

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İLAÇ YÜKLÜ NANO FİBER YAPILI POLİMERLERİN TASARIMI
VE GELİŞTİRİLMESİ

Fatih ÇİFTÇİ

DOKTORA TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Doç. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ

Eş Danışman

Dr. Öğr. Üye. Nilüfer DUYGULU

Mart, 2021

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İLAÇ YÜKLÜ NANO FİBER YAPILI POLİMERLERİN TASARIMI
VE GELİŞTİRİLMESİ**

Fatih ÇİFTÇİ tarafından hazırlanan tez çalışması 05.03.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ

Dr. Öğr. Üye. Nilüfer DUYGULU

Yıldız Teknik Üniversitesi

Yıldız Teknik Üniversitesi

Danışman

Eş Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ, Danışman

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Mehmet Burçin PİŞKİN, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Oğuzhan GÜNDÜZ, Üye

Marmara Üniversitesi

Prof. Dr. Musa TÜRKER, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üye. Yasemin YILMAZER, Üye

İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi

Danışmanım Doç. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ sorumluluğunda İlaç Yüklü Nano Fiber Yapılı Polimerlerin Tasarımı ve Geliştirilmesi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Fatih ÇİFTÇİ



Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün FDK-2017-3214 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Cemil Meriç'e



TEŞEKKÜR

Bu çalışmamda kendisiyle yüksek lisansta başlayan danışmanlık serüveni, engin bilgi ve tecrübelerini, araştırma geliştirme yöntemlerini gerek kendi çalışma ofisini gerek laboratuvar alanı tüm imkanlarını her koşulda benimle paylaşan, şartlar ne olursa olsun her zaman yanımda olduğunu hissettiren Yıldız Teknik Üniversitemizin en naif insanı, akademisyeni değerli danışman hocam Doç. Dr. Cem Bülent Üstündağ'a öncelikle teşekkür ederim.

Elektro eğirme cihaz kullanımı ile başladığımız çalışma serüvenimiz polimerik çözelti optimizasyonu, lif morfolojisi ve bu karakterizasyonların yorumlanması, geliştirilmesi ve üretilmesine kadar çalışmalarımın ve bu tezi yazmamın her bir adımında hiçbir zaman desteğini eksik etmeyen çok kıymetli eş danışmanım Arş. Gör. Dr. Nilüfer DUYGULU'ya teşekkür ederim.

Marmara Üniversitesi Nanoteknoloji ve Biyomalzemeler Uygulama ve Araştırma Merkezi (NBUAM)'i kapılarını çalışma alanı olarak bana sunan Ülkemizde ekip kurgusunu, ekiple çalışma disiplini üniversite bünyesinde oturtmuş ve fevkalade işler yapan nadir akademisyenlerimizden Doç. Dr. Oğuzhan Gündüz'e teşekkür ederim.

Antibakteriyel çalışmalarda bana yol gösteren ve bu konuda tecrübe kazandıran İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi Dr. Öğr. Üye. Yasemin YILMAZER'e teşekkür ederim.

Hücre çalışmalarımda bana destek olan, kendisiyle her zaman çalışmaktan, konuşmaktan keyif aldığım ve tecrübe kazandığım benim için çok kıymetli Akademisyen hem de Türkiye Biyoteknoloji Enstitüsü Başkan Vekili Doç. Dr. Rabia KOÇ'a aynı zamanda hücre çalışma sonuçlarını birlikte münazara ettiğimiz her vakit vaktini zamanını bana ayıran, Girişimcilik hayatına 1512 TÜBİTAK Teknogirişim ve Sermaye Desteğiyle adım atan doktora öğrencisi Zeynep KARAVELİOĞLU'na teşekkür ederim.

Bilgi birikimlerinin yanında lisansüstü serüvenimle kendileriyle tanıştığım devamında Aile olduğum, sevgilerini ve desteklerini hayatımın her alanında hissettiren Avengers Assembled Groups doktora ekibim, Dr. Benan İNAN, Nilbeste

BONCUKÇU, Ali Can ÖZARSLAN, Emre KARADUMAN, Cemre KILIÇ, Anıl Tevfik KOÇER ve değerli eşi Dr. Sinem KOÇER'e teşekkür ederim. Ek olarak benim için her zaman değerli olan kıymetli meslektaşım ve dostum olan Ayça ASLAN ve Azime YILMAZ'a teşekkür ederim.

Kendileriyle Nokta Film Prodüksiyon'da üretmiş olduğum 3 Boyutlu medikal ürünlerime yatırımcı rolüyle tanışmış olduğum devamında yazılım uygulamaları geliştirmek üzere Yıldız Teknopark'a şirket olarak kurulumunda ve dahi danışmanlığında ortak olduğum, GC-MS, HPLC, Franz Difüzyon, Antimikrobiyal analizlerde şahsıma fon olanağı sağlayan KorneaSoft Ltd. Şti şirketinin sahipleri ve ortaklarım olan Volkan SÜFÜRLER ve kıymetli eşi Seda SÜFÜRLER'e teşekkür ederim.

Ve son olarak bu zorlu süreçte manevi desteğini ve neşesini eksik etmeyen kıymetli eşim Uzman Klinik Psikolog Zeynep Uysal ÇİFTÇİ 'ye sonsuz teşekkür ederim.

Fatih ÇİFTÇİ

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	xi
KISALTMA LİSTESİ	xii
ŞEKİL LİSTESİ	xiii
TABLO LİSTESİ	xv
ÖZET	xvi
ABSTRACT	xviii
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	3
1.3 Hipotez	4
2 POLİMERİK NANO LİFLER	5
2.1 Nano lif (NL) üretim yöntemleri	7
2.1.1 Çekim yöntemi	7
2.1.2 Faz ayrımı yöntemi	8
2.1.3 Şablon sentez yöntemi	9
2.1.4 Kendiliğinden birleştirme tekniği	10
2.1.5 Ani (Flash) Çekim	10
2.1.6 Meltblowing	10
2.1.7 Bikompenet çekim	11
2.1.8 Elektro eğirme	12
2.2 Polimerik nano lif biyomedikal uygulamaları	12
2.3 Elektro eğirme Yöntemi	14
2.4 Elektro eğirme parametreleri	17

2.4.1	Çözelti parametreleri.....	19
2.4.2	Proses Parametreleri.....	24
2.4.3	Çevre Parametreleri.....	25
2.5	Nano Lif Üretimi için Kullanılan Kimyasallar ve Malzemeler	25
2.5.1	Polimer: Poli laktik asit (PLA)	25
2.5.2	Polimer Kimyasalları: Çözücüler.....	28
2.5.3	Polimer Katkısı: Grafen Oksit (GO)	30
2.5.4	Polimer Katkısı: Antiajan; Selenyum (Se).....	31
2.5.5	Polimer Katkısı: Antioksidan/Antiajan; Zataria Multiflora (ZM)	33
2.5.6	Polimer Katkısı: İlaç; Seftriakson disodyum.....	34
2.5.7	Polimer Katkısı: İlaç; Klaritromisin (CLA).....	35
2.5.8	Polimer Katkısı: İlaç; Basitrasin (BAC)	36
3	MATERYAL VE METOT	38
3.1	Polimer Çözeltisinde Kullanılan Çözücüler	38
3.2	PLA Katkı Malzemeleri	38
3.2.1	İlaç Katkı Malzemeler	39
3.2.2	GO Sentezinde Kullanılan Malzemeler	39
3.2.3	Antiajan/Antioksidan Katkı Malzemeleri	39
3.3	Antimikrobiyal Aktivite Analizinde Kullanılan Malzemeler.....	40
3.4	Sitotoksisite Testlerinde Kullanılan Malzemeler	40
3.5	PLA ve Katkılı PLA Çözeltilerinin Hazırlanması.....	41
3.6	PLA_1 Çalışma Grubu Çözeltisinin Hazırlanması.....	42
3.7	PLA_2 Çalışma Grubu Çözeltisinin Hazırlanması.....	42
3.7.1	GO Sentezi	42
3.8	PLA_3 Çalışma Grubu Çözeltilerinin Hazırlanması	44
3.8.1	Esansiyel yağ ekstrasyonu.....	44

3.9 Polimerik Nano Liflerin (PNL) Elektro Eğirmesi	45
3.10 PLA_1 Çalışma Grubu NL Elektro Eğirme İşlemleri	46
3.11 PLA_2 Çalışma Grubu NL Elektro Eğirme İşlemleri	46
3.12 PLA_3 Çalışma Grubu NL Elektro Eğirme İşlemleri	47
3.13 Polimer Çözeltilerin Karakterizasyonu	47
3.13.1 Viskozite Tayini	47
3.13.2 Yüzey Gerilimi Tayini	47
3.13.3 Elektrik iletkenliği	48
3.14 Polimerik Nano Liflerin (PNL) Karakterizasyonu	48
3.14.1 Lif Morfolojisi (SEM)	48
3.14.2 Fourier dönüşümlü kızılötesi ışın spektrometresi (FT-IR) analizi	48
3.14.3 XRD analizi	48
3.14.4 Raman Spektroskopisi	49
3.14.5 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) analizi	49
3.14.6 Gaz Kromatografisi ve Kütle Tarayıcısı (GC-MS) analizi	49
3.15 PNL için <i>In vitro</i> Çalışmaları	50
3.15.1 Salım Kinetiği Testleri	50
3.16 PNL için <i>In vitro</i> Antimikrobiyal Testleri	55
3.17 PNL için <i>In vitro</i> Sitotoksikite Testleri	55
3.17.1 Doğrudan temas	55
3.17.2 Dolaylı Temas	56
3.17.3 Hücre yapışması	56
3.17.4 <i>In vitro</i> (Scratch assay)	56
4 BULGULAR VE TARTIŞMA	57
4.1 PLA_1 Çalışma Grubu Bulgular ve Tartışmalar	57
4.1.1 PLA_1 Çözelti Karakterizasyon Bulguları	57

4.1.2	PLA_1 Çalışma Grubu NL Karakterizasyon Bulguları	58
4.1.3	PLA_1 Çalışma Grubu Tartışmaları	64
4.2	PLA_2 Çalışma Grubu Sonuçlar ve Tartışmalar	71
4.2.1	PLA_2 Çalışma Grubu Çözelti Karakterizasyon Bulguları	71
4.2.2	PLA_2 Çalışma Grubu NL Karakterizasyon Bulguları	71
4.2.3	In vitro Salım Kinetiği Bulguları.....	76
4.2.4	In vitro Antimikrobiyal Bulgular.....	79
4.2.5	In vitro Hücre Kültürü Testi Bulguları.....	81
4.2.6	PLA_2 Çalışma Grubu Tartışmaları	84
4.3	PLA_3 Çalışma Grubu Bulgular ve Tartışmalar	90
4.3.1	PLA_3 Çalışma Grubu Çözelti Bulguları.....	90
4.3.2	PLA_3 Çalışma Grubu NL Karakterizasyon Bulguları	91
4.3.3	In Vitro Salım Kinetiği Bulguları	96
4.3.4	In vitro Antimikrobiyal Bulgular.....	104
4.3.5	In vitro Sitotoksosite Bulguları.....	106
4.3.6	PLA_3 Çalışma Grubu Tartışmaları	108
5	SONUÇ VE ÖNERİLER	115
5.1	PLA_1 Çalışma Grubu Sonuç ve Öneriler.....	115
5.2	PLA_2 Çalışma Grubu Sonuç ve Öneriler.....	115
5.3	PLA_3 Çalışma Grubu Sonuç ve Öneriler.....	117
	KAYNAKÇA	119
	TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	183

SİMGELİSTESİ

nm	Nanometre
$\mu\text{S}/\text{cm}$	Mikrosimens/santimetre
cm	Santimetre
G	Gram
H_2SO_4	Sülfürik asit
H_3PO_4	Fosforik asit
HCl	Hidrojen klorür
KMnO_4	Potasyum permanganat
KV	Kilovoltaj
L	Litre
m^2	Metre kare
ML	Mili litre
MPas	Mega paskal
S	Saat
Se	Selenyum
W	Watt

KISALTMA LİSTESİ

CHL	Kloroform
DCM	Diklorometan
DMF	N, N dimetil formamide
ECM	Hücreler arası matriks
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FT-IR	Fourier dönüşümlü kızılötesi ışın spektrometresi
GC-MS	Gaz Kromatografisi ve Kütle Tarayıcısı
GO	Grafen oksit
HPLC	Fourier dönüşümlü kızılötesi ışın spektrometresi
NL	Nano lif
PLA	Poly (lactic acid)
SEM	Scanning Electron Microscope
XRD	X Işını Kristalografisi
ZM	Zataria Multiflora

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1	Nano lif çap ölçü karşılaştırması.....	6
Şekil 2. 2	Çekim yöntemi ile NL üretiminin şematik gösterimi.....	8
Şekil 2. 3	Faz ayırma yöntemi ile lif üretimi.....	9
Şekil 2. 4	Şablon sentez NL üretme yöntemi.....	10
Şekil 2. 5	Meltblowing yöntemi ile NL üretiminin şematik gösterimi.....	11
Şekil 2. 6	Bilkompent yöntemi ile NL üretiminin şematik gösterimi.....	11
Şekil 2. 7	Polimerik NL'lerin uygulama alanları.....	13
Şekil 2. 8	Elektro eğrilmiş NL patentlerinin uygulama alanlarına göre dağılımı.....	13
Şekil 2. 9	Elektro eğirme yöntemi ile PNL üretim şematik gösterimi.....	14
Şekil 2. 10	Elektro eğirme prosesine etki eden parametreler.....	18
Şekil 2. 11	Taylor konisinin oluşuma etki eden kuvvetlerinin şematik gösterimi.....	19
Şekil 2. 12	PLA yapısı.....	27
Şekil 2. 13	Grafen Oksit yapısı.....	31
Şekil 2. 14	Se periyodik tablodaki genel bilgileri.....	32
Şekil 2. 15	Zataria Multiflora antioksidan içerikleri.....	34
Şekil 2. 16	Sefriakson kimyapsal yapısı.....	35
Şekil 2. 17	CLA kimyasal yapısı.....	36
Şekil 2. 18	Basitrasın zinc kimyasal yapısı.....	37
Şekil 3. 1	GO; a, b, c, d, e, f sentez aşamaları.....	43
Şekil 3. 2	a. deneysel çalışmada kullanılan ZM yaprakları, b. ekstrasyon edilmiş ZM esansiyel yağı.....	45
Şekil 3. 3	Laboratuvar ortamında kullanılan elektro eğirme cihazı.....	46
Şekil 3. 4	PNL salım kinetiği testi işleyişi; a. 24 saat boyunca salım ortamı, b. 14. gün sonunda salım ortamı.....	51
Şekil 3. 5	Franz difüzyon; a. çalışma modeli, b. BAC salım kinetiği modellemesi.....	55
Şekil 4. 1	PLA_1 NL'lerin PLA lif boyuları ve histogramları a. %5, b. %8, c. %12.....	60
Şekil 4. 2	PLA NL için a,b,c,d; %5, e,f,g,h;%8 NL boyutları.....	62
Şekil 4. 3	PLA/ilaç NL için; a. %5, b. %8.....	63
Şekil 4. 4	PLA çözeltisinin Antibakteriyel analizi. Agar disk difüzyon yöntemi.....	64
Şekil 4. 5	PLA ve İlaç yüklü PLA NL'nin SEM ortalama lif boyutları.....	68
Şekil 4. 6	PLA ve ilaç katkılı PLA nano liflerin ortalama lif çapları arasındaki ilişki.....	69
Şekil 4. 7	Bakteri tiplerine göre PLA/ilaç NL inhibisyon karşılaştırmaları.....	70
Şekil 4. 8	PLA_2 NL'lerin SEM görüntüleri ve histogramları a. PLA, b. PLA-G, c. PLA-G1, d. PLA-G2, e. PLA-G3.....	73
Şekil 4. 9	GO fonksiyonel grup analizi; FT-IR.....	74
Şekil 4. 10	GO'nun XRD modeli.....	75
Şekil 4. 11	Grafite ve GO'nun Raman analizi.....	76
Şekil 4. 12	CLA için 24 saat boyunca ilaç salım kümülatif grafiği.....	77
Şekil 4. 13	CLA kümülatif ilaç salım hızı doğrusal eğrisi.....	78
Şekil 4. 14	CLA log kümülatif % salım grafiği.....	79
Şekil 4. 15	PLA_2 çalışma grubu bakteri inhibisyon büyümeleri.....	80
Şekil 4. 16	PLA_3 NL için Direk Temaslı XTT testi.....	81

Şekil 4. 17	PLA_3 NL için indirek (dolaylı temas) XXT grafikleri	82
Şekil 4. 18	PLA_3 NL hücre adezyon görüntüleri	83
Şekil 4. 19	PLA_2 NL için In vitro yara iyileştirme görüntüleri.....	84
Şekil 4. 20	PLA_2 NL ortalama lif boyutları karşılaştırması	86
Şekil 4. 21	PLA_3 NL a, b, c, d, SEM morfolojik görüntüleri ve histogramları.....	92
Şekil 4. 22	Basitrasın ilacı HPLC Kromatografisi (MACHEREY-NAGEL, NUCLEOSIL 100-5 C18 PPN fazında).....	93
Şekil 4. 23	Aromatik esansiyel yağ Zataria Multiflora GC-MS, antibakteriyel olduğunu gösteren Carvacrol ve Timol içeriği.....	94
Şekil 4. 24	Logaritmik kümülatif salım doğrusal-Fickian yasası	97
Şekil 4. 25	Franz Difüzyon matematiksel modeli: Zero Order	98
Şekil 4. 26	Franz Difüzyon matematiksel modeli: First Order	98
Şekil 4. 27	Franz Difüzyon matematiksel modeli: Higuchi	99
Şekil 4. 28	Franz Difüzyon matematiksel modeli: Hixson.....	99
Şekil 4. 29	Franz Difüzyon matematiksel modeli: Higuchi	100
Şekil 4. 30	Franz Difüzyon matematiksel modeli: Korsmeyer-Peppas	100
Şekil 4. 31	PLA/BAC için Lineer Regresyon Denklemi terminal ekranı (Phyton İstatistik programı)	101
Şekil 4. 32	PLA/BAC stabiliite sonuçları; kalan madde ve raf ömrü süresi.....	102
Şekil 4. 33	PLA/BAC/ZM için Lineer Regresyon Denklemi terminal ekranı (Phyton İstatistik programı)	103
Şekil 4. 34	PLA/BAC/ZM stabiliite sonuçları; kalan madde ve raf ömrü süresi	104
Şekil 4. 35	PLA_3 çalışma grubu antibakteriyel analizleri ve inhibisyon..... büyümleri.....	105
Şekil 4. 36	PLA_3 NL a. temaslı ve b. temassız XTT sonuç görüntüleri	106
Şekil 4. 37	PLA_3 adezyon görüntüleri	107
Şekil 4. 38	PLA_3 NL DAPI görüntüleri.....	108
Şekil 4. 39	PLA_3 NL ortalama lif boyutları karşılaştırması	109
Şekil 4. 40	PLA_3 NL antibakteriyel mikroorganizma inhibisyon zonlarının karşılaştırılması	113

TABLO LİSTESİ

Tablo 2. 1	Çözücülerin özellikleri ve lif morfolojisindeki değişiklikleri	29
Tablo 3. 1	PLA polimer çözeltileri, özellikleri ve yapısı	38
Tablo 3. 2	Antimikrobiyal aktivite analizi için kullanılan bakteri ve mantar suşları	40
Tablo 3. 3	PLA çalışma grupları ve içerik kodlamaları	41
Tablo 3. 4	PNL elektro eğirme işlem detayları	46
Tablo 4. 1	Farklı konsantrasyondaki PLA_1 çalışma grubuna ait çözeltisi karakterizasyonları	58
Tablo 4. 2	Akış hızı ve voltaj değişimine bağlı olarak elde edilen ortalama lif boyutu.....	59
Tablo 4. 3	PLA değişken konsantrasyonları, voltajları, akış hızları ve lif ortalama boyutları	61
Tablo 4. 4	PLA_2 çözeltisi karakterizasyon değerleri	71
Tablo 4. 5	PLA_2 çalışma grubu NL morfolojik lif boyutları.....	72
Tablo 4. 6	PLA_2 Kümülatif salım ilaç % miktarları	78
Tablo 4. 7	PLA-G3 CLA ilacı kümülatif salım ve logaritmik değerler tablosu.....	87
Tablo 4. 8	PLA_3 çözeltisi karakterizasyon değerleri	91
Tablo 4. 9	PLA_3 uygulanan voltaj, akış hızı, lif ortalama boyutları.....	91
Tablo 4. 10	ZM yağının kimyasal bileşenleri, saklama süresi ve % alanı	94
Tablo 4. 11	BAC etken maddesi kümülatif salım yüzde değerleri	96
Tablo 4. 12	Franz Difüzyon kümülatif salım kinetiği matematiksel modellemesi	97
Tablo 4. 13	Franz difüzyon kümülatif ilaç salım fickian değerleri	97
Tablo 4. 14	BAC etken maddesi 30 gün sonunda kalan madde % içeriği.....	100

İlaç Yüklü Nano Fiber Yapılı Polimerlerin Tasarımı ve Geliştirilmesi

Fatih ÇİFTÇİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ

Eş Danışman: Dr. Öğr. Üye. Nilüfer DUYGULU

Yüksek gözeneklilik, geniş yüzey alanı, ilaç taşıma, hücre çoğalmasına uygun ortam sağlama gibi özelliklere sahip biyopolimerlerden elde edilen nano lif (NL) yapılar, doku iskelesi, yara örtüsü, yapay damar gibi birçok biyomedikal uygulama alanlarına sahiptirler. Sentetik polimerlerden Poli-laktik asit (PLA); biyoyaralanabilirlik, biyouyumluluk ve uzun süreli biyoparçalanabilirlik özellikleri sayesinde biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak tercih edilen yenilikçi polimerlerdendir. Düşük üretim maliyeti, yüksek üretim hızı, geniş malzeme uygulanabilirliği ve lif kalitesi sürekliliği gibi özellikleriyle elektro eğirme yöntemi NL yapılı polimerlerin elde edilmesinde tercih edilmektedir.

Bu doktora çalışmasında da amaçlanan biyomedikal uygulamalardan yara iyileştirilmesine katkı sağlayacak antibakteriyel özellikli, hücresel tutunmaları gerçekleştirebilir ve hücre canlılığı gösterebilen, ilaç salım kapasitesi yüksek, raf ömrü uzun, antioksidan içerikli ve sitotoksikite olmayan NL yapılı polimerlerin tasarımı ve geliştirilmesidir. Bu doğrultuda yapılan çalışmalar, farklı çalışma grupları altında ele alınmış olup, elde edilen çözeltilerin özellikleri ve NL üretim

parametreleri belirlenmiştir. Elde edilen NL karakterizasyonları, salım kinetiği modellenmesi, antimikrobiyal analizleri ve *in vitro* hücre testleri ile sitotoksitelerinin analizleri detaylı olarak gerçekleştirilmiştir.

Birinci çalışma grubu (PLA_1)'nda farklı çözücü konsantrasyonlarına sahip PLA NL üretim parametreleri, ilaç katkılanması ve NL antibakteriyel davranışlarının belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda PLA konsantrasyonu; %,8 elektro eğirme işlemi akış hızı; 0,5 mL/saat ve voltaj; 10 kV olarak belirlenmiştir.

İkinci çalışma grubu (PLA_2); hidrofilik tutunmasını artması için PLA polimer çözeltilere nano Grafen oksit (GO), ilaç Klaritromisin (CLA) ve doğal biyoaktif antiajan olan Selenyum (Se) katkılanması çalışmalarını kapsamaktadır. Salım kinetiği testinde kümülatif % CLA salım değeri 8. saat sonunda %74,3 olarak ölçülmüş, 24. saat sonunda %80,4 olarak tespit edilmiştir. Antibakteriyel testlerde GO/SE/CLA katkılanmasının mikroorganizmalar üzerinde inhibisyon büyümesi olarak etkin artış gösterdiği gözlenmiştir.

Üçüncü çalışma grubu (PLA_3); ilaç Basitrasin (BAC) antioksidan Zataria Multiflora (ZM) etkisini morfolojik, antibakteriyel ve hücre sitotoksite davranışlarının gözlemlenmesi Franz difüzyon kinetik modeli ile BAC'ın kümülatif salım kinetiği matematiksel modelinin tasarlanması çalışmalarından oluşmaktadır. ZM/BAC NL yapısının Franz difüzyon matematiksel salım kinetik modeli Zero Order olarak ortaya çıkarılmış, raf ömrünün 125 gün olarak tespit edilmiştir. Antibakteriyel testlerde PLA/BAC/ZM NL bütün mikroorganizmalar (*E.coli*, *S.aureus*, *B.cereus*, *S.epidermidis*, *B.subtilis*) üzerinde en iyi inhibisyon büyümeyi göstermiştir. Hücre XTT sitotoksite testlerinde, adezyon ve 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) sonuçlarında kullanılan PLA/BAC/ZM NL hücrelere çok iyi derecede tutunduğu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: PLA, basitrasin, grafen oksit, nano lif, zataria multiflora

Design and Development of Drug-Loaded Nano Fiber Polymers

Fatih ÇİFTÇİ

Department of Bioengineering

Doctor of Philosophy Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ

Co-Advisor: Dr. Nilüfer DUYGULU

Nanofiber (NF) structures obtained from biopolymers with properties such as; high porosity, large surface area, drug transport, and providing a suitable environment for cell proliferation have many biomedical application areas such as tissue scaffolding, wound dressing, artificial vessels. Poly-lactic acid (PLA) from synthetic polymers; is one of the innovative polymers that are widely preferred in biomedical applications thanks to its bioavailability, biocompatibility, and long-term biodegradability. Due to its properties as; low production cost, high production speed, wide material applicability, fiber quality continuity, etc., the electrospinning method is preferred in obtaining NF polymers.

The aim of this doctoral study is the design and development of NF structured polymers with antibacterial properties that will contribute to wound healing from biomedical applications, can achieve cellular adhesion and show cell viability, have a high drug release capacity, have a long shelf life, contain antioxidants and do not have cytotoxicity. The studies conducted in this direction were handled under different study groups, and the properties of the obtained solutions and NF production parameters were determined. The obtained NL characterizations,

release kinetics modeling, antimicrobial analysis, and *In vitro* cell tests and cytotoxicity analyzes were carried out in detail.

In the first working group (PLA_1), studies were conducted to determine PLA NF production parameters with different solvent concentrations, drug additive, and antibacterial behavior of nanofibers. According to achieved results, the PLA concentration was determined as; 8%, electrospinning process flow rate as; 0.5 mL/hour, and voltage as; 10 kV.

The second working group (PLA_2); includes the studies of adding nano Graphene oxide (GO), drug Clarithromycin (CLA), and natural bioactive anti-agent Selenium (Se) to PLA polymer solutions to increase hydrophilic adhesion. In the release kinetics test, the cumulative % CLA release value was measured as 74.3% at the end of the 8th hour, and it was determined as 80.4% at the end of the 24th hour. In antibacterial tests, it was observed that GO / Se / CLA additive increased effectively as an inhibition growth on microorganisms.

The third working group (PLA_3); observing the effect of drug bacitracin (BAC) antioxidant Zataria Multiflora (ZM), morphological, antibacterial, and cell cytotoxicity behaviors, and designing the cumulative release kinetics model of BAC with Franz diffusion kinetic model. Franz diffusion mathematical release kinetic model of ZM / BAC NF structure has been revealed as Zero-order since antibacterial protection effect was not applied for shelf life, it was analyzed on Python and the shelf life was determined as 125 days. PLA / BAC / ZM NL showed the best inhibition growth on all microorganisms (*E.coli*, *S.aureus*, *B.cereus*, *S.epidermidis*, *B.subtilis*) in antibacterial tests. It was observed that PLA / BAC / Zm nanofiber used in cell XTT cytotoxicity tests, adhesion, and 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) results adhered to the cells very well.

Keywords: PLA, bacitracin, graphene oxide, nano fiber, zataria multiflora

1.1 Literatür Özeti

Biyopolimerler, doğal veya sentetik olan biyomalzemelerdir [1]. Gösterdikleri yüksek biyo-uyumluluk, biyo-bozunurluk ve anti-toksik etkileri nedeniyle biyoteknoloji alanındaki çalışmalarda ele alınmaktadır. Biyopolimerlerden elde edilen NL yapılar; yüksek gözeneklilik, spesifik yüzey alanları, doğal hücre dışı matris yapısı (Extra Cellular Matrix; ECM) taklit edebilme, ilaç taşıyıcı olarak kullanılabilme, hücre çoğalmasına uygun ortam oluşturma gibi özelliklerinden dolayı doku iskeleleri, yara örtüleri, yapay damar gibi biyomedikal alanda kullanım alanları bulunmaktadır [2]–[4]. Bu kullanım alanları uygun sentetik ve biyoparçalanabilir polimerler; poli-laktik asit (PLA) [5]–[9], poli-kaprolakton (PCL) [10]–[14], poli-metil metakrilat (PMMA) [15]–[17]'tir. Bu polimerlerin genel özellikleri; biyoparçalanabilir, biyoyararlanabilir ve biyouyumlu olmasıdır. Bu özelliklerin yanında biyoparçalanabilirlik süresi diğer sentetik polimerlere göre en uzun olan polimer PLA polimeridir. Bu sebeplerden dolayı bu doktora çalışmasının ana polimer malzemesi PLA olarak seçilmiştir. PLA, biyomedikal uygulamalarda geniş bir ürün yelpazesi olarak geliştirilen en yenilikçi malzemelerden biri olarak büyük ilgi görmüştür. Elektro eğrilmiş PLA'nın, mekanik özellikleri, yüzey morfolojisi ve gözenelik yapısı göz önüne alındığında epitel doku, doku mühendisliği uygulamalarındaki kullanım alanı çok önemlidir. Yüksek mukavemet özelliği, toksik oluşturmaması biyomedikal alanlardaki kullanımını ön plana çıkarmaktadır [18].

PLA polimeri incelenerek çözelti parametreleri oluşturulmuştur. PLA malzemesinin çözelti olabilmesi için kullanılan çözücülerin etken parametreleri önemlidir. Çözeltilerin kaynama noktası, iletkenlik katsayısı ve kullanılacak polimere göre değişkenlik gösteren optimizasyon şartları polimerik çözelti oluşumu ve bu çözeltiden NL üretim parametrelerini etkilediği literatürde araştırılmıştır [10].

Yapılan ön araştırmalarda polimer malzemelerinin çözücü özellikleri lif oluşumundaki katkıları gösterilmiştir. Söz konusu NL'lerin üretiminde kullanılan polimer çözeltilerinin tasarımını geliştirmek için hazırlanan her bir çözeltinin viskozitesi, iletkenliği ve yüzey aktifliğinin incelenmesinde önemli bir basamaktır [5][19][20].

PLA polimerinin biyoparçalanabilir olması ilaç salım kinetiği mekanizmasına karar vermektedir [21][22]. PLA polimerine ilaç yüklenmesindeki amaç, NL'lerin uygulanan epitel doku ve/veya vücutta, hücrelerde oluşmuş toksisiteye karşı terapötik tedaviyi amaçlamaktadır. Bu nedenle ilaç salım kinetiği ilacın vücutta istenilen süre içerisinde etkinliğini koruyarak toksisiteye karşı koymasını sağlamaktadır [21]. Bu doktora çalışmasında ilaç etkeni olarak kullanılmış olan malzemeler; Seftriakson disodyum [23]–[25], CLA [26], BAC [27], [28] antibiyotik etken malzemeleridir.

Biyomalzeme seçimi NL üretimlerinde çok önemli bir parametre olarak kabul edilmektedir. Doku yaralanmasında sinirsel iskelelerin yeniden onarımı ve imalatı için biyomalzemeler doku iskelesine uygulama konusunda önemlidir. Bu uygulamalar arasında sayısız fizikokimyasal, biyokimyasal ve biyolojik gereksinimler mevcuttur [29][30][31]. Bu nedenle, çok çeşitli doğal ve biyolojik olarak parçalanabilen sentetik polimerler, iletken malzemeler ile beraber kullanılmıştır [32][33]. Bu çalışmada, PLA polimerinin hidrofilikliğini artırmak ve nöral rejenerasyon için PLA polimerine katkı olarak GO üretilerek eklenmiştir. Grafen, bir atom kalınlığında iki boyutlu bir karbon nanofiller olarak düşünülebilir. Bal peteği benzeri bir yapı oluşturan birbirine bağlı sp^2 hibridizasyonuna sahip bir karbon atomu tabakasıdır. Grafen, 1000 GPa civarında Young modülü, yüksek elektrik iletkenliği ($\geq 10^4$ S / cm) ve yüksek termal stabilite ile mükemmel mekanik özellikler gösterir [34][35][36]. Bu özellikler grafeni, polimerik NL üretimlerde katkı maddesi kullanılabilirliğini artıracaktır [37]–[40].

Epitel hücreler kimyasal, fiziksel ve biyolojik saldırılara karşı sürekli olarak temas ve savunma bariyeri rolüne sahiptir [41][42]. Deri hücreleri, hücre solunum, metabolik süreçler veya dış saldırılar yoluyla sürekli olarak yüksek reaktif moleküller olan ve genellikle serbest radikaller olarak adlandırılan oksidasyon

ürünleri üretir [43]. Bu moleküller, enzimatik ve enzimatik olmayan sistemler tarafından fizyolojik ve dinamik bir denge içinde anında nötralize edilir. Bu dengenin bozulduğu durumlarda, hücre zarı, nükleer veya mitokondriyal DNA gibi çeşitli hücrel yapılar, yapısal modifikasyonlara maruz kalabilir devamında cilt hastalıklarını tetikleyebilir veya doku yüzeyi kötüleştirir [44]–[46]. Bu durumu iyileştirmek doku hücrelerini yenileyebilmek için bu çalışma içeriğinde antioksidan etkileri olduğu iddia edilen birkaç malzeme de polimerik NL üretiminde katkı malzemesi olarak kullanılmıştır. Bu malzemeler antiajan olarak da görev alıp doku iyileşme, doku fonksiyonunu geri kazanma gibi biyomedikal uygulama alanlarını genişletmek için ele alınmıştır. Bu antioksidan malzemeler, doku hücrelerindeki oksidatif süreçlere müdahale etmesine yardımcı olabilir [47], [48]. Bu doktora çalışmasında ilaç yüklü PLA polimerine katkı malzemesi olarak Se [49]–[52] ve ZM [53]–[55] antiajan/antioksidan malzemeleri eklenmiştir.

Bu ilaç ve katkı malzemesi yüklü PLA polimer malzemelerinin NL olarak üretim yöntemi olarak elektro eğirme yöntemi kullanılmıştır. Elektro eğirme yöntemi, polimer çözeltisinin besleme ünitesine konulup, metal iğne ucu ile toplayıcı yüzey arasında bir elektriksel alan oluşturulması temeline dayanmaktadır [56]–[59][60], [61] [60], [62]–[64]. Elektro eğirme yöntemi kullanılarak üretilen NL'ler; kimyasal ve biyolojik koruyucu malzemeler [65], [66], gaz algılama malzemeleri [19], nem hassasiyeti [20], foto algılayıcı malzemeler [64]–[70], solar giysiler [21], [67], yara örtüleri [67] ve doku iskeleleri [19], [21], [67] gibi birçok uygulama alanında kullanılmaktadır [60]–[62], [64]–[66], [68]–[74]. Elektro eğirme yöntemiyle temel olarak amaçlanan düşük toksisiteye sahip çözeltiler kullanılarak ilaç/katkı malzemesi yüklü PLA NL üretimini gerçekleştirmektir.

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmada farklı etken yapılarına sahip ilaç yüklemeleri yapılan PLA polimeri ile PLA'nın hidrofilik tutunmasını artıran nano malzeme GO, doğal biyoaktif antiajan olan Se ve hem antiajan hem de antioksidan yapıları esansiyel yağ olan ZM kullanılarak elektro eğirme yöntemi ile NL eldesi, karakterizasyonları, salım kinetiği modellenmesi, antimikrobiyal analizleri ve *in vitro* hücre testleri ile

sitotoksitelerinin analizleri yapılarak biyomedikal uygulamalarda yara iyileştirici kullanım olanaklarının araştırılması amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

Bu tez çalışmasında 3 farklı PLA Çalışma grubu bulunduğu için 3 farklı hipotez geliştirilmiştir.

Hipotez_1: PLA_1 çalışma grubuna ait PLA polimeri, üçlü çözücü (CHL, THF, DMF) sistemde farklı konsantrasyonlarda çözülebilir, bu farklı konsantrasyonlarda PLA'ya ilaç katkılanması yapılabilir ve yapılan ilaç katkılanması sonucu elde edilecek NL antibakteriyel davranışlarda bulunabilirler.

Hipotez_2: PLA_2 çalışma grubuna ait PLA'ya üretilen GO katkılanması sonucu NL hücresel tutunmaları gerçekleştirebilir ve hücre canlılığı %100' yakın etkinlik gösterebilir.

Hipotez_3: PLA_3 çalışma grubuna ait NL; Bu tez çalışmasında tasarlanan ve geliştirilen PLA tabanlı NL'ler, ilaç salım kapasitesi % 100'e yakın, raf ömrü uzun, antioksidan içerikli ve sitotoksiteler olmayan kullanım alanı geniş biyomalzemelerdir.

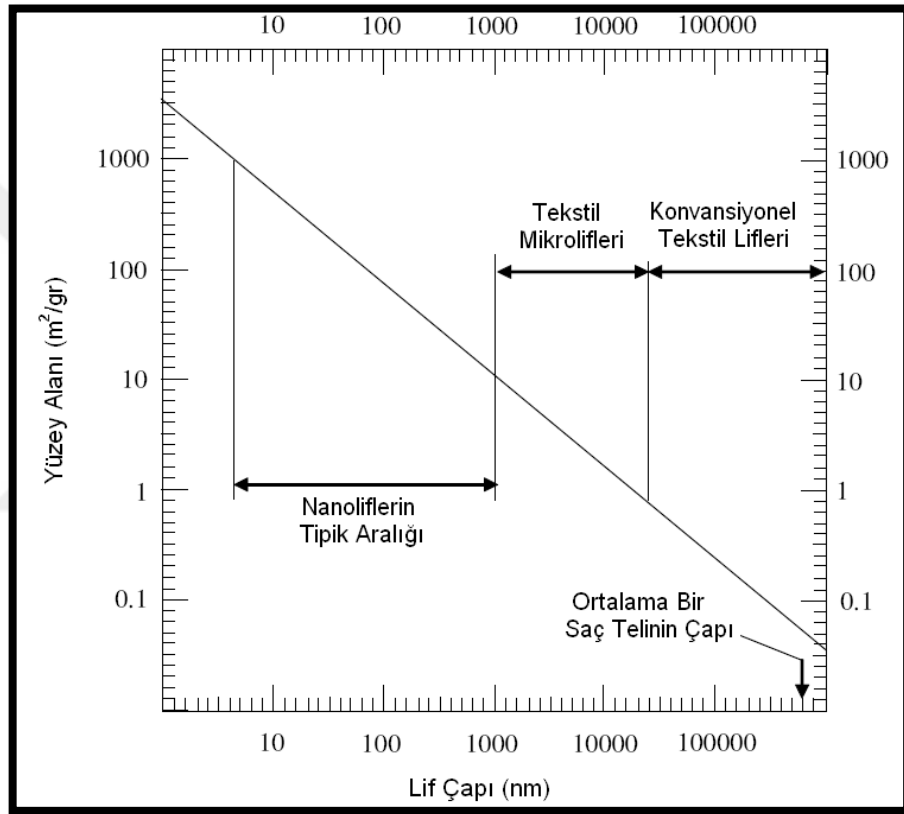
POLİMERİK NANO LİFLER

Biyoteknoloji alanında kullanımlardan, kullanıldıkları biyomedikal ürünlerde ürün performansını arttırmaları ve ürüne fonksiyonel açıdan kazanımları olması beklenmektedir. Ürüne yönelik fonksiyonel performans kazanımları en kalıcı ve etkili lif boyutu ile yapılan örneklerdir. Bunun için yapılan optimizasyonlarda ki asıl amaç NL boyutunu indirgemektir.

Polimerik liflerin; kimyasal yapısı, morfolojisi ve nano yapısı gibi kütle yapıları ile kimyasal grupları, pürüzsüzlüğü ve yüzey enerjisi gibi yüzey yapılarının dikkatli incelenip çok iyi değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu gereklilik özellikle işlevsel ve/veya akıllı liflerin performanslarının belirlenebilmesi için ve istenen özelliklerde modifiye edilip geliştirilebilmesi için oldukça önemlidir. Bu modifikasyonlarda ve geliştirmelerde çoğunlukla, optimum özelliğe sahip çok işlevli liflerin üretilmesi hedeflenmektedir. Bu tarz liflerin geliştirilmesinde en yaygın yöntem; istenilen kütle özelliklerine sahip polimerlere istenilen yüzey özelliklerini de verebilmek için oligomerler, polimerler ve nanoparçacıklar gibi yüzey aktif malzemelerle elektrospining ve benzeri metotlar kullanarak kaplamaktır [75][76][77]–[87].

Nano uygulamalar, sentetik ve yarı sentetik polimerik yapılarda teorik olarak mukavemet değerlerinin de optimize detaylarını vermektedir. Günümüzde lif/iplik formunda üretilen konvansiyonel liflerdeki kristalinite yüzdesine konulmuş sınırlamalar vardır. Örneğin yaklaşık 1nm kalınlığında olan normal bir C-C bağından çapı 5nm olan bir lif üretilirse, molekül zincirleri çok yüksek kristalin davranışlarına sahip olurlar. Bu sayede üretilen lifin mukavemet değeri, molekül zincirlerinin içerisinde bulunan C-C bağlarının mukavemeti kullanılarak ifade edilir. Oysa konvansiyonel lif üretim teknikleriyle üretilen polysterin teorik mukavemeti 120-150 GPa olmasıyla birlikte üretim sonrasında ölçülen mukavemet değeri yaklaşık 20 GPa olmaktadır [88]–[97]

Nano teknoloji sayesinde üretilen nano-lifler birçok avantaja sahiptirler. Bunların en önde gelenlerinden biri de daha liflerin daha küçük çaplarda üretilmesi sayesinde ağırlık ve hacimlerine oranla inanılmaz derecede yüksek yüzey alanına sahip olmalarıdır[2], [81], [82], [94], [95], [98]. Şekil 1.4'de liflerin çaplarındaki küçülmelere karşın birim kütledeki yüzey alanlarının artışları ile ilgili bir grafik bulunmaktadır. Nanoliflerin geniş yüzey alanına sahip yapılar oluşturmaları sayesinde, iyonları, fonksiyonel grupları ve nano boyuttaki çok çeşitli partikülleri tutma veya yayma kapasiteleri oldukça yükselmektedir [99].



Şekil 2. 1 Nano lif çap ölçü karşılaştırması [100]

Polimerik NL'ler ayrıca: filtrasyon sırasında yüksek performansı, su geçirmezlik, buruşmazlık ve leke tutmazlık gibi özellikler, gözenek boyutlarının kontrol edilebilmesini, düşük özgül ağırlığa sahip olması nedeni ile pek çok uygulama alanında avantaj sağlamaktadır [100][101].

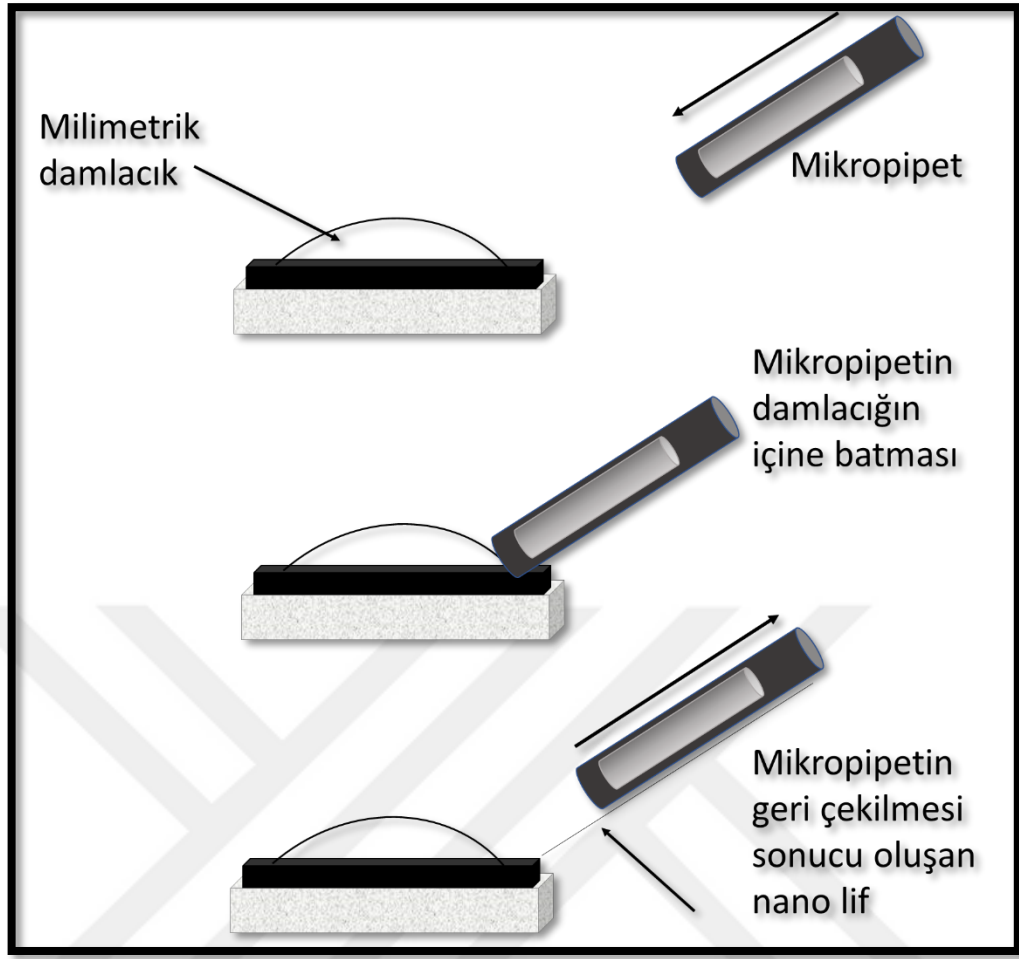
Bu çalışmada polimerik olarak kullanılan polimer ve polimere katkı olarak eklenen diğer etken malzemeler aşağıda açıklanmıştır.

2.1 Nano lif (NL) üretim yöntemleri

Elektro eğirme yönteminde polimerik çözelti aynı geleneksel çekim yöntemlerindeki gibi bir düzeden geçer. Ama bu yöntemde çekme kuvveti için hava, su veya mekanik aletler değil yüksek voltaj kullanılmaktadır [102], [103]. Ayrıca polimer kaynaklı NL'ler için en uygun üretim yönteminin elektro eğirme yöntemi olduğunu söylemek zor değildir. Çünkü bu yöntemde fizik, kimya, malzeme mühendisliği ve tekstil mühendisliği gibi ana bilimler ve mühendislik bilimleri bir arada, multidisipliner bir çerçevede kullanılmaktadır[102], [104]–[111] [112]

2.1.1 Çekim yöntemi

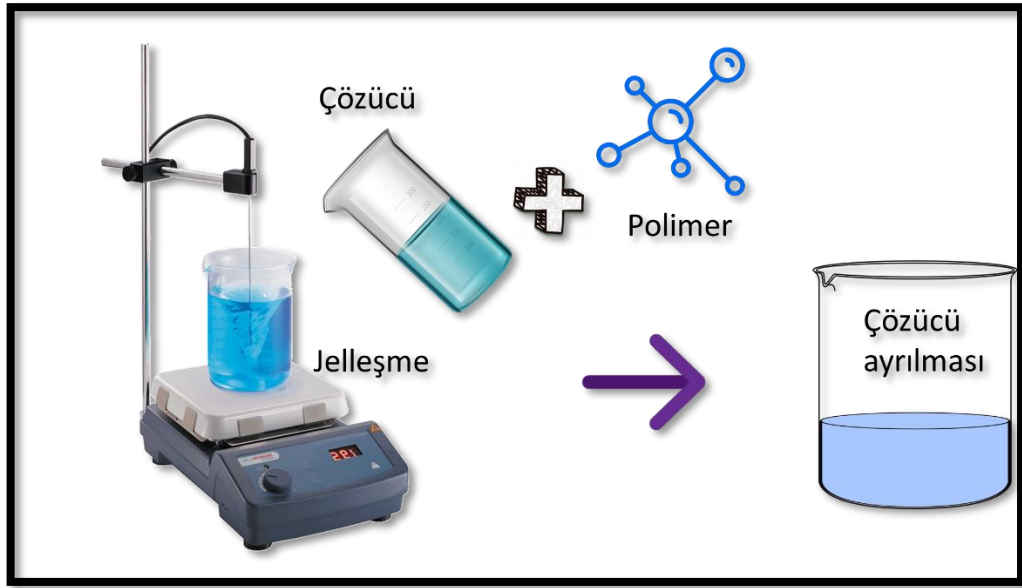
Bu yöntemde lif oluşumu; damlacık formunda toplanmış polimer çözeltilerinden keskin bir prob ucu veya mikropipet yardımıyla uzantılar çekilmesi ve hızlı bir buharlaşma ile uzantıların daralıp nanoliflere indirgenmesi şeklinde gerçekleşir[113]. Eriyik eğirme süreci hızlı ve etkilidir ve sıralı aşamaların oluşumu büyük ölçüde aşağı itilebilir [114], [115].



Şekil 2. 2 Çekim yöntemi NL üretiminin şematik gösterimi

2.1.2 Faz ayrımı yöntemi

Faz ayrımı yöntemi, homojen bir şekilde karışmış olan polimer ve çözücünün polimerce zengin ve fakir olan iki faza termodinamik olarak ayrılmasını temel alır [116]–[121]. Bu proses; çözünme, jelleşme, çözücüyle ayrışma, dondurma ve dondurarak kurutma basamaklarını kullanır [66]. Kullanılan basamakların bir kısmı ve NL üretimi Şekil 1.10'da gösterilmiştir

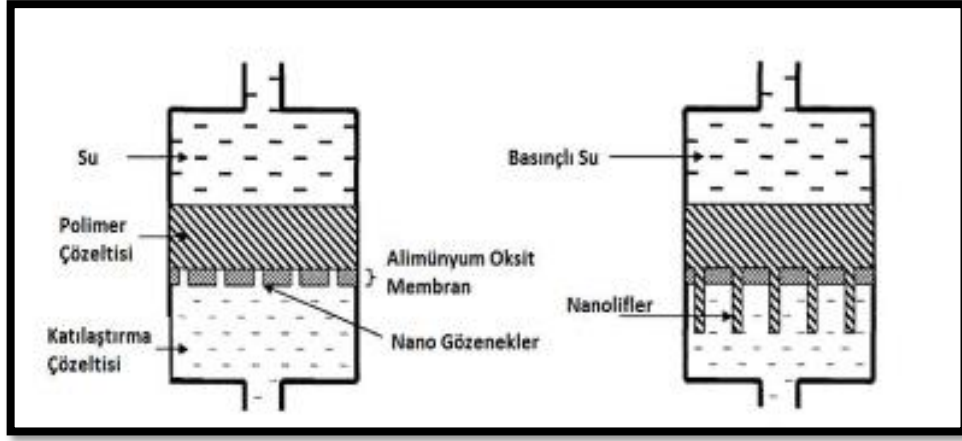


Şekil 2. 3 Faz ayırma yöntemi ile lif üretimi

Faz ayırma yöntemi uygulanırken kullanılan polimerin türü, konsantrasyonu ve soğuk aşamalarda uygulanan ısı işlem oluşan NL'lerin morfolojisini etkiler. Bu proses için kullanılabilecek olan polimerlerin sınırlı oluşu ve işlem süresinin uzun oluşu başlıca dezavantajları olarak söylenebilirken az sayıda ekipmanla doku mühendisliğinde kullanılabilecek yoğun gözenekli ve üç boyutlu yapıların üretilmesine imkan vermesi temel avantajı olarak söylenebilir [122]–[124].

2.1.3 Şablon sentez yöntemi

Bu sentez yönteminde polimer çözeltisinin gözenekli bir zardan geçirilmesi sağlanarak NL sentezi gerçekleştirilir. Bu işlemde 3 - 15 nm arasında çapında NL üretilmektedir [73], [125], [126]. Polimer çözeltisinin su basıncı yardımıyla membrandan geçmesi sağlanır. Membrandan geçen polimer uzantıları diğer tarafta katılaştırıcı ile karşılaştıklarında da nanolif oluşumu gerçekleşmiş olur[127]. Nano boyuttaki yapılar elektrokimyasal, sol-jel, kimyasal buhar ve elektriksiz depolama ile kimyasal polimerizasyon gibi farklı teknikler ve tasarımların olduğu şablonlar ve hammaddelerle üretilmektedir[128]–[131].



Şekil 2. 4 Şablon sentez NL üretme yöntemi [132]

2.1.4 Kendiliğinden birleştirme tekniği

Bu yöntemde kimyasal olarak tamamlayıcı ve yapısal olarak uyumlu olan düzensiz bileşikler minimum insan ve makine katkısıyla kendi kendilerine yapılar oluştururlar [133]–[135]. Bu mekanizmada en önemli unsur bileşenleri bağlayan moleküller arası etkileşimlerdir [66].

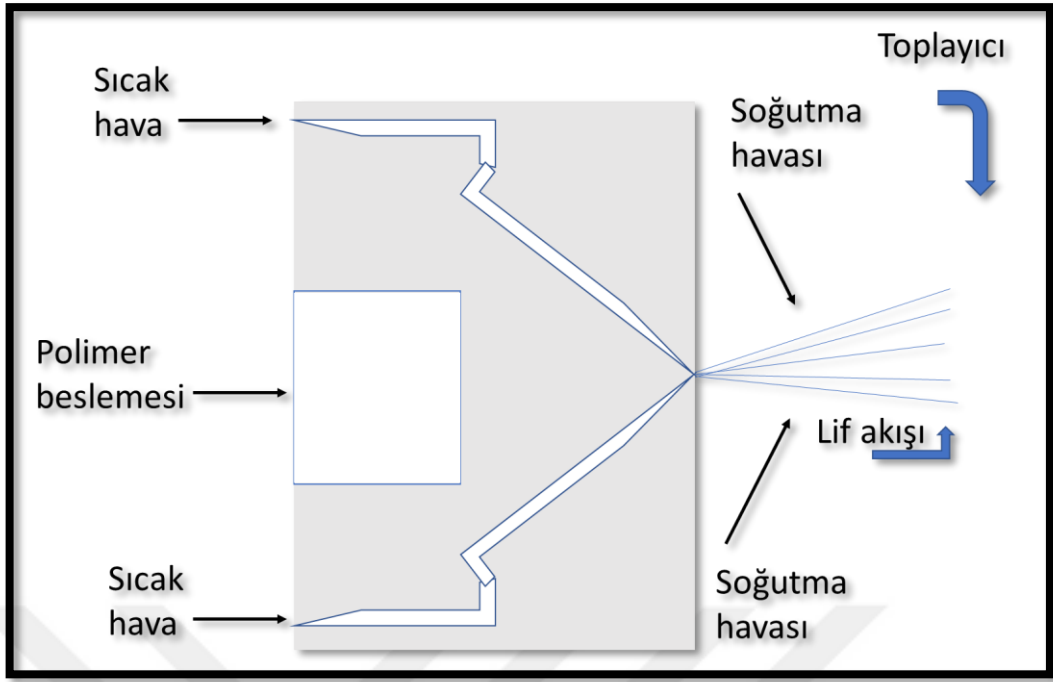
Temel dezavantaj lif çaplarının kontrol edilemez oluşu ve oluşum prosesinde elle takip edilebilecek ve değiştirilebilecek çok az değişken oluşudur [118], [136], [137].

2.1.5 Ani (Flash) Çekim

Flash çekim yöntemi methblowing yöntemine çok benzemekle birlikte bu yöntemde yüksek hızlı sıcak hava kullanılmazken, onun yerine germe işlemi uygulanmakta ve bu aşamada püskürtülen polimer soğurken lifler inceltilmektedir.

2.1.6 Meltblowing

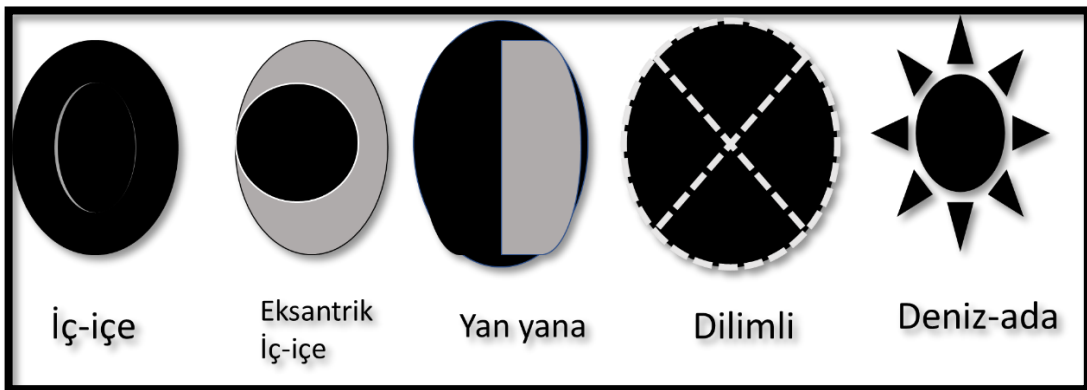
Bu yöntemde farklı olarak polimerler, mikroliflere tek basamakta dönüştürülür. Polimer çok ince bir ağızdan bir anda yüksek hızlı bir sıcak hava akışına çıkar ve çok kısa bir süre içinde nanolife dönüşür. Bu yöntemle oluşturulan lifler minimum 1 mikron çapa kadar inebilir [138]. Bu sayede termoplastik polimerlerden düşük maliyetlerle lif elde edilebilmektedir.



Şekil 2. 5 Meltblowing yöntemi ile NL üretiminin şematik gösterimi

2.1.7 Bikompenet çekim

Bikompenet yönteminde iki farklı filament aynı filament oluşturacak şekilde aynı delikten ekstrüze edilir [139]. Bu işlemde iki temel basamak izlenir: ilki bileşenlerin çekimi , ikincisi bileşenlerin birinin diğerinden uzaklaştırılması olarak söylenebilir [140] Burada ikinci basmakta adı geçen uzaklaştırma için kimyasal çözücü, mekanik bir alet veya ısı işlem kullanılabilmektedir [141]. Şekil 1.12’de bikomponent yöntemiyle çıkarılmış olan çeşitli filamentlerin kesizleri gösterilmiştir.



Şekil 2. 6 Bilkompent yöntemi ile NL üretiminin şematik gösterimi

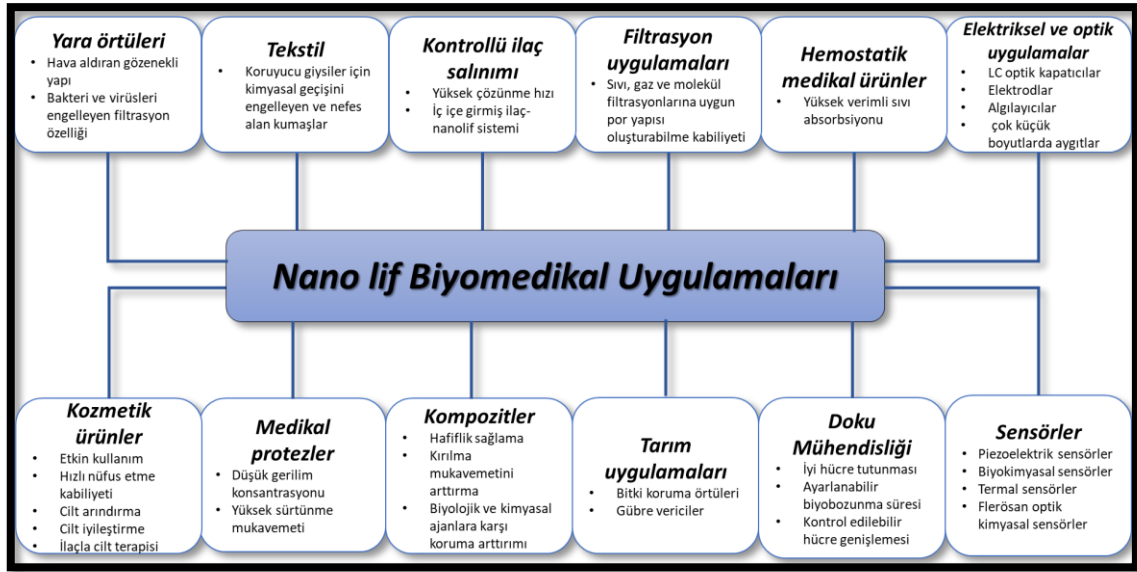
2.1.8 Elektro eğirme

Elektro eğirme yönteminde polimerik çözelti aynı geleneksel çekim yöntemlerindeki gibi bir düzeden geçer. Ama bu yöntemde çekme kuvveti için hava, su veya mekanik aletler değil yüksek voltaj kullanılmaktadır [102], [103]. Ayrıca polimer kaynaklı NL için en uygun üretim yönteminin elektro eğirme yöntemi olduğunu söylemek zor değildir. Çünkü bu yöntemde fizik, kimya, malzeme mühendisliği ve tekstil mühendisliği gibi ana bilimler ve mühendislik bilimleri bir arada, multidisipliner bir çerçevede kullanılmaktadır [102], [104]–[111] [112].

2.2 Polimerik nano lif (PNL) biyomedikal uygulamaları

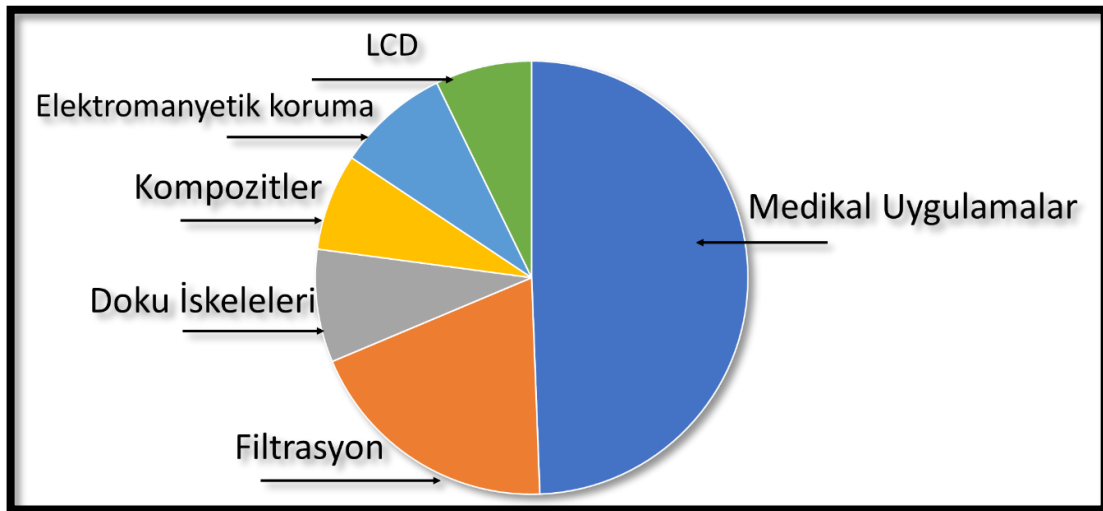
Polimer lif çapları, mikrometre ölçeğinden mikron altı ve nanometre boyutlarına düştüğünde bazı şaşırtıcı karakteristik özellikler sergilerler. Nano boyutta çaplara sahip olan lifler, bilinen diğer formlardaki materyallere göre çok daha yüksek yüzey alanı/hacim oranına sahiptir ayrıca çok iyi mekanik (sertlik, mekanik dayanım vs.) performans gösterir ve yüzey fonksiyonelliğinde de değişkenlikler gösterirler. Sergiledikleri bu olağanüstü özellikler sayesinde NL pek çok önemli uygulama alanı için seçilebilecek en uygun adaylar olmuşlardır [61], [127], [142]–[146].

Polimer nanolifleri, doku mühendisliği uygulamaları, kontrollü ilaç salınımı, medikal protezler ve hemostatik ürünler gibi biyomedikal uygulamalar haricinde, filtrasyon, sensör, elektrik ve optik, kozmetik, kompozit, koruyucu giysi ve tarım uygulamalarında kullanım alanı bulmaktadır.



Şekil 2. 7 Polimerik NL'lerin uygulama alanları

Son yıllarda NL ilgili birçok yayın ve patent çıkmıştır. Çıkan patent ve yayınlar NL potansiyel uygulama alanları ile ilgili fikirler verirken, NL teknolojisinin baş rolde olduğu uygulama alanlarının da tanımlanmasını sağlamıştır. Bu NL teknoloji ile ilgili alınan patentlerin yaklaşık üçte ikisi gibi büyük bir çoğunluğu, NL biyomedikal alanlarda kullanılması ile ilgilidir. Biyomedikal alanlardan sonraysa en çok patent filtrasyon uygulamalarında kullanılan NL'den gelmiştir. Sonrasındaysa patent sıralamasında kompozitler, sensörler ve katalizörlerle beraber diğer NL uygulamaları yer almaktadır [61], [121], [143], [146]–[150].



