuş ve termal dekompozisyonun ikinci aşaması 262 °C’de başlamıştır. Bu sonuçlardan hareketle, polimere AgNO₃ eklenmesiyle KA’nın termal stabilitesinde değişmeler olmuştur. Bunun yanı sıra

yapıda bulunan Ag'den dolayı, 900 °C'nin sonunda artan kalıntı miktarında artış da olmuştur. Liew ve ark. tarafından yapılan çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Liew vd., 2017).

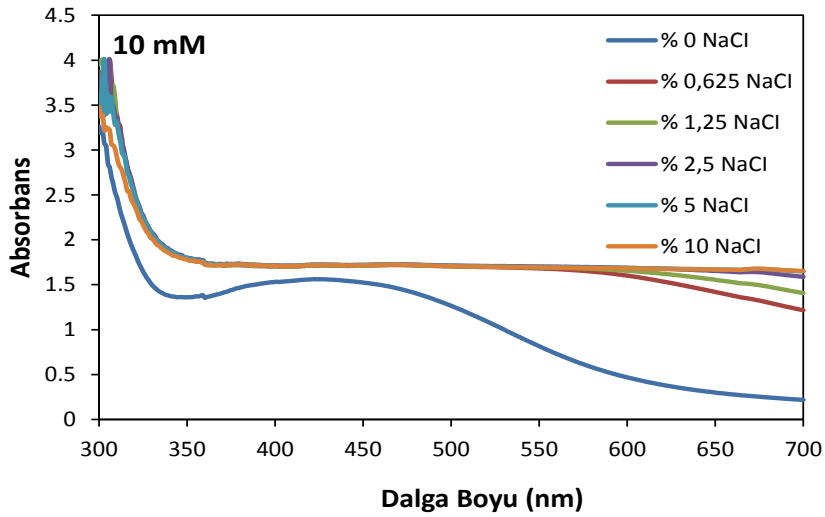
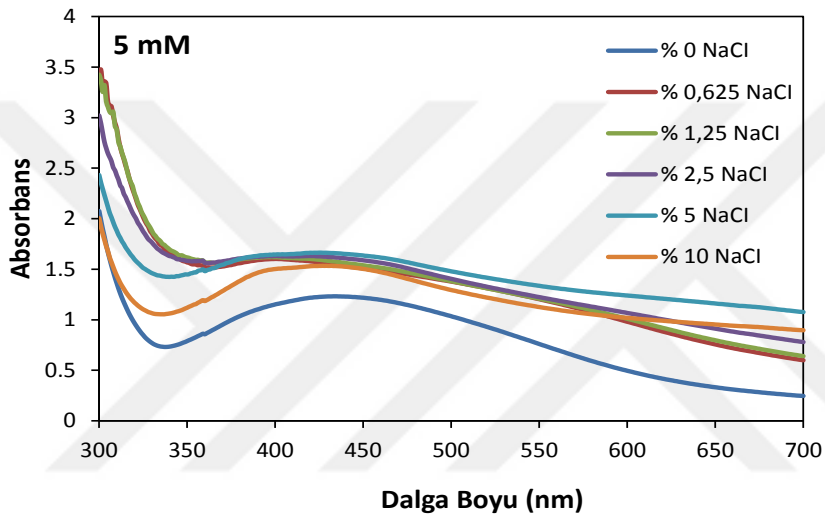
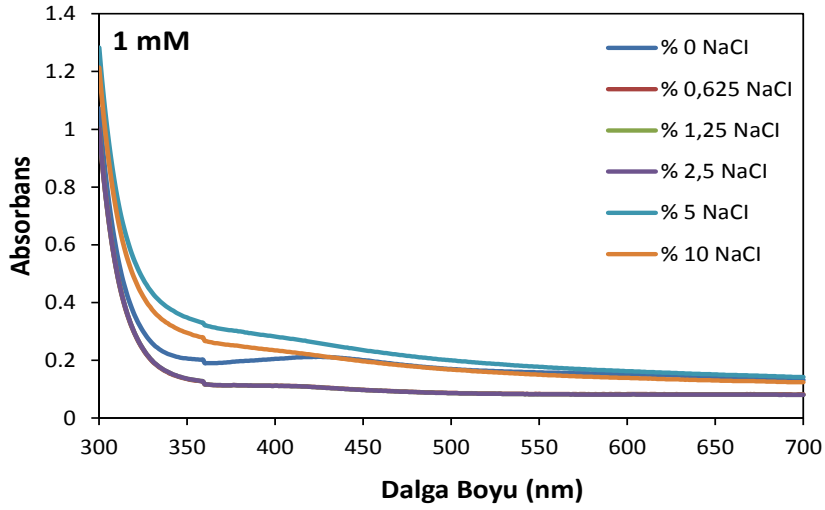


Şekil 3.10. (a) KA ve (b) KA-AgNPs'lerin TGA analiz sonuçları

3.9. Stabilite Testi

KA-AgNPs'ler farklı tuz derişimli ortamlarda inkübe edilmiş ve bir günlük inkübasyon süresi sonunda, KA-AgNPs'lerin kararlılığı yapılan UV-Vis spektrofotometre ölçümleri ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.11'de verilmiştir. 1 mM'lık grupta sadece tuz içermeyen grupta pik oluşmuş, diğer bütün tuz derişimlerinde pik derinliği tamamen yok olmuştur. İnkübasyon süresince, 5 mM'lık NPs grubunun absorpsiyon profillerinde sadece %10'luk NaCl çözeltisinde 400 nm'den 450 nm'ye bir kayma olmuştur. %0,625'lik NaCl çözelti derişiminde kayma bir şekilde azalmış, genişleyerek basıklaşmıştır. Bunun aksine, %10 NaCl derişiminde belirgin bir düşüş gözlemlenmiştir. Bu değişimler, bu gruptaki nanoparacık stabilitesinin iyonik kuvvet değişimlerine karşı çok hassas olduğunun göstergesidir. 10 mM'lık gruba ait absorpsiyon pikleri incelendiğinde, tuz içermeyen grupta belirgin bir pik oluşmuş, diğer gruplarda gözlemlenmemiştir. Bütün tuz derişimlerinde pik derinliği neredeyse tamamen yok olmuştur. Bu çalışmanın sonucuna göre, tuzlu ortamda en kararlı olan grup 5 mM KA-AgNPs'nin olduğu görülmüştür.

AgNPs'lerin tuzlu ortamda stabilitesi büyük ölçüde nanopartikülleri stabilize etmek için kullanılan polimerik ajana ve sterik etkiye göre değişmektedir. Bu sebeple daha küçük hacimli AgNPs'ler daha fazla tuz stabilitesi göstermektedir. Aragao vd. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir.

