T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

PHRAGMİTES AUSTRALİS SELÜLOZ NANOFİBERİ VE *RHANTERİUM EPAPPOSUM* UÇUCU YAĞI İLE KİTOSAN TEMELLİ KOMPOZİT FİLM ÜRETİMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sarah Mohammed Najeeb Lateef ALSHEİKH

DANIŞMAN
Doç. Dr. Yavuz Selim ÇAKMAK

AKSARAY, 2020

T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

PHRAGMİTES AUSTRALİS SELÜLOZ NANOFİBERİ VE *RHANTERİUM EPAPPOSUM* UÇUCU YAĞI İLE KİTOSAN TEMELLİ KOMPOZİT FİLM ÜRETİMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sarah Mohammed Najeeb Lateef ALSHEİKH

DANIŞMAN
Doç. Dr. Yavuz Selim ÇAKMAK

AKSARAY, 2020

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, benimle değerli bilgilerini paylaşan, kendisine ne zaman danışsam sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olan ve gelecekteki mesleki hayatımda bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağım kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Yavuz Selim Çakmak'a teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum., Laboratuvar çalışmalarımda yardımcı olan Prof. Dr. Murat Kaya ve Genel Biyoloji Araştırma Laboratuvari arkadaşlarım'a teşekkür ederim.

Lisans ve Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince beni destekleyen hocam Prof. Dr. Abdullah najm Al-Naimi. Aynı zamanda Kuveyt'ten bitki örneklerinin temininde yardımcı olan Sayın Nasir Al-Azimi'ye teşekkürlerimi sunuyorum.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi tez çalışmamda da maddi ve manevi desteğiniesirgemeyen ve yanımda olan, aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Sarah ALSHEİKH

AKSARAY, 2020

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
ÖZET iv
ABSTRACT v
ŞEKİLLER DİZİNİ vi
ÇİZELGELER DİZİNİ vii
SİMGELER VE KISALTMALAR viii
1. GİRİŞ 1
2. LİTERATÜR ÖZETİ 3
2.1 Biyobozunur Polimerler 3
2.1.1 Kitosani 3
2.1.2 Selüloz 4
2.2 *Phragmites australis*'den Elde Edilen Selüloz 5
2.3 Uçucu Yağlar ve *Rhanterium epapposum* Bitkisi 5
3. MALZEME VE YÖNTEM 9
3.1 Örnek Toplama 9
3.1.1 *Phragmites australis* 9
3.1.2 *Rhanterium epapposum* 9
3.2 Ekstraktların Hazırlanması 10
3.2.1 *P.australis*'ten selüloz izolasyonu 10
3.2.2 Esansiyel yağın ekstraksiyonu 10
3.3 Filmlerin Üretimi 11
3.3.1 Kitosan jeli hazırlama 11
3.3.2 Kompozit filmin hazırlanması 11
3.4 Fizikokimyasal Karakterizasyon 12
3.4.1 Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi 12
3.4.2 Termogravimetrik analiz 12
3.4.3 Taramalı elektron mikroskobu 13
3.4.4 Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi 13
3.5 Antioksidan Aktivite 13
3.5.1 DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal gidermeaktivitesi 13
3.5.2 FRAP (Demir iyonu indirgeme antioksidan gücü) 13
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 15
4.1 FTIR 15
4.2 TGA 17
4.3 SEM 18
4.4 Uçucu Yağ Analizleri 20
4.5 Antioksidan Aktivite 20
4.5.1 FRAP 21
4.5.2 DPPH 22
5. SONUÇLAR VE ÖNERILER 23
KAYNAKLAR 25

ÖZGEÇMİŞ 30

YÜKSEK LİSANS TEZİ

*PHRAGMİTES AUSTRALİS*SELÜLOZ NANOFİBERİVE *RHANTERİUMEPAPPOSUM* UÇUCU YAĞI İLE KİTOSAN TEMELLİ KOMPOZİT FİLM ÜRETİMİ

Sarah ALSHEIKH

Aksaray Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Yavuz Selim ÇAKMAK

ÖZET

Mevcut tez çalışmasının amacı, kitosan ve *Rhanterium epapposum* Esansiyel yağı içeren selülozdan biyoaktif filmler üretmeyi amaçlamaktadır. Literatür taramasında yapılan araştırmalar sonucunda, *R. epapposum* esansiyel yağının kullanımı kompozit filmlerde herhangi bir araştırma yapılmadığını ortaya koymuştur. Yerliler, cilt üzerindeki soğutma etkisi için yerel olarak kullanırlar. Geliştirilen filmin kimyasal yapıları ve morfolojileri FT-IR ve SEM karakterizasyon araçları kullanılarak incelenmiştir. Uçucu yağların dahil edilmesinin etkisi araştırıldı. Sonuçlar, antioksidan aktivitenin, selüloz-kitosan filmlerde *Rhanterium epapposum* yağ yüzdesini arttırdığını göstermiştir. Elde edilen sonuçlar, uçucu yağ içeren selüloz kitosandan verimli bir biyomedikal biyo-filmlerin üretimi için yüksek bir potansiyel sağlar.

Anahtar Kelimeler: *Phragmites australis*, Selüloz nano lif, Biyoaktif film, Karakterizasyon.

Ocak, 2020; 30 sayfa

M.Sc. THESİS

PHRAGMİTES AUSTRALİS CELLULOSE NANOFIBER *RHANTERİUM EPAPPOSUM* BASIC OIL CHITOSAN BASED COMPOSITE FILM PRODUCTION

Sarah ALSHEIKH

Aksaray University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biotechnology and Molecular Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Yavuz Selim ÇAKMAK

ABSTRACT

The objective of current work aimed to produce bio-active films from cellulose incorporated with chitosan and *Rhanterium epapposum* Essential oil. A search through the literatures revealed that no investigation has been carried out about the use of *R. epapposum* essential oil in the composite films. Natives use it locally for its cooling effect on the skin. The developed film's chemical structures and morphologies were investigated using FT-IR and SEM characterization tools. The impact of essential oils incorporation was explored. The results displayed that antioxidant activity increased *Rhanterium epapposum* oil percentage increases in cellulose-chitosan films. The obtained results provide a high potential for production of an efficient food bio-films from cellulose chitosan containing essential oil.

Keywords: *Phragmites australis,* Cellulose nanofibers, Bioactive film, Characterization.

January, 2020; 30 Pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Kitosanın yapısı. 3
Şekil 1.2. Selülozun kimyasal yapısı. 4
Şekil 2.1. *R. epapposum*..... 7
Şekil 3.1. *Phragmites australis.* 9
Şekil 3.2. *Rhanterium epapposum.*..... 9
Şekil 3.3. Selüloz nano fiberler (CNF). 10
Şekil 3.4. Hidrodistillasyon yöntemi ile uçucu yağ ekstraksiyonu 11
Şekil 3.5. Kontrol ve farklı içerikli filmler 12
Şekil 4.1. (a) CC, (b) CCNF, (c) CCNFEO-20, (d) CCNFEO-40 kompozit filmlerin FTIR analizi.....17
Şekil 4.2. (a) CC, (b) CCNF, (c) CCNFEO-20, (d) CCNFEO-40 kompozit filmlerin TGA analizi 18
Şekil 4.3. (a) CC, (b) CCNF, (c) CCNFEO-20, (d) CCNFEO-40 kompozit filmlerin SEM görüntüleri 19
Şekil 4.4. CC, CCNF, CCNFEO-20 ve CCNFEO-40 kompozit filmlerin demir iyonları indirgeme gücü (FRAP).....22
Şekil 4.5. CC, CCNF, CCNFEO-20 ve CCNFEO-40 kompozit filmlerin DPPH radikali giderme aktivitesi.....22

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Filmlerin antioksidan aktiviteleri. 21

SİMGELER VE KISALTMALAR

Rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
Nm	Nanometre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
mL	Mililitre
mg	Miligram
M	Molar
kDa	Kilodalton
g	Gram
CCNFEO	Chitosan-Cellulose NanoFiber Essential Oil film
CCNF	Chitosan-Cellulose NanoFiber Film
CC	Chitosan Control Film
µM	Mikrometre
µL	Mikrolitre
µg	Mikrogram
°C	Santigrat Derece
%	Yüzde
γ	Gama
β	Beta
α	Alfa

1. GİRİŞ

Aspirin'den antikanser ilaçlara kadar, bitki dünyası ilaç endüstrisine ilaçların büyük bir kısmını üretmek için hammadde sağlamıştır. Doğal maddelerle ilgili araştırmalar özellikle 1990'lardan bu yana oldukça büyük ilgi çekmektedir. Global düzeyde sürdürülebilir kalkınmanın en büyük öncelik olduğu günümüzde, tarımsal kaynaklardan yapılan biyobozunur biyomalzemelerin gelişimi büyük bir zorluk teşkil etmektedir.

Biyobozunur doğal malzemelerin tasarımında birçok önemli özellik göz önünde bulundurulmalıdır. Bu malzemeler genellikle, (1) sürekli bir inflamatuar yanıt uyandırmazlar; (2) işlevleriyle uyumlu bir bozulma süresine sahiptir; (3) kullanım amaçları için uygun mekanik özelliklere sahiptir; (4) kolayca emilebilen veya atılabilen toksik olmayan bozunma ürünleri üretir ve (5) geçirgenlik ve işlenebilirlik ile ilgili pek çok özelliği tasarlanabilir niteliktedir. Doğada en bol bulunan materyallerden olan selüloz, yenilenebilir ve çeşitli bitki kaynaklarından büyük miktarlarda elde edilebilir biyobozunur malzemelerden birini temsil eder (Voicu vd., 2016). Selüloz moleküllerinin biyosentezi her zaman nano boyutlu fibriller şeklinde gerçekleşir, sentezde selüloz nano boyutlu mikro veya nano fibriller (CNF) oluşturmak üzere 100'e kadar glukan zinciri bir araya toplanmaktadır (Stamboulis vd., 2001; Benhamou vd., 2015).

