



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ADANA ALPARSLAN TÜRKER BİLİM VE TEKNOLOJİ
ÜNİVERSİTESİ**

**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**HİDROKSİTİROZOLCE ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ ZEYTİN YAPRAĞI
SIVI EKSTRAKTININ PRONİOZOMAL ENKAPSÜLASYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

**BETÜL KILINÇLI
DOKTORA TEZİ**



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ADANA ALPARSLAN TÜRKES BİLİM VE TEKNOLOJİ
ÜNİVERSİTESİ**

**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**HİDROKSİTİROZOLCE ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ ZEYTİN YAPRAĞI
SIVI EKSTRAKTININ PRONİOZOMAL ENKAPSÜLASYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

**BETÜL KILINÇLI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
PROF. DR. PINAR KADİROĞLU KELEBEK**

ADANA, 2025

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak, bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın hazırladığım bu tez çalışmada;

Bu tezin özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin akademik kurallara ve etik davranışa uygun olarak elde edilerek sunulduğunu beyan ederim. Ayrıca, tez kapsamında bu kuralların ve davranışların gerektirdiği şekilde bu çalışmaya özgün olmayan tüm veri ve bilgiler için bilimsel etik ve gelenek çerçevesinde kaynak gösterdiğimi; bu kaynakları da kaynakçada belirttiğimi beyan ederim. Çalışmam ile ilgili yaptığım beyana aykırı bir durum saptanması halinde tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

29/12/2025

[İmza]

Betül KILINÇLI

ÖZET

HİDROKSİTİROZOLCE ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ ZEYTİN YAPRAĞI SIVI EKSTRAKTININ PRONIOZOMAL ENKAPSÜLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Betül KILINÇLI

Doktora, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Pınar KADİROĞLU KELEBEK

Aralık 2025, 321 sayfa

Bu çalışma, hidroksitirozol içeriği zenginleştirilmiş fermente zeytin yaprağı sıvısının liyofilize ekstraktının biyoaktif özelliklerinin korunması amacıyla proniozomal sistemler içerisinde enkapsülasyonunu incelemektedir. Proniozomlar, suyla temas ettiğinde kendiliğinden niozomlara dönüşebilen, kuru ve akışkan öncü yapılardır. Klasik lipozom ve niozom sistemlerine kıyasla geliştirilmiş stabilite, kontrollü salım ve uzun raf ömrü gibi belirgin üstünlükler ortaya koymaktadır. Bu özellikleri sayesinde proniozomal yapılar, ısıya ve oksidasyona duyarlı fenolik bileşiklerin taşınmasında etkili bir taşıyıcı sistem olarak değerlendirilmektedir.

Hazırlanan proniozomal formülasyonlar fizikokimyasal, morfolojik ve aroma karakterizasyonları açısından kapsamlı şekilde analiz edilmiştir. XRD verileri enkapsülasyon sonrası kısmi amorfizasyonu göstermiştir. DSC analizleri endotermik piklerde kaymayı göstererek termal stabilitenin arttığını ortaya koymuştur. SEM ve AFM görüntüleri homojen yüzey morfolojisi ve nanometrik boyut dağılımı (ortalama partikül boyutu $\sim 270 \pm 15$ nm, zeta potansiyeli -32 ± 2 mV) sergilemiştir.

Antioksidan aktivite DPPH ve ABTS yöntemleriyle değerlendirilmiş; DPPH testinde proniozomal formülasyonlar serbest ekstrakta göre anlamlı şekilde yüksek radikal süpürme kapasitesi göstermiştir ($p < 0,05$), ABTS aktivitesi ise konsantrasyonla doğrusal ilişki sergilememiştir. Antimikrobiyal testlerde belirgin inhibisyon gözlenmemiştir. Proniozomların enkapsülasyon etkinliği depolama süresinin ilk haftasında azalmış, sonrasında stabil kalmıştır.

Anahtar Kelimeler: enkapsülasyon etkinliği, hidroksitirozol, ilaç taşıyıcı sistem, proniozom, stabilite

ABSTRACT

PRNIOosomal ENCAPSULATION AND CHARACTERIZATION OF A HYDROXYTYROSOL-ENRICHED OLIVE LEAF LIQUID EXTRACT

Betül KILINÇLI

PhD, Food Engineering of Department

Supervisor: Prof. Dr. Pınar KADİROĞLU KELEBEK

December 2025, 321 pages

This study investigates the encapsulation of the lyophilized extract of fermented olive leaf brine, enriched in hydroxytyrosol, within proniosomal systems to preserve its bioactive properties. Proniosomes are dry, free-flowing precursor structures that spontaneously convert into niosomes upon contact with water. Compared to conventional liposomal and niosomal systems, they offer distinct advantages, including enhanced stability, controlled release, and prolonged shelf-life. These features make proniosomal structures an effective carrier system for thermally and oxidatively sensitive phenolic compounds.

The prepared proniosomal formulations were comprehensively analyzed in terms of physicochemical, morphological, and aroma characteristics. XRD results indicated partial amorphization occurring after encapsulation. DSC analyses revealed shifts in endothermic peaks, indicating enhanced thermal stability. SEM and AFM images demonstrated a homogeneous surface morphology and nanoscale particle size distribution (average particle size $\sim 270 \pm 15$ nm, zeta potential -32 ± 2 mV).

Antioxidant activity was evaluated using DPPH and ABTS assays; in the DPPH assay, proniosomal formulations exhibited significantly higher radical scavenging capacity compared to the free extract ($p < 0.05$), whereas ABTS activity did not show a linear relationship with concentration. No significant inhibition was observed in antimicrobial tests. The encapsulation efficiency of proniosomes decreased during the first week of storage and remained stable thereafter.

Keywords: encapsulation efficiency, hydroxytyrosol, drug delivery system, proniosome, stability, fermented olive leaf brine extract

TEŞEKKÜR

Öncelikli olarak doktora tez çalışmam süreci boyunca sabır, anlayış ve sistemli bir çalışma disiplini, bilgi paylaşımının sağladığı katkılar ile bana rehberlik eden Prof. Dr. Pınar KADİROĞLU KELEBEK'e teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmam süresince bilgi deneyimleri ile Tez İzleme Komiteme değerli katkılar sağlayan saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Serkan SELLİ ve Doç. Dr. Ali Emrah ÇETİN'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Doktora çalışmam boyunca Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Mühendislik Fakültesi'ndeki laboratuvar ve araştırma olanaklarından yararlanmama kayıtsız destek veren kıymetli hocalara ve lisansüstü öğrencilere teşekkür ederim.

En içten teşekkürlerimi, neşesiyle daima motivasyonumu artıran anneme ve her zaman kendine has destekleriyle yanımda olan babama iletiyorum.

Bu tez çalışması, Yükseköğretim Kurulu'nun (YÖK) 100/2000 Doktora Burs Programı kapsamında, "Hijyen, Sanitasyon ve Gıda Güvenliği" öncelikli alanında yürütülmüştür. Çalışmanın finansal olarak desteklenmesinden dolayı, "Biyoteknolojik İlaç Sistemleri" öncelikli alanında TÜBİTAK BİDEB 2211-C burs programına ve 221O046 proje numaralı 3501 Kariyer Geliştirme Programı desteği için TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Betül

İÇİNDEKİLER

JÜRİ ONAY SAYFASI	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANNAMESİ	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Fenolik Bileşikler: Yapı ve Fonksiyon	3
2.1.1. Genel tanım ve sınıflandırma	3
2.1.2. Yapı ve fonksiyon ilişkisi	5
2.2. Fenolik Bileşiklerin Stabilite ve Biyoyararlanımı	7
2.2.1. Stabiliteyi etkileyen faktörler	7
2.2.2. Biyoyararlanımı etkileyen faktörler	9
2.3. Hidroksitirozol: Yapı ve Biyolojik Özellikler	10
2.3.1. Kimyasal ve yapısal özellikler	10
2.3.2. Analitik tespit ve elde edilme yöntemleri	11
2.3.3. Biyolojik aktivite ve stabilite	17
2.4. Nanoteknolojik Taşıyıcı Sistemler	20
2.4.1. Taşıyıcı sistemler: Sınıflandırma ve üretim	20
2.5. Nanoteknoloji Uygulamaları: Gıda Bilimi	23
2.5.1. Gıda sektöründe nanosistemler	24
2.5.2. Enkapsülasyonun fonksiyonel ve biyolojik etkileri	28

2.5.3.	Lipozom	30
2.5.4.	Niozom	32
2.6.	Proniozomlar: Yapı ve Fonksiyon	42
2.6.1.	Yapısal özellikler	43
2.6.2.	Formülasyon bileşenleri	44
2.6.3.	Üretim yöntemleri	54
2.6.4.	Fizikokimyasal karakterizasyon parametreleri	56
2.6.4.1.	Proniozomlardan niozom hazırlanması	56
2.6.4.2.	Partikül boyutu ve polidispersidite indeksi	59
2.6.4.3.	Yüzey yükü ve stabilite	63
2.6.4.4.	Enkapsülasyon etkinliği	67
2.6.4.5.	Moleküler yapı ve etkileşimler	69
2.6.4.6.	Termal özellikler ve faz geçişleri	73
2.6.4.7.	Kristal yapı ve düzenlilik	74
2.6.4.8.	Yüzey morfolojisi ve topografi	76
2.6.5.	Fonksiyonel ve biyolojik performans	79
2.6.5.1.	Antioksidan aktivite	79
2.6.5.2.	Antimikrobiyal aktivite	81
2.6.5.3.	Uçucu bileşiklerin belirlenmesi	84
2.6.6.	Depolama ve stabilite	85
2.6.6.1.	Depolama koşullarının etkileri	85
2.6.6.2.	Depolama boyunca fizikokimyasal değişimler	86
3.	MATERYAL VE METOT	88
3.1.	Materyaller	88
3.1.1.	Ön denemelerde kullanılan örnekler	88
3.1.1.1.	Kurutulmuş zeytin yaprağı (KZY)	89
3.1.1.2.	Zeytin yaprağı ekstraktı (ZYE)	89

3.1.1.3.	Fermente zeytin yapraklarının liyofilize ekstraktı (FZYE)	90
3.1.1.4.	Fermentasyon sıvısından elde edilen hidroksitirozol içeriği zenginleştirilmiş liyofilize ekstrakt (HZYE)	91
3.1.2.	Ekstrakt seçiminde uygulanan işlemler	91
3.1.2.1.	Ekstrakt eldesi	91
3.1.2.2.	Hidroksitirozol miktarının HPLC ile tayini	92
3.2.	Proniozomal Sistemler: Hazırlık ve Formülasyon Geliştirme	93
3.2.1.	Bileşen seçimi ve formülasyon geliştirme	94
3.2.2.	Hidrasyon-santrifüj koşullarının optimize edilmesi	98
3.2.3.	Kolesterol içeren proniozomal formülasyonların hazırlanması	101
3.2.4.	Kolesterol yerine dodekanol kullanılarak formülasyonların hazırlanması	103
3.3.	Optimum Formülasyonun Seçilmesi ve Rotavapor Koşulları	105
3.3.1.	Rotavapor koşullarının belirlenmesi	105
3.3.2.	Enkapsülasyon etkinliğinin hesaplanması	106
3.3.3.	Partikül boyutu dağılımı ve polidispersidite indeksinin DLS ile analizi	107
3.3.4.	Zeta potansiyelin elektroforetik hareket ölçümü ile belirlenmesi	108
3.4.	Fizikokimyasal Karakterizasyon	110
3.4.1.	Nem içeriğinin gravimetrik analiz ile belirlenmesi	111
3.4.2.	Kimyasal yapı ve moleküler etkileşimlerin FTIR ile analizi	112
3.4.3.	Termal karakterizasyonun DSC ile analizi	113
3.4.4.	Kristallik ve yapısal düzenliliğin XRD ile belirlenmesi	115
3.4.5.	Yüzey morfolojisi ve topografinin SEM ile analizi	116
3.4.6.	Yüzey morfolojisi ve topografinin AFM ile analizi	116
3.5.	Fonksiyonel ve Biyolojik Etkinlik	118
3.5.1.	Antioksidan aktivitenin analizi	118
3.5.1.1.	DPPH yöntemi ile antioksidan aktivite analizi	119
3.5.1.2.	ABTS yöntemi ile antioksidan aktivitenin belirlenmesi	120

3.5.2.	Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi	121
3.5.3.	Uçucu bileşiklerin profil değişimlerinin SPME-GC-FID ile analizi	122
3.6.	Depolama Stabilitesi	123
3.6.1.	Enkapsülasyon etkinliğinin depolama süresince analizi	124
3.6.2.	Partikül boyutu ve polidispersidite indeksinin depolama süresince analizi	124
3.6.3.	Renk değişimlerinin CIE Lab parametreleri ile belirlenmesi	125
3.7.	İstatistiksel Analizler	125
3.7.1.	Kullanılan testler ve parametreler	126
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA	127
4.1.	Nihai Proniozomal Formülasyonun Seçimi ve Analitik Değerlendirme Sonuçları	127
4.1.1.	Hidroksitirozol içeriği zenginleştirilmiş ekstraktın belirlenmesi	127
4.1.2.	Formülasyonda kullanılan ekstraktın seçimi	127
4.1.3.	Proniozom deneme üretimlerinde ekstrakt kullanımının değerlendirilmesi	129
4.1.4.	Deneme üretimlerinde enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi	130
4.2.	Proniozomal Formülasyonların Optimizasyon Sonuçları	134
4.2.1.	Kolesterol içeren proniozom formülasyonlarının ekstrakt yüklemesi ve lipid faz oranı optimizasyon sonuçları	134
4.2.2.	Kolesterol yerine dodekanol içerikli proniozom formülasyonlarının karakterizasyon ve optimizasyon sonuçları	143
4.2.3.	Nihai proniozomal formülasyonun rotavapor ve proses parametreleri bazında optimizasyon sonuçları	145
4.3.	Optimum Koşullarda Üretilen Proniozomal Formülasyonun Karakterizasyonu	150
4.3.1.	Partikül boyutu ve polidispersidite indeksinin belirlenmesi	150
4.3.2.	Zeta potansiyel analiz sonuçlarının değerlendirilmesi	152
4.3.3.	Enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi	154
4.4.	Fizikokimyasal Karakterizasyon Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi	156
4.4.1.	Nem içeriği analiz sonuçlarının değerlendirilmesi	156

4.4.2.	FTIR kimyasal yapı ve moleküler etkileşim sonuçlarının değerlendirilmesi	157
4.4.3.	DSC termal karakterizasyon sonuçlarının değerlendirilmesi	165
4.4.4.	XRD kristallik ve yapısal düzenlilik sonuçlarının değerlendirilmesi	170
4.4.5.	Yüzey morfolojisi ve topografi analiz sonuçları	181
4.4.5.1.	SEM analizi sonuçları	181
4.4.5.2.	AFM analizi sonuçları	185
4.5.	Fonksiyonel ve Biyolojik Etkinlik	190
4.5.1.	Antioksidan aktivite analiz sonuçları	190
4.5.2.	Antimikrobiyal aktivite sonuçları	196
4.5.3.	Uçucu bileşik profili analiz sonuçları (SPME-GC-FID)	199
4.6.	Depolama Süresi Boyunca Stabilite Değerlerinin Belirlenmesi	205
4.6.1.	Enkapsülasyon etkinliği sonuçları	209
4.6.2.	Partikül boyutu ve PDI değeri sonuçları	212
4.6.3.	Renk değişimi analiz sonuçları	216
5.	SONUÇLAR	222
6.	ÖNERİLER	224
	KAYNAKÇA	226
	ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Mikro ve nanokapsül sınıflandırması	23
Şekil 2.2. Klasik, tek katmanlı ve küresel lipozomların şematik gösterimi	31
Şekil 2.3. Niozomların boyut ve lamel yapısına göre sınıflandırılması	34
Şekil 2.4. Niozom ve bilozomların yapısal gösterimi	36
Şekil 2.5. Niozomun veziküler yapısı	46
Şekil 2.6. Kritik paketlenme parametresine (CPP) göre molekül yapı morfolojileri	49
Şekil 2.7. Span 60 ve kolesterolün moleküler etkileşimi	50
Şekil 2.8. Proniozom üretim yöntemleri ve aşamaları	54
Şekil 2.9. Proniozomdan niozom hazırlanması	58
Şekil 2.11. Partikül yüzeyinde oluşan elektriksel tabaka	65
Şekil 3.1. Proniozom üretimi	93
Şekil 3.2. Proniozomlarda kullanılan örnekler	95
Şekil 4.1. Zeytin yaprağı tozu	127
Şekil 4.2. Zeytin yaprağı tozu içeren proniozomal örnek	128
Şekil 4.3. F _{SIVI} UDE liyofilize ekstraktı içeren proniozomal örnek	128
Şekil 4.4. F37 numaralı örneğe ait enkapsülasyon etkinliği değerleri	131
Şekil 4.5. F ₃₀₀ 45 dk ultrasantrifüj edilen ve F ₂₅₀ 45 dk ultrasantrifüj edilen örneklere ait kromatogram görüntüsü	137
Şekil 4.6. F ₃₀₀ 30 dk ultrasantrifüj edilen ve F ₂₅₀ 30 dk ultrasantrifüj edilen örneklere ait kromatogram görüntüsü	138
Şekil 4.7. F ₃₀₀ 10 dk ultrasantrifüj edilen ve F ₂₅₀ 30 dk ultrasantrifüj edilen örneklere ait kromatogram görüntüsü	138
Şekil 4.8. F ₃₀₀ 45 dk ultrasantrifüj edilen ve F ₃₀₀ 30 dk ultrasantrifüj edilen örneklere ait kromatogram görüntüsü	139
Şekil 4.9. F ₃₀₀ 10 dk ultrasantrifüj edilen ve F ₃₀₀ 45 dk ultrasantrifüj edilen örneklere ait kromatogram görüntüsü	140
Şekil 4.10. F ₂₀₀ ve F ₁₅₀ örneklerine ait kromatogram görüntüsü	140
Şekil 4.11. F ₁₀₀ ve F ₅₀ örneklerine ait kromatogram görüntüsü	141
Şekil 4.12. P4 örneğine ait partikül boyutu analiz sonucu	144

Şekil 4.13. Proniozom örneğine ait zeta potansiyel değeri	152
Şekil 4.14. Örneklere ait kıyaslamalı FTIR spektrumları	160
Şekil 4.15. <i>Lb. plantarum</i> ATCC 14917 ile fermente edilen sıvı kısmının ekstraksiyon sonrasında liyofilize edilen kısmına (ekstrakt) ait FTIR spektrumu	161
Şekil 4.16. Kontrole ait FTIR spektrumu.....	162
Şekil 4.17. Proniozoma ait FTIR spektrum.....	163
Şekil 4.18. Proniozom, ekstrakt ve kontrol DSC grafikleri	166
Şekil 4.19. Ekstrakta ait DSC grafiği	167
Şekil 4.20. Kontrole ait DSC grafiği.....	168
Şekil 4.21. Proniozoma ait DSC grafiği.....	169
Şekil 4.22. Ekstrakta ait XRD difraktogramı	171
Şekil 4.23. Kontrole ait XRD difraktogramı	171
Şekil 4.24. Kontrol, proniozom ve ekstrakta ait XRD difraktogramları.....	172
Şekil 4.25. Ekstrakta ait kristal boyutu dağılımı	178
Şekil 4.26. Kontrole ait kristal boyutu dağılımı.....	179
Şekil 4.27. Proniozoma ait kristal boyutu dağılımı.....	180
Şekil 4.28. Ekstrakt ve maltodekstrine ait SEM görüntüleri.....	183
Şekil 4.29. Kontrole ait SEM görüntüleri	183
Şekil 4.30. Proniozoma ait SEM görüntüleri	184
Şekil 4.31. AFM görüntüleri	186
Şekil 4.32. AFM görüntülerinin profil çizgisi ile birlikte gösterimi	188
Şekil 4.33. Proniozomların DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi.....	192
Şekil 4.34. Proniozomların ABTS serbest radikal süpürme aktivitesi.....	193
Şekil 4.35. Proniozom ve negatif kontrolün kuyucuk agar difüzyon yöntemi ile <i>E. coli</i> ATCC 25922 üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi.....	196
Şekil 4.36. Proniozomun farklı konsantrasyonlarda <i>B. subtilis</i> ATCC 11774 üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi.....	198
Şekil 4.37. 4 °C’de depolanan proniozom ve kontrol örneklerinin partikül boyutu değişimi	208
Şekil 4.38. 21 °C’de depolanan proniozom ve kontrol örneklerinin partikül boyutu değişimi	208
Şekil 4.39. 4 °C ve 21 °C’de depolamanın proniozom formülasyonlarının enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi	211

Şekil 4.40. Proniozom ve kontrol örneklerinin 4 °C’de depolama süresi boyunca partikül boyutundaki değişimi	214
Şekil 4.41. Proniozom ve kontrol örneklerinin 21 °C depolama süresi boyunca partikül boyutlarındaki değişimi.....	215
Şekil 4.42. Depolama sıcaklığı ve depolama süresine bağlı olarak proniozom ve kontrol örneklerinin Hue değerlerinin değerlendirilmesi	218



TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Fenolik bileşiklerin temel yapısal sınıflandırması	4
Tablo 2.2. Zeytin ve türetilmiş ürünlerde tirozol ve hidroksitirozol içerikleri	12
Tablo 2.3. Farklı kapsülleme ve nanotaşıyıcı üretim tekniklerinin avantaj ve dezavantajları	21
Tablo 2.4. Gıda ve besin takviyelerinde kullanılan nanoenkapsülasyon teknolojileri	26
Tablo 2.5. Nanotaşıyıcı sistemlerin yapısı, fonksiyonel avantajları ve uygulamaları	29
Tablo 2.6. Niozomların lipozomlarla karşılaştırılması	37
Tablo 2.7. Zeytin yan ürünlerinin biyoaktif bileşenleri için kullanılan kapsülleme teknikleri ve kapsülasyon işleminde kullanılan maddeler	39
Tablo 2.8. Proniozomlarda yüzey aktif madde özellikleri ve kullanımı	47
Tablo 3.1. Proniozom toz formülasyonlarında kullanılan malzemeler ve miktarları	96
Tablo 3.2. Proniozom oluşturma ve niozom elde etme koşulları	100
Tablo 3.3. Kolesterol içeren proniozom toz formülasyonunun bileşenleri	102
Tablo 3.4. Proniozom üretimi için kullanılan evaporasyon ve niozom üretimi için kullanılan ultrasantrifüj proseslerine ait parametreler	103
Tablo 3.5. Hazırlanan proniozomların formülasyonları	104
Tablo 3.6. Proniozom formülasyonlarına uygulanan evaporasyon koşulları	105
Tablo 3.7. Nihai proniozom formülasyonuna uygulanan evaporasyon koşulları	106
Tablo 4.1. Niozomlara ait % enkapsülasyon etkinliği	132
Tablo 4.2. F50–F300 formülasyonlarının farklı karıştırma sürelerinde belirlenen enkapsülasyon etkinlikleri	135
Tablo 4.3. Proniozomlara ait partikül büyüklüğü değerleri	143
Tablo 4.4. Proniozom formülasyonlarının ürün geri kazanımı ve formülasyonların hidrasyonu ile elde edilen niozomların karakterizasyon özellikleri	147
Tablo 4.5. Proniozomların üretim günlerine göre ortalama partikül boyutu ve polidispersidite indeksi	151
Tablo 4.6. Proniozomların enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi	154
Tablo 4.7. Örneklere ait nem içeriği sonuçları	156
Tablo 4.8. Örneklere ait FTIR ile elde edilen fonksiyonel gruplar	158
Tablo 4.9. Kontrol, HZYE ve proniozom XRD pikerinin karşılaştırılması	174

Tablo 4.10. Ekstrakt, kontrol ve proniozom örneklerinin AFM ile belirlenen yüzey pürüzlülük parametreleri	189
Tablo 4.11. Proniozomların konsantrasyona bağlı DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi değerleri	191
Tablo 4.12. Proniozom ve kontrolün ABTS serbest radikal süpürme aktivitesi değerleri	192
Tablo 4.13. Proniozom, kontrol ve ekstrakt örneklerinde belirlenen uçucu bileşikler ve konsantrasyonları	203
Tablo 4.14. Proniozom ve kontrol örneklerinin depolama süresi boyunca partikül boyutu ve PDI değerlerinin değişimi	206
Tablo 4.15. 4 °C ve 21 °C’de depolamanın proniozomal formülasyonların enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi	210
Tablo 4.16. Proniozom ve kontrol örneklerinin depolama süresi boyunca partikül boyutu ve PDI değerindeki değişimin belirlenmesi	213
Tablo 4.17. Proniozom ve kontrolün depolama süresi boyunca renk değişiminin belirlenmesi	219

1. GİRİŞ

Nutrasötikler, sağlığı destekleyen ve hastalık riskini azaltabilen doğal veya işlenmiş bileşenler olarak tanımlanmaktadır (Riar ve Panesar, 2024). Son yıllarda fonksiyonel gıda geliştirme çalışmaları, bu bileşenlerin biyolojik etkilerini maksimize etme ve gıdalara katma değer sağlama amacını taşımaktadır (Martirosyan, Lampert ve Lee, 2022). Bu bağlamda bitkisel kaynaklı fenolik bileşikler, güçlü antioksidan, antimikrobiyal ve kardiyoprotektif özellikleriyle öne çıkmaktadır (Frumuzachi, Kieserling, Rohn ve Mocan, 2025; Hamza, Hassanin, Hamza, Abdalla ve Amin, 2021; Manso, Lores ve de Miguel, 2021).

Zeytin, zeytinyağı ve zeytin yan ürünlerinden elde edilen hidroksitirozol; kardiyovasküler, nörodejeneratif ve inflamatuvar hastalıklara karşı koruyucu etkileriyle bilinen önemli bir fenolik bileşiktir. Sahip olduğu bu biyolojik aktivite, molekülün yüksek bir nutrasötik potansiyel taşıdığını göstermektedir (Frumuzachi, Kieserling, Rohn ve Mocan, 2025; Karkovic Markovic, Toric, Barbaric ve Jakobusic Brala, 2019; Micheli ve diğerleri, 2023; Pojero ve diğerleri, 2022).

Ancak hidroksitirozolün çevresel faktörlere (ısı, ışık, pH) karşı hassasiyeti ve oksidatif bozunmaya yatkınlığı, biyoyararlanımını ve gıda sistemlerindeki etkinliğini sınırlamaktadır (Pasquet, Julien-David, Zhao, Villain-Gambier ve Trebouet, 2024; Shi, Zhao, Yang, Subbiah ve Suleria, 2022; Sun ve diğerleri, 2022). Bu durum, bileşiğin korunması ve kontrollü salımını sağlayacak taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesini gerekli kılmaktadır (Nishimoto-Sauceda, Romero-Robles ve Antunes-Ricardo, 2022).

Zeytin yaprağı ve hidroksitirozol bazlı taşıyıcı sistemlerde farklı enkapsülasyon teknikleri kullanılmaktadır. Niozomlarda enkapsülasyon verimi %41-70 arasında değişirken, nanolipozomlarda hidroksitirozol %44-83 verim göstermiştir (Can, 2017; İlğaz ve diğerleri, 2025; Li ve diğerleri, 2022; Yuan, Qin, Tu ve Li, 2017).

Nanolipozomlar yüksek enkapsülasyon verimi sağlasa da sıvı dispersiyon formunda olmaları nedeniyle katı depolama olanağı sunmamakta ve sıcaklık, pH ile oksijen gibi çevresel faktörlere karşı stabiliteleri sınırlı kalmaktadır. Buna karşın proniozomlar, toz formda depolanabilme,

hidrasyonla hızlı aktive olabilme ve kontrollü salım özellikleri sayesinde, özellikle oksidasyona duyarlı hidroksitirozolün taşınması için daha uygun bir taşıyıcı sistem sunmaktadır (Ajrın ve Anjum, 2022; Karuppaiah, Gupta, Singh ve Singh, 2024; Silva, Vieira, Guimaraes, Pinho ve Ferreira, 2023; Teaima, Gebril, Abd Allah ve El- Nabarawi, 2022). Bu veriler, kullanılan yöntem ve bileşenlerin verim üzerinde belirleyici olduğunu ve proniozomal sistemlerin potansiyel kullanımını desteklediğini göstermektedir.

Bu tez çalışmasının amacı, hidroksitirozolce zenginleştirilmiş zeytin yaprağı sıvı ekstraktının proniozomal sistemlerle enkapsülasyonu ve bu sistemlerin fizikokimyasal, morfolojik ve fonksiyonel özelliklerinin kapsamlı biçimde karakterize edilmesidir. Çalışmanın temel hipotezi, proniozomal enkapsülasyonun hidroksitirozolün oksidatif stabilitesini artırarak biyolojik potansiyelini optimize edeceği yönündedir.

Araştırma kapsamında şu sorulara yanıt aranacaktır:

1. Proniozomal formülasyonda kullanılan bileşenler, enkapsülasyon verimi ve fizikokimyasal parametreleri nasıl etkiler?
2. Enkapsülasyon, hidroksitirozolün antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerinin korunmasına ne ölçüde katkı sağlar?
3. Geliştirilen proniozomal sistemlerin morfolojik, termal ve yapısal özellikleri ile ekstraktın taşıyıcı matriksle etkileşim mekanizmaları nasıl tanımlanabilir?
4. Farklı depolama koşulları altında proniozomal sistemlerin fizikokimyasal stabilitesi ve fonksiyonel performansı nasıl değişmektedir?

Elde edilecek bulgular, hidroksitirozolün taşıyıcı sistemlerdeki davranışının daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacak; aynı zamanda fonksiyonel gıdaların raf ömrü ve biyolojik etkinliğinin iyileştirilmesi için yenilikçi çözümler sunacaktır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Fenolik Bileşikler: Yapı ve Fonksiyon

2.1.1. Genel tanım ve sınıflandırma

Fenolik bileşikler, yapılarında en az bir aromatik hidroksil grubu bulunduran, geniş ve çeşitli bir bitkisel metabolit ailesidir (Kahkönen ve Heinonen, 2003). Bitkilerde koruma, savunma ve sinyal iletimi gibi fizyolojik roller üstlenen bu bileşikler, aynı zamanda insan sağlığı üzerinde antioksidan, antiinflamatuar ve antimikrobiyal gibi önemli farmakolojik etkilere de sahiptir (Cheynier, 2012).

Kimyasal yapılarına ve moleküler kompleksitelerine göre fenolik bileşikler, basit fenolikler ve polifenolikler olmak üzere iki ana kategoriye ayrılır. Basit fenolik bileşikler, genellikle C6 iskeletine sahip tek bir fenol halkası içerir. Bu moleküllerin kimyasal reaktivitesi ve biyolojik etkinlik profili, fenolik halkadaki hidroksil grubu ve yan grupların (örneğin, alkil, aril) konfigürasyonları (orto, meta, para) ile doğrudan ilişkilidir (Zhang, Cai, Cheng, ve Zhang, 2022). Polifenolik bileşikler ise birden fazla fenol biriminin birleşmesiyle oluşan daha karmaşık, genellikle C15 iskeletine dayanan moleküllerdir. Bu yapısal karmaşıklık, fenolik asitler, flavonoidler, tanenler ve lignanlar gibi alt sınıflandırmalara ayrılmasını sağlar. Bu çeşitlilik, onların geniş bir biyolojik fonksiyon yelpazesi sergilemesini mümkün kılmaktadır; bu fonksiyonlar arasında antioksidan kapasite, enzim inhibitörlüğü ve sinyal iletim modülasyonu yer almaktadır (Al Mamari, 2021; Vuolo, Lima ve Junior, 2019).

Fenolik bileşikler, ortak aromatik halka ve hidroksil grubu motifine sahip olsalar da karbon iskelet uzunluğu, fonksiyonel gruplar ve bağlanma motifleri açısından önemli yapısal farklılıklar göstermektedir (Santana-Galvez ve Jacobo-Velazquez, 2018; Vuolo ve diğerleri, 2019). Bu yapısal çeşitlilik, bileşiklerin biyosentetik kökenlerine ve fonksiyonel özelliklerine dayanarak basit fenoller, fenolik asitler, flavonoidler, stilbenler, lignanlar ve tanenler gibi alt gruplara ayrılmasını sağlamaktadır (Cheynier, Comte, Davies, Lattanzio ve Martens, 2013).

Bu bağlamda, fenolik bileşiklerin yapısal sınıflandırması (Tablo 2.1), hem kimyasal özelliklerinin hem de biyolojik fonksiyonlarının anlaşılmasında kritik bir rol oynamaktadır (Vuolo, Lima, ve Junior, 2019).

Tablo 2.1. Fenolik bileşiklerin temel yapısal sınıflandırması

Ana Sınıf	Genel Yapısal Özellikler	Alt Sınıflar	Örnek Bileşikler	Kaynaklar
Basit Fenoller	Tek aromatik halka, bir veya daha fazla -OH grubu	Mono- ve dihidroksibenzen türevleri	Fenol, katekol, hidrokinon	Harborne, 1999
Fenolik Asitler	C6-C1 veya C6-C3 iskelet; karboksilik asit grubu	Hidroksibenzoik asitler (C6-C1), hidroksisinnamik asitler (C6-C3)	Gallik asit, ferulik asit, p-kumarik asit	Robbins, 2003
Flavonoidler	C6-C3-C6 iskelet; iki aromatik halka (A ve B) + heterosiklik C halkası	Flavonlar, flavonoller, flavanonlar, izoflavonlar, flavan-3-oller, antosiyanidinler	Kuersetin, kateşin, genistein, siyanidin	Panche, Diwan, ve Chandra, 2016
Stilbenler	C6-C2-C6 iskelet; trans veya cis çift bağ	Stilbenler, dihidrostilbenler	Resveratrol, pinosilvin	Bavaresco, 2003
Lignanlar	İki fenilpropanoid birimin (C6-C3) β - β' bağ ile birleşmesi	Sekolignanlar, neolignanlar	Sekoisolariciresinol, matairesinol	Adlercreutz, 2007
Tanenler	Polifenolik yapı; yüksek molekül ağırlığı	Hidrolize olabilen tanenler (gallotanenler, ellagitaneler), kondanse tanenler (proantosiyandinler)	Gallotanen, proantosiyandinler	Haslam, 1998
Diğer Fenolikler	Karmaşık veya türevlenmiş yapılar	Kapsaisin, salisin, oleuropein	Oleuropein, kapsaisin	Cheynier, 2012

Bu sınıflandırma yalnızca kimyasal yapı temelli olmayıp, aynı zamanda bileşiklerin biyolojik aktivite profillerinin ve teknolojik uygulama alanlarının belirlenmesinde de yol gösterici olmaktadır (Vermeris ve Nicholson, 2007). Özellikle gıda teknolojisi, farmasötik formülasyonlar ve biyomedikal uygulamalarda, fenolik bileşiklerin hangi sınıfa ait olduğunun bilinmesi, uygun ekstraksiyon yöntemlerinin seçilmesinden stabilite optimizasyonuna kadar birçok aşamada kritik önem taşımaktadır (Dias, Oliveira, Fernandes, Simal-Gandara, ve Perez-Gregorio, 2021).

2.1.2. Yapı ve fonksiyon ilişkisi

Fenolik bileşikler, biyokimyasal ve fizyolojik işlevleri nedeniyle sağlık bilimleri ve gıda teknolojileri araştırmalarında giderek artan bir odak noktası oluşturmaktadır (Briskin, 2000; Kumar, Saini, Suthar, Kumar ve Sharma, 2022). Polifenollerin biyoyararlanımı ve biyolojik aktiviteleri, gıda işleme ve depolama süreçleri ile gastrointestinal sindirim sırasında enzimler, plazma proteinleri ve hedef dokulardaki proteinlerle olan etkileşimlerden önemli ölçüde etkilenmektedir. Basit fenoller ise bağırsaktan kana geçmeden önce konjugasyon (glukuronidasyon, sülfatlama) veya oksidasyon gibi metabolik reaksiyonlara maruz kalarak biyoyararlanımlarını ve sistemik dolaşımdaki aktivitelerini sınırlamaktadır. Bu nedenle gastrointestinal stabilite, enzimatik metabolizma ve membran geçirgenliği, basit fenollerin vücutta biyolojik etkilerini gösterebilmesi için kritik öneme sahiptir (Ciupei, Colişar, Leopold, Stanila ve Diaconeasa, 2024).

Basit fenoller, polifenollere kıyasla daha az sayıda aromatik halka ve fonksiyonel grup içermeleri nedeniyle moleküler açıdan sade bir yapıya sahiptir. Bu yapısal özellik, söz konusu bileşiklerin kimyasal reaktivitelerinin düşük olmasına ve gastrointestinal sistem koşulları altında sınırlı düzeyde yapısal degradasyona uğramalarına yol açmaktadır (Rana, Samtiya, Dhewa, Mishra ve Aluko, 2022). Ayrıca, bu bileşiklerde hidroksil ve diğer kutupsal grupların sayısının sınırlı olması, su ile etkileşim kapasitelerinin polifenollere kıyasla azalmasına yol açmaktadır. Buna bağlı olarak molekülün toplam polaritesi düşük kalmakta ve bağırsak membranından geçişleri sınırlı düzeyde gerçekleşmektedir. Bu yapısal nitelikler, basit fenollerin biyoyararlanımını ve sistemik dolaşımdaki potansiyel etkilerini kısıtlamaktadır (Koudoufio ve diğerleri, 2022).

Fenolik bileşiklerin antioksidan kapasitesini doğrudan etkileyen en önemli parametrelerden biri, aromatik halka üzerindeki hidroksilasyon derecesidir (Lee, Sohng, Kim ve Choi, 2023). Hidroksil (-OH) gruplarının sayısı ve konumu, molekülün redoks potansiyeli (E° , standard reduction potential), O- H bağ ayrılma enerjisi (BDE, bond dissociation energy) ve iyonlaşma potansiyeli (IP, ionization potential) gibi temel özelliklerini belirlemektedir (Leopoldini, Marino, Russo ve Toscano, 2004).

Özellikle orto-difenolik (katekol) ve trihidroksilik (gallol) motiflerde artan elektron yoğunluğu (Fitzpatrick, 2003), serbest radikallerin nötralizasyonu için kritik olan hidrojen atomu transferi (HAT, hydrogen atom transfer) ve tek elektron transferi (SET, single electron transfer) mekanizmalarının enerji bariyerlerini düşürmektedir (Barzegar, 2012). Bu süreçler, reaktif oksijen türlerinin (ROS, reactive oxygen species) detoksifikasyonunu yüksek verimlilikle gerçekleştiren termodinamik olarak kararlı fenoksil radikallerin oluşumunu sağlamaktadır (Lucarini, Mugnaini, Pedulli ve Guerra, 2003). Aynı zamanda, bu yapılar demir ve bakır gibi geçiş metallerini şelatlayarak oksidatif stresi azaltmaktadır (Gulcin ve Alwasel, 2022) ve oksidatif enzimlerin aktivitesini modüle ederek anti-inflamatuvar etkiler sunmaktadır (Upadhyay ve Dixit, 2015).

Geleneksel yaklaşımlarda hidrofobiklik, oktanol–su sisteminde fazlar arası dağılım katsayısının (P, partition) logaritması (log P) kullanılarak belirlenmektedir. Ancak emülsiyon sistemlerinde antioksidanların gerçek dağılım davranışının değerlendirilebilmesi amacıyla yağ–su–arayüzey modeli esas alınmaktadır. Bu model kapsamında, yağ fazı, su fazı ve arayüzey bölgesindeki antioksidan konsantrasyonları doğrudan ölçülmekte ya da matematiksel yaklaşımlar kullanılarak hesaplanmakta; elde edilen bulgular doğrultusunda, yağ fazında biriken bileşikler lipofilik, su fazında birikenler ise hidrofilik olarak tanımlanmaktadır. Bu parametreler, antioksidan emülsiyonlardaki arayüzey birikimini, kinetik davranışını ve lipid oksidasyonunu inhibe etme potansiyelini anlamak açısından önem taşımaktadır (Costa, Losada-Barreiro, Paiva-Martins ve Bravo-Diaz, 2021).

Molekülün hidrolizasyon derecesindeki artış, polaritenin yükselmesine bağlı olarak lipofilik özelliklerin değişmesine ve membran lipid çift tabakası üzerinden gerçekleşen difüzyon kinetiğinin kısıtlanmasına neden olabilmektedir. Bu etki, biyoyararlanım ve hücrel penetrasyonun azalmasıyla sonuçlanarak bileşiklerin biyolojik etkinliğini sınırlayabilmektedir (Lobius ve diğerleri, 2023).

Yapılan çalışmalar, fenolik bileşiklerin biyolojik aktivitelerinin yalnızca hidroksil grubu sayısına bağlı olmadığını; hidroksil gruplarının konumu, aromatik halkadaki π -elektron konjugasyonunun derecesi ve molekülün sterik özellikleri gibi yapısal faktörlerle de yakından ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır (de Moraes, Tonel, Fagner ve Barbosa, 2019).

2.2. Fenolik Bileşiklerin Stabilité ve Biyoyararlanımı

Fenolik bileşiklerin sağlık üzerindeki etkilerinin ortaya çıkabilmesi, yalnızca gıdadan serbestleşip emilmeye hazır hâle gelmeleriyle değil, aynı zamanda gastrointestinal sistemden emilip dolaşıma geçerek hedef dokulara ulaşmalarıyla da belirlenmektedir. Bu bağlamda, biyoerişebilirlik, fenolik bileşiklerin sindirim sürecinde gıda matriksinden ayrılarak çözünmüş ve emilmeye hazır formda bulunabilme kapasitesini ifade etmektedir. Biyoyararlanım ise biyoerişebilirliği de kapsamakla birlikte, bileşiğin emildikten sonra metabolize edilmesi ve sistemik dolaşıma geçerek hedef dokuya ulaşabilme düzeyini içermektedir. Bu nedenle bir fenolik bileşik gastrointestinal ortamda yüksek biyoerişebilirliğe sahip olsa bile, karaciğer veya bağırsak metabolizması nedeniyle biyoyararlanımı sınırlı olabilmektedir (Dominguez-Avila ve diğerleri, 2017).

2.2.1. Stabilitéyi etkileyen faktörler

Fenolik bileşiklerin hem vücutta hem de gıdalarda ortaya koyduğu biyolojik ve fonksiyonel etkilerin devamlılığı, büyük ölçüde bu maddelerin moleküler yapılarını çevresel faktörlere karşı koruyabilme yeteneğine bağlıdır. Isı, ışık, oksijen, pH ve metal iyonları gibi dış etkenlere karşı kararlılığını sürdürebilmesi, bu bileşiklerin etkili bir şekilde işlev görmesinde kritik bir rol oynamaktadır (Shahidi, ve Peng, 2018).

Polifenolik bileşikler, moleküler yapılarının özelliklerine bağlı olarak pH değişimlerine karşı farklı stabilité göstermektedir. Küçük ve tek halkalı polifenoller yüksek pH koşullarında kimyasal bozunmaya uğramaktadır. Buna karşın, çok halkalı veya konjuge yapılar daha yüksek direnç göstermektedir. Bu stabilité, fenolik hidroksil gruplarının konumu, rezonans yapılarının varlığı ve π -elektron sistemleri ile ilişkilendirilmektedir. Gıda işleme ve depolama sırasında uygulanan pH ve sıcaklık koşulları, polifenol içeriği ve antioksidan etkinliği üzerinde belirleyici rol oynamaktadır. Ayrıca bazı polifenoller antimikrobiyal özellik göstermekte ve bu yolla gıda güvenliğine katkı sağlamaktadır. Sonuç olarak, fenolik bileşiklerin yapısal özellikleri, pH stabilitesi, biyoyararlanımı ve fonksiyonel etkinliği, gıda sistemlerinde kullanım potansiyelini belirlemektedir (Friedman ve Jürgens, 2000).

Küçük ve tek halkalı polifenoller, yüksek pH'a maruz kaldığında kimyasal olarak değişime uğramaktadır. Kafeik, vanilik ve galik asit gibi bileşikler, pH 7- 11 arasında absorpsiyon

spektrumlarında geri döndürülemez değişimler göstermektedir; bu değişimler muhtemelen kinon ara ürünleri veya diğer rezonans yapılarının oksidatif bozunmasından kaynaklanmaktadır (Rahim, Kristufek, Pan, Richardson ve Caruso, 2019).

Fenolik bileşiklerde elektron eksitasyonu, molekülün temel enerji seviyesindeki elektronlarının daha yüksek enerji seviyelerine geçmesi sürecini ifade etmektedir. Bu süreç genellikle ultraviyole (UV) ışık gibi elektromanyetik radyasyon tarafından tetiklenmektedir. Aromatik halkalar ve hidroksil grupları içeren fenoller ve polifenoller, π bağ elektronları ve serbest elektron çiftleri (lone pair, n) açısından zengin yapılar sunmaktadır. UV ışığına maruz kaldıklarında, π elektronları anti-bağlanma π^* orbitallerine ($\pi \rightarrow \pi^*$ geçişi) ve serbest elektron çiftleri ise σ^* (sigma anti-bağlayıcı orbital) veya π^* (pi anti-bağlayıcı orbital) anti-bağlanma orbitallerine ($\pi \rightarrow \pi^*$ veya $n \rightarrow \sigma^*$ geçişi) uyarılabilmektedir (Lin, D. ve Xing, 2008).

Bu elektronik geçişler, moleküllerin UV/vis spektrumlarında absorpsiyon yapmasına olanak sağlamakta ve fenolik bileşiklerin kimyasal reaktivitesini doğrudan etkilemektedir. Uyarılmış elektronlar, serbest radikaller veya oksijenle etkileşime girerek oksidatif bozunma süreçlerini başlatabilir; bu durum özellikle gastrointestinal sindirim ve gıda işleme koşullarında fenolik bileşiklerin stabilitesi ve biyoyararlanımı açısından kritik öneme sahiptir. Elektron eksitasyonu ayrıca polifenollerde renk değişimleri ve rezonans yapılarının oluşumu gibi fotokimyasal olayları tetikleyebilmektedir (Al-Nu'airat ve diğerleri, 2019; Grace, 2005).

Ferreya, Bottini ve Fontana (2023) tarafından yürütülen çalışmada, üzüm sapı ekstraktlarındaki polifenolik bileşiklerin sıcaklık ve ışık koşullarına bağlı stabilitesi araştırılmıştır. Stilbenlerin ekstraktların toplam polifenol içeriğinin %87'sini oluşturduğu ve düşük sıcaklıklarda (-0°C ve 5°C) bu bileşiklerin bozulmasının sınırlı kaldığı gözlemlenmiştir. Yüksek sıcaklıklar ($25-40^{\circ}\text{C}$) ve ışık maruziyetinin, özellikle (+)-kateşin, (-)-epikateşin ve trans-piceatannol gibi bileşiklerin bozulmasını hızlandırdığı belirlenmiştir. Trans-resveratrol ve ϵ -viniferin ise ışığa karşı daha duyarlı bulunmuş; karanlık koşullarda yüksek sıcaklığa rağmen büyük ölçüde stabil kalmıştır. Özellikle trans-piceatannolün 40°C 'de iki hafta içinde neredeyse tamamen kaybolduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular, polifenollerin termal ve fotostabilitesinin moleküler yapı ve çevresel faktörlerle ilişkilendirilebileceğini göstererek, gıda işleme, katkı maddesi tasarımı ve depolama stratejilerinin belirlenmesinde kuramsal bir temel sunmaktadır.

2.2.2. Biyoyararlanımı etkileyen faktörler

Fenolik bileşiklerin işlevsel etkinliği, stabilite özellikleri ve biyoyararlanım parametreleri arasındaki karşılıklı ilişki doğrultusunda şekillenmektedir. Stabilite kaybı, sindirim öncesi veya sırasında bileşiğin oksidatif bozunmasına yol açarak intestinal emilime uygun formdaki fenolik bileşiklerin miktarını azaltmaktadır. Buna karşılık, yüksek stabiliteye sahip bileşikler gastrointestinal sistemde daha uzun süre aktif kalsa da, çözünürlük sınırlılıkları veya gıda matriksinden serbestleşememe gibi nedenlerle biyoyararlanımları düşük olabilmektedir. Bu nedenle, fenolik bileşiklerin sağlık üzerindeki etkilerinin ortaya çıkabilmesi için, sadece yapısal bütünlüklerinin korunması yeterli olmamakta; aynı zamanda sindirim sürecinin sonunda emilime uygun ve metabolik olarak aktif formlara dönüşmeleri de gerekmektedir (Karakaya, 2010).

Fenolik bileşiklerin biyoyararlanımı, büyük ölçüde bileşiğin kimyasal yapısına bağlı olarak değişmektedir. Gıda yoluyla alınan fenolik bileşiklerin büyük çoğunluğu ince bağırsakta sınırlı oranda emilmekte olup, çoğu glikozit veya ester formda bulunduğundan doğrudan biyoyararlanımları düşüktür. İnce bağırsakta laktaz-florizin hidrolaz (lactase-phlorizin hydrolase, LPH) ve sitozolik β -glukozidaz gibi enzimler, glikozile flavonoidleri aglikonlara dönüştürerek pasif difüzyon veya taşıyıcı proteinler aracılığıyla enterositlere ulaşmalarını sağlamaktadır. Yüksek moleküler ağırlıklı polimerler, esterleşmiş hidroksisinnamik asitler ve tanenler ise çoğunlukla kolonda mikrobiyal hidrolizle parçalanmakta ve ardından metabolize olarak sisteme katılmaktadır. Karaciğerde glukuronidasyon, metilasyon ve sülfatlama gibi konjugasyon reaksiyonları, fenolik bileşiklerin dolaşıma geçişini ve eliminasyonunu düzenlemekte, böylece plazmada serbest aglikon formu genellikle düşük kalmaktadır. Bu süreçler, fenolik bileşiklerin kimyasal yapısı, moleküler ağırlığı ve bağırsak mikrobiyotası ile gıda matriksine bağlı olarak biyoyararlanımlarını belirlemektedir (Zeb, 2021).

Biyoyararlanımı belirleyen başlıca faktörler arasında moleküler yapı ve hidrofobiklik/hidrofiliklik özellikleri, gıda matriksi ile etkileşimleri, sindirim ve enzimatik metabolizma, bağırsak mikrobiyotası ile işleme ve depolama koşulları yer almaktadır. Gıda matriksindeki protein, lipid ve diyet lifi gibi bileşenler, fenoliklerle kompleks oluşturarak bileşiklerin serbest ve çözünür formda bulunmasını sınırlamakta ve böylece gastrointestinal sistemden emilimini azaltmaktadır. İşleme ve depolama sırasında maruz kalınan ısı, ışık,

oksijen ve pH değışiklikleri fenoliklerin oksidatif bozunmasına yol açmakta ve böylece biyoerişebilirlik ile biyoyararlanım düzeylerini azaltmaktadır (Tresserra-Rimbau ve diğeri, 2018).

Fenolik bileşiklerin gastrointestinal sistemdeki yolculuğı, mide asiditesi, enzimatik yıkım ve bağırsak emilimi gibi bir dizi zorlukla karşılaşmaktadır (Garbatı ve diğeri, 2024). Mide ortamının düşük pH değeri bazı fenolik yapıların protonasyonuna ve parçalanmasına yol açarak kimyasal stabilitelerini azaltmaktadır (Subramanian, 2021). Benzer şekilde, gastrointestinal enzimler fenolik bileşikleri modifiye ederek serbest ve emilmeye uygun formlarını sınırlayabilmektedir (Satsu, 2017). Ayrıca, bağırsak epitelinden geçiş sırasında moleküler boyut, hidrofobik/hidrofilik özellikler ve matriks etkileşimleri gibi faktörler emilimi kısıtlamakta ve dolaşıma geçen aktif fenolik miktarını azaltmaktadır (Attar, Jayakumar ve Devarajan, 2024).

Bu faktörler, fenolik bileşiklerin sağlık üzerindeki etkilerinin ortaya çıkabilmesi için, sadece yapısal bütünlüklerinin korunmasının yeterli olmadığını, aynı zamanda sindirim sürecinin sonunda emilime uygun ve metabolik olarak aktif formlara dönüşmeleri gerektiğini göstermektedir. Bu nedenle, fenolik bileşiklerin biyoyararlanımını artırmak için stabilizeyi koruyacak ve emilimi optimize edecek taşıyıcı sistemlerin kullanımı önem kazanmaktadır.

2.3. Hidroksitirozol: Yapı ve Biyolojik Özellikler

2.3.1. Kimyasal ve yapısal özellikler

Hidroksitirozol ($C_8H_{10}O_3$), 154,16 g/mol moleköl ağırlığına sahip olup fenilpropanoid yolağı aracılığıyla sentezlenen küçük moleküllu güçlü bir fenolik bileşik olarak tanımlanmaktadır (Fernandez-Bolanos, Lopez, Fernandez-Bolanos ve Rodriguez-Gutierrez, 2008). Kimyasal yapısı, biyoaktivitesini belirleyen en temel faktördür. Bileşik, fenil halkasına bağı iki hidroksil grubu içeren bir orto-difenolik (katekol) motifine sahiptir. Bu yapı, hidroksitirozolün reaktif oksijen ve nitrojen türlerini etkisiz hale getirebilen güçlü bir hidrojen atomu donörü ve metal iyonlarını şelatlayabilen bir ajan olarak işlev görmesini sağlamaktadır (Fernandez-Bolanos ve diğeri, 2012; Galano ve diğeri, 2012). Yan zincirinde bulunan etanol grubu ise molekülün su ve lipid çözünürlüğü arasında denge sağlayan amfifilik karakterini ($\log P_{o/w} = 1,1$) belirlemektedir (Rietjens, 2008).

Yapısında bulunan katekol motifi, bu bileşiğe yüksek redoks potansiyeli ve metal iyonu bağlama kapasitesi kazandırmaktadır. Bu bileşiğin biyosentezi, fenilalanin amonyak liyaz (PAL, phenylalanine ammonia-lyase), cinnamat 4-hidroksilaz (C4H, cinnamate 4-hydroxylase) ve 4-kumarat koenzim A ligaz (4CL, 4-coumarate CoA ligase) gibi anahtar enzimlerin koordineli çalışmasıyla gerçekleşmektedir (Plamada ve diğerleri, 2024). Bu biyokimyasal süreç, hidroksitirozolü sadece bir antioksidan olmaktan öte, ilaç ve fonksiyonel gıda formülasyonları için önemli bir öncü molekül haline getirmektedir (Ayvaz ve diğerleri, 2022).

Doğada hidroksitirozol, serbest formda son derece sınırlı miktarda bulunmaktadır. Genellikle glikoz ile bağlanmış bir türevi olan hidroksitirozol glukozid (HY-4-β-D-glukozid), oleuropein, oleasin sekoridoid kompleksleri, asetat türevleri ve verbaskozid gibi bileşiklerin bağlı formlarında yer almaktadır. Bu nedenle, bileşiğin biyolojik sistemlerde veya endüstriyel uygulamalarda etkin şekilde kullanılabilmesi için, çoğunlukla bu türevlerinden ayrıştırılması gerekmektedir (De Leonardis, Macciola ve Iacovino, 2020).

2.3.2. Analitik tespit ve elde edilme yöntemleri

Hidroksitirozol, zeytinyağlarının ana fenolik bileşiklerden biri olarak yüksek antioksidan kapasitesine katkıda bulunmakta ve sağlık açısından büyük önem taşımaktadır. Zeytinyağı ve zeytin işleme atıkları gibi kaynaklarda yüksek miktarda bulunduğu bildirilmektedir. Bu değerli bileşiğin miktarı, zeytin çeşidi, coğrafi kökeni ve işleme yöntemleri gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak önemli farklılıklar göstermektedir (Frankel ve diğerleri, 2013).

Tablo 2.2, farklı zeytin çeşitleri, yetiştirildiği bölgeler, markalar ve işleme yöntemleri dikkate alınarak sızma zeytinyağlarındaki tirozol ve hidroksitirozol konsantrasyonlarının değişimini özetlemekte ve bu değişkenlerin bileşik düzeyleri üzerinde belirleyici rol oynadığını göstermektedir. Genel olarak elde edilen veriler, hidroksitirozol konsantrasyonlarının Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA, European Food Safety Authority) tarafından sağlık beyanı için belirlenen eşik değerin (250 mg/ kg) altında kaldığını ortaya koymaktadır.

Eşik değere ulaşan zeytinyağı ürünlerinde, hidroksitirozol içeriği ve buna bağlı sağlık etkileri ürün etiketinde açıkça belirtilmektedir. Bu kapsamda, ‘20 g zeytinyağı hücrelerin lipid peroksidasyonuna karşı korunmasına katkıda bulunur’ ifadesi kullanılabilmektedir (Tresserra-Rimbau, Lamuela-Raventos ve Moreno, 2018). Belirlenen bu kriter, ürünün sağlıklı bir diyet

kapsamında biyolojik olarak anlamlı düzeyde hidroksitirozol sağlamasını güvence altına almak amacıyla oluşturulmuştur.

Tablo 2.2. Zeytin ve türetilmiş ürünlerde tirozol ve hidroksitirozol içerikleri

Menşei	Çeşit / Koşullar	Tirozol (mg/kg)	Hidroksitirozol (mg/kg)	Kaynak
İran	Sızma zeytinyağları	1,92– 18,41	0,64– 77,68	Hashemi, Serenjah ve Ghiasvand, (2011)
İspanya	Üç farklı sızma zeytinyağı karışımı	8,4– 51,9	9,8– 14,9	Reboredo-Rodríguez ve diğerleri, (2014)
İspanya	Farklı olgunlaşma aşamaları	1,3– 7,82	0,39– 3,8	Franco ve diğerleri, (2014)
İspanya	Sızma zeytinyağları (n= 50)	0– 29,9	6,9– 72,7	Becerra-Herrera ve diğerleri, (2018)
İtalya	Farklı zeytinyağı karışımları	9,75– 47,1	4,0– 25,0	Mazzotti ve diğerleri, (2012)
İtalya	Sızma zeytinyağı	3,5– 6,3	2,2– 7,1	Ambra ve diğerleri, (2017)
İtalya	Sızma zeytinyağları (Mikrodalga destekli ekstraksiyon)	23,8–86,1	1,72– 113,8	Bartella, Mazzotti, Napoli, Sindona ve Di Donna, (2018)
Türkiye	4 yerli zeytin çeşidi	12,4– 18,7	1,56– 5,68	Kesen, Kelebek ve Selli, (2014)
Türkiye	Ayvalık, Gemlik, Memecik çeşitleri	6,93– 14,9	0,8– 17,3	Kelebek, Kesen ve Selli (2015)
Türkiye (Akdeniz)	11 farklı türden sızma zeytinyağı karışımı	0,12– 15,82	0,44– 28,37	Uluata, Altuntaş ve Özçelik, (2021)
Portekiz	9 farklı tek çeşit sızma zeytinyağı karışımı	56,5 – 285,5	32,55 – 262,5	Pereira, Freitas, Cabrita ve Garcia, (2020)

Tablo 2.2. Zeytin ve türetilmiş ürünlerde tirozol ve hidroksitirozol içerikleri (devamı)

Menşei	Çeşit / Koşullar	Tirozol (mg/kg)	Hidroksitirozol (mg/kg)	Kaynak
Çin	Manzanillo çeşidi zeytin ağacı yaprağı	42,19- 58,02	0,68- 1,66	Yao ve diğerleri (2019)
Yunanistan	Koroneiki çeşidi zeytin ağacı yaprağı	-	0,38- 2,67	Papageorgiou ve diğerleri (2022)

Bir zeytinyağının fonksiyonel ve besinsel değerini tam olarak değerlendirebilmek, kalite kontrol süreçlerini yönetmek ve ürün etiketlerindeki sağlık iddialarını doğrulayabilmek için hidroksitirozol içeriğinin güvenilir ve tekrarlanabilir yöntemlerle belirlenmesi büyük önem taşımaktadır (Gonzalez-Santiago, Fonolla ve Lopez-Huertas, 2010). Hidroksitirozolün güvenilir biçimde analiz edilebilmesi, laboratuvar ortamında uygulanan analitik yöntemlerle, zeytin ürünleri ve yan ürünleri matrisinden bileşiğin ayrılması, saflaştırılması ve doğru miktarının tayin edilmesi süreçlerini gerektirmektedir (Bounegru ve Apetrei, 2022). Özellikle bağlı formda bulunan feniletanoller, örneğin secoiridoid türevleri, hidroliz işlemi ile serbest formlarına dönüştürülerek biyolojik olarak daha aktif bileşikler açığa çıkarılabilmektedir (Habibi, Mohammadi ve Farhoodi Jazaeri, 2018).

Kourti ve diğerlerinin (2024) çalışmasında, kurutulmuş zeytin yapraklarından elde edilen üç farklı ekstrakt karşılaştırılmıştır: hidrolize edilmemiş metanolik ekstrakt (OLs), metanolik ekstraktın hidrolizi sonucu elde edilen ekstrakt (HOLE) ve doğrudan asidik hidroliz ile elde edilen ekstrakt (DHOLE). Analiz sonuçları, hidroksitirozolün yalnızca hidroliz uygulanmış ekstraktlarda (HOLE: 11,91 mg/kg; DHOLE: 11,27 mg/kg) tespit edildiğini, OLs'de ise saptanamadığını göstermektedir. Buna karşılık, oleuropein yalnızca OLs ekstraktında (9,36 mg/kg) bulunmuş ve hidroliz uygulanan örneklerde tamamen kaybolmuştur. Bu bulgular, ekstraksiyon ve hidroliz yöntemlerinin hidroksitirozol verimi üzerindeki belirleyici etkisini ve analitik sonuçların kullanılan yöntemlere doğrudan bağlı olarak değiştiğini ortaya koymaktadır.

Hidroksitirozol miktarlarının belirlenmesinde çoğu çalışmada yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) veya ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UHPLC) teknikleri kullanılmaktadır (Termopoli, Piergiovanni, Cappiello, Palma ve Famiglini, 2021; Tsimidou ve ark., 2019). Analiz öncesinde örnekler, zeytin ve türevlerinden mikrodalga destekli

ekstraksiyon (MAE) veya klasik sıvı ekstraksiyon yöntemleri ile hazırlanmakta ve çözücüye aktarılmaktadır; bu çözeltiler hem serbest hem de bağlı hidroksitirozol bileşiklerini içermektedir. Bu çözeltiler daha sonra HPLC/UHPLC cihazına yüklenmekte ve UV-Vis veya fotodiyot matriks dedektör (DAD) ile dedekte edilmektedir (Tsimidou ve diğerleri, 2019). Hidroksitirozol miktarlarının tayini için standartlar kullanılarak kalibrasyon eğrileri oluşturulmakta ve örneklerdeki konsantrasyonlar bu eğrilere göre hesaplanmaktadır. Bu yöntemler hem serbest hem de bağlı formdaki bileşiklerin güvenilir ve tekrarlanabilir şekilde belirlenmesini sağlamaktadır. EFSA standartlarına uygun analizlerde ise bağlı formdaki hidroksitirozol, asidik hidroliz uygulanarak serbest forma dönüştürülmekte ve toplam hidroksitirozol miktarı bu şekilde belirlenmektedir.

Analitik tespit yöntemleri, hidroksitirozolün serbest ve bağlı formlarının zeytin ve zeytinyağı matrislerinde güvenilir biçimde belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Bununla birlikte, yalnızca miktar tayini yeterli olmayıp, bu biyoaktif bileşiğin biyolojik aktivitesinin korunarak kullanılabilmesi üretim ve izolasyon süreçlerinin etkinliğine bağlıdır. Bu bağlamda, doğal kaynaklar veya işleme yan ürünlerinden hidroksitirozolün verimli biçimde elde edilmesini mümkün kılan kimyasal ve biyoteknolojik yaklaşımlar bilimsel ve teknolojik açıdan önem arz etmektedir (Tang ve diğerleri, 2024).

Hidroksitirozol elde edilebilecek başlıca doğal gıda kaynakları arasında zeytin meyveleri, yaprakları ve sızma zeytinyağı yer almaktadır; ayrıca zeytinyağı işleme atık suları, hidroksitirozol gibi biyolojik olarak aktif bileşenler açısından değerli kaynaklar olarak kabul edilmektedir. Doğada çoğunlukla bağlı formlarda bulunması nedeniyle, biyolojik ve endüstriyel uygulamalarda kullanılabilmesi için çeşitli yöntemlerle serbest hale getirilmesi gerekmektedir. Bu bağlamda, doğal, kimyasal ve biyoteknolojik yaklaşımlar olmak üzere üç temel yöntem öne çıkmaktadır (Alvarez ve diğerleri, 2017).

Serbest hidroksitirozol elde etmek için en yaygın yöntemlerden biri hidrolizdir. Doğal mekanizmalar, oleuropein gibi kompleks fenoliklerin enzimatik hidrolizi yoluyla gerçekleşmekte ve bu biyotransformasyon süreci, serbest hidroksitirozolün doğal olarak açığa çıkmasını sağlamaktadır (Alvarez ve diğerleri, 2017). Buna karşılık, laboratuvar ve endüstriyel ölçekli üretimde asit hidrolizi (Wang ve diğerleri, 2021) gibi kimyasal yöntemler daha yaygın olarak tercih edilmektedir.

Zeytin yapraklarından hidroksitirozol elde etmek amacıyla geliştirilen kimyasal yöntemler, bileşiğin ayrılması, saflaştırılması ve biyolojik olarak aktif serbest formda elde edilmesini sağlamaktadır. Bu yöntemler arasında, kurutulmuş ve öğütülmüş yaprakların su, etanol veya su-etanol karışımları ile katı-sıvı ekstraksiyona tabi tutulması öne çıkmaktadır; uygun çözücü tipi, konsantrasyonu, ekstraksiyon süresi ve sıcaklık, fenolik madde verimi üzerinde belirleyici rol oynamaktadır. Optimum koşullarda %60- 80 etanol kullanımı, fenolik verimi saf suya göre yaklaşık iki kat artırarak kuru yaprak başına 45 g/kg düzeyine ulaşılmasını sağlamaktadır. Başlangıçta düşük olan hidroksitirozol miktarı, elde edilen oleuropein hidrolizi ile artırılmakta ve ardından etil asetat ile sıvı- sıvı ekstraksiyon uygulanarak geri kazanılmaktadır; bu sayede kuru yaprak kilogramı başına 10-15 g daha fazla hidroksitirozol elde edilmektedir (Papageorgiou ve diğerleri, 2022).

Hidroliz işlemleri, oleuropein ve diğer bağlı formdaki secoiridoidlerin serbest hidroksitirozole dönüştürülmesini sağlayarak biyolojik aktivitenin artmasını mümkün kılmaktadır. Elde edilen ekstraktlar, etil asetat gibi organik çözücülerle sıvı- sıvı ekstraksiyonuna tabi tutularak hidroksitirozol saflaştırılmakta ve sprey kurutma veya matris kapsülleme yöntemleri ile stabilize edilmektedir. Ayrıca, süperkritik akışkan ekstraksiyonu ve mikrodalga destekli ekstraksiyon gibi ileri teknikler, verim ve saflığı artırmakta, ekstraksiyon süresini kısaltmakta ve çözücü kalıntısı gibi olumsuzlukları minimize etmektedir. Bu yöntemler, hidroksitirozolün serbest ve stabilize formda elde edilmesini sağlayarak, fonksiyonel gıda ve farmasötik uygulamalarda kullanımını mümkün kılmakta ve bileşiğin biyoyararlanımını artırmaktadır (Ziosi ve diğerleri, 2018).

Buna ek olarak, hidroksitirozol üretiminde geleneksel kimyasal yöntemlere kıyasla daha sürdürülebilir ve verimli biyoteknolojik yaklaşımlar da giderek artan bir ilgi görmektedir. Bu süreç, yapısal olarak benzer doğal öncü bileşikler -özellikle tirozol (Bernini, Mincione, Barontini ve Crisante, 2008) veya tirozin (Satoh, Tajima, Munekata, Keasling ve Lee, 2012)- kullanılarak biyosentez yoluyla gerçekleştirilebilmektedir (Karkovic Markovic ve diğerleri, 2020).

Biyosentezin bir uzantısı olarak biyokonversiyon, özellikle fermantasyon süreçleri aracılığıyla mikroorganizmaların biyotransformasyon yeteneklerini kullanarak hidroksitirozolün öncü moleküllerden kontrollü bir şekilde üretilmesini mümkün kılmaktadır. Örneğin,

Saccharomyces cerevisiae kullanılarak uygulanan metabolik mühendislik yaklaşımları, glikoz bazlı ortamlarda yürütülen orbital çalkalamalı şişe fermentasyonlarında yaklaşık 375 mg/L seviyesinde hidroksitirozol üretimine olanak sağlamıştır (Bisquert, Planells-Carcel, Valera-Garcia, Guillamon ve Muniz-Calvo, 2022).

Farkas ve diğerleri (2025) tarafından yürütülen çalışmada, zeytin yapraklarından hidroksitirozol üretimi için biyolojik fermentasyon yöntemleri incelenmiş ve farklı laktik asit bakteri (LAB) suşlarının etkisi araştırılmıştır. Araştırmada *Lactiplantibacillus plantarum* PB22, *Fructilactobacillus sanfranciscensis* B415, *Lactiplantibacillus pentosus* B506 ve *Lactiplantibacillus plantarum* B329 suşları kullanılmıştır. Özellikle *L. pentosus* B506 suşunun hem oleuropein hidrolizini kolaylaştırdığı hem de hidroksitirozolün yapraktan sıvı ortama difüzyonunu artırdığı gözlenmiştir. Kontrol gruplarına kıyasla, LAB aktivitesi sonucunda oluşan pH düşüşü, fermentasyon süresince hidroksitirozol üretimini önemli ölçüde artırmış; ürünün konsantrasyonu üçüncü günde maksimum seviyeye ulaşmış ve yedinci güne kadar bu seviyeyi korumuştur (Farkas ve diğerleri, 2025).

Fermente içeceklerde hidroksitirozol üretimini etkileyen faktörlerin incelendiği bir çalışmada, mustun bileşiminin (özellikle şeker içeriği ve maya tarafından kullanılabilir azot -yeast assimilable nitrogen, YAN) hidroksitirozol oluşumunun öncülleri olarak rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca, genetik olarak modifiye edilmiş maya suşlarının kullanımıyla hidroksitirozol veriminin artırılabilceği araştırılmıştır. Bu çalışma, fermente içeceklerin fonksiyonel polifenol içeriğinin artırılmasına yönelik stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlamaktadır (Gonzalez-Ramirez ve diğerleri, 2024). Bu veriler, fermentasyon süreçlerinin yüksek verimlilik, ürün saflığı ve üretim standardizasyonu bağlamında hidroksitirozol üretimine önemli avantajlar sağladığını göstermektedir.

Kimyasal yöntemler, hidroksitirozol üretiminde hızlı ve ölçeklenebilir olmalarına karşın, yan ürün oluşumu ve organik reaktif kullanımına bağlı çevresel dezavantajlar taşımaktadır. Buna karşılık, biyoteknolojik yaklaşımlar bu iki yöntemin avantajlarını birleştirmeyi hedeflemektedir; mikrobiyal biyotransformasyonlar ve enzim mühendisliği teknikleri sayesinde doğal selektivite korunmakta, üretim verimi artırılmakta ve çevresel etkiler minimize edilmektedir. Bu nedenle, hidroksitirozol üretiminde biyoteknolojik yöntemlerin geliştirilmesi,

sürdürülebilir ve ekonomik bir alternatif olarak giderek önem kazanmaktadır (Britton, Davis ve O'Connor, 2019).

Üretilen hidroksitirozolün farmasötik veya gıda uygulamalarında kullanılabilmesi için saflaştırılması kritik bir aşamadır. Bu doğrultuda ekstraksiyon ve diğer saflaştırma teknikleri uygulanmakta; doğal kaynaklardan (örneğin zeytin yaprağı ve zeytin işleme atıkları) veya biyoteknolojik süreçler sonucunda elde edilen ham çözeltilerden hidroksitirozolün ayrıştırılması sağlanmaktadır (Britton ve diğerleri, 2019).

Hidroksitirozolün ekstraksiyon ve saflaştırmasında başlıca yöntemler arasında çözücü ekstraksiyonu, ultrasonik ekstraksiyon ve kolon kromatografisi öne çıkmaktadır. Çözücü ekstraksiyonu, hammadde ile uygun çözücünün karıştırılması yoluyla bileşiğin ayrıştırılmasını sağlar (Papageorgiou ve diğerleri, 2022). Ultrasonik ekstraksiyon, ultrasonik dalgaların kullanımıyla moleküllerin matriksten daha hızlı salınımını mümkün kılarken (Hu ve diğerleri, 2024), kolon kromatografisi ise hidroksitirozolün safsızlıklardan ayrıştırılarak yüksek saflıkta ürün elde edilmesine olanak tanımaktadır (Rada, Guinda ve Cayuela, 2007).

Saf hidroksitirozol üretiminde önemli olan çevresel ve ekonomik etkiler, kullanılan hammadde ve üretim yöntemlerine bağlı olarak değişmektedir. Zeytinyağı işleme atık sularının işlenmesi, çevresel kirliliği azaltabilirken, aynı zamanda ekonomik fırsatlar sunmaktadır. Ancak biyoteknolojik yöntemlerle kıyaslandığında bazı sınırlamalara sahiptir (Roy, Mohanty, Dick ve Misra, 2023). Kimyasal ve fiziksel ekstraksiyon süreçleri genellikle yüksek maliyetli, enerji ve su tüketimi yoğun olmakta ve bazı durumlarda organik çözücü kullanımını gerektirmektedir; ayrıca fenolik bileşiklerin hassas yapısı nedeniyle kayıp ve bozunmalar oluşabilmektedir. Buna karşılık, biyoteknolojik yöntemler, enzimatik dönüşüm veya mikroorganizma temelli üretim süreçleri ile hidroksitirozolün daha düşük maliyet ve çevresel etkiyle üretilmesini mümkün kılmakta, aynı zamanda bileşiğin biyolojik aktivitesini korumada daha avantajlı olmaktadır (Ait-Kaddour ve diğerleri, 2024).

2.3.3. Biyolojik aktivite ve stabilite

Zeytin, zeytinyağı ve zeytincilik yan ürünlerinin biyolojik aktiviteleri ve stabilitesi, başta polifenol içeriği, yağ asidi profili, steroller ve diğer minör bileşenler olmak üzere, aynı zamanda duyuşal parametreler tarafından şekillendirilmektedir. Bu bileşenler, bir yandan antioksidan

kapasite ve oksidatif stabiliteyi doğrudan etkilerken, diğer yandan tat, aroma ve renk gibi duyuşal özellikler üzerinde belirleyici rol oynamaktadır (Cao ve diğerleri, 2021).

Avrupa Birliği Komisyonu Uygulama Yönetmeliği (2022/2105), zeytinyağındaki hidroksitirozol ve türevlerinin biyolojik etkinliğini etkileyen bileşimsel ve duyuşal parametrelerin düzenli olarak izlenmesini ve sağlık beyanlarıyla uyumlu şekilde raporlanmasını zorunlu kılmaktadır. Bu düzenleme, hidroksitirozol ve türevlerinin antioksidan kapasitesi ile diğer biyolojik faydalarının korunmasını desteklerken, ürünlerde zamanla ortaya çıkabilecek kalite ve stabilite kayıplarının doğru ve güvenilir şekilde izlenmesini de sağlamaktadır.

Hidroksitirozol, Regulation (EC) No 258/97 kapsamında novel food (yeni gıda) bileşeni olarak değerlendirilmiş ve European Food Safety Authority (EFSA) tarafından güvenlik açısından incelenmiştir. Panel, bileşimin tanımı, saflığı, partiler arası değişkenlik, stabilitesi ve üretim sürecine ilişkin sunulan verilerin yeterli olduğunu belirlemiş ve önerilen kullanım biçim ve düzeylerinde hidroksitirozolün güvenli olduğunu rapor etmiştir (EFSA, 2017).

Gözlenen olumsuz etki göstermeyen en yüksek doz (no observed adverse effect level, NOAEL) ve öngörülen maksimum günlük alım değerlerinin karşılaştırılması sonucunda, çocuklar (3–9 yaşı) için marjinal maruziyet riski (MoE) 100 olarak, ergen, yetişkin ve yaşı nüfus için ise en az 200 olarak hesaplanmıştır. MoE değerleri birimsizdir; çünkü hem NOAEL hem de günlük maruziyet mg/kg vücut ağırlığı/gün cinsinden olup, oran alınarak birimler birbirini götürmektedir. Bu sayede, MoE değeri hedef nüfus için güvenlik marjının nicel bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, hidroksitirozolün gıdalarda önerilen dozlarda kullanımıyla elde edilecek sistemik maruziyetin, geleneksel olarak tüketilen zeytin ve zeytinyağı kaynaklı maruziyetten eşit veya daha düşük olabileceği belirtilmiştir. Bu nedenle, hidroksitirozolün yenilikçi gıda bileşeni olarak önerilen kullanım biçim ve düzeylerinde güvenli olduğu sonucuna varılmış; ancak bu değerlendirme yalnızca güvenlik açısından yapılmış olup, etkinlik ve sağlık faydaları bu görüş kapsamında ele alınmamıştır (EFSA, 2017; PMC, 2020).

Bu bağlamda, yalnızca zeytinyağında değil, zeytin, zeytin yaprağı ve bunlardan elde edilen ekstraktlarda bulunan fenolik bileşiklerin biyolojik aktiviteleri ile depolama, işleme ve çevresel faktörlere karşı gösterdikleri stabilite, ürünlerin fonksiyonel değerini ve raf ömrünü belirleyen kritik unsurlar arasında yer almaktadır. Dolayısıyla, hidroksitirozol ve türevleri gibi başlıca

fenolik bileşiklerin hem antioksidan etkinlikleri hem de oksidatif degradasyona yatkınlıkları, zeytincilik ürünlerinin sağlık etkilerinin sürdürülebilirliği açısından temel bir araştırma alanı oluşturmaktadır (Habibi ve diğerleri, 2025).

Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesi, yapısal özellikleriyle doğrudan ilişkilidir. Saf fenol yapısı, tek başına düşük düzeyde reaktivite sergilerken; 2, 4 veya 6 pozisyonlarına alkil gruplarının bağlanması, indüktif etki yoluyla fenolik hidroksil grubunun elektron yoğunluğunu artırmakta ve böylece lipid radikalleriyle olan reaksiyon hızını yükseltmektedir. Ancak bu alkil gruplarının hacimsel olarak büyük olması, sterik engel oluşturarak radikalın aktif merkeze erişimini sınırlamakta ve dolayısıyla reaktiviteyi azaltmaktadır (Costa ve diğerleri, 2021).

Fenolik antioksidanların etkinliği büyük ölçüde fenoksil radikalının rezonansla stabilize olabilmesine bağlıdır. Bu bağlamda, aromatik halkada 2 veya 4 pozisyonuna ikinci bir hidroksil grubunun eklenmesiyle oluşan katekol yapısı, fenoksil radikalın semikinon formu üzerinden başka bir lipid radikaliyle etkileşime girerek daha kararlı kinon yapısına kadar okside olabilmesini mümkün kılar. Bu yapı hem elektron delokalizasyonunu artırmakta hem de zincir kırıcı antioksidan mekanizmayı güçlendirmektedir. Dolayısıyla, katekolik yapıların varlığı, fenolik bileşiklerin antioksidan kapasitesini anlamlı ölçüde artıran temel bir yapısal özelliktir (Geng ve diğerleri, 2023).

Katekol gruplarının varlığı, bu bileşiklerin hem yüksek antioksidan kapasitesinin hem de sınırlı stabilitesinin temel nedenidir. Katekol yapısındaki hidroksil grupları, düşük O–H bağ ayrışma entalpileri (77,7– 80,1 kcal/mol) sayesinde serbest radikallere karşı yüksek reaktivite göstermektedir. Buna karşılık, tek hidroksil grubu taşıyan fenollerde bu değer daha yüksektir (85,1–88,0 kcal/mol), bu da onların daha düşük antioksidan kapasiteye sahip olmasına rağmen oksidatif koşullarda daha stabil kalmalarına yol açmaktadır. Katekol yapısındaki hidroksil grupları, rezonans stabilizasyonu sayesinde radikalleri etkin biçimde nötralize eder; buna karşın oksijen, ışık ve yüksek sıcaklık gibi çevresel faktörlere maruz kaldıklarında kolaylıkla oto-oksidasyona uğrayarak kinon türevlerine dönüşmektedir. Bu nedenle, hidroksitirozol gibi katekolik polifenoller yüksek biyolojik aktivite gösterse de depolama ve işleme koşullarında belirgin stabilite sorunları sergilemektedir (Bernini ve diğerleri, 2012).

Bu sınırlamalar, fonksiyonel ve biyolojik etkinliğin korunması açısından önemli zorluklar yaratmakta olup, nanoteknolojik taşıyıcı sistemler bu noktada etkili bir çözüm sunmaktadır. Söz konusu sistemler, polifenollerin oksidatif bozulmalara karşı korunmasını, arayüzeyde etkin konumlanmasını ve kontrollü salımını sağlayarak biyoyararlanımlarını ve fonksiyonel performanslarını artırabilmektedir. Bu nedenle, üretim, karakterizasyon ve uygulama aşamalarında optimize edilen nanoteknolojik taşıyıcı sistemler, hidroksitirozol ve türevlerinin gıda, besin takviyesi ve farmasötik uygulamalarda etkinliğinin artırılmasında kritik bir rol oynamaktadır.

2.4. Nanoteknolojik Taşıyıcı Sistemler

Fonksiyonel polifenoller, özellikle hidroksitirozol ve türevleri, yüksek biyolojik aktiviteye sahip olmalarına karşın oksidatif bozunma, düşük çözünürlük ve gastrointestinal koşullar nedeniyle stabilite kaybına uğrayabilmektedir. Nanoteknolojik taşıyıcı sistemler, bu moleküllerin korunması, kontrollü salımı ve hedef dokularda etkinliğinin artırılması açısından etkili bir çözüm sunmakta; arayüzeyde optimal konumlanmaları sayesinde antioksidan performans ve biyoyararlanımı artırmaktadır (Zhang, Wang, Liu ve 2022).

Bu bölümde, nanoteknolojinin temel prensiplerinden başlayarak taşıyıcı sistemlerin tarihçesi, üretim ve kapsülleme yöntemleri ile fizikokimyasal karakterizasyonları ele alınacaktır.

2.4.1. Taşıyıcı sistemler: Sınıflandırma ve üretim

Taşıyıcı sistemlerin yapısal bileşenleri, sistemlerin etkinliğini anlamada temel bir rol oynamaktadır. Farklı taşıyıcı tipleri, içeriklerin fizikokimyasal özellikleri, yükleme kapasiteleri ve salım kinetiklerine göre çeşitlenmektedir (Ozkan, Kostka, Esatbeyoglu ve Capanoglu, 2020). Sistem performansı, partikül boyutu, yüzey kimyası, morfolojik bütünlük ve kontrollü salım mekanizmalarına bağlı olarak değişmektedir (Bayer, 2023; De, Mahata ve Kim, 2022).

Özellikle nano-ölçekli yapılar, biyolojik bariyerleri aşabilme ve dolaşımdaki kalış sürelerinin uzunluğu sayesinde mikro-ölçekli sistemlere göre önemli avantajlar sağlamaktadır (Wu ve diğerleri, 2022). Nanoteknoloji, 100 nm altındaki boyutlarda atomik ve moleküler düzeyde yürütülen araştırma ve geliştirme faaliyetlerini kapsayan bir alan olarak kabul edilmektedir (Yakar, 2018). Bu boyut aralığı, malzemelerin makro ölçekteki davranışlarından farklı özellikler sergilemesine olanak tanır ve araştırmacılara daha dayanıklı, hafif ve işlevsel

malzemeler geliştirme imkanı sunmaktadır (Ahmed ve diğerleri, 2012). Bu kapsamda nanokapsül, nanosfer, lipozom, dendrimer, niozom/ proniozom, hidrojel ve karbon nanotüp gibi çeşitli morfolojiler kullanılmaktadır (Squillaro, Cimini, Peluso, Giordano ve Melone, 2018).

Nanotaşıyıcıların üretiminde kullanılan teknikler, partikül boyutu, morfoloji ve salım kinetiği üzerinde belirleyici olup sistemlerin biyoyararlanımının iyileştirilmesinde önemli rol oynamaktadır (Raychaudhuri ve diğerleri, 2020). Kapsülleme, aktif bileşiğin kabuk içine hapsedilmesi, çözünmesi veya yüzey adsorpsiyonu yoluyla gerçekleştirilir (Lammari ve diğerleri, 2021). Kapsülleme teknolojileri, fiziksel (ör. sprey kurutma), kimyasal (ör. in situ polimerizasyon) ve fizikokimyasal (ör. iyonik jelasyon, hidrofobik etkileşimler) prensiplere dayanmaktadır (Alam ve diğerleri, 2023; English, Okagu, Stephens, Goertzen ve Udenigwe, 2023).

Nanotaşıyıcılar üretim yaklaşımına göre top-down (emülsifikasyon–çözücü buharlaştırma) veya bottom-up (koaservasyon, nanopresipitasyon, süperkritik akışkanlar, inklüzyon kompleksasyonu) yöntemlerle hazırlanmakta ve her yöntem, formülasyon ihtiyaçlarına göre seçilmektedir (Jafari, 2017; Alam, Kaur ve Kour, 2023). Bu tekniklerin avantaj ve dezavantajları Tablo 2.3’te özetlenmiştir.

Tablo 2.3. Farklı kapsülleme ve nanotaşıyıcı üretim tekniklerinin avantaj ve dezavantajları

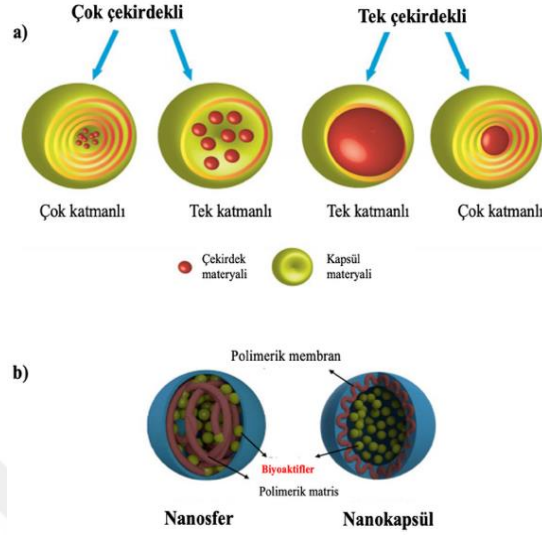
Yöntem	Avantajları	Dezavantajları	Kaynaklar
Dondurarak kurutma (Freeze-drying)	Gözenekli ve sıkışabilir yapılar oluşturmakta, düşük sıcaklıkta uygulanabilmektedir.	İşlem maliyetli ve zaman alıcı, hücre ve molekül yapısında olası hasar	Todorovic ve diğerleri (2022)
Sprey kurutma (Spray-drying)	Sürekli üretim olanağı sunmakta, hızlı ve yüksek verimli olup, farklı uygulamalara uyarlanabilir.	Termal olarak hassas bileşiklerde bozulma riski, parçacık boyutu kontrolü sınırlı	Pashazadeh ve diğerleri (2021)

Tablo 2.3. Farklı kapsülleme ve nanotaşıyıcı üretim tekniklerinin avantaj ve dezavantajları
(devamı)

Yöntem	Avantajları	Dezavantajları	Kaynaklar
Ekstrüzyon	Düşük maliyetle üretim yapılabilmekte, yüksek miktarda ürün elde edilmekte ve organik çözücü veya yüksek sıcaklık kullanılmasına gerek kalmamaktadır.	Büyük ölçekli üretimde uyum zorluğu, viskoz çözeltilerde sınırlamalar, parçacık boyutu kontrolü sınırlı	Bamidele ve Emmambux (2021)
Elektroeğirme / Elektrospreyleme	Termal bozulma riski bulunmamakta, boyut ve morfoloji kontrolü mümkün, basit ve düşük başlangıç maliyetine sahiptir.	Endüstriyel ölçekte sınırlı, özel ekipman gerektirir	Coelho ve Estevinho (2023)
Mikroemülsiyon	Kolay hazırlanmakta, maliyeti düşük ve ölçeklenebilir.	Düşük stabilite, sınırlı taşıma ve dağıtım kapasitesi	Chanioti, Katsouli ve Tzia (2021)
Nanoemülsiyon	Kinetik olarak stabil, optik ve dağılım özellikleri geliştirilmiş	Hızlı salım, uzun süreli stabilitesi sınırlı	Tabar ve diğerleri, (2025)
Lipozom temelli kapsülleme	Kontrollü salım sağlamakta, biyoyararlanımı yüksek, biyoyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir.	Yüksek maliyet, düşük fiziko-kimyasal kararlılık, parçacık boyutunda çeşitlilik	Camilleri, Attard ve Lia (2025)
Koaservasyon	Hem hidrofilik hem hidrofobik bileşenlerin kapsüllenmesine uygun, yüksek kapsülleme verimi, kontrollü salım imkânı, nispeten basit işlem basamakları bulunmaktadır.	Ölçek büyütmede zorluk, pH ve iyonik şiddete duyarlılık, kapsül duvarlarının sınırlı mekanik dayanıklılığı, çapraz bağlayıcıların toksisite riski	Aloys ve diğerleri (2016)
Lipid bazlı kapsülleme (Katı lipid nanoparçacıklar / Nanoyapılı lipid taşıyıcılar)	Üretim ölçeklenebilir, biyoyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir, kontrollü salım sağlanabilmektedir.	Katı lipid nanoparçacıklarda düşük yükleme kapasitesi, jelleşme riski, depolama sırasında aktif maddenin kaybı	Subroto, Andoyo ve Indiarto (2023)

Bu yapılara ilişkin morfolojik çeşitlilik, özellikle tek çekirdekli ve çok çekirdekli kapsüller ile bunların tek katmanlı ve çok katmanlı versiyonlarının yanı sıra nanosfer ve nanokapsül

farklılıklarını da kapsamaktadır (Ezhilarasi, Karthik, Chhanwal ve Anandharamakrishnan, 2013; Zabot ve diğerleri, 2022) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Mikro ve nanokapsül sınıflandırması a) Tek çekirdekli ve çok çekirdekli kapsüllerin tek katmanlı, çok katmanlı sınıflandırması, b) Nanosfer ve nanokapsül karşılaştırması (Ezhilarasi ve diğerleri, 2013)

Sonuç olarak, her yöntem belirli formülasyon parametrelerinde üstünlük sağlarken, ölçeklenebilirlik, stabilite ve biyouyumluluk açısından çeşitli sınırlılıklar barındırmaktadır. Bu nedenle, gıda ve biyomedikal alanlardaki uygulamalar için daha yüksek stabilite, kontrollü salım ve biyolojik uygunluk sağlayan gelişmiş nanotaşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi yönünde araştırmalar hız kazanmıştır (Suk, Xu, Kim, Hanes ve Ensign, 2016).

2.5. Nanoteknoloji Uygulamaları: Gıda Bilimi

Son yıllarda nanoteknoloji, gıda endüstrisinde yenilikçi çözümler sunmakta ve sektörde önemli bir dönüşümü mümkün kılmaktadır. Nanoteknolojinin gıda sektöründeki kullanımı, ürün kalitesini artırmak, gıda güvenliğini iyileştirmek ve tüketici taleplerine etkin yanıt vermek gibi çeşitli avantajlar sağlamaktadır (Ishida ve Ho, 2021).

2.4. Nanoteknolojik Taşıyıcı Sistemler başlıklı bölümde, nanoenkapsülasyon sistemlerinin üretim yöntemleri, taşıyıcı bileşenlerin rolü ve fizikokimyasal karakterizasyonuna ilişkin temel parametreler ayrıntılı olarak ele alınmıştır. Bu bilgiler, sistemlerin yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin anlaşılması açısından kritik öneme sahiptir. Ancak nanotaşıyıcıların gıda endüstrisinde değer kazanmasını sağlayan asıl unsur, bu özelliklerin fonksiyonel performans ve biyolojik etkinliğe nasıl yansıtıldığıdır.4

Bu bölümde nanotaşıyıcı sistemlerin gıdalarda organoleptik özellikleri iyileştirme, biyoaktif bileşenlerin stabilitesini artırma ve biyoyararlanımı optimize etme gibi fonksiyonel katkıları ele alınacaktır. Ayrıca, nanoenkapsülasyon teknolojilerinin gıda ürünlerinde kontrollü salım, raf ömrü uzatma ve mikrobiyal güvenlik sağlama potansiyeli ile birlikte, güncel endüstriyel uygulamalardaki kullanım örnekleri ve pratik faydaları da incelenecektir. Bu yaklaşım, yapısal özelliklerden fonksiyonel performansa geçişi mantıklı ve bütünsel bir çerçevede sunmaktadır.

2.5.1. Gıda sektöründe nanosistemler

Gıda alanında nanoteknoloji tabanlı yaklaşımlar, 2000’li yıllardan itibaren ambalaj, ürün dayanıklılığı ve besin bileşenlerinin taşınması yönünde uygulanmaya başlamıştır. Örneğin, nanopartiküller gıdalarda renk, tat ve doku özelliklerini iyileştirmekte; nanoemülsiyonlar ise yağ ve su fazlarının homojen karışmasını sağlayarak ürün stabilitesini artırmaktadır (Weiss ve diğerleri, 2006). Kil, silika ve montmorillonit bazlı nanopartiküller polietilen veya polipropilen matrislere dispersiyon yöntemiyle entegre edilerek gaz ve su buharı bariyerini güçlendirmekte, oksijen ve karbondioksit geçişini sınırlandırmakta ve taze ürünlerin oksidatif bozulmasını geciktirmektedir (Li, Ren, Perkins, Hu ve Wang, 2021).

Nanoteknolojik ambalajlarda ayrıca altın ve gümüş nanopartiküller veya karbon nanotüpler kullanılarak pH değişimi, gaz konsantrasyonu veya biyolojik bozunma ürünlerini tespit eden renk değiştirici sensörler uygulanmaktadır (Ghanbarzadeh, Oleyaei ve Almasi, 2015). Antimikrobiyal nanopartiküller (Ag, ZnO, TiO₂) ambalaj matrisine dahil edilerek mikroorganizmaların gelişimi engellenmekte ve gıda kaynaklı bozulmaların önüne geçilmektedir (Bajpai ve diğerleri, 2018). Gıda ve nutrasötik uygulamalarda öne çıkan nanotaşıyıcı sistemler şunlardır:

- **Nanoemülsiyonlar:** Suda veya yağda çözünen aktif bileşenlerin taşınmasını sağlar, biyoyararlanımı artırır ve kontrollü salım imkânı sunar (Tabar, Nateghi, Ravan ve Rashidi, 2025).
- **Nanolipozomlar:** Çift fosfolipid tabakaları sayesinde hem sulu hem lipofilik bileşenleri taşır, hücre zarlarıyla biyouyumlu etkileşim sağlar ve hedefe özgü salım sunmaktadır (Ahmadi, Elhamirad, Mollania, Saeidi Asl ve Pedramnia, 2022).

- **Lipid nanopartiküller:** Katı lipid nanoparçacıklar (solid lipid nanoparticles, SLN) ve nanoyapılı lipid taşıyıcılar (nanostructured lipid carriers, NLC) uzun süreli salım ve düşük toksisite sunar; NLC'ler lipid karışımları sayesinde yükleme kapasitesini artırmaktadır (Akbarzadeh ve diğerleri, 2013; Yan ve diğerleri, 2022).
- **Niozomlar / Proniozomlar:** Çift tabakalı veya katmanlı veziküller şeklinde organize olan bu sistemler hem sulu hem lipofilik bileşenleri taşır; proniozomlar hidrasyon sonrası stabil niozomlara dönüşerek kontrollü salım sağlamaktadır (Hu ve Rhodes, 1999; Mor ve diğerleri, 2021; Shafiepour ve diğerleri, 2025).
- **Ramnozomlar ve Nano-fitozomlar:** Bitkisel aktif bileşenlerin taşınması ve biyoyararlanımının artırılması için fosfolipid ile kompleksleşmiş yapılar sunmaktadır (Alsamarrai, El-Zaafarany ve Kamel, 2024).

Son yıllarda nanoteknoloji, gıda endüstrisinde yenilikçi çözümler sunmakta ve sektörde önemli bir dönüşümü mümkün kılmaktadır. Nanoteknolojinin gıda sektöründeki kullanımı, ürün kalitesini artırmak, gıda güvenliğini iyileştirmek ve tüketici taleplerine etkin yanıt vermek gibi çeşitli avantajlar sağlamaktadır (Ishida ve Ho, 2021).

Gıda ve besin takviyesi sektöründe nanoenkapsülasyon teknolojileri giderek daha fazla uygulanmaktadır. Bu yöntem, özellikle biyoaktif bileşenlerin biyoyararlanımının artırılması, işleme ve depolama koşullarında stabilitelerinin korunması ve kontrollü salımın sağlanması açısından önemli avantajlar sunmaktadır (Schlogl ve diğerleri, 2025).

Bu bağlamda, farklı taşıyıcı sistemler geliştirilmiş olup, her bir sistemin yapısal özellikleri ve fonksiyonel katkıları ürün performansını doğrudan etkilemektedir. Gıda endüstrisindeki güncel nanoenkapsülasyon uygulamaları ve bunların karakteristik özellikleri Tablo 2.4 özetlenmiştir. Tablo incelendiğinde, özellikle lipid bazlı taşıyıcıların biyoyararlanımı artırmadaki başarısı dikkat çekmektedir.

Tablo 2.4, nanoenkapsülasyon teknolojilerinin gıda endüstrisinde biyoaktif bileşenlerin taşınması, stabilizasyonu ve kontrollü salımı için etkin bir yaklaşım sunduğunu göstermektedir.

Tablo 2.4. Gıda ve besin takviyelerinde kullanılan nanoenkapsülasyon teknolojileri

Firma Adı	Ürün / Teknoloji	Taşıyıcı Sistem	Öne Çıkan Özellikler
Abdi İbrahim – Lipozone	Lipozomal B12 60 ml Damla (Abdi İbrahim, t.y.-a)	Lipozomal	Vitamin B12 takviyesi
Abdi İbrahim – Lipozone	Lipozomal Curcumin 30 Kapsül (Abdi İbrahim, t.y.-b)	Lipozomal	Anti-inflamatuvar ve eklem desteği
Abdi İbrahim – Lipozone	Lipozomal Glutasyon Kapsül (Abdi İbrahim, t.y.-c)	Lipozomal	Güçlü antioksidan, hücre koruması ve detoksifikasyon
Abdi İbrahim – Lipozone	Lipozone Coenzyme Q10 100 mg / 30 Kapsül (Abdi İbrahim, t.y.-d)	Lipozomal	Enerji üretimi ve hücre sağlığı desteği
Abdi İbrahim – Lipozone	Lipozone Quercetin 125 mg / 30 Kapsül (Abdi İbrahim, t.y.-e)	Lipozomal	Antioksidan, bağışıklık desteği
Aquanova AG	NovaSOL® – Misel Teknolojisi (Aquanova AG, t.y.)	Misel	Düşük çözünürlüklü bileşenlerin stabilizasyonu, biyoyararlanım artışı
BioDelivery Sciences International	Bioral™ Amphotericin B (nanokokleat) (BioDelivery Sciences International, 2022)	Nanokokleat	Hassas bileşenlerin stabilitesi, kontrollü salım
Codeage LLC.	Nanofood® Liposomal Wonder-C (C, D3, E & Zinc) (Codeage LLC, t.y.-a)	Lipozomal	Vegan D3, K2 ve B12 kombinasyonu, yüksek biyoyararlanım, lezzetli karışık meyve aroması

Tablo 2.4. Gıda ve besin takviyelerinde kullanılan nanoenkapsülasyon teknolojileri (devamı)

Firma Adı	Ürün / Teknoloji	Taşıyıcı Sistem	Öne Çıkan Özellikler
Lipo Life	LLT2 – Boswellia ve Curcumin (Lipo Life, t.y.)	Lipozomal	Eklem sağlığı ve inflamasyon desteği; yüksek biyoyararlanım; LDL oksidatif hasara karşı koruma
LivOn Laboratories	Lypo-Spheric™ Vitamin C (LivOn Laboratories, t.y.)	Lipozomal	Vitamin C takviyesi, hızlı emilim
Mediniti	AdvanceMax Lipozomal Koenzim Q10 (Mediniti, t.y.-a)	Lipozomal	Enerji üretimi ve hücre sağlığı desteği
Mediniti	AdvanceMax Lipozomal Magnezyum (Mediniti, t.y.-b)	Lipozomal	Yüksek biyoyararlanım, kas ve sinir sağlığı desteği
NutraLease Ltd.	NSSL – Nano-Sized Self-assembled Liquid Structures (NutraLease Ltd., t.y.)	NSSL / Misel	Suda çözünmeyen besin öğelerinin taşınması, kontrollü salım
Swiss Bork	Mag-5x Liposomal Magnesium (Swiss Bork, t.y.)	Lipozomal	Hızlı emilim, kas ve sinir sağlığını destekler
VeNatura	Lipozomal Demir ve Vitamin C Kapsül (VeNatura, t.y.)	Lipozomal	Demir ve C vitamini kombinasyonu, bağışıklık ve enerji desteği
Codeage LLC.	Nanofood® Liposomal Wonder-D Liquid Vitamins (Codeage LLC, t.y.-b)	Lipozomal	Vitamin, mineral ve bitkisel bileşiklerin sinerjik etkisi

Örneğin, Codeage firması, Nanofood® serisi ile lipozomal taşıyıcı sistemleri kullanarak vitamin ve mineral içeren sıvı takviyeler sunmaktadır; vitamin D3, K2 ve B12 kombinasyonları veya kurkumin ve amino asit içeren formülasyonlar, lipozomal yapıları sayesinde yüksek emilim ve kontrollü salım sağlamaktadır (Codeage, 2025). Aquanova AG, NovaSOL®

teknolojisi ile misel bazlı nanoenkapsülasyon uygulamakta ve çözünürlüğü düşük bileşenlerin dispersiyonunu ve stabilitesini artırmaktadır (Aquanova, 2025). Benzer şekilde, NutraLease Ltd., suda çözünmeyen besin öğelerinin taşınmasını sağlayan kendiliğinden birleşen yapı (self-assembled liquid structures, NSSL) sistemleri geliştirmekte, BioDelivery Sciences International ise Bioral™ nano-kokelat sistemi ile hassas bileşenlerin stabilitesini korumakta ve kontrollü salımını mümkün kılmaktadır (BioDelivery Sciences International, 2025). Livethesource (2025), patentli nano-enkapsüle sıvı vitamin ve mineral takviyeleri ile günlük beslenmeye destek sunmaktadır.

2.5.2. Enkapsülasyonun fonksiyonel ve biyolojik etkileri

Nanoenkapsülasyon, işleme ve sindirim sırasında bileşenleri koruyarak etkin emilimi optimize eder; ayrıca nano-kaplamalar ve yenilebilir filmler ürünlere antimikrobiyal ve antioksidan özellik kazandırarak raf ömrünü uzatır ve mikrobiyal bozulmayı azaltır (Schlogl ve diğerleri, 2025).

Nanoteknoloji tabanlı sensörler, patojenleri, ağır metalleri ve pestisitleri hassas biçimde tespit ederek kalite ve güvenliğin gerçek zamanlı izlenmesini sağlar. Nanotoksosite ve nanomalzeme migrasyonu risklerinin değerlendirilmesi, bu teknolojilerin güvenli ve etkin uygulanabilirliği açısından kritik öneme sahiptir (Schlogl ve diğerleri, 2025). Farklı nanotaşıyıcı sistemlerin yapısı, fonksiyonel avantajları ve gıda uygulamaları Tablo 2.5'te özetlenmiştir.