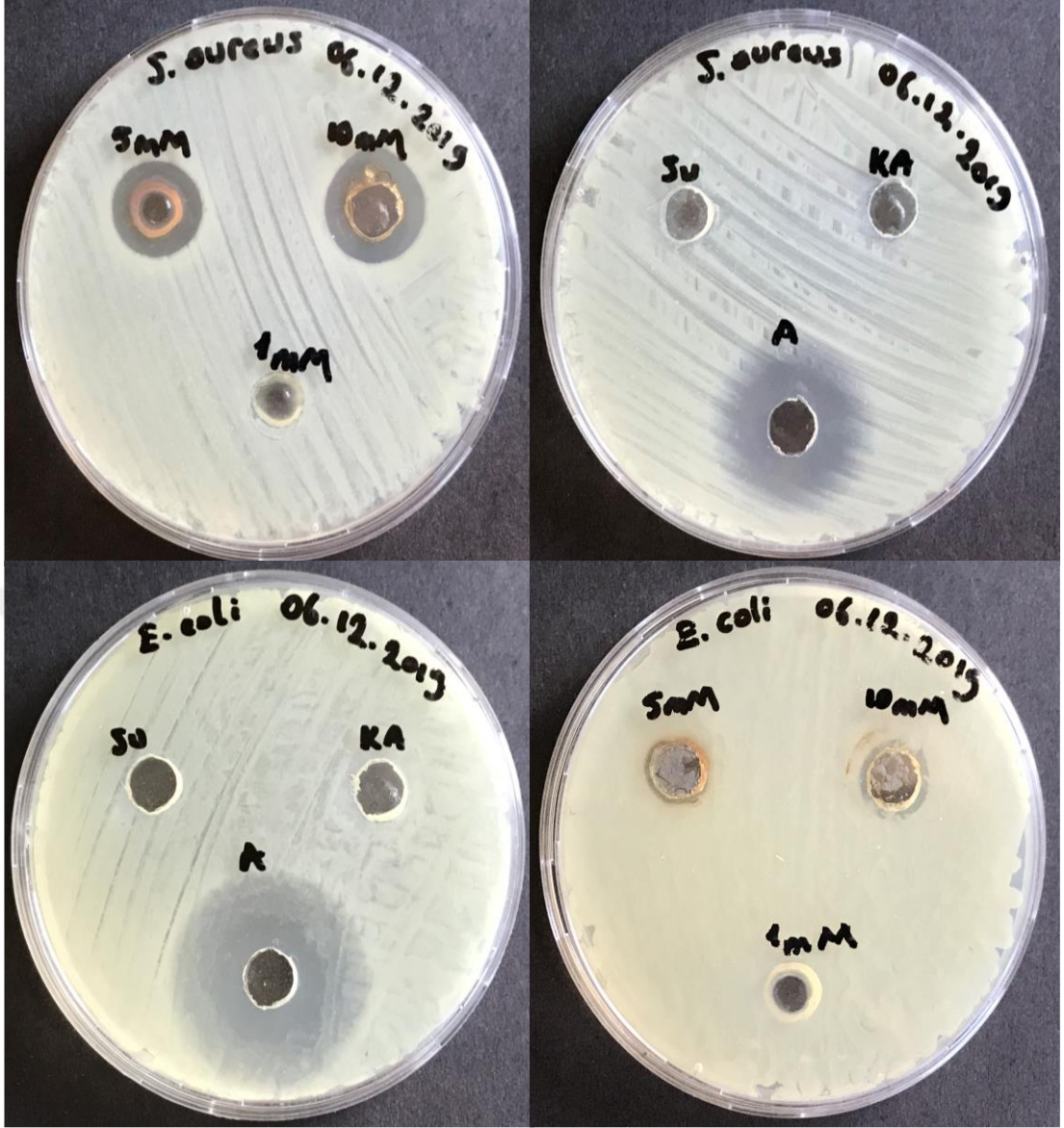


Şekil 3.11. Farklı derişimlerde hazırlanan KA-AgNPs'lerin farklı derişimlerde NaCl içerisindeki stabilite sonuçları

3.10. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

3.10.1. Agar Difüzyon Testi

Sentezlenen KA-AgNPs'lerin antimikrobiyal etkinliği agar kuyucuk difüzyon test ile incelenmiştir. Agar difüzyon testi görüntüleri Şekil 3.12'de verilmiştir. Yalnızca karragenana ait inhibisyon çapları incelendiğinde her iki bakteri çeşidinde de herhangi inhibisyon zonu olmadığı görülmektedir. Bunun sebebi, saf karragenanın antimikrobiyal etkiye sahip olmamasıdır. Her iki bakteri çeşidi için de 1 mM, 5 mM ve 10 mM gruplarına ait inhibisyon çapları Çizelge 3.2'de verilmiştir. Çaplar incelendiğinde, 1 mM'lık grubun her iki bakteri çeşidi için de antimikrobiyal etki göstermediği görülmektedir. 5 mM ve 10 mM'lık gruplar ise her iki bakteri çeşidi için de antimikrobiyal aktivite göstermiştir. İki grup kendi arasında karşılaştırıldığında ise, AgNPs'lerin gram pozitif olan grupta, yani *S. aureus* bakterisinde daha etkili olduğu görülmektedir. Aynı zamanda maksimum inhibisyon çapı da *S. aureus* bakterisine ait 10 mM grubuna aittir. Buradan yola çıkıldığında, sentezlenen KA-AgNPs'lerin antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Zepon ve ark. tarafından yapılan çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Zepon vd., 2018).



Şekil 3.12. Farklı derişimlerde hazırlanan KA-AgNPs'lerin *S.aureus* ve *E.coli* bakterisi kullanılarak yapılan agar difüzyon testi sonuçları (KA: karragenan, SU: Steril su, A: Antibiyotik, 1 mM: 1 mM KA-AgNPs; 5 mM: 5 mM KA-AgNPs, 10 mM: 10 mM KA-AgNPs)

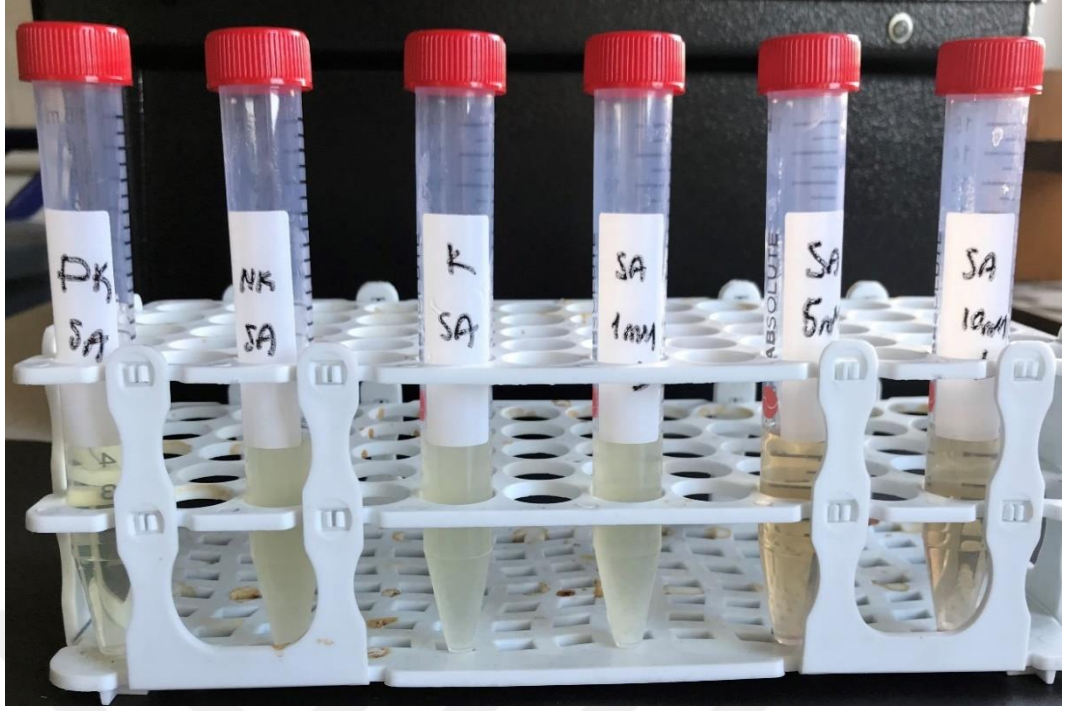
Genel olarak antimikrobiyal aktivite incelendiğinde, AgNPs'lerin bakterilerin hücre duvarlarına saldırarak yapıyı bozduğu düşünülmektedir. Burada parçacıkların mikroorganizma yapısını bozmasında NPs'lerin yüzey alanı ve elektrostatik etkileşimi doğrudan rol oynamıştır. Geniş yüzey alanına sahip nanoyapılar etkileşimi arttırmıştır (Seong vd., 2017).