Son birkaç on yılda, CNF'lerin ilerlemesi, yüksek gerilme mukavemeti, mükemmel mekanik özellikler, iyi biyouyumluluk, yüksek yüzey alanı ve düşük termal genleşme katsayısı gibi benzersiz özelliklerinden ötürü büyük ilgi görmüştür (Chen vd., 2011). Ayrıca, biyobozunur nişasta temelli filmleri güçlendirmek için (Babaee vd., 2015), biyomedikal alanda (Costa vd., 2013), doku mühendisliğinde (Nasri-Nasrabadi vd., 2014), biyolojik görüntüleme sistemlerinde (Dong ve Roman, 2007), nanokompozitlerde (Liu vd., 2010; Chen vd., 2011), gaz bariyer filmlerde (Fukuzumi vd., 2008), ve optik olarak saydam fonksiyonel malzemelerin yapısında (Nogi vd., 2009) kullanımı gibi birçok alanda uygulanabilmektedir. Biyomalzeme uygulamalarında yaygın olarak kullanılan diğer bir polimer olan kitosan doğal bir polisakarittir ve bazı canlıların bünyesinde bulunan kitinin kimyasal olarak işlenmesi ile elde edilir. Kitosanın toksik olmayışı, biyolojik olarak parçalanabilir ve

biyouyumlu bir polimer olması ve film oluşturma özelliği biyomalzeme üretiminde yaygın olarak tercih edilmesine neden olmuştur. Kitosan, çeşitli organik asitlerde viskoz bir çözelti oluştururarak fonksiyonel filmlerin yapımında kullanılabilmektedir. Kitosan filmlerin fiziko kimyasal özellikleri farmasötik uygulamalar için de ilgi çekicidir. Kitosanın selüloz nano fiber ağı ile birleşmesi sonucu yüksek kaliteli biyo-bazlı kompozitler için etkili bir pekiştirici olarak kullanımı son dönemde yaygın bir şekilde tercih edilmekte ve pek çok sektör için önemli bir kullanım potansiyeli göstermektedir (Benhamou vd., 2015).

Kitosan bazlı ve doğal polimer katkılı filmlerin antioksidan, antimikrobiyal aktivite gibi biyolojik özellikleri filmin kullanım alanları konusunda belirleyici özelliğe sahiptir. Bu tür çalışmaların çoğu yeni filmlerin geliştirilmesi ile ilgilidir (Jirdi vd., 2014).

Filmlerin biyolojik aktivitelerinin desteklenmesi amacıyla bitkisel özütler gibi doğal antioksidan kaynaklarının kullanımı en popüler film geliştirme çalışmalarındandır. Bunun nedeni, bitkisel özütlerin iyi biyolojik aktivite kaynağı olmaları ve oksijenden türetilen serbest radikallere karşı güçlü koruma etkisine sahip antioksidan aktiviteye sahip olmalarıdır (Bonilla ve Sobral, 2016).

Bu çalışma biyomedikal uygulamalar için doğal bazlı polimerik filmler geliştirmeyi amaçlamaktadır. Bu amaçla, kitosan ve *Phragmites australis* bitkisinden elde edilen selüloz karışımı ile üretilen filmlere yine çöl bölgelerinde doğal yayılışa sahip yerel bir şifalı bir bitki olan *Rhanterium epapposum*'dan elde edilen uçucu yağın farklı konsantrasyonlarda ilave edilmesiyle kompozit filmler oluşturulmuştur. Oluşturulan filmlerin antioksidan aktiviteleri ve fizikokimyasal özellikleri karakterize edilmiştir. Ayrıca film bileşiminde kullanılan uçucu yağ kompozisyonu da belirlenmiştir. Detaylı olarak karakterize edilen filmlerden elde edilen verilere göre kitosan temelli selüloz ve uçucu yağ katkılı kompozit filmler sahip oldukları özellikleri sayesinde farmasötik alanda yara bandı veya bandaj gibi yaralanmalarda kullanım potansiyeline sahip olduğu söylenebilir. Bunun için filmler üzerinde in vivo çalışmalar gibi ileri çalışmalar yürütülmelidir.

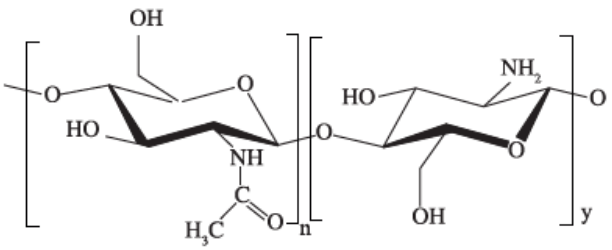
2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Biyobozunur Polimerler

Biyobozunur malzemelerde mevcut eğilimler, eşsiz tasarım stratejileri ve mühendislik açısından nispeten iyi performans gösteren gelişmiş polimerler sunmak için kayda değer gelişmeler göstermektedir (Pitt ve Schindler, 2019). Bu nedenle, gelecekteki gelişmelere yönelik stratejiler geliştirmek amacıyla bu polimerlerin tasarımı, özellikleri ve yararları hakkında yeni bir bakış açısına ihtiyaç vardır. Genel olarak, biyobozunur polimerler yapılarına ve sentezlerine dayanarak iki büyük grupta gruplandırılabilir. Bu gruplardan biri, biyokütle türevli ürünler gibi tarımsal polimerlerdir. Diğeri ise, mikro organizmalardan türetilen veya doğal ya da sentetik monomerlerden üretilen biyo polyesterlerden oluşur (Karthika vd., 2019; Kaplan, 2019). Bunlar dışında biyobozunur polimerler kimyasal bileşimlerine, orijin ve sentez yöntemlerine, işleme yöntemlerine, ekonomik önemlerine ve uygulamalarına göre de sınıflandırılabilir. Doğrudan biyokütleden ekstrakte edilen biyopolimerlerden bazıları kitin (kitosan), selüloz, nişasta ve beta glukandır.

2.1.1 Kitosan

Kitinin deasetilasyonu sonucu oluşan bir lineer polisakarit olan kitosan, selülozdan sonra doğada bulunan en bol miktarda polisakarit olan bir kitin türevidir. Kitosanın, antimikrobiyal özelliklere sahip olmasının yanı sıra, toksik olmayan, biyobozunur, biyofonksiyonel ve biyouyumlu olduğu bulunmuştur (Jayakumar vd., 2007).



Şekil 1.1. Kitosanın yapısı.

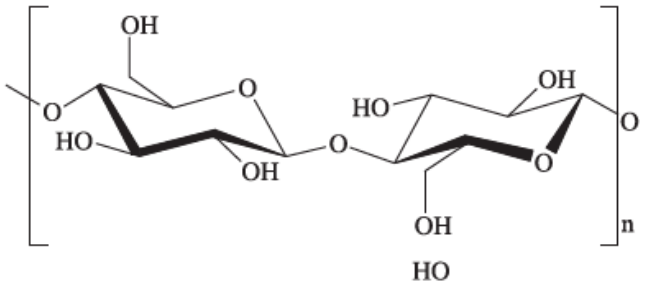
Kitosan organik asitlerde çözünmektedir.Kitin ve kitosan türevleri su, biyomedikal, kozmetik ve tarımsal veya gıda ürünlerinin işlenmesi gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. İmmünolojik, antibakteriyel, yara iyileşme aktivitesi, ilaç

salınımıgibi bazı biyolojik aktiviteleri dolayısıyla doku mühendisliği uygulamaları için önerilmiştir (Jayakumar vd., 2007).

Kitosanın antimikrobiyal bir koruyucu madde olarak potansiyeli, özellikle patojenlikleri nedeniyle gıda maddelerinde kabul edilemeyen *Listeria monocytogenes* gibi bakteriler için gösterilmiştir. Mevcut koruma yöntemleri gıda kaynaklı listeriozu engellemek için yeterli olmamaktadır (Dean ve Zottola,1996; Crandall ve Montville, 1998). Kitosanın antimikrobiyal aktiviteye, yara iyileşme özelliklerine ve hemostatik aktiviteye sahip olması, kitosan bazlı kompozitleri biyomedikal alanında çok faydalı kılmaktadır. Ayrıca, tarımda gübre olarak, gıdalarda dengeleyici ve kıvam verici olarak, su arıtımında ise iyon değiştirici olarak kullanılmıştır (Yen vd., 2008). Bunun yanında kitosan nano liflere, süngerlere, nano parçacıklara, jele, boncuklara, iskelelere, zarlara ve bağımsız filmlere kolayca işlenebilmektedir (Jayakumar vd., 2010). Ancak, kitosan filmler uygulamalarını sınırlayan zayıf mekanik özelliklere sahiptir. Kitosan bazlı kompozitlerin bu fonksiyonel özellikleri, nano boyutlu selülozun güçlendirici etkisiyle iyileştirilebilir (Fernandes vd., 2011).

2.1.2 Selüloz

Selüloz, anhidroglukoz arasındaki β-1,4-glukozidik bağlarını içeren genişletilmiş bir yapıya sahip, yeryüzünde en bol bulunan doğal bir polimerdir.



Şekil 1.2. Selülozun kimyasal yapısı.

Farklı polaritelere sahip üç hidroksil grubu (C-2'de ikincil OH, C-3'te ikincil OH ve C-6 konumunda birincil OH) mevcuttur ve çeşitli molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağlarının güçlü oluşumakromoleküler zincirin stabilitesi ve kararlılığında önemli rol oynamaktadır. Suda çözünürlüğü 6'dan fazla bir polimerizasyon derecesi ile azalmaktadır (Hospodarova vd., 2018). Endüstriyel pamuğun 500'den daha

Yüksek bir ortalama polimerizasyon derecesi bulunmaktadır.Kağıt hamuru ise 600-1700 polimerizasyon değerine sahiptir (Palme, 2015). Mekanik direnç (elastikiyet ve kopma direnci) liflerin uzunluğuna yani polimerizasyon derecesine göre değişmektedir (Basiji vd., 2010). Son yıllarda, selüloz nano fiberlerin (CNF) üretimi için ham madde olarak farklı selülozik hamurların kullanılması, bilimsel ve teknolojik olarak önemli bir ilgi kazanmıştır (Ferrer vd., 2012; Hoeng vd., 2016).

