

**ALOE VERA BAZLI BİJELLER: SENTEZ,
KARAKTERİZASYON VE BİYOAKTİF AJAN
SALIMINDAKİ ETKİNLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

**ALOE VERA BASED BIGELS: SYNTHESIS,
CHARACTERIZATION AND INVESTIGATION OF
THEIR EFFECTIVENESS ON BIOACTIVE AGENT
RELEASE**

HAZAL ŞATIR

PROF. DR. MENEMŞE GÜMÜŞDERELİOĞLU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

ALOE VERA BAZLI BİJELLER: SENTEZ, KARAKTERİZASYON VE BİYOAKTİF AJAN SALIMINDAKİ ETKİNLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Hazal ŞATIR

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Şubat 2023, 105 sayfa

Bu çalışma ‘‘Aloe vera Bazlı Bijellerin Sentezi, Karakterizasyonu ve PLGA Nanopartikül Yüklü Transdermal Melatonin Salım Sistemlerinin Geliştirilmesi’’ Hızlı Destek Projesi kapsamında (FHD-2022-19944 nolu) Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Sunulan tez çalışmasının ilk aşamasında, Aloe vera yağı organojeli ve κ -carrageenan/Aloe vera hidrojel kullanılarak yenilikçi bir bijel sistemin oluşturulması hedeflenmiştir. İkinci aşamada üretilen bijellerin karakterizasyon çalışmalarının yapılması hedeflenmiştir. Son aşamada ise üretilen bijellere amfifilik yapıda bir hormon olan melatoninin yüklenmesi ile oluşturulan hibrit yapının, transdermal salım sistemi olarak kullanım potansiyelinin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçlar kapsamında ilk olarak, κ -carrageenan/ Aloe vera tabanlı hidrojel ve Aloe vera yağı kullanılarak organojel üretimi gerçekleştirilmiştir. Ardından hidrojel/organojel oranı (H:O), 90:10, 70:30, 50:50, 30:70, 10:90 olacak şekilde hidrojel ve organojel oda sıcaklığında karıştırılarak kararlı yapıya sahip bijeller üretilmiştir. Üretilen bijellerin fiziksel, kimyasal, mekanik ve reolojik özellikleri incelenmiştir. Bijellerin 25°C ve 37°C sıcaklıklarda gerinim, frekans ve viskozite değerleri incelenerek reolojik özellikleri belirlenmiştir. Sonrasında

bijellerin sitotoksik etkisinin belirlenmesine yönelik hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Son aşamada biyoaktif ajan olarak seçilen melatonin, poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) nanopartiküllerine, nanopartiküller içerisinde bijellere ve serbest halde bijellere yüklenerek *in-vitro* salım kinetikleri incelenmiştir.

Çalışma sonucunda hidrojel/organojel oranı 10:90 olan bijelin sarıya yakın renkte homojen olmayan bir dağılım gösterdiği, 90:10 oranındaki bijelin ise beyazımsı, pürüzsüz ve homojen bir dağılım gösterdiği gözlenmiştir. Ayrıca hazırlanan bijellerin tüm oranlarda mekanik açıdan herhangi bir farklılık göstermediği görülmüştür. Bijellerin 25°C ve 37°C’de viskoelastik özellikte olup, katı jel davranışı sergiledikleri ve tüm bijel oranlarında artan kayma hızıyla viskozitelerinin azaldığı belirlenmiştir. Böylelikle bijellerin iyi yayılabilirlik özelliği gösterdiği anlaşılmıştır. L929 fibroblast hücreleri ile yapılan *in-vitro* sitotoksikite deneyleri bijellerin toksik özellik taşımadığını göstermiştir. *In-vitro* melatonin salım sonuçları değerlendirildiğinde, en hızlı melatonin salımı, serbest melatonin yüklü bijellerden gerçekleşirken, en yavaş salımın melatonin yüklü PLGA nanopartikül içeren bijellerde görülmüştür.

Sunulan tez çalışmasında ilk kez Aloe vera bazlı bijeller sentezlenmiş ve transdermal yolla melatonin salım potansiyeli PLGA nanopartiküllerin de katkısıyla *in-vitro* olarak incelenmiştir. Elde edilen bulgular ışığında hazırlanan bijellerin transdermal salım sistemleri olarak çeşitli farmasötik/kozmetik ajanların kontrollü salımında kullanılabileceği değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bijel; Aloe vera; κ-carrageenan; poli(laktik-ko-glikolik asit) nanopartikül; melatonin; transdermal ilaç salımı.

ABSTRACT

ALOE VERA BASED BIGELS: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND INVESTIGATION OF THEIR EFFECTIVENESS ON BIOACTIVE AGENT RELEASE

Hazal ŞATIR

Master of Science, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

February 2023, 105 pages

This study was supported by Hacettepe University Scientific Research Coordination Unit (FHD-2022-19944), titled " Synthesis, Characterization of Aloe vera-Based Bigels and Development of PLGA Nanoparticle-Loaded Transdermal Melatonin Release Systems ".

In the first stage of the presented thesis, it was aimed to create an innovative bigel system using Aloe vera oil organogel and κ -carrageenan/Aloe vera hydrogel. In the second stage, it is aimed to carry out characterization studies of the bigels. In the last stage, it is aimed to examine the potential of the hybrid structure formed by loading melatonin, an amphiphilic hormone, into the produced bigels, as a transdermal release system. For these purposes, firstly, organogel production was carried out using κ -carrageenan/Aloe vera based hydrogel and Aloe vera oil organogel. Then, bigels with stable structure were produced by mixing the hydrogel and organogel at room temperature with hydrogel/organogel ratios (H:O) of 90:10, 70:30, 50:50, 30:70, 10:90.

The physical, chemical and mechanical properties of the produced bigels were investigated. The rheological properties of the bigels were determined by examining the strain, frequency and viscosity values at 25°C and 37°C. Afterwards, cell culture studies were carried out to determine the cytotoxic effect of bigels. In the last step, melatonin, selected as a bioactive agent, was loaded into poly (lactic co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles, bigels in nanoparticles, and bigels in free form, and its *in-vitro* release kinetics were investigated.

As a result of the study, it was observed that the bigel with a hydrogel/organogel ratio of 10:90 showed an inhomogeneous distribution in a color close to yellow, while the bigel with a ratio of 90:10 showed a whitish, smooth and homogeneous distribution. In addition, it was observed that the prepared bigels did not show any mechanical difference in all ratios. It was determined that the bigels were viscoelastic at 25°C and 37°C, exhibited solid gel behavior, and their viscosity decreased with increasing shear rate at all bigel ratios. Thus, it was understood that the bigels showed good spreadability. *In-vitro* cytotoxicity experiments with L929 fibroblast cells showed that bigels were not toxic. When the *in vitro* melatonin release results were evaluated, the fastest melatonin release was observed in the bigels loaded with free melatonin, while the slowest release was seen in the bigels containing melatonin loaded PLGA nanoparticles.

In the presented thesis, Aloe vera-based bigels were synthesized for the first time and the transdermal melatonin release potential was investigated *in-vitro* with the contribution of PLGA nanoparticles. It has been evaluated that bigels prepared in the light of the findings can be used as transdermal release systems in the controlled release of various pharmaceutical/cosmetic agents.

Keywords: Bigel; Aloe vera; κ-carrageenan; poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticle; melatonin; transdermal drug release.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecim boyunca benden desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, derin bilgi ve tecrübesiyle, her daim bana yol gösteren, duruşu, karakteri, insani yönü ve eğitici kişiliği ile bir bilim insanı olarak hayatımın her alanında kendime örnek alacağım, saygıdeğer hocam Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU'na en içten teşekkürlerimi, sevgilerimi ve saygılarımı sunarım.

FHD-2022-19944 numaralı hızlı destek projesi kapsamında çalışmalarımda maddi destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne,

Yüksek lisans sürecimde değerli bilgilerini ve tecrübesini benimle paylaşan, beni aydınlatan, çalışmalarım boyunca beni destekleyerek motive eden sevgili Arş. Gör. Tülay Selin ERKUT'a, tez sürecimde deneyimlerini ve bilgilerini benimle paylaşarak çalışmamın ilerlemesine katkı sağlayan, verdiği ödevleri ile beni geliştiren sevgili Arş. Gör. Demet ÇAKIR'a,

Her anımda yanımda olan, benimle gurur duyan ve başarılarımın her zaman taçlanması isteyen canım arkadaşım Nazlı KHAGHANİMİLANI'ye,

Aynı laboratuvar ortamında çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum laboratuvar arkadaşlarım, Arş. Gör. Sena KOÇ, Sema COŞKUN, Zeynep ALTINIŞIK, Sitem Merve ŞAHİN ve ismini burada saymadığım ama desteklerini gördüğüm Hacettepe Üniversitesi Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma Grubu'na en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bugüne kadar benden desteğini maddi ve manevi olarak esirgemeyen, tecrübeleriyle yol göstererek beni motive eden, canım babam Ziya ŞATIR'a, anneliğinin yanında benimle arkadaş gibi olan her zaman beni destekleyerek arkamda duran, neşe kaynağım, canım annem Şule ŞATIR'a ve beni her daim güldüren, yapabileceklerimin daha fazlasına inanan, başarılarımla gurur duyan canım kardeşim Hakan ŞATIR'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Şubat 2023, Ankara

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Polimerik Jeller	4
2.1.1. Polimerik Jellerin Özellikleri	4
2.1.2. Polimerik Jellerin Sınıflandırılması	5
2.1.3. Hidrojel.....	7
2.1.4. Organojel (Oleojel)	9
2.1.5. Bijel	13
2.2. Carragenan	18
2.2.1. Carragenan Türleri	18
2.2.2. Carragenan Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	19
2.3. <i>Kappa</i> Carrageenan (κ -CA)	20
2.4. Aloe Vera	23
2.5. Melatonin	25
2.6. Kontrollü İlaç Salım Sistemleri.....	27
2.6.1. Transdermal Sistemler.....	27
2.7. <i>In-Vitro</i> İlaç Salım Kinetiği ve Salım Mekanizmasının Belirlenmesi	28
2.8. Polimerik Nanopartiküller.....	31
2.8.1. Polimerik Nanopartiküllerin Üretim Yöntemleri	31
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	34
3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal ve Biyolojik Malzemeler.....	34

3.2. κ-carrageenan/Aloe vera Tabanlı Hidrojel ve Aloe vera Yağı Tabanlı Organojel Üretimi	37
3.2.1. Hidrojel Üretimi.....	37
3.2.2. Organojel Üretimi	37
3.2.3. Hidrojel ve Organojellerin Birleştirilmesi ile Oluşturulan Bijellerin Üretimi..	37
3.3. Karakterizasyon Çalışmaları.....	38
3.3.1. Yağ Bağlama Kapasitesi (OBC) Analizi	38
3.3.2. Morfolojik İncelemeler	39
3.3.3. Kimyasal Yapı ve Faz Analizleri.....	39
3.3.4. Termal Analizler	39
3.3.5. Mekanik Analizler	39
3.3.6. Reolojik Analizler.....	40
3.4. <i>In-Vitro</i> Sitotoksosite Çalışmaları	40
3.5. <i>In-Vitro</i> Biyoaktif Ajan Salım Çalışmaları	41
3.5.1. Boş ve Melatonin Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Üretimi.....	41
3.5.2. PLGA Nanopartiküllerin Karakterizasyon Çalışması.....	44
3.5.3. Bijellere Melatonin Yüklenmesi.....	45
3.5.4. Salım Sistemlerinin Hazırlanması ve Salım Kinetiklerinin Belirlenmesi	45
3.6. İstatistiksel Analiz.....	47
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	48
4.1. Bijellerin Üretimi için Optimum Koşulların Belirlenmesi	48
4.1.1. κ-carrageenan/ Aloe vera Tabanlı Hidrojel ve Aloe vera Yağı Tabanlı Organojel İçeren Bijel Üretimi	48
4.1.2. Farklı Hidrojel/Organojel Oranlarında Bijellerin Hazırlanması	50
4.2. Bijellerin Karakterizasyonu	51
4.2.1. Morfolojik Görüntüleme.....	51
4.2.2. Mekanik Analiz Sonuçları	53
4.2.3. Bijeller İçin OBC Analizi	53
4.2.4. Kimyasal Yapı ve Faz Analizleri.....	57
4.2.5. Reolojik Analiz	63
4.3. <i>In-Vitro</i> Sitotoksosite Çalışmaları	68

4.4. <i>In-Vitro</i> Biyoaktif Ajan Salım Çalışmaları	72
4.4.1. Boş PLGA Nanopartiküllerin Üretim Koşullarının Belirlenmesi	72
4.4.2. Melatonin Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu ...	72
4.5. <i>In-Vitro</i> Melatonin Salımı ve Salım Kinetiğinin Matematiksel Analizi	79
4.5.1. PLGA Nanopartiküllerden Melatonin Salımı	79
4.5.2. Melatonin Yüklü PLGA Nanopartikül İçeren Bijellerden Melatonin Salımı ...	81
4.5.3. Serbest Melatonin Yüklü Bijellerden Melatonin Salımı	83
4.5.4. Salım Mekanizması ve Salım Kinetiğinin Belirlenmesi	86
5. YORUM	89
6. KAYNAKLAR.....	91
Ek 1- Melatonin Yüklü PLGA Nanopartiküllerden Salınan Melatoninin Kümülatif Salım Değerlerinin Hesaplanması	98
EK 2- Melatonin Yüklü PLGA Nanopartikül İçeren Bijellerden Salınan Melatoninin Kümülatif Salım Değerlerinin Hesaplanması.....	100
EK 3- Serbest Melatonin Yüklü Bijellerden Salınan Melatoninin Kümülatif Salım Değerlerinin Hesaplanması	102
EK 4 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu	104
ÖZGEÇMİŞ	105

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Hidrojel yapısı	7
Şekil 2.2. Hidrojellerin farklı özelliklerine göre sınıflandırılması.....	8
Şekil 2.3. Hidrojellerin kullanıldığı farklı uygulama alanları.....	9
Şekil 2.4. Organojel oluşumu	11
Şekil 2.5. Organojellerin sınıflandırılması.....	12
Şekil 2.6. Bijellerin oluşturulması	13
Şekil 2.7. (a) Hidrojel içerisine organojel eklenerek oluşturulan bijel sistemi.....	
(b) Organojel içerisine hidrojel eklenerek oluşturulan bijel sistemi.....	15
Şekil 2.8. Kompleks bijel sistemi	16
Şekil 2.9. κ -CA yapısı.....	21
Şekil 2.10. Aloe vera yapısı	23
Şekil 2.11. Melatonin yapısı	26
Şekil 2.12. İkili emülsiyon hazırlama yöntemi	33
Şekil 3.1. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmaların şematik gösterimi	36
Şekil 4.1. Bijel formülasyonlarının makroskobik görüntüleri. (A): üstten görünümü	
(B) karıştırıldıktan sonraki görünüm (C): karıştırıldıktan 24 saat sonraki görüntüleri (H:Hidrojel, O:Organojel)	51
Şekil 4.2. %1 (w/v)'lik Sudan I ile boyanmış organojel kullanılarak oluşturulan bijellerin 10X büyütmedeki mikroskobik görüntüleri. A) 90:10 (H:O), B) 70:30 (H:O), C)50:50 (H:O), D) 30:70 (H:O), E) 10:90 (H:O)	52
Şekil 4.3. %0.1 (w/v) oranında Sudan I ile boyanmış organojel kullanılarak oluşturulan bijellere ait 10X ve 20X büyütmelelerdeki mikroskobik görüntüleri.....	52
Şekil 4.4. %0.05 (w/v) oranında Sudan I ile boyanmış organojel kullanılarak oluşturulan bijellere ait 4X ve 10X büyütmedeki mikroskobik görüntüleri.....	53
Şekil 4.5. Hidrojel:organojel oranına bağlı olarak bijellerde sertlik değişimi.....	54
Şekil 4.6. Bijel üretiminde hidrojel ve organojelin optimum karıştırma süresini belirlemek için mekanik analiz sonuçları	55
Şekil 4.7. Hidrojel, organojel ve bijellerin ATR-FTIR spektrumları	57
Şekil 4.8. Bijellerin XRD spektrumları; (a) 10:90 (H:O), (b) 30:70 (H:O), (c) 50:50 (H:O), (d) 70:30 (H:O), (e) 90:10 (H:O)	59

Şekil 4.9. DSC analizinde bijellere ait ısıtma döngüsü; (a) 10:90 (H:O), (b) 30:70 (H:O), (c) 50:50 (H:O), (d) 70:30 (H:O), (e) 90:10 (H:O)	60
Şekil 4.10. DSC analizinde bijellere ait soğutma döngüsü; (a) 10:90 (H:O), (b) 30:70, (c) 50:50 (H:O), (d) 70:30 (H:O), (e) 90:10 (H:O)	61
Şekil 4.11. Bijellerin TGA termogramları. (a) 10:90 (H:O), (b) 30:70 (H:O), (c) 50:50 (H:O), (d) 70:30 (H:O), (e) 90:10 (H:O)	62
Şekil 4.12. Bijellerin A) 25°C, B) 37 °C’ deki frekans taraması ve C) 25°C, D) 37 °C’deki genlik taraması sonuçları	66
Şekil 4.13. Bijellerin sıcaklık taraması sonuçları	68
Şekil 4.14. Bijellerin 25°C’deki viskozite testi sonuçları	69
Şekil 4.15. Bijellerin 37°C’deki viskozite testi sonuçları	69
Şekil 4.16. A) L929 hücrelerinin 1.gün canlılıkları, B) 2. gün canlılıkları, C) 3.gün canlılıkları. Büyüme ortamına %10 (v/v) DMSO eklenmiş hücre grubu pozitif kontrol grubu olarak belirlenmiştir. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar şu sembollerle gösterilmiştir; n=3, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).....	71
Şekil 4.17. Boş PLGA nanopartiküllere ait farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri	
A) 10 000 X B) 20 000 X.....	73
Şekil 4.18. Melatoninin enkapsülasyon verimi için kullanılan kalibrasyon grafiği.....	74
Şekil 4.19. Melatonin yüklü PLGA nanopartiküllere ait (F8 formülasyonu ile üretilen) farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri A) 10 000 X, B) 20 000 X, C) 40 000 X	78
Şekil 4.20. PLGA kopolimeri ile hazırlanmış boş ve melatonin yüklü nanopartiküller ile saf DMAB’ye ve saf melatoninine ait ATR-FTIR spektrumları.....	79
Şekil 4.21. Melatoninin PLGA nanopartiküllerden melatoninin kümülatif salımı A) 15 günlük (%) B) 24 saatlik (%) C) 15 günlük (salım çalışması kapsamında 10 mg nanopartikül kullanılmış olup, 1 mg nanopartikül %18.6 enkapsülasyon verimi ile 0.1 mg melatonin yüklüdür)	80
Şekil 4.22. Melatonin yüklü PLGA nanopartikül içeren bijellerden melatoninin kümülatif salımı A) 15 günlük (%) B) 24 saatlik (%) C) 15 günlük (salım çalışması kapsamında 1 g bijele 10 mg nanopartikül ilave edilmiş olup, 1 mg nanopartikül %18.6 enkapsülasyon verimi ile 0.1 mg melatonin yüklüdür.)	82
Şekil 4.23. Serbest melatonin yüklü bijellerden melatoninin kümülatif salımı A) 15 günlük (%) B) 24 saatlik (%) C) 15 günlük (salım çalışması kapsamında 1 g bijele 1 mg serbest melatonin ilave edilmiştir)	84

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Polimerik jellerin karakteristik özellikleri, avantajları ve kullanım alanları.	6
Çizelge 2.2. Farklı organojelatör ve çözücülerden elde edilen organojel türleri.....	10
Çizelge 2.3. Bijellerin uygulama alanlarına yönelik literatürde yer alan çalışmaları.....	17
Çizelge 2.4. Carregen türlerinin özellikleri.....	19
Çizelge 2.5. κ - CA uygulama alanları.....	22
Çizelge 2.6. Aloe vera bileşenleri ve özellikleri.....	24
Çizelge 3.1. İkili emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi (w1/o/w2 karışımı) ile hazırlanan melatonin yüklü nanopartiküllerin formülasyonları.....	43
Çizelge 4.1. Bijellere ait OBC sonuçları.....	55
Çizelge 4.2. Bijel üretiminde hidrojel ve organojelin optimum karıştırma süresini..... belirlemek için OBC sonuçları	56
Çizelge 4.3. Hidrojel, organojel ve bijellere ait spesifik FTIR spektrum verileri	57
Çizelge 4.4. Bijellere ait spektrumların % kristalinite değerleri.....	58
Çizelge 4.5. Bijellerin TGA analizi sonuçları.....	63
Çizelge 4.6. Bijellerin 25°C'deki genlik taraması sonuçları	64
Çizelge 4.7. Bijellerin 37°C'deki genlik taraması sonuçları	64
Çizelge 4.8. Bijellere ait sıcaklık taraması sonuçları.....	67
Çizelge 4.9. Boş PLGA nanopartiküllerin boy ve boy dağılımı.....	73
Çizelge 4.10. Sekiz farklı formülasyonla üretilen melatonin yüklü PLGA mikro/nano partikül enkapsülasyon verimleri ve ilaç yükleme kapasiteleri	76
Çizelge 4.11. Melatoninin salım mekanizması ve salım kinetiği	87
Çizelge 7.1. Melatoninin yüklü PLGA nanopartiküllerden melatonin salımına ait değerler (1.paralel için).....	99
Çizelge 7.2. Melatoninin yüklü PLGA nanopartikül içeren bijellerden melatonin salımına ait değerler (2.paralel için)	101
Çizelge 7.3. Serbest melatonin yüklü bijellerden melatonin salımına ait değerler (3.paralel için).....	103

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

λ :	<i>Lambda</i>
κ :	<i>Kappa</i>
ι :	<i>Iyota</i>
μ :	<i>Mu</i>
ϵ :	<i>Epsilon</i>
$^{\circ}\text{C}$:	Sıcaklık
α :	Alfa
β :	Beta
λ :	Dalga boyu
\leq :	Küçük eşit
\pm :	Tolerans
μ :	Mikro
μL :	Mikro Litre
G' :	Elastik Modül
G'' :	Viskoz Modül

Kısaltmalar

IPN:	İç İçe Geçmiş Ağ Yapı
(OH-):	Hidroksil
(COOH-):	Karboksil
(NH ₂):	Amin
(SO ₃ H-):	Sülfat

PEG:	polietilen glikol
PVA:	poli(vinil alkol)
PLA:	poli(laktik asit)
PLGA:	poli(laktik-ko-glikolik asit)
PCL:	polikaprolakton
PNIPAM:	poli (N-izopropilakrilamid)
GMS:	Gliserol Monostearat
MO:	Mono Gliserit
K ⁺ :	Potasyum
Ca ²⁺ :	Kalsiyum
w/o:	Hidrojel Sistemi İçerisinde Organojel
o/w:	Organojel Sistemi İçerisinde Hidrojel
3.6-AG:	3.6-Anhidro-Galaktoz
κ -CA:	<i>Kappa Carrageenan</i>
TDSS:	Transdermal İlaç Salım Sistemi
ROS:	Reaktif Oksijen Türleri
LDL:	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
TNF- α :	Tümör Nekroz Faktörü- Alfa
TGF- β :	Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta
SCF:	Kök Hücre Faktörü
R ² :	Regresyon Katsayısına
PNP:	Polimerik Nanopartiküller
w/o:	Su/Yağ Emülsiyonu
SCF:	Süper Kritik Akışkan Teknolojisi
ABD-FDA:	Food and Drug Administration
v/v:	Hacimce Oranı

w/v:	Kütle –Hacim Oranı
w/w:	Kütle- Kütle Oranı
w2:	İkinci Sulu Faz
w1:	Birinci Sulu Faz
o:	Organik Faz
o/w1:	Organik Faz/1. Sulu Faz
w1/o/w2:	1.Sulu Faz/Organik Faz/2. Sulu Faz
TGA:	Termogravimetrik Analiz
DCM:	Diklorometan
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO:	Dimetil Sülfoksit
FBS:	Fötal Sığır Serumı
FTIR:	Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektrofotometresi
DSC:	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
ECM:	Hücre Dışı Matris
MTT:	3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-Difenilterazolyum Bromür
PBS:	Fosfat Tampon Çözeltisi
SEM:	Taramalı Elektron Mikroskobu
UV:	Ultraviyole
XRD:	X -Işını Kırınımı
3B:	Üç Boyutlu
α -MEM:	Minimum Essential Medium-Alfa Modifikasyonu
ECM:	Hücre Dışı Matris

1. GİRİŞ

Transdermal ilaç salım sistemleri, ilacın cilt üzerinden uzun süreli ve kontrollü bir şekilde salımını sağlayan sistemlerdir [1]. Bu sistemler, ilacın oral yol ya da enjeksiyon ile alındığında, bireylerde görülen kan plazma değerinde dengesizlik, sindirim sisteminde tahriş ve karaciğerde ilk geçiş etkisi gibi problemlerin üstesinden gelmek amacıyla tasarlanmıştır [2]. Transdermal sistemlerin avantajı, uzun süreli ve kontrollü terapötik etki sağlamanın yanı sıra, ilacın yan etkilerini azaltması ve biyouyumluluğu sayesinde ilaç tedavisini kolaylaştırmasıdır. Transdermal sistemler farklı ve spesifik katmanlardan oluşan FDA onaylı bantlar kullanılarak gerçekleştirilir. Transdermal bandın diğer ilaç dozaj yöntemlerinden farkı, ilacın gözenekli bir membran yapıdan ya da vücut ısısında eriyen bir veya çok katlı yapışkan banttan ağrısız ve kontrollü bir şekilde salınmasıdır [3]. Cilt yüzeyinde yer alan lipit tabakası, ilaç moleküllerinin geçmesini zorlaştırdığı için ilaçların transdermal sistemlerde uygulanmasında problem oluşturmaktadır. Bu problem, transdermal uygulamalarda jel (organojel, hidrojel, bijel) içerisine ilacın yüklenip, cilt üzerine lokalize edilerek ortadan kaldırılabilir. Organojellerin en önemli dezavantajı yağlı ve yapışkan bir yapıda olmalarından dolayı, cilde uygulandıktan sonra çıkarılmasının zor olmasıdır. Hidrofilik yapıdaki hidrojel ise cilt üzerine transdermal olarak uygulandıklarında, cildin lipofilik özelliği nedeniyle ilacın deri içerisine salımında yetersiz kalmaktadır. Transdermal ilaç sistemlerinde hidrojel veya organojel kullanıldığında ortaya çıkan bu sorunların üstesinden gelebilmek için yenilikçi yaklaşımlarla ikili jel sistemi oluşturulmuştur. **Bijeller** olarak adlandırılan bu yeni jel sistemi, hidrojel ve organojelden oluşan yarı-katı benzeri yapılarıdır. Bijeller her iki fazın dağılımına bağlı olarak; hidrojel içinde organojel, organojel içinde hidrojel ve bi-süreklili faz olmak üzere üçe ayrılır. Hidrojel ve organojele kıyasla bijeller, lipofilik ve hidrofilik doğası gereği, ilacın ciltteki lipit tabakasından emilimini artırması, cildi nemlendirmesi ve hidrasyonunu artırması, cilt yüzeyinden kolay çıkarılabilmesi gibi transdermal sistemler için önemli avantajlar sunmaktadır [4].

Literatürde şu ana kadar yapılan çalışmalarda bijellerin gıda, kozmetik ve farmasötik uygulamalarda kullanıldıkları gözlenmiştir. İlgili literatür incelendiğinde bijellerin hidrojel fazının agar, hidroksipropil metil selüloz, sodyum aljinat, jelatin, keçiyoynuzu zankı ve karragenan, metoksil pektin, guar sakızı, akasya sakızı, ksantan sakızı,

hidroksipropil metil selüloz, karbopol, polivinil piroolidon (PVP) ve polivinil alkol'dan (PVA); organojel fazının ise stearyl alkol, bal mumu, stearik asit, füme silika, gliseril stearat ve polikozanol, ayçiçek yağı, soya fasulyesi yağı ve kaprilik asit/ kaprik trigliserid olarak seçildiği sistemler mevcuttur [5].

Önerilen tez kapsamında bijelin organojel kısmını Aloe vera yağı oluştururken hidrojel kısmını κ -carrageenan ve Aloe vera jeli oluşturmuştur. Aloe vera yağı antibakteriyel, antioksidan, antikanser ve yara iyileştirici özellikleri nedeniyle, κ -carrageenan ise hidrofilik, biyoyumlu ve biyobozunur olma özellikleri nedeniyle seçilmiştir [6].

Yüzey özellikleri, boyutları ve ilaç yüklenmesindeki kolaylıkları nedeniyle nanopartiküller, ilaç salımı uygulamalarında çok sık kullanılan malzemeler haline gelmektedir. Nanopartiküller oluşturulurken doğal ve sentetik polimerlerden yararlanılmaktadır. İlaç salımında kullanılan doğal polimerlere kitin, selüloz, kollajen örnek olarak verilirken, sentetik polimerler, poli(laktik asit) (PLA), poli(etilen) (PE), poli(stiren) (PS), poli(gilikolik asit) (PGA) ve poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) şeklinde örneklendirilebilir. Bu çalışmada PLGA nanopartikülleri, biyoyumlu, FDA onaylı, biyobozunur ve kapsüllenmiş ilacın biyoyararlanımını sağlayan özellikler taşıdığı için seçilmiştir [7].

Melatonin, anti-inflamatuar, antioksidan ve vücut homeostazını sağlama gibi önemli özellikleri olan bir hormondur. Geliştirilen bijel bazlı salım sisteminin etkinliğinin model ilaç olarak seçilen melatonin ile belirlenmesine karar verilmiştir. Melatonin amfifilik olmanın yanı sıra, memeliler, bakteriler, bitkiler ve omurgalı/ omurgasız hayvanlarda bulunabilen bir nörohormondur. Melatonin salımı ön hipotalamusun suprakiazmatik çekirdeği olan merkezi sirkadiyen ritim üreticisi tarafından düzenlenmektedir. Karanlık, melatonin sentezini teşvik ederek plazma içerisine salımını tetiklemektedir. Bu benzersiz özellik melatonini, canlının fizyolojisini günlük ve mevsimsel isteklere uygun şekilde zamanlayan bir eş zamanlayıcıya dönüştürmektedir [8]. Melatonin oral olarak alındığında düşük biyoyararlanıma, kısa eliminasyona ve midede yan etkilere neden olmasından dolayı [9] geliştirilecek bijel bazlı transdermal sistem için uygun bir ilaç olduğu düşünülerek seçilmiştir.

Sunulan tez çalışması kapsamında sistematik bir planlamayla öncelikle Aloe vera- κ -carrageenan ikili jel sisteminin hazırlama koşulları (hidrojel/organojel oranları, karıştırma hızı, sıcaklık, karıştırma süresi, vb.) belirlenmiştir. Ardından, üretilen,

bijellerin kimyasal yapıları ve morfolojik özellikleri karakterize edilmiştir. Hidrojel, organojel ve bijellerin morfolojik özellikleri ışık mikroskobu, kimyasal yapıları Fourier dönüşümlü kızılötesi ışını (FTIR) spektrofotometresi, kristalinitesi X-ışını difraktometresi (XRD), ısısızal özellikleri ise termogravimetrik analiz (TGA) ve diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizleri ile, akış özellikleri ise reolojik analiz ile belirlenmiştir. Bijellerin karakterizasyon çalışması gerçekleştirildikten sonra ilaç salımı için PLGA nanopartiküllerin üretimi yapılmış ve partiküllerin yapısal özellikleri belirlenmiştir. Son aşamada ise, bijellere dahil edilen melatonin yüklü PLGA nanopartikülleri ile melatonin yüklü bijellerin salım davranışı karşılaştırmalı incelenerek uygun salım özelliklerine sahip bijel önerisinde bulunulmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

Tezin bu kısmında, tez çalışmasının temelini oluşturan literatür bilgisi özetlenmiştir. Literatür özeti genel olarak dört kısma ayrılmış olup ilk başta jeller ve jellerin özelliklerinden söz edilmiştir. İkinci kısımda, hidrojel, organojel ve bijellerin özellikleri, avantajları ve uygulama alanları ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Üçüncü kısımda, κ-carragenan, Aloe vera ve melatoninin kimyasal yapıları tanımlanarak kullanım alanlarına değinilmiştir. Son kısımda ise kontrollü ilaç salım sistemleri, transdermal uygulamaları ve salım sistemi olarak kullanılan polimerik nanopartiküller hakkında bilgi sunulmuştur.

2.1. Polimerik Jeller

Jel terimi jelatin kelimesinden türetilmiştir ve Latince’de “donmuş” anlamına gelen ‘gelu’ kelimesinin kökenine dayanmaktadır. Jel terimi ilk olarak 18.yy’da kimyager ve kimya mühendisleri tarafından yarı katı malzemeleri sınıflandırmak amacıyla kullanılmıştır [1]. Almdal ve ark. (1993) [10] en az iki bileşenden oluşan ve bu bileşenlerden birinin sıvı olduğu yumuşak maddeleri jel olarak adlandırmışlardır. Bileşenlerden diğeri ise polimer olup sıvı bileşen içerisinde kovalent ve kovalent olmayan bağlar ile üç boyutlu ağlar oluşturarak jel yapısını meydana getirmektedir. Jel yapıları polimerleri içerdiği için polimerik jeller olarak da adlandırılmaktadır. Polimerik jeller bir ya da daha fazla polimerden oluşan yarı katı yapılar olarak tanımlanmaktadır [11]. Polimerik jellerde, jel matrisinin sıvı ortamda çözünmeyip şişme özelliği göstermesi, jelin ağ yapısına viskoelastik özellik kazandırmaktadır [12].

2.1.1. Polimerik Jellerin Özellikleri

Polimerik jeller, geniş molekül ağırlığına sahip, çözücü içerisinde çözünmeden yüksek oranlarda tersinir olarak şişme ve büzülme özelliği gösteren yapılardır. Sıcaklık, pH, basınç gibi dış uyaranlara duyarlı davranış göstermesi [12], psödoplastik reolojik davranışı ve yüksek oranda su tutma kapasitesi polimerik jellerin en önemli özellikleridir [13]. Bu özellikler, polimerin yapısı, polimer matrisin türü ve çapraz bağlanma derecesi gibi birçok faktöre bağlıdır. Örneğin; yüksek oranlarda çapraz bağ içeren jel yapısı, zayıf şişme özelliği gösterebilir. Ayrıca jel içerisinde çapraz bağlama yoğunluğu, polimerik jelin viskoelastik özelliğini etkilemektedir. Yüksek oranlardaki çapraz bağ, güçlü elastik ve kayıp modülüne sahip sert malzemeler oluşturmaktadır.

Böylece istenilen özelliklere sahip polimerik jeller, polimer bileşimi ve çapraz bağ yoğunluğu ayarlanarak sentezlenebilmektedir [12].

2.1.2. Polimerik Jellerin Sınıflandırılması

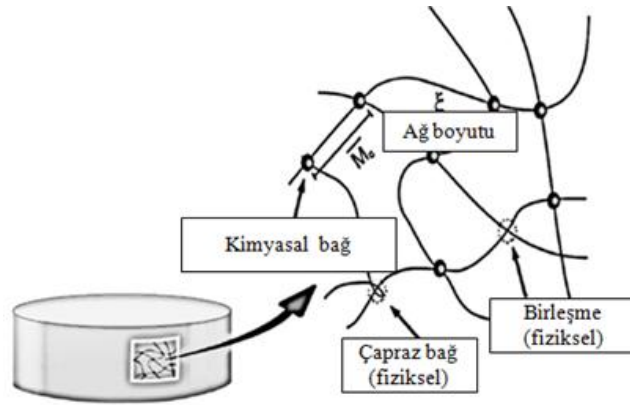
Sıvı fazın polaritesine göre polimerik jeller “organojeller” ve “hidrojeller” olarak ikiye ayrılmaktadır. Bu 2 tür jelin bileşiminden oluşan jeller ise “bijel” olarak adlandırılmaktadır. Polimerik jeller ayrıca çapraz bağlama durumuna göre fiziksel, kovalent çapraz bağlı jeller ve iç içe geçmiş ağ (IPN) jelleri olarak da sınıflandırılmaktadır. Polimerik jellerin karakteristik özellikleri, avantajları ve kullanım alanları Çizelge 2.1.’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. Polimerik jellerin karakteristik özellikleri, avantajları ve kullanım alanları [13].