Nanokapsüllerin sentezi için kullanılan teknikler beş ana grupta sınıflandırılır: lipid bazlı sistemler (nanoemülsiyon, NLC, nanolipozom), doğal nanotaşıyıcılar (siklodekstrin, kazein, nanokristaller), özel ekipmanlı üretim (elektrosprey, nanosprey, elektro-örülmüş nanofiberler), fonksiyonel biyopolimerik nanopartiküller ve diğer (amiloz nanoyapılar, protein nanotüpler, karbonhidrat nanojeller) tekniklerdir. Üretilen nanotaşıyıcılar genellikle 10-1000 nm boyut aralığındadır (Jafari, 2017; Pateiro ve diğerleri, 2021)

Tablo 2.5. Nanotaşıyıcı sistemlerin yapısı, fonksiyonel avantajları ve uygulamaları

Nanotaşıyıcı Tipi	Yapısı	Fonksiyonel Avantajları	Gıda Uygulamaları	Kaynaklar
Nanolipozomlar	Fosfolipid çift katmanlı veziküller; lipid ve sterol içerebilir.	Hem hidrofilik hem lipofilik bileşenleri taşıyabilir; biyoyararlanımı artırır, kontrollü salım sağlar.	Biyoaktif bileşen ve polifenol taşınımı; aroma stabilizasyonu	Ojagh ve Hasani (2018)
Nanokapsüller	Katı veya sıvı çekirdek; polimerik kabuk ile çevrili	Hassas bileşenleri çevresel faktörlerden korur; kontrollü salım imkânı sunar.	Lipit-çözünen vitamin ve antioksidan enkapsülasyonu; aroma stabilizasyonu	Granata, Accardo, Consoli, Paradisi ve Geraci (2025)
Nanosferler	Polimerik katı matriks	Salım kinetiğini düzenler; aktif bileşenleri matriks içinde hapseder.	Polifenol taşınımı; probiyotik korunumu	Eszenyi, Sztrik, Babka ve Prokisch (2011); Hu ve diğerleri (2024)
Niozomlar/ Proniozomlar	İyonik olmayan yüzey aktif madde ve sterol destekli veziküller	Hedefe yönelik salım sağlar; stabiliteyi artırır.	Kontrollü biyoaktif taşıma; antimikrobiyal ajan uygulamaları	Abonashey ve diğerleri (2024); Silva ve diğerleri (2023)
Nanoemülsiyonlar	Su/yağ fazının nanometre boyutunda dağılımı	Biyoaktif bileşenlerin dispersiyonunu ve stabilitesini artırır.	Lipit-çözünen vitaminler; uçucu bileşik ve aroma enkapsülasyonu	Dasgupta, Ranjan, Mundra, Ramalingam ve Kumar (2016)
Metal nanopartiküller	Gümüş (Ag), çinko oksit (ZnO), titanyum dioksit (TiO ₂) nanopartikülleri	Güçlü antimikrobiyal etki; oksidatif bozulmayı önler.	Fonksiyonel gıdalar; aktif ambalaj sistemleri	Azam, Yasmeen, Rashid ve Latif (2022)
Karbon bazlı nanosistemler	Karbon nanotüpler; grafen oksit yapıları	Sensör özellikleri; taşıyıcı ve antimikrobiyal fonksiyonlar.	Gıda sensörleri; akıllı ve aktif ambalaj uygulamaları	Alves, Ferreira, Ferreira ve Nunes (2022)

Lipid bazlı nanoenkapsülasyon sistemleri, biyoaktif bileşenlerin taşınması, korunması ve stabilizasyonu için yaygın olarak tercih edilmektedir. Kontrollü salım özellikleri sayesinde bu sistemler, biyoaktif bileşenlerin biyoyararlanımını artırmada önemli bir rol oynamaktadır. Her ne kadar biyopolimer temelli nanokapsüller bazı avantajlar sağlasa da üretim süreçlerinin

karmaşıklığı endüstriyel ölçekte uygulanabilirliklerini sınırlamaktadır. Buna karşılık, suda çözünmeyen lipid bazlı nanotaşıyıcılar; yüksek kapsülleme verimi, biyouyumluluk ve düşük toksisite gibi avantajları sayesinde daha kolay ölçeklenebilir çözümler sunmaktadır. Bu bağlamda, lipozom, niozom ve proniozomlar, lipid bazlı veziküler taşıyıcı sistemler olarak öne çıkmaktadır (Jain, Jain ve Mahajan, 2014).

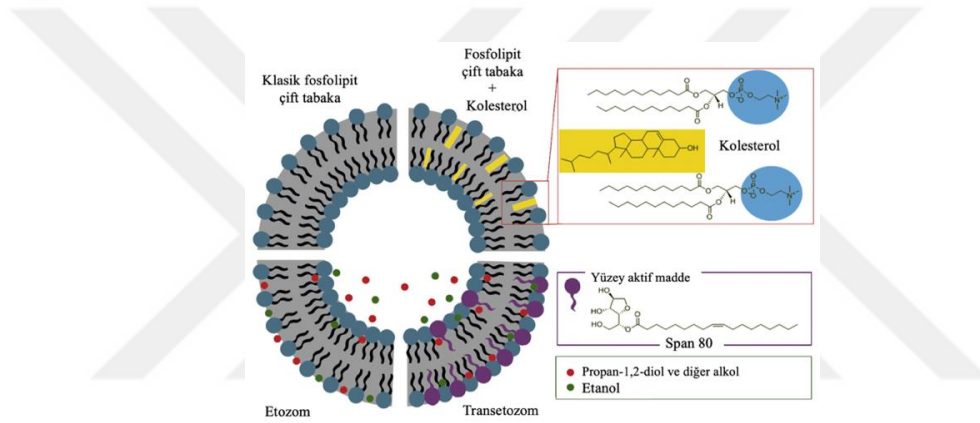
2.5.3. Lipozom

Lipozomlar, ilk kez 1960'lı yıllarda Alec D. Bangham tarafından tanımlanmış ve fosfolipitlerin sulu çözelti içinde kendiliğinden kapalı veziküller oluşturduğu gösterilmiştir. Bu süreç, temel olarak hidrofobik etki ile yönlendirilmekte ve elektrostatik etkileşimler, hidrojen bağları ile Van der Waals kuvvetleri tarafından stabilize edilmektedir. Lipozomlar, merkezi bir sulu bölme ve bunu çevreleyen bir veya daha fazla fosfolipit çift tabakasından oluşan yapay mikroskobik veziküllerdir. Hidrofilik bileşikler çekirdekte, hidrofobik molekülleri lipid tabakasında ve amfifilik maddeleri ara yüzeyde kapsülleyebilme özellikleri, onları ilaç taşıma ve gıda teknolojisi başta olmak üzere geniş bir uygulama alanına sahip nanotaşıyıcı sistemler haline getirmiştir (Laouini ve diğerleri, 2012).

Zamanla lipozomlar çeşitli modifikasyonlardan geçirilmiş ve fizikokimyasal özellikleri (ör. polimerzomlar daha dayanıklıdır), farmakokinetik profili (PEG'li lipozomlar daha uzun dolaşım ömrüne sahiptir; PEG: polietilen glikol) ve cilt penetrasyonu (etozomlar cilde geçişi artırır) gibi özellikleri geliştirilmiş yeni vezikül türleri ortaya çıkmıştır. Bu değişiklikler, genellikle "-zom" son eki kullanılarak adlandırılmıştır. Buna karşın, klinik kullanım için onaylanan veziküller çoğunlukla lipozom olarak anılmaktadır. Bu durum, 2018 yılında Amerika Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından yayımlanan "Liposome drug products: chemistry, manufacturing, and controls; human pharmacokinetics and bioavailability; and labelling documentation" başlıklı rehber dokümanla da desteklenmiş ve dokümanda yalnızca lipozomlar ele alınmıştır (FDA, 2018).

Klasik lipozomların yapısal modifikasyonları sonucunda etozomlar ve transetozomlar geliştirilmiştir. Lipozomların çift tabakası temel olarak fosfolipitlerden (örneğin model fosfolipit olarak fosfatidilkolin) oluşmakta ve genellikle membran stabilitesini artırmak amacıyla kolesterol ile desteklenmektedir. Etozomlar, yapılarında %10- 50 oranında etanol içermekte olup, bu etanol hem lipid çift tabakasına hem de sulu çekirdeğe entegre

olabilmektedir. Ayrıca etanolün propilen glikol gibi diğer alkollerle kombinasyonu sonucunda ikili etozom sistemleri elde edilebilmektedir. Transetozomlar ise etanolün yanı sıra, çift tabaka esnekliğini artırmak üzere kenar aktivatörü görevi gören yüzey aktif maddeler içermektedir. Bilozomlar ise klasik niozomların özel bir varyantı olup, noniyonik amfifillerin yanında sulu fazda safra tuzları barındırmaktadır. Safra tuzlarının varlığı, gastrointestinal ortamda enzimatik bozunma ve pH değişimlerine karşı vezikül bütünlüğünü korumakta, böylece sistemin stabilitesini artırarak oral yolla taşınan biyoaktif bileşenlerin biyoyararlanımını geliştirmektedir. Tüm bu yapısal modifikasyonlar, lipozom ve türevlerinin deri penetrasyonu, stabilite ve taşıma kapasitesi gibi fonksiyonel özelliklerini önemli ölçüde iyileştirmektedir (Apolinario, Hauschke, Nunes ve Lopes, 2021) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Klasik, tek katmanlı ve küresel lipozomların şematik gösterimi (Apolinario ve diğerleri, 2021)

Lipozomlar hem lipid hem de sulu faz içermeleri sayesinde yağda ve suda çözünebilen amfifilik bileşenlerin kapsülasyonu ve kontrollü salımında kullanılabilmektedir. Bu sistemlerin oluşumunda fosfolipitler ile su molekülleri arasındaki hidrofilik-hidrofobik etkileşimler kritik rol oynamaktadır. Lipozomların başlıca avantajları, kapsüllenen materyalin belirli bir süre korunabilmesi ve salımının kontrol edilebilmesidir. Ayrıca, kapsüllenen biyoaktif ajanlar midede sindirimden korunabilmekte ve bağırsaklarda daha yüksek biyoaktivite ve biyoyararlanım sağlayacak şekilde absorbe edilebilmektedir. Ancak fosfolipitlerin hidrolizi, depolama sırasında topaklanma, füzyon, sızıntı ve oksidasyon gibi sorunlar, lipozomların özellikle oral uygulamalarda kullanımını sınırlamaktadır (Evans ve Compton, 2017).

Lipozomların bazı dezavantajlarını gidermek amacıyla, fosfolipitlerin yerine iyonik olmayan yüzey aktif maddeler kullanılarak niozomlar geliştirilmiştir. Kolesterol ile birlikte çift tabakalı

veziküller oluşturan bu sistemler, yüzeylerine bağlanan polietilen glikol (PEG) zincirleri sayesinde daha stabil ve uzun ömürlü hâle getirilmektedir; bu işleme PEG'leme (PEGylation) denir. Yüksek stabiliteleri sayesinde protein ve peptitlerin taşınmasında etkili olan niozomlarda, kolesterol oranının artması kapsülleme kapasitesini azaltabilmektedir. Bu özellikler, niozomlar lipozomlara kıyasla daha dayanıklı ve güvenilir bir taşıyıcı sistem hâline getirmekte ve biyoaktif maddelerin stabil şekilde taşınmasını sağlayarak potansiyel biyoyararlanımlarını artırmaktadır (Hemati ve diğerleri, 2019).

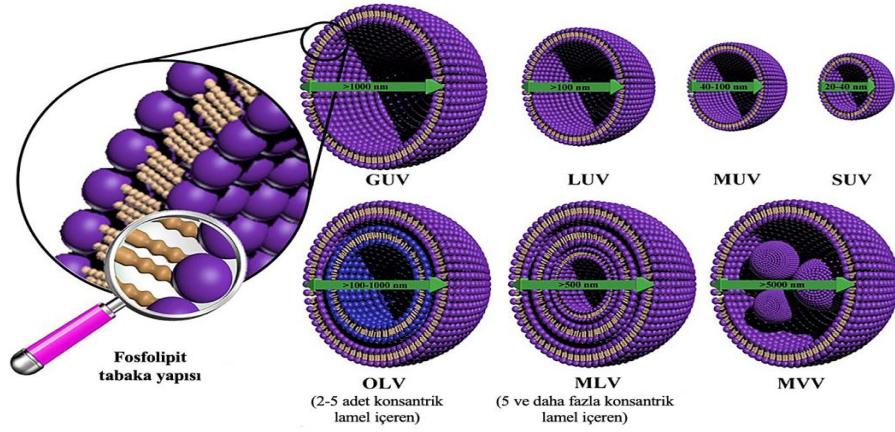
2.5.4. Niozom

Niozomlar, 1980'lerin ortalarında, fosfolipit bazlı lipozomların maliyet ve stabilite sorunlarını aşmak amacıyla geliştirilmiş, lipozom benzeri veziküler sistemlerdir. Niozomlar, fosfolipit içermemelerine rağmen çift katmanlı veziküler yapılar oluşturabilmektedir. Bunun temel nedeni, niozomların yapısında bulunan iyonik olmayan yüzey aktif maddelerin amfifilik karakteridir. Bu moleküller, hidrofilik baş grupları ile sulu faza doğru, hidrofobik kuyrukları ise birbirine bakacak şekilde dizilerek kendiliğinden çift katmanlı membranlar (bilayer) meydana getirmektedir. Yapıya eklenen kolesterol, membran akışkanlığını düzenleyerek veziküllerin stabilitesini artırmakta ve hem rijit hem de kontrollü geçirgen zarların oluşmasını sağlamaktadır. Fosfolipitlerin oluşturduğu lipozomlarla karşılaştırıldığında, niozomlar daha dayanıklı, oksidasyona dirençli ve ekonomik olarak avantajlı sistemler sunmaktadır. Bu özellikler, niozomların hem hidrofobik hem de hidrofilik biyoaktif ajanların kapsüllenmesi ve kontrollü salımı için uygun taşıyıcı sistemler hâline getirmektedir (Uchegbu ve Vyas, 1998).

Yapısal ve fonksiyonel olarak lipozomlara benzeyen niozomlar, çeşitli iyonik olmayan yüzey aktif maddeler kullanılarak hazırlanabilmektedir; bunlar arasında sorbitan monoesterler (Span 20, 40, 60, 80), polietilen glikol alkil eterler ve polietilen glikol sorbitan monoesterler (Tween 20, 60, 61, 80) yer almaktadır. Kullanılan yüzey aktif maddenin hidrofilik- lipofilik dengesi (HLB), vezikül oluşumunu ve dolaylı olarak niozomların parçacık boyutu, katman sayısı, yüzey yükü ve enkapsülasyon verimi gibi temel özelliklerini belirlemektedir; düşük HLB değerleri vezikül oluşumunu kolaylaştırmaktadır (Bnyan ve diğerleri, 2018). Bu parametreler hem *in vitro* hem de *in vivo* davranışları etkileyen kritik faktörlerdir ve niozomlar, boyut, katman sayısı ve hazırlama yöntemlerine göre sınıflandırılmaktadır (Moghassemi ve Hadjizadeh, 2014):

- Dev tek katmanlı vezikül (GUV, giant unilamellar vesicles): $>1\ \mu\text{m}$, tek katmanlı, ince film hidrasyon yöntemi (Moghassemi, Dadashzadeh, Azevedo, Feron, Amorim, 2021),
- Büyük tek katmanlı veziküller (LUV, large unilamellar vesicles): 100- 1000 nm, tek katmanlı, ters faz evaporasyonu/eter enjeksiyonu yöntemi (Chen, Hanning, Falconer, Locke ve Wen, 2019; Zarei ve diğerleri, 2013),
- Orta boyutlu tek lamelli veziküller (MUV, medium-sized unilamellar vesicle): 40- 100 nm, tek katmanlı, ince film hidrasyon yöntemi (Moghassemi ve diğerleri, 2021)
- Küçük tek katmanlı veziküller (SUV, small unilamellar vesicles): $<20-40\ \text{nm}$, tek katmanlı, sonikasyon/mikrofluidizasyon yöntemi (Abdelkader, Alani ve Alany, 2014),
- Çok katmanlı veziküller (MLV, multilamellar vesicles): $0,5-10\ \mu\text{m}$, çok katmanlı, ince film hidrasyonu/ pH gradyanı yöntemi (Ge, Wei, He ve Yuan, 2019; Tavano ve diğerleri, 2013),
- Az katmanlı veziküller (OLV, oligolamellar vesicle): 100- 500 nm, klasik film hidrasyonu yöntemi ile hazırlanmakta; lipidler organik çözücünde çözülerek ince bir film oluşturulmakta ve ardından uygun tampon veya su ile hidrasyon uygulanmaktadır. Oluşan MLV'ler, kontrollü sonikasyon veya ekstrüzyon işlemleri ile boyut ve lamel sayısı azaltılarak oligolamellar yapıya dönüştürülmektedir. Ayrıca proniozomların su ile temas etmesi sonucu da OLV'ler oluşabilmektedir (Laouni ve diğerleri, 2012).
- Çok veziküllü veziküller (MVV, multivesicular vesicles): $>1\ \mu\text{m}$, büyük veziküller içinde küçük veziküller, donma-çözme ve mekanik karıştırma yöntemi ile yapılmaktadır (Moghassemi ve Hadjizadeh, 2014).

Niozomların boyut ve lamel yapısına göre sınıflandırılması Şekil 2.3'te gösterilmektedir.



Şekil 2.3. Niozomların boyut ve lamel yapısına göre sınıflandırılması (Moghassemi ve diğerleri, 2021)

Lipid çift tabakalarının sayısı ve niozom konsantrasyonu, enkapsülasyon verimliliği ve ilaç salım kinetiğini doğrudan etkilemektedir. Niozomlar hücre tarafından alındığında veya metabolize edildiğinde, hücre içi dağılımları ve biyolojik davranışları lamel sayısına (lamellarity) bağlı olarak değişmektedir; bu nedenle lamel sayısının analizi, farmasötik ve biyolojik performansın değerlendirilmesinde kritik bir parametre olarak kabul edilmektedir (Laouni ve diğerleri, 2012).

Çok katmanlı veziküller (MLV) ve tek katmanlı niozomlar arasındaki yapısal farklılıklar, ilaç salım kinetiği üzerinde belirleyici bir rol oynamaktadır. MLV'ler, birden fazla lipid katmanına sahip olmaları nedeniyle ilacı vezikül içinde daha etkin şekilde tutmakta ve salımı geciktirmektedir; bu durum, yüksek enkapsülasyon verimi ve uzun süreli kontrollü salım ile kendini göstermektedir. Tek katmanlı niozomlar ise daha hızlı difüzyon göstermekte ve kısa süreli salım profiline sahiptir. Literatürde, Akbari, Abedi, Pardakhty ve Sadeghi-Aliabadi (2015) tarafından yapılan çalışmalar, asetazolamidin niozomlardan salımının difüzyon kontrollü bir mekanizma ile gerçekleştiğini ortaya koymakta ve çift tabaka yapısının salım hızını doğrudan etkilediğini göstermektedir.

Bu yapısal özellikler, niozomların biyobozunur, biyoyumlu, toksik olmayan ve immünojenik karakter sergilemesine olanak tanımakta; sistemik dolaşımdaki kalış süresini uzatmak ve hedefe yönelik ilaç teslimi sağlamak için önemli bir temel oluşturmaktadır. Vezikül boyutu, dolaşımdaki yarı ömrü ve hedef dokuya ulaşımı etkileyen önemli bir parametre olup, tabaka sayısı ve boyut içerdikleri ilaçların enkapsülasyon verimliliğini belirlemektedir. Küçük tek

katmanlı veziküller (SUV'ler) termodinamik olarak daha az stabil olup, agregasyon ve düşük yük kapasitesine sahiptir. Büyük tek katmanlı veziküller (LUV'lar) ise büyük su fazı içerdiklerinden hidrofilik ilaçlar için uygun olmaktadır. Çok katmanlı veziküller (MLV'ler) lipofilik ilaçlar için ideal olup, çok katmanlı membranları sayesinde daha stabil ve üretimi kolay sistemler sunmaktadır (Moghassemi ve Hadjizadeh, 2014) (Şekil 2.3).

Niozom üretimi için ince film hidrasyonu, ters faz buharlaştırma, mikroakışkan yöntem, etanol enjeksiyon, eter enjeksiyon, kabarcık yöntemi, ultrasonikasyon, transmembran pH gradyanı yöntemi ve ısıtma yöntemi literatürde yaygın olarak kullanılmaktadır (Rogerson ve diğerleri, 1988; Ishii ve Nii, 2014).

İnce film hidrasyonu yöntemi, niozom üretiminde kullanılan geleneksel bir tekniktir. Yüzey aktif maddeler ve lipidler organik çözücünde çözülme, çözücünün uzaklaştırılmasıyla ince bir film elde edilmekte ve bu film sulu faza dağıtılmaktadır. Hidrasyon sırasında, hidrofilik ilaçlar sulu faza, lipofilik ilaçlar lipid çift tabakasına eklenmekte ve el çalkalaması ile çok katmanlı veziküller, çalkalama yapılmadan ise büyük tek katmanlı veziküller elde edilmektedir. Yöntem yüksek kapsülleme verimi sağlamakta, ancak partikül boyutu büyük ve dağılım düzensiz olabilmektedir; sonikasyon veya ekstrüzyon ile optimizasyon yapılabilmektedir. Hidrasyon sıcaklığı, kapsülleme verimi ve lipid tabakasının akışkanlığını etkilerken; yük oluşturuca ajanlar da partiküllerin stabilitesini artırmaktadır (Machado ve diğerleri, 2018).

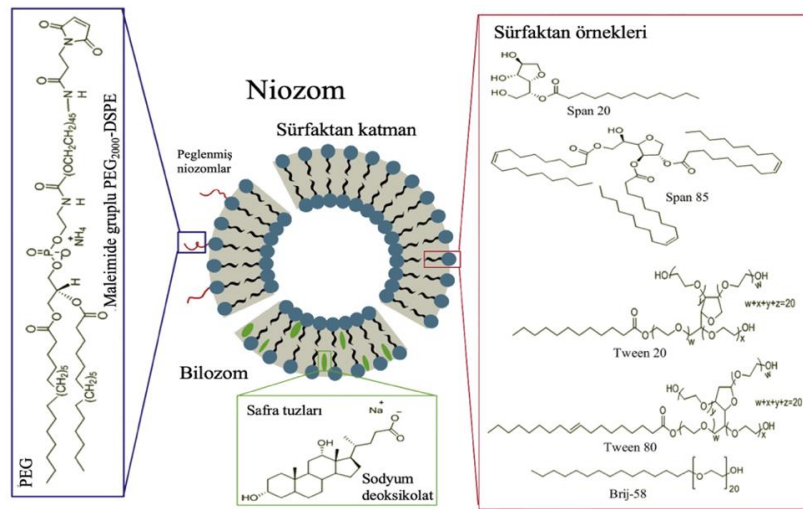
Niozom üretiminde kabarcık tekniği, sıcaklığın kontrolü için su banyolu üç boyunlu yuvarlak dipli bir balon içerisinde uygulanmaktadır (Mardani, Rajabzadeh, Malaekheh-Nikoue ve Bostan, 2025).

Çoklu membran ekstrüzyon (multiple membrane extrusion) yönteminde, önce ince bir lipid filmi oluşturulmakta; ardından ilaç içeren sulu faz ile hidrasyon yapılmakta ve ortaya çıkan süspansiyon, polikarbonat membranlardan geçirilerek parçacık boyutu kontrol edilmektedir. Polioksietilen alkil eter kullanımı ise, vezikül boyutu ve tabaka sayısının; sıcaklık, çalkalama ve kullanılan yüzey aktif madde türü gibi parametrelerle ayarlanabilmesini sağlamaktadır (Rogerson ve diğerleri, 1988).

Emülsiyon yönteminde, sulu faz içinde yağ (O/W, oil-in-water) tipi bir emülsiyon oluşturulmakta; lipid ve yüzey aktif maddeler organik çözücünde çözülüp sulu faza eklenmektedir. Karışım emülsiyon hâline geldikten sonra, organik çözücü uzaklaştırılmakta ve oluşan niozomlar sulu fazda dağılmış olarak elde edilmektedir. Bu yöntem özellikle lipofilik ilaçların kapsülasyonu için uygundur (Mawazi, Ge ve Widodo, 2025).

Lipid enjeksiyon yönteminde ise eritilmiş lipid ve yüzey aktif madde, ilaç içeren sulu faza doğrudan enjekte edilmekte ve böylece veziküller oluşarak sulu fazda dağılmaktadır (Ishii ve Nii, 2014).

Niozomlar, PEG'leme (polietilen glikol ekleme) veya diğer modifikasyonlarla biyouyumluluk ve yapısal stabilite açısından optimize edilebilmektedir. Kullanılan başlıca yüzey aktif maddeler arasında alkil eterler, alkil gliseril eterler, sorbitan yağ asidi esterleri ve polietilen glikol esterleri yer almaktadır. Ayrıca, katyonik niozomlar, bilozomlar (sulu fazda safra tuzları içeren niozomlar) ve diskomlar gibi varyasyonlar geliştirilmiştir. Özellikle bilozomlar, gastrointestinal sistemdeki asit ve diğer bileşiklerin oluşturduğu hasara karşı çift tabakayı stabilize ederek oral uygulamalarda avantaj sağlamaktadır (Apolinario ve diğerleri, 2021; Said, Arafa, El-Dakroury, Alshehri ve El Maghraby, 2024) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Niozom ve bilozomların yapısal gösterimi (Apolinario ve diğerleri, 2021)

Bu modifikasyonlar sayesinde niozomların boyut, yüzey yükü ve enkapsülasyon verimliliği kontrol edilebilmekte; klasik lipozomların sınırlamalarının üstesinden gelinerek

biyoyararlanım ve hedefe ulaşım kapasitesi artırılabilir (Huang, Chen, Chen, Gao ve Liang, 2008).

Sonuç olarak, PEG'leme veya kenar aktivatörleri ile modifiye edilen niozomlar, boyut, yüzey yükü ve kapsülleme verimliliği açısından daha iyi kontrol edilebilmekte ve böylece klasik lipozomların sınırlamalarını aşarak biyoyararlanım ve hedefe ulaşım kapasitesini artırmaktadır (Huang ve diğerleri, 2008).

Lipozomlara göre daha yüksek stabilite, daha düşük maliyet ve kullanım kolaylığı sunan niozomlar, iyonik olmayan yüzey aktif maddeler ve kolesterolün birleşiminden oluşmakta ve vezikül oluşumu belirli enerji girişleri gerektirmektedir. Geleneksel lipozomlar maliyetli olup oksidatif dehidrasyon nedeniyle stabilite sorunlarına sahipken, niozomlar daha dayanıklı ve ekonomik bir alternatif sunmaktadır (Azeem ve diğerleri, 2009; Nasr ve diğerleri, 2008; Rezvani ve diğerleri, 2019; Dada, 2024) (Tablo 2.6).

Tablo 2.6. Niozomların lipozomlarla karşılaştırılması

Özellik	Lipozomlar	Niozomlar	Referans
Üretim maliyeti	Yüksek	Daha uygun	Azeem, Anwer ve Talegaonkar (2009)
Depolama/taşıma	Özel koşullar gerekir	Özel koşul gerektirmez	Rezvani ve diğerleri (2019)
Stabilite	Fosfolipitler nötr veya yüklü, kararsız	İyonik olmayan yüzey aktif maddeler yüksüz, stabil	Nasr, Mansour, Mortada ve Elshamy (2008)
Raf ömrü	Daha kısa	Uzun	Nasr ve diğerleri, (2008)
Fizikokimyasal özellik	Kararsız	Son derece kararlı	Dada (2024)

Niozomlar, sentetik iyonik olmayan yüzey aktiflerden oluşmakta ve hem hidrofilik hem de hidrofobik moleküllerin kapsüllenmesini sağlayabilen çift katmanlı lipid vezikülleri olarak işlev görmektedir (Sharma ve diğerleri, 2016).

Niozomların fonksiyonel verimliliği, ilaç yükleme kapasitesi, fiziko-kimyasal stabilite ve üretim parametreleri ile doğrudan ilişki göstermekte ve yüksek sıcaklık veya monomer

konsantrasyonu vezikül oluşumunu ve kapsülleme etkinliğini etkilemektedir. Bu nedenle kalite tasarımı (QbD, Quality by Design) yaklaşımı, ürün gereksinimlerini karşılayan optimize edilmiş formülasyonların sistematik olarak tasarlanmasını ve geliştirilmesini sağlamaktadır (Rahman, Beg, Kazmi, Hafeez ve Kumar, 2019). Niozomlar, ilaç, hormon, antijen ve biyoaktif moleküllerin kontrollü salımında yüksek potansiyel sunmakta ve ilaç ile biyoteknoloji uygulamalarında etkin nanotaşıyıcı sistemler olarak öne çıkmaktadır (Abtahi ve diğerleri, 2021).

Literatürde, oksidatif bozunmaya duyarlı biyoaktiflerin niozomal enkapsülasyonu ile biyoyararlanım, stabilite ve etkinliklerinin önemli ölçüde iyileştirildiği rapor edilmiştir (Aslam, Ahmad ve Riaz, 2021). Örneğin, β -karoten yüklü niozomlar ısıya ve serbest radikal kaynaklı oksidatif strese karşı yüksek direnç göstermiş, kültür ortamında ise 96 saate kadar stabil kalabilmiştir (Sharma ve diğerleri, 2016). Benzer şekilde, likopenin nano-niozomlara enkapsülasyonunun bileşiğin çözünürlüğünü ve fizikokimyasal stabilitesini artırdığı; bu iyileşmiş stabilitenin ve kontrollü salım profilinin ise hücresel alımı yükselterek biyoyararlanımın anlamlı biçimde artmasına yol açtığı bildirilmiştir. Bu mekanizmalar sonucunda, likopen yüklü nano-niozomların kanser hücreleri üzerinde proliferasyonu baskılayıcı (anti-proliferatif) etki gösterdiği rapor edilmiştir (Sharma ve diğerleri, 2016; Sharma, Saxena, Jaswanth, Chalamaiah ve Balasubramaniam, 2017).

Tablo 2.7’de zeytin posası ve yaprağı ekstraktlarının farklı kapsülleme sistemlerine entegre edilmesiyle elde edilen formülasyonlar özetlenmektedir. Hazırlama yöntemleri, kullanılan yüzey aktif maddeler ve yardımcı bileşenler ile bunların enkapsülasyon verimlerine etkileri karşılaştırmalı olarak sunulmuştur. Veriler, özellikle niozom bazlı sistemlerin uygulama potansiyelini anlamak açısından önemli bir referans niteliğindedir. Genel eğilimler incelendiğinde, enkapsülasyon kapasitesinin büyük ölçüde kullanılan yüzey aktif madde tipine, kolesterol oranına ve eklenen yardımcı bileşenlerin (örneğin; polimerler veya şekerler) kombinasyonuna bağlı olarak değiştiği görülmektedir. Bu durum, formülasyon optimizasyonunun sistem performansında belirleyici bir rol oynadığını ortaya koymaktadır.

Tablo 2.7. Zeytin yan ürünlerinin biyoaktif bileşenleri için kullanılan kapsülleme teknikleri ve kapsülasyon işleminde kullanılan maddeler

Bileşik Adı	Taşıyıcı sistem	Hazırlama Yöntemi	Yardımcı maddeler	Enkapsülasyon Etkinliği (%)	Referans
Zeytin posasının fenolik ekstraktı	Mikro kapsülleme	Püskürtmeli kurutma	Dekstroz, maltodekstrin	%39,5	Paini ve diğerleri (2015)
Zeytin yaprağı ekstraktı	Mikro kapsülleme	Püskürtmeli kurutma	Sodyum aljinat	%47,1	Gonzalez ve diğerleri, (2019)
Zeytin yaprağı ekstraktı	Mikro kapsülleme	Püskürtmeli kurutma	Maltodekstrin, arap zamkı, pektin	%75- %82,1	Medfai ve diğerleri (2023)
Zeytin posası ekstraktı	Mikro kapsülleme	Su-yag-su çift katlı emülsiyon çözücü buharlaştırma	Etilselüloz	%79,6	Paulo, Tavares ve Santos, (2022)
Zeytin yaprağı ekstraktı	Mikro kapsülleme	Su-yag-su emülsiyon çözücü buharlaştırma	Soya yağı, pektin, peynir altı suyu proteini	%93,34	Mohammadi, Jafari, Esfanjani ve Akhavan (2016)
Zeytin yaprağı ekstraktı	Mikro kapsülleme	Sprey jurutma	Gam arabik/ maltodekstrin	%56, 02- %74,44	Toprakçı, Cosgun, Balci-Torun, Torun ve Şahin, (2024)
Zeytin yaprağı ekstraktı	Mikro kapsülleme	Süperkritik akışkanlarla çözelti destekli dispersiyon	poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)	%86	Dalla Rosa ve diğerleri, 2023
Zeytin yaprağı ekstraktı	Mikro kapsülleme	Süperkritik antisolvent ekstraksiyonu	Polivinilpirolidon	-	Montes, Valor, Garcia-Casas, Sanchez ve Pereyra (2024)

Tablo 2.7. Zeytin yan ürünlerinin biyoaktif bileşenleri için kullanılan kapsülleme teknikleri ve kapsülasyon işleminde kullanılan maddeler (devamı)

Bileşik Adı	Taşıyıcı sistem	Hazırlama Yöntemi	Yardımcı maddeler	Enkapsülasyon Etkinliği (%)	Referans
Zeytin yaprağı ekstraktı	Mikro kapsülleme	Sprey kurutma	Maltodekstrin ve sodyum kazeinat	%71,92	Tarchi, Olewnik-Kruszkowska, Ait-Kaddour ve Bouaziz (2025)
Zeytin yaprağı ekstraktı	Mikro kapsülleme	Nanopresipitasyon	Poli(laktik asit), poli(vinil alkol)	%49,2	Kesente ve diğerleri, 2017
Zeytin yaprağı ekstraktı	Mikro kapsülleme	Dondurarak kurutma	Maltodekstrin	%82	Chanioti, Katsouli ve Tzia (2021)
Zeytin yaprağı ekstraktı	Mikro kapsülleme	Sprey kurutma	Maltodekstrin	%62-80	Aliakbarian ve diğerleri, 2018
Zeytin yaprağı ekstraktı	Mikro kapsülleme	Dondurarak kurutma	Maltodekstrin, peynir altı suyu proteini izolatu, arap zamkı	%71,42	Ciont ve diğerleri, 2023
Zeytin yaprağı ekstraktı	Polimerik miseller	İnce film hidrasyon	Pluronic L121, Tween 80, lesitin, kolesterol	%66,21	Bergonzi ve diğerleri, 2023
Zeytin yaprağı ekstraktı	Fitozom	İnce film hidrasyon	Fosfatidilkolin	%66,24	Keskin, Bastıoğlu, Şirinyıldız, Gumus-Bonacina ve Yorulmaz, (2024)
Zeytin yaprağı ekstraktı	Lipozom	İnce tabaka film yöntemi	Soya fosfatidil kolin	%34	Gonzalez-Ortega ve diğerleri, 2021
Zeytin yaprağı ekstraktı	Nano lipozom	Etanol enjeksiyon yöntemi	Fosfatidil kolin, kolesterol	%70,7	Tavakoli, Hosseini, Jafari ve Katouzian (2018)
Zeytin yaprağı ekstraktı	Niozom	İnce film hidrasyon	Span 60, kolesterol	%41,92	Can, 2017

Tablo 2.7. Zeytin yan ürünlerinin biyoaktif bileşenleri için kullanılan kapsülleme teknikleri ve kapsülasyon işleminde kullanılan maddeler (devamı)

Bileşik Adı	Taşıyıcı sistem	Hazırlama Yöntemi	Yardımcı maddeler	Enkapsülasyon Etkinliği (%)	Referans
Zeytin yaprağı ekstraktı	Niozom	Bulamaç	Kolesterol, Span 60, Tween 20, maltodekstrin	%43,2	İlgaz ve diğerleri, 2025
Hidroksitirozol	Nano lipozom	İnce film hidrasyon	Fosfadilkolin, asetik asit, kloroform	%82,67	Li ve diğerleri, 2022
Hidroksitirozol	Nano lipozom	Film dispersiyon yöntemi	Tween 80, fosfolipid, kolesterol	%44,43	Yuan ve diğerleri, 2017
Hidroksitirozol	Mikro kapsülleme	Yağ içinde su emülsiyon	Tween 80, isopropil mistrat, zeytin yağı, monoglisid, su	-	Mitsou ve diğerleri, 2019

Mikrokapsülleme sistemlerinde enkapsülasyon verimleri %39,5- 93,3 arasında değişirken, lipozom ve nanolipozom sistemleri %34- 82,7, niozomlar ise %41,9- 70 aralığında performans göstermektedir. Bu dağılım, yüzey aktif madde türü, kolesterol oranı ve yardımcı maddelerin (Tween 20, Span 60, maltodekstrin vb.) kombinasyonunun vezikül stabilitesi ve kapsülleme kapasitesi üzerindeki belirleyici etkisini ortaya koymaktadır. Niozomların göreceli olarak daha düşük kapsülleme kapasitesine sahip olmasına rağmen, yapısal stabilite, taşınabilirlik ve trans dermal uygulama potansiyeli gibi avantajları, onları biyoaktif bileşenlerin taşınması için değerli bir taşıyıcı sistem hâline getirmektedir (Guchhait ve diğerleri, 2025).

Hidroksitirozolün farklı enkapsülasyon sistemleri aracılığıyla taşınabileceği ve her bir sistemin kendine özgü avantajlar sunduğu literatürde açıkça ortaya konulmaktadır. Örneğin, siklodekstrin kompleksleri çözünürlük ve kimyasal stabiliteyi artırırken, mikro/ nanokapsül sistemleri kontrollü salım ve raf ömrünün uzatılması açısından öne çıkmaktadır (Stergiou ve diğerleri, 2022). Lipozomlar, hidroksitirozolün antioksidan aktivitesini koruyabilmekte veya artırabilmekte ve biyolojik işlevlerin *in vivo* olarak iyileştirilmesi için etkili bir taşıyıcı görevi görebilmektedir (Yuan ve diğerleri, 2017). Niozomlar ise, kapsülleme verimi nispeten düşük olmasına rağmen yüksek stabilite, biyoyumluluk, toksik olmama ve hem hidrofilik hem lipofilik bileşenleri kapsülleyebilme kabiliyeti nedeniyle önemli bir alternatif oluşturmaktadır.

Diğer yandan, nanopartikül tabanlı sistemler özellikle biyoyararlanımın artırılması ve oksidatif stabilitenin korunması açısından güçlü bir potansiyel sergilemektedir (De Leonadis ve diğerleri, 2020).

Hidroksitirozolün enkapsülasyonu için emülsiyon temelli sistemler (makro emülsiyonlar, mikro emülsiyonlar, çift emülsiyonlar, jelleşmiş çift emülsiyonlar), kapsülleme esaslı partikül sistemleri (mikro/ nanosferler, mikro/ nanokapsüller), veziküler sistemler (lipozomlar) ve ambalaj temelli yaklaşımlar (aktif ambalajlama) gibi kolloidal sistemler kullanılabilmektedir. Söz konusu sistemler, hidroksitirozolün korunması, stabilitesi ve biyoyararlanımının artırılması gibi amaçlar için kuramsal olarak uygun çözümler sunmaktadır (Fortunati ve diğerleri, 2016).

Dolayısıyla, hidroksitirozolün hangi enkapsülasyon sisteminde kullanılacağı, hedef uygulamanın gereksinimlerine göre belirlenmelidir. Örneğin, yüksek çözünürlük ve hızlı çözünme hedefleniyorsa siklodekstrin kompleksleri; uzun raf ömrü ve kontrollü salım sağlamak için mikro/ nanokapsülleme; oksidatif stabilite ve biyouyumluluk sağlamak amacıyla niozomlar daha uygun seçenekler olarak değerlendirilmektedir (De Leonadis ve diğerleri, 2020).

2.6. Proniozomlar: Yapı ve Fonksiyon

Günümüz ilaç ve fonksiyonel gıda endüstrisinde proniozomlar, niozom ve lipozomların avantajlarını bir araya getirerek sınırlılıklarını minimize eden yenilikçi taşıyıcı sistemler olarak öne çıkmaktadır. Bu sistemler, ilacın stabilitesini artırma, kontrollü salım sağlama, biyoyararlanımı iyileştirme ve hedefe yönelik taşımayı mümkün kılma yetenekleri sayesinde geleneksel tedavilerdeki sınırlamalara çözüm sunmaktadır. Nanoteknolojik yaklaşımlarla geliştirilen proniozomlar, daha etkili ve hassas ilaç taşıma stratejilerinin önünü açmaktadır (Ekatpure ve diğerleri, 2025).

Proniozomlar, serbest akışlı toz veya yarı-katı formda öncü sistemler olarak formüle edilmekte ve hidrasyon sonrası stabil, fonksiyonel niozomlara dönüşmektedir. Bu yapı hem hidrofilik hem de hidrofobik bileşenlerin yüksek kapsülleme verimi ile taşınmasını sağlamakta, kapsüllenmiş maddeleri oksidatif ve enzimatik degradasyona karşı korumakta ve kontrollü salımı mümkün

kılmaktadır. Bu özellikleri sayesinde proniozomlar, fonksiyonel gıda ve biyolojik aktif bileşenlerin taşınması alanında giderek artan bir ilgi görmektedir (Sengar, 2025).

Proniozomlar, yüzey aktif maddeler ve stabilizatörler kullanılarak kompozisyon değişiklikleri ile ilaç salım hızının kontrol edilebildiği sistemlerdir. Hem hidrofilik hem hidrofobik ilaçları kapsülleyebilmekte ve niozomal sistemlerde görülen toplanma, füzyon ve sızıntı gibi fiziksel kararsızlıkları minimize etmektedir (Sengar ve diğerleri, 2024).

Poröz yapıya sahip proniozomlar, dehidrate edilerek kuru ve serbest akışlı formda depolanabilmekte; kısa süreli hidrasyon ile homojen boyutlarda niozomal dispersiyonlar oluşturabilmektedir. Bu özellik, etken maddenin uzun süre sıvıyla temas etmeden depolanmasını ve kontrollü salımını mümkün kılmaktadır. Proniozom tozları, suda karıştırıldığında hızlıca aktif niozom dispersiyonuna dönüşmekte ve gıda veya vücut sıvılarıyla temas ettiğinde proniozomal sistem etkin şekilde niozomal taşıyıcıya dönüşmektedir (Blazek-Welsh ve Rhodes, 2001; Walve, Rane, Gujrathi, Bakaliwal ve Pawar, 2011).

2.6.1. Yapısal özellikler

Proniozomlar, tabakalı (lamellar) küçük yapılar şeklinde oluşmaktadır. Alkil veya dialkil poligliserolat eter sınıfına ait bir iyonik olmayan yüzey aktif madde ile kolesterol karıştırıldıktan sonra suda hidrasyon uygulanmaktadır. Çift tabaka (bilayer) oluşumu sırasında yüzey aktif moleküller, hidrofilik uçlarını dışa, hidrofobik uçlarını ise içe yönlendirmektedir. Bu nedenle proniozomlar, lipozomlar gibi bir çift tabaka yapısına sahiptir. Proniozomların çift tabakası, iyonik olmayan yüzey aktif maddelerden oluşmaktadır (Walve ve diğerleri, 2011). Bu yapı sayesinde hidrofilik ilaçlar vezikülün iç bölgesinde tutulmakta, hidrofobik ilaçlar ise çift tabaka içine yerleştirilmektedir (Arslanov ve diğerleri, 2024)

Proniozomlar, kullanılan taşıyıcı türüne ve hazırlanma yöntemine bağlı kuru granüler proniozomlar ve sıvı kristal proniozomlar olarak iki ana grupta sınıflandırılmaktadır. Proniozomların oluşumu ise üç farklı mekanizma ile gerçekleşebilmektedir. İlk olarak, yüzey aktif maddelerin çözünür hâle geçtiği kritik çözünürlük sıcaklığının artırılmasıyla meydana gelmektedir. İkinci olarak, lipidleri çözen uygun bir çözücünün eklenmesiyle sağlanmaktadır. Üçüncü olarak ise hem sıcaklığın artırılması hem de çözücü kullanımının birlikte uygulanmasıyla proniozom oluşumu gerçekleşmektedir (Kumar ve Maurya, 2018).

Kuru granüler proniozomlar; kullanılan taşıyıcıya göre sorbitol bazlı proniozomlar ve maltodekstrin bazlı proniozomlar olarak iki alt grupta değerlendirilmektedir (Kakar, Rao, Goswami, Nanda ve Saroha, 2010):

- **Sorbitol bazlı proniozomlar:** Sorbitol taşıyıcı olarak kullanılmakta ve organik çözücü içerisinde hazırlanmış yüzey aktif madde karışımı, sorbitol tozu üzerine püskürtülerek kaplanmaktadır. Çözücünün uzaklaştırılması ile elde edilen bu sistem, sıcak suyun eklenmesi ve çalkalanmasıyla kısa sürede niozomlara dönüşebilmektedir. Ayrıca bu yöntem, aktif bileşenlerin hidrolize karşı hassas olduğu durumlarda özellikle yararlı olmaktadır (Kakar ve diğerleri, 2010)
- **Maltodekstrin bazlı proniozomlar:** Maltodekstrin, suda kolay çözünebilen bir polisakkarit olup taşıyıcı olarak etkin şekilde kullanılmaktadır. Bu tip proniozomlar hızlı bulamaç (slurry) yöntemi ile hazırlanmakta ve geniş yüzey alanı sayesinde daha ince yüzey aktif madde kaplaması oluşturabilmektedir. Böylece rehidrasyon süreci daha etkin gerçekleşmektedir (Kakar ve diğerleri, 2010)

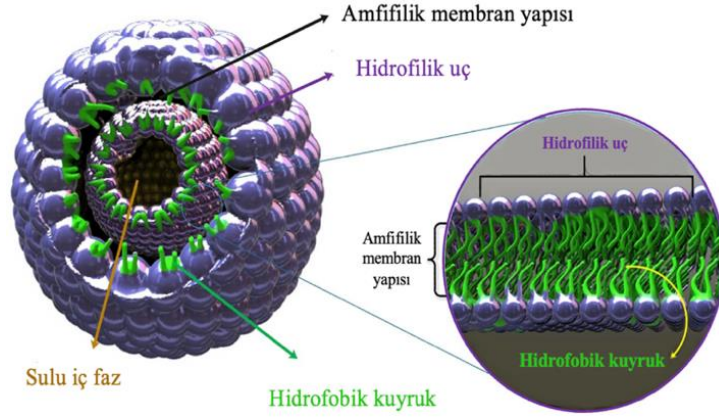
Sıvı kristal proniozomlar; yüzey aktif moleküllerin su ile temas etmesi sonucunda lipofilik zincirlerin düzensiz ve akışkan bir hâle geçmesi ile oluşmaktadır. Bu durumda liyotropik sıvı kristal fazı meydana gelmekte ve proniozomal jel formu ortaya çıkmaktadır. Proniozomal jeller, şeffaf, yarı şeffaf veya yarı katı yapıda bulunabilmekte ve kontrollü ilaç salımı için bir rezervuar görevi görmektedir (Ingale, Kasliwal ve Ghose, 2021; Kakar ve diğerleri, 2010).

2.6.2. Formülasyon bileşenleri

Proniozomal dağıtım sistemlerinin formülasyonları, belirli işlevlere sahip birkaç temel bileşenden oluşmaktadır. Bu bileşenler arasında etken madde (API) ve taşıyıcı sistemin temelini oluşturan yüzey aktif maddeler yer almaktadır; yaygın olarak Span, Tween ve Brij kullanılmaktadır. Membran yapısının stabilizasyonu ve rijitleştirilmesi için kolesterol ve lesitin gibi stabilizatörler eklenmektedir. Ayrıca, proniozomların hidrasyonu için fosfat tamponu gibi uygun bir hidrasyon ortamı kullanılmaktadır. Formülasyon sırasında vezikül boyutu ve penetrasyon özelliklerini etkileyen organik çözücüler de yer almakta olup, bunlar etanol, propanol, bütanol ve izopropanol gibi alkol türlerinden seçilmektedir (Reddy ve Gandla, 2022).

Etken madde: Bir ürünün biyolojik veya farmakolojik etkisini sağlayan, hedeflenen işlevi gerçekleştiren ana bileşen olarak tanımlanmaktadır. Enkapsülasyon süreçlerinde etken maddenin seçimi, kapsül verimliliği ve biyolojik aktivitenin stabilitesi açısından kritiktir. Etken maddenin çözünürlük profili, erime noktası, termooksidatif stabilitesi, molekül ağırlığı ve kimyasal reaktivitesi, polarite, dağılım katsayısı, elektriksel yük özellikleri kapsülleme etkinliğini belirleyen başlıca parametrelerdir (Carriere, 2016). Hidrofilik bileşikler sulu matrikslerde, lipofilik bileşikler lipid bazlı taşıyıcı sistemlerde daha etkin şekilde stabilize edilmektedir (Ye, Georges ve Selomulya, 2018). Etken madde, oksidasyon ve uçucu kayıplara karşı uygun polimerik duvar materyalleri ile korunmalı ve hedef kontrollü salım kinetiğine uygun olmalıdır (McClements, 2018). Ayrıca, kapsül duvarı ile kimyasal reaksiyona girmemesi zorunludur; aksi takdirde kapsül verimi düşmekte ve biyolojik aktivite kaybı meydana gelmektedir (Liechty, Kryscio, Slaughter ve Peppas, 2010). Endüstriyel ölçekli uygulamalarda etken maddenin organoleptik özellikleri ve pH toleransı ile seçilen kapsülleme tekniğinin uyumlu olması gerekir. Örneğin, sprey kurutma yöntemi yüksek sıcaklık gerektirmesi nedeniyle ısıya duyarlı (termolabile) moleküller için sınırlayıcı bir faktör oluşturmaktadır (Walker, Decker ve McClements, 2015).

Yüzey aktif maddeler: Yüzey aktif maddeler, proniozom ve niozom sistemlerinin temel yapı taşlarını oluşturmaktadır (Radha ve diğerleri, 2013). İyonik olmayan yüzey aktif maddeler, yüksek ara yüzey aktivitesi göstermekte ve hem polar hem de apolar segmentler içermektedir. Daha az toksik ve iritan olmalarının yanı sıra çözeltilerde fizyolojik pH'yı koruma eğilimi göstermektedir. Ek olarak, ıslatıcı, çözünürlük artırıcı, emülsifiye edici ve geçirgenlik artırıcı ajanlar olarak görev yapmaktadır (Nimbalwar, ve diğerleri, 2021). Bu moleküller hidrofilik baş ve hidrofobik kuyruk bölgelerine sahip olup, sulu ortamda kendilerini lipid çift katmanı şeklinde organize etmektedir; hidrofilik baş kısmı suya yönelirken hidrofobik kuyruklar içe doğru konumlanmaktadır (Şekil 2.5). Böylece, yüzey aktifler proniozomların membran yapısını oluşturmakta, yüzey gerilimini azaltmakta ve kritik misel konsantrasyonu (CMC) üzerinde misel yapıları oluşturmaktadır (Arshad ve diğerleri, 2025). Bu yapısal organizasyon, kapsülleme verimliliği ve fiziko-kimyasal stabilite açısından kritik öneme sahiptir.



Şekil 2.5. Niozomun veziküler yapısı (Yasamineh ve diğerleri, 2022)

Yüzey aktif maddelerin hidrofilik-lipofilik denge (HLB) değeri, kapsülleme etkinliği ve vezikül boyutu üzerinde belirleyici rol oynamaktadır. Literatürde en yüksek kapsülleme verimi, HLB değeri yaklaşık 8 olan yüzey aktiflerle sağlanmaktadır (Lucas ve diğerleri, 2010; Uchegbu ve Vyas, 1998). HLB değeri ile niozom boyutu arasında doğrudan ilişki gözlemlenmektedir; örneğin, Span 60 (HLB 4,7) ve Brij 72 (HLB 4,9) ile hazırlanan partiküller, Tween-60 (HLB 14,9) ile hazırlananlardan daha büyük olmaktadır. Bunun nedeni, HLB değeri düşük yüzey aktiflerin daha uzun hidrofobik kuyruklara sahip olması ve lipid çift katmanını sıkılaştırarak yapıyı daha kompakt hâle getirmesidir (Basiri, Rajabzadeh ve Bostan, 2017; Bach ve Lorenzo-Lal, 2023).

Faz geçiş sıcaklığı (T_c) da proniozomlarda kapsülleme verimi ve membran geçirgenliği üzerinde etkili olmaktadır. Özellikle yüksek T_c değerine sahip Span bileşikler, ilacın veziküller içinde tutulmasını maksimize ederek sızıntı ve kaçışı minimuma indirir. Kapsülleme verimi sıralaması Span 60 (C18) > Span 40 (C16) > Span 20 (C12) > Span 80 (C18) şeklindedir; doymamış alkil zinciri içeren Span 80, kapsülleme verimini düşürmektedir (Annakula ve diğerleri, 2010). Polisorbattlar ise daha büyük vezikül boyutları ve düşük lipofilik özellikleri nedeniyle Span formülasyonlarına kıyasla daha yavaş penetrasyon göstermektedir. Bu özelliklerin incelendiği proniozomal formülasyonlarda sıklıkla kullanılan yüzey aktif maddelerin özellikleri Tablo 2.8’de gösterilmiştir.

Tablo 2.8. Proniozomlarda yüzey aktif madde özellikleri ve kullanımı

Yüzey Aktif Madde	HLB	T _c (°C)	Uygun Bileşen Tipi	Proniozom Etkisi / Öneri
Brij 30	9,7	–	Lipofilik ve orta hidrofilik	Orta HLB, stabil vezikül; dengeli kapsülleme sağlar.
Brij 58	15,7	–	Hidrofilik	Yüksek HLB, hidrofilik ilaç kapsülleme ve küçük veziküller sağlar.
Brij 72	4,9	–	Lipofilik	Düşük HLB, lipofilik ilaç kapsülleme için uygundur.
Brij 76	12,4	–	Orta hidrofilik	Orta-yüksek HLB, dengeli kapsülleme ve stabilite sağlar
Span 20	8,6	16	Lipofilik	Düşük T _c , küçük veziküller, orta kapsülleme; hafif membran geçirgenliği
Span 40	6,7	42	Lipofilik	Orta T _c , iyi kapsülleme ve stabilite; lipofilik ilaçlar için uygun
Span 60	4,7	53	Lipofilik	Yüksek T _c , düzenli membran, yüksek kapsülleme verimi; stabil proniozom
Span 85	1,8	-12	Çok lipofilik	Çok düşük HLB, lipofilik ilaçlar için uygun, düşük stabilite riski
Tween 20	16,7	–	Hidrofilik	Yüksek HLB, hidrofilik ilaç kapsülleme; küçük ve homojen veziküller sağlar.
Tween 40	15,6	0,1	Hidrofilik	Yüksek HLB, hidrofilik ilaçlar için uygun; dengeli stabilite ve kapsülleme
Tween 60	14,9	–	Orta hidrofilik	Orta-yüksek HLB, iyi kapsülleme ve membran stabilitesi sağlar.
Tween 80	15,0	110 (parlama noktası)	Hidrofilik	Yüksek HLB, hidrofilik ilaç kapsülleme; güvenli termal işlem, stabil vezikül

Proniozomların özellikleri, kullanılan yüzey aktif maddenin türü, konsantrasyonu, HLB değeri ve faz geçiş sıcaklığı ile doğrudan ilişkilendirilmektedir. Yüzey aktif madde miktarı artırıldığında proniozom boyutu küçülmekte, polidispersidite indeksi azalmakta ve dağılım homojen hâle gelmektedir. İki hidrofobik zincire sahip yüzey aktifler membran yapısını güçlendirmekte ve kapsülleme verimi ile stabiliteyi artırmaktadır. Ayrıca, HLB değeri ve karbon zincir uzunluğu lipofilik ve hidrofilik ilaçların kapsülleme etkinliğini etkileyerek, HLB değeri 4-8 arasında olan maddeler çift tabaka veziküller için uygun olmaktadır. Bu parametreler, yüzey aktif maddelerin proniozom yapısındaki rolünü ve kapsülleme performansını optimize etmede kritik öneme sahiptir (Walve ve diğerleri, 2011).

Yüzey aktif maddeler ve amfifilik moleküller, lipid bazlı sistemlerin yapısal organizasyonu ve kapsülleme performansını belirleyen temel bileşenlerdir. Bu moleküllerin hidrokarbon zincir uzunluğu, polar baş grup alanı ve polar olmayan grup hacmi gibi moleküler parametreleri, oluşacak yapıların morfolojisini ve kararlılığını doğrudan etkilemektedir. Kritik paketleme parametresi (CPP), bu geometrik özellikleri bir araya getirerek misel, lamel veya vezikül gibi yapıları öngörmeye kullanılan önemli bir araçtır. Aşağıda, CPP hesaplamasında kullanılan temel moleküler parametreler ve bunların sistem morfolojisine etkileri açıklanmaktadır.

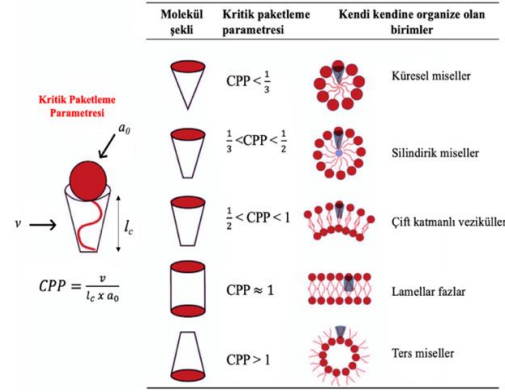
Kritik paketleme parametre (CPP, critical packing parameter) değeri amfifilik yapının hangi morfolojiyi oluşturacağını belirlemektedir. Daha küçük CPP değerleri küresel micellere, orta değerler silindirik yapılara, daha büyük değerler ise ters yapılara eğilim göstermektedir. Entropik açıdan ise, daha az molekül içeren küçük yapılar serbest enerjiyi düşürdükleri için daha kararlı olmaktadır (Bautista- Solano ve diğerleri, 2025).

Yüzey aktiflerin moleküler geometrisi, CPP ile açıklanmaktadır. CPP, yüzey aktif maddenin hidrokarbon zinciri hacmi (v), zincir uzunluğu (l_c) ve baş grup alanı (a_0) ile ilişkili olarak aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmaktadır (Dopazo, Martinez-Castillo, Alonso-Ferrer ve Mejuto, 2021):

$$CPP = \frac{v}{l_c \times a_0} \quad (2.1)$$

CPP değeri, oluşacak yapıların küresel, silindirik veya lameller (tabakalı) olma eğilimini öngörmekte olup, membran morfolojisi, faz geçişleri ve dispersiyon karakteristiklerini doğrudan etkilemektedir (Israelachvili, Mitchell ve Ninham, 1976; Khalil ve Al-hakam, 2014). Kolesterol veya diğer katkı maddeleri, CPP değerlerini değiştirerek membran sertliği, rehidrasyon kapasitesi ve toksisite profilini etkileyebilmektedir (Moghassemi ve Haddjizadeh, 2014).

Molekül geometrileri ve CPP değerlerine göre oluşacak yapı morfolojileri Şekil 2.6'da gösterilmiştir (Dopazo, Martinez-Castillo, Alonso-Ferrer ve Mejuto, 2021).



Şekil 2.6. Kritik paketlenme parametresine (CPP) göre molekül yapı morfolojileri (Dopazo ve diğerleri, 2021)

Molekül geometrisi ve CPP analizleri, proniozom ve niozom sistemlerinin yapısal organizasyonunu anlamak ve kapsülleme performansını optimize etmek için kritik araçlar olarak kullanılmaktadır (Dopazo, Martinez-Castillo, Alonso-Ferrer ve Mejuto, 2021).

Kritik paketlenme parametresi ve molekül geometrisi, yüzey aktif maddelerin sistem içindeki düzenlenişini ve morfolojiyi öngörmek için kullanılır. Bu nedenle, proniozomların yapısal özellikleri ve performansı, kullanılan yüzey aktif madde türü ve konsantrasyonu ile doğrudan ilişkilidir (Badria, Abdelaziz, Hassan, Elgazar ve Mazyed, 2020).

Yüzey aktif madde türü ve konsantrasyonu, proniozomların ilaç salım hızı, dolaşım süresi, hedefleme kapasitesi ve hücresel alımını etkilemektedir. Yüzey aktif maddeler membran yapısını oluşturmakta, emülsiyerler ise hidrasyon sonrası dispersiyonun homojen ve stabil kalmasını sağlamaktadır. Tween 80, Span 60 ve Brij 30 proniozom yapısının temel bileşenleri olarak kullanılmakta, Tween 80 ve Span 20 ise hidrasyon sonrası dispersiyonlarda emülsiyer görevi üstlenmektedir (Durga ve Veera, 2020).

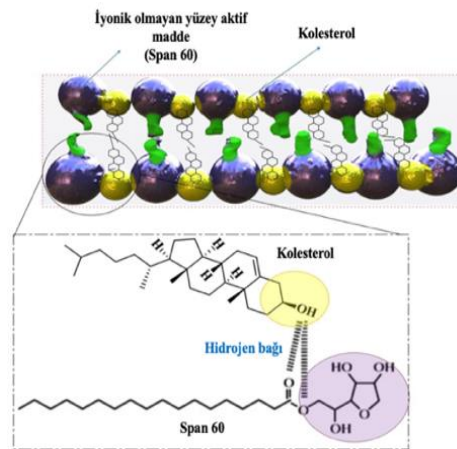
Özetle, her emülsiyer bir yüzey aktif madde olmaktadır; ancak her yüzey aktif madde emülsiyer özellik taşımamaktadır. Yüzey aktif maddeler proniozom yapısının temelini oluşturmakta, emülsiyerler dispersiyonun stabilitesini sağlamaktadır (Almeida ve diğerleri, 2016; Blazek-Welsh ve Rhodes, 2001). HLB değerine göre seçim yapmak, ilacın hidrofilik veya lipofilik özelliklerine göre optimize edilmektedir. Yüksek HLB değerine sahip bileşikler hidrofilik ilaçlar için uygun olurken, düşük HLB değerine sahip bileşikler hidrofobik ilaçlar için tercih edilmektedir (Waddad ve diğerleri, 2013; Shukla ve Tiwari, 2011).

Taşıyıcı maddeler: Proniozom hazırlığında kullanılan taşıyıcı maddeler, yüzey aktif madde ve diğer bileşenlerin oranında esneklik sağlamaktadır. Ayrıca artırılmış yüzey alanı sayesinde ilaç yükleme kapasitesini yükseltmektedir. Taşıyıcıların toksik olmaması, serbest akışkan özellikte bulunması, yükleme karışımında düşük çözünürlük göstermesi ve kolay hidrasyon için iyi su çözünürlüğüne sahip olması gerekmektedir (Mittal, Chaudhary, Chaudhary ve Kumar, 2020).

Belirtilen seçim kriterleri, taşıyıcıların yüzey aktif maddelerle etkileşimlerini, vezikül stabilitesini ve kapsülleme kapasitesini optimize etmek amacıyla dikkate alınan özellikleri açıkça ortaya koymaktadır. Bu doğrultuda en sık kullanılan taşıyıcı maddeler arasında maltodekstrin, sorbitol, manitol, sprey kurutulmuş laktoz, glikoz monohidrat, laktoz monohidrat ve sükroz stearat yer almaktadır (Ajrin ve Ajnum, 2022).

Stabilizatörler: Proniozom sistemlerinde membran stabilitesini artırmak ve kapsülleme verimini iyileştirmek amacıyla çeşitli stabilizatörler kullanılmaktadır. Literatürde en yaygın kullanılan stabilizatörler kolesterol ve dodekanol olarak bildirilmektedir (Machado ve diğerleri, 2020; Pando, Beltran, Gerone, Matos ve Pazos, 2015).

Kolesterol, amfifilik yapısı sayesinde hidroksil (-OH) grubunu su fazına, alifatik zincirini ise yüzey aktif moleküllerin hidrokarbon zincirlerine yönlendirmekte ve böylece çift tabakalı niozomal membranın rijitliğini ve moleküler oryantasyonunu sağlamaktadır. Steroid iskeletinin sert yapısı, yüzey aktif moleküllerle alternatif konumlanarak hidrokarbon zincirlerinin serbest hareketini kısıtlamakta; Van der Waals etkileşimleri ve hidrojen bağları membranı stabilize etmektedir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Span 60 ve kolesterolün moleküler etkileşimi (Yasamineh ve diğerleri, 2022)

Bu düzenli konfigürasyon, çift tabaka içinde sıkışmış bir hidrofilik ve hidrofobik ortam oluşturarak kapsüllenmiş aktif bileşenin difüzyonunu sınırlamakta ve sızmasını minimize etmektedir. Moleküler dinamik simülasyonlar ve X-ışını kırınımı (XRD) analizleri, kolesterolün bu şekilde organize olmasıyla membran kalınlığı ve akışkanlığının optimize edildiğini, böylece niozomal stabilitenin arttığını göstermektedir (Shekade, 2021).

Bununla birlikte, kolesterol miktarının belirli bir seviyenin üzerine çıkması, vezikül hacmini küçülterek kapsülleme verimini olumsuz etkilemektedir. Etkinliği, kullanılan yüzey aktif maddelerin HLB değeriyle de ilişkilidir; HLB değeri 10'un üzerinde olan yüzey aktif maddeler için daha yüksek kolesterol oranları gerekebilmektedir (Mawazi ve diğerleri, 2025). Örneğin, gentamisin içeren niozom formülasyonlarında kolesterol konsantrasyonu %10-50 aralığında sistematik olarak değiştirildiğinde, yüzey aktif madde tipi ve HLB değeri ile etkileşim göstermektedir. Lipofilik yüzey aktif maddelerle kolesterol artışı, çift tabaka içindeki hiyalüronik asit miktarını azaltarak kapsülleme verimini düşürürken, hidrofilik yüzey aktif maddelerde sinerjik etki kapsüllemeyi artırmaktadır. Özellikle Tween 60 ve yüksek kolesterol oranlarının birlikte kullanımı, %92 kapsülleme verimi sağlamakta olup, bu durum rijit çift tabaka oluşumu sayesinde membran geçirgenliğinin azalması ve ilacın sızmasının engellenmesiyle açıklanmaktadır (Ghadi, Dinarvand, Asemi, Amiri ve Ebrahimnejad, 2019).

Kolesterol, aynı zamanda niozomal membranlarda negatif eğriliği oluşturarak, diğer membranlarla füzyon sırasında hemifüzyon adı verilen geçici ve yüksek enerjili ara durumların oluşmasını mümkün kılmaktadır. Kolesterol iyonik olmayan yüzey aktiflerin yapısal dayanıklılığını artırmakta, jel fazdan sıvı faza geçişi engelleyerek veziküllerdeki ilaç sızıntısını azaltmakta ve membran eğriliğini oluşturarak hemifüzyon ve tam füzyon süreçlerini düzenlemektedir (Bach ve Lorenzo-Leal, 2023). Kolesterol yokluğunda hemifüzyon engellenmekte ve niozomların lipid çift katmanlar ile hücre membranları arasındaki etkileşim kapasitesi azalmakta, dolayısıyla hedef hücre ile lipid çift katman füzyonu sınırlanmaktadır (Churchward, Rogasevskaia, Höfgen, Bau ve Coorssen, 2005; Deulkar, Kubde, Hatwar, Bakal ve Motwani, 2024).

Ayrıca, formülasyondaki kolesterol oranı niozomların antibakteriyel etkinliğini de doğrudan etkilemektedir. Örneğin, yapılan bir çalışmada Span 40: Tween 40: kolesterol molar oranı 2,5: 2,5: 5,0 olan formülasyonlarda en yüksek antibakteriyel aktivitenin gözlemlendiği rapor edilmiştir.

Bu durum, kolesterol oranının niozom hazırlıklarında kontrol edilebilen ve biyolojik aktiviteyi modüle eden kritik bir parametre olduğunu göstermektedir (Akbari, Abedi, Pardakhty ve Sadeghi-Aliabadi, 2013).

Kolesterol eklenmesi veya diğer katkı maddeleri, membran sertliği, dondurularak kurutulmuş proniozomların yeniden hidratlanabilirliği ve toksisite gibi parametreleri etkileyebilmektedir; bu nedenle yüzey aktif maddenin tipi ve oranı, kapsülleme verimliliği ve biyolojik aktivitenin korunması açısından dikkatle optimize edilmelidir (Moghassemi ve Hadjizadeh, 2014). Kolesterol yerine gıda formülasyonlarında kullanılabilecek alternatif bileşiklerden biri dodekanoldur. Dodekanolün membran stabilitesini artırdığı, vezikül boyutunu etkileyerek kapsülleme verimini iyileştirdiği ve özellikle gıda sınıfı niozom formülasyonlarında kolesterol yerine uygulanabileceği yapılan çalışmalarda rapor edilmektedir (Jafarian, Khalilabadi, Shadloo ve Peyvandi, 2025; Pando ve diğerleri, 2015; Shadloo, Peyvandi, Shojaeian ve Shariat, 2024).

Proniozom ve niozom membranlarında kullanılan stabilizatörler, yalnızca kapsülleme verimini değil, aynı zamanda membran rijiditesi, negatif eğrilik ve biyolojik etkinliği de modüle etmektedir. Bu bağlamda, kolesterol ve dodekanol gibi katkıları, membran morfolojisini ve vezikül-hücre etkileşimini optimize etmek için kritik öneme sahiptir (Shekade, 2021; Bach ve Lorenzo-Leal, 2023; Moghassemi ve Hadjizadeh, 2014).

Yüklü moleküller: Proniozom ve niozom formülasyonlarında stabiliteyi artırmak ve veziküller arası füzyonu önlemek için yüklü moleküller sıklıkla kullanılmaktadır. Bu moleküller, çift tabakaya yüklü gruplar ekleyerek yüzey yük yoğunluğunu artırmakta ve veziküllerin agregasyonunu engellemektedir (Dimitrijevic, Lamandin, Uchegbu, Shaw ve Florence, 1997). Negatif yüklü moleküller arasında diketilfosfat (DCP) ve fosfatidik asit, pozitif yüklü moleküller arasında ise stearylamin (STR) ve stearyl piridinyum klorür (SPC) yer almaktadır. Genellikle proniozom formülasyonlarına %2,5- 5 mol oranında eklenen bu bileşenler, yüksek konsantrasyonlarda vezikül oluşumunu engelleyebilmektedir (Thabet, Elsabahy ve Eissa, 2022).

Buna ek olarak, iyonik olmayan ancak sterik bariyer sağlayan moleküller de kullanılmaktadır. Örneğin kolesterol poli-24-oksi etilen eter (SC24), %5- 10 mol oranında formülasyona

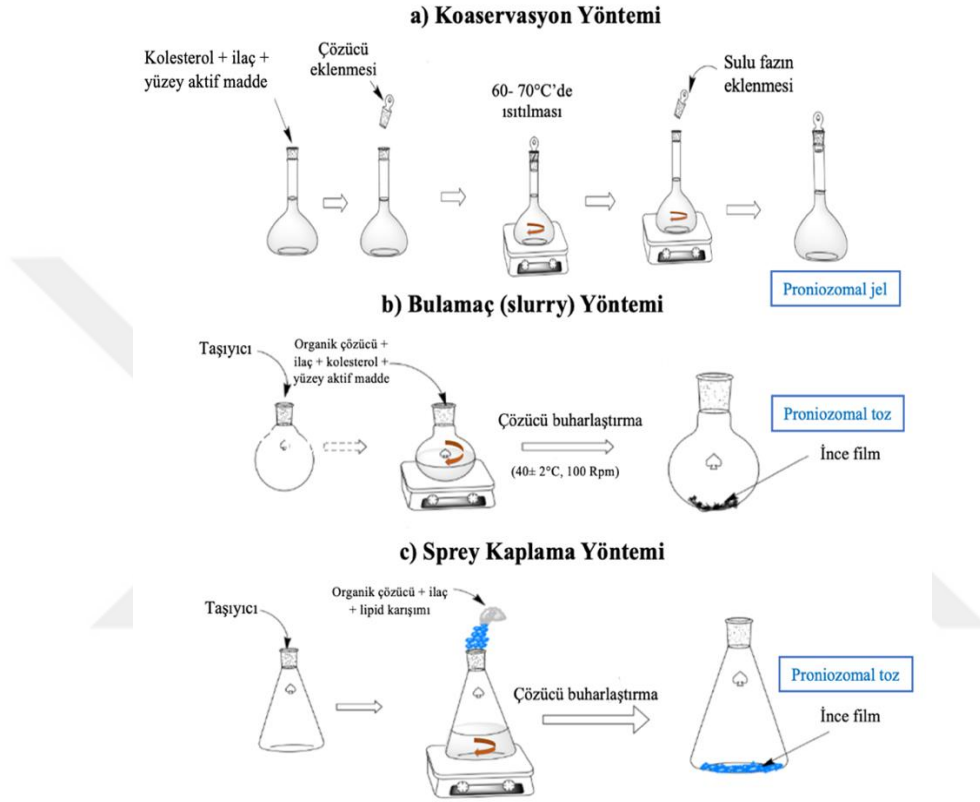
eklenerek vezikül membranına sterik engel oluşturmakta ve proniozomların fiziksel stabilitesini artırmaktadır (Ag Selecki, Selecki, Walter, Stahl ve Scheper, 2016; Junyaprasert, Teeranachaideekul ve Supaperm, 2008). Bu strateji, elektrostatik itme ve sterik bariyer mekanizmalarını birleştirerek, niozom sistemlerinde hem agregasyonu önlemekte hem de membran stabilitesini ve kapsülleme verimini artırmaktadır (Katkale, Sonawane, Kunde ve Hagavane, 2022).

Çözücü ve sulu faz: Vezikül formasyonu, sulu faz ve yardımcı çözücülerin etkileşimi ile belirlenmekte olup, sulu faz, yüzey aktif maddelerin hidrasyonu için gerekli ortamı sağlayarak vezikül membranının hidrofilik bölgelerinin düzgün hizalanmasını desteklemekte ve vezikül stabilitesini korumaktadır. Yardımcı çözücüler, membran yapısına penetre olarak deformabiliteyi ve permeabiliteyi artırmaktadır; bu etkiler, alkil zinciri uzunluğuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Uzun zincirli alkoller (C_4OH , 1-bütanol) membrana derin penetre olarak vezikülleri hızla destabilize etmekte, orta zincirli propanol (C_3OH) kısmi destabilizasyon sağlamakta, kısa zincirli etanol (C_2OH) membran esnekliğini artırmakta ve vezikül boyutunu küçültmekte; veziküllerin stabilitesini büyük ölçüde korumaktadır. Metanol (C_1OH) ise sınırlı membran penetrasyonu ile veziküllerin stabil kalmasına olanak sağlamakta, su (H_2O) ise destabilize edici etki göstermeyip temel hidrasyon ortamı sunmaktadır. Dolayısıyla, vezikül stabilitesi ve formabilitesi yalnızca yardımcı çözücünün türüne ve zincir uzunluğuna bağlı olarak değişmekte olup, etkinlik sıralaması $C_4OH > C_3OH > C_2OH > COH$ şeklinde belirtilmektedir (Yu, Yang ve Chang, 2005).

Proniozomların hazırlanmasında sulu fazda temel olarak fosfat tamponu (pH 7,4), %0,1 gliserol ve sıcak su kullanılmaktadır. Bu sulu fazın pH değeri, proniozomların ilaç yükleme verimliliğini doğrudan etkileyen önemli bir faktördür. Literatüre göre, pH 8'den 5,5'e düşürüldüğünde ilaç enkapsülasyonu belirgin şekilde artmaktadır. Bu artış, ilacın iyonlaşabilir karboksilik gruplarının pH'a bağlı olarak iyonize olmayan forma geçmesi ile açıklanmaktadır. İyonize olmayan moleküller, lipid çift tabaka fazına daha kolay entegre olarak yüksek enkapsülasyon verimliliği sağlar. Bu nedenle, hidrasyon ortamının pH'ının dikkatli kontrolü, proniozom formülasyonlarında optimal ilaç yüklemesi için kritik bir parametredir (Reddy ve Gandla, 2022).

2.6.3. Üretim yöntemleri

Proniozomlar, üç farklı yöntem kullanılarak hazırlanmaktadır: Koaservasyon faz ayrımı yöntemi, sprey kaplama yöntemi ve bulamaç (slurry) yöntemi (Walve ve diğerleri, 2011) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Proniozom üretim yöntemleri ve aşamaları (Sharma, Kashyap ve Thakur, 2023)

Koaservasyon faz ayrımı yöntemi, yüzey aktif madde, lipid ve ilacın alkol içeren çözeltilerde karıştırılmasıyla proniozomal jellerin hazırlanmasına dayanmaktadır. Karışım 60- 70°C’de ısıtılarak yüzey aktif maddenin çözünmesi sağlanmakta, ardından su fazı eklenerek berrak bir çözelti elde edilmektedir. Soğutma sonrasında proniozomal jel oluşmakta ve hidrasyon ile homojen boyutlu niozomlara dönüşmektedir. Basit ve hızlı uygulanabilen bu yöntem; özel ekipman gerektirmediği için özellikle küçük ölçekli formülasyonların hazırlanmasında tercih edilir (Khan ve diğerleri, 2024).

Bulamaç (slurry) yöntemi, taşıyıcı (örneğin maltodekstrin) ile yüzey aktif madde çözeltisinin karıştırılması ve vakum altında çözücünün uzaklaştırılmasıyla kuru, serbest akan bir toz elde

edilmesine dayanmaktadır. Elde edilen formülasyon, uygun koşullarda saklanarak stabilitesi korunmaktadır. Maltodekstrin, suda kolay çözünmesi sayesinde etkin bir taşıyıcı görevi görmektedir ve yüzey aktif maddelerin homojen bir şekilde kaplanmasını sağlamaktadır. Bu özellik, aktif bileşenleri hidroliz ve oksidasyondan korumakta ve geniş yüzey alanı rehidrasyon sürecini kolaylaştırmaktadır. Yöntem, stabil ve ölçeklenebilir olmasına rağmen zaman alıcı olabilmekte, özel ekipman gerektirebilmekte ve küçük ölçekli üretimlerde uygulaması zahmetli olabilmektedir (Annakula, Errabelli, Jukanti, Bandarinve ve Veerareddy, 2010).

Sprey kaplama yöntemi, yüzey aktif madde çözeltisinin uygun bir taşıyıcı (örneğin maltodekstrin) üzerine püskürtülmesi ve çözücünün uzaklaştırılması esasına dayanmaktadır. İşlem, taşıyıcı yüzeye hedeflenen miktarda yüzey aktif madde kaplanana kadar tekrarlanabilmektedir. Taşıyıcı yüzeyinde oluşan ince film tabakası, rehidrasyon sırasında çok tabakalı veziküllerin oluşumunu sağlar ve bu sayede homojen kaplama ile uzun süreli stabilite elde edilmektedir (Khatoon ve diğerleri, 2017).

Bununla birlikte, sorbitol gibi bazı taşıyıcıların çözücüde tam olarak çözünmemesi, sprej kaplama verimini olumsuz etkileyebilir. Çözünme sırasında yüzey aktif maddelerin taşıyıcıya homojen şekilde kaplanamaması işlemi yavaşlatmakta; bazı ilaçlarda enkapsülasyon verimini düşürebilmektedir. Ayrıca, işlem sırasında vakum veya azot gazı gibi özel ekipman kullanımına ihtiyaç duyulmaktadır (Khan ve diğerleri, 2024).

Proniozom ve benzeri nanotaşıyıcı sistemlerin üretiminde kullanılan yöntemler, oluşturdukları yapıya göre farklılık göstermektedir. İnce film hidrasyonu ve ters faz buharlaştırma yöntemlerinde lipid ve yüzey aktif maddeler önce organik çözücüde çözülerek ince bir film tabakası oluşturmakta; bu film sulu faza dağıtılarak veziküller meydana gelmektedir. Buna karşılık, etanol enjeksiyonu, lipid enjeksiyonu, kabarcık yöntemi ve mikroakışkan yöntem gibi tekniklerde veziküller doğrudan sulu fazda oluşmakta ve film tabakası oluşmamaktadır. Bu farklı üretim stratejileri, proniozomların kapsülleme verimi, stabilitesi ve kontrollü salım özelliklerini doğrudan etkilemektedir (Khatoon ve diğerleri, 2017; Sharma ve Singh, 2021).

Proniozomal tozlar ise suyla hidratlandığında hızla niozomlara dönüşmekte ve bu dönüşüm, ilaç taşıma sistemlerinin hem fiziksel stabilitesini hem de biyoyararlanımını artırmaktadır. Ayrıca, film tabakası yönteminin sağladığı kontrollü yapıyla birleştiğinde, bu süreç niozomal

formülasyonların etkinliğini ve güvenilirliğini pekiştirmektedir (Patil, Pandit, Udavant, Sonawane ve Bhambere, 2021).

Sonuç olarak, film tabakası oluşturma yöntemleri ve proniozomal tozların kullanımı, ilaç taşıma sistemlerinin kararlılığını ve terapötik etkinliğini artırarak farmasötik uygulamalarda önemli bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir.

2.6.4. Fizikokimyasal karakterizasyon parametreleri

Proniozom sistemlerinin etkinliği ve stabilitesi, fizikokimyasal özelliklerin detaylı karakterizasyonu ile değerlendirilmektedir. Bu parametreler hem proniozomların yapısal bütünlüğünü hem de hidrasyon sonrası oluşacak niozomların fonksiyonel performansını belirlemektedir (Sharma ve diğerleri, 2023)

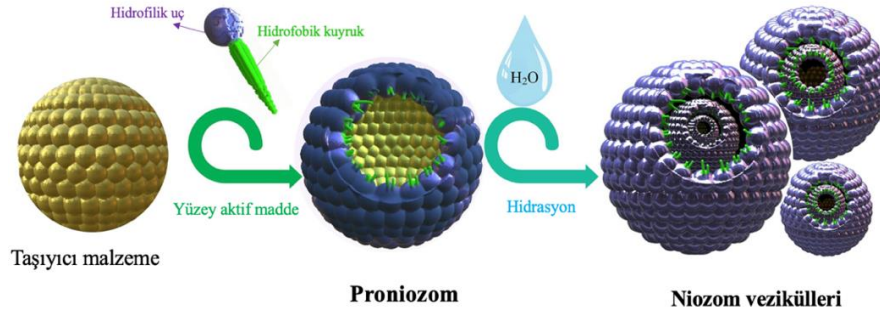
2.6.4.1. Proniozomlardan niozom hazırlanması

Proniozomlar, hidrasyon işlemi ile aktif formdaki niozomlara dönüştürülmektedir. Bu süreçte, proniozom tozları uygun sıcaklık ve yeterli süre boyunca su veya tampon çözelti ile hidrate edilmekte; yüzey aktif maddeler ve yardımcı lipidler, çift tabakalı veziküller oluşturacak şekilde organize olmaktadır. Hidrasyon koşulları, dönüşüm verimi ve oluşan niozomların boyut dağılımı üzerinde belirleyici rol oynamaktadır (Bachhav, 2016).

Proniozomal formülasyonların fiziksel stabilitesi, farmasötik etkinlik ve güvenilirlik açısından kritik öneme sahiptir. Morteza-Semnani ve diğerleri (2022) çalışmasında, Terbinasome 2 ve Terbinasome 3 jellerinden her birinden 10 g örnek santrifüj tüplerine alınmış ve oda sıcaklığında (3- 30 K) 3000 rpm hızda 30 dakika süreyle santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme işlemi; jellerin olası faz ayrışması veya çökme gibi fiziksel instabilitelerini belirlemeye yönelik uygulanmış olup, proniozomal jellerin mekanik olarak kararlı olduğunu göstermiştir. Bu bulgu, formülasyon yapısının bozulmamasının, enkapsüle edilen biyoaktif moleküllerin sistemde güvenle tutulmasını ve etkinliğin korunmasını dolaylı olarak desteklediğini ortaya koymaktadır. Dolayısıyla santrifüj testi, proniozomal jellerin hem mekanik stabilitesini hem de kapsülleme bütünlüğünü doğrulayan önemli bir karakterizasyon yöntemi olarak değerlendirilmektedir.

Niozomal dispersiyonun hazırlanması sırasında uygulanan sıcaklık (T , temperature) sistemin termodinamik koşullarını belirlemekte ve su fazı ile yüzey aktif maddenin etkileşimlerini yönlendirmektedir. Yüzey aktif maddenin ortalama faz geçiş sıcaklığı (T_m , mean phase transition temperature) ise, moleküllerin katı-jel (solid- gel) fazından sıvı kristal faza geçiş noktasını tanımlamakta ve membran akışkanlığı ile niozom oluşum verimliliği üzerinde belirleyici rol oynamaktadır. Niozom oluşumunda, uygulanan sıcaklığın T_m 'nin üzerinde tutulması ($T > T_m$) yüzey aktif moleküllerin reorganizasyonunu tetikleyerek hidrofobik kuyruk ve hidrofilik baş gruplarının düzenli bir şekilde konumlanmasını sağlamaktadır. Bu süreç, kısa süreli mekanik ajitasyon ile desteklenmekte; ajitasyon, gerekli kinetik enerjiyi sağlayarak moleküller arası etkileşimlerin termodinamik olarak optimize edilmesini kolaylaştırmakta ve böylece çift tabakalı niozomal yapıların homojen, morfolojik olarak stabil ve fonksiyonel açıdan verimli bir biçimde oluşumunu mümkün kılmaktadır (Ratnamala ve Amreen, 2022).

Kuramsal olarak, proniozomal formülasyonun hidrasyon ortamı ile teması, lipid ve yüzey aktif moleküllerin kendiliğinden organize olarak çift tabakalı veziküller oluşturmasını sağlamaktadır. Hidrasyon sırasında, proniozomların içerdiği yüzey aktif maddeler su ile etkileşime girerek enerji açısından düşük ve termodinamik olarak kararlı niozom yapılarına geçiş gerçekleştirmektedir. Bu süreç, tüp içinde karıştırma yapılmadan belirli bir süre bekletilerek, moleküllerin serbest difüzyon ve spontane organizasyon mekanizmaları ile meydana gelmektedir. Proniozomların kendiliğinden (spontane) niozom oluşturma yeteneği, hidrasyon sonrası ortaya çıkan niozom sayısı ile nicel olarak değerlendirilmektedir. Hidrate olmuş niozomların sayımı, Neubauer sayım odacığı gibi standart mikroskobik sayım teknikleri ile yapılmakta ve böylece proniozomların spontanite derecesi ölçülmektedir. Bu yaklaşım, Şekil 2.9'da gösterilen proniozom formülasyonlarının hidrasyon sonrası niozom oluşum kinetiğini ve etkinliğini açıklamaktadır (Chauhan, Naved ve Parvez, 2019; Thakur ve diğerleri, 2009).



Şekil 2.9. Proniozomdan niozom hazırlanması (Yasamineh ve diğerleri, 2022)

Proniozomlardan elde edilen niozomların boyut ve dağılımı, uygulanan hidrasyon yöntemine bağlı olarak değişmektedir. Manuel çalkalama ile gerçekleştirilen hidrasyonda, proniozomal jel sulu ortamla temas ettiğinde 200- 300 vezikül incelenmiş ve ortalama boyut ile dağılım belirlenmiştir. Çalkalama olmaksızın spontane hidrasyon, veziküllerin kendiliğinden oluşum kapasitesini ve spontane oluşum hızını göstermektedir (Abdelmagid, Jeganath ve Nitish, 2020). Ultrasonikasyon yöntemi ise hidrasyon sonrası oluşan veziküllerin boyutunu küçültmekte ve dağılımın homojenleşmesini sağlamaktadır. Bu yöntemler, proniozomların niozomlara dönüşüm sürecinde partikül boyutu, polidispersidite indeksi ve homojenlik gibi fizikokimyasal özelliklerin kontrol edilmesini mümkün kılmaktadır (Vora, Khopade ve Jain, 1998).

Yapılan çalışmalarda, proniozom formülasyonlarında vezikül oluşumunun hidrasyon sıcaklığına bağlı olarak değiştiği gözlenmektedir. Farklı yüzey aktif madde tipleri kullanılarak hazırlanan proniozomlar, Span 20 ve Span 80 içeren sistemlerde 25- 45 °C aralığında etkin şekilde niozom oluşturabilmektedir. Buna karşın Span 40 ve Span 60 içeren proniozomlar, vezikül oluşumu için 45 °C'nin üzerinde bir sıcaklık gerektirmektedir. Literatürde, Span 80 ve Span 40 veya Span 80 ve Span 60 kombinasyonlarının yalnızca yüksek sıcaklıklarda (>45 °C) niozom oluşumuna izin verdiği ve bu nedenle klinik uygulamalarda pratik bulunmadığı bildirilmektedir. Span 20 ve Span 80 kombinasyonları ise tüm incelenen sıcaklıklarda (25, 37 ve 45 °C) niozom oluşturabilmekte ve yalnızca en yüksek sıcaklıkta az sayıda kümelenme gözlenmektedir. Bu bulgular, proniozom bileşenlerinin tipi ve oranının, hidrasyon ile niozom dönüşümü ve vezikül oluşumunda belirleyici bir rol oynadığını göstermektedir (Guarati, Gianeti ve Campos, 2006).

Proniozom formülasyonlarının klinik uygulamalarda etkili olabilmesi, uygun yüzey aktif maddenin seçilmesine ve optimal hidrasyon sıcaklığının belirlenmesine bağlıdır; bu faktörler

sistemin stabilitesini ve ilaç taşıma kapasitesini doğrudan etkilemektedir (Manosroi ve diğerleri, 2003). Endüstriyel uygulamalarda ise, üretim verimliliğini artırmak ve sistemin uygulanmaya başlandığında içindeki ilacın ilk dozunu kontrollü bir şekilde verebilmesini sağlamak amacıyla proniozomlara mümkün olduğunca yüksek miktarda ilaç yüklenmektedir. Bu yaklaşım, proniozom hazırlık sürecinde gereksiz saflaştırma adımlarını azaltmakta ve böylece üretim sürecini daha hızlı ve verimli hale getirmekte; aynı zamanda terapötik etkinliği daha öngörülebilir bir sistem ortaya çıkarmaktadır (Fabiano ve diğerleri, 2024).

2.6.4.2. Partikül boyutu ve polidispersidite indeksi

Niozomların partikül boyut dağılımı ve morfolojik özellikleri, sistemin kararlılığı ve biyoyararlanımı açısından kritik parametrelerdir. Bu amaçla en sık kullanılan yöntemler lazer kırınımı (LD, laser diffraction) ve dinamik ışık saçılımı (DLS, dynamic light scattering) analizleridir. LD yöntemi, partiküllerin üzerine lazer ışını gönderilmesiyle elde edilen saçılma açısına dayalı olarak çalışır. Büyük partiküller küçük açılarda, küçük partiküller ise geniş açılarda ışığı saçar. Bu teknik 0,1 µm ile birkaç mm aralığında ölçüm yapabilmekte ve özellikle heterojen boyut dağılımına sahip sistemlerde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, aglomerasyon eğilimi gösteren dispersiyonlarda, LD ölçümleri bazen tek büyük partikül olarak algılanabilmekte ve bu durum dağılım verilerini etkileyebilmektedir (Grubbs ve diğerleri, 2021).

Niozomal veziküllerin morfolojisi genellikle küresel kabul edilmekte olup, ortalama hidrodinamik çapları dinamik ışık saçılması (DLS) yöntemiyle belirlenebilmektedir. Ek olarak, niozom boyutları ve morfolojisi, yüksek çözünürlüklü görüntüleme ve ayırma teknikleriyle analiz edilebilmektedir; bu yöntemler arasında taramalı ve transmisyon elektron mikroskobu (SEM, TEM), moleküler elek kromatografisi, ultra santrifüjleme, foton korelasyon mikroskobu, optik mikroskopi ve donma-kırma (freeze-fracture) elektron mikroskobu yer almaktadır. Donma-çözünme döngüsüne tabi tutulan niozomlarda gözlenen vezikül çapındaki artış, döngü sırasında veziküller arasında füzyon olaylarının meydana gelmesinden kaynaklanmaktadır ve bu durum niozom stabilitesinin değerlendirilmesinde önemli bir parametre olarak kabul edilmektedir (Kazi ve diğerleri, 2010).

Bu bağlamda, donma-çözünme döngüsünün niozomal veziküllerin boyut ve morfolojik özellikleri üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin, bir çalışmada

donma-çözünme işlemi sonrasında veziküllerin çaplarında artış gözlenmiş ve bunun veziküller arasında füzyon olaylarından kaynaklandığı belirtilmiştir. Başka bir çalışmada ise donma-çözünme işleminin, özellikle doymamış yüzey aktif maddelerle hazırlanan niozomların enkapsülasyon etkinliğini azalttığı bildirilmiştir. Bu bulgular, donma-çözünme işleminin niozomal veziküllerin morfolojik ve fiziksel özellikleri üzerinde belirgin etkiler yarattığını ve bu etkilerin stabilite değerlendirmelerinde dikkate alınması gerektiğini göstermektedir (Teron ve diğerleri, 2024).

Dinamik ışık saçılımı (DLS), özellikle sıvı ortamda dağılan partiküllerin Brown hareketlerini ölçerek parçacık boyutlarını belirlemeye yarayan yaygın bir tekniktir. Analizden elde edilen temel bilgi, partiküllerin hidrodinamik çapının yoğunluk ağırlıklı dağılımı olarak raporlanmaktadır. Uygun optik ve hidrodinamik modeller kullanıldığında, bu dağılım sayı ağırlıklı veya hacim ağırlıklı dağılıma dönüştürülmekte ve diğer dolaylı boyut ölçüm yöntemleriyle (örneğin analitik santrifüjleme veya ultrasonik spektroskopi) uyumlu sonuçlar elde edilmektedir. Hidrodinamik çap, hareket eden bireysel parçacıkları veya bunların oluşturduğu agregatları/ aglomeratları temsil etmekte ve genellikle parçacıkların dış boyutlarını yansıtmaktadır; ancak bir agregat içindeki tek tek parçacıkların boyutlarıyla doğrudan ilişkili değildir (Babick, 2020).

Dinamik ışık saçılımı (DLS) ve elektron mikroskopisi (SEM/TEM) sonuçları arasında literatürde hem daha büyük hem de daha küçük değerler raporlanabilmektedir. Bu farklılığın temelinde ölçüm prensipleri ve numune koşulları yer almaktadır. DLS, partiküllerin çözeltideki Brown hareketine dayalı hidrodinamik çapını belirlemekte ve hidrasyon tabakası ile olası agregasyonları boyuta dahil etmekte, bu nedenle genellikle daha büyük sonuçlar vermektedir. Buna karşılık, DLS'in küresel partikül varsayımı nedeniyle poligonal, çubuksu veya hiyerarşik yapıları nanoparçacıklar eşdeğer küre gibi değerlendirilmekte ve boyutlar mikroskopi yöntemleriyle ölçülenden daha küçük raporlanabilmektedir (Babick, 2020).

Partikül büyüklüğünün nicel olarak ifade edilmesinde, partikül küresel varsayımlar çap hesaplamalarına dayalı yöntemlerden yararlanılmaktadır. Özellikle nanopartikül boyutlarının karakterizasyonunda, parçacıklar arasındaki elektrostatik itme ve çekim kuvvetleri temel alınarak ölçüm yapılmakta; bu yaklaşım, sistemin kolloidal stabilitesinin anlaşılmasında da kritik bir rol oynamaktadır (Shakrani ve diğerleri, 2020).

Partikül boyutu analizinde, özellikle 50 μm 'den küçük nanometrik boyuttaki küresel partiküller için Mie saçılım teorisi kullanılmaktadır (Wrigglesworth ve Johnston, 2021). Bu teori kapsamında, partiküllerin optik özellikleri; absorpsiyon indeksi (Absorption Index, AI), kırılma indeksi (Refractive Index, RI) ve dispersantın kırılma indeksi dikkate alınarak doğru boyut analizi sağlanmaktadır. Saçılma açısı ve yoğunluğunun partikül büyüklüğüyle olan ilişkisi temel alınarak; büyük partiküller ışığı daha düşük açılarda yoğun şekilde saçarken, küçük partiküllerde saçılma yüksek açılarda ve daha düşük yoğunlukta gerçekleştiği bilinmektedir (Niskanen ve diğerleri, 2019).

Partikül boyutu analizlerinde kullanılan Mie saçılım teorisinin doğruluğunu artırmak amacıyla, formülasyona ait optik parametreler analiz yazılımına girilmektedir. Dispersant olarak kullanılan saf suyun kırılma indeksi (refractive index, RI) 1,330 (Erlick, 2006), materyal refraktif indeks değeri (RI): 1,629 (Anonim, 2022) ve absorpsiyon indeksi (Absorption Index, AI) ise 0,001 olarak kabul edilmiştir. Proniozomal partiküllerin kırılma indeksi, National Center for Biotechnology Information (2025) tarafından yüzey aktif madde (Span 60) ve stabilizatör (dodekanol) bileşenleri için yaklaşık 1,48 olarak belirlenmiştir. Partiküllerin absorpsiyon indeksi ise düşük ışık absorpsiyonu nedeniyle 0,01 olarak atanmıştır (Tosi ve diğerleri, 2020). Bu parametreler doğrultusunda partiküllerin optik özelliklerine uygun, doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmiştir.

Proniozomal sistemlerin partikül boyutu dağılımı, elektromanyetik dalgaların partiküller tarafından saçılımını modellemek amacıyla, parçacık boyutunun ışığın dalga boyuna oranı temel alınmaktadır. DLS tekniği, 1 nm–1 μm aralığındaki mikrometre altı parçacıkların boyut analizlerinde en yaygın kullanılan yöntem hâline gelmiş olup, analizlerin hızlı gerçekleştirilmesi ve ölçüm başına düşük maliyet gibi pratik ve ekonomik avantajlar sunmaktadır. Ayrıca, DLS, fraksiyonlama ile boyut analizini birleştiren hibrit ölçüm sistemlerinde güçlü bir ek özellik olarak kullanılmakta ve donanım ile veri analizindeki gelişmeler, tekniğin yüksek polidispersiditeye sahip materyalleri daha etkin şekilde analiz etmesini ve boyut dağılımının ayrıntılarını daha iyi çözmesini sağlamaktadır (Krumrey, 2020). Polimer ve niozomal sistemlerde molekül ağırlık dağılımını ifade etmek için kullanılan iki temel kavram M_w (weight-average molecular weight, ağırlık ortalama molekül ağırlığı) ve M_n (number-average molecular weight, sayı ortalama molekül ağırlığı) olarak tanımlanmaktadır. M_w , molekül ağırlığının kütle katkısına göre hesaplanmakta ve büyük moleküller bu değere

daha fazla etki etmektedir. Buna karşılık M_n , molekül ağırlığının sistemdeki molekül sayısına göre eşit katkıyla hesaplanmakta ve bu nedenle küçük moleküller de hesaplamada büyük moleküller kadar etkili olmaktadır. Bu iki parametrenin oranı, yani M_w/M_n , polidispersidite indeksi (PDI) olarak adlandırılmaktadır. M_w ile M_n 'nin birbirine yakın olduğu durumlarda $PDI \approx 1$ olmakta ve sistem homojen, monodispers kabul edilmektedir. Ancak M_w 'nin M_n 'den büyük olduğu durumlarda $PDI > 1$ değerleri gözlenmekte ve bu da sistemin heterojen, geniş dağılımlı bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir (Bautista- Solano ve diğerleri, 2025).

Yapısal homojenlik arttıkça PDI değeri azalmaktadır. Niozomal formülasyonlarda düşük PDI değerine ulaşılması, aktif bileşenin kontrollü ve tekrarlanabilir salımının sağlanması açısından arzu edilmektedir (Bautista- Solano ve diğerleri, 2025).

PDI'nin güvenilir biçimde hesaplanabilmesi için partikül boyutu dağılımının istatistiksel olarak Gauss dağılımına uyum göstermesi gerekmektedir. Gauss dağılımı, tek modlu ve simetrik bir dağılım yapısına sahip olduğundan, dağılımın genişliği yalnızca standart sapma (σ) ile temsil edilebilmekte ve bu sayede PDI, ortalama boyut etrafındaki yayılımın bir ölçüsü olarak tanımlanabilmektedir. Dağılımın Gauss karakterinden sapması durumunda, PDI'nin tek başına kullanılması yanıltıcı olmakta, daha kapsamlı istatistiksel ve modelleme yaklaşımlarına başvurulması gerekmektedir (Kaliva ve Vamvakaki, 2020).

PDI, nanopartikül sistemlerinin boyut dağılımının homojenliğini değerlendirmek için kullanılan temel bir parametredir. PDI, partikül boyutu dağılımının standart sapmasının karesinin ortalama z-hidrodinamik çapın karesine bölünmesi ile hesaplanır (Vora ve diğerleri, 1998):

$$PDI = \frac{\sigma^2}{R_h^2} \quad (2.2)$$

Burada σ , partiküllerin ortalama boyuttan sapma derecesini gösteren standart sapmayı, R_h ise sistemdeki nanopartiküllerin ortalama z-hidrodinamik çapını temsil etmektedir. Bu oran, nanopartikül süspansiyonunun monodispersite veya polidispersidite derecesini nicel olarak ifade eder. PDI değeri düştükçe partikül boyutları daha homojen bir dağılım gösterirken, yüksek PDI değerleri sistemin heterojen ve düzensiz bir dağılıma sahip olduğunu göstermektedir. Bu

nedenle, PDI ölçümü nanopartikül formülasyonlarının stabilite, homojenlik ve biyoyararlanım potansiyelini değerlendirmek için kritik bir parametre olarak kabul edilmektedir (Nasr, 2010).

Bir parçacığın bir ortam içerisindeki translasyonel difüzyon katsayısı, parçacığın ortamda nasıl hareket ettiğine bağlı olarak değişmektedir. Dolayısıyla, DLS yöntemiyle belirlenen çap yalnızca partikül boyutuna değil, aynı zamanda yüzey yapısına, çözücü özelliklerine, konsantrasyona ve ortamda bulunan elektrolit tipine de bağımlı olmaktadır. Partikül yüzeyinde gerçekleşen ve difüzyon hızını etkileyen herhangi bir değişiklik, gözlenen partikül boyutunu da etkilemektedir. Örneğin, nanopartikül yüzeyinde adsorbe olan bir polimer tabakasının varlığı, nanopartikülün difüzyon hızını azaltmakta ve buna bağlı olarak DLS ile belirlenen hidrodinamik boyutu artırmaktadır (Kaliva ve Vamvakaki, 2020).

Ayrıca, SEM/TEM analizleri kuru numuneler üzerinden yapılmakta, kuruma sırasında partiküllerin birbirine yapışması veya şekil değişiklikleri boyutun daha büyük görünmesine neden olmaktadır. Dolayısıyla, DLS ve SEM/TEM ölçümleri birbirini tamamlayıcı nitelikte kullanılmakta ve elde edilen sonuçların birlikte değerlendirilmesi, nanoparçacıkların gerçek boyut özelliklerinin doğru şekilde yorumlanmasını sağlamaktadır (Chen ve diğerleri, 2012; Judy, Lopus ve Kishore, 2021; Shaban, Mohamed ve Abdallah, 2018; Marsalek, 2014).

2.6.4.3. Yüzey yükü ve stabilite

Niozomlar, genellikle yüzeyine yük kazandıran bileşenler içeren iyonik olmayan yüzey aktif maddelerden formüle edilmektedir; bu nedenle vezikül yüzeyindeki yükün ölçülmesi, dispersiyonun kararlılığı açısından kritik öneme sahiptir. Bu bileşenler, niozom yüzeyine elektrostatik yük kazandırmakta ve partiküller arası itici kuvvetlerin oluşmasını sağlamaktadır, böylece agregasyonun önlenmesine katkıda bulunmaktadır (Chaw ve Kim, 2013)

Niozomların yapısal kararlılığında yüzey yükü, kritik bir parametre olarak önemli rol oynamaktadır. Çok katmanlı niozom yapılarında yük varlığı, elektrostatik etkileşimler aracılığıyla lameller arası mesafe üzerinde belirleyici bir etkiye sahiptir. Yüzey aktif madde baş gruplarının iyonizasyonu veya enkapsüle edilen bileşiğin çift tabaka ile etkileşimi sonucu oluşan yüzey yükü, ardışık lameller arasında elektrostatik itici kuvvetler oluşturmaktadır. Bu kuvvetler, lameller arası mesafenin genişlemesine ve dolayısıyla toplam enkapsüle edilen hacmin artmasına yol açmaktadır. Böylece yüzey yükü, niozomların yapısal organizasyonu,

enkapsülasyon kapasitesi ve uzun dönem stabilitesini belirleyen temel faktörlerden biri olarak değerlendirilmektedir (Mozafari, 2009).