CNF, hem şekilsiz hem de kristalli bölgeler içeren, nano ölçekte çapları ve birkaç mikrometre uzunluğu ile selülozik elyaflar olarak tanımlanabilir. Genellikle, CNF'in üretim süreci ön işlem ve fibrilasyon olmak üzere iki adımdan oluşmaktadır. Ön işlem kimyasal bazlı veya enzimatik olabilmektedir.Bu genellikle, yüksek basınçlı homojenleştiricilerde tıkanmayı önlediğinden veya seçilen fibrilasyon yöntemine bağlı olarak öğütmeden önce lifleri yumuşattığı için fibrilasyon aşamasını kolaylaştırmak için gerçekleştirilmektedir. Ek olarak, farklı ön işlemler, çok çeşitli uygulamalarda kullanılabilecek önemli ölçüde farklı özelliklere sahip CNF'e yol açacaktır (Delgado vd., 2015). CNF'in temel özellikleri yüksek spesifik yüzeyleri, mükemmel mekanik özellikleri ve çeşitli amaçlar için kimyasal olarak değiştirilebilir olmalarıdır. Ek olarak, CNF biyomedikal, çevre bilimi, kağıt ve karton üretimi, elektronik ve plastik kompozit gibi çeşitli sektörlerde potansiyel uygulamalara sahiptir (Koga vd., 2013; Lin ve Dufresne, 2014; Boufi vd., 2016). Her ne kadar bu çok yönlülük CNF'e çeşitli alanlarda kullanım konusunda büyük sunsa da, yenilenebilir karakterleri başarılarının ana unsurlarındandır (Li vd., 2013).

2.2 *Phragmites australis*'den Elde Edilen Selüloz

Phragmites australis, Poaceae familyasının en geniş coğrafi dağılıma sahip rizomlu bitkilerinden birisidir ve fitoremediyasyon ve bitki stabilizasyonu işlemlerinde faydalı özelliklere sahip önemli bir bitkidir. Ayrıca birçok yerel topluluk tarafından ham madde olarak kullanılmıştır (Köbbing vd., 2013). Çok büyük miktarda biyokütle üretimi ile özellikle önemli miktarda azotun, fosforun ve diğer birçok organik bileşiğin sudan uzaklaştırılması için kullanılabilmektedir. Hidroponik (topraksız tarım) kültürlerinde akut ve kronik $CdSO_4$ konsantrasyonuna maruz kalan *P. australis* bitkilerinin yapraklarında, köklerinde ve stolonlarında antioksidatif tepkiler kaydedilmiş olan çalışmalar bildirilmiştir (Iannelli vd., 2002).

Günümüzde, *Phragmites* birçok sulak alan rehabilitasyon projesinde kıyı erozyonunu kontrol etmek, nehir ve kanalları dengelemek ve yapı üzerindeki dalga hareketini azaltmak için kullanılmaktadır (Brix, 1999; Brix ve Cizkova, 2001). Bunun yanında, atık suların arıtılması için kurulan sulak alan sistemlerinde en yaygın kullanılan bitki türüdür (Brix, 1994). Bitki, mono şekerlere hidrolize edilebilen ve daha sonra biyoetanole fermente edilebilen yüksek selüloz (%33-36) ve hemiselüloz (% 20-22) içeriğe sahiptir (Szijártó vd., 2009).

Biyoenerji için bitkinin kullanımı üzerine ön işlemlerin etkileriaraştırılmış, glukan ve ksilan yapısının mono şeker dönüşümlerinin geliştirilebileceği gösterilmiştir (Sathitsuksanoh vd., 2009; Shuai vd., 2016). Bu nedenle *P. australis*, umut verici bir yenilenebilir enerji kaynağı olarak görülmektedir. Dönüşüm teknolojilerindeki son gelişmeler sayesinde sazlık atıkları kırsal ekonomiye katma değer sağlayan selülozik etanol üretimi için bir ham madde olarak kullanılabilecektir (Szijártó vd., 2009).

2.3 Uçucu Yağlar ve *Rhanterium epapposum* Bitkisi

Esansiyel yağlar, çok sayıda bitki dokusunda oluşan güçlü bir kokuya sahip kompleks uçucu bileşiklerin karışımlarıdır (Teixeira vd., 2013). Esansiyel yağlar antibakteriyel, antikanser, antiflojistik, antioksidan ve antiviral özellikleri nedeniyle insan tıbbında çeşitli terapötik uygulamalara sahiptir (Rashid, vd., 2013).

Uçucu yağlar bitkinin yapraklarından, saplarından, tohumlarından ve hatta köklerinden elde edilebilmektedir. Uçucu yağların her biri benzersizdir ve farklı uygulamalara sahiptir ve doğanın kendisi gibi değişkendir. Esansiyel yağların çıkarılması, birkaç mililitre yağ üretmek için gereken yüksek miktarda ham madde nedeniyle pahalıdır. Bu, orijinal uçucu yağlar için gereken yüksek fiyatları açıklamaktadır (Marzoug vd., 2011).

R. epapposum Oliv.(Asteraceae), çok yıllık bir çalımsı bir bitkidir ve Saudi Arabistan'da geniş çapta dağılmıştır. Ayrıca Orta Doğu'da bulunan cinsin tek türüdür (Collenette, 1999). Bitkisi yaklaşık 50-100 cm boyunda kabaca küresel, gür bir çalıdır (Şekil 2.1.). Kuru mevsimde oldukça yansıtıcı görünen bazdan kaynaklanan çok ince, ince yapılı dallara sahiptir.

Yapraklar küçük ve dardır, genellikle ilk yağmurlardan sonra gelişir, ara sıra ilk yaprak gelişimi yağıştan önce gelir.

Bu yapraklar ilkbaharın sonuna doğru dökülür ve bitki sıcak yaz aylarında uykuda kalır (Omar ve Bhat, 2008). Çiçeklenme ilkbaharda (Nisan-Mayıs) yaprak gelişimi tamamlandığında gerçekleşir, ancak bitki az yağış aldıysa yaprak gelişimi tamamlanmadan önce çiçek açmaya meyillidir. Capitulum adı verilen ve altı ila sekiz tohum içeren meyveler baharın sonunda dökülür ve yaz boyunca toprağa atılmaya devam eder. Her bir kapitulumden birkaç fide ortaya çıksa da, rekabet nedeniyle sadece birkaçı hayatta kalır. Tohumlar çevre koşullarında dört yıldan uzun süre canlı kalır (Zaman, 2006).



Şekil 2.1. *R. epapposum.*

Yerel olarak "Al-Arfaj" olarak bilinen *R. epapposum*, kırsal alanlardaki insanlar tarafından halk hekimliğinde cilt enfeksiyonları, gastrointestinal rahatsızlıklar ve böcek ilacı olarak kullanılır (Younis ve Adam, 2008; Phondani vd., 2016). Bitkinin toprak üstü kısımlarındaki fitokimyasal çalışmalarda, flavonoidler, tanenler, steroller, triterpenler ve uçucu yağların varlığı gösterilmiştir (Al-Yahya vd., 1990).

Ayrıca Kuzeydoğu İran'da yetişen *R. epapposum*'un toprak üstü kısımlarında bulunan uçucu yağı ince tabaka kromatografisi ve gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) ile incelenmiş ve yağın % 92'sinin terpenoid yapıda 107 uçucu bileşenden oluştuğu bildirilmiştir.

Yağın ana bileşenlerinin %55.6'sını oluşturan a-phellandrene, linalol, geraniol, bulnesol ve b-phellandrenden oluştuğu belirlenmiştir. Ayrıca terpenoid olmayan alifatik ve aromatik yapılar da tespit edilmiştir (Awad ve Abdelwahab, 2016). Bunların dışında bitkinin etanol ekstraktının antimikrobiyal (Adam vd., 2011). Ve yara iyileşme aktiviteleri (El-Harbi vd., 2016). Toplam fenolik bileşenleri ve antioksidan aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Shahat vd., 2014).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 Örnek Toplama

3.1.1 *Phragmites australis*

P. australis, 2018 yılında Aksaray Üniversitesi'nden toplanmıştır. Çiçek kısmı yapraklar ve gövdedenayrılmış ve tozu uzaklaştırmak için suyla yıkanmıştır. Daha sonra 72 saat boyunca 24 °C'de oda sıcaklığında kurutmak amacıyla filtre kağıdı üzerine serilmiştir.



Şekil 3.1. *Phragmites australis.*

3.1.2 *Rhanterium epapposum*

R. epapposum, Kuveyt'te çöl bölgelerden 2019 yılında toplanmıştır. Bitki, toprağı ve tozu çıkarmak için yıkanmış, daha sonra bitki içindeki bileşenlerin biyolojik etkinliğini korumak için güneş ışığından uzakta 10 gün boyunca oda sıcaklığında 24 °C'de kurutulmuştur. Bitki tamamen kurutulduktan sonra toz hale dönüştürmek için blender kullanılarak öğütülmüştür.

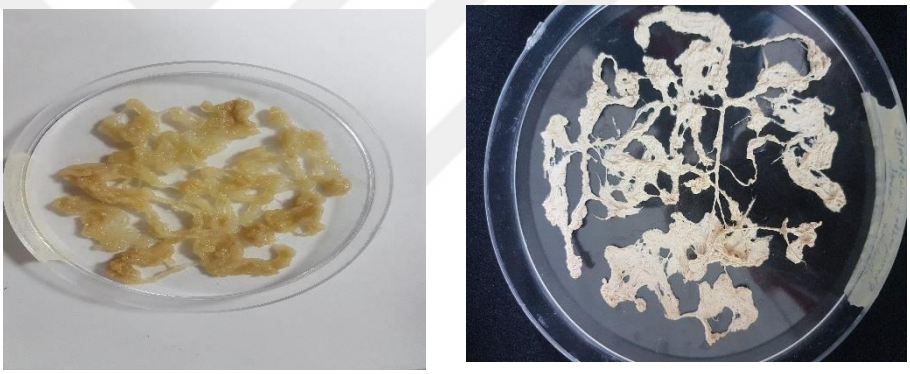


Şekil 3.2. *Rhanterium epapposum.*

3.2 Ekstraktların Hazırlanması

3.2.1 *P.australis*'ten selüloz izolasyonu

Selülozun ekstraksiyonu, *P. australis*'in çiçek kısımları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için yaklaşık 20 g toprak üstü kısım alınmış ve yapısındaki mineralleri uzaklaştırmak için 6 saat boyunca 200 °C'de 1MHCl asit içerisinde kuvvetli bir şekilde karıştırılmıştır. Bundan sonra, örnek asit etkisinden kurtulmak için iyice yıkanmış ve sonra süzülmüştür.Proteinleri uzaklaştırmak için numuneler 2 M NaOH içerisine alınmış ve karışımda 200 °C'de 6 saat ısıtılmıştır. Elde edilen selüloz pH 7.0 olana kadar suyla durulanmıştır. Selüloz nano fiberlerineldesi için selüloz numuneleri 7 gün boyunca aralıklarla ultrasonik banyosunda sonikasyona maruz bırakılmıştır. Daha sonra numuneler inkübatörde 40 °C'de tamamen kurutuluncaya kadar tutulmuştur.



