

BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OZONLANMIŞ YAĞ NANOEMÜLSİYONLARININ SENTEZİ VE
KARAKTERİZASYONU

NANOTEKNOLOJİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FÜSUN KAZANCI

ARALIK 2017

BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OZONLANMIŞ YAĞ NANOEMÜLSİYONLARININ SENTEZİ VE
KARAKTERİZASYONU

NANOTEKNOLOJİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FÜSUN KAZANCI

DANIŞMAN: Doç. Dr. Seda TIĞLI AYDIN

ZONGULDAK

Aralık 2017

KABUL:

Fusun KAZANCI tarafından hazırlanan “Ozonlanmış Yağ Nanoemülsiyonlarının Sentezi ve Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanoteknoloji Mühendisliği Anabilim Dalında Yüksek Lisans olarak oybirliğiyle kabul edilmiştir. 28/12/2017

Danışman: Doç. Dr. R. Seda TIĞLI AYDIN

Bülent Ecevit Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü

Üye: Yrd. Doç. Dr. Barış AVAR

Bülent Ecevit Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü

Üye: Yrd. Doç. Dr. Sema ALLI

Düzce Üniversitesi, Teknoloji Fakültesi, Polimer Mühendisliği Bölümü

ONAY:

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

....../....../2017

Doç. Dr. Ahmet ÖZARSLAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”


Füsun KAZANCI

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

OZONLANMIŞ YAĞ NANOEMÜLSİYONLARININ SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU

Fusun KAZANCI

Bülent Ecevit Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Nanoteknoloji Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Seda TIĞLI AYDIN

Aralık 2017, 73 sayfa

Ozon reaktif bir molekül olup, sulu ortamlarda parçalanarak oksijene dönüşmektedir. Klinik uygulamalarda yüksek konsantrasyonlarda dezenfeksiyon amaçlı, düşük konsantrasyonlarda da yara iyileşmesi ve epitelizasyonun hızlandırılmasında kullanılmaktadır. Ozon yağı (ozonla zenginleştirilmiş yağ formu) kullanımı son yıllarda tıbbi uygulamalarda tercih edilmektedir. Bu tercihin en önemli sebepleri arasında ozonun yüksek reaktivite göstermesi ve doymamış yağ asitleri ile oluşturdukları bileşikleri sayesinde hücre içi sinyal sistemine etki etmesidir. Ozon yağı formu topikal olarak ozonoterapinin uygulanmasını kolaylaştırdığı, bu sayede kutanöz ve mukozal kronik enfekte alanları tedavi edilebildiği yapılan araştırmalar sonucu bilinmektedir.

Bu Yüksek Lisans tez çalışması 2015-39971044-01 numaralı Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi projesi ile desteklenmiştir. Sunulan tez çalışmasının amacı, emülsiyon dönüşüm noktası (EIP) yöntemi kullanılarak, ozonlanmış zeytinyağı

ÖZET (devam ediyor)

nanoemülsiyon sisteminin sentezlenmesi ve nanoemülsiyon üretim parametrelerinin incelenmesidir. Nanoemülsiyon sentezinde kullanılan yağ, sürfaktan ve su oranları optimize edilmiştir. Bununla beraber, sürfaktan-yağ oranı, sürfaktan konsantrasyonu ve tipi, ve karıştırma oranının nanoemülsiyon oluşturma mekanizmasına etkileri incelenmiştir. Elde edilen nanoemülsiyonlarda (~212.7 nm) yüksek stabilite, yüzey aktif madde olarak tween 40 kullanılarak 750 rpm'de üretilbildiği tespit edilmiştir. Elde edilen nanoemülsiyonların *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli*'ye karşı antibakteriyel etkisi değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Nanoemülsiyon, Ozon, Ozon Yağı, Antibakteriyel Etki.

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF OZONATED OIL NANOEMULSIONS

Füsun KAZANCI

Bülent Ecevit University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Nanotechnology Engineering

Thesis Advisor: Assoc. Prof. Dr. Seda TIĞLI AYDIN

December 2017, 73 pages

Ozone is a reactive molecule that breaks down in aqueous media into oxygen. It is used for disinfection in high concentrations in clinical applications and in accelerating wound healing and epithelization in low concentrations. The use of ozonated oil (ozone-enriched fat form) has been preferred in medical practice in recent years. The most important reasons for this preference are the high reactivity of the ozone and its effect on the intracellular signal system due to the compounds they form with unsaturated fatty acids. It is known that the ozone layer facilitates topical application of ozonotherapy, which can treat cutaneous and mucosal chronic infected areas.

This M.Sc. thesis was financially supported by Bülent Ecevit University, Scientific Research Project number: 2015-39971044-02. The main purpose of this thesis is to synthesize the ozonated olive oil nanoemulsion system and examine the nanoemulsion production parameters using the emulsion inversion point (EIP) method. The oil, surfactant and water

ABSTRACT (continued)

ratios used in the synthesis of nanomemulsion are optimized. However, the effects of surfactant-to-oil ratio, surfactant concentration and type, and mixing ratio on the mechanism of nanoemulsion formation have been examined. It has been found that high stability in the obtained nanoemulsions (~ 212.7 nm) can be produced at 750 rpm using tween 40 as surfactant. Antibacterial effects of the obtained nanoemulsions against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were evaluated.

Keywords: Nanoemülsiyon, Ozon, Ozonated Oil, Antibacteial Effects



TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince her zaman tüm bilgi ve desteğiyle yanımda olan, çalışmalarım konusunda beni yönlendirip, gerektiğinde motive eden ve tüm yüksek lisans öğrenimim boyunca bana çok değerli katkılarda bulunan Sayın danışman hocam Doç. Dr. Seda TIĞLI AYDIN'a sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi yüksek lisans öğrenimim boyunca desteklerini benden esirgemeyen, sevgilerini hep hissettiren, annem İnci ÖZ ve babam Mithat ÖZ'e sevgi, saygı ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım sırasında tüm zorlukları benimle birlikte yaşayan, maddi ve manevi tüm desteklerini benden esirgemeyen, sevgisini hiçbir zaman esirgemeyen değerli eşim Oğuzhan KAZANCI'ya sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak; varlığıyla bana güç veren, en büyük dayanağım canım kızım Hira KAZANCI'ya teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvii
 BÖLÜM 1 Giriş	 1
 BÖLÜM 2 OZON	 3
 2.1 OZONLU YAĞLAR	 5
2.2 OZONUN MEDİKAL ALANDA KULLANIMI	7
 BÖLÜM 3 NANOTEKNOLOJİ	 11
 3.1 NANOTEKNOLOJİNİN TARİHÇESİ.....	 11
3.2 NANOPARTİKÜL	12
3.3 NANOEMÜLSİYON	13
3.4 NANOEMÜLSİYONLARDA FİZİKSEL YAPI VE KARARLILIK	18
3.4.1 Ostwald Damlacık Büyümesi	18
3.4.2 Koalesans	19
3.4.3 Kremalaşma- Sedimentasyon.....	19
3.4.4 Flokülasyon.....	19
3.4.5 Faz Değişimi	19
3.5 GÖRÜNÜM.....	20

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

Sayfa

3.6 KİMYASAL YAPI VE KARARLILIK	21
3.7 NANOEMÜLSİYONUN AVANTAJLARI VE DEZAVANTAJLARI.....	21
 BÖLÜM 4 NANOEMÜLSİYONLARIN HAZIRLANMASI.....	 23
4.1 YÜKSEK ENERJİ GEREKTİREN YÖNTEMLER	24
4.2 DÜŞÜK ENERJİ GEREKTİREN YÖNTEMLER	25
4.2.1 Faz Dönüşüm Sıcaklığı Yöntemi (PIT)	26
4.2.2 Katastrofik Faz Ters Çevirme (CPI) veya Emülsiyon Dönüşüm Noktası (EIP)	27
 BÖLÜM 5 NANOEMÜLSİYONLARIN MEDİKAL ALANDA KULLANIMI	 31
5.1 KOZMETİK	31
5.2 ANTİMİKROBİYEL NANOEMÜLSİYONLAR	32
5.3 MUKOZAL AŞI OLARAK NANOEMÜLSİYONLAR	32
5.4 HÜCRE KÜLTÜR TEKNOLOJİSİNDE NANOEMÜLSİYONLAR.....	32
5.5 KANSER TEDAVİSİNDE VE HEDEFLenen İLAÇ DAĞITIMINDA NANOEMÜLSİYON	33
5.6 ÇEŞİTLİ HASTALIK DURUMLARININ TEDAVİSİNDE NANOEMÜLSİYON	35
5.7 AZ ÇÖZÜNEN İLAÇLARIN ORAL ALIM İÇİN NANOEMÜLSİYON FORMÜLASYONLARI İLE İYİLEŞTİRİLMESİ	36
5.8 TRANSDERMAL AKTARIM İÇİN NANOEMÜLSİYONLARIN KULLANIMI	37
 BÖLÜM 6 DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	 39
6.1 EMÜLSİYON HAZIRLAMA.....	39
6.1.1 İncelenen Özellikler	39
6.1.1.1 Sor Oranı Etkisi	40
6.1.1.2 Sürfaktan Konsantrasyonu Etkisi	40
6.1.1.3 Karıştırma Hızı Etkisi.....	40
6.1.1.4 Sürfaktan Tipi Etkisi	40