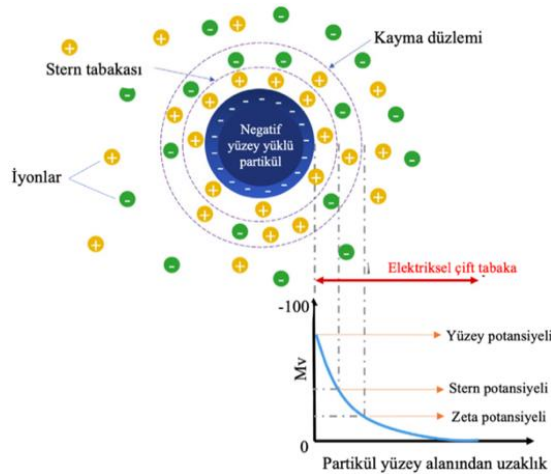
Yüzey aktif madde moleküllerinin yüklü grupları arasındaki elektrostatik itici kuvvetler, veziküller arasındaki agregasyon ve füzyon süreçlerini engelleyerek sistemin kolloidal stabilitesini sağlamaktadır. Enkapsüle edilen bileşiğin fiziko-kimyasal özellikleri, niozomal çift tabakanın yük dağılımını ve rijiditesini modüle etmektedir. İlaç molekülünün yüzey aktif madde baş grupları ile etkileşimi sonucunda çift tabakada yük oluşmakta, bu yük tabakalar arasında elektrostatik itici kuvvetler meydana getirerek vezikül çapının artmasına neden olmaktadır. Ayrıca, yüzey yükündeki artış, veziküller arasındaki yakın temasın önlenmesine yardımcı olarak agregasyon eğilimini azaltmakta ve böylece sistemin stabilitesine katkı sağlamaktadır (Khodadadi, Khodadadi, Chaturvedi ve Moradi, 2025).

Zeta potansiyeli, niozom süspansiyonunda bulunan veziküllerin toplam elektrostatik yükünü belirlemekte ve böylece sistemin stabilitesi hakkında bilgi sağlamaktadır (Hunter, Midmore ve Zhang, 2001). Zeta potansiyeli, niozomun bileşimine bağlı olarak pozitif, negatif veya nötr olabilmektedir ve büyüklüğü, süspansiyonun kararlılığını doğrudan etkilemektedir. Düşük veya nötr yüke sahip niozomlar zamanla birbirleriyle birleşmekte ve aglomerasyon göstermektedir; buna karşın yüksek negatif veya pozitif yüke sahip niozomlar, ortamda birbirlerini itmekte ve uzun süreli stabilite göstermektedir. Genel olarak, zeta potansiyeli ± 30 mV'nin üzerinde veya altında olan niozom süspansiyonları stabil kabul edilmektedir (Chaw ve Kim, 2013).

Kolloidal parçacıklar için kritik bir parametre olan ζ -potansiyel, sürekli faz ile durağan tabaka arasındaki potansiyel farkını ifade etmekte ve doğrudan yüzey yükü ile ilişkili bulunmaktadır. Bu potansiyel, kolloidal parçacıklar arasındaki etkileşim enerjisini belirleyerek sistemin koagülasyon veya agregasyona karşı stabilitesini kontrol etmektedir. Yüksek ζ -potansiyel değerine sahip sistemler (pozitif ya da negatif), elektrostatik itme kuvvetleri sayesinde stabilize edilmekte; düşük ζ -potansiyelli sistemler ise koagülasyon veya flokülasyona eğilim göstererek faz ayrışmasına yol açmaktadır. Dolayısıyla, ζ -potansiyelin ölçülmesi, kolloidal sistemlerin stabilite değerlendirmesinde temel bir kriter olarak kabul edilmektedir (Walters, Al Aani, Esteban, Williams ve Oatley-Radcliffe, 2020).

Zeta potansiyeli ölçümü, niozom süspansiyonunun iki altın elektrotlu bir hücreye eklenmesi ile gerçekleştirilmektedir. Uygulanan elektrik alanı altında niozomlar, zıt yüke sahip elektrot yönünde hareket etmektedir. Doppler elektroforez tekniği kullanılarak partiküllerin hızı voltaja bağlı olarak ölçülmekte ve numune hücresindeki niozomlar gelen ışıkla aydınlatılmaktadır. Elektrik alanı etkisiyle hareket eden niozomlar, saçılan ışıkta meydana gelen dalgalanmalarla zeta potansiyelinin belirlenmesini sağlamaktadır. Niozomların mobilitesi, ilişkili yüklerle doğru orantılı olup, bu durum tespit edilen lazer ışığının frekansında bir Doppler kaymasına yol açmaktadır (Walters ve diğerleri, 2020).

ζ -potansiyel, kolloidal partikül yüzeyinde oluşan elektriksel çift tabakanın (electrical double layer, EDL) difüz (dağılmış) bölgesindeki elektrik potansiyelini tanımlamakta ve sistem kararlılığını değerlendirmede temel parametre olarak kabul edilmektedir. Elektriksel çift tabaka, yüzeye yakın Stern tabakası (yüzeye güçlü biçimde adsorbe olmuş karşı iyonların bulunduğu sabit tabaka) ile onu çevreleyen difüz tabakadan (elektrostatik kuvvetler ve termal hareket sonucu daha serbest hareket eden iyonların bulunduğu bölge) oluşmaktadır. ζ -potansiyel, bu difüz tabakanın kayma düzlemi (slipping plane) üzerinde ölçülen potansiyeli ifade etmektedir (Park ve Seo, 2011) (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Partikül yüzeyinde oluşan elektriksel tabaka (Park ve Seo, 2011)

ζ -potansiyeli etkileyen başlıca faktörler arasında pH, iyonik güç, katkı maddelerinin konsantrasyonu ve sıcaklık yer almakta olup, bu parametrelerin kontrol edilmesi ve raporlanması ölçümlerin güvenilirliği açısından kritik önem taşımaktadır. Özellikle pH, yüzey yük yoğunluğunu değiştirmekte ve ζ -potansiyelin işaretini ile büyüklüğünü modüle

edebilmektedir; iyonik güç ise elektriksel çift tabakanın sıkışmasına yol açarak dispersiyonun elektrostatik stabilitesini etkilemektedir (Karimifard ve diğerleri, 2022).

ζ -potansiyel tayini genellikle elektroforetik mobilite ölçümüne dayanmakta ve bu ölçümler çoğunlukla dinamik ışık saçılımı (DLS) tabanlı tekniklerle gerçekleştirilmektedir. Ölçümlerin güvenilirliği için örneklerin uygun konsantrasyon ve iletkenlik değerlerinde hazırlanması, çözeltinin temiz ve homojen olması, pH'ın hassas biçimde kontrol edilmesi ve cihazın sıcaklık dengeleme adımlarının uygulanması gerekmektedir. Bununla birlikte, yüksek iyonik şiddete sahip dispersiyonlar veya çapı 5 μm 'den büyük partiküller, elektroforetik mobilite ile ζ -potansiyel arasındaki ilişkinin doğru kurulmasını güçleştirmekte ve ölçümün güvenilirliğini sınırlandırmaktadır (Karimifard ve diğerleri, 2022).

Bu bağlamda, niozomlar genellikle iyonik olmayan yüzey aktif maddeler ve opsiyonel olarak fosfolipitlerden oluşan kolloidal taşıyıcı sistemler olarak tanımlanmaktadır ve stabiliteyi büyük ölçüde yüzey elektrostatik potansiyeli (ζ -potansiyel) ile ilişkilendirilmektedir. Partikül yüzeyinde oluşan yükler, elektroforetik mobilite ölçümleri aracılığıyla belirlenebilmekte ve böylece nanosistemlerin agregasyon eğilimi ve uzun süreli stabilitesi değerlendirilmektedir. Özellikle düşük iyonik şiddete sahip dispersiyonlarda Debye uzunluğunun artması, ζ -potansiyelin büyüklüğünü ve Dukhin sayısını etkileyerek niozomların stabilitesinde önemli bir rol oynamaktadır (Varenne ve diğerleri, 2015).

Buna ek olarak, niozomların yapısında yer alan yüzey aktif madde ve lipid molekülleri arasındaki Van der Waals kuvvetleri ve hidrojen bağları, partiküller arası etkileşimleri belirlemekte ve taşıyıcı sistemin büzülme, birleşme ve yük tutma kapasitesini etkilemektedir. Hidrojen bağları, özellikle aktif molekül ile yüzey arasındaki etkileşimlerde rol oynamakta ve yükleme verimini artırabilmektedir. Ayrıca, niozomların hidrofobik iç faz ve hidrofilik dış faz yapısı, su ile etkileşimlerini ve dispersiyonun kararlılığını değiştirmektedir; bu durum, hidrofilik-hidrofobik etkileşimlerin nanoyapılı yüzeyler üzerindeki etkilerini doğrudan göstermektedir (Kaliva ve Vamvakaki, 2020).

Disetil fosfat (DCP, dicetyl phosphate) içeren niozomlarda yüksek negatif ζ -potansiyel değerleri elde edilmekte ve bunun elektrostatik stabilizasyon sağladığı literatürde rapor edilmektedir. Ancak elektrostatik stabilizasyon her zaman yeterli olmayabilir; örneğin, Span 60

temelli bazı niozomlarda ilaç yükleme sonrası agregat oluşumu gözlenmiş ve yalnızca ek bir sterik stabilizatörle kararlı dispersiyonlar elde edilebilmiştir. Bu bulgular, elektrostatik stabilizasyonun iyonik ortam koşullarına duyarlı olduğunu ve tek başına her durumda uzun süreli kararlılık sağlamayabileceğini göstermektedir (Chaw ve Kim, 2013).

Zidan, Ibrahim Mokhtar ve El Megrab (2017) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, metotreksat yüklü niozom formülasyonlarının optimizasyonu Box-Behnken tasarımı kullanılarak incelenmiştir. Araştırmada, kolesterol ve Tween 20 yüklemesi ile çözücü tipinin, zeta potansiyelini en çok etkileyen faktörler olduğu belirlenmiştir. Kolesterol ve Tween 20 konsantrasyonu arttıkça zeta potansiyeli azalmış, özellikle Tween 20'nin etkisi daha baskın olmuştur; buna karşılık hidrofilik çözücülerin kullanımı zeta potansiyelinin daha negatif değerler almasını sağlamıştır. Ayrıca, Tween 20 baş grubu hacmi arttıkça net yüzey yükü azalmış ve toplam yüzey alanı arttıkça zeta potansiyeli daha az negatif değerler göstermiştir; bu durum, Tween 20 moleküllerinin lameller yüzeyine yönelmesi ile açıklanmaktadır. Nötr kolesterolün pozitif etkisi, çift tabakadaki hidro-dinamik karşı yüklerin artmasından kaynaklanırken, negatif yük kinetik stabiliteyi yansıtmaktadır. Bu bulgular, enkapsülasyon veriminin optimize edilmesinin, yüzey iyon dağılımını dengeleyerek elektrostatik itici kuvveti sağlamada ve niozomal dispersiyonun kinetik stabilitesini güvence altına almada kritik bir rol oynadığını göstermektedir.

Dolayısıyla, kolloidal ve yüzey kimyası açısından incelenen ζ -potansiyel, Van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağları ve yüzey etkileşimleri, proniozomların formülasyonu, stabilitesi ve etkin madde taşıma kapasitesi üzerinde belirleyici faktörler olarak değerlendirilmektedir. Bu fizikokimyasal parametrelerin kontrol edilmesi, proniozomların biyouyumluluğu ve uygulama verimliliği açısından kritik öneme sahiptir (Zidan ve diğerleri, 2017).

2.6.4.4. Enkapsülasyon etkinliği

Proniozom ve niozom sistemlerinde, enkapsülasyon etkinliği (EE) ilacın vezikül içinde hapsolma oranını belirleyen temel bir parametre olarak değerlendirilmektedir. EE tayini, kapsüllenmemiş ilacın dispersiyondan ayrılması ve veziküller içinde kalan ilacın kantitatif olarak ölçülmesi ile gerçekleştirilmektedir (Ammar, Ghorab, El-Nahhas ve Higazy, 2011; Blazek-Wals ve Rhodes, 2001).

Santrifüjleme, fiziksel ayırım yöntemleri arasında merkezi bir rol oynamaktadır. Bu işlem, vezikülleri pelet hâline getirerek serbest ilacın uzaklaştırılmasını sağlamakta ve dispersiyonun homojenliğinin korunmasına katkıda bulunmaktadır. Kuramsal olarak, santrifüjleme, etkili EE tayinini sağlamakta ve vezikül boyutu ile yapısal bütünlüğün korunmasına katkıda bulunmaktadır. Bununla birlikte, aşırı hız veya uzun süreli uygulamalar lipid membran yapısını bozarak EE ve vezikül stabilitesini dolaylı olarak olumsuz etkilemektedir. Soğuk santrifüjleme yöntemi, yaklaşık 4 °C’de ve 7000 g altındaki rotasyon hızı ile 30 dakika süreyle uygulanmakta ve kapsüllenmemiş ilacın dispersiyondan uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Bu işlem sonucunda üstte süpernatant sıvısı, altta ise niozomal peletler oluşmaktadır. Pelletler distile su veya fosfat tampon ile yıkanmakta ve tekrar santrifüjlenerek kapsüllenmemiş ilacın tamamen uzaklaştırılması sağlanmaktadır (Blazek-Wals ve Rhodes, 2001).

Diyaliz yöntemi ile dispersiyon, uygun tampon çözeltide yarı geçirgen bir membran içinde tutulmakta ve serbest ilaç membran aracılığıyla uzaklaştırılmaktadır. Jel filtrasyon yöntemi ise Sephadex-G-50 gibi kolonlar kullanılarak düşük moleküler ağırlıklı kapsüllenmemiş moleküllerin mobil faza (pH ~7,4 fosfat tampon veya izotonik tuz çözeltisi) geçmesini ve veziküllerin kolonda retente edilmesini sağlamaktadır (Umbarkar, 2021).

Fiziksel ayırım sonrası, analitik tayin yöntemleri ile veziküllerde kalan enkapsüle ilacın miktarı ölçülmektedir. Pratikte çoğu çalışma santrifüjleme ile ön ayırım yapıp, ardından analitik doğruluk için diyaliz veya jel filtrasyon kullanmaktadır. Bu süreçte, UV spektrofotometri, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) veya uygun diğer analitik yöntemler kullanılmaktadır. Bu yaklaşım, membran rijitliği, kolesterolün düzenleyici etkisi ve yüzey aktif moleküllerin oryantasyonu gibi moleküler özelliklerin kapsülleme kapasitesine etkisini değerlendirmeye olanak sağlamaktadır (Mohanty ve diğerleri, 2018).

Niozomlarda enkapsülasyon verimi, kullanılan yüzey aktif madde tipine, karışımdaki bileşenlerin oranına (örneğin kolesterol oranı) ve sentez yöntemine bağlı olarak değişmektedir. EE birçok çalışmada %10- 40 aralığında rapor edilmiştir (Abd-Elbary ve El-Gendy, 2008; Guinedi, Mortada, Mansour ve Hathout, 2005); ancak bazı formülasyonlarda bu oran %75- 90 seviyelerine ulaşabilmektedir (Abd-Elbary ve El-Gendy, 2008; Waddad ve diğerleri, 2013).

2.6.4.5. Moleküler yapı ve etkileşimler

Proniozomların moleküler yapı ve etkileşim analizleri, taşıyıcı sistemin yapısal bütünlüğü, kapsülleme verimliliği ve ilaç salım kinetiğini belirlemede kritik öneme sahiptir. Bu analizler genellikle Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), nükleer manyetik rezonans (NMR) ve X-ışını difraktometresi / diferansiyel taramalı kalorimetri (XRD / DSC) kombinasyonu ile gerçekleştirilmektedir. Bu teknikler bir arada kullanıldığında, proniozomların yapısal düzenliliği, yüzey aktif madde-lipid-ilâç etkileşimleri ve kapsülleme sürecinde oluşan bağlar detaylı bir şekilde karakterize edilebilmektedir. Elde edilen veriler, proniozomların fizikokimyasal stabilitesi, kontrollü salım profili ve biyoyararlanımı açısından değerlendirilmesinde temel bilgi sağlamaktadır (Barani ve diğerleri, 2023).

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR, fourier transform infrared spectroscopy), niozomların yapısal karakterizasyonunda etkin ve güvenilir bir teknik olarak kullanılmaktadır. Özellikle yüzey aktif maddeler, kolesterol ve enkapsüle edilmiş ilâçlar gibi fonksiyonel bileşenlerin varlığını doğrulamak için FTIR etkili bir yöntem olarak değerlendirilmektedir. Bu teknik, elektromanyetik spektrumun kızılötesi bölgesinde çalışmakta olup 8×10^{-5} ile 1×10^{-2} cm dalga boyları (4,6- 46 kJ/mol enerji) aralığını kapsamaktadır. Fourier dönüşümü uygulanarak, zaman alanından alınan sinyal frekans alanında bir temsile dönüştürülmekte ve böylece moleküler titreşimlerin karakteristik bantlarının tanımlanması kolaylaşmaktadır. Kızılötesi aktifliği yalnızca molekül dipol momentinde değişime yol açan titreşimler için geçerli olmakta ve bu sayede niozomal formülasyonda mevcut olan spesifik fonksiyonel grupların tespiti sağlanmaktadır (Bautista- Solano ve diğerleri, 2025).

Literatürde, yüklü ve boş lipozomların FTIR spektrumları arasındaki farklılıkların, moleküllerin lipozomlara etkin şekilde yüklenip yüklenmediğini belirlemede yaygın olarak kullanıldığı bildirilmiştir. Bu kapsamda, $3700-3000\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde gözlenen geniş O- H gerilme bantları, tirozol, hidroksitirozol ve oleuropein gibi nutrasötik bileşiklerin alkol ve fenolik gruplarına karşılık gelmekte olup, ATR-FTIR spektroskopisinin yüzey duyarlılığı sayesinde bu moleküllerin lipozomların hidrofilik boşluğuna başarıyla yüklendiği saptanmıştır. Benzer şekilde, oleuropein yüklü lipozomlarda 1710 cm^{-1} ve 1650 cm^{-1} bantlarının belirginleşmesi ile 1210 ve 1090 cm^{-1} bantlarının şiddet artışı, oleuropeinin fosfolipit çift tabakasına entegre olduğunu doğrulamıştır. Bu bulgular, FTIR spektroskopisinin lipozom

yükleme çalışmalarında güvenilir ve etkili bir karakterizasyon yöntemi olduğunu ortaya koymuştur (Bonechi ve diğerleri, 2019).

Zeytin yaprağı ekstraktlarında, fermente edilmiş örneklerin ATR-FTIR spektrumlarındaki belirgin değişimler, fermentasyonun polifenol ve triterpen içeriklerini artırdığını göstermiştir. Özellikle 1072 ve 1018 cm^{-1} bantlarında gözlenen sekonder alkol C- O deformasyonu ve aromatik halka C-H titreşimlerindeki yoğunluk artışı, mikroorganizmaların enzimatik aktiviteleri aracılığıyla kompleks fenolik glikozitlerin hidroliz edildiğini ve serbest fenolik bileşiklerin ortaya çıktığını düşündürmüştür. Ayrıca 3550- 3200 cm^{-1} bölgesinde genişleyen - OH emilim bandı, alkollerin ve fenollerin miktarındaki artışı ve hidrojen bağlarının yoğunluğunu ortaya koymuştur (Agatonovic-Kustrin, Gegechkori, Petrovich, Ilinichna, Morton, 2021).

Fermente edilmiş etil asetat ekstraktında gözlenen 1735 cm^{-1} ve 1685 cm^{-1} dalgalıboylarındaki pikler, karboksilik asitlerin C=O ve konjuge karbonil gruplarının yoğunluğunun yükseldiğini göstermiştir; bu durum, fermentasyonun triterpenlerin (oleanolik asit, maslinik asit, eritrodiol ve ursolik asit) ekstraksiyonunu ve çözünürlüğünü artırdığını desteklemiştir. Kuramsal olarak, mikroorganizmaların ürettiği hidrolitik enzimler, bitki hücre duvarı bileşenlerini parçalayarak hedef bileşiklerin serbestleşmesini sağlamış ve böylece ekstraktın biyoaktif profilini zenginleştirmiştir. Bu mekanizma, fermentasyonun doğal ürünlerde fonksiyonel içeriklerin optimize edilmesinde etkili bir araç olduğunu göstermiştir (Mawazi ve Widodo, 2024).

Literatürde, amfifilik moleküller (fosfolipitler veya yüzey aktif maddeler) ile kolesterolün 3-OH grubu arasında veziküler sistemlerde ester bağı temelli etkileşimlerin gerçekleştiği bildirilmektedir. Bu etkileşimler, proniozomal ve niozomal çift tabaka organizasyonunda hidrojen bağları ve zayıf dipol-dipol kuvvetleri aracılığıyla membran stabilitesini artırmakta ve aynı zamanda enkapsülasyon etkinliğini desteklemektedir. IR spektrumlarında gözlenen bant kaymaları ise bu moleküller arası etkileşimlerin doğrudan kanıtı olarak değerlendirilmektedir (Nasseri, 2005).

Khan ve diğerleri (2015), eş molar oranlarda iyonik olmayan yüzey aktif maddeler ve diacerein kullanarak ince film hidrasyonu yöntemiyle niozomal formülasyonlar geliştirmiştir. FTIR analizleri, ilaç ve yüzey aktif maddelere ait bantlarda belirgin zayıflama ve pik yoğunluklarında

azalma olduğunu ortaya koymuştur. Diacerein karboksilik grubuna ait karakteristik pik (3300 cm^{-1}), tüm formülasyonlarda $3355\text{--}3379\text{ cm}^{-1}$ aralığında korunmuştur. Bazı bantlarda gözlenen genişleme, niozom oluşumunu desteklemekte; ana piklerin net biçimde gözlenmesi ise ilaç ile yüzey aktif maddeler arasında güçlü fiziksel etkileşimlerin varlığını göstermektedir. Fiziksel karışımlar ve niozomal formülasyonlarda yeni pik ya da kayma saptanmamış, bu da diacerein iyonik olmayan yüzey aktif maddelerle kimyasal etkileşime girmediğini ve yapısal bütünlüğünü koruduğunu düşündürmektedir.

Ayrıca, Span 60 için --OH , --CH_3 ve beş üyeli siklik halka titreşimlerine, kolesterol için ise simetrik/asimetrik --CH_3 ile asetil/ vinil gruplarına ait karakteristik bantlar belirlenmiştir. Bu bulgular, niozomal membran yapısının korunduğunu ve ilaç- yüzey aktif madde etkileşimlerinin fiziksel düzeyde gerçekleştiğini göstermektedir (Khan ve diğerleri, 2015).

Morteza- Semnani ve diğerleri (2022), terbinafin HCl (TER) içeren niozom formülasyonlarını ATR-FTIR spektroskopisi ile karakterize etmiştir. Çalışmada saf TER, kolesterol, Span 20, poloksamer 188 ile terbinafine 2 ve 3 formülasyonlarının spektrumları karşılaştırılmıştır. Saf TER’de $3041\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ ($\text{sp}^2\text{ C-H}$ gerilmesi), 1515 cm^{-1} (C=C gerilmesi) ve 1262 cm^{-1} (C-N gerilmesi) karakteristik pikleri belirlenmiş, yardımcı maddelerin de kendilerine özgü bantları kaydedilmiştir. ATR- FTIR analizleri, seçilen formülasyonlarda TER ile yardımcı maddeler arasında herhangi bir kimyasal etkileşim olmadığını göstermiştir. Nitekim TER’in karakteristik pikleri, terbinafine 2 ve 3 formülasyonlarında kayma göstermeksizin korunmuştur. Bu bulgu, TER’in niozom yapısı içinde bütünlüğünü koruduğunu ve biyolojik aktivitesini sürdürebilecek durumda olduğunu ortaya koymaktadır.

Kolesterolün biyomembran içerisindeki konumlanışı, amfipatik doğası ile açıklanmaktadır. Molekülün hidroksil (OH) grubu, polar karakterinden ötürü fosfolipitlerin fosfat baş gruplarına yönelmekte; bu konumlanma, hidrofilik etkileşimlere ve olası hidrojen bağı oluşumuna zemin hazırlamaktadır. FTIR spektroskopisi verileri, $3300\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde gözlenen geniş bandın, OH grubu ile fosfolipitlerin karbonil (C=O) grupları arasında zayıf hidrojen bağlarının varlığına işaret ettiğini göstermektedir. Kolesterolün merkezi steroid halkaları tamamen hidrofobik yapıda olup membran lipid zincirleri ile Van der Waals etkileşimleri gerçekleştirmekte, hidrokarbon kuyruğu ise fosfolipit kuyruklarıyla hidrofobik etkileşimler kurarak membranın yapısal stabilitesine katkı sağlamaktadır. Bu etkileşimler, lipid çift

tabakasının düzenlenmesinde ve vezikül sistemlerinin uzun süreli kararlılığında kritik rol oynamaktadır (Khan ve diğerleri, 2015).

Barot, Prajapati, Vadgama, Narkhede ve Luhar (2025), proniozomal jel formülasyonlarını koaservasyon- faz ayrışması yöntemi kullanarak hazırlamışlardır. Bu yöntemde Span 60, kolesterol, soya lesitini ve krisaborol (crisaborole) az miktarda etanol içinde çözülmüş, su banyosunda ısıtılarak yüzey aktif maddenin tamamen çözülmesi sağlanmıştır. Fosfat tamponlu tuzlu su (pH 7,4) eklenip tekrar ısıtıldığında berrak bir çözünürlük elde edilmiş ve karanlıkta bir gece bekletilerek proniozomal jel oluşumu sağlanmıştır. Yüzey aktif madde, alkol ve su fazının nispi oranları, jel oluşumunu dispersiyon yerine yönlendiren kritik parametreler olarak belirtilmiştir.

Krisaborolün FTIR karakterizasyonu, molekülün fonksiyonel gruplarının proniozomal jel içinde korunduğunu göstermişlerdir. C–H gerilme ve bükülme pikleri sırasıyla 2859,10 ve 1444,36 cm^{-1} 'de saptanmış olup, referans aralıkları olan 3000- 2850 cm^{-1} ve 1450- 1375 cm^{-1} ile uyumluluk bulunmuştur. C≡N gerilme pikinin 2256,57 cm^{-1} 'de belirlendiği ve referans aralığı olan 2260- 2240 cm^{-1} ile tutarlılık gösterdiği bildirilmiştir. O–H gerilme 3237,61 cm^{-1} 'de, C=C gerilme 1612,55 cm^{-1} 'de ve C–O gerilme 1295,32 cm^{-1} 'de gözlenmiş olup, sırasıyla 3400- 3200 cm^{-1} , 1600- 1475 cm^{-1} ve 1350- 1000 cm^{-1} referans aralıklarıyla uyumlu bulunmuştur. Bu veriler krisaborolün proniozomal jel sistemi içerisinde yapısal bütünlüğünü koruduğunu ve formülasyonun kimyasal olarak stabil olduğunu doğrulamışlardır. Sonuç olarak, proniozomal jel sistemlerinin ilacı etkin biçimde enkapsüle ettiği ve moleküler yapıyı bozulmadan muhafaza edebildiği bildirilmiştir (Barot ve diğerleri, 2025).

FTIR spektrum analizinde, Span 60'ın karakteristik bantları gözlenmiştir: 1125 cm^{-1} 'de C–O gerilme, 2800–3000 cm^{-1} arasında C–H gerilme ve 3452 cm^{-1} 'de O–H gerilme bantları tespit edilmiştir (Mirzaie ve diğerleri, 2020).

Zeytin yaprağı ekstraktı tozu, karboksilik (–COOH) ve ester (–COOCH₃) gruplarındaki karbonil bağlarının (C=O) gerilme titreşimlerini 1639,99–1615,80 cm^{-1} aralığında göstermektedir. Ayrıca dimerleşmiş hidroksil grupları (–O–H–) 3284,41–3294,14 cm^{-1} , basit hidroksil bağları (R–CH₂–O–H veya Ar–O–H) ise 3405,41–3671,53 cm^{-1} aralığında gözlenmiştir. Optimum ve kontrol nanokapsüllerde ise C=O gerilme titreşimleri 1735,75–

1660,06 cm^{-1} , dimerleşmiş hidroksil grupları 3275–3366 cm^{-1} , basit hidroksil bağları 3.403–3662 cm^{-1} aralıklarında kaydedilmiştir. Ayrıca 2918–2919 cm^{-1} aralığında, metil ($-\text{CH}_3$) ve metilen ($-\text{CH}_2$) gruplarına ait C–H titreşimleri gözlenmiş olup, bu bantlar dimerleşmiş hidroksil gruplarına bağlı karboksil ($-\text{COO}-\text{H}$) varlığını desteklemektedir. Bu veriler hem ekstraktın hem de nanokapsüllerin yapısal özelliklerinin detaylı olarak karakterize edilmesini sağlamaktadır (Soleimanifard, Sadeghi Mahoonak, Sepahvand, Heydari ve Farhadi, 2019).

2.6.4.6. Termal özellikler ve faz geçişleri

Yüzey aktif maddenin faz geçiş sıcaklığı (T_m), proniozom oluşumunda kritik bir parametre olarak değerlendirilmektedir. T_m , moleküllerin katı- jel (solid- gel) fazından sıvı kristal faza geçtiği sıcaklığı ifade etmekte olup, membran akışkanlığı ve esnekliği üzerinde doğrudan etkili olmaktadır; bu durum niozomların stabilitesini ve formülasyon verimliliğini belirlemektedir (Debnath ve Kumar, 2015).

Faz geçiş sıcaklığı genellikle diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) ile belirlenmektedir; örnek kontrollü şekilde ısıtıldığında, faz geçişi sırasında açığa çıkan veya emilen ısı endotermik pik olarak kaydedilmekte ve bu pik sıcaklığı T_m olarak alınmaktadır (Moammeri ve diğerleri, 2023). Bunun yanı sıra polarize ışık mikroskobu (PLM) ile kristalin yapıların erime ve yeniden düzenlenme davranışı gözlemlenebilmekte; Raman veya FTIR spektroskopisi ile lipid zincirlerinin konformasyon değişiklikleri takip edilerek destekleyici bilgiler elde edilmektedir (Damera ve Nag, 2021).

Ayrıca, yüzey aktif maddenin zincir uzunluğu, doyumluk durumu ve baş grup tipi gibi yapısal özellikler kullanılarak literatür verilerinden teorik tahminler yapılabilen; bu nedenle T_m , proniozomal sistemlerin tasarımı ve stabilitesinin öngörülmesinde temel bir referans noktası olarak değerlendirilmektedir (Damera ve Nag, 2021).

Sonuç olarak, yüzey aktif maddelerin faz geçiş sıcaklıkları, niozomların fizikokimyasal özelliklerini ve biyolojik performansını doğrudan etkileyen kritik bir parametre olarak önem arz etmektedir. Bu nedenle, proniozomal sistemlerin tasarımında bu sıcaklıkların dikkate alınması, hedeflenen performansın sağlanması açısından gerekmektedir (Moammeri ve diğerleri, 2023; Damera ve Nag, 2021).

Hidroksitirozol, yüksek sıcaklıklara maruz kaldığında oksidatif degradasyona ve yapısal parçalanmaya yatkınlık göstermektedir. Özellikle doğrudan alev ile temas eden cam yüzeylerinde sıcaklığın lokal olarak 200 °C'nin üzerine çıkması, bileşiğin bozunma kinetiğini hızlandırmakta ve kayıpları artırmaktadır. Buna karşılık, kaynar su banyosu ile gerçekleştirilen kontrollü ısıtma koşullarında sıcaklık yaklaşık 100 °C'de homojen biçimde dağılmakta, böylece hidroksitirozolün moleküler bütünlüğü korunmakta ve geri kazanım verimi yükselmektedir . Bu durum, hidroksitirozolün ekstraksiyon ve işleme süreçlerinde sıcaklık ve ısıtma yöntemine karşı yüksek duyarlılık gösterdiğini ve ısıl stabilitenin verimlilik açısından kritik bir rol oynadığını ortaya koymaktadır (Papageorgiou ve diğerleri, 2022).

2.6.4.7. Kristal yapı ve düzenlilik

Liyotropik sıvı kristal faz, maddenin kristal katı hâli ile izotropik sıvı hali arasında yer alan ara bir faz olarak tanımlanmaktadır. Bu özel faz, kristallerin yapısal düzenliliğini kısmen korumakta, aynı zamanda sıvıların akışkan özelliklerini göstermektedir. Dolayısıyla, bir yandan yönlendirilmiş moleküler düzenin sağladığı anizotropik fiziksel özellikleri (örneğin, çift kırılma ve karakteristik X-ışını kırınım desenleri), diğer yandan ise sıvı hallerin akışkan davranışlarını bünyesinde barındırmaktadır. Liyotropik sıvı kristaller, çözücü varlığında ve belirli moleküler konsantrasyonlarda oluşmakta olup, bu süreçte yüzey aktif maddeler amfifilik yapılarından dolayı kendiliğinden düzenlenmektedir. Hidrofilik baş gruplar suya yönelirken, hidrofobik zincirler çözücünden uzaklaşarak enerjetik açıdan en kararlı düzeni oluşturmakta ve bu durum, kritik sıcaklık ve konsantrasyon koşullarında çeşitli faz tiplerine (misel, lameller, hekzagonal, kübik vb.) dönüşmektedir. Bu fazların oluşumu, moleküllerin kendi kendine organize olma eğiliminin (self-assembly) bir sonucu olarak değerlendirilmektedir (Jadhav, Pawar, Bachhav ve Ahire, 2016).

Farmasötik bilimler açısından bakıldığında, liyotropik sıvı kristal fazlar ilaç taşıma sistemlerinde önemli avantajlar sunmaktadır. Söz konusu fazlar, geniş yüzey alanı, amfifilik doğaları ve düzenli moleküler mimarileri sayesinde ilaçların çözünürlüğünü, stabilitesini ve biyoyararlanımını artırmaktadır. Proniozom ve niozom gibi sistemlerde bu fazlar, etkin bileşiklerin enkapsülasyonu ve kontrollü salımı için uygun bir mikro çevre oluşturmaktadır. Bu nedenle, liyotropik sıvı kristal fazların anlaşılması ve optimize edilmesi, trans dermal ve diğer akıllı ilaç taşıma yaklaşımlarının geliştirilmesinde kritik bir rol üstlenmektedir (Jadhav ve diğerleri, 2016).

Niozomlarda kristal yapı ve düzenlilik, kapsüllenen moleküllerin katı halde nasıl sıralandığını ve moleküller arasında geniş ölçekte tekrarlayan bir düzenin bulunup bulunmadığını göstermektedir. Kristal yapı, moleküllerin düzenli ve tekrarlayan bir üç boyutlu örgü oluşturmasıdır ve belirli erime noktalarına sahiptir. Bu durum, moleküller arasındaki güçlü ve düzenli etkileşimlerin varlığını göstermektedir. Amorf yapı ise moleküllerin düzensiz ve rastgele dağıldığı, uzun menzilli düzenliliğin bulunmadığı yapıyı tanımlamaktadır (Morakul ve Junyaprasert, 2020).

Niozomlarda kristal yapının belirlenmesi, ilacın çözünürlüğü, stabilitesi, salım kinetiği ve biyoyararlanımı açısından büyük önem taşımaktadır. Kristal yapıdaki ilaç, niozomlarda çözünürlük sorunlarına ve düzensiz salıma yol açabilirken, amorf yapıdaki ilaç daha homojen dağılım ve kontrollü salım sağlamaktadır. Bu nedenle, niozomal formülasyonlarda ilacın kristal veya amorf formda olup olmadığının belirlenmesi gerekmektedir (Khatoon ve diğerleri, 2017).

Bu amaçla sıklıkla diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC, differential scanning calorimetry) ve X-ışını kırınımı (XRD, X-ray diffraction) teknikleri kullanılmaktadır. DSC ile saf kristal ilaçta belirgin bir erime piki gözlenirken, niozom formülasyonunda bu pik kaybolursa ilacın amorf hale geldiği anlaşılmaktadır. XRD analizinde ise kristal yapı keskin difraksiyon pikleri ile karakterize edilirken, amorf yapı geniş ve düşük yoğunluklu pikler göstermektedir. Bu analizler, niozomlarda ilacın fiziko-kimyasal durumunu ve sistem içindeki dağılımını doğrulamaya yardımcı olmakta ve proniozomal veya niozomal sistemlerin biyoyararlanım ile kontrollü salım potansiyelinin değerlendirilmesini mümkün kılmaktadır (Bukke ve diğerleri, 2024).

Yüzey aktif maddelerin lipid zincirleri, belirli bir sıcaklık aralığında katı-jel fazından sıvı-kristal faza geçiş göstermektedir. Bu geçiş sıcaklığı, ortalama faz geçiş sıcaklığı (T_m) olarak adlandırılmaktadır. $T < T_m$ olduğunda lipid zincirleri sert ve rijit olup, niozom oluşumu kinetik olarak yavaşlamakta veya verimsiz gerçekleşmektedir. $T \geq T_m$ olduğunda ise zincirler sıvı-kristal faza geçmekte, membran esnekliği ve şekil değiştirebilme kapasitesi artmakta ve lipid ile yüzey aktif moleküller enerji açısından düşük ve termodinamik olarak kararlı çift tabakalı niozom yapıları oluşturabilmektedir. Bu nedenle, T_m niozom formülasyonlarının tasarımında kritik bir parametre olarak değerlendirilmektedir (Londhe, Jadhav, Mulani, Gavade ve Kale, 2025).

Farmoudeh ve diğerlerinin (2020) çalışmasında, DSC ve XRD analizleri kullanılarak niozomal formülasyonlarda metilen mavisi (MB, methylene blue) ve yardımcı maddelerin kristal yapısı detaylı biçimde incelenmiştir. Çalışmada, Span 60 ve kolesterolün DSC taramalarında sırasıyla 52,399 °C ve 148,930 °C’de tek endotermik erime pikleri gözlenmiş; MB’nin DSC eğrisinde ise 133,963 °C’de endotermik ve 198,107 °C’de ekzotermik pikler tespit edilmiştir. Literatürde bildirildiği üzere, MB’nin beş farklı hidrat formu bulunduğu ve endotermik piklerin iki hidrat formunun katı hâl dönüşümüne, ekzotermik piklerin ise MB’nin termal olarak parçalanmasına karşılık geldiği ifade edilmiştir.

Ayrıca liyofilize edilmiş niozom tozu ile MB, Span 60 ve kolesterolün XRD spektrumları incelenmiş; saf MB tozu 5,88°, 11,28°, 25° ve 27°’de çok sayıda keskin pik göstermiş, Span 60 tek bir pikte (21,12°) ve kolesterol ise 5,12° ve 15,52°’de yoğun pikler sergilemiştir. Bu bulgular MB ve yardımcı maddelerin kristalin yapısını doğrulamakta ve formülasyona dahil edilmeden önceki katı hallerini göstermektedir (Farmoudeh ve diğerleri, 2020).

DSC çalışmaları, proniozomal sistemlerde ilacın kristal yapısının ve fiziksel durumunun değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Saf aktif bileşikler, tipik olarak belirgin endotermik erime pikleri göstererek kristalin yapıyı doğrulamaktadır. Örneğin, aseklofenak 155,15 °C’de ve lornoksikam 222,63 °C’de keskin erime pikleri sergileyerek kristal doğalarını ortaya koymaktadır. Ancak bu ilaçlar proniozomal formülasyonlarda enkapsüle edildiğinde, karakteristik endotermik pikler kaybolmakta ve ilaçlar amorf hâle gelmektedir (Madan, Ghuge ve Dua, 2016).

DSC verilerine göre, proniozomal formülasyonlarda taşıyıcılar (ör. glukoz, maltodekstrin, manitol, Lutrol F68) ile etkileşim sonucu ilacın erime noktası düşmekte ve kristal yapı tamamen amorf formata dönüşmektedir. Bu dönüşüm, ilacın çözünürlüğünü artırmakta, salım kinetiğini kontrol etmeyi kolaylaştırmakta ve biyoyararlanımı iyileştirmektedir. Benzer şekilde, metilen mavisi gibi moleküller de niozomal veya proniozomal sistemlere enkapsüle edildiğinde DSC piklerinin kaybolmasıyla amorf yapıya geçmektedir (Madan ve diğerleri, 2016)

2.6.4.8. Yüzey morfolojisi ve topografi

Nanopartiküllerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi, malzeme bilimi ve nanoteknoloji çalışmalarında kritik bir adım olarak değerlendirilmektedir. Taramalı elektron mikroskobu

(SEM), partiküllerin yüzey morfolojisini ve gerçek geometrik boyutlarını yüksek çözünürlükte ortaya koymak için kullanılmakta, transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ise alt yapısal detayların ve nano-ölçekli parçacıkların doğrulanmasını sağlamaktadır. Literatürde, altıgen yapılı $Zn_{0,94}Mn_{0,06}O$ nanopartiküllerinde SEM ve TEM görüntülerinin, 2- 6 μm çap aralığındaki altıgenlerin varlığını ve yüzeydeki 100 nm altı nanopartikülleri doğruladığı bildirilmektedir. Bu teknikler, partikül şekli, hiyerarşik yapı ve yüzey topografyası hakkında ayrıntılı bilgi sağlayarak, nano materyallerin fonksiyonel özelliklerinin anlaşılmasına katkı sunmaktadır (Shahbazkhany, Salehi, Mousavi-Kamazani ve Salarvand, 2022).

SEM, yüksek enerjili bir elektron demetinin numune yüzeyine odaklanması ve elektronların numune ile etkileşime girmesi prensibine dayanmaktadır. Bu etkileşim sonucunda, farklı türde sinyaller (örneğin ikincil elektronlar, geri saçılan elektronlar ve karakteristik X-ışınları) üretilmektedir. Bu sinyaller, numunenin yüzey morfolojisi, bileşimi ve kristal yapısı hakkında bilgi sağlamaktadır (Mohammed ve Abdullah, 2018).

SEM görüntülemesi esas olarak ikincil elektronların tespiti üzerine kurulmakta olup, bu elektronlar düşük enerjili olmaları nedeniyle yüzey topografyası hakkında yüksek çözünürlüklü bilgi vermektedir. Geri saçılan elektronlar, atom numarasına duyarlı kontrast sağlayarak numunedeki farklı elementlerin ayrımını mümkün kılmaktadır. Ayrıca, etkileşim bölgesinde yayılan karakteristik X-ışınları, enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDS/ EDX) ile elementel bileşim analizine imkan tanımaktadır (Amaral ve diğerleri, 2025).

Kuramsal olarak SEM'in çözünürlüğü, elektron dalga boyu ve elektron-optik sistemin kalitesi ile sınırlanmaktadır. Yüksek hızda (tipik olarak 0,5- 30 kV aralığında) hızlandırılan elektronlar, elektromanyetik mercekle yardımcıyla odaklanmakta ve vakum altında numune üzerine yönlendirilmektedir. Numuneden yayılan sinyaller, dedektörler tarafından algılanmakta ve sinyal şiddetleri, görüntünün her pikseline karşılık gelecek şekilde tarayıcı sistem aracılığıyla dijital hale getirilmektedir (Mota ve diğerleri, 2025). Bu kuramsal temel sayesinde SEM, nanometre ölçeğinde çözünürlük sağlamakla böylelikle nanopartiküllerin morfolojisi, boyut dağılımı ve agregasyon özelliklerinin ayrıntılı bir biçimde incelenmesine imkan tanımaktadır (Nande ve diğerleri, 2025).

Atomik kuvvet mikroskobu (AFM, atomic force microscope), örnek yüzeylerinin nanometrik düzeyde topografik özelliklerini yüksek çözünürlükte incelemekte kullanılan bir taramalı prob mikroskobudur. Bu yöntemde, uç ile örnek arasındaki etkileşimler ölçülerek yüzey morfolojisi üç boyutlu (3B) olarak görselleştirilmekte ve hem yükseklik hem de yüzey pürüzlülüğü hakkında bilgi sağlanmaktadır. AFM, optik mikroskopiye kıyasla yaklaşık 1000 kat daha yüksek çözünürlük sunmakta ve örnek yüzeyinin 3B görüntüsünü oluşturabilmektedir. AFM, ortam basıncında çalışan bir görüntüleme tekniğidir ve tek bir taramada yaklaşık 1 nm ile 8 µm arasındaki çok geniş bir parçacık boyutu aralığını karakterize edebilmektedir (Gupta, Rai, Verma ve Gautam, 2024).

AFM’de, uç ile örnek arasındaki kuvvetleri ölçmek için bir tür yay görevi gören esnek bir kantilever kullanılmaktadır; bu kantileverin ucunda yer alan elmas uçlu prob, standart silikon veya silikon nitrür uçlara kıyasla daha yüksek sertlik ve dayanıklılık sağlamaktadır. Niozomlar genellikle cam veya mika substrat üzerine yerleştirilmekte ve bu yüzey ile niozomlar arasında elektrostatik çekim, hidrojen bağları veya Van der Waals kuvvetleri gibi etkileşimler oluşabilmektedir. Bu etkileşimler, veziküllerin yüzeye yapışmasına, hafif deformasyon göstermesine veya birbirleriyle birleşmesine (füzyon) neden olabilmektedir (Bukke ve diğerleri, 2024).

AFM, nondestrüktif bir teknik olarak, örnek üzerinde zarar oluşturmadan yüksek çözünürlüklü morfolojik bilgi elde edilmesini sağlamaktadır. Bu özellik, uygulanan kuvvetin kontrollü olmasına, probun temassız veya minimum temas modlarında kullanılmasına ve örneklerin özel kimyasal işlem görmeden incelenmesine bağlıdır. AFM görüntüleri, vezikül boyutu, şekli ve yüzey topografisindeki değişimler üzerinden bu etkileşimleri dolaylı olarak ortaya koymakta ve nanosistemlerin mekanik stabilitesi, membran bütünlüğü ile substrat ile olan etkileşimleri hakkında önemli bilgiler sunmaktadır (Chicea, 2010).

Niozomların morfolojik karakterizasyonu, atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile gerçekleştirilen yüksek çözünürlüklü yüzey görüntüleme yöntemleriyle yapılmaktadır. AFM, numunenin üç boyutlu topografisini belirleyebilme özelliği sayesinde, niozom boyutu, şekli ve dağılımı hakkında doğrudan bilgi sağlamaktadır. Görüntüleme için, niozom örnekleri genellikle oda sıcaklığında ince bir mika tabakası veya temiz monokristalin silikon yüzeyi üzerine damlatılmakta ve kısmi dehidrasyon gerçekleşene kadar bekletilmektedir. Tarama işlemi

sırasında, prob ucunun numune ile etkileşimini kontrol etmek amacıyla farklı AFM modları kullanılmaktadır. Temassız mod, prob ile numune arasındaki temasın minimumda tutulmasını sağlayarak, yumuşak veziküllerin deformasyonunu önlemekte ve niozom yüksekliğinin doğru ölçülmesine imkân vermektedir. Öte yandan, vuruş (tapping) modda, prob ucunun numune yüzeyi ile periyodik teması, yüzey sürtünmesini ve uç konvolüsyon etkisini azaltmakta ve topografik bilginin doğruluğunu artırmaktadır. AFM ölçümleri sırasında prob özellikleri (Si veya özel kantileverler) ve tarama parametreleri (set point kuvveti, uzatma/çekme hızı, Z-uzunluğu) dikkatle seçilmekte, elde edilen görüntüler Gwyddion veya benzeri yazılımlar kullanılarak analiz edilmekte ve partiküllerin maksimum yüksekliği hesaplanmaktadır. Bu yöntemler, niozomların boyut, şekil ve dağılım özelliklerinin hassas bir şekilde incelenmesini mümkün kılmakta ve çeşitli formülasyonların karşılaştırmalı değerlendirmeleri için temel bir araç sunmaktadır (Chiani ve diğerleri, 2025; Rinaldi ve diğerleri, 2018; Rinaldi ve diğerleri, 2020).

2.6.5. Fonksiyonel ve biyolojik performans

2.6.5.1. Antioksidan aktivite

Oksidatif stres, serbest radikallerin hücre yapısına zarar vererek birçok kronik hastalığın patogenezinde kritik rol oynaması nedeniyle biyomedikal araştırmalarda giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Antioksidanların biyolojik sistemlerdeki önemi, serbest radikallerin yol açtığı oksidatif stresin birçok hastalığın patogenezinde kritik rol oynaması nedeniyle giderek artan bir şekilde araştırılmaktadır (Burton ve Inglood, 2015).

Proniozomların antioksidan taşıyıcı olarak kullanımı, son yıllarda biyomedikal araştırmalarda öne çıkmaktadır. Niozomlar, iyonik olmayan yüzey aktif maddeler ve lipidler kullanılarak hazırlanan, biyolojik olarak uyumlu veziküllerdir ve ilaç, vitamin veya antioksidan moleküllerin hedefe yönlendirilmesini ve kontrollü salımını sağlayabilmektedir (Uchegbu ve Vyas, 1998; Moghassemi ve Hadjizadeh, 2014). Son çalışmalar, niozomların sadece taşıyıcı rolü üstlenmekle kalmayıp, yüzeylerine kovalent olarak bağlanan fenolik bileşikler aracılığıyla kendiliğinden antioksidan aktivite gösterebileceğini ortaya koymaktadır (Abdelbary, Amin ve Zakaria, 2017; Shaker ve diğerleri, 2020).

DPPH ve ABTS gibi radikal süpürme testleri, proniozomal sistemlerin serbest radikalleri nötralize etme kapasitesini değerlendirmede yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir. Bu testler, yüzey fonksiyonelleştirme ile yüklenen aktif bileşenlerin antioksidan etkilerini karşılaştırmak için de önemli bir ölçüt sağlamaktadır.

Antioksidanların yağ-su emülsiyonlarındaki arayüzey birikimi, zincir uzunluğu ve yüzey aktif madde konsantrasyonuna bağlı olarak değişmekte olup, lipid oksidasyonunu doğrudan engellemekte olduğu gözlemlenmektedir. Enkapsülasyon, antioksidanların arayüzeyde doğru konumlanmasını desteklemekte ve fonksiyonel stabilite ile biyoyararlanımı artırmakta, proniozomların bu mekanizmayı daha etkin hâle getirdiği bildirilmektedir (Almedia ve diğerleri, 2016).

Antioksidan etkinlik, ortam pH'ı, sıcaklık ve konsantrasyondan etkilenmekte; düşük pH'ta ferrik iyon varlığında prooksidan, nötr pH'ta ise antioksidan etki göstermekte olduğu bilinmektedir (Paiva-Martins ve Gordon, 2002). Hidroksitirozol, aromatik halkasındaki hidroksil gruplarından H-atomu verilmesi yoluyla lipid radikallerini nötralize etmekte ve özellikle orto pozisyonun bu reaksiyon için yüksek reaktivite göstermektedir. Ayrıca hidroksitirozolün geçiş metali iyonlarını yakalama kapasitesi, ortam sıcaklığı, sürekli fazın pH'ı ve antioksidan konsantrasyonu gibi faktörlerden etkilenmekte olduğu rapor edilmektedir (Pazos, Alonso, Sanchez ve Medina, 2008; Paiva-Martins ve Gordon, 2002).

Hidroksitirozolün kovalent ve kovalent olmayan kompleksleri, antioksidan etkinliğin korunmasında kritik bir rol üstlenmektedir. Kovalent kompleksler, protein veya polisakkaritlerle güçlü kimyasal bağlar oluşturarak molekülün stabilitesini artırırken; kovalent olmayan kompleksler, hidrojen bağları, Van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimler aracılığıyla arayüzeyde uygun konumlanmayı sağlamaktadır. Bu durum, lipid radikalleriyle daha hızlı reaksiyon gerçekleşmesini destekleyerek biyoyararlanımı artırmaktadır (Monteiro ve diğerleri, 2021). Örneğin, Pham, Wang, Zisu ve Adhikari (2019) tarafından yapılan bir çalışmada, hidroksitirozol– keten tohumu proteini izolatu komplekslerinin emülsiyon sistemlerinde test edildiği ve 20 °C'de hidroperoksit oluşumunu %80 oranında engellediği; yalnızca protein içeren emülsiyonlarda ise bu oranın %18'de kaldığı bildirilmiştir. Bu etkinin, kompleksleşme sayesinde antioksidanın arayüzeyde daha etkin konumlanması ve moleküler

stabilitenin artmasıyla lipid radikallerinin oluşumunun daha etkili biçimde baskılanmasına bağlı olduğu belirtilmektedir.

Benzer şekilde, proniozomlar gibi taşıyıcı sistemlerde de antioksidan aktivitenin korunmasında aynı mekanizmanın geçerli olduğu kabul edilmektedir. Proniozomların antioksidan kapasitesi genellikle ABTS, DPPH, FRAP ve ORAC testleri ile değerlendirilmektedir. Bu yöntemler, kapsüllenen antioksidanların serbest radikallerle reaksiyon verme kapasitelerini belirlemenin yanı sıra, proniozomların yapısal özelliklerinin antioksidan kapasite üzerindeki etkilerini ortaya koymaktadır (Almedia ve diğerleri, 2016; Pham ve diğerleri, 2019).

Yapılan bir çalışmada, Tween 80 niozomlarının yüzeylerine galik asit (GA), ferulik asit (FR) ve kafeik asit (CF) kovalent olarak bağlanarak yeni bir nano-antioksidan ailesi geliştirilmiştir (Mazzotta, Orlando ve Muzzalupo, 2021). Öncelikle, boş ve kurkumin (CUR) yüklü veziküller, ince tabaka buharlaşma (thin-layer evaporation) tekniği ile hazırlanmış ve ardından fenolik asitlerle karbodiimid kimyası aracılığıyla fonksiyonelleştirilmiştir. SC50 değerleri (yarı maksimum radikal temizleme konsantrasyonu), fenolik asit ile fonksiyonelize edilmiş T80 ve CUR yüklü T80C niozomlarının 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ve 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikal temizleme testlerindeki etkinliğini göstermektedir (Rice-Evans, Miller ve Paganga, 1997; Kumar ve Pandey, 2013). T80- FR ve T80C- FR, DPPH için 0,041 μmol , ABTS için sırasıyla 0,014 ve 0,013 μmol SC50 değerleri göstermiştir. T80-GA, DPPH testinde 0,051 μmol ve ABTS testinde 0,014 μmol SC50 değeri ile, CUR yüklenmiş T80C-GA'nın (DPPH: 0,021 μmol ; ABTS: 0,0057 μmol) değerlerinden istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (* $p < 0,05$). T80-CF, DPPH ve ABTS testlerinde sırasıyla 0,087 ve 0,025 μmol SC50 değeri ile en düşük radikal temizleme kapasitesini göstermiş; CUR yüklenmiş T80C-CF'de ise SC50 değerleri DPPH için 0,047 μmol ve ABTS için 0,026 μmol olarak ölçülmüştür (Mazzotta ve diğerleri, 2021). Bu sonuçlar, CUR yüklemesinin bazı kombinasyonlarda sinerjik veya antagonistik etki yaratarak antioksidan kapasiteyi değiştirebildiğini ve yüzey fonksiyonelleştirmesinin antioksidan aktiviteyi artırmada kritik rol oynadığını ortaya koymaktadır (Mazzotta ve diğerleri, 2021).

2.6.5.2. Antimikrobiyal aktivite

Proniozomlarda antimikrobiyal aktivite testlerinin temel amacı, bu taşıyıcı sistemlerin serbest etken maddeye kıyasla etkinliğini ortaya koymaktır. Proniozomlar su ile temas ettiğinde

niozomlara dönüşmekte ve ilacı kontrollü bir şekilde salabilmektedir; bu sayede bakteriyel hücre zarını daha uzun süre etkileyerek daha güçlü veya kalıcı bir antibakteriyel aktivite göstermektedir. Bu nedenle, serbest ilaç ve proniozom yüklü formülasyonlar karşılaştırmalı olarak incelenmektedir. Ayrıca, Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin farklı hücre duvarı yapıları nedeniyle duyarlılıklarının değişmesi, testlerin farklı bakteri türlerine karşı etkinliği değerlendirmesinde önemli rol oynamaktadır. Elde edilen sonuçlar, kullanılan yüzey aktif madde türü, kolesterol oranı ve ilaç yükleme miktarı gibi formülasyon parametrelerinin optimizasyonuna katkı sağlamaktadır. Dolayısıyla antimikrobiyal aktivite testleri, proniozomların kontrollü salım avantajını ve potansiyel etki mekanizmalarını ortaya koyan temel bir değerlendirme yöntemi olarak işlev görmektedir (do Nascimento ve diğerleri, 2022).

Serbest ve niozomla enkapsüle edilmiş tobramisin, 0,125- 128 µg/mL aralığında çeşitli konsantrasyonlarda antibakteriyel aktivite açısından değerlendirilmiştir. Serbest tobramisin için MİK değerleri 2- 4 µg/mL arasında değişmiş olup, farklı direnç seviyelerine sahip suşların varlığını göstermektedir. Niozomla enkapsüle edilmiş tobramisin, serbest tobramisine kıyasla MİK değerlerinde anlamlı bir azalma sağlamış ve 4- 6 katlık bir iyileşme göstermiştir. (Hedayati Ch ve diğerleri, 2021).

Nanotaşıyıcı sistemler, antimikrobiyal ajanların etkinliğini artırmak ve yan etkilerini azaltmak amacıyla son yıllarda yoğun olarak araştırılmaktadır. Bu kapsamda, niozomlar özellikle antibiyotikler ve diğer antimikrobiyal bileşiklerin hedefe yönlendirilmesinde ön plana çıkmıştır. Çalışmalarda, kurkuminin niozomlarda %90 ve üzeri yüksek enkapsülasyon etkinliği ile yüklenebildiği, metal nanopartiküllerin ise %12- 20 verimlilik gösterdiği rapor edilmiştir. SEM analizleri, niozomların neredeyse küresel ve düzgün yüzeyli yapılar sergilediğini doğrulamaktadır. Salınım çalışmaları, kurkumin ve metal nanopartiküllerin niozomlardan 72 saat boyunca kontrollü şekilde salındığını göstermektedir; bu, çift lipid tabakası aracılığıyla uzun süreli ve sürdürülebilir bir antimikrobiyal etki sağlanabileceğini ortaya koymaktadır. Antibakteriyel testler, niozomla enkapsüle edilen formülasyonların *S. aureus* ve *P. aeruginosa* üzerinde serbest forma kıyasla daha yüksek öldürücülük gösterdiğini ve bakır nanopartikül içeren niozomların gümüş nanopartikül içerenlere göre daha etkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu bulgular, niozomal sistemlerin hem etkinliği artırma hem de 72 saat boyunca kontrollü salınım sağlama kapasitesi nedeniyle antimikrobiyal tedavilerde umut verici bir strateji olduğunu göstermektedir (Moammeri ve diğerleri, 2023).

Serbest ve niozomla enkapsüle edilmiş ilaçların farklı antibakteriyel etki desenleri, önceki çalışmalarda da bildirilmiştir. Bu çalışmalar, büyüme inhibisyonunun lag fazının uzaması, büyüme hızının azalması veya bakterilerin optik yoğunluğunun (OD) düşmesi ile gözlemlendiğini ve enkapsüle edilmiş ilaçların zaman içinde kademeli olarak salındığını göstermektedir. Bu durum, “daha yavaş ve uzun süreli” antibakteriyel etki desenini ortaya koymakta olup, veziküllerin bakterilerin yüzeyine yakın bölgede yüksek miktarda ilaç salarak konsantrasyon gradyanı oluşturması ve ilacın hücre içine girişini kolaylaştırması ile açıklanmaktadır. Kurkumin ve metal nanopartiküllerin niozomal formülasyonda birlikte kullanılması, yalnızca kurkuminin enkapsüle edildiği niozomlara kıyasla bakteriler üzerinde daha güçlü bir inhibe edici etki göstermektedir; bu durum, iki bileşenin birlikte çalışarak sinerjik etki oluşturmaktan kaynaklanmaktadır (Targhi ve diğerleri, 2022).

Ayrıca, niozomal taşıyıcılar, gram-negatif *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde gram-pozitif bakterilere kıyasla daha etkili bulunmuştur. Bunun nedeni, gram-pozitif bakterilerin kalın bir hücre duvarına (20–80 nm) sahip olması, gram-negatif bakterilerin ise nispeten ince bir hücre duvarı (<10 nm) ve gözenekler ile eklentiler içeren bir dış membrana sahip olmasıdır. Hücre duvarındaki bu farklılıklar, antimikrobiyal ajanlara karşı bakterilerin duyarlılığı üzerinde önemli bir rol oynamaktadır (Barani ve diğerleri, 2023).

Literatürde, niozom ile enkapsüle edilmiş *Echinacea angustifolia* ekstraktının serbest ekstrakta kıyasla daha düşük MİK değerlerine sahip olduğu ve antibakteriyel etkinliğinin arttığı bildirilmektedir. Boş niozomların antibakteriyel aktivite göstermediği, dolayısıyla etkinliğin ekstraktın niozom içine yüklenmesine bağlı olduğu vurgulanmaktadır. Zaman- öldürme (time-kill) testleri, niozom ile enkapsüle edilmiş ekstraktın kısa sürede serbest ekstrakta benzer düzeyde büyümeyi inhibe ettiğini ve uzun inkübasyon sürelerinde daha yüksek inhibisyon sağladığını göstermektedir. Bu etkinliğin mekanizması, niozomların bakteri hücre membranı ile füzyona uğrayarak ekstraktın doğrudan salınımını kolaylaştırması ve hücre içine girişini desteklemesine bağlanmaktadır. Ayrıca, niozomların enkapsüle edilen ekstraktın stabilitesini artırdığı ve uzun süreli antimikrobiyal etkinlik sağladığı bildirilmiştir (Moghtaderi ve diğerleri, 2021).

2.6.5.3. Uçucu bileşiklerin belirlenmesi

Bitkisel ekstraktların uçucu bileşik karakterizasyonu, bu bileşenlerin biyolojik aktivitelerinin aydınlatılması ve olası farmasötik uygulamalarının belirlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda, katı faz mikro ekstraksiyon (SPME, solid phase microextraction) tekniği, uçucu bileşenlerin izolasyonu ve derişiminin artırılmasında yaygın olarak tercih edilen etkin bir yöntemdir. SPME, ek solvent kullanımına gerek duymaksızın uçucu ve yarı uçucu bileşenlerin doğrudan örnek üst boşluk (headspace) kısmından toplanmasına olanak tanımakta; aynı zamanda çevresel veya termal kaynaklı bozunmaları en aza indirerek analizin güvenilirliğini artırmaktadır (Pawliszyn, Pawliszyn ve Pawliszyn, 1997; Kataoka, Lord ve Pawliszyn, 2000).

Pistacia atlantica ekstraktının uçucu bileşenleri, öncelikle bitkisel materyalin toz haline getirilmesinin ardından ultrasonik sistemde belirli koşullar altında (50 °C, 30 dk) işlenmesiyle serbest bırakılmaktadır. Bu işlem sonrasında, uçucu bileşiklerin adsorpsiyonu için katı faz mikro ekstraksiyon (SPME) fiberi numunenin üst boşluk kısmına yerleştirilmektedir. Adsorbe edilen bileşenler, fiberin termal desorpsiyonu ile doğrudan gaz kromatografi-kütle spektrometresi (GC-MS) cihazına aktarılmakta ve nitel/nicel analizleri gerçekleştirilmektedir (Khan, Parveen, Chester, Parveen ve Ahmad, 2017).

GC-MS yöntemi ile uçucu bileşenlerin tanımlanması, alıkonma süresi (retention time, RT), kütle spektrumu ve doğrusal alıkonma indeksi (linear retention index, LRI) kullanılarak yapılmaktadır. RT, kolon ve deney koşullarına bağlı olarak her bileşiğin elüsyon süresini ifade etmekte, LRI ise RT'nin doğrusal olarak standart alkan serisi ile normalize edilmesini sağlayarak farklı koşullar altında karşılaştırma yapmaya olanak tanımaktadır (van den Dool ve Kratz, 1963). Bu sayede, bileşiklerin kimyasal yapısı ve konsantrasyonu güvenilir bir şekilde belirlenebilmekte ve literatürde bildirilen referans veriler ile karşılaştırılabilmektedir.

Bu yaklaşım, özellikle farmasötik ve gıda bilimlerinde, aktif bileşenlerin karakterizasyonu, kalite kontrol ve biyolojik aktivite çalışmalarının kuramsal temelini oluşturmaktadır. SPME-GC/MS yöntemi, solvent kullanımını minimize etmesi, örnek hazırlığının basitliği ve uçucu bileşenlerin bozulmadan analiz edilebilmesine imkân tanınması nedeniyle tercih edilmektedir.

2.6.6. Depolama ve stabilite

Her ne kadar niozomların genel olarak stabil olduğu düşünülse de yapılan çalışmalar ilaçların veziküllerden sızabildiğini ve *in vitro* ortamda difüzyon süreçlerine özgü eksponansiyel salım profili gösterdiğini ortaya koymaktadır. Tıpkı enkapsülasyon veriminde olduğu gibi, salım hızı da niozomun bileşimine ve hazırlanma yöntemine bağlı olarak değişmektedir (Abdelbary ve El-Gendy, 2008; Akbari ve diğerleri, 2015; Guinedi ve diğerleri, 2005).

Proniozomların stabilitesi, ilaç taşıyıcı sistem olarak etkin bir şekilde uygulanabilmeleri açısından kritik bir öneme sahiptir. Proniozom stabilitesini artırmaya yönelik teknikler, örneğin dondurarak kurutma (freeze- drying), liyofilizasyon veya stabilizatör maddelerin ilavesi, hazırlık sürecinde titizlikle göz önünde bulundurulmaktadır. Stabilite, özellikle taşımacılık, uzun süreli depolama ve proniozom ile kapsüllenmiş ilacın moleküler bütünlüğünün korunması açısından büyük önem taşımaktadır (Hooshier ve diğerleri, 2025).

Proniozomların stabilitesi genellikle ortalama vezikül boyutu, boyut dağılımı ve enkapsülasyon verimi belirlenerek, farklı sıcaklıklarda uzun süreli depolama koşullarında değerlendirilmektedir. Depolama süresi boyunca niozomlardan düzenli aralıklarla örnekler alınmakta ve niozomlar içinde tutulan ilacın oranı UV spektroskopisi veya HPLC teknikleri kullanılarak analiz edilmektedir (Kumavat ve diğerleri, 2021).

2.6.6.1. Depolama koşullarının etkileri

Proniozomların stabilitesi, depolama sıcaklığı, bağıl nem ve saklama süresi gibi çevresel koşullardan doğrudan etkilenmektedir. Farklı depolama koşulları, vezikül boyutu, yüzey yükü, enkapsülasyon verimi ve ilaç salım profili üzerinde değişikliklere yol açabilmektedir. Bu nedenle, proniozom formülasyonlarının güvenilir bir şekilde değerlendirilmesi için depolama koşullarının sistematik olarak incelenmesi gerekmektedir.

Hazırlanan proniozomların stabilitesinin değerlendirilmesi, farklı sıcaklık koşulları altında gerçekleştirilmektedir. Bu kapsamda, proniozomlar dondurma sıcaklığı ($2-8^{\circ}\text{C}$), oda sıcaklığı ($25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) ve yüksek sıcaklık ($45 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) koşullarında 1- 3 aylık sürelerle muhafaza edilmekte; belirli zaman aralıklarında ilaç içeriği ve ortalama vezikül çapındaki değişimler

sistematik olarak izlenmektedir. Bu yaklaşım, veziküllerin termal ve fizikokimyasal stabilitesinin anlaşılmasına olanak tanımaktadır (Gonzalez-Gonzalez ve diğerleri, 2022).

Buna ek olarak, hızlandırılmış tahmini stabilite (accelerated predictive stability, APS) yaklaşımı, ilaç ürünlerinin uzun dönem stabilitesini kısa sürede öngörmeyi amaçlayan yenilikçi bir yöntem olarak geliştirilmektedir. APS, geleneksel Uluslararası İnsan Kullanımına Yönelik İlaçlar için Teknik Gereksinimlerin Uyumlaştırılması Konseyi (The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) (ICH, 2025) stabilite testlerine kıyasla çok daha kısa bir sürede (genellikle 3- 4 hafta) uygulanabilmekte ve ekstrem sıcaklık ile bağıl nem koşullarının (40- 90 °C / %10- 90 RH, relative humidity) sistematik kombinasyonunu içermektedir. Bu yöntem, farmasötik formülasyonların termal ve nem duyarlılığını hızlı ve etkin bir şekilde belirlemeyi mümkün kılmakta ve ürün geliştirme sürecinde zaman ile kaynak tasarrufu sağlamaktadır (ICH, 2025).

Böylece hem geleneksel stabilite testleri hem de Hızlandırılmış Tahmini Stabilite (APS) çalışmaları, proniozom formülasyonlarının depolama ve uygulama koşullarındaki performansını güvenilir bir şekilde öngörmeye tamamlayıcı ve kritik araçlar olarak önem kazanmaktadır. Bu yaklaşımlar, proniozomların endüstriyel üretim ve klinik uygulamalarda etkin ve güvenilir ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılabilirliğini desteklemektedir (ICH, 2025).

2.6.6.2. Depolama boyunca fizikokimyasal değişimler

Depolama süresi boyunca proniozomlarda gözlenen fizikokimyasal değişimler, vezikül yapısında bozulmalar, ilaç sızıntısı ve partikül boyutundaki artışlarla kendini göstermektedir. Bu değişimler, proniozomların farmasötik performansını ve terapötik etkinliğini etkileyebilmekte ve stabilite testleri, formülasyonun uzun dönem güvenilirliğini değerlendirmede kritik bir araç olarak kullanılmaktadır (Arjin ve Anjum, 2022).

Ayrıca, depolama sırasında partikül boyutu, polidispersidite indeksi (PDI), zeta potansiyeli, enkapsülasyon verimi ve yüzey morfolojisi gibi parametrelerde meydana gelen değişimlerin sistematik olarak izlenmesi, proniozom formülasyonlarının uzun süreli etkinliği ve kontrollü salım kapasitesinin korunması açısından önem arz etmektedir (Gurrapu, Jukanti, Bobbala, Kanuganti ve Jeevana, 2012).

Optimum siprofloksasin yüklü niozomal formülasyonun fiziksel stabilitesi, vezikül partikül boyutu, polidispersidite indeksi (PDI) ve depolama öncesi ile sonrası kalan ilaç miktarı ölçülerek değerlendirilmiştir. Örnekler, bu amaçla buzdolabı (4 ± 2 °C) ve oda sıcaklığında (25 ± 2 °C) iki ay boyunca saklanmıştır. Ortalama çap ve PDI değişimleri incelendiğinde, bu değişimlerin 4 ± 2 °C’de daha yavaş gerçekleştiği görülmektedir. Niozomal formülasyonda kalan ilaç miktarı, her iki koşulda da enkapsüle edilmiş siprofloksasinin başlangıç miktarının %20’sinden daha az bir kısmının sızdığını göstermektedir. Sıcaklıklar karşılaştırıldığında, 4 ± 2 °C’de depolanan örneğin stabilitesinin 25 ± 2 °C’de depolanan örneğe göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durum, daha düşük sıcaklıklarda niozomun hidrofobik kısmının daha rijit olması ile ilişkilendirilmektedir (Mirzaei ve diğerleri, 2020).

Literatürde proniozomların ilaç ve biyoaktif bileşik taşıyıcı olarak kullanımı üzerine çeşitli çalışmalar bulunmasına karşın, fenolik bileşiklerin proniozomal sistemlere enkapsülasyonu ve bu sistemlerin uzun süreli stabilitesi ile biyolojik işlevselliğinin birlikte değerlendirilmesi sınırlı kalmıştır. Özellikle depolama süresince enkapsülasyon etkinliği, partikül boyutu, polidispersidite indeksi (PDI), renk değişimi, antioksidan kapasite ve antimikrobiyal aktivite gibi parametrelerin sistematik olarak incelendiği çalışmalara nadiren rastlanmaktadır. Bunun yanı sıra, elde edilen sonuçların çok boyutlu istatistiksel yöntemlerle (ör. ANOVA, Tukey HSD) doğrulandığı kapsamlı araştırmalar da oldukça sınırlıdır.

Bu tez çalışması, hidroksitirozolce zenginleştirilmiş zeytin yaprağı sıvı ekstraktının proniozomal sistemlerde enkapsülasyonu sonrasında hem fizikokimyasal karakterizasyon (FTIR, DSC, XRD, GC-MS, SEM, AFM) hem de depolama stabilitesi ve biyolojik aktiviteler üzerinden değerlendirme yaparak literatürdeki bu boşluğu doldurmayı amaçlamaktadır. Böylece, proniozomların gıda bilimi ve biyoteknoloji alanında uzun dönemli, fonksiyonel ve biyolojik açıdan güvenilir taşıyıcı sistemler olarak kullanılabilirliğine ilişkin analitik bir bakış açısı geliştirilmiştir.

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyaller

Çalışmada, Akdeniz bölgesinde yetişen Gemlik çeşidi zeytinlerden (*Olea europaea* L.) Ekim 2022’de yerel bir üreticiden temin edilen yapraklar kullanılmıştır. Yapraklar analiz öncesinde temizlenip yıkanmış, nem içeriği %6’ya ulaşana kadar 40 °C’de (UF110; Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Almanya) 2 gün boyunca etüvde kurutulmuş ve laboratuvar değirmeni (IKA A 11) ile öğütülmüştür. Öğütülen örnekler, ekstraksiyon öncesi 4 °C’de muhafaza edilmiş, alüminyum folyo ile paketlenerek fermentasyon sürecine kadar –18 °C’de saklanmıştır. Sıcaklık kontrolü buzdolabı-dondurucu termometreleri ile sağlanmıştır. Tüm örnekler, Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Gıda Mühendisliği Mikrobiyoloji Laboratuvarı’nda uygun koşullarda depolanmıştır.

Hidroksitirozol içeriği zenginleştirilmiş fermente zeytin yaprağı salamura ekstraktı, İlgez, Kelebek ve Kadiroğlu (2023) tarafından bildirilen optimizasyon çalışmasına dayanılarak hazırlanmıştır. Proniozomal formülasyonlarda kullanılan lipit ve yardımcı maddeler sorbitan monostearat (Span 60), kolesterol, dodekanol ve Tween 80 olup, tümü Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD) firmasından temin edilmiştir. Maltodekstrin ise 12,8 polimerizasyon derecesine (DP) sahip olup Sunar Mısır Şirketi’nden (Adana, Türkiye) temin edilmiştir.

3.1.1. Ön denemelerde kullanılan örnekler

Çalışmada, kurutulmuş zeytin yaprağı (KZY), fermente zeytin yapraklarının liyofilize ekstraktı (F_{yaprak} 14917) ve fermentasyon sıvısından elde edilen liyofilize ekstrakt (F_{siv1} 14917) örnekleri üzerinde çeşitli işlem adımları uygulanmış; böylece örnek sayısı artırılmış ve hidroksitirozol içeriğinin yükseltilmesi hedeflenmiştir. Bu ön işlemler, proniozom formülasyonlarında kullanılacak hammadde çeşitliliğini artırmak ve hidroksitirozol yükleme kapasitesini optimize etmek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmasında kullanılan örnekler ve elde edilme yöntemleri aşağıdaki şekilde tanımlanmıştır:

- **KZY:** Kurutulmuş zeytin yaprağı tozu,
- **ZYE:** Kurutulmuş zeytin yarağı tozunun klasik çözücü ekstraktı,
- **F_{yaprak} 14917:** *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 ile fermente edilen zeytin yaprağı ekstraktı,
- **F_{yaprak} UDE Ekstre:** Aynı suş ile fermente edilen zeytin yapraklarının ultrason destekli ekstraksiyon (UDE) yöntemi ile elde edilen ekstraktı,
- **F_{yaprak} Liyofilize:** Fermente edilen zeytin yapraklarının liyofilizasyonu sonucu elde edilen ekstrakt,
- **F_{sıvı} 14917:** Fermente edilen zeytin yaprağı numunesinden elde edilen sıvı fazı,
- **F_{sıvı} 14917 Liyofilize:** Sıvı fazın liyofilizasyonu ile elde edilen ekstraktı,
- **F_{sıvı} UDE Liyofilize:** Fermentasyon sonunda elde edilen sıvı fazın UDE yöntemi ile işlenip ardından liyofilize edilmesiyle elde edilen ekstraktıdır.

Proniozom formülasyonlarının etkin bir şekilde hazırlanabilmesi için, farklı zeytin yaprağı ekstraktları hammadde olarak kullanılmıştır. Bu örnekler kullanılarak proniozomların hazırlanması ve özelliklerinin incelenmesi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen morfolojik ve fiziksel veriler, çalışmaların sistematik olarak yürütülmesini sağlamış ve proniozomal tozlar, ön denemelerde temel ve referans materyal olarak değerlendirilmiştir.

3.1.1.1. Kurutulmuş zeytin yaprağı (KZY)

Zeytin yaprakları (*Olea europaea* L.), analiz öncesinde yüzeydeki olası partikül kontaminantlardan arındırılmak üzere yıkanmıştır. Ardından %6 hedef nem içeriğine ulaşana kadar, 40 °C’de kontrollü sıcaklık ve düşük basınç koşullarında çalışan vakum destekli etüv sisteminde (UF110, Memmert GmbH+Co. KG, Schwabach, Germany) iki gün süreyle kurutulmuştur. %6 nem seviyesi, fenolik bileşiklerin stabilitesi ve ekstraksiyon verimliliği açısından optimal değer olarak kabul edilmiştir (Karahalil ve diğerleri, 2017; Silva ve diğerleri, 2020). Kurutulmuş yapraklar, homojen bir partikül dağılımı elde edilmesi amacıyla laboratuvar tipi yüksek hızlı öğütücü (IKA-A11 basic, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany) ile toz haline getirilmiş ve hidroksitirozol miktarı analiz edilmiştir.

3.1.1.2. Zeytin yaprağı ekstraktı (ZYE)

Kurutularak stabil koşullarda saklanan zeytin yaprağı tozu örnekleri, hidroksitirozol içeriği zengin ekstrakt elde edilmesi amacıyla uygun çözücü sisteminde ekstraksiyon sürecine dahil

edilmiştir. Yaklaşık 50 g kurutulmuş yaprak, %70 (v/v) etanol–steril saf su karışımı içerisinde, manyetik karıştırıcı yardımıyla 25 °C’de 24 saat süreyle ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon işlemi sonunda elde edilen karışım, 4000 rpm’de 15 dakika santrifüjlenmiş ve ardından süzülerek süpernatant kısmı ayrılmıştır. Hidroksitirozol miktarı analiz edilmiştir.

3.1.1.3. Fermente zeytin yapraklarının liyofilize ekstraktı (FZYE)

Kurutulmuş zeytin yaprakları (*Olea europaea* L.), *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 14917 suşu kullanılarak İlğaz ve diğerleri (2023) tarafından bildirilen yöntem doğrultusunda kontrollü koşullarda fermente edilmiştir. Fermentasyon süresi sonunda elde edilen fermente zeytin yaprakları, ultrason destekli ekstraksiyon (UDE) yöntemi ile ekstrakte edilmiştir. Bu işlem için Branson Digital Sonifier SFX 250 (ABD) model ultrasonik cihaz kullanılmış; cihaz 250 W çıkış gücü ve 20 kHz ultrasonik frekans ile yapılandırılmıştır. Ultrasonik prob, numune içine yaklaşık 1,5 cm derinliğe daldırılmış ve ekstraksiyon işlemi kesikli (pulsed) modda, 5 saniye aktif/5 saniye pasif döngülerle uygulanmıştır. Ekstraksiyon süresince numune sıcaklığının kontrol altında tutulması amacıyla işlemler buz banyosu eşliğinde yürütülmüştür.

Ekstraksiyonun ardından elde edilen sıvı ekstraktlar, liyofilizasyon yöntemiyle kurutulmuştur. Bu işlem, CHRIST Alpha 1-4 LDplus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Germany) model cihaz ile gerçekleştirilmiş ve hidroksitirozol miktarı tayin edilmiştir.

3.1.1.4. Fermentasyon sıvısından elde edilen hidroksitirozol içeriği zenginleştirilmiş liyofilize ekstrakt (HZYE)

Kurutulmuş zeytin yaprakları (*Olea europaea* L.), *Lb. plantarum* ATCC 14917 suşu kullanılarak, İlğaz ve ekibinin (2023) yöntemi temel alınarak kontrollü koşullarda fermente edilmiştir. Fermentasyon sürecinin ardından, zeytin yaprağı süspansiyonunun sıvı fazı (süpernatant), hidroksitirozol açısından zengin bir ekstrakt olarak ultrason destekli ekstraksiyon (UDE) yöntemiyle elde edilmiştir. Bu çalışmada ultrason destekli ekstraksiyon için Branson Digital Sonifier SFX 250 (ABD) cihazı kullanılmıştır. Cihaz 250 W güç ve 20 kHz frekans ile çalıştırılmıştır. Ultrasonik prob, numunenin içine yaklaşık 1,5 cm derinliğe yerleştirilmiş ve ekstraksiyon kesikli (pulsed) modda, 5 saniye aktif ve 5 saniye pasif döngüler halinde gerçekleştirilmiştir. Numune sıcaklığının sabit tutulabilmesi için işlem sırasında buz banyosu kullanılmıştır. UDE işleminin ardından elde edilen ekstrakt çözünmeyen partiküllerden arındırılmış ve hidroksitirozol miktarı tayin edilmiştir.

3.1.2. Ekstrakt seçiminde uygulanan işlemler

3.1.2.1. Ekstrakt eldesi

Fermentasyon süreci için İlğaz ve diğerlerinin (2023) belirttiği yöntem uygulanmış ve *Lb. plantarum* ATCC 14917 suşu tercih edilmiştir. Bu suş, MRS sıvı besiyerinde 30 °C’de 18–24 saat süreyle inkübe edilerek aktif hale getirilmiş, ardından %40’lık gliserol çözeltisine transfer edilerek stok çözeltileri hazırlanmış ve -80 °C’de muhafaza edilmiştir. İnokulum hazırlık aşamasında, mikroorganizmaların tuzlu ortama adaptasyonunu sağlamak amacıyla %5 NaCl içeren modifiye MRS sıvı besiyeri kullanılmıştır. Kurutulmuş zeytin yaprakları (*Olea europaea* L.), %5 NaCl içeren tuzlu su çözeltisinde 1:10 (g/ml) oranında hazırlanmış ve *Lb. plantarum* ATCC 14917 suşu (%1 oranında, 10⁷ kob/ml) eklenerek fermentasyona bırakılmıştır. Fermentasyon işlemi, 30 °C sıcaklıkta çalışan çalkalayıcı inkübatör (Jeo Tech-IST4075) kullanılarak 21 gün boyunca yürütülmüştür. Bu süreçte belirli aralıklarla (1., 3., 5., 7. ve 21. günlerde) oleuropein degradasyon seviyesi ve biyodönüşüm sonucunda oluşan hidroksitirozol miktarı analiz edilmiştir. Hidroksitirozol seviyesinin ölçümü için HPLC yöntemi kullanılmıştır.

Hidroksitirozol miktarının en yüksek olduğu fermentasyon sıvısına ultrason destekli ekstraksiyon (UDE) işlemi uygulanmıştır. Ekstraksiyon süreci, %70 (v/v) etanol ilavesi ile Branson Digital Sonifier SFX 250 cihazı kullanılarak, 250 W çıkış gücü ve 20 kHz sabit

frekansta gerçekleştirilmiştir. Cihazın ultrasonik probu, numunenin içine yaklaşık 1,5 cm derinliğe yerleştirilmiş ve işlem kesikli modda (5 saniye aktif/5 saniye duraklama) toplamda 15 dakika süreyle uygulanmıştır. Ekstraksiyon sırasında numune sıcaklığı, buz banyosu kullanılarak hassasiyetle kontrol altında tutulmuştur. Elde edilen ekstrakt, bitkisel partiküllerden arındırılmak amacıyla Whatman No:1 filtre kağıdı ile vakum destekli filtrasyon işlemine tabi tutulmuştur. Filtrasyonun ardından sıvı ekstrakt, -80 °C’de ön dondurma işlemine alınmış ve daha sonra liyofilizasyon cihazında (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Germany) kurutularak toz formuna dönüştürülmüştür. Böylece hidroksitirozol yönünden zenginleştirilmiş liyofilize zeytin yaprağı ekstraktı elde edilmiştir.

3.1.2.2. Hidroksitirozol miktarının HPLC ile tayini

Hidroksitirozol miktarının belirlenmesi amacıyla kromatografik ayırma işlemi, ters faz C18 özellikli bir Kinetex kolon (5 µm, 100 Å, 250 mm × 4,6 mm; Phenomenex, Torrance, CA, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Mobil faz, asetonitril (çözücü A) ve 0,22 M fosforik asit içeren saf sudan (çözücü B) oluşturulan ikili sistemden meydana gelmiştir. Ayırma işlemi, doğrusal gradyan programı ile yürütülmüştür: %5– 10 A: 0– 30. dakika, %10– 15 A: 30– 35. dakika, %15– 30 A: 35– 70. dakika, %30– 90 A: 70– 100. dakika ve %100 A: 100– 120. dakika. akış hızı 0,4 mL/dk olarak belirlenmiş, numune enjeksiyonları arasında kolonu yeniden dengelemek amacıyla 20 dakikalık post-time süresi uygulanmıştır. Dedektör, hidroksitirozolün maksimum UV absorptans gösterdiği 280 nm dalga boyunda ayarlanmış ve numuneler herhangi bir ön işlem yapılmadan doğrudan HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, ABD) sistemine enjekte edilmiştir.

Kantitatif analiz, hidroksitirozol referans standartları kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi temelinde dış standart yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Hidroksitirozol konsantrasyonu, kalibrasyon eğrisinde referans standartların pik alanları ile örneklerin pik alanlarının karşılaştırılması esas alınarak belirlenmiştir. Sonuçlar, kuru ağırlık başına mg g⁻¹ olarak ifade edilmiş, tüm analizler üç tekerrürlü yürütülmüş ve veriler için standart sapmalar hesaplanmıştır.

Sonuçlar, kuru ağırlık başına mg g⁻¹ olarak ifade edilmiştir. Tüm veriler, üç tekerrürlü analizlerden elde edilmiş olup ortalama ± standart sapma (SS) şeklinde sunulmuştur. Elde edilen veriler, ayrıca kromatogram grafikler aracılığıyla görselleştirilmiştir.

3.2. Proniozomal Sistemler: Hazırlık ve Formülasyon Geliştirme

Proniozomal sistemin oluşturulması amacıyla belirli ve optimize edilmiş adımlar izlenmiştir. Sistem bileşenleri olan yüzey aktif maddeler, stabilizatörler ve yardımcı ajanlar uygun oranlarda karıştırılarak, taşıyıcının fizikokimyasal özelliklerini ve işlevselliğini en üst düzeye çıkaracak şekilde formüle edilmiştir.

Tez çalışmasında kullanılan proniozomal sistemin üretim ve dispersiyon tasarımı aşağıdaki şekilde uygulanmıştır:

Proniozom formülasyonu (P);

- Lipid faz: 100 mg Span 60 + 50 mg dodekanol
- Çözücü faz: 9,550 ml etanol ve 450 ml su
- Duvar matriksi: 1,2339 g maltodekstrin
- Biyoaktif bileşik: 200 mg hidrokситirozol içeriği zenginleştirilmiş fermente zeytin yaprağı ekstraktının liyofilizesi (HZYE)

Üretim yöntemi;

Proniozomal dispersiyon, bulamaç (slurry) yöntemi ile hazırlanmış ve rotary evaporatör kullanılarak çözücü uzaklaştırılmıştır; bu işlem sonucunda proniozom tozu elde edilmiştir. (Şekil 4.13).



Şekil 3.1. Proniozom üretimi

Evaporasyon parametreleri (rotavapor);

- Sıcaklık: 30 °C
- Rotasyon hızı: 50 rpm
- Süre: 3 dakika

Bu koşullar, veziküllerin homojen morfoloji ve optimal enkapsülasyon verimini desteklemiştir.

Hidrasyon: Proniozom tozu (0,003 g) 3 mL saf su ile karıştırılmış ve 65 °C su banyosunda 1 saat boyunca hidrasyon gerçekleştirilmiştir; bu aşama, proniozomların etkin şekilde niozom formuna dönüşmesini sağlamıştır.

Homojenizasyon ve boyut küçültme: Elde edilen dispersiyon, 20.000 rpm'de 10 dk süreyle ve 4 °C koşulunda ultrasantrifüj edilmiştir; böylece nano ölçekli ve homojen veziküller elde edilmiştir.

Proniozomlar, yüzey aktif maddeler (Span 60 veya Tween 80), stabilizatörler (kolesterol veya dodekanol), ve örneklerin uygun oranlarda karıştırılması ve maltodekstrin bazlı taşıyıcı matriksin homojenizasyonu ile bulamaç metodu kullanılarak hazırlanmıştır.

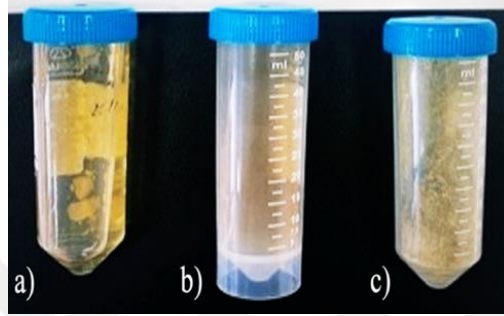
Elde edilen bulamaç, kontrollü sıcaklık ve uygun basınç altında tutularak proniozomal veziküllerin oluşumu desteklenmiştir. Veziküllerin fizikokimyasal özelliklerini iyileştirebilmek adına, hidrasyon süreleri ve sıcaklık gibi temel parametreler ayrıntılı bir şekilde değerlendirilmiş ve bu parametreler enkapsülasyon etkinliği (%), partikül boyutu, polidispersidite indeksi (PDI) ile zeta potansiyel analizleri ne bağlı olarak optimize edilmiştir.

3.2.1. Bileşen seçimi ve formülasyon geliştirme

Proniozomlar, uygun hidrasyon koşulları altında niozomal yapılara dönüşebilen, kuru ve serbest akışlı öncü taşıyıcı sistemlerdir. Bu sistemler, özellikle ısıya, ışığa ve oksidasyona karşı hassas biyoaktif bileşiklerin taşınmasında ve stabilizasyonunda avantaj sağlamaktadır. Yapısal olarak yüzey aktif maddeler, stabilizatörler (örneğin kolesterol veya dodekanol) ve taşıyıcı matriks (genellikle maltodekstrin) içeren bu sistemler, yüksek stabilite, artırılmış raf ömrü, kolay taşınabilirlik ve kontrollü salım potansiyeli gibi fonksiyonel özelliklere sahiptir. Bu bağlamda, yürütülen çalışmada proniozomal sistemler, hidroksitirozol açısından zenginleştirilmiş zeytin yaprağı ekstraktının taşıyıcı sistem içerisinde stabilize edilmesi, biyoyararlanımının artırılması ve dış etkenlere karşı korunması amacıyla geliştirilmiştir. Proniozomların hazırlanmasında bulamaç (slurry) yöntemi kullanılmıştır (Boddu, Choppari, Rapalli ve Badam, 2017; Pando, Matos, Gutierrez, Pazos, 2015; Shruthi, Pushpadass, Franklin,

Battula ve Naik, 2020; Thimmaraju ve Kurnool, 2020; Yuksel, Bayindir, Aksakal, Ozcelikay, 2016).

Formülasyonlarda kullanılan ekstraktlar Şekil 3.1’de gösterilmiş, farklı fermantasyon ve ekstraksiyon yöntemlerine göre hazırlanmış olup, analizlerde kullanılan örnekler aşağıda belirtildiği şekilde kodlanmıştır:



Şekil 3.2. Proniozomlarda kullanılan örnekler a) F_{sıvı} 14917: *Lb. plantarum* ATCC 14917 ile fermente edilen zeytin yaprağı numunesinden elde edilen sıvı faz, b) F_{yaprak} 14917: *Lb. plantarum* ATCC 14917 ile fermente edilen zeytin yaprağı ekstraktı, c) F_{yaprak} liyofilize: *Lb. plantarum* ATCC 14917 ile fermente edilen zeytin yapraklarının liyofilizasyonu sonucu elde edilen ekstrakt

Formülasyon sürecinde, çeşitli oranlarda (1:0,5 ve 1:1, w/w) yüzey aktif madde/stabilizatör (kolesterol veya dodekanol) içeren karışımlar, belirlenen ekstrakt örnekleriyle birlikte etanol içerisinde çözündürülmüştür. Bu çözeltiye taşıyıcı ajan olarak maltodekstrin ilave edilmiş; ardından karışım, vakum altında rotavapor yöntemiyle çözücüsünden arındırılmıştır. Böylece, kuru özellikte granüler yapıdaki proniozomal tozlar elde edilmiştir. Bu yöntemle toplam 40 farklı bileşen kombinasyonuna sahip maltodekstrin bazlı proniozomal taşıyıcı sistem üretimi gerçekleştirilmiştir. Hidroksitirozol içeriği yönünden zenginleştirilmiş ekstraktların kullanıldığı formülasyonlar, Tablo 3.1’de ayrıntılı olarak sunulmuştur.

Tablo 3.1. Proniozom toz formülasyonlarında kullanılan malzemeler ve miktarları

Örnek no	Molar Oran	Tween80 (g)	Kolesterol	Span60	Dodekanol	Maltodekstrin (g)	Etanol (ml)	Örnek	Örnek özelliği	Proniozom (g)
F1	(1:05)	0,0157	0,0093 g	-	-	1,2500	10	0,0120 g	KZY	-
F2	(1:05)	0,0157	0,0093 g	-	-	1,2500	10	0,0120 g	KZY	-
F3	(1:05)	0,0157	0,0093 g	-	-	1,2500	20	0,0120 g	KZY	-
F4	(1:05)	0,0157	0,0093 g	-	-	1,2500	20	-	-	1,7606
F5	(1:05)	-	-	0,1033 g	0,0894 g	0,9636	20	0,0096 g	KZY	0,1350
F6	(1:05)	-	-	0,1033 g	0,0894 g	0,9636	20	-	-	-
F7	(1:05)	-	-	0,1033 g	0,0894 g	0,9636	20	0,0096 g	KZY	-
F8	(1:1)	0,1834	0,0540 g	-	-	1,1870	20	0,0712 g	KZY	1,1599
F9	(1:1)	-	-	0,1722 g	0,0745 g	1,2339	20	0,0123 g	KZY	1,3248
F10	(1:1)	-	-	0,1722 g	0,0745 g	1,2339	20	0,0740 g	KZY	1,4365
F11	(1:1)	-	-	0,1722 g	0,0745 g	1,2339	20	-	-	-
F12	(1:1)	0,1834	0,0540 g	-	-	1,1870	20	-	-	-
F13	(1:1)	-	-	0,1722 g	0,0745 g	1,2339	20	-	-	-
F14	(1:1)	-	-	0,1722 g	0,0745 g	1,2339	20	0,0740 g	F _{Siv1} 14917	-
F15	(1:1)	-	-	0,1722 g	0,0745 g	1,2339	20	0,0740 g	F _{yaprak} liyofilize 14917	-
F16	(1:1)	-	-	0,1722 g	0,0745 g	1,2339	20	0,0740 g	F _{yaprak} liyofilize	-
F17	(1:1)	-	-	0,1722 g	0,0745 g	1,2339	20	0,0740 g	F _{yaprak} UDE ekstre	-
F18	(1:1)	-	-	0,1722 g	0,0745 g	1,2339	20	0,0740 g	F _{yaprak} liyofilize 14917	1,4000
F19	(1:1)	-	-	0,1722 g	0,0745 g	1,2339	20	0,0740 g	F _{Siv1} UDE liyofilize	1,7084
F20	(1:1)	-	-	0,1722 g	0,0745 g	1,2339	20	0,0740 g	UDE ekstre	1,4131
F21	(1:1)	-	-	-	-	1,1870	20	-	-	1,3754
F22	(1:1)	-	-	0,1722 g	0,0745 g	1,2339	20	0,0740	F _{Siv1} 14917	1,6965
F24	(1:1)	-	-	0,1722 g	0,0745 g	1,2339	20	0,0740	F _{yaprak} 14917	1,4232
F25	(1:05)	-	-	0,1033 g	0,0894 g	0,9636	20	0,0096	F _{Siv1} 14917	1,0598
F26	(1:05)	-	-	0,1033 g	0,0894 g	0,9636	20	0,0096	F _{yaprak} 14917	1,0686
F27	-	-	-	49,28 mg	44,23 mg	2	20	55 µl	F _{Siv1} 14917	-

Tablo 3.2. Proniozom toz formülasyonlarında kullanılan malzemeler ve miktarları(devamı)

Örnek no	Molar Oran	Tween80 (g)	Kolesterol	Span60	Dodekanol	Maltodekstrin (g)	Etanol (ml)	Örnek	Örnek özelliği	Proniozom (g)
F28	-	-	44,23 mg	49,28 mg	-	2	20	55 µl	FSıvı 14917	-
F29	-	-	-	49,28 mg	44,23 mg	2	20	-	-	-
F30	-	-	44,23 mg	49,28 mg	-	2	10	200 µl	FSıvı 14917	-
F31	-	-	44,23 mg	49,28 mg	-	2	10	100 µl	FSıvı UDE liyofilize	-
F32	(1:0,5)	-	-	49,28 mg	23 µl	2	10	100 µl	FSıvı UDE liyofilize	-
F33	-	-	44,23 mg	49,28 mg	-	2	10	250 mg	FSıvı 14917 liyofilize	-
F34	-	-	44,23 mg	49,28 mg	-	2	10	300 mg	FSıvı UDE liyofilize	-
F35	-	-	44,23 mg	49,28 mg	-	2	10	300 mg	FSıvı UDEliyoofilize	+
F36	-	-	44,23 mg	49,28 mg	-	2	10	250 mg	FSıvı UDE liyofilize	+
F37	-	-	44,23 mg	49,28 mg	-	2	10	200 mg	FSıvı UDE liyofilize	+
F38	-	-	44,23 mg	49,28 mg	-	2	10	150 mg	FSıvı UDE liyofilize	+
F39	-	-	44,23 mg	49,28 mg	-	2	10	100 mg	FSıvı UDE liyofilize	+
F40	-	-	44,23 mg	49,28 mg	-	2	10	50 mg	FSıvı UDE liyofilize	+
Kontrol	-	-	44,23 mg	49,28 mg	-	2	10	-	-	+

KZY, kurutulmuş zeytin yaprağı tozunu ifade etmektedir. FSıvı 14917, *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 suşu ile fermente edilen zeytin yaprağı numunesinden elde edilen sıvı fazdır. Fyaprak 14917, aynı suşla fermente edilmiş zeytin yaprağı ekstraktını belirtirken, Fyaprak UDE ekstre, bu fermente edilmiş yaprakların ultrason destekli ekstraksiyon (UDE) yöntemiyle elde edilen ekstraktıdır. Fyaprak liyofilize, fermente edilen zeytin yapraklarının liyofilizasyonu sonucunda elde edilen ekstraktı ifade etmektedir. FSıvı 14917 Liyofilize ise, fermente sıvı fazın liyofilizasyonu ile elde edilen ekstraktı temsil eder. Son olarak, FSıvı UDE liyofilize, *Lb. plantarum* ATCC 14917 suşu ile fermente edilen zeytin yapraklarının fermentasyon sonunda elde edilen sıvı fazının ultrason destekli ekstraksiyon (UDE) yöntemiyle işlenip, liyofilize edilmesiyle elde edilen ekstraktı göstermektedir.

Proniozomal toz hazırlama aşamasında, *Lb. plantarum* ATCC 14917 suşu ile fermente edilen zeytin yapraklarının fermentasyon sonunda elde edilen sıvı fazının liyofilizasyonu ile elde edilen ekstrakt temel materyal olarak kullanılmıştır. Üretim süreci; bulamaç formunun evaporasyon koşullarının optimize edilmesi, niozom eldesine yönelik hidrasyon ve santrifüj parametrelerini içeren çok aşamalı bir yöntem olarak uygulanmıştır. Her aşamada, fizikokimyasal stabilite ve enkapsülasyon etkinliği (%) dikkate alınarak optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş; elde edilen proniozomal taşıyıcıların yapısal bütünlüğü ve kararlılığı sistematik olarak değerlendirilmiştir.

3.2.2. Hidrasyon-santrifüj koşullarının optimize edilmesi

Proniozomal sistemlerin hazırlanmasında parametrelerin kontrolü, özellikle termal ve mekanik koşulların hassas yönetimi, ürün homojenliği ile fizikokimyasal stabilitenin sağlanması açısından temel bir rol oynamaktadır. Isıtma sırasında önceden belirlenmiş sıcaklık aralıklarına titizlikle uyulması, lipid matriksin yapısal bütünlüğünün korunmasına ve aktif bileşenin stabilitesinin artırılmasına olanak verir. Buna ek olarak, karıştırma hızı ve süresinin optimize edilmesi, partikül boyutu dağılımının daralmasına -yani partiküllerin boyutlarının birbirine daha yakın ve daha tutarlı hale gelmesine- polidispersidite indeks (PDI) değerinin azalmasına ve metodun tekrarlanabilirliğinin geliştirilmesine katkı sağlamaktadır. Bu parametrelerin sistematik ve kontrollü optimizasyonu, formülasyonun stabilitesinin korunması, partikül özelliklerinin hedeflenen sınırlar içinde tutulması ve biyoyararlanım ile hedefe yönelik taşıma performansının artırılması açısından büyük önem arz etmektedir (Yüksel ve diğerleri, 2016).

Enkapsülasyon etkinliğinin (%) doğru ve güvenilir şekilde hesaplanabilmesi için, veziküllerin serbest bileşenlerden etkili bir biçimde ayrılması büyük önem arz etmektedir. Bu ayırım genellikle yüksek hızlı santrifüjleme yöntemiyle sağlanmakta olup, kullanılan ultrasantrifüj koşulları; santrifüj rotor dönü hızı (örneğin 20,000- 100,000 rpm), süresi (30- 90 dakika) ve sıcaklığı (4- 25°C); elde edilen etkinlik değerlerini doğrudan etkileyebilmektedir (Han ve diğerleri, 2019). Yetersiz santrifüj kuvveti durumunda, veziküller tam olarak çökmeyerek serbest bileşenlerle net bir ayırım gerçekleştirilememekte; bu da enkapsülasyon etkinliğinin olduğundan yüksek hesaplanmasına yol açabilmektedir. Bunun nedeni, santrifüjleme yetersiz olduğunda veziküllerin bir kısmının süspansiyonda kalarak serbest madde ile birlikte ölçülmesi ve böylece serbest aktif madde miktarının eksik belirlenmesidir. Bu durum, toplam aktif

maddeden çıkarılan serbest madde miktarını düşük göstererek, enkapsüle edilen madde miktarının olduğundan fazla hesaplanmasına neden olmaktadır.

Öte yandan, aşırı yüksek rotor hızları veya uzun süreli santrifüjleme, özellikle termodinamik olarak kararsız ve düşük zeta potansiyeline sahip vezikül sistemlerinde vezikül yapısının bozulmasına veya içeriğin sızmasına neden olabilmekte ve etkinliğin olduğundan düşük ölçülmesine sebep olmaktadır (Mehn ve diğerleri, 2017). Ayrıca, santrifüj sırasında meydana gelebilecek ısı artışı, yüzey aktif maddelerin ve lipid zarlarının yapısal stabilitesini olumsuz etkileyerek taşıyıcı veziküllerin yapısal kararlılığını bozabilmektedir. Bu nedenle, optimal santrifüj parametrelerinin belirlenmesi için pilot çalışmalarla rotor hızı, süre ve sıcaklık gibi değişkenlerin sistemin fizikokimyasal özelliklerine göre hassas şekilde ayarlanması gerekmektedir. Böylece, enkapsülasyon etkinliği (%) hesaplamalarının güvenilirliği artırılarak, formülasyonun doğru değerlendirilmesi sağlanabilmektedir (Lohse ve diğerleri, 2008).