Çizelge 3.2. *E.coli* ve *S.aureus* 'a ait inhibisyon çapları

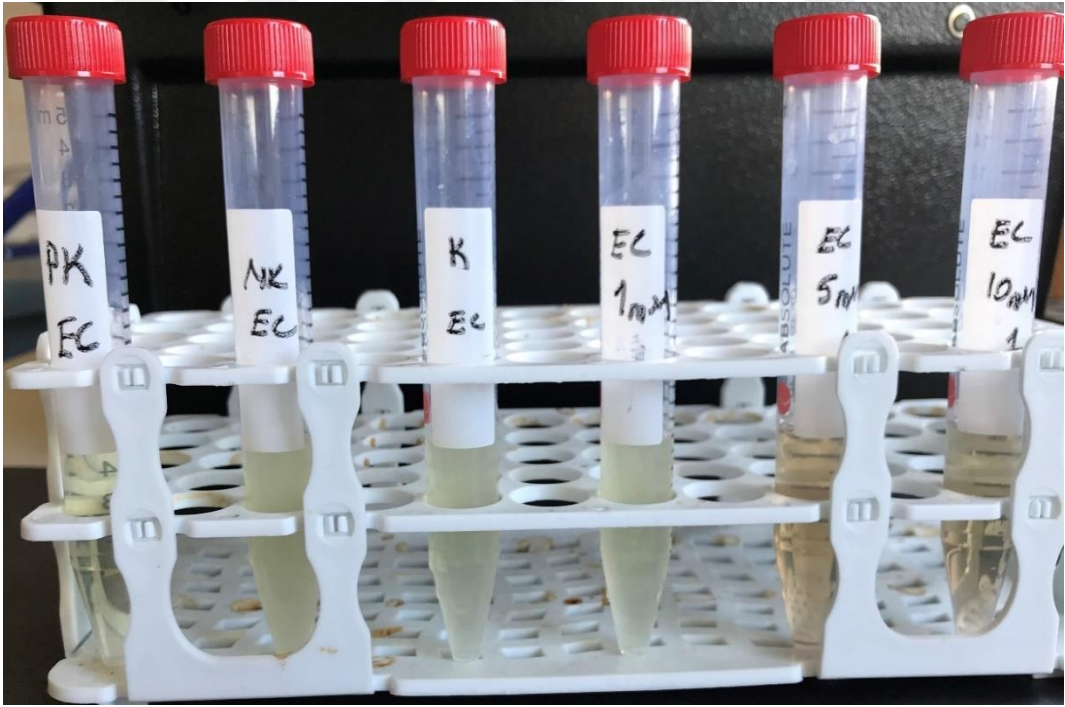
Örnekler	<i>E. coli</i> İnhibisyon Zonu (mm)	<i>S.aureus</i> İnhibisyon Zonu (mm)
Streptomisin	34,67±0,41	26,67±1,47
Negatif Kontrol (Steril su)	0	0
KA (% 0,35'lik)	0	0
1 mM KA-AgNPs	0	0
5 mM KA-AgNPs	11,33±0,41	15,67±0,44
10 mM KA-AgNPs	12,67±0,41	17,67±1,15

3.10.2. Sıvı Kültür Testi

Agar kuyucuk difüzyon testinin yanı sıra, sentezlenen KA-AgNPs'lerin antimikrobiyal etkinliği sıvı kültür testi ile de araştırılmıştır. Sıvı kültür test sonuçlarına göre, her iki bakteri çeşidi için de karragenanan ait antibakteriyel aktivite gözlemlenmezken, AgNPs grupları her iki bakteri türü içinde antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Şekil 13 ve Şekil 14). Fakat, *E.coli* ile yapılan çalışmada 1 mM'lık AgNPs grubunun herhangi bir etki göstermediği görülmüştür.

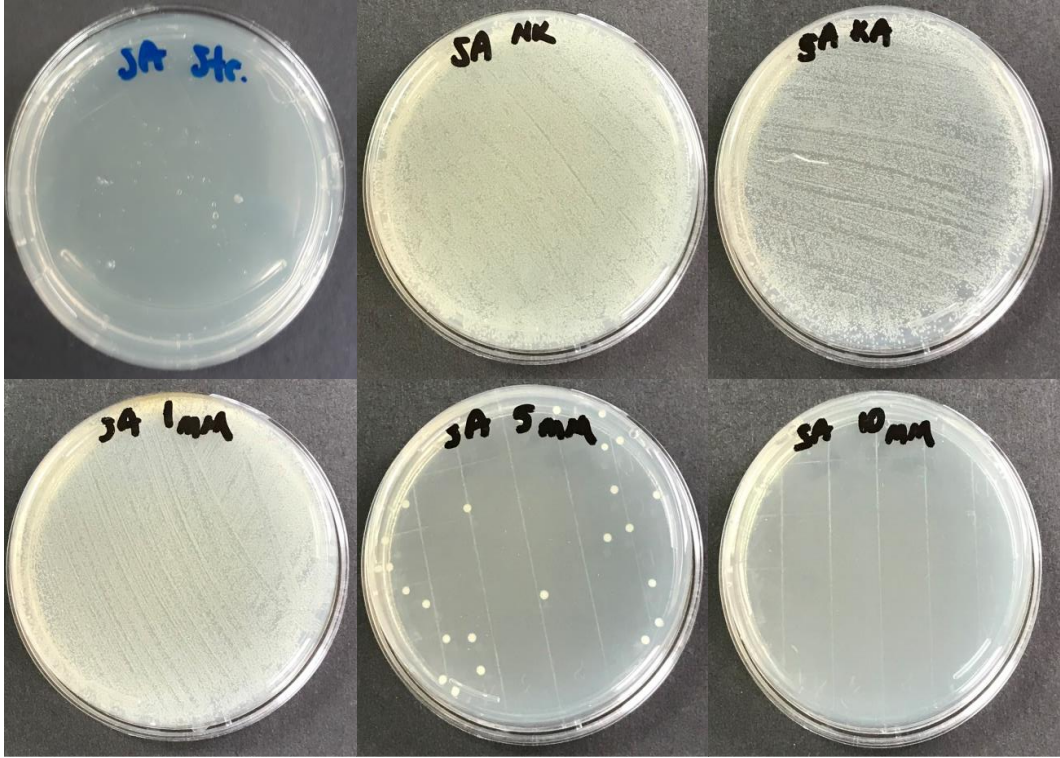
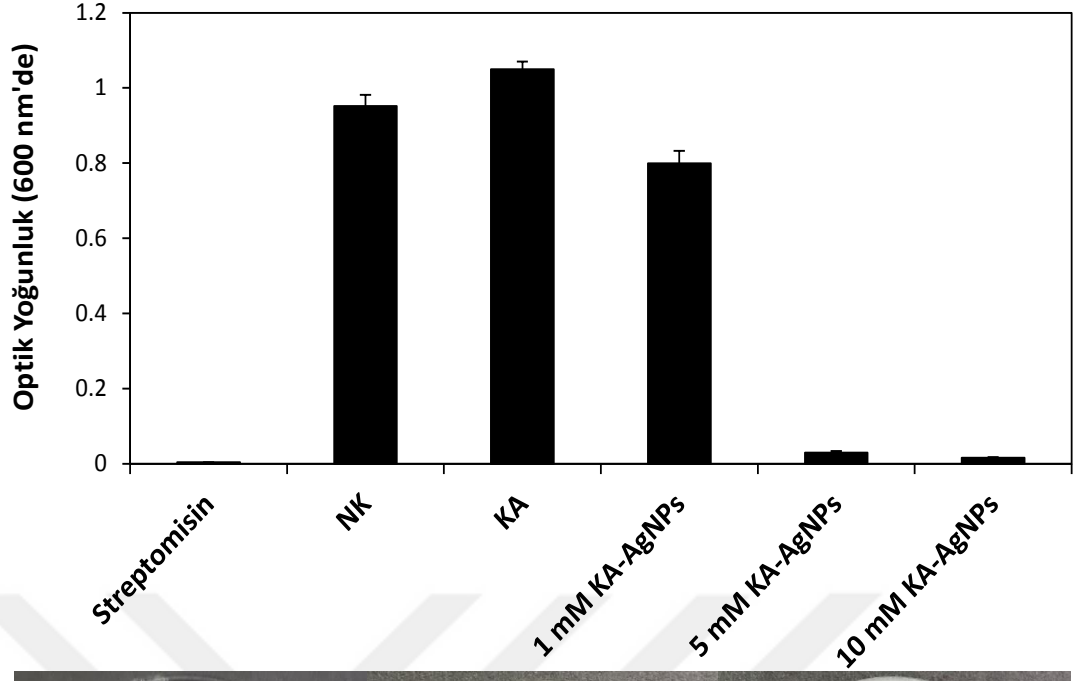


