

Esnek Yapılı PVA/SA/PEG-KY Hidrojellerinin Sentezlenmesi ve Antibakteriyel Özelliklerinin incelenmesi

Cihangir Boztepe^{1*}

¹Biyomedikal Mühendisliği / Mühendislik Fakültesi, İnönü Üniversitesi, Türkiye

*(cihangir.boztepe@inonu.edu.tr)

Özet – Bitkilerden elde edilen aromatik uçucu yağların yapısında bulunan uçucu bileşenlerin çevre koşullarından etkilenerek kaybolması uçucu yağın özelliklerinin yitirilmesine neden olmaktadır. Bu durumun üstesinden gelebilmek için uçucu yağların kapsüllemesi (kaplanması) en etkin çözüm yollarından birisidir. Bu yöntem uçucu yağa adeta kalkan görevi görerek onun stabilitesinin korunmasını, besinsel kaybının azaltılmasını ve kontrollü salım yeteneğinin geliştirilmesini sağlar. Başta gıda ve sağlık olmak üzere pek çok alanda kullanım potansiyeline sahip olan karanfil yağının sahip olduğu antioksidan, anti bakteriyel, analjezik ve anti-kanser özelliklerinin korunması için kaplanarak kullanılması endüstriyel ve bilimsel açıdan çok önemlidir. Bu çalışmada polietilen glikol (PEG) ile kaplanmış karanfil yağı, gluteraldehit (GA) ile çapraz bağlı polivinil alkol/sodyum aljinat (PVA/SA) hidrojeline yüklenerek elde edilen hidrojel kompozit sistemin Staphylococcus aureus (SA), Bacillus cereus (BC), Escherichia coli (EC) ve Salmonella spp. (S) bakterilerine karşı oyuk agar yöntemi ile antibakteriyel özellikleri incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler – Hidrojel, Antibakteriyel Test, Karanfil Yağı, Kapsülasyon, PVA

I. GİRİŞ

Patojen ve bozucu mikroorganizmaları yok etmek için kullanılan antibiyotiklerin aşırı ve yanlış kullanımı mikroorganizmalarda direnç sorununa neden olur. Ne yazık ki mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı direnci her geçen gün artmaktadır. Bu sorunu çözmek için uzmanlar mikroorganizmaları yok etmenin alternatif yollarını aramaya başladılar [1]. Bu alternatiflerin başında şifalı bitkiler gelmektedir. Bitki uçucu yağları arasında karanfil yağı (KY), antioksidan, anti bakteriyel, analjezik ve anti-kanser biyolojik aktiviteleri nedeniyle gıda ve sağlık endüstrisinde çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır. Karanfilin ham esansiyel yağı, ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından güvenli olarak sınıflandırılmıştır ve gıda endüstrisinde tatlandırıcı bir katkı maddesi olarak yaygın şekilde kullanılır. Karanfil yağının, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa ve Escherichia coli gibi başlıca insan patojenleri dâhil olmak üzere hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilere karşı geniş bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir [2].

Araştırmacılar, sağlık hizmetlerinde uçucu yağların etkili ve güvenli kullanımını sağlamak için bu bitkilere bilimsel ilgi toplamaktadır. Bu nedenle uçucu yağların çalışma mekanizmalarının ve kullanım dozlarının belirlenmesi öne çıkan çalışma başlıklarından biridir. Bitki esansiyel yağlar (EO'lar), mikroorganizmaların hücre zarı, genetik materyal ve enzim sistemlerindeki fosfolipit çift katmanını yok ederek antimikrobiyal aktivite gösterirler. Ayrıca bu yağların minör ve majör bileşenleri de antimikrobiyal kapasiteleri üzerinde etkilidir [3]. Yıllar boyunca, literatürde uçucu yağlarla ilgili birçok araştırma yer almakta olup, bunların çoğu kimyasal bileşim, antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteler üzerine odaklanmıştır. Ancak uçucu yağların, sıcaklık, oksijen ve ışık gibi olumsuz çevre koşullarına karşı yüksek uçuculukları ve duyarlılıkları nedeniyle kapsülleme veya hidrojel sistemi gibi koruyucu etkilere ihtiyacı vardır [4].