Proniozomların niozoma dönüşümü (hidrasyonu) için; 3 mg proniozom tozu, 3 mL saf su içerisinde disperse edilmiştir. Bu işlemler sırasında, proniozomlar 65 °C sıcaklıktaki su banyosunda bir saat boyunca hidrofilik yapıya dönüştürülerek niozomal süspansiyon formuna getirilmiştir. Bu formülasyonlarda, farklı hidrasyon koşulları (sıcaklık, basınç, devir hızı) uygulanarak vezikül oluşumu ile enkapsülasyon etkinliği detaylı bir şekilde incelenmiştir (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Proniozom oluşturma ve niozom elde etme koşulları

Örnek	Rpm	Basınç(mbar)	Sıcaklık (°C)	Süre(dk)	Ultrasontrifüj koşulları
F1	40	40	40	4 dk	9 000 rpm, 4°C, 45 dk
F2	40	40	40	2 dk	9 000 rpm, 4°C, 45 dk
F3	40	40	40	2 dk	9 000 rpm, 4°C, 45 dk
F4	40	40	40	2 dk	9 000 rpm, 4°C, 45 dk
F5	40	40	40	3 dk	9 000 rpm, 4°C, 45 dk
F6	40	40	40	3 dk	9 000 rpm, 4°C, 45 dk
F7	40	40	40	4 dk	9 000 rpm, 4°C, 45 dk
F8	40	40	40	4 dk	9 000 rpm, 4°C, 45 dk
F9	40	40	40	4 dk	9 000 rpm, 4°C, 45 dk
F10	40	40	40	3 dk	9 000 rpm, 4°C, 45 dk
F11	40	40	40	5 dk	9 000 rpm, 4°C, 45 dk
F12	40	40	40	4 dk	9 000 rpm, 4°C, 45 dk
F13	40	40	40	4 dk	9 000 rpm, 4°C, 45 dk
F14	40	40	40	2 dk	9 000 rpm, 4°C, 45 dk
F15	40	40	40	3 dk	9 000 rpm, 4°C, 45 dk
F16	40	40	40	4 dk	9 000 rpm, 4°C, 45 dk
F17	40	40	40	5 dk	9 000 rpm, 4°C, 45 dk
F18	40	40	40	4 dk	9 000 rpm, 4°C, 45 dk
F19	40	40	40	4 dk	9 000 rpm, 4°C, 45 dk
F20	40	40	40	4 dk	9 000 rpm, 4°C, 45 dk
F21	40	40	40	4 dk	9 000 rpm, 4°C, 45 dk
F22	40	40	40	5 dk	9 000 rpm, 4°C, 45 dk
F23	40	40	40	4 dk	9 000 rpm, 4°C, 45 dk
F24	40	40	40	4 dk	9 000 rpm, 4°C, 45 dk
F25	40	40	40	4 dk	9 000 rpm, 4°C, 45 dk
F26	40	40	40	4 dk	9 000 rpm, 4°C, 45 dk
F27	60	790	60	5 dk	9 000 rpm, 4°C, 45 dk
F28	60	790	60	5 dk	9 000 rpm, 4°C, 45 dk
F29	60	790	60	5 dk	9 000 rpm, 4°C, 45 dk
F30	60	790	60	5 dk	20 000 rpm, 4°C, 10 dk
F31	60	790	60	5 dk	30 000 rpm, 4°C, 10 dk
F32	60	790	60	5 dk	30 000 rpm, 4°C, 10 dk
F33	60	790	60	4 dk	25 000 rpm, 4°C, 30 dk
F34	60	70	60	4 dk	20 000 rpm, 4°C, 10 dk
F35	60	70	60	4 dk	20 000 rpm, 4°C, 10-30-45 dk
F36	60	70	60	4 dk	20 000 rpm, 4°C, 10-30-45 dk
F37	60	70	60	2 dk	20 000 rpm, 4°C, 10-30-45 dk
F38	60	70	60	2 dk	20 000 rpm, 4°C, 10-30-45 dk
F39	60	70	60	2 dk	20 000 rpm, 4°C, 10-30-45 dk
F40	60	70	60	2 dk	20 000 rpm, 4°C, 10-30-45 dk

Toplamda test edilen 40 formülasyon (F1- F40) arasından, proniozomal yapının toz formunda oluşturulabilme kabiliyeti ve fizikokimyasal stabilite kriterleri göz önünde bulundurularak en

uygun 6 formülasyon (F35, F36, F37, F38, F39 ve F40) seçilmiştir. Proniozom üretimi için kullanılan evaporasyon ve niozom üretimi için kullanılan ultrasantrifüj proseslerine ait parametreler bu formülasyonlar üzerinde denenmiştir.

İlgili formülasyonların hidrasyon süresini en düşük düzeyde tutmak amacıyla, diğer parametreler sabit bırakılarak yalnızca süre faktörü 10, 30 ve 45 dakika olarak değiştirilip test edilmiştir. Bu yaklaşım, niozomal süspansiyonların enkapsülasyon etkinliğini değerlendirmek için gereken en kısa uygulama süresinin optimize edilmesine olanak sağlanmıştır.

İnceleme kapsamında seçilmiş bu 6 farklı formülasyon (F35, F36, F37, F38, F39 ve F40) içeriğinde kolesterol yer almaktadır. Kolesterol içeren proniozom toz formülasyonu, genellikle belirli aktif bileşenlerin stabilitesini artırmak ve kontrollü salınım sağlamak amacıyla tasarlanmıştır (Zoghroban ve diğerleri, 2019). Bu formülasyonun içerik listesi, temel olarak emülsiyon oluşturma ve zar geçirgenliğini düzenleme özelliği taşıyan maddelerden oluşmaktadır. Çoğunlukla, kolesterol bu karışımın kritik bir parçası olup lipid tabakayı stabilize etmekte ve yapı fonksiyonlarını optimize etmektedir. Ayrıca, sürfaktanlar, yardımcı çözücüler ve diğer lipidler gibi bileşenler içerikte yer alabilmekte, formülasyonun kimyasal ve fiziksel bütünlüğünü korumaya yönelik önemli katkılar sağlamaktadır (Reddy ve Reddy, 2016). Uygulama alanına bağlı olarak bu içeriklerin oranları ve türleri değişkenlik gösterebilmektedir (Kaoud ve diğerleri, 2021).

3.2.3. Kolesterol içeren proniozomal formülasyonların hazırlanması

Kolesterol içeren proniozom formülasyonlarının bileşenleri, Tablo 3.3'te sunulduğu şekilde, Khudair ve diğerlerinin (2020) geliştirdiği formülasyon temel alınarak modifiye edilmiştir. Bu çalışmada, kolesterol kullanılarak oluşturulan lipid ve taşıyıcı fazın molar oranları (1:0,5, 1:1 ve 1:1,5) test edilmiştir. Kolesterol içeren proniozomal sistemler farklı ekstrakt miktarları ile formüle edilmiştir. Formülasyonlarda sabit miktarda kolesterol (44,23 mg) ve Span 60 (49,28 mg) yüzey aktif maddesi kullanılırken; ekstrakt miktarı 50- 300 mg aralığında değiştirilmiştir. Maltodekstrin taşıyıcı matriks olarak her formülasyonda 2 g olacak şekilde sabit tutulmuştur. Formülasyonların hazırlanmasında çözücü sistem olarak 10 mL %100 saflıkta etanol kullanılmıştır.

F35, F36, F37, F38, F39 ve F40 F35, F36, F37, F38, F39 ve F40 formülasyonları, içerdği ekstrakt miktarına bağlı olarak sırasıyla F₃₀₀, F₂₅₀, F₂₀₀, F₁₅₀, F₁₀₀, F₅₀ olarak yeniden adlandırılmıştır. Ekstrakt içermeyen örnek “kontrol” olarak isimlendirilmiştir (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Kolesterol içeren proniozom toz formülasyonunun bileşenleri

Örnek	Kolesterol	Span 60	Maltodekstrin (g)	Etanol (ml)	Ekstrakt(mg)
F ₃₀₀	44,23 mg	49,28 mg	2	10	300
F ₂₅₀	44,23 mg	49,28 mg	2	10	250
F ₂₀₀	44,23 mg	49,28 mg	2	10	200
F ₁₅₀	44,23 mg	49,28 mg	2	10	150
F ₁₀₀	44,23 mg	49,28 mg	2	10	100
F ₅₀	44,23 mg	49,28 mg	2	10	50
Kontrol	44,23 mg	49,28 mg	2	10	-

Bu seri formülasyonlar, farklı ekstrakt miktarlarının enkapsülasyon etkinliği, fiziksel özellikler ve stabilite üzerine etkisini araştırmak amacıyla tasarlanmıştır. Kontrol grubunda ekstrakt içermeyen sistem hazırlanarak baz yapının taşıyıcı özellikleri analiz edilmiştir. Her bir formülasyonun hazırlanmasında, Span 60 ve kolesterol etanol içerisinde çözülmüş; ardından maltodekstrin ve belirlenen miktarda ekstrakt eklenerek homojen karışım elde edilmiştir. Bu karışım, 60 rpm dönüş hızında, 70 mbar basınç altında, 60 ± 2 °C sıcaklıkta, belirlenen süre boyunca (2- 4 dakika) rotavapor kullanılarak proniozom tozu oluşturulmuştur.

Proniozom tozu üretimi işleminin ardından elde edilen karışım, oda sıcaklığında saf su ile hidrate edilmiştir. Hidrasyonun ardından, oluşan veziküler sistemlerin serbest ve enkapsüle bileşenlerini ayırmak amacıyla ultra santrifüjleme işlemi uygulanmıştır. Bu işlem, tüm örnekler için 20.000 rpm dönüş hızında, 4 °C sıcaklıkta ve genellikle 10 dakika sürmüştür. F₃₀₀ ve F₂₅₀ örneklerinde ise üç farklı süre (10, 30 ve 45 dakika) kullanılarak enkapsülasyon etkinliği üzerindeki zaman etkisi değerlendirilmiştir (Tablo 3.4).

Tablo 3.4. Proniozom üretimi için kullanılan evaporasyon ve niozom üretimi için kullanılan ultrasantrifüj proseslerine ait parametreler

Formülasyon	Evaporasyona ait işlem parametreleri				Ultrasantrifüje ait işlem parametreleri		
	Dönü hızı (rpm)	Basınç (mbar)	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Dönü hızı (rpm)	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
F ₃₀₀	60	70	60	4	20 000	4	10-30-45
F ₂₅₀	60	70	60	2	20 000	4	10-30-45
F ₂₀₀	60	70	60	4	20 000	4	10
F ₁₅₀	60	70	60	4	20 000	4	10
F ₁₀₀	60	70	60	2	20 000	4	10
F ₅₀	60	70	60	2	20 000	4	10
Kontrol	60	70	60	2	20 000	4	10

Hazırlanan süspansiyonlar, uygun konsantrasyonlarda seyreltilmiş ve enkapsülasyon etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla ölçümlere tabi tutulmuştur. Ölçüm verileri, ortalama değerler ve standart sapmalar ile sunulmuş; dağılım profilleri ve temsili grafiksel görünümeler üzerinden analiz edilmiştir.

3.2.4. Kolesterol yerine dodekanol kullanılarak formülasyonların hazırlanması

Bu çalışma kapsamında, kolesterol içeren sistemlerle karşılaştırma yapılabilmesini sağlamak amacıyla, alternatif bir yaklaşım olarak stabilizatör bileşeni olarak kolesterol yerine dodekanol kullanılan proniozomal formülasyonlar tasarlanmıştır ve geliştirilmiştir. Bu formülasyonlarda, sabit Span 60 miktarları kullanılmış ve stabilizatör olarak farklı oranlarda dodekanol ilave edilmiştir. Formülasyonlar ayrıca ekstrakt içeren ve içermeyen olarak ikiye ayrılmış ve her biri P harfi ile başlayan bir örnek koduyla (P1- P6) tanımlanmıştır. “P” harfi, “proniozom” kelimesini; numaralandırma ise kullanılan bileşen oranları ve içerik farklılıklarını temsil etmektedir. İlk üç formülasyon (P1, P2, P3) yalnızca etanol içeren çözücü sistem kullanılarak geliştirilmiştir. P1, S60 ve dodekanolün düşük miktarlarla yer aldığı bir ön deneme formülasyonu niteliğindedir. P2 ve P3 formülasyonlarında ise S60: dodekanol oranı 1:1 olacak şekilde, 10 mL etanol içinde çözündürülmüş, ardından maltodekstrin ve ekstrakt eklenmiştir. Bu karışımlar, rotavaporde 40 rpm hızında, 40 °C’de 4 dakika boyunca işlenmiş ve çözücü uzaklaştırılarak proniozom tozu oluşturulmuştur.

P4, P5, P6, P7, P8, P9 ve P10 numaralı formülasyonlar ise S60: dodekanol oranlarının farklılaştırıldığı (1:0,5 – 1:1,5) bir tasarımla hazırlanmıştır; bu örneklerde çözücü olarak etanol: su karışımı (9,550 mL etanol + 0,450 mL ultra saf su) kullanılmıştır.

Tablo 3.5'te P1–P10 formülasyonları için uygulanan evaporasyon koşulları, kullanılan rotasyon hızı, sıcaklık ve süre parametreleri verilmiştir. İlk seride (P1–P6), rotavaporda 40 rpm hızında ve 40 °C'de 4 dakika evaporasyon uygulanmış; ikinci seride (P7–P10) ise 40 rpm hızında ve 30 °C'de 5 dakika evaporasyon gerçekleştirilmiştir.

Dodekanol yerine kolesterol kullanımının hedeflendiği bu formülasyonlar, proniozomal sistemlerin fiziksel özellikleri, enkapsülasyon etkinliği ve taşıma performansı üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla tasarlanmıştır.

Proniozom tozlarının oluşmasının ardından elde edilen yapılar oda sıcaklığında saf su ile hidrate edilmiş; gerçekleşen hidrasyon sonrası oluşan veziküller santrifüj edilerek enkapsüle edilen bileşikler serbest bileşiklerden ayrılmıştır.

Tablo 3.5. Hazırlanan proniozomların formülasyonları

Örnek	S60	Dodekanol	Çözgen	Maltodekstrin	Ekstrakt
P1 (1:0,5)	49,28 mg	23 µl	10 mL Etanol	2 g	200 mg
P2 (1:1)	0,1722 g	0,745 g	10 mL Etanol	1,2339 g	200 mg
P3 (1:1)	0,1722 g	0,745 g	10 mL Etanol	1,2339 g	----
P4 (1:0,5)	100 mg	50 mg	9,550 mL etanol + 450 µL su	1,2339 g	200 mg
P5 (1:0,5)	100 mg	50 mg	9,550 mL etanol + 450 µL su	1,2339 g	200 mg
P6 (1:0,5)	100 mg	50 mg	9,550 mL etanol + 450 µL su	1,2339 g	----
P7 (1:1)	100 mg	100 mg	9,550 mL etanol + 450 µL su	1,2339 g	200 mg
P8 (1:1)	100 mg	100 mg	9,550 ml etanol + 450 µL su	1,2339 g	----
P9 (1:1,5)	100 mg	150 mg	9,550 ml etanol + 450 µL su	1,2339 g	200 mg
P10 (1:1,5)	100 mg	150 mg	9,550 ml etanol + 450 µL su	1,2339 g	----

P1, P2 ve P3 örneklerinin proniozom tozu oluşturma işlemleri, bileşen çözünürlüğü ve toz oluşum etkinliğinin artırılması amacıyla 40 °C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Ancak P4, P5 ve P6 formülasyonlarında, çözücü sistemine su fazı da dahil edilerek etanol/su karışımı kullanıldığından, buharlaşma hızı ve bileşen kararlılığı dikkate alınarak sıcaklık 30 °C'ye

düşürülmüştür (Tablo 3.6). Bu şekilde, sistemin aşırı ısınması ve uçucu bileşenlerin kaybı önlenmiş, daha kontrollü bir proniozom tozu oluşumu sağlanmıştır (Wehrle ve diğerleri, 2024).

Tablo 3.6. Proniozom formülasyonlarına uygulanan evaporasyon koşulları

Örnekler	Rotasyon hızı (rpm)	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
P1, P2, P3	40	40	4
P4, P5, P6, P7,P8, P9, P10	40	30	5

Söz konusu formülasyonlar, dodekanolün proniozomal formülasyonun fiziksel karakteristiği ve enkapsülasyon etkinliği üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla hazırlanmıştır. Bu yöntem sayesinde, dodekanol kullanımı ile hazırlanan formülasyonların enkapsülasyon etkinliği ve fizikokimyasal stabilitesi belirlenmiş ve elde edilen bulgular, formülasyonların performansını değerlendirmek için kullanılmıştır. Bu amaçla partikül boyutu, polidispersidite indeksi (PDI) ve enkapsülasyon etkinliği ölçümleri gerçekleştirilmiş; her bir örnek için üç ardışık ölçüm alınarak ortalama $\pm$ standart sapma (SS) şeklinde raporlanmıştır. Ölçüm verileri, cihaz tarafından sağlanan dağılım profilleri ve grafiksel çıktılar ile desteklenmiştir.

3.3. Optimum Formülasyonun Seçilmesi ve Rotavapor Koşulları

3.3.1. Rotavapor koşullarının belirlenmesi

Partikül boyutu, polidispersidite indeksi (PDI) ve enkapsülasyon etkinliği ölçümlerine göre seçilen nihai formülasyon rotavapor koşullarının belirlenmesi amacıyla detaylı şekilde incelenmiştir. Bu kapsamda belirlenen formülasyon kullanılarak rotavapor işlemi, sıcaklık, rotasyon hızı ve süre gibi farklı parametre kombinasyonlarında uygulanmıştır. Uygulanan işlem seti sonucunda, P_{4.1}'den P_{4.15}'e kadar kodlanan ve farklı evaporasyon koşullarını temsil eden numuneler elde edilmiştir.

Rotavapor sürecinde kritik öneme sahip sıcaklık, basınç, rotor dönme hızı ve işlem süresi parametreleri deneysel olarak optimize edilmiştir (Yüksel ve diğerleri, 2016). Bu optimizasyon çalışması, formülasyonun yapısal kararlılığını koruyarak içerik kaybını minimize etmeyi ve proniozomal tozun kalitesini artırmayı hedeflemiştir. Rotavapor işlemi için sıcaklık 30 °C, 35 °C ve 40 °C; rotasyon hızı ise 30 rpm, 40 rpm ve 50 rpm olarak belirlenmiş, işlem süresi ise 1,4 ila 7 dakika arasında değişen farklı kombinasyonlarda uygulanmıştır.

Tablo 3.7’de sunulan toplam 16 farklı koşulda (Kontrol ve P_{4.1}– P_{4.15} örnekleri) uygulanan rotavapor parametreleri, formülasyonların fiziksel stabilitesi ve içerik korunumu göz önünde bulundurularak değerlendirilmiştir. Her örnek, belirlenen sıcaklık, rotasyon hızı ve işlem süresi değerlerine karşılık gelmekte olup, bu parametrelerin proniozomal formülasyonun toz haline getirilmesindeki etkisi sistematik şekilde incelenmiştir.

Tablo 3.7. Nihai proniozom formülasyonuna uygulanan evaporasyon koşulları

Örnek adı	Sıcaklık (°C)	Rotasyon hızı (rpm)	Süre (dk)
P _{4.1}	30	40	4,00
P _{4.2}	30	40	4,00
P _{4.3}	30	30	7,00
P _{4.4}	30	50	6,25
P _{4.5}	35	30	2,45
P _{4.6}	35	30	2,55
P _{4.7}	35	40	3,30
P _{4.8}	35	40	3,00
P _{4.9}	35	40	3,00
P _{4.10}	35	50	3,10
P _{4.11}	35	50	2,52
P _{4.12}	40	30	1,50
P _{4.13}	40	40	1,40
P _{4.14}	40	40	1,44
P _{4.15}	40	50	1,57
Kontrol	30	40	5,00

Formülasyonlara ait niozomların partikül büyüklük değerleri ile polidispersidite indeksi (PDI) ölçümleri gerçekleştirilmiş, bu parametrelerin enkapsülasyon etkinliği üzerindeki etkileri kapsamlı olarak değerlendirilmiştir.

3.3.2. Enkapsülasyon etkinliğinin hesaplanması

Elde edilen niozomların enkapsülasyon etkinliği (%) hesaplanmasında indirekt santrifüj metodu modifiye edilerek kullanılmıştır (Sammour ve diğerleri, 2019). Niozomların enkapsülasyon etkinliği toplam etken madde miktarından tuzaklanmayan madde miktarının çıkarılması ile belirlenmiştir. Zeytin yapraklarının *Lb. plantarum* ATCC 14917 ile fermentasyon sonucunda elde edilen hidroksitirozol içeriği zenginleştirilmiş liyofilize zeytin yaprağı ekstraktı örneğindeki (360 mg/ L konsantrasyonundaki) HT içeriğinden, hidroksitirozol içeriği zenginleştirilmiş liyofilize zeytin yaprağı ekstraktı (HZYE) kullanılarak hazırlanan

niozomlarda belirlenen HT miktarının çıkarılması ve toplam HT içeriğinin oranlanması ile yüzde enkapsülasyon etkinliği hesaplanmıştır. Kullanılan formül aşağıda verilmiştir.

$$EE \% = \frac{(\text{Toplam HT miktarı} - \text{Serbest HT miktarı}) * 100}{\text{Toplam HT miktarı}} \quad (3.1)$$

Niozom yapısındaki HT varlığının belirlenmesi Kelebek ve diğerleri, (2017)'nin HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, ABD) analiz yöntemine göre yürütülmüştür. Bileşiklerin varlığının tespiti HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, ABD) kromatografisi kullanılarak yapılmıştır. Proniozomların hidrasyonu ile elde edilen niozomlar, 4 °C'de 9000 rpm hızında 45 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Elde edilen peletler bir gece boyunca 4 °C'de dinlendirilmiştir. Daha sonra süpernatantlar, enjeksiyon için uygun hale getirilmek amacıyla 33 mm çapında ve 0,45 µm gözenek boyutuna sahip PVDF (polyvinylidene fluoride) membran filtrelerden geçirilmiştir. Bu işlem, HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, ABD) analizine uygun süpernatantların hazırlanmasını sağlamıştır.

3.3.3. Partikül boyutu dağılımı ve polidispersidite indeksinin DLS ile analizi

Partiküller; poröz veya poröz olmayan özellik gösterebilen, tek ya da çok bileşenli sistemlerden oluşan ve boyutları 0,5– 2000 µm aralığında değişen moleküler agregatlar olarak tanımlanmaktadır. Partikül büyüklüğü, farmasötik formülasyonların (örneğin; süspansiyonlar, emülsiyonlar ve tabletler) fiziksel stabilitesi, biyoyararlanımı ve farmakolojik etkinliği üzerinde belirleyici bir parametredir. Boyutun aşırı küçük olduğu durumlarda, partiküller arasındaki kohezyon kuvvetleri belirgin şekilde artmakta; bu durum aglomerasyon eğilimini yükselterek sistemin akışkanlık ve homojenite özelliklerini olumsuz yönde etkilemektedir. Buna karşılık, partikül büyüklüğünün aşırı yüksek olması, karışımın homojenliğini bozmakta ve tekdüze bir dağılımın sağlanmasını engellemektedir (Mota ve diğerleri, 2025).

Çalışmada kullanılan örneklerin parçacık boyutu dağılımı, Malvern Nano ZS90 (Malvern Panalytical, Malvern, UK) cihazı kullanılarak dinamik ışık saçılımı (DLS, dynamic light scattering) yöntemiyle belirlenmiştir. Bu teknik, lazer ışınının numune içerisindeki parçacıklarla etkileşimi sonucu oluşan saçılma açısı ve şiddetindeki değişimlerin analizine dayanmaktadır. Ölçümlerde, 633 nm dalga boyunda kırmızı-mavi lazer ışını numune hücreğine yönlendirilmiş ve saçılım verileri Zetasizer Nano Software (Malvern Panalytical, Malvern, UK)

kullanılarak Mie saçılım modeli kapsamında değerlendirilmiştir. Bu sayede, saçılımın doğru şekilde modellenmesi sağlanmış ve deneysel sonuçlarla uyumlu analizler gerçekleştirilmiştir. Ölçümün yapıldığı 633 nm dalga boyu hesaplamalarda kullanılan ışık kaynağı olarak değerlendirilmiştir. Saçılan ışığın korelasyon fonksiyonundan partikül boyutu dağılımı analiz edilmiştir (Han ve diğerleri, 2024).

Parçacık boyutu analizlerinde, polidispersidite indeksi (PDI) otomatik olarak hesaplanmıştır. Ölçümler, dinamik ışık saçılması (DLS) prensibine dayanmakta olup, cihaz tarafından elde edilen korelasyon fonksiyonları Malvern Zetasizer (Malvern Panalytical, Malvern, UK) yazılımı aracılığıyla analiz edilmiştir. PDI, numunenin parçacık boyutu dağılımının genişliğini ve homojenliğini yansıtan istatistiksel bir parametredir. Parçacıkların dağılımı PDI değerlerine göre şu şekilde sınıflandırılmıştır: $<0,05$ monodispers, $<0,08$ neredeyse monodispers, $0,08-0,7$ orta derecede monodispers ve $>0,7$ polidispers (Shakrani ve diğerleri, 2020). Bu parametreler, partiküller arasındaki polidispersiditenin elektrostatik ve sterik stabilite üzerindeki etkilerini değerlendirmede kritik öneme sahiptir.

Analizler oda sıcaklığında ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$) ve pH 6,4'te gerçekleştirilmiş ve her bir örnek için üç ardışık ölçüm alınmış ve sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak raporlanmıştır. Ölçümler sırasında kullanılan dispersiyon ortamının optik ve viskozite parametreleri cihaz tarafından otomatik olarak kalibre edilmiştir; böylece ölçümlerin tekrarlanabilirliği ve güvenilirliği sağlanmıştır. Elde edilen ölçüm verileri, parametrik ortalama değerler ve standart sapmalar ile tablo halinde sunulmuş; ölçüm çıktılarının dağılım profilleri ve temsili grafiksel görünüşleri ile değerlendirilmiştir.

3.3.4. Zeta potansiyelin elektroforetik hareket ölçümü ile belirlenmesi

Zeta potansiyel analizi, optimum proniozomal formülasyonun yüzey yükünü ve kolloidal stabilitesini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Ölçümler, elektroforetik ışık saçılımı (ELS) prensibine dayalı çalışan Malvern Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Panalytical, Malvern, UK) cihazı ile yapılmıştır. Bu cihazlarda genellikle, yerleşik elektrotlar ve U biçimli ölçüm odası içeren özel tek kullanımlık küvetler bulunmaktadır (Khan ve diğerleri, 2019).

Genel olarak, lazer ışınıyla çalışan cihazlar ölçümden yaklaşık 30 dakika önce açılarak sistemin ısınması ve dengeye gelmesi sağlanmaktadır; bu uygulama, oluşabilecek sinyal gürültüsünü

azaltmaktadır. Örnek hazırlandıktan sonra (ilgili sistem parametreleri kontrol edilip kaydedildikten sonra) uygun bir hacim küvete yüklenmekte ve cihaz içerisine yerleştirilmektedir. Cihaza yüklenen sistem parametreleri, ölçülecek örnekle uyumlu olmalı; gözlemlenen veriye uygun bir modelin uygulanabilmesi için cihazın doğru materyal özellikleri ile beslenmesi gerekmektedir. Modern cihazlarda ayrıca örnek sıcaklığının operatör tarafından seçilen değere getirilmesini sağlayan bir sıcaklık dengeleme adımı bulunmaktadır (Feng, Kilker ve Lee, 2020).

Anlamlı bir ζ -potansiyel ölçümü için izin verilen maksimum nanopartikül boyutu yaklaşık 5 μm olarak belirlenmektedir. Bu boyutun üzerinde, elektriksel çift tabaka parçacığın hidrodinamik yarıçapına kıyasla çok küçük kalmakta ve parçacık hareketliliği tamamen atalet kuvvetleri tarafından belirlenmektedir; bu kuvvetler, uygulanan elektrik alanı altında oluşabilecek moleküler iç kuvvetlerden kat kat daha yüksek olmaktadır (Caputo, Clogston, Calzolari, Rösslein ve Prina-Mello, 2019).

Hesaplanan zeta potansiyel değerleri, nanopartiküllerin kararlılığı ile doğrudan ilişki göstermektedir. Zeta potansiyel, nanopartiküllerin polar bir sıvı içerisindeki “kayma yüzeyi” sınırına kadar olan hareketinden kaynaklanan potansiyel fark ile belirlenmektedir. Bu ölçüm, parçacıkların toplam elektrik yükünden ziyade, yüzeylerinde oluşan elektrokinetik potansiyel (etkin elektrik yükü) temel alınarak yapılmakta ve genellikle mV cinsinden ifade edilmektedir. Zeta potansiyel değeri arttıkça parçacıkların kararlılığı da artmaktadır (Zhang ve diğerleri, 2013).

Bu bağlamda, zeta potansiyel değerinin yorumu genel olarak aşağıdaki şekilde yapılmaktadır:

Zeta potansiyel değeri 0 ila ± 5 mV arasında ise sistem kararsız,

± 10 mV’ye kadar olan değerler düşük kararlılık,

± 10 ila ± 30 mV arası değerler orta düzeyde kararlılık,

± 30 ila ± 40 mV arası iyi kararlılık,

± 40 mV’nin üzerindeki değerler ise yüksek kararlılık seviyesini ifade etmektedir (Honary ve Zahir, 2013).

Bu nedenle, kolloidal sistemlerin, özellikle de niozom, lipozom ve benzeri taşıyıcı yapılarının stabilitesini sağlamak amacıyla zeta potansiyel değerinin genellikle ± 30 mV'nin üzerinde olması istenmektedir (Patel ve diğerleri, 2011; Bhattacharjee, 2016).

Zeta potansiyel ölçümlerinde dikkat edilmesi gereken temel faktörler, örnek konsantrasyonu ve kullanılan çözücünün iletkenliğidir. Ölçülecek nanoparçacıkların serbest hareket edebilmesini sağlamak amacıyla örnek konsantrasyonları düşük tutulmakta; yüksek konsantrasyonlar, parçacık hareketliliğini mekanik olarak engelleyerek elektroforetik mobilitenin yapay şekilde düşük ölçülmesine yol açmaktadır (Varenne ve diğerleri, 2019). Dinamik ışık saçılımı (dynamic light scattering, DLS) ölçümleri, numune içerisinden geçen koherent lazer ışınının ve elektroforetik hareket eden Nano partiküllerin ışığı saçmasıyla oluşan faz kaymasına dayandırılmaktadır. Bu nedenle, örneklerin temiz veya çok hafif bulanık olması sağlanmakta; aksi takdirde çoklu saçılma ve düşük ışık iletimi gibi ölçüm hataları ortaya çıkmaktadır (Bhattacharjee, 2016).

Zeta potansiyel ölçümleri için özel olarak tasarlanmış DTS1070 (Malvern Panalytical, Malvern, UK) model tek kullanımlık kapiller küvet kullanılmıştır. Ölçümlerde kullanılan numuneler, 0,003 g proniozomal tozun 3 mL ultra saf su (pH 6,4) ile oda sıcaklığında ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) disperse edilmesiyle hazırlanmıştır (Bayındır ve Yüksel, 2010). Analizlerde dispersiyon ortamı olarak su kullanılmış ve dispersantın kırılma indisi (RI) değeri 1,330 olarak girilmiştir (Erlick, 2006). Ölçümler sırasında çevresel parametreler (sıcaklık, viskozite, dielektrik sabiti) cihaz tarafından otomatik olarak kalibre edilmiştir.

Ölçüm sonuçları, ortalama değerler ve standart sapmalar ile raporlanmış, her bir örnek için üç ardışık ölçüm alınarak tekrarlanabilirliği sağlanmıştır. Bu parametreler, zeta potansiyel ölçümlerinin sistemin fiziksel stabilitesini kantitatif olarak yansıtmasına olanak sağlamıştır. Örnekler, ortalama zeta potansiyel değerleri ve standart sapmalarıyla tablo hâlinde sunulmuştur.

3.4. Fizikokimyasal Karakterizasyon

Rotavapor parametrelerinin optimizasyonu sonucunda belirlenen ve en yüksek enkapsülasyon etkinliği gösteren proniozomal formülasyonun fizikokimyasal stabilitesi ve yapısal bütünlüğü kapsamlı olarak değerlendirilmiştir.

Optimum proniozomal formülasyonda, kolesterol yerine stabilizatör olarak dodekanol kullanılmıştır. Formülasyonda yüzey aktif madde olarak 100 mg Span 60, dodekanol 23 µL (Span 60 ile 1:0,5 molar oranında), maltodekstrin 1,2339 g ve hidrokstitirozol açısından zenginleştirilmiş liyofilize ekstrakt (HZYE) 200 mg olarak yer almıştır. Çözücü sistemi, 9,550 mL etanol ve 0,450 mL saf sudan oluşmaktadır. Tüm bileşenler, manyetik karıştırıcı kullanılarak etanol-su karışımında homojen bir şekilde çözülmüştür. Hazırlanan bulamaç (slurry), rotavapor (Büchi R-210 Flawil, İsviçre) kullanılarak 35 ± 2 °C sıcaklık, 50 rpm rotasyon hızı ve 3-5 dakika süreyle işlenmiş, böylece toz form elde edilmiştir.

Değerlendirme; proniozom, kontrol (boş taşıyıcı sistem) ve ekstrakt (HZYE) olmak üzere üç farklı grup üzerinde karşılaştırmalı olarak gerçekleştirilmiştir. Bu analizler, enkapsülasyonun taşıyıcı sistem üzerindeki etkilerini ve zaman içinde meydana gelebilecek değişimleri sistematik ve kapsamlı şekilde ortaya koymayı hedeflemiştir.

Enkapsülasyon etkinliği (%), partikül boyutu dağılımı (nm), polidispersidite indeksi (PDI) ve zeta potansiyel (mV) analizlerine ilişkin metodolojik ayrıntılar daha önce Bölüm 3.2’de detaylı olarak sunulmuştur.

3.4.1. Nem içeriğinin gravimetrik analiz ile belirlenmesi

Proniozomal tozların nem içeriği, ürün stabilitesi ve raf ömrü açısından kritik bir parametredir. HZYE, proniozom ve kontrol numunelerinin nem içerikleri, Ohaus MB45 nem analizörü (Model MB45, Parsippany, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. Yaklaşık 0,5 g ağırlığındaki örnekler, hassas terazi entegreli Ohaus MB45 nem analizörüne yerleştirilmiş; numune, güçlü bir ısı kaynağı olan halojen lamba eşliğinde 10 dakika boyunca kurutulmuş ve cihazın entegre hassas terazisi ile ağırlık kaybı (gravimetrik) gerçek zamanlı olarak takip edilmiştir. Kurutma süresinin 10 dakika olarak belirlenmesi, numunelerin yeterli süre içinde tamamen kurumasını sağlamakla birlikte, aşırı ısınma ve termal bozunma riskini minimize etmek amacıyla optimize edilmiştir. Bu süre, ön deneyler sonucunda tespit edilmiş ve literatürde yaygın şekilde kabul gören standart bir zaman aralığı olarak belirlenmiştir (Meruva ve diğerleri, 2019; Khan ve diğerleri, 2024). Kurutma işlemi sırasında meydana gelen ağırlık kaybına göre, örneğin toplam nem içeriği (%) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Muthukumar ve diğerleri, 2022):

$$\text{Nem içeriği (\%)} = \frac{\text{Başlangıç ağırlığı} - \text{Son ağırlık}}{\text{Başlangıç ağırlığı}} \times 100 \quad (3.2)$$

Analizler her örnek için üç tekrar şeklinde gerçekleştirilerek ortalama değerler raporlanmıştır. Böylece nem tayini, proniozomal tozların fiziksel ve kimyasal stabilitesinin değerlendirilmesinde güvenilir bir parametre olarak kullanılmıştır (Shruthi ve diğerleri, 2021).

3.4.2. Kimyasal yapı ve moleküler etkileşimlerin FTIR ile analizi

Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR, Thermo Fisher Scientific, Waltham, ABD) spektroskopisi kullanılarak proniozomal formülasyonların kimyasal yapısı ve bileşenler arasındaki moleküler etkileşimler ayrıntılı şekilde analiz edilmiştir (Trinh ve diğerleri, 2019). Analizler, Thermo Scientific Nicolet iS10 FTIR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, ABD) spektrofotometresi ile gerçekleştirilmiştir. Numune hazırlığı için 1- 2 mg toz örnek, potasyum bromür (KBr) tozu ile yaklaşık 100–200 mg oranında hassas bir şekilde homojenize edilmiştir. Hazırlanan karışım, hidrolik pres presinde (Specac Mini Pellet Press, Specac Ltd., Orpington, UK) 8–10 ton/cm² basınç uygulanarak yaklaşık 1 mm kalınlığında, saydam KBr pelletleri halinde sıkıştırılmıştır. Bu işlem sonucunda, FTIR ışınının pellet içerisinden geçişini sağlayan optik olarak saydam diskler elde edilmiştir. Spektrumlar, 4000- 400 cm⁻¹ dalga boyu aralığında, 4 cm⁻¹ spektral çözünürlük ve 32 tarama ortalaması kullanılarak kaydedilmiştir. Ölçümler, cihazın örnek bölümü inert azot gazı atmosferinde tutulmuş ve ortam sıcaklığı 22 ± 2°C olarak sabitlenmiştir; bu sayede atmosferik CO₂ ve su buharından kaynaklanan interferansların minimum seviyeye indirilmesi sağlanmıştır (Demirbolat ve diğerleri, 2022).

Cihaz kalibrasyonu, polistiren standartları kullanılarak düzenli periyotlarla gerçekleştirilmiş ve spektrofotometrenin dalga sayısı doğruluğu ile sinyal stabilitesi doğrulanmıştır. Her numune için üç paralel ölçüm yapılmış, böylece analitik tekrarlanabilirlik ve veri güvenilirliği temin edilmiştir.

Spektral bant alanları veya bant yüksekliği ölçümleri kullanılarak farklı numuneler veya formülasyonlar arasındaki kimyasal değişikliklerin karşılaştırılması sağlanmıştır. Bazı durumlarda, belirli bantların absorbans oranları hesaplanarak yapısal farklılıklar daha detaylı analiz edilmiştir. Elde edilen spektrumlar, Thermo Scientific OMNIC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, ABD) yazılımı ile baz çizgisi düzeltme, gürültü azaltma ve sinyal düzeltme işlemlerinden geçirilmiştir. Spektral analiz kapsamında, formülasyondaki moleküller

arası hidrojen bağları, Van der Waals kuvvetleri, iyonik ve kovalent bağların varlığı ve dinamiği, fonksiyonel grup bantlarındaki dalga sayısı kaymaları, bant genliği değişiklikleri ve yeni absorbans bantlarının ortaya çıkışı incelenmiştir. Bu parametreler, bileşenler arasındaki kimyasal bağlanma modifikasyonlarını ve formülasyonun kimyasal stabilitesini değerlendirmek amacıyla kullanılmıştır (Mawazi ve Widodo, 2024).

3.4.3. Termal karakterizasyonun DSC ile analizi

Proniozom, kontrol ve ekstrakt örneklerinin termal özelliklerini belirlemek amacıyla diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) analizi uygulanmıştır (Gurrapu ve diğerleri, 2012). Termal analizler, Mettler Toledo DSC-3 (Mettler Toledo, Greifensee, İsviçre) cihazı kullanılarak ve yüksek hassasiyetli Seramik FRS 5+ sensör (Mettler Toledo, Greifensee, İsviçre) (56 adet termokupl içeren) yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Cihazın ± 350 mV ölçüm aralığı, sinyal kalitesini artırarak daha doğru ve tekrarlanabilir sonuçların elde edilmesini sağlamıştır (Khudair ve diğerleri, 2020). Her bir numune yaklaşık 40 μ L kapasiteli alüminyum örnek kaplarına tartılarak hermetik şekilde kapatılmış; boş bir alüminyum pan referans olarak kullanılmıştır.

Tartılan numune miktarları:

- Proniozom: 6,00 mg
- HZYE ekstraktı: 7,30 mg
- Kontrol: 4,40 mg miktarlarında tartılmıştır.

Analizler, -120°C ila 700°C sıcaklık aralığında, $10^{\circ}\text{C}/\text{dakika}$ sabit ısıtma hızıyla yürütülmüştür. İnhibitör etkilerden kaçınmak amacıyla inert atmosfer sağlanmış; azot gazı (N_2) altında, 40 mL/dk sabit akış hızında analizler tamamlanmıştır (Boddu ve diğerleri, 2017). Veri toplama aralığı 1,00 s olarak belirlenmiş ve ısıtma işlemi boyunca senkronizasyon modu aktif hâlde tutulmuştur. Ölçümler, 40 μ L kapasiteli alüminyum numune tutucu ve Mettler Toledo DSC 3 cihazı (model DSC 3/700/1047, Mettler Toledo, Greifensee, İsviçre) modülü kullanılarak alınmış; cihazın sıcaklık ve entalpi kalibrasyonları, üretici firmanın yönergelerine uygun olarak yapılmıştır. Analizler boyunca veri kaydı Mettler Toledo STARe (Mettler Toledo, Greifensee, İsviçre) yazılımı aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Analizler her örnek için üç tekrar şeklinde gerçekleştirilmiştir.

DSC analizleri sırasında, numunelerin absorpsiyon veya desorpsiyon yoluyla saldığı/sahip olduğu ısı akışları kaydedilmiş ve elde edilen termogramlar üzerinden cam geçiş sıcaklığı (T_g), erime sıcaklığı (T_m) ve teorik erime entalpisi (ΔH_m) gibi parametreler belirlenmiştir. Bu veriler ışığında numunelerin kristalinlik düzeyi ve termal stabiliteleri yorumlanmıştır (Ghanbari ve diğeri, 2023).

Ayrıca her bir ısı akışı eğrisi üzerinden üç temel nokta olan başlangıç (onset), tepe (peak/mid) ve bitiş (end) noktaları analiz edilmiştir. Başlangıç noktası, termal geçişin başladığı, yani ısı akış eğrisinin bazal çizgiden ilk sapmayı gösterdiği sıcaklık değeridir. Bu nokta, genellikle yazılım tarafından teğet (tangent) yöntemi kullanılarak otomatik olarak hesaplanmaktadır. Tepe (peak/mid) noktası, ısı akışının maksimum (veya egzotermik olaylarda minimum) değere ulaştığı ve geçişin enerjik olarak en yoğun gerçekleştiği sıcaklığı ifade etmektedir. Bitiş (end) noktası ise geçişin tamamlandığı, yani ısı akış eğrisinin tekrar bazal çizgiye ulaştığı sıcaklık olarak tanımlanmaktadır. Bu üç temel parametre, analiz edilen malzemenin termal davranışının ayrıntılı bir şekilde incelenmesine olanak sağlamaktadır (Wierzbicka-Miernik, 2016).

Enkapsülasyon sistemlerinin termal kristal yapısını belirlemek amacıyla DSC termogramlarından elde edilen erime entalpisi (ΔH_m , örnek), literatürde bildirilen saf bileşiğin teorik erime entalpisi (ΔH_m^0) ile karşılaştırılarak aşağıdaki formülle kristalinlik yüzdesi (X_c) hesaplanmıştır (Krstic ve diğeri, 2015; Tarani ve diğeri, 2023):

$$X_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0} \cdot 100\% \quad (3.3)$$

Bu geçiş sıcaklıkları ve entalpi değişimleri, yalnızca bileşenlerin termal kararlılıklarının belirlenmesinde değil, aynı zamanda proniozomal yapı ile ekstrakt arasındaki potansiyel fiziksel veya kimyasal etkileşimlerin değerlendirilmesinde kullanılmıştır (Gandra, 2020). Ek olarak, reaksiyon başlangıç sıcaklığı, maksimum pik sıcaklığı (bileşenlerin en hızlı bozulma veya reaksiyon gösterdiği sıcaklık) ve reaksiyon bitiş sıcaklığı gibi parametreler incelenmiş ve elde edilen veriler, proniozomal yapının formülasyondaki termal kararlılığı ile içerdiği bileşenlerin birbirleriyle olan uyumluluğunu ortaya koyacak şekilde yorumlanmıştır (Mawazi ve Widodo, 2024).

3.4.4. Kristallik ve yapısal düzenliliğin XRD ile belirlenmesi

Proniozom, kontrol ve ekstrakt örneklerinin kristal yapılarını belirlemek amacıyla X-ışını kırınımı (XRD) analizi uygulanmıştır (Madni ve diğerleri, 2018). XRD yöntemi, katı hal numunelerdeki atomların düzenli ve periyodik dizilimine bağlı olarak, bakır (Cu) anodundan üretilen karakteristik K-alfa ($K\alpha$) X-ışınlarının belirli açılarla kırınım yapması prensibine dayanmaktadır. Burada kullanılan $K\alpha$ ışını, L kabuğundaki bir elektronun K kabuğuna geçişi sonucu ortaya çıkan karakteristik X-ışını ışınımına karşılık gelmektedir. Bu ışınım, bakır atomunun iç kabuk elektron geçişleriyle üretilmekte olup, yaklaşık 1,5406 Å (ångström; 1 Å = 10^{-10} metre) dalga boyuna sahip elektromanyetik radyasyon türüdür. Bu dalga boyu, kristal yapıların yüksek çözünürlükte analiz edilmesine olanak sağlamaktadır (Gonzalez, 2012).

Numuneye gelen X-ışınları, kristal düzlemlerine çarparak kırınıma uğramakta ve Bragg yasası doğrultusunda belirli açılarda yapıcı girişim oluşturarak kırınıma uğrar ve karakteristik kırınım pikleri meydana gelmektedir. Bu kırınım desenleri, her kristal faza özgü benzersiz bir “parmak izi” niteliğinde olup, kristal faz kompozisyonu, kristalit boyutu, yapısal düzen ve amorf/kristal oranlarının belirlenmesine olanak tanımaktadır. Elde edilen kırınım piki pozisyonları (2θ değerleri) ve pik yoğunlukları, numunelerin kristal yapı özelliklerinin kalitatif ve kantitatif olarak tanımlanmasında temel veri olarak kullanılmaktadır (Le Pevelen, 2010).

Analizler PANalytical EMPYREAN model XRD (Malvern Panalytical, Almere, Hollanda) cihazında gerçekleştirilmiştir. Ölçümler 2θ açısı aralığında 10° - 90° arasında, 40 kV gerilim ve 30 mA sabit akım altında gerçekleştirilmiştir. Cihazın 480 mm çapındaki dikey gonyometresi kullanılarak teta-teta modunda, $0,02^\circ$ adım büyüklüğü ve her adımda 0,5 saniye tutma süresi ile ölçümler optimize edilmiştir. Numuneler, yüzey pürüzlülüğünü azaltmak için ince tabaka halinde numune tutucusuna yerleştirilmiştir (Smith ve Thompson, 2019).

Kristalit boyutu hesaplamalarında InstaNANO XRD Crystallite Size Calculator yazılımı (2025 versiyonu, InstaNANO Technologies, ABD) kullanılmıştır. Yazılım, Bragg piklerinin tam genişlik yarı maksimum (FWHM) değerlerine dayanarak Scherrer denklemini uygulamakta ve kristalit boyutlarının hızlı ve güvenilir şekilde belirlenmesini sağlamaktadır. Bu analizler kapsamında, numunelerin kristal faz kompozisyonları, amorf ve kristal yapı oranları, kristal boyutları ile proniozomal formülasyonların yapısal stabilitesi değerlendirilmiştir. Pik

genişliklerindeki değişimler, kristal yapıda meydana gelen bozulmalar veya olası faz dönüşümlerine işaret edebilmektedir. Böylece, proniozomal taşıyıcı sistem ile içerik arasındaki fizikokimyasal etkileşimlerin anlaşılması desteklenmiştir (Garcia-Tunon ve diğerleri, 2020).

3.4.5. Yüzey morfolojisi ve topografinin SEM ile analizi

Proniozomal formülasyonların yüzey morfolojilerinin değerlendirilmesi, formülasyonların fiziksel stabiliteleri, yapısal bütünlükleri ve aglomerasyon davranışlarının belirlenmesi amacıyla Taramalı Elektron Mikroskobu (scanning electron microscopy, SEM) analizi gerçekleştirilmiştir (Ravaghi ve diğerleri, 2017).

SEM analizinden önce, örnek yüzeylerine iletkenlik kazandırmak amacıyla örnekler altına (Au) kaplama işlemi uygulanmıştır. Bu işlem, vakum altında çalışan bir manyetron püskürtme sistemi (Quorum, Q150R ES, İngiltere) kullanılarak gerçekleştirilmiş ve örnekler yaklaşık 5–10 nm kalınlığında homojen bir altın tabakası ile kaplanmıştır. Kaplama işlemi, SEM cihazında yüksek çözünürlükte görüntü elde edilebilmesi için kritik öneme sahiptir (Pathan ve Lokhande, 2004).

Altın kaplanmış örnekler, 15 kV hızlandırıcı voltaj ile çalışan FEI Quanta 650 Field Emission SEM (FEI, Hollanda) cihazında görüntülenmiştir. Ölçümler, 500x büyütmede gerçekleştirilmiş olup, elde edilen görüntüler üzerinden partikül yüzey özellikleri değerlendirilmiştir.

Elde edilen SEM görüntüleri, örneklerin morfolojik özelliklerinin ayrıntılı incelenmesi amacıyla analiz edilmiştir. Görseller üzerinden partikül şekli, yüzey pürüzlülüğü, küresellik düzeyi, aglomerasyon eğilimi ve yapısal bütünlük gibi parametreler değerlendirilmiştir (Goldstein ve diğerleri, 2017). Bu değerlendirme, ekstrakt yüklemesinin taşıyıcı sistemin yüzey özelliklerine etkisini ortaya koymakla birlikte, farklı formülasyonlar arasında karşılaştırmalı bir analiz yapılmasına olanak tanımıştır. Ayrıca, elde edilen bulgular formülasyonların fiziksel stabilitesi, homojenliği ve üretim sürecine bağlı morfolojik tutarlılığı hakkında önemli bilgiler sunmuştur.

3.4.6. Yüzey morfolojisi ve topografinin AFM ile analizi

Proniozomal sistemlerin yüzey özelliklerinin nanometrik düzeyde karakterize edilmesi, partikül morfolojisinin homojenliği, topografik düzeni ve enkapsülasyon sonrası yapısal

bütünlüğün değerlendirilmesi açısından önem taşımaktadır. Bu kapsamda, ekstrakt, kontrol ve proniozom örneklerine ait yüzey morfolojileri, Park Systems marka Park NX10 (Park Systems, Suwon, Güney Kore) cihazı kullanılarak Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) yöntemiyle incelenmiştir.

Ölçümler, probun örnek yüzeyine zarar vermeden yüksek çözünürlüklü görüntü elde edilmesini sağlayan temassız modun (Non-Contact Mode, NCM) bir alt türü olan vuruş modu (Tapping Mode) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu modda, iğne uçlu prob yüzey üzerinde doğrudan temas etmeden, belirli bir frekansta titreştirilerek tarama yapılmaktadır. Prob ucu, yüzeye her temasta kısa süreli “vuruş” etkisi oluşturarak yüzeye etkileşime girmekte ve bu etkileşim sırasında oluşan titreşimler ve faz kaymaları piezoelektrik sensör aracılığıyla elektrik sinyaline dönüştürülmektedir (Garcia ve Perez, 2002).

Elde edilen elektrik sinyalleri, Park Systems’in Smart Scan™ (Park Systems, Suwon, Güney Kore), yüksek çözünürlüklü görüntü elde edilmesini desteklerken, veri işleme, yüzey topografyası analizleri ve üç boyutlu modelleme gibi gelişmiş fonksiyonlarla detaylı yüzey karakterizasyonu sağlamaktadır. Ayrıca yazılım, ölçüm sırasında otomatik hata düzeltme ve filtrasyon özellikleri ile veri kalitesinin artırılmasına olanak tanımaktadır. Ölçümler, $2,5\ \mu\text{m} \times 2,5\ \mu\text{m}$ alanlarda gerçekleştirilmiş olup, yüzey üç boyutlu (3D) ve iki boyutlu (2D) görseller şeklinde sunulmuştur. Yükseklik, genlik ve faz sinyalleri sırasıyla 2,5, 5, 10 ve 15 nm aralıklarında analiz edilmiştir.

AFM analizleri sonucunda elde edilen yüzey topografisi değerlendirilmesinde genlik parametreleri, yüzey topografyasının karakterizasyonunda yüzey profilinin dikey yöndeki (z-ekseni) sapmalarının büyüklüğünü tanımlayan temel niceliksel ölçütlerdir. Başka bir deyişle, bu parametreler; yüzeyin ortalama düzlemine göre yukarıya ya da aşağıya olan yükseklik farklarını ifade ederek, yüzeyin pürüzlülük düzeyi ve morfolojik özellikleri hakkında bilgi vermektedir (Binning, Quate ve Gerber, 1986).

Analizler, manuel olarak çizilen profil çizgisi doğrultusunda gerçekleştirilmiş olup, bu çizgi üzerindeki ölçümlerden ortalama yüzey pürüzlülüğü (R_a , arithmetic average height, μm), kareköklü ortalama sapma (R_q , root mean square roughness, μm), ortalama tepe-yarık yüksekliği (R_z , ten-point roughness height), yüzeyin en yüksek tepe noktası ile en derin vadi

arasındaki dikey mesafeyi ifade eden maksimum profil yüksekliği (Rpv, maximum profile valleys, μm) ve yüzeyin sivrilik katsayısı (Rku, kurtosis of the surface height distribution) yüzey yüksekliği dağılımının sivrilik katsayısı olarak, yüzeyin tepe ve çukur uç noktalarının yoğunluğu olarak hesaplanmıştır (Kumar, Hymavathi ve Rao, 2016).

Çalışmada kullanılan veriler, cihazın entegre analiz yazılımı aracılığıyla üç boyutlu (3D) ve iki boyutlu (2D) topografik görüntüler halinde elde edilerek, yüzeydeki olası morfolojik değişiklikler niteliksel olarak değerlendirilmiştir. Tüm ölçümler sabit ortam sıcaklığında ve sabit tarama hızında gerçekleştirilmiş; sistematik hataları minimize etmek amacıyla her örnekten üç farklı alan taranmıştır.

Hesaplamalar, yüzey boyunca elde edilen noktasal veriler üzerinden yürütülmüş ve ölçüm hassasiyeti Smart Scan™ yazılımı (Park Systems, Kore) ile optimize edilmiştir. AFM analizleri, proniozomal yapıların nanometrik ölçekte yüzey özelliklerinin detaylı incelenmesini ve morfolojik tutarlılığın değerlendirilmesini sağlamıştır (Bhushan, 2012). Ayrıca, fonksiyonel yüzey özelliklerinin (örneğin sürtünme, yapışma, kaplama tutunabilirliği ve ışık yansıtma kapasitesi) değerlendirilmesinde ilgili genlik parametreleri kullanılmıştır.

3.5. Fonksiyonel ve Biyolojik Etkinlik

Optimum proniozomal formülasyonun biyolojik aktivitelerinin değerlendirilmesinde, antioksidan kapasitenin belirlenmesi için 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiyazol-6-sülfonik asit) (ABTS, Merck, Almanya) ve 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH, Sigma- Aldrich, ABD) radikal süpürme yöntemleri kullanılmıştır. Ayrıca, formülasyonun antimikrobiyal etkinliği ise kuyucuk agar difüzyon testi ile analiz edilmiştir.

3.5.1. Antioksidan aktivitenin analizi

Proniozom ve kontrol gruplarına ait antioksidan aktivite tayinleri, literatürde yaygın olarak kullanılan DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ve ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiyazol-6-sülfonik asit)) radikal süpürme yöntemlerinde (Sanchez-Moreno ve diğerleri, 1998; Miller ve diğerleri, 1993) modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Proniozomal formülasyonlar, hidrasyon işlemi uygulanarak farklı konsantrasyonlarda (30, 15, 7,5, 3,75, 1,86 mg/ mL) niozomal sistemler oluşturulmuştur. Her konsantrasyonda (30, 15, 7,5,

3,75, 1,86 mg/ mL) hazırlanan niozom süspansiyonları, ilgili radikal çözeltileri ile belirlenen süre boyunca reaksiyona tabi tutulmuş; reaksiyonun tamamlanmasının ardından, partiküllerden kaynaklanan ışık saçılımını önlemek amacıyla 0,45 µm polietersülfon (PES) membran filtresi kullanılarak süzölmüştür. Bu filtrasyon işlemi, spektrofotometrik ölçümlerin doğruluğunu artırmıştır (Shruthi ve diğerleri, 2021).

Her bir konsantrasyon, standart antioksidan çözeltileri ile karşılaştırmalı olarak test edilmiştir. Standart eğri oluşturmak için, 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 µM konsantrasyonlarında Trolox standart çözeltileri hazırlanmış, her bir konsantrasyonun absorbans değerleri ilgili dalga boylarında kaydedilmiştir. Elde edilen standart eğri denklemi kullanılarak örneklerin antioksidan kapasitesi Trolox eşdeğeri (TE, µmol TE/g örnek) hesaplanmıştır.

Antioksidan kapasitenin değerlendirilmesinde, proniozom ve kontrol örneklerine ilişkin DPPH ve ABTS radikal süpürme yöntemleri kullanılmıştır. Her iki yöntem, serbest radikallerle reaksiyona giren antioksidan bileşenlerin etkinliğini ölçmek amacıyla spektrofotometrik analiz prensibine dayanmaktadır. Ancak yöntemler arasında belirgin farklılıklar bulunmaktadır. Bu iki yöntemin birlikte uygulanması, proniozomal formülasyonların hem hidrofobik hem de hidrofilik antioksidan içeriklerinin kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesini sağlamıştır.

3.5.1.1. DPPH yöntemi ile antioksidan aktivite analizi

DPPH yöntemi, özellikle hidrofobik karakterdeki antioksidanların değerlendirilmesinde yüksek seçiciliğe sahip bir analiz tekniğidir. Metanolde çözülmüş DPPH radikal çözeltisi, test örnekleri ile karanlık ortamda inkübe edilerek DPPH'nin mor renginin, antioksidan bileşiklerin varlığında azalarak renksiz ya da sarı renge dönüşmesi prensibi ile analizler yapılmıştır (Tavano ve diğerleri, 2014).

Elde edilen bu standart eğri yardımıyla, çalışmada kullanılan örneklerin serbest radikal süpürme aktiviteleri hesaplanmıştır. Antioksidan etkinliği, spektrofotometrik olarak belirlenen absorbans değerleri kullanılarak radikal süpürme yüzdesi şeklinde ifade edilmiştir.

$$\text{Radikal süpürme aktivitesi (\%)} = \left(\frac{A_0 - A_s}{A_0 - A_b} \right) \times 100 \quad (3.4)$$

Formülde yer alan A_0 radikal çözeltisi ve çözücünden oluşan kontrol örneğinin absorbansını; A_s test numunesinin radikal çözeltisi ile etkileşimi sonucunda ölçülen absorbansı ve A_b blank (sıfır örnek) grubuna ait absorbans değerini (çözücü tek başına) belirtmektedir.

Her bir örnek için üç tekerrür ölçüm gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak raporlanmıştır. Trolox standart eğrisi ve örneklerin radikal süpürme aktiviteleri hem grafiksel hem de tablo formatında sunulurken verilerin sayısal ve görsel karşılaştırması sağlanmıştır. Bu yaklaşım, antioksidan kapasitenin (Trolox eşdeğeri, TE) güvenilir, tekrarlanabilir ve kantitatif bir biçimde değerlendirilmesini mümkün kılmıştır.

3.5.1.2. ABTS yöntemi ile antioksidan aktivitenin belirlenmesi

ABTS yöntemi hem hidrofilik hem de hidrofobik antioksidanların tayinine olanak tanıyan, geniş uygulama alanına sahip bir tekniktir. Suda çözüneen ABTS⁺ radikalinin indirgenmesi prensibine dayanmaktadır. ABTS^{•+} radikali, oksidatif ortamda oluşturulduktan sonra örneklerle reaksiyona sokulmuş; indirgenmiş formun absorbansındaki azalma UV-Vis spektrofotometresi aracılığıyla 734 nm dalga boyunda ölçülmüştür (Machado, Gutierrez, Matos ve Fernandez, 2021). ABTS^{•+} yöntemi, geniş pH aralığında ve farklı çözücü ortamlarında güvenilir sonuçlar sunması nedeniyle özellikle su bazlı ve karma sistemlerde tercih edilmektedir (Abuelizz ve diğerleri, 2020).

ABTS radikal süpürme kapasitesi, Re ve diğerleri (1999) ile Abuelizz ve diğerleri (2020) tarafından bildirilen yöntemde yapılan küçük modifikasyonlarla gerçekleştirilmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan niozomal süspansiyonlardan 0,2 mL örnek alınarak 1,8 mL ABTS^{•+} çözeltisi ile karıştırılmış ve karışımlar 6 dakika süreyle karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Reaksiyon süresi tamamlandıktan sonra, spektrofotometrik ölçümler 734 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Antioksidan aktivite, aşağıdaki formül kullanılarak radikal süpürme aktivitesi (%) cinsinden hesaplanmıştır:

$$\text{Radikal süpürme aktivitesi (\%)} = \left(\frac{A_0 - A_s}{A_0 - A_b} \right) \times 100 \quad (3.5)$$

Burada:

- A_0 : Kontrol grubuna (radikal çözültisi + çözücü) ait absorbans değeri,
- A_s : Numune içeren sistemin absorbans değeri,
- A_b : Blank (sıfır örnek) grubuna ait absorbans değeri (çözücü tek başına), olarak tanımlanmıştır.

Örneklerin hesaplanan radikal süpürme aktivitesi (%) değerleri standart eğriye yerleştirilerek karşılık gelen Trolox eşdeğeri konsantrasyonları belirlenmiştir. Analiz sonucunda elde edilen Trolox eşdeğeri konsantrasyonu ($\mu\text{mol} / \text{L}$), standart eğri denklemi kullanılarak belirlenmiştir. Bu değer, toplam reaksiyon hacmi ile çarpılarak numunedeki toplam Trolox eşdeğeri miktarı hesaplanmıştır. Elde edilen miktar, reaksiyona alınan niozom örneğinin gram cinsinden kütlelerine bölünerek, antioksidan kapasite μmol Trolox eşdeğeri / gram örnek ($\mu\text{mol TE/g}$) birimiyle ifade edilmiştir. Bu hesaplama, numunelerin antioksidan etkinliğinin karşılaştırılabilir ve standartlaştırılmış bir şekilde sunulmasını sağlamaktadır. Örnek kütlesi, kullanılan niozom süspansiyonunun konsantrasyonu ve reaksiyona alınan hacim dikkate alınarak hesaplanmıştır.

Her bir örnek için üç tekerrür ölçüm alınmış ve ölçüm sonuçları ortalama $\pm$ standart sapma olarak raporlanmıştır. Standart eğri denklemi ve örneklerin inhibitör aktivite değerleri hem grafik hem de tablo formatında sunularak verilerin görsel ve sayısal karşılaştırması sağlanmıştır.

3.5.2. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

Proniozomların niozomlara dönüşümü sırasında, ekstraktın vezikül içi dağılımını artırmak amacıyla Branson Digital Sonifier SFX 250 (ABD) model ultrasonik cihazda 20 kHz frekansta ve 250 W gücünde ultrasonik işlem uygulanmıştır. Ultrasonik prob, numune içine 1,5 cm daldırılarak 5 saniye açık / 5 saniye kapalı döngüler halinde buz banyosu eşliğinde gerçekleştirilmiştir (Khan ve diğerleri, 2017).

Antimikrobiyal aktivite, kuyucuk agar difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Testte *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 11774 ve *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 kullanılmıştır. Tüm bakteri suşları, Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (ATCC, ABD) referans standartlarından elde edilmiştir. Bakteriyel kültürler, 0,5 McFarland standardına göre standartlaştırılmıştır. Proniozom ve kontrol örnekleri,

60, 30, 15, 7,5, 3,75 ve 1,86 mg/ mL konsantrasyonlarında hazırlanarak agar plaklarına açılan kuyucuklara uygulanmıştır. Plaklar 37 °C’de 18- 24 saat inkübe edilmiştir. Tüm deneyler üçer kez tekrarlanmış; inhibisyon zon çapları milimetre cinsinden ölçülmüştür (Begum ve diğerleri, 2015).

Elde edilen sonuçlarla, proniozom ve kontrol örneklerinin antimikrobiyal etkinliği değerlendirilmiş ve farklı bakteri suşları üzerinde oluşturdıkları inhibisyon zonları belirlenmiştir. Ayrıca, proniozomların serbest ekstrakt veya standart kontrol örneklerine kıyasla etkinliği ve konsantrasyon-artışına bağlı yanıtları ortaya konmuştur. Bu sonuçlar, hem plak fotoğrafları ile görsel olarak hem de inhibisyon zon çapları ile sayısal olarak sunulurken, proniozomların antimikrobiyal aktivitesine ilişkin güvenilir ve kantitatif bir kanıt sağlamıştır.

3.5.3. Uçucu bileşiklerin profil değişimlerinin SPME-GC-FID ile analizi

Zeytin yaprağı ekstraktlarında bulunan uçucu bileşiklerinin profillenmesi ve içerikler arası kantitatif karşılaştırmaların yapılabilmesi amacıyla katı faz mikro ekstraksiyon (SPME) ile eşleştirilmiş gaz kromatografisi alev iyonizasyon dedektörü (GC-FID) yöntemi kullanılmıştır. Bu analiz, ekstraktların fermentasyon ve enkapsülasyon gibi işlemler sonucunda uçucu bileşen profillerinde meydana gelen değişimlerin izlenmesini ve bu süreçlerin doğal aroma profili üzerindeki etkilerinin belirlenmesini amaçlamıştır (Jufri ve diğerleri, 2017).

Katı faz mikro ekstraksiyon (SPME), çözücü kullanılmaksızın, örnek ortamından uçucu ve yarı uçucu bileşenlerin bir fiber yüzeyine adsorbe edilerek toplanmasını sağlayan, hızlı ve tekrarlanabilir bir örnek hazırlama yöntemidir. Bu yöntem, aroma profili üzerinde bozucu etkisi olmayan hassas analizler için uygun bir tekniktir (Xiao ve diğerleri, 2014). Uçucu bileşiklerin ekstraksiyonu için SPME yöntemi tercih edilmiş ve analizler GC-FID cihazı (7890B, Agilent Technologies, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. Her bir örnekten 2 mL alınarak, 10 mL hacimli sızdırmaz vial şişelere aktarılmış ve analizler üç paralel olacak şekilde yürütülmüştür.

Ekstraksiyon işlemi, Agilent Technologies (ABD) üretimi otomatik enjeksiyon modülü (GC Enjektör 80) ile kontrol edilen üç aşamalı bir prosedür çerçevesinde gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada, numuneler uçucu bileşiklerin üst boşluk fazına geçişini sağlamak amacıyla dengeleme (pre-incubation) işlemine tabi tutularak 40 °C’de 10 dakika süreyle bekletilmiştir. Ardından, uçucu ve yarı uçucu bileşenlerin seçici adsorpsiyonunu sağlamak için Supelco Inc.

(ABD) üretimi, 75 µm kalınlığında DVB/CAR/PDMS (divinilbenzen/ karboksen/ polidimetilsiloksan) kaplamaya sahip StableFlex tipi SPME fiberi kullanılmıştır. İlgili fiber, numunenin üst boşluk fazına yerleştirilerek 40 °C’de 30 dk süreyle uçucu bileşenlerin adsorpsiyonunu sağlamak amacıyla ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Ekstraksiyon sonrasında, adsorplanan bileşikler fiber üzerinden doğrudan gaz kromatografisi enjeksiyon portuna transfer edilerek enjeksiyon işlemi gerçekleştirilmiş ve analiz tamamlanmıştır (Selli, Kelebek, Kesen ve Sonmezdag, 2018).

Ayrıştırma işlemleri, polar uçucu bileşenlere duyarlı DB- Wax kaplı kolon (30 m × 250 µm × 0,25 µm; J&W Scientific-Folsom, California, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kolon sıcaklık programı şu şekilde yapılandırılmıştır: başlangıçta 40 °C’de 4 dk bekletilmiş, ardından sıcaklık dakika başına 4 °C artışla 240 °C’ye çıkarılmış ve bu sıcaklıkta 10 dk tutulmuştur. Taşıyıcı gaz olarak helyum kullanılmış olup, sabit akış hızı 1 mL/ dk olarak ayarlanmıştır (Vichi ve diğerleri, 2003).

Uçucu bileşiklerin kimyasal tanımlamaları, kütüphane eşleşmeleri esas alınarak NIST11 (National Institute of Standards and Technology Library, 2011 versiyonu, ABD), Wiley7 (Wiley Registry of Mass Spectral Data, 7th Edition, Almanya / ABD) ve Flavor Library (Flavors and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds, Thermo Fisher Scientific, ABD) kütüphaneleri aracılığıyla yapılmıştır (Kelebek ve diğerleri, 2018). Kantitatif analizlerde iç standart olarak 2 µL 4-nonanol eklenmiş ve her bileşiğin miktarı, iç standarda göre normalize edilmiş pik alanları üzerinden hesaplanmıştır. Doğrusal alıkonma indeksleri (Linear Retention Indices, LRI) alifatik hidrokarbon karışımı (C8–C30, Ultrasci) kullanılarak hesaplanmış ve GC enjektörüne yukarıda belirtilen koşullarda doğrudan enjekte edilmiştir. Ayrıştırılan bileşenlerin göreceli yüzdeleri, GC-FID pik alanlarının elektronik entegrasyonu ile normalizasyon yöntemi kullanılarak ve düzeltme faktörleri uygulanmadan hesaplanmıştır. Tüm analizler iki kez tekrarlanmış ve doğrulama amacıyla LRI değerleri literatür karşılaştırmaları ile desteklenerek kimyasal bileşiklerin tanımlanması sağlanmıştır (Rinaldi ve diğerleri, 2020). Elde edilen sonuçlar tablolar hâlinde sunulmuştur.

3.6. Depolama Stabilitesi

Depolama stabilitesi, proniozomal formülasyonun kimyasal ve fiziksel özelliklerini belirli koşullarda koruyabilme kapasitesidir. Bu çalışma kapsamında, seçilen optimum proniozomal

formülasyon ve kontrol örneklerinin depolama süresince fizikokimyasal stabiliteleri değerlendirilmiştir. Stabilité çalışmaları, örneklerin hem buzdolabı koşullarında (4 ± 1 °C) hem de oda sıcaklığında (21 ± 2 °C) olmak üzere iki farklı sıcaklıkta depolanması ile gerçekleştirilmiştir. Numuneler ışık geçirmeyen cam kaplar içerisinde muhafaza edilerek 1., 7., 15., 30. ve 60. günlerde analiz edilmiştir.

Tüm analizler üçlü deney tekrarıyla gerçekleştirilmiş olup, sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde raporlanmıştır. Elde edilen bulgular, zaman ve sıcaklık faktörlerinin etkisini değerlendirmek üzere uygun istatistiksel testler kullanılarak analiz edilmiş ve anlamlı farklılıklar ($p < 0,05$) dikkate alınarak yorumlanmıştır. Bu değerlendirmeler, geliştirilen proniozomal sistemin raf ömrü boyunca stabilitesini koruyup koruyamadığını ortaya koymak açısından önem taşımaktadır.

3.6.1. Enkapsülasyon etkinliğinin depolama süresince analizi

Hidroksitirozol içeriği zenginleştirilmiş liyofilize zeytin yaprağı ekstraktı (HZYE) kullanılarak hazırlanan niozomal sistemlerde enkapsülasyon etkinliği (%), başlangıç ekstraktındaki HT miktarı (360 mg/L) ile, elde edilen vezikül içeriğindeki HT miktarı karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Bu kapsamda, HT'nin toplam miktarından serbest (tuzaklanmamış) fraksiyon çıkarılmış ve kalan miktarın toplam içeriğe oranlanmasıyla enkapsülasyon etkinliği (%) değeri elde edilmiştir. İlgili hesaplama yöntemi, Bölüm 3.1'de sunulan formülde ayrıntılı şekilde verilmiştir.

3.6.2. Partikül boyutu ve polidispersidite indeksinin depolama süresince analizi

Proniozomal formülasyonların fiziksel stabilitesinin değerlendirilmesi amacıyla, partikül boyutu dağılımı ve polidispersidite indeksi (PDI) analizleri dinamik ışık saçılması (DLS) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Ölçümler, Malvern Zetasizer Nano ZS90 cihazı ve ilişkili Zetasizer Nano yazılımı kullanılarak, 25 ± 1 °C sıcaklıkta ve pH 6,4 koşullarında, 90° lazer saçılım açısında yürütülmüştür (Stetefeld ve diğerleri, 2016). Partikül boyutu ve PDI analizleri için numuneler, 3 mg proniozom ve kontrol örnekleri 3 mL saf su ile disperse edilmesiyle hazırlanmış ve kuartz küvetler içinde ölçülmüştür. Her formülasyon için en az üç bağımsız ölçüm gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ortalama değerler şeklinde raporlanmıştır.

Bu analizler kapsamında partikül boyutları, Mie saçılma teorisi temelinde hesaplanmış; hesaplamalarda kırılma indisi ve absorpsiyon katsayısı gibi gerekli optik parametreler yazılım arayüzüne tanımlanmıştır (Ghaforyan ve diğerleri, 2015). Parçacık dağılımının homojenliğini değerlendirmek amacıyla hesaplanan PDI değerleri, sistemin fiziksel kararlılığına ilişkin önemli bir gösterge olup, 0 ile 1 arasında değişmektedir. Bu bağlamda düşük PDI değerleri, sistemin daha monodispers (tekdüze) bir yapıda olduğunu ve homojen bir dağılım sergilediğini göstermektedir (Ramos, 2017).

3.6.3. Renk değişimlerinin CIE Lab parametreleri ile belirlenmesi

Proniozomal formülasyonlar ve blank proniozomlara ait renk özellikleri, 1., 7., 15., 30. ve 60. günlerde olmak üzere farklı depolama süreleri boyunca değerlendirilmiştir. Renk ölçümleri, Konica Minolta (Japonya) marka CM-5 model spektrofotometrik renk ölçüm cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Değerlendirme, CIE Lab* renk uzayı parametreleri olan L* (ışıklık veya açıklık), a* (kırmızı-yeşil eksen) ve b* (sarı-mavi eksen) renk koordinatlarına göre yapılmış; bu temel değerlerden faydalanılarak renk doygunluğu (Chroma, C*) ve renk açısı (Hue, h°) hesaplanmıştır (Minolta, 2007).

Chroma ve Hue hesaplamaları için kullanılan formüller aşağıda verilmiştir:

$$\text{Chroma (C*)} = \sqrt{a^2 + b^2} \quad (3.6)$$

$$\text{Hue açısı (h°)} = \tan^{-1} \frac{b}{a} \quad (3.7)$$

Burada, *a* değeri kırmızı-yeşil eksen, *b* değeri ise sarı-mavi eksen temsil etmektedir. Hue açısı, gerektiğinde uygun çeyreklik düzeltmeleriyle (örneğin negatif değerlerde) dairesel koordinata uyarlanarak yorumlanmıştır. Her bir numune için ölçümler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş, elde edilen veriler ortalama ± standart sapma şeklinde tablolar halinde raporlanmıştır.

3.7. İstatistiksel Analizler

Çalışmadan elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmeleri SPSS Statistics (IBM Corp., v.29.0, Armonk, NY, ABD) ve R (v.4.3.2, R Foundation for Statistical Computing, Viyana,

Avusturya) yazılımları kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasındaki farklılıkların belirlenmesinde varyans analizi ve çoklu karşılaştırma testleri uygulanmış, sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiş ve anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

3.7.1. Kullanılan testler ve parametreler

Çalışma kapsamında elde edilen verilerin değerlendirilmesinde istatistiksel analiz yöntemleri uygulanmıştır. Proniozom ve kontrol grupları arasındaki farklılıkların belirlenmesi ve depolama süresinin örnekler üzerindeki etkilerinin ortaya konulması amacıyla öncelikle verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro–Wilk testi, varyans homojenliği ise Levene testi ile incelenmiştir. Parametrik koşulların sağlandığı durumlarda, gruplar arasındaki farklılıkların belirlenmesinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır.

ANOVA sonucunda anlamlı farklılıkların ortaya çıkması halinde, hangi gruplar arasında bu farklılıkların bulunduğunu belirlemek amacıyla Tukey Honestly Significant Difference (HSD) testi uygulanmıştır. Ortalama değerler arasındaki istatistiksel farklılıkların ayrıntılı olarak gösterilmesi için R programında agricolae paketine ait HSD.test() fonksiyonu kullanılmış, farklı harflerle işaretlenen gruplar istatistiksel olarak anlamlı farkı ifade etmiştir.

Analizlerde güven aralığı %95 olarak kabul edilmiş, istatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak belirlenmiştir. Bulgular ortalama $\pm$ standart sapma biçiminde sunulmuş ve gerekli durumlarda tablolar ve grafiklerle desteklenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Nihai Proniozomal Formülasyonun Seçimi ve Analitik Değerlendirme Sonuçları

4.1.1. Hidroksitirozol içeriği zenginleştirilmiş ekstraktın belirlenmesi

Bu bölümde, zeytin yaprağı ve fermente örneklerden elde edilen ekstraktların proniozom formülasyonlarına eklenmesi ile proniozom elde edilip edilmediği sistematik olarak incelenmiştir. Hazırlanan proniozomal tozların hidroksitirozol içerikleri, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen veriler, literatürde rapor edilen benzer çalışmalarla karşılaştırılmış ve formülasyon oluşturma koşullarının hidroksitirozol enkapsülasyon verimine etkisi analiz edilmiştir. Bu kapsamda, ekstrakt miktarı, lipid faz bileşimi ve santrifüj/hidrasyon parametrelerinin proniozomların kapsülleme verimliliği üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir.

4.1.2. Formülasyonda kullanılan ekstraktın seçimi

Kurutulmuş zeytin yaprağı tozunun (Şekil 4.1) klasik çözücü ekstraksiyonu ile elde edilen klasik çözücü ekstraktı (ZYE), zeytin yaprağı fermentasyonu sonrasında elde edilen fermente zeytin yapraklarının liyofilize ekstraktı (FZYE), zeytin yaprağı fermentasyonu sonrasında elde edilen zeytin yaprağı fermentasyon sıvısından elde edilen liyofilize ekstrakt (HZYE) kullanılarak hazırlanan formülasyonlar öncelikle toz formülasyonun fiziki olarak elde edilip edilmemesine göre değerlendirilmiştir.



Şekil 4.1. Zeytin yaprağı tozu

Formülasyon oluşturma sürecinde, (1:0,5 ve 1:1, w/w) maltodekstrin/kolesterol içeren karışımlar belirlenen ekstrakt örnekleriyle birlikte etanol içerisinde çözündürülmüştür.

Bulamaç metodu kullanılarak toplam 40 farklı kombinasyondan oluşan ön denemeler gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen proniozomlardan Şekil 4.2’de kurutulmuş zeytin yaprağı tozu (KZY) içeren, Şekil 4.3’de *Lb. plantarum* ATCC 14917 suşu ile fermente edilen zeytin yapraklarının fermentasyon sonunda elde edilen sıvı fazı, ultrason destekli ekstraksiyon (UDE) yöntemi ile işlenmiş ve ardından liyofilizasyon uygulanarak elde edilen ekstraktın (F_{SIV1} UDE liyofilize) proniozomal enkapsülasyonu sonucunda elde edilen örnekler gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Zeytin yaprağı tozu içeren proniozomal örnek



Şekil 4.3. F_{SIV1} UDE liyofilize ekstraktı içeren proniozomal örnek

40 formülasyon denemesi içerisinde sadece 20 tanesinde proniozomal toz elde edilmiştir. Proniozomal toz elde edilen örneklerin en çok F_{SIV} UDE liyofilize ekstraktı içeren örnekler olduğu belirlenmiştir.

4.1.3. Proniozom deneme üretimlerinde ekstrakt kullanımının değerlendirilmesi

Zeytin yaprağı fermantasyon sürecinde, yapraklarda doğal olarak bulunan oleuropein, *Lb. plantarum* ATCC 14917 bakterisinin β -glikozidaz ve esteraz enzim aktiviteleri sonucu biyokatalize uğramış ve hidroksitirozol içeriği fermentasyon sıvısında daha yüksek miktarda tespit edilmiştir. UDE yönteminin optimizasyonu ile birlikte hidroksitirozol içeriği zengin ekstrakt (5,04 mg hidroksitirozol /g ekstrakt) elde edilmiştir (İlgaz vd., 2023). Elde edilen ekstrakt liyofilize edilerek (HZYE) proniozom formülasyonu oluşturma çalışmalarında kullanılmıştır.

Proniozom üretiminde lipid fazı Tween 80 (157,2 mg) ve kolesterol (92,8 mg) miktarları kullanılarak elde edilmiştir. Liyofilize zeytin yaprağı ekstraktından 12,5 mg tartılarak 10 mL etanol içerisinde çözündürülmüştür. Balon içerisine 1250 mg maltodekstrin eklenmiş, hazırlanan lipid karışımı maltodekstrin üzerine ilave edilmiştir. Bu karışım rotavaporda 40 °C’de, 40 rpm hızında 2 dakika evaporasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra kuruyana kadar desikatörde bekletilmiş ve elde edilen proniozomlar, analiz edilinceye kadar 15 mL falcon tüplerinde, buzdolabında muhafaza edilmiştir. Karşılaştırma amacıyla HZYE içermeyen formülasyonlar hazırlanmış ve bunlar kontrol grubu olarak adlandırılmıştır (Khudair ve diğerleri, 2020).

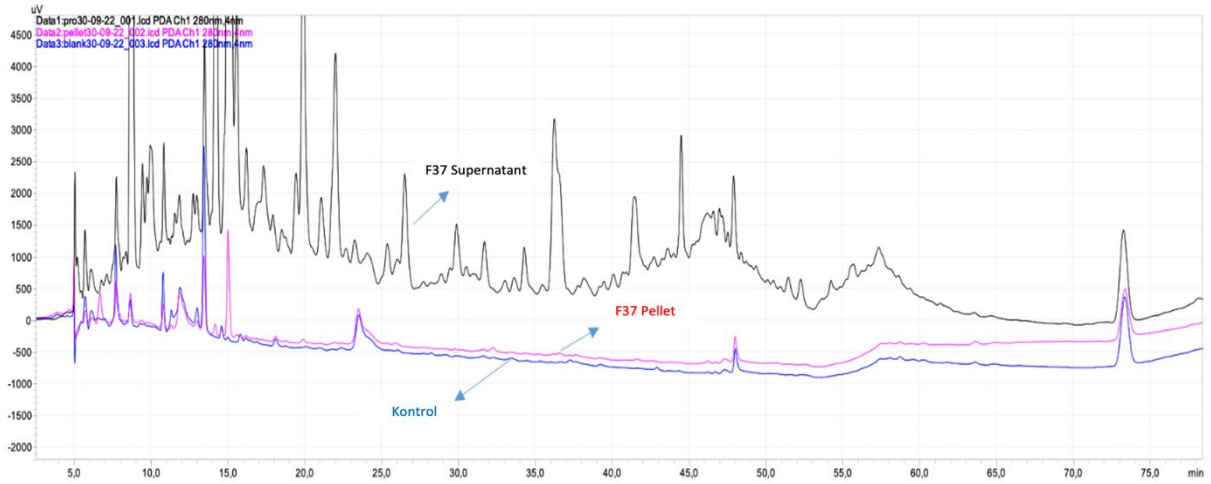
Proniozomların hidrasyonu ile niozomlar elde edilmiştir. Bu amaçla, 0,003 g proniozom tozu üzerine 3 mL saf su eklenmiş ve karışım 65 °C sıcaklıktaki su banyosunda bir saat boyunca tutulmuştur. Bu işlem sonucunda proniozomlar, hidrofilik yapıya dönüşerek niozomal süspansiyon formuna getirilmiştir (Sammour ve diğerleri, 2019). Her bir niozomal süspansiyondan, enkapsülasyon etkinliğinin (%) belirlenmesi için 1 mL örnek alınmıştır. Niozom veziküllerini içeren çökteltiyi elde edebilmek amacıyla örnekler ultrasantrifüj işlemine tabi tutulmuş ve farklı santrifüj sürelerinin (10, 30 ve 45 dk) etkisi karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir (Han ve diğerleri, 2019).

4.1.4. Deneme üretimlerinde enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi

Proniozomal tozların hidroksitirozol içerikleri HPLC (Agilent 6430) sistemi kullanılarak belirlenmiştir. Analiz sonuçları, formülasyonlar arasında farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, uygulanan ultrasantrifüj sürelerinin (10, 30 ve 45 dk) hidroksitirozol miktarı üzerinde etkili olduğu ve bu sürelerle ilgili olarak enkapsülasyon etkinliğinde değişimlerin meydana geldiği gözlenmiştir.

F36 numaralı örnekte elde edilen düşük verim (%20,46) ve uzun santrifüj süresinin enkapsülasyon kapasitesini olumsuz etkilediği gözlenmiştir. Bu nedenle, sonraki denemeler için ultrasantrifüj süresi 10 dk olarak seçilmiştir. Belirlenen bu süre, Baghirova (2022) tarafından A vitamini yüklü niozom formülasyonlarında uygulanan 30 dk'lık santrifüj süresinden daha kısa olup, yöntem açısından işlem verimliliğini artıran ve enerji/materyal kullanımını optimize eden bir koşul olarak değerlendirilebilir. Benzer şekilde, Razei, Iranbakhsh, Sepahi, Mirzaei ve Larijani (2024) çinko oksit nanopartiküllerin (ZnO NPs) niozomlara enkapsülasyonu çalışmalarında 13.000 rpm'de 90 dk santrifüj uygulamış; bu işlem sonucunda serbest nanopartiküller süpernatantta, enkapsüle edilenler ise sedimentte toplanmıştır. Bu çalışma ile kıyaslandığında, daha kısa santrifüj sürelerinin de etkin sonuçlar verdiği ve yöntemin uygulanabilirliğini artırdığı görülmektedir.

Enkapsülasyon etkinliği (%), kapsülleyici sistemin çekirdek bileşenlerini çift katmanlı membran yapısında veya nanoveziküllerin sulu çekirdek kısmında tutabilme kapasitesi olarak tanımlanmaktadır. Niozomal formülasyonlarda enkapsülasyon etkinliğinin hesaplanmasında kullanılan HPLC kromatogramları Şekil 4.4'te sunulmuştur.



Şekil 4.4. F37 numaralı örneğe ait enkapsülasyon etkinliği değerleri

HPLC analizine göre yapılan hesaplamalar sonucunda, en yüksek enkapsülasyon etkinliği, 200 mg ekstrakt içeren proniozomlardan hidratlanan, 4 °C’de 20000 rpm hızında 10 dk santrifüjlenen F37 kodlu niozom örneğinde %73,72 olarak bulunmuştur. En düşük değer ise 45 dk ultrasantrifüj işlemine tabi tutulan F36 örneğinde %20,46 olarak tespit edilmiştir. Bu durum; dispersiyondaki ekstrakt miktarının sistemin yükleme kapasitesini aşmasına ve sonuç olarak hidroksitirozolün süpernatant fazda serbest kalmasında atfedilmektedir. Pellet fraksiyonlarının incelenmesi sonucunda, ekstrakt içermeyen kontrolle benzer pik profilleri elde edilmiş ve hidroksitirozole rastlanmamıştır. Bu bulgular, hidroksitirozolün esas olarak süpernatant fazda bulunduğunu doğrulamaktadır.

Literatürde, kuersetin yüklü niozom sistemlerinde enkapsülasyon veriminin %61,49- 95,68 arasında değiştiği rapor edilmiştir. Bu çalışmalarda, en yüksek enkapsülasyon değerinin 5 mg fitosterol içeren formülasyonlarda elde edildiği belirtilmiştir. Fitosterolün lipofilik yapısı, çift tabakalı membrana entegre olarak zar sertliğini artırmakta ve böylece kuersetin moleküllerinin difüzyonunu engellemektedir. Ayrıca fitosterolün yüksek konsantrasyonlarda kuersetinle rekabete girerek enkapsülasyon verimini azalttığı da rapor edilmiştir (Elmi ve diğerleri, 2021). Bu bulgular, lipid matriks bileşenlerinin vezikül yapısı ve yükleme kapasitesi üzerinde belirleyici rol oynadığını ortaya koymaktadır.

Ultrasantrifüj süresinin proniozom formülasyonları üzerindeki etkisinin gösterildiği Tablo 4.1 incelendiğinde, farklı formülasyonların davranışları belirgin şekilde farklılık göstermiştir. F35 formülasyonu için 10, 30 ve 45 dakika süresince uygulanan ultrasantrifüj işlemleri,

enkapsülasyon etkinliğinde (%) yalnızca sınırlı bir değişime yol açmış ve 68,83–65,95 aralığında kalmıştır. Bu durum, F35’in vezikül yapısının santrifüj sürelerindeki değişimlere karşı görece stabil olduğunu ve hidroksitirozolün etkin şekilde veziküllerde tutulduğunu göstermektedir.

Tablo 4.1. Niozomlara ait % enkapsülasyon etkinliği

Örnek no	Zaman (dk)	Enkapsülasyon Etkinliği (%)
F35	10 dk	68,83
F35	30 dk	65,95
F35	45 dk	65,99
F36	10 dk	31,94
F36	30 dk	32,37
F36	45 dk	20,46
F37	10 dk	73,72
F38	10 dk	71,68
Kontrol	10 dk	-

F37 ve F38 formülasyonları kullanılarak elde edilen proniozomal yapıların 10 dakikalık ultrasantrifüj süresi sonucunda hesaplanan enkapsülasyon etkinliği sırasıyla %73,72 ve %71,68 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, kısa süreli santrifüj işlemlerinin vezikül bütünlüğünü koruyarak maksimum yükleme kapasitesi sağladığını ortaya koymaktadır.

Elde edilen veriler, proniozomlarda ultrasantrifüj süresinin, formülasyonun yapısal özellikleri ve içerik miktarıyla birlikte, enkapsülasyon etkinliği üzerinde belirleyici bir rol oynadığını göstermektedir. Kısa süreli santrifüj işlemleri, veziküllerin stabilitesini koruyarak yüksek hidroksitirozol yüklemesine olanak sağlarken, uzun süreler bazı formülasyonlarda verim kaybına neden olmaktadır.

Bu çalışmada elde edilen en yüksek enkapsülasyon etkinliği değeri (%73,72), literatürde hidroksitirozol yüklü sistemlerde bildirilen değerlerle kıyaslandığında orta-yüksek düzeyde bir performans göstermektedir. Örneğin, Al-Saqr ve diğerleri (2022), Span 60 kullanılarak hazırlanan hidroksitirozol yüklü niozomların tekdüze partikül boyutuna ve %90’ın üzerinde enkapsülasyon verimine sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Bu sonuçlar, tez çalışmasında kullanılan proniozom yapısının, hidroksitirozol gibi fenolik bileşiklerin etkili bir şekilde

enkapsülasyonu için yüksek potansiyele sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Bildirilen başka çalışmalarla karşılaştırıldığında, belirlenen enkapsülasyon etkinliği (%73,72), Pando ve diğerleri (2015) ile Machado ve diğerlerinin (2020) Span 60/dodekanol kullanılarak hazırladıkları resveratrol yüklü niozomlarında elde ettikleri %64'lük verimden daha yüksek bulunmuştur. Bu farkın, hidroksitirozol içeriği yüksek zeytin yaprağı ekstraktının dispersiyonun yüzey yükünü etkileyerek vezikül oluşumunu değiştirmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Benzer şekilde, resveratrol yüklü niozomların hazırlanmasında farklı HLB değerlerine sahip yüzey aktif maddeler kullanılmış ve HLB değeri 11'in üzerinde olan karışımlar ile hazırlanan niozomların, resveratrol için yüksek antioksidan kapasite gösterdiği rapor edilmiştir (Schlich ve diğerleri, 2020). Bu bağlamda, çalışmada Span 60 kullanılarak yürütülen formülasyonlar, hem enkapsülasyon verimi hem de yapısal stabilite açısından literatür sonuçlarıyla tutarlılık göstermektedir.

Shah ve diğerleri (2020), hazırladıkları formülasyonların ortalama vezikül çaplarını incelediklerinde, Span kullanılarak formüle edilen proniozomlar arasında vezikül boyutlarındaki değişimin (110– 170 nm) istatistiksel olarak anlamlı olmadığını rapor etmişlerdir. Span bazlı proniozomların ortalama partikül boyutu 121 nm olup, niozom partiküllerinin homojen dağılımlı olduğu tespit edilmiştir. Buna karşılık, Tween kullanılarak hazırlanan niozomlar (300– 420 nm), Span bazlı formülasyonlara kıyasla anlamlı olarak daha büyük boyut göstermiştir ($p < 0,05$). Niozom boyutu ile Spanların hidrofobikliği arasındaki ilişki, artan hidrofobiklikle birlikte yüzey enerjisinin azalmasına bağlanmakta ve bu durum daha küçük veziküllerin oluşumunu kolaylaştırmaktadır. Bu mekanizma, Spanlara kıyasla daha düşük hidrofobikliğe sahip Tween bazlı niozomlarda gözlemlenen daha büyük veziküllerin oluşumunu açıklamaktadır. Bu nedenle, tez çalışmasında formülasyonların daha küçük ve homojen veziküller oluşturma amacıyla Tween 80 yerine Span 60 tercih edilmiştir.

Elde edilen veriler, proniozomlarda ultrasantrifüj süresinin, formülasyonun yapısal özellikleri ve içerik miktarıyla birlikte, enkapsülasyon verimliliği üzerinde belirleyici bir rol oynadığını göstermektedir. Kısa süreli santrifüj işlemleri, veziküllerin stabilitesini koruyarak yüksek hidroksitirozol yüklemesine olanak sağlarken, uzun süreler bazı formülasyonlarda verim kaybına neden olmaktadır.

4.2. Proniozomal Formülasyonların Optimizasyon Sonuçları

Çalışmada, proniozom formülasyonlarının bileşenleri olan Span 60, kolesterol ve dodekanol farklı kombinasyonlar hâlinde test edilmiş; ayrıca maltodekstrin ile yüzey aktif madde ve lipid oranlarının enkapsülasyon verimliliği üzerindeki etkisi sistematik olarak değerlendirilmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda, hidroksitirozolün en yüksek miktarda ve verimli şekilde proniozom içine yüklenmesini sağlayan bileşen oranları belirlenmiştir.

Ön denemelerde kullanılan ve Tablo 3.1’de gösterilen F35– F38 kodlu örnekler, ultrasantrifüj süresinin etkisini değerlendirmek amacıyla hazırlanmıştır. Bu kapsamda, F36 örneğinde uygulanan uzun süreli santrifüj işlemi düşük enkapsülasyon verimine (%20,46) yol açmış ve bu bulgu doğrultusunda sonraki denemelerde santrifüj süresi 10 dakika olarak optimize edilmiştir.

Ön denemelerde kullanılan F35–F38 örnekleri ile nihai optimizasyon aşamasında değerlendirilen F₅₀–F₃₀₀ örnekleri farklı adlandırılmıştır. Bu farklılık, deneyin iki aşamasını (ön deneme ve optimizasyon) ayırt etmeyi ve elde edilen verilerin karşılaştırılabilir olmasını sağlamayı amaçlamaktadır.

4.2.1. Kolesterol içeren proniozom formülasyonlarının ekstrakt yüklemesi ve lipid faz oranı optimizasyon sonuçları

Kolesterol içeren proniozom formülasyonları HZYE ekstraktının farklı miktarları (50– 300 mg) kullanılarak Span 60 ve maltodekstrin ile hazırlanmıştır. Tüm formülasyonlarda etanol miktarı 10 mL olarak sabit tutulmuş, lipid ve taşıyıcı fazın molar oranları 1:0,5 ve 1:1 olacak şekilde optimize edilmiştir. Kontrol örneği ekstrakt içermemekte olup, proniozomların yapısal stabilitesi ve partikül homojenliği açısından referans olarak kullanılmıştır. Bu yaklaşım, ekstrakt miktarının enkapsülasyon verimliliği ve partikül özellikleri üzerindeki etkisinin sistematik olarak değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır.

Nihai optimizasyon aşamasında, F₅₀– F₃₀₀ kodlu proniozom örnekleri, belirlenen ekstrakt ve bileşen oranları doğrultusunda sistematik olarak hazırlanmış ve standart üretim koşullarına göre işlenmiştir. Bu yaklaşım, verimlilik ve vezikül bütünlüğü açısından karşılaştırılabilir ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmesini sağlamıştır.

Tüm formülasyonlarda rotavaporda dönüş hızı 60 rpm, basınç 70 mbar ve sıcaklık 60 °C olarak sabitlenmiş; evaporasyon süreleri formülasyona bağlı olarak 2–4 dakika arasında uygulanmıştır. Ultrasantrifüj işlemleri için dönüş hızı 20.000 rpm ve sıcaklık 4 °C olarak belirlenmiş olup, F₃₀₀ ve F₂₅₀ örneklerinde süreler 10, 30 ve 45 dakika olarak denenmiştir. Ön denemelerde, Tablo 3.1’de verilen F36 numaralı örnekte uzun süreli ultrasantrifüj uygulaması (%20,46 enkapsülasyon verimi) düşük verime yol açtığından, sonraki denemelerde ultrasantrifüj süresi 10 dakika olarak optimize edilmiştir. Diğer formülasyonlarda da verim ve vezikül bütünlüğünü korumak amacıyla 10 dakika süre uygulanmıştır.

Bu süre, veziküllerin yapısal bütünlüğünü korurken yeterli sedimentasyon sağlayarak hidroksitirozolün daha yüksek verimde enkapsülasyonuna olanak tanımakta ve yöntemde kontrollü bir optimizasyon parametresi olarak belirlenmiştir. Daha uzun santrifüj sürelerinde (30– 45 dk) yüksek hız ve basınç nedeniyle veziküller deformasyona uğrayabilir, fragmente olabilir veya dispersiyon içerisindeki yüklenen hidroksitirozol serbest faza geçebilir; bu durum enkapsülasyon verimini olumsuz etkilemektedir. Seçilen 10 dakikalık süre, hem veziküllerin bütünlüğünü korumakta hem de hidroksitirozolün verimli bir şekilde enkapsülasyonunu mümkün kılmaktadır. Tablo 4.2’de, farklı formülasyonlara ait enkapsülasyon etkinliği değerleri karşılaştırmalı olarak sunulmuştur.

Tablo 4.2. F50–F300 formülasyonlarının farklı karıştırma sürelerinde belirlenen enkapsülasyon etkinlikleri

Formülasyon	Zaman (dk)	Enkapsülasyon etkinliği (%)
F ₃₀₀	10	68,83
F ₃₀₀	30	65,95
F ₃₀₀	45	65,99
F ₂₅₀	10	31,94
F ₂₅₀	30	32,37
F ₂₅₀	45	20,46
F ₂₀₀	10	73,72
F ₁₅₀	10	71,68
F ₁₀₀	10	23,06
F ₅₀	10	8,74
Kontrol	10	-

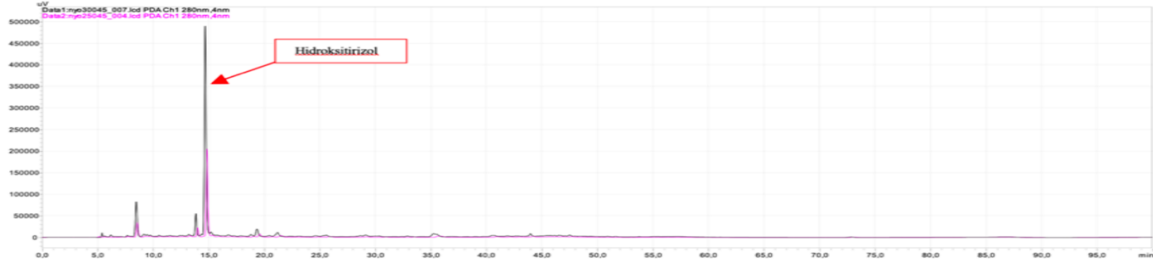
F₃₀₀ ve F₂₅₀ örneklerinde 10, 30 ve 45 dakika sürelerle ultrasantrifüj uygulanmış; F₂₀₀, F₁₅₀, F₁₀₀ ve F₅₀ örneklerinde ise 10 dakikalık süre seçilmiştir.

F₃₀₀ formülasyonunda, ultrasantrifüj süresi 10, 30 ve 45 dakika arasında değişse de, enkapsülasyon etkinliğinde belirgin bir düşüş gözlenmemiştir (%65,95– 68,83). Buna karşın, F₂₅₀ örneğinde 45 dakikalık uzun süreli ultrasantrifüj uygulaması, verimde belirgin bir düşüşe (%20,46) yol açmıştır. Bu durum, yüksek hız ve basıncın veziküller üzerinde oluşturabileceği deformasyon ve parçalanma (fragmentasyon) etkisi ile açıklanabilir. F₂₀₀ formülasyonu 10 dakikalık ultrasantrifüj süresi ile en yüksek enkapsülasyon etkinliğini (%73,72) göstermiştir. F₁₀₀ ve F₅₀ örneklerinde verimler sırasıyla %71,68 ve %23,06 olarak bulunmuştur. Kontrol örneğinde ise ekstrakt bulunmadığı için enkapsülasyon ölçümü yapılmamıştır.

Bu bulgular, proniozom formülasyonlarının ultrasantrifüj süreleri ve içerik miktarına bağlı olarak hidroksitirozolün enkapsülasyon etkinliğini (%) önemli ölçüde etkilediğini göstermektedir. Genel olarak, 10 dakikalık ultrasantrifüj süresi, vezikül bütünlüğünü koruyarak yüksek verimde enkapsülasyon sağlayan optimal bir işlem parametresi olarak belirlenmiştir.

Hazırlanan proniozomlardan elde edilen niozomların hidroksitirozol içerikleri, HPLC analizleri ile belirlenmiş ve örneklerin karşılaştırmalı kromatogramları Şekil 4.5- 4.11’de sunulmuştur. Kromatogramlar, farklı formülasyonların ve ultrasantrifüj sürelerinin enkapsülasyon etkinliği üzerindeki etkilerini görsel olarak ortaya koymaktadır.

F₃₀₀ ve F₂₅₀ örneklerinde uzun süreli ultrasantrifüj (30– 45 dk) uygulamalarının, veziküllerin deformasyonu ve yüklenen hidroksitirozolün serbest faza geçişine yol açarak enkapsülasyon verimini düşürdüğü gözlenmiştir. Bu durum, kromatogramlardaki düşük pik yoğunlukları ile doğrulanmıştır. Buna karşın, 10 dakikalık ultrasantrifüj süresi ile hazırlanan örneklerde, vezikül bütünlüğü korunmuş ve yüksek enkapsülasyon etkinliği (%) elde edilmiştir.

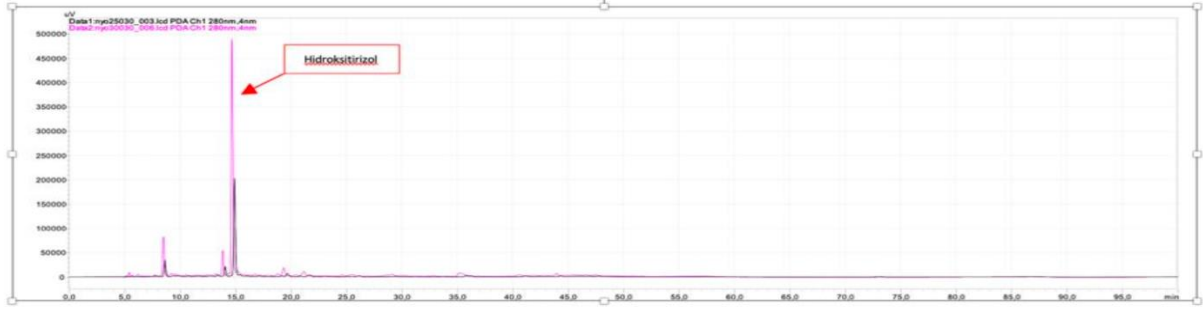


Şekil 4.5. F₃₀₀ 45 dk ultrasantrifüj edilen ve F₂₅₀ 45 dk ultrasantrifüj edilen örneklere ait kromatogram görüntüsü

F₂₅₀ formülasyonunda, ekstrakt miktarının artması (%31,94– %32,37, 10– 30 dk) veya uzun süreli santrifüj (%20,46, 45 dk) uygulamaları, veziküllerde deformasyon ve hidroksitirozolün serbest faza geçmesi nedeniyle enkapsülasyon verimini düşürmüştür. Benzer şekilde, F₁₅₀'de 10 dakikalık ultrasantrifüj süresine rağmen yüksek verim (%71,68) gözlenmiş, ancak F₁₀₀ ve F₅₀ örneklerinde ekstrakt miktarının düşük olması, vezikül yapısının ve membran stabilitesinin yeterli yükleme alanı sağlayamamasına bağlı olarak verimi belirgin şekilde azaltmıştır (%23,06 ve %8,74).