Şekil 3.13. *S.aureus* bakterisi için yapılan sıvı ortamda antimikrobiyal test sonuçları

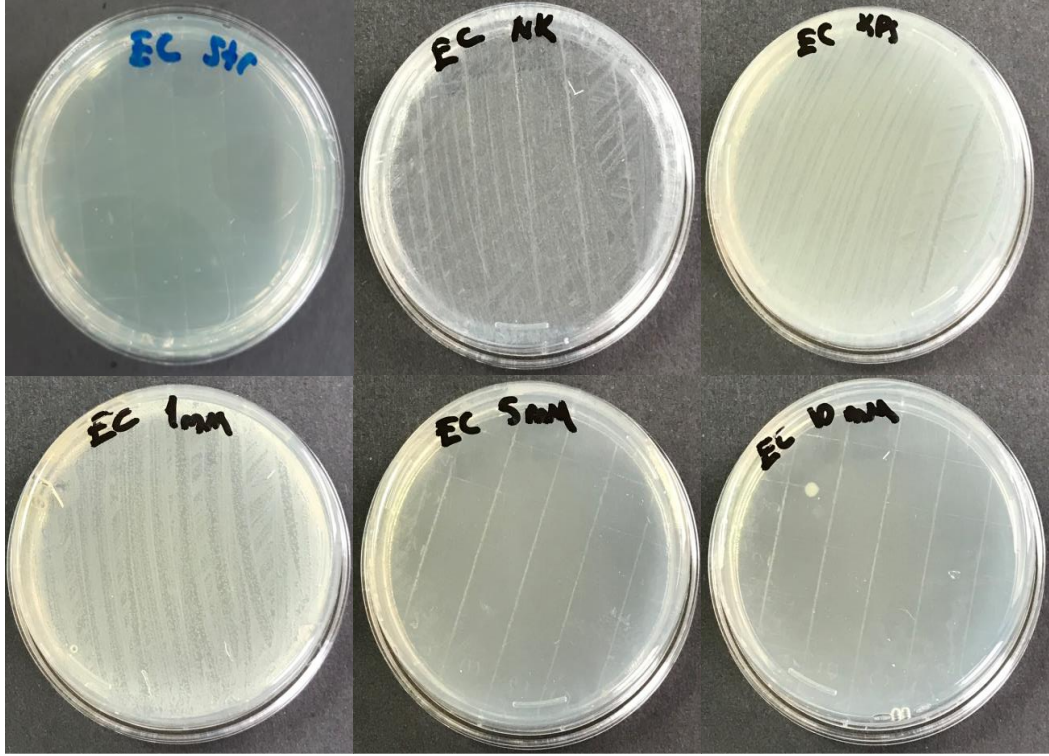
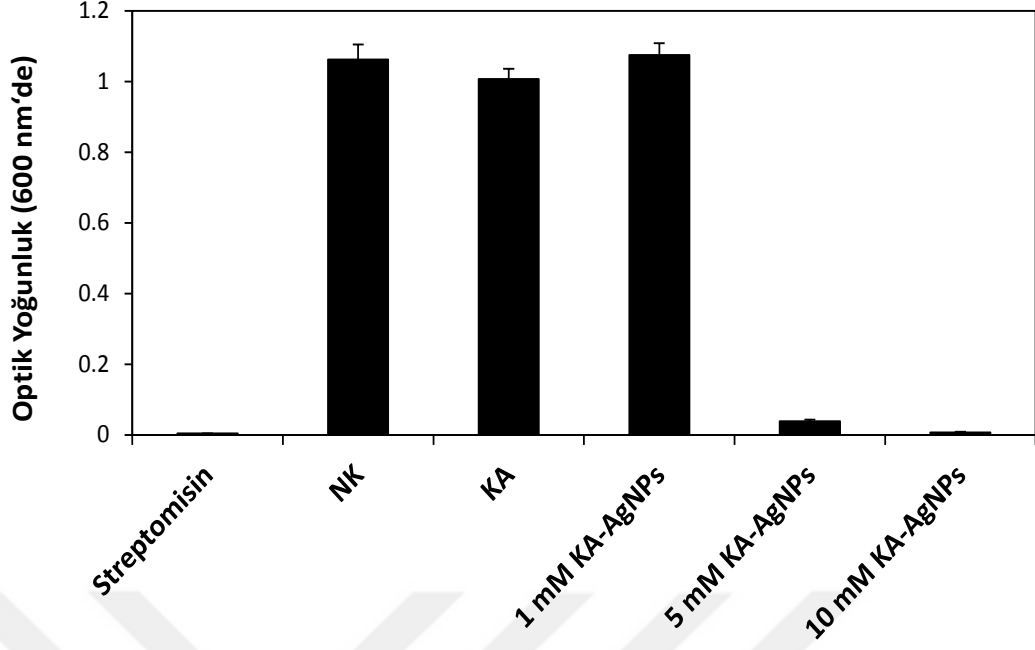


Şekil 3.14. *E.coli* bakterisi için yapılan sıvı ortamda antimikrobiyal test sonuçları