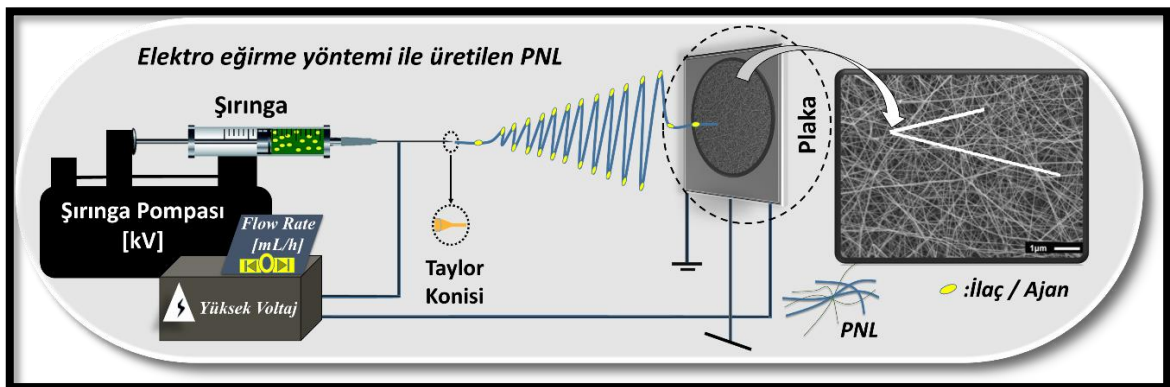
Şekil 2. 8 Elektro eğrilmiş NL patentlerinin uygulama alanlarına göre dağılımı

NL'lerin en yaygın kullanım bulduğu alanlardan biri olan ve konu ile ilgili patentlerin yaklaşık üçte ikisini oluşturan elektro eğirme NL'lerin biyomedikal uygulamaları, sunulan bu yüksek lisans tez çalışmasının da temelini oluşturması yaygın etkisi neden ile bu tez çalışması tercih edilmiştir.

2.3 Elektro eğirme Yöntemi

Sıvı polimerik çözeltinin elektriksel olarak yüklenmesi ve topraklanmış bir toplayıcı üzerinde dağınık halde NL'lerin konumlanması esasına dayanan elektro eğirme yöntemi, bilinen en yeni ve en etkin NL üretim tekniğidir. Elektro çekim tekniği diğer tekniklere göre oldukça avantajlıdır, diğer yöntemlerde kullanılabilen tüm polimerlerden elektro çekim tekniği kapsamında oldukça ince çaplara sahip olan sürekli NL elde edilebilmektedir [151]–[154]. Üstelik bunun için uygulanan proses oldukça basit ve ucuz bir uygulamadır. Elektro çekim, polimerlerden seramiklere ve kompozitlere çok çeşitli materyallerden çok ince lifler oluşturan basit ama etkili bir üretim tekniğidir. Bu teknik, elektriksel olarak yüklenmiş sıvı polimerin topraklanmış bir yüzey üzerinde sürekli lif formunda konumlanması esasına dayanır [151].

Elektro çekim, akışkanlar dinamiği, temel fizik, polimer kimyası, tekstil mühendisliği, makine ve elektrik fiziği disiplinlerini barındıran çok disiplinli bir prosestir [100]. Bu yöntemle, çapları 3 nm ile 1 mikron arasında ve 1 mikronun üzerinde kalınlıklarda sürekli NL birçok polimerden başarıyla elde edilmektedir [61]. Elektro çekim, modifiye edilmiş eski bir teknolojidir. Elektriksel kuvvetleri kullanılarak bir çözeltiden lif elde etmeyle ilgili ilk yazılı kaynak, erimiş parafinin elektrikleştirilerek lif elde edilmesinde kullanılmasıdır [155].



Şekil 2. 9 Elektro eğirme yöntemi ile PNL üretim şematik gösterimi

Yaklaşık 370 yıl önce William Gilbert, elektriksel olarak yüklü bir kehribarla arasında uygun mesafe bulunan kuru bir yüzey üzerindeki küresel su damlacığının konik forma geldiğine dikkat çekmiştir. Bu durum elektrostatik çekim ve elektrostatik spreyleme (elektro eğirme) hikâyesinin de başlangıcı olmuştur [100], [101].

1882’de Lord Rayleigh, sıvı damlacıkların elektriksel olarak yüklendiğinde oluşturdukları kararsızlıkları araştırmıştır. Bu araştırmalar esnasında Rayleigh elektrostatik kuvvet uygulanan sıvı bir damlacıkta, yüzey geriliminin bu kuvvetlerce yenilerek bir sıvı jeti oluşturulabileceğini fark etmiştir [143], [156]–[158][125]. Polimer çözeltisi ve elektrostatik çekimden NL elde edilmesi ile ilgili ilk yazılı belgeler, 1902 yılında J.F Cooley ve W.J. Morton tarafından öne sürülmüştür. Bu patentlerde üzerinde pozitif elektrot bulunan viskoz polimer çözeltisi zıt yüklü bir elektroda yakın tutulmuştur. Böylece elektrostatik çekim sağlanmıştır. Çekilen yükler, negatif yüklü bir kolektör üzerinde yığın şeklinde depolanmıştır. Bu proses, sıvının elektriksel kesilmesinin bir sonucu olarak tanımlanmıştır. Bir yıl sonra 1903 yılında buna benzer bir patent Cooley tarafından alınmıştır. Bu patentte ise viskoz polimer çözeltisi yüklü elektrotun ucuna yakındır. Fakat temas halinde değildir. Bu ilk patentler, polimer çözeltisinin uygun viskoziteye sahip olması gerekliliği üstünde durmuş ve spesifik bir örnek olarak da nitroselülozun elektro çekimini kullanmıştır. Bu yüzyılda tanımlanan prosesin ana fikrinin zaman içinde çok az bir değişiklik göstermesi enteresandır[147].

1917’de Zeleny [159], araştırmalara elektrik alanın sıvıların yüzeyleri üzerine etkilerini inceleyerek devam etmiştir. Farklı çözeltileri inceleyen Zeleny, sıvının viskozitesi ile bu sıvının yüzey gerilimini yenmesi gereken elektriksel kuvvetlerin gerilimi arasında doğrudan bir ilişki olduğunu tespit etmiştir [159]. Elektro çekim yöntemiyle lif üretimi konusu üzerine önemli patentler, 1934 yılında Anton Formhals tarafından alınmıştır. Formhals’ın icadı, sıvılar üzerindeki alan kullanımı ile suni ve sentetik filament üretiminin bir tasarımıdır [101]. 1934’ten 1944’e kadar Formhals, elektrostatik kuvvetlerin işin içinde olduğu polimer filament üretimi için deneysel düzenekler sunan bir seri patent yayınlamıştır. Selüloz asetat gibi bir polimer çözeltisi elektrik alana maruz bırakılmıştır. Zıt kutupların elektrik

yüklerinin çektiği iki elektrot arasında çözültiden polimer filamentleri oluşmuştur. Elektrotlardan biri çözeltinin içine, diğeri toplayıcının üzerine yerleştirilmiştir. Küçük bir deliği olan metal düzeden püskürtülünce, yüklü polimer jetindeki çözücü buharlaşmıştır. Toplayıcı plaka üzerinde katı lifler toplanmıştır [101].

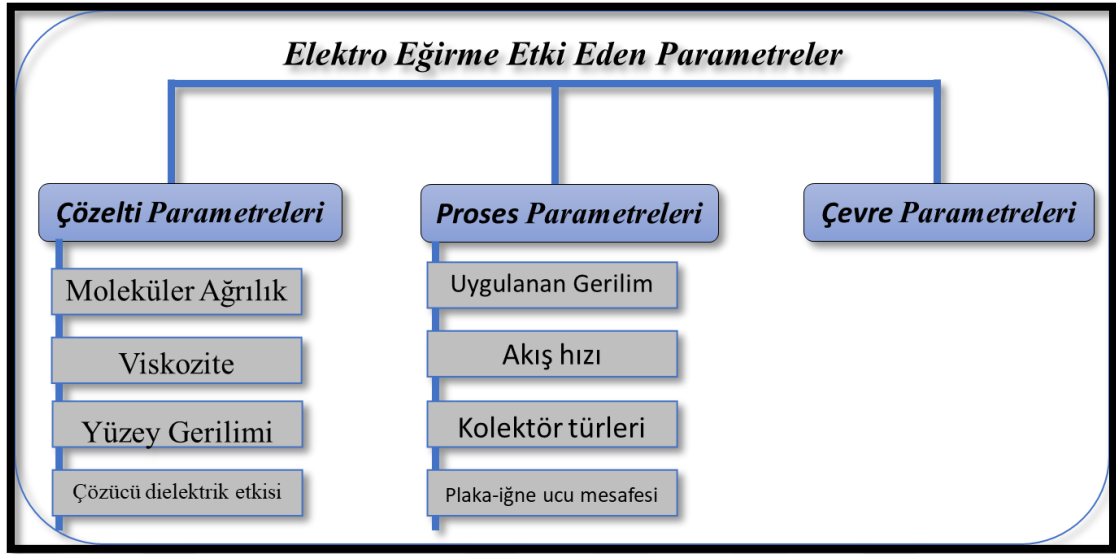
1960'lı yıllarda Taylor tarafından yapılan çeşitli çalışmalarda, elektriklenmiş sıvıların temel teorik prensipleri açıklanmıştır. Bu çalışmalardan bir tanesinde, iki sıvı arasındaki koni ara yüzün elektrik alan içerisinde dengede olduğu gösterilmiştir. Taylor'un çalışmalarında elektrik alan etkisi altında sıvı yüzeyi yüklenmiş ve karşılıklı yüklerin birbirlerini itmesi ile bir dış kuvvet oluşmuştur. Eşik değerini geçtikten sonra elektrostatik kuvvetle, sıvı damlacığı bir koni şeklini almış ve fazla yükler koninin ucunda oluşan yüklenmiş jetten dışarı çıkmıştır. Taylor, elektriksel kuvvetin yüzey gerilimine eşit olduğu bu kritik noktada koni oluştuğunu ve bu koninin yarım açısını 49.3° olduğunu tahmin etmiştir. Bu tahminleri yaptığı deneylerle uygunluk göstermiştir [101]. Taylor'un çalışması, elektrik alan içerisindeki damlacığın davranışının anlaşılmasını sağlamış ve daha sonra geliştirilen teknikler için faydalı olmuştur. 1966 yılında H.L. Simons, metal ızgaralar kullanarak polikarbonat, poliüretan gibi termoplastiklerden farklı şekillerde düzensiz lif yoğunluklarında NL dokusuz yüzeylerin üretimini gerçekleştirmiştir. Simons'ın patentleri, viskozite, iletkenlik sabiti ve çözücünün uçuculuğunu anahtar parametreler olarak tanımlamıştır. Poliolefinlerin eriyik formda elektro çekimi ile ilgili veriler, 1981 yılında Larrondo ve St. John Manley tarafından yayınlanmıştır. Bu çalışmada sıvının sıcaklığının artması dolayısı ile viskozitesinin düşmesi ile daha ince çaplarda lifler elde edildiği belirtilmiştir. Eriyikten elektro çekim, özellikle polietilen (PE), polipropilen (PP), polietilenteraftalat (PET) ve poliamid (PA) gibi ortak bir çözücüde çözilemeyen termoplastik polimerler için önemli bir yaklaşımdır. Ancak eriyikten elektro çekimde çok yüksek sıcaklıklara (genellikle 200°C 'nin üzerinde), çözültiden çekime kıyasla çok yüksek elektrik alana ihtiyaç duyulur ve genellikle vakum altında gerçekleştirilir [147]. Elektro çekim metodu, ana fikri ortaya çıktıktan 60 yıl sonra, 1994'te elektro eğirme'den türemiş ve "electrospinning" terimi ile anılmaya başlamıştır [100]. Eski çalışmalar elektrostatik çekimin temel tekniğine dayanmaktayken yeni anlayışla yapılan çalışmalar daha ziyade son 10-15 yıldır gerçekleştirilmektedir. Özellikle 90'ların ortalarından sonra yapılan çalışmalarda elektro çekim tekniğinin akışkanlar dinamiği ve elektrostatik

ile ilişkilendirildiği yaklaşım bir temel oluşturmuş ve bu teknolojinin yeniden ilgi çekmesini sağlamıştır[147]. 1990'ların ortalarında Reneker ve ark.,[160] elektro çekim prosesi üzerine çalışmaya başlamış ve pek çok araştırmacı, bu konu üzerine yoğunlaşmıştır. Bu tarihten sonra da elektro çekim yöntemi ile NL üretimine dair yayınlanan makale ve tezlerin sayısında gözle görülür bir artış gerçekleşmiştir. Şekil 1.19'da bu yükselişi gösteren bir grafik verilmiştir. Grafikte Sci-Finder tarama sisteminde Haziran 2004'e kadar yayınlanan çalışmaların yıllara göre miktarı verilmiştir[100].

Elektro çekim yöntemi ile ilgili yapılan bilimsel yayınların önemli bir bölümünü, prosesle, çözeltiyle ve çevreyle ilgili parametrelerin jet oluşumu, lif çapı, morfolojisi ve/veya yüzey morfolojilerine etkileri üzerine yapılan çalışmalar oluşturmaktadır [19], [151], [161]–[169] Bu çalışmalarda farklı parametrelerin, elektro çekim sürecindeki jet oluşumuna, elde edilen liflerin çapına, yüzey özelliklerine ve oluşan NL yüzeyin morfolojisine etkileri incelenmiş ve bu doğrultuda bazı çıkarımlar yapılmıştır. Doshi ve Reneker [73], Jaeger ve arkadaşları (1998), Reneker ve ark.[73], Taylor konisinden uzaklığın bir fonksiyonu olarak elektro eğirmenin jet çapındaki azalma miktarını belirlemişlerdir. Sistematik çalışmalarda Doshi ve Reneker, polietilenoksitin (PEO) başarılı elektro çekimi için viskozite etkisini incelemişlerdir. Hayati ve çalışma arkadaşları 1987'de yaptıkları bir çalışmada, çözelti iletkenliği ile whipping kararsızlığı arasındaki ilişkiyi tanımlamışlardır. Eski çalışmalardan beri polimerlerin elektro çekim denemelerinde yaşanan en önemli sıkıntılardan biri boncuk (bead) oluşumudur. Deitzel ve çalışma arkadaşları da NL boncuk oluşumu üzerine çalışmışlardır[147].

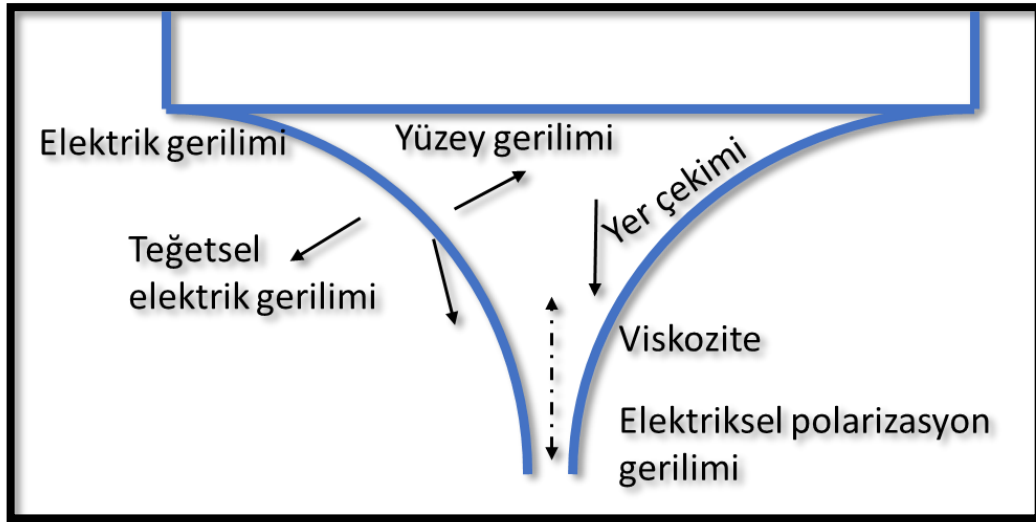
2.4 Elektro eğirme parametreleri

Elektro-eğirme yöntemi, çapı 10-100 nm aralığında değişen nanofiber ve nanotüp üretimini mümkün kılar. Bunu gözenek boyutunu yüzey alanı/hacim ve uzunluk/çap oranlarının yüksek olmasını kontrol ederek yapar. Ayrıca yöntem parametrelerini değiştirerek farklı yapılarda nanofiber üretim imkanı sağlar. Elektro-eğirme yönteminin parametreler Şekil'de verilmiştir.



Şekil 2. 10 Elektro eğirme prosesine etki eden parametreler

Elektro-eğirme yöntemi üç temel komponent içermektedir. Bunlar ilki yüksek voltaj kaynağıdır. İkincisi metalik iğne ve üçüncüsü toplayıcı plakadır (Şekil 2.10). Elektro-eğirme yönteminde alternative akım da kullanılmasına rağmen çoğunlukla doğru akım tercih edilmektedir. Komponentlerden biri olan metalik iğne, içinde polimer çözeltiye sahip şırınga ucunda bulunur. Polimerik çözelti iğneye doğru sabit ve kontrol edilebilir bir hız ile şırınga pompası sayesinde beslenir. Genellikle 1-30 kV arasında yüksek gerilim uygulanır. İğne ucunda asılı olan polimer damlacık elektriklenir. İndüklenmiş olan polimer damlacık yüzeye eşit bir şekilde dağılır[162], [170], [171][172]-[175].



Şekil 2.11 Taylor konisinin oluşuma etki eden kuvvetlerinin şematik gösterimi

Polimer jetinin toplayıcı ulaşana kadar havada geçirdiği uçuş süresi ve elektrik alan kuvveti, elektro çekim prosesini ve oluşan lifleri etkileyen faktörlerdir[60], [102], [142], [143], [176]–[183]. Düze ile toplayıcı arasındaki mesafe değiştirilerek hem uçuş süresi hem elektrik alan kuvveti değiştirilmiş olur. NL oluşumunda jetin uçuş süresi en az çözücünün buharlaşmasına kadar uzun olmalıdır. Mesafe kısaldığında bu süre kısalmaktadır. Çözücünün tamamı buharlaşmadığından dolayı liflerin temas noktalarında yapışmalar ve boncuk oluşumları görülecektir (Şekil 2.11). Ayrıca, toplayıcı ile düze arasındaki mesafe arttığında elektrik alan kuvveti de artacak ve jetin hızının artmasına neden olacak ve polimer jeti toplayıcıya daha erken ulaşacaktır [184]–[190]. Mesafe arttığında jetin izlediği yol artar. Bu yüzden elde edilen lif çaplarında düşüş görülür. Ayrıca yapılan çalışmalarda, toplayıcı-düze mesafesi kısaldığında elde edilen lifleri enine kesitlerinde form değişikliği görülmüştür. Bu form değişikliği dairesel formdan yassı forma dönüş şeklindedir[101].

2.4.1 Çözelti parametreleri

Polimerik çözeltilerde düşük konsantrasyonda, lif yapısında boncuklanma veya topaklanmalar gözlemlenmektedir. Konsantrasyon arttığında, boncukların morfolojisi küreselden iğ benzeri hale değişir ve sonuçta daha yüksek viskozite direnci nedeniyle artan çaplı tek tip liflerin oluşmasına sebep olmaktadır [52]. Bu bağlamda elektro eğirme için en önemli parametre çözelti oluşumundaki moleküler

yapı, viskozite, yüzey gerilimi, çözücü iletkenliği ve iğne ile kullanılan plaka arasındaki mesafe olarak bilinmektedir.

2.4.2.1 Moleküler Ağırlık

Moleküler ağırlık, viskozite, yüzey gerilimi, iletkenlik gibi elektriksel özellikleri değiştirir. Lif üretimi için yüksek moleküler ağırlıklı polimer kullanılarak istenen viskozitenin kullanıldığı gösterilmiştir. Elektrik iletkenliği, iletkenlik kuvveti, yüzey gerilimi ve çözeltinin reolojik özelliklerini etkileyen molekül ağırlığının [191]–[194], lif morfolojisini nasıl etkilediğini kapsayan çalışmalar da yapılmıştır. Üç farklı polimer molekül ağırlığı ile çalışan Geng ve ark. [195]–[203], sadece bir moleküler ağırlık değerinde başarılı şekilde nanolifler elde edebilmistir. Çok düşük moleküler ağırlık değerlerinde jet kırılması meydana geldiğinden çekim gerçekleşmezken [3], [204]–[206], çok yüksek molekül ağırlığı değerlerinde viskozite artısına bağlı olarak jetin elektrostatik kuvvetlerle çekilmesi mümkün olmamaktadır [21], [73], [90], [165], [178], [207]–[210], farklı molekül ağırlığına sahip polivinilalkol polimerleri ile gerçekleştirdiği çalışmada; düşük molekül ağırlığına sahip polimerler ile boncuklu, orta molekül ağırlığı değerlerinde silindirik ve düzgün, yüksek molekül ağırlık değerlerinde ise serit yapıları nanoliflerin elde edildiğini belirtmiştir. Yüksek hidroliz derecesi olan polimerlerde moleküler ağırlık artışı, çözgen buharlaşmasını yavaşlatabilmektedir. Bu da kolektöre çözeltinin henüz tam olarak üzerinden uzaklaşmamış liflerin toplanmasına neden olmaktadır. Kolektör üzerinde gerçekleşen çözücülerin buharlaşması ise, serit yapıları, düz NL oluşmasına sebebiyet vermektedir [3], [61], [67], [71], [142]–[144], [148], [207], [211]–[215].

2.4.2.2 Viskozite

Polimerik çözelti viskozitesi, lifin morfolojisini etkileyen önemli parametrelerden biridir. Elektro eğirme işlemi sırasında, düşük viskoziteli polimerik çözelti kullanıldığında, sürekli lif oluşumu meydana gelmektedir. Aksi takdirde, NL üretmek için yüksek viskoziteli bir çözelti kullanıldığında, jetlerin polimerik çözeltisinden çıkarımı zorlaşacaktır bu durumdan ötürü elektro eğirme işlemi için uygun optimum şartlara ve optimum viskoziteye ihtiyaç vardır. Çözeltilerin tüm reolojik davranışları elektrolif çekim yöntemi ile çekilebilirlikleri hakkında fikir vermektedir. Ayrıca akış hızı gibi proses parametrelerinin de nasıl kontrol edilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır [216]–[219]. Örneğin düşük viskozitelerle, daha

yüksek akış hızlarına çıkılabilmektedir [220]–[224]. Viskozite, sabit konsantrasyonda molekül ağırlığıyla, sabit molekül ağırlığında çözelti konsantrasyonu ile doğrudan kontrol edilebilmektedir [225]–[228][229][249]–[256]. Aynı polimer farklı molekül ağırlığındaki örnekleri çözelti içerisinde çözöldüğünde, genel olarak yüksek molekül ağırlığına sahip polimerden elde edilen çözelti, düşük molekül ağırlığına sahip polimerin çözeltisinden daha yüksek viskoziteye sahip olmaktadır. Yani polimerin molekül ağırlığı arttıkça oluşturduğu çözeltinin viskozitesi de artmaktadır [237]–[242]. Ayrıca kullanılan çözen de viskoziteyi değiştirmektedir [229].

2.4.2.3 Yüzey Gerilimi

Yüzey gerilimi, elektro eğirme işleminde NL çözeltisinin yüzey sürtünmesini azaltarak önemli bir rol oynar [243]–[245]. Boncuklu yapı olmadan lifler elde edilebilir. Çeşitli çözücüler, farklı yüzey gerilimlerine katkıda bulunabilir. Genellikle, bir çözeltinin yüksek yüzey gerilimi, jetlerin kararsızlığı ve püskürtülen damlacıkların oluşması nedeniyle elektro eğirme sürecini önlemektedir. Damlacıkların, boncukların ve liflerin oluşumu, çözeltinin yüzey gerilimine ve daha düşük bir elektrik alanında meydana gelmek üzere eğirme çözeltisine yardımcı olan eğirme çözeltisinin daha düşük yüzey gerilimine bağlıdır [244], [246]–[256]. Bunun sebebi; polimerik çözelti içerisinde bulunan bir molekül her taraftan gelen eşit kuvvetlerin momentum altında iken, polimerik çözelti sıvısı iğneden çıktıktan sonra etki altında kalan elektrik alan sebebiyle sıvı aynı şey geçerli olmamaktadır [244], [250], [257], [258]. Etken kuvvetler yüzey alanını en aza indirilecek şekilde etki ettiklerinden dolayı, şırınganın ucundan çıktıktan sonra oluşacak damlacıklı yapı, şekil yapısını yüzey gerilimi sayesinde almaktadır [65], [66]. Burada en önemli faktör; Polimerik çözelti yüzey geriliminin jetin sıvı iğne ucundan çıkışını engellemeyecek kadar yüksek, oluşacak damlacığın serbest bir şekilde akmasını engellemeyecek kadar da düşük olması gerekmektedir [8], [21], [178], [208], [259]–[275]. Elektro eğirme yöntemi ile elde edilen NL'lerin morfolojilerine yüzey geriliminin etkisini polimerik çözelti konsantrasyonuna ve viskoelastik kuvvetlere bağlı olarak açıklanmıştır [71], [276]–[286]. Viskoelastik kuvvetlerin yüzey gerilimini baskıladığı tüm çözelti türlerinde, yüzey geriliminin jet çapı üzerindeki etkisinin ihmal edilebilir olduğunu savunmuştur. Viskoelastik kuvvetlerin jette hızlı

şekil değişikliklerine karşı koyduğu bilinmektedir [3][287]–[289]. Düşük konsantrasyonlu çözeltiler ile çalışılırken, azalan viskoelastik kuvvetler nedeniyle yüzey geriliminin morfoloji üzerindeki rolünün arttığı belirtilmiştir [71], [276], [279]–[281], [290]–[293][294][3], [287][295].

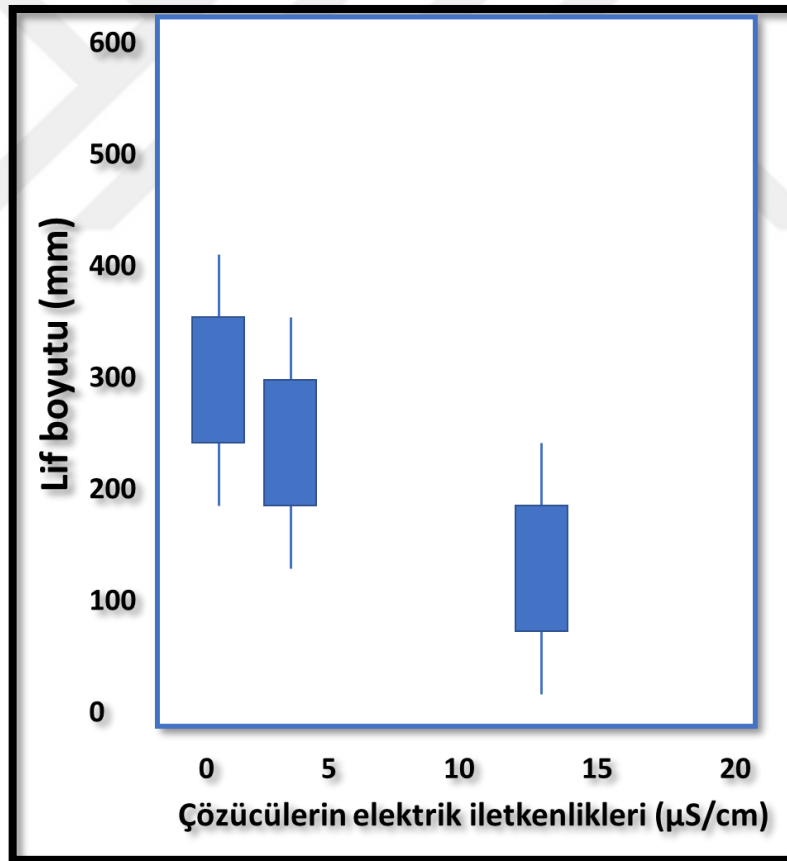
Bu parametrenin çözümü olarak çözücü yapısı veya miktarı optimize edilmektedir. Polimer çözeltilerinin karakteristik özelliklerini belirleyen çözeltilerin yüzey gerilimlerinin değiştirilmesiyle, NL morfolojisi üzerinde kontrol sağlanabilmektedir. Çözeltiye yüzey aktif madde ilavesi[66], yüzey gerilimi daha düşük olan uygun bir çözelti ilavesi [3] ile NL morfolojileri geliştirilebilmektedir.

2.4.2.4 Çözücünün İletkenlik Etkisi

Çözelti uçuculuğu da elektro eğirme düzgün morfolojili NL elde etmede kritik bir faktördür. Çözelti, lifin yapısal bütünlüğünü koruyacağı kadar kısa bir sürede, nanometre boyutlarına ulaşmasından önce katılaşmasına izin vermeyecek kadar da uzun bir sürede buharlaşmalıdır [8], [21], [178], [208], [259]–[275], [296]–[299]. Buharlaşma hızını; çözücü buhar basıncı, kaynama noktası, öz ısısı, entalpisi ve buharlaşma sıcaklığı, çözücü molekülleri arasındaki etkileşim, yüzey gerilimi ve sıvı yüzeyindeki hava akışı belirlemektedir [66]. Lifler kolektöre ulaştığında buharlaşmanın yeterince sağlanmaması durumunda serit benzeri liflerin oluşması söz konusu olabilmektedir [300], [301].

Çözelti iletkenliğine, polimer türüne, kullanılan çözücüye ve iyonize edilebilir tuzların mevcudiyetine göre karar verilir. Çözeltinin elektriksel iletkenliğinin artması, elektro eğrilmiş NL'lerin çapında önemli bir azalma olur, ancak düşük iletkenliğe sahip çözelti, tek tip lif üretmek için elektrik kuvvetiyle bir jetin yetersiz uzamasına neden olur ve boncuklar da elde edilebilir [10], [67], [302]–[312]. Elektro eğirme yöntemindeki en önemli çözelti özelliklerinden biri de elektrik iletkenliğidir. Çünkü viskoz polimer çözeltileri, yüzeylerindeki yük itmeleri ile gerilmektedir [305]. Bu itici kuvvetlerin yüzey gerilimini yenmesi ile elektro eğirme işlemi başlamaktadır [63], [67], [305], [313]–[323]. Aslında jet ile taşınan yükler öncelikle uygulanan elektrik alan, ikincil parametre olarak ise çözelti iletkenliği ile belirlenmektedir [324] jetin kararsızlık mekanizmasını açıklamak için gerçekleştirdikleri teorik çalışmalarında jet üzerindeki yük yoğunluğunun kararsızlık oluşturmak üzere elektrik alan ile etkileştiğini savunmaktadır. Jetin

kolektöre ulaşana kadar uğradığı kararsızlıkların (eğilme ya da kırılma kararsızlıklarının) jetin yörüngesine, yörünge­nin de dış elektrik alan ve iletkenliğe bağlı olduğunu vurgulamaktadırlar. Düşük iletkenlik, sebep olduğu kararsızlıklarla boncuklu NL oluşmasına sebep olabilirken [325] yüksek elektrik iletkenliği olan polimer çözeltileri ile jet, taşıdığı yüklere bağlı olarak daha fazla gerilebilmekte ve daha düzgün yapılı, ince NL elde edilebilmektedir [21], [60], [63], [72], [73], [88], [102], [142], [143], [148], [150], [176], [178]–[180], [182], [211], [215], [240], [263], [264], [318], [321], [323], [326]–[351][352][70]. Elektro eğirme çözeltilerine iletkenliği yüksek olan çözücüler ilavesi ile düzgün yapıya sahip NL’lerin, iletkenliği düşük olan çözelti ilavesi ile ise daha kalın ve daha büyük boncuklu liflerin oluşumu gözlemlenebilmektedir [353]–[355]. Elektrik iletkenlikleri farklı çözeltiler ile çalışan Tan ve ark.[323] da, iletkenlik artışı ile daha ince NL ürettiklerini belirtmiştir.



Şekil 4.1 Elektrik iletkenliği artışı ile lif çapındaki azalma

2.4.2 Proses Parametreleri

2.4.2.1 Uygulanan Gerilim

Elektrospinning işlemi sırasında çözüme uygulanan voltaj çok önemli bir faktördür[356]–[359]. Ancak eşik voltajına erişildikten sonra, lif oluşumu meydana gelir, bu, elektrik alanı ile birlikte çözelti üzerindeki gerekli yükleri içerir ve elektrospinning sürecini başlatır. Çalışmalar, daha yüksek voltajlar uygulandığında, daha fazla polimer püskürtmesinin olduğunu ve bunun daha büyük çaplı bir fiberin oluşumunu kolaylaştırdığını göstermiştir. Çoğu vaka, daha yüksek bir voltajın, jetteki daha yüksek kulombik kuvvetler ve daha güçlü bir elektrik alanı nedeniyle çözeltinin daha fazla gerilmesine yol açtığını göstermektedir. Bu etkiler, lif çapında azalmaya ve ayrıca liflerden çözücünün hızlı buharlaşmasına neden olur[71], [165], [327], [360]–[366].

2.4.2.2 Besleme hızı / Akış hızı

Sırıngadan polimerin akış hızı önemli bir parametredir[67], [309], [311], [321], [337], [361], [362], [365]–[375]. Jet hızını etkiler. Çözücü buharlaşma için yeterli zaman alacağından, besleme hızı daha düşüktür. Eğirme solüsyonunun her zaman minimum akış hızı olmalıdır. Yüksek akış hızları, toplayıcıya ulaşmadan önce uygun kuruma süresinin olmaması nedeniyle boncuklu liflerle sonuçlanır [181], [221], [309], [311], [314], [345], [366], [372]–[374], [376]–[385].

2.4.2.3 Kollektör türleri

Farklı tipte kollektörler kullanılmaktadır. Bu işlem sırasında, bir toplayıcı, nano fiberlerin toplandığı iletken bir substrat görevi görür. Genellikle toplayıcı olarak alüminyum folyo kullanılır, ancak toplanan liflerin aktarılmasındaki zorluk ve çeşitli uygulamalar için hizalanmış liflere ihtiyaç duyulması nedeniyle. Diğer toplayıcı türleri iletken kağıt, iletken kumaş, tel örgü, paralel veya ızgaralı çubuk, döner çubuk, döner tekerlek ve metanol pıhtılaşma banyosu gibi sıvı olmayan çözücüdür. Daha az iletken alanla, daha az yüzey alanı nedeniyle boncuklu lifler oluşturur[67], [166], [171], [234], [311], [322], [384], [386]–[390].

2.4.2.4 Kolektör mesafesine uç

Uç ile toplayıcı arasındaki mesafe, lif çaplarını ve morfolojisini kontrol etmek için kritik bir rol oynar. Kollektöre ulaşmadan önce liflerin kuruması için yeterli süre

vermek için minimum bir mesafenin gerekli olduğu, buna karşın çok yakın veya çok uzak mesafelerde boncukların gözlemlendiği bulunmuştur. Solventin nanoliflerden buharlaşmasını kolaylaştıran uç ve kolektör arasında optimum mesafe olmalıdır[391]–[417].

2.4.3 Çevre Parametreleri

Çözelti ve işleme parametrelerinin yanı sıra nem, sıcaklık vb. İçeren ortam parametreleri de vardır. Sıcaklık ve nem gibi ortam parametrelerinin elektrospinning sürecine etkilerini belirlemek için araştırmalar yapılmıştır[67], [102], [178], [276], [321], [332], [336]. Bu işlem sırasında, ortam faktörleri diğer parametrelerde önemli rol oynar. Örneğin, viskozite ve sıcaklığın birbiriyle ters ilişkisi vardır. Çalışmalar, çok düşük nemde, çözücünün buharlaşması daha hızlı olduğundan uçucu bir çözücünün hızla kuruyabileceğini göstermektedir. Bazen buharlaşma hızı, çözücünün iğnenin ucundan çıkarılmasına kıyasla çok hızlıdır ve bu, elektrospinning ile ilgili bir sorun yaratır [169], [230], [272], [344], [348], [418]–[423].

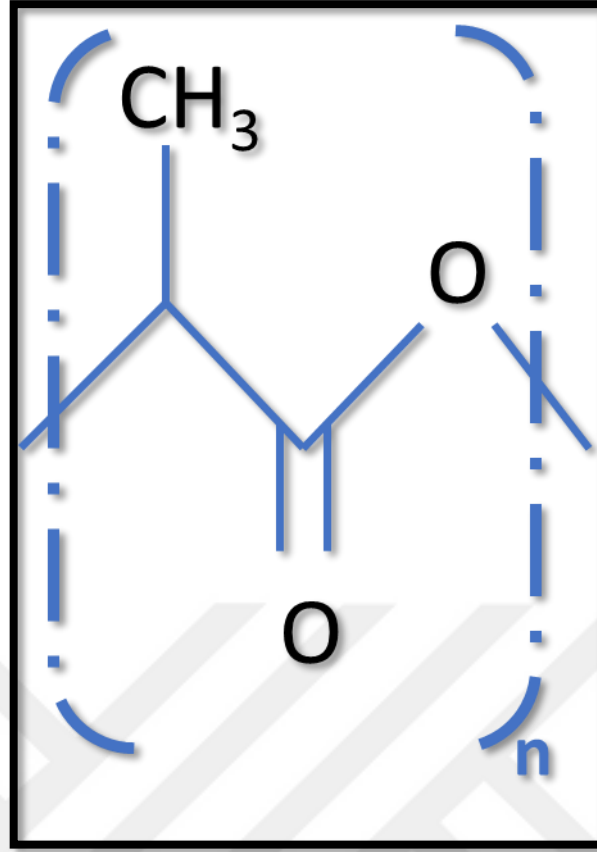
2.5 Nano Lif Üretimi için Kullanılan Kimyasallar ve Malzemeler

Bu çalışma içeriğinde kullanılan kimyasallar ve polimer malzemesine katkı olarak eklenmiş diğer malzemeler literatür çalışması olara ele alınmıştır. Bu çalışmada ana polimer olarak poli laktik asit (PLA) kullanılırken, PLA polimerini çözelti haline getirmek için kimyasal çözücüler kullanılmıştır. Yapılan üç ayrı çalışma içeriğine uygun PLA polimerine katkı olarak kullanılan diğer malzemeler sırasıyla; seftriakson disodium, grafen oksit (GO), selenyum (Se), klaritromisin (CLA), basitrasin ve esansiyel yağ olarak zataria multiflora seçilip literatür çalışmalarından bahsedilmiştir.

2.5.1 Polimer: Poli laktik asit (PLA)

Poli (laktik asit) (PLA), laktik asit monomerlerinden türetilen doğrusal bir alifatik polyesterdir PLA, biyolojik olarak uyumlu bir termoplastik alifatik polimerdir[1], [424]–[430]. PLA, ilaç yüklü malzemeler, doku iskelesi tasarımları ve uygulamaları için implant edilebilir ürünler[85], [431]–[434], elektronik sektöründe optik sensörler [435], yara örtüsü medikal malzemeleri[436]–[439] ve diş uygulamaları [85], [222], [429], [434], [440], [441] gibi çok farklı alanlarda biyomedikal uygulama

olarak. PLA, yoğunlaşma polimerizasyonu ve halka açma polimerizasyonu teknikleriyle üretilebilir. PLA, yoğunlaşma polimerizasyonu tekniği kullanılarak üretilebilir. Polimerizasyon sayesinde PLA, düşük moleküler ağırlığa ve zayıf mekanik özelliklere sahiptir. PLA'nın fiziksel özellikleri, halka açma polimerizasyonu ile mükemmel bir gelişme göstermiştir. Bu nedenle halka açma polimerizasyonu, PLA'yı ve monomer olarak kullanılan laktatiti üretmek için uygun bir yöntemdir [442]. PLA, ilaç dağıtım sistemleri olarak nano veya mikropartiküller olarak kullanıldığında. Farmasötik bilimler alanındaki bu biyolojik olarak parçalanabilen ve biyouyumlu taşıyıcılar, PLA'nın kargo, hazırlama yöntemleri, partikül boyutu veya moleküler ağırlığı ile etkileşimlere bağlı olarak farklı yükleme ve salım özellikleri göstermişlerdir [431], [433], [440], [443]–[449]. PLA bazlı antimikrobiyal malzemeler, mikrobiyal büyümeyi kontrol etmek için umut verici sistemler olarak büyük ilgi görmüştür. PLA'nın yenilenebilirlik, biyolojik olarak parçalanabilirlik ve klinik kullanım için ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onayı gibi olağanüstü fizikokimyasal özellikleri, gıda ambalajlarında ve biyomedikal malzemelerde uygulama için çekici perspektifler açmaktadır. Ek olarak PLA, düşük immünojenisite ve iyi mekanik özelliklerden dolayı yara sargısı üretmek için çok uygun bir polimerdir. Son yıllarda, antimikrobiyal aktiviteyi iyileştirmek için doğal bileşikler, peptitler, enzimler, metaller, kenetleme maddeleri ve antibiyotikler içeren çeşitli katkı maddeleri PLA polimerik matrisine eklenmiştir. PLA tabanlı antimikrobiyal sistemler hem akademik hem de endüstriyel araştırmalarda büyük ilgi görmüştür [450]–[453].



Şekil 2. 12 PLA yapısı

Fosil olmayan yenilenebilir doğal kaynaklardan üretilen termoplastik alifatik bir polyester olan PLA, yenilenebilirlik, biyolojik olarak parçalanabilirlik ve nispeten düşük maliyet gibi faydalı özellikleri nedeniyle ilginç bir biyopolimer olarak görülmüştür [1], [424], [427], [429], [445], [454], [455]. Günümüzde, enantiyomerik PLA, poli (L-laktit) (PLLA) ve poli (D-laktit) (PDLA) arasındaki farklı stereo kompleks oluşumu, stereo kompleksleşmenin PLA polimerlerinin mekanik özelliklerinin yanı sıra termal ve hidroliz direncini arttırdığını göstermiştir. PLA genellikle travmatik yaralar, akut yaralar ve kronik yaralarda yara örtüsü olarak kullanılır. İdeal bir yara pansumanı, yara yüzeyinde iyileşmenin yara iyileşmesi ve kabul edilebilir bir kozmetik görünüm ile tutarlı maksimum hızda gerçekleşebileceği bir ortam sağlayabilir. Lif çapı, gerilme mukavemeti ve yüzey özellikleri (hidrofiliklik veya hidrofobiklik) gibi yara sargısı malzemesi üretmek için nanofiber matlarda bazı önemli parametreler vardır. Nispeten nemli koşullar, bakteri büyümesi, çoğalması ve daha fazla enfeksiyon için uygun ortam yaratabilir. Bu fenomen, yara iyileşme sürecini olumsuz etkiler. Bu nedenle, faydalı yara sargısı malzemesi düşük sertliğe, yüksek esnekliğe, iyi mekanik özelliklere ve çift işlevli

yüzey karakterine sahip olabilir. Yara ile temas eden yüzey, yara dokusundan kan ve yara akıntısını emmek için hidrofilik karaktere sahip olmalıdır, aksi takdirde, yara pansuman malzemesinin çevresel temas yüzeyi, yara bölgesine nemin nüfuz etmesini önlemek için hidrofobik yüzeye sahip olabilir. PLA, PLLA ve PLGA, PVA ve kollajen ve kitosan gibi doğal polimerlerden farklı olarak nispeten hidrofobik polimerler iken, diğer yandan sentetik polimerler olarak polietilen ve polipropilen ile karşılaştırıldığında nispeten daha yüksek hidrofiliklik gösterebilirler[433], [441], [448], [456]–[462]. PLA polimerleri, cerrahi implant malzemeleri, ilaç dağıtım sistemleri, kılavuzlu doku ve kemik rejenerasyon platformları gibi çeşitli alanlarda ve ayrıca neo-doku büyümesi için gözenekli iskeleler olarak kullanılır. PLA'nın biyomedikal uygulamalarda kullanımı, sadece biyolojik olarak parçalanabilirliğine değil, aynı zamanda şekil belleği etkilerine uygunluğu dahil termo-mekanik özelliklerine de dayanmaktadır. PLA kopolimerleri, tıp için biyolojik olarak parçalanabilen çok çekici malzemelerdir [442], [463]–[466].

Biyo-bozunabilir polimerler arasında, yenilenebilir kaynaklardan sentezlenebilen biyolojik olarak parçalanabilen, çevre dostu ve ekonomik açıdan uygunluk gibi özelliklere sahip olan PLA uygulama alanları gelişmektedir [138][467]. PLA'nın kullanım alanlarından bazıları; damar içerisinden ilaç salımı, ortopedik veya cerrahi implant uygulamaları, biyo-uyumlu ve biyo-emilebilir tıbbi cihazların üretimi şeklindedir [138], [468], [469]. Bu geniş uygulama alanlarına sahip PLA içerisine ilaç yüklenmesi ve bu ilaçların etkisini belirlemeye yönelik araştırmalara olan ilgi hızla artmaktadır.

2.5.2 Polimer Kimyasalları: Çözücüler

Polimer malzemelerinin çözücüler, özellikleri ve fiber oluşumundaki katkıları gösterilmiştir. Söz konusu NL üretiminde kullanılan polimer çözeltilerinin tasarımını geliştirmek için hazırlanan her bir çözeltinin viskozitesi, iletkenliği ve yüzey aktifliğinin incelenmesinde önemli bir basamaktır. Karakterizasyon çalışmaları için literatürde, elde edilen NL SEM ile karakterize edilerek morfolojik özellikleri, polimer çözeltilerinin fizikokimyasal özellikleriyle karşılaştırılıp analiz edildiği bunun sonucunda üretilen NL her bir türüne temas açısı testi yapılarak, yapılan katkıların lif hidrofilikliğini etkilediği gözlemlenmiştir[19][20]. Çözelti parametreleri belirlenen biyopolimerler için uygun çözücüler belirlenerek polimer

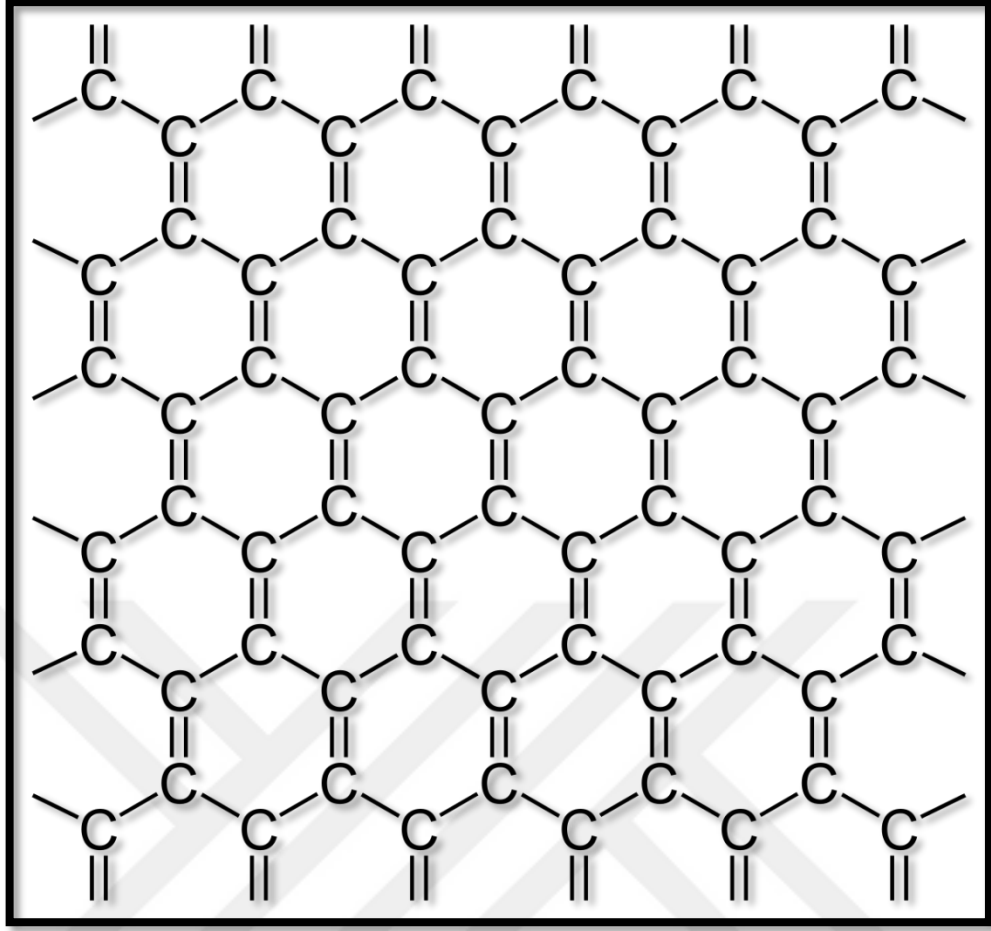
derişimi etkisi, çözelti iletkenliği etkisi, polimer molekül ağırlığı etkileri tespit edilerek araştırılmıştır [213], [325], [470]–[472] Kullanılacak polimere göre çözücüler değiştirilerek nanofiber yapıların morfolojik karakterizasyonu inceleneceği için litaratür çalışması önemli bir başlangıçtır. Öncelikle kullanılacak PLA polimeri için uygun çözücüler [321][473]; kloroform (CHL) [474], tetra-hidro-furan (THF) [475][19], dimetil formamid (DMF) [474][19] olduğu araştırılmıştır. Bu çözücüler ile hazırlanan çözelti, nanofiber elde etmek için litaratürde birinci basamak olarak ön görölmüştür.

Tablo 2. 1 Çözücülerin özellikleri ve lif morfolojisindeki değişiklikleri

Çözücüler	Kaynama Noktası (C)	Özellikler	Lif Morfolojisi	Referans
DCM	39,8	Düşük iletkenlik katsayısı, yüksek yüzey gerilimi	Boncuklu, geniş çap	[321][473]
CHL	61,2	Yüksek iç viskosite	Düşük polimer konsantrasyonunda boncuklu, daha yüksek konsantrasyonda pürüzsüz	[474]
THF	66	Yüksek dipol momenti, iyi iletkenlik	Pürüzsüz ve boncuklu, yüksek gözenek yoğunluğu	[475][19]
Etanol	78	Düşük yüzey gerilimi, yüksek iç viskosite	Pürüzsüz, geniş çap	[474][476][3]
Su	100	Düşük iç viskosite	Boncuklu, küçük çap	[474][476]
DMF	153	Yüksek dipol momenti, yüksek iletkenlik, düşük iç viskosite	Pürüzsüz ve boncuklu, yuvarlak	[474][19]

2.5.3 Polimer Katkısı: Grafen Oksit (GO)

Grafen, önemli potansiyele sahip nispeten yeni bir biyomedikal uygulama alanıdır. Son araştırmalar grafen-hücre (veya doku, organ) etkileşimlerinin anlaşıldığını göstermiştir; özellikle hücresel alım mekanizmaları hala zorludur [477]. Grafen, tek atom kalınlığında bağımsız bir 2D kristaldir. Aslında, petekli bir ağda altı atomlu halkaların katmanlarını içeren bir karbon allotropudur ve teorik olarak gerçek bir düzlemsel aromatik makromolekül olarak görülebilir [478]. Grafen, olağandışı elektronik esneklik, yüksek düzlemsel yüzey alanı ($\sim 2630 \text{ m}^2 / \text{g}$), olağanüstü mekanik mukavemet (Young modülü, $\sim 1100 \text{ GPa}$) ve benzersiz termal iletkenlik ($\sim 5000 \text{ W} / \text{m} / \text{K}$) gibi olağanüstü özellikler gösterir. Güçlendirilmiş biyopolimerler için oldukça popüler bir nano ölçekli katkı maddesidir. Grafen ve grafen türevlerinin biyolojik bir sisteme girdikten sonra nasıl bir etki bırakacağı *in vivo* ortamda gözlenmesi büyük önem arz etmektedir. Artık grafenin biyolojik etkisinin karmaşık olduğu ve maruziyet dozu ve yöntemlerinin yanı sıra kimyasal işlevselleştirme, yanal boyut, kalınlık ve yüzey özelliklerinden büyük ölçüde etkilendiği kabul edilmiştir [477]. GO, peroksidazlar tarafından kolayca parçalanır ve yüksek ilaç yükleme kapasitesi ve antibakteriyel özelliklere sahiptir [479]. GO, yüksek mekanik direnç, kimyasal stabilite, geniş yüzey alanı ve düşük toksisite gibi faydalı özellikleri sayesinde, biyomedikal uygulamalarda üzerine yaygın olarak çalışmalar yapılmaktadır. Bu malzemenin yüzeyinde polar grupların varlığı, polimer matrislerle uyumluluğu artırır. Ayrıca, antibakteriyel özellikleri ve yüksek yüzey / hacim oranı sayesinde GO, antimikrobiyal ve antiviral yüzeylerin gelişimi için umut verici bir materyaldir [480]–[482].



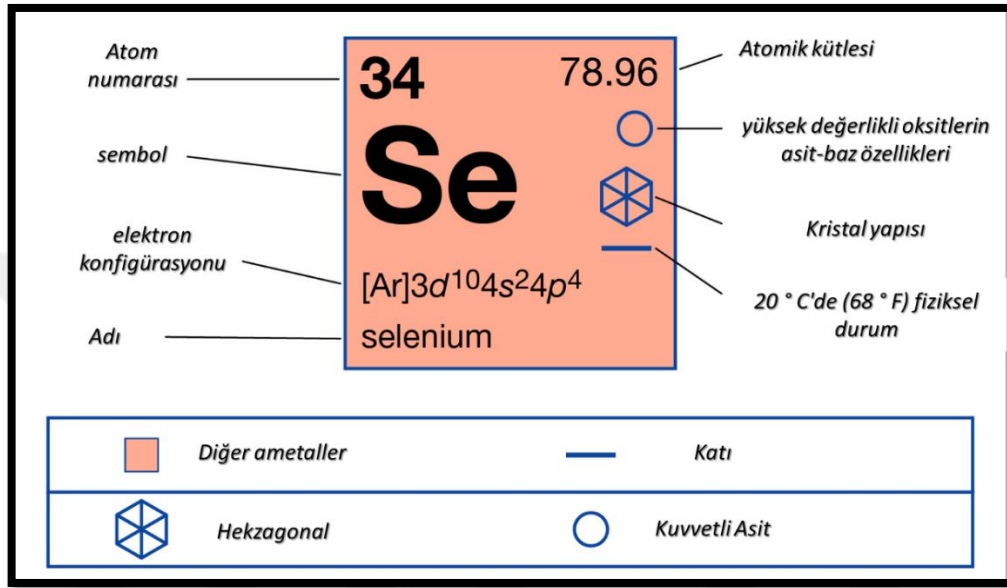
Şekil 2. 13 Grafen Oksit yapısı

GO sentezi modifiye Hummers metoduyla gerçekleştirilmektedir [483], [484]. Bu metotla GO, grafene indirgenerek kimyasal yöntemle grafit içerisindeki Oskijen içerek gruplar uzaklaştırılarak kahverengiden siyaha dönüşmektedir. Bu yöntemle kimyasal indirgenme gerçekleşir [485]–[487].

2.5.4 Polimer Katkısı: Antiajan; Selenyum (Se)

Selenyum (Se) çoğunlukla selenoproteinlerde (selenometiyonin olarak) bulunur ve bunların çoğu önemli antioksidan [488], [489] ve antiinflamatuvar etkidir [490]. Bu nedenle, yüksek plazma Se konsantrasyonları, yüksek seviyelerde selenoproteinleri harekete geçiren oksidatif strese bağlı olabilir [488]. Se'nin anti-oksidatif ve antiinflamatuvar özellikleri nedeniyle, Se seviyeleri ile yüksek oksidatif stres ve kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar, diyabete bağlı iltihaplanma ile ilişkili olduğu yaygın olarak bilinen durumlar arasındaki ilişki incelenmiştir [491]. Örneğin, selenoprotein P'nin plazma konsantrasyonunun tip 2 diyabet (T2D) deneklerinde daha yüksek olduğu, diyabetik yüksek seviyelerde oksidatif stres ve

insülin direnci ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Yine de selenometiyonini taşıyan serum albümini diyabette azalır. Selenoprotein P ekspresyonunun, inflamasyon fazı sırasında azaldığı bilinmektedir. Bu nedenle, T2D'de oluşan inflamatuvarın sistemik yanıtı sırasında kandaki selenyum seviyeleri düşer. Bilim adamları, diyabetin bozulmuş glukoz toleransı veya iyi bilinen T2D fazlarının ve ilgili oksidatif stres seviyesinin plazma selenyum konsantrasyonunu etkilediğini varsaymıştır [488].



Şekil 2. 14 Se periyodik tablodaki genel bilgileri

Se bir antioksidandır ve canlı organizmalar için temel yararlı özelliklere sahiptir. Delilbaşı ve çalışma arkadaşları, selenyum ile diyabetik arasındaki ilişkiyi belirlemek için bir açıklama yaptı. İncelemelerinde otuz dokuz Wistar sıçanı kullanıldı. Kontrol, selenyum verilen kontrol, diyabetik ve selenyum verilen diyabet grupları olmak üzere dört ana grubu oluşturulmuştur. Diyabetik + selenyum ve kontrol + selenyum gruplarına 4 hafta / gün 5 μ mol / kg / gün sodyum selenit intraperitoneal enjeksiyon yapılmıştır. Tüm hayvanlar 5. haftada belirlendi. Diyabetik gruptaki yüksek kan şekeri seviyesi ve düşük vücut ağırlığı selenyum uygulamasından önemli ölçüde etkilenmedi. Histolojik inceleme, selenyum verilen diyabet grubunda daha sağlıklı bir görünümün incelendiğini göstermiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre, selenyumun mandibulada diyabetin neden olduğu yapısal değişiklikler üzerinde faydalı etkileri vardır [492].

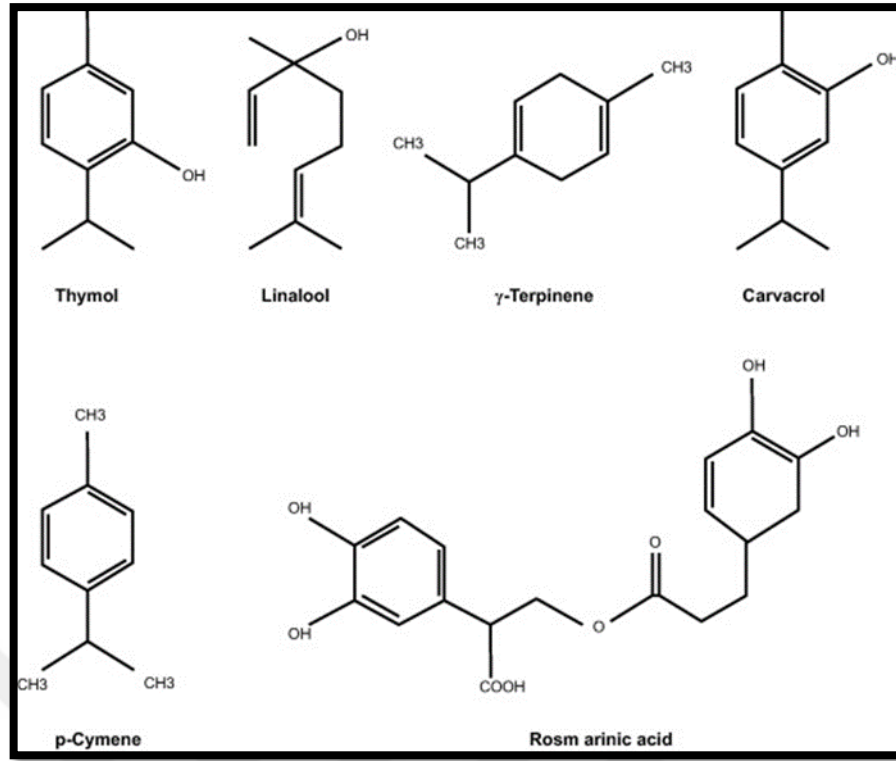
Bazı hipotezler mevcut olsa bile, Se takviyesi henüz insülin direncine neden olabilir. Bazı bilim adamları, Se'nin glikoz homeostazı ile ilgili olarak yararlı olabileceğini ve

insülin direncini azaltabileceğini düşünüyor. Jacobs vd. Se ve T2D arasındaki ilişkiyi göstermek için bir deney yapılır. Önceki çalışmalar, 200 µg / gün Se ile takviyeden sonra T2D riski için istatistiksel olarak anlamlı bir genel risk artışı olmadığını göstermektedir. Bu deneyi, farklı karakteristik özelliklere sahip 400 kişi ile gerçekleştirdiler. Plazma glikozu için 200 µg / gün Se kullandılar ve insülin, randomizasyondan önce ve müdahalenin tamamlanmasından sonraki 6 ay içinde ölçüldü. Ne cinsiyete ne de yaşa göre tabakalaşma, tedavi grubuna göre insülin duyarlılığı üzerinde istatistiksel olarak önemli bir etki meydana getirmedi [493].

2.5.5 Polimer Katkısı: Antioksidan/Antiajan; Zataria Multiflora (ZM)

ZM, ortak Farsça adı "Avishan-e-Shirazi "(Avishan, kekiğin Farsça adı ve Shiraz, İran'daki bir şehrin adıdır), orta ve güney İran, Pakistan ve Afganistan'da yaygın olarak yetişen lamiaceae familyasına ait kekik benzeri farklı türlerdeki zahter adı altındaki İran kekiği olarak bilinen bir bitkidir[494], [495]. ZM'nin aromatik ve tıbbi özelliklere sahip olduğu bildirilmektedir. Bu türün yaprakları genellikle gıda işlemede aromatik bir baharat olarak kullanılır. Ayrıca, geleneksel tıpta ZM, kramplar, kas ağrıları, mide bulantısı, hazımsızlık, ishal ve bulaşıcı hastalıklar gibi çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kullanılmaktadır [53]. Biyomedikal uygulamalarda jeller, NL'ler, filmler ve doku iskelesi şeklinde kullanılırlar. Çünkü doğada kolaylıkla bulunurlar. Kolay çözülürler, biyouyumludurlar, toksik değildirler, antimikrobiyal ve nemlendirici özellikler gösterirler, bu nedenlerle mükemmel biyolojik ve fiziko-kimyasal özelliklere sahiptirler [53], [494]–[514],

Bitkilerden türetilen uçucu yağlar, bakteriyel enfeksiyonların üstesinden gelmek için uzun süredir kullanılmaktadır. ZM uçucu yağın antimikrobiyal özellikleri ve etki mekanizması daha önce ayrıntılı olarak rapor edilmiştir [515]–[517]. ZM antioksidan kimyasal içerik yapısı gereği (Şekil 1. 5) uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesinin, karvakrol ve timol gibi yüksek fenolik bileşik içeriğine bağlı olabileceği gösterilmiştir [53], [495], [500], [518], [519], [520].

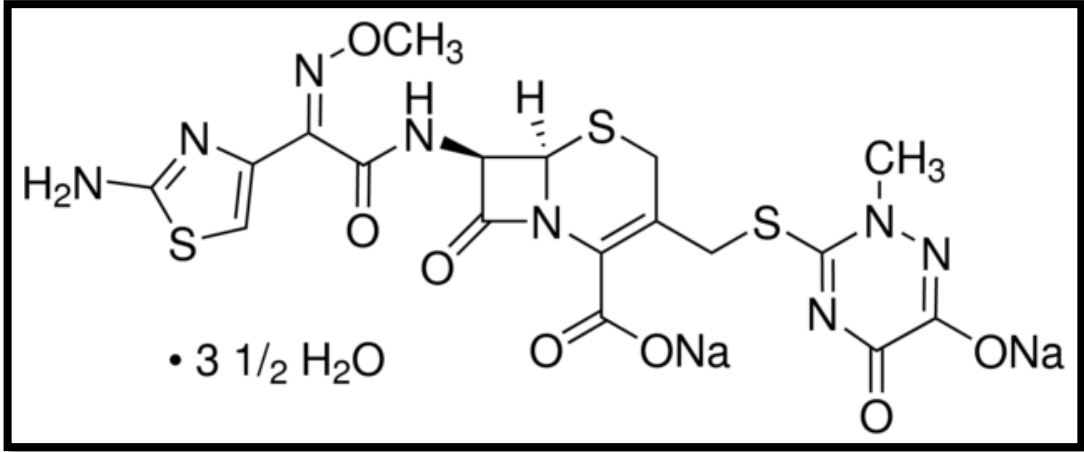


Şekil 2. 15 Zataria Multiflora antioksidan içerikleri

Şu anda, vajinal kremler, oral damlalar, şuruplar ve yumuşak kapsüller gibi bazı farmasötik ZM formları piyasada mevcuttur [53]. ZM'nin farklı farmasötik formlarının antimikrobiyal bir ajan olarak bulunmasına rağmen, şu ana kadar yara sargısında kullanılmamıştır [521]–[523].

2.5.6 Polimer Katkısı: İlaç; Seftriakson disodyum

Seftriakson, bakteri hücre duvarlarının peptidoglikan tabakasının sentezini bozan üçüncü nesil bir sefalosporin antibiyotiktir. Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı etkilidir. Seftriaksonun merkezi sinir sisteminde EAAT2 pompa ekspresyonunu artırdığı ve glutamaterjik toksisiteyi azalttığı düşünülmektedir[524].