Jel Türü	Karakteristik Özellikleri	Avantajları	Kullanım Alanları
Hidrojel	<p>-Yüksek oranlarda su ya da biyolojik akışkanları absorplayabilen üç boyutlu hidrofilik polimer ağ yapısına sahip olması.</p> <p>-Yüksek su tutma kapasitesi, yumuşaklık ve esneklik özelliği göstermesi.</p>	<p>-Biyouyumlu ve toksik olmaması.</p> <p>-Hidrojel içerisine canlı hücrelerin alınması ile in vivo jelleşme göstemesi.</p> <p>-Ciltte kolayca yayılabilir ve su ile yıkanabilir olması.</p>	<p>-Egzama tedavisi uygulamaları.</p> <p>-Cilt yenileme uygulamaları.</p> <p>-Saç ve vücut bakım ürünü uygulamaları.</p> <p>-Yara ve yara izi iyileşmesi uygulamaları.</p> <p>-Pansuman ve diş malzemesi olarak uygulamaları.</p> <p>-Hücre iskeleleri, cerrahi yapıştırıcılar kontrollü salım sağlayan ilaç taşıyıcıları olarak uygulamaları mevcuttur.</p>
Organojel	<p>-Polar olmayan organik sıvının organojelatör kullanılarak termo tersinir 3 boyutlu jel ağı içinde hapsolması ile ortaya çıkan dağılım ortamıdır.</p> <p>-Organojelatörler: Düşük moleküler ağırlığına sahip ya da yağda çözünen polimerlerdir.</p>	<p>-Lipofilik bileşenler için transdermal ilaç salım sistemi olarak kullanılması.</p> <p>-Lipofilik doğasından dolayı stratum corneumda ilaç penetrasyonunu artırması.</p> <p>-Termo tersinir olması.</p> <p>-Mikrobiyal enfeksiyonlara dirençli olması.</p> <p>-Viskoelastisik özellik göstermesi.</p>	<p>-Cilt bakımı ürünü uygulamaları.</p> <p>-Yara iyileştirici tedavi uygulamaları.</p> <p>-İlaç taşıyıcısı olarak uygulamaları.</p> <p>-Transdermal ve parenteral uygulamaları.</p> <p>-Biyoadesyon ajanlar olarak kullanımları.</p> <p>-Aşı uygulamaları mevcuttur.</p>
Bijel	<p>-Yüzey aktif ajanlar olmadan hidrojel ve organojelin birleştirilmesi ile oluşan yarı katı sistemlerdir.</p> <p>-Bağımsız jelatörler ile stabilize edilen birbiri ile karışmayan her iki fazı içermektedir.</p>	<p>-Kolay elde edilebilir olması.</p> <p>-Cilt tahrişini azaltması.</p> <p>-Fiziksel stabilite sağlaması.</p> <p>-Cilt boyunca ilaç penetrasyonunu artırması.</p> <p>-Hem su hem de yağ fazı içermesi.</p> <p>-Cilt derinliklerine kadar uygulama avantajı sağlaması.</p> <p>-Serinletici etkiye sahip olması.</p> <p>-Su ile yıkanabilir ve ciltte yayılabilir olması.</p>	<p>-Nemlendirici ve bakım ürünleri uygulamaları.</p> <p>-Metronidazol, Sikloproksolamin, Diltiazem hidroklorür gibi antibiyotiklerin taşıyıcısı olarak kullanımları.</p> <p>-Analjezik ve anti-inflamatuar etkisi mevcuttur.</p>

2.1.3. Hidrojel

Hidrojeller, yapılarındaki hidrofilik grupların varlığı sayesinde yüksek oranda su ya da vücuttaki biyolojik sıvıları absorplama yeteneğine sahip, suda çözünmeyen üç boyutlu polimerik ağlardır. Hidrojellerin ana polimer zincirinde yer alan hidrofilik fonksiyonel gruplar, hidroksil (OH-), karboksil (COOH-), amin (NH₂) ve sülfat (SO₃H-) gruplarıdır. Polimerik hidrojeller, fiziksel çapraz bağlama, kimyasal çapraz bağlama ya da her iki çapraz bağlama türünün birleştirilmesi ile oluşturulabilmektedir [14]. Şekil 2.1.'de hidrojellerin yapısı gösterilmektedir.



Şekil 2.1. Hidrojel yapısı [15].

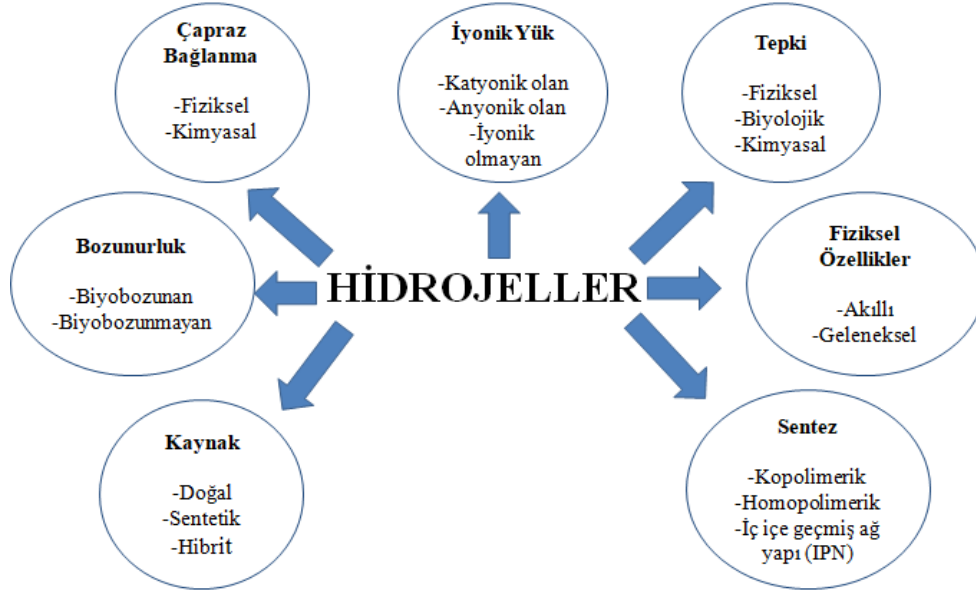
Hidrojel Özellikleri

Hidrojeller, kimyasal olarak değişmeyen, kararlı yapıdaki sistemlerdir [16]. Hidrojellerin, biyoyumluluk, biyobozunurluk, gelişmiş mekanik özellikler, farklı uyarılara karşı duyarlılık, hidrofobik ve hidrofilik terapötik bileşiklerle kolay bir şekilde konjuge olma yeteneği gibi önemli özellikleri bulunmaktadır [17]. Ayrıca hidrojeller 3 boyutlu (3B) doku ortamlarını taklit etmesi, esnek ve yumuşak olması, düşük immünojenitesi sayesinde biyomedikal uygulamalarda sıklıkla tercih edilmektedir [18]. Hidrojellerin mukoadesyon ve biyoadesyon özelliği ilaç uygulamalarında ilacın alıkonma süresini artırmaktadır [17].

Hidrojellerin Sınıflandırılması

Hidrojeller, polimer zincirleri arasındaki etkileşimlerine göre fiziksel çapraz bağlı ve kimyasal çapraz bağlı hidrojeller olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

Fiziksel çapraz bağlı hidrojeller, van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağları ve diğer moleküler arası kuvvetler ile elektrostatik etki sonucu oluşurken; kimyasal çapraz bağ ile oluşmuş hidrojeller, polimer zincirleri arasında kovalent bağlar içermektedirler [13]. Şekil 2.2.'de hidrojellerin sınıflandırılması ayrıntılı olarak şekilde gösterilmektedir.

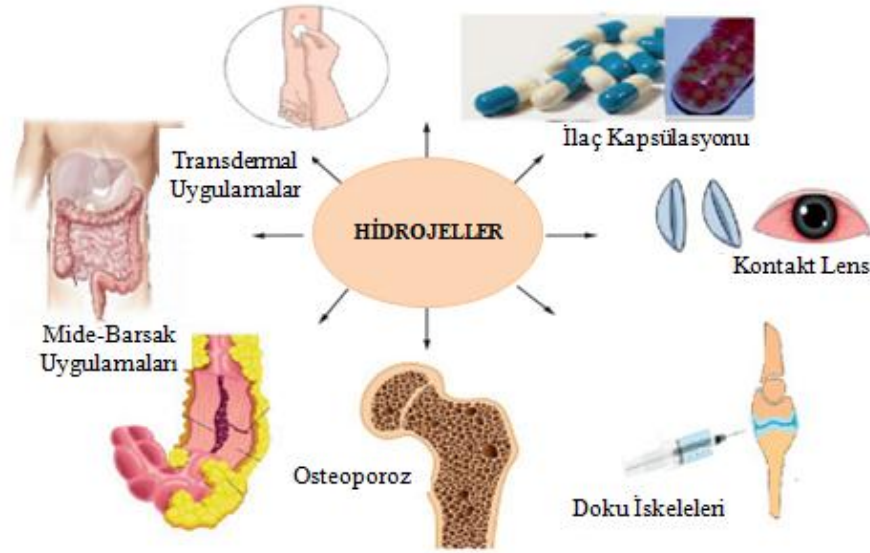


Şekil 2.2. Hidrojellerin farklı özelliklerine göre sınıflandırılması [15].

Hidrojeller kaynaklarına göre doğal ve sentetik hidrojeller olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. Doğal hidrojeller, doğal polimerlerden elde edilen polimerik jellerdir. Doğal polimerler, polisakkaritler ve proteinleri içeren bileşiklerdir. Doğal polimerler olarak polisakkaritler ve proteinlerin biyouyumluluk, enzimatik bozunma, yüksek dayanıklılık gibi önemli özellikleri mevcuttur. Biyomedikal uygulamalarda kullanılan doğal polimerler ve polisakkaritlere *kappa* carragenan, aljinat, kollajen, fibrin, jelatin, selüloz, nişasta, dekstran ve kitin örnek olarak verilebilir [14]. Sentetik hidrojeller, polietilen glikol (PEG) ya da poliamidler gibi sentetik polimerlerden elde edilmektedir. Poli(vinil alkol) (PVA), PEG, poli(laktik asit) (PLA), poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), polikaprolakton (PCL) ve poli (N-izopropilakrilamid) (PNIPAM) hidrojeller için en yaygın kullanılan sentetik polimerlerdir. Ancak doğal polimerler, yüksek biyouyumluluğu ve biyobozunurluğu sayesinde biyomedikal uygulamalarda sentetik polimerlere göre daha çok tercih edilmektedir [19].

Hidrojellerin Uygulama Alanları

Hidrojeller, oral, nazal, transdermal ve rektal sistemlerde ilaç salımı için uygun taşıyıcılardır. Hidrojellerin uygulama alanları Şekil 2.3.'deki görsel ile özetlenmiştir.



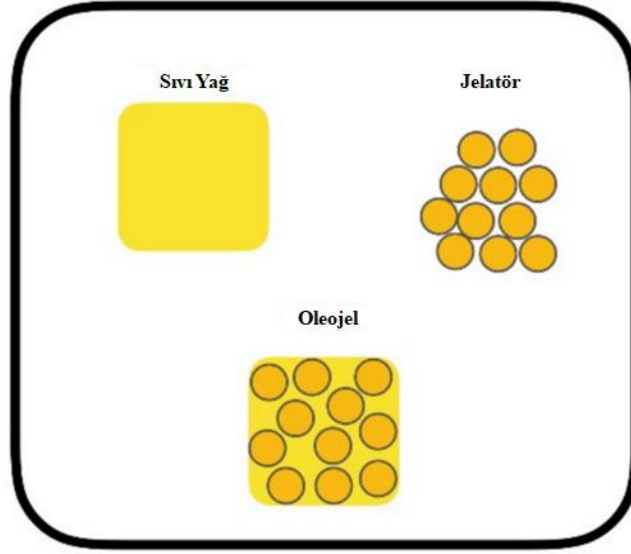
Şekil 2.3. Hidrojellerin kullanıldığı farklı uygulama alanları [20].

2.1.4. Organojel (Oleojel)

Organojeller, organik sıvı fazın, çapraz bağlanmış jelatör liflerinden oluşan 3 boyutlu ağ ile hareketsiz hale getirildiği yarı katı sistemlerdir. Bu ağ sistemi, moleküler ağırlığı düşük organojelatörlerden, polimerik organik jelatörlerden ya da kovalent bağlı polimer ağlarından oluşmaktadır [1]. Organojeller sürekli faz olarak organik sıvı fazın dışında, bitkisel yağ ya da mineral kullanılarak da oluşturulabilir. Organojelleri oluşturmak için organojelatörler ya da çözücüler kullanılmaktadır [21]. Literatürde organojelleri oluşturmak için kullanılan jelatör ve çözücü türleri Çizelge 2.2.'de gösterilmiştir. Organojellerin oluşumu ile ilgili görsel Şekil 2.4.'te gösterilmektedir.

Çizelge 2.2. Farklı organojelatör ve çözücülerden elde edilen organojel türleri [1].

Organojel Türü	Jelatör Türü	Organojelatör	İçerdiği Bağ	Organik Sıvı Faz
Fiziksel Organojeller	Molekül ağırlığı düşük jelatör.	N-stearoil L-alanin metil ester/N-behenoil L-tirozin metil ester.	van der Waals etkileşimleri ve Hidrojen bağları.	Aspir yağı.
	Molekül ağırlığı düşük jelatör.	Uzun zincirli seramidler ve stearik asit.	Hidrojen bağı.	Kanola yağı.
	Molekül ağırlığı düşük jelatör.	Monogliseritler (MO) ve Polietilenimin (PEI).	Elektrostatik etkileşimler.	Propilen glikol.
	Polimerik organik jelatör.	Poliüretan.	Hidrojen bağı ve hidrofobik etkileşimler.	1,3 – Propandiol.
	Polimerik organik jelatör.	Protein.	Protein-ligand bağlama ve solvent değişimi.	Etilen glikol.
Kimyasal Organojeller	Oligomer/polimer jelatör.	PDMS/poliüretan kauçuklar (PU)/florlu poliüretan polioller (FPU)/perfloropolieter (PFPE).	Sertleşme reaksiyonu.	Krytox/Bitkiselyağ/ Morina karaciğeri yağı/Aspir yağı.
	Monomer ve polimer jelatör.	Akrilamid ve polivinilpirolidon (PVP).	Polimerizasyon ve hidrojen bağı.	Etilen glikol.
	Oligomer/polimer jelatör.	Poli(etilen glikol) metil eter metakrilat, glisidil metakrilat ve PDMS.	Polimerizasyon.	PEO ve PDMS'den oluşan amfifilik yağ.



Şekil 2.4. Organojel oluşumu [22].

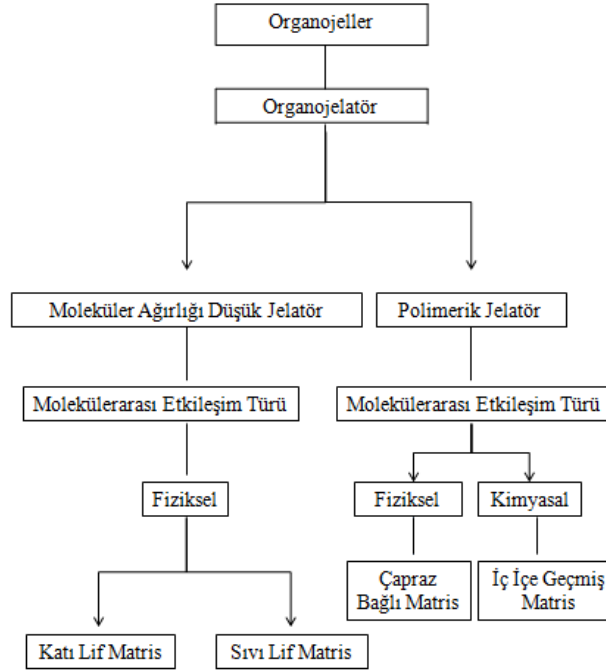
Organojellerin Özellikleri

Organojeller, jelatör molekülleri arasında fiziksel etkileşimlerle oluşan 3 boyutlu yapılar olup termo tersinirlik, viskoelastiklik, ısıl kararlılık ve biyouyumluluk gibi önemli özelliklere sahiptirler [23]. Organojeller jelleşme sıcaklıklarının üzerinde ısıtıldıklarında fiziksel bozunmaya uğrarlar, soğutulduklarında ise kararlı katı benzeri yapılarına geri dönerler [21]. Bu özellik organojellerin termo tersinir olduğunu göstermektedir. Organojeller düşük kayma hızlarında yarı katı gibi davranırlar ve elastik davranış gösterirler. Kayma hızı arttıkça jelatör molekülleri arasındaki fiziksel etkileşimler ortadan kalkar ve organojeller akışkan duruma geçerek viskoz akış davranışı sergilerler [23]. Bu durum organojellerin reolojik açıdan viskoelastik özelliğe sahip olduğunu göstermektedir [21].

Organojellerin Sınıflandırılması

Organojelleri oluşturmak için kullanılan organojelatörler, düşük molekül ağırlıklı organojelatörler ve polimerik organojelatörler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Düşük molekül ağırlıklı organojelatörlerin kendi kendine birleşerek oluşturdukları agregatlar fiziksel etkileşimler ile fiber ağları meydana getirmektedir. Oluşan fiber ağ yapısı kinetik özelliklerine göre katı fiber ağ ve sıvı fiber ağ olarak ikiye ayrılmaktadır.

Polimerik organojelatörler ise çapraz bağ ya da iç içe geçmiş ağ yapı (IPN) oluşturarak organik çözücüyü hareketsiz hale getirmektedir. Organojellerin sınıflandırılması ile ilgili görsel Şekil 2.5.'te özetlenmektedir.



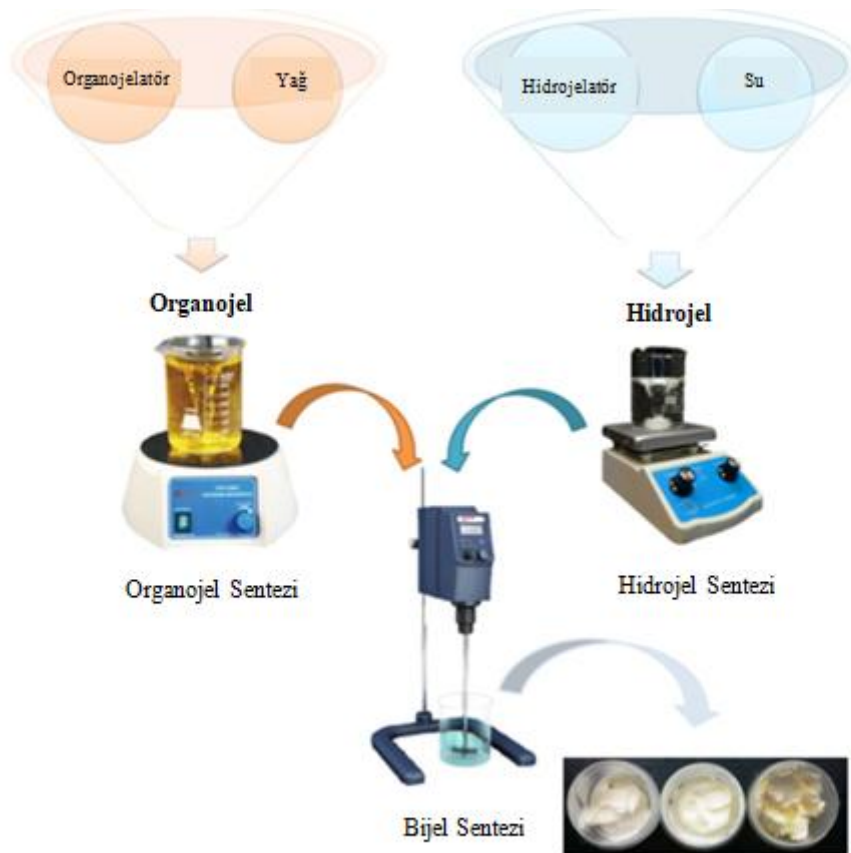
Şekil 2.5. Organojellerin sınıflandırılması [24].

Organojellerin Uygulama Alanları

Organojeller, kozmetik ve farmasötik uygulamalarda kullanılırlar. Kozmetik alanda şampuan, sprey, diş macunu ve saç bakım ürünlerinde kullanılmaktadırlar. Farmasötik uygulamaları ise transdermal, oral, parenteral ve oftalmolojik ilaç salım sistemlerini kapsar. Oftalmolojik alanda kullanılan organojellere örnek olarak lesitin tabanlı organojeller verilebilir. Bu jellere eklenen ilaçlar, oküler tabakayı etkilememekle birlikte kontrollü ve uzun süreli salım gösterirler. Enjekte edilebilen L- alanin tabanlı organojeller ise makromoleküler biyoaktif maddelerin salımı için parenteral uygulamalarda kullanılmaktadır. Organojeller lipofilik özelliğe sahip olduklarından dolayı stratum korneum tabakası için bariyer görevi görmektedir. Bu jellerin tahrişe neden olmaması ve hızlı emilimi sağlamasından dolayı transdermal ve dermal uygulamalarda kullanılmasının yanı sıra kanser ve diyabet gibi hastalıklarda da topikal tedavi amacıyla uygulandığı görülmektedir [25]. Ayrıca organojellerin kirlenme ve buzlanma önleyici, gıda ve ilaç salımı uygulamaları da mevcuttur.

2.1.5. Bijel

Bijeller, diğer jel türleri ile karşılaştırıldığında oldukça yeni bir tür olarak karşımıza çıkmaktadır. Görsel olarak bakıldığında, tek bir jel gibi görünen, iki jel fazın yüksek karıştırma hızında birlikte karıştırıldığı düzgün yarı katı dağıtım sistemleridir. Hu ve ark. (2015) [26] birbiri içerisinde karışan iki farklı jelin birleşimini **bijel** olarak adlandırmışlardır. Bijellerde bulunan ikili jeller hidrojelatör ve organojelatör kullanılarak ayrı ayrı hazırlanmaktadır. Bijeller, koloidal jel ya da hidrojel ve organojel karışımı olarak oluşturulabilmektedir [27]. Bijellerin oluşturulması ile ilgili görsel Şekil 2.6.'da gösterilmektedir.



Şekil 2.6. Bijellerin oluşturulması [28].

Bijellerin Özellikleri

Bijeller, ilaç ve kozmetik sistemler gibi farklı uygulama alanlarında kullanılan yarı-katı sistemlerdir.

Her iki faza ait özellikleri taşıması, bijellerin hidrojel ya da organojellere kıyasla daha üstün özelliklere sahip olmasını sağlamaktadır. Bijellerin, transdermal sistemlerde ilaç geçirgenliğini artırma, uygulamalardan sonra su ile temizlenebilme, nemlendirme ve serinlik etkisi yaratma, stratum korneum tabakasındaki hidrasyonu artırma ve ilaç salım hızını kontrol etme yeteneği gibi birçok önemli özelliği bulunmaktadır. Bijeller, kolay hazırlanmaları ve yüzey aktif madde bulundurmamaları nedeniyle emuljel, hidrojel ve organojellere göre avantajlıdır. Emuljeller, kararlı bir yapıda olmadıkları için emülsiyonlarda zamanla kremleşme ve faz ayrımı görülmektedir. Hidrojeller, su ile kolayca yıkanabilir olması ve serinlik etkisi sağlamasından dolayı hasta ile uyumluğunu artıran bir jeldir, ancak sadece hidrofilik ilaçlar için taşıyıcı olabilir ve cilt geçirgenliği üzerinde sınırlı özelliğe sahiptir. Organojeller lipofilik ilaçların salımı için uygun taşıyıcı sistemlerdir. Fakat ciltte yağlı bir his bırakırlar ve mekanik özellikleri zayıftır. Emuljel, hidrojel ve organojellerdeki bu dezavantajların üstesinden gelmek için bijeller üretilmiştir. Bijellerin, hidrojel, organojel, emuljel ve kremlere göre en önemli avantajı yüksek kararlılığa sahip olmasıdır. Bijeller, hidrojel ve organojel olmak üzere her iki fazı da bulundurduğu için hem lipofilik hem de hidrofilik ilaçların geçirgenliğini artırmaktadır. Ayrıca cilde kolay bir şekilde nüfuz ettiklerinden dolayı transdermal ve topikal ilaç salım uygulamalarında sıklıkla tercih edilmektedir. Bijeller, emuljel, organojel ve hidrojellere göre daha iyi mekanik özelliklere sahiptir. Hidrojelde bulunan hidrojen bağlarının varlığı, bijellere sıklık ve sertlik vermesi bakımından önemlidir. Bu nedenle hidrojel miktarının azalması durumunda bijellerin sertliğinde de azalma meydana gelmektedir [28]. Buna karşın literatürde, bijellerin mekanik karakteristikleri üzerinde organojel miktarının da etkili olduğu bildirilmiştir. Daha fazla organojel içeriğine sahip bijellerin, düşük oranda organojel içeren bijellere kıyasla daha iyi yapışkanlık ve sertlik gösterdiği de gözlenmiştir.

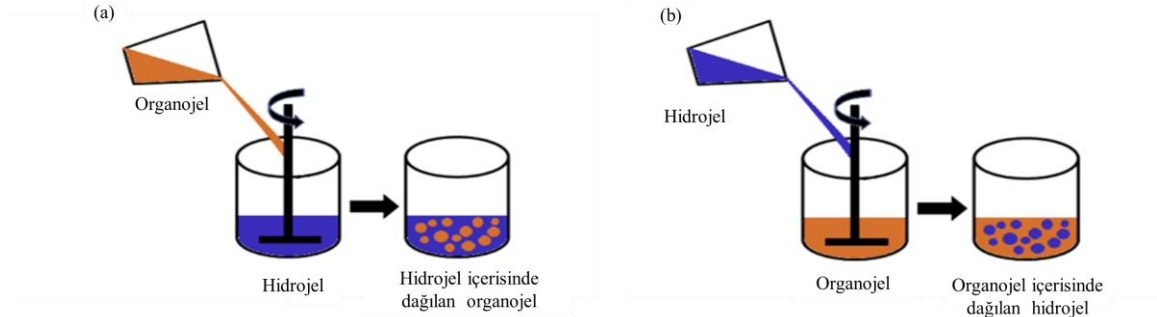
Bijellerin fiziksel özellikleri ilaç uygulamalarında bazı önemli parametreleri tanımlamaya yardımcı olabilir. Bu parametreler, kayma hızının bir fonksiyonu olarak, bijel sistemlerinin viskozitesi ve şişme davranışı olarak gösterilebilir. Örneğin bijellerin az miktarda kullanılması halinde cilt üzerinde maksimum dağılmayı sağlayarak kolay bir şekilde yayılabilmesi ve cilt üzerinde ince tabaka oluşturacak şekilde uygulanması bijel formülasyonlarının kayma incilmesi (viskozitenin azalması kayma hızının artması) davranışını göstermektedir. Bijellerin bu özelliği aktif bileşenlerin transdermal emilimini geliştirmesi açısından önemlidir.

Bijellerin sahip olduğu bu özellikler onları farmasötik, kozmetik ve gıda sistemleri gibi farklı uygulama alanlarında yaygın kullanılan malzemeler haline getirmektedir [29].

Bijellerin Sınıflandırılması

Bijeller, organojel ve hidrojel dağılımı sonucu yapısal olarak, hidrojel sistemi içerisinde organojel (w/o), organojel sistemi içerisinde hidrojel (o/w), bi-sürekli bijel ve kompleks bijel olmak üzere dört kategoride sınıflandırılmaktadırlar.

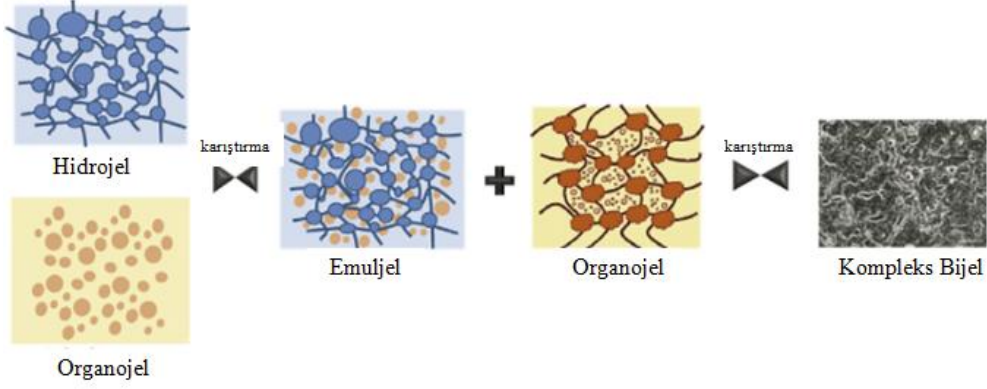
Şekil 2.7.a.'da hidrojel içerisine organojel eklenerek oluşturulan bijel sistemi, Şekil 2.7.b'de ise organojel içerisine hidrojel eklenerek oluşturulan bijel sistemi Şekil 2.7.'de gösterilerek şematize edilmiştir.



Şekil 2.7. (a) Hidrojel içerisine organojel eklenerek oluşturulan bijel sistemi (b) Organojel içerisine hidrojel eklenerek oluşturulan bijel sistemi [27].

Bi-sürekli faz sistemi, her iki fazın sürekli faz (dağılım fazı) olarak davrandığı sistemlerdir. Hidrojel içerisine organojelin eklendiği sistemlerde organojel oranının kritik sınır üzerinde artması sonucunda küresel olmayan düzensiz şekiller oluşur. Bu durumda hidrojel fazına yağ sızıntısı gerçekleşir. Hem yağ fazı hem de su fazı sürekli faz bölgesinde yer alır. Organojel içerisine hidrojel eklendiği sistemlerde ise hidrojel oranının artması ile küresel olmayan düzensiz şekiller oluşur. Bu durumda organojel fazına su sızıntısı oluşur. Sonuç olarak her iki faz sürekli faz bölgesinde bulunur. Böyle sistemlere bi-sürekli faz sistemi denilmektedir [30].

Kompleks bijeller, su içinde yağ/yağ içinde su yapıları bir emülsiyona organojel veya hidrojel eklenerek üretilen bijel sistemleridir [27]. Kompleks bijel sistemi Şekil 2.8.'de gösterilmektedir.



Şekil 2.8. Kompleks bijel sistemi [31].

Bijellerin Uygulama Alanları

Literatürde bijel sistemlerinin ilaç salımı ve kozmetik alanlarında kullanıldığı görülmektedir. Bijellerin yayılabilirlik, serinleticilik, yumuşatıcılık ve nemlendiricilik gibi önemli özelliklere sahip olması onları transdermal uygulamalarda tercih edilen bir sistem haline getirmektedir. Bijel sistemleri kullanılarak tenofovir, siprofloksasin, metrodinazol ve dilitazem hidroklorür içeren farklı ilaçların kontrollü bir şekilde salındığı sistemler geliştirilmiştir. Andonova ve ark. (2017) ketoprofen yüklü polimer taşıyıcıları bijel sistemler içerisine dahil etmiş ve dermal uygulamalar açısından ilaç fotostabilitesi ile kontrolü salımın daha iyi ve güvenli olduğu bijel formülasyonları elde etmişlerdir [32]. Sonuç olarak bijellerin özelliklerinin ilaç salımı uygulamalarında da etkili olduğu görülmektedir.

Çizelge 2.3.'te bijellerin farklı uygulama alanlarında kullanıldığı literatür çalışmaları gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Bijellerin uygulama alanlarına yönelik literatürde yer alan çalışmaları.

Organik Faz	Sulu Faz	Uygulama	Referans
Span 60, kolesterol, silisik asit bazlı organojel.	Karbopol 934 bazlı hidrojel.	Organojelin nemlendirici etkisi.	[33]
Sorbitan monostearat-badem yağı bazlı organojel.	Propilen glikol, etanol ve artırılmış suda çözülen Karbopol 940 hidrojel.	Topikal uygulamalarda nemlendirme etkisinin gösterilmesi.	[34]
Sorbitan monostearat-susam yağı bazlı organojel.	Guar zamkı bazlı hidrojel.	İyontoforetik ilaç salım sistemlerinde kullanımı.	[35]
Soya fasulyesi yağında organojelatör olarak Span 60, setil alkol veya lesitin-pluronik içeren organojel.	Hidroksipropil-metilselüloz (HPMC) bazlı hidrojel.	Transdermal ilaç salımı uygulamaları.	[36]
Stearik asit-soya fasulyesi ve susam yağı temelli organojel.	Jelatin hidrojel.	Siprofloksasin ilacının in-vitro salımı uygulamaları.	[37]
Ayçiçek yağı-span 40 organojel.	Doğal sakız bazlı hidrojel.	Kontrollü ilaç salımı uygulamaları.	[38]
Balık yağı organojel.	Karbopol hidrojel.	Gelişmiş antitümör etkileri, tümör ilerlemesini azalttı ve cilt kanserine karşı artan antitümör aktivitesinin incelenmesi.	[39]
Sızma zeytinyağında organojelatör olarak polikosanol ve emülgatör olarak gliseril stearat içeren organojel.	LM pektin hidrojel.	Kozmetik ve farmasötik uygulamaları.	[40]
Balık yağı organojel.	Doğal (sodyum aljinat) ve sentetik (hidroksipropil metilselüloz) polimer hidrojel.	Topikal ve transdermal ilaç salımı uygulamaları.	[4]
Stearil alkol organojel.	Agar hidrojel.	Kontrollü ilaç salımı uygulamaları.	[30]
Sığır serum albümini organojel.	Jelatin hidrojel.	İlaç salımı ve doku mühendisliği uygulamaları.	[41]

2.2. Carragenan

Carragenan, jel yapısı oluşturabilme özelliğinde olup, polisakkarit ailesinin genel bir adıdır. Kırmızı deniz yosunlarından (Rhodophyceae) ekstrakt yöntemi ile elde edilmektedir. Bu özel deniz yosunu tipi, Atlantik okyanusuna yakın Britanya, Avrupa ve Kuzey Amerika'da yaygındır. Besin değerine sahip olmayıp, anti-inflamatuar etki için tıp alanında ve ilaç uygulamalarında sıklıkla tercih edilmektedir.

2.2.1. Carragenan Türleri

Carragenanlar, %22 ila %35 sülfat grupları içeren *kappa* (κ), *iyota* (ι), *lambda* (λ), *epsilon* (ϵ), *mu* (μ) gibi çeşitli türlerde sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflandırma, carragenanın potasyum klorürde çözünme durumuna göre yapılmaktadır. Carragenan türünün özelliklerini etkileyen en temel farklılık, ester sülfat gruplarının sayısı, konumu ve 3.6-anhidro-galaktoz (3.6-AG) içeriğidir [42]. *Kappa* tipi carragenan, %25 ester sülfat içeriği ile %28- %35 3,6-AG içeriğine sahiptir. *Iyota* tipi carragenan, %32'lik ester sülfat içeriği ile %25 ila %30'luk 3,6-AG içeriği bulundurmaktadır. *Lambda* tipi carragenan, %35 ester sülfat içeriğine sahip olup 3,6-AG içeriği bulunmamaktadır. *Kappa* carragenanlar, *iyota* carragenanlardan daha yüksek 3,6-AG içeriğine sahip oldukları için kırılğan jeller oluşturarak yüksek jel kuvveti ve jelleşme kapasitesi göstermektedir. *Iyota* jelleri daha yumuşak ve daha elastik özelliğe sahipken *Lambda* hibritlerinin jelleşme kabiliyeti zayıftır. Çizelge 2.4.'te carragenan türlerinin özellikleri gösterilmiştir.

Çizelge 2.4. Carragenan türlerinin özellikleri [43].

<i>Kappa</i> (κ)	<i>Iota</i> (ι)	<i>Lambda</i> (λ)
-Proteinler ile güçlü etkileşim sağlaması.	-Proteinler ile orta derecede etkileşim sağlaması.	-Proteinler ile zayıf etkileşim sağlaması.
-Güçlü ve kırılğan jeller oluşturması. - K^+ veya Ca^{2+} iyonları yardımı ile jelleşmesi.	-Daha yumuşak, elastik jeller oluşturması ancak tamamen dönüştürülürse güçlü jeller oluşturması. - Ca^{2+} iyonları yardımı ile jelleşmesi.	- <i>Lambda</i> hibritleri jelleşmeyi kalınlaştıran zayıf jeller oluşturması.
-Rafine ve yarı rafine carragenanlarda bulunması.	-Rafine ve yarı rafine carragenanlarda bulunması.	-Yalnızca rafine carragenanlarda bulunması.
-Kararlı çözünme gerçekleştirmesi.	- <i>Kappa</i> ile iyi etkileşim sağlaması. -Kararlı çözünme gerçekleştirilmesi.	-Kararlı çözünme gerçekleştirmesi.
-Çözünmek için ısı – soğutma jeli formlarında bulunması.	-Çözünmek için ısı- soğutma jeli formlarında bulunması.	-Soğukta çözünme durumu görülmesi.
-Termo tersinir olması.	-Termo tersinir olması.	-Termo tersinir olmaması.