Bakteri kültürlerinin 24 saatlik inkübasyonundan sonra, her bir grup için 600 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçüm yapılmış ve bakteri kültürleri 10 kat seyreltilerek katı besiyerine ekimi yapılmıştır. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, oluşan koloniler incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.15 ve Şekil 3.16'da verilmiştir. Gruplara ait optik yoğunluklar ve katı kültürler karşılaştırıldığında, 5 ve 10 mM AgNPs'lerin gram negatif bakteri grubunda daha güçlü antimikrobiyal etki gösterdiği görülmüştür. Bunun sebebinin ise, bakterilerin hücre duvarları yapılarıyla alakalı olduğu düşünülmektedir. Gram pozitif bakterilerde çift peptidoglikan tabakalı kalın bir hücre duvarı bulunurken, gram negatif bakterilerde ince bir peptidoglikan tabakasıyla birlikte dış bir membran bulunmaktadır (Anitha vd., 2012). Bu sebeple *S. aureus* bakterisi daha kalın peptidoglikan tabakasına sahip olduğundan, hazırlanan nanoparçacıkları absorbe etmesi ve sitoplazmasına alması daha zordur (Pal vd., 2007). Bunun yanı sıra 1 mM KA-AgNPs grubunun *S. aureus* üzerinde bir miktar antimikrobiyal etkiye sahip olmasının yanı sıra, *E. coli* üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olmadığı da görülmüştür. Ayrıca 10 mM S-AgNPs grubunun sıvı kültür testinde de her iki bakteri türü için daha fazla antimikrobiyal etkiye sahip olduğu, hatta kullanılan antibiyotik kadar bakterileri öldürme etkinin olduğu hem OD ölçümleri hem de koloni oluşumu ile tespit edilmiştir.



Şekil 3.15. *S. aureus* bakterisine ait optik yoğunluk ölçüm sonuçları ve katı besiyerine aktarılan örneğin agar görüntüleri



Şekil 3.16. *E. coli* bakterisine ait optik yoğunluk ölçüm sonuçları ve katı besiyerine aktarılan örneğin agar görüntüleri

AgNPs'lerin bakterilerde görülen inhibisyon mekanizması net olarak bilinmemektedir. Bunu açıklarken şöyle bir yorum yapmak mümkündür; pozitif yüklü Ag^+ iyonları ya da AgNPs'lerin bakteriyel proteinlerle etkileşmesi sonucu bakteri DNA'sı fosfor ve sülfürle bağlanır. Böylece DNA replikasyonu olmaz ve

hücre ölümü gerçekleşir. Diğer bir yorum ise, AgNPs'lerin bakteriyel membranla etkileşmesi sonucu serbest radikallerin hasar meydana getirmesi ve membran permeabilitesinin artmasıyla hücre ölümünün meydana gelmesidir. Duran ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Duran vd., 2016).



4. SONUÇLAR

Bu çalışmada, karragenan polimeri hem indirgeyici hem kaplayıcı ajan olarak kullanılarak yeşil bir sentez yöntemi ile karragenan kaplı gümüş nanoparçacıklar başarılı bir şekilde sentezlenmiş, çevre dostu, ucuz ve ölçeklenebilir bir yöntem kullanılarak AgNPs sentezlenmesine yönelik çalışmalar sunulmuştur. Ayrıca, nanomalzeme alanında karbonhidrat polimerleri kullanılabileceğine, karragenan temelli gümüş nanoparçacıkların nanomateryal bazlı antimikrobiyal ilaçlarda umut verici bir uygulama metodu olduğuna dikkat çekilmektedir. Bu tez çalışmasında aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir;

- Literatürden hareketle üç yöntem denenmiş ve en uygun olan yöntemin ısı yöntemi olduğu görülmüştür. Bu sebeple çalışmada ısı ile nanoparçacık elde edilmiştir.
- Sentezlenen nanoparçacık gruplarının (1 mM, 5 mM, 10 mM) spektroskopik ölçümü yapılmış, 5 mM ve 10 mM gruplarında 1 mM grubuna kıyasla literatüre daha uygun AgNPs elde edildiği, Ag derişiminin artmasıyla absorbans değerlerinin de arttığı görülmüştür.
- Zeta potansiyeli analizi ile elde edilen AgNPs'lerin hepsinin zeta potansiyelinin negatif olduğu görülmüştür.
- SEM analizi ile homojen dağılımlı NP'ler elde edildiği ve Ag derişiminin artmasıyla NP boyut ve dağılımının nasıl değiştiği tespit edilmiştir.
- FTIR ile gümüş nanoparçacıklar ile karragenan etkileşimi irdelenmiş ve AgNPs yapısındaki fonksiyonel gruplar belirlenmiştir.
- EDS ile elemental dağılım açıklanmış ve gümüş varlığı gösterilmiştir.
- TGA analizi ile yalnızca KA'nın ve KA-AgNPs'lerin bozunma sıcaklıkları ve nanoparçacıkların KA ile kaplanmasıyla bozunma sıcaklığının nasıl değiştiği gösterilmiştir.
- XRD analizi ile yalnızca KA ve KA-AgNPs'lerin kristal yapısı incelenmiş ve AgNPs'lerin semikristalin yapıda olduğu görülmüştür.
- Stabilitate testi ile nanoparçacıkların suda ve tuzlu ortamda kararlılığı incelenmiştir.

- Üç nanoparçacık grubu için katı ve sıvı besiyeri ortamı kullanılarak antimikrobiyal aktivite tayini yapılmıştır. Her iki test ortamı için de *E.coli* ve *S. aureus* bakterileri kullanılmış, AgNPs'lerin kullanılan gram negatif ve gram pozitif bakteriler için antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.



KAYNAKÇA

- Abbaszadegan A, Ghahramani Y, Gholami A, et al. The effect of charge at the surface of silver nanoparticles on antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria: a preliminary study. *J Nanomater*, 16(1):53, 2015.
- Ahmad A, Mukherjee P, Senapati S, Mandal D, Khan MI, Kumar R, Sastry M Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Colloids Surf B Biointerfaces* 28: 313–318, 2003.
- Al-Alawi, A. A., Al-Marhubi, I. M., Al-Belushi, M. S. M., & Soussi, B. Characterization of carrageenan extracted from *Hypnea bryoides* in Oman. *Marine Biotechnology*, 13(5), 893–899, 2011.
- Aldalbahi, A., Nano-composite materials from carrageenan, conducting polymers and carbon nanotubes, PhD dissertation School of Chemistry: University of Wollongong, 2012.
- Anderson N. S., J. W. Campbell, M. M. Harding, D. A. Rees, and J.W. B. Samuel, “X-ray diffraction studies of polysaccharide sulphates: double helix models for κ - and ι -carrageenans,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 45, no. 1, pp. 85–97, 1969.
- Anderson, N. S. Carrageenans. Part 5. The masked repeating structures of lambda and mu-carrageenans. *Carbohydrate Research*, 7, 468–473, 1968.
- Anonim, Nanotechnology, <https://chembam.com/definitions/nanotechnology/> (Erişim Tarihi: 8 Aralık 2019).
- Apte, M., Girme, G., Nair, R., Bankar, A., Ravi Kumar, A., & Zinjarde, S. Melanin mediated synthesis of gold nanoparticles by *Yarrowia lipolytica*. *Materials Letters*, 95, 149–152, 2013.
- Aragoa A, Oliveira T, Quelemes P, Perfeito M, Araujo M, Santiago J, Silva D. Green synthesis of silver nanoparticles using the seaweed *Gracilaria birdiae* and their antibacterial activity. *Arabian Journal of Chemistry*, 2016.
- Asanithi, P. et al., Growth of silver nanoparticles by DC magnetron sputtering. *J. Nanomater*. 2012, 963609–963616, 2012.