Şekil 3.3. Selüloz nano fiberler (CNF).

3.2.2 Esansiyel yağın ekstraksiyonu

Uçucu yağ ekstraksiyonu için 100 g toz haldeki bitki alınmış ve 6 saat boyunca Clevenger aparatı kullanılarak damıtma işlemine tabi tutulmuştur. Bu süre sonunda elde edilen uçucu yağ hekzanla seyreltilerek alınmıştır. Daha sonra uçucu yağ örneği susuz $NaSO_4$ ile kurutularak 0.45 µm'lik PTFE şırınga süzgeci ile süzülerek analize kadar +4 °C'de saklanmıştır.



Şekil 3.4. Hidrodistillasyon yöntemi ile uçucu yağ ekstraksiyonu.

3.3 Filmlerin Üretimi

3.3.1 Kitosan jeli hazırlama

1g kitosan (Sigma-Aldrich CAS: 9012-76-4 yüksek viskoz) %1'lik asetik asit ile çözülerek jel hale getirilmiştir. Çözelti, filmleri üretmek için uygun jel dokusunu elde edene kadar 24 saat manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında karıştırılmıştır.

3.3.2 Kompozit filmin hazırlanması

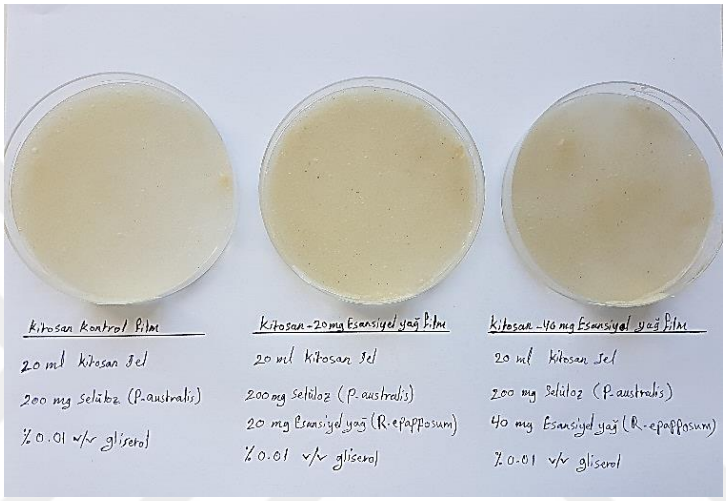
Hazırlanan kitosan jeller kullanılarak ve plastikleştirici olarak 10 µl gliserol ve diğer katkı maddeleri eklendikten sonra petri kaplarına dökülerek içeriğine göre 4 farklı film hazırlanmıştır. Filmlerin içeriği ve uygulanan işlemler aşağıdaki gibidir ;

- Kontrol kitosan film (CC) : 20 ml kitosan jel ve 10 µl gliserol eklenip karıştırılarak direkt petriye dökülmüştür.
- Kitosan+selüloz nano fiber film (CCNF) : 20 ml kitosan jel ve 10 µl gliserol eklendikten sonra üzerine 200 mg selüloz nano fiber eklendikten sonra homojenizatörde homojen bir karışım oluşuncaya kadar karıştırılmış ve petriye dökülmüştür.
- Kitosan+selüloz nano fiber+200 mg uçucu yağ içeren film (CCNFEO-20) :20 ml kitosan jel ve 10 µl gliserol üzerine 200 mg selüloz nano fiber ve 20 mg

esansiyel yağ eklendikten sonra homojenizatörde homojen bir karışım oluşuncaya kadar karıştırılmış ve petriye dökülmüştür.

- Kitosan+selüloz nano fiber+400 mg uçucu yağ içeren film (CCNFEO-40) : 20 ml kitosan jel ve 10 µl gliserol üzerine 200 mg selüloz nano fiber ve 40 mg esansiyel yağ eklendikten sonra homojenizatörde homojen bir karışım oluşuncaya kadar karıştırılmış ve petriye dökülmüştür.

Ayrı petrilere dökülen filmler etiketlenmiş ve ardından kuruması içinoda sıcaklığında 48 saat süreyle bekletilmiştir.



Şekil 3.5. Kontrol ve farklı içerikli filmler.

3.4 Fizikokimyasal Karakterizasyon

3.4.1 Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi

CC, CCNF, CCNFEO-20 ve CCNFEO-40 kompozit filmlerin yapısal farklılıkları belirlemek için, FT-IR analizi, 600-4000 cm^{-1} dalga boyunda Perkin Elmer FT-IR Spektrometresi kullanılarak yapılmıştır. Filmlerin FTIR spektrumları, karışım filmlerinin hazırlanmasından sonra bant değişimlerini belirlemek için incelenmiştir.

3.4.2 Termogravimetrik analiz

Farklı içerikli filmlerin termal özellikleri TGA/SDTA 851 Mettler Toledo analiz cihazı kullanılarak belirlenmiştir. TGA eğrileri N_2 atmosferi altında, 30-600 °C sıcaklık aralığında ve 10 °C min^{-1} ısıtma hızında elde edilmiştir. Analiz sonucunda filmlerin bozulma sıcaklıkları ve her bir basamakta kütle kayıpları belirlenmiştir.

3.4.3 Taramalı elektron mikroskobu

Filmlerin yüzey morfolojilerinin incelenmesi için taramalı elektron mikroskobu (SEM), Zeiss, Eco 40 (Almanya) kullanılarak yapılmıştır. Analizlerden 13nce örnekler Sputter Coater (Cressingto Auto 1808) kullanılarak ince bir tabaka olarak altın / paladyum ile kaplanmıştır.

3.4.4 Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi

GC-MS analizleri bir Agilent 7890 GC-MS sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Taşıyıcı gaz olarak He ile birlikte bir HP-INNOWAX kolonu (60 m uzunluğunda, 0.25 mm ı.d. ve 0.25 um film kalınlığı) kullanıldı. Kolona sıcaklık 13nce13d13 uygulanmış ve buna 13nce başlangıç sıcaklığı 60 °C de 10 dakika bekletilmiştir. Daha 13nce13 dakikada 4 °C artırılarak 220 °C'ye ulaşılmış ve bu sıcaklıkta 10 dakika bekletildikten 13nce13 dakikada 1 °C artırılarak 240 °C'ye ulaşılmıştır. Son aşamada bu sıcaklıkta 30 dakika tutularak analiz sonlandırılmıştır. Böylece toplam analiz süresi 110 dakika olmuştur. Enjektör bloğunun sıcaklığı 240 °C olarak ayarlanmıştır ve kütle spektroları 70 eV'da kaydedilmiştir.

3.5 Antioksidan Aktivite

3.5.1 DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal giderme aktivitesi

Filmlerin 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikallerinin giderme oranı UV spektrometri kullanılarak belirlenmiştir. Metotta $6x10^{-5}$ M konsantrasyondaki DPPH çözeltisinden 1 ml alınarak farklı içeriklerdeki filmlerin 10 mg üzerine eklenmiş ve oda sıcaklığında 60 dakika süresince karanlıkta bekletilerek absorbansları BECKMAN COULTER spektrometresi DU 730 UV kullanılarak 517 nm'de ölçülmüştür. Deneyler 3 kez tekrarlandı ve sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir (Siripatrawan ve Harte, 2010).

3.5.2 FRAP (Demir iyonu indirgeme antioksidan gücü)

Filmlerin anti oksidatif aktivitesi, (Aktumsek vd., 2013) tarafından bildirilen FRAP'ın modifiye edilmiş bir versiyonunun (ferrik indirgeyici antioksidan gücü) tahlili kullanılarak çalışılmıştır. Reaktif asetat tamponu, TPTZ ve ferrik (III) klorid çözeltileri (10: 1: 1; v: v: v) hazırlandı.

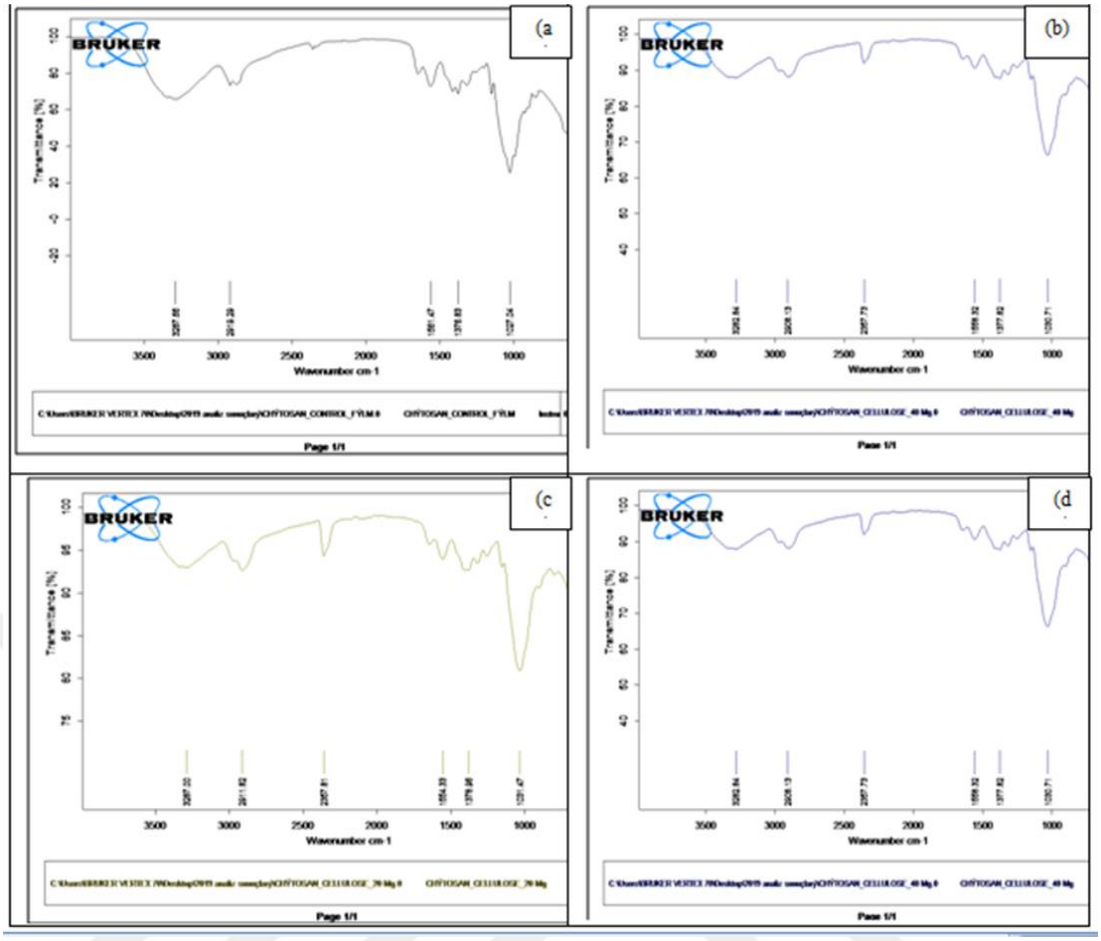
Film örnekleri (10 mg) küçükparçalara kesildi ve test tüplerine yerleştirildi. Örneklere iki mL reaktif çözelti ilave edildi ve 30 dakika 30 °C'de inkübe edildi. Fe^{+2} miktarı, 593 nm'de spektrofotometrik olarak belirlendi. Troloks standart olarak kullanıldı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 FTIR