Hidrojeller, sulu ortamda kuru ağırlıklarının yüzlerce katı kadar şişebilen, üç boyutta birbirine fiziksel veya kimyasal olarak bağlı polimerik ağ

yapılardır. Biyoyumlulukları, yüksek şişme yetenekleri ve tahriş edici olmayan yapıları nedeniyle farklı mühendislik alanlarında (örneğin biyomedikal, kimya, gıda ve elektronik), tıp, biyoteknoloji ve diğer disiplinlerde potansiyel uygulamaları vardır [5]. Hidrojel bazlı kontrollü dağıtım sistemlerinin tasarımı ve geliştirilmesi son yıllarda büyük ilgi görmüştür. Bu malzemeler, ilaç salım sistemlerinin geliştirilmesinden antimikrobiyal malzemelere kadar çeşitli uygulamaları kolaylaştırır [6].

Poli(vinil alkol) (PVA), tekrarlanan vinil alkol birimlerinden oluşan bir polimerdir. PVA tabanlı hidrojeller biyomedikal uygulamalar için ideal özelliklere sahiptir. İlk olarak, PVA hidrojelleri in vivo uygulamalarda iyi bir biyoyumluluk sergiler ki hidrojeller vücuda alındığında normal vücut hücreleri üzerinde herhangi bir yan etkisinin olmayacağını gösterir. Ek olarak, bu hidrojeller mikro yapı, Young modülü ve biyolojik dokularla karşılaştırılabilir deformasyon özellikleri gibi fiziksel özelliklere sahiptir. Bu da bu tür hidrojellerin biyomedikal uygulamalar ideal olduğu anlamına gelir. PVA hidrojelleri, kontrollü ilaç salım sistemleri olarak kullanım da dâhil olmak üzere çok sayıda biyomedikal uygulama için araştırılmaktadır [7].

Kompozit yapıları hidrojellerin geliştirilmesi, bileşen malzemelerin her birinin özelliklerini hidrojel çerçevesine dâhil etme yeteneklerinden dolayı ilgi çekici hale gelmiştir. Son yıllarda, gözenekli, mekanik olarak güçlü, yüksek oranda gerilebilir, yüksek oranda şişebilir, biyoyumlu, biyolojik olarak parçalanabilir ve toksik olmayan özelliklere sahip hidrojellerin geliştirilmesi, kontrollü ilaç salınımı, yara örtü malzemeleri, sensörler vb. gibi biyomedikal uygulamalar için büyük ilgi görmüştür. Sentetik polimerlerin yapısına doğal polimerler eklenerek mekanik, biyoyumluluk ve biyobozunurluk özellikleri geliştirilebilir. Sodyum aljinat, yüksek moleküler ağırlığa, suda çözünürlüğe ve su tutma kapasitesine sahip D-mannuronik asit ve L-glukuronik asit birimlerinden oluşan doğal bir polimerdir. Yüksek moleküler ağırlıklı (10–1000 kDa) bir doğal polimer türü olan aljinat, hidrojellerin mekanik mukavemetini artırmak için kullanılan popüler bir iç içe geçmiş ağ yapıları hidrojel (IPN) ajanıdır. Bu ajan sayesinde polimerlere uygulanan kuvvetin tüm yapıya üniform dağılımı sağlanarak hidrojelin mekanik stabilitesi artırılır [8].

Poli(etilen glikol) (PEG), biyolojik aktiviteyi korumak, stabiliteyi arttırmak, biyoaktif bileşiklerin toksisitesini azaltmak, gözenekli ve yarı IPN yapıları hidrojeller elde için etmek için kullanılan popüler bir polimerdir. PEG'in bileşiklere bağlanmaya eğilimli fonksiyonel gruplara sahip olması nedeniyle son yıllarda biyoaktif bileşiklerin verimliliğini artırmak için yüzeylerinin polietilen glikol (PEGilasyon) ile kaplanması yaygın olarak tercih edilen bir yöntemdir [9].

Glutaraldehit (GA) çapraz bağlayıcısının kullanımı, biyo esaslı hidrojellerin hazırlanması için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. GA yüksek reaktiviteye sahiptir ve hem ucuzdur hem de kolayca bulunur. GA aynı zamanda farmasötik bilimler enzim teknolojisi, histokimya, biyomedikal uygulamalar ve kimyasal sterilizasyonda da kullanılmaktadır. Aldehitler grubundan organik kimyasal bir bileşiktir. PVA tabanlı hidrojellerin üretilmesinde yaygın çapraz bağlayıcı olarak kullanılan GA, PVA zincirleri üzerindeki hidroksil grupları arasında kovalent asetal bağlar oluşturabilen iki adet işlevsel aldehit grubuna sahiptir [10].

Bu çalışmada, yapısında PEG ile kaplanmış karanfil yağı içeren, GA ile çapraz bağlı PVA/SA/PEG-KY hidrojel kompozit sistem sentezlenmiş, bu hidrojellerin anti bakteriyel özellikleri araştırılmıştır.