Shah ve diğerleri (2020) çalışmalarında, farklı ilaç yüklemelerinin vezikül boyutu üzerindeki etkisi F9 (60 mg), F4 (100 mg) ve F10 (140 mg) formülasyonları üzerinden sistematik olarak değerlendirilmiş olup, artan ilaç yükü ile birlikte ortalama partikül boyutunda 110 nm'den 155 nm'ye kadar belirgin bir büyüme gözlemlenmiştir. Bu gözlem, tramadol HCl'in (polar ilaç) yüksek kapsülleme verimi ile ilişkilendirilmiş ve sulu fazın artması sonucu veziküllerin daha büyük hacimde ilaç çözeltisini kapsülleyebilme kapasitesi kazanmasıyla açıklanmıştır.

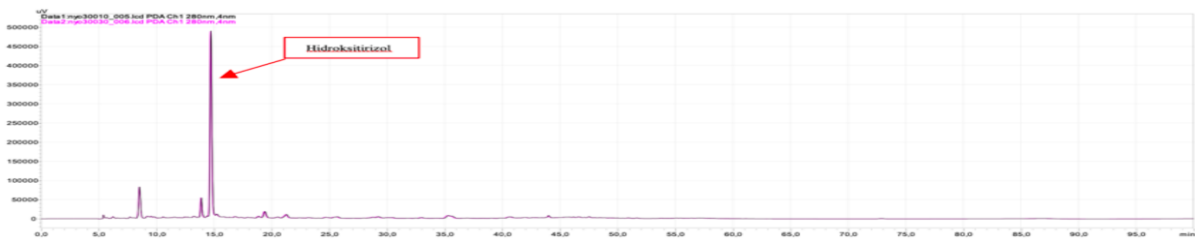
Bu bulgular, tez çalışmasında elde edilen sonuçlarla uyumlu olup, enkapsülasyon veriminin yalnızca ekstrakt miktarına bağlı olmadığını; lipid matriks bileşenleri, yüzey aktif madde özellikleri ve ekstrakt–lipid etkileşimlerinin de kapsülleme etkinliğinde kritik rol oynadığını ortaya koymaktadır.



Şekil 4.6. F₃₀₀ 30 dk ultrasantrifüj edilen ve F₂₅₀ 30 dk ultrasantrifüj edilen örneklere ait kromatogram görüntüsü

F₃₀₀ formülasyonunda 10 dakikalık ultrasantrifüj uygulaması ile F₂₅₀ formülasyonunda 30 dakikalık santrifüj süresi kıyaslandığında, enkapsülasyon etkinliği (%) açısından belirgin farklar gözlemlenmiştir (Şekil 4.7). F₃₀₀'de daha kısa sürede gerçekleştirilen santrifüj, yüksek ekstrakt içeriğine rağmen veziküllerin yapısal bütünlüğünü korumasına olanak sağlamış ve hidroksitirozolün etkin şekilde yüklenmesine imkân tanımıştır; bu sayede orta-yüksek düzeyde bir enkapsülasyon etkinliği (%) elde edilmiştir. Buna karşılık, F₂₅₀ formülasyonunda 30 dakikalık uzun santrifüj süresi, düşük ekstrakt içeriğine rağmen veziküllerde deformasyon ve fragmentasyon oluşmasına yol açmış, bunun sonucunda enkapsülasyon etkinliği (%) belirgin şekilde düşmüştür.

Bu bulgular, ekstrakt miktarının tek başına yüksek verim sağlamak için yeterli olmadığını; proses parametrelerinin, özellikle santrifüj süresi ve ekstrakt-lipid oranının birlikte optimize edilmesinin kritik olduğunu göstermektedir. Kısa santrifüj süreleri, özellikle yüksek ekstrakt içerikli formülasyonlarda, veziküllerin hidroksitirozolu verimli şekilde tutmasını sağlayarak enkapsülasyon etkinliğini (%) artırmaktadır.



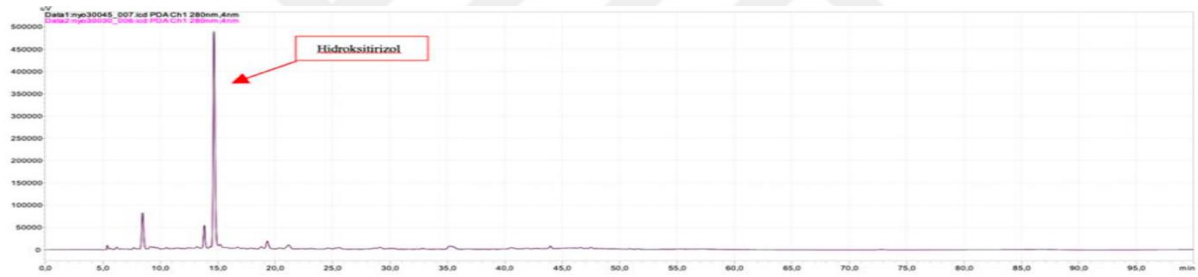
Şekil 4.7. F₃₀₀ 10 dk ultrasantrifüj edilen ve F₂₅₀ 30 dk ultrasantrifüj edilen örneklere ait kromatogram görüntüsü

F₃₀₀ formülasyonu üzerinde gerçekleştirilen ultrasantrifüj süreleri kıyaslandığında, 30 dakikalık uygulamanın 45 dakikalık uygulamaya göre daha yüksek enkapsülasyon etkinliği (%) sağladığı

gözlenmiştir (Şekil 4.8). 30 dakikalık santrifüj süresi, veziküllerin yapısal bütünlüğünü kısmen koruyarak hidroksitirozolün verimli şekilde yüklenmesine olanak tanımış ve orta-yüksek düzeyde bir enkapsülasyon etkinliği (%) elde edilmiştir.

Buna karşın, 45 dakikalık uzun süreli santrifüj işlemi, yüksek hız ve basınç etkisiyle veziküllerde deformasyon ve fragmantasyon oluşmasına yol açmış, bunun sonucunda hidroksitirozolün bir kısmı serbest faza geçmiştir. Bu durum, enkapsülasyon etkinliğinin (%) belirgin şekilde düşmesine sebep olmuştur.

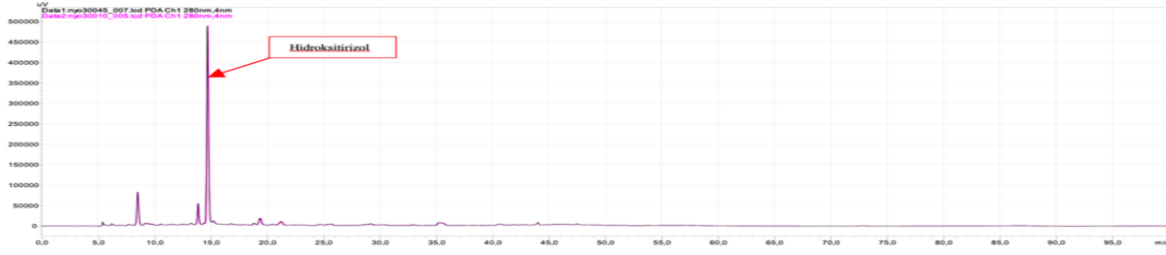
Elde edilen bulgular, proniozomların hidroksitirozol taşıyıcı sistemi olarak etkinliğinin yalnızca ekstrakt miktarına bağlı olmadığını, aynı zamanda proses parametreleri, özellikle ultrasantrifüj süresine duyarlı olduğunu göstermektedir. Uzun santrifüj sürelerinin vezikül bütünlüğünü bozarak kapsülleme verimliliğini olumsuz etkilediği sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.8. F₃₀₀ 45 dk ultrasantrifüj edilen ve F₃₀₀ 30 dk ultrasantrifüj edilen örneklere ait kromatogram görüntüsü

F₃₀₀ formülasyonu üzerinde gerçekleştirilen ultrasantrifüj süreleri kıyaslandığında, 10 dakikalık uygulamanın 45 dakikalık uygulamaya göre belirgin şekilde daha yüksek enkapsülasyon etkinliği (%) sağladığı görülmüştür (Şekil 4.9). 10 dakikalık santrifüj süresi, veziküllerin yapısal bütünlüğünü koruyarak hidroksitirozolün verimli şekilde yüklenmesine imkan tanımış ve yaklaşık %65– 68 civarında bir enkapsülasyon etkinliği (%) elde edilmiştir.

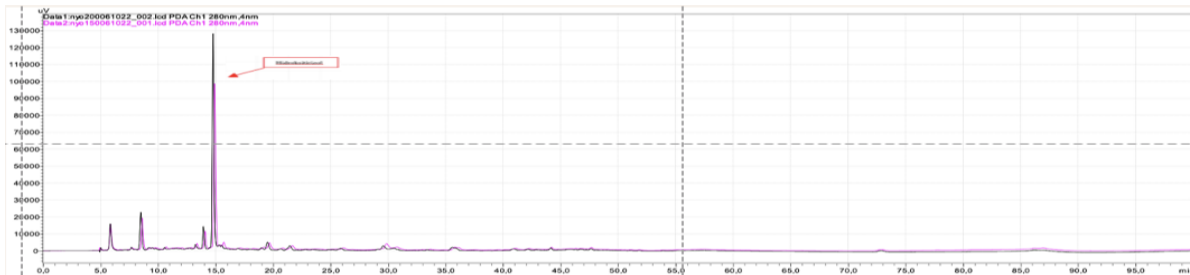
Buna karşın, 45 dakikalık uzun süreli santrifüj işlemi, yüksek hız ve basıncın etkisiyle veziküllerde deformasyon ve fragmantasyona yol açmış, hidroksitirozolün bir kısmı serbest faza geçmiştir. Bu durum, enkapsülasyon etkinliğinin (%) belirgin şekilde düşmesine neden olmuştur.



Şekil 4.9. F₃₀₀ 10 dk ultrasantrifüj edilen ve F₃₀₀ 45 dk ultrasantrifüj edilen örneklere ait kromatogram görüntüsü

F₂₀₀ ve F₁₅₀ formülasyonları, ekstrakt miktarının enkapsülasyon etkinliği (%) üzerindeki etkisini ortaya koymaktadır (Şekil 4.10). F₂₀₀, 200 mg ekstrakt içerirken yüksek bir enkapsülasyon etkinliği (%73,72) sağlamış, bu da hidroksitirozolün veziküller içerisinde etkin şekilde tutulduğunu ve lipid matriksin taşıma kapasitesi ile uyumlu olduğunu göstermektedir. Buna karşılık, F₁₅₀ formülasyonunda ekstrakt miktarının azalması, lipid–ekstrakt etkileşimleri açısından yeterli yoğunluğun oluşmamasına yol açmış ve bu nedenle enkapsülasyon etkinliği %8,74 gibi düşük bulunmuştur.

Bu sonuç, ekstrakt miktarının tek başına verimi belirlemediğini göstermektedir. Enkapsülasyon etkinliği (%), lipid matrisin taşıma kapasitesi, hidroksitirozolün fizikokimyasal özellikleri, lipid–ekstrakt etkileşimleri ve proses parametreleri (hidrasyon süresi, santrifüj hızı ve süresi) gibi faktörlerin ortak etkisiyle şekillenmektedir. Kromatogram analizleri, optimum enkapsülasyon için ekstrakt miktarının 200 mg ve ultrasantrifüj süresinin 10 dakika olarak belirlenmesini önermektedir; bu koşullar, veziküllerin yapısal bütünlüğünü korurken maksimum yükleme sağlanmasına olanak tanımaktadır. Daha uzun santrifüj sürelerinde yüksek hız ve basınç, veziküllerde deformasyon veya fragmentasyona yol açarak hidroksitirozolün serbest faza geçmesine ve verim düşüşüne neden olabilmektedir (Baghirova, 2022; Rezaei, Iranbakhsh, Sepahi, Mirzaei ve Larijani, 2024).



Şekil 4.10. F₂₀₀ ve F₁₅₀ örneklerine ait kromatogram görüntüsü

F₁₀₀ ve F₅₀ formülasyonları karşılaştırıldığında, ekstrakt miktarının düşük miktarlarda enkapsülasyon etkinliği (%) üzerinde belirgin etkisi görülmektedir (Şekil 4.11). F₁₀₀ formülasyonu, 100 mg ekstrakt içermesine rağmen lipid matriks ve hidroksitirozol arasındaki etkileşim yeterince yoğun olmadığından enkapsülasyon etkinliği (%) nispeten düşük bulunmuştur. F₅₀'de ekstrakt miktarının daha da azalması, veziküller içinde tutulan hidroksitirozolün minimum seviyede kalmasına yol açmış ve verim daha da düşmüştür. Bu durum, düşük ekstrakt miktarlarının veziküllerin taşıma kapasitesini tam olarak kullanamamasından kaynaklanmaktadır.

Bu sonuç, ekstrakt miktarının artırılmasının daha yüksek enkapsülasyon etkinliği (%) sağlamadığını göstermektedir. Düşük miktarlarda ekstrakt, lipid–ekstrakt etkileşimlerini yeterince destekleyemediği için veziküller etkin şekilde yüklenememekte, bu da verim kaybına yol açmaktadır. Bu bağlamda, minimum verim elde edilen F₅₀ ve F₁₀₀ örnekleri, lipid matriksin taşıma kapasitesini ve ekstrakt-lipid etkileşimlerinin önemini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.11. F₁₀₀ ve F₅₀ örneklerine ait kromatogram görüntüsü

Kolesterol içeren proniozom formülasyonları F₅₀– F₃₀₀ aralığında adlandırılmış olup, bu örnekler sistematik olarak belirlenen ekstrakt ve bileşen oranlarına göre hazırlanmış; verim ve vezikül bütünlüğü açısından karşılaştırılabilirlik sağlanmıştır. Örnek adlandırmalarındaki farklılık, deneysel sürecin iki aşamasını (ön deneme ve optimizasyon) ayırt etmek ve veri karşılaştırılabilirliğini korumak amacıyla uygulanmıştır. Sonuç olarak, F₂₀₀ formülasyonu ile elde edilen yüksek enkapsülasyon verimi, proniozom sistemlerinin hidroksitirozol gibi fenolik bileşikler için etkin bir taşıyıcı sistem olduğunu ortaya koymaktadır. Elde edilen veriler, formülasyon bileşenlerinin oranı ve işlem parametrelerinin (ultrasantrifüj süresi, hız ve sıcaklık) enkapsülasyon verimliliği ve vezikül bütünlüğü üzerinde belirleyici olduğunu göstermektedir.

Bu bulgular, proniozomların hidroksitirozol taşıyıcı sistemi olarak etkinliğinin yalnızca ekstrakt miktarına değil, aynı zamanda proses parametreleri, özellikle ultrasantrifüj süresine de bağlı olduğunu göstermektedir. Uzun santrifüj sürelerinin vezikül bütünlüğünü bozarak kapsülleme verimliliğini olumsuz etkilediği sonucuna varılmıştır.

Literatürde belirtildiği üzere, kolesterol konsantrasyonunun artışı bilayer yapıyı daha rijit ve kompakt hâle getirerek hidrofobik etkileşimleri güçlendirmekte ve böylece ilaç sızıntısını azaltmaktadır. Ancak kolesterol içeriği artışı, bilayer yapının bozulmasına yol açarak kapsülleme verimini olumsuz etkilemektedir. Elde edilen bulgular, maltodekstrin taşıyıcısının proniozomal sistemlerde etkin bir şekilde kullanılabileceğini ve proniozom hidrasyonu ile elde edilen niozomların yüksek kapsülleme verimi ve stabil yapısını desteklediğini göstermektedir (Gandra, 2020).

Proniozom formülasyonlarının optimizasyonu sürecinde, yüksek hidroksitirozol yüklemelerinde kolesterolün lipid çift katmanını sertleştirerek veziküllerin esnekliğini azaltılabileceği ve kapsülleme verimini sınırlandırabileceği gözlemlenmiştir. Bu nedenle, membran akışkanlığını ve elastikiyetini artırmak, veziküllerin deformasyona uğramadan yüksek miktarda hidroksitirozol taşımalarını sağlamak amacıyla kolesterol yerine uzun zincirli bir alkol olan dodekanol kullanılmıştır. Dodekanolün lipid matrise entegrasyonu, veziküllerin iç kısmının daha fazla fenolik bileşik taşımalarına olanak vererek enkapsülasyon etkinliğinin (%) artmasına katkıda bulunmuştur. Bu strateji, özellikle yüksek ekstrakt içeren formülasyonlarda proniozomların taşıma kapasitesini artırmak ve maksimum verimi elde etmek için tercih edilmiştir.

Bu doğrultuda, hidroksitirozolün verimli enkapsülasyonunu desteklemek amacıyla kolesterol yerine dodekanol kullanılarak alternatif proniozomal formülasyonlar geliştirilmiş ve bu yeni seriye “Proniozom, P” adlandırılması yapılmıştır. Literatürde, dodekanol ve benzeri uzun zincirli lipofilik alkollerin Span 60 ile kombinasyonlarında, veziküllerin membran sertliği ve stabilitesinin arttığı; böylece fenolik bileşiklerin difüzyonunun sınırlandırarak enkapsülasyon veriminin optimize edildiği rapor edilmiştir (Pando, Matos, Gutierrez ve Pazos, 2015; Machado ve diğerleri, 2021). Bu yaklaşım, hidroksitirozolün proniozomal sistemlerde stabil ve verimli bir şekilde kapsüllemesini sağlamaktadır.

4.2.2. Kolesterol yerine dodekanol içerikli proniozom formülasyonlarının karakterizasyon ve optimizasyon sonuçları

Kolesterol yerine dodekanol kullanılan proniozom formülasyonlarının bileşim ve üretim parametreleri Tablo 4.3'te özetlenmiştir.

Formülasyonlarda S60 ve dodekanol oranları değiştirilmiştir; örneğin P1'de (1:0,5) 49,28 mg S60 ve 23 µl dodekanol kullanılırken, P2 ve P3'te 1:1 oranı uygulanmıştır. Bu oranlar, veziküllerin membran akışkanlığı ve elastikiyetini etkileyerek hidroksitirozolün kapsüllenme verimliliğinde kritik rol oynamaktadır. Çözücü olarak çoğunlukla 10 mL etanol veya etanol/su karışımı tercih edilmiş, maltodekstrin ise proniozom tozunun yapısal bütünlüğünü destekleyerek veziküllerin kurutulması ve depolanması sırasında stabil kalmasını sağlamıştır. Formülasyonların bazıları 200 mg hidroksitirozol içerirken bazıları ekstraksız hazırlanmış, bu yaklaşım ekstrakt miktarının enkapsülasyon etkinliği ve vezikül stabilitesi üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla uygulanmıştır.

Tablo 4.3. Proniozomlara ait partikül büyüklüğü değerleri

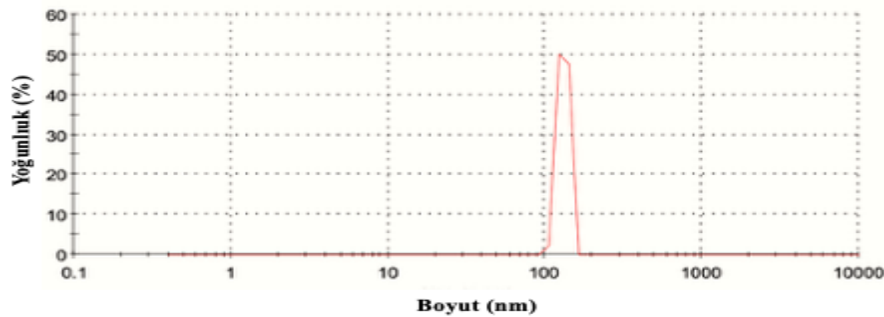
Örnek no	Partikül büyüklüğü (nm)	
	Yoğunluk (%100)	Polidispersidite İndeksi (PDI)
P1 (1:0,5)	148,77±5,39	0,949
P2 (1:1)	118,7±34,50	0,319
P3 (1:1)	62,8±6,53	0,236
P4 (1:0,5)	133,4±6,17	0,312
P5 (1:0,5)	159,8±56,59	0,420
P6 (1:0,5)	131,2±10,36	0,481
P7 (1:1)	189,0±48,23	0,474
P8 (1:1)	184,3±43,36	0,442
P9 (1:1,5)	166,0±27,17	0,426
P10 (1:1,5)	131,6± 23,87	0,608

Evaporasyon süreci ise P1–P3 için 40 rpm'de 40 °C'de 4 dk, P4– P6 için 40 rpm'de 30 °C'de 5 dk olarak belirlenmiş, bu parametreler lipid karışımının maltodekstrin üzerinde düzgün bir film oluşturmasını ve proniozomların homojen bir şekilde elde edilmesini sağlamıştır. Sonuç

olarak, S60/dodekanol oranı, ekstrakt miktarı, çözücü tipi ve evaporasyon koşulları, proniozomların fizikokimyasal özellikleri ve hidroksitirozolün verimli şekilde enkapsülasyonu üzerinde belirleyici faktörler olarak öne çıkmaktadır.

P1– P10 proniozom formülasyonlarının partikül boyutu ve dağılım homojenliği (PDI) incelendiğinde, S60:dodekanol oranı ve ekstrakt yüklemesinin fizikokimyasal özellikler üzerinde belirleyici olduğu görülmüştür. Örneğin, 1:0,5 oranına sahip P4– P6 formülasyonları, partikül boyutu açısından ortalama 131– 159 nm aralığında ve PDI değerleri 0,312– 0,481 olarak ölçülmüş, böylece nispeten homojen dağılım göstermiştir. Buna karşılık 1:1 veya 1:1,5 oranındaki formülasyonlarda (P7– P10) partikül boyutu artmış (166– 189 nm) ve PDI değerleri 0,426– 0,608 aralığında ölçülerek dağılımda heterojenlik artmıştır. Bu durum, daha yüksek dodekanol oranlarının vezikül yapısında genişleme ve heterojenleşmeye yol açtığını göstermektedir. Ekstrakt yüklemesi de boyut ve dağılımı etkilemiş; ekstrakt içeren formülasyonlarda partikül boyutu artarken, homojenlik nispeten düşmüştür. Sonuç olarak, 1:0,5 oranına sahip formülasyonlar hem daha küçük hem de daha homojen partiküller üreterek yüksek verimli proniozom sistemleri için daha uygun bir oran olarak öne çıkmaktadır.

P4 formülasyonu (Şekil 4.12), P4– P6 serisi proniozomlar arasında hem küçük partikül boyutu ($133,4 \pm 6,17$ nm) hem de düşük polidispersidite indeksi (PDI 0,312) ile öne çıkmıştır. Bu özellikler, veziküllerin homojen dağıldığını ve stabil bir yapı sergilediğini göstermektedir. Bu bulgular, P4'ün hem fiziksel stabilite hem de yükleme kapasitesi açısından proniozom üretiminde dengeli ve verimli bir formülasyon olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 4.12. P4 örneğine ait partikül boyutu analiz sonucu

Proniozom formülasyonlarında kullanılan çözgen sistemlerinin etkisi, partikül boyutu, dağılım homojenliği ve enkapsülasyon etkinliği (%) açısından incelenmiştir. Saf etanol kullanılan formülasyonlar (P1– P3), lipofilik bileşenlerin çözünmesini optimize ederek ince tabakalı lipid film oluşumunu desteklemiş ve özellikle P3'te $62,8 \pm 6,53$ nm gibi küçük partikül boyutu ve düşük PDI (0,236) elde edilmiştir. Ancak saf etanol, hidrofilik bileşenlerin çözünürlüğünü sınırladığı için bazı formülasyonlarda yükleme kapasitesi kısıtlanmıştır.

Buna karşın etanol-su karışımı kullanılan formülasyonlar (P4– P10), hem lipofilik hem de hidrofilik bileşenlerin çözünmesini sağlayarak proniozomların verimli bir şekilde yüklenmesini mümkün kılmıştır. Örneğin, P4 formülasyonu $133,4 \pm 6,17$ nm boyut ve PDI 0,312 değerleri ile hem yapısal bütünlük hem de düşük polidispersiditeyi koruyarak yüksek enkapsülasyon etkinliği (%) sağlamıştır. Etanol-su çözgen sistemi, lipidlerin kontrollü bir şekilde hidrasyonunu ve vezikül oluşumunu destekleyerek stabil ve dengeli proniozomlar elde edilmesini kolaylaştırmıştır.

Bu bulgular, saf etanolün daha küçük ve homojen partiküller üretmek için uygun olduğunu, ancak hidroksitirozol gibi suda çözünebilen fenolik bileşiklerin etkin yüklenmesi için etanol-su karışımlarının tercih edilmesinin optimal sonuç verdiğini göstermektedir. Bu nedenle, özellikle yüksek ekstrakt içeren formülasyonlarda etanol- su çözgeni kullanımı, proniozomların taşıma kapasitesini ve enkapsülasyon verimliliğini artırmıştır.

4.2.3. Nihai proniozomal formülasyonun rotavapor ve proses parametreleri bazında optimizasyon sonuçları

Önceki analizler ve deneme üretimleri, hidroksitirozolün proniozomlarda etkin şekilde taşınabilmesi için ekstrakt miktarı, lipid-alkol oranı ve proses parametrelerinin kritik olduğunu göstermiştir. Bu bulgular doğrultusunda, proniozomların fiziksel stabilitesi ve enkapsülasyon etkinliğini optimize etmek amacıyla nihai formülasyonun üretim koşulları detaylı olarak değerlendirilmiştir.

Evaporasyon süresi, sıcaklık ve rotasyon hızı gibi parametrelerin vezikül boyutu, polidispersidite indeksi ve hidroksitirozol yükleme kapasitesi üzerindeki etkisi incelenmiş; böylece, önceki denemelerde belirlenen en uygun ekstrakt-lipid oranı ve dodekanol kullanımı ile birlikte, proniozom üretiminde maksimum verim elde edilmesi hedeflenmiştir.

P4 (1:0,5) formülasyonu, P4– P6 serisi arasında hem küçük partikül boyutu ($133,4 \pm 6,17$ nm) hem de düşük polidispersidite indeksi (PDI 0,312) ile öne çıkmıştır. Bu özellikler, veziküllerin homojen dağıldığını ve stabil bir yapı sergilediğini göstermektedir. Ayrıca, hidroksitirozol yüklemesi açısından da P4, diğer serilere kıyasla daha yüksek enkapsülasyon etkinliği (%) sağlamış ve proniozom yapısında fenolik bileşiğin etkin şekilde tutulmasına olanak tanımıştır.

Örneğin P4.1 ve P4.2’de 30 °C’de 40 rpm ile 4 dk, P4.3’te 30 °C’de 30 rpm ile 7 dk, P4.4’te 30 °C’de 50 rpm ile 6,25 dk uygulanmıştır. Diğer varyantlarda sıcaklık, hız ve süre değerleri sistematik olarak değiştirilmiş, kontrol örneğinde ise 30 °C, 40 rpm ve 5 dk koşulları kullanılmıştır. Bu yaklaşım, proses parametrelerinin P4 formülasyonu üzerindeki etkilerini anlamak ve optimal evaporasyon koşullarını belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Evaporasyon optimizasyonu sonuçları, P4 formülasyonunun 30 °C, 50 rpm ve 6,25 dk koşullarında hem düşük partikül boyutu ($133,4 \pm 6,17$ nm) hem de düşük PDI (0,312) ile dengeli ve stabil bir proniozom yapısı sunduğunu ortaya koymuştur.

Bu koşullar altında, hidroksitirozolün proniozom içinde etkin şekilde tutulduğu ve yüksek enkapsülasyon etkinliği (%) elde edildiği gözlenmiştir. Daha düşük veya daha yüksek sıcaklık ve rotasyon hızı kombinasyonlarında, partikül boyutu ve PDI değerlerinde belirgin farklılıklar oluşmuş, bu da veziküllerin homojen dağılımını ve kapsülleme verimliliğini sınırlamıştır.

Dolayısıyla, hidroksitirozol yüklemesinin proniozomlarda enkapsülasyon etkinliği (%) üzerindeki etkisinin tam olarak anlaşılabilmesi için yalnızca HPLC analiz sonuçları değil; partikül boyutu dağılımı, zeta potansiyeli ve süpernatanttaki serbest hidroksitirozol miktarı gibi ek parametrelerin de dikkate alınması gerekmektedir. Elde edilen bulgular, maksimum enkapsülasyonun yalnızca ekstrakt miktarının artırılmasıyla değil, aynı zamanda lipid kompozisyonu ve proses optimizasyonunun bir arada yürütülmesiyle sağlanabileceğini göstermektedir.

Bu nedenle, nihai proniozomal formülasyonun optimizasyonu sürecinde P4 formülasyonu seçilmiştir. Optimizasyon sürecinde, rotavapor evaporasyon koşulları sistematik olarak değerlendirilmiş ve sıcaklık, rotasyon hızı ile sürenin proniozomların fizikokimyasal özellikleri üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Bu parametreler, partikül boyutu, polidispersidite indeksi (PDI), zeta potansiyel değeri ve enkapsülasyon etkinliği (%) açısından analiz edilmiştir. Elde edilen veriler, her bir proses koşulunun P4 formülasyonu üzerindeki etkisini ortaya koyarak, optimal evaporasyon koşullarının belirlenmesine olanak sağlamıştır (Tablo 4.3).

Tablo 4.4'te P_{4.1}– P_{4.15} örneklerinin karakterizasyon sonuçları, enkapsülasyon etkinliği (%), zeta potansiyel, partikül boyutu ve polidispersidite indeksi (PDI) açısından değerlendirilmiştir.

Tablo 4.4. Proniozom formülasyonlarının ürün geri kazanımı ve formülasyonların hidrasyonu ile elde edilen niozomların karakterizasyon özellikleri

Örnekler	Enkapsülasyon etkinliği (%) $\pm$ SS*	Zeta potansiyel (mV) $\pm$ SS*	Partikül boyutu (nm) $\pm$ SS*	PDI $\pm$ SS*
P _{4.1}	62,51 $\pm$ 0,15	-33,27 $\pm$ 1,10	209,70 $\pm$ 7,50	0,322 $\pm$ 0,04
P _{4.2}	59,52 $\pm$ 1,29	-33,27 $\pm$ 1,10	231,43 $\pm$ 23,72	0,400 $\pm$ 0,04
P _{4.3}	55,02 $\pm$ 1,37	-33,80 $\pm$ 2,76	205,27 $\pm$ 9,47	0,282 $\pm$ 0,01
P _{4.4}	52,45 $\pm$ 1,45	-40,10 $\pm$ 1,52	219,93 $\pm$ 7,67	0,446 $\pm$ 0,04
P _{4.5}	77,30 $\pm$ 0,19	-33,80 $\pm$ 2,76	248,9 $\pm$ 52,76	0,347 $\pm$ 0,16
P _{4.6}	77,87 $\pm$ 0,23	-33,80 $\pm$ 2,76	244,7 $\pm$ 61,69	0,421 $\pm$ 0,15
P _{4.7}	67,02 $\pm$ 1,00	-26,50 $\pm$ 1,95	218,03 $\pm$ 23,74	0,421 $\pm$ 0,11
P _{4.8}	64,80 $\pm$ 0,78	-26,50 $\pm$ 1,95	205,47 $\pm$ 19,48	0,335 $\pm$ 0,08
P _{4.9}	72,06 $\pm$ 0,30	-30,20 $\pm$ 1,87	188,60 $\pm$ 9,56	0,399 $\pm$ 0,04
P _{4.10}	80,40 $\pm$ 0,94	-32,30 $\pm$ 1,13	205,43 $\pm$ 17,26	0,411 $\pm$ 0,05
P _{4.11}	78,88 $\pm$ 0,79	-32,10 $\pm$ 1,06	209,53 $\pm$ 8,42	0,470 $\pm$ 0,07
P _{4.12}	57,06 $\pm$ 0,62	-32,03 $\pm$ 1,20	244,23 $\pm$ 51,15	0,344 $\pm$ 0,09
P _{4.13}	66,21 $\pm$ 0,34	-30,27 $\pm$ 1,87	241,17 $\pm$ 56,68	0,402 $\pm$ 0,13
P _{4.14}	61,21 $\pm$ 0,80	-30,27 $\pm$ 1,87	220,10 $\pm$ 46,09	0,423 $\pm$ 0,04
P _{4.15}	69,50 $\pm$ 0,96	-33,07 $\pm$ 1,06	195,47 $\pm$ 9,28	0,313 $\pm$ 0,13
Kontrol	-	-	208,70 $\pm$ 45,49	0,375 $\pm$ 0,04

*SS: Standart sapma, PDI: Polidispersidite indeksi, nm: nanometre, mV: milivolt

Keskin ve diğerleri (2024), zeytin yaprağı ekstraktında hidroksitirozol içeriğini 0,31 mg/g olarak belirlemiş ve fitozomal kapsüllenen ekstraktın enkapsülasyon etkinliğini %66,24 olarak rapor etmiştir. Bu bulgu, proniozomal sistemlerin hidroksitirozolün kararlılığını artırmada etkin olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, ultrason destekli ekstraksiyon ile elde edilen kurutulmuş ekstrakttaki 35,25 mg/g hidroksitirozol, mikroküre ve nanokapsüllerde sırasıyla 3,14 mg/g ve 2,13 mg/g olarak tespit edilmiştir. Bu durum, kapsülleme sırasında sıcaklığın hidroksitirozolün kararlılığını azaltabildiğini ve bu hassas bileşiğin kolaylıkla bozulabileceğini ortaya koymaktadır. Toplam fenolik madde bakımından yapılan değerlendirmelerde, en yüksek enkapsülasyon etkinliği (%71,42) maltodekstrin duvar materyali kullanılan formülasyonlarda elde edilmiştir; bu da maltodekstrinin uygun bir duvar materyali olduğunu, ancak hidroksitirozol kapsülleme yönteminin geliştirilmesinin gerekli olduğunu göstermektedir (Ciont ve diğerleri, 2023).

DLS ölçümleri, proniozom örneklerinin hidrofobik ve hidrofilik bileşenlerinin oluşturduğu dispersiyon içindeki parçacık boyutu ve dağılımının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Ölçümler 25 °C’de, su dispersantı kullanılarak ve 50 saniye süren analizler ile yapılmıştır. Malzeme ve dispersantın kırılma indeksleri sırasıyla 1,53 ve 1,330 olarak alınmış, viskozite 0,8872 cP olarak kaydedilmiştir. Ölçüm sırasında sayım oranı 116 kcps, ölçüm pozisyonu ise 4,65 mm olarak belirlenmiştir. Tek kullanımlık küvet kullanılarak gerçekleştirilen bu DLS çalışması, proniozomların partikül boyutu ve polidispersidite indeksi (PDI) değerlerinin değerlendirilmesinde temel bir referans sağlamıştır ve enkapsülasyon etkinliği (%) ile birlikte yorumlanmıştır.

Zeta potansiyel değerleri, proniozomların elektrostatik stabilitesini yansıtmaktadır. Zeta potansiyel ölçümleri, 25 °C’de su dispersantı kullanılarak tek kullanımlık ölçüm küveti içinde 4,65 mm pozisyonunda, 50 s süre ile yapılmış ve ölçüm sırasında cihazın attüenüatörü 11 olarak ayarlanmıştır. Örnekler arasında en yüksek negatif yük P₄ (-40,10 ± 1,52 mV) formülasyonunda belirlenmiştir; diğer yüksek enkapsülasyon etkinliğine sahip örnekler (P₁₀, P₁₁) yaklaşık -32 mV değerleri göstermiştir. Zeta potansiyelinin ±30 mV sınırının dışında olması, veziküllerin agregasyon ve füzyona karşı stabil olduğunu ortaya koymaktadır.

Partikül boyutu açısından P₉ en küçük partikül boyutuna (188,60 ± 9,56 nm) sahipken, P₅ ve P₆ daha büyük partiküller (248,9 ± 52,76 nm ve 244,7 ± 61,69 nm) oluşturmuştur. Düşük PDI

değerleri (örn. $P_1 0,322 \pm 0,04$; $P_8 0,335 \pm 0,08$) homojen dağılımı ve vezikül stabilitesini desteklerken, yüksek PDI değerleri ($P_{11} 0,470 \pm 0,07$) dispersiyonun heterojen olduğunu ve olası aglomerasyonu işaret etmektedir.

Bu bulgular, yüksek enkapsülasyon etkinliğine sahip proniozom formülasyonlarının hem uygun zeta potansiyel değerlerine sahip olduğunu hem de partikül boyutu ve PDI açısından dengeli bir dağılım sunduğunu göstermektedir. Özellikle, 30°C sıcaklık ve 50 rpm rotasyon hızıyla üretilen $P_{4.10}$ ve $P_{4.11}$ proniozomları, $-32,30 \pm 1,13$ mV ve $-32,10 \pm 1,06$ mV zeta potansiyel değerleri ile elektrostatik stabiliteyi ve yüksek enkapsülasyon etkinliğini sağlamıştır.

Veziküllerin yüzeyinde bulunan katyonik ve anyonik fosfolipidler, sağladıkları elektrostatik yük sayesinde zeta potansiyel değerlerinin $> +30$ mV veya < -30 mV aralığında olmasını sağlar; bu durum agregasyon, füzyon ve sedimentasyon gibi istenmeyen olayların önlenmesine katkıda bulunmaktadır. Veziküllerin yüzeyinde bulunan katyonik ve anyonik fosfolipidler, elektrostatik yük sayesinde agregasyon, füzyon ve sedimentasyon riskini minimize etmekte; formülasyona eklenen biopolimerler ve uygulanan mekanik güçler ise proniozomların stabilitesini artırmaktadır (Jalali-Jivan ve diğerleri, 2022).

Khudair ve diğerleri (2020) çalışmasında, letrozol yüklü proniozom formülasyonlarında farklı taşıyıcı ve lipid fazlar kullanılmıştır; ayrıca bazı formülasyonlarda kolesterol ve çeşitli yüzey aktif maddeler eklenerek stabilite ve zeta potansiyel üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çalışma sonuçları, tüm formülasyonların negatif zeta potansiyel gösterdiğini ve taşıyıcı ile lipid faz türünün bu değere anlamlı bir etkisinin bulunmadığını ortaya koymuştur. Bu bulgular, proniozomların yüzey yükü ve stabilitesinin yalnızca taşıyıcı veya lipid faz türüne değil, eklenen yardımcı bileşenler ve formülasyon parametrelerinin kombinasyonuna bağlı olarak şekillendiğini göstermektedir. Böylece, proniozom dispersiyonlarının kararlılığı üzerinde etkili olan faktörlerin çok boyutlu olduğu ve tek bir bileşenin etkisiyle belirlenemeyeceği anlaşılmaktadır.

Bu çalışmada, hidroksitirozol içeriği zenginleştirilmiş ekstrakt, lipid faz ve monomer fazdan oluşan bir emülsiyon aracılığıyla nanoenkapsülasyon için tasarlanmıştır. Dodekanol, Span 60 ve etanol kullanılarak hazırlanan emülsiyonda maltodekstrin, yardımcı iyonik olmayan yüzey aktif madde olarak entegre edilmiştir. Lipidik partiküllerin nano ölçekli yapısı ve ekstraktı

kapsülleme özellikleri karakterize edilmiş; elde edilen sonuçlar, P₄ formülasyonunun hem fiziksel stabilite hem de yüksek enkapsülasyon verimi açısından optimal bir proniozom örneği olduğunu ortaya koymuştur.

4.3. Optimum Koşullarda Üretilen Proniozomal Formülasyonun Karakterizasyonu

Optimum koşulları belirlenerek seçilen P₄ proniozomal formülasyonu, hidroksitirozol biyoaktif içeriğinin stabilizasyonu ve vezikül yapı özelliklerinin değerlendirilmesi amacıyla üretilmiştir. Üretim üç farklı günde tekrarlanmış ve farklı günlerde üretilen veziküllerin fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerini kapsamlı olarak belirlemek amacıyla çoklu karakterizasyon analizleri uygulanmıştır. Partikül boyutu dağılımı ve polidispersidite indeksi (PDI) ile veziküllerin homojenliği ve dispersiyon stabilitesi, zeta potansiyel ölçümleri ile elektrostatik stabilitesi değerlendirilmiş, SEM ve AFM görüntülemeleri ile morfolojik yapılar incelenmiştir. Ayrıca, FTIR analizi ile proniozom matrisi ve hidroksitirozol arasındaki potansiyel etkileşimler, XRD ve DSC analizleri ile kristal yapı ve termal davranışlar belirlenmiştir. Formülasyonun biyolojik fonksiyonları kapsamında antioksidan kapasite (DPPH ve ABTS) ve antimikrobiyal etkinlik testleri gerçekleştirilmiş; depolama çalışmaları ile uzun dönem stabilite ve biyoaktif içerik korunumu değerlendirilmiştir.

4.3.1. Partikül boyutu ve polidispersidite indeksinin belirlenmesi

Belirlenen yöntem çerçevesinde, üretim işlemi üç farklı günde tekrarlanmış ve bu süreç, proniozomların stabil vezikül yapısına sahip bir niozom dispersiyonu oluşturmasını sağlamıştır. P₁, P₂ ve P₃ üretim günlerine göre elde edilen proniozomların partikül boyutları ve polidispersidite indeksi (PDI), üretim sürecinin tekrarlanabilirliğini ve formülasyonların homojen dağılımını değerlendirmek amacıyla Tablo 4.5'te özetlenmiştir.

Tablo 4.5. Proniozomların üretim günlerine göre ortalama partikül boyutu ve polidispersidite indeksi

Örnekler	Partikül boyutu $\pm$ SS* (nm)	PDI $\pm$ SS*
P_1	225,47 $\pm$ 9,40	0,211 $\pm$ 0,05
P_2	211,57 $\pm$ 5,08	0,269 $\pm$ 0,03
P_3	221,47 $\pm$ 2,70	0,235 $\pm$ 0,01
Kontrol	162,40 $\pm$ 0,70	0,442 $\pm$ 0,05
Ortalama $\pm$ SS*	219,50 $\pm$ 5,72	0,238 $\pm$ 0,03

*SS: Standart sapma, PDI: polidispersidites indeksi, nm: nanometre

P_1, P_2 ve P_3 formülasyonlarının ortalama partikül boyutları sırasıyla 225,47 $\pm$ 9,40 nm, 211,57 $\pm$ 5,08 nm ve 221,47 $\pm$ 2,70 nm olarak bulunmuştur; kontrol sistemde ise ortalama partikül boyutu 162,40 $\pm$ 0,70 nm olarak ölçülmüştür. Polidispersidite indeksleri (PDI) üretim günlerine göre P_1 için 0,211 $\pm$ 0,05, P_2 için 0,269 $\pm$ 0,03 ve P_3 için 0,235 $\pm$ 0,01 olarak belirlenmiş, kontrol örneğinde ise 0,442 $\pm$ 0,05 değerinde ölçülmüştür. Tüm üretim günlerinin ortalaması dikkate alındığında, proniozomların ortalama partikül boyutu 219,50 $\pm$ 5,72 nm ve PDI değeri 0,238 $\pm$ 0,03 olarak bulunmuştur.

İstatistiksel analizler, üretim günleri arasında partikül boyutu ve PDI açısından anlamlı bir farklılık olmadığını göstermiştir ($p > 0,05$). Bununla birlikte, proniozom formülasyonları kontrol sistemle karşılaştırıldığında hem daha büyük partikül boyutuna hem de daha düşük PDI değerine sahip olup, daha homojen ve stabil vezikül dispersiyonu oluşturduğu görülmüştür.

Bu tez çalışmasında, maltodekstrin taşıyıcısı kullanılarak hazırlanan proniozomların hidrasyonu ile elde edilen niozomların ortalama boyutu 219,50 $\pm$ 5,72 nm ve polidispersidite indeksi 0,238 $\pm$ 0,03 olarak belirlenmiştir. Bu değerler, Ravaghi ve diğerlerinin (2017) maltodekstrin taşıyıcısı ile üretilen niozomlarda gözlemlendiği 207 $\pm$ 28 nm ortalama boyut ve PDI 0,15 $\pm$ 0,05 ile karşılaştırıldığında, boyut açısından benzerlik göstermekte ancak PDI değeri daha yüksek olup, bu da hafifçe daha geniş bir boyut dağılımını işaret etmektedir. Bu farklılık, çalışmalarda kullanılan proniozom formülasyon parametreleri, yüzey aktif madde tipi ve konsantrasyonu, ekstrakt yükü ve üretim koşullarındaki küçük değişikliklerden kaynaklanabilir. Bununla birlikte, her iki çalışma da maltodekstrin taşıyıcısının nispeten yüksek molekül ağırlığı ve viskozitesinin niozom boyutunu artırdığını ve taşıyıcı özelliklerinin vezikül

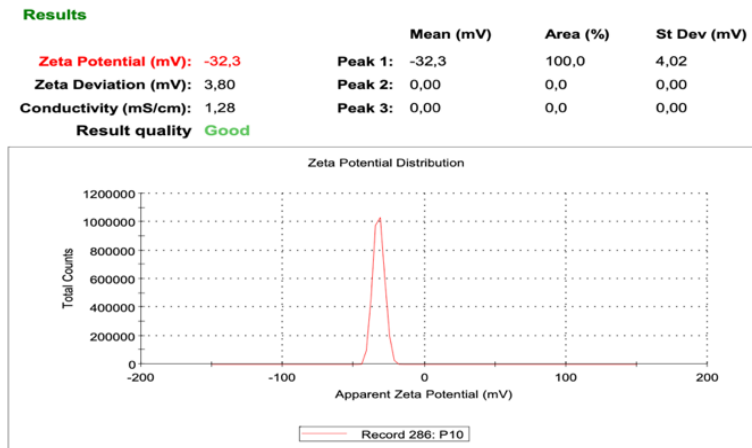
homojenliği üzerinde belirleyici rol oynadığını göstermektedir. Bu bulgular, maltodekstrin kullanılarak hazırlanan proniozomların hidrasyonu ile elde edilen niozomların küçük ile orta boyutlu ve homojen dağılımlı yapısını desteklemektedir.

Bulgular, proniozom taşıyıcısının fizikokimyasal özelliklerinin niozom boyutu ve dağılımı üzerinde kritik rol oynadığını desteklemektedir. Maltodekstrin bazlı niozomların daha büyük boyutlu olması, formülasyon stabilitesi ve kapsülleme kapasitesi açısından avantajlıdır; çünkü daha büyük veziküller, sulu çekirdekte daha yüksek hacimde etkin madde depolanmasına imkân sağlamaktadır.

4.3.2. Zeta potansiyel analiz sonuçlarının değerlendirilmesi

Zeta potansiyeli, parçacıkların yüzey yükünün önemli bir göstergesidir ve kolloidal süspansiyonların kararlılığını tahmin etmek için kullanılır (Saputra Dzakwan ve Dewi, 2020). Yüksek zeta potansiyeline sahip parçacıklar içeren kolloidler elektriksel olarak kararlıdır, buna karşın düşük zeta potansiyeli değerlerine sahip olanlar pıhtılaşmaya veya agregasyona karşı oldukça hassastır (Zhang ve diğerleri, 2013).

Şekil 4.14, proniozoma ait zeta potansiyel dağılımını göstermekte olup, veziküllerin homojen elektrostatik dağılımının ve stabil yapısının görsel olarak doğrulanmasını sağlamaktadır. Bu sonuçlar, P4 serisi proniozomların hidroksitirozol taşıyıcı sistemlerinde optimal performans sergilediğini teknik olarak doğrulamaktadır.



Şekil 4.13. Proniozom örneğine ait zeta potansiyel değeri

Elmi ve diğerkleri (2021), niozom formülasyonlarının veziküller üzerinde etkili olduğunu ve stabilizatör kullanımının vezikül boyutunu artırdığını bildirmişlerdir. Pando Gutierrez, Coca ve Pazos (2013), niozomlara uygulanan homojenizasyon işleminin hızı ile niozom vezikül boyutunun ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır. Zeta potansiyel; niozomların yüzey yükünü ve dolayısıyla agregasyon ve füzyona karşı stabilitesini belirlemek için önemli bir parametredir. Zeta potansiyel değeri parçacığın içinde bulunduğu dispersantın yüzeyine olan uzaklığını belirtmektedir (Sezgin-Bayındır, Antep ve Yüksel, 2015). Veziküller arasındaki boşlukta bulunan yüklerin +30mV ve -30 mV yüksek değerlerde olması veziküllerin kararlı yapıda olduğunu göstermektedir (Clogston ve Patri, 2010).

Khudair ve diğerklerinin 2020 yılında gerçekleştirdiği araştırmada, sorbitol bazlı proniozomların geleneksel niozomlara (yaklaşık 180 nm ortalama partikül boyutu) ve sakkaroz bazlı proniozomlara (yaklaşık 160 nm) kıyasla daha büyük partikül boyutlarına sahip niozomlar (yaklaşık 210 nm) oluşturduğu belirtilmiştir. Araştırmada tüm niozom formülasyonlarının zeta potansiyel değerlerinin -23 mV ile -40 mV arasında değişen negatif değerlere sahip olduğu gözlemlenmiş, bu durumun taşıyıcı faz tipi ve lipid bileşiminden bağımsız olarak elektrostatik stabilitenin korunduğuna işaret ettiği vurgulanmıştır. Ayrıca, yüzey aktif madde konsantrasyonundaki artışın partikül boyutunu yaklaşık 210 nm'den 150 nm'ye düşürdüğü, ancak zeta potansiyel değerlerinde belirgin bir değişim yaratmadığı ifade edilmiştir. Bu bulgular, proniozomal sistemlerin fizikokimyasal özelliklerinin, taşıyıcı faz ve yüzey aktif madde oranının titiz bir şekilde optimize edilmesine bağlı olduğunu ortaya koymaktadır.

Çalışmada elde edilen zeta potansiyel değerleri (-26,50±1,87 mV ile -40,10±1,52 mV) ve partikül boyutları, Khudair ve diğerklerinin (2020), bildirdiği verilerle tutarlılık göstermiştir. Bu durum, taşıyıcı faz ile lipid bileşenlerinin proniozomal sistemlerin kolloidal stabilitesi ve partikül boyutunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını desteklemektedir.

Zeta potansiyeli, proniozomlar da dâhil olmak üzere kolloidal veziküler taşıyıcıların fiziksel stabilitesini belirleyen kritik bir parametredir. Shah ve diğerkleri (2020) çalışmalarında hazırlanan proniozomların elektrokinetik potansiyeli -29 mV ile -42 mV arasında değişmiş; Tween bazlı formülasyonlar Span bazlı formülasyonlara kıyasla daha düşük zeta potansiyel değerleri göstermiştir (-29 mV ile -31 mV; -32 mV ile -42 mV).

Bu sonuç, yüzey aktif maddelerin artan hidrofobikliğinin proniozom zeta potansiyelini artırdığı yönündeki önceki çalışmalarla uyumludur. Span bazlı proniozomların zeta potansiyel dağılımı $-37,9 \pm 2,6$ mV olarak ölçülmüş ve tüm formülasyonların negatif zeta potansiyele sahip olduğu, bunun da negatif yüklü fosfolipitler ve kolesterolün dahil edilmesinden kaynaklandığı belirlenmiştir. Klasik elektriksel çift tabaka teorisine göre, ± 30 mV'nin üzerindeki zeta potansiyel değerleri benzer yüklü partiküller arasında orta düzeyde itme kuvveti oluşturarak flokülasyon veya agregasyonu azaltmakta ve dispersiyonun stabilizasyonuna katkı sağlamaktadır. Bu nedenle, gözlenen değerler veziküller arasında yeterli elektrostatik itme ve stabilizasyon sağlamak için yeterince yüksek bulunmuştur.

4.3.3. Enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi

Proniozomların hidrasyonu ile elde edilen niozomlardaki etken maddenin geri kazanımı, üç farklı günde tekerrürlü olarak üretilen proniozomal tozların enkapsülasyon etkinliğinin hesaplanmasıyla değerlendirilmiştir (Tablo 4.6).

Üç farklı üretim günü boyunca elde edilen P_1, P_2 ve P_3 örneklerinin enkapsülasyon etkinlikleri sırasıyla %80,40, %81,99 ve %81,22 olarak ölçülmüştür. Hesaplanan %95 güven aralığı %79,21–83,19 olup, düşük standart sapma değeri, üretim sürecinin tekrarlanabilirliğini ve proniozom formülasyonlarının homojenliğini göstermiştir. Bu sonuçlar, *Lb. plantarum* ATCC 14917 ile fermente edilmiş zeytin yaprağı sıvı ekstraktının proniozomal sistemlerde etkin bir şekilde kapsüllenebildiğini ve sistemin kontrollü salım potansiyeli için uygun olduğunu ortaya koymuştur.

Tablo 4.6. Proniozomların enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi

Örnek adı	Enkapsülasyon etkinliği (%)
P_1	80,40
P_2	81,99
P_3	81,22
Ortalama	81,20
Standart Sapma	0,80

Bu tez çalışmasında, maltodekstrin taşıyıcısı kullanılarak hazırlanan proniozomların hidrasyonu ile elde edilen niozomlarda enkapsülasyon verimi $81,20 \pm 0,80$ olarak belirlenmiştir. Çeşitli biyoaktif bileşiklerin proniozom yapılarında enkapsülasyonu literatürde

rapor edilmiştir. Rosuvastatin kalsiyum içeren maltodekstrin bazlı proniozomal formülasyonlarda elde edilen kapsülleme verimi %75–88 aralığında olup, bu çalışma ile uyumlu sonuçlar göstermektedir. Bu yüksek kapsülleme verimi, proniozom formülasyon parametrelerinin ilacın lipofilik yapısına uygun şekilde optimize edilmesinden kaynaklanmakta ve kolesterol konsantrasyonunun artırılmasıyla membranlardaki hidrofobik etkileşimlerin güçlenmesi sayesinde ilacın sızmasını azaltarak kapsülleme etkinliğinin yükselmesini sağlamaktadır (Gandra, 2020). De Leo ve diğerleri (2023), lipozomal sistemlerde hidroksitirozol ve kurkuminin enkapsülasyon verimlerini sırasıyla %70 ve %87 olarak rapor etmişlerdir. Hidroksitirozolün amfipatik yapısı, yani molekülün hem su ile etkileşen polar gruplara (hidrofilik kısmı) hem de lipidlerle etkileşen hidrofobik bölgelere sahip olması, onun hem fosfolipit membran içinde hem de su-lipid arayüzünde yer almasına olanak sağlamaktadır. Bu özellik, kurkuminin aynı bölgelerde kapsüllemesi ile kısmi bir rekabete yol açmakta ve sonuç olarak hem kurkumin hem de hidroksitirozol içeren lipozomlarda gözlemlenen enkapsülasyon etkinliği (EE%) değerlerinde belirgin olmamakla birlikte ölçülebilir bir azalma meydana gelmektedir.

Bu çalışmada elde edilen enkapsülasyon etkinliği ($81,20 \pm 0,80$), lipozomal sistemlerle karşılaştırıldığında daha yüksek bulunmuştur; bu durum, proniozomların sağladığı rijit ve kompakt bilayer yapısının, hidroksitirozolün taşıyıcı matrise etkin şekilde entegrasyonunu destekleyerek kapsüllemesini kolaylaştırdığını göstermektedir. Ayrıca, proniozom yapısının kompaktlığı ve rijitliği, hidroksitirozolün sızıntısını azaltmakta ve yüksek EE% değerinin korunmasına katkı sağlamaktadır. Bu bulgular, proniozom tabanlı sistemlerin özellikle amfipatik moleküller için, lipozomal sistemlere kıyasla hem üstün kapsülleme verimi hem de artırılmış yapısal stabilite sunduğunu ortaya koymaktadır.

Shruthi, Pushpadass, Franklin, Battula ve Naik (2020) tarafından yapılan çalışmada, resveratrol yüklü proniozomların enkapsülasyon verimliliğinin duvar materyali tipine bağlı olarak anlamlı farklılık gösterdiği belirlenmiştir ($p < 0,05$). Pullulan matriksi, maltodekstrine kıyasla daha yüksek EE% sağlamış, ancak elde edilen niozomların hidrodinamik çapı yaklaşık 3–3,2 kat daha büyük bulunmuşlardır. Buna karşılık, maltodekstrin-temelli proniozomlar 200 nm'nin altında hidrodinamik çapa sahip olup, %90'ın üzerinde EE% göstermişlerdir. Bu sonuç, nanoenkapsülasyon etkinliği ve biyoyararlanımının partikül boyutu ile ilişkili olması nedeniyle, maltodekstrin-temelli proniozomların daha avantajlı bir taşıyıcı sistem sunduğunu ortaya

koymaktadır. Ek olarak, optimum proniozom hazırlığı için 1,5 saatlik çalkalama süresinin uygun olduğu sonucuna ulaşmışlardır.

Bu karşılaştırmalar, çalışmada elde edilen maltodekstrin bazlı proniozomların yüksek kapsülleme kapasitesi ve uygun partikül boyutu ile literatürdeki mevcut sistemler arasında avantajlı bir alternatif sunduğunu göstermektedir.

4.4. Fizikokimyasal Karakterizasyon Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Proniozom formülasyonlarının etkinliği ve stabilitesi yalnızca partikül boyutu ve enkapsülasyon etkinliği ile değil, aynı zamanda fizikokimyasal ve yapısal özellikleri ile de doğrudan ilişkilidir. Bu bağlamda, formülasyonların moleküler düzeydeki etkileşimleri, termal davranışları, kristallik derecesi ve yüzey morfolojisi ayrıntılı olarak incelenmiştir. Elde edilen kapsamlı karakterizasyon analiz bulguları, proniozomların yapısal bütünlüğünü, stabilitesini ve biyoyararlanım potansiyelini belirlemeye yönelik önemli ve kritik bilgiler sağlamıştır.

4.4.1. Nem içeriği analiz sonuçlarının değerlendirilmesi

Proniozom formülasyonlarının nem içeriği, hem ürün stabilitesi hem de depolama koşullarına karşı dayanıklılığı açısından kritik bir parametredir. Nem miktarı, veziküllerin yapısal bütünlüğünü ve fiziksel özelliklerini etkileyebileceği gibi, uzun süreli saklama sırasında etkin madde kaybı ve aglomerasyon riskini de belirler. Bu nedenle, proniozom tozlarının nem içeriği gravimetrik analitik yöntemle belirlenmiş ve formülasyonların fiziksel stabilitesine dair bilgi elde edilmiştir.

Bu çalışmada, proniozom üretiminde kullanılan liyofilize örnekler ile hazırlanan proniozomların nem içeriği, kuru madde bazında % olarak belirlenmiş ve Tablo 4.7’de sunulmuştur. Ekstraktın nem içeriği %1,73 olarak saptanırken, proniozomlar ve kontrol (blank) proniozomun nem içerikleri sırasıyla %7,34 ve %7,10 olarak bulunmuştur.

Tablo 4.7. Örneklere ait nem içeriği sonuçları (%)

Örnekler	Nem içeriği (%)
Ekstrakt	1,73
Proniozom	7,34
Kontrol	7,10

Proniozomlar ile kontrol arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Elde edilen bulgular, proniozom tozlarının düşük ve kontrollü nem seviyelerine sahip olduğunu ve bu durumun, depolama sırasında veziküllerin yapısal bütünlüğünü ve fizikokimyasal stabilitesini destekleyerek formülasyonun güvenilirliğini artırdığını göstermektedir.

Shruthi ve diğerleri (2020), resveratrol yüklü proniozom üretiminde taşıyıcı materyaller olarak maltodekstrin, laktoz monohidrat ve pullulan kullanmış ve formülasyonları rotary evaporatör ile 1,5 ve 5 saat süreyle karıştırmıştır. Maltodekstrin bazlı proniozomların nem içeriği %0,09, kontrol örneklerinin ise %0,10 olarak belirlenmiş olup, bu değerler bu çalışmada elde edilen proniozomların nem değerlerinden daha düşüktür. Beş haftalık depolama süresi boyunca, kullanılan taşıyıcı materyal ve çalkalama süresinin örneklerin nem içeriği üzerinde anlamlı bir etkisi bulunmamıştır. Bu bulgular, proniozomlarda nem içeriğinin esas olarak üretim parametrelerinden ziyade taşıyıcı materyalin kimyasal ve fizikokimyasal özellikleri ile liyofilizasyon süreci tarafından kontrol edilebileceğini göstermektedir.

4.4.2. FTIR kimyasal yapı ve moleküler etkileşim sonuçlarının değerlendirilmesi

FTIR, bir maddenin kimyasal yapısını karakterize etmek amacıyla, içerdiği fonksiyonel grupları tanımlamak ve yapısal değişimleri izlemek için kullanılan güçlü bir analiz tekniğidir. Fonksiyonel gruplar, belirlenmiş frekanslarda spesifik emilim ile tanımlanır ve kızılötesi spektrumların emilimi, ana kimyasal grupları ve bileşenler arasındaki etkileşimleri gösterir (Asemani ve Rabbani, 2021). Bu çalışmada, zeytin yaprağının *Lb. plantarum* ATCC 14917 ile fermente edilen sıvı kısmının ekstraksiyon sonrasında liyofilize edilen kısmına ait fonksiyonel gruplarının belirlenmesine yönelik FTIR spektroskopi analizleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen spektrumlar Tablo 4.8’de gösterilmiştir.

Tablo 4.8. Örneklere ait FTIR ile elde edilen fonksiyonel gruplar

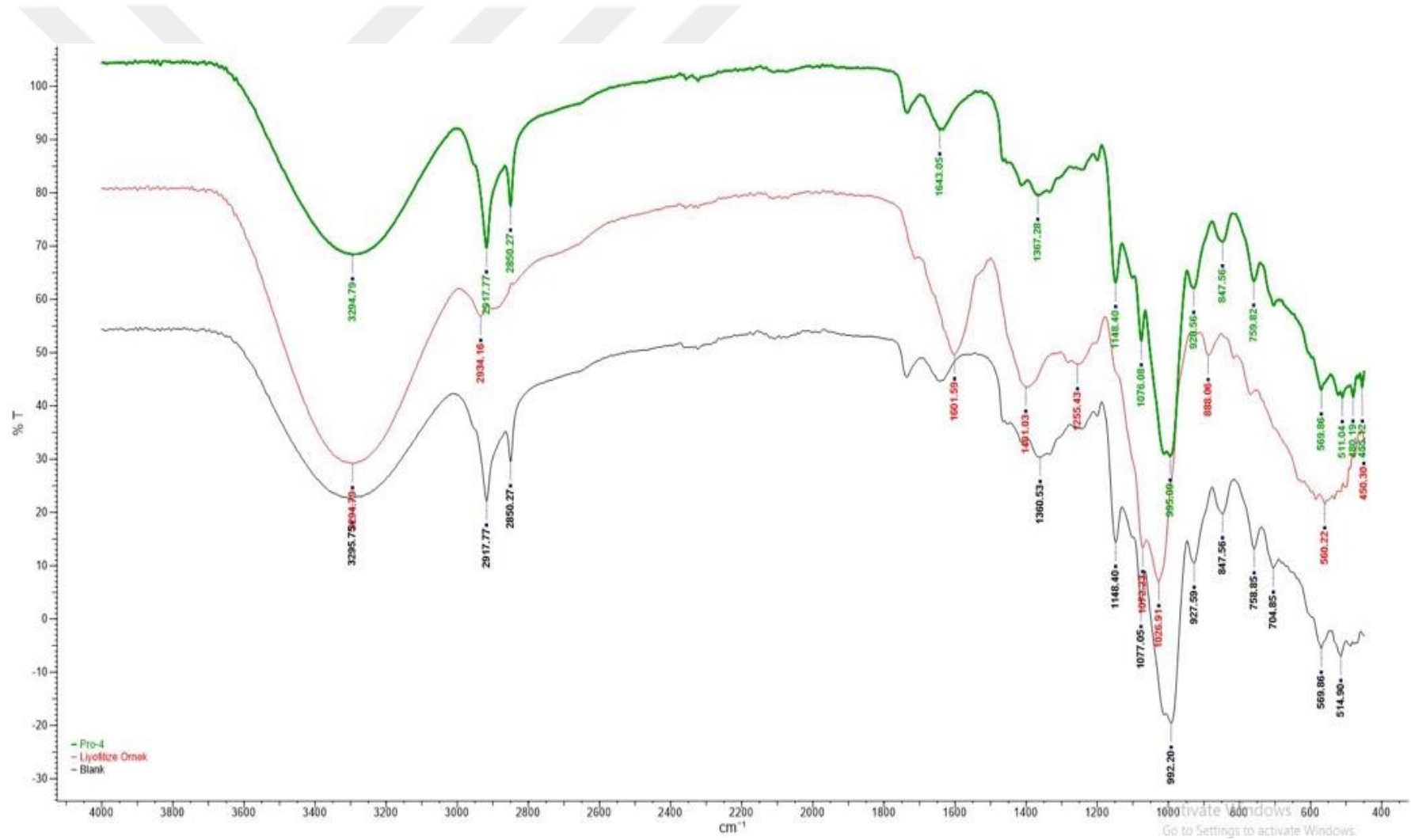
Bağ tipi	Fonksiyonel Grup	Titreşim modu	Dalgaboyu numarası (cm ⁻¹)		
			Ekstrakt	Kontrol	Proniozom
O-H	-OH	Esneme	3294,79	3295,75	3294,79
C-H	Alkanlar		2934,16	2917,77	2917,77
				2850,27	2850,27
C=O	=C-C=C- (aromatik halka)	Bükülme	1601,59	-	1643,05
C-H	-CH ₂ -		1401,03	1360,53	1367,28
	-CH ₃ -		1255,43	-	-
			-	1148,40	1148,40
C-O	Esterler, alkoller ve karboksilik asitler	Esneme	1072,23	992,20	1076,08
			1026,91		995,00
					928,56
C=C	Aromatik		888,06	847,56	847,56
C-H	-CH ₂ -		-	758,85	759,82
				704,85	
O-H	-OH	Bükülme	560,22	569,86	569,86
			450,30	514,90	511,04
				-	480,19
					455,12

Spektrumlarından elde edilen verilere göre, 3294,79 cm⁻¹ piki alkollü esterlerin serbest hidroksil grubuna bağlı O-H gerilme titreşimlerini yansıtmaktadır (Nazari, ghanbarzadeh, Kafıl, Zeinali ve Hamishehkar, 2019). 2934,16 cm⁻¹ olarak bulunan zayıf pik, örneğin uzun yağ asidi zincirinde CH, CH₂ ve CH₃ içermesinden kaynaklı C-H gerilmelerinden kaynaklanmaktadır (Keskin ve diğerleri, 2024). 1601,59 cm⁻¹ görülen pik, amid I bölgesinde amide karboksil çift bağının C=O gerilmesine ait olup aynı zamanda hidroksitirozolün karakteristik sinyalini göstermektedir (Tu ve Yuan, 2018). 1255,43 cm⁻¹ dalga sayısında tespit edilen pik, flavonoidlerin C halkasına özgü C-O gerilme titreşimlerine atfedilmiştir (Wongsa, Phatikulrungsun ve Prathumthong, 2022).

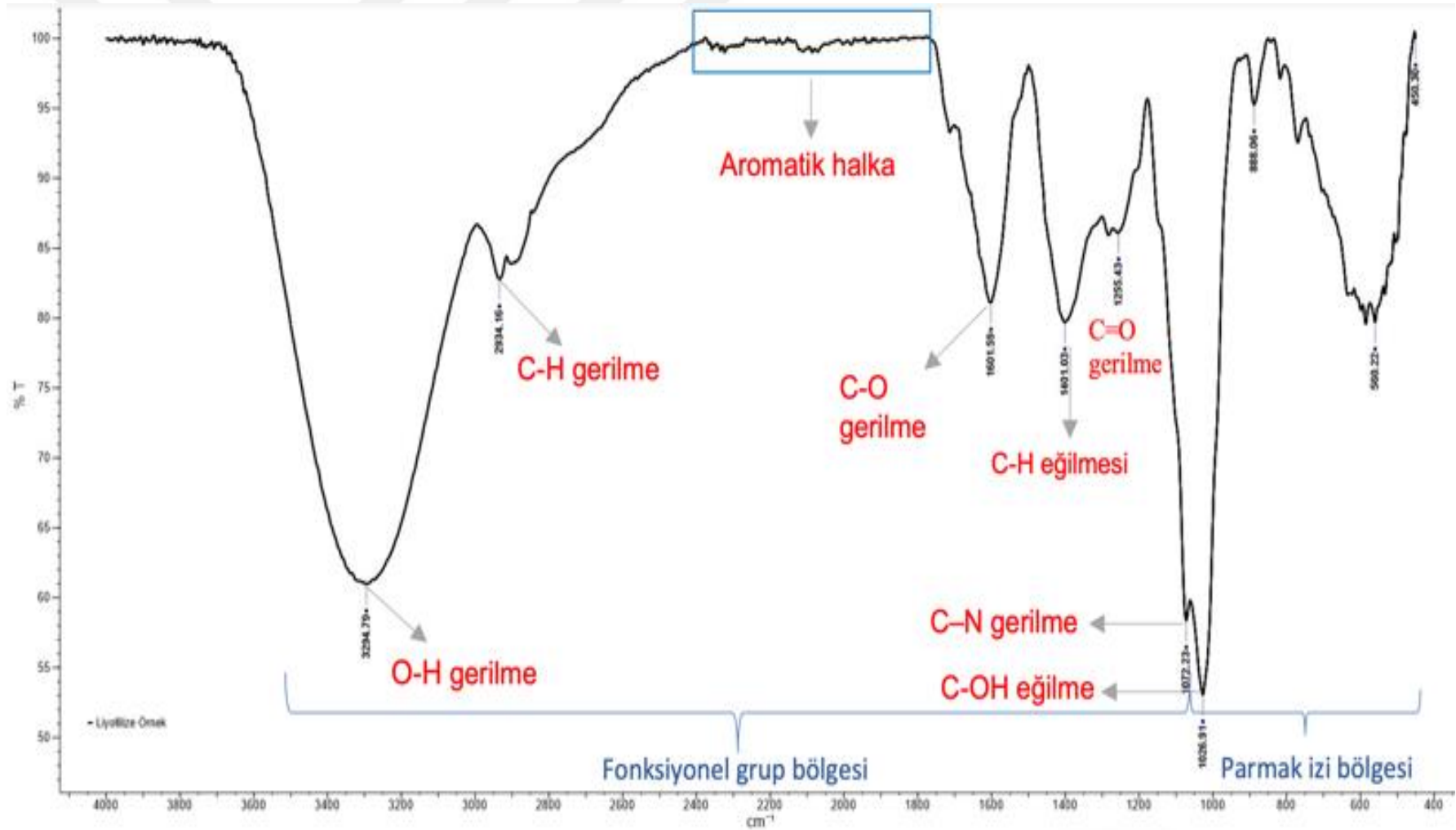
Ayrıca 1072,23 cm⁻¹ ve 1026,91 cm⁻¹'de belirlenen güçlü pikler, zeytin yaprağı ester gruplarına ait C-OH titreşimleri ya da alifatik aminlerin C-N gerilmeleri ile ilişkilendirilmiştir (Paulo ve Santos, 2020). Ekstrakta gözlenen 560,22 cm⁻¹ ve 450,30 cm⁻¹ dalga sayısındaki pikler,

hidroksitirozol ve metabolitlerine ait karakteristik bantlar olarak değerlendirilmiş olup, halka OH gruplarının bükölme titreşimlerini yansıtmaktadır (Paiva-Martins, Rodrigues, Calheiros ve Marques, 2011). şekil 4.14– 4.17’de proniozom, ekstrakt ve kontrol gruplarına ait FTIR spektrumları gösterilmiştir.

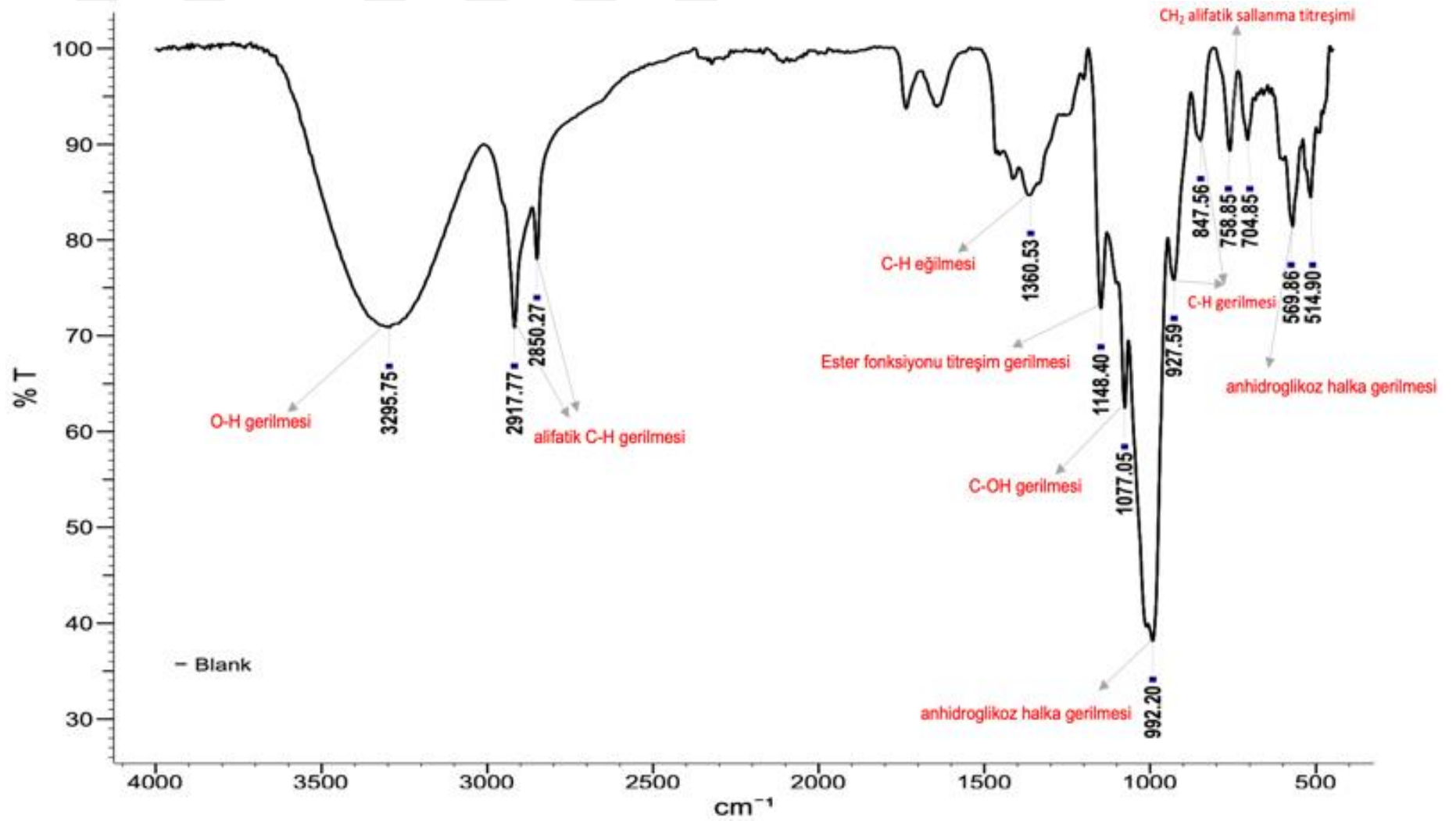




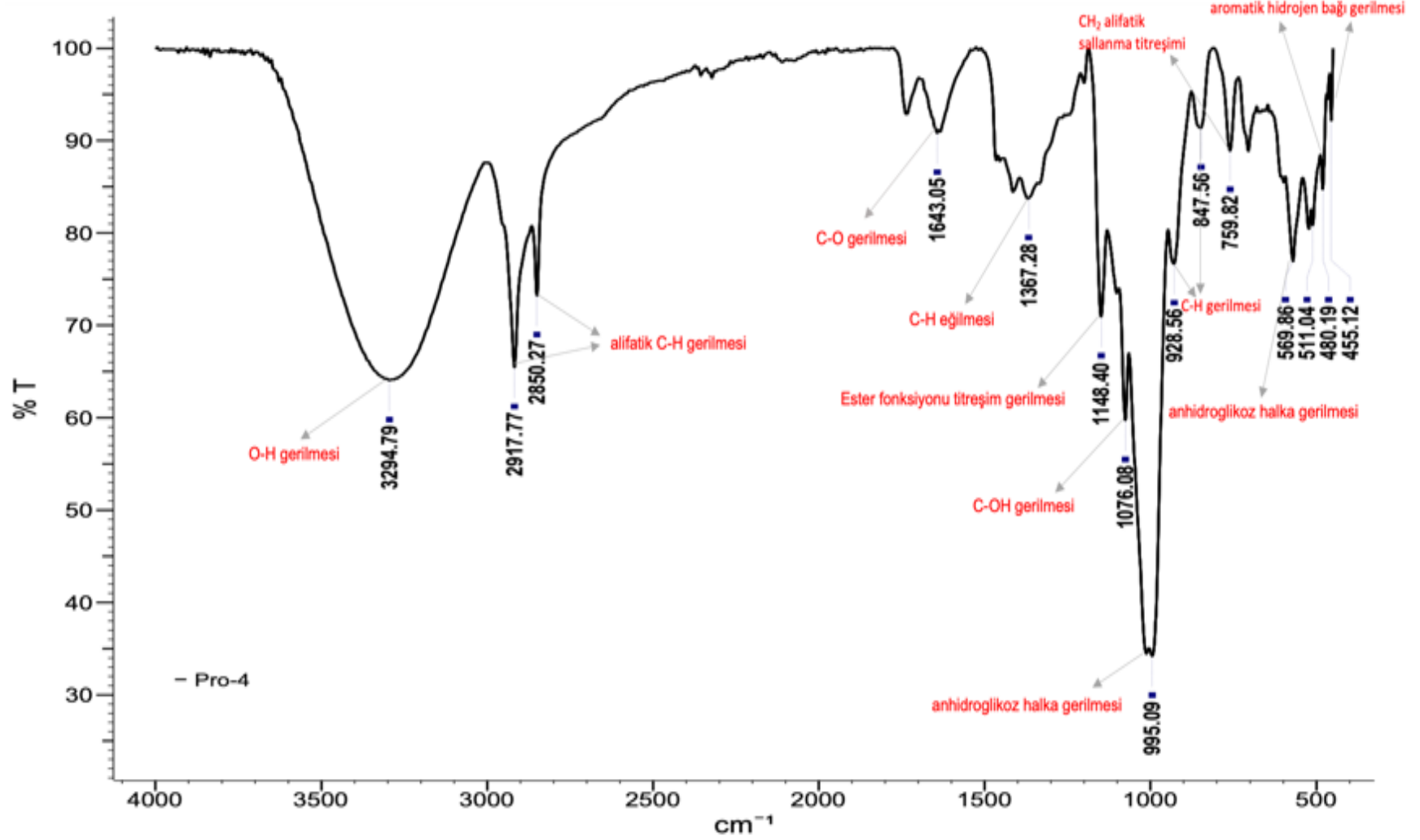
Şekil 4.14. Örneklere ait kıyaslamalı FTIR spektrumları



Şekil 4.15. *Lb. plantarum* ATCC 14917 ile fermente edilen sıvı kısmının ekstraksiyon sonrasında liyofilize edilen kısmına (ekstrakt) ait FTIR spektrumu



Şekil 4.16. Kontrole ait FTIR spektrumu



Şekil 4.17. Proniozoma ait FTIR spektrumu

Ribeiro ve diğerleri (2023), saf hidroksitirozolün FTIR spektrumunu incelemişlerdir. Spektrumda 3357 cm^{-1} 'de OH gerilme bandına karşılık gelen geniş bir sinyal gözlemlenmiştir. 2953 ve 2880 cm^{-1} 'de sp^3 hibritleşmiş karbon gerilme titreşimleri, $1727\text{--}1689\text{ cm}^{-1}$ aralığında aromatik halkadaki 1,2,4-trisüstitüe aromatik bağlara ait üst tonlar (overtones) ve 1610 ile 1530 cm^{-1} 'de aromatik titreşimler doğrulanmıştır. Elde edilen bu veriler, literatürde daha önce bildirilen bulgularla uyumluluk göstermektedir.

Proniozom ve kontrol spektrumlarında $2917,77\text{ cm}^{-1}$, $2850,27\text{ cm}^{-1}$, $1367,28\text{ cm}^{-1}$, $1148,40\text{ cm}^{-1}$, $847,56\text{ cm}^{-1}$ ve $569,86\text{ cm}^{-1}$ dalga sayılarında ortak pikler gözlenmiştir. Bu bantların, formülasyonda yer alan maltodekstrin, Span 60 ve dodekanol bileşenlerine ait karakteristik titreşimlere karşılık geldiği değerlendirilmektedir.

Proniozomda $3294,79\text{ cm}^{-1}$, kontrol grubunda ise $3295,76\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısında güçlü O–H gerilme bantları tespit edilmiştir. Proniozomdaki $3294,79\text{ cm}^{-1}$ bandı, *Lb. plantarum* ATCC 14917 ile fermente edilen sıvı fraksiyonun ekstraksiyonu ve liyofilizasyonu sonrasında yapıda oluşan hidrojen bağlarına atfedilmektedir. Kontrolde gözlenen $3295,76\text{ cm}^{-1}$ bandının ise Span 60 ile dodekanol arasında meydana gelen O–H gerilmesinden kaynaklandığı bildirilmektedir (Farmoudeh ve diğerleri, 2020).

Proniozom spektrumunda $1076,08\text{ cm}^{-1}$, ekstrakta ise $1072,23\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısında C–OH gerilme titreşim bandı belirlenmiştir. Bu bulgu, ekstrakt bileşenlerindeki hidroksil gruplarının proniozom yapısında da korunduğunu ve formülasyonun moleküler yapısında yer aldığını göstermektedir (Khan ve diğerleri, 2015). Ayrıca, $2917,77\text{ cm}^{-1}$ ve $2850,27\text{ cm}^{-1}$ bantları, formülasyonda yer alan dodekanolden kaynaklanan alifatik metilen ($-\text{CH}_2$) ve metil ($-\text{CH}_3$) gruplarının C–H gerilme titreşimleri ile ilişkilendirilmektedir (Kumar, Kumar, Soni ve Gupta, 2024). Singh ve diğerleri (2022), bu iki bandın dodekanole özgü karakteristik bantlar olduğunu doğrulamaktadır.

Kontrole ait $758,85\text{ cm}^{-1}$ ve $704,85\text{ cm}^{-1}$, proniozomda ise $759,82\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısında yer alan bantlar, aromatik hidrokarbonlarda $-\text{CH}_2$ ve $-\text{CH}_3$ gruplarının sıcaklık etkisiyle oluşan C–H esneme titreşimlerini yansıtmaktadır (Chen, Chen, Zeng, Fang ve Zhang, 2012; Pochee, Orzechowski ve Rutkowski, 2022). Aroma maddelerinin belirlenmesi analizleri sonucunda, bu aromatik yapının bifenil olduğu belirlenmektedir.

Elde edilen spektral veriler, biyoaktif bileşiklerdeki O–H grupları ile fosfolipitlerin polar grupları arasında hidrojen bağlarının oluştuğunu ve bu bağların proniozomal yapının oluşumu ve stabilitesine katkı sağladığını göstermektedir (Samed, Sharma ve Sundaramurthy, 2018).

Çalışmada elde edilen $2917,77\text{ cm}^{-1}$, $2850,27\text{ cm}^{-1}$, $1367,28\text{ cm}^{-1}$, $1076,08\text{ cm}^{-1}$ pikleri; Farmoudeh ve diğerleri (2020) tarafından raporlanan dodekanole özgü karakteristik bantlarla uyumlu bulunmuştur. Proniozomlarda $995,09\text{ cm}^{-1}$ ve $511,04\text{ cm}^{-1}$ bantları anhidroglikoz halka gerilmesine (Castro-Cabado, Parra-Ruiz, Casado ve Roman 2016), $1076,08\text{ cm}^{-1}$ bandı C–O–C antisimetrik germe titreşimine (Chen, Huang ve Huang, 2019), $992,20\text{ cm}^{-1}$ bandı ise maltodekstrinin yapısındaki C–O veya C–OH gruplarındaki C–C gerilmesine (Matwijczuk ve diğerleri, 2022) karşılık gelmektedir. Ayrıca $759,82\text{ cm}^{-1}$ bandı Span 60’ın karakteristik alifatik –CH₂ salınım titreşimini yansıtırken, $480,19\text{ cm}^{-1}$ ve $455,12\text{ cm}^{-1}$ ’de görülen pikler ekstrakta özgü parmak izi bölgesine aittir (Saleh, Pirouzifard ve Almasi, 2022).

Bu bulgular, proniozom formülasyonlarında kullanılan bileşenlerin kimyasal yapılarının korunmuş olduğunu ve FTIR spektrumları aracılığıyla karakteristik bantların başarıyla tespit edilebildiğini göstermektedir.

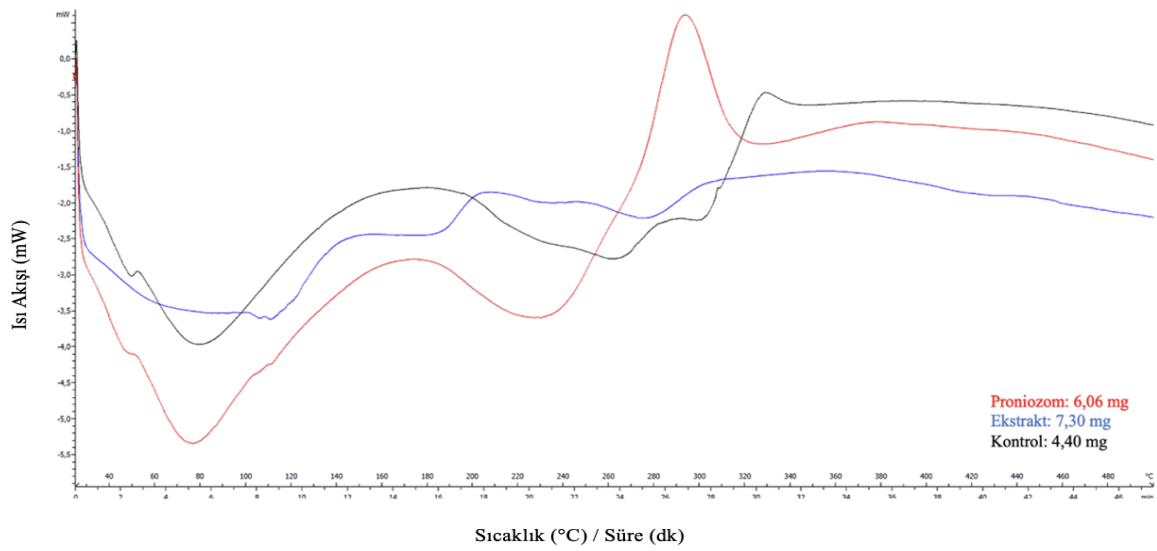
4.4.3. DSC termal karakterizasyon sonuçlarının değerlendirilmesi

DSC ile örneklerin ısı akışı sıcaklıkla birlikte ölçülerek, faz geçişleri (camsı geçiş, kristalizasyon, erime) ve endotermik/ekzotermik olaylar belirlenmiş; böylece örneğin termal kararlılığı, kristallik veya amorfik yapısı ve bileşenler arası etkileşimleri hakkında bilgi elde edilmiştir. Proniozom, kontrol ve ekstrakta ait ısı akışındaki fark ölçümleri ve dönüşüm entalpilerinin incelenerek endotermik veya ekzotermik değişimlerin belirlendiği DSC grafikleri Şekil 4.18– 4.21’de sunulmuştur.

DSC’de elde edilen grafikteki ısı kapasitesi değişimi yorumlanırken; taban çizgisinin yer değiştirmesine yol açan sıcaklık, camsı geçiş sıcaklığı (T_g) olarak, ordinatın aşağıya doğru yer değiştirmesine yol açan sıcaklık ekzotermik karakterli kristalizasyon sıcaklığı (T_c) olarak ve ordinatın yukarıya doğru yer değiştirmesine yol açan sıcaklık endotermik karakterli erime sıcaklığı (T_m) olarak belirtilir. Endotermik değişiklikler, su kaybı ve gaz atmosferinde indirgenme veya bozunma olaylarını gösterirken; ekzotermik değişiklikler polimerleşme,

katalitik reaksiyonlar veya hava/karbondioksit atmosferinde yükseltgenme süreçlerini ifade etmektedir (Koyundereli-Çılgı, Balkaya ve Soğancı, 2014).

Literatürde, saf oleuropeinin erime sıcaklığı 64,70 °C olarak bildirilmiştir (Huguet-Casquero, Xu, Gainza, Pedraz ve Belouqui, 2020). Saf hidroksitirozolün erime sıcaklığı 53,2 °C iken, Shanxi Fuheng Biotechnology Co., Ltd. (Shanxi, Çin) tarafından temin edilen enkapsüle hidroksitirozol tozunun erime sıcaklığı 77,3 °C olarak rapor edilmiştir (Zhu, Xia, Ding, Rong ve Mei, 2023).



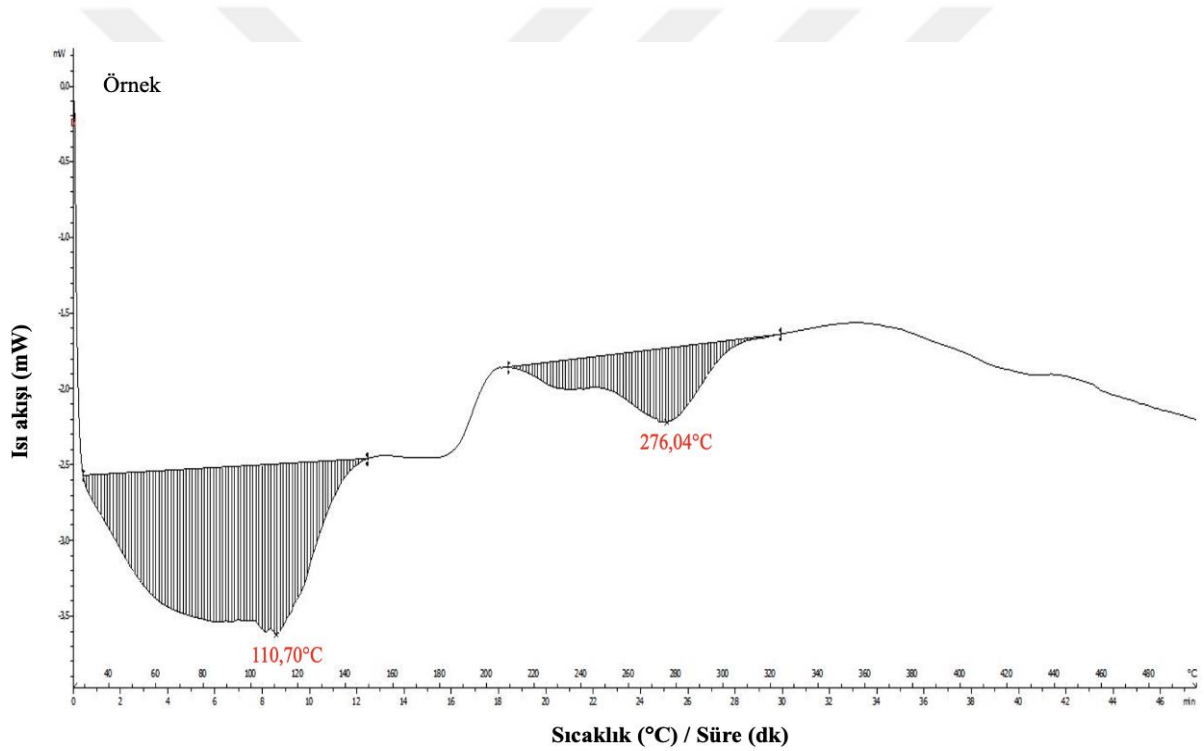
Şekil 4.18. Proniozom, ekstrakt ve kontrol DSC grafikleri

Mourtzino, Salta, Yannakopoulou, Chiou ve Karathanos (2007), 100 gram zeytin yaprağını 500 mL metanol ile 3 gün boyunca maserasyon işlemine tabi tutmuş ve elde edilen ekstraktı liyofilizasyon yöntemiyle kurutarak enkapsüle etmiştir. Elde edilen ekstrakta ait DSC grafiği incelendiğinde, zeytin yaprağının erime sıcaklığının 150–200 °C aralığında olduğu tespit etmişlerdir. Bu sıcaklık değerinin, zeytin yaprağı içeriğinde bulunan oleuropeinin erime sıcaklığı ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, düşük erime sıcaklığının zeytin yaprağında bulunan yağ asidi bileşimiyle bağlantılı olduğu ifade edilmiş; doymuş trigliseritlerce zengin yağların ise daha yüksek erime noktalarına sahip olduğu kaydedilmiştir (Bahloul, Kechaou ve Mihoubi, 2014).

Kesente ve diğerleri (2017) çalışmasında, zeytin yaprağı ekstraktının enkapsülasyonu ile elde edilen nanopartiküllerin DSC termogramları incelenmiştir. Bu çalışmadan farklı olarak, zeytin

yaprağı ekstraktına ait endotermik pik değerinin 92– 121 °C aralığında olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, saf polilaktik asit (PLA) ile ekstrakt yüklü nanopartiküllerin pik değerleri karşılaştırıldığında, endotermik pik sıcaklığındaki düşüşün nanopartikül oluşumu sırasında polimer kristalleşmesi ve amorf yapının daha yaygın olmasıyla ilişkili olduğu belirtilmiştir.

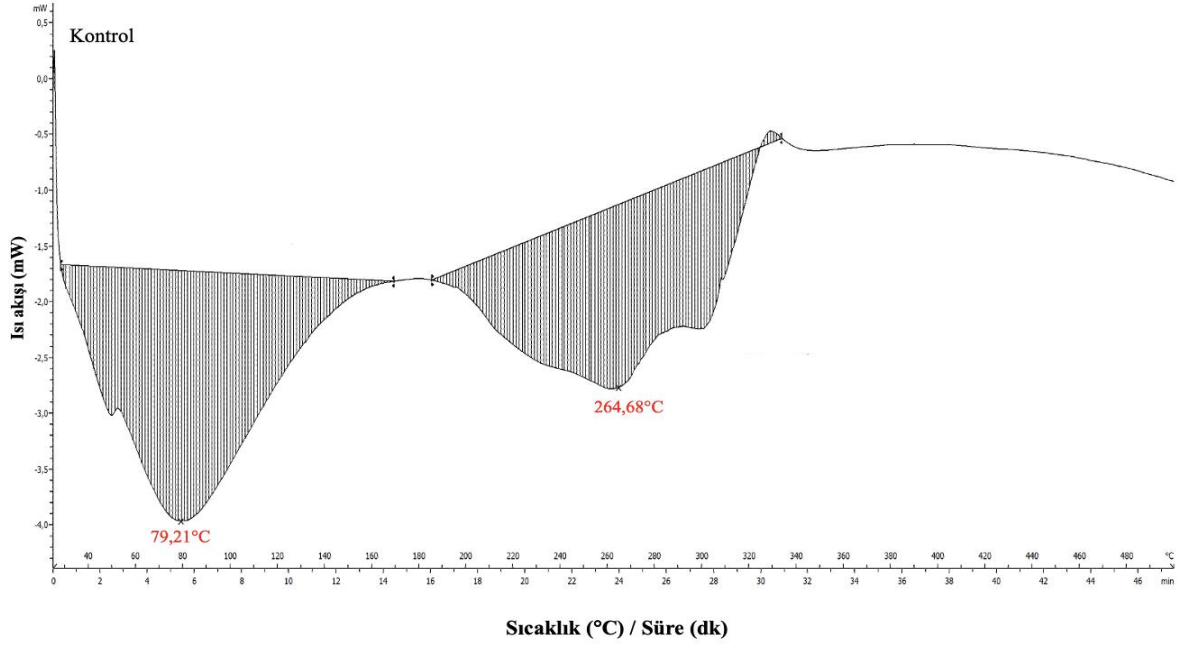
Şekil 4.19’da gösterilen diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) analiz sonuçları, zeytin yaprağı fermente liyofilize ekstraktının termal davranışını ortaya koymaktadır. Ekstrakta, 110,70°C ve 276,04°C sıcaklıklarında iki belirgin endotermik erime piki tespit edilmiştir; bu pikin ilki muhtemelen bileşenlerin erime olayı ile ilişkilendirilirken, ikincisi daha yüksek sıcaklıkta gerçekleşen diğer kristal yapısal dönüşümlere işaret etmektedir.



Şekil 4.19. Ekstrakta ait DSC grafiği

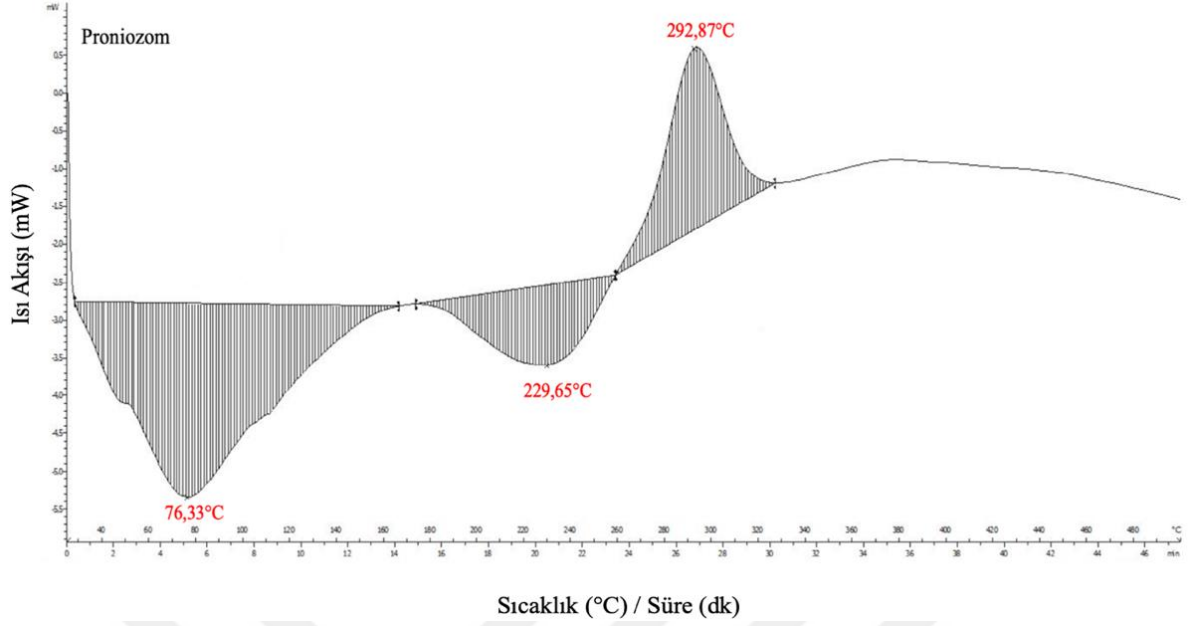
Şekil 4.20’de kontrol örneğinde 79,21 °C ve 264,48 °C’de iki endotermik pik gözlemlenmiştir. Bu pikler, kontrol örneğinin erime ve kristal yapısal dönüşümlerini yansıtmaktadır. Daha düşük erime sıcaklıkları, ekstraktın tek başına daha az stabil bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Endotermik pikler, polimer erimesinden kaynaklanan morfolojik bozunmaları ve amorf yapının pürüzsüz yüzey yapısının bozulduğunu ortaya koymaktadır. Bu bulgular, proniozom formülasyonunun ekstraktın termal stabilitesini artırarak koruyucu bir taşıyıcı sistem işlevi

gördüğünü ve böylece biyoyararlanım ve depolama kararlılığı açısından avantaj sağlayabileceğini desteklemektedir.



Şekil 4.20. Kontrole ait DSC grafiği

Şekil 4.21’de gösterilen proniozoma ait DSC termogramında, 76,33 °C ve 229,65 °C’de iki endotermik erime piki ile birlikte 292,87 °C’de endotermik karakterde bir kristalizasyon piki gözlemlenmiştir. Proniozomdaki erime piklerinin kontrol örneğine kıyasla daha yüksek veya farklı sıcaklıklarda ortaya çıkması, formülasyon içerisindeki lipid ve yüzey aktif madde bileşenlerinin ekstraktın kristal yapısını ve termal özelliklerini modifiye ettiğini göstermektedir. Özellikle, proniozomdaki yüksek sıcaklıktaki kristalizasyon piki, formülasyonun termal kararlılığının arttığını ve bileşenlerin birbirleriyle etkileşim halinde daha düzenli bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.21. Proniozoma ait DSC grafiği

Endotermik karakterdeki pikler, polimer erimesinden kaynaklanan morfolojik bozunmaları ve endo amorf yapıya sahip kontrol örneğinin pürüzsüz yüzey yapısının bozulduğunu ortaya koymaktadır. Geniş spesifik yüzey alanına sahip yüzey aktif maddelerde, lipid faz karışımı ve ekstrakt ilavesi ile gerçekleşen nanoparçacık oluşumu sırasında kristallenme süreci etkilenmekte ve düşük erime entalpisi gözlemlenmektedir (Huguet-Casquero, Xu, Gainza, Pedraz ve Beloqui, 2020). Kontrol örneğinde gözlenen daha düşük erime sıcaklıkları, ekstraktın tek başına daha az stabil bir yapıya sahip olduğunu, proniozom formülasyonunun ise ekstraktın termal stabilitesini artırarak koruyucu bir taşıyıcı sistem işlevi gördüğünü desteklemektedir. Bu veriler, proniozom formülasyonunun biyoyararlanım ve depolama kararlılığı açısından avantaj sağlayabileceğini göstermektedir.

Proniozomal formülasyonların termal karakterizasyonunda, polimerin dehidrasyonuna bağlı endotermik piklerle başlayan ve daha yüksek sıcaklıklarda polimerin bozunmasına işaret eden ekzotermik piklerle sonlanan termal geçişler gözlemlenmiştir. Bu termal davranış, Wani ve ark. (2022) tarafından kitosan matrisinde hidrositiroolün nanoenkapsülasyonu sırasında rapor edilen bulgularla uyumludur; söz konusu çalışmada, kitosanın 80–120 °C aralığında dehidrasyondan kaynaklanan endotermik pikler ve 280–300 °C aralığında polimerin termal bozunmasına işaret eden ekzotermik pikler gösterdiği rapor edilmiştir. Elde edilen veriler, bu

tür termal geçişlerin proniozomal sistemlerin yapısal bütünlüğü ve termal kararlılığının değerlendirilmesinde güvenilir bir gösterge olduğunu ortaya koymaktadır.