2.2.2. Carragenan Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Carragenan Kimyasal Yapısı

Carragenan, %15 ila %40 ester sülfat içeriğine ve 100 kDa'nın oldukça üzerinde ortalama moleküler ağırlığa sahip olan sülfatlanmış bir poligalaktandır. D-galaktoz ve 3.6-AG birimlerinin α -1,3 ve β -1,4-glikozidik bağlar ile birleştirilmesiyle oluşturulur. Kimyasal bileşimine bakıldığında, galaktoz kalıntılarından oluşan hidrokolloid yapıda olup, normal pH aralığında negatif yük gösterir. Düşük pH durumunda, ($pH \leq 3.0$) glikozidik bağların hidrolizi ile sülfatazlarla desülfasyon gerçekleştirir [42]. Carragenan, çoklu biyolojik aktiviteleri sayesinde antikoagülan, antiviral, immunomodülatör, antitümör ve antitrombotik ajan olarak kullanılabilir. Ek olarak biyoyumluluk, biyobozunurluk, su tutma kapasitesi ve jelleşme özelliğine sahiptir [44].

Carragenan Fiziksel Yapısı

Polimer zincirindeki şeker birimlerinin konformasyonu ile birlikte kaplanmış katyonlar, carragenanların fiziksel özelliklerini belirlemektedir.

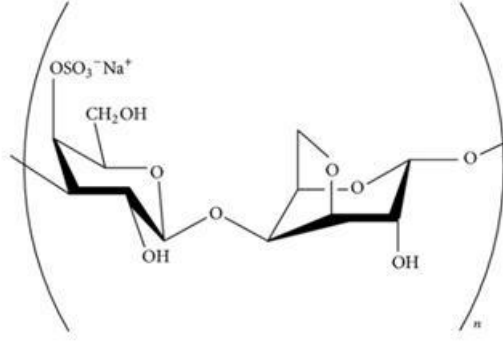
Örneğin *kappa* ve *iyota* carragenanlar kalsiyum ve potasyum iyonlarının varlığında jel formuna gelirken *lambda* carragenanlar jel oluşturmamaktadır. Carragenanlar asit katalizli hidroliz yoluyla depolimerizasyona duyarlıdırlar. Carragenanlar, yüksek sıcaklıkta ve düşük pH değerinde hızlı bir şekilde tamamen işlevselliğini kaybedebilirler. Carragenanların farklı uygulama alanlarındaki işlevi, genellikle reolojik özelliklerine bağlıdır. Carragenanlar, lineer, suda çözünür polimerler olarak oldukça viskoz sulu çözeltiler oluşturmaktadır. Carragenanların viskozitesi, konsantrasyon, sıcaklık, carragenan türü ve molekül ağırlığı gibi parametrelere bağlıdır. Örneğin; viskoziteleri konsantrasyonla artarken, sıcaklık ile azalmaktadır.

Carragenan Uygulama Alanları

Carragenanlar gıda, ilaç ve biyomedikal gibi birçok uygulama alanlarında kullanılmaktadır. Stabilize etme yeteneği, jelleştirici, emülsifiye edici ve koyulaştırıcı ajan gibi fiziksel ve fonksiyonel özelliklerinden dolayı genellikle gıda uygulamalarında kullanılmaktadır. Ayrıca, yangın söndürme köpükleri ve oda spreyi jelleri olarak da kullanılmaktadırlar. Carragenanlar dayanıklılık, biyouyumluluk ve viskoelastisite gibi özellikleri nedeniyle kontrollü ve uzun süreli ilaç salım uygulamalarında sıklıkla kullanılmıştır. Son yirmi yılda yapılan çalışmalarda, carragenanların immünomodülatör, anti-tümör, antikoagülan aktivite ve anti-hiperlipidemik gibi çeşitli özelliklere sahip oldukları belirlenmiş ve inflamasyon ve inflamatuvar ağrı tedavisi için topikal alanlarda uygulanmaları gündeme gelmiştir. Carragenanlar günümüzde kontrollü ilaç salım sistemlerinde zayıf çözünen maddelerin çözünme hızlarını artıran ve antioksidan olarak kullanılan önemli polimerlerdir [45].

2.3. Kappa Carrageenan (κ -CA)

κ -CA, kırmızı alglerden elde edilen ve sülfatlanmış galaktan olarak bilinen suda çözünür bir biyopolimerdir. Üç-bağlı β -d-galaktoz 4 sülfat ve 4-bağlı 3,6-anhidro a-d-galaktoz disakkaritlerin tekrarlayan birimlerinden oluşmaktadır [46]. Kısmen sülfatlanmış galaktanlardaki lineer zincirlerin yüksek sıcaklıklarda suda çözündüğü bir polimerdir. Bu durum jel oluşturmak için yüksek potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Şekil 2.9.'da κ -CA yapısı gösterilmektedir.



Şekil 2.9. κ -CA yapısı [47].

κ -Carragenan (κ -CA) Özellikleri

κ -CA, çözünürlük özelliğine sahip bir polimerdir. *Kappa* molekülleri çözmek için ısıya ihtiyaç duymaktadır. κ -CA, diğer carragenan türlerinden daha fazla 3,6 AG içeriğine sahip olduğu için yüksek jelleşme kapasitesi ile güçlü ve kırılğan jeller oluşturmaktadır. κ -CA, *iyota* jelleri ya da kalsiyum (Ca^{+2}) ile jelleşmektedir. Oluşan jelin kuvveti carragenan içerisindeki potasyum (K^+) ve Ca^{+2} iyonlarının konsantrasyonuna bağlıdır. *Kappa* jeli saf K^+ varlığında elastik ve yapışkan durumdayken, Ca^{+2} varlığında kırılğan haldedir. κ -CA jelleri ısıtıldıklarında kalıcı bir değişime uğramadıkları için termo tersinirdir. Ayrıca farklı bir jelleşme ve erime sıcaklığına sahiptir. *Kappa* jelleri, 10-200°C üzerinde erir ve soğuduklarında yeniden jelleşmektedir. Jel kuvvetine zarar vermeden ısı döngüsünü gerçekleştirdiği için uygulamalarda sıklıkla kullanılan önemli bir polimerdir [43].

κ -Carragenan (κ -CA) Uygulama Alanları

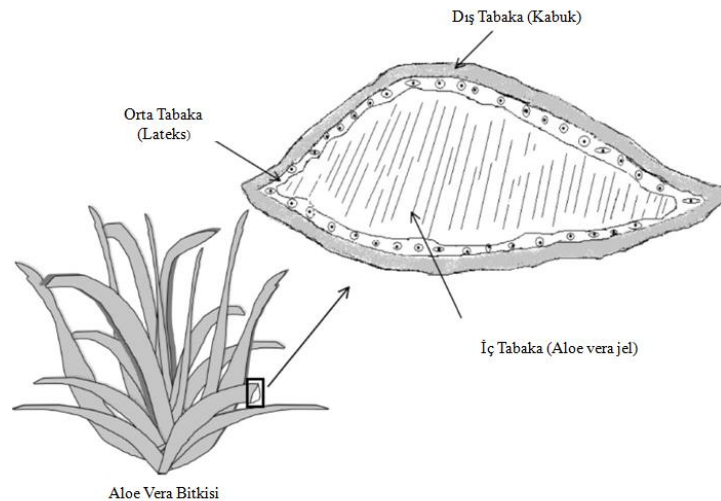
κ -CA'nın kemik ve kırıldak rejenerasyonu, ilaç salımı, film ve 3 boyutlu baskılama gibi doku mühendisliği ve biyomedikal alanlardaki uygulamaları Çizelge 2.5.'te özetlenmiştir.

Çizelge 2.5. κ - CA uygulama alanları.

κ- CA Uygulama Alanı	Uygulama Şekli
Kemik ve Kırıkrdak Rejenerasyonu	<p>-Hücre penetrasyonu ve doku vaskülarizasyonu açısından κ-CA ile hazırlanan kompozitlerin hücre penetrasyonu ve doku vaskülarizasyonu açısından gözeneklilik sağlaması ve kemik rejenerasyonunu artırması.</p> <p>-κ-CA temelli kollajen kompozit jellerde κ-CA'nın basınç dayanımını artırarak doğal kemik dokusuna benzeyen biyouyumlu yapıda iskeleler oluşturması.</p> <p>-Kemik doku mühendisliği uygulamalarında κ-CA'nın nano hidroksiapatit ile birleşiminde κ-CA'nın osteoblastik genotipli hücrelerin proliferasyonunu ve farklılaşmasını sağlaması.</p> <p>-κ-CA temelli hidrojellerin kırıkrdak rejenerasyonunu artırması.</p>
İlaç Salımı	<p>-Tüberküloz-kemik iltihabı ile enfekte olmuş dokuların rejenerasyonu için rifampisin yüklü κ-CA, maleik anhidrit, izoniazid ve nano hidroksiapatitten oluşan nanokompozitlerinden rifampisin ilaç salımının etkin bir şekilde gerçekleştirilmesi.</p> <p>-κ-carragenan'ın yüksek derecede kapsülleme verimliliği, kontrollü uygulama profili ve κ-CA içerisine yüklenen ilaç ya da biyoaktif ajanın uzun süreli salımını sağlaması sayesinde taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde kullanılması.</p>
Film	<p>-κ-CA, ksantan zankı ve jellan zankının birleştirilmesi ile hidrojel filmi oluşturulması. Oluşturulan mekanik, termal ve geçirgenlik özelliklerine sahip κ-CA temelli hidrojel filminin topikal cilt uygulamalarında, doku iskelelerinde ve doku mühendisliğinde alanlarında uygulamalarının görülmesi.</p>
3 Boyutlu Yazıcı Uygulamaları	<p>-3 Boyutlu baskı için biyolojik bağlayıcı olarak kullanılan biyobaskılı κ-CA temelli hidrojellerin biyouyumluluk ve güçlü yapısal bütünlük göstermesi.</p>

2.4. Aloe Vera

Aloe gibi bazı bitkilerden elde edilen karbonhidratlar biyolojik aktivite özelliği göstermektedir. Aloe daha önce *Liliaceae* ailesinden kabul edilirken son zamanlarda *Aloeaceae* ailesinde yer almaktadır. Kökeni Güney ve Doğu Afrika'nın yanı sıra tüm Akdeniz bölgelerine dayanmaktadır ve 400'den fazla türü vardır. Çoğunlukla subtropikal bölgelerde yetişmektedir. Gövdesinde rozet şekline benzeyen yeşil yapraklı çok yıllık bir bitkidir. Yaprakları üçgen şeklinde olup mezofili çevreleyen kütikül ile kaplı kalın bir epidermisten oluşan tırtıklı kenarlara sahiptir. Aloe vera, yüksek miktarda su (%99-99,5) içeren yumuşak bir bitkidir. Aloe veranın katı içeriği, %0.5-1 arasında değişmektedir. Aloe veranın içerisinde su ve yağda çözünen mineraller, vitaminler, polisakkaritler, organik asitler, enzimler ve fenolik bileşikler gibi çeşitli aktif bileşenler bulunmaktadır. Yaprak bölgesi, jel, lateks ve kabuk olmak üzere üç katmandan meydana gelmektedir. Jel kısmı, büyük parankim hücrelerine sahip yumuşak, berrak, nemli ve kaygan dokulardan oluşan iç tabakadır. Bu tabaka şeffaf, müsilajlı bir yapıdadır ve su (%99), glukomannanlar, amino asitler, lipidler, steroller ve vitaminler gibi biyoaktif ajanlar içermektedir. Lateks bölgesi, antrakinonlar, acı sarı özsu ve glikozitleri içeren orta tabakadır. Kabuk katmanı, jel matriksine koruma sağlamakla birlikte karbonhidrat ve proteinlerin sentezine yardımcı olan 15-20 hücreden oluşmuş dış ve kalın bir tabakadır. Aloe vera'nın yapısı ayrıntılı olarak Şekil 2.10.'da ayrıntılı olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.10. Aloe vera yapısı [48].

Aloe vera Özellikleri

Amino asit, salisilik asit, enzimler, vitaminler, mineraller, şekerler, saponinler, antrakinonlar ve steroidler olmak üzere yaklaşık 200 aktif bileşen içeren Aloe vera bitkisi aynı zamanda yaklaşık 75 besin maddesini de içinde barındırmaktadır. İçinde barındırdığı bu bileşenlerden dolayı Aloe vera, antioksidan, anti-inflamatuar ve antidiyabetik özellikler taşımakta olup, güneş yanığı tedavisinde, bağışıklık güçlendirmede, yaşlanma karşıtı ve antikanser ajanı olarak kullanılmaktadır [48]. Aloe vera jelinin içerdiği bileşenler ve özellikleri Çizelge 2.6.'da yer almıştır.

Çizelge 2.6. Aloe vera bileşenleri ve özellikleri [49].

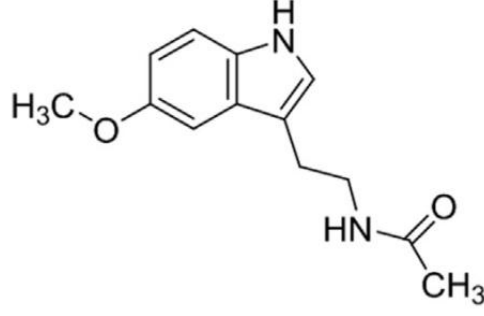
Bileşen	Sayısı ve türü	Özelliği ve aktivitesi
Amino asit	Gerekli 22 amino asitten 20'sini ve 8 temel amino asitten 7'sini karşılaması.	Vücut ve kas dokularındaki proteinlerin temel yapı taşları üzerinde etkili olması.
Antrakinon	Aloe emodin, aloetic asit, aloin, antrasen bileşenleri içermesi.	Analjezik, antibakteriyel özellikte olması.
Enzimler	Antranol, barbaloin, krizafonik asit, smodin, tarçinik asit esterleri, izobarbaloin, resistannol enzimleri içermesi.	Antifungal ve antiviral aktivite, ancak yüksek konsantrasyonlarda toksik olması.
Hormonlar	Oksinler ve giberellin hormonları içermesi.	Yara iyileşmesi ve antiinflamatuar özellikte olması.
Mineraller	Kalsiyum, krom, bakır, demir, manganez, potasyum mineralleri bulundurması.	Sağlık için temel bileşen olması.
Salisilik asit	Aspirin benzeri bileşikler içermesi.	Analjezik etkisinin olması.
Saponinler	Glikozitleri içermesi.	Temizleyici ve antiseptik olması.
Steroidler	Kolesterol, kampesterol, lupeol, sitosterol anti- inflammatuar ajanlar, lupeol gibi steroidler içermesi.	Antiseptik ve analjezik özelliklere sahip olması.
Şekerler	Monosakaritler: Glikoz ve fruktoz polisakaritler:glukomannanlar/polimannoz şekerleri bulundurması.	Acemannan'ın anti-viral, bağışıklık düzenleyici aktivitesi bulunması.
Vitaminler	A, B, C, E, kolin, B12, folik asit vitaminleri içermesi.	Serbest radikalleri nötralize etmesi.

Aloe vera Uygulama Alanları

Aloe vera ve jeli sivilcelere karşı cilt toniği olarak kullanılmaktadır. Ayrıca sert ve kuru havalarda cildi yumuşatarak nemli tutmaktadır. Seçilmiş esansiyel yağlarla karıştırıldığında, mükemmel bir cilt pürüzsüzleştirici, nemlendirici, güneş koruyucu losyon olarak kozmetik ve cilt ürünlerinde kullanılmaktadır. Aloe vera'nın antiseptik özelliği, lupeol, salisilik asit, üre nitrojen, tarçınik asit, fenoller ve kükürt olmak üzere altı antiseptik ajanı yapısında bulundurmasından kaynaklanmaktadır. Bu bileşikler mantarlar, bakteriler ve virüsler üzerinde inhibitör etkiye sahiptir. Klinik uygulamalarda, Aloe sakızı özleri, hem normal hem de diyabetik sıçanlarda glikoz toleransını artırmış ve 4-14 hafta boyunca alınan Aloe vera özü, hem klinik hem de deneysel olarak önemli bir hipoglisemik etki göstermiştir. Aloe vera jeli şeker hastalığında şekerin azaltılması amacıyla kullanılmaktadır. [49]. Aloe vera'da bulunan glikoproteinler ve polisakkaritler farklı kanser türlerine karşı yararlı olan güçlü bir kemo-önleyici özelliğindedir. Bu ajanlar, bağışıklık sistemini uyararak kansere karşı mücadele edilmesini sağlamaktadır. Ayrıca bu aktif bileşiklerin tümör oluşturulan hayvanların yaşam süresini önemli ölçüde uzattığı görülmüştür. Aloe vera, diş hekimliği alanında, ağrıyı azaltmak ve iyileşmeyi hızlandırmak gibi çeşitli dental komplikasyonları tedavi etmek amacıyla yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Aloe vera jeli, biyoyararlanımı düşük olan ilaçların emilimini artırma potansiyeline sahiptir. Aloe vera yağının bağırsak yoluyla emilimi ve biyoyararlanımı artırmaya ek olarak, ilaçların transdermal yoldan penetrasyonunu hızlandırmada da faydalı olduğu bilinmektedir [48].

2.5. Melatonin

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin), ilk olarak Lerner ve ark. (2022) tarafından melanofor kasılma hormonu şeklinde belirtilerek kurbağa ve balık melanositleri üzerinde cilt rengini açan bir molekül olarak keşfedildi [50]. Sonrasında Reiter ve ark. (2010) melatoninin tüm omurgalılarda bulunan, epifiz bezinden ritmik olarak salgılanan ve mevsimsel olarak ritimlerin düzenlenmesinde görev alan bir hormon şeklinde tanımladı. Melatoninin, geceleri fazla salgılandığı, birçok omurgalı dokusunda sentezlendiği ve bakterilerden, protozoalardan bitkilere, mantarlara ve omurgasızlara kadar tüm canlılarda bulunduğu bilinmektedir [51]. Şekil 2.11.'de melatoninin yapısı gösterilmektedir.



Şekil 2.11. Melatonin yapısı [52].

Melatoninin Özellikleri

Endojen bir nörohormon olan melatonin, triptofandan sentezlenen ve epifiz bezi tarafından salgılanan bir indolamindir. Antioksidan özellikleri sayesinde inflamasyonun ilerlemesini engeller ve akut karaciğer hasarına neden olan, iskemi-reperfüzyon, safra kanalı ligasyonu, pankreatit nefrotoksisitesi ve nöronal dejenerasyon gibi rahatsızlıkları önlemektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, reaktif oksijen türleri (ROS) ve proinflamatuvar sitokinlerin üretimini, melatonin uygulamasıyla büyük ölçüde azaldığı kanıtlanmıştır. Melatonin amfifilik özelliğe sahip olduğu için, serbest radikalleri temizlemekte, çekirdek ve mitokondri gibi hücre bölmelerine kolayca girebilmektedir. Melatoninin, lipofilik özelliği, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) partiküllerinin lipid fazına girmesini ve lipid peroksidasyonunu inhibe edebilmesini sağlamaktadır [53].

Melatoninin Uygulama Alanları

Melatonin, uyku bozukluklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Genellikle uyku gecikmesini azaltır ve özellikle sirkadiyen evrelerin bozulması durumunda uykuyu iyileştirir. Ayrıca melatoninin, Alzheimer, Parkinson, Huntington hastalıkları ve amyotrofik lateral skleroz gibi nörodejeneratif hastalıkları hafifletmek için etkili olduğu görülmektedir [54]. Melatonin deri ve bağırsak tarafından çevresel saldırıya maruz kaldığı zaman beyin gibi oksijen tüketiminin fazla olduğu organlarda üretimini artırır. Melatoninin bağışıklık sistemi üzerindeki etkisine bakıldığında peritoneal makrofajlar tarafından, tümör nekroz faktörü- α (TNF α), dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF β) ve kök hücre faktörü (SCF) dahil olmak üzere çeşitli immünomodülatör sitokinlerin gen ekspresyonu ile interlökin düzeylerini düzenlediği görülmektedir. Melatonin aynı zamanda anti-kanser özellikte olup tümör büyümesini azaltır. Bu durum melatoninin kemoterapötik ajanların toksisitesini düşürmesi ile sonuçlanmaktadır [55].

2.6. Kontrollü İlaç Salım Sistemleri

Tabletler, kapsüller, şurup ve merhemler gibi klasik ilaç salım sistemleri sürdürülebilir salımda yetersiz olup, kan plazmasında dalgalanmalara ve zayıf biyoyararlanıma neden olduğu için kontrollü ilaç salım sistemleri klasik ilaç salım sistemlerindeki bu dezavantajların üstesinden gelmek için tasarlanmış ve kullanılmıştır [56]. Kontrollü ilaç salım sistemleri, ilk olarak 1952 yılında sürdürülebilir salım teknolojisi ile başlamıştır. Kontrollü ilaç salım sistemleri ile, ilacın kontrollü bir şekilde verilmesi ve insan ya da hayvanlarda ilacın etkinliğinin artırılması amaçlanmaktadır. Kontrollü salım sistemlerinin temel hedefi; etkin maddenin istenilen oranlarda salımını gerçekleştirerek etkin madde miktarının sabitlenmesini sağlamak ve yan etkilerin oluşmasını önlemektir. Kontrollü ilaç sistemlerinde salım; ilacın biyomalzemenin içine ya da yüzeyine tutuklanması ve ardından uygun mekanizmalarla biyomalzemedan salınması ile gerçekleşmektedir. Kontrollü ilaç sistemleri olarak partiküler formdaki ilaç salım sistemleri partikül boyutlarına göre mikropartiküller ve nanopartiküller olarak sınıflandırılmaktadır [57].

2.6.1. Transdermal Sistemler

Kontrollü ilaç salım sistemlerinin oral uygulama, transdermal uygulama, akciğer inhalasyonu, mukozal uygulama ve intravenöz enjeksiyon olmak üzere birçok uygulama şekli vardır. Bunlar arasında, transdermal ilaç salım sistemi (TDDS) uzun süreli kontrollü ilaç salımını sağlaması ve kolay uygulanabilirliği ile ilgi çekici bir yaklaşıma sahiptir [58]. Transdermal ilaç salımı, iğne bazlı enjeksiyonların kullanıldığı geleneksel uygulama yöntemlerinden farklı olarak deri yoluyla vücuda invaziv olmayan ilaç iletiminin sağlandığı sistemlerdir. Ayrıca TDDS, ilaç salımını kontrol etmek amacıyla kullanılarak yöntemin uzun süreli gerçekleşmesini sağlar. Transdermal ilaç salım sisteminin en önemli özelliği, invaziv olmayan bir uygulama yöntemi olduğundan hastaya minimum ağrı etkisi sağlamasıdır. Transdermal sistemler, bant şeklinde polimerik nanopartikül, nanoemülsiyon, mikro iğne, iyontoferez ve elektroporasyon şeklinde uygulanmaktadır [58].

Transdermal bant veya cilt bandı, deri yoluyla kan dolaşımına belirli bir dozda ilaç vermek için deriye yerleştirilen ilaçlı bir yapışkan yamadır. Transdermal bantlarda, bantın içindeki rezervuarda bulunan sıvı ilacın deriden kan dolaşımına geçişini kontrol eden özel bir zar kullanılır.

Transdermal bantlar, mide asitleri tarafından parçalanan, bağırsaktan iyi emilmeyen ya da karaciğer tarafından parçalanan maddelerin iletimini daha iyi sağladığı için uzun süreli ve kontrollü ilaç salımını gerçekleştirmektedirler. Transdermal bantlar oral olarak verilen ilaçlardan daha az yan etkiye sahip olduğu için daha avantajlıdır [59].

2.7. *In-Vitro* İlaç Salım Kinetiği ve Salım Mekanizmasının Belirlenmesi

İlaç salım kinetiğinin ve salım mekanizmasının belirlenebilmesi için çeşitli matematiksel modeller kullanılmaktadır. Bu modeller doğrultusunda salım verileri grafiğe geçirilerek grafiğin lineer regresyon katsayısına (R^2) göre kinetik salım modeli belirlenmektedir.

Sıfırıncı derece kinetik: Sıfırıncı dereceden ilaç salım kinetiği matematiksel olarak Eşitlik 2.1’de gösterilmektedir.

$$Q = Q_0 + K_0 t \quad (2.1)$$

Q_0 = Başlangıç ilaç miktarı

Q_t = t süre sonunda salınan ilaç miktarı

K_0 = Salım hız sabiti

Q , salınan veya çözünen ilaç miktarı olduğunda (salımın ilaç çözüldükten sonra hızla meydana geldiği düşünülerek), Q_0 çözeltideki ilacın başlangıç miktarı olup genellikle sıfırdır. K_0 sıfırıncı derece salım sabitidir. İlaç salımının kümülatif yüzdesine karşılık zaman grafiği sıfırıncı derece kinetik modeli belirtmektedir. Sıfırıncı derece salım kinetiği, ilacın kontrollü salınmasını sağlayan sabit yüzey alanına sahip sistemler için uygundur. Deri üzerine uygulanan bantlar bu tür kinetiğe örnek olarak verilebilir. Bu kinetiğe göre birim zamanda salınan ilaç miktarı konsantrasyondan bağımsız olarak sürekli sabit durumdadır [60].

Birinci derece kinetik: Bu salım kinetiği modelinde salım hızı konsantrasyona bağlı olarak değişmektedir. İlaçların emilimi ya da eliminasyonunu tanımlamak için kullanılmaktadır [61]. Matematiksel modeli Eşitlik 2.2 ile gösterilmektedir [62].

$$dC/dt = K_B (C_0 - C_t) \quad (2.2)$$

Eşitlikte C_0 ilacın başlangıç konsantrasyonunu, C_t ise ilacın t anındaki konsantrasyonunu ifade etmektedir. K_B sabiti, ilacın birinci derece kinetik sabiti olup dC/dt ise zamanla ilaç konsantrasyonunda meydana gelen değişimi göstermektedir. Eşitlik 2.2’nin doğrusallaştırılmış hali Eşitlik 2.3’te verilmektedir.

$$\ln [C_o/(C_o-C_t)] = K_B t \quad (2.3)$$

C_o = Başlangıç ilaç miktarı

C_t = t süre sonunda salınan ilaç miktarı

K_B = Salım hız sabiti.

$\ln C$ değerleri zamana karşı grafiğe geçirildiğinde eğimi K_B olan bir doğru elde edilmektedir. Birinci derece kinetik modelde zamana bağlı olarak çözünen etkin madde miktarı üssel şekilde azalmaktadır. Uzun süreli salım yapan sistemler ile klasik ilaç salım sistemlerinin çoğu bu tür sistemlere örnek olarak gösterilebilir. Ayrıca bu kinetik modeli gözenekli matrislerde suda çözünen ilacın miktarını tanımlamak için kullanılmaktadır [61].

Higuchi modeli: Kontrollü ilaç salım sistemlerinde katı matrisler içinde disperse edilmiş etkin maddelerin salım hızlarını açıklamak için birçok matematiksel model geliştirilmiştir. Matris sistemlerden ilaç salım hızını ifade etmek için kullanılan modellerden biri Higuchi denklemdir. Bu eşitlik ilk olarak düzlemsel sistemler üzerinde kullanılırken sonrasında farklı geometrilere sahip matris sistemler üzerinde değiştirilerek kullanım alanı genişletilmiştir [63]. Bu salım kinetiği Eşitlik 2.4 ile ifade edilmektedir.

$$Q_t = K_H t^{1/2} \quad (2.4)$$

Q_o = Başlangıç ilaç miktarı

Q_t = t anında salınan ilaç miktarı

K_H = Salım hız sabiti

“Karekök kanunu” olarak da bilinen bu kinetik modelde salınan ilaç miktarı, zamanın kareköküne karşı grafiğe geçirilerek lineer bir doğru elde edilmektedir. Difüzyon kontrollü salımın gerçekleştiği durumlarda doğrunun eğimi K_H sabitini vermektedir.

Hixson-Crowell modeli: Hixson ve Crowell modeli “küp kök kanunu” olarak bilinmekte olup aşağıdaki varsayımlara dayanmaktadır [61].

- İlacın çözünerek ortama difüzyonu partikülün yüzey alanına dik olarak gerçekleşir.
- Partikülün belirli bir geometrik şekilde olması beklenmemektedir.
- Çoğunlukla küresel morfolojiye sahip olan katı partiküller çözünme işlemi süresince morfolojilerini korumaktadır.

d) Partikül yüzeylerinde gerçekleşen çözünme hızlarının birbirinden farklı olması önemsizdir; çünkü bu modele göre salım kinetiğinin belirlenmesinde ortalama çözünme hızı kullanılmaktadır.

Küp kök yasası olarak bilinen bu model, salım sırasında partiküllerin veya tabletlerin yüzey alanında ve çapında değişikliğin olduğu sistemlerden yapılan salımı tanımlamaktadır. Düzgün boyutlu parçacıklardan oluşan bir ilaç tozu için, parçacıkların küp köküne dayalı olarak çözünme hızını ifade eden bir denklem türetmek mümkündür [64]. Bu denklem Eşitlik 2.5 olarak gösterilmektedir.

$$Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = - K_{HC}t \quad (2.5)$$

Q_0 = Başlangıçtaki ilaç miktarı

Q_t = t anında salınan kümülatif ilaç miktarı

K_{HC} = Hixson-Crowell salım hız sabiti

Bu modelde ilaç salım hızını ilaç molekülerinin çözünme hızı belirlemektedir. $Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3}$ değerleri zamana karşı grafiğe geçirildiğinde eğimi K_{HC} olan bir doğru elde edilmektedir. Bu eşitlik özellikler partiküler ilaç şekilleri için uygundur.

Korsmeyer-Peppas modeli: Korsmeyer ve ark. (1983), ilk olarak bir polimerik sistemden ilaç salımını tanımlayan eşitlik türetmişlerdir [61]. Polimerik sistemlerden etkin maddelerin kontrollü salım mekanizması genellikle Fick difüzyon eşitliği ile gösterilmiştir. Ancak deneysel koşullar durumunda salım mekanizması Fick difüzyon eşitliğinden sapmalara neden olabilir. Bu nedenle farklı geometrik şekillerde olan polimerik sistemlerin kontrollü salım mekanizması Eşitlik 2.6 olarak belirtilen Korsmeyer-Peppas eşitliği ile ifade edilmektedir.

$$\log(M_t/M_\infty) = \log k + n \log t \quad (2.6)$$

M_t = t zamanında salınan etkin madde miktarı

M_∞ = ∞ zamanda salınacak etkin madde miktarı

k = salım sisteminin yapısal ve geometrik özelliklerini belirten kinetik sabit

n = salım mekanizmasını gösteren difüzyonel sabit

Burada M_t/M_∞ t zamanda salınan ilaç fraksiyonunu gösterirken, k difüzyon hız sabitidir ve n salım mekanizmasını gösteren üs olarak ifade edilmektedir. Kümülatif ilaç salım yüzdesinin logaritmik değerine karşılık zamanın logaritmik grafiği Korsmeyer-Peppas kinetik modeli belirtmektedir. Korsmeyer-Peppas modeli birden fazla salım mekanizmasının olduğu durumlarda kullanılmaktadır [65].

2.8. Polimerik Nanopartiküller

Nanopartiküller ilaç moleküllerinin farmokodinamik ve farmokokinetik özelliklerini geliştirmek ve değiştirmek için fiziksel bir yaklaşım olarak kullanılmaktadırlar [66]. Polimerik nanopartiküller (PNP), boyutları 10-1000 nm arasında olan katı partikül ya da partikül dispersiyonları olarak tanımlanan sistemlerdir. Polimerik nanopartiküller, ilacın çözüldüğü, hapsedildiği, kapsüllendiği ya da bir nanopartikül matrisine bağlandığı biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak bozunabilir polimerlerden hazırlanmaktadır. Hazırlama yöntemine bağlı olarak nanopartiküller, nanoküreler veya nanokapsüller elde edilebilmektedir. Son yıllarda, biyolojik olarak parçalanabilen polimerik nanopartiküller, uzun süreli salım özellikleri sayesinde potansiyel ilaç salım sistemleri olarak kullanılmaktadır [66]. Polimerik nanopartiküller, kontrollü ve uzun süreli salım yeteneğine, doku ve hücrelerle biyouyumluluk sağlama gibi önemli özelliklere sahip olduğu için ilaçların, proteinlerin ve DNA'nın hedef hücreler ile organlara etkili bir şekilde taşınmasını gerçekleştirmektedir. Ayrıca, nanometre boyutları sayesinde, biyoaktif ajanların etkili bir biçimde hücre zarlarından geçişlerini düzenleyerek kan akışının stabil kalmasını sağlamaktadırlar. Polimerik nanopartiküller, birçok yöntemle üretilen farmasötik maddelerin stabilitesini artırma, klasik oral ve intravenöz uygulama yöntemlerine göre daha verimli ve etkin olma, lokal olarak uygulandıklarında farmasötik madde konsantrasyonunun daha yüksek olmasını sağlama gibi önemli avantajlara sahiptir. Bu tür özelliklere sahip olması polimerik nanopartiküllerin ilaç salımı uygulamalarında güvenli şekilde kullanılmasını sağlamaktadır. Bu kapsamda polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan polimerler, doğal ve sentetik olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Doğal polimerler, jelatin, kitosan, sodyum aljinat şeklinde sıralanırken sentetik polimerler polilaktitler (PLA), poliglikolitler (PGA), poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), polianhidritler, poliortoesterler, polisiyanoakrilatlar, polikaprolakton, poliglutamik asit ve polimalik asit şeklinde sıralanabilir.

2.8.1. Polimerik Nanopartiküllerin Üretim Yöntemleri

Polimerik nanopartiküller hazırlanırken, PNP'nin özellikleri, optimize edilmelidir. Bu nedenle, uygulamalarda istenilen özelliklere sahip PNP'leri elde etmek için uygun hazırlama tekniklerini kullanmak oldukça avantajlıdır.

Polimerik nanopartiküller üretilirken, önceden oluşturulmuş polimer dispersiyonu ile nanopartiküllerin hazırlanması, monomerlerin polimerizasyonundan nanopartiküllerin

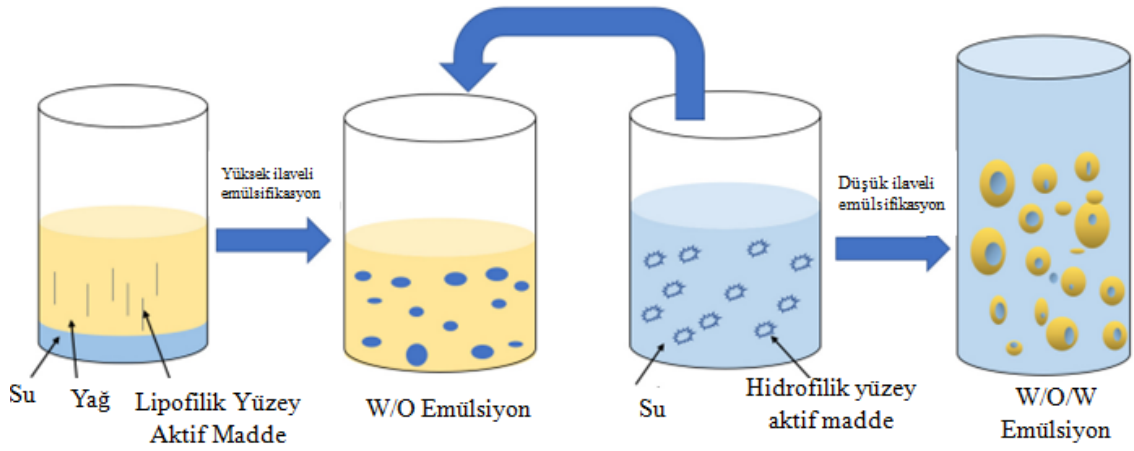
hazırlanması ve hidrofilik polimerlerin iyonik jelleşmesi ile nanopartiküllerin hazırlanması olarak 3 farklı yöntem kullanılmaktadır. Önceden oluşturulmuş polimer dispersiyonu ile nanopartiküllerin hazırlanması yöntemi ise kendi arasında çözücü buharlaştırma, nano-çökeltme, emülsifikasyon/ çözücü difüzyonu, diyalizin tuzlanması, süper kritik akışkan teknolojisi (SCF) olarak farklı metotlara ayrılmaktadır. Polilaktik asit, PGA ve PLGA polimerlerinden biyobozunabilir nanopartiküller hazırlamak için önceden hazırlanmış polimerlerin dispersiyonu tekniği yaygın olarak kullanılmaktadır [67]. Bu polimerler ayrıca toksikolojik olarak güvenli olup enzimatik ya da enzimatik olmayan bozunmadan sonra kolayca elimine edilebilme özelliğindedir. Biyobozunur polimerler arasında PLGA, ABD-FDA (Food and Drug Administration) ve Avrupa İlaç Ajansı tarafından ilaç salımı için onaylanan [68] ve nanopartiküllerin geliştirilmesi için başarılı şekilde uygulanan bir kopolimerdir. PLGA, nano boyuttaki salım sistemlerinin birçok ideal özelliğini göstererek kapsüllenmiş maddenin uzun süreli salımını sağlamaktadır. Poli(laktik-ko-glikolik asit) içerisinde kapsüllenen küçük moleküller, proteinler ve nükleik asitler, çeşitli klinik uygulamalarda gelişmiş aktivite göstermektedir. Poli(laktik-ko-glikolik asit) kopolimeri, partikülleri belirli dokulara hedefleyebilmekte ya da görüntüleme amacıyla ligandların boyutunu, yükünü ve yüzey özelliklerini kolay bir şekilde özelleştirebilmektedir [69]. Poli(laktik-ko-glikolik asit) kopolimeri, biyolojik olarak parçalanabilen metabolit monomerleri laktik asit ve glikolik asidi üretebilmek için vücutta hidrolize uğramaktadır. Bu özelliği sayesinde biyomedikal ve ilaç salım sistemlerinde sıklıkla tercih edilmektedir [70]. Poli(laktik-ko-glikolik asit) nanopartiküllerin üretim yönteminde hidrofobik ve hidrofilik ilaçları mikro ya da nano boyutta kapsüllemek amacıyla tekli ya da ikili emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemde PLGA, bir yüzey aktif madde veya stabilizatör ile emülsiyon haline getirilen organik faz içerisinde çözülmemektedir. Hidrofobik ilaçlar doğrudan yağ fazına eklenirken hidrofilik ilaçlar partikül oluşmadan önce polimer çözeltisi ile emülsiyon haline getirilmektedir [69].