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
6.2 EMÜLSİYON KARAKTERİZASYONU	41
6.2.1 Termodinamik Stabilite	41
6.2.1.1 Isıtma Soğutma Döngüsü	41
6.2.1.2 Santrifüjleme	41
6.2.1.3 Dondurarak Çözülme Döngüsü	41
6.2.2 Partikül Büyüklüğü	41
6.2.3 Zeta Potansiyel.....	42
6.2.4 Kinetik Stabilite- Kremleşme Testi	42
6.2.5 Sıcaklık Kontrollü Stabilite- pH ve Viskozite Ölçümleri	42
6.2.6 Partikül Büyüklüğü ve Morfoloji.....	43
6.2.7 ¹³ C- NMR Analizi.....	43
6.2.8 Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR)	43
6.2.9 Antimikrobiyal Aktivite Testi- Zon Testi	43
6.2.10 İstatiksel Analiz	44
 BÖLÜM 7 BULGULAR VE TARTIŞMALAR.....	 49
 7.1 OZONLANMIŞ YAĞ SİSTEMLERİNİN HAZIRLANMASI	 49
7.2 TERMODİNAMİK STABİLİTE	49
7.3 PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜ, DAĞILIM VE ZETA POTANSİYELİ	50
7.3.1 Sürfaktan- Yağ Oranının (SOR) Etkileri	50
7.3.2 Karıştırma Hızının Etkisi	51
7.3.3 Yüzey Aktif Madde Türünün Etkisi	52
7.4 DEPOLAMA, KİNETİK VE SICAKLIK STABİLİTESİ	53
7.5 MORFOLOJİK VE YAPISAL DEĞERLENDİRME.....	59
7.5 ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTE	62
 BÖLÜM 8 SONUÇLAR.....	 65
 KAYNAKLAR.....	 69
ÖZGEÇMİŞ	73



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 Ozonun Lewis yapısı.....	4
Şekil 2.2 Ozonun doymamış yağ asitleri ile reaksiyonu, Criegee Mekanizması	6
Şekil 3.1 Yağ ve su miselleri.....	13
Şekil 3.2 Yağ / su nanoemülsiyon sistemindeki parçacıkların çekirdek-kabuk yapısının şematik gösterimi.....	13
Şekil 3.3 Tween 40'ın molekül yapısı.....	16
Şekil 3.4 Tween 80'in molekül yapısı	16
Şekil 3.5 Nanoemülsiyon sistemlerinin serbest enerjisinin şematik diyagramı	17
Şekil 3.6. Kinetik olarak kararlı nanoemülsiyonların şematik diyagramı.....	18
Şekil 3.7 Nanoemülsiyonların bozunma mekanizmaları	20
Şekil 4.1 Yağ/ su nanoemülsiyonlarının hazırlanması için yüksek enerjili ve düşük enerjili yöntemlere genel bakış	24
Şekil 4.2 Pıt yöntemi kullanılarak nanoemülsiyon hazırlanması	27
Şekil 4.3 EIP yönteminin uygulanışı sırasında sistemin lamellar sıvı kristal/veya sünger tip mikroemülsiyon fazından geçişi	28
Şekil 7.1 Formüle edilmiş ozonlanmış yağ nanoemülsiyonlarının pH değerleri ve sıcaklık kararlılığı.....	55
Şekil 7.2 Formüle edilmiş ozonlanmış yağ nanoemülsiyonlarının viskozite değerleri ve sıcaklık kararlılığı	57
Şekil 7.3 F6 nanoemülsiyonlarının SEM görüntüleri (a) (x100.000), (b) 30 gün sonra (x100.000).....	59
Şekil 7.4 Zeytinyağı, ozonlanmış yağ nanoemülsiyonu ve 30. Günde ozonlanmış yağ nanoemülsiyonun FTIR spektrumları	60
Şekil 7.5 30 gün sonra zeytinyağı, ozonlanmış yağ nanoemülsiyonu ve ozonlanmış yağ nanoemülsiyonun ¹³ C NMR spektrumları	61
Şekil 7.6 A, A1, B, B1, Kontrol ve antibiyotiğin antibakteriyel aktivitesi	62



ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 Ozonlu yağ ile yapılmış çalışmalar	9
Çizelge 6.1 Farklı nanoemülsiyon sistemlerinde kullanılan bileşenlerin yüzdeleri	40
Çizelge 7.1 750 rpm'de Tween 40 ile formüle edilen ozonlanmış yağ nanoemülsiyonlarının termodinamik stabilitesi.	50
Çizelge 7.2 Seçilen ozonlanmış yağ nanoemülsiyonlarının, 750 rpm'de Tween 40 ile formüle edilmiş partikül boyutu analizi ve 30 gün sonraki stabilitesi (kremleşme testi).	51
Çizelge 7.3 1500 rpm'de Tween 40'a göre seçilmiş ozonlanmış yağ nanoemülsiyonlarının partikül boyutu ve 30 gün sonraki stabilitesi (kremleşme testi).....	52
Çizelge 7.4 Tween 80 vasıtasıyla 750 rpm'de formüle edilmiş seçilmiş ozonlanmış yağ nanoemülsiyonlarının partikül boyutu ve 30 gün sonraki stabilitesi (kremleşme testi).	53
Çizelge 7.5 Ozonlanmış yağ nanoparçacıklarının kinetik stabilitesi.	54
Çizelge 7.6 Ozonlanmış yağın ve ozonlanmış yağ nanoemülsiyonlarının antibakteriyel etkisini gösteren inhibisyon zonlarının çapı (mm).	63



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

°C	: Santigrat Derece
μL	: Mikrolitre
CDCl ₃	: Tetrametilsilan
meq	: Miliekivalent
mg	: Miligram
mm	: Milimetre
nm	: Nanometre
O	: Oksijen Atomu
O ₂	: Oksijen Molekülü
O ₃	: Ozon
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
ζ	: Zeta Potansiyeli

KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
CoQ10	: Koenzim Q10
DLS	: Dinamik Işık Saçılım Spektrometresi
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DSC	: Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
EIP	: Emülsiyon Dönüşüm Noktası
FESEM	: Emisyon Taramalı Elektron Mikroskobu
FTIR	: Transform Infrared Spektroskopisi
GSH-PX	: Glutasyon Peroksi-daz
HLB	: Hidrofilik Lipofilik Denge
IgA	: İmmunoglobülin A
IgG	: İmmunoglobülin G
NSAID	: Steroidsiz iltihap giderici ağrı kesiciler

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

OA	: Osteoartrit
PCL	: Paclitaxel
PDGF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörleri
PdI	: Polidispersite indeksi
PIT	: Faz Dönüşüm Sıcaklığı
POE	: Polioksietilen
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SOR	: Sürfaktan-Yağ oranı
TBARS	: Tiyoarbitürik Asit ile Reaksiyon Veren Maddeler
TGF- β	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta
TGPS	: Tokoferil Polietilen Glikol-1000 Suksinat
VEGF	: Vasküler Endotel Büyüme Faktörü

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Ozon reaktif bir molekül olup, sulu ortamlarda parçalanarak oksijene dönüşmektedir. Klinik uygulamalarda yüksek konsantrasyonlarda dezenfeksiyon amaçlı, düşük konsantrasyonlarda da yara iyileşmesi ve epitelizasyonun hızlandırılmasında kullanılmaktadır. Ozon tek başına deriye penetre olamazken ozonlanmış yağlar şeklinde uygulaması bu olumsuz etkileri önlenmekte ve çoklu doymamış yağ asitleriyle oksidatif reaksiyona girerek deriye daha iyi penetre olabilme özelliği kazanmaktadır. Ozonun doymamış yağ asitleri ile oluşturdukları bileşikler sayesinde hücre içi sinyal sistemine etki edebildiği bilinerek, ozon yağı formu topikal olarak ozonterapiinin uygulanmasını kolaylaştırdığı, bu sayede kutanöz ve mukozal kronik enfekte alanlar tedavi edilebildiği ve bununla beraber, ozon yağının tıbbi alanda ümit verici bir biyomalzeme olduğu anlaşılmıştır.

Nanoteknolojinin temeli, atom veya molekülleri tek tek hassas şekilde birleştirip, doğadaki atomik dizilimi taklit ederek istenen ürünü elde etme ilkesine dayanmaktadır. Çünkü maddeleri farklı kılan; en küçük birim olan atomların dizilişlerindeki çeşitliliğidir. Nanoteknolojideki son gelişmeler kozmetik, ilaç alanında ciddi araştırmalar yapılmaktadır ve bunlardan en ilgi çekenini de nanoemülsiyonlardır. Partikül boyutu, nanoemülsiyonların en önemli özelliklerinden biridir. Nanoemülsiyonun stabilitesi, optik özelliği ve reolojisi, damlacıkların büyüklüğünden etkilenir. Nanoemülsiyon çalışmalarının temel hedefi yüksek muntazamlıkla nanometre aralığında bir parçacık boyutuna ulaşmaktır.