- Asharani, P.V., Hande, M.P., Valiyaveetil, S., Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biol.* 10, 65, 2009.
- AshaRani, P.V., Mun, G.L.K., Hande, M.P., Valiyaveetil, S., 2009. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* 3, 279–290.
- Barbeyron, T., Michel, G., Potin, P., Henrissat, B., & Kloareg, B., ι -Carrageenases constitute a novel family of glycoside hydrolases, unrelated to that of κ -carrageenases. *Journal of Biological Chemistry*, 275(45), 35499–35505, 2000.
- Bhattacharyya S., A. Borthakur, P.K. Dudeja, J.K. Tobacman, *J. Nutr.* 138, 469–475, 2008.
- Bhattacharyya, S., Borthakur, A., Dudeja, P. K., & Tobacman, J. K. Carrageenan induces cell cycle arrest in human intestinal epithelial cells in vitro. *Journal of Nutrition*, 138, 469–475, 2008.
- Binns, Chris. *Introduction to Nanoscience and Nanotechnology*. Hoboken: Wiley, 2010.
- Blaser SA, Scheringer M, MacLeod M, Hungerbühler K., Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to Ag: contribution of nano-functionalized plastics and textiles. *Sci Total Environ* 390:396–409, 2008.
- Caceres, P. J., Carlucci, M. J., Damonte, E. B., Matsuhira, B., & Zuniga, E. A. Carrageenans from Chilean samples of *Stenogramme interrupta* (Phylloporaceae): structural analysis and biological activity. *Phytochemistry*, 53, 81–86, 2000.
- Carlucci, M. J., Scolaro, L. A., & Damonte, E. B. Inhibitory action of natural carrageenans on herpes simplex virus infection of mouse astrocytes. *Chemotherapy (Basel)*, 45, 429–436, 1999.
- Chiovitti, A., Bacic, A., Craik, D. J., Kraft, G. T., Liao, M.-L., Falshaw, R., et al. A pyruvated carrageenan from Australian specimens of the red alga *Sarcocystis filiforme*. *Carbohydrate Research*, 310, 77–83, 1998.
- CLSI M7- A7, *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, 2006.

- Coviello T., Matricardi P., Marianecchi C., Alhaique F.J., *Control. Release* 119, 5–24, 2007.
- Dai W.G., Dong L.C., Y.Q. Song, *Int. J. Pharm.* 342, 201–207, 2007.
- Daniel MC, Astruc D., Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem Rev.* 104, 293–346, 2004.
- Drexler, K. Eric. *Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology*. New York: Anchor, 1986.
- Drosg B., Fritz I., Gattermayr F., Silvestrini L., *Chem. Biochem. Eng. Q.* 29, 145–156, 2015.
- Durán N., Durán M., Jesus M.B., Seabra A.B., Fávares W.J., Nakazato G., Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 12, 789–799, 2016.
- Elsupikhe R.F., Shameli K., Ahmad Mansor B, Ibrahim N.A., Zainudin N., Green sonochemical synthesis of silver nanoparticles at varying concentrations of κ carrageenan. *Nanoscale Research Letters* 10,302, 2015.
- Farhadi S., B. Ajerloo, A. Mohammadi, Green biosynthesis of spherical silver nanoparticles by using date palm (*Phoenix dactylifera*) fruit extract and study of their antibacterial and catalytic activities, *Acta Chim. Slov.* 64, 129–143, 2017.
- Foldbjerg, R., Olesen, P., Hougaard, M., Dang, D.A., Hoffmann, H.J., Autrup, H., PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicol. Lett.* 190, 156–162, 2009.
- Frattini A, Pellegrini N, de Nicastro Dand, Sanctis O, First principles study of the adsorption of NH_3 on Ag surfaces. *Mater Chem Phys*, 94,148–152, 2005.
- Frattini A, Pellegrini N, Nicastro D, de Sanctis O, Effect of amine groups in the synthesis of Ag nanoparticles using aminosilanes. *Mater Chem Phys* 94:148–152, 2005.
- Funami, T., Hiroe, M., Noda, S., Asai, I., Ikeda, S., & Nishinarib, K. Influence of molecular structure imaged with atomic force microscopy on the

- rheological behavior of carrageenan aqueous systems in the presence or absence of cations. *Food Hydrocolloids*, 21, 617–629, 2007.
- Gao J, Youn S, Hovsepyan A, Llaneza VL, Wang Y, Bitton G, Bonzongo JC Dispersion and toxicity of selected manufactured nanomaterials in natural river water samples: effects of water chemical composition. *Environ Sci Technol* 43:3322–3328, 2009.
- Goebel, H.H., Muller, J., Ultrastructural observations on silver deposition in the choroid plexus of a patient with argyria. *Acta Neuropathol.* 26, 247–251, 1973.
- Gurunathan, S.; Choi, Y.Z.; Kim, J.H. Antibacterial efficacy of silver nanoparticles on endometritis caused by *Prevotella melaninogenica* and *Arcanobacterium pyogenes* in dairy cattle. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 1210.
- He, H., Tao, G., Wang, Y., Cai, R., Guo, P., Chen, L., Zuo, H., Zhao, P., Xia, Q., In situ green synthesis and characterization of sericin-silver nanoparticle composite with effective antibacterial activity and good biocompatibility. *Mater. Sci. Eng. C*, 80, 509–516, 2017.
- Heath J. Size-dependent surface-plasmon resonances of bare silver particles. *Phys Rev B: Condens Matter.* 40(14):9982–85, 1989.
- Hilliou, L. Chapter Two- Hybrid Carrageenans: Isolation, Chemical Structure, and Gel Properties. In S.-K. Kim (Vol. Ed.), *Advances in Food and Nutrition Research: Vol. 72*, pp. 17–43, 2014.
- Hong, J.S., Kim, S., Lee, S.H., Jo, E., Lee, B., Yoon, J., et al., Combined repeated-dose toxicity study of silver nanoparticles with the reproduction/developmental toxicity screening test. *Nanotoxicology* 8, 349–362, 2014.
- Hosseinidoust, Z.; Basenet, M.; van de Ven, T.G.; Tufenkji, N. One-pot green synthesis of anisotropic silver nanoparticles. *Environ. Sci. Nano*, 3, 1259–1264, 2016.
- Hurtado, A. Q., Neish, I. C., & Critchley, A. T., Developments in production technology of *Kappaphycus* in the Philippines: more than four decades of farming. *Journal of Applied Phycology*, 27(5), 1945–1961, 2015.
- Jiao G., Yu G., Zhang J., Ewart H.S., *Mar. Drugs* 9, 196–223, 2011.

- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA Sixty-eighth Meeting: summary and conclusions. Geneva, June 19–28, 2007.
- Jouanneau, D., Guibet, M., Boulenger, P., Mazoyer, J., Smietana, M., & Helbert, W., New insights into the structure of hybrid κ -/ μ -carrageenan and its alkaline Conversion, *Food Hydrocolloids*, 24(4), 452–461, 2010.
- Jung K.A., Lim S., Kim Y., Park J.M., *Technology* 135, 182–190, 2013.
- Kam E.L.V., Vry J.D., Schiene K., Tzschentke T.M., *Pain* 136, 373–379, 2008.
- Karn B, Kuiken T, Otto M., Nanotechnology and in situ remediation: a review of the benefits and potential risks. *Environ Health Perspect* 117, 1813–1831, 2009.
- Kholoud, M.M. et al. Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arab. J. Chem.* 3, 135–140, 2010.
- Kim, J. K., Yarish, C., Hwang, E. K., Park, M., & Kim, Y., Seaweed aquaculture: cultivation technologies, challenges and its ecosystem services. *ALGAE*, 32(1), 1–13, 2017.
- Kim, Y.S., Kim, J.S., Cho, H.S., Rha, D.S., Kim, J.M., Park, J.D., et al., Twenty-eightday oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhal. Toxicol.* 20, 575–583, 2008.
- Knutsen, S. H., & Grasdalen, H., Analysis of carrageenans by enzymatic degradation, gel filtration, and ¹H NMR spectroscopy. *Carbohydrate Polymer*, 19, 199–210, 1992.
- Kora, A.J.; Sashidhar, R.; Arunachalam, J.; Kora, D.A.J. Aqueous extract of gum olibanum (*Boswellia serrata*): A reductant and stabilizer for the biosynthesis of antibacterial silver nanoparticles. *Process. Biochem.* 47, 1516–1520, 2012.
- Kraan S., Algal polysaccharides, novel applications and outlook, In Chuan-Fa Chang (Ed.), *Carbohydrates; Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotech-nology*, 1st ed., vol. 99, 489–532, 2012.
- Lai VMF, Wong PA-L, Lii C-Y., Effects of cation properties on sol-gel transition and gel properties of κ -carrageenan, *Journal of Food Science* 65, 1332–1337, 2000.

- Larotonda, Torres, Goncalves, Sereno, & Hilliou, 2016; Souza, Hilliou, Bastos, & Gonçalves, 2011.
- Li XY, Liu B, Ye WJ, Wang XY, Sun RC. Effect of rectorite on the synthesis of Ag NP and its catalytic activity. *Mater Chem Phys.* 151:301–07, 2015.
- Liang A., J. China, *Chin. Mater. Med.* 34, 512–514, 2009.
- Liew JWY, Loh KS, Ahmad A, Lim KL, Wan Daud WR, Synthesis and characterization of modified κ -carrageenan for enhanced proton conductivity as polymer electrolyte membrane. *PLoS ONE* 12(9): e0185313, 2017.
- Liu, J., Sonshine, D.A., Shervani, S., Hurt, R.H., Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces. *ACS Nano* 4, 6903–6913, 2010.
- Lorenz C, Hagendorfer H, von Goetz N, Kaegi R, Gehrig R, Ulrich A, Scheringer M, Hungerbühler K., Nanosized aerosols from consumer sprays: experimental analysis and exposure modeling for four commercial products. *J Nanopart Res* 13:3377–3391, 2011.
- Loureiro, R. R., Cornish, M. L., & Neish, I. C. Applications of Carrageenan: With Special Reference to Iota and Kappa Forms as Derived from the Eucheumatoid Seaweeds. In A. Q. Hurtado, A. T. Critchley, & I. C. Neish (Eds.). *Tropical Seaweed Farming Trends, Problems and Opportunities: Focus on Kappaphycus and Eucheuma of Commerce* pp. 165–171, 2017.
- Loureiro, R. R., Hurtado, A. Q., & Critchley, A. T. Impacts of AMPEP on Epiphytes and Diseases in Kappaphycus and Eucheuma Cultivation. In A. Q. Hurtado, A. T. Critchley, & I. C. Neish (Eds.). *Tropical Seaweed Farming Trends, Problems and Opportunities: Focus on Kappaphycus and Eucheuma of Commerce* pp. 111–119, 2017.
- Luo YQ, Shen SQ, Luo J, Wang XY, Sun RC. Green synthesis of silver nanoparticle in xylan solution via Tollens reaction and its detection for Hg²⁺. *Nanoscale.* 7:690–700, 2015.
- M.J. Haider, M.S. Mehdi, Study of morphology and zeta potential analyzer for the silver nanoparticles, *Int. J. Sci. Eng. Res.* 5, 81–385, 2014.
- Mahalik N.P., *Micromanufacturing and Nanotechnology*, Springer, 2006.

- Makino K., Idenuma R., Murakami T., Ohshima H., *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 20, 355–359, 2001.
- Mandal D, Kumar Dash S, Das B, et al. Bio-fabricated silver nanoparticles preferentially targets Gram positive depending on cell surface charge. *Biomed Pharmacother*, 83:548–558, 2016.
- Matsumoto M., Yokouchi H., Suzuki N., Ohata H., Matsunaga T., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 105, 247–254, 2003.
- Mccandless, E. L., West, J. A., & Guiry, M. D., Carrageenan patterns in the Giartinaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 10, 275–284, 1982.
- McHugh, D. J., *A guide to the seaweed industry*. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2003.
- Michel A-S, Mestdagh MM, Axelos, MAV Physico- chemical properties of carrageenan gels in presence of various cations. *International Journal of Biological Macromolecules* 21, 195–200, 1997.
- Minghou, J., *Processing and extraction of phycocolloids*. Regional Workshop on the Culture and Utilization of Seaweeds, 1990.
- Morais, C., Do Valle, J. L. E., & Pizzinato, A., *Colet. ITAL Campinas*, Vol. 19, pp. 12–24, 1989.
- Morris Christopher, J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods in Molecular Biology*, 225, 115–121, 2003.
- Murata M., Nakazoe J., *JARQ-Jpn. Agric. Res. Q.* 35, 281–290, 2001.
- Murty B. S., Ramsden, Jeremy, *Textbook of Nanoscience and Nanotechnology*. Elsevier, 2016.
- Murty B.S., Shankar P., *Textbook of Nanoscience and Nanotechnology*, Springer, 2013.
- Nair B, Pradeep T, Coalescence of nanoclusters and formation of submicron crystallites assisted by Lactobacillus strains. *Cryst Growth Des* 2, 293–298, 2002.
- Necas J., Bartosikova L., *Vet. Med.* 58, 187–205, 2013.
- Nel, A., Xia, T., Madler, L., Li, N., Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311, 622–627, 2006.

- Noguez C, Surface plasmons on metal nanoparticles: the influence of shape and physical environment. *J Phys Chem B* 111:3306–3819, 2007.
- Pardonche, P. E., Aplicação de extratos de algas marinhas na indústria de alimentos. *Boletim técnico CECA Produtos Químicos S/A* p. 15, 1985.
- Pereira L, Amado AM, Critchley AT, Van de Velde F, Ribeiro-Claro PJ., Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman). *Food Hydrocolloids*. 23(7):1903–09, 2009.
- Population Council, Microbicides Program. Online Population Council News, February 18, 2008.
- Pourjavadi A, Harzandi A, Hosseinzadeh H. Modified carrageenan 3. Synthesis of a novel polysaccharide-based superabsorbent hydrogel via graft copolymerization of acrylic acid onto kappa-carrageenan in air. *Eur Poly J*. 40(7):1363–70, 2004.
- Prajapati, V. D., Maheriya, P. M., Jani, G. K., & Solanki, H. K., Carrageenan: A natural seaweed polysaccharide and its applications. *Carbohydrate Polymers*, 105, 97–112, 2014.
- Prosperi D., Colombo M., Negatively charged silver nanoparticles with potent antibacterial activity and reduced toxicity for pharmaceutical preparations, *Int. J. Nanomed.* 12, 2517–2530, 2017.
- Ramakrishnan, S., & Prud'homme, R. K. Effect of solvent quality and ions on the rheology and gelation of k-carrageenan. *Journal of Rheology*, 44, 885–896, 2000.
- Reddy G.K.M. Shobharani K., Satla, Switi Gaikwad, *Asian. J. Pharm. Sci.* 6, 275–286, 2011.
- Remita S, Fontaine P, Lacaze E, Borensztein Y, Sellame H, Farha R. X-ray radiolysis induced formation of silver nano-particles: A SAXS and UV-visible absorption spectroscopy study. *NuclInstr Meth Phys Res B*., 263(2):436–40, 2007.
- Rogers, Ben, Sumita Pennathur, and Jesse Adams. *Nanotechnology: Understanding Small Systems*. 2nd ed. Boca Raton: CRC, 2011.
- Rowe R.C., Sheskey P.J., M.E. Quinn, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Pharmaceutical Press, London, 2009.