P. australis selüloz, CC, CCNF, CCNFEO-20 ve CCNFEO-40 kompozit filmlerin FT-IR spektrumları Şekil 4.1'de verilmiştir. *P.australis* selüloz nonafiber, CC, CCNF, CCNFEO-20 ve CCNFEO-40 filmlerin FT-IR spektrumu 3200-3500 cm^{-1} aralığında geniş pik göstermiştir. Bu geniş pik, absorbe edilmiş suyun moleküller arası hidrojen bağı ile bağlı O-H grubunun titreşiminden kaynaklanmaktadır (Dai vd., 2002). Ayrıca filmlere plastikleştirici olarakeklenen gliserol, hidrojen bağının yoğunluğundan dolayı –OH absorpsiyonu ile bandının genişlemesine neden olmuştur (Dou vd., 2009). *R. epapposum* uçucu yağı, kitosan-selüloz nanofiber film matrisi içine dahil edildikten sonar, 2400-2300 cm^{-1}'de pik oluşmuştur, bu pik C-H asimetrik titreşimine karşılık gelmektedir. Dolayısıyla, farklı oranlarda *R.epapposum* uçucu yağının kitosan-selüloz nanofiber filmlerine dahil edilmesi ile miktarının artmasıyla pik şiddetinin de arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.1). Ticari kitosan için; NHCOCH3 grubundaki ν (C=O) (Amid I bandı) 1650 cm^{-1}ve NHCOCH3 grubundaki ν (NH2) (Amid II bandı) 1590 cm^{-1}ve 1370 cm^{-1}' de (amid III, C = N) karakteristik bantlar olduğu bilinmektedir (Peng vd., 1994; Al Sagheer vd., 2009). *P. australis* selüloz nanofiberin spekturumunda, polisakaritlerin hidroksil grubu O-H'ın titreşim modunun yanı sıraselülozun hidrojenin molekül içi titreşime karşılık gelen 3330.26 cm^{-1} civarında bant gözlemlenmiştir. Bu pik yapıda absorbe edilen suya atfedilmektedir (Schwanninger vd., 2004). Diğer yandan, 2891.52 cm^{-1}'de gözlenen pik C-H gruplarının titreşimine bağlanmaktadır. Ayrıca 1638.66, 1318.48, 1028.68 ve 1028.68 cm^{-1} civarındaki bantlar, selülozun C-H2, C-H, O-H ve C-O bağlarına karşılık gelmektedir. Daha önceki çalışmalara bakıldığında, 2900, 1640, 1315, 1106 ve 1055 cm^{-1} civarındaki bantlar, farklı bitkilerdenselüloz izolasyonubaşarılı bir şekilde yapıldığını göstermektedir (Sun vd., 2004; Kaya, vd., 2016). Bu sonuçlar ile *P. australis*'ten izole edilen selülozun piklerinin deuyumlu olduğu görülmektedir. CC film için; gliserol ilavesi ile kitosan filmi oluştuktan sonra intramoleküler hidrojen bağlarının titreşimine karşılık gelen 3287.66 cm^{-1}'de geniş ve ortaderecede yoğun bir bant göstermiştir. Ayrıca, 1648.20 cm^{-1}'de C = O gerilmesi (amid I),1561.47 cm^{-1}'de N-H titreşimi (amid II), 1376.83 cm^{-1}'de C-N gerilmesi (Amid III) ve1027.04 cm^{-1}'de gözlemlenen kuvvetli absorpsiyon bantları, C-O bağlarının asimetrik germe titreşimlerinden kaynaklanmaktadır (Şekil 4.1). CCNF film için, -

OH grubunun bandı 3442.00 cm^{-1}'e doğru kaydığı görülmektedir. Bu durum kitosan, selüloz ve gliserolün yapısında bulunan –OH grubu tarafından uygulanan gerilmenin varlığına bağlıdır. CCNF filmde CH_2 simetrik ve asimetrikgerilme bandı, 2916.04-1406.32 cm^{-1}'de bulunan piklere bağlanırken, 1552 cm^{-1}'deki band, amidII'nin NH bağlarının titreşimine karşılık gelmektedir. Bu bantlar, kitosan selüloz filme başarılı bir şekilde dahil edildiğini doğrulamaktadır. Bu gözlemler daha önce bildirilençalışma ile uyumlu bulunmuştur (Su vd., 2018). Şekil 4.1'de görüldüğü üzere elde edilen CCNFEO-20 ve CCNFEO-40 filmlerin spektrumlarında *R. epapposum* uçucu yağı için karakteristik zirve pikisırasıyla; 2357.81 ve 2357.73 cm^{-1} olarak kaydedilmiştir. CCNFEO-20 ve CCNFEO-40 filmlerinde uçucu yağın miktarının artması ile karakteristik olan piklerin şiddetini arttırdığı gözlemlenmiştir. Başka bir çalışmada, kitosan film matrisi içine eklenen *C. sativa* tohumu yağının konsantrasyonunun artmasıyla karakteristik pikin şiddetini daha da arttırdığı belirlenmiştir (Gursoy vd., 2018). Ve benzer sonuç elde edildiği gözlenmiştir. Ayrıca, CCNFEO-20 ve CCNFEO-40 kompozit filmlerdeki kitosanın amid II bant yoğunluğu, kitosan, selüloz ve uçucu yağ arasındaki olası etkileşimler sonucunda azalmıştır. Farklı oranlarda *R. epapposum* uçucuyağı eklenen kitosan-selüloz kompozit film numunelerinin FT-IR spektrumunda gözlemlenen değişiklikler, uçucu yağın kompozit film matrisi içine başarılı bir şekilde dâhil edildiğini göstermiştir.



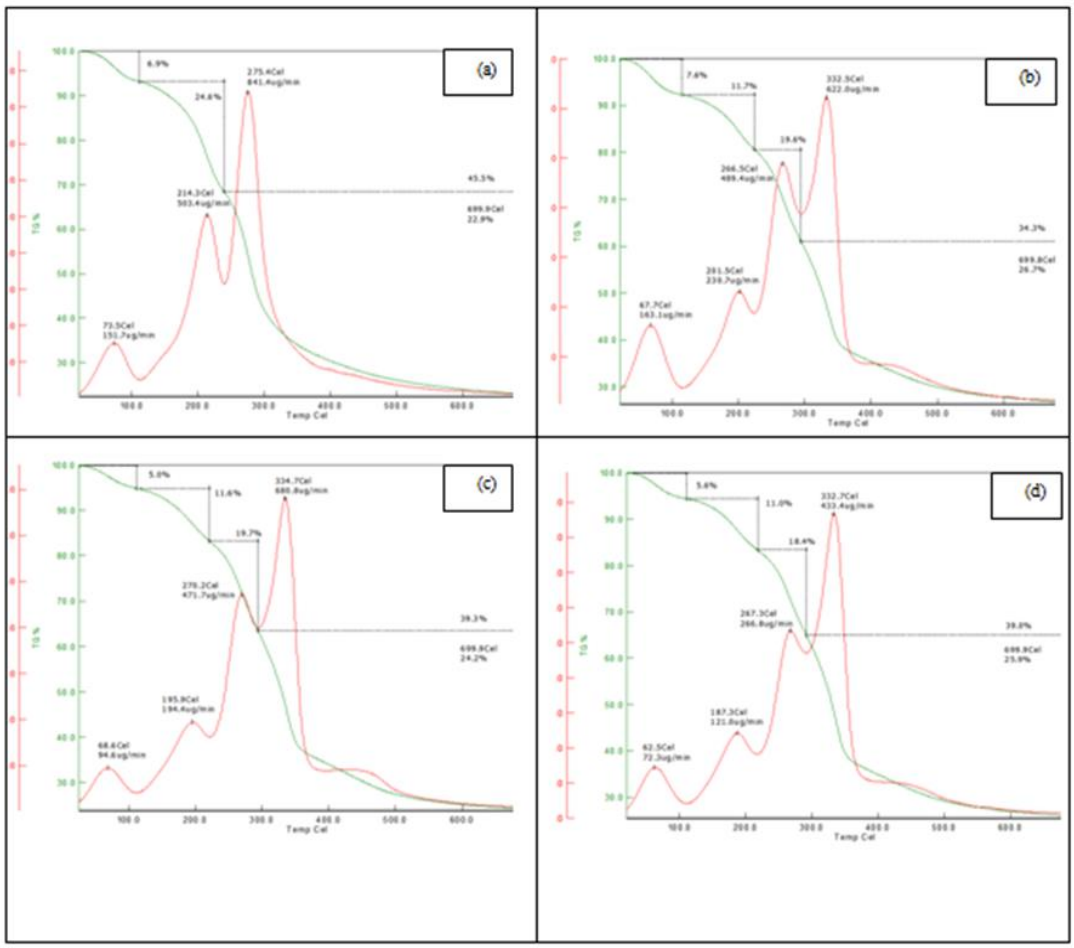
Şekil 4.1. (a) CC, (b) CCNF, (c) CCNFEO-20, (d) CCNFEO-40 kompozit filmlerin FTIR analizi.