Nanoemülsiyonlar genellikle yağ fazından (organik faz), sulu fazdan, surfaktan (yüzey aktif madde) ve/veya co-surfaktandan (yardımcı yüzey aktif madde) imal edilir. Nanoemülsiyonların hazırlanmasında kullanılan yöntemler ikiye ayrılır. Bunlar yüksek enerjili ve düşük enerjili yöntemlerdir. Bu çalışmada, yağ fazı olarak zeytinyağı, sulu faz olarak su, yüzey aktif madde olarak Tween 80 ve Tween 40 kullanılmıştır. Nanoemülsiyonlar,

düşük enerji gerektiren yöntemlerden emülsiyon dönüşüm noktası (EIP) yöntemi ile hazırlanmıştır.

Bu çalışmanın amacı, çeşitli biyomedikal uygulamalar için umut verici taşıyıcı sistem olduğunu düşündüğümüz ozonlanmış yağ nanoemülsiyon sisteminin sentezlenmesi ve nanoemülsiyon üretim parametrelerinin incelenmesidir. Değişken formülasyon parametreleri (sürfaktan-yağ oranı, sürfaktan konsantrasyonu, karıştırma oranı ve yüzey aktif madde tipi) ile ortalama parçacık çapları, dağılımları ve stabiliteleri araştırılmıştır.

Nanoemülsiyonların küresel ve düzgün yapısı, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile gözlemlenmiş ve ortalama parçacık çaplarını doğrulanmıştır. Nanoemülsiyonların yapısal karakterizasyonları sistemin içerisinde ozonit yapısının var olduğunu göstermiş ve 30 günlük depolama sonrasında yapısal kararlılık tespit edilmiştir. Ozonlu yağ emülsiyonlarının *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli*'ye karşı antibakteriyel etkisi, biyomedikal alanda büyük bir uygulama potansiyeli olduğunu düşündürmektedir.



BÖLÜM 2

OZON

Ozon (O_3), üç oksijen atomunun (O) birleşmesi ile oluşur. Bu oluşum; oksijen molekülünün (O_2) atomik oksijene (O) ayrılmasından sonra, başka bir oksijen molekülü (O_2) ile çarpışmasından meydana gelir. Oksijen molekülünün ayrışması için enerji gereklidir. Bu enerji; doğal olarak ya da ticari amaçla üretilerek, oksijen atomundan elde edilebilir. Güneşten gelen ultraviyole ışınlar ve gök gürültülü sağanak yağmur sırasındaki yıldırımlar sonucu, doğal olarak ozon oluşur. Doğal yolla ozon oluşumunda ilk etapta, güneşten gelen yüksek enerjili ultraviyole radyasyonunun (görünür ve uzun dalga boylu) etkisiyle oksijen molekülü (O_2) parçalanır ve serbest oksijen atomu haline dönüşür. Daha sonra bu serbest haldeki oksijen atomları (O) yine ultraviyole radyasyonunun etkisiyle, oksijen molekülüne (O_2) çarpışır böylece oksijen molekülü ile birleşerek ozon molekülü (O_3) oluşur. Ozon (O_3) kararsız bir gazdır. Ozonun havadaki kararlılığı sudaki kararlılığından daha iyidir ama iki durumda da bu kararlılık çok uzun sürmez. Suda çözünmüş ozonun yarı ömrü, sudaki fosfatların ve karbonatların konsantrasyonuna bağlı olarak 8 dakika ile 14 saat arası olduğu saptanmıştır (Özler vd. 2009). Ozon gazı, havadaki konsantrasyonu 240 g/m^3 'e (havanın ağırlıkça % 20'si) ulaştığında patlayıcı olur. Ancak ozon gazının su ya da atık su dezenfeksiyon sistemlerindeki maksimum konsantrasyonunun 50 g/m^3 derişimi geçmez (Havanın ağırlıkça % 4,1'i) (Erdem 2010).

Ozonun sıvılardaki çözünürlüğü önemlidir ve ozon dezenfeksiyon sistemlerinde dezenfeksiyon suya transfer edilen ozonun konsantrasyonuna bağlıdır. Henry yasasına göre ozon sistemlerinde, sıvıda çözünen ozon gazı, sabit sıcaklıkta, ozon gazının sıvı üzerindeki kısmi basıncı arttıkça artar. Matematiksel olarak Henry Yasası şu şekilde Eşitlik 2.1 ile açıklanır;

$$H = P / C \text{ ya da } P = H \times C \quad (2.1)$$

P = Gazın sıvı üzerindeki kısmi basıncı (atm),

C = Sıvı ile dengede bulunan, sıvı içindeki gazın mol fraksiyonu,

H = Henry yasası sabiti (Sıcaklıkla değişir.) (atm / mol fraksiyonu)

Ozon çok kuvvetli bir oksidan ajandır ve 2,07 V'luk oksidasyon potansiyeline sahiptir, florin ve persülfattan sonra, bilinen üçüncü en güçlü oksidan maddedir ve çok etkili bir dezenfektandır. Oksijen atmosferde; oksijen atomu (O), oksijen molekülü (O₂) ve ozon molekülü (O₃) olarak üç ayrı formda bulunmaktadır. Ozon genelde organik ve inorganik bileşiklerle reaksiyona girebilir. Çoğunlukla oksidasyon reaksiyonları sonucunda elde edilen ürün, ilk bileşene göre daha az toksik etkiye sahiptir (Erdem 2010).



Şekil 2.1 Ozonun Lewis yapısı.

Ozon gazını 1839 yılında, alman kimyacı Christian Friedrich Schönbein keşfetmiştir. Ozon renksizdir ve keskin kokulu bir gazdır. Ozonun keşfinden sonra ilk yıllarda dezenfeksiyon amacıyla kullanılmıştır. 1860 yılında Monaco şehrinde ozon, su arıtma tesisinde dezenfeksiyon amacıyla kullanılmaya başlanmıştır (Özler vd. 2009). Ancak, o sırada ozon üretimi çok zor ve pahalı bir yöntem olduğu için ozonlama işlemi pek tercih edilen bir işlem olmamıştır. Teknolojinin gelişmesiyle ozon kullanımı yayılmış ve kullanım alanları çoğalmıştır. Ozon havuzlarda, soğutma sistemlerinde, kaplıcalarda dezenfektan olarak kullanılmaktadır. Ozon, çeşitli endüstrilere girerek buralarda kullanım alanlarını arttırmıştır. Suyun arıtılması, siyanürlü gazların yok edilmesi gibi hem maddi açıdan kar, hem de sağlık açısından yarar sağlayan alanlarda kullanılmıştır. Ozonla yapılan çeşitli deneyler sonucunda, ozonun güçlü bir oksitleyici olması sebebiyle suda ve havada koku giderici, mikrop kırıcı, ortamı kirleten pek çok organik molekülün yok edicisi olarak kullanılabileceği anlaşılmıştır. Ozon, ortamdaki hava kirliliği ve kötü kokuları yok eder böylece insanlara ferahlık ve zindelik hissi verir; daha iyi düşüncelerini ve konsantrasyonlarının devamlılığını sağlar.

Ozonun gıda sektöründe yaygın olarak dezenfektan şeklinde kullanılır. Ozon hiçbir kalıntı bırakmaz ve gıda maddesinin kendisiyle herhangi bir reaksiyona girmesi söz konusu değildir.

Bu sebeple ozonlama, dezenfeksiyon için kullanılabilecek en sağlıklı ve en çevreci yöntemdir. Ozonlama çoğunlukla medikal uygulamalar için de kullanılmaktadır (Erdem 2010).

Ozon(O_3), yaygın olarak iyi antimikrobiyal, bakterisidal, antiviral ve antifungal ajanlar olarak kabul edilmiştir (Kim vd. 2009). Sadece virüs ve bakterileri öldürmekle kalmaz tüm mikroorganizmalar ve toksinlerini de okside edebilir (Özler vd. 2009).