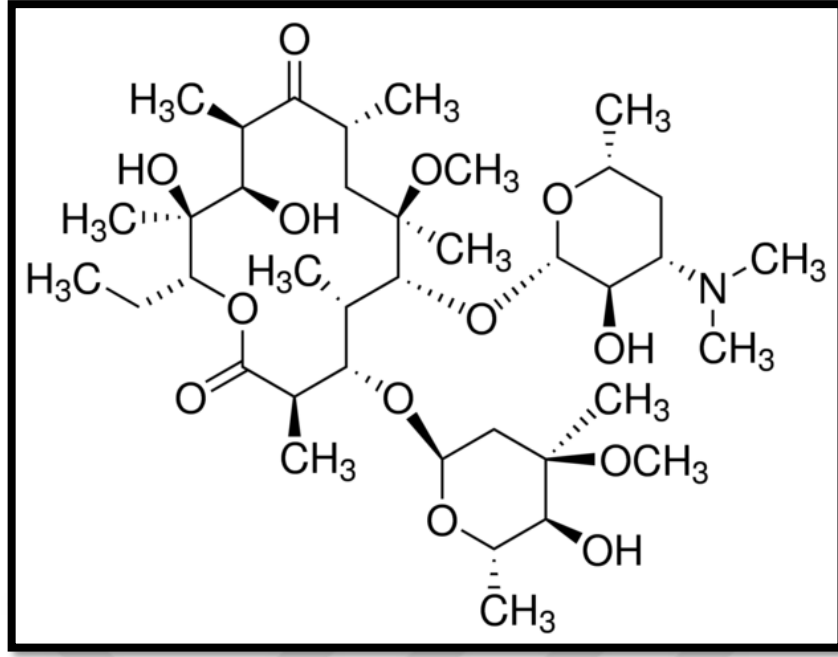


Şekil 2. 16 Sefriakson kimyapsal yapısı

Antibakteriyel ajan olarak Seftriakson disodyum tuz, Hemiheptahydrate kullanılır. Seftriakson, neonatal ensefalopati pentilentetrazol ile uyarılan konvülsiyonları azaltmak için ilaca bağlı immün hemolitik anemilerin profilaktik stratejilerini incelemek için kullanılır. Seftriakson, bakteri hücre duvarlarının peptidoglikan tabakasının sentezini bozan üçüncü nesil bir sefalosporin antibiyotiktir. Gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı etkilidir. Seftriaksonun, merkezi sinir sisteminde EAAT2 pompa ekspresyonunu artırdığı ve glutamaterjik toksisiteyi azalttığı düşünülmektedir. İlaç, duyarlı mikroorganizma enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan önemli hedef proteinlere bağlanarak bakterilerde hücre duvarı sentezini inhibe ederek öldürücü etkiye sahiptir.

2.5.7 Polimer Katkısı: İlaç; Klaritromisin (CLA)

Klaritromisin (CAS adı: 6-O-Methylethromycin; CAS kayıt numarası: 81103-11-9; Moleküler formül: C₃₈H₆₉N₁₃; Moleküler ağırlık: 747,9); yapısal olarak eritromisine bağlı, aside dayanıklı, oral yoldan uygulanan bir makrolid antimikrobiyal ilaçtır [525], [526]. CLA, eritromisine benzer geniş bir antimikrobiyal aktivite spektrumuna sahiptir ve bir dizi Gram-pozitif ve Gram-negatif organizmayı, atipik patojenleri ve bazı anaeroblara inhibe eder[527].



Şekil 2. 17 CLA kimyasal yapısı

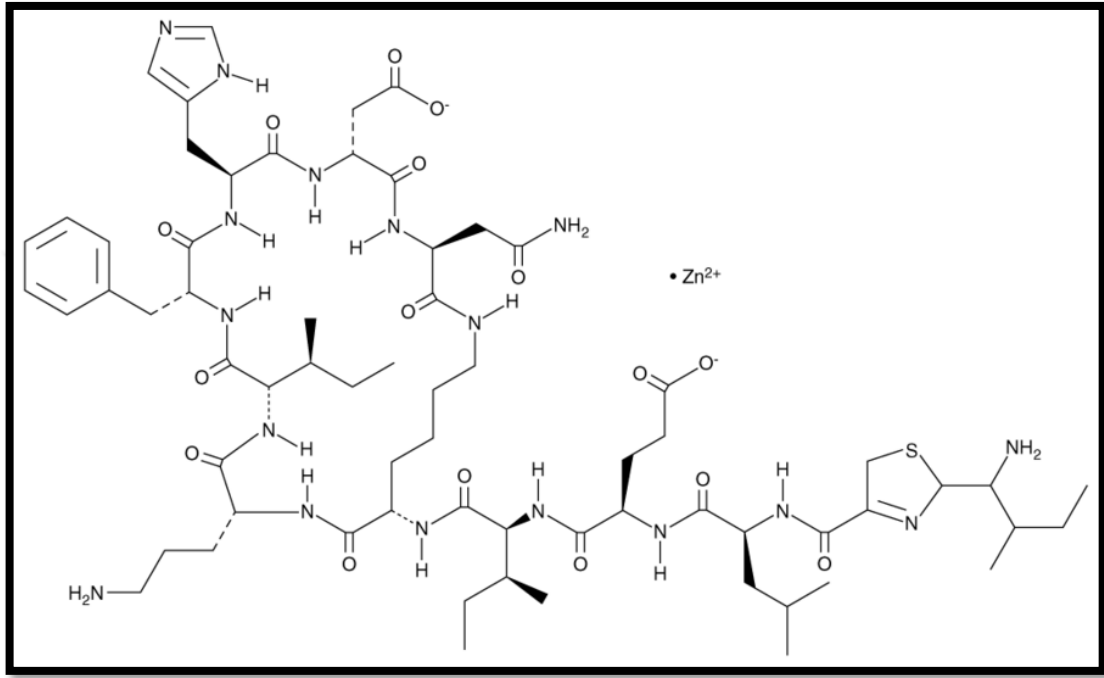
CLA, üstün bir farmakokinetik profile sahiptir[528]–[532]. Klaritromisine göre gelişmiş farmakokinetik profili ve in vitro antimikrobiyal aktivitesi enfeksiyon hastalıklarında üstün etkinlikte olduğunu ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, CLA, temelde daha az gastrointestinal rahatsızlıklara neden olarak daha fazla tolerans gösterir[532]–[534].

Sonuç olarak, gelişiminin bu aşamasında CLA, toplum kaynaklı enfeksiyonların tedavisi için onu diğer makrolidlere ve β -laktam antibiyotiklere faydalı bir alternatif haline getirecek bir klinik profile sahip olduğu görülmektedir. CLA, in vitro aktivite spektrumuna sahiptir. *S.aureus* ve *S. epidermidis* suşlarına karşı duyarlıdır[535]. CLA, *Bacillus* türlerine karşı test edilen en güçlü makroliddir ve *Listeria monocytogenes*'e karşı daha aktiftir. CLA, *Corynebacterium* türlerine karşı genel olarak zayıf aktivite gösterir, ancak bu bulgunun bir izolat alt popülasyonu tarafından direnci yansıttığı düşünülmektedir[536].

2.5.8 Polimer Katkısı: İlaç; Basitrasin (BAC)

Farmakolojik etkisi duyarlı gram-pozitif ve gram-negatif aeroblar/anaerobların sebep olduğu bütün enfeksiyonlara karşı direnç göstermektedir. BAC, derideki çeşitli iltihabi ve mikrobik durumların ve yaralanmaların tedavisinde kullanılan antibiyotik bir deri pomadıdır. Bulaşıcı cilt hastalığı (impetigo), egzama, kıl kökü

iltihabı, tırnak çevresinin iltihabı, cıban, apse ve dolama gibi derideki bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisi ile dış kulak yolu hastalıkları, yaralar ve diğer cilt travmaları, meme başı çatlakları ve yanıkların tedavisinde kullanılan bu etken ilaç; birçok gram pozitif bakteriye karşı etkili polipeptit yapısında bir antibiyotik. Hücre duvarında peptidoglikan katmanının oluşumunu etkileyerek etkisini gösterir. Deri, mukoza ve yaralara tropikal uygulamada kullanılır.



Şekil 2. 18 Basitrasin zinc kimyasal yapısı

BAC, ilk olarak *B. licheniformis*'ten izole edilen siklik bir polipeptit antibiyotiktir.[537]–[544] BAC içeren formülasyonlar, genellikle diğer antibiyotiklerle kombine edilerek, insanlarda ve hayvanlarda enfeksiyonların topikal tedavisi için kullanılır[545], [546][547]. BAC aktivitesi çinko ile artırılabilir[548]. BAC, peptidoglikan sentezinde bir lipid taşıyıcı olan C55-izopropil pirofosfatı (IPP) ayırır ve bu şekilde hücre duvarı biyosentezini bozar[545], [547].

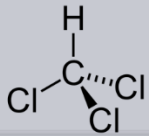
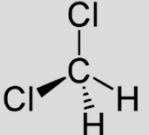
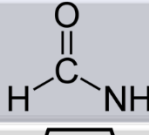
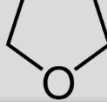
MATERYAL VE METOT

Bu tez çalışmasında NL üretimi için polimer malzemesi olarak Poli (laktik asit) (PLA) kullanılmıştır. Granül formundaki PLA Nature Works LLC (PLA 4060D) firmasından temin edilmiştir.

3.1 Polimer Çözeltisinde Kullanılan Çözücüler

PLA çözeltisi elde etmek için çok çeşitli çözücüler kullanılmıştır ve tüm çözücüler MERCK firmasından satın alınmıştır. Çözücülerin adı, kısa adı, formülü, molar kütle, kaynama noktası ve yapı bilgileri Tablo 3.1' de verilmektedir.

Tablo 3. 1 PLA polimer çözeltileri, özellikleri ve yapısı

Çözücü adı	Kısa adı	Formül	Molar Kütle (g/mol)	Kaynama Noktası (°C)	Yapısı
Kloroform	CHL	CHCl_3	119,38	61,2	
Diklorometan	DCM	CH_2Cl_2	84,93	39,6	
Dimetilformamid	DMF	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$	73,09	153	
Tetrahidrofuran	THF	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$	72,11	66	

3.2 PLA Katkı Malzemeleri

PLA nanoliflerin biyomedikal uygulamalara aktarımında katkı malzemelerinin etkisini belirlemek amacıyla lif üretimi öncesinde PLA çözeltilere çeşitli katkılamalar yapılmıştır. İlaç katkısı olarak; seftriakson disodium, BAC, CLA

kullanılırken, iletkenlik özelliği için GO, antiajan olarak da Se ve ZM katkıları yapılmıştır.

3.2.1 İlaç Katkı Malzemeler

3.2.1.1 Seftriakson Disodyum

Seftriakson disodyum ($C_{18}H_{16}N_8 Na_2O_7S_{33}.5H_2O$, MA = 661.60 g/mol, CAS 104376-79-6) Merck'ten alınmıştır.. Sefalosporin bir üçüncü nesil antibiyotiktir. Suda ve aseton, formamide kadar çeşitli çözücülerde çözünmektedir [325].

3.2.1.2 CLA

Klaritromisin ($C_{38}H_{69}NO_{13}$, MW: 747.95CAS no:81103-11-9Abbott Laboratories, Illinois, United States). Merck firmasından alınmış etken bir antibiyotiktir.

3.2.3.1 BAC

Basitrasin (katolog no. B0125, Poole, UK) Merck firmasından alınmıştır. Item № 21212; CAS № 1405-89-6; Safılık $\geq 70\%$ (Bacitracin A,B1,B3 mixture; Moleküler formülü; $C_{66}H_{101}N_{17}O_{16}S \cdot Zn$; Formül ağırlığı: 1486.)

3.2.2 GO Sentezinde Kullanılan Malzemeler

GO sentezinin gerçekleşmesi için (Modifiye Hummers yöntemi) kullanılan kimyasallar ve malzemeler;

- grafit tozu (3 g, $<20 \mu m$) (Merck),
- sülfürik-asit (H_2SO_4) (Merck),
- fosforik asit (H_3PO_4) (Merck),
- potasyum permanganat (18 g, $KMnO_4$) (Merck).
- Mineral yağı (Merck).
- hidrojen klorür (ağırlıkça% 35 HCl)(Merck)
- Etanol ve 400 g Buz kullanılmıştır.

3.2.3 Antiajan/Antioksidan Katkı Malzemeleri

3.2.3.1 Se

Se (Mw = 78.96, Sodium selenite CAS-10102-18-8 Santa Cruz) toz formunda Merck firmasından alınmış etken bir antiajandır.

3.2.3.2 ZM

ZM Mısır Çarşısında temin edilmiştir (İstanbul) ortak Farsça adı "Avishan-e-Shirazi" (Avishan, kekiğin Farsça adı ve Shiraz, İran'daki bir şehrin adıdır), orta ve güney İran, Pakistan ve Afganistan'da yaygın olarak yetişen lamiaceae familyasına ait kekik benzeri bir bitkidir[494], [495]

3.3 Antimikrobiyal Aktivite Analizinde Kullanılan Malzemeler

Polimerik liflerin antimikrobiyal analizleri aktivitesini belirlemek için disk ayırma ve minimal inhibitör konsantrasyon (MIC) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Analizlerde 6 adet (5 adet bakteri ve 1 adet mantar)(Tablo 3.2) mikroorganizma kullanılmıştır.

Tablo 3. 2 Antimikrobiyal aktivite analizi için kullanılan bakteri ve mantar suşları

Mikroorganizmalar		Suş NO
Gram (+) Bakteri	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778
	<i>Listeria Monocytognes</i>	ATCC 6633
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
Gram (-) Bakteri	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
	<i>Salmonella typhi</i>	
Mantar	<i>Candida albicans</i>	ATCC 14053

3.4 Sitotoksosite Testlerinde Kullanılan Malzemeler

Hücre kültürü süreçlerinde kullanılan DMEM/F12, Fotal Bovine Serum (FBS), Tripsin-EDTA (%0,25) solüsyonları ve Tripan Blue (%0,4) Gibco marka olup, kullanılan diğer kimyasalar sırasıyla; penisilin-streptomisin antibiyotik solüsyonu (GeneMark), 4'6 – diamidino - 2 phenylindole (DAPI), Fluorescein isothiocyanate

(FITC), XTT ve Phenazine Methosulfate (PMS) ise Santa Cruz Biotechnology markasından temin edilmiştir.

3.5 PLA ve Katkılı PLA Çözeltilerinin Hazırlanması

İlaç yüklü polimer NL eldesi için bu çalışmada ana polimer olarak PLA kullanılmıştır. Bu çalışmada PLA tabanlı üç farklı polimerik NL eldesi üzerine çalışılmıştır. Hem çözelti hazırlanması hem de NL elde edilmesinde yapılan çalışmalar kodlanarak ilerlemiştir. Bu çalışmalar ve içerikleri kısaltmalar şeklinde Tablo 3.3'te aşağıda verilmiştir.

Tablo 3. 3 PLA çalışma grupları ve içerik kodlamaları

Çalışma Grubu	Çözücüler	Katkı Malzemeleri			Çalışma grubu İçerik Kodlaması
		İlaç	Nano Malzeme	Antiajan/Antioksidan	
PLA_1	DMF	---	---	---	PLA
	THF	Seftriakson	---	---	PLA/İlaç
	CHL	Disodyum			
PLA_2	DMF	---	---	---	PLA
		---	Grafen Oksit (GO)	---	PLA-G
		---	Grafen Oksit (GO)	Selenyum (Se)	PLA-G1
	DCM	Klaritromisin (CLA)	Grafen Oksit (GO)	Selenyum (Se)	PLA-G2
		Klaritromisin (CLA)	Grafen Oksit (GO)		PLA-G3
PLA_3	CHL	---	---	---	PLA
		Basitrasin (BAC)	---	---	PLA/BAC
	DMF	---	---	Zataria Multiflora (ZM)	PLA/ZM
		Basitrasin (BAC)	---	Zataria Multiflora (ZM)	PLA/BAC/ZM

PLA çözelti çalışmaları üç farklı çalışma grubunda ele alınmıştır. Her bir çalışma grubu farklı çözücüler kullanılarak elde edilen PLA çözeltilerini kapsamaktadır. Çözelti ve çözücü bilgileri Tablo 3.3'de yer almaktadır. PLA polimerinin farklı konsantrasyon oranlarında çözeltileri hazırlanmış ve optimum çözelti özellikleri çeşitli fiziksel karakterizasyon yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. İlaç ve diğer katkı malzemeleri ise belirlenen optimum PLA çözelti konsantrasyon değerlerde farklı yüzdelerle çözeltiliye eklenmiştir. Her bir çalışma grubu çözeltilerinin

hazırlanması sonrasında çözelti karakterizasyonları olarak sırasıyla yoğunluk, viskozite, yüzey gerilimi ve iletkenlik analizleri yapılmıştır.

3.6 PLA_1 Çalışma Grubu Çözeltisinin Hazırlanması

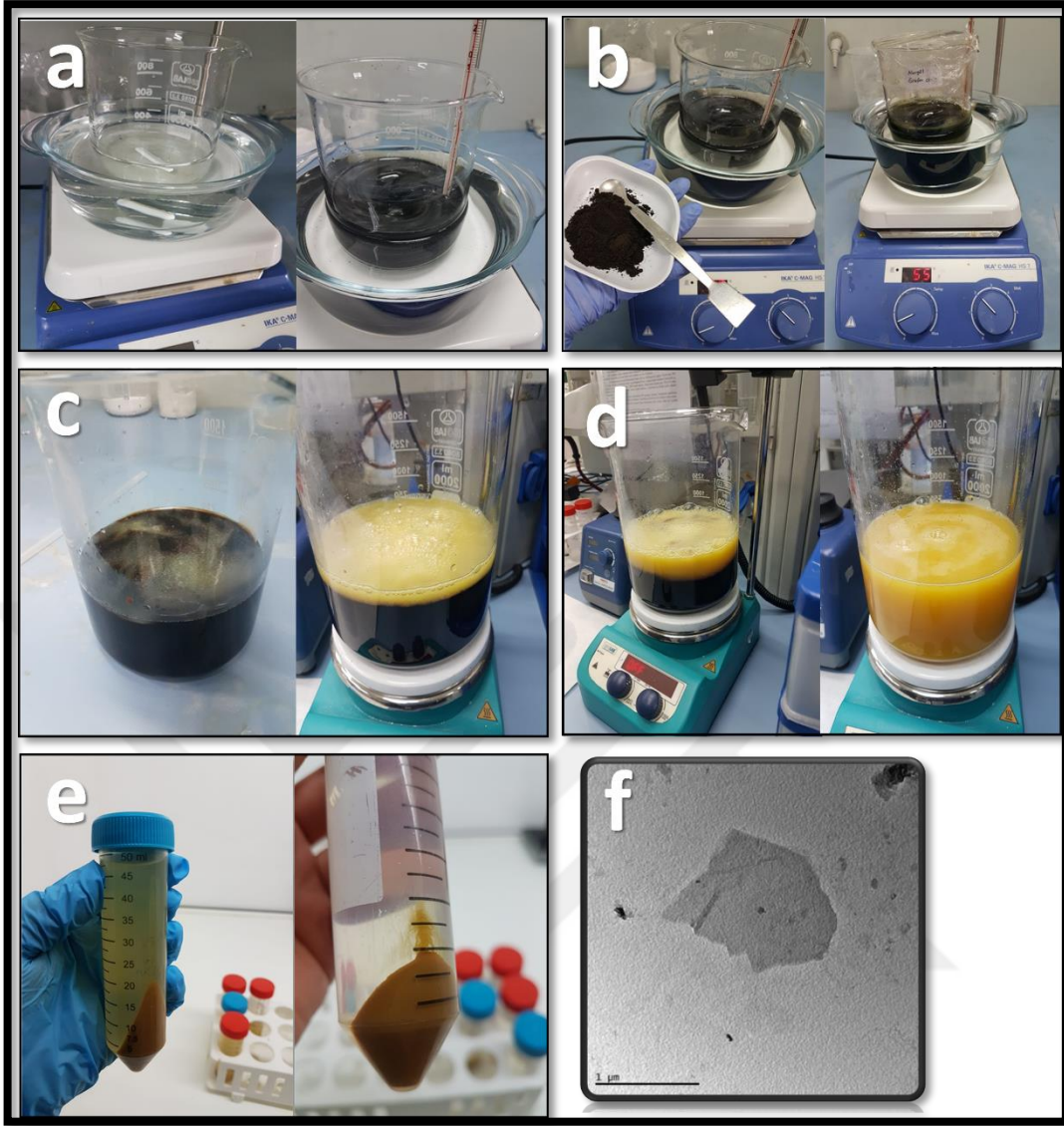
PLA_1 çözeltisi farklı oranlarda üçlü çözücü sistemleri kullanılarak ağırlıkça % 5, 8 ve 12 PLA polimer konsantrasyonlarında gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, PLA parçacıkları CHL içinde çözüldü ve ardından çözeltiye DMF ve THF yavaşça eklendi. PLA bu süreçte homojenik dağılım için oda sıcaklığında 40 dakika boyunca karıştırıldı. Hem PLA hem de CHL miktarı sabit tutularak, polimer konsantrasyonları çözücü oranı varyasyonları arasında belirlenmiştir. DMF, THF ve CHL'nin çözücü oranları; ağırlıkça % 5, 8, 12 için sırasıyla; 2: 2: 1 v / v, 1: 1: 1 v / v, 0,5: 0,5: 1 v / v olarak değiştirilmiştir. En son aşamada PLA miktarının %1 oranınca seftriakson disodium ilacı kontrollü bir şekilde eklenmiş ve 2 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Bu çalışma grubu içerik olarak, PLA ve PLA/ilacı olarak ilerlemiştir.

3.7 PLA_2 Çalışma Grubu Çözeltisinin Hazırlanması

PLA'nın farklı ağırlık yüzdeleri (ağırlıkça% 3, 5 ve 8) 5 mL DMF ve 15 mL DCM (1: 3 v / v) solüsyonları içinde çözüldü ve homojen bir solüsyon elde etmek için 2 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. GO nano malzemesi eklenmeden önce Hummers metoduyla sentezlenmiştir. Daha sonra çözeltiye ayrı ayrı, GO, Se ve CLA ilave edilmiştir. Bu çalışma grubu içerik olarak PLA, PLA-G, PLA-G1, PLA-G2, PLA-G3 kodlamalarıyla ilerlemiştir.

3.7.1 GO Sentezi

Grafen oksit sentez işlemleri ait görsel akış Şekil de yer alırken sentez işlemleri maddeler halinde aşağıda açıklanmaktadır.



Şekil 3. 1 GO; a, b, c, d, e, f sentez aşamaları

- 1 L beher içerisine 360 ml H_2SO_4 (sülfürik asit) 40 ml H_3PO_4 (fosforik asit) ve balığı da ekledikten sonra beher mineral yağ dolu kabın içerisine yerleştirilmiştir. Bu kap ile beheri, sıcaklığı 55 °C ve hızı 200 rpm olarak ayarlanan manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiştir. Beher içerisine 3 gr grafit tozu eklenmiştir. Grafitten dolayı karışımın rengi siyaha dönmüştür. Beher içerisine yavaş yavaş 18 gr $KMnO_4$ (Potasyum Permanganat) eklenerek sentezin tamamlanması için 16 saat beklenmiştir.
- GO sentezi gerçekleşmiştir. Sentez işleminden sonra yıkama işlemine geçilmiştir.
- 2 L'lik beher içerisine 400 gr buz, buzun üzerine de sentezlenen Grafen (400 ml) eklendi. Toplam karışım miktarı 800 ml oldu. Beher karıştırıcı üzerine

alındıktan sonra beher içerisine karışımın rengi koyu yeşilden sarıya dönene kadar (4 kez) 3'er ml H₂O₂ (Hidrojen Peroksit) eklenmiştir. Oluşan sarı renkli karışım 16 adet 50 ml'lik santrifüj tüpüne döküldükten sonra 3000 rpm hızda 45 dk santrifüje bırakılmıştır.

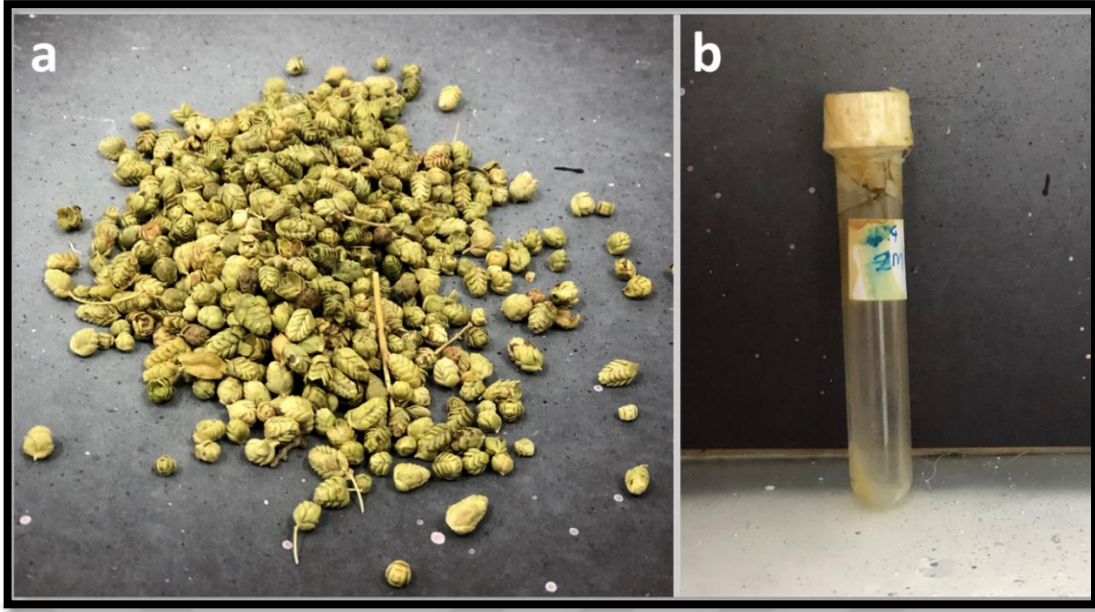
- d. Santrifüj bittikten sonra, distile suyla yıkama işlemi için tüplerin üstünde kalan sıvı boşaltıldı ve tüplere 50 ml'ye kadar distile su ilave edilip tekrar 3000 rpm hızda 45 dk santrifüje bırakılmıştır.
- e. Santrifüj bittikten sonra, HCl ile yıkama işlemi için tüplerin üstünde kalan sıvı boşaltılarak 40 ml'ye kadar HCl ilave edilmiştir. Cam çubuk tüp içerisine 2-3 kez batırılıp çıkarıldıktan sonra tüp 3000 rpm hızda, 45 dk santrifüje bırakılmıştır. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Santrifüj bittikten sonra, C₂H₅OH (Etanol) ile yıkama işlemi için tüplerin üstünde kalan sıvı boşaltılarak 40 ml'ye kadar C₂H₅OH ilave edilip 6000 rpm hızda 45 dk santrifüje bırakılmıştır. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Yıkama işlemi tamamlanan karışım kurutma işlemi başlayana kadar C₂H₅OH içerisinde saklanmıştır.
- f. Elde edilen GO tozları TEM'de analiz edilerek sheet yapısı görüntülenmiştir.

3.8 PLA_3 Çalışma Grubu Çözeltilerinin Hazırlanması

İlk iki çalışmada kullanılan %8 optimum değeri bu çözelti çalışma içeriğinde tek başına kullanılmıştır. PLA polimeri ağırlıkça %8 oranında sırasıyla 10 mL CHL, 5 mL DMF, 5 mL THF (2:1:1) çözücülerini kullanılarak çözülmüş, hazırlanan çözeltilere sırasıyla BAC ve ZM esansiyel yağı eklenerek 2 saat boyunca manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Bu çalışma grubu PLA, PLA/BAC, PLA/ZM, PLA/BAC/ZM kodlamalarıyla içerik olarak ilerlemiştir.

3.8.1 Esansiyel yağ ekstrasyonu

ZM bitkisi (İran kekiği, Pakistan) 10' ar gramlık kartuşlar hazırlanarak metanol çözücüsü içerisinde soxhlet aparatı ile ekstrakte edildi. Elde edilen ekstraktların çözücülerini rotary evaporatörde (Hei-VAP Advantage, Heidolph, GER) ultrasafe su ile buharlaştırıldı. Hazırlanan ekstraktlar kullanılabilecek kadar +4 °C' de saklandı.

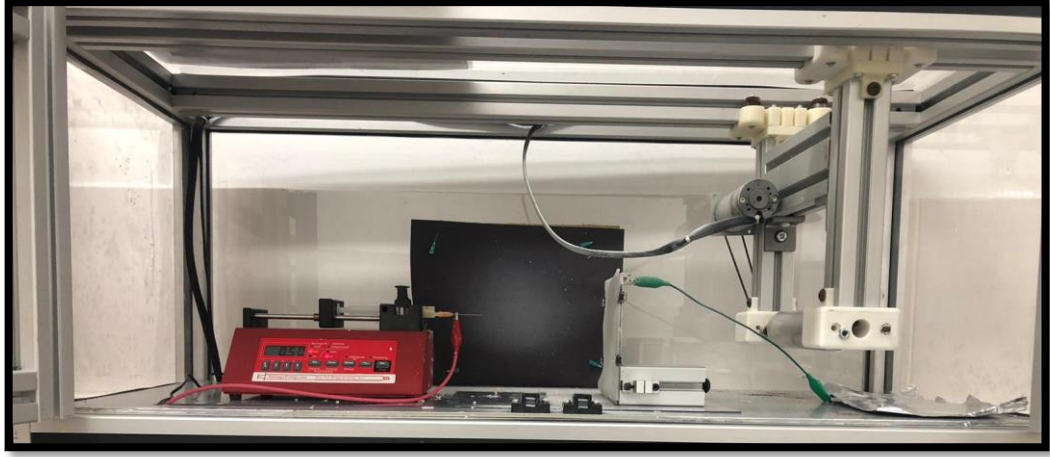


Şekil 3. 2 a. deneysel çalışmada kullanılan ZM yaprakları, **b.** ekstrasyon edilmiş ZM esansiyel yağı

ZM bitkinin özü için hazırlanan ekstratlar 100 ml'lik ultrasaf su içerisinde tekrar çözülmüş ve iki kısma ayrılmıştır. Birinci kısım (25 ml) elektro eğirme işleminde kullanılmak üzere PLA_3 çözeltiye bahsedilen oranlarda katılarak polimerik çözelti sorası NL uygulamasında kullanılmıştır. Daha sonrasında üretilen NL'lerin karakterizasyonları ve antioksidan özelliklerin belirlenmesinde fayda sağlamıştır. Geri kalan kısım (75 ml) ise fenolik bileşiklerin tayini amacıyla seçimli ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen organik faz alınıp HPLC konsantrasyonunu ayarlamak için tekrar rotary evaporatörde buharlaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. HPLC mobil faz çözücü sistemine uygun olan bir çözücü (ultrasafe su) ile konsantrasyon ayarlaması yapılan çözeltiler, son olarak 0,45 µ'luk filtreden geçirilerek partiküllerinden ayrıştırılmıştır

3.9 Polimerik Nano Liflerin (PNL) Elektro Eğirmesi

Elektro eğirme işlemleri farklı iğne ucu çapı, uygulama voltajı ve akış hızlarında gerçekleştirilmiştir. Toplayıcı plaka üzerine alüminyum folyo kullanılmış, polimer çözeltisinin yüklendiği şırınganın iğne ucu ile toplayıcı arasındaki mesafe 15 cm olarak sabit tutulmuştur. Elektro eğirme sistemi şematik görüntüsü Şekil 3.3'de yer almaktadır. İğne ucu 0.63 mm çapına sahip iğneler kullanılarak ve farklı uygulama voltajı değerlerinde fiber üretimleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3. 3 Laboratuvar ortamında kullanılan elektro eğirme cihazı

Tablo 3. 4 PNL elektro eğirme işlem detayları

Polimer çözeltisi	konsantrasyon %	Voltaj kV	Akış hızı mL/sa	Mesafe cm
PLA_1	5-8-12	10-15	0,2-0,5	15
PLA_2	3-5-8	25	1	
PLA_3	8	25	1,0-1,5	

3.10 PLA_1 Çalışma Grubu NL Elektro Eğirme İşlemleri

PNL için uygulanan elektro eğirme proses çalışmaları, farklı voltaj ve debilerde gerçekleştirilmiştir. PLA_1 NL'lerin üretimi için voltajlar 10-15 kV arasında değiştirilirken, akış hızları 0,5-1 mL / saat arasında değiştirilmiştir. Tüm lifler alüminyum folyo üzerinde toplanmış, iğne ucu-kollektör mesafesi 15 cm olarak korunmuştur. Tüm PNL'ler, testlerden ve karakterizasyondan önce solvent tortusunu çıkarmak için bir gece boyunca çeker ocak altında kurutulmuştur.

3.11 PLA_2 Çalışma Grubu NL Elektro Eğirme İşlemleri

Bu çalışma grubunda NL üretimi için elektro eğirme işlemi süreci çalışmaları; ağırlıkça % 8 olarak hazırlanan çözelti süspansiyon edilmiş, paslanmaz çelik bir iğne ile 10 mL'lik plastik şırıngaya çekilmiştir; PLA, PLA-G, PLA-G1, PLA-G2 ve PLA-G3

çözeltileri kullanıldı. Elektro eğirme işleminin parametreleri voltaj 25 kV, mesafe 15 cm ve besleme hızı 4000 μ L / saat olacak şekilde ayarlanmıştır. 37 ° C'de yaklaşık % 50 nem ve diğer elektro eğirme işlem parametreleri tüm durumlar için ortaktır.

3.12 PLA_3 Çalışma Grubu NL Elektro Eğirme İşlemleri

PLA_3 çalışma gurubu NL üretimi için elektro eğirme koşulları diğer PLA_2 işlemleri ile aynı düzlemde gerçekleştirilmiştir. PLA_3 çalışma grubu çözeltileri ağırlıkça % 8 olarak 20 mL'lik beher içinde hazırlanmış, paslanmaz çelik bir iğne ile 10 mL'lik plastik şırıngaya çekilmiştir. Geri kalan 10 mL'lik çözelti çözelti karakterizasyonları için kullanılmıştır. Elektro eğirme işleminin parametreleri voltaj 25 kV, mesafe 15 cm olarak sabitlenmiştir. Kollektör üzerinde yağlı kağıt kullanılarak elde edilen anoliflerin kolayca yağlı kağıttan çıkarılması hızlanmıştır. Akış hızı 1,0-1,5 arasında değiştirilmiştir.

3.13 Polimer Çözeltilerin Karakterizasyonu

Elektro eğirme yönteminde lif oluşumunun morfolojisinde çözeltilerin sahip olduğu viskozite, yüzey gerilimi ve elektrik iletkenliği kritik öneme sahiptir. Her bir çözelti 20 mL beherlerde hazırlanarak, 10 mL'lik beher içindeki çözelti, çözelti karakterizasyonları için kullanıma hazır hale gelmiştir.

3.13.1 Viskozite Tayini

PLA_1, PLA_2 ve PLA_3 çözelti viskoziteleri (DV-E, Brookfield AMETEK, ABD), kullanılarak ölçülmüştür. Tüm ölçümler 5 -30 hız (RPM) değeri aralıklarında ortam sıcaklığında (25 ° C) dört kez tekrarlanmıştır. Tüm ekipman parçaları, ölçümlerden önce kalibre edilmiştir.

3.13.2 Yüzey Gerilimi Tayini

PLA_1, PLA_2 ve PLA_3 çözelti yüzey gerilimleri DuNoge (Zuidema-W.) metodu kullanarak Sigma (Force Tensiometers, SIGMA 702) cihazı ile yapılmıştır. Her biri 10 ml olan çözeltiler beher camlarına dökülerek ölçüm için hazırlanmıştır. Yüzey gerilimi tayini plakaya uygulanan kuvvet hesabıyla ölçülmektedir. Ölçümler oda sıcaklığında (25 ° C) gerçekleşmiştir.

3.13.3 Elektrik iletkenliği

PLA_1, PLA_2 ve PLA_3 çözelti elektriksel iletkenlik Cond 3110 SET 1, WTW, (Almanya) cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm standartları gereği polimerik çözeltilerde kullanılacak polimer kontrol grubu olarak 23°C'de 0,010 mol/L, 0,040 mol/L ve 0,100 mol/L ölçümünde potasyum klorür çözeltilerinin iletkenlikleri sırasıyla 1359 $\mu\text{S}/\text{cm}$, 5234 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ve 12,39 mS/cm olacak şekilde kalibre edilmiştir. Hem iletkenlik ölçüm probu hem de termometre probu çözelti içerisine daldırılarak elektrik iletkenlik değeri mS/cm cinsinden kaydedilmiştir.

3.14 Polimerik Nano Liflerin (PNL) Karakterizasyonu

Polimerik çözeltisi hazırlanmış ve karakterize edilmiş PLA_1, PLA_2 ve PLA_3 çözeltileri elektro eğirme işleminden geçtikten sonra üretilen liflerin karakterizasyon işlemine geçilmiştir. Burada yapılan karakterizasyon tipleri; lif morfolojik yapısının belirlenmesi, karbon yapılarının tespiti için FTIR, XRD, Raman spektroskopisi analizi. İlaç salım kinetiğinin izlenmesi, kullanılan antioksidan esansiyel yağların karvakrol ve timol bileşikleri için HPLC ve GC-MS tayini ve son olarak mikroorganizma testleriyle hücre testlerinin analizleri yapılmıştır

3.14.1 Lif Morfolojisi (SEM)

PLA_1, PLA_2 ve PLA_3 için elektro eğirmede gerçekleşen tüm PNL numuneleri için Taramalı elektron mikroskobu (SEM, Zeiss EVO LS10) kullanılmıştır. NL numuneleri EDX (Bruker 123 eV Quantax Microanalysis System) cihazı ile elementel analizi yapılmıştır. Fiber çapı belirlemek amacıyla görüntü yazılımı (ImageJ) kullanılmıştır. Ortalama nano fiber çapını belirlemek için her bir örnek için 200 ölçüm yapılmıştır.

3.14.2 Fourier dönüşümlü kızılötesi ışın spektrometresi (FT-IR) analizi

PLA_2 çalışma içeriğinde bulunan GO için, Fourier Kızılötesi Spektroskopisi FT-IR (Perkin Elmer Spectrum 400, ATR) cihazı ile 900-3700 cm^{-1} aralığında 4 ile 32 tarama ortalaması alınarak analizi yapılmıştır.

3.14.3 XRD analizi

P2 çalışması içeriğinde sentezlenen Grafen oksit kristal yapısı Cu K α radyasyonlarına ($\lambda=1.54060 \text{ \AA}$, 45 kV ve 40 mA) sahip tarama hızı 1°/dakikada 3°

ile 20° arası olan XRD (X-ray diffraction analysis; X' Pert PRO PANalytical equipment) ile karakterize edilmiştir.

3.14.4 Raman Spektroskopisi

Raman spektroskopik işlemleri Renishaw InVia sistemi ile yapılmıştır. PLA_2 çalışması için elde edilen GO yapısı içerisindeki fonksiyonel grupların tespiti ve FT-IR/XRD sonuç bulgularıyla karşılaştırma yapmak için bu analiz yapılmıştır. Bu analizde Grafit yapıdan GO yapıya geçişteki düzenli düzensiz yapıları incelemek için Raman spektroskopi analizi, numuneler pelet haline getirildikten sonra moleküllerin GO üzerindeki titreşimleri 1000-2000 cm⁻¹ tarama aralıklarında 785 nm objektif lens ve >300 mW lazer gücünde i-Raman Plus cihazında gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen GO'nun literatürde var olan karakteristik ısı özellikleri ile kıyaslamak için Shimadzu TGA-50 marka cihazda, 10 °C/dk'lık sıcaklık artış hızında, 100 mL/dk azot çıkış hızında ve 0-800 oC sıcaklık aralığında Termogravimetrik (TG) analizi yapılmıştır.

3.14.5 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) analizi

P3 çalışma içeriğinde bulunan ZM esansiyel yağ için iki faz arasındaki kütle transferini içeren ayırma tekniği olarak adlandırılmaktadır. RP-HPLC-UV analizleri UV-Vis dedektör ile donanımlı Thermo Finnigan Surveyor HPLC(Perkin Elmer Spectrum) cihazı ile yapılmıştır. Analizler ters faz C18 kolonu (150 mm x 4,6 mm, 5µ; Fortis) kullanarak ve asetronitril, su ve asetik asitle gradient program uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca numune ve standartların enjeksiyon hacmi 10 µL' ye, mobil faz akış hızı 1,2 mL/dk' ya ve kolon sıcaklığı 30 °C' ye ayarlanarak çalışma optimizasyonu sağlanmıştır.

3.14.6 Gaz Kromatografisi ve Kütle Tarayıcısı (GC-MS) analizi

P3 çalışma içeriğinde bulunan ZM esansiyel yağının fenol bileşenlerindeki antioksidan kütleli içeriklerinin belirlenmesi amacıyla Gaz Kromatografisi Kütle Tarayıcısı (GC-MS) cihazı kullanılmıştır. Analizler YL Instruments 6100 GC marka gaz kromatografisi(Perkin Elmer Spectrum) cihazında gerçekleştirilmiştir. Taşıyıcı gaz, akış hızı 1 mL dk⁻¹ olan helyumdur. Gaz kromatografisi cihazı alev iyonizasyon dedektörü (FID) ve 60 m x 0.32 mm x 0.25 µm ZB-FFAP kolonu içermektedir. Kolon sıcaklık programı 40°C ile başlayıp, 15°C/dk hızla 180°C'ye, ardından 7°C/dk hızla

240°C'ye çıkmaktadır. Enjektör sıcaklığı 240°C olup, akış hızı 2 ml/dk olarak ayarlanmıştır. Dedektör sıcaklığı 280°C'de tutulmuştur. Taşıyıcı gaz olarak hidrojen gazı kullanılmıştır. Metil heptadekonat (C17:0) iç standart olarak kullanılmış ve örnekler metil heptadekonat ve n-heptan ile karıştırılarak gaz kromatografisi için hazır hale getirilmiştir.

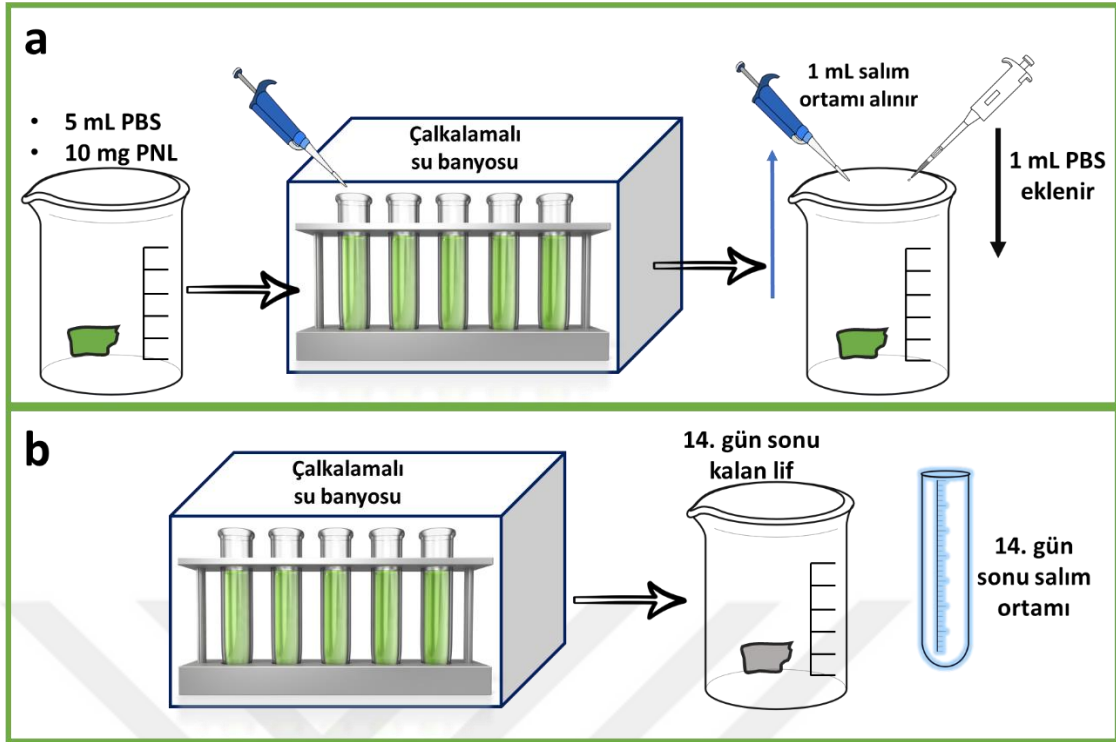
3.15 PNL için *In vitro* Çalışmaları

3.15.1 Salım Kinetiği Testleri

Salım kinetiği çalışmasında iki ayrı deneysel çalışma analizi gerçekleştirilmiştir. Birinci çalışma labratuvar ortamında çalkalamalı su banyosu üzerinde bilindik bir salım modeli olarak belirlenmiştir. İkinci çalışma Franz difüzyon analizi ile salım kinetiğine matematiksel modelleme getirilerek etken madde miktarı tayini ve stabilitesi çalışmaları yapılmıştır.

3.15.1.1 PLA_2 Çalışma Grubu Salım Kinetiği

Salım ortamı için öncelikle fosfat tampon çözeltisi (PBS) (pH 7.2) 10 kat seyreltilerek hazırlanmıştır. 2,6807gram (0.01 mol) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 450 mL ultra saf suda çözünmüştür. Hazırlanan her iki çözelti karıştırılmış ve üzerine 8,766gram (0,15 mol) NaCl eklenip karıştırılmıştır. Elde edilen çözeltinin pH'ı 1M NaOH veya 1M HCl yardımıyla 7.2'ye ayarlanmıştır. Toplam hacim 1 litre olacak şekilde ultra saf sui le tamamlanmıştır. Her bir örnek için 10 mg PNL'ye 1mL PBS ilave edilmiş ve bu çözelti 37°C'de 100 rpm'de çalkalamalı su banyosunda bekletilmiştir. Belirlenen saatlerde (Şekil 3.4) PNL çözeltisi 25 dakika 1460 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatantı ayrılmıştır. Çökeltiye 1mL taze PBS eklenerek tekrar 37°C'de 100 rpm'de çalkalamalı su banyosunda beklemeye bırakılmıştır. Bu işlemler belirlenen her saatte tekrarlanmıştır alınan süpernatantlar UV / Vis Spektrometresinde (Lambda 35; PerkinElmer, Almanya) analiz edilmiştir. Bu kapsamda 280 nm'de uyarılan örneklerin 335,05 nm'deki emisyon pikinin şiddet değerleri kaydedilmiştir. Kalibrasyon eğrisi kullanılarak salınan peptid miktarları kümülatif değer olarak hesaplanmıştır. Bu doğrultuda ilaç ve katkı malzemesi için kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.



Şekil 3. 4 PNL salım kinetiği testi işleyişi; **a.** 24 saat boyunca salım ortamı, **b.** 14. gün sonunda salım ortamı

PLA₂ çalışmasındaki CLA etken maddesinin içinde olduğu NL'lerin salım profillerinin belirlenebilmesi için farklı iki yol izlenmiştir.

Şekil 3.1'de salım kinetiği testleri tek NL numunesi üzerinden yapılmıştır. 20 mL'lik beherlerin içine koyulan numuneler 50 devir/dk. hızla hareket eden 37 °C'deki bir çalkalamalı su banyosuna yerleştirilmiştir. Belirlenmiş 9 zaman dilimlerinde (1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8., 24. saatleri) ortamdan 1 mL'lik salım yapılmış PBS alıp yerine 1 mL'lik yeni PBS eklenmiştir. Bu durum 2 hafta olarak bu durum tekrarlanmıştır.

3.15.1.2 PLA₃ çalışma Grubu Salım Kinetiği: Franz Difüzyon Hücresi

Genel olarak, ilaç içeren polimerik matrislerden çözünen maddenin taşınması işlemi, etken maddenin difüzyon olarak yani, polimerik malzemenin matris yapısının şişmesi ve erezyona uğraması malzemenin biyozonur olup olmamsıyla gerçekleşmektedir [549]. Spesifik olarak, Fick'in difüzyon yasası, polimerik matrislerden çözünen maddenin taşınmasının tanımlanması için temel sağlar. Fickian difüzyon olayında polimerin gevşeme zamanı (burada çözünen taşıma işlemi belirtir t_r) karakteristik solvent dağılımı süresi (çok daha büyüktür t_d) $T_r \approx t_d$ kavramlarıyla tanımlanır. Matematiksel modellemenin amacı, karmaşık salım

sürecini basitleştirmek ve belirli bir malzeme sisteminin salım mekanizmaları hakkında fikir sahibi olmaktır. Bu nedenle, matematiksel bir model esas olarak bir veya iki baskın itici güce odaklanır. İlaç salınımının amacı, hem doğal olarak türetilmiş hem de sentetik olarak türetilmiş makromoleküller üzerinde biyo-etkinliği en üst seviyeye çıkarmak, klinik uygulanabilirliği kolaylaştırmak ve yaşam kalitesini iyileştirmeyi hedeflemektedir.

- **Biyobozunmayan Polimerik Matris Salım Kinetiği**

Bozunmayan polimerler, peroral dozaj formlarının, transdermal filmlerin ve implant cihazlarının imalatında yaygın olarak kullanılmaktadır[550]. Bu polimerler arasında poliüretanlar, silikon kauçuk, poli (etilen vinil asetat) bulunur. İlaç verilmesinde kullanılan bozunmayan polimerler, doku / kan uyumluluğu, dayanıklılık, sağlam yapı ve in vivo uygulama sırasında mekanik mukavemet ile karakterize edilir. Ortopedik ve dental implantlar gibi uzun süreli kullanım malzemeleri, bozulma veya erozyon süreçlerini önlemek için su itici yüzeylere sahiptir [551]. Biyobozunmayan polimerik sistemlerden çözünen madde taşınması esas olarak difüzyon odaklı olarak kabul edilir. Bozunmayan polimerler, "rezervuar" ve "matris" tipi cihazlara gerçekleşir [552]. Tanımı gereği, rezervuar tipi cihazlar, hız kontrol membranı olarak işlev gören bir inert kaplama malzemesine sahip olanları ifade eder. Salım hızı nispeten sabit kalır ve konsantrasyon gradyanından etkilenmez, ancak büyük olasılıkla polimerik membranın kalınlığı ve geçirgenliği ile ilgilidir. Matris tipi cihazların aksine, ilaç salımının, konsantrasyon gradyanı, difüzyon mesafesi ve şişme derecesi ile ilişkili olan Fickian difüzyon odaklı olma olasılığı daha yüksektir [553][554].

- **Biyobozunan Polimerik Matris Salım Kinetiği**

Biyolojik olarak parçalanabilen polimerler, hasta uyumluluğunu önemli ölçüde artırabilen ve genişletilmiş dozlama ve hedefleme yoluyla yan etkileri azaltabilen kontrollü uygulama sistemlerinin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır [555]. Hormonlar, antitümör ilaçlar ve antibiyotikler dahil olmak üzere, biyolojik olarak parçalanabilir salım sistemlerine dayalı birkaç farmasötik ürün FDA tarafından onaylanmıştır [556]. Genel olarak, biyolojik olarak parçalanabilen polimerler, hidrolize veya enzimatik bozunmaya eğilimli; ester, amid ve anhidrit bağları gibi kararsız bağlar içerir [557]. Yüzey bozulması ve toplu bozulmalar, iki

tipik bozunma modudur. Yüzey bozucu bir polimerde, bozulma, cihazın dış yüzeyiyle sınırlıdır [558][559]. Bununla birlikte, yığinsal bozunan bir polimerde degradasyon, malzeme boyunca homojen olarak meydana gelir [559]. Su, hidroliz sırasında önemli bir faktördür ve bu nedenle cihaza su girmesi, ayrışma kinetiğinin yanı sıra salım kinetiğinin incelenmesi için önemli bir öneme sahiptir. Yarı kristalli polimerlerin bozunması iki aşamada gerçekleşir; İlk aşama, ester bağları gibi kararsız bağların rastgele hidrolitik kesilmesi ile amorf bölgelere su infüzyonundan oluşur. İkinci aşama, amorf bölgelerin çoğu bozulduğunda başlar [560]. Bozunma, polimer zincirinin kesilmesiyle sonuçlandığından, polimerin ortalama moleküler ağırlığındaki değişiklik, zaman içinde bozunma sürecini ölçmek için kullanılabilir. Jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) kullanılarak, bozunma işlemi genellikle bozulmuş malzemenin ortalama moleküler ağırlığının zamana göre grafiğini çizerek karakterize edilir. Aşağıdaki iki denklem, bozulma kinetiğini tanımlamak için yaygın olarak kullanılmaktadır:

$$\text{Zero - order: } Mw_t = Mw_0 k_{degr} t \quad (3.1)$$

$$\text{First order: } Mw_t = Mw_0 \exp (-k_{degr} t) \quad (3.2)$$

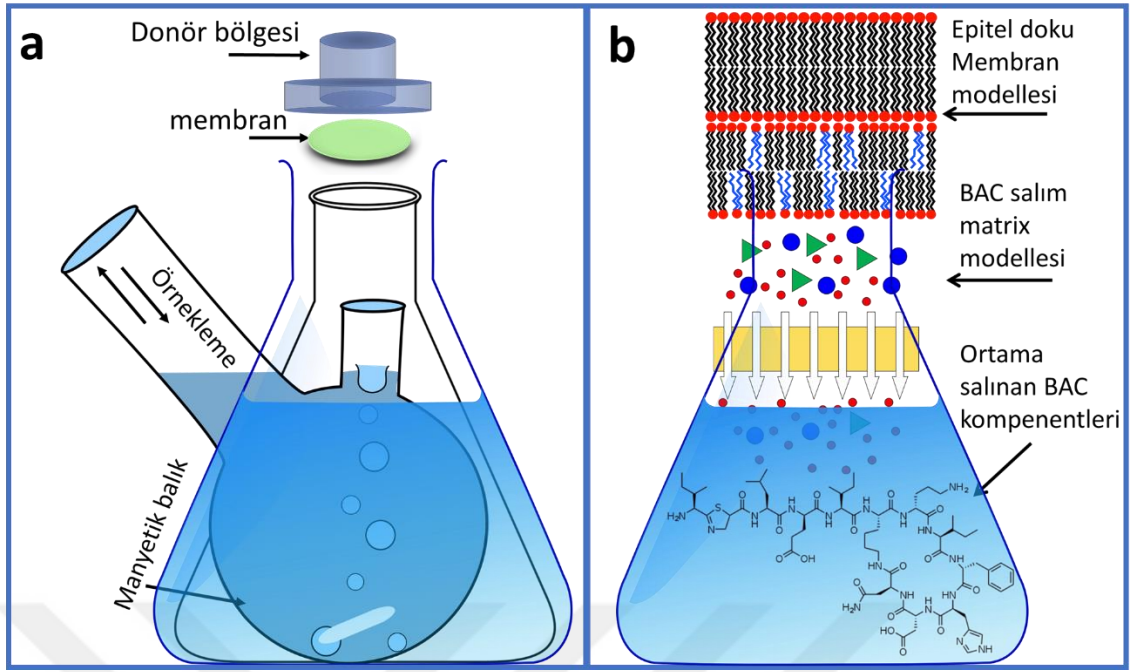
Burada, Mw_t ve Mw_0 , t ve sıfır anında ortalama polimer molekül ağırlığıdır. k_{degr} , polimerin görünür bozunma hız sabitini belirtir.

Polimer bozunması, Siepmann ve Gopferich tarafından polimer zincirlerinin oligomerlere ve monomerlere bölündüğü zincir kesme işlemi olarak tanımlanırken, biyolojik erozyon, biyolojik bir sistemle temas halinde olan kütleden veya yüzeyden materyal kaybını ifade eder [561]. Bu tanımlar sayesinde, iki kavram birbirini dışlamaz, birbiriyle ilişkilidir.

Biyobozunur olarak kullanılan polyester olan PLA polimeri ester bağları ile karakterize edilen bir polimer sınıfıdır. PLA, partikülat ilaç dağıtım sistemleri geliştirmede en sık kullanılan biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerden biridir[562]. PLA, iki farklı monomerin halka açma kopolimerizasyonu ile sentezlenir [563]. PLA'nın hidrofobik yapısı nedeniyle, çekirdek-kabuk yapılarına sahip PLA nano- / mikropartikülleri, çeşitli emülsifikasyon süreçleri ile hazırlanır ve hidrofobik ilaçlar, partiküllerin hidrofilik çekirdeğinde kapsüllenebilir [564], hidrofobik ilaçlar ise hidrofobik içinde dağılma eğilimindedir [565]. PLA partikül

dağıtım sistemleri için tipik salım profili, başlangıç patlama fazıdır ve bunu hemen hemen sıfıra yakın bir sıra fazı izler [566]. PLA ve PLGA gibi biyolojik olarak parçalanabilen polyesterler kullanılarak implantlar veya mikropartiküller şeklinde çeşitli kas içi veya deri altı kontrollü uygulama sistemleri geliştirilmiştir [567].

Dermal absorpsiyonu ölçmek için en yaygın in vitro teknik, etken maddesinin uygun bir formülasyonda bir deri numunesinin yüzeyine uygulanmasıdır [568]. NL'ler için çoğunlukla kullanılan dissolüsyon test yöntemleri [569], [570] Franz Difüzyon cihazıyla yapılmıştır. BAC etken maddesine sahip NL numuneleri Franz difüzyon hücrelerinin bulunduğu membranların üzerine konulmuştur. Membran Franz cihazının orta kısmında bulunmaktadır. NL numuneleri membranın üzerine yerleştirilmiştir. Hücrelerin alt kısmına ortam (2,5 mL), üst kısmına ise geçişi incelenecek numune (1,5 mL) eklenmiştir. Ortam sıcaklığı 37°C'de sabit tutulup, sabit hızda karıştırma ile deney gerçekleştirilmiştir. 15. ve 30. dakikalarda, 1'inci, 2'nci, 4'üncü, 6'ncı, 8'nci, 24'üncü, saatlerde alt kısımdan 2,5 mL örnek alınmış ve yerine 37°C'ye getirilmiş taze ortam ilave edilerek deney sürdürülmüştür. Alınan örneklerdeki etkin madde miktarları HPLC ile tayin edilmiştir. Hücrelerden geçen % kümülatif etkin madde miktarları zamana karşı grafiğe geçirilerek, 24 saat sonunda % kümülatif geçen miktarlar hesaplanmıştır. NL için kümülatif kütle kayıpları Python programıyla istatistiksel olarak analiz edilmiştir.



Şekil 3. 5 Franz difüzyon; a. çalışma modeli, b. BAC salım kinetiği modellemesi

3.16 PNL için *In vitro* Antimikrobiyal Testleri

Agar Disk Difüzyon Assay yöntemi kullanılarak Antimikrobiyal testler gerçekleştirilmiştir. Gram-pozitif; *Bacillus cereus* (ATCC 11778) ve *Listeria Monocytogenes* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), Gram negatif; *Escherichia coli* ve *Salmonella typhi* bakterilerle test edilmiştir. Biyomalzemeler UV altında 2 saat steril edildikten sonra steril bir pens yardımıyla bakteri ekimi yapılmış agar yüzeyine yerleştirilmiştir. Bu işlem yapılırken, oluşacak zonların birbirini üzerine gelmemesi için diskler arasında 22 mm, petri kenarından ise 14 mm uzaklık olmasına dikkat edilmelidir. Daha sonra besiyerleri 18-24 saat süreyle 37°C'de inkübe edilir ve oluşan inhibisyon zonları kumpas yardımıyla ölçülmüştür. Her bir PNL'nin ≤ 3 defa ölçümü alınıp ortama değeri zon büyümesi olarak ifade edilmiştir.

3.17 PNL için *In vitro* Sitotoksisite Testleri

3.17.1 Doğrudan temas

PNL numuneleri yağlı kâğıttan ayrılarak 2x2 boyutunda mikropalaklara yerleştirilmiştir. Ardından 500 uL ortam içinde 3×10^4 konsantrasyonlu L929 hücreleri, 48 çukurlu düz tabanlı mikropalakların her çukuruna ekilip hücre bağlanması için 37 ° C'de 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon

süresinden sonra, kültür ortamının tüm hacmi aspire edilerek devamında 0,5 mg / mL konsantrasyona sahip 5-karboksanilid (XTT) (7.5 mg / mL fenazin metosülfat) ile 2,3-bis- (2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil) -2H-tetrazolium- içeren 500 uL taze ortam değiştirilmiştir. Hücreler 4 saat 37 ° C'de inkübe edilmiştir, Hücre kültürü ortamı negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Optik yoğunluk 450 nm'de ölçülerek hücre canlılığı yüzdesi hesaplanmıştır.

3.17.2 Dolaylı Temas

PNL numuneler, 24 saat boyunca hücre kültürü ortamında tutularak farklı hacimlerde ortamın (25 uL, 50 uL, 75 uL, 100 uL) hücre canlılığı üzerindeki etkisi 96 kuyucuklu mikrolakalara tohumlanan L929 hücreleri üzerinde test edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon süresinden sonra standart XTT testi yapıp hücre canlılığı yüzdesel olarak hesaplanmış ve görüntülenmiştir

3.17.3 Hücre yapışması

PNL numuneleri kuyucuklara yerleştirilmiştir, Ardından 1 mL ortamda 5×10^4 konsantrasyona sahip L929 hücreleri 24 kuyucuklu düz tabanlı mikrolakaların her kuyucuğuna ekilerek hücre eklenmesi için 24 saat 37 ° C'de inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon süresinden sonra, numuneler üzerindeki hücre yapışması mikroskopla gözlemlenmiştir.

3.17.4 *In vitro* Yara İyileştirme Testi (Scratch assay)

500 uL ortamda 3×10^4 konsantrasyona sahip L929 hücreleri 48 oyuklu düz tabanlı mikrolakada tohumlanmıştır. Bu tohumlar 37 ° C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Hücreler, plakanın tabanının yüzeyinde birleştikten sonra, oyuklar üzerinde "artı-şekilli" çizikler oluşturulmuş ve ardından her bir oyuğa numuneler eklenmiştir. Daha sonra çizikler kapanana kadar belirli aralıklarla (3 saat, 6 saat, 12 saat ve 24 saat) hücrelerden resimler çekilmiştir. Örneklerin hücre göçü üzerindeki etkisi, yara kapanma süresine göre görsel olarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

PLA tabanlı polimer çözeltilerine yapılan katkılı PLA polimerik çözeltilerin farklı konsantrasyonlardaki vizkozite, yüzey gerilimi, yoğunluk ve iletkenlik analizleri PLA_1, PLA_2 ve PLA_3 başlıkları altında ele alınmıştır. Elde edilen sonuçlar her bir çalışma başlığında detaylı olarak tartışılmıştır.

PLA tabanlı polimer NL için yapılan karakterizasyonlar her bir çalışma içeriğinde farklılık göstermiştir. Genel anlamda yapılan çalışmalar; morfolojik bulgular, salım kinetiği, antimikrobiyal analizler ve sitotoksikite test bulgularıdır. PLA_1, PLA_2 ve PLA_3 çalışma grupları için yapılan karakterizasyonlar ayrı başlıklar halinde detaylı olarak açıklanmıştır.

4.1 PLA_1 Çalışma Grubu Bulgular ve Tartışmalar

PLA_1 çalışma grubu, CHL DMF ve THF çözücülerinin kullanılarak farklı konsantrasyonlarda PLA ve ilaç katkılamaasının çözelti özelliklerini ve elektro eğirme yöntemiyle NL üretim çalışmalarını kapsamaktadır.

4.1.1 PLA_1 Çözelti Karakterizasyon Bulguları

PLA_1 çalışma grubunda PLA çözeltileri % (5-8-12) konsantrasyonda hazırlanırken, %8 ve 12 konsantrasyonlu PLA çözeltilerine %1 ilaç (seftriakson disodium) katkılamaası yapılmıştır. Her bir yüzde değeri için elde edilen vizkozite, yüzey gerilimi, yoğunluk ve iletkenlik değeri Tablo 4.1’de verilmektedir.