4.2 TGA

Üretilen CC, CCNF, CCNFEO-20 ve CCNFEO-40 kompozit filmlerin TGA analizleri 100-700 °C arasında gerçekleştirilmiş ve elde edilen termogramlar Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Elde edilen termogramlarda 4 ana kütle kaybı piki kaydedilmiştir. Bu kayıplardan ilki CC film için 73.5 °C'de, CCNF film için 67.7 °C'de, CCNFEO-20 film için 68 °C'de ve CCNFEO-40 film için 62.5 °C'de sırasıyla %6.9, %7.6, %5.0 ve %5.6 olarak belirlenmiştir.

Literatüre göre 0-100°C arasında gerçekleşen kütle kayıpları suyun yapıdan uzaklaşmasına atfedilmektedir (Hu vd., 2016). Üretilen filmler için 190-220 °C arasında gerçekleşen ikinci kütle kaybı plastikleştirici olarak kullanılan gliserolün dekompozisyonuna atfedilmektedir (Noshirvani vd., 2017). Üretilmiş olan CC, CCNF, CCNFEO-20 ve CCNFEO-40 kompozit filmlerin için gözlenen üçüncü ana

pik sırasıyla 214.3, 266.5, 270.2 ve 267.3°C'lerde 24.6%, 19.6%, 19.7%, 18.4% olarak kaydedilmiştir (Şekil 4.2). Burada gerçekleşen kütle kayıpları kitosanın dekompozisyonuna atfedilmektedir (Mujtaba vd., 2017). Üretilen filmlerin termogramlarında CCNF film için 332.5 °C'de, CCNFEO-20 film için 334.5 °C'de ve CCNFEO-40 film için 332.4 °C'de gerçekleşen dördüncü kütle kaybı sırasıyla 34.3%, 39.3%, 39.0% olarak belirlenmiştir. Bu kayıp selülozun dekompozisyonuna atfedilmektedir (Pelissari vd., 2017).



Şekil 4.2. (a) CC, (b) CCNF, (c) CCNFEO-20, (d) CCNFEO-40 kompozit filmlerin TGA analizi.

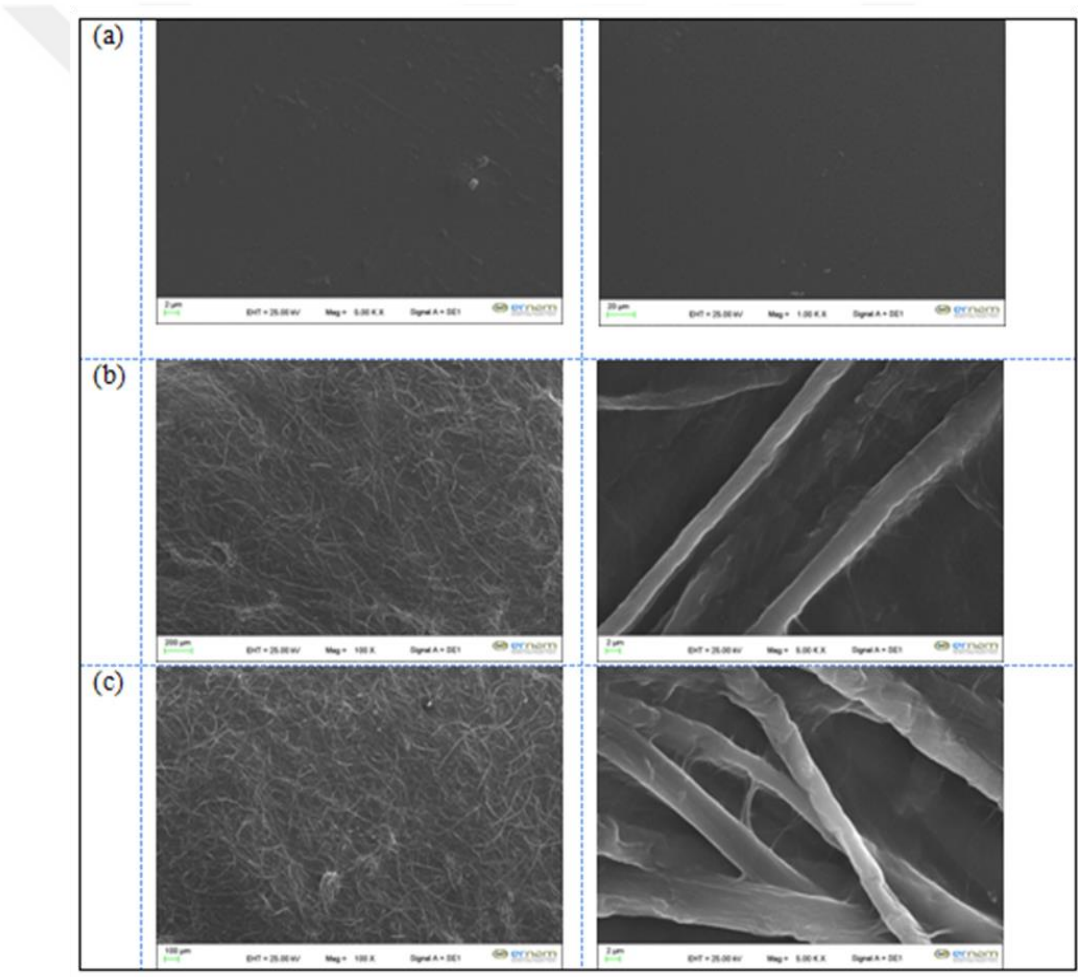
4.3 SEM

Filmlerin morfolojik özellikleri SEM analizi kullanılarak belirlenmistir. CC filmi, çözücü döküm yöntemi ile hazırlanan kitosan filminin homojen yapısını gösteren, az sayıda çatlak ve gözenekli nispeten düzgün bir yüzey göstermiştir (Şekil 4.3). Bu bulgular diğer araştırmaların sonuçlarına karşılık geldi. Ayrıca, hapsolmuş havaya

bağlı olarak bir miktar kabarcık oluşması da fark edilmiştir (kurutma işlemi sırasında meydana gelmiş olabilir).

Sonuçlar, CCNFEO-20 filmlerin mikroyapısının yüzey ve kesitte önemli ölçüde değiştiğini göstermiştir. SEM yüzey mikrograflarına göre, CNF içeren film daha heterojen bir yapıya sahip olduğu gösterilmiştir (Choo vd., 2016).

CNF ilavesi, dalgalanmaların ve sırtların artan seviyesiyle sonuçlanan çatlak sapma alanlarının yoğunluğunu arttıran pürüzlü bir yüzeye yol açabilir (Ballner vd., 2016). Farklı oranlarda uçucu yağ içeren filmlerin yüzeyinde önemli bir fark olmadığını da fark edebiliriz.



Şekil 4.3. (a) CC, (b) CCNF, (c) CCNFEO-20, (d) CCNFEO-40 kompozit filmlerin SEM görüntüleri.

4.4 Uçucu Yağ Analizleri

R. epapposum bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın bileşimi GC-MS ile analiz edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda camphene, myrecene, limonene, α-pinene, sabinene ve β-pinene ana bileşenler olarak belirlenmiştir. Bu bileşenler uçucu yağ kompozisyonunun önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Suudi Arabistan'dan toplanan *R. epapposum* bitkisinin uçucu yağ bileşiminin araştırıldığı bir çalışmada bizim sonuçlarımıza benzer şekilde camphene, myrecene, limonene ve α-pinene temel bileşenler olarak belirlenmiştir (Demirci vd., 2017). Yine Suudi Arabistan'da yapılan diğer bir çalışmada bitkinin çiçek, yaprak ve gövde kısımlarının uçucu yağ bileşimi araştırılmış ve çiçekte limonene, linalool, 4-terpineol ve α-cadinol, yapraklarda limonene, sabinene, α-pinene ve β-myrcene, gövdede ise linalool, ionole, α-cadinol, β-eudesmol, 4-terpineol ve α-terpineol temel bileşenler olarak bulunmuştur (Awad ve Abdelwahab, 2016).

4.5 Antioksidan Aktivite

Kitosan temelli selüloz ve uçucu yağ katkılı olarak hazırlanmış filmlerin antioksidan aktiviteleri FRAP ve DPPH testleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu testlerden FRAP aktivitesi araştırılan örneğin demir iyonlarını indirgeme özelliklerinin değerlendirilmesi ile aktivite hakkında bilgi vermektedir. DPPH testi ise ortamda bulunan bir radikalin antioksidatif aktiviteye sahip bir örnek tarafından giderilme oranının belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Uygulanan antioksidan aktivite belirleme testleri ile kontrol ve kompozit filmlerin antioksidan aktivitelerinde selüloz ve uçucu yağ ilavesinin ne gibi değişikliklere yol açtığı incelenmiştir. Böylece antioksidan aktivite yönünden filmlerin bileşiminde kullanılacak katkı maddelerinin oranıyla ilgili bir validasyon araştırması da yapılması amaçlanmıştır. Bu tür validasyon çalışmalarından elde edilecek veriler filmlerin potansiyel kullanım alanları konusunda da fikir vermesi açısından oldukça değerlidir.

4.5.1 FRAP

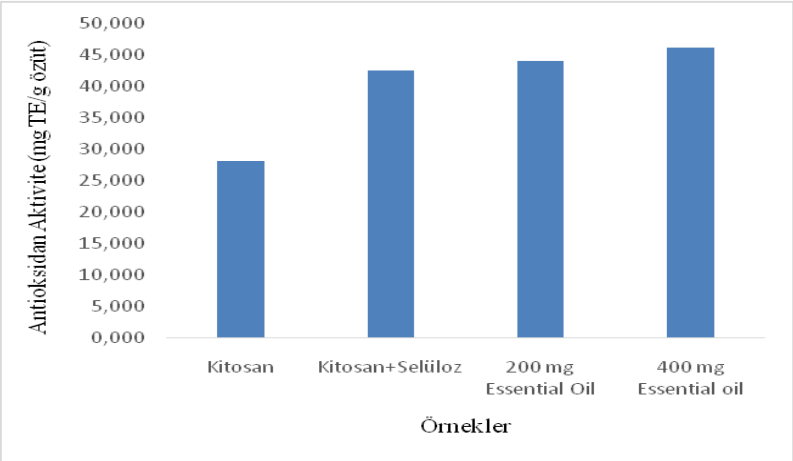
Kitosan temelli olarak hazırlanan CC, CCNF, CCNFEO-20 ve CCNFEO-40 kompozit filmlerin demir iyonu indirgeme aktiviteleri belirlenerek antioksidan potansiyellerindeki değişimler araştırılmış ve farklı içeriklere sahip filmlerin bu aktiviteleri karşılaştırılarak sonuçlar Çizelge 4.1 ve Şekil 4.4 verilmiştir.