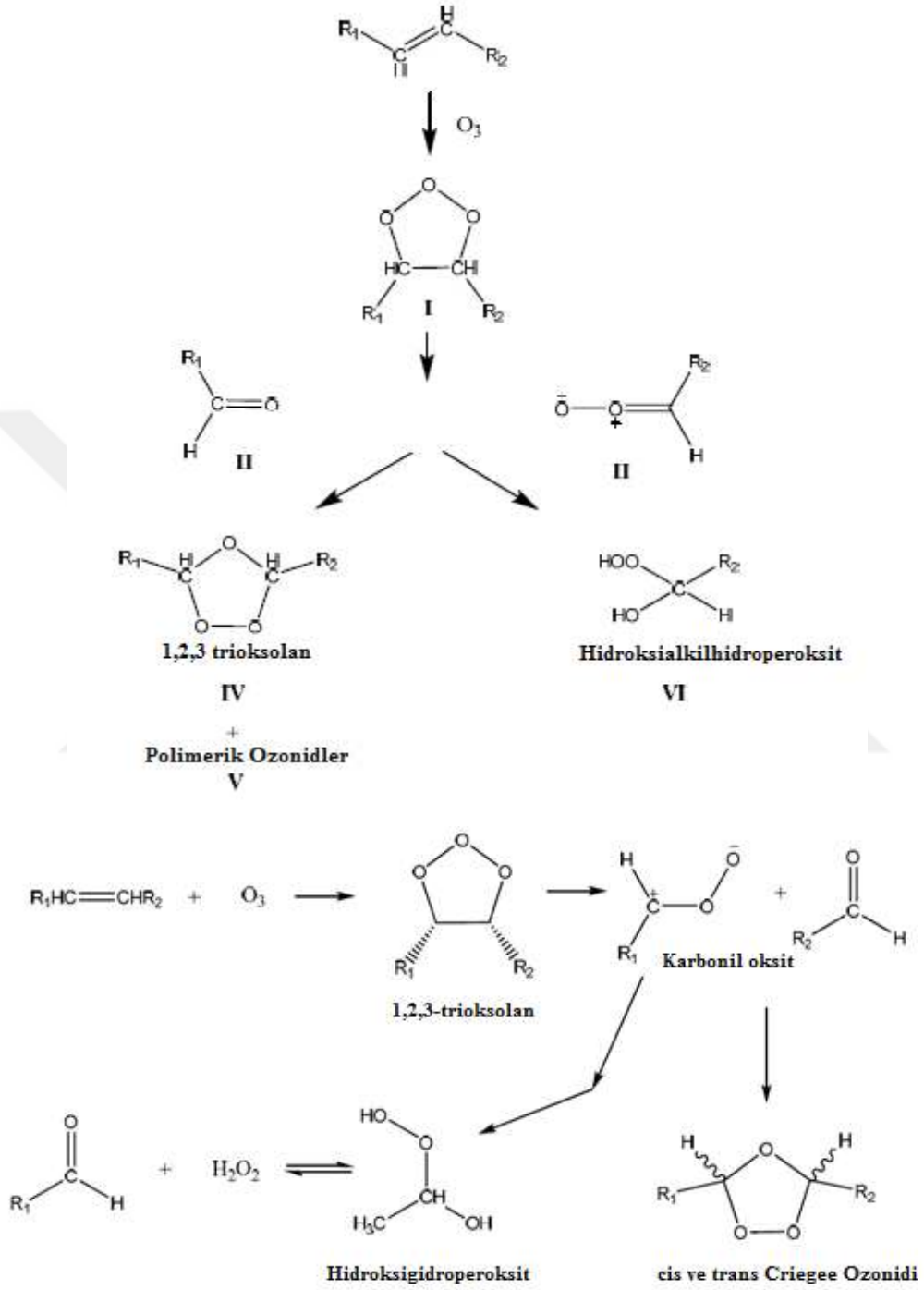
2.1 OZONLU YAĞLAR

Bitkisel yağların % 97 – 98'i trigliserid yapısındadır. Yağların doğal yapıları ve karakterleri, içerisinde barındırdıkları doymuş ve doymamış yağ asitlerine bağlıdır. Bitkisel yağlardaki doymamış trigliseritler yağa birçok olumlu özellik katmaktadır. Çift bağlar, hidrojenasyonda da olduğu gibi sıklıkla yağların kimyasal modifikasyonlar için kullanılmaktadır. Trigliseritlerin ozonlanması bir diğer reaksiyon türüdür ve son zamanlarda oldukça ilgi çekmektedir. Ozonlanmış bitkisel yağlar, doğal bitkisel yağlara göre çok daha karmaşık yapılara sahiptir. Ozon gazının, oleik asit reaksiyonu sonrası kararsız haline ozonit denir (Öcal 2013).

Ozon tek başına deriye penetre olamazken ozonlanmış yağlar şeklinde uygulaması bu olumsuz etkileri önlenmekte ve çoklu doymamış yağ asitleriyle oksidatif reaksiyona girerek deriye daha iyi penetre olabilme özelliği kazanmaktadır (Altınok ve Yipel 2014). Ozonun bitkisel yağlarla etkileşimi sonucunda hidroperoksitler, ozonidler, aldehitler, peroksitler, diperoksitler ve poliperoksitler gibi oksijenlenmiş bileşikler meydana gelir. Ozonun bitkisel yağlar ve lipitlerle olan reaksiyonu, bitkisel yağlardaki doymamış trigliseritlerdeki karbon – karbon çift bağları ile meydana gelir. Bu reaksiyon mekanizması Criegee mekanizması olarak bilinir (Erdem 2010). Bu tepkime öncelikle doymamış bağın ozonla birleştirilmesini sağlar. Ozonid, trioksolan benzeri karbonil fragmentleri, aldehit ve peroksitlere dönüşür (Öcal 2013).

Criegee mekanizmasına göre, ozonun karbon – karbon çift bağına katılması sonucu, kararsız ozonid bileşiği olan 1,2,3-tri-oxolane (I) ürünü oluşur ve hızlı bir şekilde aldehit (II) ve karbonil oksit (III) bileşiklerine bozunur. Su ve herhangi bir çözücünün bulunmadığı ortamda II ve III tekrardan düzenlenerek 1,2,4-trioksolan (Cis ve Trans Criegee Ozonidi) (IV) ana ürünü ile polimerik ozonid (V) ürünlerine dönüşür. Eğer ortamda su bulunuyorsa, bu durumda karbonil ozonid (III) bileşiği hidroksialkilhidroperoksit (VI) ürününe dönüşür. Yukarıda

açıklandığı gibi, ozonun bitkisel yağlardaki doymamış yağ asitleri ile reaksiyonu sonucunda oksijenlenmiş ürünler olarak hidroperoksitler, ozonidler ve aldehitler oluşur (Erdem 2010).



Şekil 2.2 Ozonun doymamış yağ asitleri ile reaksiyonu, Criegee Mekanizması (Erdem 2010).

2.2 OZONUN MEDİKAL ALANDA KULLANIMI

Ozonun tıbbi amaçla kullanımının ilk olarak 1880 yılında Dr. John Harvey Kellogg (Battle Creek/Michigan/ABD) tarafından gerçekleştirildiğini yazan kaynaklar bulunmakla birlikte daha yaygın görüşe göre kabul edilen ilk tıbbi kullanımı Birinci Dünya Savaşı sırasında Alman askerlerinin kangren ve benzeri ciddi yaralanmalarını tedavi eden Dr. Albert Wolff'a dayanır. Bilimsel bir toplantıda ozonun tedavi edici bir ajan olarak gündeme alındığı ilk önemli organizasyon ise 1935 yılında Berlin'de toplanan 59. Alman Cerrahi Birliği (59th Meeting of the German Surgical Society) toplantısı olup, burada Dr. Erwin Payr "Cerrahi'de Ozon Uygulamaları" başlığı altında kendi vakalarından oluşan derleme türünde bir sunum yapmıştır. Bu tarihten sonra 80'li yıllara kadar, ozon tedavisini münferit olarak uygulayan çeşitli hekimler ve araştırmacılar bulunmaktadır. 1980'li yıllardan itibaren ise tıbbi amaçla ozon kullanımına yönelik gerek bilimsel çalışmalar, gerekse vaka serileri literatürde artmaya başlamıştır (Özler vd. 2009).

Hee Su Kim ve arkadaşları, bir kobay modelinde akut deri yara iyileşmesi üzerine ozonlu zeytinyağının terapötik etkilerini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirdikleri deneyde, kobay sırtında 6 mm lik deri yaraları oluşturmuştur. Ozonlu zeytinyağının yara üzerindeki etkisini incelemek amacıyla, saf zeytinyağı ve tedavi edilmeyen kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Ek olarak gine domuzunun yara büyüklüğünde ozonlu zeytinyağı grubunda önemli derecede azalma görülmüştür. 7. Günde yağ içeren gruba karşın ozonlu gruptaki fibroblastların daha fazla sayıda olduğu saptanmıştır. İmmünohistokimyasal boyama PDGF, TGF- β ve VEGF büyüme faktörlerini kanıtlamıştır. Sonuç olarak ozonlu zeytinyağı topikal uygulamada PDGF, TGF- β ve VEGF nin artan ekspresyonuna bağlı olarak akut deri yaralarının iyileşmesini hızlandırabileceğini göstermiştir (Kim vd. 2009)

Valacchi ve arkadaşları SKH1 farelerin derisinde yapılan akut kutanöz yaralarda ozonlu susam yağının üç farklı sınıfta terapötik etkilerini değerlendirmiştir. Özellikle yara kapanma hızı, histolojik parametreler ve bu vasküler endotel büyüme faktörleri ve siklin D1 Gibi anahtar proteinlerin düzeyi ozonlu yağ bulunan peroksit düzeyine göre analiz edilmiştir. Orta derecede ozonlu susam yağının ilk 7 günde düşük ve yüksek peroksit değeri olan ozonlu susam yağlarına göre yara kapatma etkisinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Ve aynı tedavi altında yara iyileşmesi ile görevli hücrelerden daha erken ve hızlı bir cevap alındığı, daha yüksek anjiyogenezin yanı sıra gelişmiş bir vasküler endotel büyüme faktörü ve siklin

D1 ifadesi gözlenmiştir. Sonuç olarak bu çalışma ozonlu susam yağının deri yara iyileşmesindeki geçerliliğini ve ozonlama derecesinin önemini vurgulamaktadır (Valacchi et al. 2011).