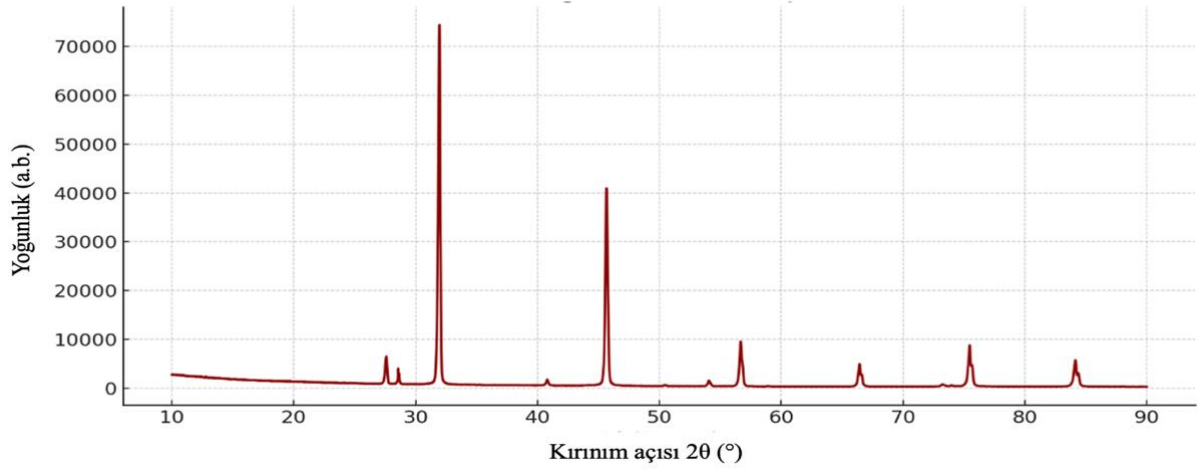
4.4.4. XRD kristallik ve yapısal düzenlilik sonuçlarının değerlendirilmesi

Kontrol matrisi, liyofilize zeytin yaprağı ekstraktı ve proniozom örneklerinin kristal yapı özellikleri, X-ışını kırınım (XRD) analizi ile incelenmiştir. Analizler, Cu K α ışını ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$) kullanılarak, 45 kV gerilim ve 40 mA akım altında, 10° ile 90° 2 θ aralığında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen difraktogramlar, örneklerdeki faz saflığı, kristal yapı ve yönelim derecesinin belirlenmesi amacıyla değerlendirilmiştir.

Kristalit boyutlarının hesaplanmasında Scherrer eşitliği esas alınmış ve InstaNANO yazılımındaki “Crystallite Size Calculator (Scherrer Equation)” modülü kullanılmıştır. Bu yaklaşım sayesinde, kontrol, ekstrakt ve proniozom örneklerinde kristal büyüklükleri nm cinsinden nicel olarak belirlenmiştir.

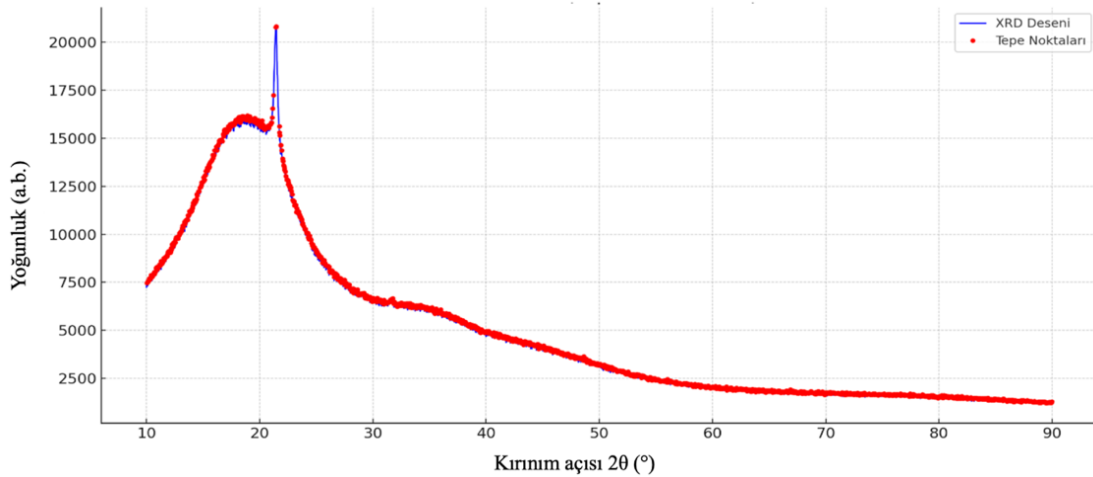
Analizler sonucunda elde edilen difraktogramlarda fazlara özgü pikler tespit edilmiş ve bağlı yoğunlukları (arbitrary birim, a.b.) üzerinden değerlendirilmiştir. Bu birim, mutlak ölçüm birimlerinden bağımsız olup, pik şiddetlerinin birbirleriyle karşılaştırılmasına olanak sağlamaktadır. Pik yoğunlukları, baskın fazların tespiti ve kristallerin yönelim derecesinin belirlenmesinde kritik bir parametre olarak kullanılmıştır. Elde edilen bulgular, kontrol örneğinin orta-düşük kristalinlikte nanokristalin karaktere sahip olduğunu, ekstraktın daha belirgin kristal yapıya sahip olduğunu ve proniozom formülasyonunda ekstraktın kristal yapısının korunarak matris içinde başarılı bir şekilde entegre edildiğini göstermiştir.

Ekstraktın XRD deseni (Şekil 4.22), belirgin kristalli yapıyı ortaya koymuştur. Pikler 27– 84° aralığında yoğunlaşmış olup, bu pikler ekstrakt içeriğindeki polifenoller ve hidroksitirozol/oleuropein gibi bileşenlerin kristal bölgelerine karşılık gelmektedir. Ekstraktın serbest haldeki kristal yapısına ait düşük yoğunluklu karakteristik pikler, proniozom formülasyonunda enkapsülasyon sonrasında matris içinde moleküler düzeyde homojen olarak dağıldığından, difraktogramda belirginleşmemektedir. Bu bulgu, Acosta ve diğerlerinin (2015) kitosan mikroküreleri ile gerçekleştirdiği çalışmadaki sonuçlarla uyum göstermektedir; söz konusu çalışmada ekstraktın kristal pikleri enkapsülasyon sonrası belirgin şekilde azalmış ve amorf yapı korunmuştur.



Şekil 4.22. Ekstrakta ait XRD difraktogramı

Kontrol örneğinin difraktogramında, $2\theta \approx 20^\circ$ civarında geniş bir tepe noktası gözlemlenmiş olup, amorf yapının varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.23). Bununla birlikte, 21° civarında Span 60'a ait karakteristik bir kristal pik tespit edilmiştir. Scherrer hesaplamalarına göre kontrol örneğinin kristalit boyutları 0,26-0,78 nm aralığında değişmiş ve örneğin orta-düşük kristalinlikte, nanokristalin türde olduğu belirlenmiştir. Amorf yapıların higroskopik özellik göstermesi, su tutma kapasitesinin artmasına ve depolama sırasında fiziksel/kimyasal değişimlerin ortaya çıkmasına yol açabilmektedir.

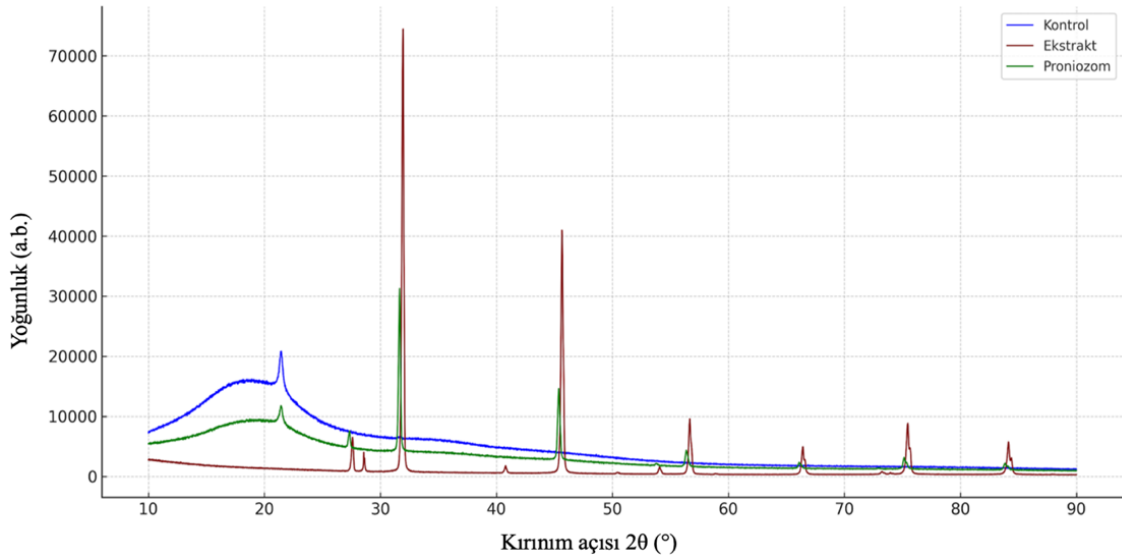


Şekil 4.23. Kontrole ait XRD difraktogramı

Benzer şekilde, proniozomda ekstrakt bileşenlerinin moleküler düzeyde taşıyıcı matris ile uyumlu şekilde entegre olduğu ve stabil bir amorf yapının korunduğu (Şekil 4.25)

doğrulanmıştır. Bu yapı, kristalin fazın azalması ve amorf fazın sürdürülmesi sayesinde, aktif bileşenlerin çözünürlüğünü ve salım hızını artırarak biyoyararlanımın yükselmesine ve proniozomların fiziksel stabilitesinin korunmasına olanak sağlamaktadır. Bu bulgular, proniozomların hem ilaç salım etkinliği hem de depolama sırasında yapısal kararlılık açısından sağladığı avantajları doğrudan göstermektedir.

Örneklere ait XRD difraktogramları Şekil 4.24'te grafiksel olarak sunulmuştur. Kontrol matrisi ve proniozomda, hem yarı kristalli matris pikleri hem de amorf yapılar gözlenmiş olup, her iki örnekte de Span 60'a ait karakteristik pik tespit edilmiştir. HZYE daha belirgin kristal yapıya sahip olup, proniozom formülasyonunda ekstrakt yüklemesi açık bir şekilde gözlemlenmiştir. Proniozomda 21– 21,6° aralığındaki pikler matris kristallerini, 31,66° ve 45,39° gibi yüksek açılı pikler ise HZYE polifenollerine ait kristalizasyonu göstermektedir. Bu bulgular, proniozom formülasyonunda ekstraktın kristal yapısının korunarak taşıyıcı matrise etkin bir şekilde entegre olduğunu ve sistemde hem yarı kristalli hem de amorf bölgelerin bir arada bulunduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 4.24. Kontrol, proniozom ve ekstrakta ait XRD difraktogramları

Soleimanifard ve diğerleri (2019), serbest haldeki zeytin yaprağı ekstraktının yüksek yoğunluklu karakteristik kristal pikler sergilediğini rapor etmişlerdir. Ancak, ekstraktın nanoyapılı lipid taşıyıcılar içine yüklenmesi sonucunda, difraktogramlarda gözlenen kristal pikin yoğunluğunda anlamlı bir azalma meydana gelmiştir. Bu azalma, ekstrakt moleküllerinin

lipid matrisi içerisinde moleküler düzeyde amorf bir faza dönüşerek, kristalliliğin önemli ölçüde azaldığını göstermektedir. Ayrıca, taşıyıcı matrisin amorf yapısının korunması, sistemin termal ve fizikokimyasal stabilitesini artırmakta ve biyoyararlanım potansiyelini olumlu yönde etkilemektedir. Kristalliliğin bu şekilde düşürülmesi, kontrollü salınım kinetiklerinin elde edilmesinde ve etkin madde stabilitesinin sürdürülmesinde kritik bir faktör olarak değerlendirilmektedir. Bu bağlamda, proniozomal formülasyonlarımızda da benzer şekilde ekstraktın amorf yapısının korunması ve kristal yapının azalması, taşıyıcı sistem içindeki etkin madde dağılımının başarılı olduğunu ve formülasyonun stabilitesine katkı sağladığını ortaya koymaktadır.

Tablo 4.9, kontrol matrisi, liyofilize zeytin yaprağı ekstraktı ve proniozom formülasyonuna ait XRD analizlerinden elde edilen 2 θ piklerini karşılaştırmalı olarak sunmaktadır. Kontrol örneğinde 18– 21,5° aralığında gözlemlenen pikler, maltodekstrin, Span 60 ve dodekanol gibi taşıyıcı bileşenlerin yarı kristal yapısını yansıtmaktadır. Ekstrakt örneğinde ise 27– 84° aralığındaki pikler, HZYE içeriğinde bulunan polifenoller, flavonoidler ve hidroksitirozol/oleuropein gibi bileşenlerin kristal bölgelerine işaret etmektedir.

Proniozom örneğinde gözlenen pikler hem matris hem de ekstrakt katkısını göstermektedir. Özellikle 21– 21,6° aralığındaki pikler matris kristallerini temsil ederken, 31,66° ve 45,39° gibi yüksek açılı pikler ekstrakt polifenollerinin kristalizasyonunu ortaya koymaktadır. Bu durum, proniozom formülasyonunda ekstraktın kristal yapısının korunarak matris içinde başarılı bir şekilde entegre edildiğini göstermektedir.

Tablo 4.9. Kontrol, HZYE ve proniozom XRD 2θ piklerinin karşılaştırılması

2θ (°)	Kontrol Pikleri	Ekstrakt Pikleri	Proniozom Pikleri	Muhtemel Kaynaklar
18,46	✓			Maltodekstrin yarı kristal
18,59	✓			Maltodekstrin / Span 60
18,91	✓			Maltodekstrin
18,96	✓			Maltodekstrin
19,10	✓			Maltodekstrin
21,15	✓		✓	Matris pikleri
21,21			✓	Matris pikleri
21,22	✓			Matris pikleri
21,27			✓	Matris pikleri
21,32			✓	Matris pikleri
21,40	✓			Matris pikleri
21,43			✓	Matris pikleri
21,44	✓			Matris pikleri
21,45			✓	Matris pikleri
21,47	✓			Matris pikleri
21,48		✓	✓	Matris ve ekstrakt katkısı
21,60			✓	Matris pikleri
27,60		✓		Ekstrakt polifenol (hidroksitirozol)
31,66			✓	Ekstrakt polifenol (oleuropein / hidroksitirozol kristali)
45,39			✓	Ekstrakt polifenol (yüksek mertebe pikleri)
45,65		✓		Ekstrakt polifenol
56,67		✓		Ekstrakt polifenol
66,41		✓		Ekstrakt polifenol
66,44		✓		Ekstrakt polifenol
75,47		✓		Ekstrakt polifenol
75,64		✓		Ekstrakt polifenol
75,67		✓		Ekstrakt polifenol
84,14		✓		Olası mineral / ekstrakt katkısı

Maltodekstrin genellikle amorf bir yapıya sahiptir, bu da XRD analizlerinde geniş ve belirgin olmayan piklerle 18– 22 $2\theta^\circ$ aralığında kendini göstermektedir (Raja, Sankarikutty, Sreekumar, Jayalekshmy ve Narayanan, 1989). Span 60 genellikle stearik asit esteri, kristalin formunda ve 6– 8, 21– 23 $2\theta^\circ$ aralığındadır. Thongpon ve diğerleri (2025), kurkumin yüklü proniozomlarda Span 60'ın $\sim 2-8$ Å, kolesterolün $\sim 1-2$ Å aralığında H bağlarından kaynaklı hidrofobik interaksiyonlar gösterdiğini belirtmişlerdir. Etanol buharlaştırıldığı için XRD'de görülmemektedir. Dodekanol kristalin ve alkol formunda sırasıyla 7– 9, ve 20– 21 $2\theta^\circ$ aralığında bulunur. Kapsüllenmiş toz materyallerin, ana duvar materyallerine kıyasla sergilediği kristalit boyutundaki azalma, parçacık büyümesinin kısıtlanması yoluyla nanoparçacık oluşumuna yönelik bir eğilimi ortaya koyduğunu göstermektedir (Wani ve diğerleri, 2022).

Kontrol ve proniozom örneklerinde 21– 21,6° aralığında gözlemlenen pikler, matris bileşenleri olan maltodekstrin, Span 60 ve dodekanolün kristalizasyonunu doğrulamaktadır. Bu pikler, proniozomal formülasyonda taşıyıcı iskeletin düzenli moleküler örgüsüne işaret etmekte ve matrisin yarı kristal karakterini desteklemektedir. Matrisin kristal bölgeleri, formülasyonun fizikokimyasal stabilitesini artırırken, enkapsüle edilen ekstrakt bileşenlerinin moleküler düzeyde homojen şekilde dağılımını mümkün kılmaktadır. Sonuç olarak, bu yapı, proniozomlarda hem matrisin mekanik bütünlüğünü korumakta hem de biyoaktiflerin amorf ortamda stabil kalmasını sağlamaktadır.

Kontrol örneğinin yoğun piklerine ilişkin d-aralıklarının analizi, 4,13– 4,20 Å aralığındaki değerlerin maltodekstrin, Span 60 ve dodekanol gibi taşıyıcı bileşenlerde sıkça gözlenen karakteristik özelliklerle uyumlu olduğunu göstermektedir (Tablo 4.9). Bu bulgu, kontrol örneğinin yüksek derecede kristal bir yapıya sahip olduğunu ve piklerin büyük ölçüde maltodekstrin kaynaklı olduğunu işaret etmektedir. Örneğin, 18,46– 19,10° 2θ aralığındaki pikler yarı kristal maltodekstrin ve Span 60 matrisiyle ilişkilendirilmiştir. 21– 21,6° aralığındaki pikler ise matrisin (maltodekstrin, Span 60 ve dodekanol) kristalizasyonuna bağlıdır. Bu veriler, kontrol örneğindeki belirgin ve yoğun piklerin kristal yapı hakimiyetini açıkça ortaya koyduğunu göstermektedir.

Buna karşılık, proniozom ve özellikle ekstrakt örneklerinde pik sayısında ve yoğunluğunda belirgin bir azalma gözlenmiştir. Bu durum, örneklerin kristal özelliklerinden amorf yapıya doğru değişim gösterdiğini ve ekstraktın proniozom matrisinde moleküler düzeyde homojen olarak dağıldığını göstermektedir. Ekstrakt örneğinde pik pozisyonları genel olarak benzer bir düzen sergilerken, bazı küçük kaymalar tespit edilmiştir; proniozom örneğinde ise bu kaymalar daha belirgin olup, kristal düzlemleri arasındaki gerilmelere ve yapısal deformasyonlara işaret etmektedir. Ayrıca, proniozom örneğinde bazı piklerin daha yüksek yoğunlukta gözlemlenmesi, belirli fazların daha fazla kristalleşme göstermiş olabileceğini düşündürmektedir. Ancak genel olarak, belirgin kristal piklerin yokluğu; bunun yerine, 18– 22° 2θ aralığında geniş ve yayılmış bir amorf tepenin varlığı tespit edilmiştir. Bu gözlem, proniozomal sistemde ekstraktın kristal yapısının kısmen bozulduğunu ve amorf yapının korunarak stabil bir matris oluşturduğunu desteklemektedir.

Proniozom formülasyonunun XRD difraktogramında, 21– 21,6° aralığındaki pikler matris bileşenleri olan Span 60, maltodekstrin ve dodekanol kaynaklı birinci mertebe kristal pikler olarak gözlenmiştir. Liyofilize zeytin yaprağı ekstraktına ait pikler, 31,66°'da birinci mertebe pik ve 45,39°'da yüksek mertebe (second-order) pik olarak tespit edilmiştir. Yüksek mertebe pik, aynı kristal düzlemin tekrarlayan yapısını doğrulamakta ve ekstraktın proniozom içindeki kristal yapısının korunmuş olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, proniozom formülasyonunda hem taşıyıcı matrisin yarı kristalli yapısının hem de ekstraktın kristal karakterinin bir arada bulunduğunu ve sistemin başarılı bir şekilde entegre edildiğini ortaya koymaktadır.

Li ve diğerlerinin (2022) yaptıkları araştırmada, oleocanthal, oleacein, oleuropein ve hidroksitirozol gibi bileşiklerle yüklenmiş nanolipozomların kristal yapılarının korunduğu belirtilmiştir. Bu durumun, vakumlu dondurarak kurutma işlemi sırasında sakkarozun mannitole benzer şekilde bir kriyoprotektan işlevi görmesine bağlandığı ifade edilmiştir. Araştırmaya göre, sakkarozun lipozomların içine nüfuz ederek lipit membranla etkileşime girmesi ve yeni bir kristal faz oluşumuna katkıda bulunması sonucu, lipozomların yapısının etkili bir biçimde korunduğu vurgulanmıştır. Çalışmadan yola çıkıldığında, proniozomal formülasyonda kullanılan maltodekstrinin de sakkaroz ile benzer şekilde etkileşim gösterdiği ve bu etkileşim sayesinde proniozomların yapısının başarıyla korunduğu sonucuna varılmıştır.

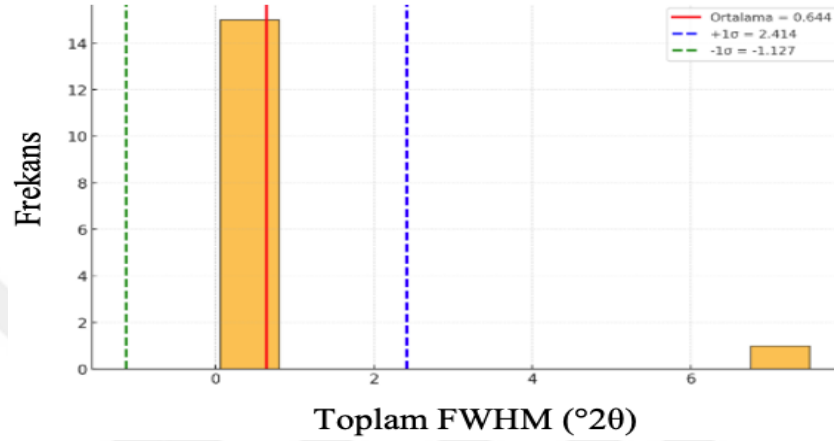
Kristal boyutları, X-ışını kırınımı verileri kullanılarak Scherrer denklemi yardımıyla nanometre (nm) cinsinden hesaplanmış ve elde edilen d boyutu dağılımları Şekil 4.27– 4.29’da ayrıntılı bir şekilde sunulmuştur. Scherrer denklemi, kırınım piklerinin tam genişlik-yarı yükseklikteki değerlerini (FWHM) ve kırınım açılarını (θ) temel alarak kristal boyutlarının tahmin edilmesinde yaygın şekilde kullanılan bir yöntem olarak öne çıkmaktadır. Literatürde, fenolik bileşiklerin moleküler yapılarına atfedilen etkilerle kristalleşme mekanizmalarını engellediği ve amorf faz oluşumuna katkı sağladığı bilinmektedir (Chen ve diğerleri, 2024). Bu bağlamda, ekstrakt örneğinde hesaplanan ortalama kristal boyutunun 0,42 nm olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç, çalışılan materyalde düşük düzeyli kristalinlik ile yaygın amorf fazın varlığını işaret etmektedir.

Ayrıca, ekstraktın formülasyonda bulunan Span 60 ve dodekanol gibi yüzey aktif ajanlarla etkileşimleri, kristal yüzey enerjisini düşürerek kristallerin birleşme ve büyüme süreçlerini kolaylaştırmıştır. Bu tür etkileşimler, kristal büyümesini destekleyen termodinamik koşullar oluşturarak daha büyük boyutlu kristal yapıların oluşumunu teşvik etmektedir. Dolayısıyla, proniozomal sistemlerde fenolik bileşiklerin kristalleşme davranışı, yüzey aktif maddelerin varlığıyla dengelenmiş olarak gözlemlenmiştir (Şekil 4.27). Bu durum, formülasyonun fizikokimyasal stabilitesi ve potansiyel biyoyararlanımı üzerinde doğrudan etkili olabilmektedir.

X-ışını kırınımı (XRD) verilerinden elde edilen kristalit boyutu analizine göre, örneklerde gözlenen piklerin büyük çoğunluğu dar bir aralıkta (0,10– 0,23 Å) dağılım göstermiştir. Ortalama kristalit boyutu 0,168 Å, standart sapma 0,058 Å olarak hesaplanmış; buna göre $\pm 1\sigma$ aralığı 0,110– 0,226 Å arasında belirlenmiştir. Bu değerler, sistemin oldukça homojen bir kristal yapıya sahip olduğunu ve kristalitlerin nanometrik boyutta ($\sim 1,7$ nm) bulunduğunu göstermektedir.

Veri setinde $14,50^\circ$ civarındaki pik (52,50 Å) diğerlerinden belirgin biçimde daha yüksek bir kristalit boyutu değeri sergilemiş ve istatistiksel olarak aykırı değer (outlier) olarak değerlendirilmiştir. Bu pik, muhtemelen sistemde bulunan farklı bir fazın, kısmen kristalin bir bölgenin ya da formülasyondaki yapısal düzensizliğin göstergesidir. Genel dağılımın dar ve tek modlu olması, kristal yapının yüksek oranda düzenli ve homojen bir şekilde oluştuğunu desteklemektedir. İlgili histogram analizinde frekans yoğunluğu 0,15– 0,20 Å aralığında en

yüksek değere ulaşmış, bu da kristal büyüklüklerinin büyük kısmının bu aralıkta yoğunlaştığını göstermiştir. Dolayısıyla elde edilen sonuçlar, formülasyonun yüksek derecede yapısal bütünlük ve düşük kristal boyutu varyasyonu ile karakterize edildiğini ortaya koymaktadır (Şekil 4.25).



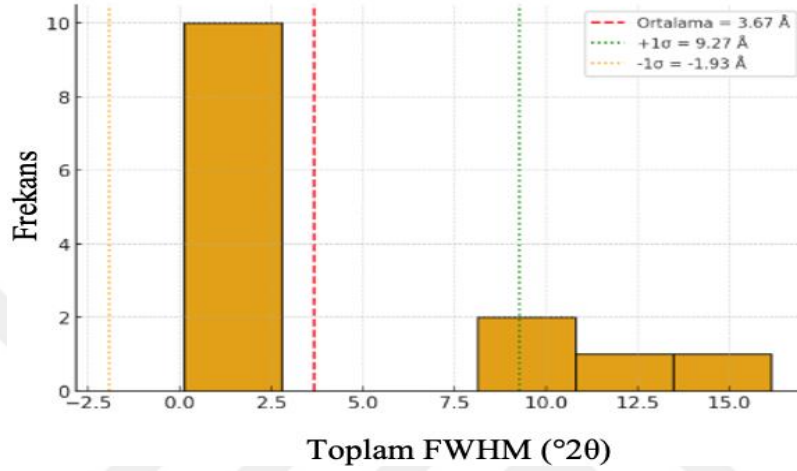
Şekil 4.25. Ekstrakta ait kristal boyutu dağılımı

X-Işını Kırınımı (XRD) analizi, kontrolün yapısal dağılımında belirgin bir bimodalite gözlemlendiğini ortaya koymuştur. Bu bimodalite, fiziksel özellikler bakımından farklı iki ayrı kristalit popülasyonunun varlığına işaret etmektedir. Bir yandan ≈ 48 nm boyutunda hesaplanan iyi kristalleşmiş bölgelere ait dar ve keskin pikler gözlemlenirken, diğer yandan FWHM ortalaması $\approx 5,14^\circ$ olan çok geniş ve yayvan pikler baskınlık göstermektedir.

Bu yayvan piklerin ve ilgili dağılımının istatistiksel analizi, 0,37 nm (3,67 Å) gibi atomik ölçeğe yakın bir kristalit boyutu ortalaması vermiştir (Fatimah, Ragadhita, Al Huseaeni ve Nandiyanto, 2022). Bu sonuç, niozomal yapının temelini oluşturan sürfaktan ve kolesterol bileşenlerinin uzun menzilli bir kristal kafes düzeni oluşturmadığını ve yüksek derecede amorf bir karaktere sahip olduğunu kesinleştirmektedir (Wadhwa, Sharma, Sahu, Sharma ve Kumar, 2022). Elde edilen 0,3- 1 nm aralığındaki ortalama boyut, yapının esnek lamel düzeniyle uyumlu bulunmuştur.

$1,93^\circ$ (-1σ değeri) ile $9,27^\circ$ ($+1\sigma$ değeri) arasındaki geniş FWHM varyasyonu, sistemdeki heterojenliği açıkça ortaya koyar. Bu durum, XRD verilerinin niozomal fazın sinyalini yüksek

FWHM ile birlikte, formülasyon kaynaklı agregasyon veya kristalizasyondan ileri gelen ≈ 48 nm'lik küçük bir kristal katkının sinyalini (düşük FWHM) içerdiğini göstermektedir. Dolayısıyla, XRD bulguları, numunenin dominant olarak amorf/ultra-nanokristal bir matristen oluştuğu, ancak mikron altı ölçekte ikincil bir kristal fazın da yapıya dahil olduğu sonucunu desteklemektedir (Şekil 4.26).



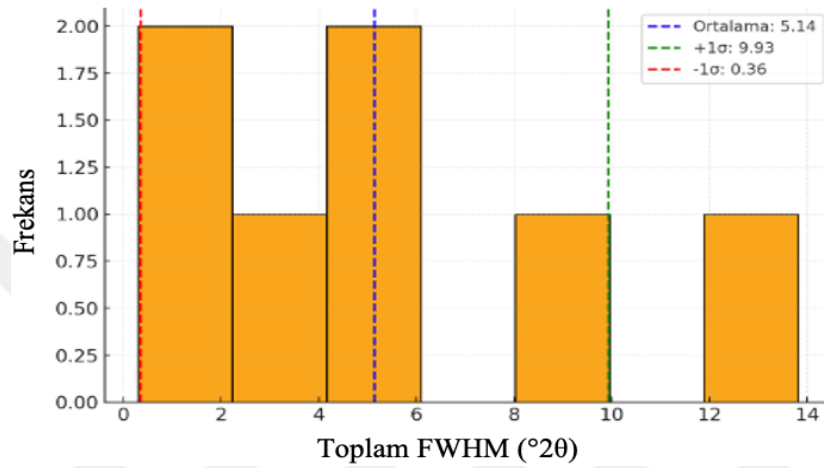
Şekil 4.26. Kontrole ait kristal boyutu dağılımı

Kontrole ait kristalit boyutu dağılım genişliği, sistemde yüksek heterojenlik ve farklı kristal fazların bir arada bulunduğuna işaret etmektedir. Özellikle $19,86^\circ$ ve $35,57^\circ$ konumlarındaki piklerde gözlenen yüksek kristalit boyutu değerleri (16,16 ve 11,33 Å), yapıda kısmen kristalin veya yeniden düzenlenmiş bölgelerin varlığına işaret etmektedir. Buna karşılık $27-56^\circ$ aralığında yer alan piklerde kristalit boyutlarının 0,1– 0,25 Å arasında dar bir aralıkta yoğunlaştığı görülmektedir; bu durum amorf benzeri, düşük düzenlilikte nano-yapıların ağırlıklı olduğunu düşündürmektedir.

Bu bulgular, sistemin genel olarak karma fazlı bir yapıya sahip olduğunu, küçük kristalitlerin amorf matris içinde dağıldığını ve bazı bölgelerde kristalin yoğunlaşmaların meydana geldiğini göstermektedir. $\pm 1\sigma$ aralığının oldukça geniş olması, kristal büyüklüklerinin birbirine göre büyük farklılıklar gösterdiğini ve formülasyonda faz ayrışması veya düzensiz kristal büyümesi olasılığını desteklemektedir.

Proniozomun yapısal heterojenliğinin pik profilleri üzerindeki etkisini detaylandırmak amacıyla, XRD verilerine ait pik parametreleri istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Analiz

sonuçları, yüksek ortalama pik genişliği (FWHM) değerleri ile birlikte değerlendirildiğinde, numunenin genelinde çok küçük kristalitlerin ve/veya önemli oranda amorf fazın baskın olduğunu göstermektedir (Şekil 4.27). Bu durum, kristal yapıdaki düzensizliklerin ve düşük düzen derecesinin bir göstergesi olarak yorumlanabilir. Nitekim, Scherrer denklemi uyarınca pik genişliği değerleri kristalit boyutu ile ters orantılı olduğundan, gözlenen geniş pik profilleri proniozom sisteminin yüksek amorf karakter sergilediğini teyit etmektedir.



Şekil 4.27. Proniozoma ait kristal boyutu dağılımı

Dağılımın $0,36^\circ$ (-1σ değeri) ile $9,93^\circ$ ($+1\sigma$ değeri) arasındaki geniş aralığı, önceki Scherrer hesaplamaları ile ortaya konan bimodal/heterojen boyutsal karakteri istatistiksel olarak desteklemektedir. Dağılımın alt sınırına yakın olan değerleri, boyut dağılımında hesaplanan iyi kristalleşmiş ve büyük kristalitleri temsil ederken; ortalama ve üst sınırlara doğru yığılan $5,14^\circ$ ve üzerindeki yüksek değerleri, ortalama kristalit boyutuna katkıda bulunurken, üzerindeki yüksek FWHM değerleri, $0,37$ nm ortalama kristalit boyutuna katkıda bulunan ultra-küçük nanokristalitler ve amorf bölgelere karşılık gelmektedir. Bu geniş istatistiksel dağılım, numune içindeki kristalizasyon derecesinin ve tanecik boyutunun tek tip olmaktan uzak olduğunu ve elde edilen yapısal bulguların, $0,36^\circ$ 'lik dar bir pürüzsüz pik rejiminden, 9° 'yi aşan yayvan bir nanokristal/amorf rejime kadar uzanan geniş bir boyutsal yelpazenin ortalamasını temsil ettiğini açıkça göstermektedir (Li ve diğerleri, 2023).

Sonuç olarak, elde edilen XRD verileri, formülasyonun kısmen kristalin – kısmen amorf karakterde olduğunu; ortalama 10 Å civarındaki kristalitlerin homojen bir dağılımdan ziyade farklı boyutlarda kümelenmeler oluşturduğunu göstermektedir. Bu durum, yapının termal

işlem, bileşen etkileşimi veya formülasyonun taşıyıcı matrisi tarafından etkilenmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Genel olarak, elde edilen veriler, proniozomal enkapsülasyonun kontrollü ve yüksek derecede optimize edilmiş kristal büyümesini sağladığını göstermektedir. Bu yaklaşım sayesinde kristaller, hedeflenen boyut aralığında büyük ölçüde tutarlı şekilde elde edilmiştir. Dolayısıyla, üretilen materyalin uygulama açısından istikrarlı ve güvenilir fiziksel özellikler sergilemesi beklenmektedir.

4.4.5. Yüzey morfolojisi ve topografi analiz sonuçları

Yüzey morfolojisi ve topografisi, formülasyonların mikroyapısal özelliklerini ve partikül homojenliğini değerlendirmek amacıyla incelenmiştir. HZYE içeren mikro/nano kapsüller, SEM ve AFM ile gözlemlenmiş; elde edilen veriler, partikül şekli, homojenliği ve yüzey pürüzlülüğüne ilişkin yapısal ve fonksiyonel bilgilerin elde edilmesine olanak sağlamıştır.

4.4.5.1. SEM analizi sonuçları

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), örneklerin şekil, yüzey topografisi, homojenlik ve agregasyon durumunu yüksek çözünürlükte detaylı bir şekilde incelemesini sağlamaktadır. Analiz öncesinde, proniozom örnekleri uygun şekilde hazırlanmış ve vakum altında yüksek büyütme oranlarında gözlenmiştir. Taşıyıcı malzeme olarak kullanılan maltodekstrin, *Lb. plantarum* ATCC 14917 ile fermente edilen sıvı kısmının ekstraksiyon sonrasında liyofilize edilen ekstraktı (HZYE), kontrol ve proniozom formülasyonlarının yüzey morfolojileri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiş olup, elde edilen görüntüler Şekil 4.29- 4.31’de sunulmuştur.

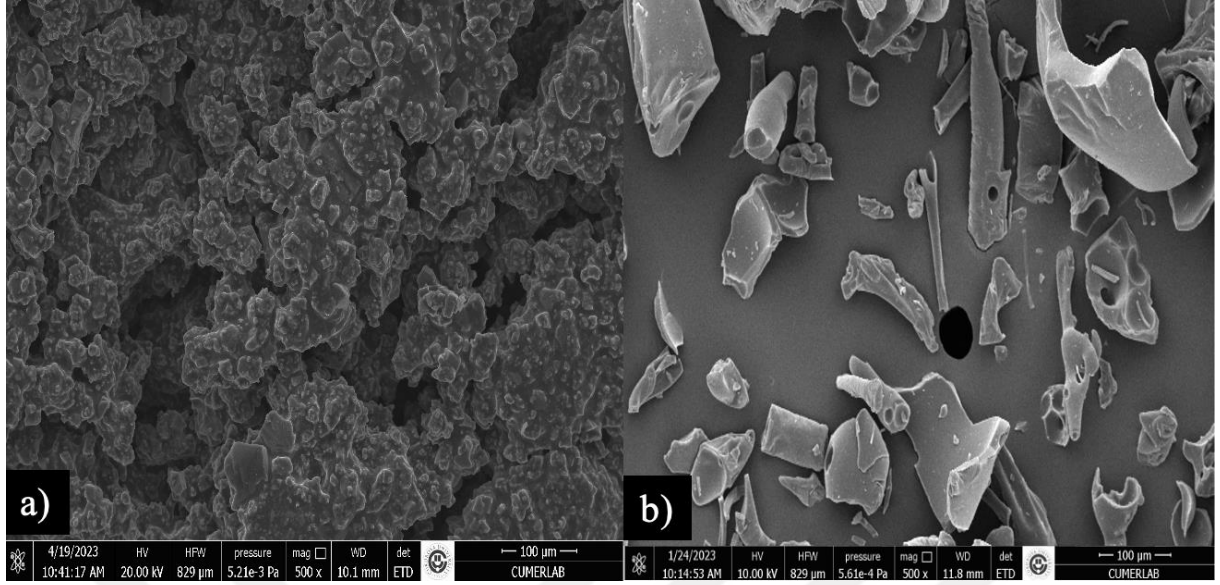
Ribeiro ve diğerleri (2023), 2 mg/mL ve 5 mg/mL hidroksitirozol içeren poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) nanokapsüllerinin SEM görüntülerini incelemişlerdir. SEM analizleri, hidroksitirozolün kristal yapılı ve düzensiz bir yüzey sergilediğini ortaya koymuştur. Elde edilen görüntüler, bu çalışmada kullanılan HZYE ile benzer morfolojik özelliklere sahiptir (Şekil 4.28-a).

Ribeiro ve diğerleri, zeytin yaprağı ekstraksiyonundan kaynaklanan organik kalıntıların EDX spektrumunda C, O, N, P ve S elementleri ile doğrulandığını bildirmiştir. Ag-olive örneğinde bu elementlerin varlığı, fitokimyasal bileşiklerin nanopartikül yüzeyinde bulunduğunu

göstermektedir. Ag-pure örneğinde ise bu elementler gözlenmemiş, kalsinasyon işleminin organik ve uçucu bileşikleri uzaklaştırarak yüksek saflıkta, kristalin gümüş nanopartiküller elde edilmesini sağladığı ortaya konmuştur. Literatürde de OLE ile sentezlenen AgNP'lerin EDX analizlerinde benzer şekilde C, O, N ve bazen P ile S sinyalleri raporlanmış ve bu elementlerin ekstrakt bileşenlerinin nanoparçacık yüzeyinde kaldığını gösterdiği belirtilmiştir (Alotaibi ve diğerleri, 2024; Sellami ve diğerleri, 2021; Vanvalveni ve diğerleri, 2021).

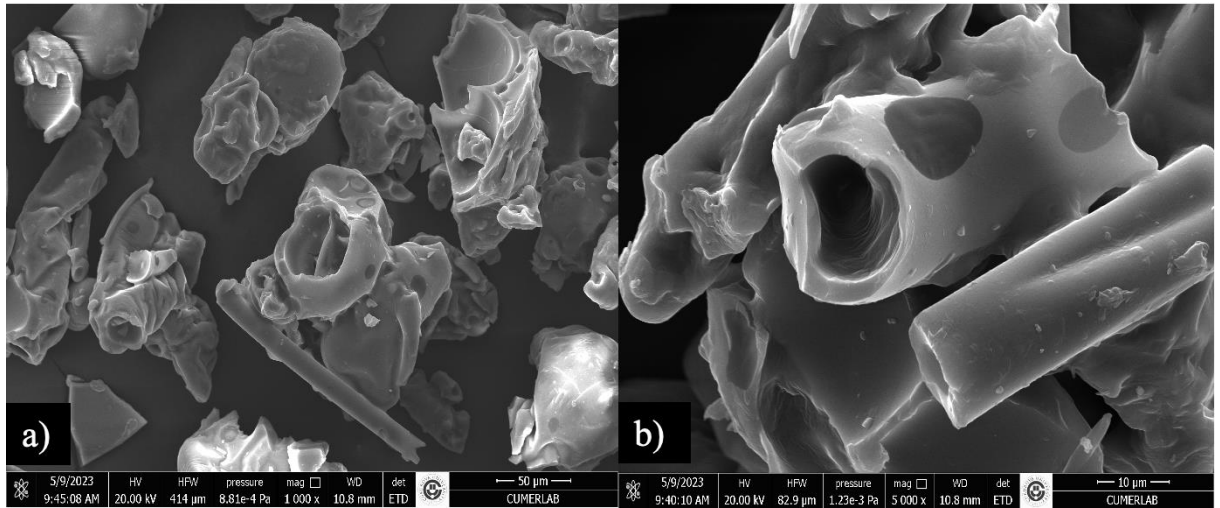
Maltodekstrinler, gıda ürünlerinin fizikokimyasal ve reolojik özelliklerini şekillendirmek için gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Badin ve diğerleri (2025), üç farklı dekstroz eşdeğeri (DE) maltodekstrini model matriksler olarak ele almış, tek parçacık yüzey morfolojisi ile teknoloji-fonksiyonel davranışlar arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. SEM gözlemleri, tüm maltodekstrin partiküllerinin yüzeyde granül yapılar sergilediğini göstermiştir. Düşük DE değerine sahip maltodekstrinler, daha homojen ve küresel şekle sahipken, DE arttıkça yüzey pürüzlülüğü artmış ve düzensiz yapılar, boşluklar ve kırışıklıklar belirginleşmiştir. Orta ve yüksek DENE sahip partiküller, etraflarında çok sayıda mikroboşluk ve kırışıklık yapıları ile daha pürüzlü ve daha az küresel yüzey göstermiştir. Bu morfolojik farklılıklar, DE değerinin partikül şekli ve yüzey topografisi üzerinde belirleyici olduğunu ve bunun da ıslanma, yapışma ve akışkanlık gibi teknoloji-fonksiyonel özellikleri doğrudan etkilediğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, cam geçiş sıcaklığı ve bağıl nemin etkisi altında partikül elastikiyeti ve kapiler köprü oluşumunun, tozun topaklanma davranışıyla doğrudan ilişkili olduğu vurgulanmıştır.

Proniozomal formülasyonda kullanılan maltodekstrine ait SEM görüntülerinde granüllerin kırıklı yapıda ve farklı boyutlarda olduğu, morfolojik yapıda belirgin bir tekdüzelik bulunmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.28-b). Bu durum, maltodekstrinin üretim sürecinden kaynaklanan parçalanma eğilimi ve amorf karakteri ile ilişkilendirilmektedir. Jufri, Anwar ve Djajadisastra (2004) ise SEM analizine göre DE 5– 10 olan maltodekstrin partiküllerinin poligonal şekilli ve boyutlarının homojen olmadığını bildirmişlerdir. Partiküllerin blender ile küçültülmesi sonucu bazı parçaların köşeli, bazılarının ise daha küçük boyutlara ayrıldığı; bu nedenle elekten geçirilse bile boyut dağılımının homojen kalmadığı rapor edilmiştir. Bu bulgular, bu çalışmada kullanılan maltodekstrin görselleri ile de uyumludur.



Şekil 4.28. Ekstrakt ve maltodekstrine ait SEM görüntüleri a) Ekstrakt (500x), b) Maltodekstrin (500x)

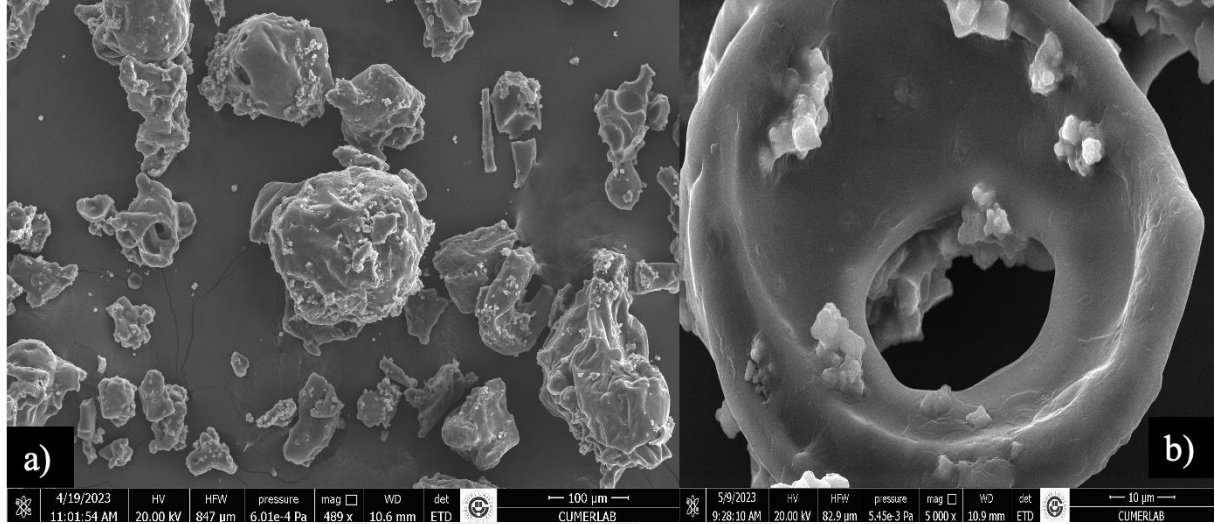
Kontrol proniozomların SEM görüntüleri (Şekil 4.29), yüzey morfolojisi ve partikül dağılımını değerlendirmek amacıyla incelenmiştir. Görüntülerde kapsüller genellikle yuvarlak ve düzgün kenarlı olup, bazı bölgelerde hafif kırıklıklar gözlenmiştir.



Şekil 4.29. Kontrole ait SEM görüntüleri a) 1000x büyütme, b) 5000x büyütme

Ramazanli ve Ahmadov (2022), zeytin yaprağı ekstraktı ile sentezlenen gümüş nanopartiküllere ait SEM analizlerinde, nanopartiküllerin büyük çoğunluğunun küresel ve pürüzsüz yüzeyli olduğunu göstermiştir. Nanopartiküller, iyi dağılmış ve düzenli bir yerleşim sergilerken, boyutları yaklaşık 7,12– 18,8 nm aralığında bulunmuştur. SEM görüntüleri, nanopartiküllerin

agregatlar içinde bile doğrudan temas edebildiğini ortaya koymuş ve bunun stabilizatör ajanların etkinliğini gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca, agregasyon sırasında küçük nanopartiküllerin bir araya gelerek daha büyük yapılar oluşturabildiğini belirtmişlerdir. Bu bulgular, bu çalışmada elde edilen sonuçlarla uyumludur (Şekil 4.30).



Şekil 4.30. Proniozoma ait SEM görüntüleri a) 1000x büyütme, b) 5000x büyütme

Daha önceki çalışmalarda, mikrokapsüllenmiş ve nanokapsüllenmiş zeytin yaprağı toz formülasyonlarının morfolojik yapısının genellikle küresel ve pürüzsüz bir yüzeye sahip olduğu, ancak belirli düzeyde kümelenme eğilimi gösterdiği rapor edilmiştir (Muhammad, Ramzan, Zhang ve Zhang, 2021; Mansour ve diğerleri, 2023). Bu çalışmada elde edilen sonuçlarda da benzer şekilde kümelenmenin gözlemlendiği, bu durumun ise sistemin termal denatürasyona karşı geliştirdiği dirence bağlı olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca, büyük parçacıkların yüzeyinde daha küçük küreciklerin varlığı dikkat çekmiş ve bu yapının önceki literatür bulgularıyla tutarlılık gösterdiği belirlenmiştir (Silva ve diğerleri, 2013; Szabo ve diğerleri, 2021). Söz konusu morfolojik özelliklerin, büyük parçacıkları oksidasyon ve su penetrasyonuna karşı daha dirençli hale getirdiği düşünülmektedir (Szabo, 2021; Ciont ve diğerleri, 2023).

SEM görüntüleri, HZYE içeren mikro/nano kapsüllerin yüzey morfolojisini ve partikül dağılımını değerlendirmek amacıyla incelenmiştir. Görüntülerde maltodekstrin matrisinin kırıklı ve düzensiz bir yapıya sahip olduğu, buna karşılık zeytin yaprağı ekstraktının kristal benzeri bir görünüm sergilediği gözlenmiştir. Kapsüllerin çoğunlukla yuvarlak ve düzgün kenarlı bir morfolojiye sahip olduğu, bazı bölgelerde ise hafif pürüzlülük ve topografik

düzensizliklerin bulunduğu belirlenmiştir. Partiküllerin genel olarak homojen bir dağılım gösterdiği, yalnızca sınırlı düzeyde aglomerasyonların olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular, uygulanan enkapsülasyon yönteminin kapsüllerin yapısal bütünlüğünü koruduğunu ve morfolojik stabiliteyi büyük ölçüde sağladığını göstermektedir.

Ayrıca, SEM analizleri proniozomların genellikle multilameller vezikül (MLV) boyutlarında, DLS analizleri ise niozomların küçük unilameller vezikül (SUV) formunda olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, Masjedi ve Montahaei (2021) tarafından bildirilen bulgularla uyumlu bulunmuştur. Bu durum, proniozomların daha kompleks lameller yapı sunması ve yüzey aktif madde-lipid etkileşimlerinin faz geçiş stabilitesine katkı sağlamasıyla açıklanabilir (Ajrın ve Anjum, 2022).

4.4.5.2. AFM analizi sonuçları

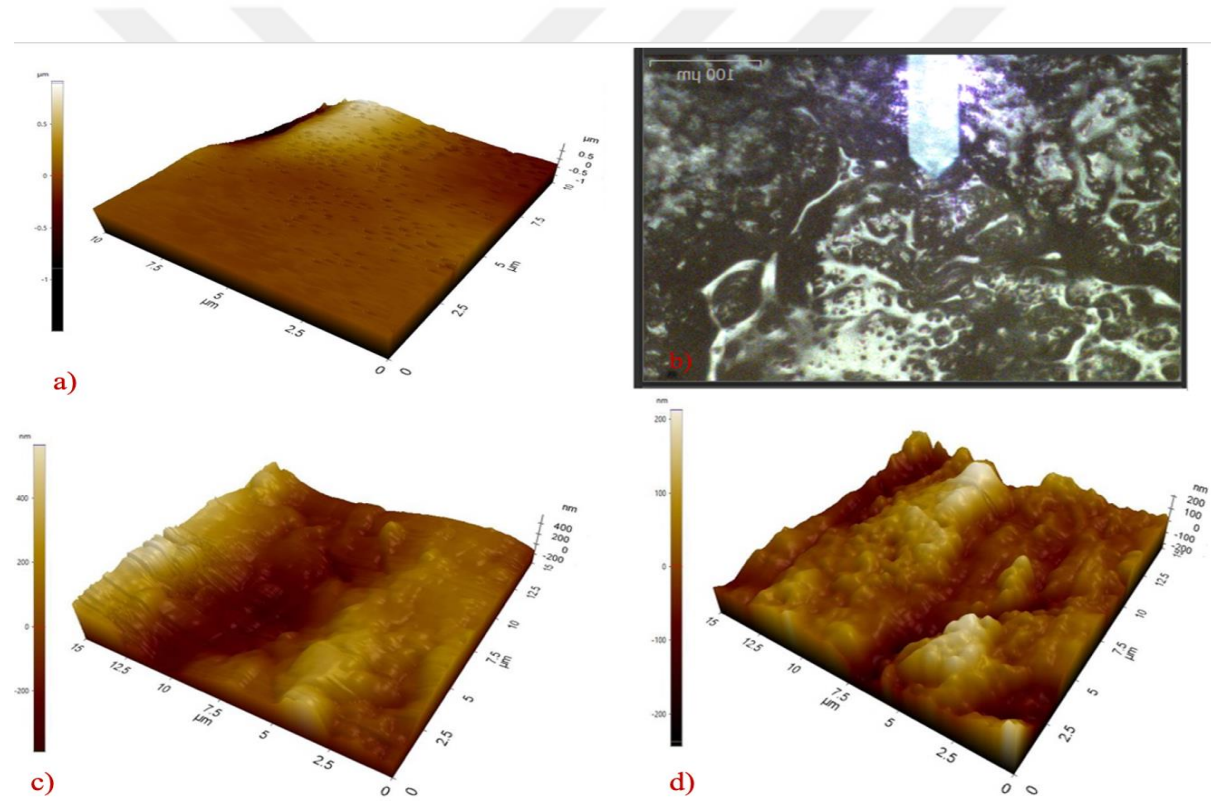
Ekstrakt, kontrol ve proniozom formülasyonlarının yüzey morfolojisi ve topografisi, atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile elde edilen görüntüler kullanılarak detaylı biçimde incelenmiştir. AFM, nanometrik çözünürlükte yüzey pürüzlülüğü, tepe-çukur mesafesi, sivrilik ve topografik heterojenlik gibi özelliklerin kantitatif olarak belirlenmesini sağlamak amacıyla kullanılmıştır. Bu sayede formülasyonların morfolojik karakteristikleri karşılaştırılmış ve potansiyel fonksiyonel etkilerine ilişkin yapısal bilgiler elde edilmiştir.

Görüntüler, Park Smart Scan™ yazılım sistemi aracılığıyla manuel çizilen profil çizgisi üzerinden analiz edilmiştir. Bu çizgiye ait ölçümler sonucunda kareköklü ortalama sapma (R_q), ortalama yüzey pürüzlülüğü (R_a) ve yüzeyin en yüksek tepe noktası ile en derin vadi arasındaki dikey mesafeyi ifade eden parametre (R_{pv}) mikrometre (μm) cinsinden belirlenmiş; yüzeyin sivrilik katsayısı (R_{ku}) ise teorik olarak hesaplanmıştır. Ölçüm sırasında AFM imleci (cursor) yatayda $\Delta X = 1,151 \mu m$, dikeyde $\Delta Y = 0,231 \mu m$ ve eğim açısı $11,353^\circ$ olacak şekilde konumlandırılmıştır; bu, analiz çizgisinin yatayda $1,151 \mu m$ sağa ve dikeyde $0,231 \mu m$ yukarı yöneldiğini, yaklaşık $11,353^\circ$ 'lik bir eğime sahip olduğunu göstermektedir.

Analizler, saniyede 15– 25 kare (fps) hızında görüntüleme yapabilen yüksek hızlı AFM (HS-AFM) ile gerçekleştirilmiş; tarama yaklaşık 100 çizgiden oluşan $100 \times 100 \text{ nm}^2$ 'lik bir grid alanında yapılmıştır. Bu konfigürasyon, yüksek mekansal çözünürlükle yüzey morfolojisinin zamana bağlı değişimlerini izlemeyi mümkün kılmıştır. HS-AFM'nin yüksek tarama kapasitesi

sayesinde, yüzeydeki nanometrik topografik heterojenlikler detaylı biçimde ortaya konmuş ve potansiyel fonksiyonel yüzey etkileşimleri hakkında önemli yapısal bilgiler elde edilmiştir ve sonuçlar Şekil 4.31 ve 4.32’de gösterilmiştir.

Şekil 4.31_a’da sunulan AFM yüzey profilinin kantitatif analizi sonucunda, ekstrakta ait yüzeyin ortalama pürüzlülük değeri (R_a) 67 nm olarak hesaplanmıştır. Bu değer ekstraktın fonksiyonel uygulamalar (örneğin proniozomlar, kapsülleme sistemleri) için uygun bir yüzey morfolojisi sunduğunu göstermektedir. Yüzeyin RMS (karekök ortalama) pürüzlülük değeri (R_q) 105 nm olarak ölçülmüş ve bu değer, yüzeyde bazı lokal bölgelerde ortalamanın üzerinde yükseklik değişikliklerinin bulunduğunu ortaya koymuştur.



Şekil 4.31. AFM görüntüleri a) HZYE b) HZYE’nin elmas uçla analizi c) Kontrol d) Proniozom

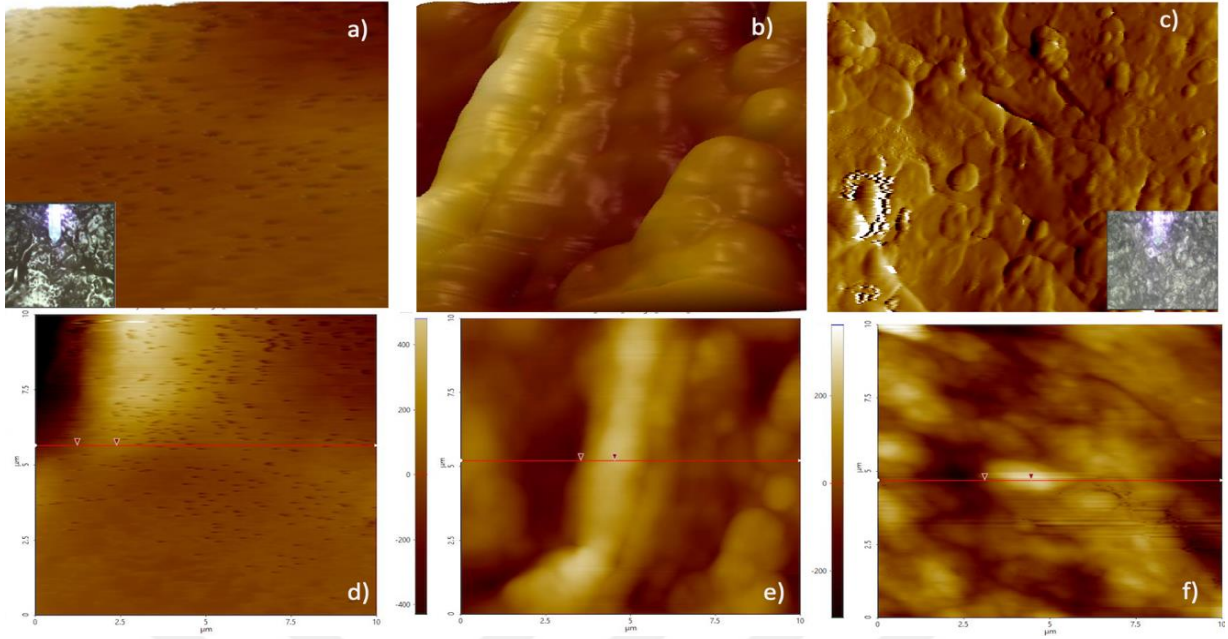
Ekstrakta ait en yüksek yüzey pürüzlülüğü (R_{pv}) 582 nm olarak tespit edilmiştir; bu, yüzeyde tepe noktaları ile çukur noktaları arasında belirgin bir dikey mesafe olduğunu göstermekte ve yüzey topografyasının lokal olarak heterojen olduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 4.32_a). Bunun yanında, yüzey pürüzlülüğünün dağılım karakterini ortaya koyan kurtosis (R_{ku}) değeri 5,025 olarak hesaplanmıştır. Normal dağılımda bu değer 3 civarında olması beklenirken, elde

edilen daha yüksek Rku değeri, yüzeyde keskin tepe noktaları ve derin vadilerin varlığına işaret etmektedir.

Bu sivri ve heterojen yapı, yüzey enerjisini ve dolayısıyla moleküler etkileşim potansiyelini artırabilmektedir. Bu ölçüm, yüzey topografyasının yerel olarak çıkıntılar ve çöküntüler içerdiğini ancak aşırı düzeyde agresif yapısal sivrilikler barındırmadığını ortaya koymaktadır. Elde edilen parametreler, ekstrakt yüzeyinin kontrollü fakat heterojen bir nano-yapı profiline sahip olduğunu göstermektedir (Barot, Rawtani ve Kulkarni, 2021).

Kontrol örneğine ait Şekil 4.32_b'de sunulan AFM görüntüsü üzerinden gerçekleştirilen profil çizgisi (cursor line) analizi sonucunda, yatay mesafe (ΔX) 0,987 μm ve dikey yükseklik farkı (ΔY) 416,934 nm olarak belirlenmiştir. Profil çizgisinin eğim açısı ise 22,904° olarak hesaplanmıştır. Bu yüzeyde ortalama yüzey pürüzlülüğü (R_a) 113,834 nm, kök ortalama kare pürüzlülük (R_q) 134,005 nm ve maksimum yüzey pürüzlülüğü (R_{pv}) 520,057 nm değerleri elde edilmiştir. Ayrıca, yüzeyin pürüzlülük dağılımını ifade eden kurtosis (Rku) değeri 1,992 olarak ölçülmüştür. Bu parametreler, yüzeyin belirgin tepe ve çukur yapıları barındırmakla birlikte, Rku değerinin 2'nin altında olması sebebiyle, yüzey profilinin nispeten daha yayvan ve sivrilikten uzak bir dağılım gösterdiğini ortaya koymaktadır. R_a ve R_q değerlerinin birbirine yakın olması ise yüzey pürüzlülüğünün genel olarak dengeli ve homojen bir yapıda olduğunu desteklemektedir. Elde edilen değerler, kontrol örneğinin yüzey topografyasının hafif düzensizlikler içerdiğini ancak aşırı keskin veya ani yükseklik değişimleri bulunmadığını göstermektedir.

Proniozom formülasyonunda (Şekil 4.32_c) ise profil çizgisi boyu (ΔX) 0,752 μm ve dikey yükseklik farkı (ΔY) 238,643 nm olarak ölçülmüştür. Profilin eğim açısı 17,596° olarak hesaplanmıştır. Bu formülasyonda ortalama pürüzlülük (R_a) 153,148 nm ve kök ortalama kare pürüzlülük (R_q) 180,443 nm ile kontrol örneğine kıyasla daha yüksek pürüzlülük değerleri elde edilmiştir.



Şekil 4.32. AFM görüntülerinin profil çizgisi ile birlikte gösterimi a) HZYE, b)Kontrol, c)Proniozom, d)HZYE (profil çizgisi ile), e)Kontrol (profil çizgisi ile), f)Proniozom (profil çizgisi ile)

Maksimum pürüzlülük (R_{pv}) 675,229 nm ile daha geniş bir tepe-çukur mesafesi göstermekte, bu da yüzey topografisinin lokal olarak daha heterojen ve kompleks olduğunu ifade etmektedir. Kurtosis (R_{ku}) değeri 2,091 olup, kontrol örneğine benzer şekilde nispeten yayvan bir dağılım sergilemesine rağmen, hafifçe daha fazla sivrilik ve uç değerlerin varlığına işaret etmektedir.

Tablo 4.10’da sunulan AFM analiz sonuçlarına göre, proniozom formülasyonu yüzey pürüzlülüğü ve topografik dalgalılık açısından ekstrakt ve kontrol örneklerine kıyasla belirgin bir artış göstermektedir. Ortalama pürüzlülük (R_a) ve kök ortalama kare pürüzlülük (R_q) değerleri proniozomda en yüksek ölçülmüş, tepe-çukur yüksekliği (R_{pv}) de yüzeyin daha belirgin dalgalı olduğunu ortaya koymuştur.

Sivrilik katsayısı (R_{ku}) ise proniozomda kontrol örneğine yakın bir değer sergileyerek, yüzeyin sivrilik açısından daha homojen bir dağılıma sahip olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, Tablo 4.10’daki verilerle uyumlu olarak proniozom formülasyonunun yüzey morfolojisinde önemli değişiklikler yarattığını doğrulamaktadır.

Tablo 4.10. Ekstrakt, kontrol ve proniozom örneklerinin AFM ile belirlenen yüzey pürüzlülük parametreleri

Parametre	Ekstrakt	Kontrol	Proniozom
Ra (nm)	67	114	153
Rq (nm)	81	134	180
Rpv (nm)	582	520	675
Rku	5,03	1,99	2,09

AFM analizleri, ekstrakt yüklü niozomların daha düşük Ra (67 nm) ve Rq (81 nm) değerleri ile daha düzgün yüzey yapısına sahip olduğunu göstermiştir. Rpv değerleri, proniozom örneklerinde en yüksek 675 nm olarak bulunmuş ve yüzey tepe-çukur farklarının bu formülasyonda daha belirgin olduğunu ortaya koymuştur. Rku değeri ekstrakt örneğinde yüksek (5,03) bulunmuş ve yüzeyin sivri uçlu özellikler taşıdığını göstermektedir (Fegghi, Anvar, Moghimipour, Mirzaie ve Tadayoni, 2025)

DLS ölçümleri ile karşılaştırıldığında, AFM ile elde edilen boyutlar daha küçüktür; örneğin proniozom AFM’de 153 nm iken, DLS ile $219,5 \pm 5,72$ nm olarak ölçülmüştür. Bu fark, AFM’nin kurutulmuş katı yüzeydeki parçacıkları ölçmesi, DLS’nin ise sıvı ortamda hidrodinamik çapı belirlemesinden kaynaklanmaktadır. PDI değerleri, proniozomun daha homojen bir dağılıma sahip olduğunu göstermektedir ($0,238 \pm 0,03$).

Proniozom formülasyonunun yüzey pürüzlülük parametreleri, kontrol örneğine kıyasla belirgin şekilde artış göstermiştir; bu artış, yüzey alanının genişlemesi ve topografik heterojenitenin yükselmesiyle ilişkilendirilebilir. Ortalama pürüzlülük (Ra) ve karekök ortalama kare pürüzlülük (Rq) değerlerindeki yükseliş, yüzeyde daha fazla aktif etkileşim alanı oluştuğunu gösterirken, maksimum pürüzlülük (Rpv) ve kurtosis (Rku) değerlerindeki artışlar formülasyonun mikromorfolojik yapısına özgün heterojenliklerin ve yüzey topografyasında keskin tepe ile derin vadilerin varlığını ortaya koymaktadır. Bu veriler, kullanılan taşıyıcı sistemin yüzey morfolojisini anlamlı biçimde etkilediğini ve proniozomun, kontrollü fakat belirgin heterojenlik içeren bir yüzey profiline sahip olduğunu göstermektedir. Böylece, bu yapısal karakteristikler biyoyararlanım ve kapsülleme performansı açısından fonksiyonel avantajlar sağlayabilecek optimize edilmiş bir yüzey özellikleri profiline işaret etmektedir. Bu

veriler, proniozomun taşıyıcı sistemi tarafından sağlanan yapısal düzenlemelerin, kapsülleme performansı ve biyoyararlanım açısından fonksiyonel avantajlar yaratabileceğini desteklemektedir (Al-Edresi, Hamrah ve Al-Shaibani, 2024).

4.5. Fonksiyonel ve Biyolojik Etkinlik

Son yıllarda, biyoaktif bileşiklerin stabilizasyonu ve etkinliklerinin artırılması, farmasötik ve gıda teknolojisi alanında önemli bir araştırma konusu olmuştur. Hidroksitirozol (HZYE), özellikle zeytin yaprağı kaynaklı polifenolik bir bileşik olarak güçlü antioksidan ve antimikrobiyal özellikler sergilemektedir; ancak yüksek suda çözünürlüğü ve çevresel faktörlere karşı duyarlılığı, etkinliğinin doğrudan uygulanmasını sınırlamaktadır. Bu sınırlamaları aşmak amacıyla, proniozomlar biyomoleküllerin taşınmasında ve kontrollü salımında etkin taşıyıcı sistemler olarak öne çıkmaktadır. Proniozom formülasyonları, hidroksitirozolün fiziko-kimyasal kararlılığını artırmasının yanı sıra, veziküler yapının bileşiği oksidatif, ışık kaynaklı veya enzimatik degradasyona karşı koruması sayesinde biyoyararlanımını da iyileştirebilmektedir. Bu iyileşme, proniozomların amfifilik yüzey aktif maddelerle oluşturduğu stabil vezikül yapısının, hidroksitirozolün kontrollü salımını sağlaması, mukozal geçirgenliği artırması ve taşıyıcı-lipit etkileşimleri yoluyla hücre alımı kolaylaştırması gibi teknik mekanizmalardan kaynaklanmaktadır. Bu bağlamda, çalışmada HZYE'nin proniozom sistemi içinde enkapsülasyonu ile fonksiyonel özelliklerinin, antioksidan kapasitesinin ve antimikrobiyal etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen bulgular, hem farmasötik hem de besin takviyesi uygulamaları için HZYE proniozomlarının potansiyel kullanımını ortaya koymaktadır.

4.5.1. Antioksidan aktivite analiz sonuçları

Bu çalışmada, proniozom formülasyonlarının serbest radikal temizleme kapasitesini değerlendirmek amacıyla ABTS ve DPPH yöntemleri kullanılarak antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. Analizler sonucunda, kontrol grubunda anlamlı bir antioksidan aktivite gözlemlenmemiştir. Buna karşın proniozom formülasyonu, konsantrasyona bağlı olarak artan bir antioksidan aktivite sergilemiştir. Niozomal çözeltinin konsantrasyonu arttıkça, antioksidan aktivite değerlerinde ($\mu\text{mol TE/g}$) anlamlı bir artış kaydedilmiştir.

DPPH yöntemi ile antioksidan aktivite ölçümlerinde, Trolox standart eğrisi $y = 1,3925x - 3,8923$ ve yüksek belirleme katsayısı $R^2 = 0,9787$ elde edilmiştir. Bu sonuç, ölçümlerin

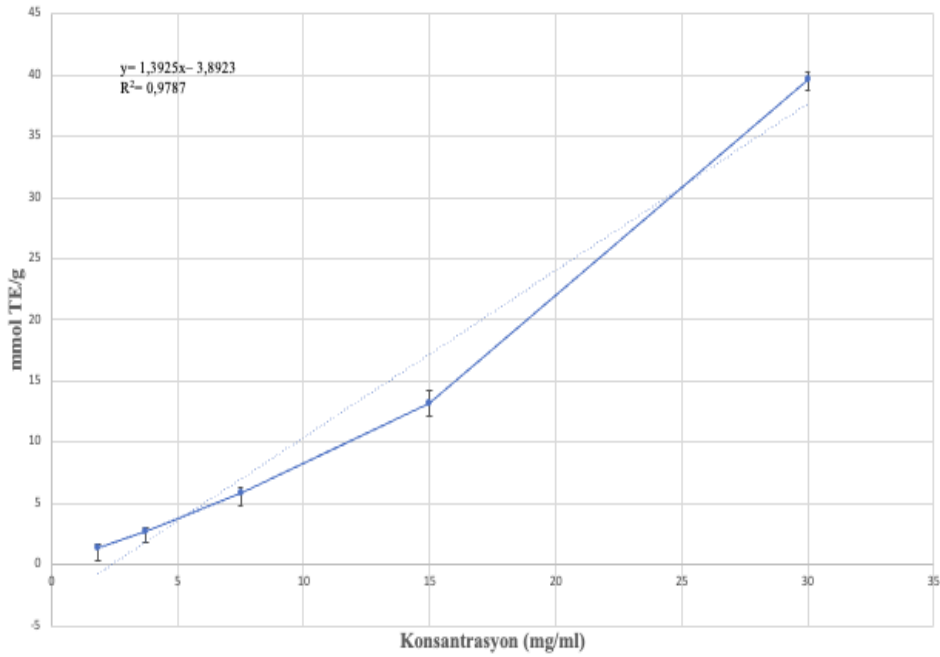
doğruluğunu ve Trolox eşdeğeri (TE) cinsinden hesaplamaların güvenilirliğini göstermektedir. Tablo 4.11’de sunulan veriler, proniozom formülasyonlarının antioksidan kapasitesinin konsantrasyona bağlı olarak anlamlı bir şekilde değiştiğini ortaya koymaktadır. En yüksek konsantrasyon olan 30 mg/mL’de DPPH radikal süpürme kapasitesi $39,71 \pm 0,59$ $\mu\text{mol/g}$ olarak belirlenmiş olup, konsantrasyon azaldıkça antioksidan aktivitede belirgin bir düşüş gözlenmiştir; örneğin 1,86 mg/mL’de ölçülen aktivite $1,32 \pm 0,34$ $\mu\text{mol/g}$ seviyesine kadar gerilemiştir.

Tablo 4.11. Proniozomların konsantrasyona bağlı DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi değerleri

Konsantrasyon (mg/mL)	DPPH ($\mu\text{mol/g}$)
30	$39,71 \pm 0,59$
15	$13,18 \pm 0,98$
7,5	$5,82 \pm 0,52$
3,75	$2,74 \pm 0,23$
1,86	$1,32 \pm 0,34$

DPPH serbest radikal süpürme kapasitesine dayalı analiz sonuçları değerlendirildiğinde, kontrol grubundaki proniozomların belirgin bir antioksidan aktivite göstermediği tespit edilmiştir. Buna karşın, ekstrakt yüklü proniozomal formülasyonlarda antioksidan aktivitenin, konsantrasyon artışıyla doğru orantılı olarak arttığı gözlenmiştir. Niozomal çözeltinin konsantrasyonu arttıkça, antioksidan etkinlik değerleri μmol Trolox eşdeğeri (TE)/g birimiyle ölçülen sonuçlarda anlamlı bir artış sergilemiştir.

Bu bulgular, proniozomların içerdiği biyoaktif bileşenlerin etkin bir şekilde radikal süpürme kapasitesi gösterdiğini ve formülasyon konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak fonksiyon gösterebildiğini ortaya koymaktadır. Konsantrasyona bağlı değişimi görselleştiren grafik Şekil 4.33’te sunulmuştur.



Şekil 4.33. Proniozomların DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi

ABTS yöntemi ile yapılan ölçümler, proniozom ve kontrol gruplarında konsantrasyon artışıyla belirgin bir antioksidan aktivite artışı göstermemiştir (Tablo 4.13). Proniozom formülasyonunda 30 mg/mL konsantrasyonda ölçülen aktivite $222,89 \pm 16,92$ olarak yüksek görünmekle birlikte, daha düşük konsantrasyonlarda değerler kontrol grubu ile büyük ölçüde benzerlik göstermektedir.

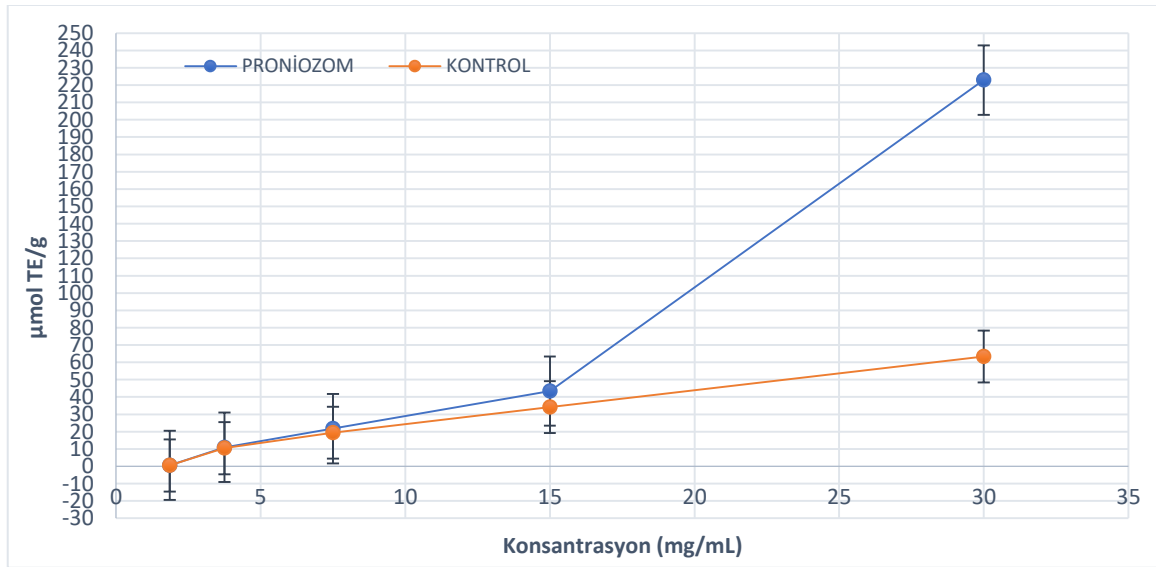
Kontrol grubunda da yüksek konsantrasyonlarda artış gözlemlenmiş, ancak formülasyonlar arasında tutarlı bir fark oluşmamıştır. Ölçümlerde gözlenen yüksek varyasyon ve bazı konsantrasyonlarda değerlerin beklenmedik şekilde yüksek veya düşük çıkması, ABTS yönteminin bu çalışmada güvenilir ve tekrarlanabilir bir antioksidan değerlendirmesi sağlamadığını göstermektedir (Tablo 4.12).

Tablo 4.12. Proniozom ve kontrolün ABTS serbest radikal süpürme aktivitesi değerleri

Konsantrasyon (mg/mL)	30	15	7,5	3,75	1,86
Proniozom	222,89±16,92	43,40±0,98	21,70±0,52	10,94±0,63	0,52±0,72
Kontrol	63,31±9,75	34,21±1,47	19,37±1,38	10,43±0,46	0,48±0,07

Ölçümlerde gözlenen yüksek değişkenlik ve konsantrasyon-bağımlı artışın net bir şekilde saptanamaması, ABTS yönteminin proniozomların antioksidan kapasitesini kantitatif olarak güvenilir biçimde değerlendirmede yetersiz olduğunu göstermektedir (Şekil 4.34).

Zimmermann, Shahgaldian, Corvini ve Hommes (2011), duman yöntemiyle üretilmiş silika nanoparçacıkları üzerine immobilize edilen lakkazın ABTS substratı ile ölçülen aktivitesi serbest lakkaza kıyasla bir ay boyunca belirgin şekilde daha stabil bulunmuştur. Bununla birlikte, ABTS'nin nanoparçacıklara difüzyon sınırlamaları ve enzimlerin seçici bağlanması ölçülen aktiviteyi etkileyebilecek faktörler olarak belirtilmiştir.



Şekil 4.34. Proniozomların ABTS serbest radikal süpürme aktivitesi

Elde edilen sonuçlarda, aynı konsantrasyonlarda DPPH ölçümlerinin nispeten düşük, ABTS ölçümlerinin ise yüksek değerler verdiği gözlenmiştir. Bu farklılık, her iki yöntemin kimyasal yapısı ve çözünürlük özelliklerinden kaynaklanabilir. ABTS radikali hem lipofilik hem de hidrofilik bileşenlerle etkileşime girebildiği için, proniozom içerisindeki tüm biyoaktif bileşenlerin antioksidan kapasitesi daha yüksek görünmüş olabilir. Buna karşın DPPH radikali suda çözünmediğinden, özellikle hidrofilik antioksidanların etkisi yeterince ölçülememiş ve bu nedenle aynı konsantrasyonlarda daha düşük aktivite değerleri elde edilmiştir (Büyüktuncel, 2013). Bu durum, iki yöntem arasındaki duyarlılık ve ölçüm aralığı farklarını ve yöntemlerin proniozomların antioksidan kapasitesini değerlendirmede sağladığı farklı bilgileri ortaya koymaktadır.

Mazzotta ve diğerleri (2021), doğal fenolik asit yüklü niozomların antioksidan aktivitelerini ABTS ve DPPH yöntemleri ile incelemişlerdir. Çalışmaları sonucunda, ABTS yöntemi ile DPPH yöntemine kıyasla daha yüksek antioksidan kapasite değerleri elde ettiklerini bildirmişlerdir. Yüzey konjugasyonuna bağlı olarak ABTS yöntemi, bu çalışmada gözlenen sonuçlara benzer şekilde, antioksidan kapasiteyi belirlemede daha duyarlı bulunmuştur.

Machado, Gutierrez, Matos ve Fernandez (2021), resveratrolün Tween80:Span80 ve Tween80:Span80:dodekanol niozomlarında enkapsüle edilmesinin antioksidan aktivite üzerindeki etkilerini DPPH ve ABTS yöntemleri ile incelemişlerdir. DPPH testi sonuçlarına göre, her iki tip niozomda enkapsüle edilen resveratrolün antioksidan aktivitesi, aynı konsantrasyondaki serbest resveratrol çözeltisi ile benzer bulunmuştur; bu durum, niozomların metanol içinde yapısal bütünlüklerini kaybederek açılması resveratrolün serbestleşerek DPPH radikalini temizleyebilmesi ile açıklanabilir. ABTS testi sonuçları ise, sulu ortamda yapılan ölçümlerde farklılık göstermiştir. Tween80:Span80 niozomlarında enkapsüle resveratrolün antioksidan kapasitesi kontrol çözeltisinden daha düşük (75 ± 1 vs. 100) olarak ölçülürken, Tween80:Span80:dodekanol niozomlarında resveratrolün antioksidan kapasitesi kontrol çözeltisi ile benzer (96 vs. 100) bulunmuştur. Bu bulgular, dodekanol varlığının resveratrolün sistemin hidrofilik ara yüzeyine daha fazla maruz kalmasını sağlayarak antioksidan aktivitesini artırdığını göstermektedir. Çalışma, resveratrolün niozomlarda enkapsüle edilmesinin antioksidan aktivitesini koruduğunu göstermektedir. Ayrıca, niozomların vezikül yapısı -yani lipid tabakalarının sayısı, rijitliği ve organizasyonu- ortam koşullarına (pH, sıcaklık, çözücü tipi vb.) bağlı olarak değişebilmekte ve bu değişiklikler, içindeki resveratrolün salım kinetiğini ve dolayısıyla antioksidan aktivitesini etkileyebilmektedir.

Montes ve diğerleri (2024), zeytin budama atıklarından süperkritik akışkan ekstraksiyon yöntemi ile elde ettikleri biyoaktif bileşikleri kapsülleyerek antioksidan kapasitelerini değerlendirmişlerdir. Farklı polimer-ekstrakt oranlarının kullanıldığı kapsüllerde, toplam fenolik madde içeriği en yüksek olan formülasyonlarda antioksidan aktivitenin görece düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, polimer matrisinin bileşenler arası difüzyon ve radikal süpürme kinetiği üzerinde sınırlayıcı bir etkisi olabileceğini belirtmektedir.

Li ve diğerleri (2022), hidroksitirozolün nanolipozomal formülasyonlarını ABTS ve DPPH yöntemleri ile antioksidan aktivite açısından değerlendirmişlerdir. ABTS ölçümlerinde lipozomal formülasyon, serbest hidroksitirozolden daha yüksek antioksidan aktivite göstermiştir (2,04 mmol Trolox/g), buna karşın DPPH yöntemi ile yapılan ölçümlerde serbest hidroksitirozol örnekleri lipozomal örneklerden daha yüksek antioksidan kapasite sergilemiştir. Bu bulgular, kullanılan radikal türü ve çözünürlük özelliklerinin antioksidan aktivite ölçümlerini belirgin şekilde etkileyebileceğini ortaya koymaktadır.

Mitosu ve diğerleri (2019), yağ içinde su emülsiyon yöntemi kullanarak hidroksitirozolu üç farklı mikrokapsül formülasyonu (A, B, C) ile enkapsüle etmiş ve antioksidan aktivitelerini değerlendirmişlerdir. Eşit miktarda hidroksitirozol içermelerine rağmen, C formülasyonunda gözlemlenen serbest radikal süpürme seviyesi, A ve B formülasyonlarında elde edilen aktiviteye ulaşamamıştır. Bu farklılık, A ve B formülasyonlarının esnek yüzey aktif madde tek katmanlarının hidroksitirozol taşıyıcıları olarak daha uygun olduğunu, C formülasyonunun yapısal sertliğinin ise antioksidan ile radikal arasındaki etkileşimi kısıtlayarak reaksiyona bir bariyer oluşturduğunu düşündürmektedir.

Kapsüllerdeki antioksidan aktivite ile toplam fenolik madde içeriği arasındaki tutarsızlık ise Valor ve diğerleri (2023) tarafından açıklanmıştır; belirli koşullar altında antioksidanların redoks potansiyeli ve matris ortamındaki konsantrasyonlarına bağlı olarak pro-oksidan davranış gösterebileceği ve ekstraktın karmaşık bileşik yapısı nedeniyle sürecin seçiciliğinin optimize edilmesi gerektiği vurgulanmıştır.

Elmi ve diğerleri (2021) tarafından yapılan çalışmada, stabilizatör içermeyen kuersetin yüklü niozomlar DPPH radikal süpürme testinde %28,42 ile en yüksek antioksidan aktiviteyi göstermiştir. Buna karşın, %1 polietilen glikol 400 (PEG 400) ile stabilize edilen niozomlarda antioksidan aktivite %5,33 olarak ölçülmüştür. Bu sonuç, stabilizatörlerin kuersetini niozom içinde tutarak serbest kuersetin miktarını azaltması ve dolayısıyla DPPH ile reaksiyona giren antioksidan kapasitenin düşmesi ile açıklanabilir.

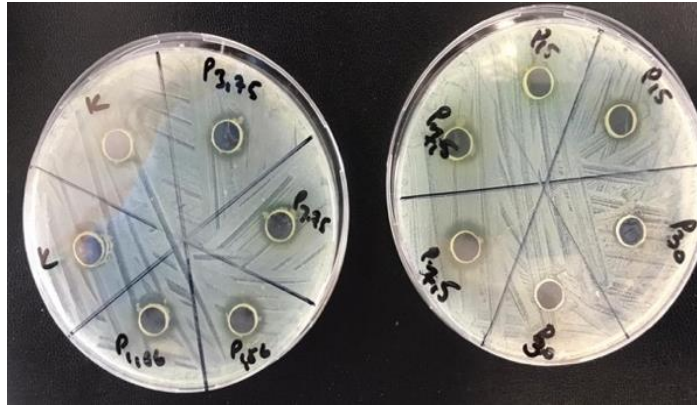
Bu bulgular, proniozom ve diğer kapsül sistemlerinde antioksidan kapasitenin hem formülasyon yapısına hem de kullanılan ölçüm yöntemine bağlı olarak değişkenlik gösterebileceğini ortaya koymaktadır.

4.5.2. Antimikrobiyal aktivite sonuçları

Proniozomların kontrollü hidrasyon ve ultrasonik akustik kavitasyon ile niozomlara dönüştürülmesinin ardından, elde edilen veziküllerin *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis* ve *K. pneumoniae* üzerinde antimikrobiyal etkinliğinin kantitatif olarak değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Proniozom ve kontrol örneklerinin antimikrobiyal aktiviteleri, kuyucuk agar difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Analizde *S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 25922, *B. subtilis* ATCC 11774 ve *K. pneumoniae* ATCC 13883 bakterileri kullanılmıştır. Örnekler, 60, 30, 15, 7,5, 3,75 ve 1,86 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.

Başlangıçta proniozomların niozoma dönüştürülmesi yalnızca su ile hidrasyon yöntemi kullanılarak denenmiş, ancak bu yöntemle antimikrobiyal aktivite gözlenmemiştir. Bu nedenle, veziküller içerisindeki ekstraktın kütle transferini artırmak amacıyla ultrason destekli akustik kavitasyon uygulanmıştır. Bu yöntemle elde edilen niozomlar, aynı bakteri türleri üzerinde kuyucuk agar difüzyon yöntemiyle test edilmiştir (Şekil 4.35–4.36).

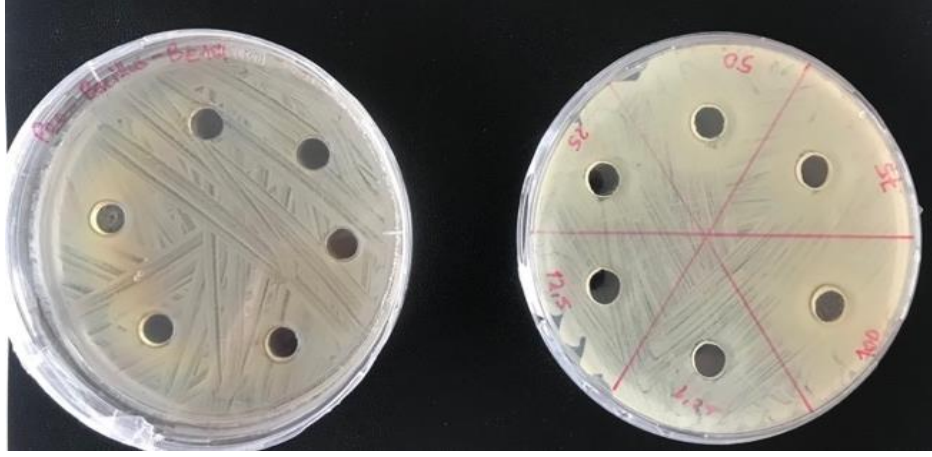


Şekil 4.35. Proniozom ve negatif kontrolün kuyucuk agar difüzyon yöntemi ile *E. coli* ATCC 25922 üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi

Yapılan denemeler sonucunda, proniozom ve kontrol gruplarının *S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 25922, *B. subtilis* ATCC 11774 ve *K. pneumonia* ATCC 13883 üzerinde belirgin antimikrobiyal aktivite göstermediği gözlenmiştir. Bu durumun, proniozomların niozoma dönüştürülmesi sırasında düşük konsantrasyon veya veziküllerin yeterince parçalanamamasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle, antimikrobiyal aktivitenin değerlendirilmesine yönelik denemelere, niozomal çözelti konsantrasyonunun artırılması ile devam edilmiştir.

Proniozomların hidratlanmasıyla elde edilen niozomların konsantrasyonları 100, 75, 50, 25, 12,5 ve 6,25 mg/mL olarak ayarlanmıştır. Niozomal veziküllerin daha etkin dispersiyonu için, 25 mL'lik süspansiyonlar ultra turrax cihazı ile 5 dakika boyunca 5500 rpm'de çözündürülmüştür. Bu işlem sonrasında tam dispersiyonun sağlanamadığı örneklerde, ekstrakt salınımını artırmak ve çözünürlüğü iyileştirmek amacıyla süspansiyonlar 50 °C'de ultrasonik banyoda 1 saat süreyle bekletilmiştir. Hazırlanan niozomal çözeltilerin, belirlenen konsantrasyonları hazırlanarak, dört farklı bakteri üzerinde kuyu agar difüzyon yöntemi kullanılarak antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir.

Analizler sonucunda, hazırlanan niozomal çözeltiler *S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 25922, *B. subtilis* ATCC 11774 ve *K. pneumonia* ATCC 13883 üzerinde belirgin antimikrobiyal aktivite göstermemiştir (Şekil 4.36). Bu durum, etkin bileşik konsantrasyonunun bakterileri inhibe edecek seviyeye ulaşmaması, veziküllerin tam olarak parçalanmaması ve içerdiği aktif bileşiğin serbestleşememesi, agar ortamında yetersiz difüzyon ve bakteri yapısal dirençleri (Gram-negatiflerde lipopolisakkarit tabakası, Gram-pozitiflerde peptidoglikan) gibi nedenlerle açıklanabilir. Ayrıca, niozom matrisi aktif bileşiğin bakteri ile temasını kısıtlayarak gözlemlenebilir antimikrobiyal etkinin düşük olmasına katkıda bulunmuş olabileceği düşünülmektedir (Wang, Van der Mei, Ren, Busscher ve Shi, 2020).



Şekil 4.36. Proniozomun farklı konsantrasyonlarda *B. subtilis* ATCC 11774 üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi

Targhi ve diğerleri (2021), kurkumin yüklü niozom ve metal nanopartikül formülasyonlarının *S. aureus* ve *P. aeruginosa* üzerindeki antibakteriyel etkinliğini değerlendirmiştir. Bu bulgular, mevcut çalışmada proniozomların tek başına antibakteriyel aktivite göstermemesi ile karşılaştırıldığında belirgin bir farklılık ortaya koymaktadır. Çift ilaç yüklü niozomal hidrojel formülasyonları (Cur-AgNPs-Nio ve Cur-CuNPs-Nio), hem gram-pozitif hem de gram-negatif bakterilerde en güçlü inhibisyonu sergilemiş ve MIC/MBC değerleri, hidrojel içermeyen formülasyonlara kıyasla önemli ölçüde düşmüştür. Tek başına Cur-Nio veya serbest kurkumin formülasyonlarında antibakteriyel etkinlik daha sınırlı bulunmuştur. Gram-pozitif *S. aureus*'un daha yüksek duyarlılığı, Cur-(metal)NP-Nio'nun teikoik asit ile etkileşimi sonucu peptidoglikan tabakasında gözenekler oluşturmaya bağlı olduğunu bildirmişler; bu da antibakteriyel maddenin sitozole girişini artırarak etkinliği yükselttiğini göstermiştir.

Metal nanopartiküller (AgNP ve CuNP) ROS üretimi, protein inaktivasyonu ve membran penetrasyonu gibi mekanizmalarla bakterileri etkilerken, CuNP'ler DNA'ya bağlanarak hücresel süreçlerde bozulmalara neden olabilmektedir. Kitosan hidrojel ise polikasyonik yapısı, amino grup yoğunluğu ve çevresel koşullara bağlı olarak antibakteriyel etkinliği modüle edebilmektedir. Sonuçlar, niozom-nanopartikül kombinasyonu ve hidrojel destekli formülasyonların, hem gram-pozitif hem de gram-negatif bakterilere karşı geliştirilmiş bir antibakteriyel performans sunduğunu göstermektedir (Targhi ve diğerleri, 2021).

Bu çalışmada proniozomların tek başına antimikrobiyal etkinliğinin sınırlı olmasının başlıca nedenleri, düşük içerik konsantrasyonu, veziküllerin yeterince parçalanamaması ve ekstraktın hedef bakteriye ulaşamaması olarak değerlendirilebilir.

4.5.3. Uçucu bileşik profili analiz sonuçları (SPME-GC-FID)

Bu çalışma, proniozomal kapsülleme sistemlerinin uçucu bileşiklerin stabilizasyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmek ve serbest ekstrakt ile karşılaştırmalı olarak bu bileşiklerin profillerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. SPME-GC-FID analizleri kullanılarak proniozom ve serbest ekstrakt örneklerinde tespit edilen uçucu bileşikler, kapsülleme sistemlerinin bu bileşiklerin stabilizasyonu üzerindeki etkisini anlamak açısından önemli bilgiler sunmaktadır. Serbest ekstraktta stiren, 1-dodesen, 4-nonanon, (E)-3-heksen-1-ol, benzil alkol, benzen etanol, nonanoik asit, n-dekanoik asit, 2,4-di-tert-bütenol, benzoik asit ve dodekanoik asit gibi bileşikler belirlenmiştir. Bu bileşikler arasında özellikle alkol sınıfının yüksek oranda bulunması, ekstrakt elde edilirken etanolün çözücü olarak kullanılmasına bağlanmıştır (Arya ve diğerleri, 2025). Ekstraktta tespit edilen stirenin vinil grubundaki çift bağın kolaylıkla polimerize olabilmesi nedeniyle proniozomal formülasyonda bulunmaması, kapsülleme sırasında polimerizasyon reaksiyonlarının gerçekleştiğini düşündürmektedir (Cheow ve Hadinoto, 2011; Xu ve Blum, 2008).

Proniozom örneklerinde uçucu bileşiklerin serbest ekstraktlara kıyasla daha düşük düzeylerde bulunduğu belirlenmiş; bu durum, kapsülleme sisteminin uçucu bileşikleri tutarak serbestleşmelerini sınırladığına işaret etmektedir (Taymouri ve Varshosaz, 2016).

Proniozomal sistemlerde kullanılan iyonik olmayan yüzey aktif maddelerin amfifilik yapıları sayesinde stabil vezikül oluşumunu desteklediği ve uçucu bileşiklerin korunmasına katkı sağladığı gözlenmiştir. Benzer şekilde, Hofland ve diğerleri (1993), iyonik olmayan yüzey aktif maddelerin stabil vezikül oluşumunu teşvik ettiğini ve toksisiteyi azalttığını bildirmiştir.

Proniozomal formülasyonda, 1-undesen, dodekanol, bifenil ve 1-dodekanol gibi uçucu bileşiklerin baskın olduğu gözlenmiştir. 1-Undesen, yağ asitlerinin indirgenmesi sonucu oluşabilen bir alken olup, proniozomal sistem içerisindeki olası biyokimyasal indirgenme ve lipid peroksidasyon süreçlerinin bir yan ürünü olarak değerlendirilmektedir (Mazotta ve diğerleri, 2024). Dodekanoik asit (laurik asit) gibi doymuş orta zincirli yağ asitlerinin varlığı

ise hem sistemin fizikokimyasal stabilitesine hem de biyolojik etkinliğine katkıda bulunduğu düşünülmektedir.

Proniozomal sistemlerde uçucu bileşiklerin serbest ekstraktlara kıyasla düşük konsantrasyonlarda tespit edilmesi; lipid ve yüzey aktif maddeler arasındaki güçlü hidrofobik etkileşimlere ve oluşan multilameller yapının maskeleye etkisine işaret etmektedir. Bu yapı, uçucu bileşenleri fiziksel olarak hapsederek kontrollü bir salım mekanizması sunmaktadır (Ghosh, Ray ve Pramanik, 2020). Bu etkileşimler, proniozom membranının lipid katmanları arasında uçucu bileşiklerin tutulmasını sağlayarak oksidatif bozunmayı ve uçucu kaybını azaltmaktadır ve dolayısıyla formülasyonun hem fizikokimyasal hem de biyolojik stabilitesine katkıda bulunmaktadır (Masjedi ve Montahaei, 2021).

Örneğin, bir çalışmada laurik asit içeren katı lipid nanopartiküllerinin, retinoik asit ile birlikte akne tedavisinde topikal uygulama için potansiyel taşıma sistemleri olarak değerlendirildiği bildirilmiştir. Bu sistemlerin yüksek enkapsülasyon verimliliği ve antibakteriyel aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Silva ve diğerleri, 2015).

Yüzey aktif maddeler, amfifilik yapıları sayesinde proniozomal membranların stabilizasyonunu sağlayan temel bileşenlerdir; lipofilik kuyruk ve hidrofilik baş grubu içerirler ve baş gruplarının elektriksel yüküne göre katyonik, anyonik, amfoterik (zwitteriyonik) veya iyonik olmayan olarak sınıflandırılmaktadır (Ghosh ve diğerleri, 2020). Özellikle iyonik olmayan yüzey aktif maddeler, düşük toksisite ve yüksek biyouyumlulukları sayesinde proniozomal veziküllerin yapısal bütünlüğünü korumakta ve multilameller yapının stabilitesini artırmaktadır. Bu bulgu, Masjedi ve Montahaei (2021) tarafından rapor edilen iyonik olmayan yüzey aktif maddelerin proniozomal sistemlerin kararlılığını güçlendirdiğine dair literatür ile uyumludur.

Serbest ekstraktın GC-MS analizleri, başlıca uçucu bileşiklerin stiren, 1-dodesen, 4-nonanon, (E)-3-heksen-1-ol, benzil alkol, benzen etanol, nonanoik asit, n-dekanoik asit, 2,4-di-tert-bütenol, benzoik asit ve dodekanoik asit olduğunu göstermiştir. Bu bileşiklerin yoğunluğu, ekstraksiyon sırasında kullanılan etanol çözgeninin polaritesi ve çözünürlük özellikleri ile ilişkilendirilmektedir (Mazzotta ve diğerleri, 2024).

GC-MS analizlerinde tespit edilen stiren, benzo1 halkasına baēlı bir vinil grubu ($-\text{CH}=\text{CH}_2$) taşıyan aromatik bir bileşiktir. Bu vinil grubu, serbest radikal polimerizasyon reaksiyonlarına yüksek eğilim gösterir; çünkü çift baē, serbest radikallerle reaksiyona girerek zincir büyümesini başlatabilir veya devam ettirebilmektedir. Ayrıca, bu özellik stirenin çapraz bağlanma reaksiyonlarına yatkın olmasını sağlamaktadır. Sonuç olarak, proniozomal formülasyonda stirenin tespit edilmemesi, kapsülleme sırasında polimerizasyonun gerçekleştiēine dair dolaylı bir kanıt olarak deēerlendirilmektedir. Bu polimerizasyon süreci, oluşan çapraz bağlar sayesinde polimerin üç boyutlu aē yapısını oluşturmaktadır ve formülasyonun mekanik ile kimyasal stabilitesini artırmaktadır. Bu durum, proniozomal formülasyonlarda stirenin tespit edilmemesinin, kapsülleme sırasında polimerizasyonun gerçekleştiēine dair dolaylı bir gösterge olarak yorumlanmasını desteklemektedir. Çapraz bağlama süreci, formülasyonun stabilitesini güçlendirerek uçucu bileşiklerin etkinliğini ve güvenliēini artırmaktadır (SpecialChem, 2025).

Ayrıca, çapraz bağlanma polimerin cam geçiş sıcaklıēını (T_g) yükselterek termal stabilitesini ve amorf fazın rijitliēini artırdıēı bilinmektedir; düşük dereceli çapraz bağlanmada T_g deēiřimi sınırlıyken, yüksek dereceli çapraz bağlanmada T_g 'deki artış belirginleşmektedir ve bu, çapraz baē noktaları arasındaki polimerin molekül aēırlılıēına duyarlılıēı ile ilişkilidir (SpecialChem, 2025). Bu bulgular, proniozomal formülasyonlarda stiren polimerizasyonunun uçucu bileşiklerin stabilitesine katkıda bulunduēunu ve kapsülleme sırasında formülasyonun yapısal bütünlüēünü koruduēunu göstermektedir (Gupta, Kaur, Sewak, Gill ve Rani, 2025).

Sonuç olarak, proniozomal enkapsülasyon, uçucu bileşiklerin çevresel stres faktörlerine doērudan maruz kalmasını önleyerek oksidatif ve termal bozunmaya karşı kimyasal bütünlüklerini korumuştur. Bu koruyucu etki, proniozomların yarı kapalı, amfifilik ve viskoelastik yapısının oksijen, ışık ve sıcaklık kaynaklı degradasyona karşı etkin bir bariyer oluşturmasını saēlamıřtır. Böylece proniozomal sistemler, uçucu bileşiklerin stabilizasyonu ve kontrollü salınımının saēlanması aēısından oldukça etkili bir yaklaşım sunmaktadır. Ayrıca sistemde kullanılan yüzey aktif maddelerin amfifilik ve iyonik olmayan özellikleri, stabil vezikül oluşumunu destekleyerek düşük toksisite ve yüksek biyouyumluluk gibi ek avantajlar saēlamaktadır.

Örneklere ait aroma maddeleri ve miktarları Tablo 4.13'te sunulmuştur. Analiz sonuçları, serbest ekstrakt, fermente ekstrakt yüklü proniozom ve boş proniozom örnekleri arasındaki uçucu bileşik profillerinin belirgin farklılıklar gösterdiğini ortaya koymaktadır.



Tablo 4.13. Proniozom, kontrol ve ekstrakt örneklerinde belirlenen uçucu bileşikler ve konsantrasyonları (µg/kg)

No	RT	LRI	Kimyasal Sınıf	Bileşik	Konsantrasyon (µg/ kg)		
					Proniozom	Kontrol	Ekstrakt
1	10.788	1142	Hidrokarbon	1-Undesen	0,83	-	-
2	14.962	1236	Aromatik hidrokarbon	Stiren	-	-	0,73
3	15.393	1246	Hidrokarbon	1- Dodesen	0,67	10,22	-
4	19.239	1356,5	Keton	4-Nonanon	-	-	0,17
5	23.157	1364	Alkol	(E)-3-Heksen-1-ol	-	-	0,39
6	40.864	1828	Alkol	Benzil alkol	-	-	3,21
7	41.829	1865	Alkol	1-Heptadekanol	-	-	16,69
8	43.301	1967	Aromatik hidrokarbon	Bifenil	0,42	0,40	-
9	43.894	1970	Alkol	1-Dodekanol	448,68	454,98	-
10	46.274	2124	Karboksilik asit	Nonanoik asit	-	0,50	-
11	47.590	2128	Karboksilik asit	n-Dekanoik asit	-	-	1,09
12	47.940	2277	Fitol	2,4-Di-tert-bütenol	0,60	0,67	-
13	49.147	2387	Karboksilik asit	Benzoik asit	-	-	0,28
14	49.813	2447	Karboksilik asit	Dodekanoik asit	0,43	0,43	-

LRI: Linear retention index (Lineer alıkonma indeksi), RT = Tutma Süresi

Proniozomal formülasyonların kimyasal yapısı ve bileşen etkileşimlerinin incelenmesi, bu sistemlerin stabilitesi ve fonksiyonelliği açısından kritik öneme sahiptir. Bu çerçevede, proniozomun içerdiği aktif ve yardımcı bileşenlerin yapısal özellikleri, özellikle karboksil (-COOH) gruplarının kimyasal reaksiyonlardaki rolleri detaylı olarak değerlendirilmiştir. Proniozom ve kontrol proniozoma eşit miktarda dodekanol eklenmiş olmasına rağmen, proniozomda ölçülen dodekanol miktarının 448,68 µg, kontrol grubuna göre (454,98 µg) daha düşük olması, dodekanolün proniozomal yapıda kısmen reaksiyona girdiğini veya yapısal olarak bağlandığını düşündürmektedir (Mujtaba ve diğerleri, 2024).