Tablo 4. 1 Farklı konsantrasyondaki PLA_1 çalışma grubuna ait çözeltisi karakterizasyonları

Polimer konsantrasyonu (% wt/v)		Vizkosite (mPa·s)	Yüzey gerilimi (mN·m ⁻¹)	Yoğunluk (g/mL)	İletkenlik (μS/cm)
PLA	5	94,4 ± 6,90	30,06 ± 2,21	1,103	2,61
	8	103,7 ± 8,50	30,24 ± 2,18	1,192	2,70
	12	114,5 ± 8,60	31,27 ± 1,25	2,45	2,74
PLA/ Seftriakson disodyum	5	93,90 ± 6,81	30,13 ± 1,21	1,231	4,52
	8	103,9 ± 8,58	30,26 ± 2,13	1,233	5,83
	12	203,5 ± 6,67	36,25 ± 3,11	1,251	6,02

4.1.2 PLA_1 Çalışma Grubu NL Karakterizasyon Bulguları

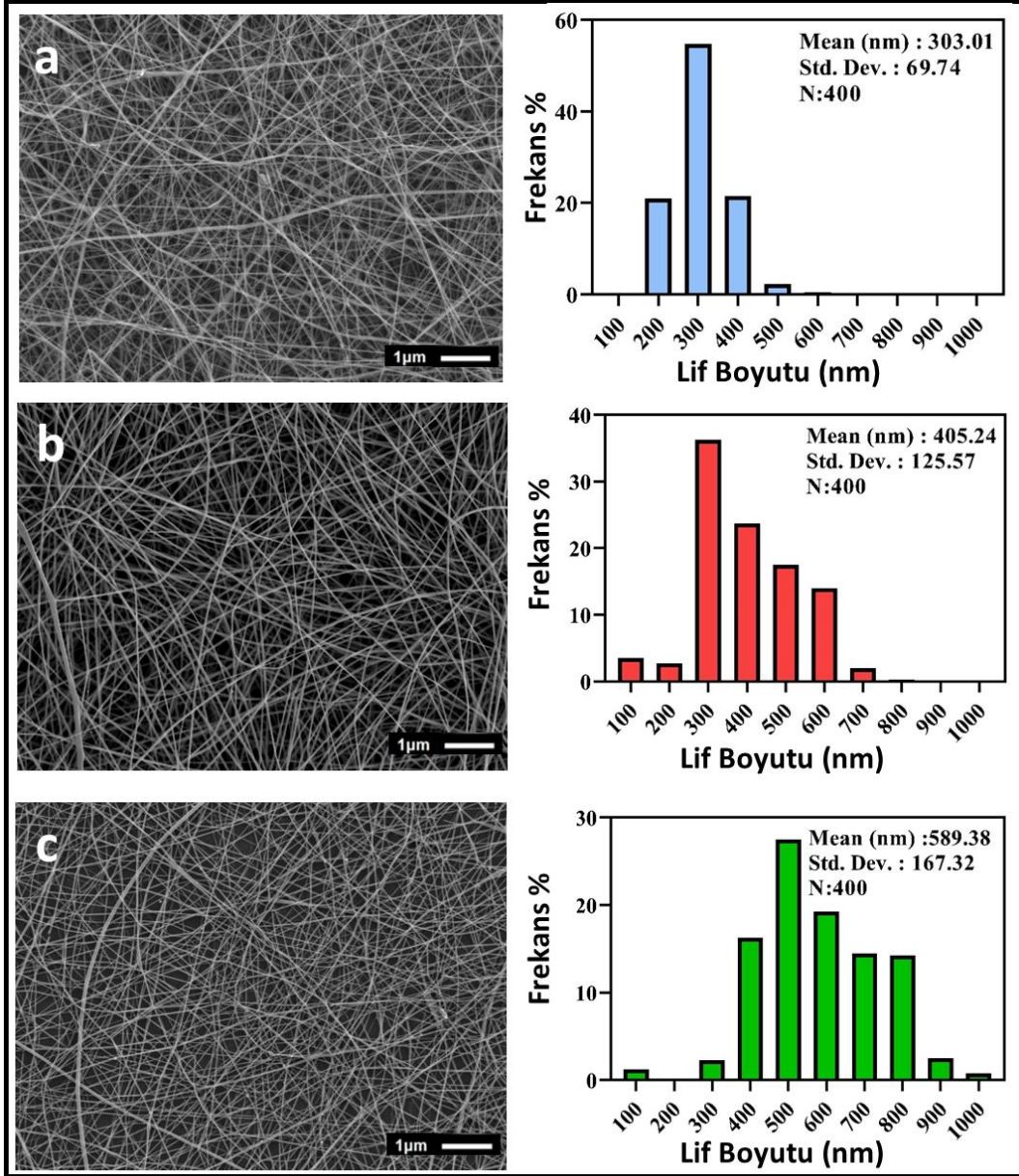
PLA, PLA/Seftriaskon disodium NL karakterizasyonları morfolojik olarak SEM ve antibakteriyel çalışma başlıklarını içermektedir.

4.1.2.1 SEM morfolojisi

%5, %8, %12 ağırlıkça PLA ve PLA/seftriakson çözeltileri farklı akış hızı ve voltaj, ile NL ortalama değerleri tablo'da yer almıştır. Voltaj değerleri 10-15 kV iken akış hızı 0,5-1 mL/s olarak değiştirilmiştir

Tablo 4. 2 Akış hızı ve voltaj değişimine bağlı olarak elde edilen ortalama lif boyutu

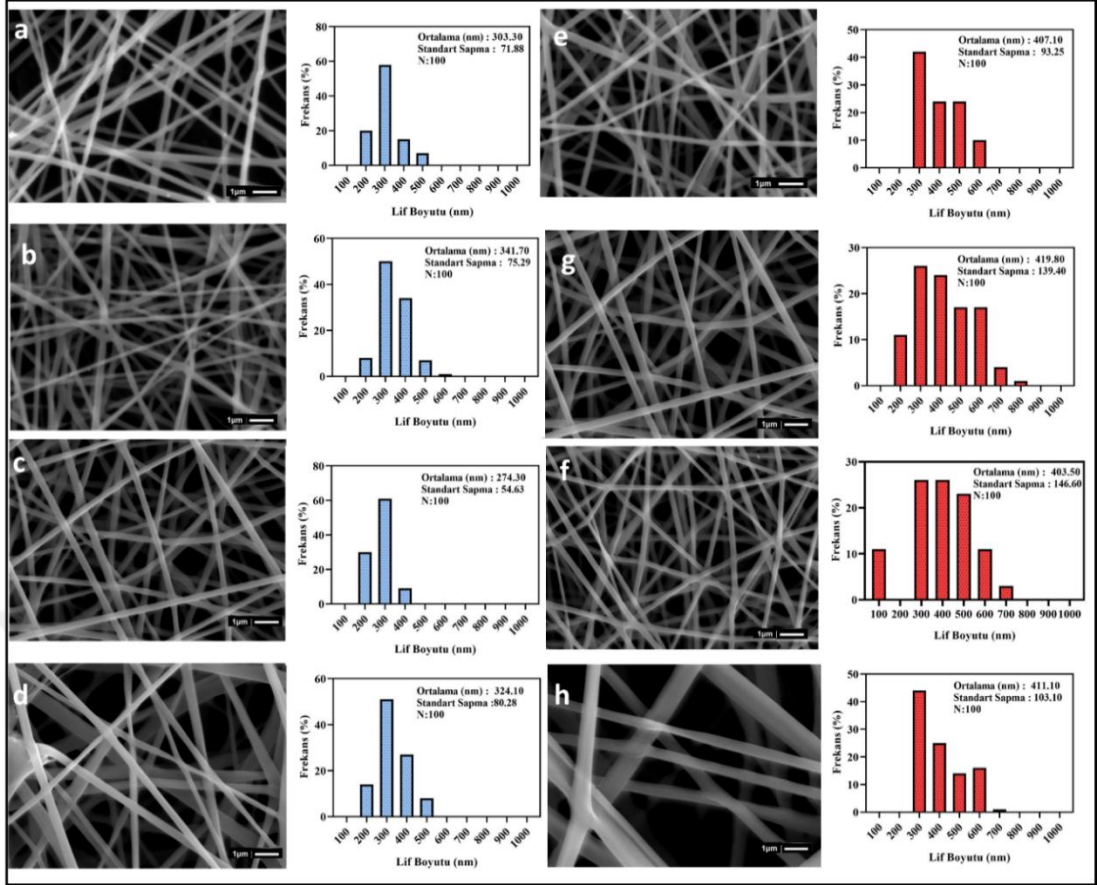
PLA_1 NL	% wt/v	Uygulanan voltaj kV	Akış hızı (mL/s)	Ortalama lif boyutu (nm)
PLA	5	10	0,5	303,01 ± 69,74
	8	10	0,5	405,24 ± 125,57
	12	10	0,5	589,38 ± 167,32
PLA/ Seftriakson disodyum	5	10	0,5	290,34 ± 83,20
	8	10	0,5	375,57 ± 78,37



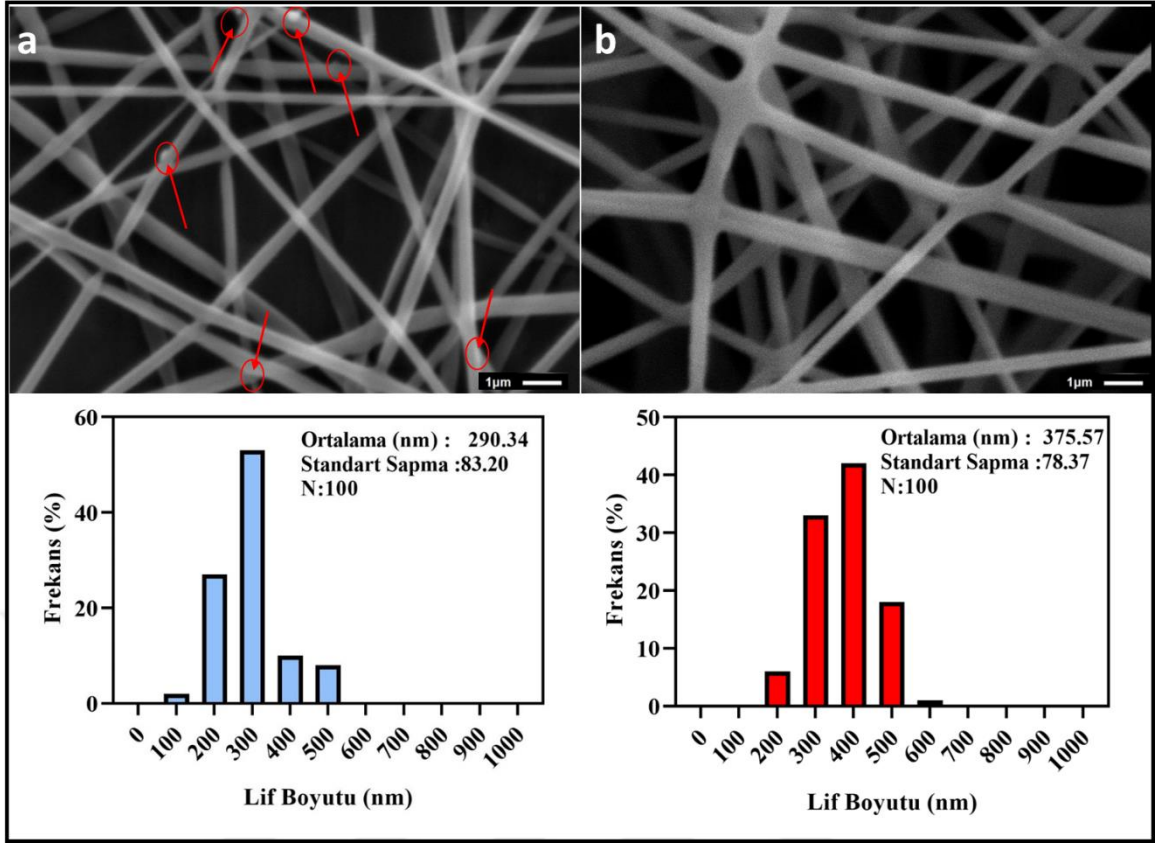
Şekil 4. 1 PLA_1 NL'lerin PLA lif boyuları ve histogramları **a.** %5, **b.** %8, **c.** %12

Tablo 4. 3 PLA değişken konsantrasyonları, voltajları, akış hızları ve lif ortalama boyutları

PLA polimer konsantrasyonu (% wt/v)	Voltaj kV	Akış hızı (mL/s)	PLA lif ortalama boyu (nm)
5	10	0,5	303,30 ± 71,88
5	10	1	341,70 ± 75,29
5	15	0,5	274,30 ± 54,63
5	15	1	324,10 ± 80,28
8	10	0,5	407,10 ± 93,25
8	10	1	419,80 ± 139,40
8	15	0,5	403,50 ± 146,60
8	15	1	411,10 ± 103,10



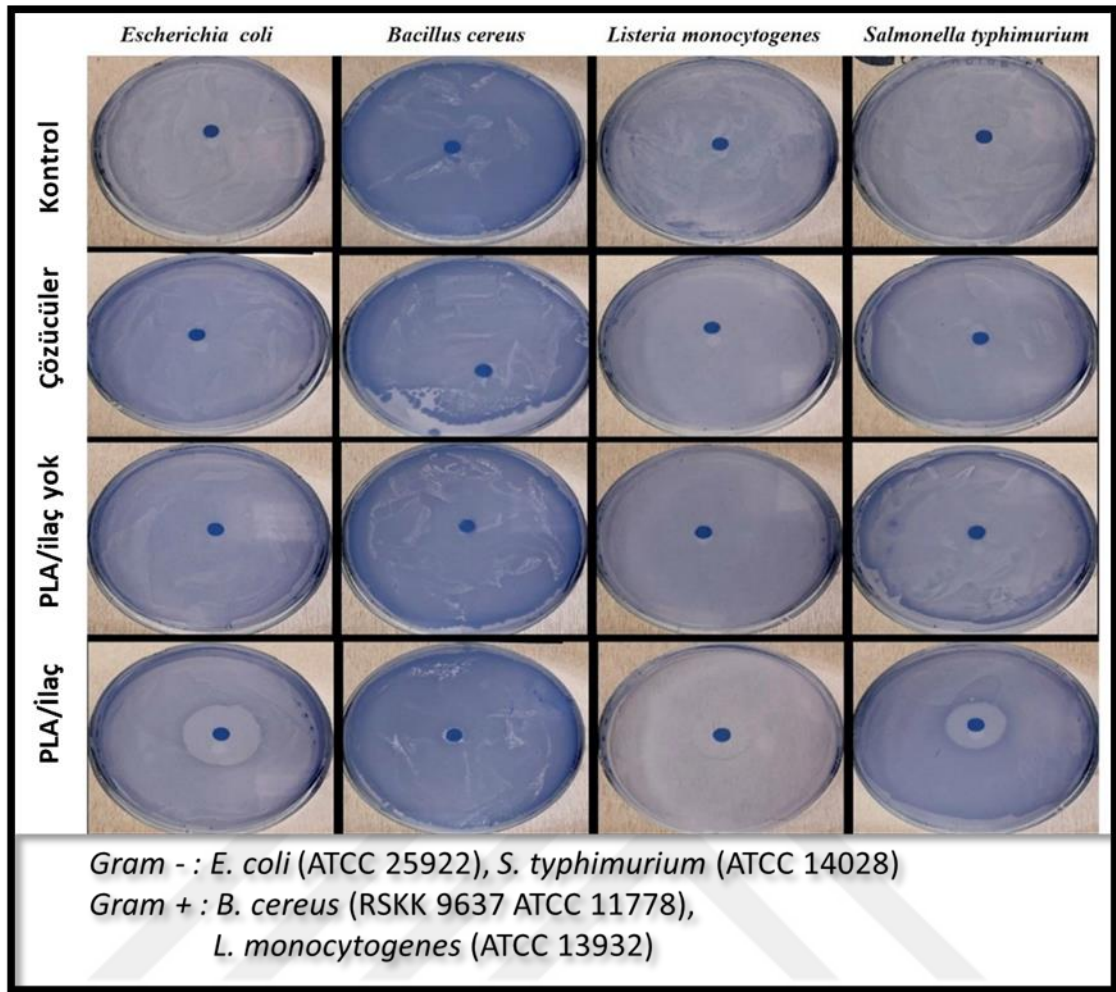
Şekil 4. 2 PLA NL için a,b,c,d; %5, e,f,g,h;%8 NL boyutları



Şekil 4. 3 PLA/ilaç NL için; a. %5, b. %8

4.1.2.2 *In vitro* Antibakteriyel Bulgular

Agar disk difüzyon yöntemi ile yapılan bu yöntem, Şekil 4.4'da kontrol grubu, PLA çözücüler, PLA ve PLA içerisine yüklenmiş ilaçla beraber dört gruba ayrılmıştır. Bu dört gruba ayrı ayrı dört bakteri üzerinde gözlemleme yapılmıştır.



Şekil 4. 4 PLA çözeltisinin Antibakteriyel analizi. Agar disk difüzyon yöntemi

4.1.3 PLA_1 Çalışma Grubu Tartışmaları

NL çapının, homojenliği ve devamlılığı, başarılı bir ilaç salım sistemi elde etmek için gerekli olan önemli faktörlerden bazılarıdır. Bu hedeflere ulaşmak için, polimer tipi ve çözücü sistemlerine göre elektro eğirme koşullarının belirlenmesi gereklidir [61], [67], [142], [179], [571][126], [309], [572][572], [573].

Çözelti parametrelerinin lif oluşumu üzerindeki etkisini anlamak için PLA_1 çözeltileri sırasıyla 10 kV ve 0,5 mL / s (voltaj ve akış hızı) değerlerinde elektro eğirme yapılmıştır. Üçlü çözücü bileşen oranları değiştirilerek PLA_1 konsantrasyonları% 5, 8 ve 12 wt / v olarak ayarlanmıştır (Tablo 4.1). Şekil 4.2'de PLA_1 polimer konsantrasyon değişimlerinin morfolojiler üzerindeki etkisi, dağılımları ile lif boyutu verilmiştir.

PLA_1 liflerinin morfolojik özellikleri, boncuk oluşumunun meydana gelmediğini ve tüm PLA_1 solüsyon konsantrasyonları için homojenik liflerin gözleendiğini ortaya koymuştur. Ancak lif çapları farklılıklar göstermiş ve ortalama lif çapları %5 için $303,00 \pm 69,74$ nm, %8 için $405,20 \pm 125,60$ nm ve %12 konsantrasyonları için $589,40 \pm 167,30$ nm olarak ölçülmüştür. Lif çapı, Herrero ve ark.[62]'na benzer şekilde P1 konsantrasyon artışıyla artmıştır. Huang ve ark [574] çalışmalarında NL değişikliklerinin, çözelti jet boyutu ve püskürtmedeki polimer içeriği ile ilişkili olduğuna dikkat çekmiştir. Jet bir şırıngadan metal toplayıcıya hareket ettiğinde, lif çapı farklılıkları oluşturmak için bölünmesine izin verebilir veya vermeyebilir. Bu durumda lif boyutundaki en önemli parametrelerden biri çözelti viskozitesidir [61].

PLA_1 NL çözelti viskozite değerleri Tablo 4.1 olarak sunulmuştur. PLA_1 konsantrasyonlarının artması, çözelti viskozitelerinde $94,40 \pm 6,90$ 'dan $114,50 \pm 8,60$ mPa.s.'ye bir artışa neden olmuştur. Genel olarak, çözelti viskozitesindeki bir artış, lif çapında bir artışa yol açar [575][21], [67], [89], [90], [178]. Bunun yanında, Herrero ve ark. [62] ve Huang ve ark. [574], katı bir polimerin bir çözücü içinde çözülmesiyle elde edilen bir çözeltinin viskozitesinin, polimer konsantrasyonu ile orantılı olduğunu ve yüksek polimer konsantrasyonunun lif çapını genişlettiğini göstermiştir. Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar benzerlik göstermiş ve polimer konsantrasyonu arttıkça lif çapı da artışı gözlenmiştir. Ek olarak çözücülerin fiziksel özellikleri; kaynama noktası, viskozite ve yüzey gerilimi sadece polimerin elektro eğirmesini etkilemekle kalmaz, aynı zamanda liflerin uygulama alanlarını da etkiler. Casasola vd. [576], klorlu veya florlu çözücülerin PLA çözünmesi için yaygın olarak kullanılan çözücü sistemleri olduğunu göstermiş ve daha az toksik bir çözücü sistemi kullanmanın tıbbi uygulamalar, doku mühendisliği sorunlarında kritik bir öneme sahip olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada, PLA_1 düşük toksisiteye sahip olduğu bilinen üçlü bir çözücü sistemi içinde çözülmüştür. CHL, THF ve DMF'nin kaynama noktaları; Sırasıyla 61, 66 ve 153 ° C'dir [119]. Hem CHL hem de THF düşük kaynama noktalarına sahiptir ve elektro eğirme sırasında, hızla buharlaşabilirler ve damlacık oluşumuna veya gözenekli lif yapısının oluşmasına neden olabilirler. Kaynama noktasının yüksek olması nedeniyle bu tür olumsuzlukların oluşmasını önlemek için çözeltiye DMF eklenmiştir. Ayrıca seftriakson disodyum, DMF'de daha az çözünürdür [116]. Çözücünün kaynama noktası sadece lif oluşumunu değil aynı zamanda lif çapını da etkiler. Wannatong ve ark. [577], çözücünün kaynama

noktasının artmasıyla lif çapının katlanarak azaldığını bulmuştur. Ek olarak, DMF oranı 2'den 0,5'e düşürüldüğünde PLA_1 lif çapları artmıştır. Bu artışın nedeni şu şekilde açıklanabilir; yüksek kaynama noktasına sahip çözücü yavaşça buharlaşır ve jetin oluşumu sırasında viskoelastik özellikler lif çapını düşürerek gerilmeye neden olabilir [578][576].

PLA NL hem morfolojisini hem de çapını etkileyen diğer önemli parametre yüzey gerilimidir[576][3]. Tablo 4.1'da, yüzey gerilimi değerleri, polimer konsantrasyonunun artmasıyla biraz artmıştır. Yüksek yüzey gerilimi, dengesiz bir jet oluşumuna veya boncuk oluşumuna neden olabilir [576]. Fong ve ark. [3], yüzey gerilimi artışı boncuk oluşumu olmadan fiber çaplarını büyütmüştür. Yüzey gerilimini ve lif morfolojisi değişikliklerini genellemek zordur. Ancak, çözücü tipinin yüzey gerilimi davranışını belirlediği söylenebilir [576].

Şekil 4.3'de, farklı polimer konsantrasyonları ile elektro eğirme yapılmış PLA lifleri, silindirik lif oluşumları göstermiştir. Ek olarak, PLA konsantrasyonlarının artması ile liflerin hem ortalama çapları hem de standart sapması artmıştır. Yeterli bir ilaç yükleme sistemi elde etmek için, geniş bir özgül yüzey alanına sahip dar bir boyut dağılımı tercih edilmiştir [116], [118][579][580]. Németh vd.[579], lif çaplarını ölçerek silindirik liflerin özgül yüzey alanını (SSA) hesaplamıştır. Fiber çapındaki artışın, polidispersite indeksi (PDI) ile ilgili SSA değerini düşürdüğünü bulmuşlardır. Sonuçlarımızı bu yaklaşıma göre belirledik ve %5 ve %8 PLA liflerinin SSA değerlerinin %12'den daha yüksek olduğunu analiz etmiştik. Bu nedenle %5 ve %8 PLA polimer konsantrasyonları ile ileri çalışmalar yapılmıştır.

Elektro eğirme işleminde, akış hızı ve voltajın ayarlanmasıyla stabilize bir Taylor konisi elde edilebilir. Genel olarak, düşük akış hızı değerleri, kararlı bir jet konisi elde etmek için kolaylık sağlar [117], [581], [582][574]. Ancak, Zargham ve ark. [367], düşük bir akış hızının küçük boyutlu damlacık oluşumunu tetikleyebileceğini ve jetin elektrik alan kuvvetinin çekme kapasitesi nedeniyle azalabileceğini vurgulamışlardır. İğnenin içinde damlacık veya koni görünmeden geri çekilmiş jet adı verilen kararsız bir jet oluşturulabilir. Bu geri çekilmiş jetler sürekli olarak koni ile değiştirilebilir ve elektro eğirme sırasında büyük boyutlu NL oluşturulabilir. Öte yandan, yüksek akış hızlarında kümelenmiş sıvı ve döndürülmemiş damlacıklar meydana gelebilir. Ayrıca, toplayıcı üzerindeki lifler, kusur oluşumuna neden

olabilecek yeterli çözücü buharlaşması olmadan alınabilir. Çalışmalar, iğne ucu-kollektör mesafesi sabit tutularak hem debi hem de gerilim değerleri değiştirilerek yapılmaktadır. Tablo 4.3 ve Şekil 4.2'de, 0,5 ve 1 mL / saat gibi farklı akış hızlarında ve 10 ve 15 kV gerilimlerde elektro eğirme yapılan PLA NL'lerin SEM görüntülerini göstermektedir.

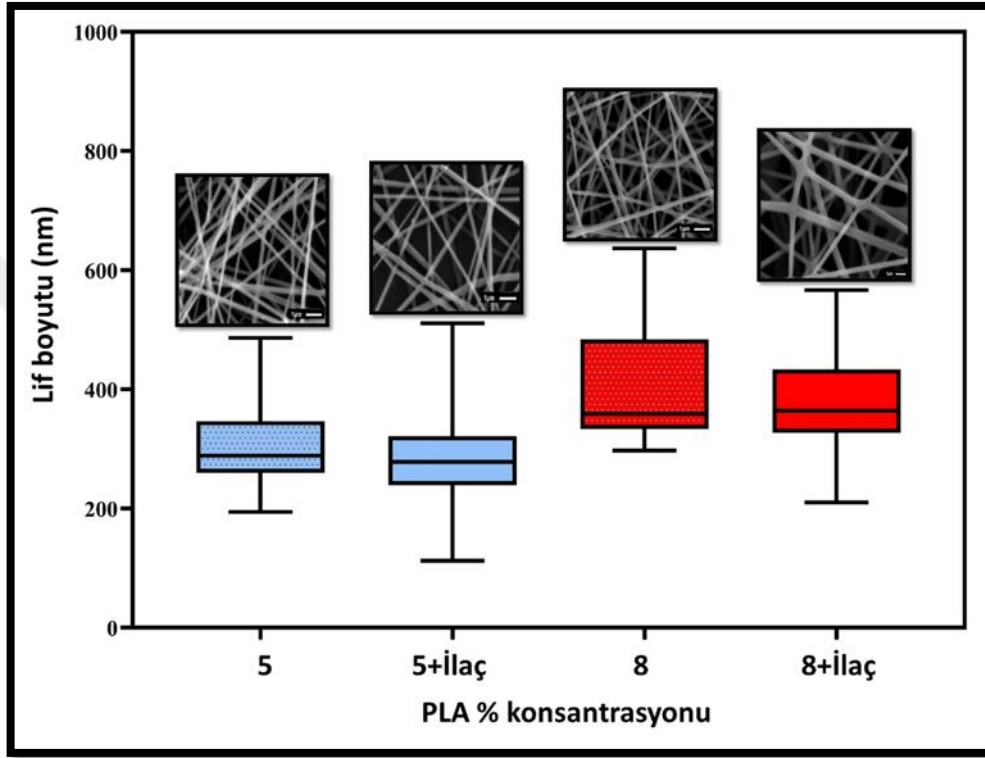
Uygulanan akış hızı, başlatıcı damlacığın şekillerini etkileyebilir ve lif morfolojisi değişikliklerine neden olabilir. Ayrıca, akış hızının artması, liflerin alan yoğunluğunda bir azalmaya neden olur.

Tablo 4.2'de, farklı akış hızlarına ve PLA polimer konsantrasyonlarına ilişkin olarak ölçülen ortalama lif çapları verilmiştir.

%5 konsantrasyonlu çalışmada 10 kV – 0,5 mL/s ile 15 kV – 1 mL/s lifleri, %8'lik liflerden önemli ölçüde ($P < 0,05$) daha yüksek proses parametresinden etkilenmiştir. Voltajlar sabit tutulduğunda ve akış hızı 0,5-1 mL/s arasında değiştiğinde, tüm ortalama lif çapları arttı. Bununla birlikte, voltajın 10'dan 15 kV'a artması, fiber çaplarında bir azalmaya neden olmuştur. Bu çap düşüşünün nedeni, voltajdaki artışın, polimer jetindeki yük itme ile ilişkili polimer çözeltisi üzerinde bir gerilmeye neden olabileceği şeklinde açıklanmıştır. Tablo 4.3 ve Şekil 4.2'ye göre küçük dağılımlı en düşük fiber çapı $274,30 \pm 54,63$ nm olarak 15 kV – 0,5 mL/s için elde edilmiştir. % 8'lik PLA içerikli lifler, işlem parametreleri ile önemli bir ($P > 0.05$) tutum göstermemiş ve ortalama lif çapları tüm koşullar için 400 nm civarında ölçülmüştür. Elektro eğirme işlem parametrelerini belirlemek için tek yönlü ANOVA (Tukey) programının çoklu karşılaştırma testleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, %5'lik PLA için 10 kV – 0,5 mL/s ile 10 kV – 1 mL/s arasında ve 10 kV – 1 mL/s ile 15 kV – 0,5 mL/s arasında önemli varyasyonların gözlemlendiğini ortaya çıkarmıştır. Bu nedenle, optimum elektro eğirme koşulları olarak 10 kV ve 0,5 mL/s değerleri seçilmiştir.

Bu çalışmada, seftriakson disodyum antibiyotik ilaç olarak seçilmiş ve PLA miktarının ağırlıkça% 1 oranında, herhangi bir yüzey aktif madde ilavesi olmaksızın ağırlıkça % 5-8 PLA konsantrasyonuna sahip çözeltilere yüklenmiştir. İlaç yüklenmiş PLA çözelti viskozitelerinin fiziksel davranışı ve yüzey gerilimi değerleri ölçülmüş ve Tablo 4.1'de verilmiştir. Hem viskozite hem de yüzey gerilimi değerleri, ilaç yüklü PLA çözeltileri ile önemli ($P > 0.05$) farklılıklar göstermemiştir.

Şekil 4.3'te PLA ve ilaç yüklü PLA NL'lerin ortalama lif boyutu SEM görüntüleri ile verilmiştir. Yaygın olarak, ilaç ilavesi, ilaç olmayan liflere kıyasla lif boyutu azaltmıştır. Zeng ve ark. [325] çap küçültme konusunda benzer davranışlar elde etmişler ve bunu yüzey geriliminin azalmasıyla açıklamışlardır. Bu çalışmada, yüzey gerilimi doğrudan bir azalma eğilimi göstermemiştir. Bu nedenle bu çap durumu hakkında yorum yapmak zordur.

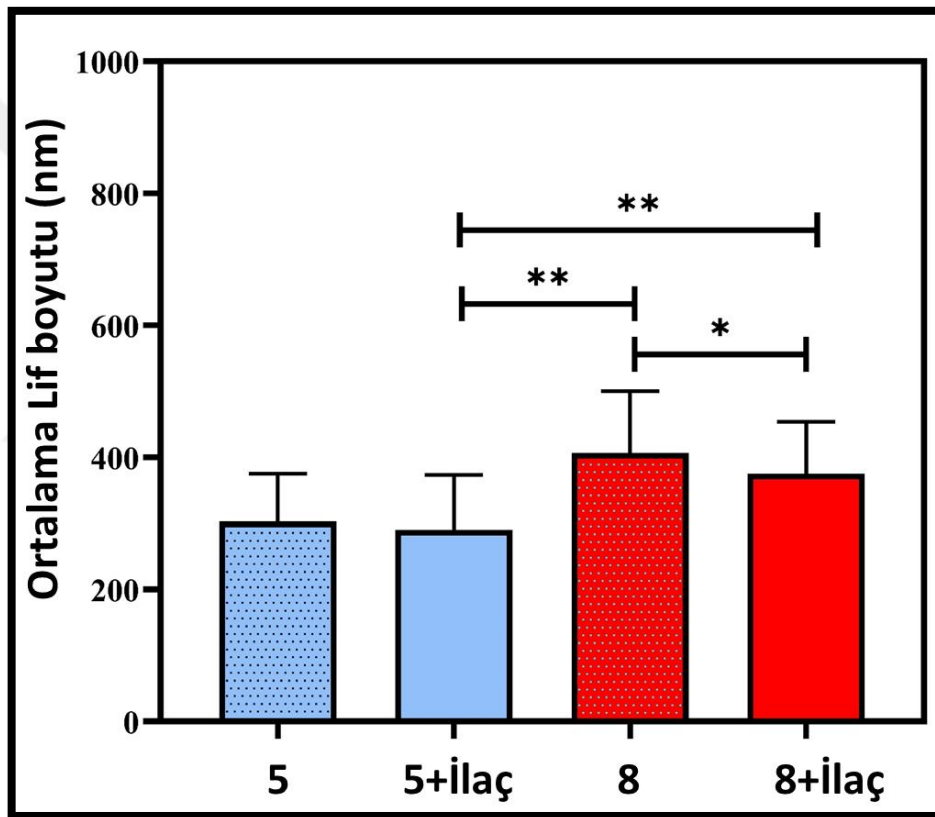


Şekil 4. 5 PLA ve ilaç yüklü PLA NL'nin SEM ortalama lif boyutları

Şekil 4.3'te, farklı polimer konsantrasyonlarında elektro eğirme yapılmış ilaç yüklü PLA NL'lerinin SEM görüntüleri ve lif boyutu dağılımı gösterilmektedir. Morfolojik araştırmalar % 5 ilaç yüklü PLA'nın lif yüzeylerinde bazı çözünmemiş ilaç partiküllerinin oluştuğunu göstermiştir. Şekil 4.3'te gösterilen bu partikül oluşumunun nedeni, ilacın ilaç-polimer-çözücü sistemindeki çözünürlüğüne ve uygunluğuna bağlı olabilir. Genellikle, hidrofilik ilaçlar hidrofilik polimerler içinde kapsüllenirken, hidrofobik ilaçlar hidrofobik polimerlerde daha iyi salım performansı göstermiştir [119], [583]. Hidrofobik polimerlerde kategorize edilen PLA, bununla birlikte, seftriakson disodyum, asetondan DMF'ye artan çözünürlükle hidrofilik bir ilaç olarak sınıflandırılmıştır [116]. Elektro eğirme sırasında, çözelti

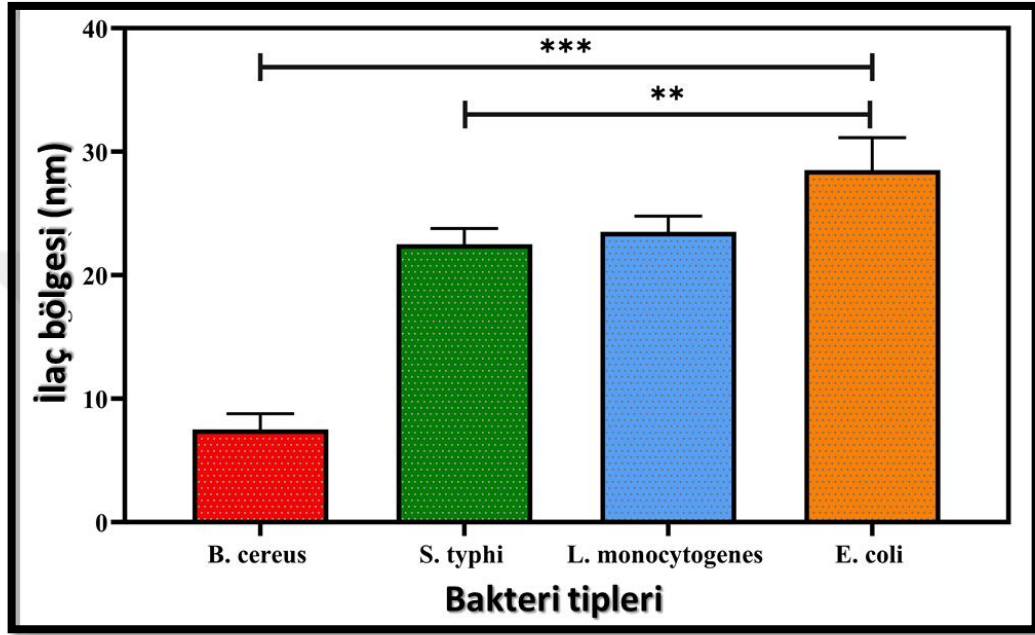
oluşumu, çözücüyü hemen çıkararak bir lif oluşturmak üzere uzatılır ve bu, PLA ile ilacın boncuklanmasına sebep olduğu görülmüştür.

Ek olarak, %5 PLA için 15 kV – 1 mL/s'de DMF miktarı yüksek olması ilaç partiküllerinin yetersiz bir şekilde çözülmesine yol açmıştır. Bununla birlikte, ilaç yüklü % 8 PLA konsantrasyonu yeterli ilaç çözünürlüğü, herhangi bir ilaç partikülü meydana gelmeden elde edilmiştir. Ayrıca, PLA ve ilaç katkılı PLA NL'leri arasındaki ilişki tek yönlü ANOVA ve Tukey'nin çoklu karşılaştırma testleri ile analiz edilmiştir (Şekil 4.6). %8 PLA ve PLA/ilac ve %8 PLA ve PLA/ilac'tan önemli ölçüde ($P < 0.05$) daha yüksek çap varyasyonları göstermiştir.



Şekil 4. 6 PLA ve ilaç katkılı PLA nano liflerin ortalama lif çapları arasındaki ilişki ilaç yüklü % 8 PLA konsantrasyonlarının antibakteriyel performansı, agar disk difüzyon yöntemi kullanılarak model organizmalara karşı hem kalitatif hem de kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Antibakteriyel test aşamaları; bakteri kültürü hazırlama, ilaç harmanlanmış nanoliflerin bakterilerle bağlantısı ve antibakteriyel aktivite değerlendirmesi olarak ilerlemiştir. İlaçsız ve ilaç katkılı PLA₁ NL'lerin antibakteriyel aktiviteleri Gram-pozitif; *B. cereus* ve *L. monocytogenes* ve Gram-negatif; *E. coli* ve *S. typhi* bakteri mikroorganizmaları kullanılmıştır. Kontrol grubu,

PLA çözücüler, PLA ve ilaç katkılı PLA'nın antibakteriyel analizleri Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Kontrol grubu, çözücüler ve PLA çözeltisinde mikrobiyal büyümenin engellenmesi gözlenmezken, ilaç yüklü lifler için mikrobiyal engellemeler gözlenmiştir. İnhibisyon bölgeleri şu şekilde ölçülmüştür: *E. coli*; $28,33 \pm 1,44$ mm, *B. cereus*; $7,84 \pm 0,28$ mm, *L. monocytogenes*; $23,16 \pm 1,89$ mm ve *S. typhi*; $22,66 \pm 0,76$ mm olarak ölçülmüştür.



Şekil 4. 7 Bakteri tiplerine göre PLA/ilaç NL inhibisyon karşılaştırmaları

Farklar tek yönlü ANOVA ve Tukey'nin çoklu karşılaştırma testleri ile hesaplanmıştır. ** $P < 0.001$ ve *** $P < 0.0001$; Hata çubukları: Her ölçüm için yinelenen 4 ölçümün ortalaması ve SD'si alınmıştır. Kontrol grubu, çözücüler ve PLA çözeltisinde mikrobiyal büyümenin inhibisyonu görülmezken PLA/ilaç çözeltisinde mikrobiyal inhibisyonlar gözlemlenmiş ANOVA programında istatistiksel olarak (Şekil 4.7) analiz edilmiştir. Sonuç olarak bu PLA₁ çalışması, ilaç dağılımı için lif üretiminde elektro eğirme parametrelerinin önemini ortaya koymuştur. PLA₁ NL üçlü çözücü sistemi kullanılarak üretilmiş ve hem çözelti hem de üretim parametrelerinin etkisi detaylı olarak incelenmiştir. PLA₁ polimer konsantrasyonları, CHL, DMF ve THF'nin çözücü oranı varyasyonları ile % 5-12 şeklinde belirlenmiştir. Elektro eğirme proses parametreleri küçük değişikliklerle araştırılmıştır (voltaj 10-15 kV; akış hızı 0,5-1 mL/s). Optimum üretim koşulları 10 kV ve 0,5 mL/s elde edilmiştir. % 5 ve % 8 PLA konsantrasyonlarında, ortalama NL

sırasıyla $303,00 \pm 69,74$ ve $405,20 \pm 125,60$ nm olarak ölçülmüştür. Ek olarak (ağırlıkça %1) seftriakson disodyum PLA çözücülerine karıştırıldı ve elektro eğirme işlemi yapılmıştır. Morfolojik araştırmalar, % 8 ilaç yüklü PLA konsantrasyonlarında, iyi ilaç dağılımına sahip homojen lif oluşumunun elde edildiğini ortaya çıkarmıştır. % 8 ilaç yüklü PLA NL'lerin antimikrobiyal tutumu, *Escherichia coli*'ye karşı daha güçlü antimikrobiyal aktivite sergilediği görülmüştür.

4.2 PLA_2 Çalışma Grubu Sonuçlar ve Tartışmalar

4.2.1 PLA_2 Çalışma Grubu Çözelti Karakterizasyon Bulguları

PLA_2 çözeltisinde ele alınan PLA, PLA/GO, PLA/GO/Se, PLA/Se/CLA ve PLA/GO/Se/CLA çözeltileri %8 konsantrasyonunda analiz edilerek tablo olarak verilmiştir

Tablo 4. 4 PLA_2 çözeltisi karakterizasyon değerleri

%8 PLA_2 NL numuneler	Vizkosite (mPas)	Yüzey gerilimi (mN/m)	Yoğunluk (g/mL)	İletkenlik (μ S/cm)
PLA	123,0	30,28	1,2184	2,6
PLA-G	104,6	28,95	1,2205	15,3
PLA-G1	247,9	30,72	1,2349	8,5
PLA-G2	251,4	27,94	1,2256	9,7
PLA-G3	253,8	31,62	1,1761	14,7

4.2.2 PLA_2 Çalışma Grubu NL Karakterizasyon Bulguları

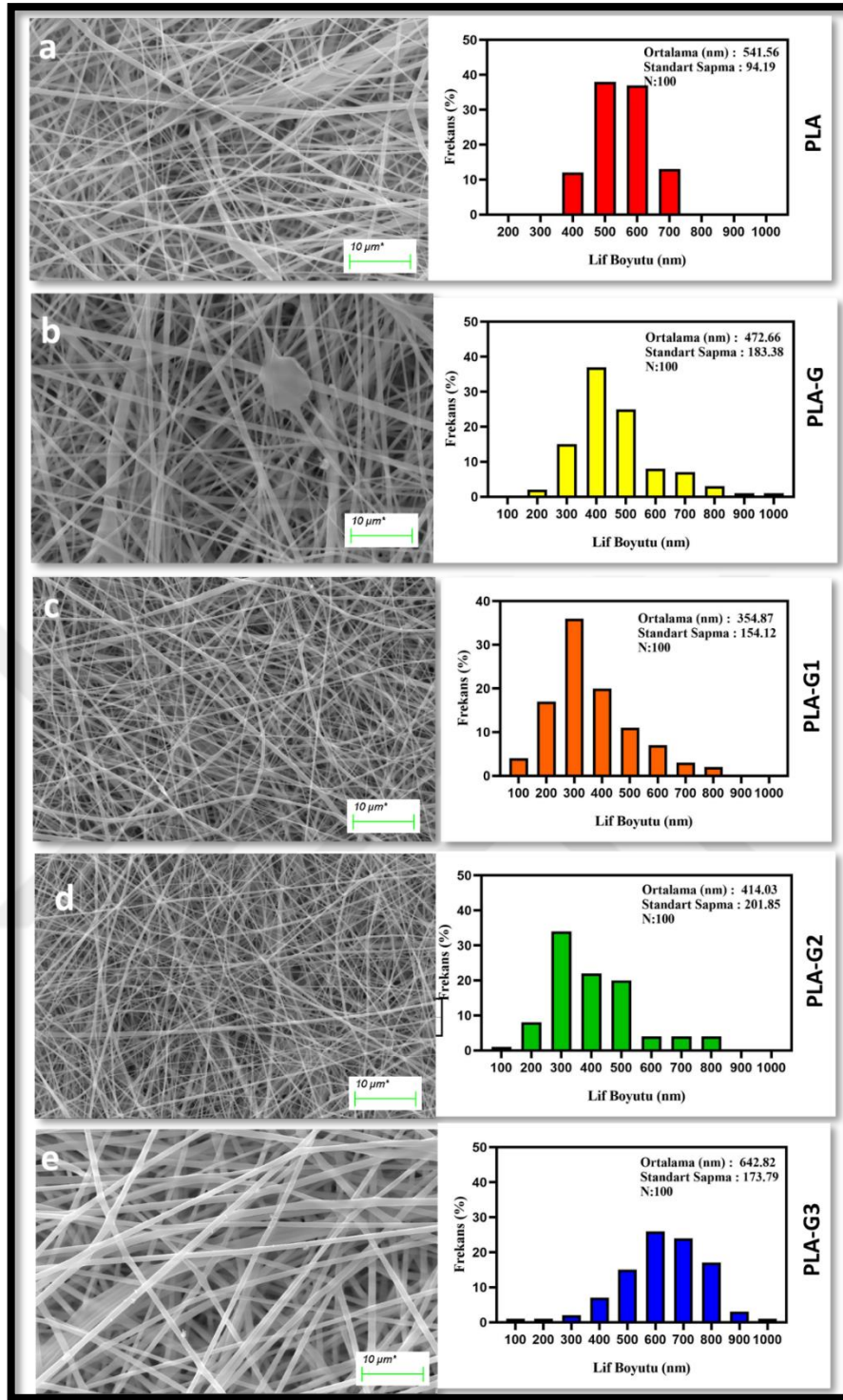
4.2.2.1 Morfolojik Bulgular

PLA_2 çalışma grubuna ait NL numunelerinin morfolojik yapılarının sonuçları lif boyutu olarak Tablo 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4. 5 PLA_2 çalışma grubu NL morfolojik lif boyutları

%8 PLA_2 NL numuneler	Ortalama lif boyutu (nm)
PLA	541,56 ± 94,19
PLA-G	472,66 ± 183,38
PLA-G1	354 ± 154,12
PLA-G2	414,03 ± 201,85
PLA-G3	642 ± 173,79

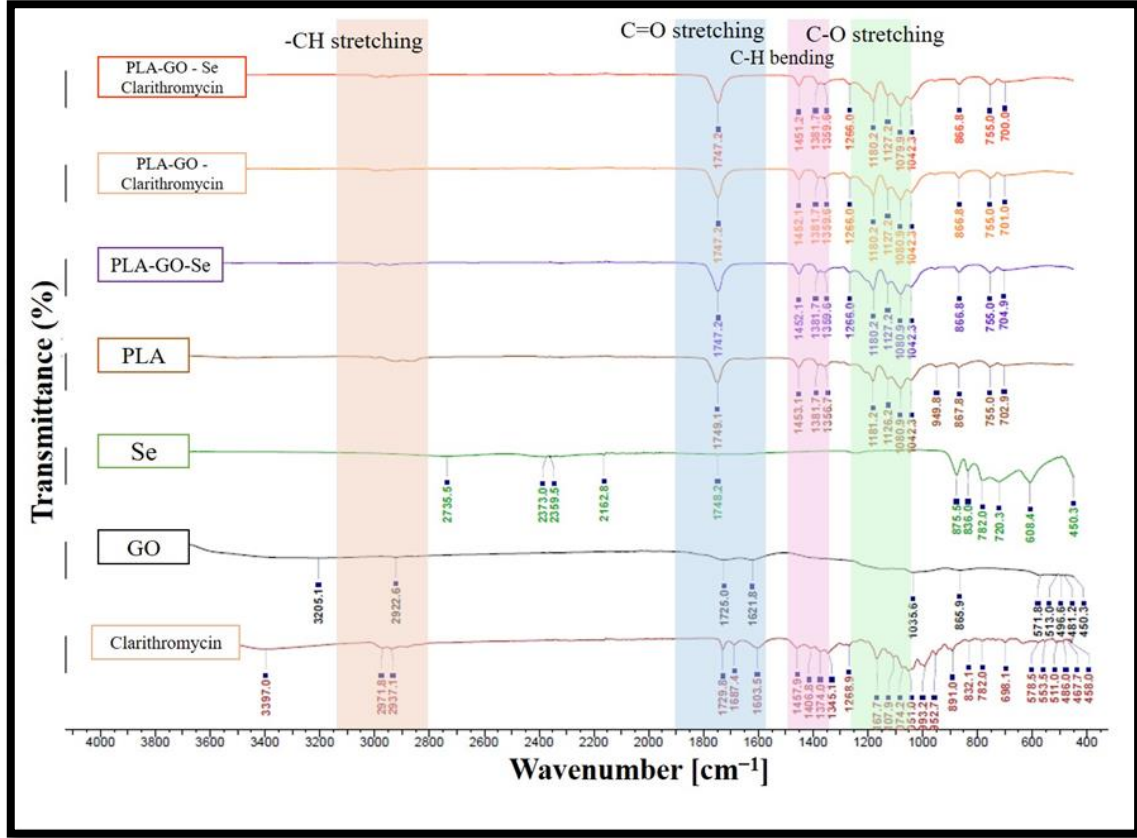
Şekil 4.8'de gösterilen SEM görüntülerine göre, Se veya CLA'yı yüklemek için yeterli karıştırma nedeniyle homojenik dağıtılmış PLA-G çözeltisi seçilmiştir. GO'yu sheet şeklinde kullandığımızda nano lif elde etmek için buradaki homojenik karıştırma önemli görülmüştür. PLA-G, PLA-G1, PLA-G2 ve PLA-G3'ün SEM görüntüleri Şekil 4.8'deki gibi gösterilmektedir. Nano liflerin çapı ve elektro eğirme işleminde kullanılan çözelti konsantrasyonu birbiriyle doğru orantılıdır. NL örneklerin ortalama boyutu Tablo 4.5'de gösterildiği gibidir. GO ve Se'nin eklenmesiyle, nano lif çaplarında azalma görülmüştür. En düşük fiber çapı 472,66 ± 183,38 PLA-G1'de gözlenmiştir. Bu bağlamda konsantrasyon arttığında, lif boyutu da arttığı, boncuklu yapının morfolojisi küreselden iğ benzeri hale değiştiği ve sonuç olarak yüksek viskozite direnci nedeniyle artan çaplara sahip tek tip lifler oluştuğu görülmüştür.



Şekil 4. 8 PLA_2 NL'lerin SEM görüntüleri ve histogramları a. PLA, b. PLA-G, c. PLA-G1, d. PLA-G2, e. PLA-G3

4.3.2.1 FT-IR Bulgular

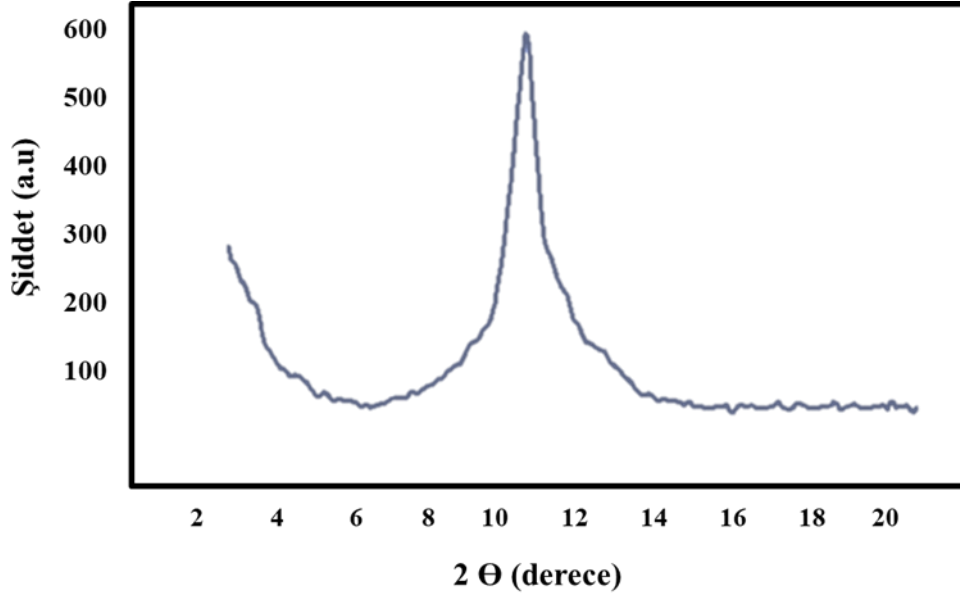
PLA_2 çalışma grubunda üretilen GO için fonksiyonel grupların bağ yapısını FT-IR ile görmüş olduk. Şekil 4.9'da PLA, GO, Se, CLA yanında PLA/GO/Se, PLA/GO/CLA ve PLA/GO/Se/CLA olarak fonksiyonel gruplar görüntülenmiştir.



Şekil 4. 9 GO fonksiyonel grup analizi; FT-IR

4.3.2.2 XRD Analiz Bulguları

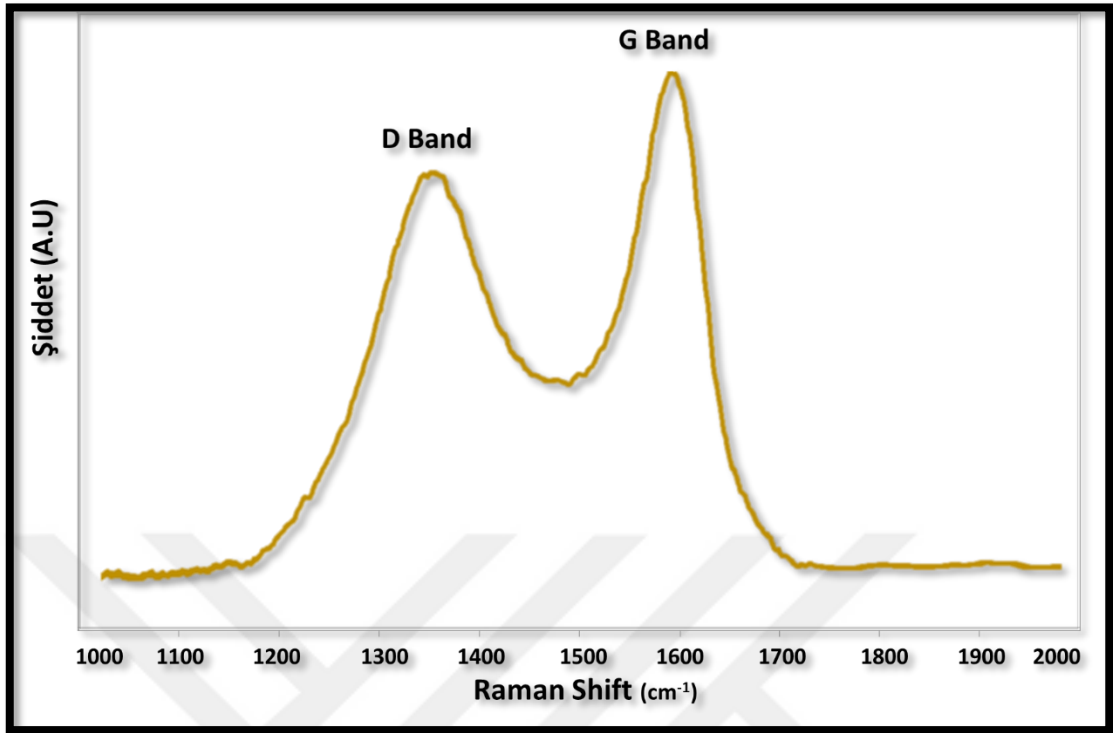
XRD analizi, malzemenin tabakaları arası değişikliği ve kristal özelliklerini incelemek amacıyla kullanılmaktadır.



Şekil 4. 10 GO'nun XRD modeli

Grafende $26,4636^\circ$ 'lik geniş zirvenin varlığı, yalnızca birkaç grafen katmanının varlığını gösterir [584]. Bu tepe, interkalasyon işlemi sırasında grafit galerisine giren oksijen atomlarının çıkarılmasından kaynaklanan 3.56 inter ara katman aralığına sahip 002 grafit düzlemine karşılık gelir. Bu, kimyasal bir indirgeme yöntemi kullanarak GO'nun grafene indirgenmesini doğrular. XRD spektroskopisinden karakteristik pikler; Grafit için $2\theta=26,4636^\circ$ ve GO için $2\theta=10,5524^\circ$ değerlerinde görülmektedir. Grafit yapısında var olan $26,4636^\circ$ pikinin oksidasyon sonrasında GO'da görülmemesi, bunun yerine $10,5524^\circ$ pikinin oluşması literatürdeki sonuçlarla uyuşmakta ve GO yapının düzgün olarak elde edildiğini göstermiştir[585][586][587].

4.3.2.3 Raman Spektroskopisi Bulguları



Şekil 4. 11 Grafit ve GO'nun Raman analizi

Şekil 4.11'de GO'nun yapısal değişimini gösteren G (sp²) bandı düzenli/aromatik yapıları ifade ederken D (sp³) bandı ise aromatik yapıdaki düzensizliklerini, amorf yapıları ve oksidasyon sonucunda oluşan alifatik yapıları gösterilmiştir [588][589][590]. Raman spektrumunda beklendiği gibi D piki 1330 cm⁻¹ ve G piki de 1601 (cm⁻¹) de görülmektedir. D pikinin şiddeti (ID) düzensiz yapıların derecesini, G pikinin şiddeti (IG) düzenli yapıların şiddet değerini vermektedir. Literatürde belirtildiği gibi karbon esaslı materyallerin ID/IG oranı 0,95-1,22 aralığında olması beklenmektedir [591][592]. Çalışmamız da ise GO yapısının ID/IG oranı 1,12 bulunmuştur. Dolayısıyla, Raman spektroskopisi, sentezlenen GO yapısını doğrulamaktadır.

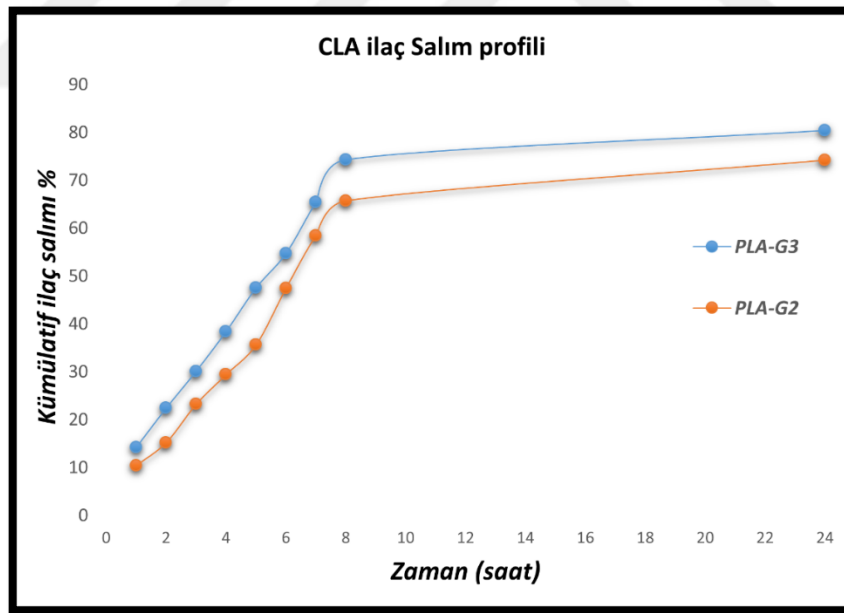
4.2.3 *In vitro* Salım Kinetiği Bulguları

Korelasyon katsayısına göre hem doğrusallık (doğrusal), ilaç salım kinetiği hem de ilaç modelinden bağımsız bir yaklaşımla benzerlikler ve farklılıklar, ilaç salım kinetiği ve çözünme profillerinin matematiksel modeli(salım kinetic modeli) belirlenerek karşılaştırılmıştır. Salım için kullanılan NL içinde ilaç bulunan PLA-

G2 ve PLA-G3 numuneleri kullanılmıştır. CLA ilacı için kümülatif salım % değerleri ve salım profili tablo ve şekilde gösterilmiştir.

Sırasıyla çeşitli formülasyonlar, PLA-G2 ve PLA-G3 in vitro ilaç salım çalışmaları için seçilmiştir. Katkılı PLA NL'lerinden klaritromisinin in vitro ilaç salımı, sırasıyla PBS (pH 7,4) ortamında simüle edilerek çalkalamalı su banyosu içinde difüzyon yayılımı olarak labratuvar koşullarında $37 \pm 1^\circ$ 'de 24 saat (8 zaman diliminde) boyunca salınan kümülatif % değerleri, yapılmıştır (Tablo 4.6).

CLA salınımı bu çalışma grubunda esas olarak PLA-GO konsantrasyonuna bağlıdır. GO konsantrasyon artışı etken madde salımını etkilediği görülmüştür. GO geniş yüzey alanı nedeni ile etken maddeyi hapsedmiştir ve pH 7,4'te çözünmeyi düşürmüştür. İlk aşamada NL'lerden CLA patlama salımı, NL'lerin yüzeyinde ilaç kristallerinin çözünmesinden kaynaklanmıştır. Artan PLA-GO konsantrasyonu ile CLA salınım yüzdesi (PLA-G2) önemli ölçüde azalmıştır. Tablo 4.6'da görüldüğü gibi PLA-G3 salım yüzde miktarı PLA-G2'den % olarak daha büyük olduğu için salım profili olarak PLA-G3 seçilmiştir (Şekil 4. 12 ve 4.13).



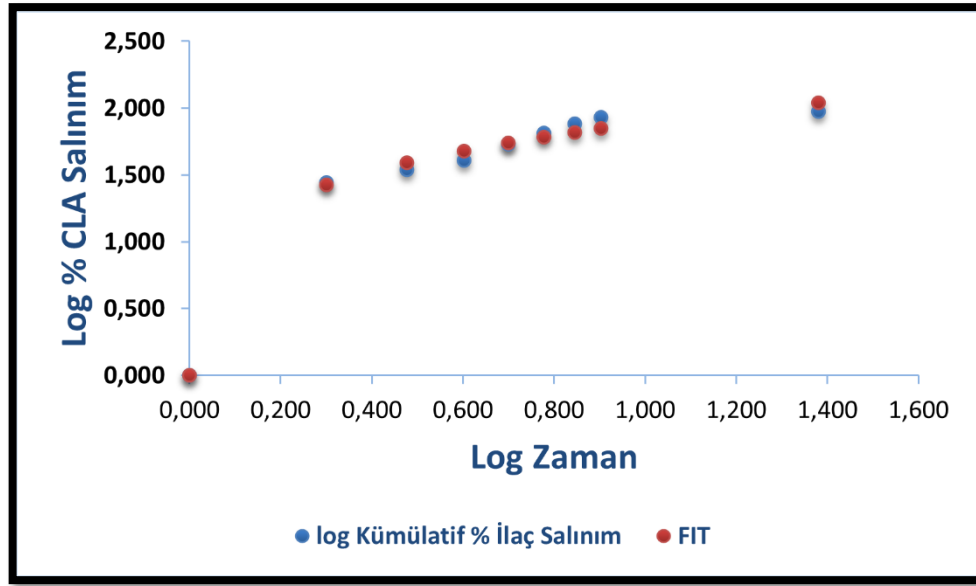
Şekil 4. 12 CLA için 24 saat boyunca ilaç salım kümülatif grafiği

Tablo 4. 6 PLA_2 Kümülatif salım ilaç % miktarları

Zaman	Salınan Kümülatif İlaç Yüzdesi	
	PLA-G3	PLA-G2
1	14,2	10,4
2	22,4	15,2
3	30,1	23,2
4	38,4	29,4
5	47,5	35,6
6	54,7	47,4
7	65,4	58,4
8	74,3	65,7
24	80,4	74,2



Şekil 4. 13 CLA kümülatif ilaç salım hızı doğrusal eğrisi

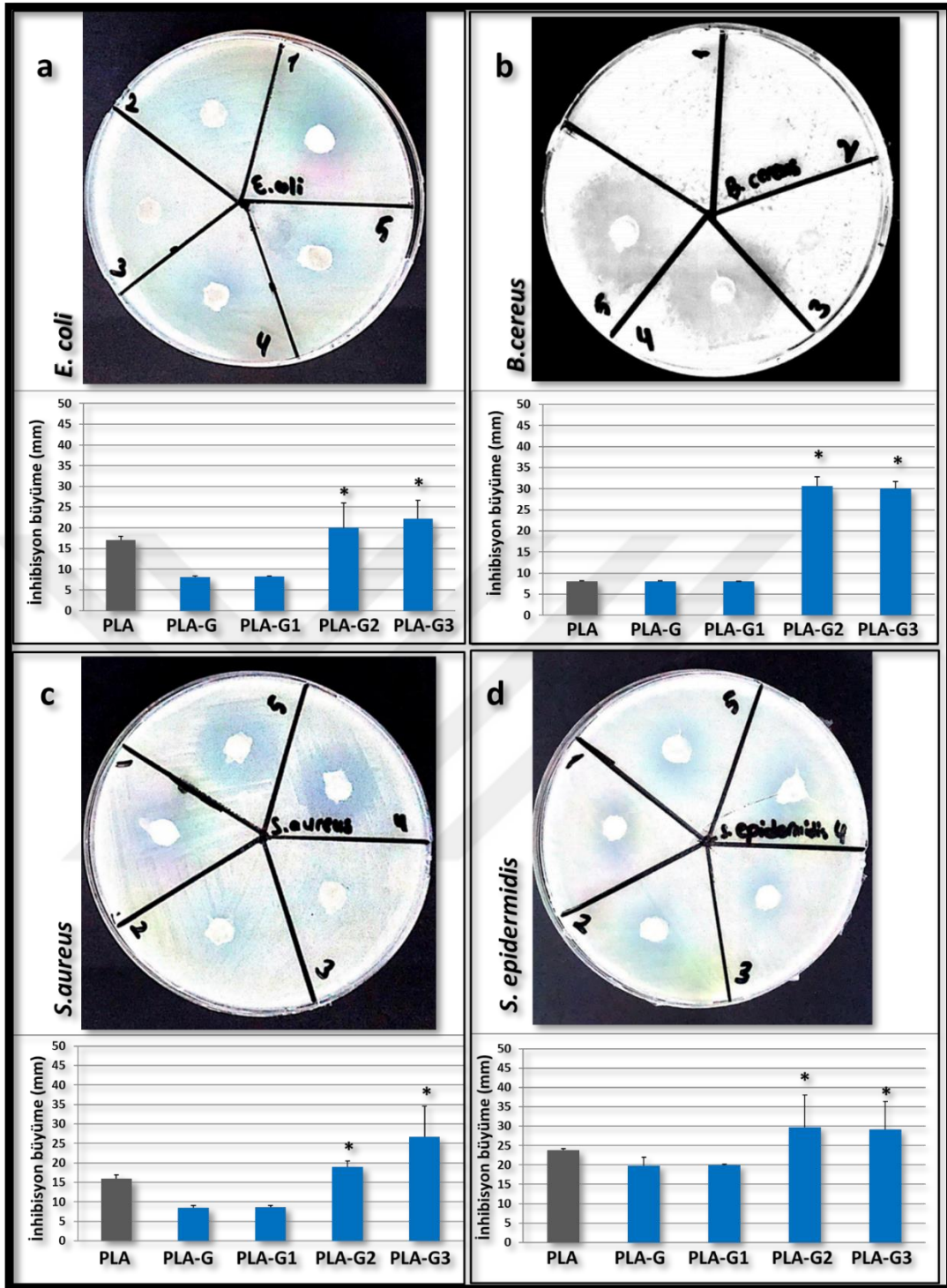


Şekil 4. 14 CLA log kümülatif % salım grafiği

4.2.4 *In vitro* Antimikrobiyal Bulgular

PLA kontrol grubu oluşturulup bunun üzerine diğer NL'ler kullanılan mikroorganizmalar üzerinde disk difüzyon yöntemiyle inhibisyon büyümeleri Şekil 4.15'te gösterilmiştir. En iyi ortalama büyüme PLA-G3 için gerçekleşmiş olup bütün NL için gerçekleştirilen işlemler; 24 saatte *E.coli*'ye, *S. aureus*'a, *B. cereus*'a, *S. epidermidis*'e karşı antibakteriyel inhibisyon etkileri gözlemlenmiştir.