Zullyt B. Zamora Rodr'iguez ve arkadaşları, ozonlu ayçiçeği yağının potasyel koruyucu etkilerini belirlemek amacıyla, saf etanol ile oluşturulan sıçan mide mukozası yaralanması araştırmasını gerçekleştirmiştir. Ozonlu ayçiçeği yağı bir kanül ile intragastik farelere 4 gün boyunca uygulanmıştır. Sonuçlar, etanol ile muamele edilmiş kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, ozonlu ayçiçeği yağı ön işleme tabi tutulmuş sıçanlarda gastrik ülserin azalmış olduğunu göstermiştir. Ozonlu ayçiçeği yağı ile ön işleme tabi tutulmuş sıçanlar, tek başına etanol ile muamele edilmiş sıçanlar ile karşılaştırıldığında, gastrik mukozada TBARS içeriğinde belirgin bir azalma görülmüştür. Tek başına etanol ile muamele edilen sıçanlara karşı ozonlu ayçiçeği yağı ile muamele edilen sıçanlarda SOD ve GSH-Px aktivitelerinin belirgin olarak arttığı gözlenmiştir. Özet olarak ozonlu ayçiçeği yağı ile muamele edilen sıçanlarda mide ülserinin koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu sonuçlar yaralanmayı önleyen SOD ve GSH-Px gibi bazı önemli antioksidan enzimlerin uyarılmasına aracılık ederek ozonlu ayçiçeği yağının koruyucu etki olduğuna dair kanıtları göstermiştir (Rodriguez et al. 2007).

Akiyo Matsumoto ve arkadaşları, ağustos 1998 ve ağustos 2000 tarihleri arasında çeşitli hastanelerden cerrahi operasyon geçirmiş 20 hastaya inatçı fistül ve yaralarına ozonlanmış zeytinyağı uygulamıştır. Ozonlanmış zeytinyağı tedavisi vakaların 19 unda etkili olmuştur. Tek istisna pilonidal sinüs durumu olan hasta olduğu gözlenmiştir. Ozonlanmış zeytinyağı, cerrahi operasyon sonrası sindirim sistemi dirençli karın fistülü tedavisinde etkili olmuştur ve hiçbir yan etkisi gözlenmemiştir. İrinin boşaltılması ve granülasyon oluşumu için tam etkili olduğu belirtilmiştir (Matsumoto et al. 1998).

Campanati ve arkadaşları, ozonlu zeytinyağının deri yara iyileşmesinde etkili olduğunu göstermek için in vivo çalışmada klinik değerlendirmeler yapmıştır. Reepitelizasyon aşamasında ikinci derece cilt yanıklarına sahip 30 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Her cilt yanığı iki simetrik bölüme ayrılmıştır. Bir kısmı ozonlu yağ ile diğer kısmı ise hiyalüronik asit jel ile topikal uygulama ile 12 hafta boyunca günde bir kez muamele edilmiştir. Her iki tedavi yönteminde de iyileşme görülmüştür. Ve ozonlu yağın eritem, gerginlik, kaşıntı ve yanma hissinde hiyalüronik asit kadar etkili olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte lezyon sonrası hiperpigmentasyon azaltmada hiyalüronik aside kıyasla daha etkili görünmektedir (Campanati et al. 2013).

Çizelge 2.1 Ozonlu yağ ile yapılmış çalışmalar.

YIL	YAZAR	BASLIK	KONU
1980	Sweet, F., Kao, M.S., Lee, S.C., Hagar, W.L., Sweet, W.E.	Ozonun insan kanseri hücrelerinin büyümesini seçici olarak inhibe etmesi	0.3 ve 0.5 ppm ozon varlığında in vitro koşullarda kanser hücre büyümesinin sırasıyla %40 ve %60 inhibe edildiği ve kontrol hücrelerinin etkilenmediği, 0.8 ppm ozon varlığında ise kontrol hücrelerinin %50'sinden azının ve kanser hücrelerinin ise %90'ı kadar inhibe edildiği rapor edilmiştir
1990	Zanker, K.S., Krocze, R.	5-fluorourasil'in, düşük dirençli bir ozona sahip bir kemorezistant tümör hücre hattına ve taze insan tümör hücrelerine karşı in vitro sinerjistik etkinliği	İn vitro ortamda 5-fluorouracil dirençli kolon karsinoma hücrelerinin ozon terapiyle beraber kemo-duyarlılığının artırıldığını belirtmişlerdir
1995	Turcic, J., Hancević J, Antoljak T, Zic R, Alfirević	Thiersch'e göre bölünmüş deri greftlerinin savaş yaralarına iyi gelmesinin ozon etkisi	Ateşli silah yaralanması sonucu doku defektlerinin tedavisi için deri grefti + ozon terapi uygulamasında greft başarısını %40'dan %75'e ulaştığını bildirmiştir
2000	Akiyo Matsumoto, Shotaro Sakurai, Nariko Shinriki, Shigeru Suzuki and Toshiaki Miura	Çıkarılabilir Fistül ve Cerrahi Operasyon Sonrası Yara Tedavisinde Ozonlanmış Zeytinyağının Terapötik Etkileri	Çeşitli hastanelerden cerrahi operasyon geçirmiş 20 hastaya inatçı fistül ve yaralarına ozonlanmış zeytinyağı uygulamıştır. . Ozonlanmış zeytinyağı tedavisi vakaların 19 unda etkili olmuştur.
2004	Clavo, B., Pérez, J.L., López, L., Suárez, G., Lloret, M., Rodríguez, V., Macías, D., Santana, M., Hernández, M.A., Martín-Oliva, R., Robaina, F.	Tümör Oksijenasyonu için Ozon Terapisi	Tümör oksijenasyonunun ozonla artırılabilceği ve ozonun ek bir kemo-radyoterapi ajanı olabileceği vurgulanmıştır
2005	Martínez-Sánchez, G., Al-Dalain, S.M., Menéndez, S., Re, L., Giuliani, A., Candelario-Jalil, E., Alvarez, H., Fernández-Montequín	Diyabetik ayaklı hastalarda ozonun terapötik etkinliği	Diyabetik ayak gelişmiş hasta grubundaki ozon tedavisi uygulanan hastalarda antibiyotik tedavisi alanlara göre yara iyileşmesinde hızlanma, hastanede kalma sürelerinde kısalma ve glisemik kontrolün daha iyi olduğu rapor edilmiştir
2007	Zullyt B. Zamora Rodr'iguez, Ricardo Gonzá'lez A'lvarez, Daile'n Guanche, NelsonMerino, Frank Hern'andez Rosales, Silvia Men'endez Cepero, Yaima Alonso Gonz'alez, and Siegfried Schulz	Sıçanlarda Ozonize Ayçiçeği Yağının Etanol Kaynaklı Ülserlerde Etkiler	Ozonlu ayçiçeği yağının potasyel koruyucu etkilerini belirlemek amacıyla, saf etanol ile oluşturulan sıçan mide mukozası yaralanması araştırmasını gerçekleştirmiştir. Ve ozonlu ayçiçeği yağı ile muamele edilen sıçanlarda mide ülserinin koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir.

Çizelge 2.1 (devam ediyor)

2008	Hee Su Kim, Sun Up Noh, Ye Won Han, Kyoung Moon Kim, Hoon Kang, Hyung Ok Kim and Young Min Park	Ozonun Topikal Uygulamasının Akut Kutanöz Yara İyileşmesine Terapötik Etkileri	Ozonun akut deri yara iyileşmesini FGF, PDGF, TGF-B ,VEGF gibi büyüme faktörleriyle ilişkili olarak arttırabileceği gösterilmiştir
2010	Giuseppe Valacchi, PhD1,2; Yunsook Lim, PhD2; Giuseppe Belmonte, MS1; Clelia Miracco, MD3; Iacopo Zanardi, PhD4; Velio Bocci, MD5; Valter Travagli, PharmD4	Ozonlanmış susam yağı, SKH1 farelerinde kutanöz yara iyileşmesini artırması	SKH1 farelerin derisinde yapılan akut kutanöz yaralarda ozonlu susam yağının terapötik etkilerini değerlendirmiştir. Orta derecede ozonlu susam yağının ilk 7 günde düşük ve yüksek peroksit değeri olan ozonlu susam yağlarına göre yara kapatma etkisinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.
2013	A. Campanati, S. De Blasio, A. Giuliano, G. Ganzetti, K. Giuliodori, T. Pecora, V. Consales, I. Minnetti, A. Offidani	İkinci derece yanıkların tedavisinde topikal ozonlanmış yağ ile hiyalüronik jelin; prospektif, karşılaştırmalı, randomize olmayan, kontrollü bir klinik araştırması	30 hastanın cilt yanığı iki simetrik bölüme ayrılmıştır. Bir kısmı ozonlu yağ ile diğer kısmı ise hiyalüronik asit jel ile topikal uygulama ile muamele edilmiştir. Ve ozonlu yağın eritem, gerginlik, kaşıntı ve yanma hissinde hiyalüronik asit kadar etkili olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte lezyon sonrası hiperpigmentasyon azaltmada hiyalüronik aside kıyasla daha etkili görünmektedir.