- Rudolph B., Seaweed product: Red algae of economic significance. In R. E. Martin, E. P. Carter, L. M. Davis, & G. J. Flich (Eds.), *Marine and freshwater products handbook*, 515–529, 2000.
- Salvioni L., Galbiati E., Collico V., G. Alessio, S. Avvakumova, F. Corsi, P. Tortora, Seong M, Lee DG. Silver nanoparticles against *Salmonella enterica* serotype typhimurium: role of inner membrane dysfunction. *Curr Microbiol.*, 74(6):661–670, 2017.
- Shameli K, Ahmad MB, Jazayeri SD, Sedaghat S, Shabanzadeh P, Jahangirian H, et al. Synthesis and characterization of polyethylene glycol mediated silver nanoparticles by the green method. *Int J Mol Sci.*,13(6):6639–50, 2012.
- Shameli K, Ahmad MB, Jazayeri SD, Shabanzadeh P, Sangpour P, Jahangirian H, et al. Investigation of antibacterial properties silver nanoparticles prepared via green method. *Chem Cent J.*, 6(73):1–10, 2012.
- Shankar SS, Rai A, Ahmad A, Sastry M, Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core–Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth. *J Colloid Interface Sci* 275, 496–502, 2004.
- Sharma, D.; Ledwani, L.; Bhatnagar, N. Antimicrobial and cytotoxic potential of silver nanoparticles synthesized using *Rheum emodi* roots extract. *Ann. West. Univ. Timisoara*, 24, 121–135, 2015.
- Silva F.R.F., Dore C.M.P.G., C.T. Marques, M.S. Nascimento, N.M.B. Benevides, H.A.O. Rocha, et al., *Carbohydr. Polym.* 79, 26–33, 2010.
- Simon P, Chaudhry Q, Bakos D., Migration of engineered nanoparticles from polymer packaging to food a physicochemical view. *J Food Nutr Res* 47,105–113, 2008.
- Skebo, J.E., Grabinski, C.M., Schrand, A.M., Schlager, J.J., Hussain, S.M., Assessment of metal nanoparticle agglomeration, uptake and interaction using high-illuminating system. *Int. J. Toxicol.* 26, 135–141, 2007.
- Stanley N., “Production, properties and uses of carrageenan. Production and utilization of products from commercial seaweeds,” *FAO Fisheries Technical Paper 288*, FAO, Rome, Italy,1987.
- Stanley N., *FAO Corporate document repository*, chapter 3: Production, properties and uses of carrageenan, 2014.

- Stanley N., Production and utilization of products from commercial seaweeds. In D. J. McHugh (Ed.), *FAO fisheries technical paper* (Vol. 288), 116–146, 1987.
- Stanley, N., Production, properties and uses of carrageenan. *Production and utilization of products from commercial seaweeds. FAO Fisheries Technical Paper 288*. Rockland, USA: FAO116–146, 1987.
- Sulabha K. Kulkarni, *Nanotechnology: Principles and Practices*, Third Edition, Springer, 2015.
- Swihart MT., Vapor-phase synthesis of nanoparticles. *Curr Opin Colloid Interface Sci*. 8, 127–133, 2003.
- Thakkar KN, Mhatre SS, Parikh RY, Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomed Nanotechnol Biol Med* 6, 257–262, 2010.
- Tien, D. et al., Discovery of ionic silver in silver nanoparticle suspension fabricated by arc discharge method. *J. Alloys Compd.* 463, 408–411, 2008.
- Tobacman, J. K., Review of harmful gastrointestinal effects of carrageenan in animal experiments. *Environmental Health Perspectives*, 109, 983–994, 2001.
- Turkevich, J., Stevenson, P. C., and Hillier, J., A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* 55, 75, 1951.
- Valderrama, D., Cai, J., Hishamunda, N., & Ridler, N., Social and economic dimensions of carrageenan seaweed farming. *Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 580*, 2013.
- Van de Velde, F., & De Ruiter, G. A., Carrageenan. In A. Steinbüchel, S. De Baets, & E. J. van Damme (Eds.). *Biopolymers* (pp. 245–274). Weinheim, Germany: Wiley-VCH Vol. Polysaccharides II: Polysaccharides from Eukaryotes, 2002.
- Van De Velde, F., Knutsen, S. H., Usov, A. L., Rollema, H. S., & Cerezo, A. S. 1H and 13C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: Application in research and industry. *Trends in Food Science & Technology*, 13, 73–92, 2002.

- Van Der Wal A, Norde W, Zehnder AJB, Lyklema J. Determination of the total charge in the cell walls of Gram-positive bacteria. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 9(1–2):81–100, 1997.
- Wallace, W.E., Keane, M.J., Murray, D.K., Chisholm, W.P., Maynard, A.D., Ong, T.M., Phospholipid lung surfactant and nanoparticle surface toxicity: lessons from diesel soots and silicate dusts. *J. Nanopart. Res.* 9, 23–38, 2007.
- Walser T, Demou E, Lang DJ, Hellweg S., Prospective environmental life cycle assessment of nanosilver T-shirts. *Environ Sci Technol* 45: 4570–4578.
- Weinbreck F., Nieuwenhuijse H., Robijn G.W., C.G. de Kruif, *Langmuir* 19, 9404–9410, 2003.
- Weiner M.L., *Inflamm. Res.* 32, 46–51, 1991.
- Wided N., Robert D., Brian S., *Chemico-Biological Interactions* 295, 1–12, 2018.
- Xia, X.; Zeng, J.; Moran, C.H.; Xia, Y. Recent developments in shape-controlled synthesis of silver nanocrystals. *J. Phys. Chem. C*, 116, 21647–21656, 2012.
- Yuan YG, Peng QL, Gurunathan S. Effects of silver nanoparticles on multiple drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from mastitis-infected goats: an alternative approach for antimicrobial therapy. *Int J Mol Sci.* 2017;18(3):569.
- Zepon K, Marques M, Paula M, Morisso F, Kanis L. Facile, green and scalable method to produce carrageenan-based hydrogel containing in situ synthesized AgNPs for application as wound dressing. *International Journal of Biological Macromolecules* 113, 51–58, 2018.
- Zhang Q.B., N. Li, X.G. Liu, Z.Q. Zhao, Z.E. Li, Z.H. Xu, *Carbohydr. Res.* 339, 105–111, 2004.
- Zia K.M., Tabasum S., Nasif M., Sultan N, Aslam N., Noreen A., Zuber M., A review on synthesis, properties and applications of natural polymer based carrageenan blends and composites, *International Journal of Biological Macromolecules* 96, 282–301, 2017.