Analizler, ANOVA programında bağımsız örnekler $P < 0.05$ düzeyinde farkların önemli olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir. Ortalama arasındaki istatistiksel olarak anlamlı fark, $*P < 0,05$ 'te seçilecek olan anlamlılık seviyesi ile tek yönlü ANOVA ile hesaplanmıştır. Tüm testler, üç defa tekrarlanarak SD'si alınmıştır.

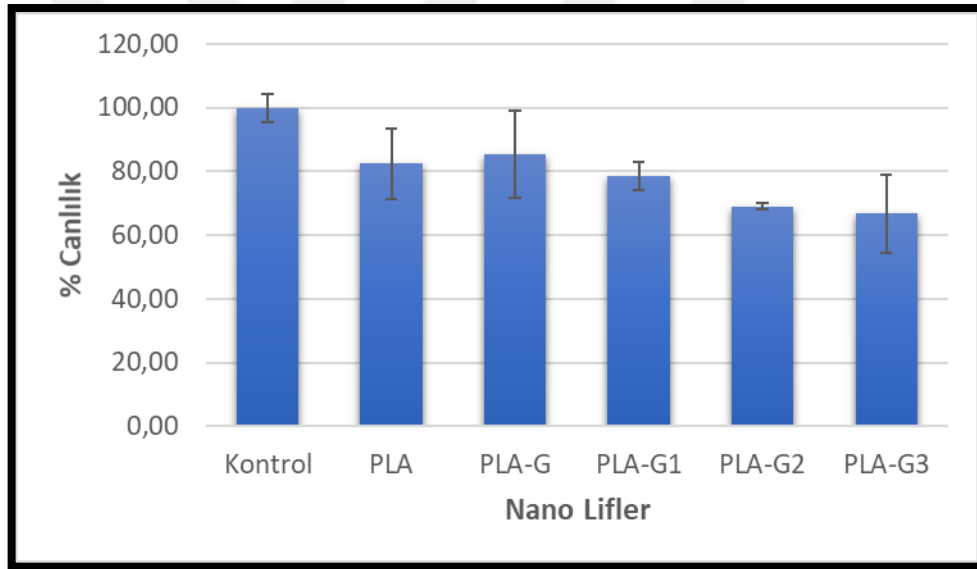


Şekil 4. 15 PLA₂ çalışma grubu bakteri inhibisyon büyümeleri

4.2.5 *In vitro* Hücre Kültürü Testi Bulguları

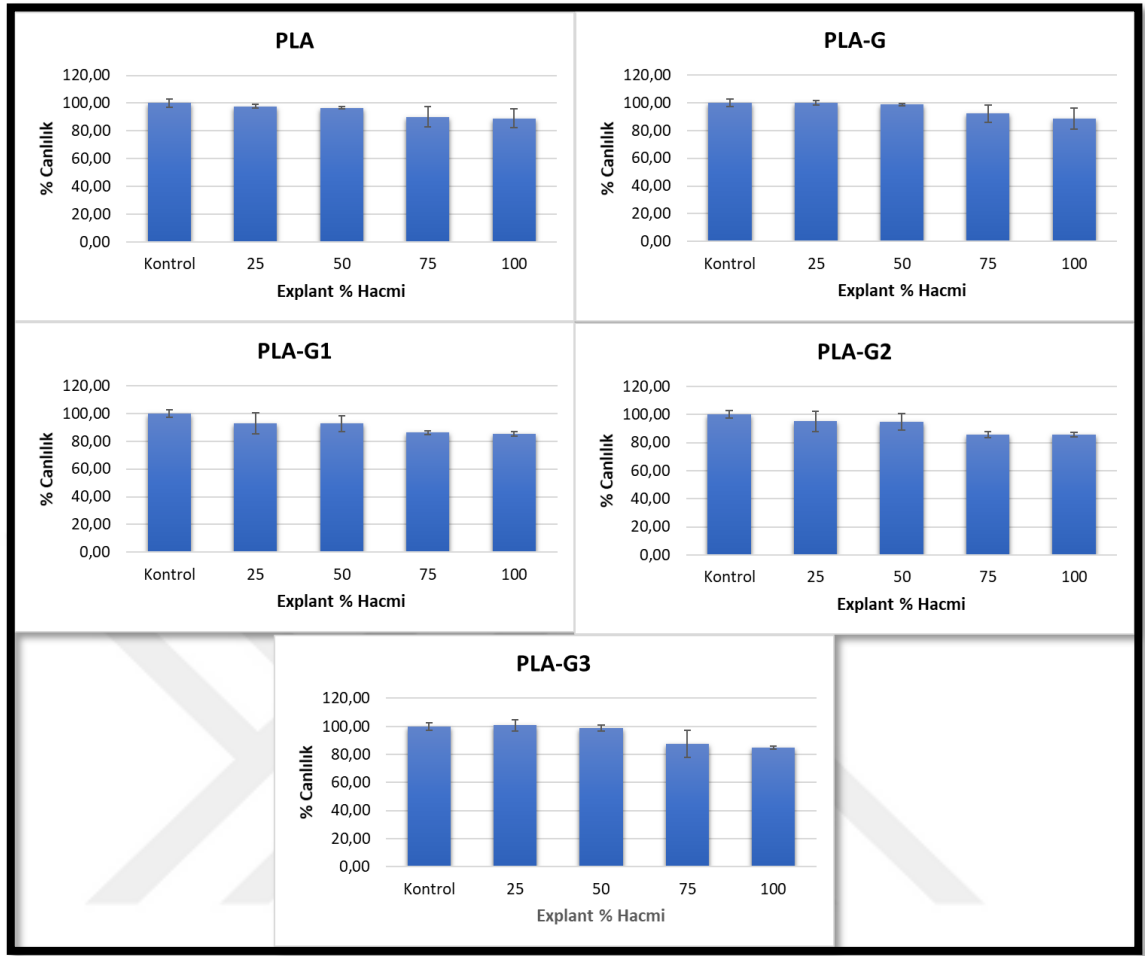
4.2.5.1 XTT Bulguları

NL'ler doğrudan temas yöntemi ile L929 hücre canlılığı üzerindeki etkisi incelendiğinde; ISO 10993-5 standartlarına [27] göre PLA-G1, PLA-G2, PLA-G3'ün zayıf sitotoksik etki gösterdiği, PLA ve PLA-G'nin ise hücreler üzerinde toksik etki göstermediği görülmüştür (Şekil 4.16). PLA, literatürde biyo-uyumlu bir polimer olarak bahsedilmektedir, ancak GO, doza bağlı olarak sitotoksik bir etki göstermektedir. Doğrudan sitotoksosite sonuçlarına göre, PLA ve PLA-G NL'lerinin toksik olmaması PLA'nın biyoyumluluğu ve GO için konsantrasyon değerinin doğru seçilmesi ile açıklanabilir. Ayrıca PLA-G1, PLA-G2 ve PLA-G3 NL'lerinin zayıf toksisitesi, üretimde kullanılan yüksek konsantrasyonlardaki CLA ve Se ile açıklanabilir.



Şekil 4. 16 PLA_3 NL için Direk Temaslı XTT testi

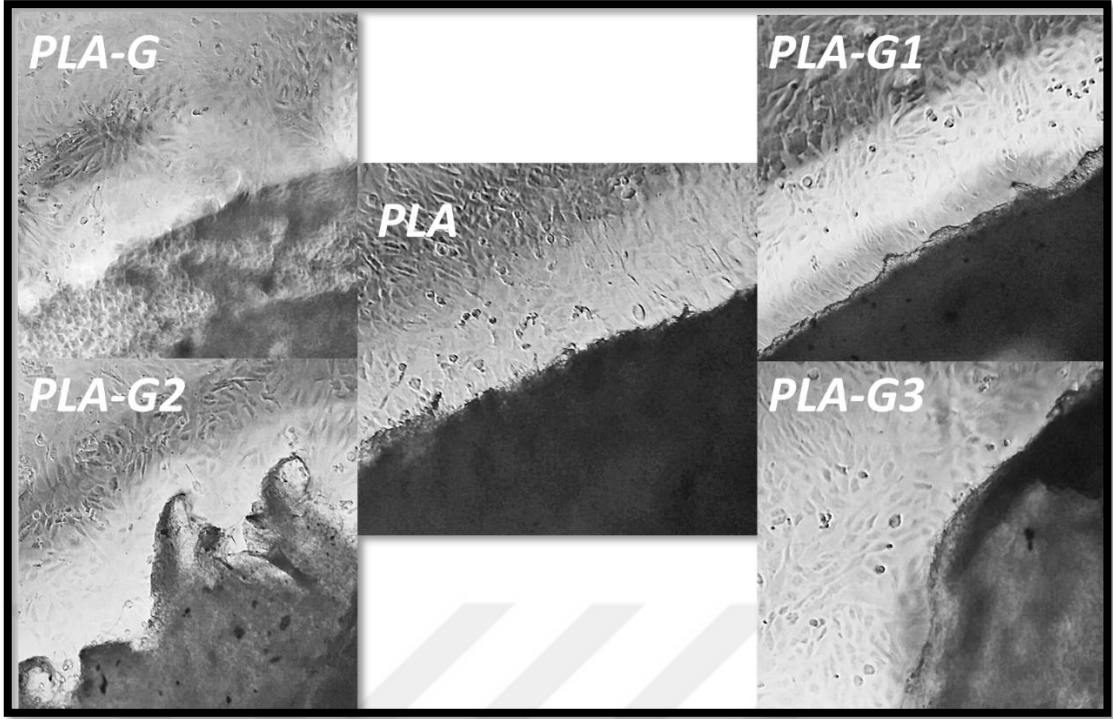
Örneklerin L929 hücre canlılığı üzerindeki etkisi dolaylı yöntemle incelenmiştir; Örneklerin herhangi bir hacim değerinde hücreler üzerinde toksik etki göstermediği, ancak tüm örnekler için artan hacim oranına bağlı olarak hücre canlılığında azalma meydana geldiği gözlenmiştir. Direkt sitotoksosite testinde hafif toksik etki gösteren PLA-G1, PLA-G2 ve PLA-G3, indirek analiz sonucunda sitotoksik etki göstermemiştir. Bu durum Se ve CLA maddelerinin konsantrasyonları ile açıklanabilir. Özellikle, PLA-G3'ün% 25'lik hacminin, diğer malzemelere kıyasla en iyi yaşayabilirliği (kontrolün üzerinde) gösterdiği gözlenmiştir.



Şekil 4. 17 PLA_3 NL için indirek (dolaylı temas) XXT grafikleri

4.2.5.2 Hücre Adezyonu Testi Bulguları

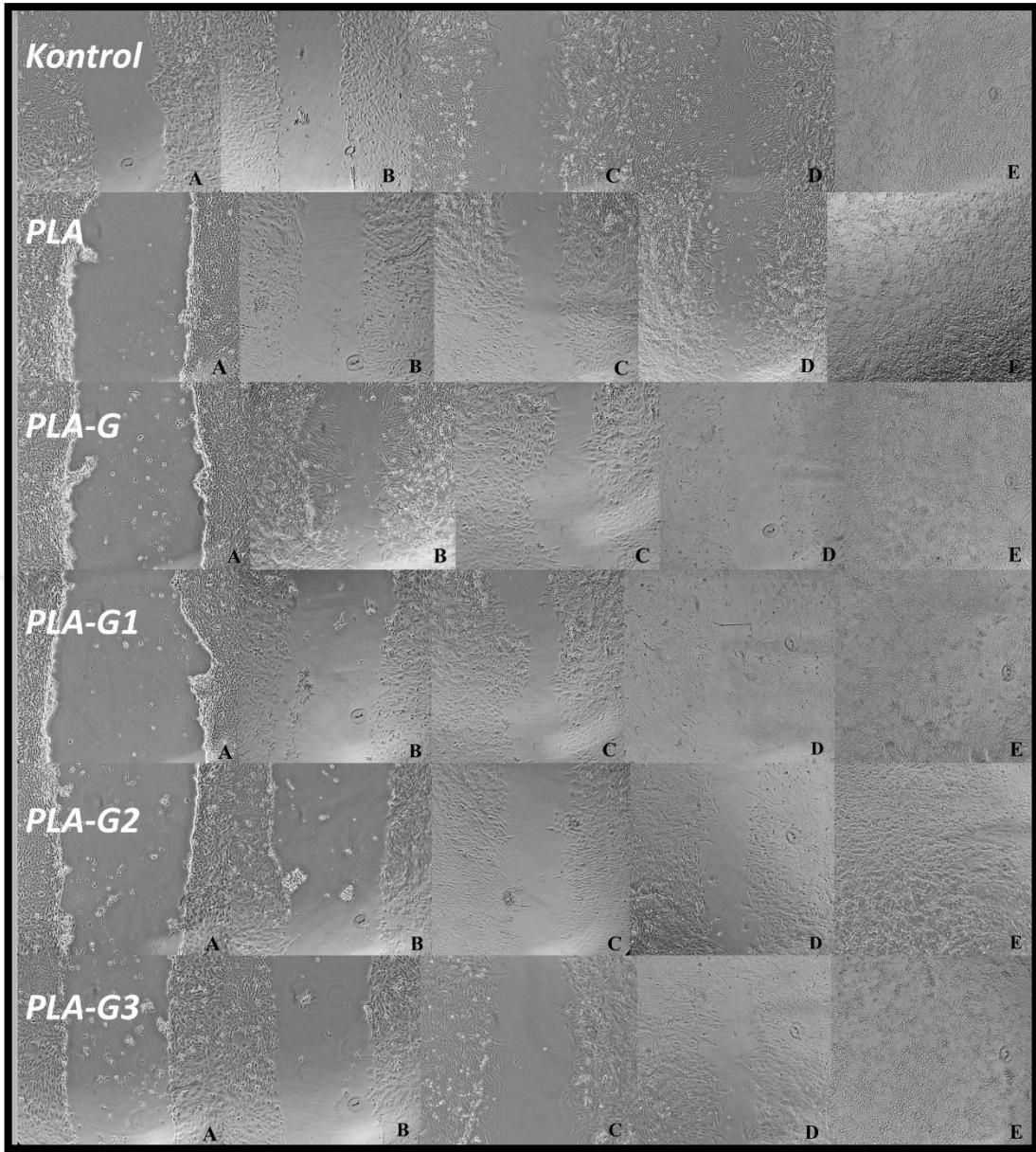
Adezyon bulguları incelendiğinde (Şekil 4.18) ve 5 örneğin tamamının hücre yapışmasını desteklediği görülmüştür. Örneklerin etkisi; L929 hücre göçü üzerindeki PLA, PLA-G, PLA-G1, PLA-G2 ve PLA-G3, zamana bağlı olarak kontrol ile karşılaştırılmıştır. Bu durum, PLA'nın biyoyumluluğu ve GO konsantrasyon değerinin doğru seçilmesi ile ilgili olabilir.



Şekil 4. 18 PLA_3 NL hücre adezyon görüntüleri

4.2.5.3 In Vitro Yara İyileştirme Testi (Scratch Assay) Bulguları

PLA-G1, PLA-G2 ve PLA-G3 ile muamele edilen hücreler materyal üzerinde yapışma gösterdi, ancak hücrelerde stres granülleri ve bazı ölü hücreler bulunmuştur. Bu durum doğrudan sitotoksikite sonuçlarını destekler ve malzemeler üretilirken eklenen aşırı Se ve CLA konsantrasyonları ile açıklanabilir. Bu etkiler incelendiğinde kontrol grubunda oluşan yaraların ve numunelere maruz kalan grupların 24 saat sonra kapatıldığı görüldü. Ayrıca numunelere maruz kalan hücrelerin kontrol grubuna göre daha hızlı hücre göçüne sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 4.19). Ayrıca Se (PLA-G1, PLA-G2 ve PLA-G3) ile kombine edilen PLA-GO nanofiber formülasyonları ile tedavi edilen hücrelerin daha hızlı göç gösterdiği görülmüştür. Bu durum selenyumun antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri ile açıklanabilir.



Şekil 4. 19 PLA_2 NL için In vitro yara iyileştirme görüntüleri

Burada amaç GO ilavesinin hücresel tutunmayı hızlandırdığı, desteklediğini gözlemleyebilmek. Yani poliferasyon görülmesini beklenmiştir.

4.2.6 PLA_2 Çalışma Grubu Tartışmaları

PLA konsantrasyonun, dolayısıyla çözelti viskozitesinin artması, daha büyük ve daha homojen lif çapları oluşumu ile sonuçlanmıştır. Daha yüksek viskozite direnci nedeniyle küreselden lif benzeri yapı oluşumundan çapları artmış tek tip lifler üzerinde oluşan boncukların morfolojisi oluşmuştur. Yüksek yüzey gerilimine sahip çözelti, jetlerin dengesizliği ve püskürtülen damlacıkların oluşması nedeniyle

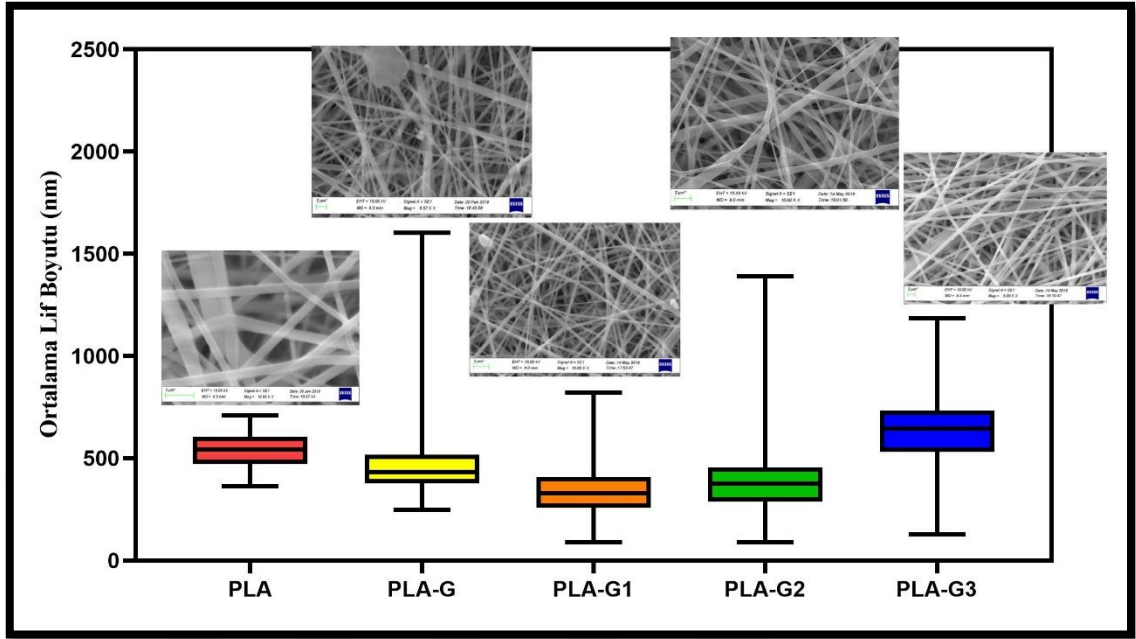
elektro eğirme sürecini engellemektedir. Lif çapı ve konsantrasyonu birbiriyle doğru orantılıdır. Konsantrasyon arttığında, lif çapı da artar.

Elektro eğirme işlemi gerçekleştirildiğinde, diğerlerinden daha büyük öneme sahip parametre uygulanan voltajdır. Ancak eşik voltajına erişildikten sonra, lif oluşumu meydana gelir, Bu, elektrik alanı ile birlikte çözelti üzerinde gerekli yükleri içerir ve elektro eğirme tekniğini başlatır. Çalışmalar, çözüme daha yüksek voltajlar uygulandığında, daha fazla polimer püskürmesi olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle nano liflerin daha büyük çapta oluştuğunu söyleyebiliriz. Dahası, çoğu vaka, daha yüksek bir voltajın, jetteki daha büyük kulombik kuvvetler ve daha güçlü bir elektrik alanı nedeniyle çözeltinin daha fazla gerilmesine yol açtığını göstermektedir. Bu durumlardan yola çıkarak hazırlanan çözeltiye 25 kV gerilim uygulanmıştır. Şekil 4.5'e göre GO'nun PLA lifleri üzerinde boncuk içermeyen morfolojilerle sonuçlanan bir yumuşatma etkisi olduğu gösterilebilir. Boncuklar, hücreler için gerilim artırıcı yerler olduğundan, GO ilavesi, diğer fonksiyonel ajanların dahil edilmesi için uygun bir ajan görevi görmüştür. Çözeltilerin fiziksel karakterizasyonunun sonucu Tablo 4.4'te gösterilmektedir. PLA için ortalama boyutun 541,56 nm ve PLA-G'nin ortalama boyutunun 472,66 nm olduğunu gösterilmiştir. Boncukların morfolojisi küreselden iğ benzeri hale değişir ve sonuçta yüksek viskozite direnci nedeniyle artan çaplara sahip tek tip lifler oluşmuştur.

Yüksek yüzey gerilimine sahip çözelti, jetlerin dengesizliği ve püskürtülen damlacıkların oluşması nedeniyle elektrospinning sürecini engellemiştir. Lif boyutu ve konsantrasyonu literatürde olduğu gibi birbiriyle doğru orantılı olduğu gösterilmiştir. Konsantrasyon arttığında, lif çapı da artar.

Şekil 4.8'de gösterilen SEM görüntülerine göre, Se veya CLA'yı yüklemek için yeterli karıştırma nedeniyle homojenik dağıtılmış PLA-G çözeltisi seçilmiştir. GO'yu sheet şeklinde kullandığımızda NL elde etmek için buradaki homojenik karıştırma önemlidir. PLA-G1, PLA-G2 ve PLA-G3'ün SEM ve histogramları Şekil 4.8'deki gibi gösterilmiştir. NL boyutu ve elektro eğirme işleminde kullanılan çözelti konsantrasyonu birbiriyle doğru orantılıdır. NL örneklerin ortalama boyutu Tablo 4.20'de gösterildiği gibidir. GO ve Se'nin eklenmesiyle, NL çaplarında azalma görülmüştür. En düşük fiber çapı ($354 \pm 154,12$ nm) PLA-G1'de gözlenmiştir. Bu bağlamda konsantrasyon arttığında, lif çapı da arttığı, boncuklu yapının morfolojisi

küreselden iğ benzeri hale değiştiği ve sonuç olarak yüksek viskozite direnci nedeniyle artan çaplara sahip tek tip lifler oluştuğu görülmüştür.



Şekil 4. 20 PLA_2 NL ortalama lif boyutları karşılaştırması

FTIR analizi, elektro eğirme işeminde üretilen NL'lerin işlevsel gruplarını incelemek için gerçekleştirilmiştir. Yapı içerisinde bulunan PLA, CLA, GO, Se Şekil 4.9'da gösterilmiştir. C-O germe, C = O germe, C-H bükme ve -CH germe bant yapıları gösterilmektedir. PLA-NL'ler yaklaşık 2150 cm^{-1} 'de absorpsiyon bandına ve 1980 ile 700 cm^{-1} arasında bantlara sahiptir [593].

Üretilen GO XRD üzerinde modellenmiştir. Grafitin $2\theta=26,4636^\circ$ 'de güçlü kırınım tepe noktası gösterilmektedir. GO için ise $10,5524^\circ$ 'te bir tepe noktasına sahiptir. Bu da $8,17^\circ$ C'lik bir düzleme karşılık gelmiştir. Bu durum da da grafitin oksidasyonunu teyit etmiş olup grafitin oksidasyonundan daha büyük ölçüdedir ve büyük öneme sahiptir. Bu sonuç literatürde bildirilen değerlere benzerdir [594]. Aralıktaki artış, grafit tabakaları arasında oksijenle temas eden fonksiyonel grupların oluşumundan kaynaklanmaktadır.

GO'nun bakteri testlerinde özellikle diğer etken malzemelerden daha iyi olması Şekil 4.10'daki XRD sonucunda gösterdiği gibi sahip olduğu fonksiyonel gruplara bağlı olduğu ifade edilebilir.

Raman spektroskopisi, üretilen grafit katmanlarının sayısını karakterize etmek için kullanılan önemli ve basit bir yöntemdir. Grafit, genellikle iki ana özelliği inceleyerek Raman spektroskopisi kullanılarak karakterize edilmiştir. Birincisi; grafitleştirilmiş

yapıdan kaynaklanan G-bandı (yaklaşık 1600 cm^{-1}). İkincisi; burada bulunan kusur veya bozukluklardan kaynaklanan D-bandı (yaklaşık 1350 cm^{-1}) olduğu görülmüştür [13].

PLA_2 salım kinetik profili olarak PLA-G3 NL'i kullanılmıştır. Kümülatif % değeri %80,4 olarak belirlendiği için 100'e en yakın numune olarak seçilmiştir. Tüm formülasyonlarda ilaç salınımının zamana bağlı ilacın matristen salınmasını ifade eden sıfırıncı derece salınım modeline ($R^2 = 0.9761$) [595]–[597] uyduğu görülmüştür. PLA_2 NL'lerinde kullanılan GO malzemesi konsantrasyonunun artışı etken madde salınımını etkilediği görülmüştür. Grafen oksit geniş yüzey alanı nedeni ile etken maddeyi hapsetmiştir ve pH 7,4'te çözünmeyi düşürmüştür. Gokhale [598] çalışmasında, bütün salım kinetik modellerini çalışmış, ilaç kapsülünün parçalanmasıyla Zero Order modelini matematiksel işlemlerle Tablo 4.7'de olduğu gibi tasarlamıştır. PLA_2 çalışmasında ise difüzyon yoluyla salım yapılmıştır.

Tablo 4. 7 PLA-G3 CLA ilacı kümülatif salım ve logaritmik değerler tablosu

Zaman (Saat)	Kümülatif ilaç salınımı %	% Kalan aktif madde	Zamanın Kare Kökü	log % Kalan aktif madde	Log zaman	log Kümülatif ilaç salınımı %	(Wt)
1	14,2	85,8	1,000	1,933	0,000	0,000	4,411
2	22,4	77,6	1,414	1,890	0,301	1,350	4,265
3	30,1	69,9	1,732	1,844	0,477	1,479	4,119
4	38,4	61,6	2,000	1,790	0,602	1,584	3,949
5	47,5	52,5	2,236	1,720	0,699	1,677	3,744
6	54,7	45,3	2,449	1,656	0,778	1,738	3,565
7	65,4	34,6	2,646	1,539	0,845	1,816	3,259
8	74,3	25,7	2,828	1,410	0,903	1,871	2,951
24	80,4	19,6	4,899	1,292	1,380	1,905	2,696

Antibakteriyel testlerde; *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus* ve *S. epidermidis*'e karşı antibakteriyel aktivite Şekil 4.15'te gösterildiği gibi PLA-G3 NL'de çalışılmıştır.

Antibakteriyel çalışmalarda kullanılan mikroorganizmaların malzeme karakterizasyonuna göre büyüme gözlemlendiği görülmüştür. Bu çalışma kapsamında kullanmış olduğumuz Se, bilinen bakteri direncinin olmadığı yeni bir antibiyotik kimyasıdır [599][600][601]. Se vücutta yaygın bir eser elementtir ve özellikle selenoproteinlerin oluşumunda önemli bir etken madde olmuştur [602][603]. Se antikanser etkilere sahip olduğu öne sürülmüştür [604]. Burada, PLA'ya antibakteriyel özellikler kazandırmak CLA, GO yüklü PLA'ya elektro eğirme yapmak için Se nanopartikülleri katmış olduk. PLA/GO/Se/CLA NL ile ECM'ye benzer bir morfolojiyi tasvir etmiş olduk. Se katkılı PLA NL grupları ile antibakteriyel [605], antimikrobiyal [606], antioksidan [607] etkiler göstermiştir. Chung ve ark.[605] yaptığı Se katkılı PCL çalışmasında da cilt uygulamalarında bakterileri engellediği bakteri hücre aktivitesini azalttığı gösterilmiştir. Se'nin PLA NL'lerine katkı olarak eklenmesi antibiyotik yokluğunda yara iyileşmesini artıran ve enfeksiyonu azaltan biyomedikal uygulama olarak yara örtüsü potansiyeline sahip olduğunu bu çalışmada göstermiştir. Bakteriler, kontrol grubu PLA ve katkılı PLA'larla bir büyüme ortamında inkübe edilmiştir. PLA-G3 bütün mikroorganizmalarda etki göstermiştir (Şekil 4.15). PLA-G2 E.coli ve S.aureus üzerinde kontrol grubuna yakın etki gösterirken, B.cereus ve S.epidermidis üzerinde oldukça iyi etki göstermiştir. PLA-G ve PLA-G1 diğer NL'lere oranla bütün mikroorganizmalarda kontrol grubuna yakın etki göstermiştir. Bunun sonucu olarakca GO ve Se kombinasyonları S. epidermidis mikroorganizması üzerinde antibakteriyel etkiler göstermiştir, S. epidermidis gram + bakteri olup insan ve hayvan cildinin mukozunda görülmektedir [608][609][610]. PLA üzerine katılan ajanların S.epidermidis üzerinde etki göstermesi önemlidir. Bunun yanında PLA-G3'de, S. epidermidis üzerinde antibakteriyel etkilere sahiptir. CLA katkılı ve katkısız S.edpidemidis bakteri inhibisyon bölgesi için; 23,73 mm, PLA-G; 19,73 mm, PLA-G1; 19,87 mm, PLA-G2; 29,70 mm ve PLA-G3; 29,16 mm büyüme miktarları ölçülmüştür (Şekil 7d). Bu sonuçlar, PLA ve CLA kombinasyonlarının antibakteriyel etkisinin diğer kombinasyonlardan daha güçlü olduğunu göstermiştir. Çünkü CLA, 50S ribozomal alt birimine bağlanan ve bakterilerin protein sentezini inhibe eden bir makrolid antibiyotiktir[532], [611]–[613]. Bu nedenle PLA ve CLA kombinasyonları bakterileri inhibe etmiş ve yüksek antibakteriyel etki göstermiştir.

Sitotoksisite deneylerinde doğrudan(direct) ve dolaylı (Indirect) metotlar kullanılmıştır. NL'lerin doğrudan temas yöntemi ile L929 hücre canlılığı üzerindeki

etkisi incelendiğinde; ISO 10993-5 standartlarına [27] göre PLA-G1, PLA-G2, PLA-G3'ün zayıf sitotoksik etki gösterdiği, PLA ve PLA-G'nin ise hücreler üzerinde toksik etki göstermediği görülmüştür (Şekil 4.16 ve 4.17). PLA, literatürde biyo-uyumlu bir polimer olarak bahsedilmektedir[614], ancak GO, doza bağlı olarak sitotoksik bir etki göstermektedir[615], [616]. Doğrudan sitotoksikite sonuçlarına göre, PLA-G ve PLA-G1 örneklerinin toksik olmaması PLA'nın biyoyumluluğu ve GO için konsantrasyon değerinin doğru seçilmesi ile açıklanabilir. Ayrıca PLA-G1, PLA-G2 ve PLA-G3 örneklerinin zayıf toksisitesi, üretimde kullanılan yüksek konsantrasyonlarda CLA ve Se ile açıklanabilir. Örneklerin L929 hücre canlılığı üzerindeki etkisi dolaylı yöntemle incelenmiştir; Örneklerin herhangi bir hacim değerinde hücreler üzerinde toksik etki göstermediği, ancak tüm örnekler için artan hacim oranına bağlı olarak hücre canlılığında azalma meydana geldiği gözlenmiştir. Direkt sitotoksikite testinde hafif toksik etki gösteren PLA-G1, PLA-G2 ve PLA-G3, indirek analiz sonucunda sitotoksik etki göstermemiştir. Bu, seyreltilmiş Se ve CLA madde konsantrasyonları ile açıklanabilir. Özellikle, PLA-G3'ün% 25'lik hacminin, diğer malzemelere kıyasla en iyi canlılığı (kontrolün üzerinde) gösterdiği gözlemlenmiştir

Hücre adezyonu ve In Vitro yara iyileştirme testi (Scratch Assay) ile örneklerin hücre yapışması incelendiğinde (Şekil 4.18 ve 4.19), 5 örneğin tamamının hücre yapışmasını desteklediği görülmüştür. Örneklerin etkisi; L929 hücre göçü üzerindeki PLA, PLA-G, PLA-G1, PLA-G2 ve PLA-G3, zamana bağlı olarak kontrol ile karşılaştırılmıştır. Bu durum, PLA'nın biyoyumluluğu ve GO konsantrasyon değerinin doğru seçilmesi ile ilgili olabilir. Ek olarak, PLA-G1, PLA-G2 ve PLA-G3 ile işleme tabi tutulan hücreler materyal üzerinde yapışma göstermiş, ancak hücrelerde stres granülleri ve bazı ölü hücreler bulunmuştur. Bu durum doğrudan sitotoksikite sonuçlarını destekler ve malzemeler üretilirken eklenen aşırı Se ve CLA konsantrasyonları ile açıklanabilir. Bu etkiler incelendiğinde kontrol grubunda oluşan yaraların ve numunelere maruz kalan grupların 24 saat sonra kapatıldığı görülmüştür. Ayrıca numunelere maruz kalan hücrelerin kontrol grubuna göre daha hızlı hücre göçüne sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.19). Ayrıca Se (PLA-G1, PLA-G2 ve PLA-G3) ile kombine edilen PLA-GO NL formülasyonları ile tedavi edilen hücrelerin daha hızlı göç gösterdiği görülmüştür. Bu durum Se'nin antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri ile açıklanabilir.

Sonuç olarak; bu çalışmada GO ve PLA'nın etkilerini Se ve CLA ile destekleyerek iyileşmesi çok zor olan diyabetik yaralar için antibakteriyel etkiye sahip etkili yara örtüsü materyallerinin tasarlanması amaçlanmıştır. Sonuçlara göre, NL formülasyonlar yüksek ilaç yükleme kapasitesine, mekanik dirence, kimyasal stabiliteye ve geniş yüzey alanına sahiptir. PLA-G3 NL'in ortalama çapları 640 nm'dir. Ayrıca PLA-G3, sırasıyla 253,8 mPas ve 31,62 mN / m'den daha yüksek viskozite ve yüzey gerilimi değerine sahiptir. Ayrıca bu malzemenin yüzeyinde polar grupların bulunması uyumluluğu artırmaktadır. Öte yandan, sitotoksikite ve hücre adezyon deneyleri, materyallerin düşük toksisite potansiyelini, biyouyumluluğunu göstermiştir. *E. coli*, *S. aureus* ve *B. cereus* üzerindeki PLA-G2 ve PLA-G3'ün inhibisyon oranları, diğer formülasyon gruplarından daha yüksek olduğu görülmüştür. CLA ile kombine edilen PLA-GO NL'in daha güçlü bir antibakteriyel etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Hücre kültürü deneyleri, beş numunenin tamamının hücre yapışmasını desteklediğini ve in vitro yara iyileştirme deneyine göre, numunelere maruz kalan hücrelerin kontrol grubuna kıyasla daha hızlı hücre göçüne sahip olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak, PLA-GO NL'leri Se ile desteklenerek daha hızlı bir yara iyileşme durumu gözlemlenmiş bunun yanında. CLA ile desteklenmesi, yara ortamında antibakteriyel etki üretilmesine neden olmuştur. Bu durum Se'nin antioksidan ve antiinflamatuvar etkileriyle açıklanabilir. Sonuç olarak, Se destekli yara örtüsü malzemesi, yara iyileşme sürecini destekler ve CLA ile kullanılması cilt mukozal yapısı üzerinde antibakteriyel etki sağlamaktadır. Yara örtüsü malzemesi olarak Se/CLA destekli PLA NL'lerin kullanılması, yara iyileşme sürecine katkıda bulunacağı ön görülmüştür.

4.3 PLA_3 Çalışma Grubu Bulgular ve Tartışmalar

Bu çalışma grubu içeriğinde yapılan deneysel çalışmalara ait çözelti karakterizasyon bulguları ve NL karakterizasyon bulgularına yer verilmiştir.

4.3.1 PLA_3 Çalışma Grubu Çözelti Bulguları

P3 çözeltisinde ele alınan PLA, PLA/B, PLA/ZM ve PLA/B/ZM çözeltileri %8 konsantrasyonunda analiz edilerek tablo olarak verilmiştir

Tablo 4. 8 PLA_3 çözeltisi karakterizasyon değerleri

%8 PLA_3 numuneleri	Viskozite (mPas)	Yüzey gerilimi (mN/m)	Yoğunluk (g/mL)	İletkenlik (μS/cm)
PLA	123,0	23,42	1,2931	2,6
PLA/BAC	217,1	24,96	1,2894	6,31
PLA/ZM	237,6	29,56	1,2891	2,42
PLA/BAC/ZM	289,8	28,09	1,298	4,82

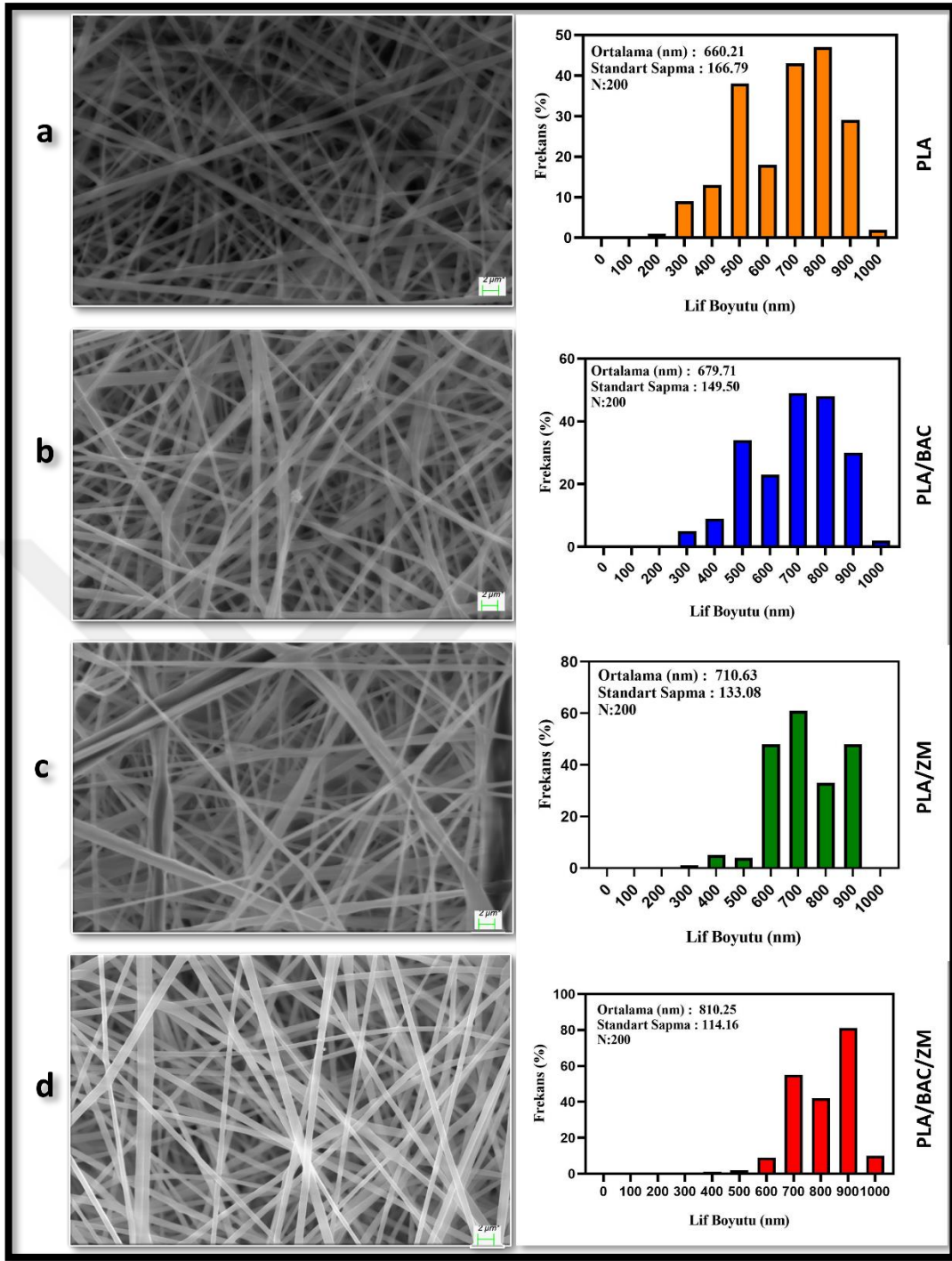
4.3.2 PLA_3 Çalışma Grubu NL Karakterizasyon Bulguları

4.3.2.1 Morfolojik Bulgular

PLA, PLA/BAC, PLA/ZM, PLA/BAC/ZM NL'leri için lif boyutları analiz edilmiştir.

Tablo 4. 9 PLA_3 uygulanan voltaj, akış hızı, lif ortalama boyutları

PLA_3 NL	Uygulanan voltaj kV	Akış hızı mL/h	Mesafe cm	Lif ortalama boyutu (nm)
PLA	25	1	15	660,21 $\pm$ 166,79
PLA/BAC	25	1	15	679,71 $\pm$ 149,50
PLA/ZM	25	1	15	710,63 $\pm$ 133,08
PLA/BAC/ZM	25	1	15	810,25 $\pm$ 114,16



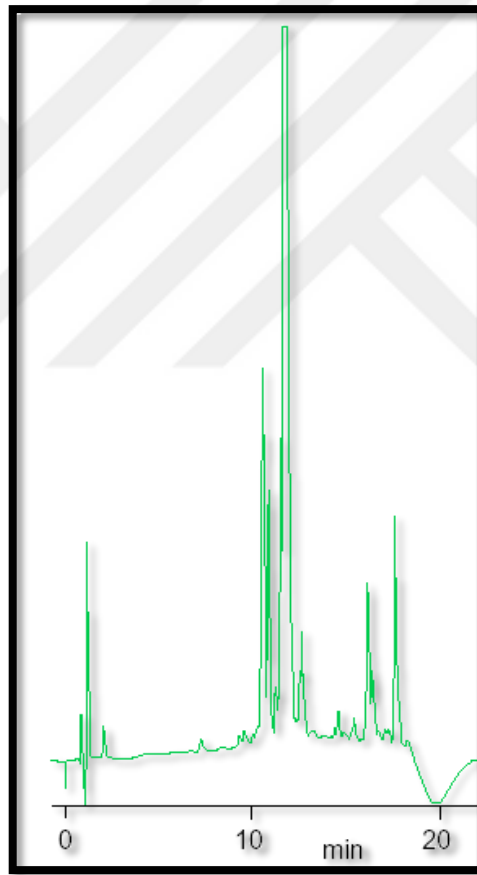
Şekil 4. 21 PLA₃ NL a, b, c, d, SEM morfolojik görüntüleri ve histogramları

PLA₃ NL için hazırlanan polimerik çözelti kapsamında PLA, BAC, ve ZM malzemeleri birbiriyle PLA, PLA/BAC, PLA/ZM ve PLA/BAC/ZM olarak kombinasyon oluşturulmuştur. Çözeltiler elektro eğirme işlemine tabi tutulduktan sonra elde edilen NL'ler için morfolojik yapısının tayin edilmesi amacıyla SEM cihazında karakterizasyon testlerine tabi tutulmuştur.

Şekil 4.21’de PLA_3 NL için morfolojik yapı görüntüleme gösterilmiştir. Burada PLA polimeri üzerine katkı yapılan malzemelerin içerideki yapılarını yakınlıştırarak tek bir görüntüde elde edilmiştir.

4.3.2.2 HPLC Analiz Bulguları

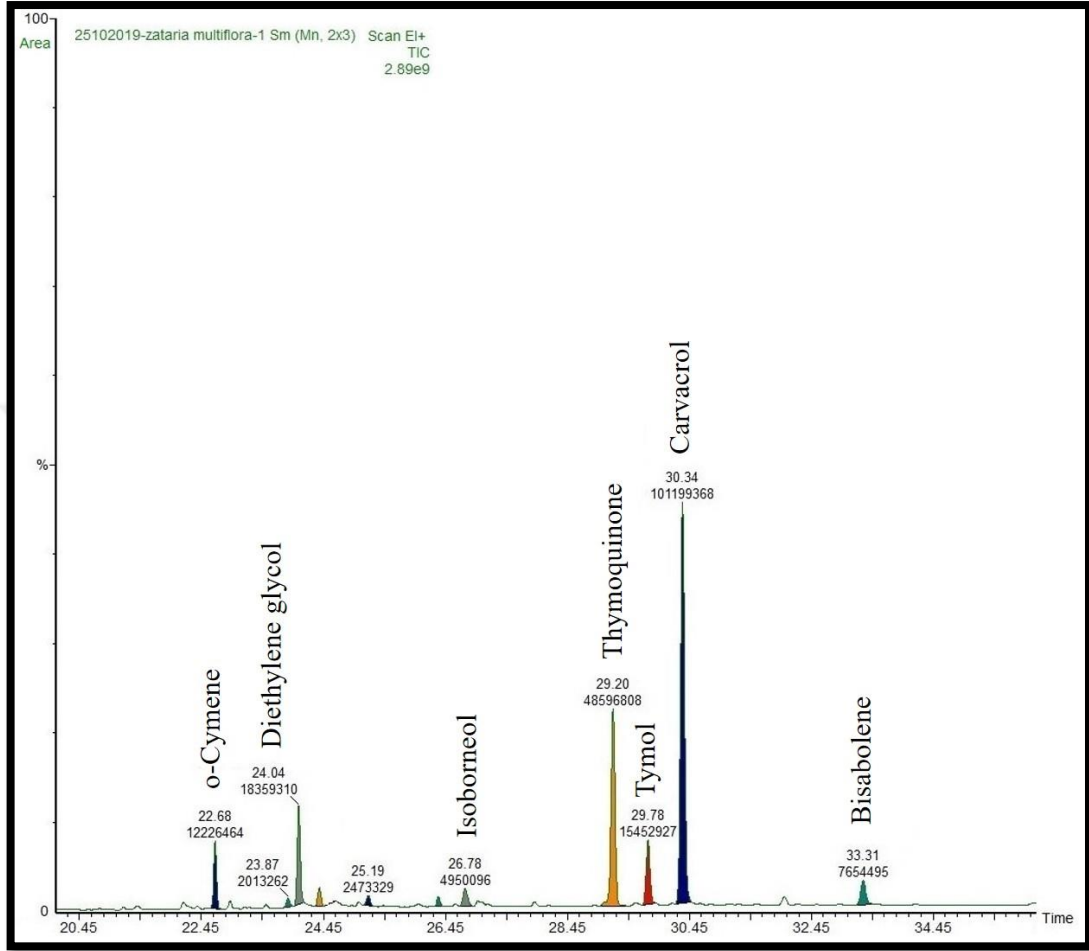
BAC karakterizasyon için HPLC yöntemleri ile analiz gerçekleştirilmiştir. BAC farklı formlarının ölçümelerini ve uzun çeşitli yapılarını tespit etmek için HPLC metodu kullanılmıştır. Yaklaşık 50 BAC formunun mevcut analiz yapılan etken maddede var olduğunuz görmüş olmamızı, izokratik HPLC metodu için ilaç kalite testlerinde kullanılabilirlik sağlamlığını göstermiştir. BAC’ın ana terapötik kullanım biçimleri A ve B’dir, BAC ise F nefrotoksisite gösteren bir bozunma ürünüdür [617][618], [619].



Şekil 4. 22 Basitrasin ilacı HPLC Kromatografisi (MACHEREY-NAGEL, NUCLEOSIL 100-5 C18 PPN fazında)

4.3.2.3 GC-MS Analiz Bulguları

Aromatik esansiyel yağ içeren *Zataria Multiflora* içeriğinde Carvacrol gibi antibakteriyel etken maddesine sahip olduğu resimde grafik olarak gösterilmiştir



Şekil 4. 23 Aromatik esansiyel yağ *Zataria Multiflora* GC-MS, antibakteriyel olduğunu gösteren Carvacrol ve Timol içeriği

Tablo 4. 10 ZM yağının kimyasal bileşenleri, saklama süresi ve % alanı

Bileşenler	Saklama Süresi (RT)	% Alan
β -Caryophyllene	7,84	0,47
α -Pinene	8,06	0,43
α -Terpinene	9,45	0,14

Tablo 4. 10 ZM yağının kimyasal bileşenleri, saklama süresi ve % alanı(devamı)

Myrcene	9,90	0,40
Carvacrol acetate	10,34	0,18
γ -Terpinene	11,02	0,26
Thymol methyl ether	11,32	0,06
Allo-Aromadendrene	14,75	0,42
Linalool	16,52	1,08
Carvacrol methyl ether	17,63	0,37
β -Pinene	19,15	2,12
Terpinene-4-ol	22,08	0,63
o-Cymene	22,60	15,19
Diethylene glycol	24,04	0,25
Spathulenol	25,14	0,30
Isoborneol	26,78	2,02
Thymol	29,78	25,47
Carvacrol	30,34	48,06
Bisabolene	33,31	0,75

ZM yağının kimyasal bileşenleri tabloda gösterilmiştir. Toplamda % 99,87 içeriğe sahip olan ZM için 20 bileşen olarak GC-MS analiz sonuçları ortaya çıkmıştır. Ana

bileşen olarak karvakrol %50'sini oluştururken içerik alanı olarak %48,06 karvakrol, %25,47 timol olarak görülmüştür.

4.3.3 *In Vitro* Salım Kinetiği Bulguları

PLA/BAC/ZM ve PLA/BAC iki formülasyon karşılaştırıldığında ZM içeren formülün ilaç salınımı 24 saat sonra % 95 lere ulaşmıştır. Aynı zamanda kısa dönem oda koşullarında 25 0C de bekletilen numuneler 7, 14, 21 ve 30 gün boyunca bekletilip BAC miktar tayini yapılmıştır. ZM içeren formülün BAC ın stabilitesini arttırdığını görülmektedir. 30 gün boyunca ürün stabil kalmıştır.

Tablo 4. 11 BAC etken maddesi kümülatif salım yüzde değerleri

Zaman (saat)	Salınan Kümülatif İlaç Yüzdesi	
	PLA/BAC/ZM	PLA/BAC
1	19,7	18,1
2	28,5	26,2
4	44,1	39,4
6	68,1	64,4
8	86,4	81,9
24	95,1	89,4

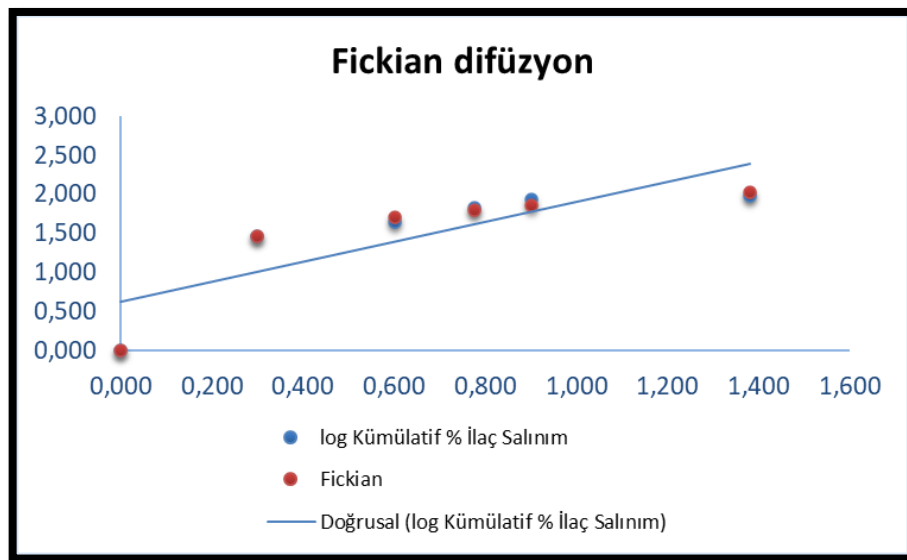
ZM nin hem salınımı hem de ürün salınımı pozitif yönde etkisinden dolayı PLA/BAC/ZM final formül olarak seçilmiştir. Tüm ilaç salınım profili de bu formül için yapılmıştır.

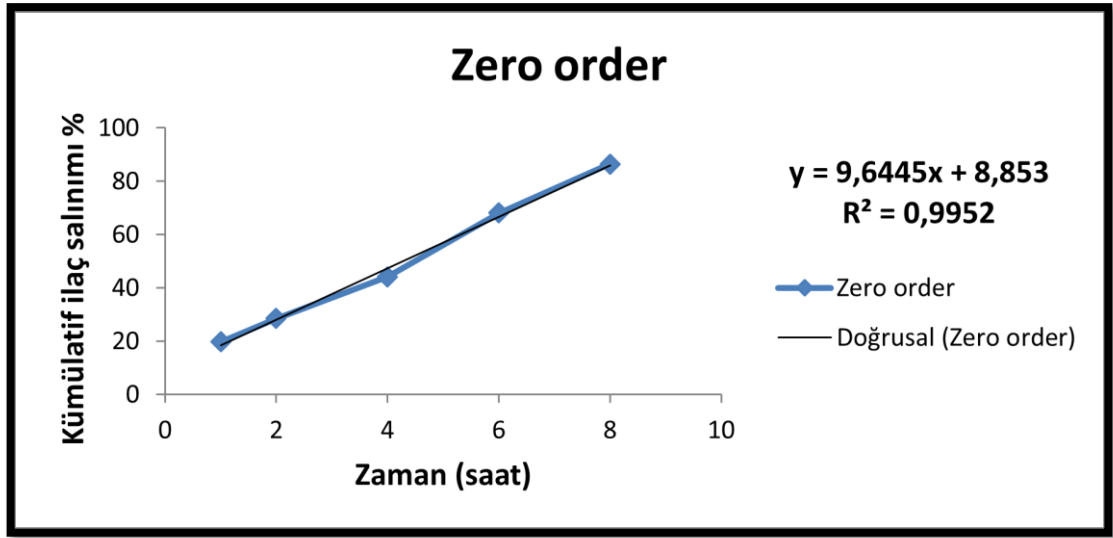
Tablo 4. 12 Franz Difüzyon kümülatif salım kinetiği matematiksel modellemesi

Zaman (Saat)	Kümülatif ilaç salınımı %	% Kalan aktif madde	Zamanın Kare Kökü	log % Kalan aktif madde	zaman log	log Kümülatif ilaç salınımı %	(Wt)	Wo-Wt
1	19,7	80,3	1,000	1,905	0,000	0,000	4,314	0,000
2	28,5	71,5	1,414	1,854	0,301	1,455	4,151	0,491
4	44,1	55,9	2,000	1,747	0,602	1,644	3,824	0,818
6	68,1	31,9	2,449	1,504	0,778	1,833	3,171	1,471
8	86,4	13,6	2,828	1,134	0,903	1,937	2,387	2,255
24	95,1	4,9	4,899	0,690	1,380	1,978	1,698	2,944

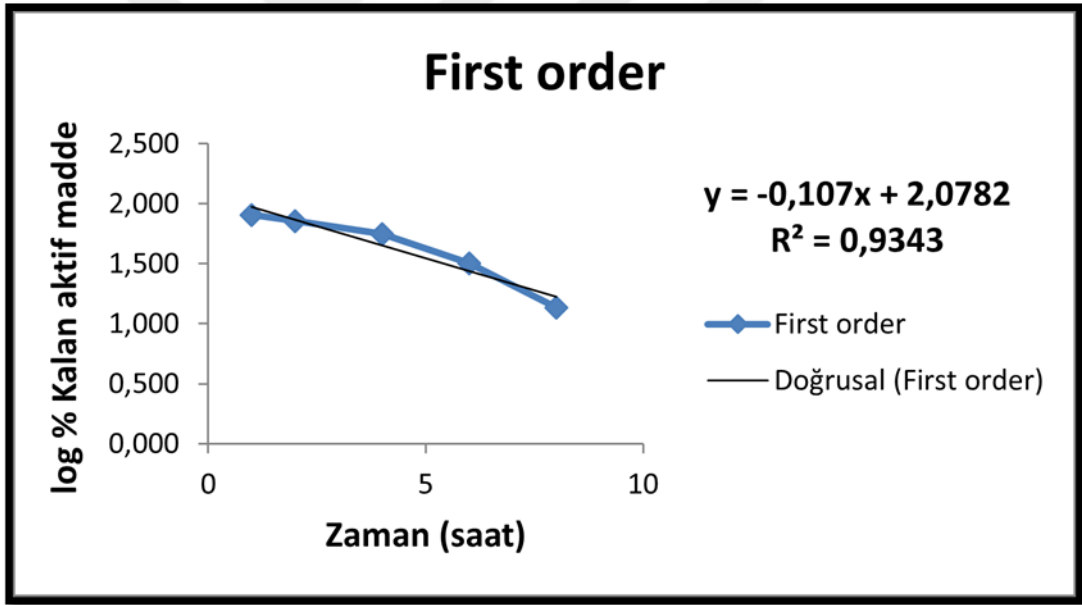
Tablo 4. 13 Franz difüzyon kümülatif ilaç salım fickian değerleri

Log Zaman	log Kümülatif % İlaç Salınım	FIC	SD
0,000	0,000	0	0
0,301	1,455	1,465462	0,000109
0,602	1,644	1,700196	0,003158
0,778	1,833	1,796292	0,001347
0,903	1,937	1,854594	0,006791
1,380	1,978	2,031118	0,002822

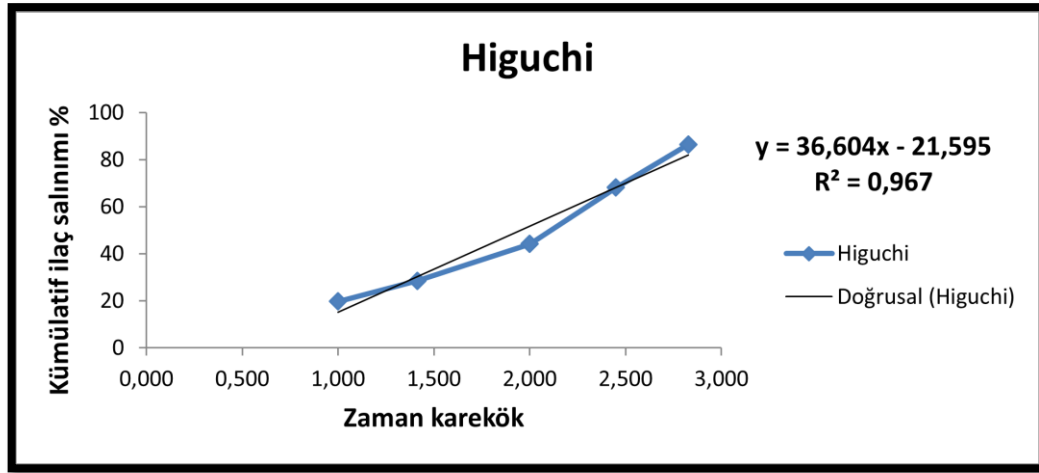
**Şekil 4. 24** Logaritmik kümülatif salım doğrusal-Fickian yasası



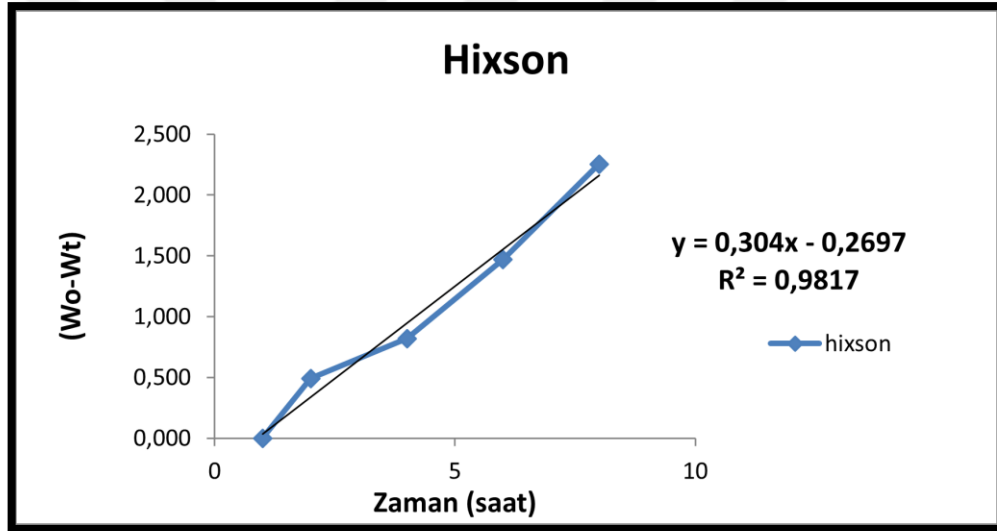
Şekil 4. 25 Franz Difüzyon matematiksel modeli: Zero Order



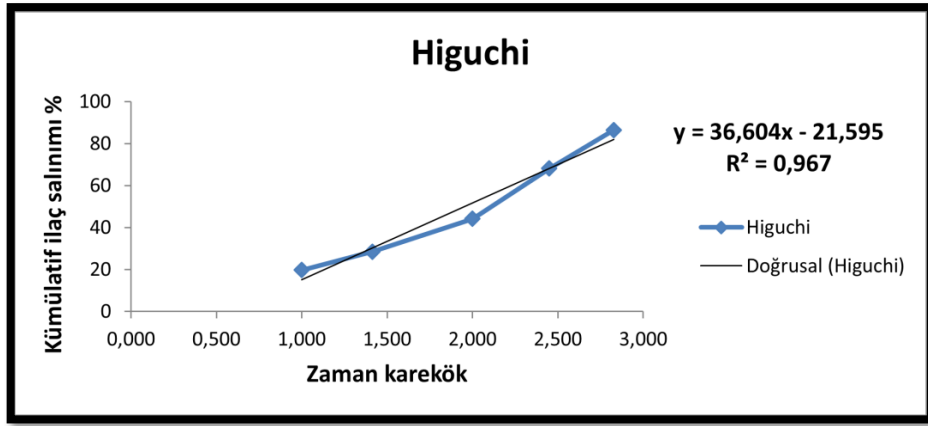
Şekil 4. 26 Franz Difüzyon matematiksel modeli: First Order



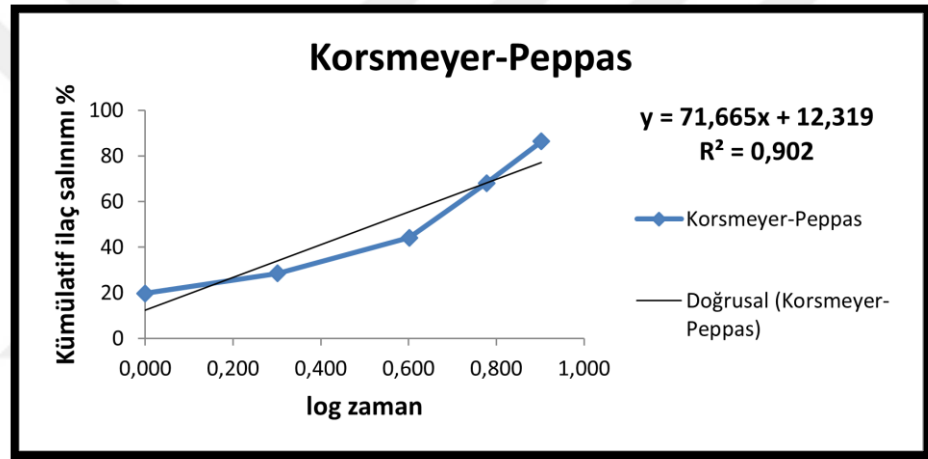
Şekil 4. 27 Franz Difüzyon matematiksel modeli: Higuchi



Şekil 4. 28 Franz Difüzyon matematiksel modeli: Hixson



Şekil 4. 29 Franz Difüzyon matematiksel modeli: Higuchi



Şekil 4. 30 Franz Difüzyon matematiksel modeli: Korsmeyer-Peppas

Salınım kinetiğinin Korsemeyer Peppas denklemine göre Fitting eğrisi yapılarak salınım tipinin (n değeri) belirlenmiştir. Burada belirlenen “n” değerine göre “K ve R²” değerleri bulunmuştur.

K; 1,895, n; 0,214, SSD; 0,00142, R²; 0,99746 olarak bulunmuştur.