II. MATERYAL VE YÖNTEM

A. Kullanılan Malzemeler

Polivinil alkol (PVA) ve Poli(etilen glikol) (PEG, Ma: 4000) Sigma-Aldrich firmasından; sodyum aljinat (SA) ve Glutaraldehit (GA) Merck firmasından ve karanfil uçucu esansiyel yağı (KY) Onka Farma firmasından temin edilmiştir. Bu ürünler yüksek saflıkta olmalarından dolayı harici olarak saflaştırma işlemi yapılmamıştır.

B. PVA/SA/PEG-KY Hidrojel Kompozit Sistemin Sentezlenmesi

PEG ile kaplı KY yağı çözeltisi hazırlamak için 10 mL saf suda 1,5 gram PEG çözünüp üzerine 0,5 mL KY eklenerek 3 saat manyetik karıştırıcıda 1200 rpm karıştırma hızında karıştırılmıştır. Başka bir beherde, 20 ml saf su içerisine 2,5 gram PVA ve 0,25 gram SA eklenip 60 °C sıcaklıkta 5 saat karıştırılarak homojen ve kısmen viskoz çözelti elde edilmiştir. Oda sıcaklığına soğutulan bu çözelti

manyetik karıştırıcı ile 1200 rpm hızında karıştırılırken üzerine PEG-KY çözeltisinin tamamı damla damla eklenmiş ve 2 saat karıştırmaya devam edilmiştir. Homojen dispersiyona sahip bu çözeltiden çapraz bağlı hidrojel oluşturmak için GA çözeltisi kullanılmıştır. GA çözeltisi, 10 ml %1 'lik HCl çözeltisine 2,5 ml eklenerek hazırlanmıştır. Polimer çözeltisi 1200 rpm karıştırma hızında karıştırılırken üzerine damla damla GA çözeltisinden 5 ml eklenmiştir. Çözelti 5 dakika karıştırıldıktan sonra çapı 12 cm olan polistiren (PS) kalıba aktarılmıştır. 10 dakika sonra jelleşme meydana gelmiştir. Üzeri kapalı bir halde 24 saat oda sıcaklığında bekletilerek çapraz bağlanma reaksiyonunun tamamlanması sağlanmıştır.

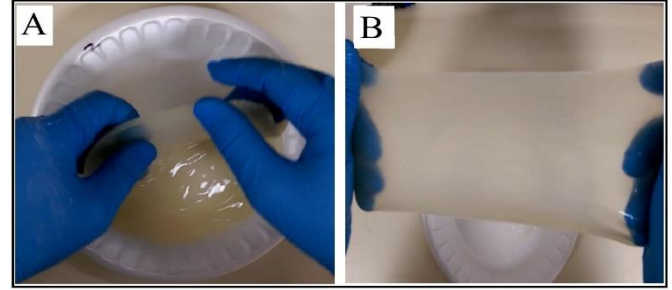
C. Antibakteriyel Test

Antimikrobiyal test oyuk agar yöntemiyle yapılmıştır. Kısaca 100 µL taze kültür test edilen mikroorganizmaların her biri Mueller Hinton suyu agar içeren petri kaplarına aktarıldı. Steril paslanmaz çelik delici ile, steril su ile doyurulmuş Hidrojel-esansiyel yağ kompozitinden dört mm çapında daireler elde edildi. Yüzey kuruduktan sonra aynı aparat kullanılarak petri kaplarına delikler açıldı. Bu oyuklar, Hidrojel-esansiyel yağ kompozitleri ile emprenye edildi. Uçucu yağların antimikrobiyal aktivitesini belirlemek için, yapısında uçucu yağ bulunmayan PVA/SA/PEG hidrojelleri kullanıldı. Pozitif kontrol olarak standart bir antimikrobiyal ajan olan tetrasiklin kullanıldı. Petri kapları bakteriler için 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra inhibisyon bölgelerinin çapları milimetre cinsinden ölçüldü.

Antimikrobiyal kapasite testinde test mikroorganizması olarak 4 bakteri türü kullanılmıştır. Test edilen tüm mikroorganizmalar, Refik Saydam Ulusal Halk Sağlığı Kurumu (RS) ve İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı (ML) tarafından temin edilmiştir. Gram pozitif bakteri olarak Staphylococcus aureus (SA) ve Bacillus cereus (BC); gram negatif bakteri olarak Escherichia coli (EC) ve Salmonella spp. (S) kullanılmıştır. Test edilen tüm mikroorganizmaların gece kültürlerini hazırlamak için, bakteriler için beyin kalp infüzyon suyu (Merck) ve maya için sabouroud dekstrozu suyu kullanıldı.