İkili Emülsiyon Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

Geleneksel olarak ikili emülsiyon yöntemi, tek aşamalı emülsiyonlaştırma ya da iki aşamalı emülsiyonlaştırma olmak üzere iki şekilde uygulanmaktadır.

Tek aşamalı yöntem, iyonik olmayan bir emülgatörden veya farklı emülgatörlerin karışımından oluşan emülsiyonun ısıtılması ile gerçekleştirilmektedir. Bu durum faz inversiyonuna ve çoklu emülsiyon oluşumuna neden olmaktadır. Genellikle ikili

emülsiyonlar, iki aşamalı emülsiyonlaştırma işlemi ile formüle edilebilmektedir. İkili emülsiyon çözücü buharlaştırma yönteminin ilk aşaması, yoğun homojenizasyon altında lipofilik bir emülgatör kullanılarak iç emülsiyonu adı verilen emülsiyonun hazırlanmasıdır. Sonraki adımı ise, hidrofilik bir emülgatör kullanılarak birincil su/yağ (w/o) emülsiyonunun sulu (dış) bir fazda dağıtılmasıdır. Yüksek basınçlı homojenleştiriciler, ultrason emülsifikasyonu, mikroakışkan emülsifikasyonu ve membran emülsifikasyonu gibi çeşitli yöntemlerinin kullanılması ile ikili emülsiyonlar hazırlanabilmektedir. Şekil 2.12.'de ikili emülsiyon yöntemi ayrıntılı olarak gösterilmektedir.



Şekil 2.12. İkili emülsiyon hazırlama yöntemi [71].

İkili emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi homojenizasyon ve ultrasonikasyon kullanılarak hazırlanan bir yöntemdir. Homojenizasyon ve ultrasonikasyon işlemlerinin süresi ve hızına bağlı olarak partikül boyutu değişmektedir. Ayrıca partikül boyutu polimerin türüne, konsantrasyonuna ve kullanılan emülsiyon ajanının çeşidine (PVA, DMAB) ve konsantrasyonuna bağlı olarak da değişmektedir [67]. Yöntemin kolay olması ve partikül boyutunun ayarlanabilirliği, bu yöntemin ilaç salım sistemlerinde sıklıkla tercih edilmesini sağlamıştır [72].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

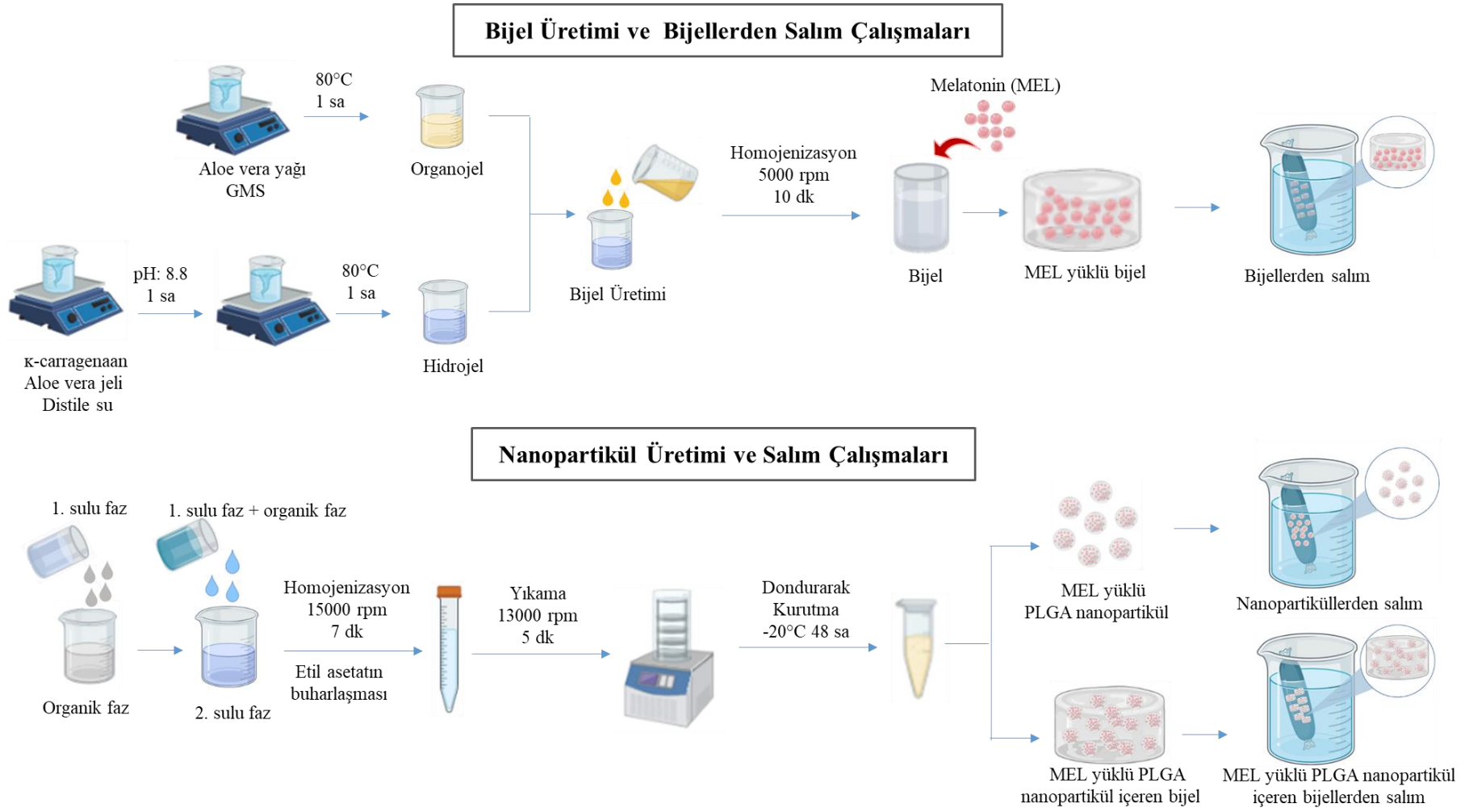
Bu bölümde, tez kapsamında yapılan deneysel çalışmalara yer verilmiş ve çalışmalar maddeler halinde aşağıda özetlenmiştir.

- İlk olarak, kullanılan cihazlar, kimyasal ve biyolojik malzemeler ile bu malzemelerin temin edildikleri firmalar belirtilmiştir.
- Ardından, jel üretim aşamalarından (hidrojel, organojel ve bijel üretimi) söz edilmiş ve jellere ait karakterizasyon çalışmaları detaylı bir şekilde anlatılmıştır.
- Sonrasında bijellerin L929 fare fibroblast hücreleri üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla yapılan hücre kültürü çalışmalarından bahsedilmiştir.
- Bir sonraki bölümde boş ve melatonin yüklü poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) nanaopartikül üretimi ve partiküllere ait karakterizasyon çalışmaları ayrıntılı bir şekilde anlatılmıştır.
- Son olarak, bijellere melatonin yüklenmesi, salım sistemlerinin hazırlanması ve salım kinetiklerinin belirlenmesi çalışmalarından söz edilmiştir.

3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal ve Biyolojik Malzemeler

Tez çalışması kapsamında organojel fazını oluşturmak için kullanılan Aloe vera yağı ve gliserol monostearat (GMS) sırasıyla Balen (Türkiye) ve Çağdaş Kimya (Türkiye) firmalarından temin edilmiştir. Hidrojel fazını oluşturmak için kullanılan κ-carrageenan ve Aloe vera jeli sırasıyla Brenntag (Almanya) ve Sigma-Aldrich (ABD) firmalarından satın alınmıştır. Bijelerde morfolojik görüntülerin belirlenebilmesi için kullanılan Sudan I boyası Sigma-Aldrich (ABD) firmasından temin edilmiştir. *In-vitro* hücre kültür çalışmaları için kullanılan L929 hücre hattı Hücre Kültürü Koleksiyonundan (HÜKÜK, Türkiye) tedarik edilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan Dulbecco's Modified Eagle Medium-High glikoz (DMEM-High glucose) Biowest (Fransa) firmasından temin edilirken, penisilin-streptomisin, fosfat tampon çözeltisi (PBS) ve fetal sığır serumu (FBS) Capricorn Scientific (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Tripsin/EDTA (%0.01 Tripsin/10 mM EDTA) çözeltisi ve DMSO (dimetilsulfoksit) Sigma-Aldrich (ABD) firmasından satın alınmıştır. Hücre canlılığının belirlenmesi için kullanılan 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyumbromür (MTT) çözeltisi Sigma-Aldrich (ABD) firmasından temin edilmiştir.

İlaç salım çalışmaları için kullanılan melatonin, poli (laktik-ko glikolik asit) (PLGA, PLA/ PGA:50/50; molekül ağırlığı: 40,000-75,000 g/gmol), didodesil dimetil amonyum bromür (DMAB), etil asetat, asetonitril ve diklorometan (DCM) Sigma-Aldrich (ABD) firmasından tedarik edilmiştir. *In-vitro* ilaç salım çalışmaları için kullanılan diyaliz membran (Moleküler ağırlık: 14 kDa) Sigma-Aldrich (ABD) firmasından satın alınmıştır. Salım çalışmaları için kullanılan NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄ sodyum azit Merck (ABD) firmasından temin edilmiştir.



Şekil 3.1. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmaların şematik gösterimi.

3.2. κ-carrageenan/ Aloe vera Tabanlı Hidrojel ve Aloe vera Yağı Tabanlı Organojel Üretimi

3.2.1. Hidrojel Üretimi

Hidrojel üretimi için Aloe vera jeli, hidrojelatör olarak ise κ-carrageenan (Sigma Aldrich, ABD) kullanılmıştır. Yirmi mL'lik distile su içerisine % 1.5 (w/v) derişimde κ-carrageenan ve 900 µL Aloe vera jeli eklenmiştir. Ardından, bu karışım 500 rpm hızda 1 saat süresince karıştırılmıştır. Bu sürenin sonunda oluşan çözeltinin pH'ı 8.8'e ayarlanmıştır. Sonrasında çözelti yeniden manyetik karıştırıcıya (Heidolph MR-Hei-Tec, Almanya) alınmış, 80°C'de ve 500 rpm'de 1 saat karıştırılarak akışkan yapıda hidrojel oluşumu gerçekleştirilmiştir [73]. Hazırlanan çözelti 24 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmiş ve hidrojel haline getirilmiştir. Üretilen hidrojel +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Organojel Üretimi

Organojel üretimi için yağ fazı olarak Aloe vera yağı, organojelatör olarak ise gliserol monostearat (GMS) kullanılmıştır. Yüzde 20 (w/v) derişimde olacak şekilde GMS Aloe vera içerisine eklenmiştir. Ardından oluşan çözelti manyetik karıştırıcıya alınmış (Heidolph MR-Hei-Tec, Almanya) 80°C sıcaklıkta ve 500 rpm karıştırma hızında karıştırılarak akışkan yapıda organojel üretimi gerçekleştirilmiştir [30, 73, 74]. Hazırlanan çözelti 24 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmiş ve organojel haline getirilmiştir. Üretilen organojel +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3. Hidrojel ve Organojellerin Birleştirilmesi ile Oluşturulan Bijellerin Üretimi

İlk olarak, manyetik karıştırıcıda 80°C'de hidrojel ve organojel üretimi gerçekleştirilmiştir. Ardından, manyetik karıştırıcının üzerinde 80°C sıcaklıkta akışkan halde bulunan hidrojel ve organojel, hidrojel ve organojel oranı sırasıyla, 90:10, 70:30, 50:50, 30:70, 10:90 (v/v) olacak şekilde birleştirilmiştir. Bu amaçla hidrojel içerisine organojel belirtilen oranlarda damla damla eklenmiştir. Homojen bir yapı elde etmek için karışım organojel ve hidrojel üretiminde belirlenen optimum sıcaklık ve optimum pH değerlerinde oluşturulmuştur.

Yukarıda belirlenen oranlarda, hidrojel içerisine organojel eklenmiş, oluşan çözelti yüksek karıştırma hızında homojenizatör (Heidolph Silent Crusher, Almanya)

kullanılarak 5000 rpm hızda 10 dk karıştırılmış ve bijel örnekleri hazırlanmıştır. Ardından farklı oranlardaki bijellerin oda sıcaklığında soğumaları beklenmiştir.

Yirmi dört saat sonra bijel oluşumu tüpü ters çevirme testi ile belirlenmiştir. Üretilen bijel örnekleri +4°C’de muhafaza edilmiştir.

3.3. Karakterizasyon Çalışmaları

3.3.1. Yağ Bağlama Kapasitesi (OBC) Analizi

Yağ bağlama kapasitesi, kararlılık ve yağ tutma derecesini belirlemek amacıyla yapılan bir test olduğu için organojel ve bijellerde ayrı ayrı uygulanmıştır.

3.3.1.1. Organojeller için OBC Analizi

Yüzde 5, 10, 15 ve 20 (w/v) oranlarında GMS kullanılarak cam şişelerde hazırlanan organojellerde yağı en çok tutan oranı belirlemek için santrifüj kuvvetleri ile yağ bağlama kapasitesi testi gerçekleştirilmiştir. Bu deney gerçekleştirilirken; öncelikle 15 mL’lik boş santrifüj tüpleri (w_1) tartılmıştır. Ardından, 5 g organojel santrifüj tüpüne aktarılmış ve örnek oda sıcaklığında donmaya bırakılmıştır. Sonrasında örnek içeren santrifüj tüpü (w_2) tekrar tartılmıştır. Son olarak, örnek içeren tüp 25°C’de 6000 rpm’de, 20 dk (3 kez) santrifüj edilmiş ve üzerindeki yağ alındıktan sonra tekrar tartılmıştır (w_3).

Yağ bağlama kapasitesi (OBC, %) ve salınan yağ yüzdesi sırasıyla Eşitlik 3.1 ve 3.2 yardımıyla hesaplanmıştır [75]:

$$\text{OBC (\%)} = 100 - \text{Salınan Yağ Yüzdesi (\%)} \quad (3.1)$$

$$\text{Salınan Yağ Yüzdesi (\%)} = \frac{(w_2 - w_1) - (w_3 - w_1)}{(w_2 - w_1)} \times 100 \quad (3.2)$$

3.3.1.2. Bijeller için OBC Analizi

Bijel örneklerine ait süre optimizasyonunun ve örneklerin yağı tutma derecesinin belirlenmesi için santrifüj kuvvetleri ile yağ bağlama kapasitesi testi gerçekleştirilmiştir. Süre optimizasyonu için 1, 4, 7 ve 10 dk süreyle 3 paralel olacak şekilde 50:50 (H:O) oranı hazırlanmıştır. Kararlılık için ise ayrı ayrı 10:90, 30:70, 50:50, 70:30, 90:10 (v/v) oranlarından 3 paralel olacak şekilde bijel örnekleri üretilmiştir. Şırıngalarda üretilen bijeller enjektör yardımıyla santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Ardından, tüplerin santrifüjlenmeden önce ilk ağırlığı tartılmıştır (w_i). Son olarak, örnek içeren tüp 25°C’de 6000 rpm’de, 20 dk santrifüj edilmiş (3 kez) ve üzerindeki yağ alındıktan sonra tekrar tartılmıştır (w_s).

Yağ bağlama kapasitesi Eşitlik 3.3 takip edilerek hesaplanmıştır [76]:

$$\text{OBC}(\%) = \left[1 - \left(w_i - \frac{w_s}{w_i} \right) \right] \times 100 \quad (3.3)$$

3.3.2. Morfolojik İncelemeler

Üretilen organojel, hidrojel ve bijellerin mikroyapısı, optik mikroskop kullanılarak gözlenmiştir. Bu amaçla, yağ fazı Sudan I ile boyanarak farklı oranlarda bijeller oluşturulmuştur. Oluşturulan sıcak bijel karışımından bir damla (20 µL) lam üzerine damlatılmış ve bijelin lam üzerine yayılması sağlanmıştır. Ardından bijel ile kaplanan lam +4°C'de 24 saat bekletilmiştir. Sonrasında numunelerin farklı büyütmelemlerde görüntüleri alınmıştır [73].

3.3.3. Kimyasal Yapı ve Faz Analizleri

Üretilen organojel, hidrojel ve bijellerdeki kristalin yapıların ve trigliserid varlığının belirlenebilmesi için X-ışını difraktometresi (XRD) analizi (Rigaku MiniFlex Masaüstü Işını Difraktometrisi, Japonya) yapılmıştır. Kimyasal yapı ve fonksiyonel gruplar ise Fourier dönüşümlü kızılötesi ışını (FTIR) analizi (Thermo Scientific Nicolet 6700, ABD) ile belirlenmiştir [30, 73, 74].

3.3.4. Termal Analizler

Organojel, hidrojel ve bijellerin ısıl kararlılıkları 25°C-600°C sıcaklık aralığında, 10°C/dk ısıtma hızıyla, azot ortamında yürütülen termogravimetrik analiz ile (SII EXTAR6000, Japonya) belirlenmiştir. Bijellerin erime, buharlaşma ve kristalizasyon sıcaklıklarının belirlenebilmesi için diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC, Perkin Elmer Diamond, ABD) ile analiz yapılmıştır. Analiz, -10°C'den 200°C'ye ısıtma döngüsü ve 200°C'den -10°C'ye soğutma döngüsü olmak üzere iki farklı sıcaklık döngüsü kullanılarak gerçekleştirilmiştir [30].

3.3.5. Mekanik Analizler

Organojel, hidrojel ve bijellerin mekanik özellikleri örneklere sıkıştırma testi (Stable Micro Systems TA XTPLUS, İngiltere) uygulanarak belirlenmiş ve sertlik değerleri (N) ölçülmüştür. Analizde 10 mm çapında silindirik bir prob ve 90 mm/dk hızda, 50 N yük hücresi kullanılmıştır [76].

3.3.6. Reolojik Analizler

Belirlenen tüm deney gruplarının viskoelastik özellikleri reolojik analizler (Anton Paar MCR102 Reometre, Avustralya) yapılarak incelenmiştir.

Bu amaçla üretilen bijellere 25°C ve 37°C olmak üzere iki farklı sıcaklıkta gerinim, frekans ve viskozite testleri uygulanmıştır. Reolojik analizde 0.001-1000 s⁻¹ aralığında iki farklı sıcaklıkta genlik taraması ve 0.1-100 rad/s aralığında frekans taraması yapılmıştır. Viskozite taraması ise 0.001-100 s⁻¹ aralığında gerçekleştirilmiştir. Ek olarak sıcaklık taraması yapılırken örnekler +4°C'den 80°C'ye ısıtılmış, ardından 80°C'den +4°C'ye soğutulmuştur [73, 77, 78].

3.4. *In-Vitro* Sitotoksosite Çalışmaları

'ISO 10993-5 Biological evaluation of Medical Devices-Part 5: Test for *In-vitro* Cytotoxicity' Uluslararası Standardına göre *in-vitro* sitotoksosite testi gerçekleştirilmiştir. *In-vitro* sitotoksosite deneylerinde bijellere ait ekstraktların hücre canlılığı üzerindeki etkisi gözlenmiştir. Bu amaçla, ilk olarak üretilen bijeller PBS içerisinde 37°C'de bekletilmiştir. Ardından, bijellere ait ekstraksiyon ortamları toplanmış ve 0.22 µm'lik filtrelerden geçirilerek sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. *In-vitro* sitotoksosite çalışması gerçekleştirilirken pasaj 28'deki L929 hücre hattı kullanılmıştır. Hücrelerin DMEM-High glucose içerisinde hacimce %10 FBS, %2 L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin içeren besi ortamında (büyüme ortamı) kültüre edilmesi sağlanmıştır. Sonrasında hücreler, Tripsin/EDTA ile yüzeyden kaldırılmış ve 1x10⁵ hücre/mL konsantrasyonda olacak şekilde 96 gözlü kültür kaplarına ekilmiştir. Ardından, %5 CO₂ ve %95 nem içeren 37°C'deki etüvde (Heraeus, Almanya) 24 saat süresince kültürasyon gerçekleştirilmiştir. Kültürasyon sonrası malzemelerin bekletildiği ekstraksiyon ortamlarının besi ortamıyla hacimce %100, %50 ve %25 seri dilüsyonları hazırlanıp, 96 gözlü kaplara konulmuştur. Ekstraksiyon ortamlarının normal büyüme ortamına eklenmesi ile hücreler 3 gün kültüre edilmiş, sonrasında hücrelerin canlılıkları ve mitokondriyal aktiviteleri MTT analizi ile belirlenmiştir. Bu testte negatif kontrol için 96 gözlerde çoğaltılmış hücreler üzerine taze normal kültür ortamı kullanılırken pozitif kontrol için hacimce % 10'luk DMSO kullanılmıştır [79].

Bu kapsamda bijeller üzerindeki besi ortamı kültürün 1., 2. ve 3. günlerinde uzaklaştırılmış ve her bir göze 200 µL serumsuz besi ortamı ve 20 µL MTT çözeltisi (2.5 mg/mL PBS) eklenmiştir. Sonrasında 3 saat boyunca 37°C'deki CO₂ etüvünde

inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrasında bijeller üzerindeki ortam uzaklaştırılmıştır. Ardından her bir göze 200 µL HCl içeren izopropanol çözeltisi eklenmiş ve formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen çözeltilerin 690 nm referans olmak üzere 570 nm’de spektrofotometrik (Asys UVM 340, Avusturya) olarak ölçümleri yapılmış ve optik yoğunlukları belirlenmiştir.

3.5. In-Vitro Biyoaktif Ajan Salım Çalışmaları

Bu çalışmada; amfifilik özelliğe sahip melatonin biyoaktif ajan olarak kullanılmıştır. İlaçların bijellere yüklenmesi ve enkapsülasyon verimi ile salım kinetiğinin belirlenmesi için spektrofotometrik (Thermo Scientific Nanodrop 2000c, ABD) yöntem uygulanmıştır [80, 81].

3.5.1. Boş ve Melatonin Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Üretimi

3.5.1.1.Boş PLGA Nanopartiküllerin Sentezi

Boş PLGA nanopartiküllerin sentezlenmesinde tekli emülsiyon hazırlama çözücü buharlaştırma metodu kullanılmıştır. PLGA kopolimeri (PLA/PGA: 50/50; molekül ağırlığı: 40,000-75,000 g/gmol) ilk olarak etil asetat içerisinde çözdürülmüş ve %2 (w/v)’lik organik faz hazırlanmıştır. Sonrasında stabilizatör olarak DMAB, %1 (w/v) oranında 2 mL saf suya eklenerek sulu faz oluşturulmuştur. Elde edilen organik ve sulu fazlar ayrı ayrı 3 saat süresince 450 rpm’de karıştırılmıştır. Karıştırma işlemi sonucunda sulu faz damla damla organik faza eklenmiş ve oluşan karışım yüksek hızlı homojenizatör kullanılarak 7 dk boyunca 15000 rpm’de homojenize edilmiştir. Homojenizasyon sonrasında karışım manyetik karıştırıcıya alınmış ve karışıma 40°C’de 2.5 mL saf su ilave edilmiştir. Karışımda süspanse halde bulunan PLGA nanopartiküllerin bir araya gelmemesi ve organik fazın buharlaşarak karışımdan uzaklaşması için çözeltinin 12 saat boyunca karıştırılması sağlanmıştır. On iki saat sonunda karışım, 3 kere saf su ile 13000 rpm’de, 5 dk santrifüj edilerek yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra oluşan nanopartiküller liyofilizatörde -80°C’de (Christ Alpha, 1-2LD Plus, USA) 2 gün boyunca kurutulmuştur [80, 81].

3.5.1.2. PLGA Nanopartiküllere Melatonin Yüklenmesi

PLGA nanopartiküllere melatonin yüklenmesi için ikili emülsiyon hazırlama ve çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır. İlk olarak, PLGA kopolimerinin (PLA/PGA:50/50) 5 mL etil asetat ya da DCM içerisinde çözdürülmesi ile %2’lik

organik faz hazırlanmıştır. Organik faz içerisinde melatoninin PLGA'ya oranı %6 (w/w), %10 (w/w) ve %20 (w/w) olacak şekilde melatonin eklenmiştir. Melatoninin sulu faza difüzyonunu engellemek amacıyla, stabilizör kullanılmadan sulu faza %0.1 (w/v) oranında melatonin eklenmiş ve birinci sulu faz (w1) hazırlanmıştır.

Buna ek olarak, DMAB ya da PVA stabilizörleri kullanılarak %1'lik (w/v) ikinci sulu faz (w2) hazırlanmıştır. Hazırlanan birinci sulu faz, ikinci sulu faz ve organik faz 3 saat boyunca karıştırılmıştır. Ancak w2 fazının hazırlanması için stabilizör olarak kullanılan PVA, DMAB'dan farklı olarak önce 2 saat boyunca 80°C'de, ardından 1 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Hazırlanan w1 fazı organik faza damla damla ilave edilmiş ve 15000 rpm'de 7 dk homojenize edilerek o/w1 karışımı elde edilmiştir. o/w1 karışımı ve w2 fazı, 1 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Ardından o/w1 karışımı w2 fazına damla damla ilave edilerek 15000 rpm'de 7 dk boyunca homojenize edilmiştir. Elde edilen w1/o/w2 karışımı manyetik karıştırıcıya alınmış ve karışıma 40°C'de 2.5 mL saf su ilave edilmiştir. Ardından PLGA nanopartikül oluşturulmasında kullanılan yıkama ve kurutma işlemleri uygulanarak melatonin yüklü PLGA nanopartiküller hazırlanmıştır [80, 81].

Çizelge 3.1'de polimerik taşıyıcı içerisinde amfifilik ilacın enkapsülasyon verimini artırmak için kullanılan deneysel parametreler özetlenmiştir.

Çizelge 3.1. İkili emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi (w1/o/w2 karışımı) ile hazırlanan melatonin yüklü nanopartiküllerin formülasyonları.

Parametreler	Formülasyonlar							
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
İlk sulu faz hacmi (w1) (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2
Melatonin miktarı (mg)	4	4	4	4	4	4	4	4
Organik çözücü	DCM	DCM	DCM	DCM	Etil asetat	Etil asetat	Etil asetat	Etil asetat
Organik çözücü hacmi (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5
PLGA miktarı (mg)	100	100	100	100	100	100	100	100
Melatonin miktarı (org.faz) (mg)	6	10	20	6	6	10	20	6
İkinci sulu faz (w2) (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2
Stabilizör (w2)	PVA	PVA	PVA	PVA	DMAB	DMAB	DMAB	DMAB
Stabilizör (w2) (%)	1	1	1	1	1	1	1	1
Melatonin miktarı (w2) (mg)	4	4	4	20	4	4	4	20
1.homojenizasyon hızı (rpm)	15000	15000	15000	15000	15000	15000	15000	15000
Süre (dk)	7	7	7	7	7	7	7	7
2.Homojenizasyon hızı (rpm)	15000	15000	15000	15000	15000	15000	15000	15000
Süre (dk)	7	7	7	7	7	7	7	7

Bu formülasyonlar arasında en yüksek enkapsülasyon verimine sahip formülasyon seçilip, bu formülasyona ait reçete kullanılarak melatonin yüklü PLGA nanopartiküller hazırlanmıştır.

3.5.2. PLGA Nanopartiküllerin Karakterizasyon Çalışması

3.5.2.1. Melatonin Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Veriminin Belirlenmesi

Üretilen PLGA nanopartiküllerin enkapsülasyon veriminin belirlenmesi için 6 mg melatonin yüklü PLGA nanopartikül, 1 mL DCM ile muamele edilerek 1 gece bekletilmiştir. Ardından 1 mL asetonitril ile çözdürülmüştür. Karışım, homojen bir çözelti elde edilene kadar vortekslenmiştir (FINE PCR). Ardından 279 nm’de absorbens değeri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Absorbans değerlerinden derişime geçiş yapabilmek için kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Kalibrasyon grafiği için melatonin asetonitril içerisinde çözdürülerek stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözelti asetonitril ile seyreltilerek farklı melatonin konsantrasyonlarına sahip standart çözeltiler hazırlanmıştır. Elde edilen standart çözeltilerin 279 nm’de absorbens değerleri belirlenmiştir. Absorbans-derişim parametrelerinden oluşan kalibrasyon grafiği elde edilerek kalibrasyon denklemi bulunmuştur. Önceden not edilen absorbens değeri bu denklemde yerine yazılarak derişime geçilmiştir. Ardından, enkapsülasyon verimi ve yüklenen ilaç yüzdesi Eşitlik 3.4 ve 3.5 kullanılarak hesaplanmıştır [80, 81].

% EE (Enkapsülasyon Verimi)

$$\% EE = \frac{\text{Yüklenen ilaç miktarı}}{\text{Toplam ilaç miktarı}} \times 100 \quad (3.4)$$

% DL (Yüklenen İlaç Yüzdesi)

$$\% DL = \frac{\text{Nanopartikül içinde enkapsüle edilen ilaç miktarı}}{\text{Naopartiküllerin toplam ağırlığı}} \times 100 \quad (3.5)$$

3.5.2.2. Partikül Boyutunun Belirlenmesi

İlk olarak 1:100 (w/v) oranında seyreltilen sulu çözelti içerisinde bulunan nanopartiküller homojenize edilmiştir. Ardından Zetasizer (Nano series, İngiltere) cihazı ile nanopartiküllerin boyut ve boyut dağılımları belirlenmiştir [80, 81].

3.5.2.3. FTIR Analizi

PLGA polimerinin, melatoninin, stabilizörlerin, melatonin içeren ve içermeyen (boş) PLGA nanopartiküllerin 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında FTIR (Thermo Scientific Nicolet 6700, ABD) spektrofotometresi ile analizi yapılarak kimyasal yapıları ve fonksiyonel grupları belirlenmiştir [32].

3.5.2.4. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi

Sulu ortamda süspanse halde bulunan boş PLGA nanopartiküller ile melatonin yüklü PLGA nanopartiküller 1:100 (w/v) oranında seyreltilmiştir. Karışım seyreltildikten sonra analiz yapılacak yüzeye damlatılıp kurutulmuştur. Sonrasında örnekler altın paladyum ile kaplanarak taramalı elektron mikroskobu (Zeiss Evo-50, Almanya) ile incelenmiştir [80, 81].

3.5.3. Bijellere Melatonin Yüklenmesi

3.5.3.1. Melatonin Yüklü Bijellerin Hazırlanması

İlk olarak, hidrojel ve organojel Bölüm 3.2.1 ve 3.2.2’de ayrıntılı olarak anlatılan deneysel yöntemler kullanılarak üretilmiştir. Ardından 70:30 (v/v) oranında olacak şekilde hidrojel içerisine organojel ve belli miktarda melatonin eklenmiştir. Elde edilen karışım 5000 rpm’de oda sıcaklığında 10 dakika süresince homojenizatör ile karıştırılmış ve melatonin yüklü bijeller üretilmiştir [36, 74].

3.5.3.2. Melatonin Yüklü PLGA Nanopartikül İçeren Bijellerin Hazırlanması

İlk olarak, hidrojel ve organojel bölüm 3.2.1 ve 3.2.2’de anlatılan deneysel yöntemlerin kullanılması ile üretilmiştir. Ardından 70:30 (v/v) oranı kullanılarak hidrojel içerisine organojel ve belli miktarda melatonin yüklü PLGA nanopartikül ilave edilmiştir. Elde edilen karışım homojenizatör ile 5000 rpm’de ve oda sıcaklığında 10 dakika süresince karıştırılarak melatonin yüklü PLGA nanopartikül içeren bijeller üretilmiştir [32, 77].

3.5.4. Salım Sistemlerinin Hazırlanması ve Salım Kinetiklerinin Belirlenmesi

3.5.4.1. PLGA Nanopartiküllerden Melatonin Salımı

PLGA nanopartiküllerden melatonin salımının incelenmesi amacıyla 10 mg PLGA nanopartikül selüloz membrana yerleştirilerek içerisine 1 mL PBS (pH:5.5) eklenmiştir. Ardından selüloz membran %0.1 (w/v) sodyum azit içeren 10 mL PBS çözeltisine konmuştur. Salım çalışmaları, 37°C sıcaklık ve 70 rpm çalkalama hızında etüv

içerisinde üç paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküllerden melatonin salım çalışmasında ilk gün 1., 3., 5., 7. ve 24. saatlerde, 5. güne kadar her gün, diğer günlerde salım süresince birer gün ara ile salım ortamından 900 µL salınarak yerine 900 µL taze ortam konulmuştur. Partiküllerden salınan melatonin miktarı 279 nm'de absorbans değeri ölçülerek spektrofotometrik yöntem ile hesaplanmıştır. Analiz sonucunda partikülden salınan melatoninin kümülatif salım grafiği oluşturulmuş ve grafiğe uygun kinetik model belirlenmiştir [80, 81].

3.5.4.2. Melatonin Yüklü PLGA Nanopartikül İçeren Bijellerden Melatonin Salımı

Melatonin yüklü PLGA nanopartikül içeren bijellerden melatonin salımı için 10 mg PLGA nanopartikül içeren 1 g bijel diyaliz membran içerisine yerleştirilmiştir. Membranlar koyu renkli şişelere konularak üzerine 10 mL PBS (pH:5.5) çözeltisinden oluşan salım ortamı (%0.1 w/v sodyum azit içeren) eklenmiştir. Salım çalışmaları, 37°C sıcaklığındaki ve 70 rpm çalkalama hızındaki etüvde üç paralel olacak şekilde yürütülmüştür. Nanopartikül yüklü bijellerden melatonin salım çalışmasında ilk gün 1., 3., 5., 7. ve 24. saatlerde, 5. güne kadar her gün, diğer günlerde salım süresince birer gün ara ile salım ortamından 900 µL salınarak yerine 900 µL taze ortam konulmuştur. Spektrofotometrik yöntem nanopartikül yüklü bijellerden salınan melatonin miktarının 279 nm'deki absorbans değeri hesaplanmıştır. Analiz sonucunda nanopartikül yüklü bijellerden salınan melatoninin kümülatif salım grafiği çizilmiş ve grafiğe uygun kinetik model seçilmiştir [32, 77].

3.5.4.3. Serbest Melatonin Yüklü Bijellerden Melatonin Salımı

Melatonin yüklü bijellerden melatonin salımını incelemek amacıyla 1 mg melatonin yüklü 1 g bijel diyaliz membran içerisine konulmuştur. Membranlar koyu renkli şişeler içerisine yerleştirilerek üzerine 10 mL PBS (pH:5.5) çözeltisinden oluşan salım ortamı (%0.1 (w/v) sodyum azit içeren) ilave edilmiştir. Salım çalışmaları, 37°C sıcaklığında ve 70 rpm çalkalama hızına ayarlanmış etüvde üç paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Bijellerden melatonin salım çalışmasında ilk gün 1., 3., 5., 7. ve 24. saatlerde, 5. güne kadar her gün, diğer günlerde salım süresince birer gün ara ile salım ortamından 900 µL salınarak yerine 900 µL taze ortam konulmuştur. Bijellerden salınan melatonin miktarının 279 nm'de absorbans değeri spektrofotometrik yöntem kullanılarak ölçülmüştür. Analiz sonucunda bijellerden salınan melatoninin kümülatif salım grafiği oluşturulmuş ve grafiğe uygun kinetik model belirlenmiştir [78, 82].

3.6. İstatistiksel Analiz

Deneysel çalışmalar en az 3 örnek üzerinden ve gerekli kontroller kullanılarak yapıldıktan sonra elde edilen veriler, GraphPad InStat yazılımı kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Farklı deney gruplarında istatistiksel karşılaştırma için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmış ve veriler n=3 için \pm standart sapma değerleri ile gösterilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tez çalışmasının bu bölümünde ilk olarak transdermal sistemlerde ilaç salımı çalışmaları için hidrojel, organojel ve bijel üretimi gerçekleştirilerek karakterizasyon çalışmalarını içeren sonuçlar sunulmuş ve tartışılmıştır. Çalışmanın ikinci kısmında üretilen bijellerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi incelenmiş ve deneysel bulgulara yer verilmiştir. Son kısımda ise bijellere ait ilaç salım çalışmalarının sonuçlarına değinilmiştir. İlaç salımında öncelikle nanopartikül olarak kullanılacak poli(laktik-ko-glolik asit) (PLGA) üretimi ve karakterizasyonu sonuçları değerlendirilmiştir. Sonrasında melatonin yüklü PLGA içeren nanopartikül üretimi ve karakterizasyonu sonuçları anlatılmıştır. Ardından melatonin yüklü PLGA nanopartikül içeren bijeller ile melatonin yüklü bijellerden melatonin salım sonuçları değerlendirilmiştir.