Tüm bu bulguların ışığında, ozonun doğrudan hücresel penetrasyon yapamadığı fakat doymamış yağ asitleri ile oluşturdukları bileşikler sayesinde hücre içi sinyal sistemine etki edebildiği ve ozon yağı formu topikal olarak ozonterapiinin uygulanmasını kolaylaştırdığı, bu sayede kutanöz ve mukozal kronik enfekte alanlar tedavi edilebildiği sonucuna varılmıştır. Bununla beraber, ozon yağının tıbbi alanda ümit verici bir biyomalzeme olduğu anlaşılmıştır.

BÖLÜM 3

NANOTEKNOLOJİ

‘Nano’ sözcük olarak, bir fiziksel büyüklüğün bir milyarda biri anlamına gelmektedir. Bir nanometre ise metrenin bir milyarda birine eşit bir uzunluk birimidir. Bir nanometre içine yan yana ancak 2-3 atom dizilebilmektedir; yaklaşık 100-1000 atom bir araya gelerek nano ölçeklerde bir nesneyi oluşturur. Nanoteknolojinin temeli, atom veya molekülleri tek tek hassas şekilde birleştirip, doğadaki atomik dizilimi taklit ederek istenen ürünü elde etme ilkesine dayanmaktadır. Çünkü maddeleri farklı kılan; en küçük birim olan atomların dizilişlerindeki çeşitliliğidir.

Nanoteknolojiye olan ilginin gün geçtikçe artmasının 3 temel nedeni vardır;

- 1) Nanoteknolojik araştırmalar, maddenin temel bilgisindeki eksiklikleri tamamlamaktadır.
- 2) Nanoteknolojinin yeni uygulamalar vaat etmesidir.
- 3) Endüstriyel protiplendirmenin ticari boyut kazanmasıdır (İlyasoğlu ve El 2010).

3.1 NANOTEKNOLOJİNİN TARİHÇESİ

Nanoteknolojinin ortaya çıkışından günümüze kadar geçen süreçte tarihsel gelişimi aşağıda verilmiştir.

Nanoteknolojinin gelişim basamakları:

1. Nesil (~2000-): Pasif nano yapılarıdır. Nano yapıları kaplamalar, nano parçacıklar, nano parçacıkların dispersiyonu, metal, polimer, seramikten yapılmış nano yapılar 1. nesil ürünlere örnek olarak verilebilir.
2. Nesil (~ 2005-): Aktif nano yapılarıdır. Transistörler, biyolojik ve biyolojik olmayan sensörler, hedefe giden ilaç ve kimyasallar 2. nesil ürünlere örnek verilebilir

3. Nesil (~ 2010-): Nano boyutta ve çoklu ölçülü yapılarda ağ kuran, birçok sentez yöntemi kullanan üç boyutlu nano sistemlerdir.
4. Nesil (~ 2015-): Nano sistemdeki her molekülün özel bir yapıya sahip olduğu ve farklı rol oynadıkları heterojen moleküler nano sistemlerdir (İlyasoğlu ve El 2010).

3.2 NANOPARTİKÜL

Nanopartiküller, yığınsal malzemelerle atomik veya moleküler yapılar arasındaki boşluğu doldurduğu için bilimsel açıdan büyük ilgi görürler. Bir yığın malzemesi, boyutundan bağımsız olarak sabit fiziksel özelliklere sahiptir, ancak nano ölçeğinde bu genellikle geçerli değildir. Nano ölçekte incelendiğinde iyi karakterize edilmiş birkaç yığın malzemesinin en ilginç özelliklere sahip olduğu bulunmuştur. Bunun için, nanoparçacıkların çok yüksek en-boy oranına sahip olması da dahil olmak üzere birçok nedeni vardır (Thakkar et al. 2010).

Nanopartiküllerin kimyasal tasarımı ve sentezi, nanoteknolojinin gelişimine katkıda bulunmuştur. Nanoteknoloji araştırmalarının temelleri, kimyasal sentez sırasında farklı optik, elektronik veya manyetik özelliklerin ayarlanabileceği yapıların boyut ve şekline dayanır.

Boyutları biyolojik moleküllere (ör. Proteinler, DNA) ve yapılara (ör. Virüsler ve bakteriler) benzer olduğundan, çeşitli biyomedikal uygulamalarda nanoparçacıkların kullanılması konusunda büyük bir ilgi vardır. Nanopartiküller şu anda görüntüleme, biyosensifikasyon, gen ve ilaç dağıtımında kullanılmaktadır.

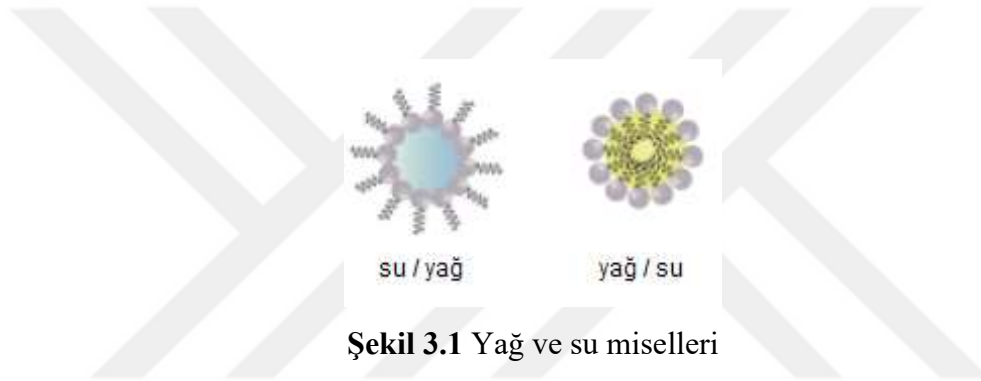
Nanoparçacıkların hücresel alımına ilişkin nicel ve nitel araştırmalar geliştirmeye devam ederken, biyomedikal uygulamalarda nanoteknolojiyi ilerletmek için büyüklük ve şekilleri açısından gereklidir. Gelişen nanopartiküllerde, nanopartikül toksisitesinin değerlendirilmesi; görüntüleme, ilaç aktarımı ve terapotik uygulamalar ve çok işlevli nanopartiküllerin tasarımı için önemlidir. Çoğu araştırma, genellikle 100 nm'den büyük lipozomlar ve polimer parçacıkları üzerine odaklanmıştır.

Katı lipid nanopartikülleri topikal uygulamalarda ilaç taşıyıcı olarak umut vermektedir. Artan hidrasyon ile stratum korneum yoluyla ilaçların penetrasyonunu artırabilen oklüzyon özellikleri vardır. Nanoemülsiyonlarda parçacık boyutunun azaltılması ilaç penetrasyonunu ve ilaçların sistemik etkinliğini artırabilir. Hücresel canlılık testleri farklı katı lipid nanopartikül

preparatlarının iyi bir lokal tolere edilebilirliğini kanıtlamıştır ve ayrıca katı lipid nanopartikül dispersiyonlarının düşük sitotoksitesi gözlenmiştir. Şimdiye kadar, topikal nanopartikül formülasyonları, nanopartikül dispersiyonunun, yaygın olarak kullanılan hidrojel veya kremler gibi dermal taşıyıcılara eklenmesiyle üretilmiştir ve istenen yarı katı kıvamda bir topikal formülasyonlar elde edilmiştir (Chithrani et al. 2006).

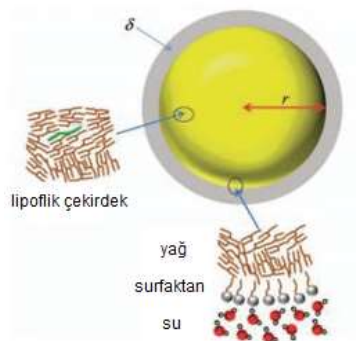
3.3 NANOEMÜLSİYON

Nanoemülsiyonlar genellikle karışmayan iki sıvı içerir. Bu sıvılardan biri küçük küresel damlacıklar halinde dağılır ve sürekli faz türüne bağlı olarak, nano emülsiyonlar ya su içinde yağ (y / s) ya da yağ içinde su (s / y) olarak sınıflandırılır.



Şekil 3.1 Yağ ve su miselleri

Nanoemülsiyonlar genellikle yağ fazından (organik faz), sulu fazdan, surfaktan (yüzey aktif madde) ve/veya co-surfaktandan(yardımcı yüzey aktif madde) imal edilir.



Şekil 3.2 Yağ / su nanoemülsiyon sistemindeki parçacıkların çekirdek-kabuk yapısının şematik gösterimi (Yıldırım 2015).

Organik faz: Triasilgliseroller, diasilgliseroller, monoasilgliseroller, serbest yağ asitleri, tatlandırıcı yağlar, uçucu yağlar, mineral yağlar, yağ ikame maddeleri, mumlar, yağda çözünen vitaminler ve lipofilik nutrasötikler (karotenoidler, Koenzim Q) gibi çok polar

olmayan bileşenlerin çeşitleri organik faz formülasyonunda yer alır. Yağ fazının toplu fizikokimyasal özellikleri (polarite, suda çözünürlük, ara yüzey gerilimi, kırılma indisi, viskozite, yoğunluk, faz davranışı ve kimyasal stabilite) nanoemülsiyonların oluşumunu, stabilitesini ve özelliklerini etkiler.