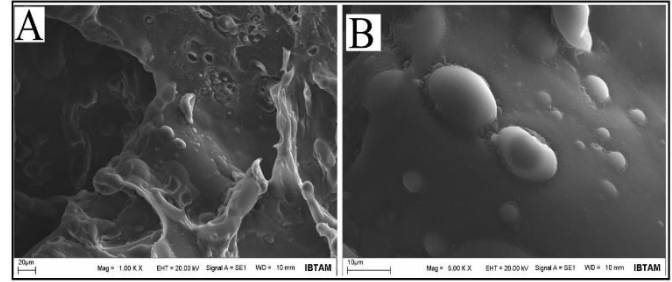
III. BULGULAR VE TARTIŞMA

GA ile çapraz bağlı PVA/SA/PEG-KY hidrojel kompozit sistemin görüntüsü şekil 1' de gösterilmiştir.



Şekil 1. (A): Hidrojel sistemin kalıptan çıkarılması, (B): Sentezlenen hidrojel sistemin esnek görüntüsü.

Şekil 1' den görüleceği üzere sentezlenen PVA/SA/PEG-KY hidrojel kompozit sistemin oldukça elastik ve mekanik olarak dayanıklı olduğu görülmektedir. Şekil 2' de sentezlenen PVA/SA/PEG-KY hidrojel sistemin farklı ölçeklerdeki SEM görüntüsü verilmiştir.



Şekil 2. Sentezlenen PVA/SA/PEG-KY hidrojel kompozit sistemin SEM görüntüleri

Şekil 2' den, sentezlenen hidrojel sistemin gözenekli bir morfolojik yapıya sahip olduğu ve PEG ile kaplanmış karanfil uçucu yağlarının küresel olarak hidrojel sisteme gömülü olduğu görülmektedir. Bu görüntülerden uçucu karanfil yağının PEG ile başarılı bir şekilde kaplandığı ve PVA/SA hidrojel destek sistemine başarılı bir şekilde immobilize edildiği söylenebilir. Gömülü kürelerin boyut aralığının yaklaşık olarak 3 - 12 µm olduğu görülmektedir.

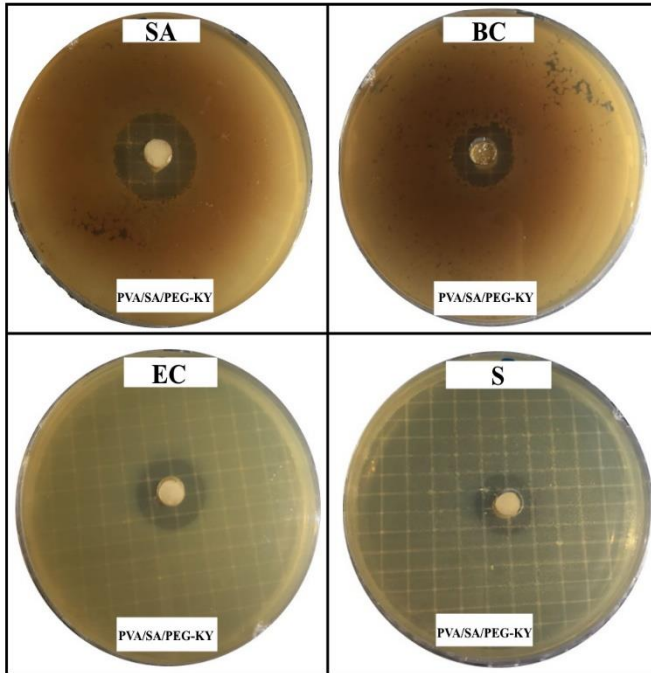
Sentezlenen PVA/SA/PEG-KY hidrojel kompozit sistemin E.coli (EC), Salmonella spp. (S), B.cereus (BC) ve S.aureus (SA)'a karşı antibakteriyel aktivitesi kuyu agar tekniği ile araştırıldı. Antibakteriyel testlerin sonucu her bir bakteri türüne ait petri kapların fotoğrafları şekil 3'de ve sonuçlar Tablo 1'de sunulmuştur. Yapısında uçucu karanfil yağı bulunmayan PVA/SA/PEG hidrojel

sistemin herhangi bir antibakteriyel aktivite göstermemesi nedeniyle fotoğrafları verilmemiştir.