4.1. Bijellerin Üretimi için Optimum Koşulların Belirlenmesi

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen bijeller, hidrojel ve organojelden oluşan iki fazlı jel sistemlerdir. Hidrojel üretimi κ -carragenan, Aloe vera jeli ve distile su kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Organojel üretimi ise Aloe vera yağı ve gliserol monostearat (GMS) kullanılarak elde edilmiştir. Ardından hidrojel içerisine belirli oranlarda organojel eklenerek bijeller üretilmiştir. Deneysel sonuçlar tartışılmış ve ilgili sonuçlara aşağıda yer verilmiştir.

4.1.1. κ -carrageenan/ Aloe vera Tabanlı Hidrojel ve Aloe vera Yağı Tabanlı Organojel İçeren Bijel Üretimi

Sunulan tez çalışmasında Aloe vera yağı organojeli ve κ -carrageenan/ Aloe vera hidrojelini kullanılarak yenilikçi bir bijel sisteminin oluşturulması hedeflenmiştir. Topikal ve transdermal amaçlı kullanılan jeller, hidrojel, organojel ve bijel olarak sınıflandırılmaktadır. Organojeller, jelatörün 3 boyutlu matris içerisinde hapsediği apolar faz içeren yarı katı sistemlerdir [83]. Organojeller, stratum korneum boyunca hidrofobik ilaçların geçirgenliğini artırırken yağlı ve yapışkan kalmaları nedeniyle dezavantaj oluşturmaktadırlar [28]. Transdermal sistem amaçlı kullanılan hidrojel ise suda çözünmeyen ancak suda şişebilen hidrofilik çapraz bağlı polimerlerin oluşturduğu ağ yapılarıdır [84]. Hidrojellerin, kolay hazırlanmaları, yağlı olmayan yapıları, iyi yayılabilirlikleri, stratum korneum hidrasyonunu artırma yetenekleri, serinletici etkisi ve suyla temizlenebilir oluşları, onları topikal farmasötik uygulamalarda avantajlı hale

getirmektedir. Ancak hidrofobik ilaç salımında enkapsülasyon verimlerinin düşük olması ve derinin lipit yapılı stratum korneum tabakasından geçirgenliğinin az olması, hidrojel ve Aloe vera yağ tabanlı organojel içeren bijel üretimi gerçekleştirilmiştir. Bijellerin, transdermal sistemlerde ilaç geçirgenliğini artırma, uygulamalardan sonra su ile yıkanabilme, nemlendirme, serinlik etkisi, stratum korneum tabakasındaki hidrasyonu artırma ve ilaç salım hızını kontrol etme yeteneği gibi birçok önemli özelliği bulunmaktadır [28].

Yapılan tez çalışmasında bijeller hazırlanırken organojel üretiminde literatürden farklı olarak Aloe vera yağı ve GMS kullanılmıştır. Aloe vera yağı, içerisinde bulundurduğu aktif bileşenler sayesinde kollajen birikimini artırarak yara iyileşme sürecini hızlandırdığı için tercih edilmiştir [86]. Organojel oluştururken jelatör olarak seçilen GMS ise amfifilik özelliği sayesinde su ve yağ fazı içeren karışımlarda kendi kendine birleşme özelliği göstermesi nedeniyle tercih edilmiştir. Ayrıca GMS'nin hidratlanmış katmanlı yapısı, stratum korneum'un su içeriğini önemli derecede arttırdığı için ilaç geçirgenliğini de artırma avantajına sahiptir [87].

Bijel üretiminde hidrojel hazırlanırken κ -carrageenan ve Aloe vera jeli kullanılmıştır. κ -carrageenan diğer doğal polimerlere nazaran sağladığı avantajlar nedeniyle seçilmiştir. Bu avantajlar vücut içerisinde bulunan doğal glikozaminoglikanlara benzemesi, mekanik kuvveti ve jelasyon özellikleri olarak sıralanabilir. Aynı zamanda doğal tiksotropik davranışı nedeniyle, κ -carrageenan, minimal invaziv tedaviler için makromoleküller ve hücreler ile enjekte edilebilir bir matris olarak da kullanılabilir [88].

Sunulan tez çalışmasında, öncelikle organojel üretimi gerçekleştirilmiş ve üretilen organojeller yağ bağlama kapasiteleri açısından incelenerek optimum GMS miktarına karar verilmiştir.

Organojel için Optimum GMS Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Organojel üretiminde kullanılacak organojelatör miktarının belirlenmesi için Aloe vera yağına ağırlıkça %5 (w/v), %10 (w/v), %15 (w/v) ve %20 (w/v) oranlarında GMS eklenmiştir. Belirtilen oranlara göre hazırlanan organojellere yağ bağlama kapasitesi testi uygulanmıştır ve sonuçlar sırasıyla 89 ± 2.0 , 98 ± 0.20 , 97 ± 0.76 , 99 ± 0.96 olarak

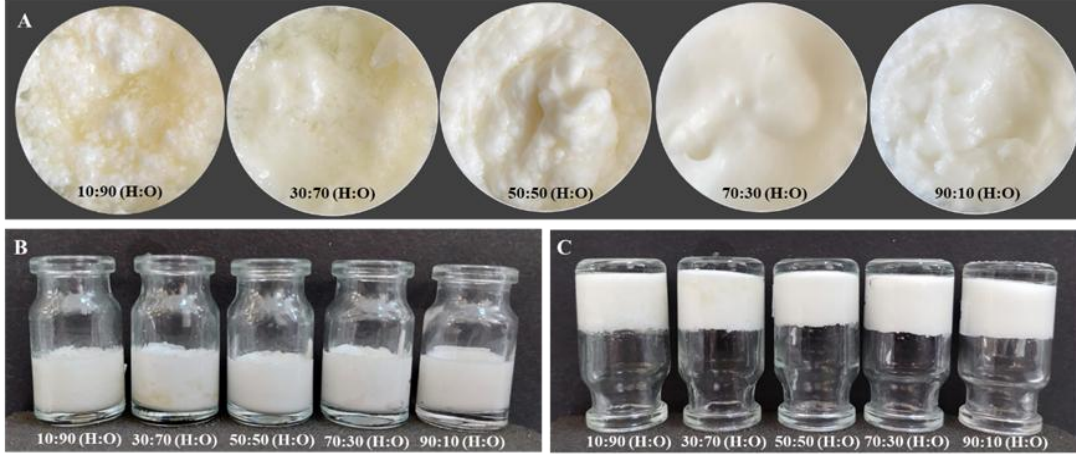
bulunmuştur. En yüksek yağ tutma kapasitesinin ağırlıkça %20 (w/v) oranında GMS içeren organojelde olduğu görülmüştür. Bu nedenle tüm bijel örnekleri %20 (w/v) konsantrasyonda GMS ile hazırlanan organojel kullanılarak oluşturulmuştur. Literatürde Ghan ve ark. (2020), palmiye yağı ve farklı konsantrasyonlarda GMS ile hazırlanan organojellere uyguladıkları bu test sonucunda diğer organojelatörlere göre GMS kullanılarak hazırlanan organojelin yüksek yağ bağlama kapasitesi gösterdiğini belirtmişlerdir. Çalışmalarında kütlece %1-18 aralığında değişen organojelatör (GMS) konsantrasyonunun, palmiye yağı bazlı organojellerin fiziksel ve moleküler yapısı üzerindeki etkisini değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda organojellerin mekanik ve termal özelliklerinin organojelatör konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak iyileştiği gözlenmiştir [75].

Hidrojel için Optimum κ-carrageenan Miktarının Belirlenmesi

Literatürde κ-carrageenan ve distile su ile hazırlanmış hidrojellerde ağırlıkça %1.5 oranında κ-carrageenan kullanılmıştır [73]. İlgili literatür dikkate alınarak sunulan çalışmada κ-carrageenan hidrojeller %1.5 konsantrasyonun alt değerleri olan %0.5 ve %1.0 oranlarında da hazırlanmıştır. Su tutma kapasitesi testinde %0.5 ve %1.0 konsantrasyonda hazırlanan jellerin kararsız yapıda olduğu görülmüştür. Bu nedenle sunulan çalışmada %1.5 oranında κ-carrageenan kullanılarak hidrojellerin hazırlanmasına karar verilmiştir.

4.1.2. Farklı Hidrojel/Organojel Oranlarında Bijellerin Hazırlanması

Sunulan tez çalışmasında κ-carrageenan/ Aloe vera tabanlı hidrojel ve Aloe vera yağı tabanlı organojelin 5 farklı oranında bijel üretimi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen gruplar kıyaslanmış ve literatürden örneklerle sonuçlar desteklenmiştir. Şekil 4.1.'de hazırlanan bijellere ait makroskobik görüntülere yer verilmiştir.



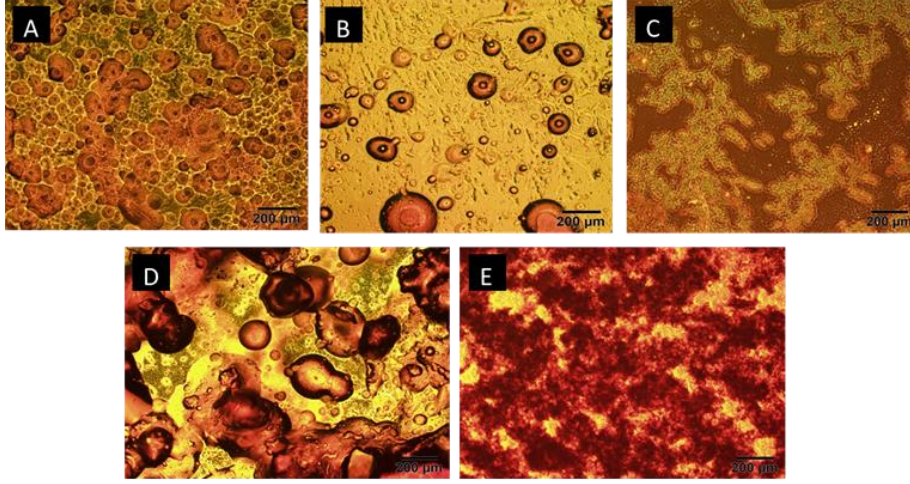
Şekil 4.1. Bijel formülasyonlarının makroskobik görüntüleri. (A): üstten görünüm (B) karıştırıldıktan sonraki görünüm (C): karıştırıldıktan 24 saat sonraki görüntüler (H:Hidrojel, O:Organojel).

Şekil 4.1.(A) incelendiğinde organojel oranının en fazla olduğu bijel örneğinde (10:90) pürüzlü, homojen olmayan yağlı bir yapı gözlenirken hidrojel oranının artmasına bağlı olarak yapının daha pürüzsüz ve beyaz bir görünüm aldığı görülmektedir. Şekil 4.1.(B)'de bijel örneklerinin düz ve karıştırıldıktan hemen sonraki görüntülerine yer verilmiştir. Tüpü ters çevirme yöntemi, jelleşme oluşumunu doğrulamak için bijellerde kullanılan yaygın bir yöntemdir [78]. Şekil 4.1.(C)'de yer alan görüntülerde, oluşturulan bijellerin ters çevrildiğinde herhangi bir akışkanlık durumu gözlenmediği ve jelleşmenin meydana gelerek kararlı yapıda bijellerin oluştuğu görülmektedir [89].

4.2. Bijellerin Karakterizasyonu

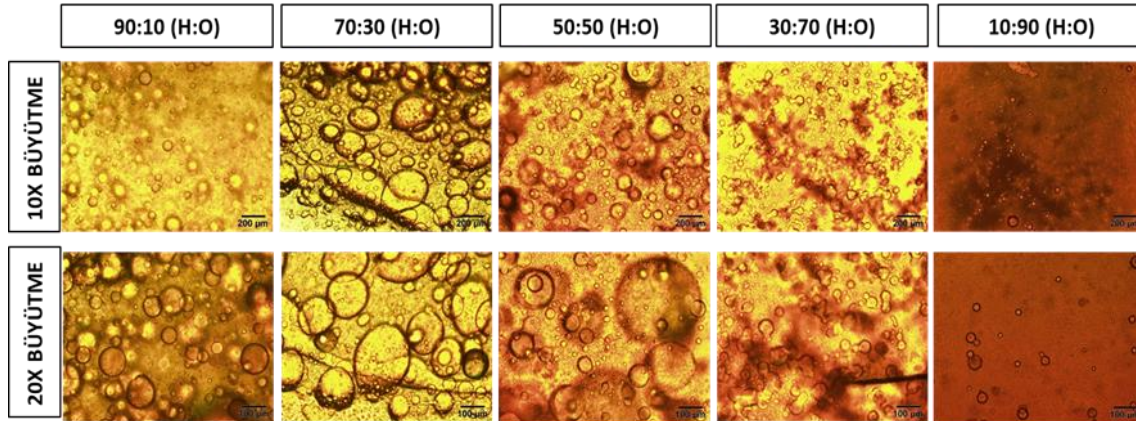
4.2.1. Morfolojik Görüntüleme

Bijellerde hidrojel faz içerisinde organojel fazın küresel damlacıklar halinde dağılımı, organik bir bileşik olan Sudan I boyası kullanılarak incelenmiştir. Sudan I boyası ya da kırmızısı, bijel içerisindeki yağ fazı boyamaktadır. Yöntemde yağ fazın Sudan I boyası ile boyanması kütlece %1, %0.1 ve %0.05 olmak üzere üç farklı derişim kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ilk olarak, ağırlıkça %1 (w/v)'lik Sudan I ile boyanmış organojel kullanılarak tüm oranlarda bijeller üretilmiştir. Üretilen sıcak bijellerden bir damla (20 µL) alınarak lama damlatılmış ve bijellerin 10X büyütmede mikroskobik görüntüleri alınmıştır. Şekil 4.2'de %1 (w/v)'lik Sudan I boyası ile boyanmış organojellerden üretilen bijel örneklerine ait görüntülere yer verilmiştir.



Şekil 4.2. %1 (w/v)'lik Sudan I ile boyanmış organojel kullanılarak oluşturulan bijellerin 10X büyütmedeki mikroskopik görüntüleri. A) 90:10 (H:O), B) 70:30 (H:O), C) 50:50 (H:O), D) 30:70 (H:O), E) 10:90 (H:O).

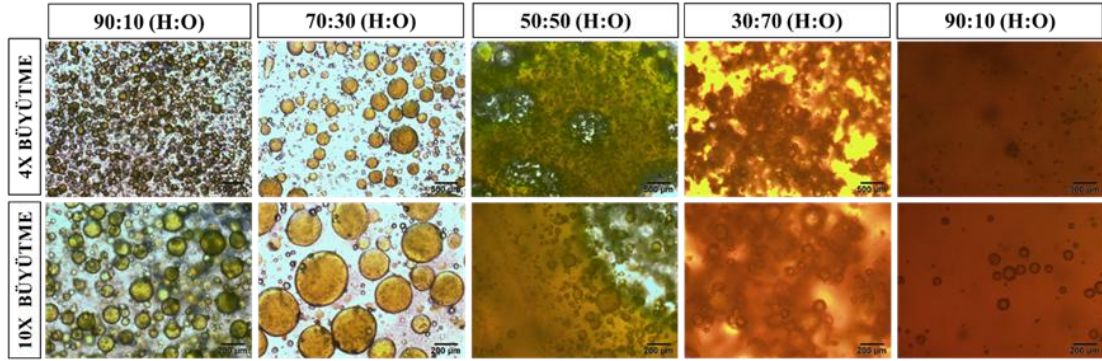
Şekil 4.2'deki boyama sonuçlarına bakıldığında boya derişiminin yüksek olmasından dolayı hem hidrojin hem de yağ fazının boyandığı görülmüş ve organojel fazın hidrojel faz içerisindeki dağılımı gözlenememiştir. Bu nedenle boya derişimi azaltılmış ve ağırlıkça %0.1 (w/v) Sudan I boyası ile boyanmış organojel kullanılarak bijeller tekrar üretilmiştir. Üretilen sıcak bijellerden 50 µL alınmış ve lama damlatılmıştır. Bijellerin 10X ve 20X büyütmelerde alınan mikroskopik görüntüleri Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. % 0.1 (w/v) oranında Sudan I ile boyanmış organojel kullanılarak oluşturulan bijellere ait 10X ve 20X büyütmelerdeki mikroskopik görüntüleri.

Şekil 4.3'teki görüntülerde, boya derişiminin azaltılmasıyla yağ faza ait küresel damlacıkların daha iyi görüntülediği ve hidrojel içerisinde belirginleştiği gözlenmiştir. Ancak bütün oranlarda küresel damlacıkların sıklığı ve boyutu tam olarak

görüntülenemediği için boya oranı daha da azaltılmıştır ve %0.05 (w/v) oranında Sudan I ile boyanmış organojel kullanılarak bijeller üretilmiştir. Üretilen sıcak bijellerden lama 50 µL damlatılmış ve bijellerin 10X ve 20X büyütmede mikroskopik görüntüleri alınmıştır.



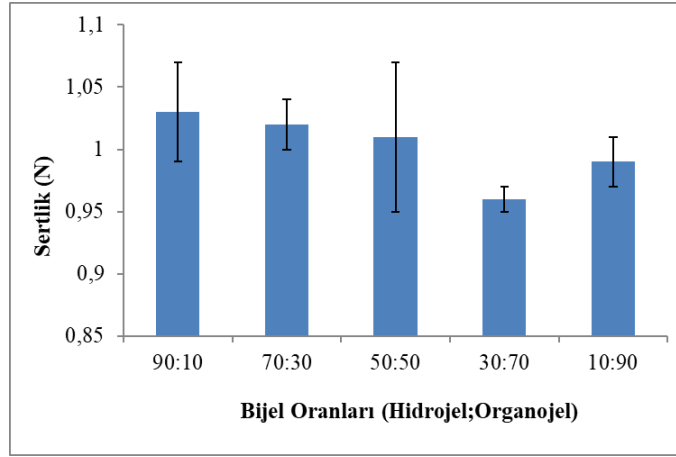
Şekil 4.4. %0.05 (w/v) oranında Sudan I ile boyanmış organojel kullanılarak oluşturulan bijellere ait 4X ve 10X büyütmedeki mikroskopik görüntüleri.

Şekil 4.4'teki bijellere ait mikroskopik görüntüler değerlendirildiğinde, boya oranının azaltılmasına bağlı olarak organojel oranı düşük bijellerde sık ve düzgün küresel damlacıklar elde edilirken, organojel oranı fazla olan bijellerde boya, yağı tamamen boyadığı için seyrek ve daha küçük boyutlarda damlacıklar gözlenmektedir. Bu durumda 90:10 (H:O) bijel numunesi sık ve küçük küresel damlacıklar oluştururken 70:30 (H:O) bijel numunesinde organojel damlacıkları daha büyük boyuttadır. Ayrıca, 50:50 (H:O) bijel numunesinde ise daha büyük yağ damlacıkları gözlenmektedir. Zheng ve ark. (2020) organojel fazda yer alan yağ damlacıklarının, hidrojel oranı yüksek olan bijellerde daha iyi dağılım gösterdiğini belirtmişlerdir [90]. Bu sonuçlara göre, ağırlıkça %0.05 (w/v) oranında Sudan I boyası kullanılarak hazırlanan düşük organojel oranına sahip bijellerde istenilen küresel damlacıkların oluşması ve organojel fraksiyonlarının artması ile organojelin hidrojel fazı içerisindeki dağılımının küçük boyutlarda görülmesi yapılan çalışmanın literatürü desteklediğini göstermektedir.

4.2.2. Mekanik Analiz Sonuçları

Hidrojel:yağ faz oranı bijellerin mekanik özelliklerini etkileyen önemli parametrelerden biridir. Bijellerin kullanım amacı doğrultusunda, sertlik, yapışkanlık ve yayılabilirlik gibi çeşitli mekanik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla mekanik analiz testleri yapılmaktadır. Sunulan tez çalışmasında üretilen farklı organojel ve hidrojel oranlarındaki bijellerin sertlik özelliğinin belirlenmesi amacıyla oda sıcaklığında

mekanik analiz testi gerçekleştirilmiş ve ilgili sonuçlar Şekil 4.5'te verilmiştir. Bu test TA1 texture profile analyzer cihazı ile çift sıkıştırma yöntemi uygulanarak yapılmıştır. Mekanik analiz testi, silindirik bir prob kullanılarak 90 mm/dk hızda 50 N yük hücresi ile gerçekleştirilmiştir.

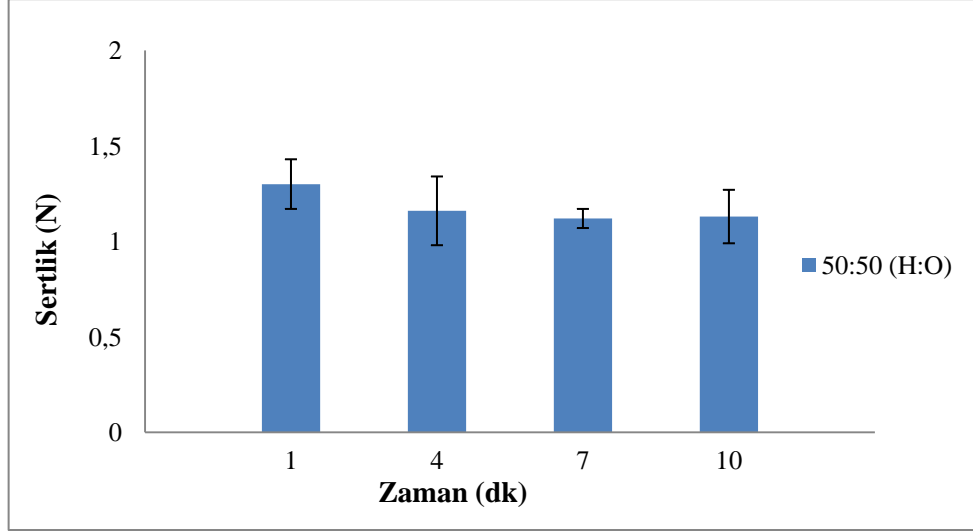


Şekil 4.5. Hidrojel:organojel oranına bağlı olarak bijellerde sertlik değişimi.

Çalışma kapsamında bijel üretiminin oda sıcaklığında gerçekleştirilmesi bijellerdeki mekanik özelliklerin belirlenmesinde önemli bir etkidir. Çünkü seçilen sıcaklık organojel fazın kristalizasyon sürecini etkilemektedir. Düşük sıcaklıklarda yüksek soğutma hızına maruz kalan bijellerin, organojel fazı arttıkça sertliğinin de arttığı görülmüştür. Ancak, oda sıcaklığında üretilen bijellerde oranlar arasında belirgin bir farkın görülmediği belirtilmiştir. Şekil 4.5'te üretilen bijellerin sertlik değerlerinde hidrojel:organojel oranı açısından belirgin bir farklılık görülmediği gözlenmiştir ve sonuçlar literatürle uyumludur.

Bijellerin Optimum Oluşum Süresini Belirlemek İçin Uygulanan Mekanik Analiz Testi

Bijellerin optimum oluşum süresini belirlemek amacıyla eşit oranda yağ ve su fazı içeren 50:50 (H:O) oranındaki bijel numunesi seçilmiştir ve bu oranda 1, 4, 7 ve 10 dk süresince homojenizasyon işlemi uygulanarak oluşturulan bijellerde mekanik analiz testi gerçekleştirilmiştir. Mekanik analiz testi TA1 texture profile analyzer cihazı ile çift sıkıştırma yöntemi uygulanarak yapılmıştır. Bu test, silindirik bir prob kullanılarak 90 mm/dk hızında 50 N yük hücresi ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.6. Bijel üretiminde hidrojel ve organojelin optimum karıştırma süresini belirlemek için yapılan mekanik analiz sonuçları.

Şekil 4.6'daki mekanik analiz sonuçları 2 fazın karıştırma sürelerinin sertlik açısından bir fark yaratmadığını göstermiştir. Samiu ve ark. (2021) tarafından yapılan çalışmada da oda sıcaklığında karıştırma süresindeki değişimin mekanik özellikleri etkilemediği ve bu durumun hazırlama koşullarına bağlı olduğu belirtilmiştir [76].

4.2.3. Bijeller için OBC Analizi

Bijellerin kararlılığını belirlemek amacıyla mekanik analiz testine ek olarak yağ bağlama kapasitesi (OBC) testi gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.1'de bijellere ait OBC sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.1. Bijellere ait OBC sonuçları.

Hidrojel/ Organojel Oranı (H:O)	90:10	70:30	50:50	30:70	10:90
OBC (%)	95.00 ±2.70	95.00±0.90	95.00±1.34	97.00±0.66	99.00±0.06

Çizelge 4.1'de yer alan OBC değerlerinin 25°C'de oluşturulan tüm hidrojel:organojel oranlarındaki bijellerde birbirine yakın olduğu görülmüştür. Samiu ve ark. (2021) tarafından jelatin bazlı hidrojel ve GMS bazlı organojel kullanarak hazırlanan bijellere ait bir çalışmada 25°C'de mekanik özellikler ve yağ tutma kapasitesi açısından bijellerde herhangi bir farklılık gözlenmezken, +4°C'de, sertlik ve OBC değerlerinin

hidrojel ve organojel oranlarına göre değiştiği görülmüştür [69]. Bu durum, düşük sıcaklıklarda daha güçlü GMS kristallerinin oluşmasından dolayı organojel oranı arttıkkça sertliğin belirgin bir biçimde artmasından kaynaklanmaktadır [76].

Bijel retiminde Hidrojel ve Organojelin Optimum Karıştırma Süresini Belirlemek İçin OBC Analizi

Bijel retiminde hidrojel ve organojelin optimum karıştırma süresini belirlemek için oda sıcaklığında (25°C) 1, 4, 7 ve 10 dk süresince homojenizatör ile 50:50 (H:O) oranında hazırlanan bijellere OBC testi uygulanmıştır. Çizelge 4.2’de bijel üretiminde hidrojel ve organojelin optimum karıştırma süresini belirlemek için yapılan OBC analiz sonuçları gösterilmiştir. Analiz sonucunda süre açısından bijellerin yağ tutma derecelerinde önemli bir farklılık görülmemiştir. Bu durum 50:50 (H:O) oranındaki bijellerin hazırlama koşullarının 25°C’de gerçekleşmesine bağlı olarak açıklanabilir. Ancak karıştırma sresinin değişimine bağlı olarak bijellerin görüntülerinde önemli farklılıklar oluşmuştur. Bu durum homojenizasyon süresi ile karıştırma hızı arasındaki ilişkiye bağlı olarak açıklanabilir. Kararlı bijellerin oluşumu iki aşamada gerçekleşir. İlk aşama, hidrojel ve organojel fazın ayrıldığı ve büyük damlacıkların oluştuğu birincil karışma basamağıdır. İkinci aşama ise oluşan bu büyük damlacıkların boyutunun, yüksek homojenizasyon enerjisi ile azalmasıdır. Ek olarak, homojenizasyon sonunda damlacık dağılımını iki karşıt fiziksel süreç arasındaki dengeye göre değişmektedir: i) arayüz kuvvetleri ve homojenizasyon enerjisine bağlı olarak damlacıkların parçalanması ii) emülgatör verimliliğine bağlı olarak damlacıkların birleşmesidir. Bu yüzden homojenizasyon süresi ve hızı, damlacık boyutu ve jel kararlılığı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir [76]. Çizelge 4.2’de bijel üretiminde hidrojel ve organojelin optimum karıştırma süresini belirlemek için yapılan OBC analiz sonuçları gösterilmiştir.

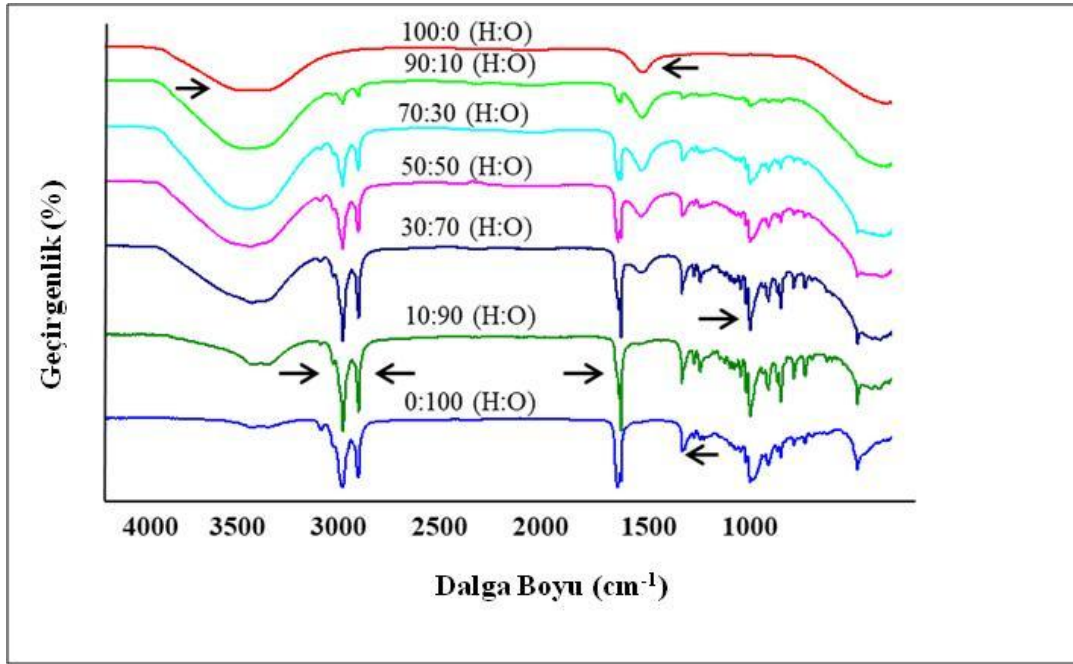
Çizelge 4.2. Bijel retiminde hidrojel ve organojelin optimum karıştırma süresini belirlemek için yapılan OBC analiz sonuçları.

Hidrojel/Organojel Oranı (H:O)	50:50	50:50	50:50	50:50
Süre (dk)	1	4	7	10
OBC (%)	99.00 ± 0.32	99.00 ± 0.12	99.00 ± 0.67	99.00 ± 0.10

4.2.4. Kimyasal Yapı ve Faz Analizleri

4.2.4.1. ATR-FTIR Analizi

Beş farklı oranda hazırlanan bijeller ile hidrojel ve organojelin kimyasal yapı ve fonksiyonel gruplarının belirlenebilmesi için 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında ATR-FTIR analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analizde literatürü destekleyen sonuçlara ulaşılmıştır. Hidrojel, organojel ve bijellere ait FTIR spektrumları Şekil 4.7’de verilmiştir. Spektrumda yer alan karakteristik pikler ise Çizelge 4.3’te gösterilmiştir.



Şekil 4.7. Hidrojel, organojel ve bijellerin ATR-FTIR spektrumları.

Çizelge 4.3. Hidrojel, organojel ve bijellere ait spesifik FTIR spektrum verileri.

Polimer	Fonksiyonel Grup	Dalga Boyu (cm^{-1})	Referans
Aloe vera jeli	O-H gerilimi O-H bükülmesi	3700-3100 1635	[91] [92]
κ -carragenan	O-H gerilimi	3378	[91]
GMS	C-H gerilimi C=O gerilimi	3000-2850 1730	[92]
Aloe vera yağı	CH ₃ aromatik amin C=O gerilimi	1423 1162	[73]

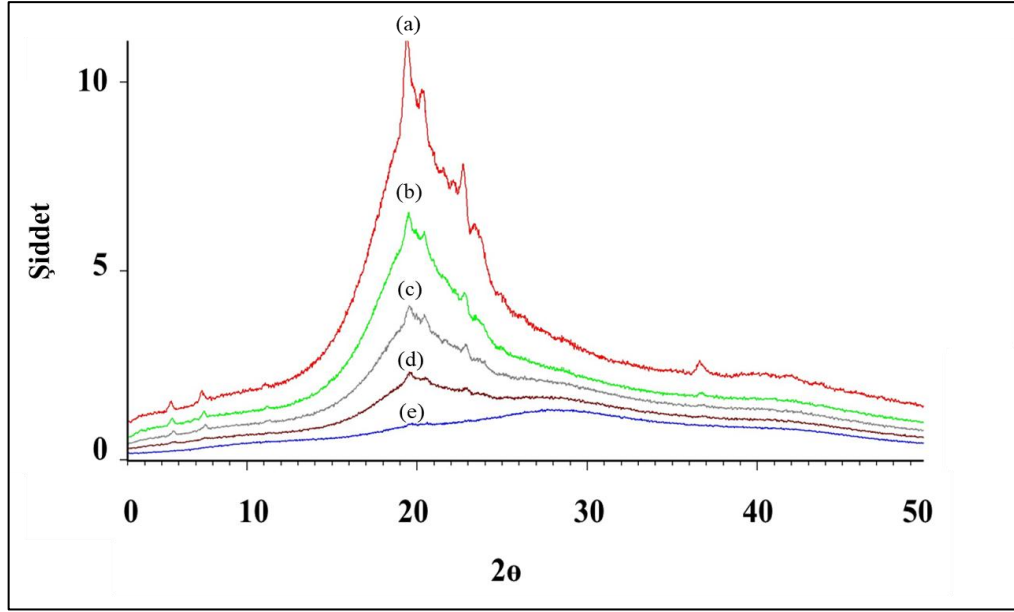
Şekil 4.7 incelendiğinde 3378 cm^{-1} dalga boyunda görülen pik, κ - carrageenan tabanlı hidrojel faza ait O-H absorpsiyonunu göstermektedir. Oldukça hidrofilik bir organik malzeme olan Aloe vera jeli iki hidroksil pikine sahiptir. İlk olarak, $3700\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ de görülen yayvan pik Aloe vera jeline spesifik O-H gerilmesini sergilemektedir ve Aloe vera'yı oluşturan mannoz, üronik asit ve galakturonik asit bileşenlerindeki O-H gruplarından ya da Aloe vera jelinde bulunan aloin ve emodin gibi fenolik gruplardan gelmektedir [91]. İkinci olarak 1635 cm^{-1} deki pik ise Aloe vera jelinin karakteristik O-H bükülme bandını göstermektedir. Şekil 4.7'de, $3000\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ aralığında görülen pik, GMS'ye ait C-H gerilme titreşimini, 1730 cm^{-1} deki pik ise C=O gerilme titreşimini belirtmektedir [92]. Ayrıca, 1423 cm^{-1} deki pik Aloe vera yağından gelen CH_3 birincil aminlerini, 1162 cm^{-1} deki organojel oranının artması ile görülen keskin pik ise Aloe vera yağındaki trigliseridlerin C=O gerilmesini belirtmektedir [73].

4.2.4.2. X-ışını difraktometresi (XRD) Analizi

Bijellerdeki kristalin yapıların varlığı XRD analizi ile karakterize edilmiştir. Çalışma kapsamında beş farklı oranda üretilen bijellerin XRD analizi sonuçları Şekil 4.8'de gösterilmektedir. Çizelge 4.4'te ise bijellere ait XRD spektrumlarından elde edilen % kristalinite değerleri belirtilmiştir.

Çizelge 4.4. Bijellere ait % kristalinite değerleri.

Hidrojel/Organojel Oranı (H:O)	10:90	30:70	50:50	70:30	90:10
Kristalinite (%)	22.26	17.24	13.11	11.25	9.82

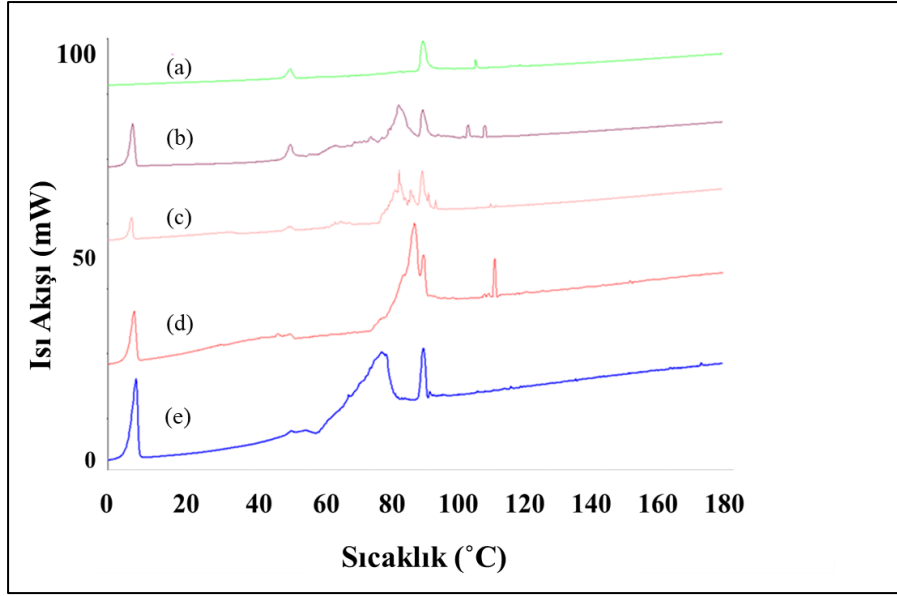


Şekil 4.8. Bijellerin XRD spektrumları; (a) 10:90 (H:O), (b) 30:70 (H:O), (c) 50:50 (H:O), (d) 70:30 (H:O), (e) 90:10 (H:O).