Ekstrakta tespit edilen benzoik asit, aromatik bir karboksilik asit olup yapısındaki -COOH grubu aracılığıyla lipit çift tabakası ve su fazı arasında iyonlaşma ve hidrojen bağları oluşturabilir; bu etkileşimler proniozomal yapıda polimer ağlarının oluşumunu ve lipit matrisle etkileşimleri dolaylı olarak etkileyebilir (Li, Wan, He, Rong ve Liu, 2023).

Ekstrakta tanımlanan nonanoik asit, alifatik yapısı nedeniyle lipofilik karakter sergileyen ve serbest hâlde bulunduğunda belirgin bir koku profiline sahip bir bileşiktir. Literatürde nonanoik asidin polar-apolar arayüzeylerde konumlanma eğilimi model sistemler üzerinden ortaya konmuştur; proniozomal lipit/su arayüzeyi, benzer fizikokimyasal özellikler taşıyan bir ortam sunduğundan, nonanoik asidin sistem içerisindeki dağılımı arayüzey etkileşimleri ve iyonlaşma durumu tarafından belirlenmektedir. Bu mekanizmalar, bileşiğin serbest uçucu formda bulunmasını sınırlandırarak analitik olarak tespit edilememesine ve duyuusal etkilerinin baskılanmasına katkı sağlamıştır (Badban, Hyde ve Phan, 2017).

Elde edilen bulgular, ekstrakt bileşenleri ile proniozomal yapı arasındaki etkileşimlerin, hedeflenen fonksiyonel özelliklerin elde edilmesinde etkili olduğunu ortaya koymaktadır.

Ek olarak, güçlü antioksidan özelliğe sahip ve hem hidrofilik hem de hidrofobik karakter taşıyan 2,4-di-tert-bütilfenol (2,4-DTBP), ekstrakt yapısında mevcutken proniozomal formülasyonda saptanmamıştır. Bu durum, 2,4-DTBP'nin proniozomal yapının içinde tuzaklandığını ve bu nedenle serbest formda analizde yer almadığını düşündürmektedir (Zhao, Wang, Lucardi, Su ve Li, 2020). Bu farklılık, özellikle antioksidan aktivite testleri üzerinde etkili olabilir; çünkü DPPH testi, bileşiğin hem hidrofobik özelliklerini hem de hidrojen verici

kapasitesini ölçerken, ABTS testi bileşiklerin hidrofilik özelliklerini daha etkin bir şekilde ortaya koymaktadır (Baranei ve diğerleri, 2021).

Dolayısıyla, elde edilen deneysel bulgular, formülasyondaki bileşiklerin fizikokimyasal karakteristiklerine bağlı olarak farklı antioksidan yanıtların gözlemlendiğini göstermektedir. Bu sonuçlar, ilgili literatür bulgularıyla da uyumlu olarak formülasyonun biyolojik etkinlik ve stabilite profili hakkında destekleyici kanıt sunmaktadır.

İçerisine ekstrakt yüklenmeyen kontrol proniozomda; 1-dodesen, dodekanol, bifenil, 1-dodekanol, 2,4-di-tert-bütenol ve dodekanoik asit gibi çeşitli organik bileşikler tespit edilmiştir. Bu bileşiklerin varlığı, proniozomal yapının kimyasal bileşimini ve fonksiyonel özelliklerini doğrudan etkilemektedir. Özellikle, kontrol ve ekstraktta bulunan 1-dodesen, polimerizasyon reaksiyonları sırasında aktif bir monomer görevi görerek, uzun zincirli ve esnek yapıları polimerik ağların oluşumuna katkı sağlamaktadır. Bu polimerik yapıların oluşumu, partiküllerin mekanik dayanıklılığını artırmakla kalmayıp, aynı zamanda fizikokimyasal stabilitesini de iyileştirmektedir (Zhao ve diğerleri, 2024).

Uzun zincirli polimerlerin proniozomal sistemlerdeki rolü, lipit çift tabaka yapısının düzenlenmesi ve partikül boyutu homojenliğinin sağlanması açısından önemlidir. Bu polimerler, lipit molekülleriyle etkileşime girerek daha düzenli bir organizasyon oluşturarak partiküllerin homojenliğini artırabilmektedir. Bu bileşiklerin varlığı, formülasyonun raf ömrünü uzatan önemli bir faktördür. Bu sinerjik etkileşimler, sistemin kararlılığını ve fonksiyonel performansını artıran kritik parametreler olarak değerlendirilmektedir (Gleue ve diğerleri, 2020).

4.6. Depolama Süresi Boyunca Stabilite Değerlerinin Belirlenmesi

Nanopartikül sistemlerinin fiziksel stabilitesi, formülasyonların etkinliği, biyoyararlanımı ve raf ömrü açısından kritik bir parametredir. Bu stabilite; sıcaklık, ışık, nem ve depolama süresi gibi çevresel faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Özellikle parçacık boyutu (Z-average) ve polidispersidite indeksi (PDI) değerlerinde meydana gelen değişimler, sistemin fiziksel bütünlüğü hakkında önemli bilgiler sunar. Parçacık boyutundaki artış genellikle vezikül füzyonu veya agregasyonuna, azalması ise vezikül deformasyonu ya da yapısal bozulmaya işaret eder. Bu tür değişiklikler, niozomal veya proniozomal sistemlerde enkapsülasyon verimliliği ve salım kinetiğini doğrudan etkileyerek sistemin performansını ve uzun dönem

stabilitesini olumsuz yönde etkileyebilir (Moghassemi ve Hadjizadeh, 2014; Abdelbary ve El-Gendy, 2008).

Bu çalışmada, hazırlanan proniozom formülasyonu ile kontrol grubu örnekleri, 4 °C (soğuk depolama) ve 21 °C (oda sıcaklığı) koşullarında 60 gün boyunca saklanmıştır. Belirlenen 1., 7., 15., 30. ve 60. günlerde, örneklerin partikül boyutu, PDI, renk değişimi ve enkapsülasyon verimliliği (EE%) ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler, depolama süresine bağlı olarak formülasyonların fiziksel stabilitesinde meydana gelen değişimleri ortaya koymuştur. Ölçülen partikül boyutu ve PDI değerlerine ait ortalama $\pm$ standart sapma sonuçları Tablo 4.14'te sunulmuştur.

Tablo 4.14. Proniozom ve kontrol örneklerinin depolama süresi boyunca partikül boyutu ve PDI değerlerinin değişimi

Proniozom 4°C	Boyut (nm$\pm$SS)	PDI (nm$\pm$SS)
1. gün	219,67 $\pm$ 1,50 ^a	0,232 $\pm$ 0,014 ^a
7. gün	196,53 $\pm$ 4,45 ^b	0,299 $\pm$ 0,063 ^a
15. gün	205,43 $\pm$ 2,67 ^{ab}	0,213 $\pm$ 0,032 ^a
30. gün	197,23 $\pm$ 5,50 ^b	0,267 $\pm$ 0,039 ^a
60. gün	171,53 $\pm$ 3,64 ^c	0,246 $\pm$ 0,022 ^a
Kontrol 4°C		
1. gün	204,13 $\pm$ 4,43 ^a	0,487 $\pm$ 0,038 ^a
7. gün	168,50 $\pm$ 8,85 ^b	0,377 $\pm$ 0,040 ^{ab}
15. gün	171,23 $\pm$ 8,94 ^b	0,382 $\pm$ 0,039 ^{ab}
30. gün	182,53 $\pm$ 2,86 ^{ab}	0,179 $\pm$ 0,063 ^c
60. gün	149,43 $\pm$ 3,46 ^c	0,365 $\pm$ 0,044 ^b
Proniozom 21°C		
1. gün	244,53 $\pm$ 12,26 ^a	0,345 $\pm$ 0,009 ^a
7. gün	221,37 $\pm$ 3,96 ^{ab}	0,343 $\pm$ 0,032 ^a
15. gün	191,67 $\pm$ 6,27 ^b	0,176 $\pm$ 0,006 ^b
30. gün	184,47 $\pm$ 1,85 ^b	0,160 $\pm$ 0,024 ^b
60. gün	195,30 $\pm$ 12,32 ^b	0,256 $\pm$ 0,085 ^{ab}
Kontrol 21°C		
1. gün	203,97 $\pm$ 5,17 ^a	0,493 $\pm$ 0,038 ^a
7. gün	161,70 $\pm$ 1,85 ^b	0,414 $\pm$ 0,019 ^{ab}
15. gün	164,03 $\pm$ 9,93 ^b	0,431 $\pm$ 0,045 ^{ab}
30. gün	177,07 $\pm$ 3,76 ^b	0,300 $\pm$ 0,040 ^{bc}
60. gün	164,53 $\pm$ 3,07 ^b	0,150 $\pm$ 0,055 ^c

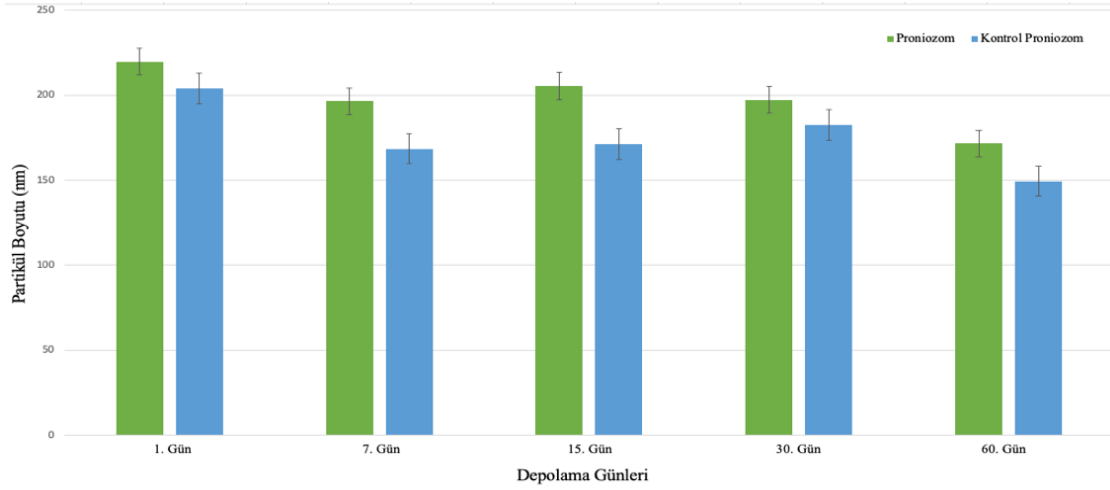
nm: nanometre, SS: standart sapma, Aynı harfler (örneğin, “a” ve “a”) yer alan değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p > 0,05$). Farklı harfler (örneğin, “a” ve “b”) yer alan değerler arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p < 0,05$). Boyut ve PDI değerleri için harflendirmeler ayrı ayrı yapılmış olup, her parametre için anlamlılık değerlendirmesi bağımsızdır.

Bu sonuçlar, sıcaklık artışına bağlı olarak vezikül yüzey geriliminin artması ve hidrasyon kabuğunun zayıflaması nedeniyle partikül boyutunda ve PDI değerinde kademeli bir yükselişe işaret etmektedir. Dolayısıyla, soğuk depolama koşullarının, proniozomal yapının fiziksel stabilitesini korumada daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Nanopartikül sistemlerinin stabilitesini korumak, formülasyonların etkinliği ve güvenilirliği açısından kritik öneme sahiptir. Bu bağlamda, geliştirme aşamasında sıcaklık, nem ve depolama süresi gibi parametrelerin optimize edilmesi büyük önem taşır. Ayrıca, fiziksel stabilite üzerindeki etkilerin detaylı şekilde anlaşılabilmesi için uzun süreli stabilite testleri yapılmalı ve bu testlerden elde edilen veriler titizlikle analiz edilmelidir. Bu tür çalışmalar, nanopartikül bazlı sistemlerin biyoyararlanımını artırmak ve güvenilir bir şekilde kullanılabilirliğini sağlamak açısından değerli katkılar sunar.

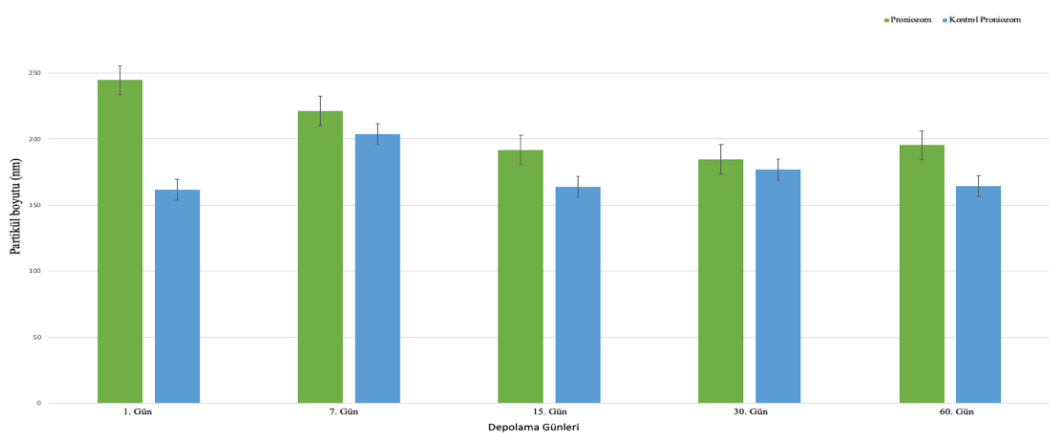
Bu çalışmada, farklı sıcaklıklarda depolanan proniozom ve kontrol örnekleri üzerinde ortalama partikül boyutu ve PDI değerleri incelenmiş, zamanla ortaya çıkan fiziksel değişimler değerlendirilmiştir. 4 °C’de depolanan proniozom örneklerinde partikül boyutu 219,67 nm’den 171,53 nm’ye düşüş göstermiş, bu durum sistemin depolama boyunca fiziksel olarak kararlı kaldığını ortaya koymuştur. PDI değerleri ise çoğunlukla 0,2– 0,3 aralığında seyretmiş ve tekdüze bir partikül dağılımını işaret etmiştir. Buna karşılık, kontrol grubunda PDI değerlerinin genellikle 0,35’in üzerinde olması, sistemde heterojenlik ve potansiyel agregasyon eğilimi olduğunu göstermektedir.

21 °C’de depolanan proniozomal örneklerde başlangıçta gözlenen daha yüksek partikül boyutu (244,53 nm) zamanla 184– 195 nm aralığına düşmüş ve bu durum sistemin stabilizasyon yönünde bir uyum gösterdiğini işaret etmiştir. Kontrol grubunda ise partikül boyutu daha düşük seviyelerde seyretmesine rağmen, PDI değerlerinin özellikle 1. ve 7. günlerde 0,4’ün üzerinde olması, parçacık dağılımının istikrarsız olabileceğini göstermektedir. Bu bulgular, proniozomal sistemlerin hem düşük agregasyon eğilimi hem de tekdüze dağılım ile depolama boyunca daha stabil olduğunu desteklemektedir (Şekil 4.37).



Şekil 4.37. 4 °C’de depolanan proniozom ve kontrol örneklerinin partikül boyutu değişimi

Genel olarak, hem 4 °C hem de 21 °C depolama koşullarında, proniozomal formülasyonlar kontrol gruplarına kıyasla daha homojen partikül dağılımı ve daha kararlı partikül boyutu aralıkları sergilemiştir. Bu bulgular, proniozomal yapıların fiziksel stabilite açısından kontrolsüz dispers sistemlere göre üstün olduğunu desteklemektedir. Özellikle düşük sıcaklıkta (4 °C) depolanan örneklerde, hem ortalama partikül boyutunun hem de polidispersidite indeksinin stabil kalması, bu sıcaklığın uzun süreli stabilite için daha uygun bir koşul olduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 4.38). Dolayısıyla, proniozomal sistemlerin agregasyon ve dağılım heterojenliği açısından daha dirençli olduğu ve formülasyon etkinliğinin korunmasına katkı sağladığı sonucuna ulaşılmıştır.



Şekil 4.38. 21 °C’de depolanan proniozom ve kontrol örneklerinin partikül boyutu değişimi

Proniozom ve kontrol örneklerinin 4 °C ve 21 °C’de 60 gün boyunca depolanması sırasında partikül boyutları ve PDI değerlerinde, 7. günden itibaren önemli olmasa da bir azalma

gözlenmiştir. Her iki sıcaklık koşulunda depolamanın chroma değerleri üzerine etkisi anlamlı bulunmamıştır. Ancak 4 °C’de depolanan kontrol ile 21 °C’de depolanan kontrol örnekleri arasında chroma değerleri bakımından anlamlı bir fark tespit edilmiştir.

Proniozom formülasyonlarının partikül boyutu ve PDI değerleri, depolama süresi ve sıcaklık koşullarına bağlı olarak değişiklik göstermiştir. Düşük sıcaklıkta (4 °C) saklanan proniozomlarda, başlangıçta yüksek olan partikül boyutları zamanla anlamlı şekilde azalmış ve daha homojen bir dağılım sergilemiştir. Bu bulgu, proniozomların düşük sıcaklıkta daha stabil olduğunu göstermektedir. Buna karşılık, 21 °C’de depolanan proniozomlarda partikül boyutlarında dalgalanmalar ve PDI değerlerinde artışlar gözlenmiş; bu durum, partiküllerin sıcaklık etkisiyle daha heterojen ve düzensiz bir yapıya sahip olabileceğine işaret etmektedir. Kontrol gruplarında ise boyut ve PDI değerlerinde daha belirgin dalgalanmalar ve heterojenlik gözlenmiş, bu da proniozomların kontrollere kıyasla daha stabil partikül özelliklerine sahip olduğunu desteklemiştir.

Genel olarak, proniozomların özellikle düşük sıcaklık koşullarında uzun süreli depolamada partikül boyutu ve dağılımı açısından daha kararlı olduğu ve böylece formülasyon etkinliğinin korunma potansiyelinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle proniozom formülasyonlarının, kalite ve performansın korunması açısından uygun depolama sıcaklıklarında muhafaza edilmesi büyük önem taşımaktadır.

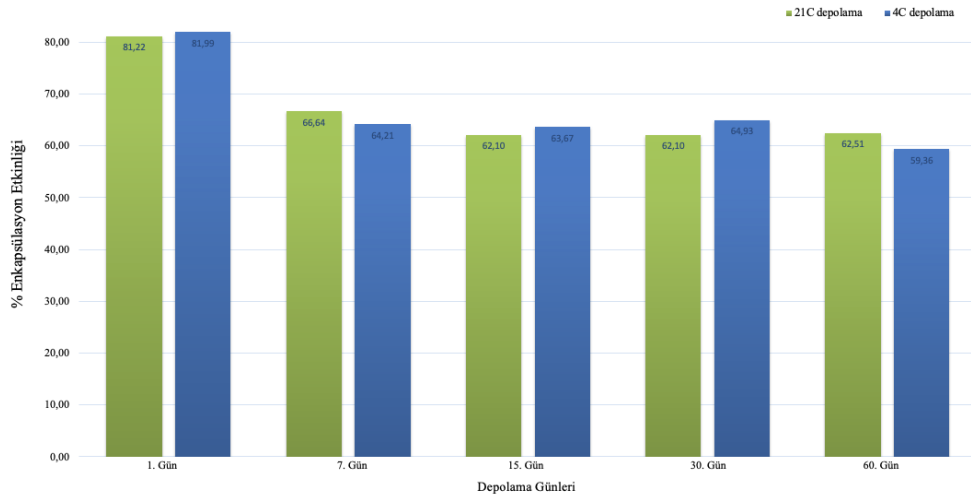
4.6.1. Enkapsülasyon etkinliği sonuçları

Proniozomların 60 günlük depolama süresince kararlılığı, 1., 7., 15., 30. ve 60. günlerde belirlenen hidroksitirozol miktarları üzerinden değerlendirilmiştir (Şekil 4.41, Tablo 4.15). Elde edilen sonuçlar, zamanla hidroksitirozol içeriğinde azalma olduğunu ve dolayısıyla kimyasal kararlılığın depolama süresi boyunca azaldığını göstermiştir. Bu durum, proniozomal sistemlerin uzun süreli depolama sırasında belirli düzeyde kimyasal degradasyona uğrayabileceğini ve formülasyonun depolama koşullarına karşı optimizasyon gereksinimini ortaya koymaktadır.

Tablo 4.15. 4 °C ve 21 °C’de depolamanın proniozomal formülasyonların enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi

Depolama Günleri	Enkapsülasyon Etkinliği %	
	4°C	21°C
1	81,99	81,22
7	64,21	66,64
15	63,67	62,10
30	64,93	62,10
60	59,36	62,51

Başlangıçta proniozomların enkapsülasyon etkinliği her iki depolama koşulunda da yüksek bulunmuş (%81,99–81,22), bu durum formülasyonun etkin kapsülleme kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir. Ancak depolamanın ilk yedi gününde, hem 4 °C hem de 21 °C’de enkapsülasyon etkinliğinde belirgin bir düşüş gözlenmiştir (4 °C: %81,99 → %64,21; 21 °C: %81,22 → %66,64), bu düşüşün üretim sonrası bazı veziküllerde sızıntı veya membran yapısındaki başlangıç düzensizliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. 7. gün sonrasında enkapsülasyon etkinliği değerleri 15. ve 30. günlerde nispeten stabilize olmuş (4 °C: 63,67–64,93; 21 °C: 62,10), bu durum proniozomların kısa süreli depolama sonrası yapısal bütünlüklerini koruduğunu göstermektedir. Uzun dönemde (60. gün) enkapsülasyon etkinliğinde hafif bir azalma gözlenmiş (4 °C: %59,36; 21 °C: %62,51), muhtemelen membran akışkanlığındaki değişim veya aktif maddenin proniozomlar içinde yeniden dağılmasından kaynaklanmaktadır (Şekil 4.39). Sonuç olarak, proniozomların enkapsülasyon etkinliği depolama süresince azalma eğilimi gösterse de 4 °C ve 21 °C koşulları arasında anlamlı bir fark bulunmamış olup, sistemin kısa ve orta dönem depolamalarda görece stabil olduğu söylenebilir.



Şekil 4.39. 4 °C ve 21 °C’de depolamanın proniozom formülasyonlarının enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi

Mohamad Saimi, Salim, Ahmad, Abdulmalek ve Abdul Rahman (2021) tarafından yürütülen çalışmada, niozomal formülasyonlar 90 gün boyunca 45 °C ve 4 °C sıcaklıklarında depolanmış ve 45 °C’de depolanan niozomların daha yüksek stabilite gösterdiği rapor edilmiştir. Bu durum, sıcaklığın formülasyon stabilitesi üzerindeki etkisinin yalnızca düşük sıcaklıkla sınırlı olmayabileceğini, belirli koşullarda yüksek sıcaklıkların da yapısal kararlılığa katkı sağlayabileceğini göstermektedir. Elde edilen bu bulgu, mevcut çalışmada gözlenen sıcaklık kaynaklı stabilite farklılıklarının formülasyon bileşimi ve üretim parametrelerine bağlı olarak değişebileceğini desteklemektedir.

Bergonzi ve diğerlerinin (2023) araştırmasında, *Olea europaea* L. yaprağından elde edilen polifenol açısından zengin ekstraktların polimerik miseller içerisinde enkapsülasyonu detaylı olarak incelenmiştir. Fiziksel stabilitenin artırılması ve uzun süreli depolama koşullarında kararlılığın sağlanması amacıyla dondurarak kurutma yöntemi uygulanmıştır. Çalışmada, misellerin fiziksel ve kimyasal özellikleri, enkapsülasyon verimliliği, stabilite ve *in vitro* salım profilleri titizlikle analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, enkapsülasyon verimliliği %66,21 ± 1,11 olarak hesaplanmış, misellerin ortalama boyutu 14,21 ± 0,14 nm ve polidispersidite indeksi (PDI) 0,19 ± 0,05 olarak belirlenmiştir. Bu bulgular, formülasyonun yüksek fiziksel stabiliteye sahip olduğunu ve farmasötik uygulamalarda potansiyel kullanımını desteklediğini göstermektedir.

Rahimnia ve diğeri (2023) ise niozomal ve katı lipit nanopartikül sistemleri ile A vitaminini enkapsüle etmişlerdir. Niozomal yöntemle $82,16 \pm 2,40$, katı lipit nanopartikül sisteminde ise $61,30 \pm 6,70$ enkapsülasyon etkinliği elde edilmiştir. Her iki sistem, 3 ay boyunca 4°C ve 25°C 'de depolanarak stabilite bakımından karşılaştırılmış ve sıcaklığın, bu çalışmada gözlenen etkiden farklı olarak, her iki sistemde de belirgin bir etkisi olmadığı raporlanmıştır.

Tüm bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, taşıyıcı sistemin tipi, formülasyon yöntemi, kullanılan biyolojik aktif bileşen ve depolama koşulları, renk stabilitesi de dahil olmak üzere ürün kalitesini belirlemede kritik faktörler olarak öne çıkmaktadır. Bu bağlamda, bu çalışmanın sonuçları, proniozomal sistemlerin düşük sıcaklıklarda renk stabilitesini korumada potansiyel bir strateji sunduğunu desteklemekte ve literatürdeki mevcut bilgilerle bütünleşerek konuyla ilgili önemli bir katkı sağlamaktadır.

4.6.2. Partikül boyutu ve PDI değeri sonuçları

Nanopartikül sistemlerinin fiziksel stabilitesi, formülasyonların etkinliği ve güvenilirliği açısından kritik öneme sahiptir. Bu stabilite, sistemin depolama koşullarına ve süreye bağlı olarak önemli ölçüde değişkenlik gösterebilir. Özellikle parçacık boyutundaki değişiklikler, sistemin fiziksel bütünlüğünü ve performansını doğrudan etkileyebilecek bir parametre olarak öne çıkmaktadır. Parçacık boyutundaki azalma, genellikle veziküllerin yapısal bütünlüğünün kaybolması veya agregasyon gibi süreçlerle ilişkilendirilebilir.

Bu tür değişiklikler, formülasyonun biyoyararlanımını, etkinliğini ve uzun vadeli stabilitesini olumsuz yönde etkileyebilir. Nanopartikül sistemlerinin stabilitesini korumak için uygun depolama koşullarının sağlanması büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda, formülasyon geliştirme aşamasında sıcaklık, nem ve depolama süresi gibi faktörlerin detaylı bir şekilde optimize edilmesi gerekmektedir.

Ayrıca, fiziksel stabilite üzerindeki etkilerin daha iyi anlaşılması için uzun süreli stabilite testlerinin yapılması ve bu testlerden elde edilen verilerin dikkatlice analiz edilmesi önerilmektedir. Bu tür çalışmalar, nanopartikül bazlı sistemlerin etkinliğini artırmak ve güvenilir bir şekilde kullanılabilirliğini sağlamak açısından değerli katkılar sunacaktır.

Proniozom ve kontrol örneklerinin 4°C ve 21°C koşullarında 60 gün depolaması gerçekleştirilmiştir. Depolamanın 1., 7., 15., 30. ve 60. günlerinde partikül boyutu, renk ve

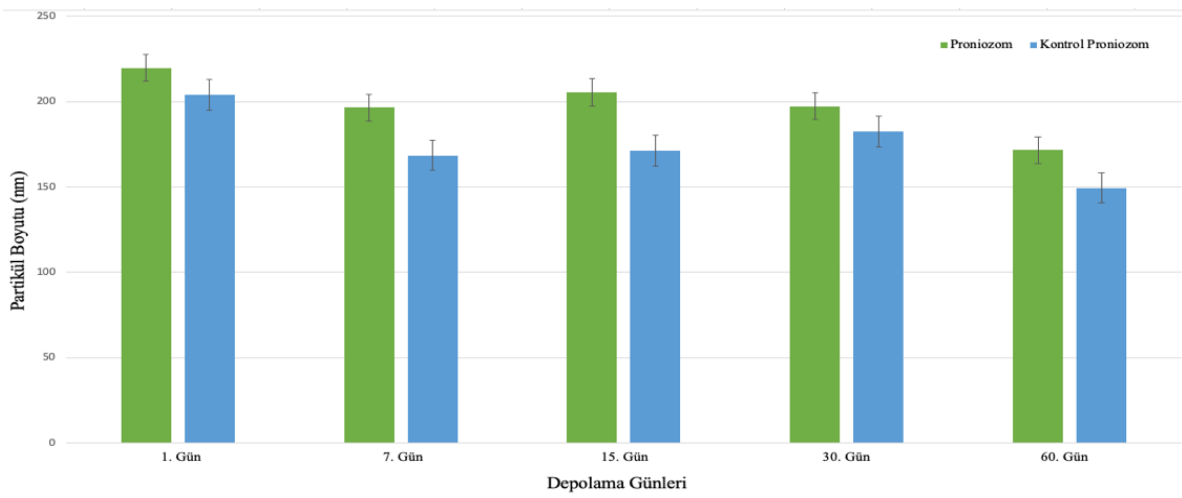
enkapsülasyon verimliliği ölçülmüştür. Ölçülen partikül boyutu ve PDI değerlerine ait ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 4.16’da verilmiştir. Farklı sıcaklıklarda depolanan proniozomal ve kontrol örneklerine ait ortalama partikül boyutu ve PDI değerleri, zamanla oluşan fiziksel değişimleri göstermektedir. 4 °C’de depolanan proniozomlarda partikül boyutu genel olarak 219,67 nm’den 171,53 nm’ye doğru azalma eğilimi göstermiş ve bu durum sistemin depolama boyunca fiziksel olarak kararlı kaldığını ortaya koymuştur. Benzer şekilde, PDI değerleri çoğunlukla 0,2– 0,3 aralığında kalmış ve tekdüze bir partikül dağılımını işaret etmiştir. Buna karşılık, kontrol grubunda PDI değerlerinin çoğunlukla 0,35’in üzerinde olması, sistemde heterojenlik ve potansiyel agregasyon eğilimi olduğunu düşündürmektedir.

Tablo 4.16. Proniozom ve kontrol örneklerinin depolama süresi boyunca partikül boyutu ve PDI değerindeki değişimin belirlenmesi

Proniozom 4°C	Boyut (nm±SS)	PDI (nm±SS)
1. gün	219,67±1,50 ^a	0,232±0,014 ^a
7. gün	196,53±4,45 ^b	0,299±0,063 ^a
15. gün	205,43±2,67 ^{ab}	0,213±0,032 ^a
30. gün	197,23±5,50 ^b	0,267±0,039 ^a
60. gün	171,53±3,64 ^c	0,246±0,022 ^a
Kontrol 4°C		
1. gün	204,13±4,43 ^a	0,487±0,038 ^a
7. gün	168,50±8,85 ^b	0,377±0,040 ^{ab}
15. gün	171,23±8,94 ^b	0,382±0,039 ^{ab}
30. gün	182,53±2,86 ^{ab}	0,179±0,063 ^c
60. gün	149,43±3,46 ^c	0,365±0,044 ^b
Proniozom 21°C		
1. gün	244,53±12,26 ^a	0,345±0,009 ^a
7. gün	221,37±3,96 ^{ab}	0,343±0,032 ^a
15. gün	191,67±6,27 ^b	0,176±0,006 ^b
30. gün	184,47±1,85 ^b	0,160±0,024 ^b
60. gün	195,30±12,32 ^b	0,256±0,085 ^{ab}
Kontrol 21°C		
1. gün	203,97±5,17 ^a	0,493±0,038 ^a
7. gün	161,70±1,85 ^b	0,414±0,019 ^{ab}
15. gün	164,03±9,93 ^b	0,431±0,045 ^{ab}
30. gün	177,07±3,76 ^b	0,300±0,040 ^{bc}
60. gün	164,53±3,07 ^b	0,150±0,055 ^c

nm: nanometre, SS: standart sapma, Aynı harfler (örneğin, “a” ve “a”) yer alan değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p > 0.05$). Farklı harfler (örneğin, “a” ve “b”) yer alan değerler arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p < 0.05$). Boyut ve PDI değerleri için harflendirmeler ayrı ayrı yapılmış olup, her parametre için anlamlılık değerlendirmesi bağımsızdır.

Nanopartikül sistemlerinin fiziksel stabilitesi, depolama koşullarına ve süreye bağlı olarak partikül boyutu ve dağılımındaki değişikliklerle yakından ilişkilidir. Şekil 4.40 ve Şekil 4.41 incelendiğinde, 21 °C’de depolanan proniozomal sistemlerde başlangıçta gözlenen daha yüksek partikül boyutu (244,53 nm) zamanla 184– 195 nm aralığına düşmüş ve bu durum sistemin stabilizasyon yönünde bir uyum gösterdiğini işaret etmektedir. Kontrol grubunda ise partikül boyutu daha düşük seviyelerde seyretmekle birlikte, PDI değerlerinin genellikle yüksek olması (örneğin 1. ve 7. günlerde >0,4), parçacık dağılımında istikrarsızlık olabileceğini göstermektedir.

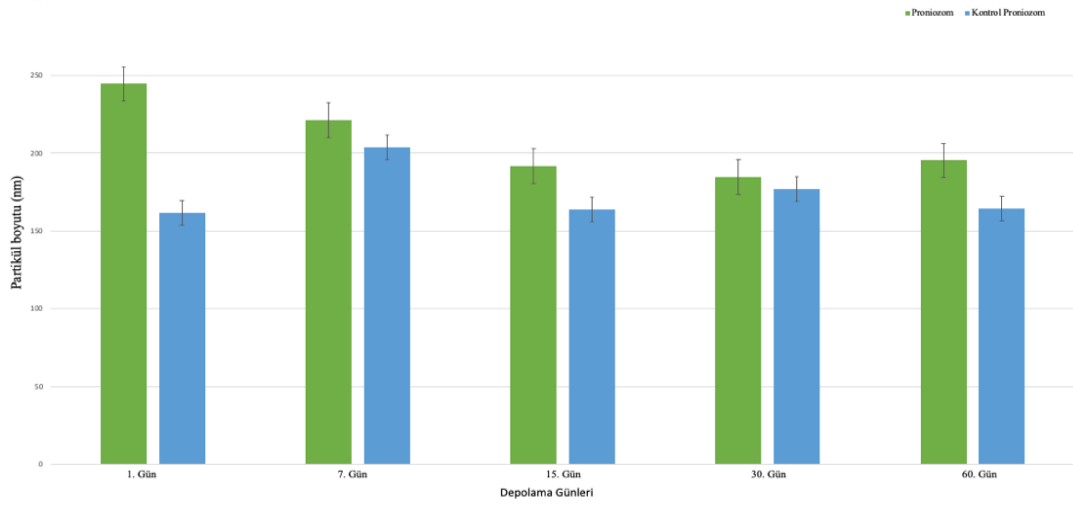


Şekil 4.40. Proniozom ve kontrol örneklerinin 4 °C’de depolama süresi boyunca partikül boyutundaki değişimi

Proniozom ve kontrol örnekleri 4 °C ve 21 °C koşullarında 60 gün boyunca depolanmış ve partikül boyutu ile PDI değerleri izlenmiştir. 4 °C’de depolanan proniozomal formülasyonlarda partikül boyutu başlangıçta 219,67 nm iken zamanla 171,53 nm’ye düşmüş, PDI değerleri ise çoğunlukla 0,2– 0,3 aralığında stabil kalmıştır. Bu durum, düşük sıcaklıkta proniozomların uzun süreli depolamada homojen ve kararlı bir partikül dağılımı sergilediğini göstermektedir. Buna karşılık, 21 °C’de depolanan proniozomal sistemlerde başlangıçta daha yüksek boyut (244,53 nm) gözlenmiş, zamanla 184– 195 nm aralığına düşerek bir stabilizasyon eğilimi sergilemiştir.

Kontrol gruplarında ise hem 4 °C hem de 21 °C’de PDI değerleri genellikle yüksek seyretmiş ve partikül boyutu dalgalanmaları gözlenmiş; bu durum, kontrolsüz dispers sistemlerin proniozomal formülasyonlara kıyasla daha heterojen ve stabil olmayan partikül dağılımına

sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Genel olarak, proniozomal formülasyonlar her iki sıcaklık koşulunda da kontrol gruplarına kıyasla daha homojen ve kararlı partikül dağılımı sunmakta, özellikle düşük sıcaklık koşullarının uzun süreli stabilite açısından daha uygun olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 4.41. Proniozom ve kontrol örneklerinin 21 °C depolama süresi boyunca partikül boyutlarındaki değişimi

Proniozom ve kontrol örneklerinin 4 °C ve 21 °C’de 60 gün depolanması sırasında partikül boyutları ve PDI değerlerinde 7. günden itibaren görülen önemli olmasa da bir azalma meydana gelmiştir. 4 °C ve 21 °C’de depolamanın chroma değeri üzerine depolama günlerinin etkisi anlamlı bulunmamıştır. Ancak 4 °C’de depolanan kontrol ve 21 °C’de depolanan kontrol arasında chroma değerleri bakımından anlamlı bir fark bulunmuştur.

Proniozom formülasyonlarının boyut ve polidispersidite indeksi (PDI) değerleri, saklama süresi ve sıcaklık koşullarına bağlı olarak değişiklik göstermiştir. Düşük sıcaklıkta (4°C) saklanan proniozomlarda, partikül boyutları başlangıçta yüksek olup zamanla anlamlı şekilde azalmış ve daha homojen bir dağılım sergilemiştir. Bu durum, proniozomların düşük sıcaklıkta daha stabil olduğunu göstermektedir. Buna karşılık, 21°C’de saklanan proniozomlarda boyutlarda dalgalanmalar görülmüş ve PDI değerlerinde artışlar meydana gelmiştir, bu da partiküllerin sıcaklık etkisiyle daha heterojen ve düzensiz bir yapıya sahip olabileceğine işaret etmektedir. Kontrol gruplarında ise boyut ve PDI değerlerinde daha belirgin dalgalanmalar ve heterojenlik

gözlenmiş, bu da proniozomların kontrollere kıyasla daha stabil partikül özelliklerine sahip olduğunu desteklemiştir.

Bu çalışmada proniozom ve kontrol örneklerinin 4 °C ve 21 °C’de depolanması sırasında partikül boyutundaki değişimler incelendiğinde, düşük sıcaklıkta (4 °C) depolanan örneklerin daha kararlı bir yapı sergilediği belirlenmiştir. Depolama süresinin artmasıyla birlikte özellikle 21 °C’de partikül boyutunda kademeli bir artış gözlenmiş, bu durum sistemde aglomerasyon eğiliminin başladığını göstermiştir. Bu bulgular, Nagalakshmi ve diğerleri (2016), tarafından bildirilen, düşük sıcaklıkta depolanan niozomların yüksek sıcaklığa göre daha kararlı olduğu yönündeki sonuçlarla uyum göstermektedir.

Öte yandan, Basiri ve diğerleri (2017) ile Nadzir, Fen, Mohamed ve Hisham (2017) tarafından yürütülen çalışmalarda, organik çözücü kullanılmadan gerçekleştirilen ısıtma yöntemi ve stabilizatör (SDS) ilavesinin, 27– 45 °C aralığında daha yüksek stabilite sağladığı rapor edilmiştir. Bu farklılık, formülasyonda kullanılan yüzey aktif madde türü, kolesterol oranı ve hazırlama yönteminin sistemin termal özelliklerini etkilemesinden kaynaklanabilmektedir.

Elde edilen sonuçlar, proniozomal sistemlerin düşük sıcaklıklarda fiziksel olarak daha kararlı olduğunu, buna karşın yüksek sıcaklıklarda lipid çift tabakasının akışkanlığındaki artış nedeniyle partikül birleşimi ve olası ilaç sızıntısının meydana gelebileceğini ortaya koymaktadır. Bu durum, bazı literatür çalışmalarında bildirilen yüksek sıcaklık stabilitesine sahip niozomal sistemlerden farklı bir stabilite eğilimi göstermektedir.

Genel olarak, proniozomların özellikle düşük sıcaklık koşullarında uzun süreli depolamada partikül boyutu ve dağılımı açısından daha kararlı olduğu ve böylece etkinliklerinin korunma potansiyelinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle, proniozom formülasyonlarının uygun depolama sıcaklıklarında muhafaza edilmesi, kalite ve performans açısından kritik öneme sahip olduğu değerlendirilmiştir.

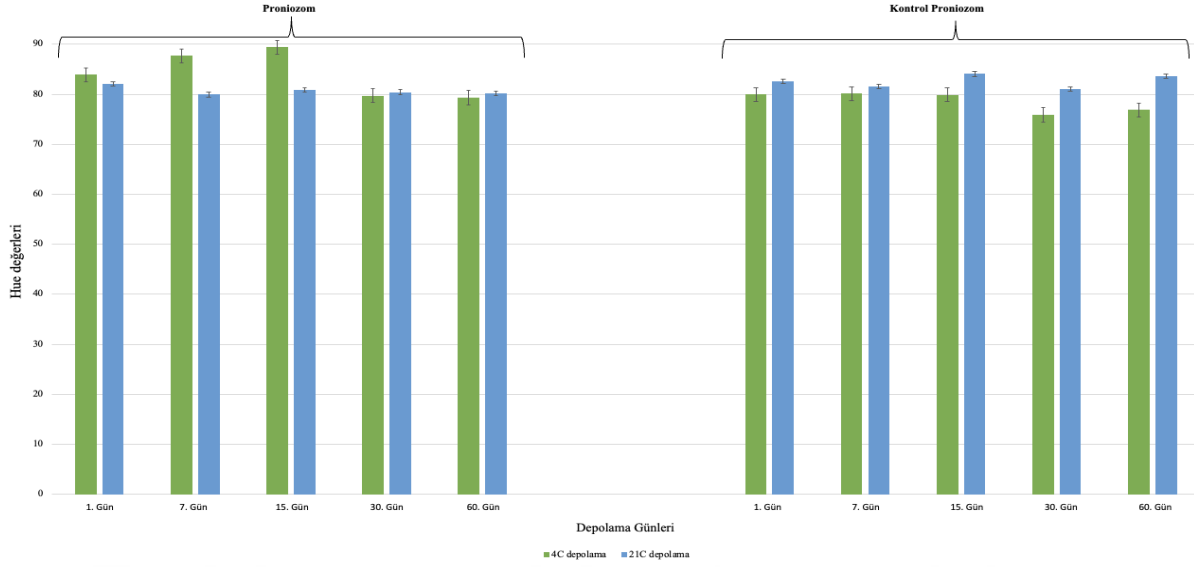
4.6.3. Renk değişimi analiz sonuçları

Chroma, bir rengin doygunluğunu, canlılığını ve parlaklığını ifade eden temel bir renk parametresidir. Yüksek Chroma değerleri, ürünün daha canlı, doygun ve parlak bir renge sahip olduğunu gösterirken, genellikle tazelik ve yüksek kalite algısıyla ilişkilendirilmektedir. Buna

karşılık, düşük Chroma değerleri, rengin soluk, mat veya gri tonlara yakın olduğunu ve ürünün okside olmuş veya tazeliğini kaybetmiş olarak algılanmasına neden olabileceğini göstermektedir (Gomez ve diğerleri, 2024). Renk ölçümlerinde Chroma genellikle CIE $L^*a^*b^*$ renk sistemi kullanılarak belirlenir; burada L^* parlaklığı, a^* yeşil-kırmızı tonunu, b^* ise mavi-sarı tonunu temsil etmektedir. Chroma, a^* ve b^* değerlerinin birleşimiyle hesaplanmakta ve bir rengin griye ne kadar karışmadığını, yani rengin yoğunluğunu sayısal olarak ifade etmektedir. Bu nedenle, Chroma ölçümleri ürünün görsel kalite değerlendirmesinde ve tazelik göstergesi olarak kritik bir rol oynamaktadır (Weatherall ve Coombs, 1992; Barbhuiya ve diğerleri, 2025).

Proniozom ve kontrol örneklerine ait renk değişim verileri Tablo 4.17 ve Şekil 4.42’de sunulmuştur. Bu veriler, proniozomal formülasyonların renk karakteristiklerinin değerlendirilmesi ve formülasyon kalitesinin izlenmesi açısından önemli bilgiler sağlamaktadır.

Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve sonrasında uygulanan Tukey HSD testi sonuçları, farklı depolama günleri, sıcaklık koşulları ve örnek grupları (proniozom ve kontrol) arasında Chroma değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunduğunu göstermektedir ($p < 0,05$). Özellikle proniozom ve kontrol grupları arasında neredeyse tüm zaman noktalarında anlamlı farklılıklar gözlenmiş olup, bu durum formülasyon tipinin renk doygunluğu üzerindeki etkisini açık bir şekilde ortaya koymaktadır.



Şekil 4.42. Depolama sıcaklığı ve depolama süresine bağlı olarak proniozom ve kontrol örneklerinin Hue değerlerinin değerlendirilmesi

Proniozom grubunda ise ekstraktın pigment içeriği nedeniyle Chroma değerleri belirgin şekilde daha yüksek (7,87– 9,92) ölçülmüş ve farklı gün ve sıcaklıklarda farklı harflerle işaretlenmiştir; bu da depolama süresi ve sıcaklığın, ekstrakt içeren örneklerde renk doygunluğunu anlamlı biçimde etkilediğini göstermiştir.

Örneğin 4 °C’de 15. günde Chroma 9,92 (a) iken, 30. günde 7,87 (d) ölçülmüş; bu farklılık, ekstraktın renk yoğunluğunun zamanla azaldığını ancak kontrol grubuna kıyasla hala çok daha yüksek seviyede kaldığını göstermektedir. Hue değerlerinde görülen küçük fakat istatistiksel olarak anlamlı değişimler de pigmentlerin depolama koşullarına duyarlılığını ortaya koymuştur (Tablo 4.17).

Tablo 4.17’de elde edilen Hue ve Chroma verilerinin değerlendirilmesi, renk parametrelerindeki farklılıkların büyük ölçüde eklenen ekstraktın pigment özelliklerinden kaynaklandığını ortaya koymaktadır. Kontrol grubunda ekstrakt bulunmaması nedeniyle Chroma değerlerinin yaklaşık 1 civarında kalması ve Hue değerlerinin 75° civarında seyretmesi, örneklerin nötr, beyazımsı ve hafif yeşilimsi-sarımsı tonlar göstermesine yol açmıştır. Bu düşük pigment yoğunluğu nedeniyle, gün ve sıcaklık değişimlerine rağmen kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir renk değişimi gözlenmemiştir.

Tablo 4.17. Proniozom ve kontrolün depolama süresi boyunca renk değişiminin belirlenmesi

Kontrol Grubu	Chroma (ortalama $\pm$ SS)	Hue (ortalama $\pm$ SS)
1g_4d	3,23 $\pm$ 0,09 (a)	-79,66 $\pm$ 0,49 (a)
1g_21d	0,87 $\pm$ 0,02 (a)	-82,62 $\pm$ 0,03 (a)
7g_4d	2,69 $\pm$ 0,02 (a)	-80,11 $\pm$ 0,01 (a)
7g_21d	0,77 $\pm$ 0,01 (a)	-81,61 $\pm$ 0,02 (a)
15g_4d	2,52 $\pm$ 0,01 (a)	-79,88 $\pm$ 0,03 (a)
15g_21d	0,63 $\pm$ 0,02 (a)	-84,04 $\pm$ 0,05 (a)
30g_4d	1,75 $\pm$ 0,01 (a)	-80,44 $\pm$ 0,02 (a)
30g_21d	0,67 $\pm$ 0,01 (a)	-81,05 $\pm$ 0,02 (a)
60g_4d	2,92 $\pm$ 0,00 (a)	-80,17 $\pm$ 0,05 (a)
60g_21d	0,27 $\pm$ 0,01 (a)	-83,65 $\pm$ 0,05 (a)
Proniozom Grubu		
1g_4d	9,40 $\pm$ 0,16 (a)	-83,88 $\pm$ 0,08 (a)
1g_21d	9,40 $\pm$ 0,03 (a)	-82,07 $\pm$ 1,00 (b)
7g_4d	9,24 $\pm$ 0,01 (a)	-87,71 $\pm$ 0,01 (a)
7g_21d	8,83 $\pm$ 0,01 (b)	-79,93 $\pm$ 0,02 (c)
15g_4d	9,92 $\pm$ 0,03 (a)	-89,11 $\pm$ 0,09 (a)
15g_21d	8,07 $\pm$ 0,01 (c)	-80,87 $\pm$ 0,06 (c)
30g_4d	7,87 $\pm$ 0,01 (d)	-79,74 $\pm$ 0,00 (c)
30g_21d	8,71 $\pm$ 0,01 (b)	-80,46 $\pm$ 0,02 (c)
60g_4d	8,05 $\pm$ 0,04 (c)	-79,35 $\pm$ 0,05 (c)
60g_21d	7,97 $\pm$ 0,01 (d)	-80,16 $\pm$ 0,05 (c)

Aynı sütun içinde aynı harfi taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p > 0,05$). Varyans analizi (ANOVA) ve çoklu karşılaştırma testi (Tukey HSD) 95% güven aralığında uygulanmıştır. Aynı sütun içinde farklı harf taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p < 0,05$). Varyans analizi (ANOVA) ve Tukey HSD testi ile gruplar arasında anlamlı farklılıklar değerlendirilmiştir ($n = 3$, $\alpha = 0,05$).

Proniozom grubunda ise ekstraktın pigment içeriği renk parametrelerinin seyrini belirleyen temel etken olmuştur. Chroma değerlerinin 7,87– 9,92 aralığında ölçülmesi, ekstraktın formülasyona canlılık ve renk doygunluğu kazandırdığını ortaya koymuştur. Depolama süresi ve sıcaklık arttıkça Chroma değerlerinde dalgalanmalar gözlenmesi, pigment stabilitesinin çevresel koşullara duyarlı olduğunu göstermiştir. Örneğin, 4 °C’de Chroma değeri uzun süre yüksek kalırken, 21 °C’de zamanla azalma eğilimi pigmentlerin yüksek sıcaklıkta daha hızlı degradasyona uğradığını göstermektedir. Nitekim 15. gün 21 °C’de proniozom ve kontrol grubu arasındaki -7,44 birimlik fark, ekstrakt içeren grubun renk doygunluğunu koruma kapasitesinin istatistiksel olarak anlamlı biçimde üstün olduğunu göstermektedir ($p < 0,05$).

Hue değerlerinde proniozom grubunda görülen küçük fakat anlamlı değişimler de pigment davranışının depolama koşullarından etkilendiğini doğrulamıştır. Hue değerlerinin çoğunlukla -79° ila -89° arasında seyretmesi, proniozom grubundaki örneklerin yeşilimsi– mavi (soğuk) renk tonlarını koruduğunu ortaya koymuştur. Bu durum, proniozom grubunda pigmentlerin yönlendirdiği renk tonunun stabil kaldığını; kontrol grubunda ise Hue değerlerinin daha az negatif olması nedeniyle sıcak tonlara kaymanın ve matlığın belirginleştiğini göstermiştir.

Tek yönlü ANOVA ve Tukey HSD testi, Chroma ve Hue verilerinde gruplar arası istatistiksel farklılıkları doğrulamış; farklı harflerle işaretlenen proniozom örneklerinin hem depolama süresi hem sıcaklığa bağlı olarak anlamlı renk değişimleri gösterdiği belirlenmiştir. Kontrol grubunun çoğu zaman aynı harfle işaretlenmesi, ekstrakt içermeyen ortamın renk parametrelerinde anlamlı değişikliklere yol açmadığını göstermektedir; bu durum, renk değişimlerinin ekstrakt varlığıyla doğrudan ilişkili olduğunu desteklemektedir.

Negi ve diğerleri (2017) tarafından yapılan çalışmada, resveratrol ile yüklenmiş niozomal jellerde renk değişimi gözlenmiş ve jeller kahverengimsi sarı renge dönüşmüştür. Bu gözlem, niozomal formülasyonların karakteristik renk değişimlerine duyarlı olabileceğini göstermektedir.

Mohamad Saimi ve diğerleri (2021) ise düşük doz gemcitabin (Gem) ve sisplatin (Cis) içeren optimize edilmiş niozomal NGC formülasyonlarını 90 gün boyunca farklı sıcaklıklarda depolamış ve formülasyonun özellikle 45 °C’de daha kararlı olduğunu bildirmiştir; bu sıcaklıkta partikül boyutu ± 15 nm aralığında korunmuş ve renk yalnızca beyazdan açık sarıya

hafifçe değişmiştir. Yüksek sıcaklıkta meydana gelen bu hafif renk değişiminin, lipid çift katmanlarının artan akışkanlığından kaynaklanan olası ilaç sızıntısıyla ilişkili olduğu öne sürülmüştür. Elde edilen bulgular, niozomal ve proniozomal formülasyonların depolama sıcaklığı ve süreye bağlı olarak farklı stabilite davranışları sergileyebileceğini göstermektedir.

Bu bulgular, renk stabilitesi ve doygunluğundaki temel belirleyicinin proniozomal yapının kendisinden ziyade ekstraktın pigment içeriği ve bu pigmentlerin depolama koşullarına karşı stabilitesi olduğunu ortaya koymaktadır. Yüksek Chroma değerlerinin korunması, proniozom grubunun görsel kalite açısından daha çekici ve stabil bir renk profili sunmasına yol açmıştır.

Sonuç olarak, tüm depolama koşullarında proniozom grubunun kontrol grubuna kıyasla daha yüksek Chroma, daha stabil Hue ve daha canlı-soğuk tonlarda renk görünümü sergilemesi; renk özelliklerindeki üstünlüğün ekstrakt ilavesinden kaynaklandığını ve bu ekstraktın proniozomal sistem içinde belirli bir stabilite kazandığını göstermektedir. Depolama süresi ve sıcaklığa bağlı bazı dalgalanmalar görölmesine rağmen, proniozom grubunun pigment stabilitesini kontrol grubuna göre daha iyi koruduğu istatistiksel olarak doğrulanmıştır ($p < 0,05$). Bu nedenle çalışma, proniozom sistemlerinin ekstrakt taşındığında renk stabilitesini artırmada etkili bir platform sunduğunu ortaya koymaktadır.

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, zeytin yaprağı fermantasyonu sonucunda elde edilen ve güçlü antioksidan özelliklere sahip hidroksitirozol içeriği zenginleştirilmiş ekstrakt, iyonik olmayan yüzey aktif maddeler kullanılarak nano boyutta veziküler yapılar içinde toz formunda başarıyla kapsüllenmiştir; bu yaklaşım literatürde ilk kez uygulanmıştır. Toz formda veziküler yapının elde edilebilmesi için bulamaç (slurry) yöntemi tercih edilmiş ve proniozomların karakterizasyonu, çok yönlü analitik yöntemlerle gerçekleştirilmiştir.

Hidroksitirozol içeriği zenginleştirilmiş proniozomların karakterizasyonu çok yönlü analitik yöntemlerle gerçekleştirilmiştir. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri, nano boyutta, homojen ve küresel veziküler yapıların oluştuğunu doğrulamıştır. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile yapılan incelemeler, yüzey morfolojisinin düzgün olduğunu ve veziküler yapıların homojen dağıldığını göstermiştir. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizleri, hidroksitirozolün proniozomlar içerisinde kimyasal olarak bozulmadan fiziksel olarak kapsüllendiğini ortaya koymuş; karakteristik fonksiyonel gruplarda herhangi bir kayıp veya kayma gözlenmemesi, molekülün yapısal bütünlüğünün korunduğunu desteklemiştir. Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) ve X-ışını difraksiyonu (XRD) analizleri ise, hidroksitirozolün kristal formdan amorf yapıya geçtiğini, veziküler yapılar içerisinde homojen dağıldığını ve belirgin kristal piklerinin kaybolduğunu göstermiş; böylece kapsülasyonun etkinliği ve termal stabilitesi doğrulanmıştır.

Hidroksitirozol içeriği zenginleştirilmiş proniozomların antioksidan aktiviteleri, hem DPPH hem de ABTS radikal süpürme yöntemleri ile değerlendirilmiştir. DPPH testi sonuçları, hidroksitirozolün veziküler sistem içerisinde enkapsüle edilmesiyle antioksidan aktivitede belirgin ve tutarlı bir artış olduğunu göstermiştir. ABTS testi ise benzer bir eğilim sergilemekle birlikte, örnekler arasında küçük varyasyonlar gözlenmiştir; bu durum, ABTS radikalinin farklı çözünürlük özellikleri ve reaksiyon kinetiği nedeniyle hidroksitirozolün sistem içerisindeki erişilebilirliğinin değişken olabileceğini düşündürmektedir. Elde edilen bulgular, literatürde bildirilen proniozomal ve niozomal sistemlerde bioaktif bileşiklerin veziküler yapılar içerisinde korunarak stabil antioksidan etki sağladığını gösteren çalışmalar ile uyum içerisinde. Genel olarak hem DPPH hem ABTS testleri hidroksitirozolün proniozomal yapılar içinde etkin bir

şekilde korunabildiğini ve kontrollü salımının antioksidan kapasiteyi artırdığını doğrulamaktadır.

Buna ek olarak, şeker bazlı yüzey aktif maddelerin bazı mikroorganizmalar, özellikle gram-negatif bakteriler üzerinde beklenen antimikrobiyal etkinliği göstermediği; bazı durumlarda ise mikrobiyal büyümeyi teşvik edebildiği gözlenmiştir. Bu bulgu, gelecekte yapılacak çalışmaların, şeker bazlı yüzey aktif maddelerin antimikrobiyal etkinliğini artırmak amacıyla yapısal modifikasyonlar, farklı formülasyon stratejileri ve taşıyıcı sistem optimizasyonu üzerine odaklanmasının önemini vurgulamaktadır.

Depolama stabilitesi değerlendirmelerinde, optimal proniozomal formülasyon hidroksitirozolü büyük oranda tuzaklamış; 60 günlük depolama süresi boyunca partikül boyutunda 4 °C’de belirgin bir artış, oda koşullarında ise azalma gözlenmiştir. Ayrıca, enkapsülasyon etkinliği 4 °C’de belirli bir düşüş gösterirken, oda koşullarında daha belirgin bir azalma meydana gelmiştir. Bu bulgular, proniozomların karanlık ortamda ve uygun depolama sıcaklıklarında fizikokimyasal olarak stabil kalabildiğini göstermektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma hidroksitirozol içeriği zenginleştirilmiş zeytin yaprağı ekstraktının, iyonik olmayan yüzey aktif maddeler kullanılarak nano boyutta, toz formda ve veziküler sistemler içinde başarılı şekilde kapsüllenebileceğini ortaya koymaktadır. Elde edilen proniozom ve niozom yapıları, aroma maddelerini koruma, antioksidan aktiviteyi artırma ve uygun depolama koşullarında stabil kalabilme potansiyeline sahiptir. Bu bulgular, söz konusu sistemlerin fonksiyonel gıda bileşeni olarak uygulanabilirliğine işaret etmekte ve gelecekte yapılacak çalışmalar için sağlam bir bilimsel temel oluşturmaktadır.

6. ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında elde edilen bulgular, yalnızca gıda teknolojisi alanında değil, biyoteknoloji, malzeme bilimi, eczacılık, mikrobiyoloji ve biyokimya gibi disiplinlerle de doğrudan ilişkilendirilebilir. Bu bağlamda, çok disiplinli bir yaklaşım benimsenerek ileriki çalışmalarda aşağıdaki geliştirmeler önerilmektedir.

Proniozomal ve niozomal yapılar, kullanılan yüzey aktif maddelerin özellikleri ve taşıyıcı sistemlerin yapısal karakteristikleri aracılığıyla mikroorganizma popülasyonları üzerinde seçici etki gösterebilir. Bu bağlamda, özellikle probiyotik mikroorganizmalarla etkileşimleri ve mikrobiyal flora üzerindeki uzun dönemli etkileri sistematik olarak incelenmelidir. Şeker bazlı yüzey aktif maddelerin bazı bakteri türlerinin büyümesini destekleyebildiği gözlenmiş olup, bu durum fonksiyonel gıdalarda kullanılacak taşıyıcı sistemlerin probiyotik destekli ürünlerle uyumluluğunun değerlendirilmesini zorunlu kılmaktadır. Ayrıca, farklı antimikrobiyal özellikteki yüzey aktif maddelerin seçilmesi, bu sistemlerin doğal koruyucu ajanlar olarak potansiyel kullanımını ortaya koyabilir ve gıda ile farmasötik ürünlerde güvenli kullanım sınırlarının belirlenmesine bilimsel katkı sağlayabilir.

Geliştirilen proniozomal sistemler yalnızca gıda katkısı olarak değil, aynı zamanda topikal veya oral farmasötik taşıyıcı sistemler olarak da değerlendirilebilir. Özellikle hidroksitirozol gibi biyoaktif bileşiklerin biyoyararlanımını artırmak amacıyla kontrollü salım ve hedefe yönelik taşıma özellikleri üzerine prelinik farmakokinetik ve toksikolojik çalışmalar yapılması önerilmektedir.

Ekstrakt bileşenlerinin yapısal karakterizasyonu ile moleküllerin taşıyıcı sistemlerle etkileşimlerinin belirlenmesinde; NMR ve LC-MS/MS gibi ileri spektral tekniklerden yararlanılmaktadır. Ayrıca aroma taşıma kapasitesi, acı tadın maskelenmesi ve fonksiyonel etkilerin farklı gıda matrislerindeki duyuşsal algısı sistematik olarak değerlendirilmeli; raf ömrü boyunca aromatik profilin korunumu ve taşıyıcı sistemlerin performansı izlenmelidir.

Buna ek olarak, proniozomal ve niozomal sistemlerin biyomedikal, gıda ve kozmetik uygulamalara entegrasyonu kapsamında, uzun süreli stabilite, sıcaklık toleransı ve formülasyon optimizasyonu üzerine sistematik çalışmalar yürütülmelidir. Yüksek sıcaklık, mekanik stres ve

diğer çevresel faktörlere karşı dayanıklılık, taşıyıcı sistemlerin hem ticari hem de klinik uygulamaya potansiyelini belirlemede kritik öneme sahiptir.

Bu öneriler doğrultusunda, disiplinlerarası yaklaşımlarla geliştirilecek proniozomal sistemlerin, sadece temel bilimsel bilgi üretimine değil, aynı zamanda endüstriyel uygulamalara da katkı sağlaması hedeflenmektedir. Özellikle fonksiyonel gıda, farmasötik taşıyıcılar ve biyolojik nanotaşıyıcı platformlar gibi alanlarda yenilikçi ürünlerin geliştirilmesi öngörülmektedir.



KAYNAKÇA

Abd-Elbary, G. ve El-Gendy, N. (2008). Niosome-encapsulated gentamicin for ophthalmic controlled delivery. *An Official Journal of the American Association of APS Pharmaceutical Scientists*, 9(3), 740-747. doi: <https://doi.org/10.1208/s12249-008-9105-1>

Abdelmagid, K., Jeganath, S. ve Nitish, B. (2020). Niosomes as target drug delivery system: A review. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 11(3), 3198- 3203. doi: <https://doi.org/10.26452/ijrps.v11i3.2435>.

Abdi İbrahim İlaç San. ve Tic. A. Ş. (t.y.-a). *Lipozone B12 60 ml damla*. Lipozone web sitesi. Erişim tarihi: 24 Ağustos 2025. <https://www.abdiibrahim.com.tr/urunler/tuketici-sagligi/diger>

Abdi İbrahim İlaç San. ve Tic. A. Ş. (t.y.-b). *Lipozone curcumin 30 kapsül*. Lipozone web sitesi. Erişim tarihi: 24 Ağustos 2025. <https://www.abdiibrahim.com.tr/urunler/tuketici-sagligi/diger>

Abdi İbrahim İlaç San. ve Tic. A. Ş. (t.y.-c). *Lipozomal glutatyon kapsül*. Lipozone web sitesi. Erişim tarihi: 24 Ağustos 2025. <https://lipozone.com.tr/glutatyon-kapsul>

Abdi İbrahim İlaç San. ve Tic. A. Ş. (t.y.-d). *Lipozone coenzyme Q10 100 mg / 30 kapsül*. Lipozone web sitesi. Erişim tarihi: 24 Ağustos 2025. <https://www.abdiibrahim.com.tr/urunler/tuketici-sagligi/diger>

Abdi İbrahim İlaç San. ve Tic. A. Ş. (t.y.-e). *Lipozone quercetin 125 mg / 30 Kapsül*. Lipozone web sitesi. Erişim tarihi: 24 Ağustos 2025. <https://www.abdiibrahim.com.tr/urunler/tuketici-sagligi/diger>

Abtahi, N. A., Naghib, S. M., Haghirsadat, F., Reza, J. Z., Hakimian, F., Yazdian, F. ve Tofighi, D. (2021). Smart stimuli-responsive biofunctionalized niosomal nanocarriers for programmed release of bioactive compounds into cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Nanotechnology Reviews*, 10(1), 1895- 1911. doi: <https://doi.org/10.1515/ntrev-2021-0119>

Abonashey, S. G., Hassan, H. A., Shalaby, M. A., Fouad, A. G., Mobarez, E. ve El-Banna, H. A. (2024). Formulation, pharmacokinetics, and antibacterial activity of florfenicol-loaded niosome. *Drug Delivery and Translational Research*, 14(4), 1077-1092. doi:

<https://doi.org/10.1007/s13346-023-01459-9>

Adlercreutz, H. (2007). Lignans and human health. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 44(5-6), 483-525. doi: <https://doi.org/10.1080/10408360701612942>

Ag Seleci, D., Seleci, M., Walter, J. G., Stahl, F. ve Scheper, T. (2016). Niosomes as nanoparticulate drug carriers: fundamentals and recent applications. *Journal of Nanomaterials*, 2016(1), 7372306. doi: <https://doi.org/10.1155/2016/7372306>

Agatonovic-Kustrin, S., Gegechkori, V., Petrovich, D. S., Ilinichna, K. T. ve Morton, D. W. (2021). HPTLC and FTIR fingerprinting of olive leaves extracts and ATR-FTIR characterisation of major flavonoids and polyphenolics. *Molecules*, 26(22), 6892. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26226892>

Ahmadi, E., Elhamirad, A. H., Mollania, N., Saeidi Asl, M. R. ve Pedramnia, A. (2022). Incorporation of white tea extract in nano-liposomes: optimization, characterization, and stability. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(5), 2050-2060. doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.11544>

Aissaoui, Y., Boukhari, Y. ve Mahi, M. A. (2022). The anti-inflammatory effect of polyphenolics olive leaf extracts *Olea europaea* L. *Phytotherapie*, 20(1), 17- 22. doi: <https://doi.org/10.3166/phyto-2021-0251>

Ait-Kaddour, A., Hassoun, A., Tarchi, I., Loudiyi, M., Boukria, O., Cahyana, Y. ... Khwaldia, K. (2024). Transforming plant-based waste and by-products into valuable products using various “Food Industry 4.0” enabling technologies: A literature review. *Science of the Total Environment*, 955, 176872. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.176872>

Ajrin, M. ve Anjum, F. (2022). Proniosome: A promising approach for vesicular drug delivery. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 19(4), 462- 475. doi:

[10.4274/tjps.galenos.2021.53533](https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2021.53533)

Akbari, V., Abedi, D., Pardakhty, A. ve Sadeghi-Aliabadi, H. (2013). Ciprofloxacin nanoniosomes for targeting intracellular infections: An in vitro evaluation. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(4), 1556. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1556-y>

Akbari, V., Abedi, D., Pardakhty, A. ve Sadeghi-Aliabadi, H. (2015). Release studies on ciprofloxacin loaded non-ionic surfactant vesicles. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 7(2), 69. Erişim adresi: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4483317/>

Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y. ... Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale research letters*, 8(1), 102. doi: <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>

Alam, M. S., Kaur, M. ve Kour, J. (2023). An overview of various nanosystems for encapsulating nutraceuticals. J. Kour ve diğerleri (Ed.). *Handbook of nanoencapsulation preparation, characterization, delivery, and safety of nutraceutical nanocomposites* içinde (s. 1-24). Boca Raton : CRC Press. doi: <https://doi.org/10.1201/9781003259183-1>

Abdelbary, G. A., Amin, M. M. ve Zakaria, M. Y. (2017). Ocular ketoconazole-loaded proniosomal gels: formulation, ex vivo corneal permeation and in vivo studies. *Drug Delivery*, 24(1), 309- 319. doi: <https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1247928>

Acosta, N., Sanchez, E., Calderon, L., Cordoba-Diaz, M., Cordoba-Diaz, D., Dom, S. ... Heras, A. (2015). Physical stability studies of semi-solid formulations from natural compounds loaded with chitosan microspheres. *Marine Drugs*, 13(9), 5901-5919. doi: <https://doi.org/10.3390/md13095901>

Al-Edresi, S., Hamrah, K. A. ve Al-Shaibani, A. (2024). Formulation and validation of Candesartan cilexetil-loaded nanosuspension to enhance solubility. *Pharmacia*, 71, 1-13. doi: <https://doi.org/10.3897/pharmacia.71.e114943>

Aliakbarian, B., Sampaio, F. C., de Faria, J. T., Pitangui, C. G., Lovaglio, F., Casazza, A. A. ... Perego, P. (2018). Optimization of spray drying microencapsulation of olive pomace polyphenols using response surface methodology and artificial neural network. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 93, 220- 228. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.048>

Al-Nu'airat, J., Dlugogorski, B. Z., Gao, X., Zeinali, N., Skut, J., Westmoreland, P. R. ... Altarawneh, M. (2019). Reaction of phenol with singlet oxygen. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 21(1), 171- 183. doi: [10.1039/C8CP04852E](https://doi.org/10.1039/C8CP04852E)

Al Mamari, H. H. ve Badria, F. A. (Ed.). (2021). *Phenolic compounds: Classification, chemistry, and updated techniques of analysis and synthesis*. London, United Kingdom: IntechOpen. doi: [10.5772/intechopen.98958](https://doi.org/10.5772/intechopen.98958)

Almeida, J., Losada-Barreiro, S., Costa, M., Paiva-Martins, F., Bravo-Diaz, C. ve Romsted, L. S. (2016). Interfacial concentrations of hydroxytyrosol and its lipophilic esters in intact olive oil-in-water emulsions: Effects of antioxidant hydrophobicity, surfactant concentration, and the oil-to-water ratio on the oxidative stability of the emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(25), 5274- 5283. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01468>

Alotaibi, N. F., ALqarni, L. S., Alghamdi, S. Q., Al-Ghamdi, S. N., Amna, T., Alzahrani, S. S. ... Nassar, A. M. (2024). Green synthesis of uncoated and olive leaf extract-coated silver nanoparticles: sunlight photocatalytic, antiparasitic, and antifungal activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(6), 3082. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms25063082>

Aloys, H., Korma, S. A., Alice, T. M., Chantal, N., Ali, A. H., Abed, S. M. ve Ildephonse, H. (2016). Microencapsulation by complex coacervation: Methods, techniques, benefits, and applications-A review. *American Journal of Food Science and Nutrition Research*, 3(6), 188-192. Erişim adresi: <https://www.researchgate.net/publication/326186301>

Alsamarrai, A. M., El-Zaafarany, G. M. ve Kamel, A. O. (2024). Rhamnosomes: A new generation of flexible vesicles for a boosted targeted nose-to-brain delivery of selegiline in the treatment of Parkinson's disease. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 101, 106294. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2024.106294>

Al Saqr, A., Annaji, M., Poudel, I., Rangari, S., Boddu, S. H., Tiwari, A. K. ve Babu, R. J. (2022). Niosomal formulation of hydroxytyrosol, a polyphenolic antioxidant, for enhancing transdermal delivery across human cadaver skin. *Pharmaceutical Development and Technology*, 27(2), 155- 163. doi: <https://doi.org/10.1080/10837450.2022.2025540>

Alshawwa, S. Z., Kassem, A. A., Farid, R. M., Mostafa, S. K. ve Labib, G. S. (2022). Nanocarrier drug delivery systems: characterization, limitations, future perspectives and implementation of artificial intelligence. *Pharmaceutics*, 14(4), 883. doi: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040883>

Alves, Z., Ferreira, N. M., Ferreira, P. Nunes, C. (2022). Design of heat sealable starch-chitosan bioplastics reinforced with reduced graphene oxide for active food packaging. *Carbohydrate Polymers*, 291, 119517. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119517>

Amaral, V. A., Santana, V. L., Lisboa, E. S., Martins, F. S., Chaud, M. V., de Albuquerque-Junior, R. L. C. ... Severino, P. (2025). Chitosan membranes incorporating Aloe vera glycolic extract with joint synthesis of silver nanoparticles for the treatment of skin lesions. *Drug Delivery and Translational Research*, 15, 1376- 1392. doi: <https://doi.org/10.1007/s13346-024-01683-x>

Ambra, R., Natella, F., Bello, C., Lucchetti, S., Forte, V. ve Pastore, G. (2017). Phenolics fate in table olives (*Olea europaea* L. cv. Nocellara del Belice) debittered using the Spanish and Castelvetro methods. *Food Research International*, 100, 369- 376. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.027>

Ammar, H. O., Ghorab, M., El-Nahhas, S. A. ve Higazy, I. M. (2011). Proniosomes as a carrier system for transdermal delivery of tenoxicam. *International Journal of Pharmaceutics*, 405(1-2), 142- 152. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.11.003>

Annakula, D., Errabelli, M. R., Jukanti, R., Bandari, S. ve Veerareddy, P. R. (2010). Provesicular drug delivery systems: An overview and appraisal. *Archives of Applied Science Research*, 2(4), 135- 146. Erişim adresi:

<https://www.scholarsresearchlibrary.com/articles/provesicular-drug-delivery-systems-an-overview-and-appraisal.pdf>

Apolinario, A. C., Hauschke, L., Nunes, J. R. ve Lopes, L. B. (2021). Lipid nanovesicles for biomedical applications: 'What is in a name'?. *Progress in Lipid Research*, 82, 101096. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2021.101096>

Aquanova AG. (t.y.). *NovaSOL® micelle technology*. AQUANOVA AG. Erişim tarihi: 24 Ağustos 2025. <https://aquanovacorp.com/en/technology-science/micelle-structure>

Arora, D. ve Jaglan, S. (2016). Nanocarriers based delivery of nutraceuticals for cancer prevention and treatment: A review of recent research developments. *Trends in Food Science & Technology*, 54, 114-126. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.06.003>

Arshad, N., Shaheen, F., Khan, I. N., Naeem, S., Riaz, M., Siddique, M. I. ... Waqar, M. A. (2025). A comprehensive review on niosomes: novel manufacturing techniques, factors influencing formation, applications and recent advances. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 74(15), 1331- 1348. doi: <https://doi.org/10.1080/00914037.2024.2426611>

Arslanov, V. V. ve Krylov, D. I. (2024). Reassembly of the vesicular structure of niosomes after their destruction in a mechanical field. *Journal of Colloid and Interface Science*, 662, 342-356. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2024.02.035>

Arya, P., Vaidya, D., Kaushal, M., Devi, S., Gupta, A. ve Chand, S. (2025). Effects of different solvents on phytochemical constituents, in-vitro antimicrobial activity, and volatile components of *Boehmeria rugulosa* Wedd. wood extract. *Scientific Reports*, 15(1), 29135. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-025-14506-x>

Asemani, M. ve Rabbani, A. R. (2021). A novel and efficient chemometric approach to identifying oil families by saturate biomarker data and FTIR spectroscopy of asphaltene subfractions. *Marine and Petroleum Geology*, 124, 104838. doi: <https://doi.org/10.1016/j.marpetgeo.2020.104838>

Aslam, S., Ahmad, M. ve Riaz, M. (2021). Stability of carotenoids. Zia-Ul-Haq, M., Dewanjee, S. ve Riaz, M. (Ed.). *Carotenoids: structure and function in the human body* içinde (s. 251-315). Cham, Switzerland: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-46459-2_8

Attar, E. S., Jayakumar, S. ve Devarajan, P. V. (2024). Oral *In-Situ* nanoplatfrom with balanced hydrophobic-hydrophilic property for transport across gastrointestinal mucosa. *An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 25(5), 113. doi: <https://doi.org/10.1208/s12249-024-02824-8>

Ayvaz, H., Cabaroglu, T., Akyildiz, A., Pala, C. U., Temizkan, R., Ağçam, E. ... Direito, R. (2022). Anthocyanins: Metabolic digestion, bioavailability, therapeutic effects, current pharmaceutical/industrial use, and innovation potential. *Antioxidants*, 12, 48. doi: <https://doi.org/10.3390/antiox12010048>

Azam, S. E., Yasmeen, F., Rashid, M. S. ve Latif, M. F. (2022). Physical factors affecting the antibacterial activity of Silver (Ag) and Zinc Oxide (ZnO) nanoparticles (NPs), there application in edible and inedible food packaging, and regulation in food products. *International Journal of Agriculture and Biosciences*, 11(3), 181- 193. doi: <https://doi.org/10.47278/journal.ijab/2022.025>

Azeem, A., Anwer, M. K. ve Talegaonkar, S. (2009). Niosomes in sustained and targeted drug delivery: some recent advances. *Journal of Drug Targeting*, 17(9), 671- 689. doi: <https://doi.org/10.3109/10611860903079454>

Babick, F. (2020). Dynamic light scattering (DLS). Hodoroba, V., Unger, W. E. S. ve Shard, A. G. (Eds.). *Characterization of nanoparticles* içinde (s. 137- 172). Elsevier. doi: <https://doi.org/10.1016/C2017-0-00312-9>

Bach, H. ve Lorenzo-Leal, A. C. (2023). Use of niosomes for the treatment of intracellular pathogens infecting the lungs. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 15(4), e1891. doi: <https://doi.org/10.1002/wnan.1891>

Bachhav, A. A. (2016). Proniosome: A novel non-ionic proovesicles as potential drug carrier. *Asian Journal of Pharmaceutics (AJP)*, 10(03), 210- 222. doi:

<https://doi.org/10.22377/ajp.v10i03.757>

Badban, S., Hyde, A. E., ve Phan, C. M. (2017). Hydrophilicity of nonanoic acid and its conjugate base at the air/water interface. *ACS Omega*, 2(9), 5565–5573.

<https://doi.org/10.1021/acsomega.7b00960>

Badin, R., Gaiani, C., Desobry, S., Prakash, S., Bhandari, B., Rasch, R. ... Burgain, J. (2025). Links between single maltodextrin particles properties and powder functionality. *Carbohydrate Polymers*, 350, 123057. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.123057>

Badria, F. A., Abdelaziz, A. E., Hassan, A. H., Elgazar, A. A. ve Mazyed, E. A. (2020). Development of proovesicular nanodelivery system of curcumin as a safe and effective antiviral agent: statistical optimization, in vitro characterization, and antiviral effectiveness. *Molecules*, 25(23), 5668. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules25235668>

Baghirova, L. (2022). Vitamin A palmitat yüklü nano-dermakozmetiklerin hazırlanması, karakterizasyonu ve yara iyileştirme potansiyellerinin belirlenmesi (Yükseklisans Tezi). Anadolu Üniversitesi, Eskişehir. Erişim adresi:

<https://www.proquest.com/docview/2866801754?pq-origsite=gscholar&fromopenview=true&sourcetype=Dissertations%20&%20Theses>

Bahloul, N., Kechaou, N. ve Mihoubi, N. B. (2014). Comparative investigation of minerals, chlorophylls contents, fatty acid composition and thermal profiles of olive leaves (*Olea europaea* L.) as by-product. *Grasas y Aceites*, 65(3), e035-e035. doi:

<http://dx.doi.org/10.3989/gya.0102141>

Bajpai, V. K., Kamle, M., Shukla, S., Mahato, D. K., Chandra, P., Hwang, S. K. ... Han, Y. K. (2018). Prospects of using nanotechnology for food preservation, safety, and security. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(4), 1201- 1214. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.06.011>

Bali, E. B., Ergin, V., Rackova, L., Bayraktar, O., Küçükboyacı, N. ve Karasu, Ç. (2014). Olive leaf extracts protect cardiomyocytes against 4-hydroxynonenal-induced toxicity *in vitro*: comparison with oleuropein, hydroxytyrosol, and quercetin. *Planta Medica*, 80(12), 984- 992. doi: [10.1055/s-0034-1382881](https://doi.org/10.1055/s-0034-1382881)

Bamidele, O. P. ve Emmambux, M. N. (2021). Encapsulation of bioactive compounds by “extrusion” technologies: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(18), 3100- 3118. doi: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1793724>

Bangham, A. D. (1992). Liposomes: realizing their promise. *Hospital Practice*, 27(12), 51- 62. doi: <https://doi.org/10.1080/21548331.1992.11705537>

Barani, M., Paknia, F., Roostae, M., Kavyani, B., Kalantar-Neyestanaki, D., Ajalli, N. ve Amirbeigi, A. (2023). Niosome as an effective nanoscale solution for the treatment of microbial infections. *BioMed Research International*, 2023(1), 1- 18. doi: <https://doi.org/10.1155/2023/9933283>

Barbhuiya, R. I., Wroblewski, C., Ravikumar, S. P., Subramanian, J., Elsayed, A. ve Singh, A. (2025). Synthesis of neem-oil-infused niosome and starch nanoparticle coatings for preserving the quality of strawberry fruit. *Foods*, 14(11), 1860. doi: <https://doi.org/10.3390/foods14111860>

Barot, M., Prajapati, A. P., Vadgama, N., Narkhede, S. B. ve Luhar, S. Formulation development and evaluation of proniosomal gel containing crisaborole. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 18(5), 2261- 2268. doi: [10.52711/0974-360X.2025.00324](https://doi.org/10.52711/0974-360X.2025.00324)

Barot, T., Rawtani, D. ve Kulkarni, P. (2021). Development, characterization and in vitro–in vivo evaluation of Farnesol loaded niosomal gel for applications in oral candidiasis treatment. *Heliyon*, 7(9), e07968. doi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07968>

Baranei, M., Taheri, R. A., Tirgar, M., Saeidi, A., Oroojalian, F., Uzun, L. ... Goodarzi, V. (2021). Anticancer effect of green tea extract (GTE)-Loaded pH-responsive niosome Coated with PEG against different cell lines. *Materials Today Communications*, 26, 101751. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2020.101751>

Bartella, L., Mazzotti, F., Napoli, A., Sindona, G. ve Di Donna, L. (2018). A comprehensive evaluation of tyrosol and hydroxytyrosol derivatives in extra virgin olive oil by microwave-assisted hydrolysis and HPLC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(8), 2193-2201. doi: <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0885-1>

Barzegar, A. (2012). The role of electron-transfer and H-atom donation on the superb antioxidant activity and free radical reaction of curcumin. *Food Chemistry*, 135(3), 1369- 1376. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.070>

Basiri, L., Rajabzadeh, G. ve Bostan, A. (2017). α -Tocopherol-loaded niosome prepared by heating method and its release behavior. *Food Chemistry*, 221, 620- 628. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.129>

Bautista-Solano, A. A., Davila-Ortiz, G., Perea-Flores, M. D. J. ve Martinez-Ayala, A. L. (2025). A comprehensive review of niosomes: Composition, structure, formation, characterization, and applications in bioactive molecule delivery systems. *Molecules*, 30(17), 3467. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules30173467>

Bavaresco, L. (2003). Role of viticultural factors on stilbene concentrations of grapes and wine. *Drugs Under Experimental and Clinical Research*, 29(5-6), 181- 187. Erişim adresi: <https://europepmc.org/article/med/15134373>

Bayer, I. S. (2023). Controlled drug release from nanoengineered polysaccharides. *Pharmaceutics*, 15(5), 1364. doi: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051364>

Becerra-Herrera, M., Velez-Martín, A., Ramos-Merchante, A., Richter, P., Beltran, R. ve Sayago, A. (2018). Characterization and evaluation of phenolic profiles and color as potential discriminating features among Spanish extra virgin olive oils with protected designation of origin. *Food Chemistry*, 241, 328- 337. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.106>

Bergonzi, M. C., De Stefani, C., Vasarri, M., Ivanova Stojcheva, E., Ramos-Pineda, A. M., Baldi, F. ... Degl'Innocenti, D. (2023). Encapsulation of olive leaf polyphenol-rich extract in polymeric micelles to improve its intestinal permeability. *Nanomaterials*, 13(24), 3147. doi: <https://doi.org/10.3390/nano13243147>

Bernini, R., Crisante, F., Barontini, M., Tofani, D., Balducci, V. ve Gambacorta, A. (2012). Synthesis and structure/antioxidant activity relationship of novel catecholic antioxidant structural analogues to hydroxytyrosol and its lipophilic esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(30), 7408- 7416. doi: <https://doi.org/10.1021/jf301131a>

Bernini, R., Mincione, E., Barontini, M. ve Crisante, F. (2008). Convenient synthesis of hydroxytyrosol and its lipophilic derivatives from tyrosol or homovanillyl alcohol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 8897- 8904. doi: <https://doi.org/10.1021/jf801558z>

Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential- what they are and what they are not?. *Journal of Controlled Release*, 235, 337- 351. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>

BioDelivery Sciences International. (2022, 24 Mart). *Amphotericin B cochleates: BioNasal, Bioral, Encochleated, SinuNase – drug profile*. AdisInsight. Erişim tarihi: 24 Ağustos 2025. <https://adisinsight.springer.com/drugs/800013069>

Bisquert, R., Planells-Carcel, A., Valera-García, E., Guillamon, J. M. ve Muniz-Calvo, S. (2022). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for hydroxytyrosol overproduction directly from glucose. *Microbial Biotechnology*, 15(5), 1499- 1510. doi: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13957>

Blazek–Welsh, A. I. ve Rhodes, D. G. (2001). SEM imaging predicts quality of niosomes from maltodextrin-based proniosomes. *Pharmaceutical Research*, 18(5), 656- 661. doi:

<https://doi.org/10.1023/A:1011037527889>

Boddu, M., Choppari, V., Rapalli, V. K. ve Badam, M. (2017). Formulation and evaluation of proniosomes of felodipine. *Drug Designing: Open Access*, 6(154), 2169-0138. doi:

[10.4172/2169-0138.1000154](https://doi.org/10.4172/2169-0138.1000154)

Bonechi, C., Donati, A., Tamasi, G., Pardini, A., Rostom, H., Leone, G. ... Rossi, C. (2019). Chemical characterization of liposomes containing nutraceutical compounds: Tyrosol, hydroxytyrosol and oleuropein. *Biophysical Chemistry*, 246, 25- 34. doi:

<https://doi.org/10.1016/j.bpc.2019.01.002>

Bounegru, A. V. ve Apetrei, C. (2022). Sensitive detection of hydroxytyrosol in extra virgin olive oils with a novel biosensor based on single-walled carbon nanotubes and tyrosinase. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 9132. doi:

<https://doi.org/10.3390/ijms23169132>

Briskin, D. P. (2000). Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant Physiology*, 124(2), 507- 514. doi:

<https://doi.org/10.1104/pp.124.2.507>

Britton, J., Davis, R. ve O'Connor, K. E. (2019). Chemical, physical and biotechnological approaches to the production of the potent antioxidant hydroxytyrosol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(15), 5957- 5974. doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09914-9>

Bukke, S. P. N., Venkatesh, C., Bandenahalli Rajanna, S., Saraswathi, T. S., Kusuma, P. K., Goruntla, N., ... Munishamireddy, S. (2024). Solid lipid nanocarriers for drug delivery: design innovations and characterization strategies—a comprehensive review. *Discover Applied Sciences*, 6(6), 279. doi: <https://doi.org/10.1007/s42452-024-05897-z>

Burton, G. ve Inglood, K. (2015). Antioxidant defences synthesized *in vivo*. Halliwell, B. ve Gutteridge, J. M. (Eds). *Free radicals in biology and medicine* içinde (77- 151). NY, Oxford University Press. Erişim adresi:

<https://www.slideshare.net/slideshow/freeradicalsinbiologyandmedicinepdf/251785123#4>

Büyüktuncel, E. (2013). Main spectrophotometric methods for the determination of total phenolic content and antioxidant capacity. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 17(2), 93-103. doi: [10.12991/201317377](https://doi.org/10.12991/201317377)

Bnyan, R., Khan, I., Ehtezazi, T., Saleem, I., Gordon, S., O'Neill, F. ve Roberts, M. (2018). Surfactant effects on lipid-based vesicles properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 107(5), 1237- 1246. doi: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.01.005>

Camilleri, D., Attard, K. ve Lia, F. (2025). Formulation and evaluation of liposome-encapsulated phenolic compounds from olive mill waste: Insights into encapsulation efficiency, antioxidant, and cytotoxic activities. *Molecules*, 30(11), 2351. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules30112351>

Can, A. (2017). Zeytin yaprağı ekstraktının niozom tekniğı ile mikroenkapsülasyonu ve antimikrobiyal aktivitesi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek lisans tezi, 92. doi: <https://acikerisim.comu.edu.tr/items/d1e0094c-b77f-4204-97c3-697209818b3c>

Cao, H., Saroglu, O., Karadag, A., Diaconeasa, Z., Zoccatelli, G., Conte-Junior, C. A. ve Xiao, J. (2021). Available technologies on improving the stability of polyphenols in food processing. *Food Frontiers*, 2(2), 109- 139. doi: <https://doi.org/10.1002/fft2.65>

Caputo, F., Clogston, J., Calzolari, L., Rösslein, M. ve Prina-Mello, A. (2019). Measuring particle size distribution of nanoparticle enabled medicinal products, the joint view of EUNCL and NCI-NCL. A step by step approach combining orthogonal measurements with increasing complexity. *Journal of Controlled Release*, 299, 31- 43. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.02.030>

Carriere, F. (2016). Impact of gastrointestinal lipolysis on oral lipid-based formulations and bioavailability of lipophilic drugs. *Biochimie*, 125, 297- 305. doi:

<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.11.016>

Castro-Cabado, M., Parra-Ruiz, F. J., Casado, A. L. ve Roman, J. S. (2016). Thermal crosslinking of maltodextrin and citric acid. Methodology to control the polycondensation reaction under processing conditions. *Polymers and polymer composites*, 24(8), 643-654. doi:

<https://doi.org/10.1177/096739111602400803>

Chauhan, S. B., Naved, T. ve Parvez, N. (2019). Formulation development and evaluation of proniosomal gel of ethinylestradiol and levonorgestrel for antifertility treatment. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 12(1), 364- 368. doi:

<http://dx.doi.org/10.22159/ajpcr.2019.v12i2.29546>

Chanioti, S., Katsouli, M. ve Tzia, C. (2021). Novel processes for the extraction of phenolic compounds from olive pomace and their protection by encapsulation. *Molecules*, 26(6), 1781. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26061781>

Chaw, C. S., ve Kim, K. Y. (2013). Effect of formulation compositions on niosomal preparations. *Pharmaceutical Development and Technology*, 18(3), 667- 672. doi:

<https://doi.org/10.3109/10837450.2012.672988>

Chen, C., Chen, Z., Zeng, X., Fang, X. ve Zhang, Z. (2012). Fabrication and characterization of nanocapsules containing n-dodecanol by miniemulsion polymerization using interfacial redox initiation. *Colloid and Polymer Science*, 290(4), 307-314. doi:

<https://doi.org/10.1007/s00396-011-2545-2>

Chen, L., Li, X., Li, W., Hao, X., Wu, S., Zhang, M. ... Zhang, N. (2024). Structural, physicochemical, and digestive properties of enzymatic debranched rice starch modified by phenolic compounds with varying structures. *International Journal of Biological Macromolecules*, 274, 133262. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133262>

Chen, S., Hanning, S., Falconer, J., Locke, M. ve Wen, J. (2019). Recent advances in non-ionic surfactant vesicles (niosomes): Fabrication, characterization, pharmaceutical and cosmetic applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 144, 18- 39. doi:

<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.08.015>

Chen, S., Huang, H. ve Huang, G. (2019). Extraction, derivatization and antioxidant activity of cucumber polysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules*, 140, 1047-1053. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.203>

Chen, Z. H., Kim, C., Zeng, X. B., Hwang, S. H., Jang, J. ve Ungar, G. (2012). Characterizing size and porosity of hollow nanoparticles: SAXS, SANS, TEM, DLS, and adsorption isotherms compared. *Langmuir*, 28(43), 15350- 15361. doi: <https://doi.org/10.1021/la302236u>

Cheow, W. S. ve Hadinoto, K. (2011). Factors affecting drug encapsulation and stability of lipid–polymer hybrid nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85(2), 214-220. doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.02.033>

Cheynier, V. (2012). Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochemistry Reviews*, 11(2), 153- 177. doi: <https://doi.org/10.1007/s11101-012-9242-8>

Cheynier, V., Comte, G., Davies, K. M., Lattanzio, V. ve Martens, S. (2013). Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72, 1- 20. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.009>

Chiani, M., Abedini, R., Ahangari-Cohan, R., Behdani, M., Barzi, S. M., Mohseni, N. ve Kazemi-Lomedasht, F. (2025). Encapsulation of anti-VEGF nanobody into niosome nanoparticles: a novel approach to enhance circulation half life and efficacy. *Journal of Microencapsulation*, 42(2), 132-141. doi: <https://doi.org/10.1080/02652048.2024.2443435>

Chicea, D. (2010). Nanoparticles and nanoparticle aggregates sizing by DLS and AFM. *Optoelectronics and Advanced Materials – Rapid Communications*, 4, 1310-1315. Erişim adresi: <https://oam-rc.inoe.ro/articles/nanoparticles-and-nanoparticle-aggregates-sizing-by-dls-and-afm/fulltext>

Churchward, M. A., Rogasevskaia, T., Höfgen, J., Bau, J. ve Coorssen, J. R. (2005). Cholesterol facilitates the native mechanism of Ca²⁺-triggered membrane fusion. *Journal Of Cell Science*, 118(20), 4833- 4848. doi: <https://doi.org/10.1242/jcs.02601>

Ciont, C., Difonzo, G., Pasqualone, A., Chis, M. S., Ranga, F., Szabo, K. ... Vodnar, D. C. (2023). Phenolic profile of micro-and nano-encapsulated olive leaf extract in biscuits during in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 428, 136778. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136778>

Ciupei, D., Colișar, A., Leopold, L., Stanila, A. ve Diaconeasa, Z. M. (2024). Polyphenols: from classification to therapeutic potential and bioavailability. *Foods*, 13(24), 4131. doi: <https://doi.org/10.3390/foods13244131>

Clogston, J. D. ve Patri, A. K. (2010). Zeta potential measurement. *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery* içinde (s. 63- 70). Totowa, NJ: Humana press. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1_6

Codeage LLC. (t.y.-a). *Nanofood® liposomal wonder-C liquid vitamins (C, D3, E & Zinc)*. Codeage web sitesi. Erişim tarihi: 24 Ağustos 2025. <https://www.codeage.com/products/nanofood-wonder-c-liquid-vitamins-c-d3-e-zinc-liposomal>

Codeage LLC. (t.y.-b). *Nanofood® liposomal wonder-D liquid vitamins*. Codeage web sitesi. Erişim tarihi: 24 Ağustos 2025. <https://www.codeage.com/products/nanofood-liposomal-wonder-d-liquid-vitamins>

Coelho, S. C. ve Estevinho, B. N. (2023). A brief review on the electrohydrodynamic techniques used to build antioxidant delivery systems from natural sources. *Molecules*, 28(8), 3592. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules28083592>

Commission Implementing Regulation (EU), 2022/2105 of 29 July 2022. Laying down rules on conformity checks of marketing standards for olive oil and methods of analysis of the characteristics of olive oil. *Official Journal of the European Union*, L284/ 23. Erişim adresi: https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_impl/2022/2105/oj

Costa, M., Losada-Barreiro, S., Paiva-Martins, F. ve Bravo-Diaz, C. (2021). Polyphenolic antioxidants in lipid emulsions: Partitioning effects and interfacial phenomena. *Foods*, 10(3), 539. doi: <https://doi.org/10.3390/foods10030539>

Dada, P. B. (2024). Niosome: Novel pharmaceutical drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutical Research and Applications*, 9(1), 453- 455. doi: [10.35629/7781-0901453455](https://doi.org/10.35629/7781-0901453455)

Dalla Rosa, A., Secco, M. C., De Cezaro, A. M., Fischer, B., Cansian, R. L., Junges, A. ... Valduga, E. (2023). Encapsulation of olive leaf (*Olea europaea*) extract using solution-enhanced dispersion by supercritical fluids (SEDS) technique. *The Journal of Supercritical Fluids*, 198, 105922. doi: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2023.105922>

Damera, D. P. ve Nag, A. (2021). Tuning the phase transition temperature of hybrid Span60-L64 thermoresponsive niosomes: Insights from fluorescence and Raman spectroscopy. *Journal of Molecular Liquids*, 340, 117110. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.117110>

Dasgupta, N., Ranjan, S., Mundra, S., Ramalingam, C. ve Kumar, A. (2016). Fabrication of food grade vitamin E nanoemulsion by low energy approach, characterization and its application. *International Journal of Food Properties*, 19(3), 700- 708. doi: <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1042587>

Davalos, J. Z., Valderrama-Negron, A. C., Barrios, J. R., Freitas, V. L. ve Ribeiro da Silva, M. D. (2018). Energetic and structural properties of two phenolic antioxidants: Tyrosol and hydroxytyrosol. *The Journal of Physical Chemistry A*, 122(16), 4130- 4137. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.8b00457>

De Leonardis, A., Macciola, V. ve Iacovino, S. (2020). Delivery systems for hydroxytyrosol supplementation: State of the art. *Colloids and Interfaces*, 4(2), 25. doi:

<https://doi.org/10.3390/colloids4020025>

De Moraes, E. E., Tonel, M. Z., Fagan, S. B. ve Barbosa, M. C. (2019). Density functional theory study of π -aromatic interaction of benzene, phenol, catechol, dopamine isolated dimers and adsorbed on graphene surface. *Journal of Molecular Modeling*, 25(10), 302. doi:

<https://doi.org/10.1007/s00894-019-4185-2>

De, R., Mahata, M. K. ve Kim, K. T. (2022). Structure-based varieties of polymeric nanocarriers and influences of their physicochemical properties on drug delivery profiles. *Advanced Science*, 9(10), 2105373. doi: <https://doi.org/10.1002/advs.202105373>

Debnath, A. ve Kumar, A. (2015). Structural and functional significance of niosome and proniosome in drug delivery system. *International Journal of Pharmacy and Engineering*, 3(3), 621- 637. Erişim adresi:

https://www.researchgate.net/publication/359398693_Structural_and_Functional_significance_of_Niosome_and_Proniosome_in_Drug_Delivery_System

Deulkar, D. A., Kubde, J. A., Hatwar, P. R., Bakal, R. L. ve Motwani, A. N. (2024). Niosomes: A promising approach for targeted drug delivery. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 29(01), 179-195. doi:

<https://doi.org/10.30574/gscbps.2024.29.1.0341>

Dias, R., Oliveira, H., Fernandes, I., Simal-Gandara, J. ve Perez-Gregorio, R. (2021). Recent advances in extracting phenolic compounds from food and their use in disease prevention and as cosmetics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(7), 1130- 1151. doi:

<https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1754162>

Dimitrijevic, D., Lamandin, C., Uchegbu, I. F., Shaw ve Florence, A. T. (1997). The effect of monomers and of micellar and vesicular forms of non-ionic surfactants (Solulan C24 and Solulan 16) on Caco-2 cell monolayers. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 49(6), 611-616. doi: <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1997.tb06854.x>

Dominguez-Avila, J. A., Wall-Medrano, A., Velderrain-Rodriguez, G. R., Chen, C. Y. O., Salazar-Lopez, N. J., Robles-Sanchez, M. ve Gonzalez-Aguilar, G. A. (2017). Gastrointestinal interactions, absorption, splanchnic metabolism and pharmacokinetics of orally ingested phenolic compounds. *Food & Function*, 8(1), 15- 38. doi: [10.1039/C6FO01475E](https://doi.org/10.1039/C6FO01475E)

do Nascimento, T., de Abreu Garofalo, D., de Souza Bustamante Monteiro, M. S., Santos-Oliveira, R., dos Santos Matos, A. P. ve Ricci-Junior, E. (2022). Drug encapsulation: review of niosomes for promoting antimicrobial activity. *Journal of Nanoparticle Research*, 24(12), 262. doi: <https://doi.org/10.1007/s11051-022-05637-7>

Dopazo, G. A., Martinez- Castillo, C., Alonso- Ferrer, M. ve Mejuto, C. (2021). Modelling the behavior of amphiphilic aqueous solutions. Mazzeo, P. L. ve Spagnolo, P. (Ed.). *Deep learning applications* içinde (s. 83- 101). London, United Kingdom: Intechopen. doi: [10.5772/intechopen.95613](https://doi.org/10.5772/intechopen.95613)

Drexler, K. E. (1986). *Engines of creation: The coming era of nanotechnology*. NY: Anchor Press/Doubleday. Erişim adresi: https://fenntic.net/pub/EnginesofCreation2_8803267.pdf

Dukhin, A. S. ve Xu, R. (2020). Zeta-potential measurements. Hodoroba, V., Unger, W. E. S. ve Shard, A. G. (Eds.). *Characterization of nanoparticles* içinde (s. 213- 224). Elsevier. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814182-3.00014-6>

Durga, B. ve Veera, L. (2020). Recent advances of non-ionic surfactant-based nano-vesicles (niosomes and proniosomes): A brief review of these in enhancing transdermal delivery of drug. *Future Journal Pharmaceutical Sciences*, 6, 100. doi: <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00117-y>

Ekatpure, M., Yadav, G., Shaikh, I. N., Desai, A., Khan, U. ve Kate, A. (2025). Proniosomes as next-generation drug carriers: A review of current innovations. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 14(7), 77-94. Erişim adresi: https://wjpr.s3.ap-south-1.amazonaws.com/article_issue/a109d8f6faae2acae4f5dfae7137304a.pdf

El-Laithy, H. M., Shoukry, O. ve Mahran, L. G. (2011). Novel sugar esters proniosomes for transdermal delivery of vinpocetine: preclinical and clinical studies. *European Journal Of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 77(1), 43-55. doi:

<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.10.011>

Elmi, N., Ghanbarzadeh, B., Ayaseh, A., Sahraee, S., Heshmati, M. K., Hoseini, M. ve Pezeshki, A. (2021). Physical properties and stability of quercetin loaded niosomes: stabilizing effects of phytosterol and polyethylene glycol in orange juice model. *Journal of Food Engineering*, 296, 110463. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110463>

English, M., Okagu, O. D., Stephens, K., Goertzen, A. ve Udenigwe, C. C. (2023). Flavour encapsulation: A comparative analysis of relevant techniques, physiochemical characterisation, stability, and food applications. *Frontiers in Nutrition*, 10, 1019211. doi:

<https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1019211>

Eszenyi P, Sztrik A, Babka B, Prokisch J (2011, July) Production of Lactomicrosel® and nanosize (100-500 nm) selenium spheres by probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 1(2), 148- 152. doi:

[10.7763/IJBBB.2011.V1.27](https://doi.org/10.7763/IJBBB.2011.V1.27)

European Commission (EU), (2012). Commission Regulation (EU) No 432/2012 of 16 May 2012 establishing a list of permitted health claims made on foods, other than those referring to the reduction of disease risk and to children's development and health. *Official Journal of the European Union*, L136, 1–40. Erişim adresi:

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32012R0432>

European Food Safety Authority (EFSA), 2011. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA); Scientific opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL-cholesterol concentrations (ID 1639), maintenance of normal blood pressure (ID 3781), “anti-inflammatory properties” (ID 1882), “contributes to the upper respiratory tract health” (ID 3468), “can help to maintain a normal function of gastrointestinal tract” (3779), and “contributes to body defences against external

agents” (ID 3467) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *t Journal*, 9(4): 2033, 25. doi: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2033>

European Food Safety Authority (EFSA), 2017. Scientific opinion on safety of hydroxytyrosol as a novel food pursuant to Regulation (EC) No 258/97. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (EFSA NDA Panel). *EFSA Journal*, 15(3):4728, 23. doi: [10.2903/j.efsa.2017.4728](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4728)