Sulu faz: Nanoemülsiyonların sulu fazını öncelikle su oluşturur, ancak asitler, bazlar, mineraller, proteinler, karbonhidratlar ve yardımcı çözücüler gibi sulu fazda çeşitli diğer kimyasal bileşenler mevcut olabilir. Nanoemülsiyonların oluşumu, kararlılığı ve fizikokimyasal özellikleri kompozisyonundan doğrudan etkilenir, çünkü bileşenlerin sulu fazdaki polarite, arayüzey gerilimi, kırılma indisi, reoloji, yoğunluk, faz davranışı, pH ve iyonik gücü etkiler (Yıldırım 2015).

Partikül boyutu, nanoemülsiyonların en önemli özelliklerinden biridir. Nanoemülsiyonların damlacık boyutları 20 nm ila 500 nm arasındadır, ancak nanoemülsiyonları konvansiyonel emülsiyonlardan ayırt etmek için, literatürde tanımlanmış farklı boyut aralığı yoktur. Nanoemülsiyonun stabilitesi, optik özelliği ve reolojisi, damlacıkların büyüklüğünden etkilenir. Nanoemülsiyon çalışmalarının temel hedefi yüksek muntazamlıkla nanometre aralığında bir parçacık boyutuna ulaşmaktır (monodispers sistem). Polidispersite İndeksi (PdI), boyut dağılımı için bir önlem olarak bilinir. PdI 0.200'den küçük olduğunda, genellikle monodispers boyut dağılımı gözlenir. Bir emülsiyonda çok boyutlu partiküller varsa, emülsiyonlar polidispers olarak tanımlanır (multimodal sistem). Büyük parçacıklar ve büyük ebatlı dağılımlar formülasyonun kararsızlığına işaret eder.

Bir emülsiyonun faz ayrımını önlemek için yüzey aktif maddeler kullanılır. Yüzey aktif maddeler emülsiyonun stabilitesini artırır, çünkü bunlar bir araya toplanmayı önleyen koruyucu bir tabaka oluştururlar. Yüzey aktif maddeler yağ ve su molekülleri arasında oluşan ara yüzey gerilimi Laplace basıncını düşürür. Yüzey aktif maddeler 3 büyük kategori altında değerlendirilebilir. Bunlar protein, polisakarit ve küçük molekül yüzey aktif maddelerdir (Yıldırım 2015).

1- Protein emülsiyonlaştırıcılar: Soya proteini izolatu, peynir altı suyu proteini izolatu, β -laktoglobulin gibi bazı gıda proteinleri besin değerlerinde yüksek olan ve genellikle güvenli olarak kabul edilen bir surfaktan olarak kullanılırlar. Proteinler amfifilik karakterlere

sahiptirler ve adsorbe edilmiş protein moleküllerinin dış yüzeyinde elektrostatik itme, sterik engelleme ve ozmotik basınç oluşumu yoluyla emülsiyonları dengelerler.

2- Polisakkarit emülsiyon yapıcılar: Arabik (Acacia senegal), modifiye nişasta modifiye edilmiş selülozlar, bazı pektin ve bazı galaktomannanlar gıda sistemlerinde en çok kullanılan polisakkarit emülsiyonlaştırıcılardır. Fonksiyonel gruplarına bağlı olarak, polisakkaritler anyonik, katyonik ve noniyonik olarak sınıflandırılır. Polisakkaritlerin monomer kompozisyonları proteinlerle karşılaştırıldığında, polisakkaritler daha uniformdur ve bu çözünürlük, viskozite arttırma, bağlanma özellikleri, jelleşme gibi özel fiziko-kimyasal ve fonksiyonel özellikler sağlar.

3- Küçük moleküler yüzey aktif maddeler: Küçük moleküler yüzey aktif maddeler hem hidrofilik (kafa grubu) hem de hidrofobik kısımlara sahiptir. Bu yüzey aktif maddeler, sulu ortamdaki hidrofilik işlevsel grupları göz önüne alınarak 4 alt grup altında incelenebilir. Bunlar anyonik, katyonik, noniyonik ve zwitterioniktir.

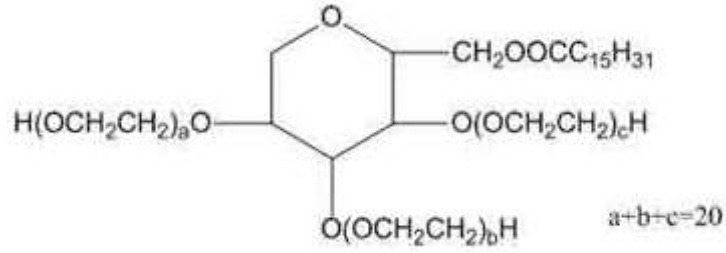
i. Anyonik sürfaktanlar: Bu sürfaktanların negatif yükü vardır. Yağ asitlerinin alkali metal tuzlarının anyonları, uzun zincirli sülfonatların anyonları, sülfatlar ve fosfatlar bu gruba dahildir.

ii. Katyonik sürfaktanlar: Bu sürfaktanların pozitif yükleri vardır. Genellikle amin tuzları veya amonyum ve piridinyum bileşiklerinden oluşur.

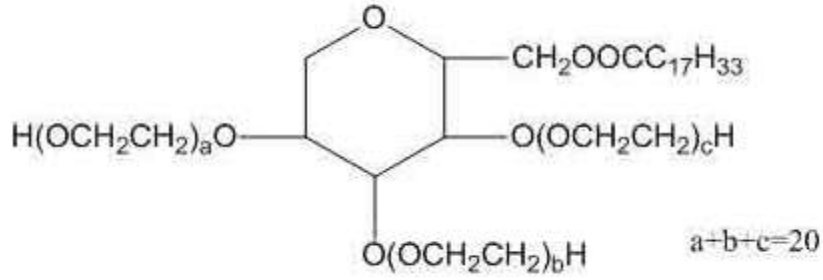
iii. Noniyonik yüzeyaktif maddeler: Bu yüzey aktif maddeler yaygın olarak polioksietilen bileşiklerini ifade eder, ancak bu grupta şeker esterleri, amin oksitler ve yağ alkanolamidleri de bulunmaktadır.

iv. Zwitteriyonik yüzey aktif cisimleri: Bu yüzey aktif cisimleri, molekülün hidrofilik kısmında pozitif ve negatif yüklere sahiptir. Lesitin (uzun zincirli fosfonil kolinler) bu gruba aittir. Yağ / su emülsiyonlarının kinetik kararlılığı genellikle küçük moleküler yüzey aktif cisimler tarafından arttırılmıştır. Nanoemülsiyon oluşturmak için; küçük molekül yüzey aktif maddeler, proteinler ve polisakkaritler yüzey aktif maddeler olarak kullanılabilir (Yıldırım 2015).

Bu çalışmada, yüzey aktif madde olarak Tween 80 ve Tween 40 kullanılmıştır. Tween 40 ve Tween 80 farmasötik, kozmetik ve gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Tween 40, yapısal olarak Tween 80'den farklı olarak, yağlı asit yan zinciri olarak palmitik asit, Tween 80 ise oleik asit içermektedir (O'Sullivan et al. 2004).



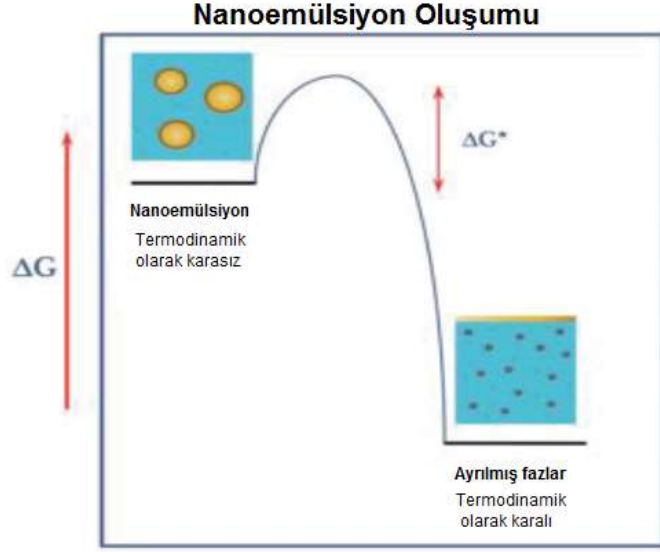
Şekil 3.3 Tween 40'ın molekül yapısı



Şekil 3.4 Tween 80'in molekül yapısı.

Nanoemülsiyonlar termodinamik açıdan kararsız fakat kinetik olarak kararlı sistemlerdir. Kararlı bir nano emülsiyon oluşturmak için yüzey aktif maddenin yağ oranı (SOR) ve sulu fazın miktarı çok önemli faktörlerdir. Hazırlama yöntemi ile sistemin bileşimi ve bileşeni uygun bir şekilde seçilirse yüksek kinetik kararlılığa sahip nanoemülsiyonlar elde edilebilir. Yüzey aktif madde kullanmadan, yüksek kinetik kararlılığı olan nanoemülsiyon sağlanmaz.