Antibakteriyel test sonuçları PVA/SA/PEG-KY hidrojel kompozit sistemin gram pozitif ve gram negatif bakteri türlerine karşı yüksek aktiviteye sahiptir. Gram negatif bakteri grubuna kıyasla gram pozitif bakteri grubunun üzerinde daha fazla etkiye sahip olduğu saptanmıştır. En yüksek antibakteriyel aktivite 18 mm'lik zon çapıyla S.aureus (SA)'ya karşı olduğu bulunmuştur.

Tablo 1. PVA/SA/PEG-KY hidrojel sistemin antibakteriyel aktiviteleri

Bakteri Türü	E.coli (EC)	Salmonella (S)	B.cereus (BC)	S.aureus (SA)
Oluşan Zon Çapı (mm)	14	12	15	18



Şekil 3. PVA/SA/PEG-KY hidrojel sistemin antibakteriyel test sonucu petri fotoğrafları

IV. SONUÇLAR

Bu çalışmada yapısında karanfil uçucu yağı içeren esnek yapılı PVA/SA/PEG-KY hidrojel kompozit sistemi başarıyla sentezlenmiştir. Üretilen bu kompozit sistemin SEM analizlerinden, karanfil yağının başarılı bir şekilde PEG ile kaplandığı ve destek malzemesi olan GA ile çapraz bağlı PVA/SA

hidrojeline immobilize edildiği bulunmuştur. Elde edilen bu hidrojel kompozit sistemin iki tür gram pozitif (B.cereus (BC) ve S.aureus (SA)) ve iki tür gram negatif (E.coli (EC) ,Salmonella spp. (S)) bakterilerine karşı antibakteriyel özellikleri incelenmiştir. Bu hidrojel sistemin her iki sınıfa ait dört bakteri türüne oldukça yüksek antibakteriyel özelliğe sahip olduğu saptanmıştır. Geliştirilen oldukça esnek yapılı bu kompozit sistemin sağlık alanında yara örtü ve iyileştirme malzemesi olarak, gıda sanayinde koruyucu ambalaj olarak kullanım potansiyelinin olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] J. D. Kovacs, P. Felso, L. Makszin, Z. Papal vd., "Antimicrobial and Virulence-Modulating Effects of Clove Essential Oil on the Foodborne Pathogen *Campylobacter jejuni*" *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 82, pp. 6158–6166, Oct. 2016.
- [2] J. Bai, J. Li, Z. Chen, X. Bai, Z. Yang, Z. Wang, Y. Yang, "Antibacterial activity and mechanism of clove essential oil against foodborne pathogens", *LWT - Food Science and Technology*, vol. 173, 114249, Dec. 2022.
- [3] L.Nunez, M. Daquino, "Microbicide activity of clove essential oil (*Eugenia caryophyllata*)", *Medical Microbiology*, vol. 43, 1255-1260, Dec. 2012.
- [4] A. Pandey, J. V. Jagtap, S.A. Polshettiwar, "Formulation and evaluation of in-vitro antimicrobial activity of gel containing essential oils and effect of polymer on their antimicrobial activity". *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Vol. 3, 234-237, Dec. 2010.
- [5] C. Boztepe, M. Daskin, A. Erdogan, "Synthesis of magnetic responsive poly(NIPAAm-co-VSA)/Fe3O4 IPN ferrogels and modeling their deswelling and heating behaviors under AMF by using artificial neural networks, *Reactive and Functional Polymers*. Vol. 173, 105219, Feb. 2022
- [6] K. Torpol, S. Sriwattana, J. Sangsuwan, P. Wiriyacharee, W. Prinyawiwatkul, *International Journal of Food Science and Technology*, Vol. 54, 2064-2074, Jan. 2019.
- [7] L. R. Shivakumara, T. Demappa, *Synthesis and Swelling Behavior of Sodium Alginate/Poly(vinyl alcohol) Hydrogels*, *Turk J Pharm Sci*, vol. 16. 252-260, May. 2018
- [8] K. E. Balan, C. Boztepe, A. Kunkul, *Modeling the effect of physical crosslinking degree of pH and temperature responsive poly(NIPAAm-co-VSA)/alginate IPN hydrogels on drug release behavior*, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, Vol. 75, 103671, Aug. 2022.
- [9] J. S. Suk, Q. Xu, N. Kim, J. Hanes, L. M. Ensign, *PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 99, 28-51, Oct. 2015.

- [10] M. F. Akhtar, M. Hanif, N. M. Ranjha, Methods of synthesis of hydrogels, Review, Saudi Pharmaceutical Journal, Vol. 24, Nov. 2016.