Evans, K. O. ve Compton, D. L. (2017). Phosphatidyl-hydroxytyrosol and phosphatidyl-tyrosol bilayer properties. *Chemistry and Physics of Lipids*, 202, 69-76. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2016.11.010>

Ezhilarasi, P. N., Karthik, P., Chhanwal, N. ve Anandharamakrishnan, C. (2013). Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 6(3), 628-647. doi: <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0944-0>

Fabiano, M. G., Forte, J., Hanieh, P. N., Rinaldi, F., Marianecci, C. ve Carafa, M. (2024). Niosomes. Ijeoma F. Uchegbu ve diğerleri (Ed.). *Fundamentals of Pharmaceutical Nanoscience* içinde (s. 29- 61). Cham: Springer Nature Switzerland. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-031-59478-6_3

Farkas, Z., Romeo, R., Pangallo, D., Krakova, L., Giuffre, A. M. ve Sidari, R. (2025). Conversion of oleuropein to hydroxytyrosol by lactic acid bacteria fermentation of olive leaves in water solution with reduced glucose content. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 41(8), 283. doi: <https://doi.org/10.1007/s11274-025-04495-4>

Farmoudeh, A., Akbari, J., Saeedi, M., Ghasemi, M., Asemi, N. ve Nokhodchi, A. (2020). Methylene blue-loaded niosome: preparation, physicochemical characterization, and in vivo wound healing assessment. *Drug Delivery and Translational Research*, 10, 1428-1441. doi: <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00715-6>

Fatimah, S., Ragadhita, R., Al Husaeni, D. F. ve Nandiyanto, A. B. D. (2022). How to calculate crystallite size from x-ray diffraction (XRD) using Scherrer method. *ASEAN Journal of Science and Engineering*, 2(1), 65- 76. doi: <https://doi.org/10.17509/ajse.v2i1.37647>

Feghhi, S., Anvar, A., Moghimipour, E., Mirzaie, A. ve Tadayoni, M. (2025). Development and Characterization of Nisin-Loaded Niosomal Nanoparticles for Enhanced Preservation Efficacy. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 20(20), e165304. doi: <https://doi.org/10.5812/jjnpp-163741>

Feng, Y., Kilker, S. R. ve Lee, Y. (2020). Surface charge (zeta-potential) of nanoencapsulated food ingredients. Jafari, S. M. (Ed.). *Characterization of nanoencapsulated ingredients* içinde (s. 213- 241). Academic Press. doi: <https://doi.org/10.1016/C2017-0-03547-4>

Fernandez-Bolanos, J. G., Lopez, O., Fernandez-Bolanos, J. ve Rodriguez-Gutierrez, G. (2008). Hydroxytyrosol and derivatives: Isolation, synthesis, and biological properties. *Current Organic Chemistry*, 12(6), 442-463. doi: <https://doi.org/10.2174/138527208784083888>

Fernandez-Bolanos, J. G., Lopez, O., Lopez-Garcia, M. A. ve Marset, A. (2012). Biological properties of hydroxytyrosol and its derivatives. Boskou, D. (Ed.). *Olive oil-constituents, quality, health properties and bioconversions* içinde (s. 375- 396). London, UK: IntechOpen. Erişim adresi: <http://www.intechopen.com/books/olive-oil-constituents-quality-health-properties-andbioconversions/biological-properties-of-hydroxytyrosol-and-its-derivatives>

Ferreira, S., Bottini, R. ve Fontana, A. (2023). Temperature and light conditions affect stability of phenolic compounds of stored grape cane extracts. *Food Chemistry*, 405, 134718. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134718>

Fitzpatrick, P. F. (2003). Mechanism of aromatic amino acid hydroxylation. *Biochemistry*, 42(48), 14083- 14091. doi: <https://doi.org/10.1021/bi035656u>

Flores-Andrade, E., Beristain, C. I., Vernon-Carter, E. J., Gutierrez, G. F. ve Azuara, E. (2009). Enthalpy-entropy compensation and water transfer mechanism in osmotically dehydrated agar gel. *Drying Technology*, 27(9), 999-1009. doi: <https://doi.org/10.1080/07373930902904921>

Fortunati, E., Luzi, F., Dugo, L., Fanali, C., Tripodo, G., Santi, L. ... Bernini, R. (2016). Effect of hydroxytyrosol methyl carbonate on the thermal, migration and antioxidant properties of PVA-based films for active food packaging. *Polymer International*, 65(8), 872- 882. doi:

<https://doi.org/10.1002/pi.5090>

Frankel, E., Bakhouch, A., Lozano-Sanchez, J., Segura-Carretero, A. Fernandez-Gutierrez, A. (2013). Literature review on production process to obtain extra virgin olive oil enriched in bioactive compounds. Potential use of byproducts as alternative sources of polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(22), 5179- 5188. doi:

<https://doi.org/10.1021/jf400806z>

Friedman, M. ve Jürgens, H. S. (2000). Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2101- 2110. doi:

<https://doi.org/10.1021/jf990489j>

Frumuzachi, O., Kieserling, H., Rohn, S. ve Mocan, A. (2025). The impact of oleuropein, hydroxytyrosol, and tyrosol on cardiometabolic risk factors: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-21. doi:

<https://doi.org/10.1080/10408398.2025.2453090>

Franco, M. N., Galeano-Diaz, T., Lopez, O., Fernandez-Bolanos, J. G., Sanchez, J., De Miguel, C. ... Martin-Vertedor, D. (2014). Phenolic compounds and antioxidant capacity of virgin olive oil. *Food Chemistry*, 163, 289- 298. doi:

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.091>

Galano, A., Alvarez-Idaboy, J. R., Francisco-Márquez, M. ve Medina, M. E. (2012). A quantum chemical study on the free radical scavenging activity of tyrosol and hydroxytyrosol. *Theoretical Chemistry Accounts*, 131(3), 1173. doi:

<https://doi.org/10.1007/s00214-012-1173-3>

Gandra, S. (2020). Rosuvastatin calcium proniosome powder: a novel approach to improve intestinal absorption and bioavailability. *Asian Journal Pharmaceutical and Clinical Research*, 13(12), 148- 156. doi: <http://dx.doi.org/10.22159/ajpcr.2020.v13i12.39585>

Garbati, P., Picco, C., Magrassi, R., Signorello, P., Cacopardo, L., Dalla Serra, M. ... Viti, F. (2024). Targeting the gut: a systematic review of specific drug nanocarriers. *Pharmaceutics*, 16(3), 431. doi:

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16030431>

Geng, Y., Liu, X., Yu, Y., Li, W., Mou, Y., Chen, F. ... Ma, L. (2023). From polyphenol to o-quinone: Occurrence, significance, and intervention strategies in foods and health implications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 22(4), 3254- 3291. doi:

<https://doi.org/10.1111/1541-4337.13182>

Ge, X., Wei, M., He, S. ve Yuan, W. E. (2019). Advances of non-ionic surfactant vesicles (niosomes) and their application in drug delivery. *Pharmaceutics*, 11(2), 55. doi:

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11020055>

Ghadi, Z. S., Dinarvand, R., Asemi, N., Amiri, F. T. ve Ebrahimnejad, P. (2019). Preparation, characterization and in vivo evaluation of novel hyaluronan containing niosomes tailored by Box-Behnken design to co-encapsulate curcumin and quercetin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 130, 234- 246. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.01.035>

Ghanbarzadeh, B., Oleyaei, S. A. ve Almasi, H. (2015). Nanostructured materials utilized in biopolymer-based plastics for food packaging applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(12), 1699- 1723. doi: <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.731023>

Gleue, L., Schupp, J., Zimmer, N., Becker, E., Frey, H., Tuettenberg, A. ve Helm, M. (2020). Stability of alkyl chain-mediated lipid anchoring in liposomal membranes. *Cells*, 9(10), 2213. doi: <https://doi.org/10.3390/cells9102213>

Gomez, H. A. G., Niederauer, G. F., Minatel, I. O., Antunes, E. R. M., Carneiro, M. J., Sawaya, A. C. H. F., ... Marques, M. O. M. (2024). Metabolite profiling reveals the influence of grapevine genetic distance on the chemical signature of juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 104(4), 2383-2397. doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.13124>

Gonzalez, E., Gomez-Caravaca, A. M., Gimenez, B., Cebrian, R., Maqueda, M., Martinez-Ferez, A. ... Robert, P. (2019). Evolution of the phenolic compounds profile of olive leaf extract encapsulated by spray-drying during in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 279, 40-48. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.127>

Gonzalez-González, O., Ramirez, I. O., Ramirez, B. I., O'Connell, P., Ballesteros, M. P., Torrado, J. J. ve Serrano, D. R. (2022). Drug stability: ICH versus accelerated predictive stability studies. *Pharmaceutics*, 14(11), 2324. doi: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14112324>

Gonzalez-Ortega, R., Sturm, L., Skrt, M., Di Mattia, C. D., Pittia, P. ve Poklar Ulrih, N. (2021). Liposomal encapsulation of oleuropein and an olive leaf extract: Molecular interactions, antioxidant effects and applications in model food systems. *Food Biophysics*, 16(1), 84- 97. doi: <https://doi.org/10.1007/s11483-020-09650-y>

Gonzalez-Ramirez, M., Gallardo-Fernandez, M., Cerezo, A. B., Bisquert, R., Valero, E., Troncoso, A. M. ve Garcia-Parrilla, M. C. (2024). The production of bioactive hydroxytyrosol in fermented beverages: the role of must composition and a genetically modified yeast strain. *Fermentation*, 10(4), 198. doi: <https://doi.org/10.3390/fermentation10040198>

Gonzalez-Santiago, M., Fonolla, J., ve Lopez-Huertas, E. (2010). Human absorption of a supplement containing purified hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, and evidence for its transient association with low-density lipoproteins. *Pharmacological Research*, 61(4), 364- 370. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.12.016>

Ghosh, S., Ray, A. ve Pramanik, N. (2020). Self-assembly of surfactants: An overview on general aspects of amphiphiles. *Biophysical Chemistry*, 265, 106429. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2020.106429>

Gowri, S. P., Lakshmi, H. V., Bhanu, V. N., Brahmaiah, B., Nama, S. ve Rao, C. B. (2013). Proniosome: A novel approach to vesicular drug delivery system. *The Pharma Innovation*, 2(3, Part A), 166- 173. Erişim adresi: <https://www.thepharmajournal.com/archives/2013/vol2issue3/PartA/11.pdf>

Goudanavar, P., Ramesh, B., Fattepu, S. ve Sreeharsha, N., 2021. Irinotecan engineered proniosomes: *In vitro* and *in vivo* characterization. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 33(41A), 230- 238. doi: [10.9734/jpri/2021/v33i41A32322](https://doi.org/10.9734/jpri/2021/v33i41A32322)

Granata, G., Accardo, P., Consoli, G. M. L., Paradisi, R. ve Geraci, C. (2025). High vitamin E-loaded nanocapsules to fortify a fruit-based product. *Food Bioscience*, 64, 105884. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2025.105884>

Grgic, J., Selo, G., Planinic, M., Tisma, M. ve Bucic-Kojic, A. (2020). Role of the encapsulation in bioavailability of phenolic compounds. *Antioxidants*, 9(10), 923. doi: <https://doi.org/10.3390/antiox9100923>

Grubbs, J., Tsaknopoulos, K., Massar, C., Young, B., O'Connell, A., Walde, C. ... Cote, D. (2021). Comparison of laser diffraction and image analysis techniques for particle size-shape characterization in additive manufacturing applications. *Powder Technology*, 391, 20- 33. doi: <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2021.06.003>

Guaratini, T., Gianeti, M. D. ve Campos, P. M. (2006). Stability of cosmetic formulations containing esters of vitamins E and A: Chemical and physical aspects. *International Journal of Pharmaceutics*, 327(1-2), 12- 16. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.07.015>

Guchhait, K. C., Pradhan, S. R., Jana, P., Ballav, S., Mitra, M., Jana, D. ... Ghosh, C. (2025). Modern Bioactive Delivery System for Higher Bioavailability. D. Lahriri ve diğerleri (Ed.). *Bioactive ingredients for healthcare industry volume 1: Extraction strategies, stability and medicinal properties* içinde (s. 105- 157). Singapore: Springer Nature Singapore. doi: https://doi.org/10.1007/978-981-96-3663-1_6

Guinedi, A. S., Mortada, N. D., Mansour, S. ve Hathout, R. M. (2005). Preparation and evaluation of reverse-phase evaporation and multilamellar niosomes as ophthalmic carriers of acetazolamide. *International Journal of Pharmaceutics*, 306(1-2), 71- 82. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.09.023>

Gulcin, İ. ve Alwasel, S. H. (2022). Metal ions, metal chelators and metal chelating assay as antioxidant method. *Processes*, 10(1), 132. doi: <https://doi.org/10.3390/pr10010132>

Gupta, P., Rai, N., Verma, A. ve Gautam, V. (2024). Microscopy based methods for characterization, drug delivery, and understanding the dynamics of nanoparticles. *Medicinal Research Reviews*, 44(1), 138- 168. doi: <https://doi.org/10.1002/med.21981>

Gupta, R., Kaur, R., Sewak, A., Gill, G. S. ve Rani, P. (2025). Lipid-based nanoencapsulation of anthocyanins: Strategies to enhance stability, bioavailability, and functional efficacy. *Annals of Phytomedicine*, 14(1), 479- 492. doi: [10.54085/ap.2025.14.1.46](https://doi.org/10.54085/ap.2025.14.1.46)

Gurrapu, A., Jukanti, R., Bobbala, S. R., Kanuganti, S. ve Jeevana, J. B. (2012). Improved oral delivery of valsartan from maltodextrin based proniosome powders. *Advanced Powder Technology*, 23(5), 583- 590. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ap.2011.06.005>

Habibi, E., Riahi, L., M'Rabet, Y., Aouadhi, C., Hosni, K. ve Mahmoudi, H. (2025). Varietal and geographical influence on the quality and antioxidant properties of Tunisian olive oils. *Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration*, 1- 16. doi: <https://doi.org/10.1007/s41207-025-00917-9> 44

Habibi, H., Mohammadi, A., Farhoodi, M. ve Jazaeri, S. (2018). Application and optimization of microwave-assisted extraction and dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography for the determination of oleuropein and hydroxytyrosol in olive pomace. *Food Analytical Methods*, 11(11), 3078- 3088. doi: <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1279-x>

Harborne, J. B. (1999). Classes and functions of secondary products from plants. Walton, N. J., ve Brown, D. E. (Ed.). *Chemicals from plants : Perspectives on plant secondary products* içinde (s. 1- 26). London, UK: Imperial College Press., doi: https://doi.org/10.1142/9789812817273_0001

Hashemi, P., Serenjah, F. N. ve Ghiasvand, A. R. (2011). Reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction with multivariate optimization for sensitive HPLC determination of tyrosol and hydroxytyrosol in olive oil. *Analytical Sciences*, 27(9), 943- 947. doi:

<https://doi.org/10.2116/analsci.27.943>

Haslam, E. (1998). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of Natural Products*. 61(11), 1454- 1455. doi: [10.1021/np960040+](https://doi.org/10.1021/np960040+)

Hamza, A. A., Hassanin, S. O., Hamza, S., Abdalla, A. ve Amin, A. (2021). Polyphenolic-enriched olive leaf extract attenuated doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats via suppression of oxidative stress and inflammation. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 82(1), 54. doi:

<https://doi.org/10.1186/s41936-021-00251-w>

Hedayati Ch, M., Abolhassani Targhi, A., Shamsi, F., Heidari, F., Salehi Moghadam, Z., Mirzaie, A. ... Akbarzadeh, I. (2021). Niosome-encapsulated tobramycin reduced antibiotic resistance and enhanced antibacterial activity against multidrug-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 109(6), 966- 980. doi: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37086>

Hemati, M., Haghirsadat, F., Yazdian, F., Jafari, F., Moradi, A. ve Malekpour-Dehkordi, Z. (2019). Development and characterization of a novel cationic PEGylated niosome-encapsulated forms of doxorubicin, quercetin and siRNA for the treatment of cancer by using combination therapy. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1), 1295- 1311. doi:

<https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1489271>

Hofland, H. E., Bouwstra, J. A., Gooris, G. S., Spies, F., Talsma, H. ve Junginger, H. E. (1993). Nonionic surfactant vesicles: A study of vesicle formation, characterization, and stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, 161(2), 366- 376. doi:

<https://doi.org/10.1006/jcis.1993.1479>

Hooshiar, M. H., Khalaf Ansar, B. S., Shaghaghian, R., Banavand, M., Sharif, S. A., Zamani, K. ve Esfahlan, R. J. (2025). Curcumin and Silibinin loaded pegylated nanoniosome for cancer therapy: bioinformatics and in vitro study. *Molecular Biology Reports*, 52(1), 1- 16. doi: <https://doi.org/10.1007/s11033-025-10835-2>

Huang, Y., Chen, J., Chen, X., Gao, J. ve Liang, W. (2008). PEGylated synthetic surfactant vesicles (niosomes): Novel carriers for oligonucleotides. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(2), 607- 614. doi: <https://doi.org/10.1007/s10856-007-3193-4>

Hu, C. ve Rhodes, D. G. (1999). Proniosomes: a novel drug carrier preparation. *International Journal of Pharmaceutics*, 185(1), 23- 35. doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00122-2](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00122-2)

Huguet-Casquero, A., Xu, Y., Gainza, E., Pedraz, J. L. ve Beloqui, A. (2020). Oral delivery of oleuropein-loaded lipid nanocarriers alleviates inflammation and oxidative stress in acute colitis. *International Journal of Pharmaceutics*, 586, 119515. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119515>

Hu, M., Han, B., Xie, L., Lu, B., Bai, D., Shi, N. ... Zhang, J. (2024). Ultrasonic assisted natural deep eutectic solvents as a green and efficient approach for extraction of hydroxytyrosol from olive leaves. *Industrial Chemistry & Materials*, 2(2), 309- 320. doi: [10.1039/D3IM00055A](https://doi.org/10.1039/D3IM00055A)

Hume, L. R. (1987). A comparative study of niosomes (non-ionic surfactant vesicles) and liposomes: their stability in biological environments (Doktora tezi). University of Strathclyde. doi: [10.48730/xwez-jx89](https://doi.org/10.48730/xwez-jx89)

Hu, Q., Li, J., Wang, T., Xu, X., Duan, Y. ve Jin, Y. (2024). Polyphenolic nanoparticle-modified probiotics for microenvironment remodeling and targeted therapy of inflammatory bowel disease. *American Chemical Society Nano*, 18(20), 12917- 12932. <https://doi.org/10.1021/acsnano.4c00830>

Huguet-Casquero, A., Xu, Y., Gainza, E., Pedraz, J. L. ve Beloqui, A. (2020). Oral delivery of oleuropein-loaded lipid nanocarriers alleviates inflammation and oxidative stress in acute colitis. *International Journal of Pharmaceutics*, 586, 119515. doi:

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119515>

Hunter, R. J., Midmore, B. R. ve Zhang, H. (2001). Zeta potential of highly charged thin double-layer systems. *Journal of Colloid and Interface Science*, 237(1), 147- 149. doi:

<https://doi.org/10.1006/jcis.2001.7423>

IBM Corp. (2022). *IBM SPSS Statistics for Windows, Version 29.0* (Computer software). Armonk, NY: IBM Corp.

Ishida, Y. ve Ho, T. M. (2021). Properties of cyclodextrins and their applications in food processing. T. M. Ho ve diğerleri (Ed.). *Functionality of cyclodextrins in encapsulation for food applications* içinde (s. 223- 253). Cham, Switzerland: Springer Nature Switzerland AG. doi:

https://doi.org/10.1007/978-3-030-80056-7_12

International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use Ich Harmonised Guideline (ICH). (2025). Stability testing of drug substances and drug products Q1. Erişim adresi:

https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-ich-q1-guideline-stability-testing-drug-substances-drug-products-step-2b_en.pdf

Ingale, M., Kasliwal, R. ve Gholse, Y. (2021). Current updated review on proniosomes as a novel approach for drug delivery. *International Journal of Modern Pharmaceutical Research*, 5(2), 120- 128. Erişim adresi:

https://ijmpronline.com/admin/assets/article_issue/1619670389.pdf

International Olive Council (IOC). 2022. Document to declare the use of IOC methods for phenolic compounds determination method 1: COI/t.20/DOC. No 29/rev.1 2017. determination of biophenols in olive oils by HPLC. Erişim adresi: https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2022/06/Doc.-No-29-REV-2_ENK.pdf

Ishii, F. ve Nii, T. (2014). Lipid emulsions and lipid vesicles prepared from various phospholipids as drug carriers. Oshimo, H. ve Makino, K. (Ed.). *Colloid and interface science in pharmaceutical research and development* içinde (s. 469- 501). Oxford, UK: Elsevier. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62614-1.00022-3>

Israelachvili, J. N., Mitchell, D. J. ve Ninham, B. W. (1976). Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics*, 72, 1525- 1568. doi: <https://doi.org/10.1039/F29767201525>

İlgaz, C., Kelebek, H. ve Kadiroglu, P. (2023). Ultrasound-assisted extraction of hydroxytyrosol from *Lactiplantibacillus plantarum* fermented olive leaves: Process optimization and bioactivity assessment. *Fermentation*, 9(6), 514. doi: <https://doi.org/10.3390/fermentation9060514>

İlgaz, C., Casula, L., Sarais, G., Schlich, M., Dessi, D., Cardia, M. C., Sinico, C., Kadiroğlu, P. ve Lai, F. (2025). Proniosomal encapsulation of olive leaf extract for improved delivery of oleuropein: Towards the valorization of an agro-industrial byproduct. *Food Chemistry*, 143877. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.143877>

Jadhav, K. R., Pawar, A. Y., Bachhav, A. A. ve Ahire, S. A. (2016). Proniosome: A novel non-ionic proovesicules as potential drug carrier. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 10(3), 210- 222. doi: [0.22377/ajp.v10i03.757](https://doi.org/10.22377/ajp.v10i03.757)

Jafarian, A., Khalilabadi, S., Shadloo, A. ve Peyvandi, K. (2025). The influence of operational parameters on the characterization of tretinoin-loaded niosomes. *ACS Omega*. 10(28), 30031-30045. doi: <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c11147>

Jalali-Jivan, M., Rostamabadi, H., Assadpour, E., Tomas, M., Capanoglu, E., Alizadeh-Sani, M. ... Jafari, S. M. (2022). Recent progresses in the delivery of β -carotene: From nano/microencapsulation to bioaccessibility. *Advances in Colloid and Interface Science*, 307, 102750. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102750>

Judy, E., Lopus, M. ve Kishore, N. (2021). Mechanistic insights into encapsulation and release of drugs in colloidal niosomal systems: Biophysical aspects. *RSC advances*, 11(56), 35110-35126. doi: [10.1039/D1RA06057K](https://doi.org/10.1039/D1RA06057K)

Jufri, M., Anwar, E. ve Djajadisastra, J. (2004). Pembuatan niosom berbasis maltodekstrin de 5-10 dari pati singkong. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 1(1), 10-20. doi: [10.7454/psr.v1i1.3365](https://doi.org/10.7454/psr.v1i1.3365)

Junyaprasert, V. B., Teeranachaideekul, V. ve Supaperm, T. (2008). Effect of charged and non-ionic membrane additives on physicochemical properties and stability of niosomes. *AAPS Pharmscitech*, 9(3), 851- 859. doi: <https://doi.org/10.1208/s12249-008-9121-1>

Kahkönen, M. P. ve Heinonen, M. (2003). Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 628- 633. doi: <https://doi.org/10.1021/jf025551i>

Kakar, R., Rao, R., Goswami, A., Nanda, S. ve Saroha, K. (2010). Proniosomes: An emerging vesicular system in drug delivery and cosmetics. *Der Pharmacia Lettre*, 2(4), 227- 239. Erişim adresi: <https://scispace.com/pdf/proniosomes-an-emerging-vesicular-system-in-drug-delivery-4vr2kxdc8x.pdf>

Kaliva, M. ve Vamvakaki, M. (2020). Nanomaterials characterization. Narain, R. (Ed.). *Polymer science and nanotechnology* içinde (s. 401- 433). Elsevier. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816806-6.00017-0>

Kamble, B., Talreja, S., Gupta, A., Patil, D., Pathak, D., Moothedath, I. ve Duraiswamy, B. (2013). Development and biological evaluation of *Gymnema sylvestre* extract-loaded nonionic surfactant-based niosomes. *Nanomedicine*, 8(8), 1295- 1305. doi: <https://doi.org/10.2217/nnm.12.162>

Karakaya, S. (2004). Bioavailability of phenolic compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(6), 453- 464. doi: <https://doi.org/10.1080/10408690490886683>

Karimifard, S., Rezaei, N., Jamshidifar, E., Moradi Falah Langeroodi, S., Abdihaji, M., Mansouri, A., ... Mostafavi, E. (2022). pH-responsive chitosan-adorned niosome nanocarriers for co-delivery of drugs for breast cancer therapy. *ACS Applied Nano Materials*, 5(7), 8811-8825. doi: <https://doi.org/10.1021/acsanm.2c00861>

Karkovic Markovic, A., Toric, J., Barbaric, M. ve Jakobusic Brala, C. (2019). Hydroxytyrosol, tyrosol and derivatives and their potential effects on human health. *Molecules*, 24(10), 2001. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules24102001>

Karuppaiah, A., Annamalai, G., Dhasaiyan, M., Manikandan, S., Jose, P. A. ve Rahman, H. (2024). An updated review of nano techniques for enhancing the bioavailability and therapeutic efficacy of poly phenolic bioactive compounds. *Current Nanomedicine*. 3(5), 15. doi: <https://doi.org/10.2174/0124681873312762241114045714>

Kataoka, H., Lord, H. L. ve Pawliszyn, J. (2000). Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 880(1-2), 35- 62. doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00309-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00309-5)

Katkale, A., Sonawane, S., Kunde, V. ve Hagavane, S. (2022). Review on niosomes as novel drug delivery system. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 1137(10.20959). doi: [10.20959/wjpr20223-23338](https://doi.org/10.20959/wjpr20223-23338)

Kazi, K. M., Mandal, A. S., Guha, A., Chatterjee, S., Behera, M. ve Kuotsu, K. (2010). Niosome: A future of targeted drug delivery systems. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 1(4), 374- 380. doi: [10.4103/0110-5558.76435](https://doi.org/10.4103/0110-5558.76435)

Kelebek, H., Kesen, S. ve Selli, S. (2015). Comparative study of bioactive constituents in Turkish olive oils by LC-ESI/MS/MS. *International Journal of Food Properties*, 18(10), 2231-2245. doi: <https://doi.org/10.1080/10942912.2014.968788>

Kelebek, H., Kesen, S., Sonmezdag, A. S., Cetiner, B., Kola, O. ve Selli, S. (2018). Characterization of the key aroma compounds in tomato pastes as affected by hot and cold break process. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12, 2461- 2474. doi:

<https://doi.org/10.1007/s11694-018-9863-8>

Kesen, S., Kelebek, H. ve Selli, S. (2014). LC–ESI–MS characterization of phenolic profiles Turkish olive oils as influenced by geographic origin and harvest year. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(3), 385-394. doi: <https://doi.org/10.1007/s11746-013-2380-3>

Kesente, M., Kavetsou, E., Roussaki, M., Blidi, S., Loupassaki, S., Chanioti, S. ... Detsi, A. (2017). Encapsulation of olive leaves extracts in biodegradable PLA nanoparticles for use in cosmetic formulation. *Bioengineering*, 4(3), 75. doi:

<https://doi.org/10.3390/bioengineering4030075>

Keskin, S. M., Bastıoğlu, A. Z., Şirinyıldız, D. D., Gumus-Bonacina, C. E. ve Yorulmaz, A. (2024). Improving the stability of olive leaf extract through nanophytosomal encapsulation: optimization of the preparation conditions, characterization and evaluation of the release kinetics. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 18(1), 299- 312. doi:

<https://doi.org/10.1007/s11694-023-02171-5>

Khalil, R. A. ve Al-hakam, A. Z. (2014). Theoretical estimation of the critical packing parameter of amphiphilic self-assembled aggregates. *Applied Surface Science*, 318, 85- 89. doi:

<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.01.046>

Khalil, R. A. ve Hammad, F. J. (2014). Critical intermolecular forces: A new physical insight for the formation of wormlike micelles. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 36(2), 211- 220. Erişim adresi:

https://jcsp.org.pk/PublishedVersion/b631cbba-d05f-45c2-893a-883193eef824final%202nd%20Revised%201st%20gally%20proof%20of%209706%20_Rabah%20Ali%20Khalil_.docx%20checked.pdf

Khan, M. I., Madni, A., Ahmad, S., Khan, A., Rehmanand, M. ve Mahmood, M. A. (2015). ATR-FTIR based pre and post formulation compatibility studies for the design of niosomal

drug delivery system containing nonionic amphiphiles and chondroprotective drug. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 37(3), 527- 534. Erişim adresi:

<https://research.ebsco.com/c/wxdis4/viewer/pdf/hgnqfvkk6b>

Khan, W., Parveen, R., Chester, K., Parveen, S. ve Ahmad, S. (2017). Hypoglycemic potential of aqueous extract of *Moringa oleifera* leaf and in vivo GC-MS metabolomics. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 577. doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00577>

Khatoon, M., Shah, K. U., Din, F. U., Shah, S. U., Rehman, A. U., Dilawar, N. ... Khan, A. N. (2017). Proniosomes derived niosomes: recent advancements in drug delivery and targeting. *Drug Delivery*, 24(2), 56-69. doi: <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1384520>

Khodadadi, E., Khodadadi, E., Chaturvedi, P. ve Moradi, M. (2025). Comprehensive insights into the cholesterol-mediated modulation of membrane function through molecular dynamics simulations. *Membranes*, 15(6), 173. doi: [10.3390/membranes15060173](https://doi.org/10.3390/membranes15060173)

Kholodenko, A. L. ve Douglas, J. F. (1995). Generalized Stokes-Einstein equation for spherical particle suspensions. *Physical Review E*, 51(2), 1081. doi: <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.51.1081>

Khudair, N., Agouni, A., Elrayess, M. A., Najlah, M., Younes, H. M. ve Elhissi, A. (2020). Letrozole- loaded nonionic surfactant vesicles prepared via slurry-based proniosome technology: Formulation development and characterization. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 58, 101721. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101721>

Koudoufio, M., Desjardins, Y., Feldman, F., Spahis, S., Delvin, E. ve Levy, E. (2020). Insight into polyphenol and gut microbiota crosstalk: are their metabolites the key to understand protective effects against metabolic disorders?. *Antioxidants*, 9(10), 982. doi: <https://doi.org/10.3390/antiox9100982>

Kourti, M., Skaperda, Z., Tekos, F., Stathopoulos, P., Koutra, C., Skaltsounis, A. L. ve Kouretas, D. (2024). The bioactivity of a hydroxytyrosol-enriched extract originated after direct hydrolysis of olive leaves from Greek cultivars. *Molecules*, 29(2), 299. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules29020299>

Koyundereli-Çılgı, G., Balkaya, T. ve Soğancı, T. (2014). Farklı Yüksletgenme basamağına sahip metal tuzlarının termal bozunma reaksiyonlarının kinetik ve termodinamik olarak incelenmesi. *TÜBİTAK 1002 proje raporu*, (proje no: 212T241), 6-9. Erişim. adresi: <https://pdf.trdizin.gov.tr/pdf/Rms5NWF3UFcyNFRVNHhpL3BnbVhEVXBOM0lReHZwSllnbzRvdFg5cEJ6UEI3aHJaYkxXRW9KUTQ4ZnNLcE9NLzZQSEtFVjVBdzVrcThzck03dnFUb3ZXNEVRQjQxaUhDVUY3ZTV5QU5jdFpTQlBwSzVZUm5RR0Z3dFFKVEY4S1dkM0pYYjcwMnk3enpGREVEMVY3dGw2Z21uMHA1T2o0aHBRMkNZMU9kQmRXazQrNDVSQ2s4L2kwMlBzc0h3RzYxNmTsQndzOGI1QU96ZE5oejlyQlNGcmdvTDlqUUhlRDMxb2FCZ2lKdzN1Zz0>

Krumrey, M. (2020). Small angle x-ray scattering (SAXS). Hodoroaba, V., Unger, W. E. S. ve Shard, A. G. (Eds.). *Characterization of nanoparticles* içinde (s. 173- 183). Elsevier. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814182-3.00011-0>

Kumar, S., Kumar, S., Soni, A. ve Gupta, V. (2024). Formulation and evaluation of nystatin niosomal gel drug delivery system. *World Journal of Pharmaceutical Research*.13(7), 1436-1453. doi: [10.4103/2230-973X.107002](https://doi.org/10.4103/2230-973X.107002)

Kumar, S. ve Maurya, H. (2018). An Overview on advance vesicles formulation as a drug carrier for NDDS. *European Journal of Biomedical*, 5(2), 292-303. Erişim adresi: https://www.researchgate.net/publication/326835934_AN_OVERVIEW_ON_ADVANCE_VESICLES_FORMULATION_AS_A_DRUG_CARRIER_FOR_NDDS

Kumar, S. ve Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 2013(1), 162750. doi: <https://doi.org/10.1155/2013/162750>

Kumar, S., Saini, R., Suthar, P., Kumar, V. ve Sharma, R. (2022). Plant secondary metabolites: Physico-chemical properties and therapeutic applications. Sharma-Kumar A., ve Sharma, A. (Ed.). *Plant secondary metabolites* içinde (s. 371- 413). Gateway East, Singapore: doi: https://doi.org/10.1007/978-981-16-4779-6_12

Kumavat, S., Sharma, P. K., Koka, S. S., Sharma, R., Gupta, A. ve Darwhekar, G. N. (2021). A review on niosomes: Potential vesicular drug delivery system. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 11(5), 208- 212. doi: <https://doi.org/10.22270/jddt.v11i5.5046>

Lammari, N., Tarhini, M., Miladi, K., Louaer, O., Meniai, A. H., Sfar, S. ... Elaissari, A. (2021). Encapsulation methods of active molecules for drug delivery. Chappel, E. (Ed.). *Drug delivery devices and therapeutic systems* içinde (s. 289- 306). Academic Press. doi: <https://doi.org/10.1016/C2018-0-04221-8>

Laouini, A., Jaafar-Maalej, C., Limayem-Blouza, I., Sfar, S., Charcosset, C. ve Fessi, H. (2012). Preparation, characterization and applications of liposomes: state of the art. *Journal of colloid Science and Biotechnology*, 1(2), 147- 168. doi: [10.1166/jcsb.2012.1020](https://doi.org/10.1166/jcsb.2012.1020)

Lee, U. J., Sohng, J. K., Kim, B. G. ve Choi, K. Y. (2023). Recent trends in the modification of polyphenolic compounds using hydroxylation and glycosylation. *Current Opinion in Biotechnology*, 80, 102914. doi: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2023.102914>

Leopoldini, M., Marino, T., Russo, N. ve Toscano, M. (2004). Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. *The Journal of Physical Chemistry A*, 108(22), 4916- 4922. doi: <https://doi.org/10.1021/jp037247d>

Li, M., Cui, J., Ngadi, M. O. ve Ma, Y. (2015). Absorption mechanism of whey-protein-delivered curcumin using Caco-2 cell monolayers. *Food Chemistry*, 180, 48- 54. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.132>

Li, W., Chountoulesi, M., Antoniadis, L., Angelis, A., Lei, J., Halabalaki, M. ... Wang, C. (2022). Development and physicochemical characterization of nanoliposomes with incorporated oleocanthal, oleacein, oleuropein and hydroxytyrosol. *Food Chemistry*, 384, 132470. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132470>

Li, Y., Zhang, J., Song, P., Miao, X., Liu, G., Yang, C. ... Bian, F. (2023). Small-angle X-Ray Scattering for PEGylated liposomal doxorubicin drugs: an analytical model comparison study. *Molecular Pharmaceutics*, 20(9), 4654- 4663. doi:

<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c00396>

Liechty, W. B., Kryscio, D. R., Slaughter, B. V. ve Peppas, N. A. (2010). Polymers for drug delivery systems. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, 1(1), 149-173. doi:

<https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-073009-100847>

Liga, S., Paul, C., Moaca, E. A. ve Peter, F. (2024). Niosomes: Composition, formulation techniques, and recent progress as delivery systems in cancer therapy. *Pharmaceutics*, 16(2), 223. doi: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16020223>

Li, M., Wan, X., He, X., Rong, C. ve Liu, S. (2023). Impacts of external fields on aromaticity and acidity of benzoic acid: a density functional theory, conceptual density functional theory and information-theoretic approach study. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 25(3), 2595-2605. doi: [10.1039/D2CP04557E](https://doi.org/10.1039/D2CP04557E)

Lipo Life. (t.y.). *LLT2 – Boswellia ve curcumin*. Lipo Life. Erişim tarihi: 24 Ağustos 2025. <https://www.lipolife.co.za/shop-move/LLT2-Boswellia-and-Curcumin-p467283632>

Li, Q., Ren, T., Perkins, P., Hu, X. ve Wang, X. (2021). Applications of halloysite nanotubes in food packaging for improving film performance and food preservation. *Food Control*, 124, 107876. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.107876>

LivOn Laboratories. (t.y.). *Lypo-Spheric™ vitamin C*. Nanotech Project. Erişim tarihi: 24 Ağustos 2025. <https://www.nanotechproject.tech/cpi/products/lypo-spheric-vitamin-c/>

Li, W., Chountoules, M., Antoniadis, L., Angelis, A., Lei, J., Halabalaki, M. ... Wang, C. (2022). Development and physicochemical characterization of nanoliposomes with incorporated oleocanthal, oleacein, oleuropein and hydroxytyrosol. *Food Chemistry*, 384, 132470. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132470>

Lobiuc, A., Paval, N. E., Mangalagiu, I. I., Gheorghita, R., Teliban, G. C., Amariuca-Mantu, D. ve Stoleru, V. (2023). Future antimicrobials: Natural and functionalized phenolics. *Molecules*, 28(3), 1114. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules28031114>

Londhe, A., Jadhav, R., Mulani, A., Gavade, P. ve Kale, V. (2025). Niosomes: An advanced drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3(1), 2196- 2206. doi: [10.5281/zenodo.14739889](https://doi.org/10.5281/zenodo.14739889)

Lucarini, M., Mugnaini, V., Pedulli, G. F. ve Guerra, M. (2003). Hydrogen-bonding effects on the properties of phenoxy radicals. An EPR, kinetic, and computational study. *Journal of the American Chemical Society*, 125(27), 8318- 8329. doi: <https://doi.org/10.1021/ja034963k>

Machado, N. D., Garcia-Manrique, P., Fernandez, M. A., Blanco-Lopez, M. C., Matos, M. ve Gutierrez, G. (2020). Cholesterol free niosome production by microfluidics: Comparative with other conventional methods. *Chemical Engineering Research and Design*, 162, 162-171. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2020.08.002>

Machado, N. D., Gutierrez, G., Matos, M. ve Fernandez, M. A. (2021). Preservation of the antioxidant capacity of resveratrol via encapsulation in niosomes. *Foods*, 10(5), 988. doi: <https://doi.org/10.3390/foods10050988>

Madan, J. R., Ghuge, N. P. ve Dua, K. (2016). Formulation and evaluation of proniosomes containing lornoxicam. *Drug Delivery and Translational Research*, 6(5), 511- 518. doi: <https://doi.org/10.1007/s13346-016-0296-9>

Manosroi, A., Wongtrakul, P., Manosroi, J., Sakai, H., Sugawara, F., Yuasa, M. ve Abe, M. (2003). Characterization of vesicles prepared with various non-ionic surfactants mixed with cholesterol. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 30(1-2), 129- 138. doi: [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(03\)00080-8](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(03)00080-8)

Manso, T., Lores, M. ve de Miguel, T. (2021). Antimicrobial activity of polyphenols and natural polyphenolic extracts on clinical isolates. *Antibiotics*, 11(1), 46. doi: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010046>

Mansour, H. M., Shehata, M. G., Abdo, E. M., Sharaf, M. M., Hafez, E. S. E. ve Galal Darwish, A. M. (2023). Comparative analysis of silver-nanoparticles and whey-encapsulated particles from olive leaf water extracts: Characteristics and biological activity. *Plos One*, 18(12), e0296032. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0296032>

Mardani, P., Rajabzadeh, G., Malaekheh-Nikouei, B. ve Bostan, A. (2025). Investigation and evaluation of dually loaded niosomes containing crocin and omega-3 by heating & bubble method. *Iranian Food Science & Technology Research*, 21(2): 217- 234. doi: <https://doi.org/10.22067/ifstrj.2024.88094.1367>

Martirosyan, D., Lampert, T. ve Lee, M. (2022). A comprehensive review on the role of food bioactive compounds in functional food science. *Functional Food Science*, 2(3), 64- 78. doi: <https://doi.org/10.31989/ffs.v2i3.906>

Marsalek, R. (2014). Particle size and zeta potential of ZnO. *APCBEE procedia*, 9, 13- 17. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apcb.2014.01.003>

Masjedi, M. ve Montahaei, T. (2021). An illustrated review on nonionic surfactant vesicles (niosomes) as an approach in modern drug delivery: Fabrication, characterization, pharmaceutical, and cosmetic applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 61, 102234. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102234>

Matwijczuk, A., Budziak-Wieczorek, I., Czernel, G., Karcz, D., Baranska, A., Jedlinska, A. ve Samborska, K. (2022). Classification of honey powder composition by FTIR spectroscopy coupled with chemometric analysis. *Molecules*, 27(12), 3800. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules27123800>

Mawazi, S. M., Ge, Y. ve Widodo, R. T. (2025). Niosome preparation techniques and structure- An illustrated review. *Pharmaceutics*, 17(1), 67. doi: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17010067>

Mawazi, S. M. ve Widodo, R. T. (2024). Unravelling the absence of testosterone peak in niosomes using DSC; insights from FTIR and HRTEM investigations. *BioNanoScience*, 14(5), 5094- 5105. doi:

<https://doi.org/10.1007/s12668-024-01591-x>

Mazzotta, E., Orlando, C. ve Muzzalupo, R. (2021). New nanomaterials with intrinsic antioxidant activity by surface functionalization of niosomes with natural phenolic acids *Pharmaceutics*, 13(6), 766. doi: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060766>

Mazzotta, E., Romeo, M., Hafidi, Z., Perez, L., Perrotta, I. D. ve Muzzalupo, R. (2024). Design of thermosensitive niosomes by eutectic mixture of natural fatty acids. *Pharmaceutics*, 16(7), 909. doi: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16070909>

Mazzotti, F., Benabdelkamel, H., Di Donna, L., Maiuolo, L., Napoli, A. ve Sindona, G. (2012). Assay of tyrosol and hydroxytyrosol in olive oil by tandem mass spectrometry and isotope dilution method. *Food Chemistry*, 135(3), 1006- 1010. doi:

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.005>

McClements, D. J. (2018). Delivery by design (DbD): A standardized approach to the development of efficacious nanoparticle-and microparticle-based delivery systems. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(1), 200- 219. doi:

<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12313>

Medfai, W., Oueslati, I., Dumas, E., Harzalli, Z., Viton, C., Mhamdi, R. ve Gharsallaoui, A. (2023). Physicochemical and biological characterization of encapsulated olive leaf extracts for food preservation. *Antibiotics*, 12(6), 987. doi: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12060987>

Medina-Martinez, M. S., Truchado, P., Castro-Ibanez, I. ve Allende, A. (2016). Antimicrobial activity of hydroxytyrosol: A current controversy. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(4), 801- 810. doi: <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1116924>

Mediniti. (t.y.-a). *AdvanceMax Lipozomal Koenzim Q10*. Mediniti. Erişim tarihi: 24 Ağustos 2025. <https://mediniti.com/tr/advancemax-lipozomal-koenzim-q10>

Mediniti. (t.y.-b). *AdvanceMax Lipozomal Magnezyum*. Mediniti. Erişim tarihi: 24 Ağustos 2025. <https://mediniti.com/tr/advancemax-lipozomal-magnezyum/>

Mehn, D., Iavicoli, P., Cabaleiro, N., Borgos, S. E., Caputo, F., Geiss, O. ... Gilliland, D. (2017). Analytical ultracentrifugation for analysis of doxorubicin loaded liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 523(1), 320-326. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.03.046>

Micheli, L., Bertini, L., Bonato, A., Villanova, N., Caruso, C., Caruso, M., Bernini, R. ve Tirone, F., (2023). Role of hydroxytyrosol and oleuropein in the prevention of aging and related disorders: focus on neurodegeneration, skeletal muscle dysfunction and gut microbiota. *Nutrients*, 15(7), 1767. doi: <https://doi.org/10.3390/nu15071767>

Mirzaie, A., Peirovi, N., Akbarzadeh, I., Moghtaderi, M., Heidari, F., Yeganeh, F. E. ... Bakhtiari, R. (2020). Preparation and optimization of ciprofloxacin encapsulated niosomes: A new approach for enhanced antibacterial activity, biofilm inhibition and reduced antibiotic resistance in ciprofloxacin-resistant methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. *Bioorganic chemistry*, 103, 104231. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104231>

Mitropoulou, G., Stavropoulou, E., Vaou, N., Tsakris, Z., Voidarou, C., Tsiotsias, A., Tsigalou, C., Taban, B. M., Kourkoutas, Y. ve Bezirtzoglou, E. (2023). Insights into antimicrobial and anti-inflammatory applications of plant bioactive compounds. *Microorganisms*, 11(5), 1156. doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051156>

Mitsou, E., Dupin, A., Sassi, A. H., Monteil, J., Sotiroudis, G. T., Leal-Calderon, F. ve Xenakis, A. (2019). Hydroxytyrosol encapsulated in biocompatible water-in-oil microemulsions: How the structure affects in vitro absorption. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 184, 110482. doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110482>

Mittal, S., Chaudhary, A., Chaudhary, A. ve Kumar, A. (2020). Proniosomes: The effective and efficient drug-carrier system. *Therapeutic Delivery*, 11(2), 125- 137. doi: <https://doi.org/10.4155/tde-2019-0065>

Moammeri, A., Chegeni, M. M., Sahrayi, H., Ghafelehbash, R., Memarzadeh, F., Mansouri, A. ... Ren, Q. (2023). Current advances in niosomes applications for drug delivery and cancer treatment. *Materials Today Bio*, 23, 100837. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2023.100837>

Moghassemi, S. ve Hadjizadeh, A. (2014). Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems: an illustrated review. *Journal of Controlled Release*, 185, 22- 36. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.015>

Moghassemi, S., Dadashzadeh, A., Azevedo, R. B., Feron, O. ve Amorim, C. A. (2021). Photodynamic cancer therapy using liposomes as an advanced vesicular photosensitizer delivery system. *Journal of Controlled Release*, 339, 75- 90. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.09.024>

Moghtaderi, M., Mirzaie, A., Zabet, N., Moammeri, A., Mansoori-Kermani, A., Akbarzadeh, I. ... Ren, Q. (2021). Enhanced antibacterial activity of *Echinacea angustifolia* extract against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* through niosome encapsulation. *Nanomaterials*, 11(6), 1573. doi: <https://doi.org/10.3390/nano11061573>

Mohammadi, A., Jafari, S. M., Esfanjani, A. F. ve Akhavan, S. (2016). Application of nano-encapsulated olive leaf extract in controlling the oxidative stability of soybean oil. *Food Chemistry*, 190, 513- 519. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.115>

Mohamad Saimi, N. I., Salim, N., Ahmad, N., Abdulmalek, E. ve Abdul Rahman, M. B. (2021). Aerosolized niosome formulation containing gemcitabine and cisplatin for lung cancer treatment: Optimization, characterization and in vitro evaluation. *Pharmaceutics*, 13(1), 59. doi: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010059>

Mohammed, A. ve Abdullah, A. (2018). Scanning electron microscopy (SEM): A review. Proceedings of the 2018 international conference on hydraulics and pneumatics'te sunulan bildir, HERVEX, Baile Govora, Romania, 77- 85. Erişim adresi: <https://fluidas.ro/hervex/proceedings2018/77-85.pdf>

Mohanty, D., Jhansi, M., Bakshi, V., Akiful Haque, M., Swapna, S., Sahoo, C. K. ve Upadhyay, U. K. (2018). Niosomes: A novel trend in drug delivery. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 11(11), 5205- 5211. doi: [10.5958/0974-360X.2018.00950.2](https://doi.org/10.5958/0974-360X.2018.00950.2)

Monteiro, M., Silva, A. F., Resende, D., Braga, S. S., Coimbra, M. A., Silva, A. M. ve Cardoso, S. M. (2021). Strategies to broaden the applications of olive biophenols oleuropein and hydroxytyrosol in food products. *Antioxidants*, 10(3), 444. doi: <https://doi.org/10.3390/antiox10030444>

Montes, A., Valor, D., Garcia-Casas, I., Sanchez, A. ve Pereyra, C. (2024). Encapsulation of olive (*Olea europaea* L.) pruning waste particles by supercritical CO₂ technology. *Foods*, 13(6), 905. doi: <https://doi.org/10.3390/foods13060905>

Mor, S., Battula, S. N., Swarnalatha, G., Pushpadass, H., Naik, L. N. ve Franklin, M. (2021). Preparation of casein biopeptide-loaded niosomes by high shear homogenization and their characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(15), 4371- 4380. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c05982>

Morakul, B. ve Junyaprasert, V. B. (2020). Proniosomes: An effective carrier for dermal and transdermal delivery. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 42 (6), 1171- 1186. <https://doi.org/10.14456/SJST-PSU.2020.153>

Morteza-Semnani, K., Saeedi, M., Akbari, J., Hedayati, S., Hashemi, S. M. H., Rahimnia, S. M. ... Hedayati, M. T. (2022). Green formulation, characterization, antifungal and biological safety evaluation of terbinafine HCl niosomes and niosomal gels manufactured by eco-friendly green method. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 33(18), 2325- 2352. doi: <https://doi.org/10.1080/09205063.2022.2103626>

Mota, W. S., Severino, P., Kadian, V., Rao, R., Zielińska, A., Silva, A. M. ... Souto, E. B. (2025). Nanometrology: particle sizing and influence on the toxicological profile. *Frontiers in Nanotechnology*, 7, 1479464. doi: <https://doi.org/10.3389/fnano.2025.1479464>

Mourtzinou, I., Salta, F., Yannakopoulou, K., Chiou, A. ve Karathanos, V. T. (2007). Encapsulation of olive leaf extract in β -cyclodextrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(20), 8088-8094. doi: <https://doi.org/10.1021/jf0709698>

Mozafari, R. M., Johnson, C., Hatziantoniou, S. ve Demetzos, C. (2008). Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *Journal of Liposome Research*, 18(4), 309- 327. doi: <https://doi.org/10.1080/08982100802465941>

Mozafari, M. R. ve Walker, J. M. (2009). Nanoliposomes: Preparation and analysis. *Liposomes: Methods and protocols, volume 1: Pharmaceutical nanocarriers* içinde (s. 51- 76). Totowa, NJ: Humana press. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-60327-360-2_2

Mujtaba, M. A., Kaleem, M., Chaware, R., Ingole, A., Asiri, Y. I., Hassan, M. Z. ... Aldawsari, M. F. (2024). Development and optimization of proniosomal formulation of irbesartan using a box-behnken design to enhance oral bioavailability: physicochemical characterization and in vivo assessment. *ACS Omega*, 9(14), 16346-16357. doi: <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c10506>

Muhammad, Z., Ramzan, R., Zhang, R. ve Zhang, M. (2021). Resistant starch-based edible coating composites for spray-dried microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus*, comparative assessment of thermal protection, in vitro digestion and physicochemical characteristics. *Coatings*, 11(5), 587. doi: <https://doi.org/10.3390/coatings11050587>

Munoz-Almagro, N., Garrido-Galand, S., Taladrid, D., Moreno-Arribas, M., Villamiel, M. ve Montilla, A. (2022). Supporting Information for use of natural low-methoxyl pectin from sunflower by-products for the formulation of low-sucrose strawberry jams. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 102, 5957- 5964. doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.11948>

Nadzir, M. M., Fen, T. W., Mohamed, A. R. ve Hisham, S. F. (2017). Size and stability of curcumin niosomes from combinations of Tween 80 and Span 80. *Sains Malaysiana*, 46(12), 2455-2460. doi: [10.17576/jsm-2017-4612-22](https://doi.org/10.17576/jsm-2017-4612-22)

Nagalakshmi, S., Krishnaraj, K., Jothy, A. M., Chaudhari, P. S., Pushpalatha, H. B. ve Shanmuganthan, S. (2016). Fabrication and characterization of herbal drug-loaded nonionic surfactant based niosomal topical gel. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 8(11), 1271- 1278. Erişim adresi:

<https://www.jpsr.pharmainfo.in/~ijcsitco/pharmainfo/jpsr/Documents/Volumes/vol8Issue11/jpsr08111605.pdf>

Naik, S. R., Pilgaonkar, V. W. ve Panda, V. S. (2006). Evaluation of antioxidant activity of Ginkgo biloba phytosomes in rat brain. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 20(11), 1013- 1016. doi: <https://doi.org/10.1002/ptr.1976>

Najlah, M., Hidayat, K., Omer, H. K., Mwesigwa, E., Ahmed, W., AlObaidy, K. G. ... Elhissi, A. (2015). A facile approach to manufacturing non-ionic surfactant nanodispersions using proniosome technology and high-pressure homogenization. *Journal of Liposome Research*, 25(1), 32-37. doi: <https://doi.org/10.3109/08982104.2014.924140>

Nandee, R., Chowdhury, M. A., Hossain, N., Rana, M. M., Mobarak, M. H. ve Khandaker, M. R. (2024). Surface topography and surface morphology of graphene nanocomposite by FESEM, EDX and AFM analysis. *Nano-Structures & Nano-Objects*, 38, 101170. doi: <https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2024.101170>

Nasr, M., Mansour, S., Mortada, N. D. ve Elshamy, A. A. (2008). Vesicular aceclofenac systems: a comparative study between liposomes and niosomes. *Journal of Microencapsulation*, 25(7), 499- 512. doi: <https://doi.org/10.1080/02652040802055411>

Nasr, M. (2010). In vitro and in vivo evaluation of proniosomes containing celecoxib for oral administration. *Aaps Pharmscitech*, 11(1), 85-89. doi: <https://doi.org/10.1208/s12249-009-9364-5>

Nasseri, B. (2005). Effect of cholesterol and temperature on the elastic properties of niosomal membranes. *International Journal of Pharmaceutics*, 300(1- 2), 95- 101. doi:

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.05.009>

Nazari, M., Ghanbarzadeh, B., Kafil, H. S., Zeinali, M. ve Hamishehkar, H. (2019). Garlic essential oil nanophytosomes as a natural food preservative: Its application in yogurt as food model. *Colloid and Interface Science Communications*, 30, 100176. doi:

<https://doi.org/10.1016/j.colcom.2019.100176>

Nikou, T., Sakavitsi, M. E., Kalampokis, E. ve Halabalaki, M. (2022). Metabolism and bioavailability of olive bioactive constituents based on *in vitro*, *in vivo* and human studies. *Nutrients*, 14(18), 3773. doi: <https://doi.org/10.3390/nu14183773>

Nimbalwar, M. G., Panchale, W. A., Nimbokar, S. W., Gudalwar, B. R., Manwar, J. V. ve Bakal, R. L. (2021). A brief review on principle, preparation and properties of proniosomes: A provesicular drug delivery system. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(5), 149- 162. Erişim adresi: <https://www.wjpsonline.com/index.php/wjps/article/view/116>

Nishimoto-Sauceda, D., Romero-Robles, L. E. ve Antunes-Ricardo, M. (2022). Biopolymer nanoparticles: a strategy to enhance stability, bioavailability, and biological effects of phenolic compounds as functional ingredients. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 102(1), 41-52. doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.11512>

Niskanen, I., Forsberg, V., Zakrisson, D., Reza, S., Hummelgard, M., Andres, B. ... Thungström, G. (2019). Determination of nanoparticle size using Rayleigh approximation and Mie theory. *Chemical Engineering Science*, 0201, 222-229. doi:

<https://doi.org/10.1016/j.ces.2019.02.020>

NutraLease Ltd. (t.y.). *Nano-sized self-assembled liquid structures (NSSL) supplements*. Nanotech Project. Erişim tarihi: 24 Ağustos 2025.

<https://www.nanotechproject.tech/cpi/products/nano-sized-self-assembled-liquid-structures-nssl-supplements/>

Ojagh, S. M. ve Hasani, S. (2018). Characteristics and oxidative stability of fish oil nano-liposomes and its application in functional bread. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(2), 1084-1092. doi: <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9724-5>

Ozkan, G., Kostka, T., Esatbeyoglu, T. ve Capanoglu, E. (2020). Effects of lipid-based encapsulation on the bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds. *Molecules*, 25(23), 5545. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules25235545>

Paini, M., Aliakbarian, B., Casazza, A. A., Lagazzo, A., Botter, R. ve Perego, P. (2015). Microencapsulation of phenolic compounds from olive pomace using spray drying: A study of operative parameters. *LWT-Food Science and Technology*, 62(1), 177-186. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.022>

Paiva-Martins, F. ve Gordon, M. H. (2002). Effects of pH and ferric ions on the antioxidant activity of olive polyphenols in oil-in-water emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(6), 571- 576. doi: <https://doi.org/10.1007/s11746-002-0524-4>

Paiva-Martins, F., Rodrigues, V., Calheiros, R. ve Marques, M. P. (2011). Characterization of antioxidant olive oil biophenols by spectroscopic methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(2), 309-314. doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.4186>

Panche, A. N., Diwan, A. D. ve Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, e47. doi: <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>

Pando, D., Beltran, M., Gerone, I., Matos, M. ve Pazos, C. (2015). Resveratrol entrapped niosomes as yoghurt additive. *Food Chemistry*, 170, 281-287. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.082>

Pando, D., Gutierrez, G., Coca, J. ve Pazos, C. (2013). Preparation and characterization of niosomes containing resveratrol. *Journal of Food Engineering*, 117(2), 227-234. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.02.020> [Get rights and content](#)

Papageorgiou, C. S., Lyri, P., Xintaropoulou, I., Diamantopoulos, I., Zagklis, D. P. ve Paraskeva, C. A. (2022). High-yield production of a rich-in-hydroxytyrosol extract from olive (*Olea europaea*) leaves. *Antioxidants*, 11(6), 1042. doi:

<https://doi.org/10.3390/antiox11061042>

Park, S. J. ve Seo, M. K. (2011). Intermolecular force. *Interface science and technology* içinde (s. 1- 57). Elsevier. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375049-5.00001-3>

Pasquet, P. L., Julien-David, D., Zhao, M., Villain-Gambier, M. ve Trebouet, D. (2024). Stability and preservation of phenolic compounds and related antioxidant capacity from agro-food matrix: Effect of pH and atmosphere. *Food Bioscience*, 057, 103586. doi:

<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.103586>

Pashazadeh, H., Zannou, O., Ghellam, M., Koca, I., Galanakis, C. M. ve Aldawoud, T. M. (2021). Optimization and encapsulation of phenolic compounds extracted from maize waste by freeze-drying, spray-drying, and microwave-drying using maltodextrin. *Foods*, 10(6), 1396. doi: <https://doi.org/10.3390/foods10061396>

Pateiro, M., Gomez, B., Munekata, P. E., Barba, F. J., Putnik, P., Kovacevic, D. B. ve Lorenzo, J. M. (2021). Nanoencapsulation of promising bioactive compounds to improve their absorption, stability, functionality and the appearance of the final food products. *Molecules*, 26(6), 1547. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26061547>

Patel, G. K., Prajapati, B. ve Pathak, Y. (2023). Niosomes in malaria. Shegokar, R. ve Pathak, Y. (Ed) *Malarial drug delivery systems: Advances in treatment of infectious diseases* içinde (s. 253- 277). Cham, Switzerland: Springer International Publishing. doi:

https://doi.org/10.1007/978-3-031-15848-3_12

Patil, M., Pandit, P., Udavant, P., Sonawane, S. ve Bhambere, D. (2021). Development and optimization of proniosomal gel containing etodolac: in-vitro, ex-vivo and in-vivo evaluation. *Ars Pharmaceutica*, 62(3), 290- 304. doi: [10.30827/ars.v62i3.17944](https://doi.org/10.30827/ars.v62i3.17944)

Paulo, F. ve Santos, L. (2020). Encapsulation of the antioxidant tyrosol and characterization of loaded microparticles: an integrative approach on the study of the polymer-carriers and loading contents. *Food and Bioprocess Technology*, 13(5), 764-785. doi:

<https://doi.org/10.1007/s11947-020-02407-y>

Paulo, F., Tavares, L. ve Santos, L. (2022). Extraction and encapsulation of bioactive compounds from olive mill pomace: Influence of loading content on the physicochemical and structural properties of microparticles. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16(4), 3077- 3094. doi: <https://doi.org/10.1007/s11694-022-01408-z>

Pawliszyn, J., Pawliszyn, B. ve Pawliszyn, M. (1997). Solid phase microextraction (SPME). *The Chemical Educator*, 2(4), 1- 7. doi: <https://doi.org/10.1007/s00897970137a>

Pazos, M., Alonso, A., Sanchez, I. ve Medina, I. (2008). Hydroxytyrosol prevents oxidative deterioration in foodstuffs rich in fish lipids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(9), 3334- 3340. doi: <https://doi.org/10.1021/jf073403s>

Pereira, C., Freitas, A. M. C., Cabrita, M. J. ve Garcia, R. (2020). Assessing tyrosol and hydroxytyrosol in Portuguese monovarietal olive oils: Revealing the nutraceutical potential by a combined spectroscopic and chromatographic techniques-based approach. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie (LWT- Food Science and Technology)*, 118, 108797. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108797>

Pham, L. B., Wang, B., Zisu, B. ve Adhikari, B. (2019). Complexation between flaxseed protein isolate and phenolic compounds: Effects on interfacial, emulsifying and antioxidant properties of emulsions. *Food Hydrocolloids*, 94, 20- 29. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.03.007>

Plamada, D., Nemes, A. S., Teleky, B. E., Pascuta, M. S., Odocheanu, R., Mitrea, L. ... Vodnar, D. C. (2024). Microbial production of aromatic phenolic compounds. *Microbial Production of Food Bioactive Compounds*, 1-24. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-030-81403-8_53-1

Pochec, M., Orzechowski, K. ve Rutkowski, K. (2022). Indicators of premelting in 1-decanol and 1-nonanol studied by FTIR spectroscopy. *Surfaces and Interfaces*, 28, 101676. doi: <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2021.101676>

Pojero, F., Aiello, A., Gervasi, F., Caruso, C., Ligotti, M. E., Calabro, A. ... ve Allegra, M. (2022). Effects of oleuropein and hydroxytyrosol on inflammatory mediators: Consequences on inflammaging. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 380. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms24010380>

Quezada, M. M., Fernandes, C., Montero, J., Correia, A., Salgado, H. ve Fonseca, P. (2024). A different approach to analyzing the surface roughness of prosthetic dental acrylic resins. *Applied Sciences*, 14(2), 619. doi: <https://doi.org/10.3390/app14020619>

Rada, M., Guinda, A. ve Cayuela, J. (2007). Solid/liquid extraction and isolation by molecular distillation of hydroxytyrosol from *Olea europaea* L. leaves. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(11), 1071-1076. doi: <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700061>

Radha, G. V., Rani, T. S. ve Sarvani, B. (2013). A review on proniosomal drug delivery system for targeted drug action. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 4(2), 42- 48. doi: [10.4103/0976-0105.113609](https://doi.org/10.4103/0976-0105.113609)

Rahim, M. A., Kristufek, S. L., Pan, S., Richardson, J. J. ve Caruso, F. (2019). Phenolic building blocks for the assembly of functional materials. *Angewandte Chemie International Edition*, 58(7), 1904-1927. doi: <https://doi.org/10.1002/anie.201807804>

Rahman, M., Beg, S., Kazmi, I., Hafeez, A. ve Kumar, V. (2019). Application of QbD elements for the development of conventional to lipid vesicular for topical drug delivery system. Beg, S. ve Hasnain, M. S. (Ed.). *Pharmaceutical quality by design* içinde (s. 367- 378). London, United Kingdom: Academic Press. doi: <https://doi.org/10.1016/C2017-0-03874-0>

Raja, K. C. M., Sankarikutty, B., Sreekumar, M., Jayalekshmy, A. ve Narayanan, C. S. (1989). Material characterization studies of maltodextrin samples for the use of wall material. *Starch-Starke*, 41(8), 298-303. doi: <https://doi.org/10.1002/star.19890410805>

Ramazanli, V. N. ve Ahmadov, I. S. (2022). Synthesis of silver nanoparticles by using extract of olive leaves. *Advances in Biology & Earth Sciences*, 7(3), 238- 244. Erişim adresi: https://jomardpublishing.com/UploadFiles/Files/journals/ABES/V7N3/Ramazanli_Ahmadov.pdf

Ramos-Escudero, F., Morales, M. T. ve Asuero, A. G. (2015). Characterization of bioactive compounds from monovarietal virgin olive oils: Relationship between phenolic compounds-antioxidant capacities. *International Journal of Food Properties*, 18(2), 348-358. doi: <https://doi.org/10.1080/10942912.2013.809542>

Rana, A., Samtiya, M., Dhewa, T., Mishra, V. ve Aluko, R. E. (2022). Health benefits of polyphenols: A concise review. *Journal of Food Biochemistry*, 46(10), e14264. doi: <https://doi.org/10.1111/jfbc.14264>

Rashidinejad, A., Birch, E. J., Sun-Waterhouse, D. ve Everett, D. W. (2014). Delivery of green tea catechin and epigallocatechin gallate in liposomes incorporated into low-fat hard cheese. *Food Chemistry*, 156, 176- 183. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.115>

Ratnamala, K. ve Amreen, A. (2022). Niosome: potential carrier for targeted drug delivery. *Aditum Journal of Clinical and Biomedical Research*, 4(3), 1-7. Erişim adresi: https://aditum.org/images/currentissue/1654853621Galley_Proof.pdf

Ravaghi, M., Sinico, C., Razavi, S. H., Mousavi, S. M., Pini, E. ve Fadda, A. M. (2017). Proniosomal powders of natural canthaxanthin: preparation and characterization. *Food Chemistry*, 220, 233- 241. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.162>

Raychaudhuri, R., Pandey, A., Hegde, A., Abdul Fayaz, S. M., Chellappan, D. K., Dua, K. ve Mutalik, S. (2020). Factors affecting the morphology of some organic and inorganic nanostructures for drug delivery: characterization, modifications, and toxicological perspectives. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 17(12), 1737-1765. doi: <https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1819237>

R Core Team. (2023). *R: A language and environment for statistical computing* (Version 4.3.2) (Computer software). Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Erişim adresi: <https://www.r-project.org/>

Reboredo-Rodríguez, P., Rey-Salgueiro, L., Regueiro, J., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B. ve Simal-Gandara, J. (2014). Ultrasound-assisted emulsification–microextraction for the determination of phenolic compounds in olive oils. *Food Chemistry*, 150, 128-136. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.157>

Reddy, K. T. K., ve Gandla, K. (2022). Novel vesicular drug delivery systems proniosomes. *Journal of Pharmaceutical Research*, 6(3), 1- 10. doi: [10.23880/oajpr-16000272](https://doi.org/10.23880/oajpr-16000272)

Rezaei, H., Iranbakhsh, A., Sepahi, A. A., Mirzaei, A. ve Larijani, K. (2024). Formulation, preparation of niosome loaded zinc oxide nanoparticles and biological activities. *Scientific Reports*, 14, 16692. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-67509-5>

Rezvani, M., Hesari, J., Peighambaroust, S. H., Manconi, M., Hamishehkar, H. ve Escribano-Ferrer, E. (2019). Potential application of nanovesicles (niosomes and liposomes) for fortification of functional beverages with Isoleucine-Proline-Proline: A comparative study with central composite design approach. *Food Chemistry*, 293, 368-377. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.015>

Riar, C. S. ve Panesar, P. S. (2024). Bioactive compounds and nutraceuticals: Classification, potential sources, and application status. *Bioactive compounds and nutraceuticals from dairy, marine, and nonconventional sources* içinde (s. 3-60). NY: Apple Academic Press. doi: <https://doi.org/10.1201/9781003452768>

Ribeiro, J. P. M., Schebelski, D. J., Lyra, A. M., Camargo, G. D. A., Nadal, J. M., Novatski, A. ... Farago, P. V. (2023). Physicochemical characterization, quantitative drug analysis, and stability testing of hydroxytyrosol-loaded poly (ϵ -caprolactone) nanocapsules. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 66, e23230081. doi: <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2023230081>

Rietjens, S. J. (2008). Hydroxytyrosol. A versatile antioxidant from olive oil. (Doctoral thesis, Maastricht University). doi: <https://doi.org/10.26481/dis.20080918sr>

Rinaldi, F., Hanieh, P. N., Chan, L. K. N., Angeloni, L., Passeri, D., Rossi, M. ... Marianecchi, C. (2018). Chitosan glutamate-coated niosomes: A proposal for nose-to-brain delivery. *Pharmaceutics*, 10(2), 38. doi: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020038>

Rinaldi, F., Hanieh, P. N., Imbriano, A., Passeri, D., Del Favero, E., Rossi, M. ... Carafa, M. (2020). Different instrumental approaches to understand the chitosan coated niosomes/mucin interaction. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 55, 101339. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101339>

Rinaldi, F., Oliva, A., Sabatino, M., Imbriano, A., Hanieh, P. N., Garzoli, S. ... Carafa, M. (2020). Antimicrobial essential oil formulation: Chitosan coated nanoemulsions for nose to brain delivery. *Pharmaceutics*, 12(7), 678. doi: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070678>

Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 2866- 2887. doi: <https://doi.org/10.1021/jf026182t>

Rogerson, A. C. J. W. N. F. A. T., Cummings, J., Willmott, N. ve Florence, A. T. (1988). The distribution of doxorubicin in mice following administration in niosomes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 40(5), 337- 342. doi: <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1988.tb05263.x>

Roy, P., Mohanty, A. K., Dick, P. ve Misra, M. (2023). A review on the challenges and choices for food waste valorization: environmental and economic impacts. *American Chemical Society Environmental Au*, 3(2), 58- 75. doi: <https://doi.org/10.1021/acsenvironau.2c00050>

Sahin, N.O. (2007). Niosomes as nanocarrier systems. Mozafari, M.R. (Ed.). *Nanomaterials and nanosystems for biomedical applications* içinde (s. 67- 81). Springer, Dordrecht. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6289-6_4

Said, A. R., Arafa, M. F., El-Dakoury, W. A., Alshehri, S. ve El Maghraby, G. M. (2024). Bilosomes and niosomes for enhanced intestinal absorption and in vivo efficacy of cytarabine in treatment of Acute Myeloid Leukemia. *Pharmaceuticals*, 17(12), 1572. doi:

[10.3390/ph17121572](https://doi.org/10.3390/ph17121572)

Saleh, A., Pirouzifard, M. ve Almasi, H. (2022). Optimization and characterization of lippia citriodora essential oil loaded niosomes: a novel plant-based food nano preservative. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 650, 129480. doi:

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.129480>

Samed, N., Sharma, V. ve Sundaramurthy, A. (2018). Hydrogen bonded niosomes for encapsulation and release of hydrophilic and hydrophobic anti-diabetic drugs: an efficient system for oral anti-diabetic formulation. *Applied Surface Science*, 449, 567-573. doi:

<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.11.055>

Santana-Galvez, J. ve Jacobo-Velazquez, D. A. (2018). Classification of phenolic compounds. Nollet, L. M. L., ve Gutierrez-Urbe, J. A. (Ed.). *Phenolic compounds in food* içinde (s. 3- 20). West Lafayette: CRC press. doi: <https://doi.org/10.1201/9781315120157>

Saputra, Y. E., Dzakwan, M. ve Dewi, N. A. (2020, June). Evaluation nano-phytosome of myricetin with thin layer film hydration-sonication method. In *2nd Bakti Tunas Husada-Health Science International Conference (BTH-HSIC 2019)* (pp. 294-297). Atlantis Press. Erişim adresi: <https://www.atlantis-press.com/proceedings/bth-hsic-19/125941119>

Sarbishegi, M., Charkhat Gorgich, E. A., Khajavi, O., Komeili, G. ve Salimi, S. (2018). The neuroprotective effects of hydro-alcoholic extract of olive (*Olea europaea* L.) leaf on rotenone-induced Parkinson's disease in rat. *Metabolic Brain Disease*, 33(1), 79- 88. doi:

<https://doi.org/10.1007/s11011-017-0131-0>

Satoh, Y., Tajima, K., Munekata, M., Keasling, J. D. ve Lee, T. S. (2012). Engineering of L-tyrosine oxidation in Escherichia coli and microbial production of hydroxytyrosol. *Metabolic Engineering*, 14(6), 603- 610. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.08.002>

Satsu, H. (2017). Molecular and cellular studies on the absorption, function, and safety of food components in intestinal epithelial cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 81(3), 419- 425. doi: <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1259552>

Schlogl, A. E., Gonçalves, M. M., D'Onofre Couto, B., Batista, R. R., Estanislau, F. R., de Paula Gonçalves, L. ... Santos, I. J. B. (2025). Role of nanotechnology in food processing. Yadav, K. S. ve Kumari, A. (Ed.). *Nanobiotechnology in agri-food sector içinde* (s. 253- 281). Singapore: Springer Nature Singapore. doi: https://doi.org/10.1007/978-981-96-7756-6_12

Sellami, H., Khan, S. A., Ahmad, I., Alarfaj, A. A., Hirad, A. H. ve Al-Sabri, A. E. (2021). Green synthesis of silver nanoparticles using *Olea europaea* leaf extract for their enhanced antibacterial, antioxidant, cytotoxic and biocompatibility applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22), 12562. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms222212562>

Selli, S., Kelebek, H., Kesen, S. ve Sonmezdag, A. S. (2018). GC-MS olfactometric and LC-DAD-ESI-MS/MS characterization of key odorants and phenolic compounds in black dry-salted olives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(11), 4104- 4111. doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.8927>

Sengar, A. (2025). Innovations in drug delivery and advanced therapeutics. *Preprints*, 1- 9. doi: [10.20944/preprints202502.0156.v1](https://doi.org/10.20944/preprints202502.0156.v1)

Sengar, A., Saha, S., Sharma, L., Hemlata, Saindane, P. ve Sagar, S. D. (2024). Fundamentals of proniosomes: Structure & composition, and core principles. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 13(21), 1063- 1071. doi: [10.20959/wjpr202421-34352](https://doi.org/10.20959/wjpr202421-34352)

Sezgin-Bayindir, Z., Antep, M. N. ve Yüksel, N. (2015). Development and characterization of mixed niosomes for oral delivery using candesartan cilexetil as a model poorly water-soluble drug. *American Association of Pharmaceutical Scientist-pharmscitech*, 16, 108-117. doi: <https://doi.org/10.1208/s12249-014-0213-9>

Shaban, M., Mohamed, F. ve Abdallah, S. (2018). Production and characterization of superhydrophobic and antibacterial coated fabrics utilizing ZnO nanocatalyst. *Scientific Reports*, 8(1), 3925. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22324-7>

Shadloo, A., Peyvandi, K., Shojaeian, A. ve Shariat, S. (2024). How the designed processing parameters affect the liquid mixture density and viscosity of the tretinoin-loaded niosomes at different temperatures?. *Heliyon*, 10(18), e37925. doi: [10.1016/j.heliyon.2024.e37925](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e37925)

Shadloo, A., Peyvandi, K., Shojaeian, A. ve Shariat, S. (2025). Unveiling the power of CO₂ gas hydrates: Precise size control and enhanced drug encapsulation for next-generation Niosomes. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 64(24), 11665- 11680. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.5c00213>

Shafiepour, M., Razavi, S. H., Khanniri, E., Jahan, F. M., Nouri, M. ve Afraei, M. (2025). Nanocarriers for foods: A review of niosomes and proniosomes in bioactive compounds. *Food and Humanity*, 100623. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foohum.2025.100623>

Shah, J., Nair, A. B., Shah, H., Jacob, S., Shehata, T. M. ve Morsy, M. A. (2020). Enhancement in antinociceptive and anti-inflammatory effects of tramadol by transdermal proniosome gel. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(6), 786- 796. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2019.05.001>

Shahbazkhany, S., Salehi, M., Mousavi-Kamazani, M. ve Salarvand, Z. (2022). ZnO. 94MnO. 06O for adsorption and photo-degradation of methyl orange dye under visible irradiation: Kinetics and isotherms study. *Environmental Research*, 203, 111833. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111833>

Shahidi, F. ve Peng, H. (2018). Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds. *Journal of Food Bioactives*, 4, 11-68. doi: <https://doi.org/10.31665/JFB.2018.4162>

Shaker, M. S., Oppenheimer, J., Grayson, M., Stukus, D., Hartog, N., Hsieh, E. W. ... Greenhawt, M. (2020). COVID-19: Pandemic contingency planning for the allergy and immunology clinic. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 8(5), 1477-1488. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2020.03.012>

Sharafshadeh, M. S., Tafvizi, F., Khodarahmi, P. ve Ehtesham, S. (2023). Preparation and physicochemical properties of cisplatin and doxorubicin encapsulated by niosome alginate nanocarrier for cancer therapy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 235, 123686. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123686>

Sharma, P. K., Saxena, P., Jaswanth, A., Chalamaiah, M., Tekade, K. R. ve Balasubramaniam, A. (2016). Novel encapsulation of lycopene in niosomes and assessment of its anticancer activity. *Journal of Bioequivalence & Bioavailability*, 8, 224- 232. doi: [10.4172/JBB.1000300](https://doi.org/10.4172/JBB.1000300)

Sharma, P. K., Saxena, P., Jaswanth, A., Chalamaiah, M. ve Balasubramaniam, A. (2017). Anti-diabetic activity of lycopene niosomes: Experimental observation. *Journal of Pharmaceutics & Drug Development*, 4(1), 103. doi: [10.15744/2348-9782.4.103](https://doi.org/10.15744/2348-9782.4.103)

Sharma, R. B., Kashyap, D. ve Thakur, H. (2023). Updated review on proniosomal transdermal drug delivery system. *International Journal of Drug Development and Research*, 15(1), 989. Erişim adresi: <https://www.itmedicalteam.pl/articles/updated-review-on-proniosomal-transdermal-drug-delivery-system.pdf>

Sharma, S., Garg, A., Agrawal, R., Chopra, H. ve Pathak, D. (2024). A comprehensive review on niosomes as a tool for advanced drug delivery. *Pharmaceutical Nanotechnology*, 12(3), 206-228. doi: <https://doi.org/10.2174/2211738511666230726154557>

Shekade, M. S. V. (2021). Journal of pharmacy and experimental medicine. *Journal of Pharmacy and Experimental Medicine*. 1(1), 1- 5. doi: <http://dx.doi.org/10.51521/JPEM.2021.1106>

Shi, L., Zhao, W., Yang, Z., Subbiah, V. ve Suleria, H. A. R. (2022). Extraction and characterization of phenolic compounds and their potential antioxidant activities. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(54), 81112-81129. doi:

<https://doi.org/10.1007/s11356-022-23337-6>

Shukla, N. D. ve Tiwari, M. (2011). Proniosomal drug delivery system–clinical applications. *Intenational Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 2(3), 880-887.

Erişim adresi:

https://www.researchgate.net/publication/268365895_Proniosomal_Drug_Delivery_Systems_-_Clinical_Applications

Shruthi, P. A., Pushpadass, H. A., Franklin, M. E. E., Battula, S. N. ve Naik, N. L. (2020). Resveratrol-loaded proniosomes: Formulation, characterization and fortification. *Lwt*, 134, 110127. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110127>

Silva, A. F., Resende, D., Monteiro, M., Coimbra, M. A., Silva, A. M. ve Cardoso, S. M. (2020). Application of hydroxytyrosol in the functional foods field: From ingredient to dietary supplements. *Antioxidants*, 9(12), 1246. doi: <https://doi.org/10.3390/antiox9121246>

Silva, E. L., Carneiro, G., De Araújo, L. A., de Jesus, M., Trindade, V., Yoshida, M. I. ... Ferreira, L. A. M. (2015). Solid lipid nanoparticles loaded with retinoic acid and lauric acid as an alternative for topical treatment of acne vulgaris. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 15(1), 792-799. doi: <https://doi.org/10.1166/jnn.2015.9184>

Silva, P. I., Stringheta, P. C., Teofilo, R. F., ve De Oliveira, I. R. N. (2013). Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 538-544. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.08.039>

Silva, P. M., Gonçalves, C., Pastrana, L. M., Coimbra, M. A., Vicente, A. A. ve Cerqueira, M. A. (2023). Recent advances in oral delivery systems of resveratrol: Foreseeing their use in functional foods. *Food & Function*, 14(23), 10286-10313. doi: [10.1039/D3FO03065B](https://doi.org/10.1039/D3FO03065B)

Singh, J., Parvate, S., Vennapusa, J. R., Maiti, T. K., Dixit, P. ve Chattopadhyay, S. (2022). Facile method to prepare 1-dodecanol@ poly (melamine-paraformaldehyde) phase change energy storage microcapsules via surfactant-free method. *Journal of Energy Storage*, 49, 104089. doi: <https://doi.org/10.1016/j.est.2022.104089>

Soares, T. F., Alves, R. C. ve Oliveira, M. B. P. P. (2024). From olive oil production to by-products: Emergent technologies to extract bioactive compounds. *Food Reviews International*, 40(10), 3342-3369. doi: <https://doi.org/10.1080/87559129.2024.2354331>

Soleimanifard, M., Sadeghi Mahoonak, A., Sepahvand, A., Heydari, R. ve Farhadi, S. (2019). Spanish olive leaf extract-loaded nanostructured lipid carriers: Production and physicochemical characterization by Zetasizer, FT-IR, DTA/TGA, FE-SEM and XRD. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(7), e13994. doi: <https://doi.org/10.1111/jfpp.13994>

SpecialChem. (2025). *Crosslinking in polymers*. Polymer Additives Tech Library. Erişim adresi: <https://www.specialchem.com/polymer-additives/guide/crosslinking>

Stergiou, A., Binou, P., Igoumenidis, P. E., Chiou, A., Yannakopoulou, K. ve Karathanos, V. T. (2022). Host–guest inclusion complexes of hydroxytyrosol with cyclodextrins: Development of a potential functional ingredient for food application. *Journal of Food Science*, 87(6), 2678-2691. doi: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16165>

Stout, K. J. (1981). Surface roughness~ measurement, interpretation and significance of data. *Materials & Design*, 2(5), 260-265. doi: [https://doi.org/10.1016/0261-3069\(81\)90069-8](https://doi.org/10.1016/0261-3069(81)90069-8)

Subramanian, P. (2021). Lipid-based nanocarrier system for the effective delivery of nutraceuticals. *Molecules*, 26(18), 5510. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26185510>

Subroto, E., Andoyo, R. ve Indiarto, R. (2023). Solid lipid nanoparticles: review of the current research on encapsulation and delivery systems for active and antioxidant compounds. *Antioxidants*, 12(3), 633. doi: <https://doi.org/10.3390/antiox12030633>

Suk, J. S., Xu, Q., Kim, N., Hanes, J. ve Ensign, L. M. (2016). PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 99, 28-51. doi: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.012>

Sun, J., Mu, Q., Kimura, H., Murugadoss, V., He, M., Du, W. ve Hou, C. (2022). Oxidative degradation of phenols and substituted phenols in the water and atmosphere: A review. *Advanced Composites and Hybrid Materials*, 5(2), 627-640. doi: <https://doi.org/10.1007/s42114-022-00435-0>

Suryawanshi, S. S., Patil, P. P., Gaikwad, R. G., Mali, S. S. ve Pol, S. L. (2021). Proniosomes: Modern drug delivery system. *Pharmaceutical Resonance*, 4(1), 41-56. doi: [10.25258/ijddt.14.3.93](https://doi.org/10.25258/ijddt.14.3.93)

Swiss Bork. (t.y.). *Swiss Bork mag 5x 30 kapsül*. Swiss Bork web sitesi. Erişim tarihi: 24 Ağustos 2025. <https://swissbork.com.tr/urun/swiss-bork-mag-5x-30-kapsul/>

Szabo, K., Teleky, B. E., Ranga, F., Simon, E., Pop, O. L., Babalau-Fuss, V. ... Vodnar, D. C. (2021). Bioaccessibility of microencapsulated carotenoids, recovered from tomato processing industrial by-products, using in vitro digestion model. *Lwt*, 152, 112285. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112285>

Szente, L., Sohajda, T. ve Fenyvesi, E. (2021). Encapsulation for masking off-flavor and off-tasting in food production. T. M. Ho ve diğerleri (Ed.). *Functionality of cyclodextrins in encapsulation for food applications* içinde (s. 223- 253). Cham, Switzerland: Springer Nature Switzerland AG. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-030-80056-7_12

Tabar, M. N., Nateghi, L., Ravan, M. H. ve Rashidi, L. (2025). Encapsulation of walnut husk and pomegranate peel extracts by alginate and chitosan-coated nanoemulsions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 301, 140349. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.140349>

Thabet, Y., Elsabahy, M. ve Eissa, N. G. (2022). Methods for preparation of niosomes: A focus on thin-film hydration method. *Methods*, 199, 9-15. doi:

<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2021.05.004>

Tarchi, I., Olewnik-Kruszkowska, E., Aït-Kaddour, A. ve Bouaziz, M. (2025). Innovative process for the recovery of oleuropein-rich extract from olive leaves and its biological activities: Encapsulation for activity preservation with concentration assessment pre and post encapsulation. *ACS Omega*, 10(6), 6135-6146. doi: <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c10858>

Targhi, A. A., Moammeri, A., Jamshidifar, E., Abbaspour, K., Sadeghi, S., Lamakani, L. ... Akbarzadeh, I. (2021). Synergistic effect of curcumin-Cu and curcumin-Ag nanoparticle loaded niosome: Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities. *Bioorganic Chemistry*, 115, 105116. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105116>

Tang, J., Wang, J., Gong, P., Zhang, H., Zhang, M., Qi, C. ... Chen, W. (2024). Biosynthesis and biotechnological synthesis of hydroxytyrosol. *Foods*, 13(11), 1694. doi:

<https://doi.org/10.3390/foods13111694>

Targhi, A. A., Moammeri, A., Jamshidifar, E., Abbaspour, K., Sadeghi, S., Lamakani, L. ve Akbarzadeh, I. (2021). Synergistic effect of curcumin-Cu and curcumin-Ag nanoparticle loaded niosome: Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities. *Bioorganic Chemistry*, 11(1), 1-8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105116>

Tayebi, N. ve Polycarpou, A. A. (2004). Modeling the effect of skewness and kurtosis on the static friction coefficient of rough surfaces. *Tribology International*, 37(6), 491-505. doi:

<https://doi.org/10.1016/j.triboint.2003.11.010>

Taymouri, S. ve Varshosaz, J. (2016). Effect of different types of surfactants on the physical properties and stability of carvedilol nano-niosomes. *Advanced Biomedical Research*, 5(1), 48. doi: [10.4103/2277-9175.178781](https://doi.org/10.4103/2277-9175.178781)

Tavakoli, H., Hosseini, O., Jafari, S. M. ve Katouzian, I. (2018). Evaluation of physicochemical and antioxidant properties of yogurt enriched by olive leaf phenolics within nanoliposomes. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 66(35), 9231-9240. doi:

<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02759>

Tavano, L., Muzzalupo, R., Mauro, L., Pellegrino, M., Ando, S. ve Picci, N. (2013). Transferrin-conjugated pluronic niosomes as a new drug delivery system for anticancer therapy. *Langmuir*, 29(41), 12638-12646. doi: <https://doi.org/10.1021/la4021383>

Teaima, M. H., Gebril, M. I., Abd Allah, F. I. ve El-Nabarawi, M. A. (2022). Niosomes versus proniosomes as promising drug delivery systems in treatment of diabetes mellitus. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 14(5), 32-40. doi: [10.22159/ijap.2022v14i5.44039](https://doi.org/10.22159/ijap.2022v14i5.44039)

Termopoli, V., Piergiovanni, M., Cappiello, A., Palma, P. ve Famiglini, G. (2021). Tyrosol and hydroxytyrosol determination in extra virgin olive oil with direct liquid electron ionization-tandem mass spectrometry. *Separations*, 8(10), 173. doi:

<https://doi.org/10.3390/separations8100173>

Teron, C., Bhuyan, A., Saikia, P., Dutta, S. R., Gogoi, H. ve Rongpi, S. (2024). A Comprehensive Review on Niosomes in Drug Delivery and Recent Advancements. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 14(9), 262- 273. doi: <https://doi.org/10.22270/jddt.v14i6.6651>

Thakur, R., Anwer, M. K., Shams, M. S., Ali, A., Khar, R. K., Shakeel, F. ve Taha, E. I. (2009). Proniosomal transdermal therapeutic system of losartan potassium: development and pharmacokinetic evaluation. *Journal of Drug Targeting*, 17(6), 442- 449. doi:

<https://doi.org/10.1080/10611860902963039>

Thongpon, P., Intuyod, K., Pongking, T., Priprem, A., Chomwong, S., Tanasuka, P. ... Pinlaor, S. (2025). Curcumin-loaded maltodextrin-based proniosomes potentially effective against gemcitabine-resistant cholangiocarcinoma. *ACS Applied Bio Materials*, 8(1), 913- 930. doi:

<https://doi.org/10.1021/acsabm.4c01832>

Toprakçı, İ., Cosgun, G., Balci-Torun, F., Torun, M. ve Şahin, S. (2024). Preservation of active components in olive leaf extract by spray drying method in biodegradable polymers: Optimization, in vitro gastrointestinal digestion and application. *Phytochemical Analysis*, 35(8), 1757-1770. doi: <https://doi.org/10.1002/pca.3222>

Tresserra-Rimbau, A., Lamuela-Raventos, R. M. ve Moreno, J. J. (2018). Polyphenols, food and pharma. Current knowledge and directions for future research. *Biochemical Pharmacology*, 156, 186-195. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.07.050>

Tsimidou, M. Z. (2022). A critical appraisal of the separation protocols proposed for the implementation of the health claim on “olive oil polyphenols”(EC regulation 432/2012). *Separations*, 9(11), 351. doi: <https://doi.org/10.3390/separations9110351>

Tsimidou, M. Z., Sotiropoulou, M., Mastralexi, A., Nenadis, N., García-González, D. L. ve Gallina Toschi, T. (2019). In house validated UHPLC protocol for the determination of the total hydroxytyrosol and tyrosol content in virgin olive oil fit for the purpose of the health claim introduced by the EC Regulation 432/2012 for “Olive oil polyphenols”. *Molecules*, 24(6), 1044. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules24061044>

Tu, J. L. ve Yuan, J. J. (2018). Thermal decomposition behavior of hydroxytyrosol (HT) in nitrogen atmosphere based on TG-FTIR methods. *Molecules*, 23(2), 404. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules23020404>

Uchegbu, I. F. ve Florence, A. T. (1995). Non-ionic surfactant vesicles (niosomes): physical and pharmaceutical chemistry. *Advances in Colloid and Interface Science*, 58(1), 1-55. doi: [https://doi.org/10.1016/0001-8686\(95\)00242-1](https://doi.org/10.1016/0001-8686(95)00242-1)

Uchegbu, I. F. ve Vyas, S. P. (1998). Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 172(1-2), 33- 70. doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(98\)00169-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(98)00169-0)

Umbarkar, M. G. (2021). Niosome as a novel pharmaceutical drug delivery: A brief review highlighting formulation, types, composition and application. *Indian Journal of Pharmaceutical Education & Research*, 55(1), 11- 28. doi: [10.5530/IJPER.55.1S.34](https://doi.org/10.5530/IJPER.55.1S.34)

Upadhye, S. ve Rafik, I. N. (2020). Proniosomes: A novel vesicular drug delivery system. *American Journal Pharmtech Research*, 10(2), 260-73. doi: <http://dx.doi.org/10.46624/ajptr.2020.v10.i2.019>.

Upadhyay, S. ve Dixit, M. (2015). Role of polyphenols and other phytochemicals on molecular signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015(1), 504253. doi: <https://doi.org/10.1155/2015/504253>

Valor, D., Montes, A., Calderon-Dominguez, M., Aghziel, I., Sanchez-Gomar, I., Alcala, M., ... Pereyra, C. (2023). Generation of highly antioxidant submicron particles from *Myrtus communis* leaf extract by supercritical antisolvent extraction process. *Antioxidants*, 12(2), 530. doi: <https://doi.org/10.3390/antiox12020530>

Van de Hulst, H. C., Raimond, E. ve Van Woerden, H. (1957). Rotation and density distribution of the Andromeda nebula derived from observations of the 21-cm line. *Bulletin of the Astronomical Institutes of the Netherlands*, 14 (480), 1. Erişim adresi: <https://adsabs.harvard.edu/full/1957BAN....14....1V>

Van Den Dool, H. A. N. D. ve Kratz, P. D. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*. 11, 463- 471. doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)80947-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)80947-X)

Vanlalveni, C., Lallianrawna, S., Biswas, A., Selvaraj, M., Changmai, B. ve Rokhum, S. L. (2021). Green synthesis of silver nanoparticles using plant extracts and their antimicrobial activities: A review of recent literature. *RSC Advances*, 11(5), 2804- 2837. doi: [10.1039/D2RA90055F](https://doi.org/10.1039/D2RA90055F)

Varenne, F., Coty, J. B., Botton, J., Legrand, F. X., Hillaireau, H., Barratt, G. ve Vauthier, C. (2019). Evaluation of zeta potential of nanomaterials by electrophoretic light scattering: Fast field reversal versus Slow field reversal modes. *Talanta*, 205, 120062. doi:

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.06.062>

VeNatura. (t.y.). *Lipozomal demir ve vitamin C kapsül*. VeNatura web sitesi. Erişim tarihi: 24 Ağustos 2025. <https://venatura.com.tr/urunler/lipozomal-urunler/lipozomal-demir-ve-vitamin-c-kapsul/>

Verma, P., Prajapati, S. K., Yadav, R., Senyschyn, D., Shea, P. R. ve Trevaskis, N. L. (2016). Single intravenous dose of novel flurbiprofen-loaded proniosome formulations provides prolonged systemic exposure and anti-inflammatory effect. *Molecular pharmaceutics*, 13(11), 3688- 3699. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00504>

Vermerris, W. ve Nicholson, R. (2007). Chemical properties of phenolic compounds. *Phenolic compound biochemistry* içinde (s. 35- 61). Berlin/ Heidelberg, Germany: *Springer Science & Business Media*. doi: <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5164-7>

Vora, B., Khopade, A. J. ve Jain, N. K. (1998). Proniosome based transdermal delivery of levonorgestrel for effective contraception. *Journal of Controlled Release*, 54(2), 149-165. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(97\)00100-4](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(97)00100-4)

Vuolo, M. M., Lima, V. S. ve Junior, M. R. M. (2019). Phenolic compounds: Structure, classification, and antioxidant power. Campos, M. R. S. (Ed.). *Bioactive compounds health benefits and potential applications* içinde (s. 33- 50). Sawston: Cambrigde, *Woodhead Publishing*. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00002-5>

Waddad, A. Y., Abbad, S., Yu, F., Munyendo, W. L., Wang, J., Lv, H. ve Zhou, J. (2013). Formulation, characterization and pharmacokinetics of Morin hydrate niosomes prepared from various non-ionic surfactants. *International Journal of Pharmaceutics*, 456(2), 446-458. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.08.040>

Wadhwa, P., Sharma, S., Sahu, S., Sharma, A. ve Kumar, D. (2022). A review of nanoparticles characterization techniques. *Current Nanomaterials*, 7(3), 202- 214. doi:

<https://doi.org/10.2174/2405461507666220405113715>

Walker, R., Decker, E. A. ve McClements, D. J. (2015). Development of food-grade nanoemulsions and emulsions for delivery of omega-3 fatty acids: Opportunities and obstacles in the food industry. *Food & Function*, 6(1), 41-54. doi: [10.1039/C4FO00723A](https://doi.org/10.1039/C4FO00723A)

Walters, M., Al Aani, S., Esteban, P. P., Williams, P. M. ve Oatley-Radcliffe, D. L. (2020). Laser Doppler electrophoresis and electro-osmotic flow mapping for the zeta potential measurement of positively charged membrane surfaces. *Chemical Engineering Research and Design*, 159, 468- 476. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2020.04.022>

Walve, J. R., Rane, B. R., Gujrathi, N. A., Bakaliwal, S. R. ve Pawar, S. P. (2011). Proniosome: A surrogated carrier for improved transdermal drug delivery system. *International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy*, 2(3), 743- 750. Erişim adresi: https://www.ijrap.net/admin/php/uploads/495_pdf.pdf

Wang, D. Y., Van der Mei, H. C., Ren, Y., Busscher, H. J. ve Shi, L. (2020). Lipid-based antimicrobial delivery-systems for the treatment of bacterial infections. *Frontiers in Chemistry*, 7, 872. doi: <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00872>

Wang, Y., Luo, S., Luo, J., Qu, J., Feng, S., Chen, T. ... Ding, C. (2021). Preparation of hydroxytyrosol by acid hydrolysis from olive leaves. *Separations*, 8(9), 159. doi: <https://doi.org/10.3390/separations8090159>

Wani, T. A., Masoodi, F. A., Akhter, R., Akram, T., Gani, A. ve Shabir, N. (2022). Nanoencapsulation of hydroxytyrosol in chitosan crosslinked with sodium bisulfate tandem ultrasonication: Techno-characterization, release and antiproliferative properties. *Ultrasonics Sonochemistry*, 82, 105900. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105900>

Weatherall, I. L. ve Coombs, B. D. (1992). Skin color measurements in terms of CIELAB color space values. *Journal of Investigative Dermatology*, 99(4), 468- 473. doi:

<https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12616156>

Weiss, J., Takhistov, P. ve McClements, D. J. (2006). Functional materials in food nanotechnology. *Journal of Food Science*, 71(9), R107- R116. doi:

<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00195.x>

Wongsa, P., Phatikulrungsun, P. ve Prathumthong, S. (2022). FT-IR characteristics, phenolic profiles and inhibitory potential against digestive enzymes of 25 herbal infusions. *Scientific Reports*, 12(1), 6631. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10669-z>

Wu, J., Zhu, Z., Liu, W., Zhang, Y., Kang, Y., Liu, J. ... Shao, L. (2022). How nanoparticles open the paracellular route of biological barriers: mechanisms, applications, and prospects. *ACS nano*, 16(10), 15627- 15652. doi: <https://doi.org/10.1021/acsnano.2c05317>

Wulff-Perez, M., Torcello-Gomez, A., Galvez-Ruiz, M. J. ve Martin-Rodriguez, A. (2009). Stability of emulsions for parenteral feeding: Preparation and characterization of o/w nanoemulsions with natural oils and Pluronic f68 as surfactant. *Food Hydrocolloids*, 23(4), 1096- 1102. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.09.017>

Xu, G. ve Blum, F. D. (2008). Surfactant-enhanced free radical polymerization of styrene in emulsion gels. *Polymer*, 49(15), 3233- 3238. doi:

<https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.05.019>

Yao, Q., Shen, Y., Bu, L., Yang, P., Xu, Z. ve Guo, X. (2019). Ultrasound-assisted aqueous extraction of total flavonoids and hydroxytyrosol from olive leaves optimized by response surface methodology. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 49(9), 837- 845. doi:

<https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1630648>

Yan, Z., Yang, K., Tang, X., Bi, Y., Ding, Y., Deng, M. ... Chen, T. (2022). Norcantharidin nanostructured lipid carrier (NCTD-NLC) suppresses the viability of human hepatocellular

carcinoma HepG2 cells and accelerates the apoptosis. *Journal of Immunology Research*, 2022(1), 3851604. doi: <https://doi.org/10.1155/2022/3851604>

Yasamineh, S., Yasamineh, P., Kalajahi, H. G., Gholizadeh, O., Yekanipour, Z., Afkhami, H. ... Dadashpour, M. (2022). A state-of-the-art review on the recent advances of niosomes as a targeted drug delivery system. *International journal of pharmaceutics*, 624, 121878. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121878>

Ye, Q., Georges, N. ve Selomulya, C. (2018). Microencapsulation of active ingredients in functional foods: From research stage to commercial food products. *Trends in Food Science & Technology*, 78, 167- 179. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.025>

Yu, W. Y., Yang, Y. M. ve Chang, C. H. (2005). Cosolvent effects on the spontaneous formation of vesicles from 1: 1 anionic and cationic surfactant mixtures. *Langmuir*, 21(14), 6185- 6193. doi: <https://doi.org/10.1021/la046984d>

Yuan, J. J., Qin, F. G., Tu, J. L. ve Li, B. (2017). Preparation, characterization, and antioxidant activity evaluation of liposomes containing water-soluble hydroxytyrosol from olive. *Molecules*, 22(6), 870. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules22060870>

Yuksel, N., Bayindir, Z. S., Aksakal, E. ve Ozcelikay, A. T. (2016). In situ niosome forming maltodextrin proniosomes of candesartan cilexetil: *In vitro* and *in vivo* evaluations. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, 453- 463. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.019>

Zabot, G. L., Schaefer Rodrigues, F., Polano Ody, L., Vinícius Tres, M., Herrera, E., Palacin, H. ... Olivera-Montenegro, L. (2022). Encapsulation of bioactive compounds for food and agricultural applications. *Polymers*, 14(19), 4194. doi: <https://doi.org/10.3390/polym14194194>

Zafra-Gomez, A., Luzon-Toro, B., Capel-Cuevas, S. ve Morales, J. C. (2011). Stability of hydroxytyrosol in aqueous solutions at different concentration, temperature and with different ionic content: a study using UPLC-MS. *Food and Nutrition Sciences*, 2(10):1- 7. doi: [10.4236/fns.2011.210149](https://doi.org/10.4236/fns.2011.210149)

Zarei, M., Norouzian, D., Honarvar, B., Mohammadi, M., Shamabadi, H. E. ve Akbarzadeh, A. (2013). Paclitaxel loaded niosome nanoparticle formulation prepared via reverse phase evaporation method: an in vitro evaluation. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, 16(6), 295- 298. doi: <https://doi.org/10.3923/pjbs.2013.295.298>

Zeb, A. (2021). Metabolism of phenolic antioxidants. *Phenolic antioxidants in foods: Chemistry, biochemistry and analysis* içinde (s. 333- 383). Cham, Switzerland: Springer Nature Switzerland AG 2021. doi: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-74768-8>

Zhang, J., Tang, Q., Xu, X. ve Li, N. (2013). Development and evaluation of a novel phytosome-loaded chitosan microsphere system for curcumin delivery. *International journal of pharmaceutics*, 448(1), 168- 174. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.03.021>

Zhang, Y., Cai, P., Cheng, G. ve Zhang, Y. (2022). A brief review of phenolic compounds identified from plants: Their extraction, analysis, and biological activity. *Natural Product Communications*, 17(1), 1- 14. doi: <https://doi.org/10.1177/1934578X211069721>

Zhao, F., Wang, P., Lucardi, R. D., Su, Z. ve Li, S. (2020). Natural sources and bioactivities of 2, 4-di-tert-butylphenol and its analogs. *Toxins*, 12(1), 35. doi: <https://doi.org/10.3390/toxins12010035>

Zhu, B., Xia, M., Ding, Z., Rong, X. ve Mei, X. (2023). Enhancing physical and chemical stability of hygroscopic hydroxytyrosol by cocrystal formation. *International Journal of Pharmaceutics*, 646, 123470. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.123470>

Zidan, A. S., Mokhtar Ibrahim, M. ve Megrab, N. A. E. (2017). Optimization of methotrexate loaded niosomes by Box–Behnken design: An understanding of solvent effect and formulation variability. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 43(9), 1450- 1459. doi: <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1318907>

Zimmermann, Y. S., Shahgaldian, P., Corvini, P. F., & Hommes, G. (2011). Sorption-assisted surface conjugation: a way to stabilize laccase enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(1), 169- 178. doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3534-6>

Ziosi, P., Paolucci, C., Santarelli, F., Tabanelli, T., Passeri, S., Cavani, F. ve Righi, P. (2018). A two-step process for the synthesis of hydroxytyrosol. *Chemistry-Sustainability-Energy-Materials*, 11(13), 2202- 2210. doi: <https://doi.org/10.1002/cssc.20180068>