- **Salım Kinetiği istatistiksel analiz: Stabilité Çalışması**

Tablo 4. 14 BAC etken maddesi 30 gün sonunda kalan madde % içeriği

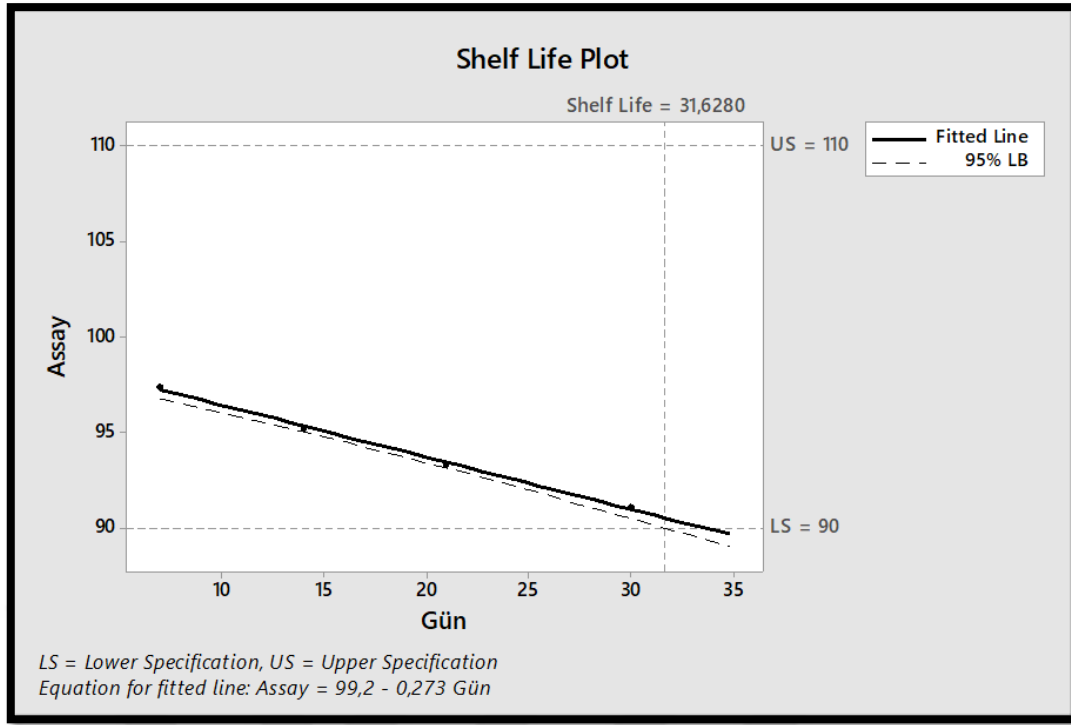
BAC etken içeren NL'ler	Başlangıç %	% kalan ilaç kütleli içeriği			
		7.gün	14.gün	21.gün	30.gün

Tablo 4.14 BAC etken maddesi 30 gün sonunda kalan madde % içeriği(devamı)

PLA/BAC	100	97,4±5,4	95,2±2,9	93,3±2,9	91,1±1,3
PLA/BAC/ZM	100	98,9±2,5	98,4±5,6	97,9±5,7	97,5±3,4

```
Spyder (Python 2.7)
File Edit Search Source Run Debug Consoles Projects Tools View Help
untitled0.py
1 #. coding: utf-8 -*-
2 """ Stability Study:PLA/BAC"""
3 Created on Thursday August 27 22.15.52 2020
4
5 @author: FatihCiftci
6 """BAC"""
7
8 import numpy as np
9 import pandas as pd
10 from sklearn.linear_model import LinearRegression as lr
11 import matplotlib.pyplot as plt
12 data= pd.read_csv("Desktop/linear.csv")
13 x= data["Assay"]
14 -"versus"-
15 y= data["Gün"]
16
17 lineerregresyon=lr ["ModelSummary:ms"]
18
19 lineerregresyon=lr[S R-sq R-sq(adj) R-sq(pred)]
20 lineerregresyon.fit[0,193382 99,65% 99,48% 97,63%]
21
22 lineerregresyon.predict(Coefficients)
23
24 lineerregresyon=lr[Term Coef SE Coef T-Value P-Value VIF]
25 lineerregresyon=fit[Constant 99,160 0,226 438,53 0,000]
26 lineerregresyonresult=ms[Gün -0,2728 0,0114 -24,02 0,002 1,00]
27
28 x= Assay = 99,160
29 y= Gün = 0,2728
30
31 ShelfLifeEstimation= [LS, US]
32
33 Lower spec limit = 90 Upper spec limit = 110
34 Lineerregresyon.ms= content [Shelf life = time period in which you can be 95%
35 confident that at least 50% of response is within spec limits]
36
37 plt.ShelfLife(x,y)
38 plt.show(Shelf life = 31,6280)
```

Şekil 4. 31 PLA/BAC için Lineer Regresyon Denklemini terminal ekranı (Phyton İstatistik programı)

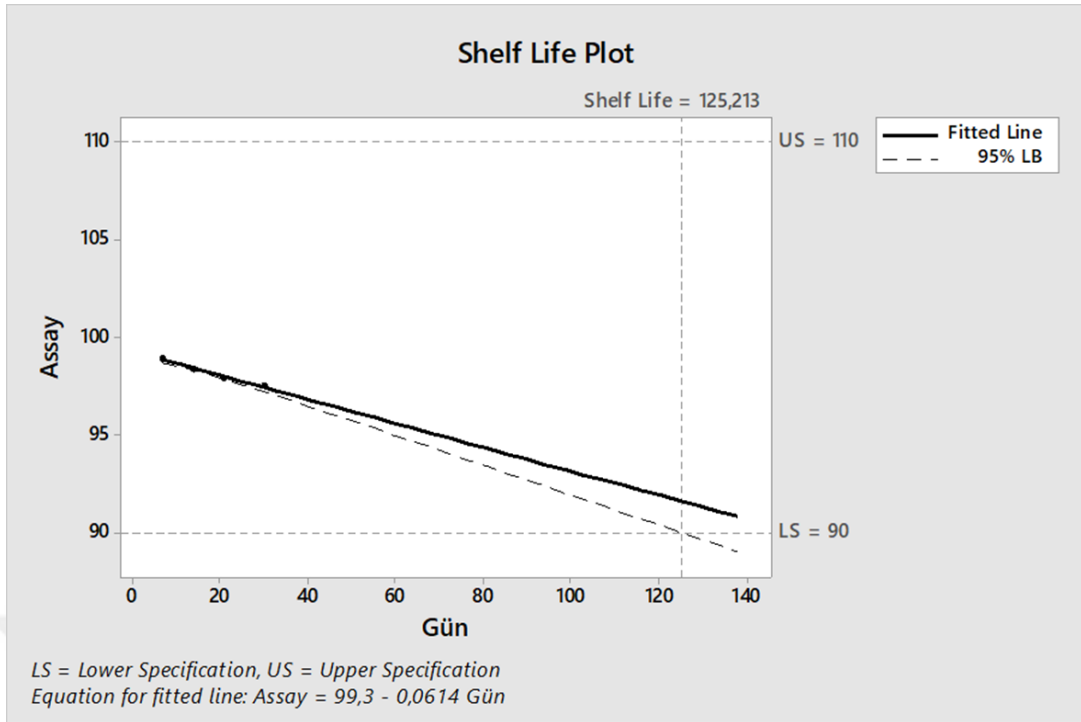


Şekil 4. 32 PLA/BAC stabiliite sonuçları; kalan madde ve raf ömrü süresi
(Python Algoritması üzerinde yapılmıştır; LS: Alt özellik sınırı, Shelf life: raf ömrü)

```
Spyder (Python 2.7)
File Edit Search Source Run Debug Consoles Projects Tools View Help
C:\Users\FatihCiftci
untitled0.py
Source Console Object

1  #. coding: utf-8 -*-
2  """ Stability Study:PLA/BAC/ZM """
3  Created on Thursday August 27 23.00.15 2020
4
5  @author: FatihCiftci
6  """BAC"""
7
8  import numpy as np
9  import pandas as pd
10 form sklearn.linear_model import LinearRegressionEquation as lr
11 import matplotlib.pyplot as plt
12 data= pd. Read_csv("Desktop/linear1.csv")
13 x= data["Assay"]
14 -"versus"-
15 y= data["Gün"]
16
17 lineerregresyon=lr ["ModelSummary:ms"]
18
19 lineerregresyon=lr[S R-sq R-sq(adj) R-sq(pred)]
20 lineerregresyon.fit[0,0864531 98,65% 97,98% 91,13%]
21
22 lineerregresyon.predict(Coefficients)
23
24 lineerregresyon=lr[Term Coef SE Coef T-Value P-Value VIF]
25 lineerregresyon=fit[Constant 99,280 0,101 982,10 0,000]
26 lineerregresyonresult=ms[Gün --0,06138 0,00508 -12,09 0,007 1,00]
27
28 x= Assay = 99,280
29 y= Gün = 0,06138
30
31 ShelfLifeEstimation= [LS, US]
32
33 Lower spec limit = 90 Upper spec limit = 110
34 Lineerregresyon.ms= content [Shelf life = time period in which you can be 95%
35 confident that at least 50% of response is within spec limits]
36
37 plt.ShelfLife(x,y)
38 plt.show(Shelf life = 125,213)
```

Şekil 4. 33 PLA/BAC/ZM için Lineer Regresyon Denklemi terminal ekranı (Phyton İstatistik programı)

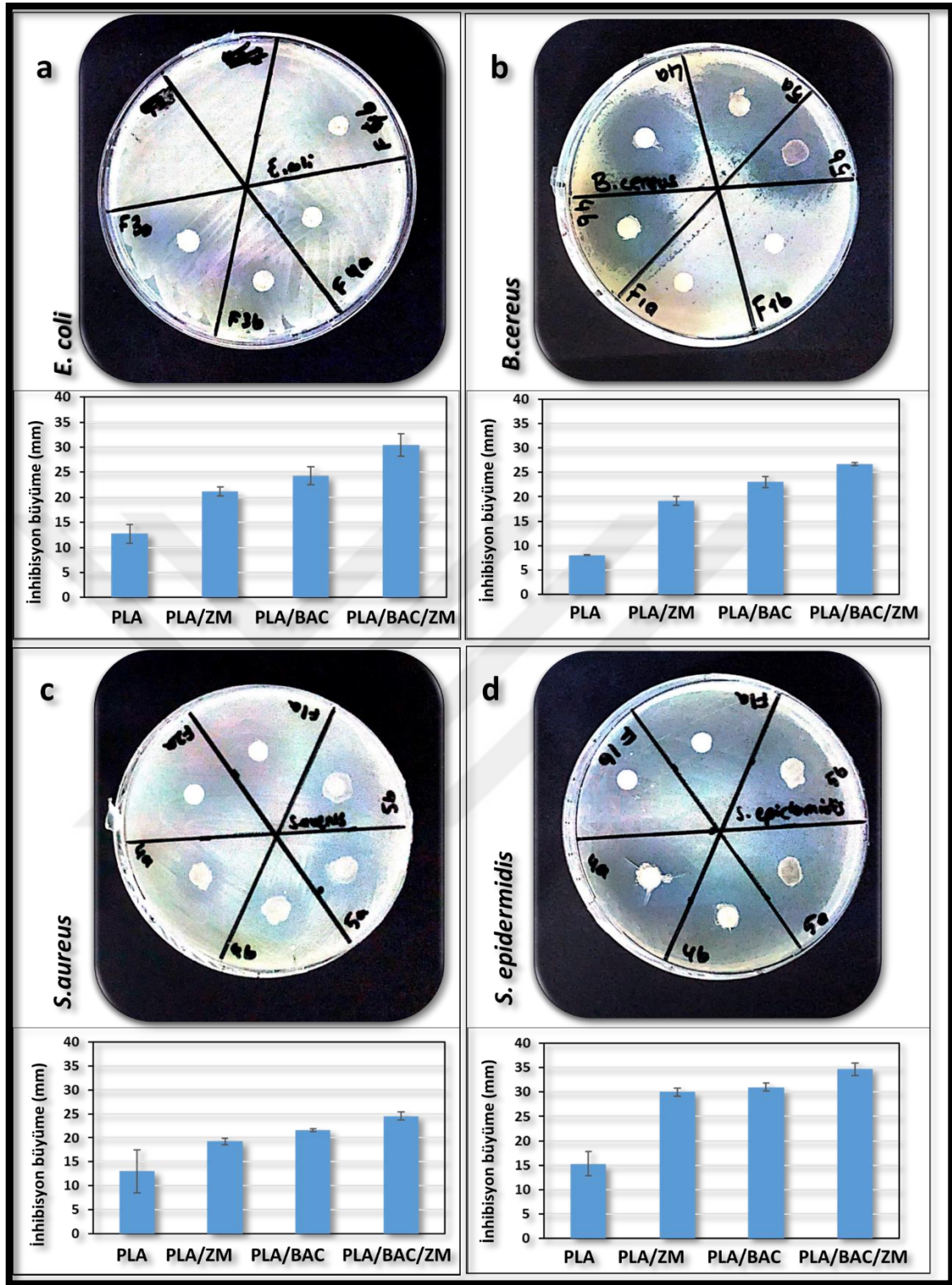


Şekil 4. 34 PLA/BAC/ZM stabiliite sonuçları; kalan madde ve raf ömrü süresi

4.3.4 *In vitro* Antimikrobiyal Bulgular

- **Antibakteriyel Bulgular**

PLA_3 çalışma grubu için yapılan antibakteriyel çalışmalarda PLA control grubu oluşturulup bunun üzerine diğer NL'ler kullanılan mikroorganizmalar üzerinde disk difüzyon yöntemiyle inhibisyon büyümeleri Şekil 4.35'te gösterilmiştir. En iyi ortalama büyüme kullanılan bakterilere (E.coli'ye, S. aureus'a, B. cereus'a, S. epidermidis) karşı PLA/BAC/ZM NL'i için gerçekleşmiştir.

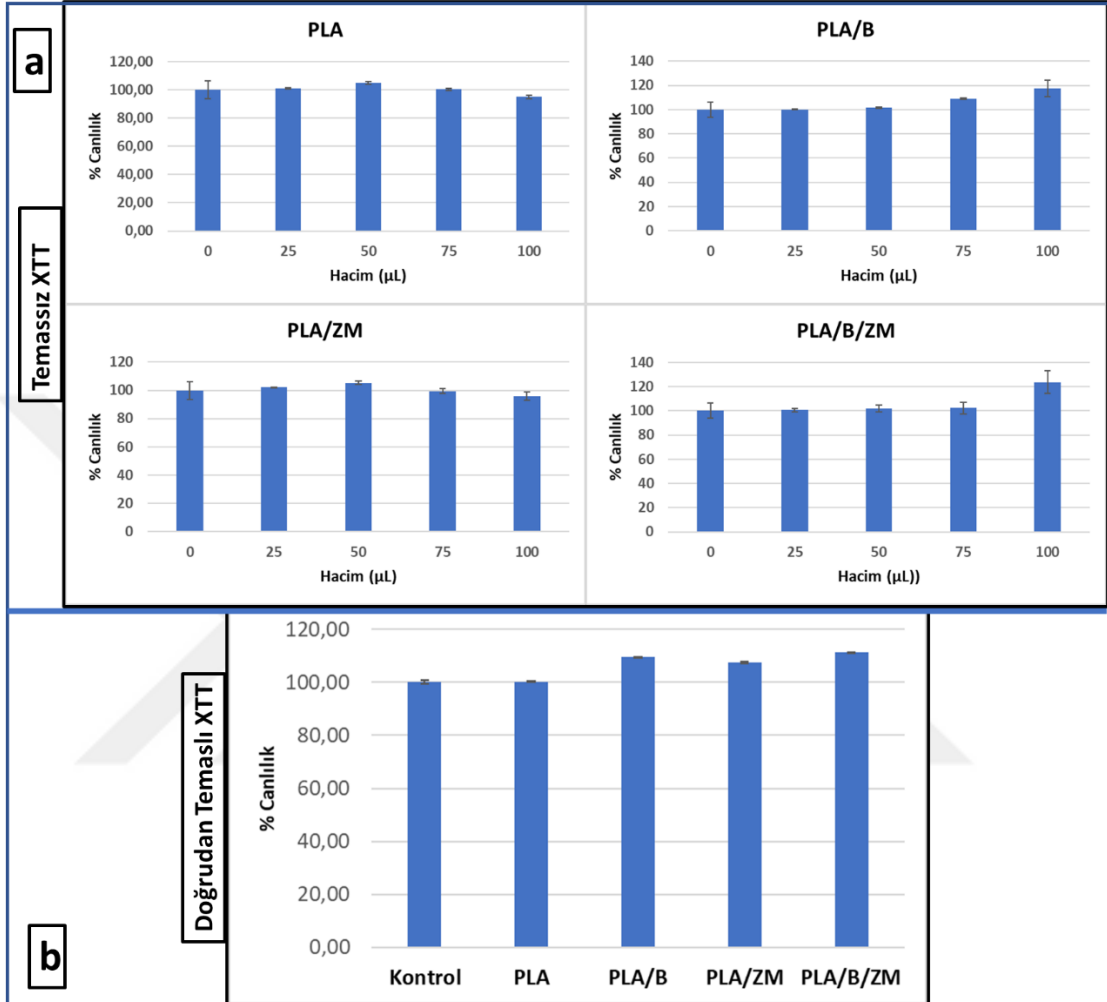


Şekil 4. 35 PLA_3 çalışma grubu antibakteriyel analizleri ve inhibisyon büyümeleri

4.3.5 *In vitro* Sitotoksosite Bulguları

- *Indirect - Direct XTT Bulguları*

Temaslı ve temassız XTT sitotoksosite testi 4.36'da verilmiştir.



Şekil 4. 36 PLA_3 NL a. temaslı ve b. temassız XTT sonuç görüntüleri

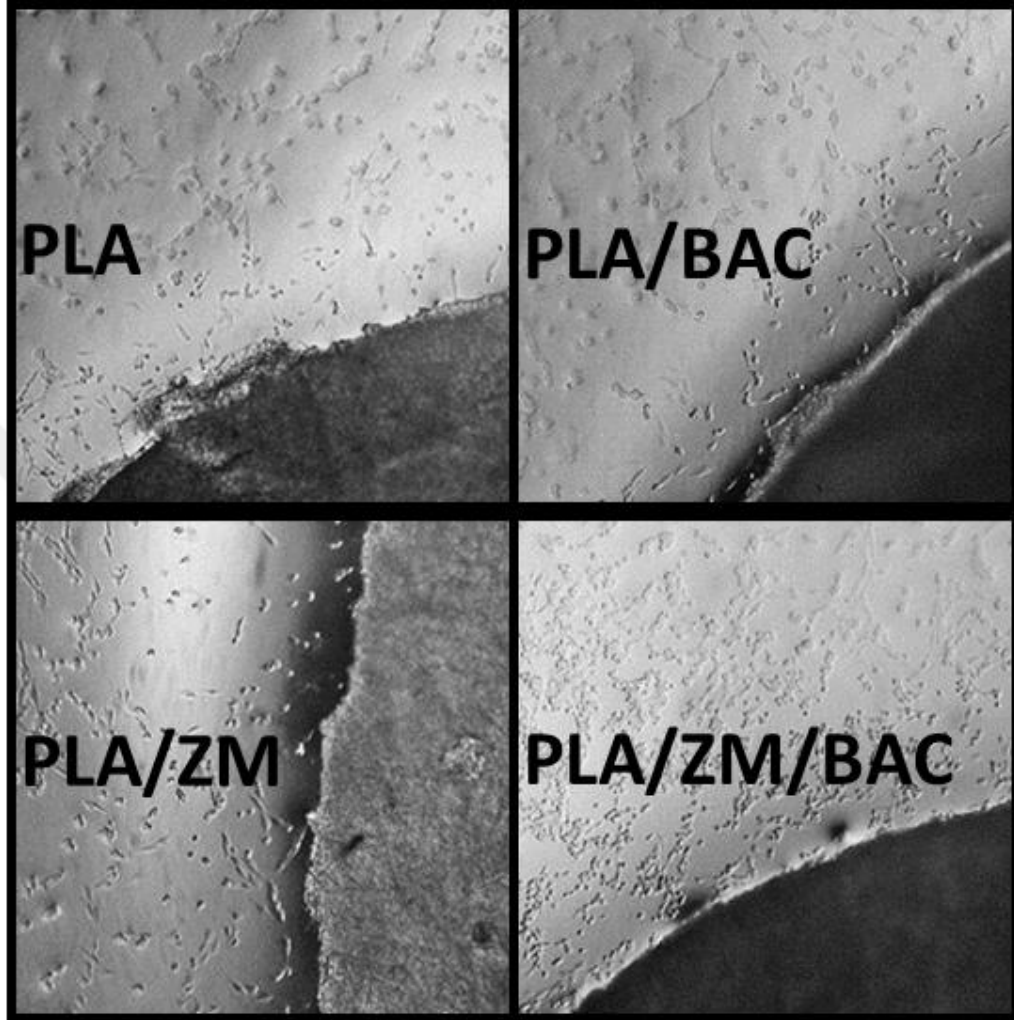
Temassız XTT çalışmasında en iyi hücre canlılık yüzdesi $123,71 \pm 9,27$ ile PLA/B/ZM olarak görülmüştür. Bu NL'den sonra en iyi yüzde sıralaması PLA/B; $117,53 \pm 6,60$, PLA/ZM; $95,93 \pm 2,87$ ve son olarak PLA; $94,95 \pm 1,24$ olarak görülmüştür.

Doğrudan temaslı XTT hücre testi çalışması görüntüsünde hücre canlılığın yüzdesi olarak en iyi PLA/B/ZM; $111,19 \pm 0,23$ olarak görülmüştür. Devamında sırasıyla; PLA/B; $109,45 \pm 0,15$, PLA/ZM; $107,41 \pm 0,30$, PLA; $100,20 \pm 0,18$ olarak görülmüştür.

- *Adezyon Görüntüleri*

Adezyon görüntüleme amacı malzemelerin hücre üzerindeki tutunmaları ve veya yapışmaları. Burada da görüldüğü gibi PLA/B/ZM NL numunesi hücrelere daha fazla

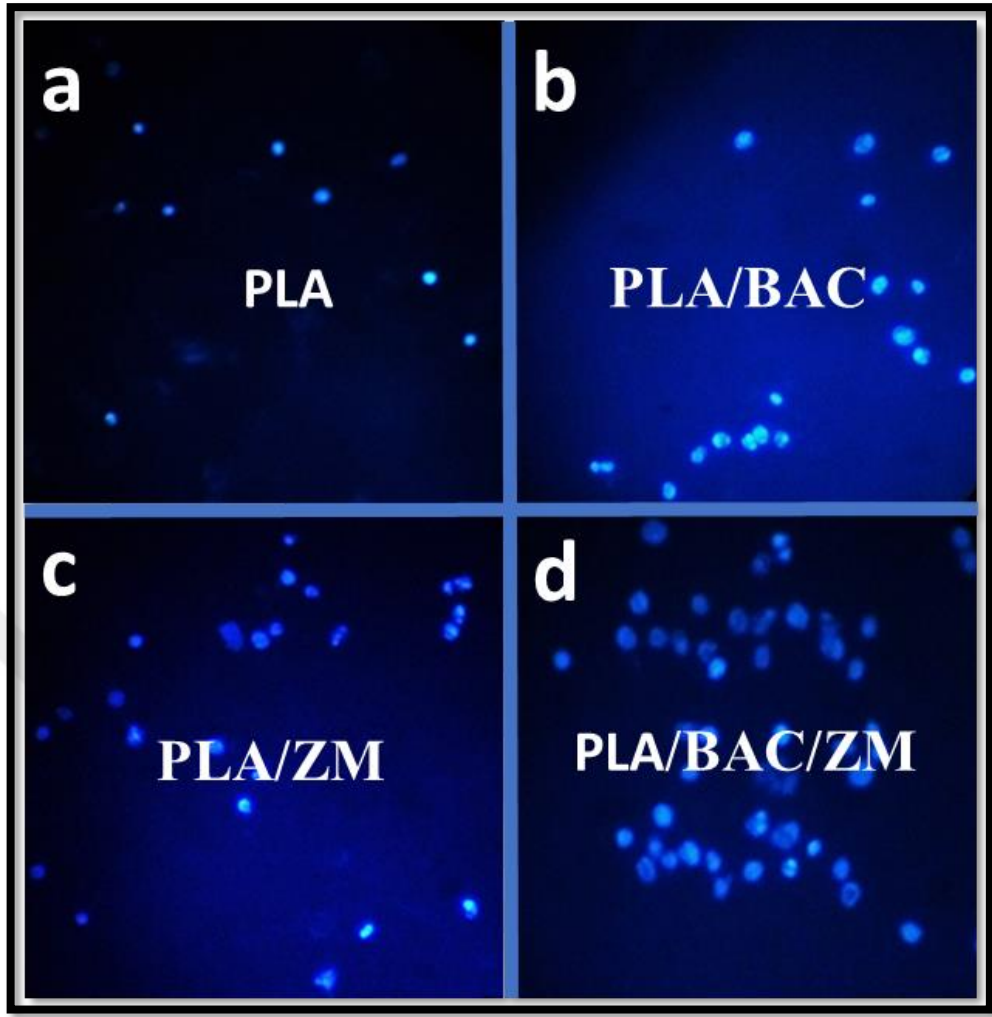
tutunmuş ve dağılım göstermiştir. PLA/B ve PLA/ZM birbirlerine yakın tutunma özellikleri göstermiştir.



Şekil 4. 37 PLA_3 adezyon görüntüleri

- **DAPI Görüntüleri**

DAPI boyası, temel kullanım amacı, floresan boyadır. DNA'ya link olarak, DNA'nın kırık bölgelerine de bağlanır. Adenin Timin gibi zengin bölgelere direk olarak interlöke olur. Çeşitli floresan çalışmalarda özellikle hücrelerdeki çekirdek bölgesinin boyanması için kullanılan bir çalışmadır. İnvert mikroskop çalışma sistemi ile çalışan bir sistem. Hücreler malzemelere yapıştıktan sonra, invert mikroskopla ters mercek görüntülemesiyle floresans boya ile hücrelerin çekirdekleri boyanarak görüntülenmiş ve hücrenin gerçekten malzemeye tutunup tutunmadığı gösterilmiştir.



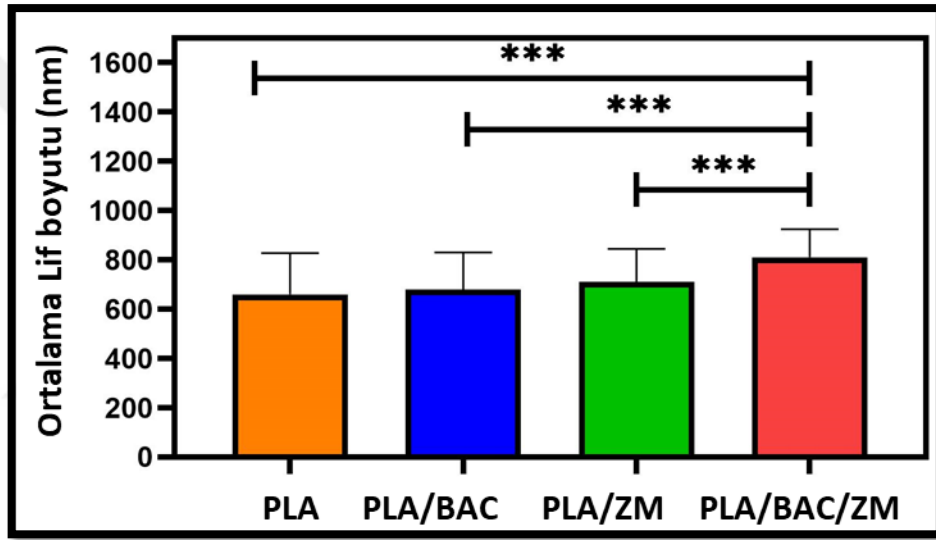
Şekil 4. 38 PLA_3 NL DAPI görüntüleri

4.3.6 PLA_3 Çalışma Grubu Tartışmaları

PLA konsantrasyonu bu çalışma grubunda %8 olarak hazırlanmıştır. Çözelti fiziksel özellikleri olan, viskozite, yoğunluk, yüzey gerilimi ve iletkenlik sabiti analizleri bu konsantrasyon üzerinden yapılmıştır. Viskozite artışıyla yüzey geriliminin arttığı görülen bu çalışma grubunda, NL üretim bandındaki numunelerinde çözelti özellikleriyle doğru orantılı olarak arttığı görülmüştür.

Huang ve ark.[620] çözelti viskozitesinin lif morfolojik yapısını etkilediği düşük viskozite değerine sahip liflerin daha ince yapıya sahip olduğunu, yüksek viskozite değerine sahip numunelerin de daha kalın lif morfolojisine sahip olduğunu incelemiştir. Bu durumu destekler nitelikte çalışmaya sahip olan Subbiah ve ark. [143] viskozite ve yüzey gerilimindeki artış, çözeltinin iğneden çıkışını ve taylor konisindeki değişimleri inceleyerek göstermiştir. Lyons ve ark. [621] yüksek

viskoziteye sahip çözeltilerin elektro eğirme işlemi sırasında yüksek elektrostatik kuvvet uygulanmasına sebep olacağını göstermiştir. Nitekim bu çalışma kapsamında bütün NL'e uygulanan voltaj değeri 25 olarak belirlenmiştir. Moghe ve ark. [229] voltaj değerinin viskozite değeri ile doğru orantılı olduğunu, yüksek voltaj değerinin lif yapısında boncuklanma oluşturacağını göstermiştir. Nitekim bu çalışma kapsamında PLA/BAC lif morfolojik yapısı incelendiğinde üretilen liflerin bazı bölgelerinde boncuksu yapı olduğu görülmüştür. Bu duruma son olarak Zong ve ark. [622] ve Demir ve ark.[63] yapmış olduğu çalışmada çözelti akışındaki vizkoelastik kuvvetin artışı polimerik lif oluşumunda liflerin gerilimi için uygulanacak elektriksel kuvvetin de artışına sebep olacağını açıklamışlardır.



Şekil 4. 39 PLA_3 NL ortalama lif boyutları karşılaştırması

% 8 olarak PLA konstantrasyonunun hazır PLA_3 grubuna ait NL'ler için morfolojik değişimler SEM ile incelenmiştir. PLA, PLA/BAC, PLA/ZM ve PLA/BAC/ZM NL'leri için görüntüleme yapılmıştır. Özellikle ZM içeren NL yapılarıyla başlayan lif boyutunda genişleme mevcuttur. Üçlü kombinasyonla gerçekleşen elektro eğirme sonrası lif oluşumu, lif yapısındaki büyümenin tek başına gerçekleşebileceğini veya tümünün birlikte bu sonuca götüreceğini Peppas [623] çalışmalarında göstermiştir. PLA/BAC/ZM lif boyutunun büyük olma sebebi ZM esansiyel yağın antiajan olarak timo ve karvakrol gibi antiajan bileşenlerine sahip olması bunun yanında kullanılan bir diğer etken malzeme olan BAC'ın da peptit içerikli bir antiboytik yani antiajan olduğundan lif iç çapında genişlemeye ve büyümeye sebep olmuştur. Ayrıca ZM yapısı itibariyle esansiyel yağ olup vizkozite özelliği çözelti hazırlanması sonrası

incelenip karşılaştırıldığında PLA'ya oranla %100 PLA/BAC'a oranla %2 olarak artış göstermiştir. Yüzey gerilimlerini hemen hemen birbiriyle aynı olan dört numunenin gittikçe artan gerilimi viskozite ile doğru orantılı gerçekleşmiştir.

Salım kinetiği sistemleri, etken madde ile kullanılan biyomalzeme sisteminin yapısal ve işlevsel ilişkisini anlamak, belirli bir uygulama için bir dağıtım sisteminin başarılı bir şekilde tasarlanmasının anahtarıdır. Dahası, katkılı polimerik matrisler geliştirmek, çözünen madde taşıma mekanizmalarını aydınlatmak için daha sağlam matematiksel modeller gerektirir. Bu doktora çalışması PLA_3 çalışma grubu içerisinde ilaç salım kinetiği olarak seçilen biyobozunur PLA polimerlerin yapı-işlev ilişkisine matematiksel modelleme ile farklı bir bakış sağlamayı amaçlanmıştır.

Genel olarak, ilaç sisteminin difüzyon ile biyoparçalanabilirliği polimerik matris şişmesi ve malzeme bozunmasının, ilaç içeren polimerik matrislerden çözünen maddenin taşınması için ana itici güçler olduğu Gokhale [598] ileri sürülmüştür.

Matematiksel modellerin kullanılmasıyla, istenen ilaç salım profilini optimize etmek için gereken NL'ler PLA/BAC ve PLA/BAC/ZM olarak belirlenmiştir. Salım modelini tanımlamak için birkaç matematiksel model üzerinde çalışılmıştır. Bunlar; Zero order, First Order, Higuchi, Hixon, Korsemeyer-Peppas salım kinetik modelleridir. Bu modellerden yola çıkarak salım doğrusal eğri profili (Fickian) oluşturulmuştur. Bu profile göre oluşturulan salım kinetik difüzyon profili Zero Order olarak belirlenmiştir. Salım profilini belirledikten sonra etken maddenin 30 gün sonunda % olarak kalan kümülatif madde miktarı istatistiksel olarak Python'da analiz edilmiştir. Fu ve ark. [597] kullanılan PLA polimer malzemesinin biyozunur olduğunu ve bu yapıya katkı olarak eklenecek ilaç etken malzemelerinin salınımı için Franz difüzyon matematiksel modeli gerçekleştirilmesi gerektiğini söylemiştir. Bao ve ark. [624] merhem formülasyonu geliştirmiş merhem viskozitesinin yüksek olması ve emilim temas sürelerinin uzun olabileceğini göz önüne larak in vitro salım kinetiği modellemesini Franz difüzyon ile gerçekleştirmiştir. PLA_ çalışma grubunda yapmış olduğumuz NL için özellikle PLA/BAC/ZM NL'I viskozitesinin yüksek (~300) olması ve yüzey geriliminin (~30) buna paralel büyüklükte olması üretilen NL içindeki emilimin fazla olmasına ve Franz difüzyon ile salım profilinde kümülatif % etken madde kalım miktarını etkileyeceği görülmüştür. Bu doktora çalışması içinde PLA_3 çalışma grubuna ait kullanılan polimer malzeme ve etken malzemeler bu

çalışma prensibine uymuştur. Salamanca ve ark.[625] yapmış olduğu Franz difüzyon çalışmasında selüloz membran pH. 7,4 ortamında kullanılmış doğrusal Fickian denkleminde R^2 değerini 0,929 bularak çalışma profilini Zero order difüzyonuna göre belirlemiştir. Gokhale [598] salım kinetiği çalışma modelini Korsemeyer-Peppas'a göre R^2 'i belirlemiş Fickian yasası gereği 0,996 olarak bulmuştur. Baert ve ark. [626] jelleri hem deri hem de yapay deri ortamında difüze ederek Franz difüzyon model ile salım kinetiği oluşturmuş, 24 saat ölçümü sonrasında R^2 değerini 0,926 bularak Korsemeyere göre salım profilini belirlemiştir.

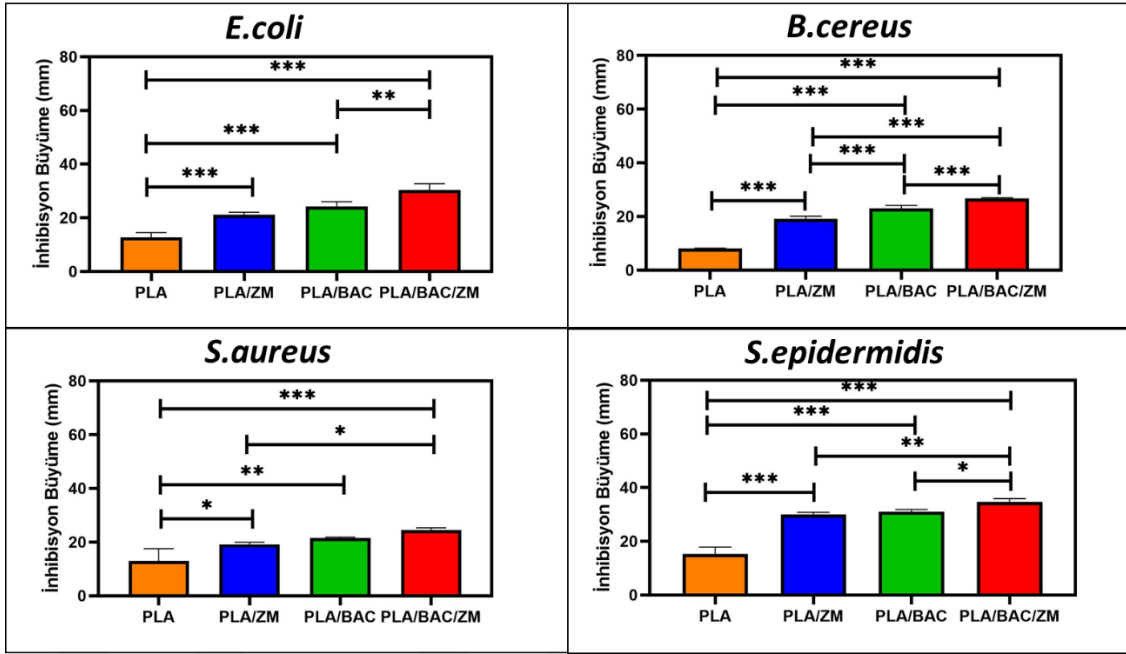
Stabilite spesifikasyon çalışması PLA/BAC içeriği sonucunda; Alt özellik sınırı = 90 Üst özellik sınırı = 110, Raf ömrü = yanıtın en az %50'sinden %95 emin olabileceğimiz zaman aralığı spesifikasyon sınırları dahilinde Raf ömrü = 31,6280 olarak belirlenmiştir. PLA/BAC/ZM çalışması sonucunda; Alt özellik sınırı = 90 Üst özellik sınırı = 110. Raf ömrü = yanıtın en az %50'sinden %95 emin olabileceğiniz zaman aralığı spesifikasyon sınırları dahilinde Raf ömrü = 125,213 olarak belirlenmiştir. Genel sonuç olarak bu PLA_3 çalışma grubu için salım kinetiği NL madde miktarı raf ömrü istatistiği PLA/BAC için 31 gün, PLA/BAC/ZM için 125 gün raf ömrü olduğunu bu çalışmalardan spesifikasyon aralığı (%90-110) kapsamında en iyi çalışma numunesi olarak PLA/BAC/ZM seçilmesi gerektiğini bizlere göstermiştir.

İzokratik analiz sisteminin kullanıldığı HPLC yönteminde ve Basitrasin A'nın en az % 40'ının bulunduğu görülmüştür, BAC, A, B1, B2 ve B3 toplamının % 70'inden fazla olmadığı, erken ayrıştırılan peptitlerin % 20'sinden vebozunma ürünü BAC F için % 6.0'dan fazla olmayan formlarının ticari tedavi olarak kullanılabilirliği literatürle uyumlu görülmüştür.

GC-MS sonuçları ZM esansiyel yağı üzerinden yapılmıştır. ZM yağı; timol, karvakrol, zatrinal içeren fenolik bileşikler br kekik benzeri bitki türüdür[627]. Z.M'nin biyolojik etkileri esas olarak fenolik özelliği ile ilişkilidir. ZM bileşikleri; özellikle timol ve carvacrol (Şekil 4.23) [628], biyolojik ve farmakolojik olarak mantar önleyici Dehkordi ve ark.[507], anti oksidatif stres Sharififar ve ark.[629], Kavoosi ve ark.[630], antimikrobiyal Alizadeh ve ark.[627], Mahmoudabadi ve ark.[631], antiinflamatuvar Sajed ve ark.[632](10), immünostimulan Shokri ve ark.[633], ağrı kesici Jaffary ve ark.[634], Aghamohammadi ve ark.[635]özelliklere sahip olduğu

Çalışmalarda da görülmüştür. Timol bileşeni, mikrobiyal hücre zarları üzerinde etkili olduğu, hem üretilen lif morfolojisi yapısında hem hücresel salım kinetiği modelinde etken madde olarak ilaçla oluşturmuşt olduğu kombinasyonu hem de antimikrobiyal çalışmalarda etkisini göstermiştir. Bu alışmalar göz önüne alındığında ZM komponentleri içindeki karvakrol ve timol yapısının ekstrasyon edilmiş bitkinin GC-MS sonuçlarında ortaya çıkması bu çalışmanın antioksidan yara iyileştirici biyomedikal uygulama olarak kullanılabilir yönünde olumlu sonuç oluşturmuştur.

B. subtilis tarafından sentezlenen BAC peptid antibiyotiklerden olup bakterilerde peptidoglikan sentezini engeller. Bakteriyel hücre duvarı peptidoglikanın polisakkarid zincirlerinin kros bağlanması rolü olan transpeptidasyon enzimlerini inhibe ederek hücre duvarı sentezini önlemektedir. Gram pozitif bakterilerde daha etkili olan BAC, hücre duvarı için prekürsör taşıyan lipidlerin fonksiyonunu da bozarak inhibe etmektedir [636][637]. ZM yağı ise hem gram pozitif hem gram negatif bakterilere karşı etkili olduğu daha önceki çalışmalarda belirtilmiştir [505], [507], [638]–[640]. Çalışmalarımızda kullandığımız *E.coli* bakterisi gram negatif, *S.aureus*, *S.epidermidis* ve *B.cereus* bakterileri ise gram pozitif grupta bulunmaktadır. Kontrol grubu olan PLA'nın dört bakteri türüne karşı antibakteriyel özelliği bulunmaktadır. Fakat sonuçlarda da grldğu gibi PLA, BAC ve ZM yağı kombinasyonu, kontrol grubuna göre oldukça etkili antibakteriyel özelliği göstermiştir. Yapılan çalışmalarda elde ettiğimiz sonuçlar, yanık tedavisine yönelik PLA, BAC ve ZM yağı kombinasyonlu ürünü geliştirmeye teştik edici olmuştur.



Şekil 4. 40 PLA_3 NL antibakteriyel mikroorganizma inhibisyon zonlarının karşılaştırılması

Temaslı ve temassız XTT hücre çalışmaları birbiriyle karşılaştırıldığında hücre canlılık yüzdesi en iyi olan çalışma grubu içeriği olan NL; PLA/BAC/ZM olduğu görülmüştür. Temaslı XTT testi; kullanılan liflerin hücreler arasındaki sitotoksosite analizleri tespit edilmiştir. Temassız dolaylı XTT teste ise; malzemeler hücre besiyeri üzerlerinde bekletilerek ortama saldıği toksik etki olup olmadığı görülmeye çalışılmıştır Bu kombinasyonu doğuran sonuçlardan olan PLA/BAC ve PLA/ZM çalışmalarını da karşılaştırdığımızda büyüme yüzdeleri birbirlerine yakın ve sitotoksosite özellik gösteremedikleri görülmektedir. Yani canlı üzerindeki toksik etki oranları %100'ün üzerinde görülmüş olup biyomedikal yara örtüsü uygulamalarda tek başına bu çalışmayla bile desteklenebilir görülmüştür.

Adezyon testinde sitotoksosite ile paralel analiz sonuçları içermiştir. Kullanılan adesif hücrelerin liflere tutunması incelenmiştir. Yani malzeme üzerinde konformasyon bozukluğu yaşamadan büyüme olup olmadığı incelenmiştir. Eğer ortamda toksik yapı veya komponent varsa hücre büyümesi olmadığı incelenmiştir. Bu NL malzemelerinde hücre adezyon görüntülerinde malzeme tutunmaları malzeme yapışmaları görülmüştür. Burada hücre XTT testlerini destekleyen PLA/BAC/ZM NL çalışması olmuştur. En fazla tutunma özelliği ile ön plana çıkmıştır.

DAPI boyası, temel kullanım amacı floresan boyaması yaparak DNA'ya link/bağlanma gerçekleştiriyor. Adenin ve Timin gibi zengin içerikli yapılara bağlanma gerçekleştirip gerçekleştirmediği bunun yanında hücre çekirdeğine Ivtır mikroskop(ters mikroskop, objektif altta, ışık kaynağı yukarda) yardımıyla tutunmaların büyümelerin gerçekleşip gerçekleşmediği görülmüştür.

DAPI görüntülerinde PLA_3 çalışma grubu için istenen sonuçlar elde edilmiş görülmüştür. Hücre çekirdeği üzerinde malzemenin hücresel tutunmayı görüntülemek amacıyla yapılan bu boyama çalışmasında en iyi hücresel tutunmayı PLA/BAC/ZM NL'inde gözükümüştür. PLA/ZM ve PLA/BAC NL'leri için birebir aynı sonuçlar mevcuttur. Malzemenin hücresel tutunması gayet başarılı sonuçlanmıştır.



SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1 PLA_1 Çalışma Grubu Sonuç ve Öneriler

- Farklı konsantrasyonlara sahip PLA çözeltilerinde konsantrasyon miktarı arttıkça viskozite değerleri artış göstermiştir..
- Her bir konsantrasyon değeri için boncuksuz homojen fiber dağılımı elde edilirken, 5 ve 8'lik konsantrasyonlarda NL boyutu $303,01 \pm 69,74$ ve $405,24 \pm 125,57$ olarak ölçülmüştür.
- 5 ve 8'lik PLA konsantrasyonun ilaç katkılanması ile NL boyutunu %4 ve %7 oranlarında azaltmıştır.
- Elektro eğirme işleminde Akış hızı ve voltaj değişimi gerçekleştirilmişken en iyi elektro eğirme parametreleri akış hızı 0.5 mL/s voltaj 10 kV olarak belirlenmiştir.
- İlaç katkılı %8'lik PLA konsantrasyonu $375,57 \pm 78,37$ lif boyutunda antibakteriyel analizi gram – *E.coli* bakterisine karşı en iyi etkiyi göstermiştir.
- Elektro eğirme işlemindeki parametreler; uygulanan voltaj, akış hızı olarak belirlenmiştir.
- Antibakteriyel analizlerde PLA hiçbir mikroorganizma üzerinde büyüme gerçekleştirilmemiş, PLA/ilaç NL ise gram – ve gram + mikroorganizması olan *E.coli* ve *S.thypi* üzerinde inhibisyon değerleri görülmüştür.
- ❖ NL için mekanik testler uygulanabilir
- ❖ Kullanılan etken ilaç katkısı için salım kinetiği profili oluşturulabilir.
- ❖ Salım profili belirlenmiş NL için hücre testi gerçekleştirilebilir.

5.2 PLA_2 Çalışma Grubu Sonuç ve Öneriler

- Hummers metodu kullanılarak GO üretimi gerçekleştirilerek PLA polimerine katkılanmıştır.
- GO FT-IR sonuçlarında -CH stretching, C=O stretching, C-O stretching ve C-H bending bağları tespit edilmiştir.

- GO XRD sonuçlarında Grafit için $2\theta=26,4636^\circ$ ve GO için $2\theta=10,5524^\circ$ değerlerinde görülmektedir. Grafit yapısında var olan $26,4636^\circ$ pikinin oksidasyon sonrasında GO'da görülmemesi, bunun yerine $10,5524^\circ$ pikinin oluşması literatürdeki sonuçlarla uyuşmakta ve GO yapının düzgün olarak elde edildiğini göstermiştir
- GO Raman spektrumunda beklendiği gibi D piki 1330 cm^{-1} ve G piki de $1601\text{ (cm}^{-1})$ de görülmektedir. D pikinin şiddeti (ID) düzensiz yapıların derecesini, G pikinin şiddeti (IG) düzenli yapıların şiddet değerini vermektedir. Literatürde belirtildiği gibi karbon esaslı materyallerin ID/IG oranı 0,95-1,22 aralığında olması beklenmektedir. Bu çalışmada ID/IG oranı 1,12 olarak bulunmuş ve GO varlığı doğrulanmıştır.
- GO PLA'ya eklenmesiyle (PLA-G) çözelti iletkenlik artış gösterirken, PLA-G1 (GO-Se) Se katkısıyla iletkenlik düşmüştür.
- PLA-G'ye ilaç katkılanması (PLA-G2) ortalama nano lif boyutunu düşürürken PLA-GO-CLA-Se (PLA-G3) ortalama lif boyutu $642 \pm 173,79\text{ nm}$ olarak ölçülmüştür.
- Salım kinetiği testinde kümülatif % CLA salım değeri 8. saat sonunda %74,3 olarak ölçülmüş, 24. saat sonunda % 80,4 olarak tespit edilmiştir.
- Antibakteriyel testlerde PLA-G3 ve PLA-G2 nano liflerinin bütün mikroorganizmalar üzerinde inhibisyon büyümesi olarak etkin artış gösterdiği gözlenmiştir.
- Hücre XTT sitotoksosite testlerin her bir malzeme için toksik etki gözlenmemiştir. Hücre canlılığı olarak en iyi % büyüme PLA-G (GO) olduğu gözlenirken, GO kullanım amacı olan PLA'nın hidrofobik yapısını hidofilik olarak hücresel tutunmalarda ortaya koymuştur.
- CLA için yapılan salım kinetiği çalışmalarında PLA-G3 NL'I kümülatif ilaç % olarak % 80,4 olarak salım yaparak PLA_G2'nin %74,2'sinden daha iyi bir sonuç elde ettiğimizi göstermiştir. Bu sonuçla PLA-G3 içindeki etken CLA en fazla yüzdesel olarak salınım yaptığı görülmüştür.
- Antibakteri testlerinde mikroorganizmalar üzerinde en iyi inhibisyonu gerçekleştiren NL'ler PLA-G2 ve PLA-G3 olarak görülmüştür. Özellikle gram – olan *E.coli* ve gram + olan *S.epidermidis* mikroorganizması üzerindeki büyüme değerleri bu çalışmanın amacına hizmet etmiştir. *E.coli*

mikroorganizması üzerinde; PLA-G2; 22 mm, PLA-G3; 24 mm inhibisyon, *S.epidermidis* mikroorganizması üzerinde; PLA-G2; 32 mm, PLA-G3; 30 mm inhibisyon olarak ölçülmüştür.

- Hücre sisotoksisite testlerinde hiçbir NL numunesi toksik etki göstermemiştir. Canlılık % karşılaştırıldığında PLA; 80, PLA-G; 83, PLA-G1; 79, PLA-G2; 75, PLA-G3; 70 olarak görülmüştür.
- Adezyon testinde, PLA-G NL malzemesinin hücrelere tutunması daha fazla olduğu görüntülenmiştir. GO içerikli PLA-G lifi, PLA polimerinin hidrofobik yapısını hidrofilliğe çevirdiği diğer bir deyişle PLA polimerinin malzeme tutunmasını arttırdığı görülmüştür.
- ❖ In vitro hayvan testleri yapılabilir.

5.3 PLA_3 Çalışma Grubu Sonuç ve Öneriler

- Rotary ile ZM esansiyel yağ elde edilip, GC-MS kullanılarak ZM antioksidan kompenetlerinin ana bileşen olarak karvakrol %50'sini oluştururken içerik alanı olarak %48,06 karvakrol, %25,47 timol olarak görülmüştür. ZM, 20 bileşenle toplamda % 99,87 antioksidan oranına sahip olduğu analiz edilmiştir.
- %8 PLA'ya elde edilen antioksidan ZM ve ilaç (BAC) malzemeleri eklenmiştir.
- PLA vizkositesi 123,0 iken, ZM ve BAC katkılarıyla beraber artış göstermiştir.
- PLA'nın başlangıç iletkenliği 2,6 $\mu\text{S}/\text{cm}$ olarak ölçülmüşken, PLA/BAC/ZM kombinasyonunda bu durum %50 oranında artış göstermiştir.
- PLA ortalama nano lif boyutu $660,21 \pm 166,79$ ölçülürken PLA/BAC/ZM nano lif ortalama boyutu $810,25 \pm 114,16$ olarak ölçülmüştür
- ZM/BAC nano lif yapısının Franz difüzyon matematiksel salım kinetik modeli Zero order olarak ortaya çıkarılmış, raf ömrü için antibakteriyel koruma etkisi yapılmadığı için Pyhton üzerinden analiz edilerek raf ömrünün 125 gün olarak tespit edilmiştir.
- Antibakteriyel testlerde PLA/BAC/ZM NL bütün mikroorganizmalar üzerinde en iyi inhibisyon büyümeyi göstermiştir.
- Hücre XTT sitotoksisite testlerinde, adezyon ve DAPI sonuçlarında kullanılan PLA/BAC/ZM nano lifi hücrelere çok iyi derecede tutunduğu gözlenmiştir.

- ❖ PLA_3 çalışma grubuna PLA_2'den GO ve/veya Se katkısı çalışması alınıp malzeme kombinasyonu değiştirilebilir.
- ❖ PLA_3 çalışma grubu için *In vivo* hayvan testi yapılabilir
- ❖ PLA_3 çalışması için 3 farklı yayın çıktısı olabilir.
 - PLA/BAC yara örtüsü uygulamaları
 - PLA/BAC/ZM yara örtüsü uygulamaları
 - PLA/BAC/ZM Franz difüzyon salım kinetiği modellemesi



- [1] D. Garlotta, "A literature review of poly(lactic acid)," *J. Polym. Environ.*, 2001, doi: 10.1023/A:1020200822435.
- [2] C. H. Lee *et al.*, "Nanofiber alignment and direction of mechanical strain affect the ECM production of human ACL fibroblast," *Biomaterials*, 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.04.037.
- [3] H. Fong, I. Chun, and D. H. Reneker, "Beaded nanofibers formed during electrospinning," 1999, doi: 10.1016/S0032-3861(99)00068-3.
- [4] H. L. Schreuder-Gibson, P. Gibson, and P. Tsai, "Cooperative Charging Effects of Fibers from Electrospinning of Electrically Dissimilar Polymers," *Int. Nonwovens J.*, 2004, doi: 10.1177/1558925004001300406.
- [5] S. Y. Gu and J. Ren, "Process optimization and empirical modeling for electrospun poly(D,L-lactide) fibers using response surface methodology," *Macromol. Mater. Eng.*, 2005, doi: 10.1002/mame.200500215.
- [6] Z. Jun, H. Hou, A. Schaper, J. H. Wendorff, and A. Greiner, "Poly-L-lactide nanofibers by electrospinning - Influence of solution viscosity and electrical conductivity on fiber diameter and fiber morphology," *E-Polymers*, 2003, doi: 10.1515/epoly.2003.3.1.102.
- [7] S. N. Patra, A. J. Easteal, and D. Bhattacharyya, "Parametric study of manufacturing poly(lactic) acid nanofibrous mat by electrospinning," *J. Mater. Sci.*, 2009, doi: 10.1007/s10853-008-3050-y.
- [8] F. Yang, R. Murugan, S. Wang, and S. Ramakrishna, "Electrospinning of nano/micro scale poly(l-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering," *Biomaterials*, 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.06.051.
- [9] L. Xiao, B. Wang, G. Yang, and M. Gauthier, "Poly(Lactic Acid)-Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications," in *Biomedical*

Science, Engineering and Technology, 2012.

- [10] K. H. Lee, H. Y. Kim, M. S. Khil, Y. M. Ra, and D. R. Lee, "Characterization of nano-structured poly(ϵ -caprolactone) nonwoven mats via electrospinning," *Polymer (Guildf)*, 2003, doi: 10.1016/S0032-3861(02)00820-0.
- [11] F. Yang, J. G. C. Wolke, and J. A. Jansen, "Biomimetic calcium phosphate coating on electrospun poly(ϵ -caprolactone) scaffolds for bone tissue engineering," *Chem. Eng. J.*, 2008, doi: 10.1016/j.cej.2007.07.076.
- [12] E. Luong-Van, L. Grøndahl, K. N. Chua, K. W. Leong, V. Nurcombe, and S. M. Cool, "Controlled release of heparin from poly(ϵ -caprolactone) electrospun fibers," *Biomaterials*, 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.10.028.
- [13] K. T. Shalumon, K. H. Anulekha, K. P. Chennazhi, H. Tamura, S. V. Nair, and R. Jayakumar, "Fabrication of chitosan/poly(caprolactone) nanofibrous scaffold for bone and skin tissue engineering," *Int. J. Biol. Macromol.*, 2011, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2011.01.020.
- [14] C. Erisken, D. M. Kalyon, and H. Wang, "Functionally graded electrospun polycaprolactone and β -tricalcium phosphate nanocomposites for tissue engineering applications," *Biomaterials*, 2008, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.06.022.
- [15] D. D. Wright, E. P. Lautenschlager, and J. L. Gilbert, "Bending and fracture toughness of woven self-reinforced composite poly(methyl methacrylate)," 1996, doi: 10.1002/(sici)1097-4636(19970915)36:4<441::aid-jbm2>3.3.co;2-0.
- [16] D. D. Wright-Charlesworth, E. P. Lautenschlager, and J. L. Gilbert, "Hot compaction of poly(methyl methacrylate) composites based on fiber shrinkage results," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2005, doi: 10.1007/s10856-005-4431-2.
- [17] H. Wang *et al.*, "Electrospun poly(methyl methacrylate) nanofibers and microparticles," *J. Mater. Sci.*, 2010, doi: 10.1007/s10853-009-4035-1.
- [18] B. Gupta, N. Revagade, and J. Hilborn, "Poly(lactic acid) fiber: An overview," *Progress in Polymer Science (Oxford)*. 2007, doi:

10.1016/j.progpolymsci.2007.01.005.

- [19] X. Zong, K. Kim, D. Fang, S. Ran, B. S. Hsiao, and B. Chu, "Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes," *Polymer (Guildf)*., 2002, doi: 10.1016/S0032-3861(02)00275-6.
- [20] J. H. Yu, S. V. Fridrikh, and G. C. Rutledge, "The role of elasticity in the formation of electrospun fibers," *Polymer (Guildf)*., 2006, doi: 10.1016/j.polymer.2006.04.050.
- [21] T. J. Sill and H. A. von Recum, "Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering," *Biomaterials*. 2008, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.01.011.
- [22] *Electrospun Biomaterials and Related Technologies*. 2017.
- [23] H. M. Owens and A. K. Dash, "Ceftriaxone Sodium: Comprehensive Profile," *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*. 2003, doi: 10.1016/S0099-5428(03)30002-4.
- [24] "Ceftriaxone sodium," *Drugs of Today*, 1983, doi: 10.37573/9781585285402.054.
- [25] A. M. Stevenson, "Ceftriaxone sodium," *MCN Am. J. Matern. Child Nurs.*, 1998, doi: 10.1097/00005721-199809000-00011.
- [26] S. Ramteke, R. B. U. Maheshwari, and N. K. Jain, "Clarithromycin based oral sustained release nanoparticulate drug delivery system," *Indian J. Pharm. Sci.*, 2006, doi: 10.4103/0250-474x.27822.
- [27] B. Howard, "Bacitracin," in *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, 2007.
- [28] E. Rietkötter, D. Hoyer, and T. Mascher, "Bacitracin sensing in *Bacillus subtilis*," *Mol. Microbiol.*, 2008, doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06194.x.
- [29] K. S. Topp and B. S. Boyd, "Structure and biomechanics of peripheral nerves: Nerve responses to physical stresses and implications for physical therapist practice," *Physical Therapy*. 2006, doi: 10.1093/ptj/86.1.92.
- [30] P. Cras, "Glial neurobiology," *Spinal Cord*, 2008, doi: 10.1038/sj.sc.3102138.

- [31] D. You, K. Li, W. Guo, G. Zhao, and C. Fu, "Poly (lactic-co-glycolic acid)/graphene oxide composites combined with electrical stimulation in wound healing: Preparation and characterization," *Int. J. Nanomedicine*, 2019, doi: 10.2147/IJN.S216365.
- [32] X. Jing, H. Y. Mi, M. R. Salick, X. F. Peng, and L. S. Turng, "Preparation of thermoplastic polyurethane/graphene oxide composite scaffolds by thermally induced phase separation," *Polym. Compos.*, 2014, doi: 10.1002/pc.22793.
- [33] Y. Xu, W. Hong, H. Bai, C. Li, and G. Shi, "Strong and ductile poly(vinyl alcohol)/graphene oxide composite films with a layered structure," *Carbon N. Y.*, 2009, doi: 10.1016/j.carbon.2009.08.022.
- [34] P. Blake *et al.*, "Making graphene visible Low-energy electron transmission imaging of clusters on free-standing graphene Making graphene visible," *Cit. Appl. Phys. Lett. J. Vac. Sci. Technol. B Appl. Phys. Lett. Phys. Lett. Phys. Lett.*, 2007.
- [35] S. Ghosh *et al.*, "Extremely high thermal conductivity of graphene: Prospects for thermal management applications in nanoelectronic circuits," *Appl. Phys. Lett.*, 2008, doi: 10.1063/1.2907977.
- [36] C. Faugeras *et al.*, "Few-layer graphene on SiC, pyrolytic graphite, and graphene: A Raman scattering study," *Appl. Phys. Lett.*, 2008, doi: 10.1063/1.2828975.
- [37] J. K. Lee, K. B. Smith, C. M. Hayner, and H. H. Kung, "Silicon nanoparticles-graphene paper composites for Li ion battery anodes," *Chem. Commun.*, 2010, doi: 10.1039/b919738a.
- [38] K. Moon *et al.*, "Graphene for ultracapacitors," 2010, doi: 10.1109/ECTC.2010.5490644.
- [39] W. D. Tan, C. Y. Su, R. J. Knize, G. Q. Xie, L. J. Li, and D. Y. Tang, "Mode locking of ceramic Nd:yttrium aluminum garnet with graphene as a saturable absorber," *Appl. Phys. Lett.*, 2010, doi: 10.1063/1.3292018.
- [40] A. H. Li *et al.*, "Electronic structure and thermoelectric properties of Bi₂Te₃

- crystals and graphene-doped Bi₂Te₃,” *Thin Solid Films*, 2010, doi: 10.1016/j.tsf.2010.03.124.
- [41] E. Contassot, H. D. Beer, and L. E. French, “Interleukin-1, inflammasomes, autoinflammation and the skin,” *Swiss Medical Weekly*. 2012, doi: 10.4414/smw.2012.13590.
- [42] D. C. De Sá and C. Festa Neto, “Inflammasomes and dermatology,” *An. Bras. Dermatol.*, 2016, doi: 10.1590/abd1806-4841.20165577.
- [43] E. Pelle, T. Mammone, D. Maes, and K. Frenkel, “Keratinocytes act as a source of reactive oxygen species by transferring hydrogen peroxide to melanocytes,” *J. Invest. Dermatol.*, 2005, doi: 10.1111/j.0022-202X.2005.23661.x.
- [44] A. Pappas, A. Liakou, and C. C. Zouboulis, “Nutrition and skin,” *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2016, doi: 10.1007/s11154-016-9374-z.
- [45] A. S. Ryan and L. A. Goldsmith, “Nutrition and the skin,” *Clin. Dermatol.*, 1996, doi: 10.1016/0738-081X(96)00068-5.
- [46] B. Hafeez, “Role of Zinc in Plant Nutrition- A Review,” *Am. J. Exp. Agric.*, 2013, doi: 10.9734/ajea/2013/2746.
- [47] G. Roupe, “Skin in the elderly,” *Lakartidningen*, 2001.
- [48] D. Priscila and M. Mejia, “Peelings químicos no rejuvenescimento facial,” *Pós-graduação em Fisioter. dermatofuncional - Fac. Cambury Resumo*, 2010.
- [49] L. M. Boylan and J. E. Spallholz, “Selenium,” in *Sports Nutrition: Vitamins and Trace Elements, Second Edition*, 2005.
- [50] “Selenium and selenium compounds,” *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man*. 1975, doi: 10.1002/14356007.a23_525.
- [51] S. J. Hamilton, “Review of selenium toxicity in the aquatic food chain,” *Science of the Total Environment*. 2004, doi: 10.1016/j.scitotenv.2004.01.019.
- [52] H. D. Mistry, F. Broughton Pipkin, C. W. G. Redman, and L. Poston, “Selenium in reproductive health,” *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2012, doi: 10.1016/j.ajog.2011.07.034.

- [53] H. Sajed, A. Sahebkar, and M. Iranshahi, "Zataria multiflora Boiss. (Shirazi thyme) - An ancient condiment with modern pharmaceutical uses," *Journal of Ethnopharmacology*. 2013, doi: 10.1016/j.jep.2012.12.018.
- [54] M. Shaiq Ali, M. Saleem, Z. Ali, and V. U. Ahmad, "Chemistry of Zataria multiflora (Lamiaceae)," *Phytochemistry*, 2000, doi: 10.1016/S0031-9422(00)00249-1.
- [55] M. Moradi *et al.*, "Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with Zataria multiflora Boiss essential oil and grape seed extract," *LWT - Food Sci. Technol.*, 2012, doi: 10.1016/j.lwt.2011.11.020.
- [56] R. Scaffaro, F. Lopresti, M. D'Arrigo, A. Marino, and A. Nostro, "Efficacy of poly(lactic acid)/carvacrol electrospun membranes against Staphylococcus aureus and Candida albicans in single and mixed cultures," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2018, doi: 10.1007/s00253-018-8879-7.
- [57] R. Scaffaro, A. Maio, F. Lopresti, and L. Botta, "Nanocarbons in electrospun polymeric nanomats for tissue engineering: A review," *Polymers*. 2017, doi: 10.3390/polym9020076.
- [58] M. Silke, S. Jean S, C. D. Bruce, and F. R. John, "Micro- and Nanostructured Surface Morphology on Electrospun Polymer Fibers," *Macromolecules*, 2002, doi: 10.1021/MA020444A.
- [59] J. K. Y. Lee *et al.*, "Polymer-based composites by electrospinning: Preparation & functionalization with nanocarbons," *Progress in Polymer Science*. 2018, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2018.07.002.
- [60] N. Bhardwaj and S. C. Kundu, "Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique," *Biotechnology Advances*. 2010, doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.01.004.
- [61] Z. M. Huang, Y. Z. Zhang, M. Kotaki, and S. Ramakrishna, "A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites," *Compos. Sci. Technol.*, 2003, doi: 10.1016/S0266-3538(03)00178-7.
- [62] M. Herrero-Herrero, J. A. Gómez-Tejedor, and A. Vallés-Lluch, "PLA/PCL electrospun membranes of tailored fibres diameter as drug delivery systems,"

- Eur. Polym. J.*, 2018, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2017.12.045.
- [63] M. M. Demir, I. Yilgor, E. Yilgor, and B. Erman, "Electrospinning of polyurethane fibers," *Polymer (Guildf)*., 2002, doi: 10.1016/S0032-3861(02)00136-2.
- [64] E. J. Chong *et al.*, "Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution," *Acta Biomater.*, 2007, doi: 10.1016/j.actbio.2007.01.002.
- [65] S. Ramakrishna, J. Mayer, E. Wintermantel, and K. W. Leong, "Biomedical applications of polymer-composite materials: A review," *Compos. Sci. Technol.*, 2001, doi: 10.1016/S0266-3538(00)00241-4.
- [66] S. Ramakrishna, K. Fujihara, W.-E. Teo, T. Yong, Z. Ma, and R. Ramaseshan, "Electrospun nanofibers: solving global issues," *Mater. Today*, 2006, doi: 10.1016/S1369-7021(06)71389-X.
- [67] A. Haider, S. Haider, and I. K. Kang, "A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology," *Arabian Journal of Chemistry*. 2018, doi: 10.1016/j.arabjc.2015.11.015.
- [68] P. K. Baumgarten, "Electrostatic spinning of acrylic microfibers," *J. Colloid Interface Sci.*, 1971, doi: 10.1016/0021-9797(71)90241-4.
- [69] H. Lu, T. Zhang, X. P. Wang, and Q. F. Fang, "Electrospun submicron bioactive glass fibers for bone tissue scaffold," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2009, doi: 10.1007/s10856-008-3649-1.
- [70] V. Beachley and X. Wen, "Polymer nanofibrous structures: Fabrication, biofunctionalization, and cell interactions," *Progress in Polymer Science (Oxford)*. 2010, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2010.03.003.
- [71] V. Beachley and X. Wen, "Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and length," *Mater. Sci. Eng. C*, 2009, doi: 10.1016/j.msec.2008.10.037.
- [72] J. M. Deitzel, J. D. Kleinmeyer, J. K. Hirvonen, and N. C. Beck Tan, "Controlled deposition of electrospun poly(ethylene oxide) fibers," *Polymer (Guildf)*.,

2001, doi: 10.1016/S0032-3861(01)00336-6.