Şekil 4.8'deki XRD spektrumlarında Aloe vera yağından gelen trigliseridlerin varlığı ve kristalin özellikleri incelenmiştir. Tüm difraktogramlarda GMS için ana karakteristik pik 19.50° 2θ değerinde görülmüştür. Bu karakteristik pik, jel sistem içerisinde immobilize olan sıvı yağ içerisindeki trigliseridlerin varlığını göstermektedir. Organojel oranının artmasına bağlı olarak keskinleşen pik, Aloe vera yağının GMS molekülleri sayesinde yapılandırılması sonucunda kristalinite durumunun artmasını ifade etmektedir [37]. Sonuçlar organojel oranı yüksek olan bijellerin kararlı ve daha iyi mekanik özelliklere sahip olduğunu belirtmektedir.

4.2.4.3. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

Bijellerin termal özellikleri diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizi ile, azot gazı varlığında -10°C 'den 200°C 'ye ısıtma ve 200°C 'den -10°C 'ye soğutma olmak üzere iki farklı döngüde gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.9'da DSC analizinde bijellere ait ısıtma döngüsü termogramlarına yer verilmiştir.

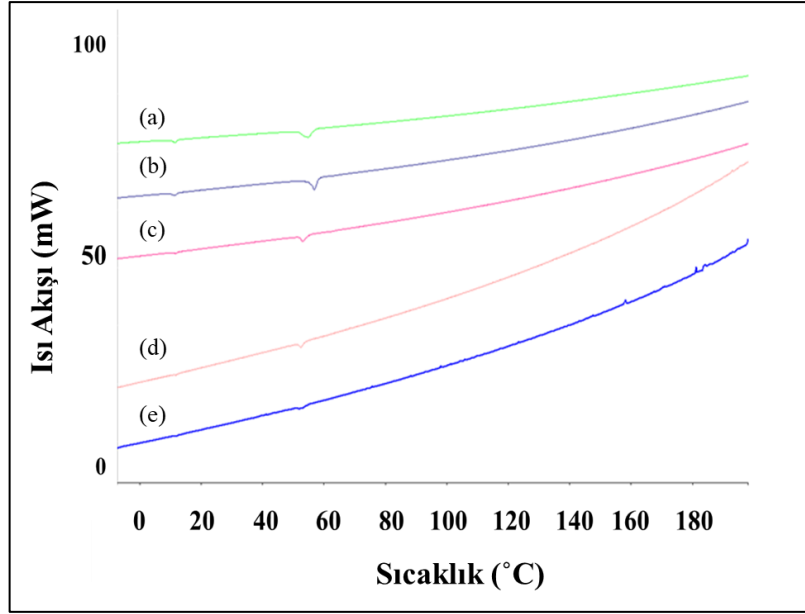


Şekil 4.9. DSC analizinde bijellere ait ısıtma döngüsü; (a) 10:90 (H:O), (b) 30:70 (H:O), (c) 50:50 (H:O), (d) 70:30 (H:O), (e) 90:10 (H:O).

Şekil 4.9’da bijellere ait ısıtma döngüsünde hidrojel oranı yüksek olan bijel numunelerinde 0-2°C sıcaklıkları arasında hidrojel içerisindeki yarı kristalin Aloe vera jeline ait karakteristik erime piki (T_m) gözlenmiştir. Ayrıca 84-100°C sıcaklık aralığında görülen pik ise Aloe vera jelindeki bağlı suyun buharlaşmasını göstermektedir. Yarı kristalin formundaki κ -carrageenan ise bu sıcaklıklarda erime gerçekleştirmediği için görülen sıcaklıkların Aloe vera jelinden geldiği literatürdeki çalışmaları desteklemektedir. Literatürde Ghan ve ark. (2020) DSC analizinin ısıtma döngüsünde 56°C’de organojel içerisinde bulunan GMS kristallerinin erime sıcaklığını gözlemlemişlerdir [75]. Yapılan çalışmada GMS’nin erime sıcaklıkları literatürde verilen sıcaklık değerleri ile örtüşmektedir ve hidrojel oranı yüksek bijel örneklerinde bu pik şiddeti düşüktür.

Literatürdeki sonuçlara göre çalışmada DSC analizinde ısıtma döngüsünde görülen üçüncü erime sıcaklığının κ -carrageenan’dan geldiği görülmektedir. Şekil 4.9’da 70-80°C sıcaklık aralığında görülen pik κ -carrageenan için spesifik T_m değeridir. Sonuç olarak yapılan DSC analizinde tüm bijel oranlarında ortaya çıkan sıcaklık değerleri ile literatürü destekleyecek sonuçlara ulaşılmıştır.

Şekil 4.10’da bijellerin 200°C’den -10°C’ye olmak üzere soğutma döngüsüne ait analiz gösterilmiştir.

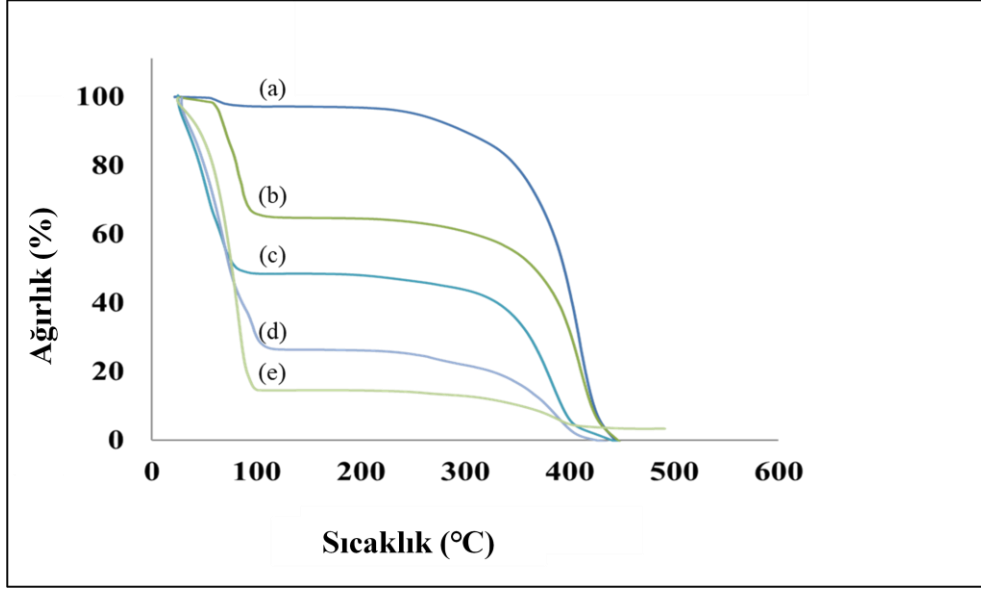


Şekil 4.10. DSC analizinde bijellere ait soğutma döngüsü; (a) 10:90 (H:O), (b) 30:70 (H:O), (c) 50:50 (H:O), (d) 70:30 (H:O), (e) 90:10 (H:O).

Şekil 4.10'da verilen bijellere ait soğutma döngüsünde hidrojele ait soğutma piki gözlenmemiştir. Bunun en önemli nedeni, önce ısıtılıp sonrasında soğutma işlemine maruz bırakılan bijelerde hidrojel fazda buharlaşma meydana gelmesidir. Dolayısıyla yapılan çalışmada da hidrojin soğutma döngüsünde kristalizasyon sıcaklığına rastlanmadığı için hidrojin buharlaşması sonucunun literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir [30]. Bijellere ait soğutma döngüsünde sadece organojel içerisinde bulunan GMS'nin kristalizasyon sıcaklığı (~50-55°C) gözlenmiştir. Organojelde görülen kristalizasyon sıcaklığı Aloe vera yağı ve GMS içerisinde bulunan kristallere aittir. Organojel oranının artmasına bağlı olarak pik şiddetlerinde artış gözlenmektedir.

4.2.4.4. Termogravimetrik (TGA) Analizi

Termogravimetrik analiz ile bijel yapısındaki kütle kaybı ve bijeli oluşturan malzemelerdeki bozulma sıcaklığı tanımlanmıştır. Şekil 4.11'de hidrojel, organojel ve bijellerin 25-600°C sıcaklık aralığında ısıl kararlılıkları incelenmiştir. Çizelge 4.5'te bijelerde görülen kütle kaybı özetlenmektedir.



Şekil 4.11. Bijellerin TGA termogramları. (a) 10:90 (H:O), (b) 30:70 (H:O), (c) 50:50 (H:O), (d) 70:30 (H:O), (e) 90:10 (H:O).

Şekil 4.11’de Termogravimetrik analiz sonuçlarına göre bijellerde hidrojel ve organojel kaynaklı 2 farklı termal değişim görülmektedir. Hidrojel oranının daha yüksek olduğu (90:10 (H:O), 70:30 (H:O)) bijellerde, hidrojin suyun buharlaşmasına bağlı olarak hızlı bir şekilde kütle kaybettiği görülmüştür. Organojel ve organojel oranının yüksek olduğu (10:90 (H:O), 30:70 (H:O)) bijellerde ise hem 350-420°C sıcaklıklarda hem de 450-500°C de geç bir kütle kaybı gözlenmektedir [93]. Ek olarak, 350-420°C’de görülen kütle kaybı GMS ile ilişkili olup ara ürünün karbonizasyonu şeklinde açıklanabilir [94]. Şekil 4.11’de 450-500°C’de görülen kütle kaybı ise Aloe vera yağının erimesi sonucudur. İlgili sonuçlar incelendiğinde yüksek organojel oranına sahip bijellerde daha yüksek sıcaklıklarda kütle kaybının gerçekleştiği ve termal kararlılığın arttığı görülmüştür [93]. Çizelge 4.5’te TGA analizine göre farklı hidrojel ve organojel oranlarına sahip bijellerin bozunmaya başladığı sıcaklık (T_{d1}) ve maksimum bozunma sıcaklıkları (T_{d2}) gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Bijellerin TGA analizi sonuçları.

Hidrojel /Organojel Oran (H:O)	90:10	70:30	50:50	30:70	10:90
(Hidrojele ait)					
T_{d1} (°C)	60.23	45.36	36.46	70.18	57.27
T_{d2} (°C)	85.07	70.95	54.09	86.50	62.22
(Organojele ait)					
T_{d1} (°C)	363.48	345.320	345.10	378.14	379.69
T_{d2} (°C)	388.22	388.63	384.41	409.82	409.96

4.2.5. Reolojik Analiz

Bijellerin reolojik analizi 25°C ve 37°C’de gerçekleştirilmiştir. Bijel üretimi oda sıcaklığında yapıldığı için 25°C, bijellerin transdermal sistemlerde bant amaçlı uygulamalarda kullanılması açısından da vücut sıcaklığı analiz sıcaklıkları olarak seçilmiştir. Reolojik analizde depo modülü (G’), malzeme içerisinde depolanan enerjiyi gösterirken, kayıp modülü (G’’) ise malzeme içerisinde kaybedilen enerjiyi göstermektedir. Depo modülü malzemenin elastik özellikleri hakkında bilgi verirken, kayıp modülü malzemenin viskoz özellikleri hakkında bilgi verir. Malzeme jelleştikçe, G’ ve G’’ değerleri, yani malzemenin elastik özellikleri ve viskozitesi artmaya başlamaktadır. Reolojik analiz sonuçları Şekil 4.12’de verilmiş olup aşağıdaki kısımlarda detaylandırılmıştır.

4.2.5.1. Genlik ve Frekans Taraması

Genlik Taraması: Gerinim taraması kontrollü salınım modunda yapılmış ve gerilim değerleri ölçülmüştür. Gerinim %0.001’den %500’e logaritmik olarak artırılmıştır. Açısız frekans 10 rad/s olarak ayarlanmıştır. Cihaz her bir veri için süreyi kendisi ayarlamış; toplamda 35 veri alınmıştır. 25°C ve 37°C olmak üzere; iki farklı sıcaklık için ölçüm yapılmıştır ve her sıcaklık için yeni bijel örneği yüklenmiştir. Çizelge 4.6’da bijellerin 25°C’deki genlik taraması sonuçları gösterilirken Çizelge 4.7’de bijellerin 37°C’deki genlik taraması sonuçları gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Bijellerin 25°C’deki genlik taraması sonuçları.

Bijel	Lineer Viskoelastik Bölge – 25 °C				
	Gerinim (%)		Depolama Modülü (Pa)	Kayıp Modül (Pa)	tan α
	Limit	Önerilen			
10:90 (H:O)	0.007	0.005	16839.0	2989.2	0.18
30:70 (H:O)	0.012	0.005	28512.0	3388.4	0.12
50:50 (H:O)	0.021	0.010	34680.0	7017.1	0.20
70:30 (H:O)	0.019	0.010	17407.0	2959.7	0.17
90:10 (H:O)	0.539	0.100	6292.3	817.3	0.13

Çizelge 4.7. Bijellerin 37°C’deki genlik taraması sonuçları.

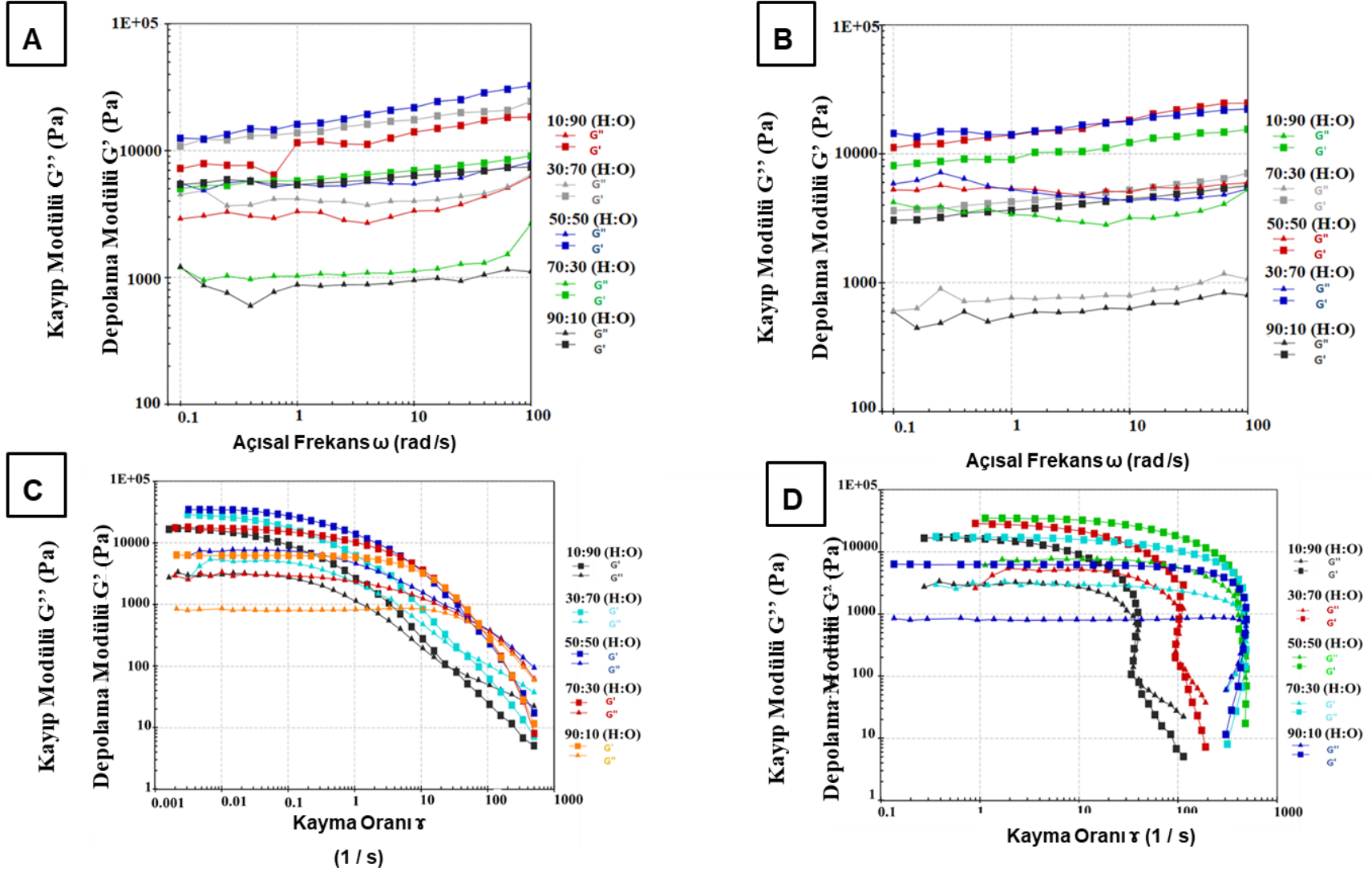
Bijel	Lineer Viskoelastik Bölge – 37 °C				
	Gerinim (%)		Depolama Modülü (Pa)	Kayıp Modül (Pa)	tan α
	Limit	Önerilen			
10:90 (H:O)	0.005	0.001	59554	12072	0.20
30:70 (H:O)	0.017	0.010	39480.0	8234.6	0.21
50:50 (H:O)	0.205	0.010	25424.0	5818.7	0.23
70:30 (H:O)	0.046	0.010	8703.7	1418.6	0.16
90:10 (H:O)	0.707	0.500	4412.4	580.6	0.13

Şekil 4.12.C ve D’de verilen 25°C ve 37°C’deki gerinim taraması sonuçları lineer viskoelastik bölgedeki G’ değerleri G’’ değerlerinden daha yüksek olduğunu göstermektedir. Çizelge 4.6 ve 4.7’de verilen 25°C ve 37°C’deki ölçüm sonuçları karşılaştırıldığında tan α değerlerinin 37°C’de daha yüksek olduğu görülmektedir. Bunun en önemli nedeni sıcaklık artışı ile bijellerdeki organojel fazın bütünlüğünün azalması ve akışkanlığın artmasıdır. Ancak her iki sıcaklık değerinde de kayıp modülün depo modüle oranı olan tan α değerleri ise 1’in altındadır. Bu durum tüm bijel oranlarının jel davranışı sergilediğini göstermektedir.

Frekans Taraması: Gerinim kontrollü salınım modunda test yapılmış ve gerilim değerleri ölçülmüştür. Açısal frekans 100 rad/s'den 0.1 rad/s'ye logaritmik olarak azaltılmıştır. Frekans taramasında 25°C ve 37°C olmak üzere, iki farklı sıcaklık için ölçüm yapılmıştır ve lineer viskoelastik bölgede çalışıldığından, iki farklı sıcaklık için aynı bijel örneği kullanılmıştır.

Şekil 4.12.A ve B'de verilen frekans sonuçlarına bakıldığında her iki sıcaklıkta da lineer viskoelastik bölgede $G' > G''$ olduğu görülmüştür. Elde edilen bu bulgular da tüm frekans aralığı boyunca malzemelerin viskoelastik özelliğe sahip olduğunu kanıtlamaktadır ve sonuçlar literatür ile uyumludur [78, 95].

Şekil 4.12'de verilen tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde görsel olarak kuvvetli jel yapısına sahip olması beklenen, 70:30 (H:O) ve 90:10 (H:O) oranlarındaki bijellerin lineer viskoelastik bölgede daha uzun süre lineer özellik gösterdiği ve daha geç deformasyona uğradığı görülmektedir. Bu durum 70:30 (H:O) ve 90:10 (H:O) bijellerin viskoelastik bölgede daha düşük $\tan \delta$ değerlerine sahip olması ve daha sert bir yapı göstermesi ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca sıcaklık arttıkça organojel oranı yüksek olan 10:90 (H:O) ve 30:70 (H:O) numunelerde akışkanlığın artmasına bağlı olarak $\tan \delta$ değerlerinin arttığı gözlenmiştir. Tüm oranlardaki bijeller viskoelastik özellik gösterirken, özellikle 37°C'deki 70:30 (H:O) bijellerin en yüksek viskoelastik özelliğe sahip olduğu görülmüştür. Bu sonuç **Bölüm 4.2.1**'de verilen morfolojik görüntüleri destekler nitelikte olup, reolojik özellikler açısından 70:30 (H:O) bijel grubunun transdermal sistemler için en ideal bijel oranı olduğunu göstermektedir.



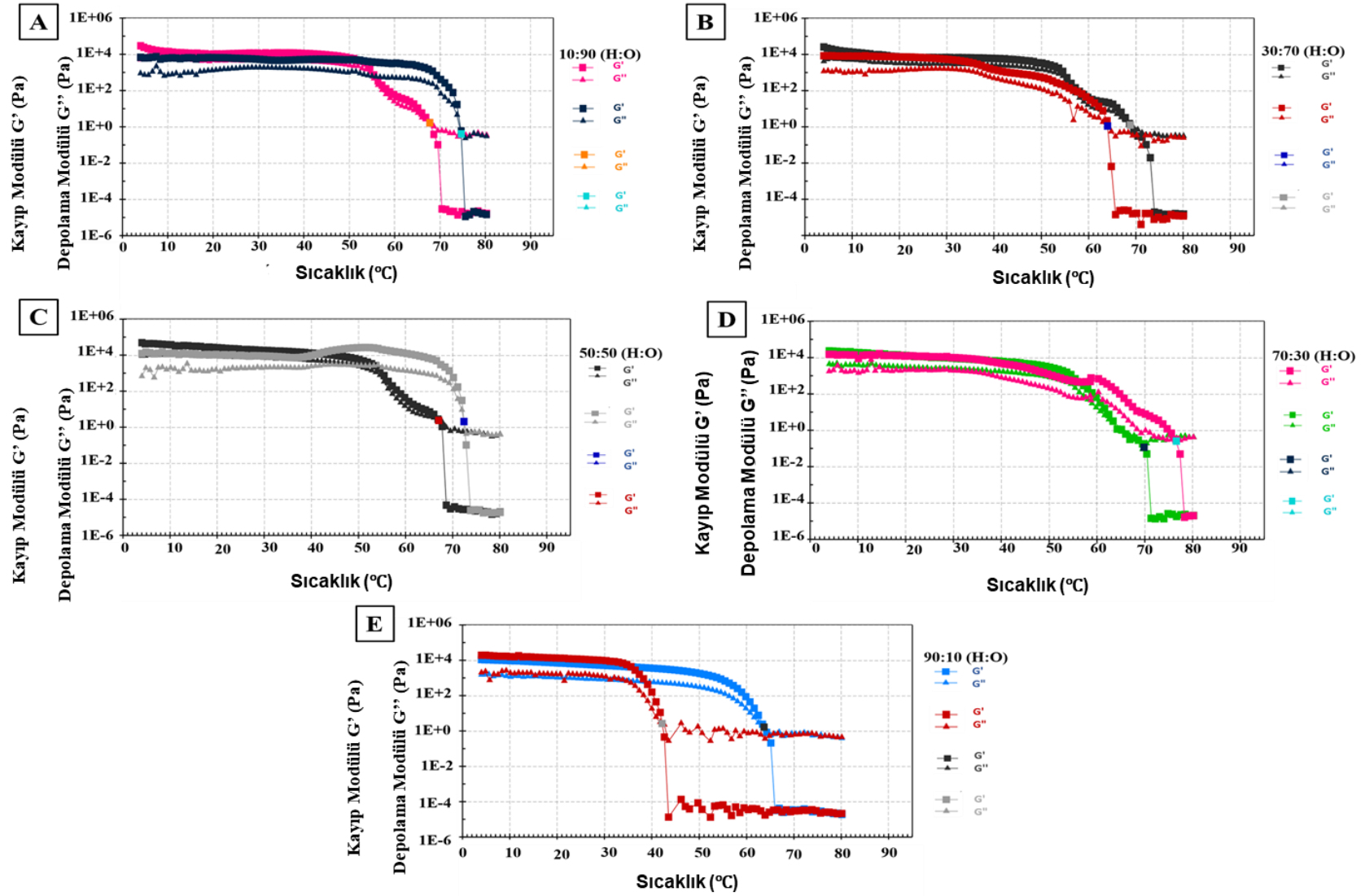
Şekil 4.12. Bijellerin A) 25°C, B) 37°C'deki frekans taraması ve C) 25°C, D) 37°C'deki genlik taraması sonuçları.

4.2.5.2. Sıcaklık Taraması

Tez çalışması kapsamında gerinim kontrollü salınım modunda analiz yapılmış ve gerilim değerleri ölçülmüştür. Gerinim lineer viskoelastik bölgeden seçilmiş olup; %0.001 gerinim uygulanmıştır. Açısal frekans 10 rad/s olarak ayarlanmıştır. Cihaz her bir veri için süreyi kendisi ayarlamış; toplamda 35 veri alınmıştır. Sıcaklık değişimi için; iki döngü yapılmıştır. İlk döngüde 4°C'den 80°C'ye ısıtma yapılmıştır. İkinci döngüde ise; 80°C'den +4°C'ye soğutma yapılmıştır. Bu sıcaklık aralığı, bijellerin +4°C'de muhafaza edilmesi, 25°C'de jelleşmesi ve 80°C'de erimesinden dolayı seçilmiştir. Yapılan sıcaklık taraması sonuçları Şekil 4.13 ve Çizelge 4.8 ile açıklanmaktadır. Sıcaklık taramasında Çizelge 4.8'deki sonuçlar değerlendirildiğinde ısıtma döngüsünde beş farklı orandaki bijellerin jelasyon sıcaklığı ile kristalizasyon sıcaklığı gösterilmektedir. Bu sıcaklıklar, literatürle [96] karşılaştırıldığında ısıtma döngüsündeki erime sıcaklığı GMS'nin erimesine bağlı olarak jelleşme sıcaklığını gösterirken, soğutma döngüsünde ise GMS'nin ısı vererek, kristaller oluşturduğu kristalizasyon sıcaklığının görüldüğü belirlenmiştir. Çizelge 4.8.'de bijellere ait sıcaklık taraması sonuçları gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. Bijellere ait sıcaklık taraması sonuçları.

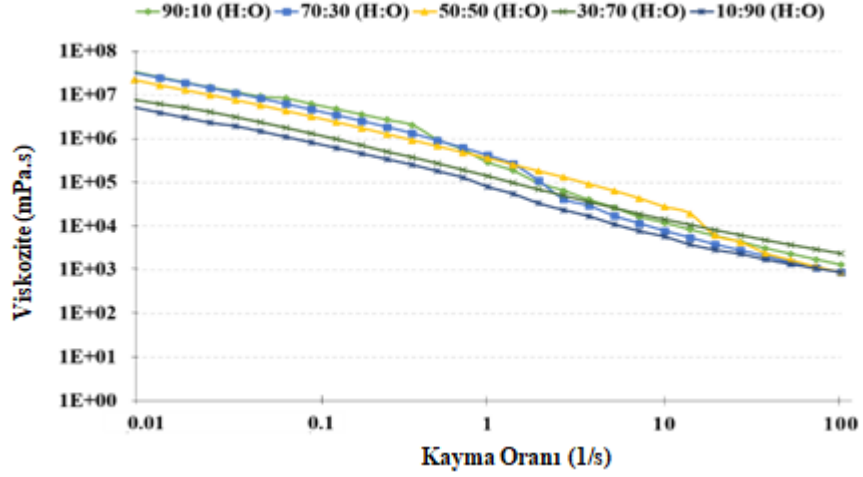
Bijel	Erime Sıcaklığı (°C)	Kristalizasyon Sıcaklığı (°C)
10:90 (H:O)	67.79	74.74
30:70 (H:O)	68.85	64.03
50:50 (H:O)	67.07	72.43
70:30(H:O)	69.87	76.62
90:10 (H:O)	63.70	42.16



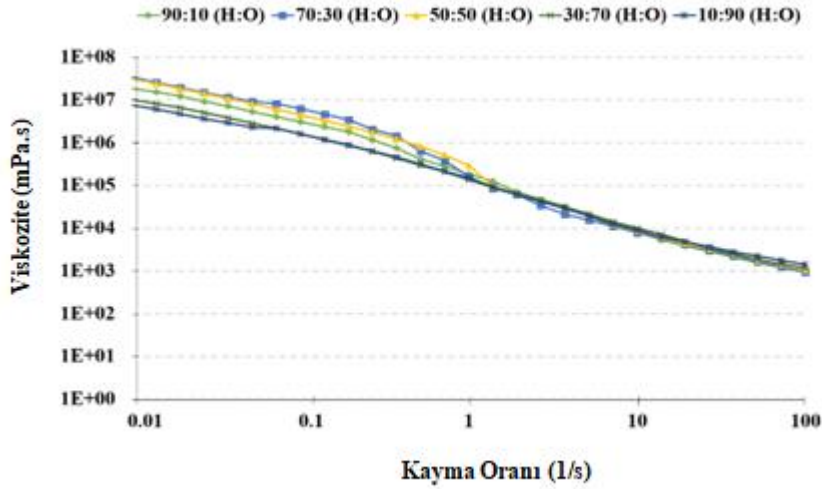
Şekil 4.13. Bijellerin sıcaklık taraması sonuçları.

4.2.5.3. Viskozite Ölçümü

Beş farklı orandaki bijel numunelerinin $0.001-100 \text{ s}^{-1}$ gerinim değeri aralığında 25°C ve 37°C olacak şekilde iki farklı sıcaklıkta viskozite ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.14'te bijellerin 25°C 'deki viskozite ölçüm sonuçları gösterilirken Şekil 4.15'te bijellerin 37°C 'deki viskozite ölçüm sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 4.14. Bijellerin 25°C 'deki viskozite ölçüm sonuçları.



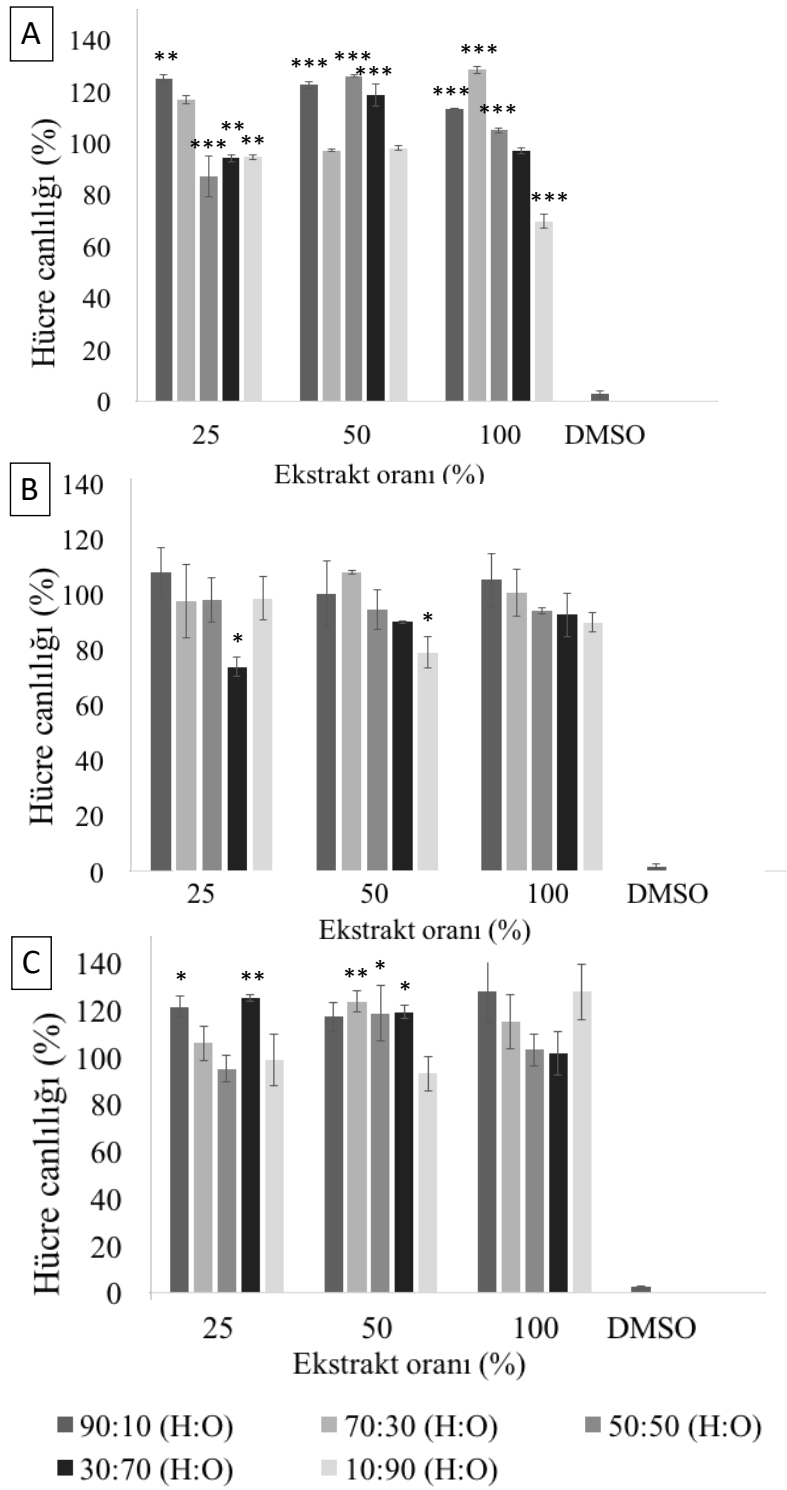
Şekil 4.15. Bijellerin 37°C 'deki viskozite ölçüm sonuçları.

Şekil 4.14 ve 4.15'te bijellere ait viskozite ölçüm sonuçlarında her iki sıcaklık değerinde de bijellerin kayma ile incelen (shear-thinning) Newtonian olmayan akışkan özellik gösterdiği görülmektedir. Şekil 4.14'te verilen 25°C sıcaklıkta viskozitelerin organojel oranı arttıkça azaldığı görülmektedir. Bijel formülasyonlarında hidrojel oranının artması ile viskozite artışının en önemli nedeni, hidrojellerdeki moleküller arası hidrojen bağının bijel formülasyonlarındaki yapının sertliğini artırmasından

kaynaklanabilir. Literatürde Rehman ve ark. (2014) yaptığı çalışmada hidrojel oranının artmasına bağlı olarak viskozitenin arttığı gözlenirken organojel oranının artmasına bağlı olarak viskozitenin azaldığı görülmüştür [93]. İlgili sonuçlar incelendiğinde, oda ve vücut sıcaklığındaki bijellerin viskozite profilleri arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Ancak Şekil 4.15'te hidrojel oranı yüksek olan 90:10 (H:O), 70:30 (H:O) ve 50:50 (H:O) bijel gruplarındaki viskozite değerlerinin, sıcaklık artışından daha çok etkilendiği görülmüştür. Bu durumun ise hidrojel kısmındaki κ-carrageenan ve Aloe vera jelinin miktarı ile ilişkili olduğu düşünülmüştür [97].