Buna göre kontrol olarak kullanılan CC filmin trolox eşdeğeri olarak hesaplanan antioksidan aktivitesi 28.16 mg/g extract iken selüloz ilavesi ile (CCNF) bu aktivite 42.53 mg/g extract seviyesine yükselmiştir. Daha sonra *R. epapposum* bitkisinden elde edilen uçucu yağın farklı oranlarda (20 mg ve 40 mg) eklenmesiyle üretilen kompozit filmlerin aktiviteleri sırasıyla 44.05 mg/g extract ve 46.19 mg/g extract olarak bulunmuştur. Sonuçlardan görüldüğü gibi selüloz ilavesi antioksidan aktivitede ciddi bir artışa neden olmuşken uçucu yağ ilavesi sonucunda artış sınırlı kalmıştır.

Çizelge 4.1. Filmlerin antioksidan aktiviteleri.

Örnekler	**TE (mg/g özüt)**	**İnhibisyon (%)**
CC	28.16±1.70	5.31±1.10
CCNF	42.53±2.41	6.15±0.08
CCNFEO-20	44.05±0.79	6.45±0.59
CCNFEO-40	46.19±1.19	6.71±0.13

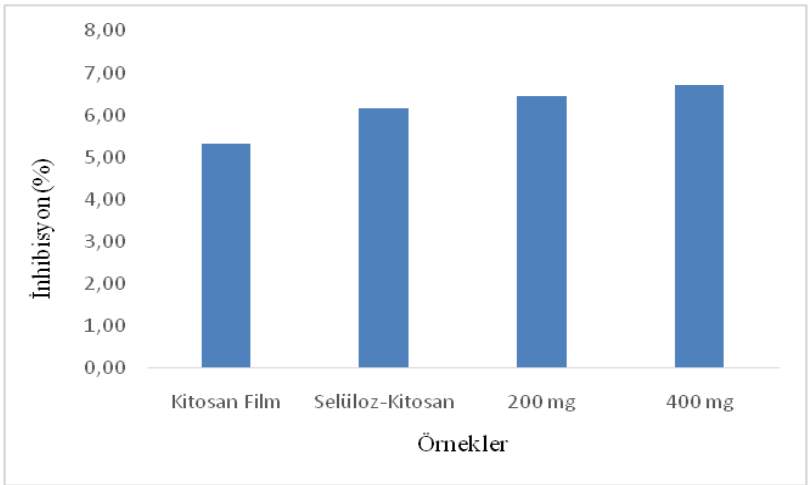
TE: Troloks eşdeğeri



Şekil 4.4. CC, CCNF, CCNFEO-20 ve CCNFEO-40 kompozit filmlerin demir iyonları indirgeme gücü.

4.5.2 DPPH

Çalışmada üretilen CC, CCNF, CCNFEO-20 ve CCNFEO-40 kompozit filmlerin DPPH radikali giderme aktiviteleri belirlenmiş ve yüzde inhibisyon oranları Çizelge 4.1'de verilmiştir. Elde edilen verilere göre CC film %5.31 düzeyinde DPPH radikalini inhibe ederken, CCNF filmde bu oran %6.15'e yükselmiştir. *Rhanterium epapposum* uçucu yağı ilavesi filmlerin antioksidan aktivitelerini az da olsa artırmıştır. Buna göre CCNFEO-20 filmin inhibisyon aktivitesi %6.45, CCNFEO-40 film %6.71 oranında inhibisyon göstermiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. CC, CCNF, CCNFEO-20 ve CCNFEO-40 kompozit filmlerin DPPH radikali giderme aktivitesi.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmada öncelikle selüloz nanofiber içeren kitosan filmler başarıyla oluşturulmuş ve filmlere farklı konsantrasyonlarda *R. epapposum* bitkisinden elde edilen esansiyel yağlar homojen bir şekilde ilave edilmiştir. Daha sonra elde edilen filmlerin yüzeylerinin karakterizasyonu amacıyla uygulanan SEM analizleri sonucunda esansiyel yağ içeren filmlerin yüzeylerinin daha fazla pürüzlü bir yapıda olduğu gösterilmiştir. Çalışmada incelen kompozit filmlerin antioksidan aktiviteleri DPPH radikali giderme aktivitesi ve FRAP testleri uygulanarak belirlenmiştir. Bu testler sonucunda elde edilen verilere göre CC ile kıyaslandığında CCNF, CCNFEO-20 ve CCNFEO-40 filmlerinin antioksidan yeteneklerinin arttığı gösterilmiştir. Bu durum DPPH radikali giderme aktivitesinde sınırlı düzeyde artış görülmüşken FRAP testinde ise özellikle CC ve CCNF filmler arasında antioksidan aktivite yaklaşık iki kat artmıştır. Yine FRAP testinde CCNF ile CCNFEO-20 ve CCNFEO-40 filmleri arasında farklı kompozit filmlerin demir indirgeme güçleri arasındaki artış düşük düzeylerde kalmıştır.

Ayrıca farklı içerikli filmlerin termal stabilitesinin incelenmesi sonucunda CC filminde 3 farklı kütle kaybı görülürken diğer filmlerde 4 farklı kütle kaybı kaydedilmiştir. Termal stabilite analizleri sonucunda aynı düzeyde gerçekleşen kütle kayıpları açısından değerlendirildiğinde ilk kütle kaybı hariç diğer tüm kütle kayıplarında bozunma dereceleri control filme kıyasla diğer tüm filmlerde artmıştır. Ancak katkılı filmler olan CCNF, CCNFEO-20 ve CCNFEO-40 filmlerinin kendi aralarındaki kıyasta bariz farklılık yada kütle kaybı ile katkı yapılan madde ve miktarı arasında bir bağlantı bulunmamıştır. Genel olarak selüloz ve uçucu yağ ilave edilen filmlerin termal kararlılığı daha yüksek bulunmuştur.

Çalışma bitkilerden elde edilen doğal bir polimer olan selüloz ve tıbbi özelliklere sahip olabilen bitki ekstraktlarından olan uçucu yağlar kullanılarak nanofiber ve fitokimyasalların pek çok önemli etkiye sahip olan kitosanın birleştirilmesi ile yeni bir formülasyona sahip doğal, biyobozunur, biyouyumlu yeni kompozit filmlerin tasarlanması gerçekleştirilmiştir. Üretilen bu filmlerin temel karakterizasyon analizleri ve in vitro antioksidan kapasiteleri de belirlenmiştir. Elde edilen veriler mevcut çalışmada üretilen filmlerin genel olarak iyi özelliklere sahip olduğunu göstermiştir.

Biyoselüloz bazlı doğal kompozit filmlerin çevresel kirlenmenin azaltılmasına katkılarından dolayı kullanım alanlarının giderek gelişmekte ve yaygınlaşmaktadır.

Ek olarak, bu tür doğal filmlerin antioksidan aktiviteleri gibi özellikleri bunların gıda endüstrisi, medical, çevre gibi alanlarda kullanılabilirliğinin belirlenmesi adına önemlidir. Bu nedenle bu çalışmada geliştirilen kitosan temelli selüloz nanofiber ve uçucu yağ katkılı filmlerin ileri in vitro ve in vivo testleri de yapılarak tamamıyla karakterize edilmesi ile gıda kaplamaları gibi doğal koruyucu ürünler, yara bantları gibi biyomedikal ürünlerolarak kullanım potansiyellerinin oldukça geniş olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Adam, S.I.Y., El-Kamali, H.H. ve Adama, S.E.I., 2011. Phytochemical screening and antibacterial activity of two Sudanese wild plants, *Rhanterium epapposum* and *Trichodesma africanum*, J. Fac. Sci. Technol, 2, 83-96.

Aktumsek, A., Zengin, G., Guler, G.O., Cakmak, Y.S. ve Duran, A., 2013. Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *CentaureaL*. species, Food and Chemical Toxicology, 55, 290-296.

Al-Harbi, K. B., El-Tigani-Asil, E. A., Ahmed, A. F., El-Ashmawy, I. M. ve Al-Wabel, N. A., 2016. Wound healing potential of methanolic extracts of some plants native to Al-Qassim Region, Saudi Arabia,Journal of Food, Agriculture & Environment,14, 3-4.

Al-Yahya, M.A., 1990. Saudi plants: a phytochemical and biological approach, King Abdulaziz City for Science and Technology.

Awad, M. ve Abdelwahab, A., 2016. Chemical diversity of essential oils from flowers, leaves, and stems of *Rhanterium epapposum* Oliv., Growing in northern border region of Saudi Arabia, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 6, 9, 767-770.

Ballner, D., Herzele, S., Keckes, J., Edler, M., Griesser, T., Saake, B. ve Gindl-Altmutter, W., 2016. Lignocellulose nanofiber-reinforced polystyrene produced from composite microspheres obtained in suspension polymerization shows superior mechanical performance, ACS applied materials & interfaces, 8, 21, 13520-13525.

Basiji, F., Safdari, V., Nourbakhsh, A. ve Pilla, S., 2010. The effects of fiber length and fiber loading on the mechanical properties of wood-plastic (polypropylene) composites, Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 34, 3, 191-196.

Boufi, S., Gonzalez, I., Delgado-Aguilar, M., Tarres, Q., Pèlach, M. À. Ve Mutje, P., 2016. Nanofibrillated cellulose as an additive in papermaking process: A review, Carbohydrate polymers, 154, 151-166.

Bonilla, J. ve Sobral, P.J., 2016. Investigation of the physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of gelatin-chitosan edible film mixed with plant ethanolic extracts, Food Bioscience, 16, 17-25.

Brix, H. ve Cizkova, H., 2001. Introduction: Phragmites-dominated wetlands, their functions and sustainable use, Aquatic Botany, 69, 2-4, 87-88.