- [73] J. Doshi and D. H. Reneker, "Electrospinning process and applications of electrospun fibers," *J. Electrostat.*, 1995, doi: 10.1016/0304-3886(95)00041-8.
- [74] M. Mohammadian and A. K. Haghi, "Systematic parameter study for nano-fiber fabrication via electrospinning process," *Bulg. Chem. Commun.*, 2014.
- [75] R. Jalili, M. Morshed, and S. A. H. Ravandi, "Fundamental parameters affecting electrospinning of PAN nanofibers as uniaxially aligned fibers," *J. Appl. Polym. Sci.*, 2006, doi: 10.1002/app.24290.
- [76] O. Jirsak, F. Sanetrnik, D. Lukas, V. Kotek, L. Martinova, and J. Chaloupek, "A method of nanofibres production from a polymer solution using electrostatic spinning and a device for carrying out the method," 2005.
- [77] S. Ahadian, R. Rahal, J. Ramón-Azcón, R. Obregón, and A. Hasan, "Biomaterials in Tissue Engineering," in *Tissue Engineering for Artificial Organs: Regenerative Medicine, Smart Diagnostics and Personalized Medicine*, 2016.
- [78] E. S. Place, J. H. George, C. K. Williams, and M. M. Stevens, "Synthetic polymer scaffolds for tissue engineering," *Chem. Soc. Rev.*, 2009, doi: 10.1039/b811392k.
- [79] E. Schacht, "Biomaterials," *Verhandelingen - Koninklijke Academie voor Geneeskunde van België*. 2004, doi: 10.4324/9780203381564_biomaterials.
- [80] K. F. Leong, C. K. Chua, N. Sudarmadji, and W. Y. Yeong, "Engineering functionally graded tissue engineering scaffolds," *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2008, doi: 10.1016/j.jmbbm.2007.11.002.
- [81] X. Li, L. Wang, Y. Fan, Q. Feng, F. Z. Cui, and F. Watari, "Nanostructured scaffolds for bone tissue engineering," *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. 2013, doi: 10.1002/jbm.a.34539.
- [82] M. Goldberg, R. Langer, and X. Jia, "Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering," *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2007, doi: 10.1163/156856207779996931.
- [83] B. J. Papenburg, "Design strategies for tissue engineering scaffolds," *ProQuest*

Diss. Theses ProQuest Diss. Theses, 2009.

- [84] S. A. Sell, P. S. Wolfe, K. Garg, J. M. McCool, I. A. Rodriguez, and G. L. Bowlin, "The use of natural polymers in tissue engineering: A focus on electrospun extracellular matrix analogues," *Polymers*. 2010, doi: 10.3390/polym2040522.
- [85] M. Savioli Lopes, A. L. Jardini, and R. Maciel Filho, "Poly (lactic acid) production for tissue engineering applications," 2012, doi: 10.1016/j.proeng.2012.07.534.
- [86] E. Francois, D. Dorcemus, and S. Nukavarapu, "Biomaterials and scaffolds for musculoskeletal tissue engineering," in *Regenerative Engineering of Musculoskeletal Tissues and Interfaces*, 2015.
- [87] W. He, Y. Feng, Z. Ma, and S. Ramakrishna, "Polymers for tissue engineering," 2008, doi: 10.1021/bk-2008-0977.ch019.
- [88] S. Agarwal, J. H. Wendorff, and A. Greiner, "Use of electrospinning technique for biomedical applications," *Polymer*. 2008, doi: 10.1016/j.polymer.2008.09.014.
- [89] H. Liu, X. Ding, G. Zhou, P. Li, X. Wei, and Y. Fan, "Electrospinning of nanofibers for tissue engineering applications," *Journal of Nanomaterials*. 2013, doi: 10.1155/2013/495708.
- [90] J. Xue, T. Wu, Y. Dai, and Y. Xia, "Electrospinning and electrospun nanofibers: Methods, materials, and applications," *Chemical Reviews*. 2019, doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00593.
- [91] S. Chakraborty, I. C. Liao, A. Adler, and K. W. Leong, "Electrohydrodynamics: A facile technique to fabricate drug delivery systems," *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009, doi: 10.1016/j.addr.2009.07.013.
- [92] S. Thenmozhi, N. Dharmaraj, K. Kadirvelu, and H. Y. Kim, "Electrospun nanofibers: New generation materials for advanced applications," *Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology*. 2017, doi: 10.1016/j.mseb.2017.01.001.
- [93] M. Liu, X. P. Duan, Y. M. Li, D. P. Yang, and Y. Z. Long, "Electrospun nanofibers

- for wound healing,” *Materials Science and Engineering C*. 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.03.034.
- [94] R. Vasita and D. S. Katti, “Nanofibers and their applications in tissue engineering,” *International Journal of Nanomedicine*. 2006, doi: 10.2147/nano.2006.1.1.15.
- [95] A. Eatemadi, H. Daraee, N. Zarghami, H. M. Yar, and A. Akbarzadeh, “Nanofiber: Synthesis and biomedical applications,” *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*. 2016, doi: 10.3109/21691401.2014.922568.
- [96] A. M. Al-Enizi, M. M. Zagho, and A. A. Elzatahry, “Polymer-based electrospun nanofibers for biomedical applications,” *Nanomaterials*. 2018, doi: 10.3390/nano8040259.
- [97] A. Martins, R. L. Reis, and N. M. Neves, “Electrospinning: Processing technique for tissue engineering scaffolding,” *International Materials Reviews*. 2008, doi: 10.1179/174328008X353547.
- [98] Y. Fukumori and H. Ichikawa, “Nanoparticles for cancer therapy and diagnosis,” *Advanced Powder Technology*. 2006, doi: 10.1163/156855206775123494.
- [99] T. I. Süpüren G., Kanat Z.E., Çay A., Kırıcı T., Gülümser T., “Nano lifler (bölüm 2),” *Tekst. ve Konfeksiyon*, 2007.
- [100] M. Dasdemir, M. Topalbekiroglu, and A. Demir, “Electrospinning of thermoplastic polyurethane microfibers and nanofibers from polymer solution and melt,” *J. Appl. Polym. Sci.*, 2013, doi: 10.1002/app.37503.
- [101] M. Dasdemir, G. S. Kozanoglu, M. Topalbekiroglu, and A. Demir, “Production and comparison of solution and melt electrospun thermoplastic polyurethane nanofibers,” 2007.
- [102] W. E. Teo and S. Ramakrishna, “A review on electrospinning design and nanofibre assemblies,” *Nanotechnology*, 2006, doi: 10.1088/0957-4484/17/14/R01.
- [103] W. E. Teo, W. He, and S. Ramakrishna, “Electrospun scaffold tailored for tissue-specific extracellular matrix,” *Biotechnology Journal*. 2006, doi:

10.1002/biot.200600044.

- [104] R. Sarbatly, D. Krishnaiah, and Z. Kamin, "A review of polymer nanofibres by electrospinning and their application in oil-water separation for cleaning up marine oil spills," *Marine Pollution Bulletin*. 2016, doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.03.037.
- [105] *Nano-size Polymers*. 2016.
- [106] S. Mohammadzadehmoghadam *et al.*, "Electrospinning: Current status and future trends," in *Nano-Size Polymers: Preparation, Properties, Applications*, 2016.
- [107] R. Sood, S. Cavaliere, D. J. Jones, and J. Rozière, "Electrospun nanofibre composite polymer electrolyte fuel cell and electrolysis membranes," *Nano Energy*. 2016, doi: 10.1016/j.nanoen.2016.06.027.
- [108] S. M. Yukseloglu, N. Sokmen, and S. Canoglu, "Biomaterial applications of silk fibroin electrospun nanofibres," *Microelectron. Eng.*, 2015, doi: 10.1016/j.mee.2015.04.008.
- [109] I. F. Wahab, S. I. A. Razak, N. S. Azmi, F. N. Dahli, A. H. M. Yusof, and N. H. M. Nayan, "Electrospun Graphene Oxide-Based Nanofibres," in *Advances in Carbon Nanostructures*, 2016.
- [110] N. Rosman *et al.*, "Electrospun nanofiber-coated membrane: A review," *Jurnal Teknologi*. 2016, doi: 10.11113/jt.v78.10071.
- [111] F. Berton, D. Porrelli, R. Di Lenarda, and G. Turco, "A critical review on the production of electrospun nanofibres for guided bone regeneration in oral surgery," *Nanomaterials*. 2020, doi: 10.3390/nano10010016.
- [112] K. H. Tseng, C. J. Chou, S. H. Shih, D. C. Tien, H. C. Ku, and L. Stobinski, "Novel quantification for silver ion generated by the submerged arc discharge method," *Int. J. Mater. Prod. Technol.*, 2019, doi: 10.1504/IJMPT.2019.097676.
- [113] T. Ondarçuhu and C. Joachim, "Drawing a single nanofibre over hundreds of microns," *Europhys. Lett.*, 1998, doi: 10.1209/epl/i1998-00233-9.
- [114] Y. Liang, S. Wang, J. Qi, F. Ye, and J. Lin, "Microstructure and properties of cost-effective Fe-6.5 wt% Si ribbons fabricated by melt-spinning," *Scr. Mater.*,

2019, doi: 10.1016/j.scriptamat.2019.01.002.

- [115] Y. F. Liang, S. Wang, H. Li, Y. M. Jiang, F. Ye, and J. P. Lin, "Fabrication of Fe-6.5wt%Si Ribbons by Melt Spinning Method on Large Scale," *Adv. Mater. Sci. Eng.*, 2015, doi: 10.1155/2015/296197.
- [116] C. Zhang, J. Wang, and Y. Wang, "Solubility of ceftriaxone disodium in acetone, methanol, ethanol, N,N-dimethylformamide, and formamide between 278 and 318 K," *J. Chem. Eng. Data*, 2005, doi: 10.1021/je0501989.
- [117] F. Zhang, X. Q. Li, Y. Su, H. S. Wang, X. M. Mo, and C. L. He, "Electrospinning of Polymethyl methacrylate Nanofibers with different solvents," *2008 Int. Symp. Fiber Based Scaffolds Tissue Eng. Proc.*, 2008.
- [118] H. Zhang, W. Wang, S. Mallapragada, A. Travesset, and D. Vaknin, "Macroscopic and tunable nanoparticle superlattices," *Nanoscale*, 2017, doi: 10.1039/c6nr07136h.
- [119] Q. Zhang *et al.*, "Electrospun polymeric micro/nanofibrous scaffolds for long-term drug release and their biomedical applications," *Drug Discovery Today*. 2017, doi: 10.1016/j.drudis.2017.05.007.
- [120] X. Zhang, X. M. Li, T. L. Chen, J. M. Bian, and C. Y. Zhang, "Structural and optical properties of Zn_{1-x}Mg_xO thin films deposited by ultrasonic spray pyrolysis," *Thin Solid Films*, 2005, doi: 10.1016/j.tsf.2005.06.088.
- [121] Y. Zhang, T. L. Chwee, S. Ramakrishna, and Z. M. Huang, "Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2005, doi: 10.1007/s10856-005-4428-x.
- [122] T. Zimina, R. M. Smith, J. C. Highfield, P. Myers, and B. W. King, "Study of the flow development during the slurry packing of microcolumns for liquid chromatography," 1996, doi: 10.1016/0021-9673(95)01026-2.
- [123] T. Ellingsen, O. Aune, J. Ugelstad, and S. Hagen, "Monosized stationary phases for chromatography," *J. Chromatogr. A*, 1990, doi: 10.1016/S0021-9673(01)88940-8.
- [124] L. E. Blue and J. W. Jorgenson, "1.1 μm superficially porous particles for liquid

- chromatography. Part I: Synthesis and particle structure characterization," *J. Chromatogr. A*, 2011, doi: 10.1016/j.chroma.2011.09.004.
- [125] A. Krupa *et al.*, "Electrosprayed Nanoparticles for Nanofiber Coating," *Illass 2008*, 2008.
- [126] Y. E. Miao and T. Liu, "Electrospun Biopolymer Nanofibers and Their Composites for Drug Delivery Applications," in *Biodegradable Polyesters*, 2015.
- [127] J. Fang, H. T. Niu, T. Lin, and X. G. Wang, "Applications of electrospun nanofibers," *Chinese Science Bulletin*. 2008, doi: 10.1007/s11434-008-0319-0.
- [128] P. Selvaraj *et al.*, "Soft-template synthesis of high surface area mesoporous titanium dioxide for dye-sensitized solar cells," *Int. J. Energy Res.*, 2019, doi: 10.1002/er.4288.
- [129] A. K. Chandiran, M. Abdi-Jalebi, M. K. Nazeeruddin, and M. Grätzel, "Analysis of electron transfer properties of ZnO and TiO₂ photoanodes for dye-sensitized solar cells," *ACS Nano*, 2014, doi: 10.1021/nn405535j.
- [130] W. G. Yang, F. R. Wan, Q. W. Chen, J. J. Li, and D. S. Xu, "Controlling synthesis of well-crystallized mesoporous TiO₂ microspheres with ultrahigh surface area for high-performance dye-sensitized solar cells," *J. Mater. Chem.*, 2010, doi: 10.1039/b923105f.
- [131] F. Scarpelli, T. F. Mastropietro, T. Poerio, and N. Godbert, "Mesoporous TiO₂ Thin Films: State of the Art," in *Titanium Dioxide - Material for a Sustainable Environment*, 2018.
- [132] A. Huczko, H. Lange, and T. Sogabe, "Influence of Fe and Co/Ni on carbon arc plasma and formation of fullerenes and nanotubes," *J. Phys. Chem. A*, 2000, doi: 10.1021/jp002842q.
- [133] L. C. Palmer and S. I. Stupp, "Molecular self-assembly into one-dimensional nanostructures," *Acc. Chem. Res.*, 2008, doi: 10.1021/ar8000926.
- [134] S. R. Bull *et al.*, "A templating approach for monodisperse self-assembled organic nanostructures," *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, doi: 10.1021/ja710749q.

- [135] L. A. Renna, T. S. Gehan, and D. Venkataraman, "Polymer nanostructures through packing of spheres," in *Optical Properties of Functional Polymers and Nano Engineering Applications*, 2014.
- [136] T. P. Bigioni, X. M. Lin, T. T. Nguyen, E. I. Corwin, T. A. Witten, and H. M. Jaeger, "Kinetically driven self assembly of highly ordered nanoparticle monolayers," *Nat. Mater.*, 2006, doi: 10.1038/nmat1611.
- [137] T. H. Kim *et al.*, "Highly ordered self-assembly of 1D nanoparticles in phospholipids driven by curvature and electrostatic interaction," *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, doi: 10.1021/ja901810n.
- [138] C. Chen *et al.*, "Poly(lactic acid) (PLA) based nanocomposites - A novel way of drug-releasing," *Biomed. Mater.*, 2007, doi: 10.1088/1748-6041/2/4/L01.
- [139] H. L. Shao, S. Umemoto, T. Kikutani, and N. Okui, "Layer-by-layer polycondensation of nylon 66 by alternating vapour deposition polymerization," *Polymer (Guildf)*, 1997, doi: 10.1016/S0032-3861(96)00504-6.
- [140] J. L. Gong *et al.*, "Removal of cationic dyes from aqueous solution using magnetic multi-wall carbon nanotube nanocomposite as adsorbent," *J. Hazard. Mater.*, 2009, doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.09.072.
- [141] J. Kaput, J. Noble, B. Hatipoglu, K. Kohrs, K. Dawson, and A. Bartholomew, "Application of nutrigenomic concepts to Type 2 diabetes mellitus," *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2007, doi: 10.1016/j.numecd.2006.11.006.
- [142] J. D. Schiffman and C. L. Schauer, "A review: Electrospinning of biopolymer nanofibers and their applications," *Polymer Reviews*. 2008, doi: 10.1080/15583720802022182.
- [143] T. Subbiah, G. S. Bhat, R. W. Tock, S. Parameswaran, and S. S. Ramkumar, "Electrospinning of nanofibers," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 96, no. 2, pp. 557–569, 2005, doi: 10.1002/app.21481.
- [144] T. Jiang, E. J. Carbone, K. W. H. Lo, and C. T. Laurencin, "Electrospinning of polymer nanofibers for tissue regeneration," *Progress in Polymer Science*.

- 2015, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2014.12.001.
- [145] A. R. Boccaccini, M. Erol, W. J. Stark, D. Mohn, Z. Hong, and J. F. Mano, "Polymer/bioactive glass nanocomposites for biomedical applications: A review," *Compos. Sci. Technol.*, 2010, doi: 10.1016/j.compscitech.2010.06.002.
- [146] A. Baji, Y. W. Mai, S. C. Wong, M. Abtahi, and P. Chen, "Electrospinning of polymer nanofibers: Effects on oriented morphology, structures and tensile properties," *Composites Science and Technology*. 2010, doi: 10.1016/j.compscitech.2010.01.010.
- [147] A. L. Andradý, *Science and Technology of Polymer Nanofibers*. 2007.
- [148] A. Frenot and I. S. Chronakis, "Polymer nanofibers assembled by electrospinning," *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. 2003, doi: 10.1016/S1359-0294(03)00004-9.
- [149] Kenry and C. T. Lim, "Nanofiber technology: current status and emerging developments," *Progress in Polymer Science*. 2017, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2017.03.002.
- [150] I. S. Chronakis, "Novel nanocomposites and nanoceramics based on polymer nanofibers using electrospinning process - A review," *J. Mater. Process. Technol.*, 2005, doi: 10.1016/j.jmatprotec.2005.06.053.
- [151] N. E. Duygulu, F. Ciftci, and C. B. Ustundag, "Electrospun drug blended poly(lactic acid) (PLA) nanofibers and their antimicrobial activities," *J. Polym. Res.*, 2020, doi: 10.1007/s10965-020-02215-0.
- [152] G. Coşkun Üstündağ and E. Karaca, "Production of Electrospun Nanofibrous Mat Containing Alginate and Providing of Water Resistance With Crosslinking," *J. Text. Eng.*, 2016.
- [153] G. Coşkun Üstündağ and E. Karaca, "POLİVinil Alkol)/SodyumAlginat Karışımlarından ElektroÇekimYöntemiİle EldeEdileNanolifliYüzeyleriİncelenmesi," *Cilt*, 2009.
- [154] G. C. Ustundag Karaca E. Ozbek S. Cavusoglu I., "In Vivo Evaluation Of Electrospun Poly (Vinyl Alcohol)/Sodium Alginate Nanofibrous Mat As Wound Dressing," *Tekst. Ve Konfeksiyon*, 2010.

- [155] D. Smith, D. Reneker, W. Kataphinan, and S. Dabney, "Electrospun skin masks and uses thereof," 2001.
- [156] M. Bognitzki *et al.*, "Nanostructured fibers via electrospinning," *Adv. Mater.*, 2001, doi: 10.1002/1521-4095(200101)13:1<70::AID-ADMA70>3.0.CO;2-H.
- [157] G. E. Zaikov, "NA nanostructured Fibers Via Electrospinning (Part II)," in *Applied Nanotechnology: Materials and Applications*, 2016.
- [158] X. Shi *et al.*, "Electrospinning of Nanofibers and Their Applications for Energy Devices," *Journal of Nanomaterials*. 2015, doi: 10.1155/2015/140716.
- [159] J. Zeleny, "Instability of electrified liquid surfaces," *Phys. Rev.*, 1917, doi: 10.1103/PhysRev.10.1.
- [160] D. H. Reneker, A. L. Yarin, H. Fong, and S. Koombhongse, "Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning," *J. Appl. Phys.*, 2000, doi: 10.1063/1.373532.
- [161] C. P. Barnes, S. A. Sell, E. D. Boland, D. G. Simpson, and G. L. Bowlin, "Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds," *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007, doi: 10.1016/j.addr.2007.04.022.
- [162] D. Li, Y. Wang, and Y. Xia, "Electrospinning of polymeric and ceramic nanofibers as uniaxially aligned arrays," *Nano Lett.*, 2003, doi: 10.1021/nl0344256.
- [163] J. Xue, J. Xie, W. Liu, and Y. Xia, "Electrospun Nanofibers: New Concepts, Materials, and Applications," *Acc. Chem. Res.*, 2017, doi: 10.1021/acs.accounts.7b00218.
- [164] M. H. El-Newehy, S. S. Al-Deyab, E. R. Kenawy, and A. Abdel-Megeed, "Nanospider technology for the production of nylon-6 nanofibers for biomedical applications," *J. Nanomater.*, 2011, doi: 10.1155/2011/626589.
- [165] J. M. Deitzel, J. Kleinmeyer, D. Harris, and N. C. Beck Tan, "The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles," *Polymer (Guildf.)*, 2001, doi: 10.1016/S0032-3861(00)00250-0.
- [166] A. Kilic, F. Oruc, and A. Demir, "Effects of Polarity on Electrospinning Process," *Text. Res. J.*, 2008, doi: 10.1177/0040517507081296.

- [167] J. Venugopal, S. Low, A. T. Choon, and S. Ramakrishna, "Interaction of cells and nanofiber scaffolds in tissue engineering," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, 2008, doi: 10.1002/jbm.b.30841.
- [168] H. Yoshimoto, Y. M. Shin, H. Terai, and J. P. Vacanti, "A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering," *Biomaterials*, 2003, doi: 10.1016/S0142-9612(02)00635-X.
- [169] S. G. Kumbar, R. James, S. P. Nukavarapu, and C. T. Laurencin, "Electrospun nanofiber scaffolds: Engineering soft tissues," *Biomed. Mater.*, 2008, doi: 10.1088/1748-6041/3/3/034002.
- [170] D. Li and Y. Xia, "Electrospinning of nanofibers: Reinventing the wheel?," *Advanced Materials*. 2004, doi: 10.1002/adma.200400719.
- [171] D. Li, Y. Wang, and Y. Xia, "Electrospinning Nanofibers as Uniaxially Aligned Arrays and Layer-by-Layer Stacked Films," *Adv. Mater.*, 2004, doi: 10.1002/adma.200306226.
- [172] W. Sigmund *et al.*, "Processing and structure relationships in electrospinning of ceramic fiber systems," *J. Am. Ceram. Soc.*, 2006, doi: 10.1111/j.1551-2916.2005.00807.x.
- [173] J. Yuh, L. Perez, W. M. Sigmund, and J. C. Nino, "Electrospinning of complex oxide nanofibers," *Phys. E Low-Dimensional Syst. Nanostructures*, 2007, doi: 10.1016/j.physe.2006.09.013.
- [174] S. H. Lee and W. M. Sigmund, "Synthesis of anatase-silver nanocomposite fibers via electrospinning," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2006, doi: 10.1166/jnn.2006.127.
- [175] V. Maneeratana and W. M. Sigmund, "Electrospun structures with controlled specific surface areas and pores," 2006, doi: 10.2514/6.iac-06-c2.4.07.
- [176] M. Mirjalili and S. Zohoori, "Review for application of electrospinning and electrospun nanofibers technology in textile industry," *J. Nanostructure Chem.*, 2016, doi: 10.1007/s40097-016-0189-y.
- [177] V. Pillay *et al.*, "A review of the effect of processing variables on the fabrication of electrospun nanofibers for drug delivery applications," *Journal of*

Nanomaterials. 2013, doi: 10.1155/2013/789289.

- [178] Q. P. Pham, U. Sharma, and A. G. Mikos, "Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: A review," *Tissue Engineering*. 2006, doi: 10.1089/ten.2006.12.1197.
- [179] F. E. Ahmed, B. S. Lalia, and R. Hashaikh, "A review on electrospinning for membrane fabrication: Challenges and applications," *Desalination*. 2015, doi: 10.1016/j.desal.2014.09.033.
- [180] G. C. Rutledge and S. V. Fridrikh, "Formation of fibers by electrospinning," *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007, doi: 10.1016/j.addr.2007.04.020.
- [181] S. V. Fridrikh, J. H. Yu, M. P. Brenner, and G. C. Rutledge, "Controlling the Fiber Diameter during Electrospinning," *Phys. Rev. Lett.*, 2003, doi: 10.1103/PhysRevLett.90.144502.
- [182] W. E. Teo, R. Inai, and S. Ramakrishna, "Technological advances in electrospinning of nanofibers," *Science and Technology of Advanced Materials*. 2011, doi: 10.1088/1468-6996/12/1/013002.
- [183] K. P. Feltz, E. A. Gowney Kalaf, C. Chen, R. S. Martin, and S. A. Sell, "A review of electrospinning manipulation techniques to direct fiber deposition and maximize pore size," *Electrospinning*, 2017, doi: 10.1515/esp-2017-0002.
- [184] L. N. Nthunya *et al.*, "A review of nanoparticle-enhanced membrane distillation membranes: membrane synthesis and applications in water treatment," *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2019, doi: 10.1002/jctb.5977.
- [185] M. B. Bazbouz, M. Taylor, D. Baker, M. E. Ries, and P. Goswami, "Dry-jet wet electrospinning of native cellulose microfibers with macroporous structures from ionic liquids," *J. Appl. Polym. Sci.*, 2019, doi: 10.1002/app.47153.
- [186] M. D. Köse, Y. Başpınar, and O. Bayraktar, "Electroencapsulation (Electrospraying & Electrospinning) of Active Compounds for Food Applications," *Curr. Pharm. Des.*, 2019, doi: 10.2174/1381612825666190717125538.
- [187] Y. Xu, M. Yu, S. Ramakrishna, S. Russell, and Y.-Z. Long, "2019 Nanoscale-

Review Portable electrospun instrument," *Nanoscale*, 2019.

- [188] J. Han, L. Xiong, X. Jiang, X. Yuan, Y. Zhao, and D. Yang, "2019 Progress in Polymer Science-Electrospun: topology for biological application," *Prog. Polym. Sci.*, 2019.
- [189] J. C. Rose and L. De Laporte, "2019 Advanced Healthcare Materials- Hierarchical design of tissue regenerative constructs," *Adv. Healthc. Mater.*, 2018.
- [190] "Erratum regarding missing Declaration of Competing Interest statements in previously published articles (Bioprinting (2019) 15, (S240588661830040X), (10.1016/j.bprint.2019.e00048)),," *Bioprinting*. 2020, doi: 10.1016/j.bprint.2020.e00114.
- [191] A. Koski, K. Yim, and S. Shivkumar, "Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning," *Mater. Lett.*, 2004, doi: 10.1016/S0167-577X(03)00532-9.
- [192] X. Dai and S. Shivkumar, "Electrospinning of PVA-calcium phosphate sol precursors for the production of fibrous hydroxyapatite," *J. Am. Ceram. Soc.*, 2007, doi: 10.1111/j.1551-2916.2007.01569.x.
- [193] E. Hirsch *et al.*, "Electrospinning scale-up and formulation development of PVA nanofibers aiming oral delivery of biopharmaceuticals," *Express Polym. Lett.*, 2019, doi: 10.3144/expresspolymlett.2019.50.
- [194] B. Yalcinkaya and F. Cengiz Callioglu, "The effect of supporting material type on the nanofiber morphology," 2011.
- [195] X. Geng, O. H. Kwon, and J. Jang, "Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution," *Biomaterials*, 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.01.066.
- [196] Y. P. Singh, S. Dasgupta, S. Nayar, and R. Bhaskar, "Optimization of electrospinning process & parameters for producing defect-free chitosan/polyethylene oxide nanofibers for bone tissue engineering," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2020, doi: 10.1080/09205063.2020.1718824.
- [197] K. Triyana, M. S. Mu'Min, K. Faizah, Y. Yusuf, A. Kusumaatmaja, and Harsojo,

- “Electrospun nanofibers based on polyvinyl Alcohol/chitosan and its stability in KOH solution,” 2015, doi: 10.4028/www.scientific.net/MSF.827.321.
- [198] K. Kooshina, H. Sima, and A. Talebian, “Fabrication and Characterization of Gelatin Nanofibers Dissolved in Concentrated Acetic Acid,” *Int. J. Chem. Mol. Eng.*, 2017.
- [199] U. Habiba, A. M. Afifi, B. C. Ang, and S. Talebian, “Influence of hydrolysis on electrospinnability of chitosan/polyvinyl alcohol blends solution and fiber diameter distribution,” *Sains Malaysiana*, 2016.
- [200] R. Erdem and M. Akalın, “Characterization and evaluation of antimicrobial properties of electrospun chitosan/polyethylene oxide based nanofibrous scaffolds (with/without nanosilver),” *J. Ind. Text.*, 2015, doi: 10.1177/1528083713503000.
- [201] A. Doderio, E. Brunengo, M. Alloisio, A. Sionkowska, S. Vicini, and M. Castellano, “Chitosan-based electrospun membranes: Effects of solution viscosity, coagulant and crosslinker,” *Carbohydr. Polym.*, 2020, doi: 10.1016/j.carbpol.2020.115976.
- [202] E. Kedroňová, V. Kupka, A. Manakhov, A. Stoica, L. Vojtová, and L. Zajíčková, “Electrospun biodegradable PCL, PEG and PCL/PEG polyurethane nanofibers coated by amine-rich plasma polymers,” 2016.
- [203] X. Zhang, H. Liu, J. Qin, X. Yin, J. Lv, and L. Zhu, “Preparation and platelet adhesion of chitosan/PVA nanofibrous membrane,” *Bioinspired, Biomim. Nanobiomaterials*, 2017, doi: 10.1680/jbibn.16.00015.
- [204] H. Liu and C. Tang, “Electrospinning of cellulose acetate in solvent mixture N,N-dimethylacetamide (DMAc)/acetone,” *Polym. J.*, 2007, doi: 10.1295/polymj.PJ2006117.
- [205] S. H. Bahrami and A. Gholipour Kanani, “Effect of changing solvents on poly(ϵ -Caprolactone) nanofibrous webs morphology,” *J. Nanomater.*, 2011, doi: 10.1155/2011/724153.
- [206] N. Yuya, I. Kim, W. Kai, and K. Byoung-Suhk, “Morphology Controlled Electrospun Poly (Vinyl Pyrrolidone) Fibers : Effects of Organic Solvent and

- Relative Humidity,” *J. Mater. Sci. Eng. with Adv. Technol.*, 2010.
- [207] X. Hu, S. Liu, G. Zhou, Y. Huang, Z. Xie, and X. Jing, “Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications,” *Journal of Controlled Release*. 2014, doi: 10.1016/j.jconrel.2014.04.018.
- [208] W. J. Li, C. T. Laurencin, E. J. Caterson, R. S. Tuan, and F. K. Ko, “Electrospun nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering,” *J. Biomed. Mater. Res.*, 2002, doi: 10.1002/jbm.10167.
- [209] M. Li, M. J. Mondrinos, M. R. Gandhi, F. K. Ko, A. S. Weiss, and P. I. Lekes, “Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering,” *Biomaterials*, 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.03.030.
- [210] P. Lu and B. Ding, “Applications of Electrospun Fibers,” *Recent Pat. Nanotechnol.*, 2008, doi: 10.2174/187221008786369688.
- [211] J. A. Matthews, G. E. Wnek, D. G. Simpson, and G. L. Bowlin, “Electrospinning of collagen nanofibers,” *Biomacromolecules*, 2002, doi: 10.1021/bm015533u.
- [212] S. Agarwal, A. Greiner, and J. H. Wendorff, “Functional materials by electrospinning of polymers,” *Progress in Polymer Science*. 2013, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2013.02.001.
- [213] D. H. Reneker, A. L. Yarin, E. Zussman, and H. Xu, “Electrospinning of Nanofibers from Polymer Solutions and Melts,” *Advances in Applied Mechanics*. 2007, doi: 10.1016/S0065-2156(07)41002-X.
- [214] F. Li, Y. Zhao, and Y. Song, “Core-Shell Nanofibers: Nano Channel and Capsule by Coaxial Electrospinning,” in *Nanofibers*, 2010.
- [215] D. H. Reneker and A. L. Yarin, “Electrospinning jets and polymer nanofibers,” *Polymer*. 2008, doi: 10.1016/j.polymer.2008.02.002.
- [216] W. Cui, X. Li, J. Chen, S. Zhou, and J. Weng, “In situ growth kinetics of hydroxyapatite on electrospun poly(DL-lactide) fibers with gelatin grafted,” 2008, doi: 10.1021/cg800641s.
- [217] J. Dougherty, E. Schaefer, R. Niemeier, E. Koch, C. Cady, and K. Nair, “Effect of valproic acid on cell proliferation of Wharton’s jelly MSC in PCL nanofiber scaffolds,” 2013, doi: 10.1115/IMECE2013-65041.

- [218] L. Z. Lugo-Morales, "Development and characterization of carbon-fiber microbiosensors for fast-scan cyclic voltammetry," *Dissertation Abstracts International: Section B: The Sciences and Engineering*. 2014.
- [219] H. Tseng, "The Characterization of the Microstructure of the Aortic Valve for Tissue Engineering Applications," 2013.
- [220] M. Li, Y. Guo, Y. Wei, A. G. MacDiarmid, and P. I. Lekes, "Electrospinning polyaniline-contained gelatin nanofibers for tissue engineering applications," *Biomaterials*, 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.11.037.
- [221] Q. P. Pham, U. Sharma, and A. G. Mikos, "Electrospun poly (ϵ -caprolactone) microfiber and multilayer nanofiber/microfiber scaffolds: Characterization of scaffolds and measurement of cellular infiltration," *Biomacromolecules*, 2006, doi: 10.1021/bm060680j.
- [222] D. Kai *et al.*, "Engineering Poly(lactide)-Lignin Nanofibers with Antioxidant Activity for Biomedical Application," *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 2016, doi: 10.1021/acssuschemeng.6b00478.
- [223] Lan, "The Review on Electrospun Gelatin Fiber Scaffold," *J. Res. Updat. Polym. Sci.*, 2012, doi: 10.6000/1929-5995.2012.01.02.1.
- [224] R. Asmatulu and W. S. Khan, "Introduction to electrospun nanofibers," in *Synthesis and Applications of Electrospun Nanofibers*, 2019.
- [225] R. F. Bombaldi de Souza, F. C. Bombaldi de Souza, A. C. K. Bierhalz, A. L. R. Pires, and Â. M. Moraes, "Biopolymer-based films and membranes as wound dressings," in *Biopolymer Membranes and Films*, 2020.
- [226] Y. El Har-El *et al.*, "Diverse biomedical applications of electrospun scaffolds," 2014.
- [227] S. Najafi, A. Gholipour-Kanani, N. Eslahi, and S. H. Bahrami, "Study on release of cardamom extract as an antibacterial agent from electrospun scaffold based on sodium alginate," *J. Text. Inst.*, 2020, doi: 10.1080/00405000.2020.1825164.
- [228] Y. Jiao, C. Li, Q. Li, L. Liu, F. Wang, and L. Wang, "Improved Fibroblast Adhesion and Proliferation by Controlling Multi-level Structure of Polycaprolactone

Microfiber," *J. Donghua Univ. (English Ed.*, 2020.

- [229] A. K. Moghe and B. S. Gupta, "Co-axial electrospinning for nanofiber structures: Preparation and applications," *Polym. Rev.*, 2008, doi: 10.1080/15583720802022257.
- [230] L. Persano, A. Camposeo, C. Tekmen, and D. Pisignano, "Industrial upscaling of electrospinning and applications of polymer nanofibers: A review," *Macromolecular Materials and Engineering*. 2013, doi: 10.1002/mame.201200290.
- [231] S. Agarwal, A. Greimer, and J. H. Wendorff, "Electrospinning of manmade and biopolymer nanofibers - Progress in techniques, materials, and applications," *Adv. Funct. Mater.*, 2009, doi: 10.1002/adfm.200900591.
- [232] J. Xie, X. Li, and Y. Xia, "Putting electrospun nanofibers to work for biomedical research," *Macromol. Rapid Commun.*, 2008, doi: 10.1002/marc.200800381.
- [233] K. A. Khalil, H. Fouad, T. Elsarnagawy, and F. N. Almajhdi, "Preparation and characterization of electrospun PLGA/silver composite nanofibers for biomedical applications," *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2013.
- [234] *Handbook of Nanofibers*. 2019.
- [235] X. Wang, F. Sun, G. Yin, Y. Wang, B. Liu, and M. Dong, "Tactile-sensing based on flexible PVDF nanofibers via electrospinning: A review," *Sensors (Switzerland)*. 2018, doi: 10.3390/s18020330.
- [236] S. Sarkar, S. Deevi, and G. Tepper, "Biased AC electrospinning of aligned polymer nanofibers," *Macromol. Rapid Commun.*, 2007, doi: 10.1002/marc.200700053.
- [237] M. Z. Elsabee, H. F. Naguib, and R. E. Morsi, "Chitosan based nanofibers, review," *Materials Science and Engineering C*. 2012, doi: 10.1016/j.msec.2012.05.009.
- [238] T. C. Mokhena, V. Jacobs, and A. S. Luyt, "A review on electrospun bio-based polymers for water treatment," *Express Polym. Lett.*, 2015, doi: 10.3144/expresspolymlett.2015.79.
- [239] Y. Tian *et al.*, "Electrospun membrane of cellulose acetate for heavy metal ion

- adsorption in water treatment," *Carbohydr. Polym.*, 2011, doi: 10.1016/j.carbpol.2010.08.054.
- [240] S. Agarwal and A. Greiner, "On the way to clean and safe electrospinning-green electrospinning: Emulsion and suspension electrospinning," *Polymers for Advanced Technologies*. 2011, doi: 10.1002/pat.1883.
- [241] C. A. Bonino *et al.*, "Electrospinning alginate-based nanofibers: From blends to crosslinked low molecular weight alginate-only systems," *Carbohydr. Polym.*, 2011, doi: 10.1016/j.carbpol.2011.02.002.
- [242] A. S. Tayi, E. T. Pashuck, C. J. Newcomb, M. T. McClendon, and S. I. Stupp, "Electrospinning bioactive supramolecular polymers from water," *Biomacromolecules*, 2014, doi: 10.1021/bm401877s.
- [243] J. H. Kim *et al.*, "Tensile testing of ultra-thin films on water surface," *Nat. Commun.*, 2013, doi: 10.1038/ncomms3520.
- [244] W. Sujaritjun, P. Uawongsuwan, W. Pivsa-Art, and H. Hamada, "Mechanical property of surface modified natural fiber reinforced PLA biocomposites," *Energy Procedia*, 2013, doi: 10.1016/j.egypro.2013.06.798.
- [245] H. K. Rafi, T. L. Starr, and B. E. Stucker, "A comparison of the tensile, fatigue, and fracture behavior of Ti-6Al-4V and 15-5 PH stainless steel parts made by selective laser melting," *Int. J. Adv. Manuf. Technol.*, 2013, doi: 10.1007/s00170-013-5106-7.
- [246] S. Ochi, "Mechanical properties of kenaf fibers and kenaf/PLA composites," *Mech. Mater.*, 2008, doi: 10.1016/j.mechmat.2007.10.006.
- [247] G. H. Yew, A. M. Mohd Yusof, Z. A. Mohd Ishak, and U. S. Ishiaku, "Water absorption and enzymatic degradation of poly(lactic acid)/rice starch composites," *Polym. Degrad. Stab.*, 2005, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2005.04.006.
- [248] G. Rajesh and A. V. R. Prasad, "Tensile Properties of Successive Alkali Treated Short Jute Fiber Reinforced PLA Composites," *Procedia Mater. Sci.*, 2014, doi: 10.1016/j.mspro.2014.07.425.
- [249] M. Heidari-Rarani, M. Rafiee-Afarani, and A. M. Zahedi, "Mechanical

- characterization of FDM 3D printing of continuous carbon fiber reinforced PLA composites,” *Compos. Part B Eng.*, 2019, doi: 10.1016/j.compositesb.2019.107147.
- [250] T. Yu, J. Ren, S. Li, H. Yuan, and Y. Li, “Effect of fiber surface-treatments on the properties of poly(lactic acid)/ramie composites,” *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.*, 2010, doi: 10.1016/j.compositesa.2009.12.006.
- [251] E. de M. Teixeira, A. A. S. Curvelo, A. C. Corrêa, J. M. Marconcini, G. M. Glenn, and L. H. C. Mattoso, “Properties of thermoplastic starch from cassava bagasse and cassava starch and their blends with poly (lactic acid),” *Industrial Crops and Products*. 2012, doi: 10.1016/j.indcrop.2011.11.036.
- [252] M. S. Huda, L. T. Drzal, A. K. Mohanty, and M. Misra, “Effect of fiber surface-treatments on the properties of laminated biocomposites from poly(lactic acid) (PLA) and kenaf fibers,” *Compos. Sci. Technol.*, 2008, doi: 10.1016/j.compscitech.2007.06.022.
- [253] A. Iwatake, M. Nogi, and H. Yano, “Cellulose nanofiber-reinforced polylactic acid,” *Compos. Sci. Technol.*, 2008, doi: 10.1016/j.compscitech.2008.03.006.
- [254] X. Tian, T. Liu, Q. Wang, A. Dilmurat, D. Li, and G. Ziegmann, “Recycling and remanufacturing of 3D printed continuous carbon fiber reinforced PLA composites,” *J. Clean. Prod.*, 2017, doi: 10.1016/j.jclepro.2016.11.139.
- [255] S. A. Hinchcliffe, K. M. Hess, and W. V. Srubar, “Experimental and theoretical investigation of prestressed natural fiber-reinforced polylactic acid (PLA) composite materials,” *Compos. Part B Eng.*, 2016, doi: 10.1016/j.compositesb.2016.03.089.
- [256] A. Orue, A. Jauregi, C. Peña-Rodriguez, J. Labidi, A. Eceiza, and A. Arbelaiz, “The effect of surface modifications on sisal fiber properties and sisal/poly (lactic acid) interface adhesion,” *Compos. Part B Eng.*, 2015, doi: 10.1016/j.compositesb.2014.12.022.
- [257] R. Mahjoub, J. M. Yatim, A. R. Mohd Sam, and S. H. Hashemi, “Tensile properties of kenaf fiber due to various conditions of chemical fiber surface modifications,” *Constr. Build. Mater.*, 2014, doi: 10.1016/j.conbuildmat.2014.01.036.

- [258] V. C. Li, S. Wang, and C. Wu, "Tensile strain-hardening behavior of polyvinyl alcohol engineered cementitious composite (PVA-ECC)," *ACI Mater. J.*, 2001, doi: 10.14359/10851.
- [259] W. Cui, Y. Zhou, and J. Chang, "Electrospun nanofibrous materials for tissue engineering and drug delivery," *Sci. Technol. Adv. Mater.*, 2010, doi: 10.1088/1468-6996/11/1/014108.
- [260] K. C. Gupta, A. Haider, Y. R. Choi, and I. K. Kang, "Nanofibrous scaffolds in biomedical applications," *Biomaterials Research*. 2014, doi: 10.1186/2055-7124-18-5.
- [261] R. Khajavi, M. Abbasipour, and A. Bahador, "Electrospun biodegradable nanofibers scaffolds for bone tissue engineering," *Journal of Applied Polymer Science*. 2016, doi: 10.1002/app.42883.
- [262] M. P. Prabhakaran *et al.*, "Electrospun biocomposite nanofibrous scaffolds for neural tissue engineering," *Tissue Eng. - Part A*, 2008, doi: 10.1089/ten.tea.2007.0393.
- [263] J. Lannutti, D. Reneker, T. Ma, D. Tomasko, and D. Farson, "Electrospinning for tissue engineering scaffolds," *Mater. Sci. Eng. C*, 2007, doi: 10.1016/j.msec.2006.05.019.
- [264] K. Garg and G. L. Bowlin, "Electrospinning jets and nanofibrous structures," *Biomicrofluidics*, 2011, doi: 10.1063/1.3567097.
- [265] L. Wang, Y. Wu, T. Hu, B. Guo, and P. X. Ma, "Electrospun conductive nanofibrous scaffolds for engineering cardiac tissue and 3D bioactuators," *Acta Biomater.*, 2017, doi: 10.1016/j.actbio.2017.06.036.
- [266] A. Martins, J. V. Araújo, R. L. Reis, and N. M. Neves, "Electrospun nanostructured scaffolds for tissue engineering applications," *Nanomedicine*, 2007, doi: 10.2217/17435889.2.6.929.
- [267] M. P. Prabhakaran, J. Venugopal, C. K. Chan, and S. Ramakrishna, "Surface modified electrospun nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering," *Nanotechnology*, 2008, doi: 10.1088/0957-4484/19/45/455102.
- [268] G. Jin, M. P. Prabhakaran, D. Kai, S. K. Annamalai, K. D. Arunachalam, and S.

- Ramakrishna, "Tissue engineered plant extracts as nanofibrous wound dressing," *Biomaterials*, 2013, doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.10.026.
- [269] J. M. Holzwarth and P. X. Ma, "Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering," *Biomaterials*. 2011, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.009.
- [270] X. Wang, B. Ding, and B. Li, "Biomimetic electrospun nanofibrous structures for tissue engineering," *Materials Today*. 2013, doi: 10.1016/j.mattod.2013.06.005.
- [271] L. Ghasemi-Mobarakeh, M. P. Prabhakaran, M. Morshed, M. H. Nasr-Esfahani, and S. Ramakrishna, "Electrospun poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering," *Biomaterials*, 2008, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.08.007.
- [272] D. Liang, B. S. Hsiao, and B. Chu, "Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications," *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007, doi: 10.1016/j.addr.2007.04.021.
- [273] D. Sundaramurthi, U. M. Krishnan, and S. Sethuraman, "Electrospun nanofibers as scaffolds for skin tissue engineering," *Polymer Reviews*. 2014, doi: 10.1080/15583724.2014.881374.
- [274] J. Xie, M. R. MacEwan, A. G. Schwartz, and Y. Xia, "Electrospun nanofibers for neural tissue engineering," *Nanoscale*, 2010, doi: 10.1039/b9nr00243j.
- [275] M. P. Prabhakaran, J. Venugopal, and S. Ramakrishna, "Electrospun nanostructured scaffolds for bone tissue engineering," *Acta Biomater.*, 2009, doi: 10.1016/j.actbio.2009.05.007.
- [276] C. J. Thompson, G. G. Chase, A. L. Yarin, and D. H. Reneker, "Effects of parameters on nanofiber diameter determined from electrospinning model," *Polymer (Guildf)*., 2007, doi: 10.1016/j.polymer.2007.09.017.
- [277] C. Wang, C. H. Hsu, and J. H. Lin, "Scaling laws in electrospinning of polystyrene solutions," *Macromolecules*, 2006, doi: 10.1021/ma060866a.
- [278] H. W. Tong and M. Wang, "Electrospinning of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) fibrous scaffolds for tissue engineering applications: Effects

- of electrospinning parameters and solution properties," *J. Macromol. Sci. Part B Phys.*, 2011, doi: 10.1080/00222348.2010.541008.
- [279] D. S. Katti, K. W. Robinson, F. K. Ko, and C. T. Laurencin, "Bioresorbable nanofiber-based systems for wound healing and drug delivery: Optimization of fabrication parameters," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, 2004, doi: 10.1002/jbm.b.30041.
- [280] B. Pant, M. Park, and S. J. Park, "Drug delivery applications of core-sheath nanofibers prepared by coaxial electrospinning: A review," *Pharmaceutics*. 2019, doi: 10.3390/pharmaceutics11070305.
- [281] K. Nasouri, A. M. Shoushtari, and M. R. M. Mojtahedi, "Effects of polymer/solvent systems on electrospun polyvinylpyrrolidone nanofiber morphology and diameter," *Polym. Sci. - Ser. A*, 2015, doi: 10.1134/S0965545X15060164.
- [282] H. M. Khanlou, A. Sadollah, B. C. Ang, J. H. Kim, S. Talebian, and A. Ghadimi, "Prediction and optimization of electrospinning parameters for polymethyl methacrylate nanofiber fabrication using response surface methodology and artificial neural networks," *Neural Comput. Appl.*, 2014, doi: 10.1007/s00521-014-1554-8.
- [283] F. Cengiz-Çallioğlu, "Dextran nanofiber production by needleless electrospinning process," *E-Polymers*, 2014, doi: 10.1515/epoly-2013-0021.
- [284] T. Volova, D. Goncharov, A. Sukovatyi, A. Shabanov, E. Nikolaeva, and E. Shishatskaya, "Electrospinning of polyhydroxyalkanoate fibrous scaffolds: Effects on electrospinning parameters on structure and properties," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2014, doi: 10.1080/09205063.2013.862400.
- [285] L. Wei, Q. Qiu, R. Wang, and X. Qin, "Influence of the processing parameters on needleless electrospinning from double ring slits spinneret using response surface methodology," *J. Appl. Polym. Sci.*, 2018, doi: 10.1002/app.46407.
- [286] H. Maleki, A. A. Gharehaghaji, and P. J. Dijkstra, "A novel honey-based nanofibrous scaffold for wound dressing application," *J. Appl. Polym. Sci.*, 2013, doi: 10.1002/app.37601.

- [287] C. Kriegel, K. M. Kit, D. J. McClements, and J. Weiss, "Influence of surfactant type and concentration on electrospinning of chitosan-poly(ethylene oxide) blend nanofibers," *Food Biophys.*, 2009, doi: 10.1007/s11483-009-9119-6.
- [288] C. Kriegel, K. M. Kit, D. J. McClements, and J. Weiss, "Electrospinning of chitosan-poly(ethylene oxide) blend nanofibers in the presence of micellar surfactant solutions," *Polymer (Guildf.)*, 2009, doi: 10.1016/j.polymer.2008.09.041.
- [289] A. N. Sohi, H. Naderi-Manesh, M. Soleimani, S. Mirzaei, M. Delbari, and M. Dodel, "Influence of Chitosan Molecular Weight and Poly(ethylene oxide): Chitosan Proportion on Fabrication of Chitosan Based Electrospun Nanofibers," *Polym. Sci. - Ser. A*, 2018, doi: 10.1134/S0965545X18040077.
- [290] S. Y. Gu, J. Ren, and G. J. Vancso, "Process optimization and empirical modeling for electrospun polyacrylonitrile (PAN) nanofiber precursor of carbon nanofibers," *Eur. Polym. J.*, 2005, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2005.05.008.
- [291] H. Shao, J. Fang, H. Wang, and T. Lin, "Effect of electrospinning parameters and polymer concentrations on mechanical-to-electrical energy conversion of randomly-oriented electrospun poly(vinylidene fluoride) nanofiber mats," *RSC Adv.*, 2015, doi: 10.1039/c4ra16360e.
- [292] N. Amiraliyan, M. Nouri, and M. H. Kish, "Effects of some electrospinning parameters on morphology of Natural silk-based nanofibers," *J. Appl. Polym. Sci.*, 2009, doi: 10.1002/app.29808.
- [293] N. T. B. Linh, Y. K. Min, H. Y. Song, and B. T. Lee, "Fabrication of polyvinyl alcohol/gelatin nanofiber composites and evaluation of their material properties," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, 2010, doi: 10.1002/jbm.b.31701.
- [294] S. L. Shenoy, W. D. Bates, and G. Wnek, "Correlations between electrospinnability and physical gelation," *Polymer (Guildf.)*, 2005, doi: 10.1016/j.polymer.2005.06.053.
- [295] H. Liu and T. J. Webster, "Bioinspired nanocomposites for orthopedic applications," in *Nanotechnology for the Regeneration of Hard and Soft Tissues*, 2007.

- [296] J. H. Jang, O. Castano, and H. W. Kim, "Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering," *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009, doi: 10.1016/j.addr.2009.07.008.
- [297] C. Li, C. Vepari, H. J. Jin, H. J. Kim, and D. L. Kaplan, "Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering," *Biomaterials*, 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.022.
- [298] L. Ghasemi-Mobarakeh, M. P. Prabhakaran, M. Morshed, M. H. Nasr-Esfahani, and S. Ramakrishna, "Electrical stimulation of nerve cells using conductive nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering," *Tissue Eng. - Part A*, 2009, doi: 10.1089/ten.tea.2008.0689.
- [299] W. J. Li, R. L. Mauck, J. A. Cooper, X. Yuan, and R. S. Tuan, "Engineering controllable anisotropy in electrospun biodegradable nanofibrous scaffolds for musculoskeletal tissue engineering," *J. Biomech.*, 2007, doi: 10.1016/j.jbiomech.2006.09.004.
- [300] S. Koombhongse, W. Liu, and D. H. Reneker, "Flat polymer ribbons and other shapes by electrospinning," *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, 2001, doi: 10.1002/polb.10015.
- [301] B. Ksapabutr, T. Chalermkiti, and M. Panapoy, "Effect of Nozzle Shapes on the Formation of Taylor Cone and the Oscillation of Fibers During Electrospinning Process," *C. J. Spec. Issue Nanotechnol.*, 2005.
- [302] L. Härdelin, J. Thunberg, E. Perzon, G. Westman, P. Walkenström, and P. Gatenholm, "Electrospinning of cellulose nanofibers from ionic liquids: The effect of different cosolvents," *J. Appl. Polym. Sci.*, 2012, doi: 10.1002/app.36323.
- [303] T. Uyar and F. Besenbacher, "Electrospinning of cyclodextrin functionalized polyethylene oxide (PEO) nanofibers," *Eur. Polym. J.*, 2009, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2008.12.024.
- [304] Y. Yao, P. Zhu, H. Ye, A. Niu, X. Gao, and D. Wu, "Polysulfone nanofibers prepared by electrospinning and gas/jet- electrospinning," *Front. Chem. China*, 2006, doi: 10.1007/s11458-006-0041-4.

- [305] T. Uyar and F. Besenbacher, "Electrospinning of uniform polystyrene fibers: The effect of solvent conductivity," *Polymer (Guildf)*., 2008, doi: 10.1016/j.polymer.2008.09.025.
- [306] S. Xu, J. Zhang, A. He, J. Li, H. Zhang, and C. C. Han, "Electrospinning of native cellulose from nonvolatile solvent system," *Polymer (Guildf)*., 2008, doi: 10.1016/j.polymer.2008.04.046.
- [307] L. Van Der Schueren, I. Steyaert, B. De Schoenmaker, and K. De Clerck, "Polycaprolactone/chitosan blend nanofibres electrospun from an acetic acid/formic acid solvent system," *Carbohydr. Polym.*, 2012, doi: 10.1016/j.carbpol.2012.01.085.
- [308] I. S. Chronakis, S. Grapenson, and A. Jakob, "Conductive polypyrrole nanofibers via electrospinning: Electrical and morphological properties," *Polymer (Guildf)*., 2006, doi: 10.1016/j.polymer.2006.01.032.
- [309] R. S. Bhattarai, R. D. Bachu, S. H. S. Boddu, and S. Bhaduri, "Biomedical applications of electrospun nanofibers: Drug and nanoparticle delivery," *Pharmaceutics*. 2019, doi: 10.3390/pharmaceutics11010005.
- [310] H. Itoh, Y. Li, K. H. K. Chan, and M. Kotaki, "Morphology and mechanical properties of PVA nanofibers spun by free surface electrospinning," *Polym. Bull.*, 2016, doi: 10.1007/s00289-016-1620-8.
- [311] H. Niu, X. Wang, and T. Li, "Needleless Electrospinning: Developments and Performances," in *Nanofibers - Production, Properties and Functional Applications*, 2011.
- [312] R. Casasola, N. L. Thomas, and S. Georgiadou, "Electrospinning of poly(lactic acid): Theoretical approach for the solvent selection to produce defect-free nanofibers," *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, 2016, doi: 10.1002/polb.24042.
- [313] J. W. Lu, Y. L. Zhu, Z. X. Guo, P. Hu, and J. Yu, "Electrospinning of sodium alginate with poly(ethylene oxide)," *Polymer (Guildf)*., 2006, doi: 10.1016/j.polymer.2006.09.027.
- [314] J. Miao, M. Miyauchi, T. J. Simmons, J. S. Dordick, and R. J. Linhardt, "Electrospinning of nanomaterials and applications in electronic components

- and devices," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2010, doi: 10.1166/jnn.2010.3073.
- [315] S. Cavaliere, S. Subianto, I. Savych, D. J. Jones, and J. Rozière, "Electrospinning: Designed architectures for energy conversion and storage devices," *Energy and Environmental Science*. 2011, doi: 10.1039/c1ee02201f.
- [316] X. Li, Y. Chen, H. Huang, Y. W. Mai, and L. Zhou, "Electrospun carbon-based nanostructured electrodes for advanced energy storage - A review," *Energy Storage Materials*. 2016, doi: 10.1016/j.ensm.2016.06.002.
- [317] M. Inagaki, Y. Yang, and F. Kang, "Carbon nanofibers prepared via electrospinning," *Advanced Materials*. 2012, doi: 10.1002/adma.201104940.
- [318] M. M. Hohman, M. Shin, G. Rutledge, and M. P. Brenner, "Electrospinning and electrically forced jets. II. Applications," *Phys. Fluids*, 2001, doi: 10.1063/1.1384013.
- [319] B. Kim, H. Park, S. H. Lee, and W. M. Sigmund, "Poly(acrylic acid) nanofibers by electrospinning," *Mater. Lett.*, 2005, doi: 10.1016/j.matlet.2004.11.032.
- [320] C. J. Angammana and S. H. Jayaram, "Analysis of the effects of solution conductivity on electrospinning process and fiber morphology," *IEEE Trans. Ind. Appl.*, 2011, doi: 10.1109/TIA.2011.2127431.
- [321] S. A. Theron, E. Zussman, and A. L. Yarin, "Experimental investigation of the governing parameters in the electrospinning of polymer solutions," *Polymer (Guildf)*., 2004, doi: 10.1016/j.polymer.2004.01.024.
- [322] J. Ma *et al.*, "Thermal conductivity of electrospun polyethylene nanofibers," *Nanoscale*, 2015, doi: 10.1039/c5nr04995d.
- [323] S. H. Tan, R. Inai, M. Kotaki, and S. Ramakrishna, "Systematic parameter study for ultra-fine fiber fabrication via electrospinning process," *Polymer (Guildf)*., 2005, doi: 10.1016/j.polymer.2005.05.068.
- [324] M. M. Hohman, M. Shin, G. Rutledge, and M. P. Brenner, "Electrospinning and electrically forced jets. I. Stability theory," *Phys. Fluids*, 2001, doi: 10.1063/1.1383791.
- [325] J. Zeng *et al.*, "Influence of the drug compatibility with polymer solution on the release kinetics of electrospun fiber formulation," *J. Control. Release*, 2005,

doi: 10.1016/j.jconrel.2005.02.024.

- [326] J. Doshi and D. H. Reneker, "Electrospinning process and applications of electrospun fibers," 1993, doi: 10.1109/ias.1993.299067.
- [327] Y. Z. Long, X. Yan, X. X. Wang, J. Zhang, and M. Yu, "Electrospinning," in *Electrospinning: Nanofabrication and Applications*, 2018.
- [328] S. Ramakrishna, K. Fujihara, W. E. Teo, T. C. Lim, and Z. Ma, *An introduction to electrospinning and nanofibers*. 2005.
- [329] A. Greiner and J. H. Wendorff, "Electrospinning: A fascinating method for the preparation of ultrathin fibers," *Angewandte Chemie - International Edition*. 2007, doi: 10.1002/anie.200604646.
- [330] B. Cramariuc, R. Cramariuc, R. Scarlet, L. R. Manea, I. G. Lupu, and O. Cramariuc, "Fiber diameter in electrospinning process," *J. Electrostat.*, 2013, doi: 10.1016/j.elstat.2012.12.018.
- [331] A. L. Yarin, "Coaxial electrospinning and emulsion electrospinning of core-shell fibers," *Polymers for Advanced Technologies*. 2011, doi: 10.1002/pat.1781.
- [332] S. De Vrieze, T. Van Camp, A. Nelvig, B. Hagström, P. Westbroek, and K. De Clerck, "The effect of temperature and humidity on electrospinning," *J. Mater. Sci.*, 2009, doi: 10.1007/s10853-008-3010-6.
- [333] T. A. Kowalewski, S. Błoński, and S. Barral, "Experiments and modelling of electrospinning process," *Bull. Polish Acad. Sci. Tech. Sci.*, 2005.
- [334] S. Ramakrishna, K. Fujihara, W.-E. Teo, T.-C. Lim, and Z. Ma, "Electrospinning Process," in *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*, 2005.
- [335] K. Sarkar *et al.*, "Electrospinning to Forcespinning™," *Mater. Today*, 2010, doi: 10.1016/S1369-7021(10)70199-1.
- [336] Z. Li and C. Wang, "Effects of Working Parameters on Electrospinning," 2013.
- [337] A. L. Yarin, S. Koombhongse, and D. H. Reneker, "Bending instability in electrospinning of nanofibers," *J. Appl. Phys.*, 2001, doi: 10.1063/1.1333035.
- [338] D. Sun, C. Chang, S. Li, and L. Lin, "Near-field electrospinning," *Nano Lett.*, 2006,

doi: 10.1021/nl0602701.

- [339] J. Pelipenko, J. Kristl, B. Janković, S. Baumgartner, and P. Kocbek, "The impact of relative humidity during electrospinning on the morphology and mechanical properties of nanofibers," *Int. J. Pharm.*, 2013, doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.07.078.
- [340] C. L. Casper, J. S. Stephens, N. G. Tassi, D. B. Chase, and J. F. Rabolt, "Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers: Effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process," *Macromolecules*, 2004, doi: 10.1021/ma0351975.
- [341] T. D. Brown, P. D. Dalton, and D. W. Hutmacher, "Melt electrospinning today: An opportune time for an emerging polymer process," *Progress in Polymer Science*. 2016, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2016.01.001.
- [342] A. K. Haghi and M. Akbari, "Trends in electrospinning of natural nanofibers," 2007, doi: 10.1002/pssa.200675301.
- [343] N. Tucker, J. J. Stanger, M. P. Staiger, H. Razzaq, and K. Hofman, "The history of the science and technology of electrospinning from 1600 to 1995," *J. Eng. Fiber. Fabr.*, 2012, doi: 10.1177/155892501200702s10.
- [344] X. Lu, C. Wang, and Y. Wei, "One-dimensional composite nanomaterials: Synthesis by electrospinning and their applications," *Small*. 2009, doi: 10.1002/sml.200900445.
- [345] Y. M. Shin, M. M. Hohman, M. P. Brenner, and G. C. Rutledge, "Experimental characterization of electrospinning: The electrically forced jet and instabilities," *Polymer (Guildf)*., 2001, doi: 10.1016/s0032-3861(01)00540-7.
- [346] H. Homayoni, S. A. H. Ravandi, and M. Valizadeh, "Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization," *Carbohydr. Polym.*, 2009, doi: 10.1016/j.carbp.2009.02.008.
- [347] H.-S. Wang, G.-D. Fu, and X.-S. Li, "Functional Polymeric Nanofibers from Electrospinning," *Recent Pat. Nanotechnol.*, 2008, doi: 10.2174/187221009787003285.
- [348] G. E. Wnek, M. E. Carr, D. G. Simpson, and G. L. Bowlin, "Electrospinning of

- nanofiber fibrinogen structures," *Nano Lett.*, 2003, doi: 10.1021/nl025866c.
- [349] R. Ramaseshan, S. Sundarrajan, R. Jose, and S. Ramakrishna, "Nanostructured ceramics by electrospinning," *J. Appl. Phys.*, 2007, doi: 10.1063/1.2815499.
- [350] A. Rogina, "Electrospinning process: Versatile preparation method for biodegradable and natural polymers and biocomposite systems applied in tissue engineering and drug delivery," *Appl. Surf. Sci.*, 2014, doi: 10.1016/j.apsusc.2014.01.098.
- [351] S. Ramakrishna, K. Fujihara, W.-E. Teo, T.-C. Lim, and Z. Ma, *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*. 2010.
- [352] N. A. M. Barakat, M. A. Kanjwal, F. A. Sheikh, and H. Y. Kim, "Spider-net within the N6, PVA and PU electrospun nanofiber mats using salt addition: Novel strategy in the electrospinning process," *Polymer (Guildf.)*, 2009, doi: 10.1016/j.polymer.2009.07.005.
- [353] W. Zuo, M. Zhu, W. Yang, H. Yu, Y. Chen, and Y. Zhang, "Experimental study on relationship between jet instability and formation of beaded fibers during electrospinning," *Polym. Eng. Sci.*, 2005, doi: 10.1002/pen.20304.
- [354] K. Kim, J. Kim, and H. Shim, "Fiber formation model for PVP (polyvinyl pyrrolidone) electrospinning. I. Critical voltage," *Fibers Polym.*, 2017, doi: 10.1007/s12221-017-5617-1.
- [355] H. Fong, "The study of electrospinning and the physical properties of electrospun nanofibers," *ProQuest Diss. Theses*, 1999.
- [356] A. L. Yarin, W. Kataphinan, and D. H. Reneker, "Branching in electrospinning of nanofibers," *J. Appl. Phys.*, 2005, doi: 10.1063/1.2060928.
- [357] M. Halabi *et al.*, "Electrospun anion-conducting ionomer fibers-effect of humidity on final properties," *Polymers (Basel)*, 2020, doi: 10.3390/POLYM12051020.
- [358] M. G. McKee and T. E. Long, "Implication of hydrogen bonding on rheological/electrospinning relationships," *Abstr. Pap. 228th ACS Natl. Meet. Philadelphia, PA, United States, August 22-26, 2004*, 2004.
- [359] Y. Xin and D. H. Reneker, "Garland formation process in electrospinning,"

- Polymer (Guildf).*, 2012, doi: 10.1016/j.polymer.2012.05.060.
- [360] N. Okutan, P. Terzi, and F. Altay, "Affecting parameters on electrospinning process and characterization of electrospun gelatin nanofibers," *Food Hydrocoll.*, 2014, doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.12.022.
- [361] Y.-M. Lim, H.-J. Gwon, J. Pyo, and Y.-C. Nho, "Preparation of Cellulose-based Nanofibers Using Electrospinning," in *Nanofibers*, 2010.
- [362] T. Wang and S. Kumar, "Electrospinning of polyacrylonitrile nanofibers," *J. Appl. Polym. Sci.*, 2006, doi: 10.1002/app.24123.
- [363] X. M. Mo, C. Y. Xu, M. Kotaki, and S. Ramakrishna, "Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: A biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation," *Biomaterials*, 2004, doi: 10.1016/j.biomaterials.2003.08.042.
- [364] G. S. Bisht *et al.*, "Controlled continuous patterning of polymeric nanofibers on three-dimensional substrates using low-voltage near-field electrospinning," *Nano Lett.*, 2011, doi: 10.1021/nl2006164.
- [365] K. S. Athira, P. Sanpui, and K. Chatterjee, "Fabrication of Poly(Caprolactone) Nanofibers by Electrospinning," *J. Polym. Biopolym. Phys. Chem.*, 2014.
- [366] B. P. Sautter, "Continuous Polymer Nanofibers Using Electrospinning," *Mech. Eng.*, 2005.
- [367] S. Zargham, S. Bazgir, A. Tavakoli, A. S. Rashidi, and R. Damerchely, "The effect of flow rate on morphology and deposition area of electrospun nylon 6 nanofiber," *J. Eng. Fiber. Fabr.*, 2012, doi: 10.1177/155892501200700414.
- [368] D. Kai, S. S. Liow, and X. J. Loh, "Biodegradable polymers for electrospinning: Towards biomedical applications," *Mater. Sci. Eng. C*, 2015, doi: 10.1016/j.msec.2014.04.051.
- [369] S. J. Doh, C. Kim, S. G. Lee, S. J. Lee, and H. Kim, "Development of photocatalytic TiO₂ nanofibers by electrospinning and its application to degradation of dye pollutants," *J. Hazard. Mater.*, 2008, doi: 10.1016/j.jhazmat.2007.09.118.
- [370] A. L. Yarin and E. Zussman, "Upward needleless electrospinning of multiple nanofibers," *Polymer (Guildf).*, 2004, doi: 10.1016/j.polymer.2004.02.066.