4.3. *In-Vitro* Sitotoksosite Çalışmaları

Sitotoksosite çalışmaları için ISO 10993-5 standardı kapsamında farklı dilüsyonlardaki (%25, %50, %100) ekstraktlarla L929 fare fibroblast hücrelerinin 3 gün boyunca kültürü gerçekleştirilmiştir. Hücre çoğalması ve canlılığı MTT analizi ile incelenmiştir. Bu analizde, büyüme ortamına % 10 (v/v) dimetil sülfoksit (DMSO) eklenmiş hücre grubu pozitif kontrol, büyüme ortamına ekstrakt eklenmemiş hücre grubu ise boş kontrol grubu olarak belirlenmiştir. Boş kontrol grubunun canlılığı %100 olarak alınmış ve farklı dilüsyonlardaki ekstrakt eklenmiş hücre gruplarının absorbans değerleri, boş kontrol grubunun absorbans değerlerine bölünerek yüzde canlılık değerleri hesaplanmıştır (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. A) L929 hücrelerinin 1.gün canlılıkları, B) 2. gün canlılıkları, C) 3.gün canlılıkları. Büyüme ortamına % 10 (v/v) DMSO eklenmiş hücre grubu pozitif kontrol grubu olarak belirlenmiştir. (İstatistiksel olarak anlamlı farklar şu sembollerle gösterilmiştir; n=3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

ISO 10993-5/ EN 30993 standardına göre %70'in altındaki canlılık malzemenin toksik etkisi olduğunu göstermektedir. Buna ek olarak, ekstraksiyon dilüsyonlarının azalması ile hücresel canlılık da azalıyorsa materyalin hücreler üzerinde toksik etkisinin olduğu söylenebilir. MTT analizinin sonuçlarına göre tüm oranlardaki bijellerde %70'in üzerinde canlılık görülmekte olup (Şekil 4.16.), bijellerin hücreler üzerinde herhangi bir toksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

4.4. In-Vitro Biyoaktif Ajan Salım Çalışmaları

Terapötik nanopartikül (NP) teknolojileri, ilaç geliştirme sürecinde yenilikçi olup farmasötik endüstri için önemli potansiyele sahip malzemelerdir. Polimerik nanopartiküller, ilaçları kapsülleyebilir ve optimal ilaç konsantrasyonu aralığında sabit oranlarda ilaç salımını sağlayarak ilaçların *in vivo* terapötik etkinliğini artırabilir. Ayrıca toksik, stabil olmayan ve düşük çözünürlüğe sahip ilaçların kullanımını da kolaylaştırır [98]. Bu çalışmada nanopartikül üretim aşamasında parenteral uygulamalar için ilaç dağıtım sistemlerinde FDA onaylı biyobozunur bir polimer olduğu için poli(laktik-koglikolik asit) (PLGA) kopolimeri kullanılmıştır. PLGA kopolimeri, biyoaktif ajanı bozulmadan koruyarak belirli organlara ve hücrelere hedefleme avantajı sunması açısından çalışmalarda sıklıkla tercih edilmektedir [99]. Melatonin, ışığa olan duyarlılığı ve yarı ömrünün kısa olması nedeniyle gerekli biyoyararlanımı sağlaması açısından yetersiz kalmaktadır. Bunun için melatoninin polimerik nanopartikül taşıyıcılarla taşınması biyomedikal uygulama alanlarında önemli avantaj sağlamaktadır. Tez çalışmasında melatonin PLGA nanopartiküller içerisine ikili emülsiyon hazırlama çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak yüklenmiştir. Bu sayede melatoninin sabit dozlarda uzun süreli salımının sağlanması amaçlanmıştır.

4.4.1. Boş PLGA Nanopartiküllerin Üretim Koşullarının Belirlenmesi

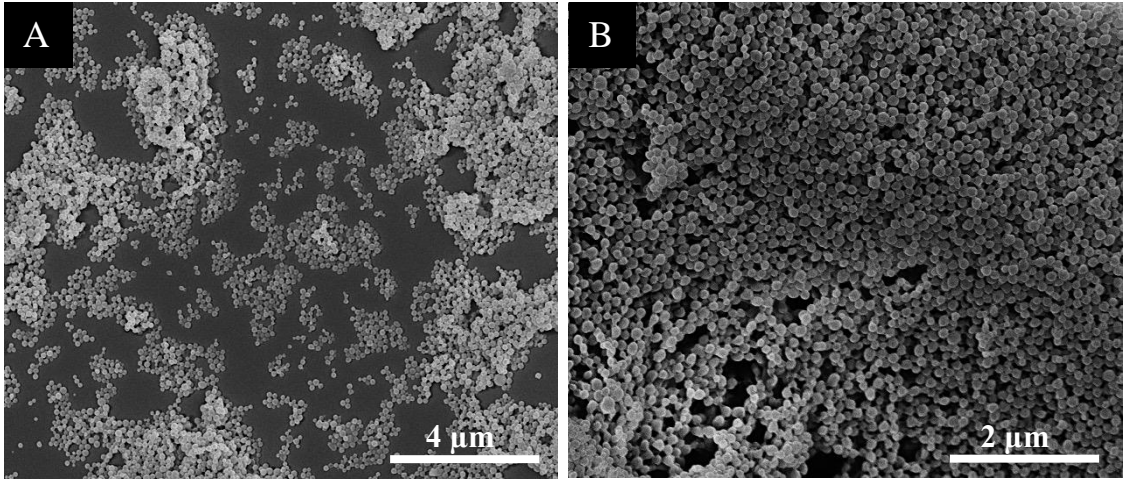
Boş PLGA nanopartiküller, tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak üretilmiştir. Bu yöntemde polimer içeren organik faz ile yüzey aktif madde içeren sulu faz bulunmaktadır. İki faz karıştırıldıktan sonra emülsiyon oluşmakta, sonrasında organik çözücü uzaklaştırılarak nanopartiküllerin üretimi sağlanmaktadır. Bu yöntem, yüksek hızlı homojenizatör kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Üretilen boş PLGA nanopartiküllerin boy ve boy dağılımlarını belirlemek için DLS analizi gerçekleştirilmiştir. DLS sonuçlarına ek olarak, nanopartiküllerin boy ve boy dağılımları SEM görüntüleri kullanılarak Imaje J (NIH, Bethesda, MD, ABD) programı

ile de belirlenmiştir. Çizelge 4.9’da boş PLGA nanopartiküllerin ortalama çapları ve çoklu dağılım endeksleri gösterilirken, Şekil 4.17’de boş PLGA nanopartiküllere ait SEM görüntülerine yer verilmiştir.

Çizelge 4.9. Boş PLGA nanopartiküllerin boy ve boy dağılımı.

Formülasyon	Ortalama Partikül Çapı (nm) (DLS)	Ortalama Partikül Çapı (nm) (Imaje J)	Çoklu Dağılım Endeksi (PDI) (DLS)
Boş PLGA nanopartikül	249.7 ± 13.0	174.0 ± 26.0	0.29 ± 0.07

Partiküllerin boy dağılımları çoklu dağılım endeksi (PDI) ile ifade edilmektedir. PDI değerinin sıfıra yakın olması eş boy dağılımına sahip partiküllerin varlığını göstermektedir. Boş PLGA nanopartiküllerin ortalama çap ve PDI değerleri sırasıyla, 249.7 ± 13.0 nm ve 0.29 ± 0.07 olarak belirlenmiştir. Imaje J programı SEM görüntülerinden belirlenen ortalama çap değeri ise 174.0 ± 26.0 nm olarak bulunmuştur.



Şekil 4.17. Boş PLGA nanopartiküllere ait farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri A) 10 000 X, B) 20 000 X.

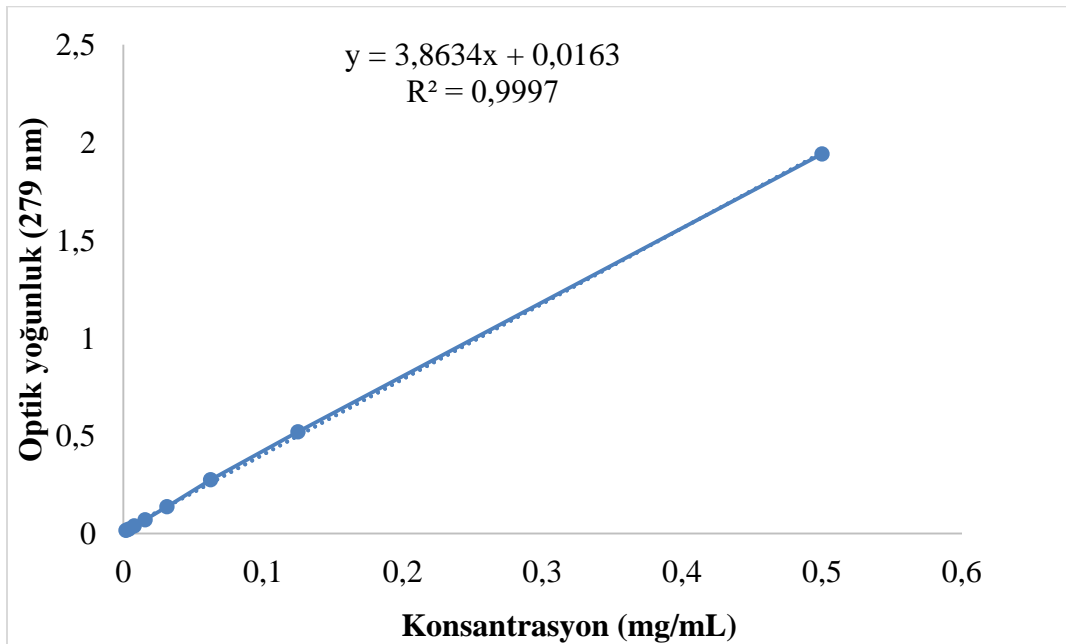
Partiküllerin morfolojisini belirlemek için SEM analizi gerçekleştirilmiştir. SEM sonuçlarına göre 15000 rpm homojenizasyon hızında 7 dk süresince homojenize edilerek hazırlanan boş PLGA nanopartiküllerin düzgün küresel yapıda olduğu ve boyutlarının birbirine yakın olduğu görülmüştür (Şekil 4.17.B). Bazı bölgelerde partiküllerin homojen olarak dağılamayıp yığın yapılar oluşturdukları gözlenmiştir (Şekil 4.17.A).

4.4.2. Melatonin Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu

Melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerin üretimi için ikili emülsiyon hazırlama çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır. PLGA nanopartiküllerin üretimi sırasında organik faza ağırlıkça oranı %6 (w/v), %10 (w/v) ve %20 (w/v) olacak şekilde melatonin eklenmiştir. Poli(vinil alkol) (PVA) ve didodesil dimetil amonyum bromür (DMAB) olmak üzere 2 farklı stabilizatör; etil asetat ve diklorometan (DCM) olmak üzere 2 farklı organik çözücü kullanılarak 8 farklı formülasyonda melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerin üretimi gerçekleştirilmiştir. Melatoninin amfifilik özellikte bir ilaç olmasından dolayı organik faz ve sulu fazın karıştırılması sırasında sulu faza difüzyonu gerçekleşebilmektedir, bu nedenle üretim sırasında difüzyonu engellemek amacıyla sulu faza da bir miktar melatonin eklenmiştir. Sulu faza ağırlıkça %0.2 (w/v) ve %1 (w/v) melatonin eklenmiştir.

4.4.2.1. Enkapsülasyon Verimi

PLGA nanopartiküller üretilirken, organik fazda bulunan melatonin miktarının ne kadarının partiküller tarafından hapsedildiğini belirlemek amacıyla partiküller sırasıyla DCM ve saf asetonitril içerisinde çözdürülerek partikül içerisine hapsedilen melatonin konsantrasyonu 279 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Şekil 4.18'de enkapsülasyon veriminin hesaplanmasında kullanılan kalibrasyon grafiği gösterilmiştir.



Şekil 4.18. Melatoninin kalibrasyon grafiği.

Çizelge 3.1’de belirtilen sekiz farklı formülasyonun enkapsülasyon verimi karşılaştırıldığında, organik faza eklenen ilaç miktarının artması ile enkapsülasyon veriminin azaldığı belirlenmiştir. Bu durum melatoninin amfifilik bir yapıda olmasından dolayı, partikül oluşurken melatoninin sulu fazlara difüzyonundan kaynaklanmaktadır. Bu durumun engellenebilmesi amacıyla, çalışmada birinci sulu faza eklenen melatonin miktarı (4 mg) sabit tutulmuş, ikinci sulu faza 4 veya 20 mg melatonin eklenmiştir. İkinci sulu faza eklenen melatonin miktarının artmasıyla enkapsülasyon veriminin arttığı belirlenmiştir. En yüksek enkapsülasyon verimi, ikinci sulu faza eklenen melatonin miktarı 20 mg olan grupta görülmüştür. Melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerin enkapsülasyon verimleri ve ilaç yükleme kapasiteleri Çizelge 4.10’da sunulmuştur.

Çizelge 4.10. Sekiz farklı formülasyonla üretilen melatonin yüklü PLGA mikro/nanopartikül enkapsülasyon verimleri ve ilaç yükleme kapasiteleri.

Modifiye Edilmiş İkili Emülsiyon (w1/o/w2) No:	Enkapsülasyon Verimi, EE (%)	Yüklenen İlaç, DL (%)
F1	12.3 ± 0.2	1.5 ± 0.02
F2	9.4 ± 1.3	1.8 ± 0.2
F3	6.4 ± 0.3	3.1 ± 0.1
F4	39.7 ± 0.2	3.6 ± 0.01
F5	8.3 ± 0.2	0.6 ± 0.02
F6	6.7 ± 0.1	1.17 ± 0.01
F7	3.5 ± 0.1	1.7 ± 0.02
F8	18.6 ± 1.4	1.8 ± 0.15

Çizelge 4.10'a göre en yüksek enkapsülasyon verimi ve ilaç yükleme kapasitesi F4'de, ikinci sırada ise F8'de bulunmuştur. PLGA partikülleri üretilirken organik faza eklenen melatonin miktarının artması ile enkapsülasyon verimi azalmıştır. Keum ve ark. (2011) [100] yaptıkları çalışmada tekli emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemini kullanarak dosataksel yüklü PLGA nanopartiküller sentezlemişlerdir. Çalışma kapsamında organik faza eklenen Dosataksel miktarının enkapsülasyon verimi üzerindeki etkisi araştırılmış ve sonuç olarak enkapsülasyon verimindeki artışın organik faza eklenen dosataksel miktarı ile orantılı olmadığı görülmüştür. Yüklenen ilaç miktarının artışı ile enkapsülasyon veriminin ilk olarak arttığı ve belli bir değere ulaştıktan sonra azalmaya başladığı belirtilmiştir. Enkapsülasyon verimindeki artış PLGA ile etkileşen Dosataksel miktarının artışı ile açıklanırken, azalış Dosataksel'in sulu faza difüzyonu ile açıklanmıştır.

Sahana ve ark. (2008) [101] yaptıkları çalışmada emülsiyon hazırlama-çözücü buharlaştırma yöntemi ile estradiol yüklü PLGA nanopartiküller üreterek farklı

stabilizatörlerin enkapsülasyon verimi üzerine etkisini araştırmışlardır. Stabilizatör olarak PVA'nın kullanıldığı durumda daha yüksek enkapsülasyon verimi bulunmuştur. Bu durum, estradiolün PVA ile hazırlanan sulu faz içerisindeki çözünürlüğünün düşük olması ile açıklanmıştır.

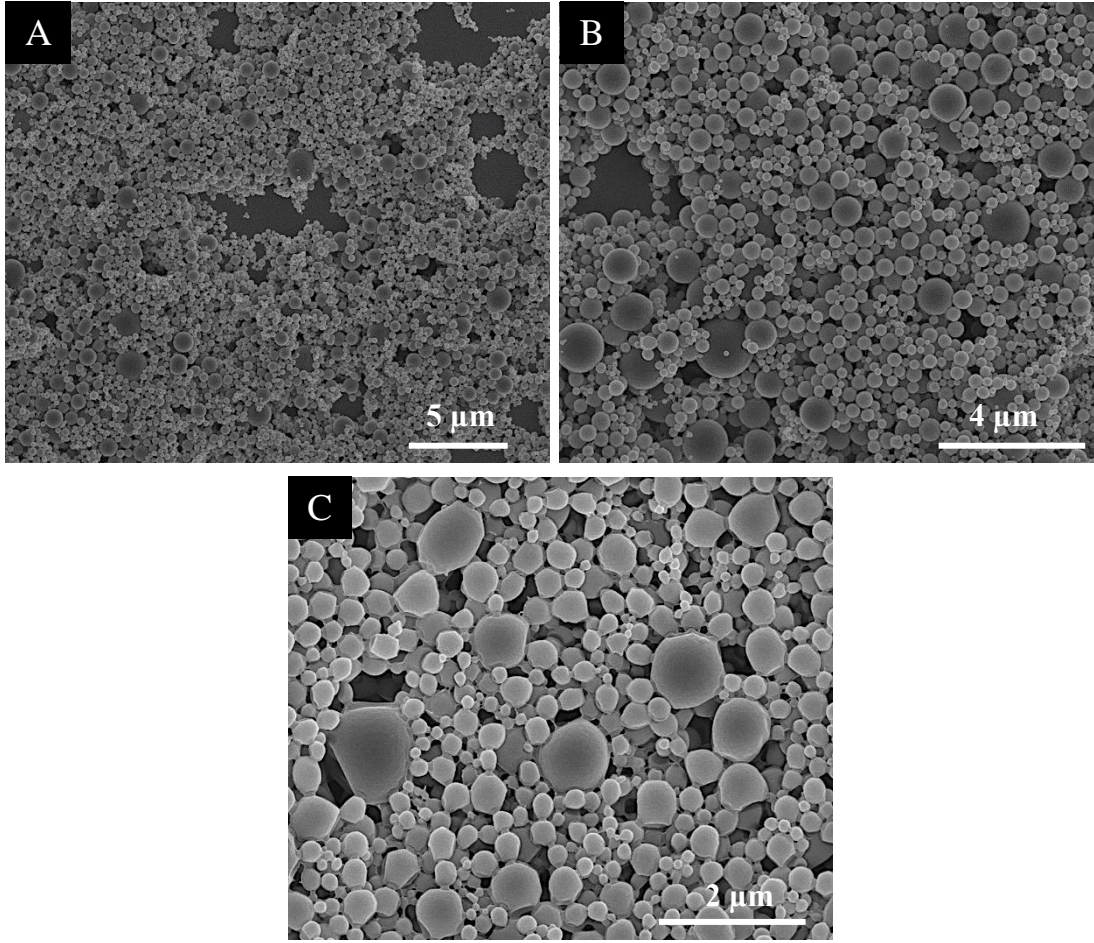
Musumeci ve ark. (2013) [101] yaptıkları çalışmada çözücü yer değiştirme yöntemiyle melatonin yüklü PLGA nanopartiküller üretmişlerdir. Çalışma kapsamında polimere göre oranı %5 (w/w) olacak şekilde melatonin organik faza ilave edilmiş ve enkapsülasyon verimi ~%5 olarak bulunmuştur. Enkapsülasyon verimini artırmak amacıyla PLGA polimerine ek olarak amfifilik bir polimer olan polietilen glikol (PEG) kullanılmış ve PLGA-PEG nanopartikülleri üretilmiştir. PLGA-PEG nanopartiküllerin enkapsülasyon verimi ~%25 olarak bulunmuştur.

Çalışma kapsamında kullanılan stabilizatörlerin de enkapsülasyon verimi üzerinde etkisi bulunmaktadır. Diklorometan (DCM) yüksek uçuculuğa, düşük kaynama noktasına ve su ile iyi karışabilme özelliğine sahip olduğu için ilaç kapsüllemeye çözücü buharlaştırma tekniğinde en yaygın kullanılan çözücülerdendir. Etil asetat DCM'e göre daha az toksik olup suda daha fazla çözünme özelliğindedir. Etil asetatın suda yüksek çözünürlüğe sahip olması ilacın suda kaybolmasına neden olacağı için enkapsülasyon verimini düşürecektir. Diklorometan (DCM) suda az çözüldüğü için ilacın suya difüzyonu azalacak ve enkapsülasyon verimi artacaktır [102]. DCM'in buhar basıncının yüksek olmasına bağlı olarak DCM partikül süspansiyonundan hızlı bir şekilde uzaklaşacaktır. Böylece, ortamdaki ilaç sulu faza difüzlenmeden partiküller çökecek ve ilacın enkapsülasyon verimi artacaktır [103].

Sonuç olarak, literatürdeki çalışmalar doğrultusunda organik çözücünün ve stabilizatör çeşidinin emülsiyon hazırlama çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretilen partiküllerin enkapsülasyon verimleri üzerinde etkili parametreler olduğu vurgulanmıştır. Tez çalışması kapsamında hazırlanan formülasyonlardan organik çözücü olarak DCM'in, stabilizatör olarak PVA'nın kullanıldığı F4 formülasyonu ile üretilen partiküllerin en yüksek enkapsülasyon verimine sahip olduğu görülmüştür.

En yüksek enkapsülasyon veriminin elde edildiği F4 formülasyonu ile üretilen partiküllerin ortalama çap değerleri DLS analizi ile incelenmiş ve 1564.3 ± 143.7 nm olarak bulunmuştur. Partiküllerin boyutlarının mikrometre mertebesinde olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle çalışmanın devamında nanopartikül üretim yöntemlerinden

ikinci en yüksek enkapsülasyon verimine sahip, partikül çapı 533.7 ± 17.2 nm olan F8 formülasyonunun kullanılmasına karar verilmiştir.

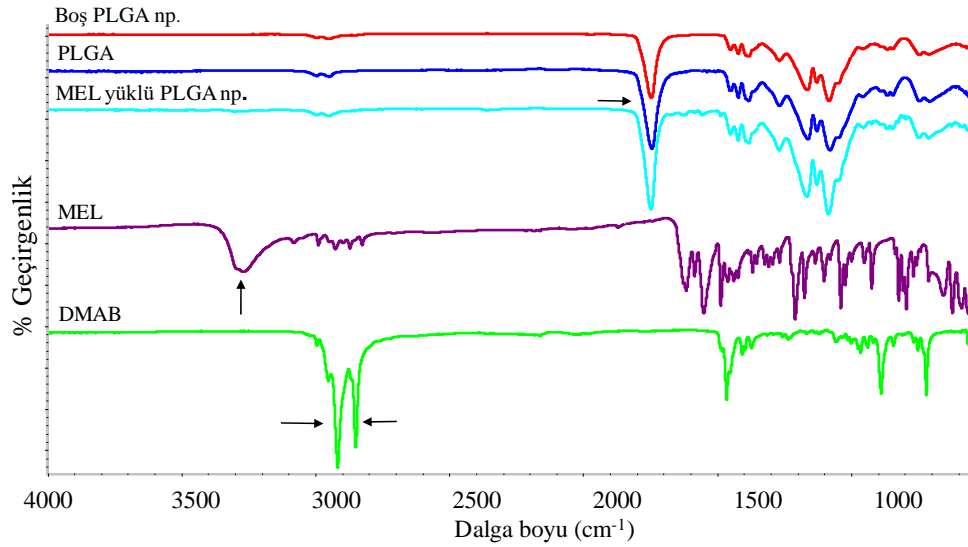


Şekil 4.19. Melatonin yüklü PLGA nanopartiküllere ait (F8 formülasyonu ile üretilen) farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri A) 10 000 X, B) 20 000 X, C) 40 000 X.

Boş PLGA nanopartiküllerde olduğu gibi melatonin yüklü nanopartiküllerin de yapı olarak küresel morfolojiye sahip olduğu ve yüzeylerinde herhangi bir pürüzlülük bulunmadığı görülmektedir. Üretilen melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerin ortalama çap ve çoklu dağılım endeksi (PDI) değerleri sırasıyla 533.7 ± 17.2 nm ve 0.21 ± 0.09 olarak bulunmuştur. Boş PLGA nanopartiküller ile kıyaslandığında yapıya melatonin katılması ile nanopartikül morfolojisi üzerinde herhangi bir etki oluşmamıştır. Melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerde yapıya nanopartikül eklenmesi ile boyut dağılımının farklılaştığı ve çap dağılımının arttığı görülmüştür.

4.4.2.2. ATR-FTIR Analizi

Üretilen nanopartiküllerin kimyasal yapı ve fonksiyonel gruplarının belirlenebilmesi ve kullanılan DMAB ve PVA stabilizörlerinin üretim yapıldıktan sonra partiküllerden uzaklaşıp uzaklaşmadığını görmek amacıyla ATR-FTIR analizi gerçekleştirilmiştir. PLGA kopolimeri ile hazırlanmış boş ve melatonin yüklü nanopartiküller ile saf DMAB'ye ve saf melatonine ait spektrumlar Şekil 4.20.'de gösterilmiştir.



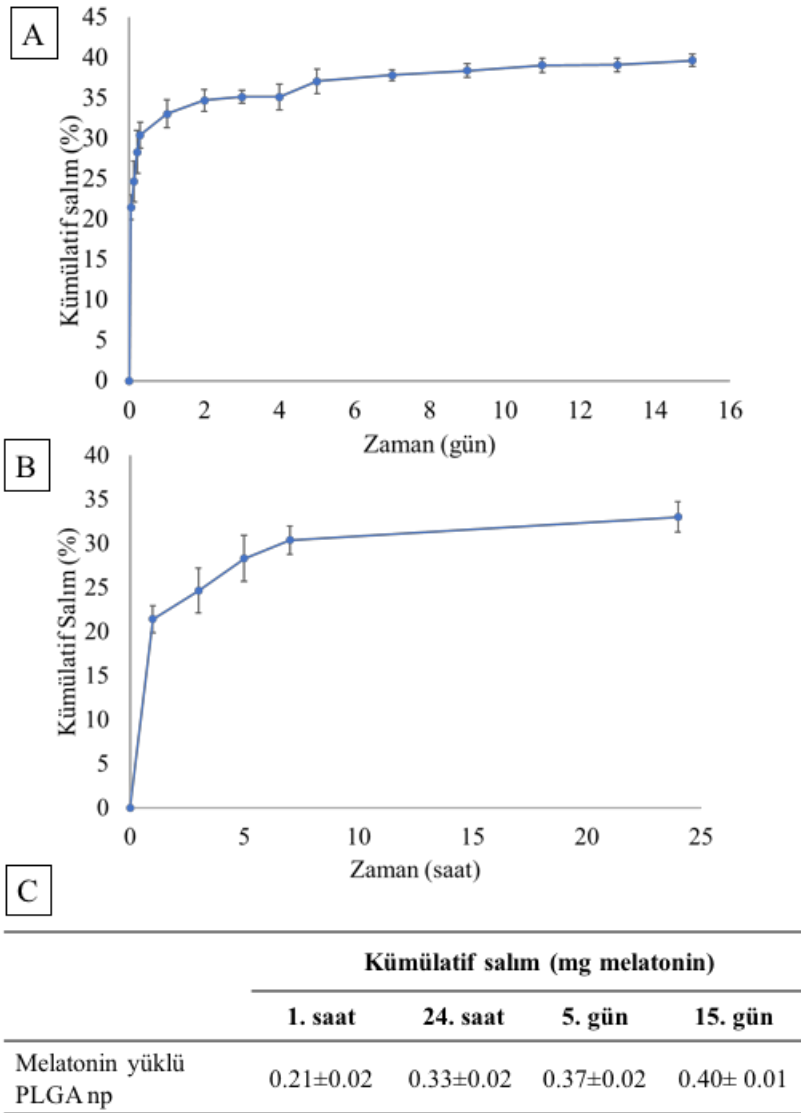
Şekil 4.20. PLGA kopolimeri ile hazırlanmış boş ve melatonin yüklü nanopartiküller ile saf DMAB'ye ve saf melatonine ait ATR-FTIR spektrumları.

Şekil 4.20.'ye göre 1760 cm^{-1} dalga boyunda ait C=O gerilmesine ait pik [104] PLGA kopolimerine ait olup boş PLGA nanopartiküllerde ve melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerde görülmektedir. Bu durum polimerin partikül formuna geldiğinde kimyasal yapısında herhangi bir değişikliğin olmadığını göstermektedir. $2835\text{-}2840\text{ cm}^{-1}$ dalga boyuna ait pik, saf DMAB'ye ait olup alifatik C-H piklerini belirtmektedir [105]. Üretilen nanopartiküllere ait spektrumda saf DMAB'ye ait pik yer almadığı için bu durum PLGA nanopartiküllerin üretim sonrası gerçekleştirilen yıkama işlemi ile DMAB'ın partiküllerden tamamen uzaklaştığını göstermiştir. Saf melatonin, 3305 cm^{-1} dalga boyunda NH_2 gerilmesine ait pik göstermektedir. Melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerde saf melatonine ait bu pik bulunmamıştır. Bunun nedeni eklenen melatonin oranının polimer oranından daha düşük olması ile sonuçlanmaktadır [106].

4.5. *In-Vitro* Melatonin Salımı ve Salım Kinetiğinin Matematiksel Analizi

4.5.1. PLGA Nanopartiküllerden Melatonin Salımı

In-vitro melatonin salım çalışmaları enkapsülasyon verimi en yüksek olan F8 formülasyonuna ait nanopartiküller ile 15 gün boyunca 3 paralel örnek şeklinde gerçekleştirilmiştir. PLGA nanopartiküllerden salınan melatonine ait yüzde kümülatif salım grafikleri ve mg melatonin miktarlarını gösteren veriler Şekil 4.21’de sunulmuştur.

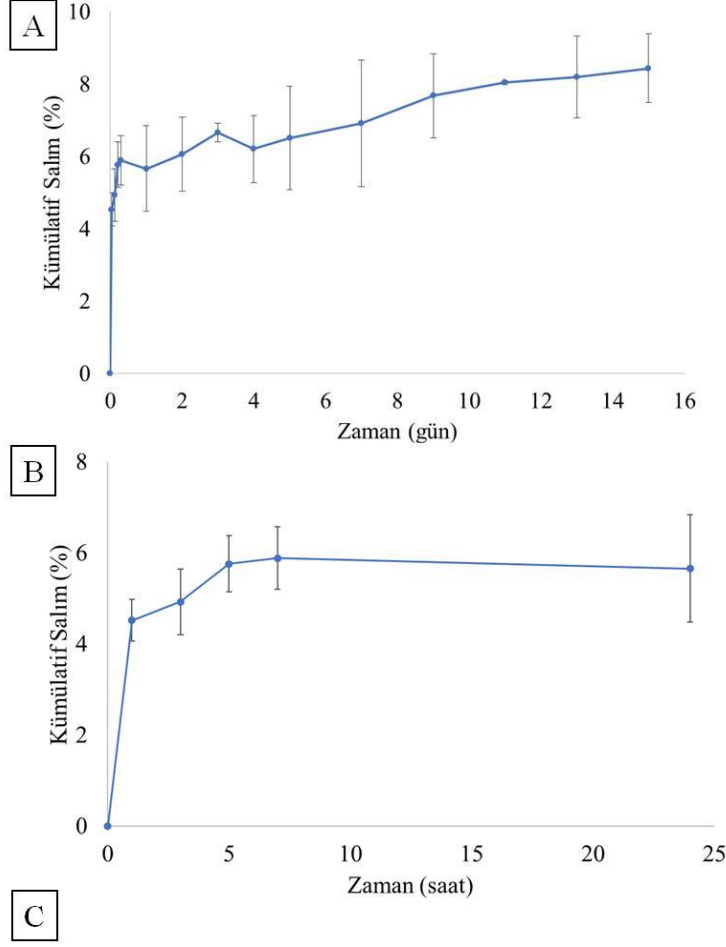


Şekil 4.21. Melatoninin PLGA nanopartiküllerden melatoninin kümülatif salımı A) 15 günlük (%) B) 24 saatlik (%) C) 15 günlük (salım çalışması kapsamında 10 mg nanopartikül kullanılmış olup, 1 mg nanopartikül %18.6 enkapsülasyon verimi ile 0.1 mg melatonin yüklüdür).

Ani patlama etkisi ile salım, PLGA partiküllerin yüzeyine elektrostatik etkileşimlerle tutunan melatoninin partikül yapısından uzaklaşarak salım ortamına geçmesi sonucu gerçekleşmektedir. Böylece, salım hızı henüz stabil bir profile ulaşmamış olur [107]. İlk 24 saatte melatoninin yaklaşık olarak %33'ünün difüzyon mekanizması ile kontrollü bir şekilde salımı gözlenirken (Şekil 4.21.B), on beş günlük salım çalışmaları sonunda partikül içerisinde bulunan melatoninin yaklaşık %39.7'sinin difüzyon mekanizması ile kontrollü bir şekilde salındığı görülmüştür (Şekil 4.21.A). Poli (laktik-ko-glikolik asit) nanopartiküllerden salınan kümülatif melatonin miktarı, 1.saat, 24. saat, 5. gün ve 15. gün için sırasıyla, yaklaşık 0.21, 0.33, 0.37 ve 0.40 mg olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.21.C).

4.5.2. Melatonin Yüklü PLGA Nanopartikül İçeren Bijellerden Melatonin Salımı

In-vitro melatonin yüklü PLGA nanopartikül içeren bijellerden salım çalışmaları gerçekleştirilirken 70:30 (H:O) oranına ait bijeller seçilmiştir. Bu orana ait bijeller, morfolojik görüntüleme uygun, düzenli ve küresel damlacıklara sahip olduğu aynı zamanda reolojik davranışına göre kayma hızının artmasına bağlı olarak viskozitesinin azalması ile daha iyi yayılabilirlik özelliği gösterdiği için tercih edilmiştir [32]. Yetmiş:otuz (H:O) oranına ait bijellere karar verildikten sonra bu orana ait bijellere 3 paralel olacak şekilde melatonin yüklü PLGA nanopartikül eklenerek 15 gün boyunca melatonin salım davranışı incelenmiştir. Melatonin yüklü PLGA nanopartikül içeren bijellerden salınan melatoninine ait yüzde kümülatif salım grafikleri ve mg melatonin miktarlarını gösteren veriler Şekil 4.22'de sunulmuştur.



	Kümülatif salım (mg melatonin)			
	1. saat	24. saat	5. gün	15.gün
Melatonin yüklü PLGA np içeren bijel	0.045±0.05	0.057±0.012	0.058±0.014	0.084±0.009

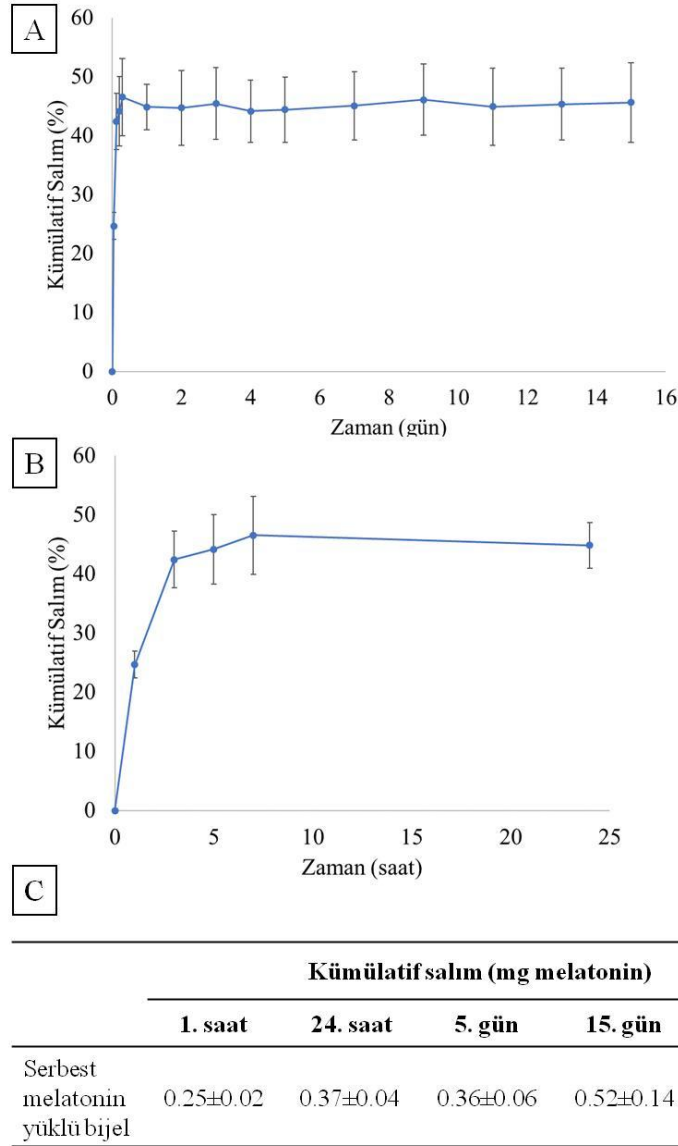
Şekil 4.22. Melatonin yüklü PLGA nanopartikül içeren bijellerden melatoninin kümülatif salımı A) 15 günlük (%) B) 24 saatlik (%) C) 15 günlük (salım çalışması kapsamında 1 g bijele 10 mg nanopartikül ilave edilmiş olup, 1 mg nanopartikül %18.6 enkapsülasyon verimi ile 0.1 mg melatonin yüklüdür).

Melatonin yüklü PLGA nanopartikül içeren bijelerde PLGA nanopartiküllere kıyasla daha düşük bir ani patlama etkisi görülmüştür. İlk 24 saatte melatoninin yaklaşık olarak %5.7'sinin difüzyon mekanizması ile kontrollü bir şekilde salımı gözlenirken (Şekil 4.22.B), on beş günlük salım çalışmaları sonunda partikül içerisinde bulunan melatoninin yaklaşık %8.9'unun difüzyon mekanizması ile kontrollü bir şekilde salındığı görülmüştür (Şekil 4.22.A). Düşük miktarda ani patlama etkisi ile salım, nanopartikül yüzeyinde bulunan melatonin moleküllerinin bijel içerisinde enkapsüle

olması ile açıklanabilir. Melatonin yüklü PLGA nanopartikül içeren bijellerden salınan kümülatif melatonin miktarı, 1.saat, 24. saat, 5. gün ve 15. gün için sırasıyla, yaklaşık 0.045, 0.057, 0.058 ve 0.084 mg olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.22.C).

4.5.3. Serbest Melatonin Yüklü Bijellerden Melatonin Salımı

In-vitro melatonin yüklü bijellerden salım çalışmaları gerçekleştirilirken seçilen 70:30 (H:O) oranına ait bijellere 3 paralel olacak şekilde melatonin ilave edilmiş ve 15 gün boyunca melatonin salım davranışı incelenmiştir. Melatonin yüklü bijellerden salınan melatonine ait yüzde kümülatif salım grafikleri ve mg melatonin miktarlarını gösteren veriler Şekil 4.23'te sunulmuştur.