Brix, H., 1994. Functions of macrophytes in constructed wetlands. Water Science and Technology, 29, 4, 71-78.

Brix, H., 1999. Genetic diversity, ecophysiology and growth dynamics of reed (*Phragmites australis*). Aquatic Botany, 64, 179-184.

Choo, K., Yern, C., Cheng, C., Sabariah, J. ve Nai-Shang, L., 2016. "Preparation and characterization of polyvinyl alcohol-chitosan composite films reinforced with cellulose nanofiber.", Materials, 9, 8, 644.

Crandall, A.D. ve Montville, T.J., 1998. Nisin resistance in Listeria monocytogenes ATCC 700302 is a complex phenotype, Appl. Environ. Microbiol., 64, 1, 231-237.

Collenette, S., 1999. Wildflowers of Saudi Arabia, National Commission for Wildlife Conservation and Development, (NCWCD).

Dean, J.P. ve Zottola, E.A., 1996. Use of nisin in ice cream and effect on the survival of Listeria monocytogenes, Journal of Food Protection, 59, 5, 476-480.

Demirci, B., Yusufoglu, H.S., Tabanca, N., Temel, H.E., Bernier, U.R., Agramonte, N.M. ve Demirci, F., 2017. *Rhanterium epapposum* Oliv. essential oil: Chemical composition and antimicrobial, insect-repellent and anticholinesterase activities, Saudi Pharmaceutical Journal, 25, 5, 703-708.

Fernandes, S.C., Freire, C.S., Silvestre, A.J., PascoalNeto, C. ve Gandini, A., 2011. Novel materials based on chitosan and cellulose, Polymer International, 60, 6, 875-882.

Ferrer, A., Quintana, E., Filpponen, I., Solala, I., Vidal, T., Rodríguez, A. ve Rojas, O. J. 2012. Effect of residual lignin and heteropolysaccharides in nanofibrillar cellulose and nanopaper from wood fibers, Cellulose, 19, 6, 2179-2193.

Ghaderi, M., Mousavi, M., Yousefi, H. ve Labbafi, M., 2014. All-cellulose nanocomposite film made from bagasse cellulose nanofibers for food packaging application, Carbohydrate polymers, 104, 59-65.

Hoeng, F., Denneulin, A. ve Bras, J., 2016. Use of nanocellulose in printed electronics: a review, Nanoscale, 8, 27, 13131-13154.

Hospodarova, V., Singovszka, E. ve Stevulova, N., 2018. Characterization of cellulosic fibers by FTIR spectroscopy for their further implementation to building materials, American Journal of Analytical Chemistry, 9, 06, 303.

Iannelli, M. A., Pietrini, F., Fiore, L., Petrilli, L. ve Massacci, A., 2002. Antioxidant response to cadmium in *Phragmites australis* plants, Plant Physiology and Biochemistry, 40, 11, 977-982.

Jayakumar, R., Menon, D., Manzoor, K., Nair, S.V. ve Tamura, H., 2010. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials, A short review, Carbohydrate polymers, 82, 2, 227-232.

Jayakumar, R., Nwe, N., Tokura, S. Tamura, H., 2007. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials, International journal of biological macromolecules, 40, 3, 175-181.

Jridi, M., Hajji, S., Ayed, H.B., Lassoued, I., Mbarek, A., Kammoun, M. ve Nasri, M., 2014. Physical, structural, antioxidant and antimicrobial properties of gelatin–chitosan composite edible films, International journal of biological macromolecules, 67, 373-379.

Kaplan, Z., 2019. Long-term protection efficiency of biodegradable polymer treatments on limestone.

Karthika, M., Shaji, N., Johnson, A., Neelakandan, M.S., Gopakumar, D.A. ve Thomas, S., 2019. Biodegradation of Green Polymeric Composites Materials, Bio Monomers for Green Polymeric Composite Materials, 141-159.

Köbbing, J.F., Thevs, N. ve Zerbe, S., 2013. The utilisation of reed (*Phragmites australis*): a review, Mires & Peat, 13.

Koga, H., Saito, T., Kitaoka, T., Nogi, M., Suganuma, K. ve Isogai, A., 2013. Transparent, conductive, and printable composites consisting of TEMPO-oxidized nano cellulose and carbon nano tube, Bio macro molecules, 14, 4, 1160-1165.

Li, Q., McGinnis, S., Sydnor, C., Wong, A. ve Renneckar, S., 2013. Nano cellulose life cycle assessment, ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 1, 8, 919-928.

Lin, N. ve Dufresne, A., 2014. Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect, European Polymer Journal, 59, 302-325.

Marzoug, H.N.B., Romdhane, M., Lebrihi, A., Mathieu, F., Couderc, F., Abderraba, M. ve Bouajila, J., 2011. Eucalyptus oleosa essential oils: chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of the oils from different plant parts (stems, leaves, flowers and fruits), Molecules, 16, 2, 1695-1709.

Mujtaba, M., Salaberria, A. M., Andres, M. A., Kaya, M., Gunyakti, A. ve Labidi, J., 2017. Utilization of flax (Linum usitatissimum) cellulose nanocrystals as reinforcing material for chitosan films, International journal of biological macromolecules, 104, 944-952.

Noshirvani, N., Ghanbarzadeh, B., Gardrat, C., Rezaei, M. R., Hashemi, M., Le Coz, C. ve Coma, V., 2017. Cinnamon and ginger essential oils to improve antifungal, physical

and mechanical properties of chitosan-carboxymethyl cellulose films, Food Hydrocolloids, 70, 36-45.

Omar, S.A. ve Bhat, N.R., 2008. Alteration of the *Rhanterium epapposum* plant community in Kuwait and restoration measures, International Journal of Environmental Studies, 65, 1, 139-155.

Palme, A., 2015. Characterization of cellulose in post-consumer cotton textiles, Doctoral dissertation, Department of Chemistry and Chemical Engineering, Chalmers University of Technology, Sweden.

Patiño-Masó, J., Serra-Parareda, F., Tarrés, Q., Mutjé, P., Espinach, F.X. ve Delgado-Aguilar, M., 2019. TEMPO-Oxidized Cellulose Nanofibers: A Potential Bio-Based Super absorbent for Diaper Production, Nanomaterials, 9, 9, 1271.

Pelissari, F.M., do Amaral Sobral, P.J. ve Menegalli, F.C., 2014. Isolation and characterization of cellulose nanofibers from banana peels. Cellulose, 21, 1, 417-432.

Phondani, P.C., Bhatt, A., Elsarrag, E. ve Horr, Y.A., 2016. Ethnobotanical magnitude towards sustainable utilization of wild foliage in Arabian Desert, Journal of traditional and complementary medicine, 6, 3, 209-218.

Pitt, C.G. ve Schindler, A., 2019. Biodegradation of polymers, Controlled drug delivery, 1.

Rashid, S., Rather, M.A., Shah, W.A. ve Bhat, B.A., 2013. Chemical composition, antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil of Artemisia indica Willd, Food chemistry, 138, 1, 693-700.

Riva, G.H., García-Estrada, J., Vega, B., López-Dellamary, F., Hérnandez, M.E. vs Silva, J.A., 2015. Cellulose-chitosan nanocomposites-evaluation of physical, mechanical and biological properties, Cellulose-Fundamental Aspects and Current Trends, 229-250.

Sathitsuksanoh, N., Zhu, Z., Templeton, N., Rollin, J.A., Harvey, S.P. ve Zhang, Y.P., 2009. Saccharification of a potential bioenergy crop, *Phragmite saustralis* (common reed), by lignocellulose fractionation followed by enzymatic hydrolysis at decreased cellulase loadings, Industrial & Engineering Chemistry Research, 48, 13, 6441-6447.

Shahat, A.A., Ibrahim, A.Y. ve Elsaid, M.S., 2014. Polyphenolic content and antioxidant activity of some wild Saudi Arabian asteraceae plants, Asian Pacific Journal of Tropical Medicine,7, 7, 545-551.

Shuai, W., Chen, N., Li, B., Zhou, D. ve Gao, J., 2016. Life cycle assessment of common reed (*Phragmites australis* (Cav) Trin. ex Steud) cellulosic bioethanol in Jiangsu Province, China, Biomass and Bioenergy, 92, 40-47.

Siripatrawan, U. ve Harte, B.R., 2010. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract, Food Hydrocolloids,24, 8, 770-775.

Szijártó, N., Kádár, Z., Varga, E., Thomsen, A. B., Costa-Ferreira, M. ve Réczey, K., 2009. Pretreatment of reed by wet oxidation and subsequent utilization of the pretreated fibers for ethanol production,Applied biochemistry and biotechnology, 155, 1-3, 83-93.

Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Serrano, C., Matos, O., Neng, N.R. ve Nunes, M. L., 2013. Chemical composition and bioactivity of different oregano (Origanum vulgare) extracts and essential oil, Journal of the Science of Food and Agriculture, 93, 11, 2707-2714.

Vesey-Fitzgerald, D.F., 1957. The vegetation of central and eastern Arabia, The Journal of Ecology, 779-798.

Wang, Y., Pitto-Barry, A., Habtemariam, A., Romero-Canelon, I., Sadler, P.J. ve Barry, N.P., 2016. Nanoparticles of chitosan conjugated to organo-ruthenium complexes, Inorganic Chemistry Frontiers, 3, 8, 1058-1064.

Yaghmai, M.S. ve Kolbadipour, S., 1987. Volatile components of *Rhanterium epapposum* Oliv,Flavour and fragrance journal, 2, 1, 29-32.

Yen, M.T., Yang, J.H. ve Mau, J.L., 2008. Antioxidant properties of chitosan from crab shells,Carbohydrate polymers,74, 4, 840-844.

Younis, S.I. ve Adam, S.E.I., 2008. Evaluation of toxicity of *Rhanterium epapposum* in Wistar rats,J Pharmacol Toxicol,3, 134-140.

Zaman, S., 2006. Establishment of seed bank unit for native plants of Kuwait, Kuwait Institute for Scientific Research, Report No.KISR,8536.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Sarah ALSHEİKH

Adres :Şamlı mah. Muhammet Sitesi, 3000. Sokak, 68100 Aksaray/Merkez

E-posta adresi : sarashehzadah@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Lisans : Mosul Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, 2003-2007

Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi, Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji ABD, 2017-2020