- [371] E. S. Medeiros, G. M. Glenn, A. P. Klamczynski, W. J. Orts, and L. H. C. Mattoso, "Solution blow spinning: A new method to produce micro- and nanofibers from polymer solutions," *J. Appl. Polym. Sci.*, 2009, doi: 10.1002/app.30275.
- [372] H. Niu and T. Lin, "Fiber generators in needleless electrospinning," *Journal of Nanomaterials*. 2012, doi: 10.1155/2012/725950.
- [373] S. S. S. Bakar, K. C. Fong, A. Eleyas, and M. F. M. Nazeri, "Effect of Voltage and Flow Rate Electrospinning Parameters on Polyacrylonitrile Electrospun Fibers," 2018, doi: 10.1088/1757-899X/318/1/012076.
- [374] L. Y. Yeo and J. R. Friend, "Electrospinning carbon nanotube polymer composite nanofibers," *J. Exp. Nanosci.*, 2006, doi: 10.1080/17458080600670015.
- [375] D. Li and Y. Xia, "Fabrication of titania nanofibers by electrospinning," *Nano Lett.*, 2003, doi: 10.1021/nl034039o.
- [376] N. Nikmaram *et al.*, "Emulsion-based systems for fabrication of electrospun nanofibers: Food, pharmaceutical and biomedical applications," *RSC Advances*. 2017, doi: 10.1039/c7ra00179g.
- [377] J. E. Díaz, A. Barrero, M. Márquez, and I. G. Loscertales, "Controlled encapsulation of hydrophobic liquids in hydrophilic polymer nanofibers by co-electrospinning," *Adv. Funct. Mater.*, 2006, doi: 10.1002/adfm.200600204.
- [378] F. L. Zhou, R. H. Gong, and I. Porat, "Needle and needleless electrospinning for nanofibers," *J. Appl. Polym. Sci.*, 2010, doi: 10.1002/app.31282.
- [379] L. Huang, K. Nagapudi, P. R. Apkarian, and E. L. Chaikof, "Engineered collagen - PEO nanofibers and fabrics," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2001, doi: 10.1163/156856201753252516.
- [380] G. G. Chase, J. S. Varabhas, and D. H. Reneker, "New methods to electrospin nanofibers," *J. Eng. Fiber. Fabr.*, 2011, doi: 10.1177/155892501100600304.
- [381] Y. Liu, S. Zhou, Y. Gao, and Y. Zhai, "Electrospun nanofibers as a wound dressing for treating diabetic foot ulcer," *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019, doi: 10.1016/j.ajps.2018.04.004.
- [382] M. Ziabari, V. Mottaghitlab, and A. K. Haghi, "A new approach for optimization

- of electrospun nanofiber formation process," *Korean J. Chem. Eng.*, 2010, doi: 10.1007/s11814-009-0309-1.
- [383] H. Zhuo, J. Hu, S. Chen, and L. Yeung, "Preparation of polyurethane nanofibers by electrospinning," *J. Appl. Polym. Sci.*, 2008, doi: 10.1002/app.28067.
- [384] S. Haider *et al.*, "Highly aligned narrow diameter chitosan electrospun nanofibers," *J. Polym. Res.*, 2013, doi: 10.1007/s10965-013-0105-9.
- [385] K. Rodríguez, P. Gatenholm, and S. Renneckar, "Electrospinning cellulosic nanofibers for biomedical applications: Structure and in vitro biocompatibility," *Cellulose*, 2012, doi: 10.1007/s10570-012-9734-0.
- [386] R. S. Barhate, C. K. Loong, and S. Ramakrishna, "Preparation and characterization of nanofibrous filtering media," *J. Memb. Sci.*, 2006, doi: 10.1016/j.memsci.2006.06.030.
- [387] H. Wu, D. Lin, and W. Pan, "Fabrication, assembly, and electrical characterization of CuO nanofibers," *Appl. Phys. Lett.*, 2006, doi: 10.1063/1.2355474.
- [388] P. Katta, M. Alessandro, R. D. Ramsier, and G. G. Chase, "Continuous electrospinning of aligned polymer nanofibers onto a wire drum collector," *Nano Lett.*, 2004, doi: 10.1021/nl0486158.
- [389] M. K. Leach, Z. Q. Feng, S. J. Tuck, and J. M. Corey, "Electrospinning fundamentals: Optimizing solution and apparatus parameters," *J. Vis. Exp.*, 2010, doi: 10.3791/2494.
- [390] D. Li, G. Ouyang, J. T. McCann, and Y. Xia, "Collecting electrospun nanofibers with patterned electrodes," *Nano Lett.*, 2005, doi: 10.1021/nl0504235.
- [391] T. Röcker and A. Greiner, "Electrospinning of poly-L-lactide nanofibers on liquid reservoir collectors," *E-Polymers*, 2008, doi: 10.1515/epoly.2008.8.1.1268.
- [392] D. A. Schmatz, J. A. V. Costa, and M. G. de Moraes, "A novel nanocomposite for food packaging developed by electrospinning and electrospraying," *Food Packag. Shelf Life*, 2019, doi: 10.1016/j.fpsl.2019.100314.
- [393] S. Manandhar, S. Vidhate, and N. D'Souza, "Water soluble levan polysaccharide

- biopolymer electrospun fibers," *Carbohydr. Polym.*, 2009, doi: 10.1016/j.carbpol.2009.06.023.
- [394] Y. Wang, H. Li, G. Wang, T. Yin, B. Wang, and Q. Yu, "Electrospinning of polymer nanofibers with ordered patterns and architectures," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2010, doi: 10.1166/jnn.2010.2149.
- [395] X. Huang, D. Wu, Y. Zhu, and D. Sun, "Needleless electrospinning of multiple nanofibers," 2007, doi: 10.1109/NANO.2007.4601311.
- [396] N. M. Aruan, I. Sriyanti, D. Edikresnha, T. Suciati, M. M. Munir, and K. Khairurrijal, "Polyvinyl Alcohol/Soursop Leaves Extract Composite Nanofibers Synthesized Using Electrospinning Technique and their Potential as Antibacterial Wound Dressing," 2017, doi: 10.1016/j.proeng.2017.03.006.
- [397] Y. E. Aguirre-Chagala, V. Altuzar, E. León-Sarabia, J. C. Tinoco-Magaña, J. M. Yañez-Limón, and C. Mendoza-Barrera, "Physicochemical properties of polycaprolactone/collagen/elastin nanofibers fabricated by electrospinning," *Mater. Sci. Eng. C*, 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.03.118.
- [398] D. Yang, J. Zhang, J. Zhang, and J. Nie, "Aligned electrospun nanofibers induced by magnetic field," *J. Appl. Polym. Sci.*, 2008, doi: 10.1002/app.28896.
- [399] S. Nangare, N. Jadhav, P. Ghagare, and T. Muthane, "Pharmaceutical applications of electrospinning," *Annales Pharmaceutiques Francaises*. 2020, doi: 10.1016/j.pharma.2019.07.002.
- [400] H. Rajabinejad, R. Khajavi, A. Rashidi, N. Mansouri, and M. E. Yazdanshenas, "Recycling of used bottle grade poly ethyleneterephthalate to nanofibers by melt-electrospinning method," *Int. J. Environ. Res.*, 2009.
- [401] K. Zhang, A. Barhoum, C. Xiaoqing, H. Li, and P. Samyn, "Cellulose Nanofibers: Fabrication and Surface Functionalization Techniques," in *Handbook of Nanofibers*, 2019.
- [402] M. R. Badrossamay *et al.*, "Engineering hybrid polymer-protein super-aligned nanofibers via rotary jet spinning," *Biomaterials*, 2014, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.12.072.
- [403] F. L. Zhou, R. H. Gong, and I. Porat, "Three-jet electrospinning using a flat

- spinneret," *J. Mater. Sci.*, 2009, doi: 10.1007/s10853-009-3768-1.
- [404] J. Y. Park, I. H. Lee, and G. N. Bea, "Optimization of the electrospinning conditions for preparation of nanofibers from polyvinylacetate (PVAc) in ethanol solvent," *J. Ind. Eng. Chem.*, 2008, doi: 10.1016/j.jiec.2008.03.006.
- [405] G. H. Kim, "Electrospinning process using field-controllable electrodes," *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, 2006, doi: 10.1002/polb.20814.
- [406] S. S. Esnaashari, S. Rezaei, E. Mirzaei, H. Afshari, S. M. Rezayat, and R. Faridi-Majidi, "Preparation and characterization of kefiran electrospun nanofibers," *Int. J. Biol. Macromol.*, 2014, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.06.014.
- [407] J. Rafique *et al.*, "Electrospinning highly aligned long polymer nanofibers on large scale by using a tip collector," *Appl. Phys. Lett.*, 2007, doi: 10.1063/1.2768871.
- [408] B. K. Gu, K. Sohn, S. J. Kim, and S. I. Kim, "Fabrications of nanofibers as crossed arrays by electrospinning," 2007, doi: 10.1166/jnn.2007.18102.
- [409] H. Bagheri, O. Rezvani, S. Zeinali, S. Asgari, T. G. Aqda, and F. Manshaei, "Electrospun nanofibers," in *Solid-Phase Extraction*, 2019.
- [410] E. Kostakova, M. Seps, P. Pokorny, and D. Lukas, "Study of polycaprolactone wet electrospinning process," *Express Polym. Lett.*, 2014, doi: 10.3144/expresspolymlett.2014.59.
- [411] D. Chen, Y. E. Miao, and T. Liu, "Electrically conductive polyaniline/polyimide nanofiber membranes prepared via a combination of electrospinning and subsequent in situ polymerization growth," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2013, doi: 10.1021/am303292y.
- [412] M. Pokorny, K. Niedoba, and V. Velebny, "Transversal electrostatic strength of patterned collector affecting alignment of electrospun nanofibers," *Appl. Phys. Lett.*, 2010, doi: 10.1063/1.3430507.
- [413] H. Schneider, J. Steuber, W. Du, M. Mortazavi, and D. Bullock, "Polyethylene Oxide Nanofiber Production by Electrospinning," *J. Ark. Acad. Sci.*, 2016.
- [414] S. S. Ojha, M. Afshari, R. Kotek, and R. E. Gorga, "Morphology of electrospun nylon-6 nanofibers as a function of molecular weight and processing

- parameters," *J. Appl. Polym. Sci.*, 2008, doi: 10.1002/app.27655.
- [415] E. Omollo, C. Zhang, J. I. Mwasiagi, and S. Ncube, "Electrospinning cellulose acetate nanofibers and a study of their possible use in high-efficiency filtration," *J. Ind. Text.*, 2016, doi: 10.1177/1528083714540696.
- [416] Y. R. Park *et al.*, "Three-dimensional electrospun silk-fibroin nanofiber for skin tissue engineering," *Int. J. Biol. Macromol.*, 2016, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.07.047.
- [417] M. X. Electrospinning, "Electrospinning of Crude Plant Extracts for Antibacterial and Wound Healing Applications: A Review," 2018.
- [418] L. A. Smith and P. X. Ma, "Nano-fibrous scaffolds for tissue engineering," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2004, doi: 10.1016/j.colsurfb.2003.12.004.
- [419] D. I. Braghirolli, D. Steffens, and P. Pranke, "Electrospinning for regenerative medicine: A review of the main topics," *Drug Discovery Today*. 2014, doi: 10.1016/j.drudis.2014.03.024.
- [420] E. D. Boland, J. A. Matthews, K. J. Pawlowski, D. G. Simpson, G. E. Wnek, and G. L. Bowlin, "Electrospinning collagen and elastin: Preliminary vascular tissue engineering," *Front. Biosci.*, 2004, doi: 10.2741/1313.
- [421] D. Lv *et al.*, "Green Electrospun Nanofibers and Their Application in Air Filtration," *Macromolecular Materials and Engineering*. 2018, doi: 10.1002/mame.201800336.
- [422] Q. Liu, J. Zhu, L. Zhang, and Y. Qiu, "Recent advances in energy materials by electrospinning," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2018, doi: 10.1016/j.rser.2017.05.281.
- [423] D. Gupta, J. Venugopal, S. Mitra, V. R. Giri Dev, and S. Ramakrishna, "Nanostructured biocomposite substrates by electrospinning and electrospraying for the mineralization of osteoblasts," *Biomaterials*, 2009, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.12.079.
- [424] J. M. Raquez, Y. Habibi, M. Murariu, and P. Dubois, "Polylactide (PLA)-based nanocomposites," *Progress in Polymer Science*. 2013, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2013.05.014.

- [425] O. Martin and L. Avérous, "Poly(lactic acid): Plasticization and properties of biodegradable multiphase systems," *Polymer (Guildf)*, 2001, doi: 10.1016/S0032-3861(01)00086-6.
- [426] J. Ahmed and S. K. Varshney, "Polylactides-chemistry, properties and green packaging technology: A review," *Int. J. Food Prop.*, 2011, doi: 10.1080/10942910903125284.
- [427] R. M. Rasal, A. V. Janorkar, and D. E. Hirt, "Poly(lactic acid) modifications," *Progress in Polymer Science (Oxford)*. 2010, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2009.12.003.
- [428] R. Auras, L. T. Lim, S. E. M. Selke, and H. Tsuji, *Poly(Lactic Acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications*. 2010.
- [429] A. J. R. Lasprilla, G. A. R. Martinez, B. H. Lunelli, A. L. Jardini, and R. M. Filho, "Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices - A review," *Biotechnology Advances*. 2012, doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.06.019.
- [430] D. E. Henton, P. Gruber, J. Lunt, and J. Randall, "Polylactic acid technology," in *Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites*, 2005.
- [431] M. Santoro, S. R. Shah, J. L. Walker, and A. G. Mikos, "Poly(lactic acid) nanofibrous scaffolds for tissue engineering," *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, doi: 10.1016/j.addr.2016.04.019.
- [432] A. Grémare *et al.*, "Characterization of printed PLA scaffolds for bone tissue engineering," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, 2018, doi: 10.1002/jbm.a.36289.
- [433] B. Tyler, D. Gullotti, A. Mangraviti, T. Utsuki, and H. Brem, "Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications," *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, doi: 10.1016/j.addr.2016.06.018.
- [434] R. P. Pawar, S. U. Tekale, S. U. Shisodia, J. T. Totre, and A. J. Domb, "Biomedical applications of poly(lactic acid)," *Rec. Pat. Regen. Med.*, 2014, doi: 10.2174/2210296504666140402235024.
- [435] Q. X. Tian, S. Q. Zhang, T. Wang, X. Q. Zhou, and D. F. Yin, "Preparation and electric-optical property of polymer dispersed liquid crystal devices," *Jiefangjun Ligong Daxue Xuebao/Journal PLA Univ. Sci. Technol. (Natural Sci.*

Ed., 2011.

- [436] R. A. Thakur, C. A. Florek, J. Kohn, and B. B. Michniak, "Electrospun nanofibrous polymeric scaffold with targeted drug release profiles for potential application as wound dressing," *Int. J. Pharm.*, 2008, doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.07.033.
- [437] Y. Okamura, K. Kabata, M. Kinoshita, D. Saitoh, and S. Takeoka, "Free-standing biodegradable poly(lactic acid) nanosheet for sealing operations in surgery," *Adv. Mater.*, 2009, doi: 10.1002/adma.200901035.
- [438] S. Chitrattha and T. Phaechamud, "Porous poly(dl-lactic acid) matrix film with antimicrobial activities for wound dressing application," *Mater. Sci. Eng. C*, 2016, doi: 10.1016/j.msec.2015.09.083.
- [439] A. Jouybar *et al.*, "Enhanced Skin Regeneration by Herbal Extract-Coated Poly-L-Lactic Acid Nanofibrous Scaffold," *Artif. Organs*, 2017, doi: 10.1111/aor.12926.
- [440] P. Saini, M. Arora, and M. N. V. R. Kumar, "Poly(lactic acid) blends in biomedical applications," *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, doi: 10.1016/j.addr.2016.06.014.
- [441] T. Casalini, F. Rossi, A. Castrovinci, and G. Perale, "A Perspective on Polylactic Acid-Based Polymers Use for Nanoparticles Synthesis and Applications," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2019, doi: 10.3389/fbioe.2019.00259.
- [442] L. T. Sin, R. R. Rahmat, and W. A. W. A. Rahman, *Polylactic Acid: PLA Biopolymer Technology and Applications*. 2012.
- [443] A. Kumari, S. K. Yadav, and S. C. Yadav, "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010, doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.09.001.
- [444] J. M. Anderson and M. S. Shive, "Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres," *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012, doi: 10.1016/j.addr.2012.09.004.
- [445] M. Murariu and P. Dubois, "PLA composites: From production to properties,"

- Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, doi: 10.1016/j.addr.2016.04.003.
- [446] Y. Ramot, M. Haim-Zada, A. J. Domb, and A. Nyska, "Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers," *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, doi: 10.1016/j.addr.2016.03.012.
- [447] K. Hamad, M. Kaseem, H. W. Yang, F. Deri, and Y. G. Ko, "Properties and medical applications of polylactic acid: A review," *Express Polym. Lett.*, 2015, doi: 10.3144/expresspolymlett.2015.42.
- [448] C. Wischke and S. P. Schwendeman, "Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles," *International Journal of Pharmaceutics*. 2008, doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.04.042.
- [449] Y. Cheng, S. Deng, P. Chen, and R. Ruan, "Polylactic acid (PLA) synthesis and modifications: A review," *Front. Chem. China*, 2009, doi: 10.1007/s11458-009-0092-x.
- [450] E. Fortunati *et al.*, "Multifunctional bionanocomposite films of poly(lactic acid), cellulose nanocrystals and silver nanoparticles," *Carbohydr. Polym.*, 2012, doi: 10.1016/j.carbpol.2011.09.066.
- [451] X. An, H. Ma, B. Liu, and J. Wang, "Graphene oxide reinforced polylactic acid/polyurethane antibacterial composites," *J. Nanomater.*, 2013, doi: 10.1155/2013/373414.
- [452] F. Kayaci, O. C. O. Umu, T. Tekinay, and T. Uyar, "Antibacterial electrospun poly(lactic acid) (PLA) nanofibrous webs incorporating triclosan/cyclodextrin inclusion complexes," *J. Agric. Food Chem.*, 2013, doi: 10.1021/jf400440b.
- [453] Y. Ning, A. Yan, K. Yang, Z. Wang, X. Li, and Y. Jia, "Antibacterial activity of phenyllactic acid against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* by dual mechanisms," *Food Chem.*, 2017, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.01.112.
- [454] R. Auras, B. Harte, and S. Selke, "An overview of polylactides as packaging materials," *Macromolecular Bioscience*. 2004, doi: 10.1002/mabi.200400043.
- [455] L. T. Lim, R. Auras, and M. Rubino, "Processing technologies for poly(lactic acid)," *Progress in Polymer Science (Oxford)*. 2008, doi:

10.1016/j.progpolymsci.2008.05.004.

- [456] Z. Song, H. Xiao, and Y. Zhao, "Hydrophobic-modified nano-cellulose fiber/PLA biodegradable composites for lowering water vapor transmission rate (WVTR) of paper," *Carbohydr. Polym.*, 2014, doi: 10.1016/j.carbpol.2014.04.049.
- [457] N. E. Suyatma, A. Copinet, L. Tighzert, and V. Coma, "Mechanical and barrier properties of biodegradable films made from chitosan and poly (lactic acid) blends," *J. Polym. Environ.*, 2004, doi: 10.1023/B:JOOE.0000003121.12800.4e.
- [458] X. Y. Xiong, K. C. Tam, and L. H. Gan, "Release kinetics of hydrophobic and hydrophilic model drugs from pluronic F127/poly(lactic acid) nanoparticles," *J. Control. Release*, 2005, doi: 10.1016/j.jconrel.2004.11.018.
- [459] M. L. Sanyang, S. M. Sapuan, M. Jawaid, M. R. Ishak, and J. Sahari, "Development and characterization of sugar palm starch and poly(lactic acid) bilayer films," *Carbohydr. Polym.*, 2016, doi: 10.1016/j.carbpol.2016.03.051.
- [460] L. C. Lins *et al.*, "Development of Bioresorbable Hydrophilic-Hydrophobic Electrospun Scaffolds for Neural Tissue Engineering," *Biomacromolecules*, 2016, doi: 10.1021/acs.biomac.6b00820.
- [461] G. L. Siparsky, K. J. Voorhees, J. R. Dorgan, and K. Schilling, "Water transport in polylactic acid (PLA), PLA/polycaprolactone copolymers, and PLA/polyethylene glycol blends," *J. Environ. Polym. Degrad.*, 1997, doi: 10.1007/BF02763656.
- [462] J. K. Oh, "Polylactide (PLA)-based amphiphilic block copolymers: Synthesis, self-assembly, and biomedical applications," *Soft Matter*. 2011, doi: 10.1039/c0sm01539c.
- [463] M. Nofar, D. Sacligil, P. J. Carreau, M. R. Kamal, and M. C. Heuzey, "Poly (lactic acid) blends: Processing, properties and applications," *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.002.
- [464] C. Shasteen and Y. Bin Choy, "Controlling degradation rate of poly(lactic acid) for its biomedical applications," *Biomedical Engineering Letters*. 2011, doi: 10.1007/s13534-011-0025-8.

- [465] E. M. Elmowafy, M. Tiboni, and M. E. Soliman, "Biocompatibility, biodegradation and biomedical applications of poly(lactic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid) micro and nanoparticles," *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2019, doi: 10.1007/s40005-019-00439-x.
- [466] L. Lim, R. Auras, and M. Rubino, "Progress in Polymer Science Processing technologies for poly (lactic acid)," *Prog. Polym. Sci.*, 2008, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2008.05.004.
- [467] K. Song, Q. Wu, Y. Qi, and T. Kärki, "Electrospun nanofibers with antimicrobial properties," in *Electrospun Nanofibers*, 2016.
- [468] N. M. Barkoula, S. K. Garkhail, and T. Peijs, "Effect of compounding and injection molding on the mechanical properties of flax fiber polypropylene composites," *J. Reinf. Plast. Compos.*, 2010, doi: 10.1177/0731684409104465.
- [469] Y. Ikada and H. Tsuji, "Biodegradable polyesters for medical and ecological applications," *Macromol. Rapid Commun.*, 2005, doi: 10.1002/(sici)1521-3927(20000201)21:3<117::aid-marc117>3.0.co;2-x.
- [470] G. A. Kanani and H. S. Bahrami, "Review on electrospun nanofibers scaffold and biomedical applications," *Trends Biomater. Artif. Organs*, 2010.
- [471] O. Regev, S. Vandebriel, E. Zussman, and C. Clasen, "The role of interfacial viscoelasticity in the stabilization of an electrospun jet," *Polymer (Guildf)*., 2010, doi: 10.1016/j.polymer.2010.03.061.
- [472] R. Rošic, J. Pelipenko, P. Kocbek, S. Baumgartner, M. Bešter-Rogač, and J. Kristl, "The role of rheology of polymer solutions in predicting nanofiber formation by electrospinning," *Eur. Polym. J.*, 2012, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2012.05.001.
- [473] C. Meechaisue, R. Dubin, P. Supaphol, V. P. Hoven, and J. Kohn, "Electrospun mat of tyrosine-derived polycarbonate fibers for potential use as tissue scaffolding material," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2006, doi: 10.1163/156856206778365988.
- [474] Q. Yang *et al.*, "Influence of solvents on the formation of ultrathin uniform poly(vinyl pyrrolidone) nanofibers with electrospinning," *J. Polym. Sci. Part B*

Polym. Phys., 2004, doi: 10.1002/polb.20222.

- [475] W. K. Son, J. H. Youk, T. S. Lee, and W. H. Park, "The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly(ethylene oxide) fibers," *Polymer (Guildf)*, 2004, doi: 10.1016/j.polymer.2004.03.006.
- [476] T. Jarusuwannapoom *et al.*, "Effect of solvents on electro-spinnability of polystyrene solutions and morphological appearance of resulting electrospun polystyrene fibers," *Eur. Polym. J.*, 2005, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2004.10.010.
- [477] I. S. Bayer, "Thermomechanical properties of polylactic acid-graphene composites: A state-of-the-art review for biomedical applications," *Materials*, 2017, doi: 10.3390/ma10070748.
- [478] C. Cheng, S. Li, A. Thomas, N. A. Kotov, and R. Haag, "Functional Graphene Nanomaterials Based Architectures: Biointeractions, Fabrications, and Emerging Biological Applications," *Chemical Reviews*, 2017, doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00520.
- [479] F. De Maio *et al.*, "Graphene oxide prevents mycobacteria entry into macrophages through extracellular entrapment," *Nanoscale Adv.*, 2019, doi: 10.1039/c8na00413g.
- [480] S. Ruiz *et al.*, "Antimicrobial films based on nanocomposites of chitosan/poly(Vinyl alcohol)/graphene oxide for biomedical applications," *Biomolecules*, 2019, doi: 10.3390/biom9030109.
- [481] A. B. Alayande, M. Obaid, and I. S. Kim, "Antimicrobial mechanism of reduced graphene oxide-copper oxide (rGO-CuO) nanocomposite films: The case of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1," *Mater. Sci. Eng. C*, 2020, doi: 10.1016/j.msec.2019.110596.
- [482] A. Konwar, S. Kalita, J. Kotoky, and D. Chowdhury, "Chitosan-Iron Oxide Coated Graphene Oxide Nanocomposite Hydrogel: A Robust and Soft Antimicrobial Biofilm," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2016, doi: 10.1021/acsami.6b07510.
- [483] D. C. Marcano *et al.*, "Improved synthesis of graphene oxide," *ACS Nano*, 2010,

doi: 10.1021/nn1006368.

- [484] L. Thanh Huyen, D. Sy Duc, N. Xuan Hoan, N. Huu Tho, and N. Xuan Viet, "Synthesis of Fe₃O₄-Reduced Graphene Oxide Modified Tissue-Paper and Application in the Treatment of Methylene Blue," *VNU J. Sci. Nat. Sci. Technol.*, 2019, doi: 10.25073/2588-1140/vnunst.4883.
- [485] J. Song, X. Wang, and C. T. Chang, "Preparation and characterization of graphene oxide," *J. Nanomater.*, 2014, doi: 10.1155/2014/276143.
- [486] L. Sun and B. Fugetsu, "Mass production of graphene oxide from expanded graphite," *Mater. Lett.*, 2013, doi: 10.1016/j.matlet.2013.07.072.
- [487] J. Chen, B. Yao, C. Li, and G. Shi, "An improved Hummers method for eco-friendly synthesis of graphene oxide," *Carbon N. Y.*, 2013, doi: 10.1016/j.carbon.2013.07.055.
- [488] A. I. S. Sobczak, F. Stefanowicz, S. J. Pitt, R. A. Ajjan, and A. J. Stewart, "Total plasma magnesium, zinc, copper and selenium concentrations in type-I and type-II diabetes," *BioMetals*, 2019, doi: 10.1007/s10534-018-00167-z.
- [489] J. Kadrabová, A. Madarič, Z. Kováčiková, and E. Ginter, "Selenium status, plasma zinc, copper, and magnesium in vegetarians," *Biol. Trace Elem. Res.*, 1995, doi: 10.1007/BF02789145.
- [490] J. Kim *et al.*, "Association between serum selenium level and the presence of diabetes mellitus: A meta-analysis of observational studies," *Diabetes Metab. J.*, 2019, doi: 10.4093/dmj.2018.0123.
- [491] X. L. Wang, T. B. Yang, J. Wei, G. H. Lei, and C. Zeng, "Association between serum selenium level and type 2 diabetes mellitus: A non-linear dose-response meta-analysis of observational studies," *Nutr. J.*, 2016, doi: 10.1186/s12937-016-0169-6.
- [492] C. Delilbasi, S. Demiralp, and B. Turan, "Effects of selenium on the structure of the mandible in experimental diabetics," *J. Oral Sci.*, 2002, doi: 10.2334/josnusd.44.85.
- [493] E. Jacobs *et al.*, "Selenium supplementation and insulin resistance in a randomized, clinical trial," *BMJ Open Diabetes Res. Care*, vol. 7, p. e000613, Feb.

2019, doi: 10.1136/bmjdr-2018-000613.

- [494] A. Abbaszadegan *et al.*, "Time-dependent antibacterial effects of Aloe vera and Zataria multiflora plant essential oils compared to calcium hydroxide in teeth infected with Enterococcus faecalis," *J. Investig. Clin. Dent.*, 2016, doi: 10.1111/jicd.12123.
- [495] K. Zomorodian *et al.*, "Antimicrobial activity of seven essential oils from Iranian aromatic plants against common causes of oral infections," *Jundishapur J. Microbiol.*, 2015, doi: 10.5812/jjm.17766.
- [496] M. Mahboubi, "Systematic review: The potency of Zataria multiflora Boiss in treatment of vaginal infections," *Infectio*, 2018, doi: 10.22354/in.v22i2.712.
- [497] M. Mahboubi, "Management of acute cough by Zataria multiflora Boiss as an alternative treatment," *Journal of Integrative Medicine*. 2018, doi: 10.1016/j.joim.2017.12.006.
- [498] M. Aminzare, M. Hashemi, H. Hassanzadazar, E. Amiri, and Z. Abbasi, "Antibacterial activity of corn starch films incorporated with Zataria multiflora and Bonium persicum essential oils," *Annu. Res. Rev. Biol.*, 2017, doi: 10.9734/ARRB/2017/37103.
- [499] M. R. Khazdair, A. Anaeigoudari, M. Hashemzehi, and R. Mohebbati, "Neuroprotective potency of some spice herbs, a literature review," *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2019, doi: 10.1016/j.jtcme.2018.01.002.
- [500] K. Zomorodian *et al.*, "Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from three ecotypes of Zataria multiflora," *Pharmacogn. Mag.*, 2011, doi: 10.4103/0973-1296.75902.
- [501] M. Mahboubi, R. Heidarytabar, E. Mahdizadeh, and H. Hosseini, "Antimicrobial activity and chemical composition of Thymus species and Zataria multiflora essential oils," *Agric. Nat. Resour.*, 2017, doi: 10.1016/j.anres.2018.02.001.
- [502] G. Kavoosi and F. Rabiei, "Zataria multiflora: Chemical and biological diversity in the essential oil," *J. Essent. Oil Res.*, 2015, doi: 10.1080/10412905.2015.1031917.

- [503] A. Chedia, H. Ghazghazi, S. Dallali, S. Houssine, H. Brahim, and M. Abderazzak, "Comparison of Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Thymus capitatus* L. essential Oils from two Tunisian localities (Sousse and Bizerte)," *Int. J. Agron. Plant Prod.*, 2013.
- [504] A. A. *et al.*, "Time-dependent antibacterial effects of Aloe vera and Zataria multiflora plant essential oils compared to calcium hydroxide in teeth infected with *Enterococcus faecalis*," *J. Investig. Clin. Dent.*, 2016.
- [505] A. Niczad, S. Sharafzadeh, A. Alizadeh, B. Amiri, and F. Bazrafshan, "Variability in Essential Oil Constituent, Phenolic Content, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Different Ecotypes of *Zataria multiflora* Boiss. from Iran," *J. Essent. Oil-Bearing Plants*, 2019, doi: 10.1080/0972060X.2020.1713221.
- [506] I. Rasooli, "Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of *Thymus x-porlock* and *Zataria multiflora*," *Life Med. Sci. Online [online Comput. file]*, 2000.
- [507] S. S. Saei-Dehkordi, H. Tajik, M. Moradi, and F. Khalighi-Sigaroodi, "Chemical composition of essential oils in *Zataria multiflora* Boiss. from different parts of Iran and their radical scavenging and antimicrobial activity," *Food Chem. Toxicol.*, 2010, doi: 10.1016/j.fct.2010.03.025.
- [508] H. Shokri and A. Sharifzadeh, "*Zataria multiflora* Boiss.: A review study on chemical composition, anti-fungal and anti-mycotoxin activities, and ultrastructural changes," *J. HerbMed Pharmacol.*, 2017.
- [509] T. Shomali and N. Mosleh, "*Zataria multiflora*, broiler health and performance: A review," *Iranian Journal of Veterinary Research*. 2019.
- [510] H. Ziaei Hezarjaribi, N. Nadeali, M. Fakhar, and M. Soosaraei, "Medicinal plants with anti-trichomonas vaginalis activity in Iran: A systematic review," *Iranian Journal of Parasitology*. 2019, doi: 10.18502/ijpa.v14i1.712.
- [511] A. Gholipour, M. Bahmani, and A. Kazemi-Vardanjani, "Phytotherapy for *Bacillus cereus*: A review of the most important medicinal plants of Iran effective on *B. cereus*," *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*. 2016.
- [512] A. Rostami, M. Taheri, M. Gholizadeh, S. J. Seyyedtabaei, S. Raeghi, and S.

- Fallahi, "Scolicidal Effect of Some Herbs on *Echinococcus granulosus* Protoscoleces: a Systematic Literature Review," *Herb. Med. J. J*, 2016.
- [513] M. Aminzare *et al.*, "Colibacillosis phytotherapy: An overview on the most important world medicinal plants effective on *Escherichia coli*," *J. Pharm. Sci. Res.*, 2017.
- [514] A. Khaledi and M. Meskini, "A systematic review of the effects of *satureja khuzestanica* jamzad and *zataria multiflora* boiss against *pseudomonas aeruginosa*," *Iranian Journal of Medical Sciences*. 2020, doi: 10.30476/ijms.2019.72570.
- [515] S. Burt, "Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review," *International Journal of Food Microbiology*. 2004, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.
- [516] I. H. N. Bassolé and H. R. Juliani, "Essential oils in combination and their antimicrobial properties," *Molecules*. 2012, doi: 10.3390/molecules17043989.
- [517] L. E. Shi, Z. H. Li, W. Zheng, Y. F. Zhao, Y. F. Jin, and Z. X. Tang, "Synthesis, antibacterial activity, antibacterial mechanism and food applications of ZnO nanoparticles: A review," *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*. 2014, doi: 10.1080/19440049.2013.865147.
- [518] J. Xu, F. Zhou, B. P. Ji, R. S. Pei, and N. Xu, "The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*," *Lett. Appl. Microbiol.*, 2008, doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02407.x.
- [519] H. Gandomi, A. Misaghi, A. Akhondzadeh Basti, H. Hamed, and Z. Ramezani Shirvani, "Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on colony morphology and ultrastructure of *Aspergillus flavus*," *Mycoses*, 2011, doi: 10.1111/j.1439-0507.2010.01942.x.
- [520] E. Darvishi, M. Omid, A. A. Bushehri, A. Golshani, and M. L. Smith, "Thymol antifungal mode of action involves telomerase inhibition," *Med. Mycol.*, 2013, doi: 10.3109/13693786.2013.795664.

- [521] H. Farahani, A. Barati, M. Arjomandzadegan, and E. Vatankhah, "Nanofibrous cellulose acetate/gelatin wound dressing endowed with antibacterial and healing efficacy using nanoemulsion of Zataria multiflora," *Int. J. Biol. Macromol.*, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.175.
- [522] A. D. Moghaddam, M. Kazemi, M. Jebraeel, and A. Sharifan, "Design of Zein Electrospinning Nanofiber Packaging Containing Zataria Multiflora Essential Oil to Preserve the Ration Food," *Food Technol. Nutr.*, 2019.
- [523] "Synthesis of Zataria Multiflora Extraction Loaded Chitosan/PEO Nanofibers via Electrospinning Method for Potential Biomedical Applications," *J. FASA Univ. Med. Sci.*, 2018.
- [524] S. G. Lee *et al.*, "Mechanism of ceftriaxone induction of excitatory amino acid transporter-2 expression and glutamate uptake in primary human astrocytes," *J. Biol. Chem.*, 2008, doi: 10.1074/jbc.M707697200.
- [525] K. Falzari, Z. Zhu, D. Pan, H. Liu, P. Hongmanee, and S. G. Franzblau, "In vitro and in vivo activities of macrolide derivatives against Mycobacterium tuberculosis," *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, doi: 10.1128/AAC.49.4.1447-1454.2005.
- [526] S. Omura, S. Morimoto, T. Nagate, T. Adachi, and Y. Kohno, "Research and development of clarithromycin," *Yakugaku Zasshi.* 1992, doi: 10.1248/yakushi1947.112.9_593.
- [527] R. Anderson, G. Joone, and C. E. J. Van Rensburg, "An in-vitro evaluation of the cellular uptake and intraphagocytic bioactivity of clarithromycin (A-56268, TE-031), a new macrolide antimicrobial agent," *J. Antimicrob. Chemother.*, 1988, doi: 10.1093/jac/22.6.923.
- [528] M. H. Gotfried, "Clarithromycin (Biaxin®) extended-release tablet: A therapeutic review," *Expert Review of Anti-Infective Therapy.* 2003, doi: 10.1586/14787210.1.1.9.
- [529] M. J. M. Darkes and C. M. Perry, "Clarithromycin extended-release tablet: A review of its use in the management of respiratory track infections," *American Journal of Respiratory Medicine.* 2003, doi: 10.1007/BF03256648.

- [530] S. Chodosh *et al.*, "Efficacy of oral ciprofloxacin vs. clarithromycin for treatment of acute bacterial exacerbations of chronic bronchitis," *Clin. Infect. Dis.*, 1998, doi: 10.1086/514934.
- [531] G. Anderson, "Clarithromycin in the treatment of community-acquired lower respiratory tract infections," *J. Hosp. Infect.*, 1991, doi: 10.1016/0195-6701(91)90214-S.
- [532] D. H. Peters and S. P. Clissold, "Clarithromycin: A Review of its Antimicrobial Activity, Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Potential," *Drugs*, 1992, doi: 10.2165/00003495-199244010-00009.
- [533] A. L. Barry, C. Thornsberry, and R. N. Jones, "In vitro activity of a new macrolide, A-56268, compared with that of roxithromycin, erythromycin, and clindamycin," *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1987, doi: 10.1128/AAC.31.2.343.
- [534] S. Floyd-Reising, J. A. Hindler, and L. S. Young, "In vitro activity of A-56268 (TE-031), a new macrolide antibiotic, compared with that of erythromycin and other antimicrobial agents," *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1987, doi: 10.1128/AAC.31.4.640.
- [535] A. L. Barry, P. B. Fernandes, J. H. Jorgensen, C. Thornsberry, D. J. Hardy, and R. N. Jones, "Variability of clarithromycin and erythromycin susceptibility tests with *Haemophilus influenzae* in four different broth media and correlation with the standard disk diffusion test," *J. Clin. Microbiol.*, 1988, doi: 10.1128/jcm.26.11.2415-2420.1988.
- [536] A. L. Barry, R. N. Jones, and C. Thornsberry, "In vitro activities of azithromycin (CP 62,993), clarithromycin (A-56268; TE-031), erythromycin, roxithromycin, and clindamycin," *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1988, doi: 10.1128/AAC.32.5.752.
- [537] E. Katz and A. L. Demain, "The peptide antibiotics of *Bacillus*: Chemistry, biogenesis, and possible functions," *Bacteriological Reviews*. 1977, doi: 10.1128/mmbr.41.2.449-474.1977.
- [538] R. Bleich, J. D. Watrous, P. C. Dorrestein, A. A. Bowers, and E. A. Shank, "Thiopeptide antibiotics stimulate biofilm formation in *Bacillus subtilis*," *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2015, doi: 10.1073/pnas.1414272112.
- [539] E. Gross, "Peptide Antibiotics," *J. Chromatogr. Libr.*, 1978, doi: 10.1016/S0301-4770(08)60955-0.
- [540] C. Leifert *et al.*, "Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45," *J. Appl. Bacteriol.*, 1995, doi: 10.1111/j.1365-2672.1995.tb02829.x.
- [541] A. Staroń, D. E. Finkeisen, and T. Mascher, "Peptide antibiotic sensing and detoxification modules of *Bacillus subtilis*," *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2011, doi: 10.1128/AAC.00352-10.
- [542] M. Ito-Kagawa and Y. Koyama, "Selective cleavage of a peptide antibiotic, colistin by colistinase," *J. Antibiot. (Tokyo)*., 1980, doi: 10.7164/antibiotics.33.1551.
- [543] M. M. Nakano and P. Zuber, "Molecular biology of antibiotic production in bacillus," *Crit. Rev. Biotechnol.*, 1990, doi: 10.3109/07388559009038209.
- [544] S. A. Cochrane and J. C. Vederas, "Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: A Gold Mine of Antibiotic Candidates," *Med. Res. Rev.*, 2016, doi: 10.1002/med.21321.
- [545] P. Butaye, L. A. Devriese, and F. Haesebrouck, "Antimicrobial growth promoters used in animal feed: Effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria," *Clinical Microbiology Reviews*. 2003, doi: 10.1128/CMR.16.2.175-188.2003.
- [546] I. Phillips *et al.*, "Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004, doi: 10.1093/jac/dkg483.
- [547] S. T. Chancey, D. Zähler, and D. S. Stephens, "Acquired inducible antimicrobial resistance in Gram-positive bacteria," *Future Microbiology*. 2012, doi: 10.2217/fmb.12.63.
- [548] H. Astiazarán-García, G. Iñigo-Figueroa, L. Quihui-Cota, and I. Anduro-Corona, "Crosstalk between zinc status and *Giardia* infection: A new approach," *Nutrients*. 2015, doi: 10.3390/nu7064438.

- [549] D. Y. Arifin, L. Y. Lee, and C. H. Wang, "Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems," *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2006, doi: 10.1016/j.addr.2006.09.007.
- [550] O. Pillai and R. Panchagnula, "Polymers in drug delivery," *Current Opinion in Chemical Biology*. 2001, doi: 10.1016/S1367-5931(00)00227-1.
- [551] "Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering," *Choice Rev. Online*, 2004, doi: 10.5860/choice.42-1940.
- [552] L. K. Fung and W. M. Saltzman, "Polymeric implants for cancer chemotherapy," *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1997, doi: 10.1016/S0169-409X(97)00036-7.
- [553] J. Siepmann and F. Siepmann, "Mathematical modeling of drug delivery," *International Journal of Pharmaceutics*. 2008, doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.09.004.
- [554] S. B. Lin, K. S. Hwang, S. Y. Tsay, and S. L. Cooper, "Segmental orientation studies of polyether polyurethane block copolymers with different hard segment lengths and distributions," *Colloid Polym. Sci.*, 1985, doi: 10.1007/BF01412787.
- [555] M. DAVIES, "Biodegradable polymers as drug delivery systems Editors: M. Chasin and R. Langer Marcel Dekker, New York, 1990, pp. 338, ISBN 082478344 1, \$119.50," *Biomaterials*, 1993, doi: 10.1016/0142-9612(93)90119-m.
- [556] R. Dorati *et al.*, "Investigation of the degradation behaviour of poly(ethylene glycol-co-d,l-lactide) copolymer," *Polym. Degrad. Stab.*, 2007, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2007.06.020.
- [557] J. Heller, R. W. Baker, R. M. Gale, and J. O. Rodin, "Controlled drug release by polymer dissolution. I. Partial esters of maleic anhydride copolymers—properties and theory," *J. Appl. Polym. Sci.*, 1978, doi: 10.1002/app.1978.070220720.
- [558] J. Heller, "Controlled release of biologically active compounds from bioerodible polymers," *Biomaterials*. 1980, doi: 10.1016/0142-

9612(80)90060-5.

- [559] K. R. Kamath and K. Park, "Biodegradable hydrogels in drug delivery," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1993, doi: 10.1016/0169-409X(93)90027-2.
- [560] U. Edlund and A. C. Albertsson, "Degradable polymer microspheres for controlled drug delivery," *Advances in Polymer Science*. 2002, doi: 10.1007/3-540-45734-8_3.
- [561] J. Siepmann and A. Göpferich, "Mathematical modeling of bioerodible, polymeric drug delivery systems," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2001, doi: 10.1016/S0169-409X(01)00116-8.
- [562] L. Singh, V. Kumar, and B. D. Ratner, "Generation of porous microcellular 85/15 poly (DL-lactide-co-glycolide) foams for biomedical applications," *Biomaterials*, 2004, doi: 10.1016/j.biomaterials.2003.09.040.
- [563] C. E. Astete and C. M. Sabliov, "Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles," *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2006, doi: 10.1163/156856206775997322.
- [564] Y. Kakizawa *et al.*, "Controlled release of protein drugs from newly developed amphiphilic polymer-based microparticles composed of nanoparticles," *J. Control. Release*, 2010, doi: 10.1016/j.jconrel.2009.09.024.
- [565] D. K. Sahana, G. Mittal, V. Bhardwaj, and M. N. V. R. Kumar, "PLGA nanoparticles for oral delivery of hydrophobic drugs: Influence of organic solvent on nanoparticle formation and release behavior in vitro and in vivo using estradiol as a model drug," *J. Pharm. Sci.*, 2008, doi: 10.1002/jps.21158.
- [566] Y. P. Li *et al.*, "PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: Synthesis, preparation and biodistribution in rats," *J. Control. Release*, 2001, doi: 10.1016/S0168-3659(01)00218-8.
- [567] L. Brannon-Peppas, "Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery," *International Journal of Pharmaceutics*. 1995, doi: 10.1016/0378-5173(94)00324-X.
- [568] T. J. Franz, "Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data," *J. Invest. Dermatol.*, 1975, doi: 10.1111/1523-1747.ep12533356.

- [569] L. Bartosova and J. Bajgar, "Transdermal Drug Delivery In Vitro Using Diffusion Cells," *Curr. Med. Chem.*, 2012, doi: 10.2174/092986712803306358.
- [570] B. Godin and E. Touitou, "Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models," *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007, doi: 10.1016/j.addr.2007.07.004.
- [571] M. S. Islam, B. C. Ang, A. Andriyana, and A. M. Afifi, "A review on fabrication of nanofibers via electrospinning and their applications," *SN Appl. Sci.*, 2019, doi: 10.1007/s42452-019-1288-4.
- [572] R. Sridhar, S. Sundarrajan, J. R. Venugopal, R. Ravichandran, and S. Ramakrishna, "Electrospun inorganic and polymer composite nanofibers for biomedical applications," *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2013, doi: 10.1080/09205063.2012.690711.
- [573] M. Hadjiargyrou and J. B. Chiu, "Enhanced composite electrospun nanofiber scaffolds for use in drug delivery," *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2008, doi: 10.1517/17425247.5.10.1093.
- [574] Y. S. Huang, Y. J. Lu, and J. P. Chen, "Magnetic graphene oxide as a carrier for targeted delivery of chemotherapy drugs in cancer therapy," *J. Magn. Magn. Mater.*, 2017, doi: 10.1016/j.jmmm.2016.10.042.
- [575] R. Scaffaro, F. Lopresti, M. D'Arrigo, A. Marino, and A. Nostro, "Efficacy of poly(lactic acid)/carvacrol electrospun membranes against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* in single and mixed cultures," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2018, doi: 10.1007/s00253-018-8879-7.
- [576] R. Casasola, N. L. Thomas, A. Trybala, and S. Georgiadou, "Electrospun poly lactic acid (PLA) fibres: Effect of different solvent systems on fibre morphology and diameter," *Polymer (Guildf.)*, 2014, doi: 10.1016/j.polymer.2014.06.032.
- [577] L. Wannatong, A. Sirivat, and P. Supaphol, "Effects of solvents on electrospun polymeric fibers: Preliminary study on polystyrene," *Polym. Int.*, 2004, doi: 10.1002/pi.1599.
- [578] J. Li, X. Feng, J. Shi, T. Liu, and J. Ding, "Porous Polylactide Film Plus

- Atorvastatin-Loaded Thermogel as an Efficient Device for Peritoneal Adhesion Prevention," *ACS Omega*, 2018, doi: 10.1021/acsomega.8b00090.
- [579] C. Németh *et al.*, "Fast dissolving nanofibrous matrices prepared by electrospinning of polyaspartamides," *Eur. Polym. J.*, 2020, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2020.109624.
- [580] W. Cui, X. Li, X. Zhu, G. Yu, S. Zhou, and J. Weng, "Investigation of drug release and matrix degradation of electrospun poly(DL-lactide) fibers with paracetamol inoculation," *Biomacromolecules*, 2006, doi: 10.1021/bm060057z.
- [581] Y. F. Qian, Y. Su, X. Q. Li, H. S. Wang, and C. L. He, "Electrospinning of polymethyl methacrylate nanofibres in different solvents," *Iran. Polym. J. (English Ed.)*, 2010.
- [582] A. Awad, S. A. Bashier, and S. F. Halim, "Fabrication and Characterization of PMMA / Carbon Electro Spun Nanofibers in Two Different Solvents," *Int. J. Sci. Basic Appl. Res.*, 2014.
- [583] A. Bhaw-Luximon, R. Jeetah, N. Goonoo, A. Veeren, Y. Jugdawa, and D. Jhurry, "A review of polymeric biomaterials research for tissue engineering and drug delivery applications at the Centre for Biomedical and Biomaterials Research, Mauritius," *African J. Sci. Technol. Innov. Dev.*, 2014, doi: 10.1080/20421338.2014.924270.
- [584] M. Wojtoniszak *et al.*, "Synthesis, dispersion, and cytocompatibility of graphene oxide and reduced graphene oxide," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2012, doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.08.026.
- [585] K. H. Liao, A. Mittal, S. Bose, C. Leighton, K. A. Mkhoyan, and C. W. MacOsco, "Aqueous only route toward graphene from graphite oxide," *ACS Nano*, 2011, doi: 10.1021/nn1028967.
- [586] V. Loryuenyong, K. Totepvimarn, P. Eimburanapravat, W. Boonchompoo, and A. Buasri, "Preparation and characterization of reduced graphene oxide sheets via water-based exfoliation and reduction methods," *Adv. Mater. Sci. Eng.*, 2013, doi: 10.1155/2013/923403.

- [587] I. Karteri, Karataş, A. A. Al-Ghamdi, and F. Yakuphanoglu, "The electrical characteristics of thin film transistors with graphene oxide and organic insulators," *Synth. Met.*, 2015, doi: 10.1016/j.synthmet.2014.11.036.
- [588] L. Shahriary and A. a. Athawale, "Graphene Oxide Synthesized by using Modified Hummers Approach," *Int. J. Renew. Energy Environ. Eng.*, 2014.
- [589] K. P. Loh, Y. Zhou, Q. L. Bao, L. A. L. Tang, and Y. L. Zhong, "Hydrothermal Dehydration for the 'Green' Reduction of Exfoliated Graphene Oxide to Graphene and Demonstration of Tunable Optical Limiting Properties," *Chem. Mater.*, 2009.
- [590] S. H. Ryu and A. M. Shanmugharaj, "Influence of long-chain alkylamine-modified graphene oxide on the crystallization, mechanical and electrical properties of isotactic polypropylene nanocomposites," *Chem. Eng. J.*, 2014, doi: 10.1016/j.cej.2014.01.101.
- [591] A. C. Ferrari, "Raman spectroscopy of graphene and graphite: Disorder, electron-phonon coupling, doping and nonadiabatic effects," *Solid State Commun.*, 2007, doi: 10.1016/j.ssc.2007.03.052.
- [592] W. Chen, L. Yan, and P. R. Bangal, "Chemical reduction of graphene oxide to graphene by sulfur-containing compounds," *J. Phys. Chem. C*, 2010, doi: 10.1021/jp107131v.
- [593] C. T. Lim, E. P. S. Tan, and S. Y. Ng, "Effects of crystalline morphology on the tensile properties of electrospun polymer nanofibers," *Appl. Phys. Lett.*, 2008, doi: 10.1063/1.2857478.
- [594] C. C. Teng *et al.*, "Thermal conductivity and structure of non-covalent functionalized graphene/epoxy composites," *Carbon N. Y.*, 2011, doi: 10.1016/j.carbon.2011.06.095.
- [595] J. C. Aguilar *et al.*, "Designing Polymeric Nanoparticles for Targeted Drug Delivery System Outline :," *Vaccine*, 2007.
- [596] L. J. Peek, C. R. Middaugh, and C. Berkland, "Nanotechnology in vaccine delivery," *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008, doi: 10.1016/j.addr.2007.05.017.

- [597] Y. Fu and W. J. Kao, "Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems," *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2010, doi: 10.1517/17425241003602259.
- [598] A. Gokhale, "Achieving zero-order release kinetics using multi-step diffusion-based drug delivery," *Pharm. Technol. Eur.*, 2014.
- [599] P. A. Tran and T. J. Webster, "Antimicrobial selenium nanoparticle coatings on polymeric medical devices," *Nanotechnology*, 2013, doi: 10.1088/0957-4484/24/15/155101.
- [600] A. Wang *et al.*, "Induced pluripotent stem cells for neural tissue engineering," *Biomaterials*, 2011, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.03.070.
- [601] M. Shakibaie, H. Forootanfar, Y. Golkari, T. Mohammadi-Khorsand, and M. R. Shakibaie, "Anti-biofilm activity of biogenic selenium nanoparticles and selenium dioxide against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Proteus mirabilis*," *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2015, doi: 10.1016/j.jtemb.2014.07.020.
- [602] P. J. D. Andrews *et al.*, "Randomised trial of glutamine, selenium, or both, to supplement parenteral nutrition for critically ill patients," *BMJ*, 2011, doi: 10.1136/bmj.d1542.
- [603] B. Santhosh Kumar and K. I. Priyadarsini, "Selenium nutrition: How important is it?," *Biomedicine and Preventive Nutrition*. 2014, doi: 10.1016/j.bionut.2014.01.006.
- [604] L. C. Clark *et al.*, "Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin: A randomized controlled trial," *J. Am. Med. Assoc.*, 1996, doi: 10.1001/jama.276.24.1957.
- [605] S. Chung, B. Ercan, T. J. Webster, and P. Tran, "Electrospun silk doped with selenium for antibacterial skin applications," 2014, doi: 10.1109/NEBEC.2014.6972758.
- [606] H. Mahmoudvand *et al.*, "Scolicidal effects of biogenic selenium nanoparticles against protoscolices of hydatid cysts," *Int. J. Surg.*, 2014, doi: 10.1016/j.ijisu.2014.03.017.

- [607] S. K. Torres *et al.*, "Biosynthesis of selenium nanoparticles by *Pantoea agglomerans* and their antioxidant activity," *J. Nanoparticle Res.*, 2012, doi: 10.1007/s11051-012-1236-3.
- [608] B. Balusamy, A. Senthamizhan, and T. Uyar, "Electrospun nanofibrous materials for wound healing applications," in *Electrospun Materials for Tissue Engineering and Biomedical Applications: Research, Design and Commercialization*, 2017.
- [609] S. Homaeigohar and A. R. Boccaccini, "Antibacterial biohybrid nanofibers for wound dressings," *Acta Biomaterialia*. 2020, doi: 10.1016/j.actbio.2020.02.022.
- [610] D. Chouhan, B. Chakraborty, S. K. Nandi, and B. B. Mandal, "Role of non-mulberry silk fibroin in deposition and regulation of extracellular matrix towards accelerated wound healing," *Acta Biomater.*, 2017, doi: 10.1016/j.actbio.2016.10.019.
- [611] M. G. Sturgill and R. P. Rapp, "Clarithromycin: Review of a new macrolide antibiotic with improved microbiologic spectrum and favorable pharmacokinetic and adverse effect profiles," *Ann. Pharmacother.*, 1992, doi: 10.1177/106002809202600912.
- [612] D. H. Peters, H. A. Friedel, and D. McTavish, "Azithromycin: A Review of its Antimicrobial Activity, Pharmacokinetic Properties and Clinical Efficacy," *Drugs*, 1992, doi: 10.2165/00003495-199244050-00007.
- [613] S. C. Piscitelli, L. H. Danziger, and K. A. Rodvold, "Clarithromycin and azithromycin: new macrolide antibiotics [published erratum appears in Clin Pharm 1992 Apr;11(4):308] [see comments]," *Clin Pharm*, 1992.
- [614] K. Madhavan Nampoothiri, N. R. Nair, and R. P. John, "An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research," *Bioresource Technology*. 2010, doi: 10.1016/j.biortech.2010.05.092.
- [615] W. Hu *et al.*, "Graphene-based antibacterial paper," *ACS Nano*, 2010, doi: 10.1021/nn101097v.
- [616] Y. Chang *et al.*, "In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells,"

- Toxicol. Lett.*, 2011, doi: 10.1016/j.toxlet.2010.11.016.
- [617] G. A. Brewer, "Bacitracin," *Anal. Profiles Drug Subst. Excipients*, 1981, doi: 10.1016/S0099-5428(08)60135-5.
- [618] A. R. Potts, T. Psurek, C. Jones, L. Parris, and A. Wise, "Validation of a quantitative HPLC method for bacitracin and bacitracin zinc using EDTA as a mobile-phase modifier," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2012, doi: 10.1016/j.jpba.2012.06.016.
- [619] "Antibiotics Monograph No. 5 Polymyxin, Neomycin and Bacitracin," *Postgrad. Med. J.*, 1956, doi: 10.1136/pgmj.32.369.357.
- [620] Y. Zhang, Z. M. Huang, X. Xu, C. T. Lim, and S. Ramakrishna, "Preparation of core-shell structured PCL-r-gelatin bi-component nanofibers by coaxial electrospinning," *Chem. Mater.*, 2004, doi: 10.1021/cm049580f.
- [621] J. Lyons, C. Li, and F. Ko, "Melt-electrospinning part I: Processing parameters and geometric properties," *Polymer (Guildf)*, 2004, doi: 10.1016/j.polymer.2004.08.071.
- [622] X. Zong *et al.*, "Prevention of postsurgery-induced abdominal adhesions by electrospun bioabsorbable nanofibrous poly(lactide-co-glycolide)-based membranes," *Ann. Surg.*, 2004, doi: 10.1097/01.sla.0000143302.48223.7e.
- [623] L. Brannon-Peppas, "Polymers in controlled drug delivery," *Med. Plast. Biomater.*, 1997.
- [624] Q. Bao *et al.*, "In vitro release testing method development for ophthalmic ointments," *Int. J. Pharm.*, 2017, doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.04.075.
- [625] C. H. Salamanca, A. Barrera-Ocampo, J. C. Lasso, N. Camacho, and C. J. Yarcce, "Franz diffusion cell approach for pre-formulation characterisation of ketoprofen semi-solid dosage forms," *Pharmaceutics*, 2018, doi: 10.3390/pharmaceutics10030148.
- [626] B. Baert *et al.*, "A new discriminative criterion for the development of franz diffusion tests for transdermal pharmaceuticals," *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2010, doi: 10.18433/j3ws33.
- [627] N. S. Alizadeh, E. M. Khoei, M. Fazelimanesh, and A. Astaneh, "Antibacterial

- effects of *Zataria multiflora* Boiss (Shirazi Avishan extract) on urinary tract *Escherichia coli* infections," *Res. J. Biol. Sci.*, 2009.
- [628] M. Mahboubi and F. Ghazian Bidgoli, "Antistaphylococcal activity of *Zataria multiflora* essential oil and its synergy with vancomycin," *Phytomedicine*, 2010, doi: 10.1016/j.phymed.2009.11.004.
- [629] F. Sharififar, M. H. Moshafi, S. H. Mansouri, M. Khodashenas, and M. Khoshnoodi, "In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss," *Food Control*, 2007, doi: 10.1016/j.foodcont.2006.04.002.
- [630] G. Kavooosi, J. A. Teixeira Da Silva, and M. J. Saharkhiz, "Inhibitory effects of *Zataria multiflora* essential oil and its main components on nitric oxide and hydrogen peroxide production in lipopolysaccharide-stimulated macrophages," *J. Pharm. Pharmacol.*, 2012, doi: 10.1111/j.2042-7158.2012.01510.x.
- [631] A. Z. Mahmoudabadi, M. A. Dabbagh, and Z. Fouladi, "In vitro anti-*Candida* activity of *Zataria multiflora* Boiss," *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, 2007, doi: 10.1093/ecam/nel099.
- [632] S. H., S. A., and I. M., "*Zataria multiflora* Boiss. (Shirazi thyme) - An ancient condiment with modern pharmaceutical uses," *J. Ethnopharmacol.*, 2013.
- [633] H. Shokri, F. Asadi, A. R. Bahonar, and A. R. Khosravi, "The role of *Zataria multiflora* essence (Iranian herb) on innate immunity of animal model," *Iran. J. Immunol.*, 2006.
- [634] F. Jaffary, A. Ghannadi, and A. Siahpoush, "Antinociceptive effects of hydroalcoholic extract and essential oil of *Zataria multiflora*," *Fitoterapia*, 2004, doi: 10.1016/j.fitote.2003.12.015.
- [635] A. Aghamohammadi, M. Azadbakht, and S. J. Hosseinimehr, "Quantification of thymol content in different extracts of *Zataria multiflora* by HPLC method," *Pharm. Biomed. Res.*, 2016, doi: 10.18869/acadpub.pbr.2.1.8.
- [636] C. T. Spann, S. C. Taylor, and J. M. Weinberg, "Topical antimicrobial agents in dermatology.," *Disease-a-month : DM.* 2004, doi:

10.1016/j.disamonth.2004.05.011.

- [637] N. S. Trookman, R. L. Rizer, and T. Weber, "Treatment of minor wounds from dermatologic procedures: A comparison of three topical wound care ointments using a laser wound model," *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2011, doi: 10.1016/j.jaad.2010.11.011.
- [638] F. Fatemi, Y. Asri, I. Rasooli, S. D. Alipoor, and M. Shaterloo, "Chemical composition and antioxidant properties of γ -irradiated Iranian *Zataria multiflora* extracts," *Pharm. Biol.*, 2012, doi: 10.3109/13880209.2011.596208.
- [639] M. Abdollahi, H. Hamzehzarghani, and M. J. Saharkhiz, "Effects of the essential oil of *zataria multiflora* boiss, a thyme-like medicinal plant from iran on the growth and sporulation of *aspergillus niger* both in vitro and on lime fruits," *J. Food Saf.*, 2011, doi: 10.1111/j.1745-4565.2011.00317.x.
- [640] A. R. Khosravi, H. Shokri, M. Sharifrohani, H. E. Mousavi, and Z. Moosavi, "Evaluation of the antifungal activity of *Zataria multiflora*, *Geranium herbarium*, and *Eucalyptus camaldolensis* essential oils on *Saprolegnia parasitica*-infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs," *Foodborne Pathog. Dis.*, 2012, doi: 10.1089/fpd.2011.1086.

Makaleler

1. N.E. Duygulu, F. Ciftci, C. B. Ustundag, “Electrospun drug blended poly(lactic acid) (PLA) nanofibers and their antimicrobial activities”, *Journal of Polymer Research*, 2020, doi: 10.1007/s10965-020-02215-0