Şekil 4.23. Serbest melatonin yüklü bijellerden melatoninin kümülatif salımı A) 15 günlük (%) B) 24 saatlik (%) C) 15 günlük (salım çalışması kapsamında 1 g bijele 1 mg serbest melatonin ilave edilmiştir).

Serbest melatonin yüklü bijelerde PLGA nanopartiküllere kıyasla, ani patlama etkisi ile daha yüksek miktarda melatonin salınmıştır. Bu durum, bijel yüzeyinde bulunan serbest melatonin miktarının nanopartiküllere göre fazla olması ile açıklanabilir. İlk 24 saatte melatoninin yaklaşık olarak %36.4'ünün difüzyon mekanizması ile kontrollü bir şekilde salımı gözlenirken (Şekil 4.23.B), on beş günlük salım çalışmaları sonunda bijel içerisinde bulunan melatoninin yaklaşık %52.5'inin difüzyon mekanizması ile kontrollü bir şekilde salındığı görülmüştür (Şekil 4.23.A).

Serbest melatonin yüklü bijellerden salınan kümülatif melatonin miktarı, 1.saat, 24. saat, 5. gün ve 15. gün için sırasıyla, yaklaşık 0.25, 0.37, 0.36 ve 0.52 mg olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.23.C).

Melatonin salım verileri karşılaştırıldığında, en yüksek kümülatif salımın serbest melatonin yüklü bijellerden, ardından melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerden, en düşük ise melatonin yüklü PLGA nanopartikül içeren bijellerden gerçekleştiği görülmüştür. Bu durum beklenen bir sonuçtur. Çünkü ilaç, nanopartikül ve bijel içerisinde nanopartikülün boyutuna bağlı olarak daha yavaş ve kontrollü sürekli salım davranışı gösterir. Vanoli ve ark. (2022) etosuksimid ve dimetilfumarat olmak üzere, sırasıyla hidrofilik ve lipofilik özellikteki bu iki ilacı jel bazlı nanopartiküllere enkapsüle etmişlerdir. Ardından ilaç yüklü bu nanopartikülleri, bijeller içerisine dahil ederek bu iki ilacın salım davranışını araştırmışlardır. Çalışma sonucunda her iki ilacın da jel bazlı nanopartikül içeren bijellerden salımının bijellere göre daha yavaş ve kontrollü olduğu görülmüştür [108]. Literatürde Andonova ve ark. (2017) yaptığı çalışmada ketoprofen yüklü polimerik taşıyıcılar sentezlenmiştir. Bu polimerik taşıyıcılar karbopol/badem yağı kullanılarak oluşturulan bijellere ilave edilmiş ve bu sistemin farmakolojik etkileri incelenmiştir. Sonuç olarak, kümülatif salım verileri değerlendirildiğinde, ketoprofen içeren bijellerin nanopartikül içeren bijellere göre daha hızlı salım profili sergilediği görülmüştür [32]. Benzer sonuçlar farklı ilaçlar ve polimerler kullanılarak üretilen çeşitli nano/mikropartiküler sistemlerde de elde edilmiştir [109, 110].

4.5.4. Salım Mekanizması ve Salım Kinetiğinin Belirlenmesi

Farklı ilaç salım modelleri (sıfırıncı derece, birinci derece, Higuchi, Hixson-Crowell, Korsmeyer-Peppas) kullanılarak PLGA nanopartiküllerden, melatonin yüklü PLGA nanopartikül içeren bijellerden ve serbest melatonin yüklü bijellerden melatonin salımı matematiksel olarak incelenmiştir. Elde edilen grafiklerden lineer regresyon katsayıları (R^2) 1'e en yakın olan model, salım kinetiğini ifade eden model olarak tanımlanmıştır. Çizelge 4.11'de melatoninin salım mekanizması ve salım kinetiği ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.11. Melatoninin salım mekanizması ve salım kinetiği.

	Sıfıncı Derece		Birinci Derece		Higuchi		Hixson-Crowell		Korsmeyer Peppas		
	R ²	K ₀ (mg.sa ⁻¹)	R ²	K ₁ (sa ⁻¹)	R ²	K _H (mg.sa ^{-1/2})	R ²	K _{HC} (sa ^{-1/3})	R ²	K (sa ⁻ⁿ)	n
Melatonin Yüklü PLGA Nanopartikül	0.8979	0.0002	0.9117	0.0002	0.9267	0.1320	0.8671	0.0286	0.9113	0.2390	0.0799
Melatonin Yüklü PLGA Nanopartikül İçeren Bijel	0.9045	0.0171	0.9085	0.0028	0.9602	1.2526	0.7849	0.0608	0.6585	7.8380	0.0816
Serbest Melatonin Yüklü Bijel	0.8689	0.0003	0.8671	0.0337	0.9295	0.0440	0.9286	0.006	0.9295	2.3730	0.0220

Partiküler sistemlerde, salım mekanizması pek çok parametreye bağılı olmakla birlikte genellikle difüzyon kontrollü bir mekanizma gözlenmektedir. Kullanılan polimerin yapısı ve biyobozunurluk özelliği de salım mekanizmasını etkileyen önemli faktörler arasındadır. *In-vitro* salım çalışması sonuçlarına göre, melatonin yüklü PLGA nanopartikül içeren bijellerden, PLGA nanopartiküllerden ve melatonin yüklü bijellerden on beş günlük kümülatif melatonin salım verileri sırasıyla 8.43 ± 0.95 , 39.6 ± 0.76 ve 45.6 ± 6.7 olarak belirlenmiştir. Melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerde ve melatonin yüklü PLGA nanopartikül içeren bijellerde, R^2 değeri sırasıyla 0.9267 ve 0.9602 olarak hesaplanırken, serbest melatonin yüklü bijellerde ise R^2 değeri 0.9295 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen salım verileri kıyaslandığında, melatoninin her üç salım sistemi için de ağırlıklı olarak difüzyon mekanizmasıyla salındığı ve salım kinetiklerinden çok Higuchi salım modeline uyduğu belirlenmiştir [111]. Korsmeyer-Peppas salım kinetiğine göre ise n değerleri hesaplanmış ve 0.45'ten küçük bulunmuştur. Bu durum, difüzyonun Fick yasasına uygun olarak gerçekleştiğini belirtmektedir.

5. YORUM

Sunulan tez çalışmasında özgün yaklaşımlarla yenilikçi bir bijel üretimi gerçekleştirilmiş ve geliştirilen bijellerin karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Sonraki aşamada biyoaktif ajan olarak seçilen melatonin PLGA nanopartiküller içerisine ve bijellere yüklenerek *in-vitro* salımı incelenmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında κ -carrageenan/ Aloe vera esaslı hidrojel üretimi ve Aloe vera yağı içeren organojel üretimi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında oda sıcaklığında hidrojel içerisine organojel eklenerek bijellerin üretimi gerçekleştirilmiştir.

- Üretilen bijellerin kimyasal yapı ve faz analizleri gerçekleştirilmiş, DSC analizine göre bijellerin ısıtma döngüsünde erime sıcaklığı gözlenirken soğutma döngüsünde organojelatör olarak kullanılan gliserol monostearat'a ait kristalizasyon sıcaklıkları gösterilmiştir. Bijellerin ısıl kararlılıkları ve bozunma sıcaklıkları termogravimetrik analiz sonuçlarına göre belirlenmiştir. X ışını difraktometresi ile bijellerin kristalinitesi ve sıvı trigliseritlerin varlığı gösterilmiştir.
- Mekanik analiz sonuçlarına göre tüm oranlardaki bijellerin yapı olarak sertlik değerlerinde herhangi bir farklılık görülmemiştir.
- Sudan I ile yapılan analiz sonucunda, 70:30 (H:O) oranına ait bijelin morfolojik olarak düzgün ve eş boyutta küresel damlacıklar oluşturduğu gözlenmiş olup, kayma hızının artmasına bağlı olarak viskozitesinin azaldığı ve yayılabilirlik özelliğinin iyileştiği gözlenmiştir.
- Reolojik analiz ile bijellerin katı jel davranış sergiledikleri, G' değerlerinin G'' değerlerinden daha yüksek olması sonucunda viskoelastik davranış gösterdikleri belirlenmiştir.
- *In-vitro* sitotoksikite deneyleri, bijellerin tüm oranlarında toksik etki göstermediklerini ortaya koymuştur.
- Melatonin, oral yolla alınması durumunda, düşük biyoyararlanıma, kısa eliminasyona ve midede yan etkilere neden olduğu için bu çalışmada transdermal salım sisteminde kullanılabileceği öngörülmüş ve bu doğrultuda *in-vitro* salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir.
- PLGA nanopartiküller ikili emülsiyon yöntemi ile başarılı bir şekilde üretilmiştir.

- Üretilen melatonin yüklü partiküllerden enkapsülasyon verimi en yüksek (%18.6) olan nanopartiküller seçilmiş ve 70:30 (H:O) oranına ait bijellere yüklenerek melatoninin 15 gün boyunca *in-vitro* salımı incelenmiştir.

Elde edilen sonuçlar ışığında transdermal uygulamalarda kullanılmak üzere, PLGA nanopartiküllerden kontrollü melatonin salımı yapan, κ -carrageenan/ Aloe vera esaslı hidrojel ve Aloe vera yağı esaslı organojel içeren yenilikçi bir bijel sistemi geliştirilmiştir.

6. KAYNAKLAR

- [1] L. Zeng, X. Lin, P. Li, F.-Q. Liu, H. Guo, W.-H. Li, , Progress in Organic Coatings, 159 (2021) 106417.
- [2] V. Rastogi, P. Yadav, Asian J Pharm, 6 (2012) 161-170.
- [3] S. Dhiman, T.G. Singh, A.K. Rehni, Int J Pharm Pharm Sci, 3 (2011) 26-34.
- [4] K. Rehman, M.H. Zulfakar, Drug Dev Ind Pharm, 40 (2014) 433-440.
- [5] A. Kulawik-Pioro, M. Miastkowska, Int J Mol Sci, 22 (2021).
- [6] S. Mitura, A. Sionkowska, A. Jaiswal, J Mater Sci-Mater M, 31 (2020) 1-14.
- [7] H. Jarrar, D. Cetin Altindal, M. Gümüşderelioğlu, Int J Pharm, 600 (2021) 120489.
- [8] M.C. Carroll, M. Reilly, Intern Med., 1 (2021) 1-3.
- [9] D. Aeschbach, B.J. Lockyer, D.J. Dijk, S.W. Lockley, E.S. Nuwayser, L.D. Nichols, C.A. Czeisler, Clin Pharmacol Ther, 86 (2009) 378-382.
- [10] K. Almdal, J. Dyre, S. Hvidt, O. Kramer, Polymer gels and networks, 1 (1993) 5-17.
- [11] A.K. Nayak, B. Das, Polymeric gels, Elsevier (2018) , pp. 3-27.
- [12] S. Bhattacharya, R. Shunmugam, Journal of Macromolecular Science, Part A, 57 (2020) 906-926.
- [13] A. Kulawik-Pióro, M. Miastkowska, International Journal of Molecular Sciences, 22 (2021) 5124.
- [14] H. Chamkouri, M. Chamkouri, Am. J. Biomed. Sci. Res, 11 (2021) 485-493.
- [15] F. Ullah, M.B.H. Othman, F. Javed, Z. Ahmad, H.M. Akil, Materials Science and Engineering: C, 57 (2015) 414-433.
- [16] R.D. Kasai, D. Radhika, S. Archana, H. Shanavaz, R. Koutavarapu, D.-Y. Lee, J. Shim, International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, (2022) 1-11.
- [17] S. Bashir, M. Hina, J. Iqbal, A. Rajpar, M. Mujtaba, N. Alghamdi, S. Wageh, K. Ramesh, S. Ramesh, Polymers, 12 (2020) 2702.

- [18] A. Onaciu, R.A. Munteanu, A.I. Moldovan, C.S. Moldovan, I. Berindan-Neagoe, *Pharmaceutics*, 11 (2019) 432.
- [19] W. Bao, M. Li, Y. Yang, Y. Wan, X. Wang, N. Bi, C. Li, *Frontiers in chemistry*, 8 (2020) 53.
- [20] H. Shoukat, K. Buksh, S. Noreen, F. Pervaiz, I. Maqbool, *Therapeutic Delivery*, 12 (2021) 375-396.
- [21] C.L. Esposito, P. Kirilov, V.G. Roullin., *Journal of controlled release*, 271 (2018) 1-20.
- [22] T.C. Pinto, A.J. Martins, L. Pastrana, M.C. Pereira, M.A. Gels, 7 (2021) 86.
- [23] S. Sahoo, N. Kumar, C. Bhattacharya, S. Sagiri, K. Jain, K. Pal, S. Ray, B. Nayak, *Designed monomers and polymers*, 14 (2011) 95-108.
- [24] A. Vintiloiu, J.-C. Leroux,—a review, *Journal of controlled release*, 125 (2008) 179-192.
- [25] N.K. Mujawar, S.L. Ghatage, V.C. Yeligar , *Int J Pharm*, 4 (2014).
- [26] Z. Hu, T. Patten, R. Pelton, E.D. Cranston, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 3 (2015) 1023-1031.
- [27] V.K. Singh, D. Qureshi, S.K. Nayak, K. Pal, *Elsevier* (2018), pp. 265-282.
- [28] A. Shakeel, U. Farooq, T. Iqbal, S. Yasin, F.R. Lupi, D. Gabriele, *Materials Science and Engineering: C*, 97 (2019) 932-953.
- [29] A. Shakeel, F.R. Lupi, D. Gabriele, N. Baldino, B. De Cindio, *Soft Materials*, 16 (2018) 77-93.
- [30] S.P. Kodela, P.M. Pandey, S.K. Nayak, K. Uvanesh, A. Anis, K. Pal, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 66 (2017) 669-678.
- [31] F. Lupi, L. Gentile, D. Gabriele, S. Mazzulla, N. Baldino, B. De Cindio, *Journal of colloid and interface science*, 459 (2015) 70-78.
- [32] V. Andonova, P. Peneva, G.S. Georgiev, V.T. Toncheva, E. Apostolova, Z. Peychev, S. Dimitrova, M. Katsarova, N. Petrova, M. Kassarova, *International Journal of Nanomedicine*, 12 (2017) 6221.

- [33] I.F. Almeida, A. Fernandes, L. Fernandes, M. Pena Ferreira, P. Costa, M. Bahia, *Pharmaceutical development and technology*, 13 (2008) 487-494.
- [34] V.Y. Andonova, P.T. Peneva, E.G. Apostolova, T.D. Dimcheva, Z.L. Peychev, M.I. Kassarova, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 16 (2017) 1455-1463.
- [35] V.K. Singh, A. Anis, S. Al-Zahrani, D.K. Pradhan, K. Pal, *Int J Electrochem Sci*, 9 (2014) 5640-5650.
- [36] M.M. Ibrahim, S.A. Hafez, M.M. Mahdy, *asian journal of pharmaceutical sciences*, 8 (2013) 48-57.
- [37] S.S. Sagiri, V.K. Singh, S. Kulanthaivel, I. Banerjee, P. Basak, M. Battachrya, K. Pal, *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 43 (2015) 1-17.
- [38] B. Behera, S. Dey, V. Sharma, K. Pal, *Advances in Polymer Technology*, 34 (2015) 1-16.
- [39] K. Rehman, M.H. Zulfakar, *Pharmaceutical research*, 34 (2017) 36-48.
- [40] F.R. Lupi, A. Shakeel, V. Greco, C.O. Rossi, N. Baldino, D. Gabriele, *Materials Science and Engineering: C*, 69 (2016) 358-365.
- [41] A. Blumlein, J.J. McManus, *Journal of Materials Chemistry B*, 3 (2015) 3429-3435.
- [42] J. Necas, L. Bartosikova, *Carrageenan: a review, Veterinarni medicina*, 58 (2013) 1-10.
- [43] S. Hotchkiss, M. Brooks, R. Campbell, K. Philp, A. Trius, *ResearchGate* (2016) 229-243.
- [44] H. Cheng, X. Zhang, Z. Cui, S. Mao, *Elsevier* (2021), pp. 75-129.
- [45] K.M. Zia, S. Tabasum, M. Nasif, N. Sultan, N. Aslam, A. Noreen, M. Zuber, *International journal of biological macromolecules*, 96 (2017) 282-301.
- [46] M.M. Fouda, M. El-Aassar, G. El Fawal, E.E. Hafez, S.H.D. Masry, A. Abdel-Megeed, *International journal of biological macromolecules*, 74 (2015) 179-184.
- [47] L.R. Rane, N.R. Savadekar, P.G. Kadam, S.T. Mhaske, *J. Mater*, 2014 (2014) 1-8.
- [48] A.A. Maan, A. Nazir, M.K.I. Khan, T. Ahmad, R. Zia, M. Murid, M. Abrar, *The Journal of Herbal Medicine*, 12 (2018) 1-10.

- [49] P.K. Sahu, D.D. Giri, R. Singh, P. Pandey, S. Gupta, A.K. Shrivastava, A. Kumar, K.D. Pandey, *Pharmacology & Pharmacy*, 4 (2013) 599.
- [50] P. Pévet, Melatonin, *Dialogues in clinical neuroscience*, (2022) 1-10.
- [51] Y. Yonei, A. Hattori, K. Tsutsui, M. Okawa, B. Ishizuka, Effects of melatonin: Basics studies and clinical applications, *Anti-Aging Medicine*, 7 (2010) 85-91.
- [52] S. Filali, C. Bergamelli, M.L. Tall, D. Salmon, D. Laleye, C. Dhelens, E. Diouf, C. Pivot, F. Pirot, *Journal of pharmaceutical analysis*, 7 (2017) 237-243.
- [53] M. Eghbal, A. Eftekhari, E. Ahmadian, Y. Azarmi, A. Parvizpurs, *J Pharmacol Reports*, 1 (2016) 2.
- [54] I. Kostoglou-Athanassiou, *Therapeutic advances in endocrinology and metabolism*, 4 (2013) 13-24.
- [55] R.J. Reiter, Melatonin: clinical relevance, *Best practice & research clinical endocrinology & metabolism*, 17 (2003) 273-285.
- [56] S. Adepu, S. Ramakrishna, *Molecules*, 26 (2021) 5905.
- [57] P.T. Wong, S.K. Choi, Mechanisms of drug release in nanotherapeutic delivery systems, *Chemical reviews*, 115 (2015) 3388-3432.
- [58] W.Y. Jeong, M. Kwon, H.E. Choi, K.S. Kim, *Biomaterials research*, 25 (2021) 1-15.
- [59] D. Patel, S.A. Chaudhary, B. Parmar, N, *The pharma innovation*, 1 (2012) 66.
- [60] G. Singhvi, M. Singh, *Int J Pharm Stud Res*, 2 (2011) 77-84.
- [61] S. Dash, P.N. Murthy, L. Nath, P. Chowdhury, *Acta Pol Pharm*, 67 (2010) 217-223.
- [62] M.H. Shoaib, J. Tazeen, H.A. Merchant, R.I. Yousuf, *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 19 (2006) 119-124.
- [63] J. Siepmann, N.A. Peppas, *Advanced drug delivery reviews*, 64 (2012) 163-174.
- [64] A. Hixson, J. Crowell, , *Industrial & Engineering Chemistry*, 23 (1931) 923-931.
- [65] J. Siepmann, N.A. Peppas, *International journal of pharmaceuticals*, 418 (2011) 6-12.
- [66] V. Mohanraj, Y. Chen, *Tropical journal of pharmaceutical research*, 5 (2006) 561-573.

- [67] B. Nagavarma, H.K. Yadav, A. Ayaz, L. Vasudha, H. Shivakumar, Asian J Pharm Clin Res, 5 (2012) 16-23.
- [68] D. Panigrahi, P.K. Sahu, S. Swain, R.K. Verma, SN Applied Sciences, 3 (2021) 1-21.
- [69] R.L. McCall, R.W. Sirianni, JoVE (Journal of Visualized Experiments), (2013) 1-16.
- [70] A. Kumari, S.K. Yadav, S.C. Yadav, Colloids and surfaces B: biointerfaces, 75 (2010) 1-18.
- [71] J. Mudrić, K. Šavikin, S. Ibrić, J. Đuriš, Lekovite sirovine, 39 (2019) 76-83.
- [72] R.H. Staff, D. Schaeffel, A. Turshatov, D. Donadio, H.J. Butt, K. Landfester, K. Koynov, D. Crespy, Small, 9 (2013) 3514-3522.
- [73] H. Zheng, L. Mao, M. Cui, J. Liu, Y. Gao Food Hydrocolloid, 105 (2020) 105855.
- [74] B. Behera, S.S. Sagiri, K. Pal, K. Pramanik, U.A. Rana, I. Shakir, A. Anis, Polymer-Plastics Technology and Engineering, 54 (2015) 837-850.
- [75] S.Y. Ghan, L.F. Siow, C.P. Tan, K.W. Cheong, Y.Y. Thoo, Food Biophysics, 15 (2020) 386-395.
- [76] T. Samui, D. Goldenisky, J. Rosen-Kligvasser, M. Davidovich-Pinhas, Food Hydrocolloid, 113 (2021) 106416.
- [77] R. Hamed, N.N. Mahmoud, S.H. Alnadi, A.Z. Alkilani, G. Hussein, Drug Dev Ind Pharm, 46 (2020) 1705-1715.
- [78] B. Behera, S.S. Sagiri, V.K. Singh, K. Pal, A. Anis, Starch-Stärke, 66 (2014) 865-879.
- [79] R. van Dijkhuizen-Radersma, S. Hesselting, P. Kaim, K. De Groot, J. Bezemer, Biomaterials, 23 (2002) 4719-4729.
- [80] F. Ramazani, W. Chen, C.F. van Nostrum, G. Storm, F. Kiessling, T. Lammers, W.E. Hennink, R.J. Kok, International journal of pharmaceutics, 499 (2016) 358-367.
- [81] H. Jarrar, D.Ç. Altındal, M. Gümüşderelioğlu, International Journal of Pharmaceutics, 600 (2021) 120489.

- [82] S.R. Paul, D. Qureshi, Y. Yogalakshmi, S.K. Nayak, V.K. Singh, I. Syed, P. Sarkar, K. Pal, *Journal of Surfactants and Detergents*, 21 (2018) 17-29.
- [83] I. Kaushik, A. Jain, R. Grewal, S. Siddiqui, R. Gahlot, R. Anju, *MOJ Food Process. Technol*, 4 (2017) 66-72.
- [84] T. RAO, P. CHVS, *Int J Curr Pharm Res*, 13 (2021) 12-17.
- [85] A. Martín-Illana, F. Notario-Pérez, R. Cazorla-Luna, R. Ruiz-Caro, M.C. Bonferoni, A. Tamayo, M.D. Veiga, *Drug Discovery Today*, (2021) 1-20.
- [86] C. Burusapat, M. Supawan, C. Pruksapong, A. Pitiseree, C. Suwantemee, *Plastic and reconstructive surgery*, 142 (2018) 217-226.
- [87] P. Talele, S. Sahu, A.K. Mishra, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 172 (2018) 517-525.
- [88] S.M. Mihaila, A.K. Gaharwar, R.L. Reis, A.P. Marques, M.E. Gomes, A. Khademhosseini, *Advanced healthcare materials*, 2 (2013) 895-907.
- [89] B. Behera, V. Singh, S. Kulanthaivel, M. Bhattacharya, K. Paramanik, I. Banerjee, K. Pal, *European Polymer Journal*, 64 (2015) 253-264.
- [90] Q. Zhu, J. Gao, L. Han, K. Han, W. Wei, T. Wu, J. Li, M. Zhang, *Food Chemistry*, 365 (2021) 130419.
- [91] D. Bajer, K. Janczak, K. Bajer, *Journal of Polymers and the Environment*, 28 (2020) 1021-1039.
- [92] K. Khezri, M. Saeedi, K. Morteza-Semnani, J. Akbari, A. Hedayatizadeh-Omran, *Nanomedicine, and Biotechnology*, 49 (2021) 38-47.
- [93] K. Rehman, M.C.I.M. Amin, M.H. Zulfakar, *Journal of oleo science*, (2014) 1-16.
- [94] W. Qin, Y. He, Z. Guo, L. Zhang, L. Wu, X. Yin, S. Shakya, A. Maharjan, Y. Tang, W. Zhu, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14 (2019) 174-182.
- [95] R. Hamed, A.a. AbuRezeq, O. Tarawneh, , *Drug Dev Ind Pharm*, 44 (2018) 1488-1497.
- [96] D. Golodnizky, M. Davidovich-Pinhas, *Foods*, 9 (2020) 1857.
- [97] E. Algin Yapar, S. Tuncay Tanriverdi, G. Aybar Tural, Z.P. Gümüş, E. Turunc, E.H. Gokce, *Drug Dev Ind Pharm*, 46 (2020) 1639-1646.

- [98] S. Svenson, R.K. Prud'homme, Springer Science & Business Media (2012)-1-16
- [99] F. Danhier, E. Ansorena, J.M. Silva, R. Coco, A. Le Breton, V. Pr at, Journal of controlled release, 161 (2012) 505-522.
- [100] C.-G. Keum, Y.-W. Noh, J.-S. Baek, J.-H. Lim, C.-J. Hwang, Y.-G. Na, S.-C. Shin, C.-W. Cho, International journal of nanomedicine, 6 (2011) 2225.
- [101] T. Musumeci, C. Bucolo, C. Carbone, R. Pignatello, F. Drago, G. Puglisi, Int J Pharmaceut, 440 (2013) 135-140.
- [102] R. Bodmeier, Polymer International, 66 (2017) 1448-1455.
- [103] D.L. Cooper, S. Harirforoosh, D, PloS one, 9 (2014) 1-8
- [104] D.R. Marques, L.A.d. Santos, L.F. Schopf, J.C.S.d. Fraga, Analysis of Pol meros, 23 (2013) 579-584.
- [105] H. Testereci, G. Akın- ktem, Z.  ktem, e, Reactive and Functional Polymers, 61 (2004) 183-189.
- [106] H.S. Mansur, C.M. Sadahira, A.N. Souza, A.A. Mansur, Materials Science and Engineering: C, 28 (2008) 539-548.
- [107] X. Huang, C.S. Brazel, Journal of controlled release, 73 (2001) 121-136.
- [108] V. Vanoli, G. Massobrio, F. Pizzetti, A. Mele, F. Rossi, F. Castiglione, ACS omega, 7 (2022) 42845-42853.
- [109] G. Ruan, S.S. Feng, , Biomaterials, 24 (2003) 5037-5044.
- [110] K. Avgoustakis, A. Beletsi, Z. Panagi, P. Klepetsanis, A.G. Karydas, D.S. Ithakissios, J Control Release, 79 (2002) 123-135.
- [111] T. Higuchi, J Pharm Sci-US, 52 (1963) 1145-&.

Ek 1- Melatonin Yüklü PLGA Nanopartiküllerden Salınan Melatoninin Kümülatif Salım Değerlerinin Hesaplanması

Melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerden kümülatif melatonin salımının hesaplanması amacıyla *in-vitro* salım deneyleri gerçekleştirilmiştir. Salım deneyleri 10 mL PBS (pH:5.5) membran ortamı içerisinde yürütülmüştür. Salım ortamı belirli aralıklarla taze PBS ortamı ile değiştirilmiştir. Bu amaçla melatonin yüklü PLGA nanopartikül ile membran ortamı arasındaki derişim oranı sabit tutulmaya çalışılmıştır. Örnek olarak birinci paralele ait melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerden salınan melatonin'e ait kümülatif salım hesaplamaları aşağıda gösterilmiştir. Kalibrasyon grafiği kullanılarak kalibrasyon denklemi elde edilmiş ve absorbans değerleri denklemde yerine yazılarak derişim değerleri bulunmuştur.

Kullanılan kalibrasyon denklemi

$$y=3.093*x$$

Salım ortamı: 10 mL PBS

Yenilenen hacim: 900 μ L

Örnek t: 1. Gün

Absorbans: 0.081

$$C=0.081/ 3.093=0.02619 \text{ mg/mL}$$

$$\text{Salınan melatonin miktarı}=0.02619 \text{ mg/mL} *10 \text{ mL}=0.2619 \text{ mg}$$

$$\text{Atılan melatonin miktarı}=0.2619 \text{ mg}*0.09=0.0236 \text{ mg}$$

$$\text{Toplam melatonin miktarı}=(0.2619+(0+0.0198+0.0195+0.0230+0.0233))\text{mg}=0.3474\text{mg}$$



Önceden atılan melatonin miktarı

$$\text{Kümülatif Salım (\%)} = (100*0.3474 \text{ mg}) / 1 \text{ mg}=\% 34.74$$

Melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerden melatonin salımına ait değerler Çizelge 7.1'de verilmiştir.

Çizelge 7.1. Melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerden melatonin salımına ait değerler (1. paralel için).

Zaman (gün)	Absorbans	C (mg/mL)	Salınan MEL (mg)	Atilan MEL (mg)	Toplam MEL (mg)	Kümülatif salım (%)
0	0	0	0	0	0	0
0.04	0.068	0.0220	0.2199	0.0198	0.2199	21.9851
0.12	0.067	0.0217	0.2166	0.0195	0.2364	23.6405
0.21	0.079	0.0255	0.2554	0.0230	0.2947	29.4698
0.29	0.08	0.0259	0.2586	0.0233	0.3209	32.0918
1	0.081	0.0262	0.2619	0.0236	0.3474	34.7430
2	0.078	0.0252	0.2522	0.0227	0.3613	36.1300
3	0.070	0.0226	0.2263	0.0204	0.3581	35.8131
4	0.067	0.0217	0.2166	0.0195	0.3688	36.8801
5	0.062	0.0200	0.2005	0.0180	0.3721	37.2131
7	0.058	0.0188	0.1875	0.0169	0.3772	37.7239
9	0.053	0.0171	0.1714	0.0154	0.3780	37.7950
11	0.050	0.0162	0.1617	0.0145	0.3837	38.3673
13	0,046	0.0149	0.1487	0.0134	0.3853	38.5289
15	0.044	0.0142	0.1423	0.0128	0.3922	39.2208

EK 2- Melatonin Yüklü PLGA Nanopartikül İçeren Bijellerden Salınan Melatoninin Kümülatif Salım Değerlerinin Hesaplanması

Melatonin yüklü PLGA nanopartikül içeren bijellerden kümülatif melatonin salımının hesaplanması amacıyla *in-vitro* salım deneyleri gerçekleştirilmiştir. Salım deneyleri 10 mL PBS (pH:5.5) membran ortamı içerisinde yürütülmüştür. Salım ortamı belirli aralıklarla taze PBS ortamı ile değiştirilmiştir. Bu amaçla melatonin yüklü PLGA nanopartikül ile membran ortamı arasındaki derişim oratımı sabit tutulmaya çalışılmıştır. Örnek olarak birinci paralele ait melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerden salınan melatonin'e ait kümülatif salım hesaplamaları aşağıda gösterilmiştir. Kalibrasyon grafiği kullanılarak kalibrasyon denklemi elde edilmiş ve absorbans değerleri denklemde yerine yazılarak derişim değerleri bulunmuştur.

Kullanılan kalibrasyon denklemi

$$y=3.093*x$$

Salım ortamı: 10 mL PBS

Yenilenen hacim: 900 μ L

Örnek t: 1. Gün

Absorbans: 0.01

$$C=0.01/3.093=0.00323 \text{ mg/mL}$$

$$\text{Salınan melatonin miktarı}=0.00323 \text{ mg/mL} * 10 \text{ mL}=0.0323 \text{ mg}$$

$$\text{Atılan melatonin miktarı}=0.0323 \text{ mg} * 0.09=0.0029 \text{ mg}$$

$$\text{Toplam melatonin miktarı}=(0.0323+(0+0.0041+0.0041+0.0041+0.0041))\text{mg}=0.0486\text{mg}$$

Önceden atılan melatonin miktarı

$$\text{Kümülatif Salım (\%)}=(100*0.0486 \text{ mg}) / 1 \text{ mg} = \% 4.86$$

Melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerden melatonin salımına ait değerler Çizelge 7.2'de verilmiştir.

Çizelge 7.2. Melatonin yüklü PLGA nanopartikül içeren bijellerden melatonin salımına ait değerler (2. paralel için).

Zaman (gün)	Absorbans	C (mg/mL)	Salınan MEL (mg)	Atılan MEL (mg)	Toplam MEL (mg)	Kümülatif salım (%)
0	0	0	0	0	0	0
0.04	0.014	0.0045	0.0453	0.0041	0.0453	4.5263
0.12	0.014	0.0045	0.0453	0.0041	0.0493	4.9337
0.21	0.014	0.0045	0.0453	0.0041	0.0534	5.3411
0.29	0.014	0.0045	0.0453	0.0041	0.0575	5.7485
1	0.010	0.0032	0.0323	0.0029	0.0486	4.8626
2	0.008	0.0026	0.0259	0.0023	0.0451	4.5070
3	0.014	0.0045	0.0453	0.0041	0.0668	6.6796
4	0.008	0.0026	0.0259	0.0023	0.0515	5.1471
5	0.007	0.0023	0.0226	0.0020	0.0506	5.0566
7	0.009	0.0029	0.0291	0.0026	0.0591	5.9069
9	0.012	0.0039	0.0388	0.0035	0.0714	7.1387
11	0.015	0.0048	0.0485	0.0044	0.0846	8.4578
13	0.012	0.0039	0.0388	0.0035	0.0792	7.9243
15	0.012	0.0039	0.0388	0.0035	0.0827	8.2735

EK 3- Serbest Melatonin Yüklü Bijellerden Salınan Melatoninin Kümülatif Salım Değerlerinin Hesaplanması

Serbest melatonin yüklü bijellerden kümülatif melatonin salımının hesaplanması amacıyla *in-vitro* salım deneyleri gerçekleştirilmiştir. Salım deneyleri 10 mL PBS (pH:5.5) membran ortamı içerisinde yürütülmüştür. Salım ortamı belirli aralıklarla taze PBS ortamı ile değiştirilmiştir. Bu amaçla melatonin yüklü PLGA nanopartikül ile membran ortamı arasındaki derişim ortamı sabit tutulmaya çalışılmıştır. Örnek olarak birinci paralele ait melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerden salınan melatonine ait kümülatif salım hesaplamaları aşağıda gösterilmiştir. Kalibrasyon grafiği kullanılarak kalibrasyon denklemi elde edilmiş ve absorbans değerleri denklemde yerine yazılarak derişim değerleri bulunmuştur.

Kullanılan kalibrasyon denklemi

$$y=3.093*x$$

Salım ortamı: 10 mL PBS

Yenilenen hacim : 900 μ L

Örnek t: 1. Gün

Absorbans: 0.077

$$C=0.077/3.093=0.02489 \text{ mg/mL}$$

$$\text{Salınan melatonin miktarı}=0.02489 \text{ mg/mL} * 10 \text{ mL}=0.2489 \text{ mg}$$

$$\text{Atılan melatonin miktarı}=0.2489 * 0.09 = 0.0224 \text{ mg}$$

$$\text{Toplam melatonin miktarı}=(0.2489+(0+0.0207+0.0265+0.0247+0.0239))\text{mg}=0.3447\text{mg}$$



Önceden atılan melatonin miktarı

$$\text{Kümülatif Salım (\%)}: (100*0.3447\text{mg})/1=\% 34.47$$

Serbest melatonin yüklü bijellerden melatonin salımına ait değerler Çizelge 7.3'de verilmiştir.

Çizelge 7.3. Serbest melatonin yüklü bijellerden melatonin salımına ait değerler (3. paralel için).

Zaman (gün)	Absorbans	C mg/mL	Salınan MEL (mg)	Atılan MEL (mg)	Toplam MEL (mg)	Kümülatif salım (%)
0	0	0	0	0	0	0
0.04	0.071	0.0230	0.2296	0.0207	0.2296	22.9551
0.12	0.091	0.0294	0.2942	0.0265	0.3149	31.4872
0.21	0.085	0.0275	0.2748	0.0247	0.3220	32.1953
0.29	0.082	0.0265	0.2651	0.0239	0.3370	33.6987
1	0.077	0.0249	0.2489	0.0224	0.3447	34.4682
2	0.064	0.0207	0.2069	0.0186	0.3251	32.5057
3	0.061	0.0197	0.1972	0.0177	0.3340	33.3980
4	0.053	0.0171	0.1714	0.0154	0.3259	32.5865
5	0.048	0.0155	0.1552	0.0140	0.3251	32.5121
7	0.045	0.0145	0.1455	0.0131	0.3294	32.9389
9	0.043	0.0139	0.1390	0.0125	0.3360	33.6017
11	0.034	0.0110	0.1099	0.0099	0.3194	31.9431
13	0.034	0.0110	0.1099	0.0099	0.3293	32.9324
15	0.03	0.0097	0.0970	0.0087	0.3263	32.6285