Nanoemülsiyonların termodinamik istikrarsızlığı, ayrı fazların ve kolloidal dispersiyonların serbest enerjisinden kaynaklanmaktadır. Nanoemülsiyonlar için, ayrılan fazların serbest enerjisi kolloidal dispersiyonun serbest enerjisinden daha düşüktür.

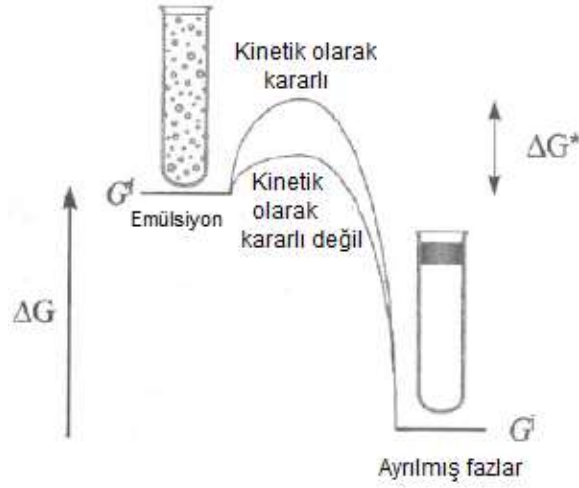


Şekil 3.5 Nanoemülsiyon sistemlerinin serbest enerjisinin şematik diyagramı.

Damlacık büyüklüğü üzerindeki kolloidal dispersiyon oluşumunun serbest enerjisi eşitlik 3.1 kullanılarak hesaplanır.

$$\Delta G = \Delta G_I - T \Delta S \quad (3.1)$$

Eşitlik 3.3 nanoemülsiyonların termodinamik açıdan olumsuz olduğunu göstermektedir. Çünkü sistemler her zaman en düşük serbest enerjiye sahip olma eğilimindedir. Burada ΔG_I , arayüz serbest enerji terimi ve $T \Delta S$ entropi terimidir. Azalan parçacık boyutlu ara yüzey alanı nedeniyle ΔG_I terimi daima pozitifdir. Bununla birlikte, $T \Delta S$ dağılımın oluşumu için uygundur, çünkü parçacık boyutunun azaltılmasıyla damlacık organizasyonunun farklı yollarının sayısı artar. İki durum arasındaki serbest enerji bariyeri ΔG^* nedeniyle, sistem uzun süre (aylar hatta yıllar boyunca) kinetik olarak kararlı (metastabil) kalır. En uygun duruma gelmeden önce (termodinamik açıdan kararlı), bu aktivasyon enerjisi aşılmalıdır.



Şekil 3.6 Kinetik olarak kararlı nanoemülsiyonların şematik diyagramı.

Termodinamik olarak kararsız nanoemülsiyon sistemleri, metastabil bir halde bulunabilir, dolayısıyla kinetik olarak kararlı olabilirler. Bir emülsiyon sistemi için farklı metastabil durumlar vardır ve en termodinamik açıdan kararlı durumlara ulaşana kadar emülsiyon bir metastabil durumdan diğerine geçer. Emülsiyonda bir aktivasyon enerjisi oluşturmak için, emülsiyon yapıcılar kullanılmalıdır (Yıldırım 2015).

3.4 NANOEMÜLSİYONLARDA FİZİKSEL YAPI VE KARARLILIK

Nanoemülsiyonlar, termodinamik açıdan kararsız sistemlerdir ve emülsiyon sistemlerinin kararlılığı çok farklı şekillerde bozulabilmektedir. Bunlar Ostwald damlacık büyümesi, koalesans, kremalaşma, sedimentasyon (çökme), flokülasyon ve faz değişimidir.

3.4.1 Ostwald Damlacık Büyümesi

Emülsiyonda, dağılmış halde bulunan küçük damlacıkların zaman içerisinde çözünmesi ve içeriklerinin daha büyük damlacıklara taşınmasıdır. Emülsiyon damlacık çapının giderek büyümesine neden olmaktadır.

3.4.2 Koalesans

Sürekli fazda filmlerin parçalanmasına ve iki damlacığın birleşip daha büyük tek bir damlacığa dönüşmesine neden olmaktadır. Geri dönüşümlü bir durum değildir. Yüzeyler arası filmin yapısı ile ilgilidir.

3.4.3 Kremalaşma- Sedimentasyon

Çökme (sedimentasyon), iç faz damlacıklarının aşağıya doğru göç etmesi olarak tanımlanırken, kremalaşma bu durumun tersine iç faz damlacıklarının yukarıya doğru göç etmesidir. Entropik kaynaklı kuvvetlerin neden olduğu Brownian hareketi, uzun bir süre tanecikleri asılı şekilde korumaktadır. Seyreltik sistemler için, kremalaşma/ sedimentasyon hızları eşitlik 3.2 Stokes eşitliği ile verilmektedir:

$$v = \frac{2r^2 (\rho - \rho_0)g}{9\eta} \quad (3.2)$$

r: Partikül/ damlacık yarıçapı,

η : Dış fazın viskozitesi,

ρ : İç faz damlacıklarının yoğunluğu,

ρ_0 : Dış faz damlacıklarının yoğunluğu,

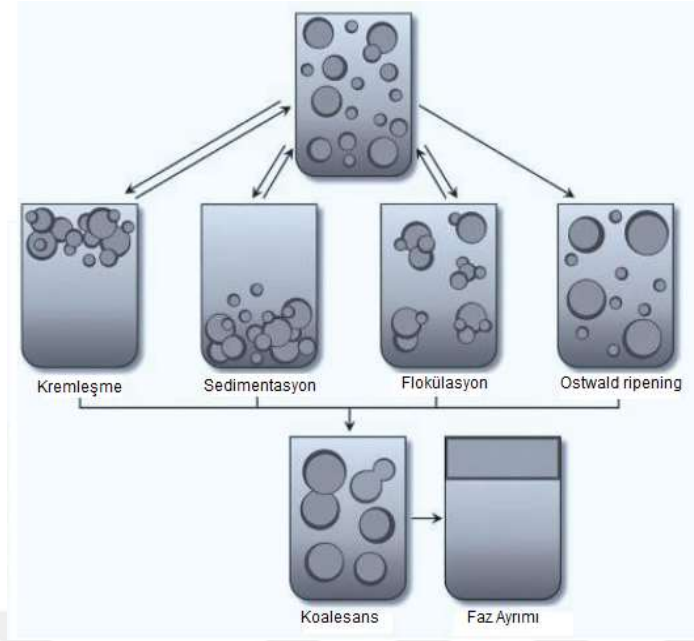
g: Yer çekimi ivmesidir (9.8 m/s²) .

3.4.4 Flokülasyon

Emülsiyonda dağılmış halde bulunan damlacıkların bir araya gelmesi olarak ifade edilen flokülasyon, geri dönüşümlü ve çoğunlukla kabul edilebilir bir durumdur.

3.4.5 Faz Değişimi

Emülsiyonun faz dönüşümüdür. Fazların oranının ve diğer bazı faktörlerin etkili olduğu bir durumdur. Uygun yüzey aktif maddelerin yeterli konsantrasyonda kullanılması ile faz değişimi riski en aza indirilebilmektedir (İlyasoğlu ve Nehir El 2010).



Şekil 3.7 Nanoemülsiyonların bozunma mekanizmaları (Yıldırım 2015).

3.5 GÖRÜNÜM

Nanoemülsiyonlar, mikro ölçekli emülsiyonların sahip olduğu fiziksel özelliklerden daha farklı ilginç fiziksel özelliklere sahiptir. Örneğin mikro ölçekli emülsiyonlar genelde görünür ışığın güçlü bir şekilde çoklu saçılımına neden olmaktadır, bu yüzden beyaz bir görünüme sahiptirler. Genelde ürün görünümü, ürünün mikro yapısına ve bileşimine bağlıdır. Ürünün görünümü, ürünün görünür ışıkla etkileşime girme yoluna bağlı olarak değişmektedir.

Nanoemülsiyonlardaki yapıların görünür dalga boylarından daha küçük olmasına bağlı olarak nanoemülsiyonlar optik olarak transparan görünürler. Tüm hacim fraksiyonları için görünür spektrumda geçiş hemen hemen %100'dür. Buna karşın ultraviyole spektrumda, ışığın dalga boyu taneciğin yarıçapına yaklaştıkça nanoemülsiyonlar ışığı önemli ölçüde saçarlar. Koenzim Q10 içeren nanoemülsiyonlarla ilgili yapılan bir çalışmada, 100nm'den daha büyük damlacıklar içeren nanoemülsiyonlar beyaz görünürken, 70-100 nm civarı damlacıklar içeren dispersiyonların opak görüldüğü, bunun altındakilerin ise saydam olduğu fark edilmiştir (İlyasoğlu ve El 2010).

3.6 KİMYASAL YAPI VE KARARLILIK

Genel olarak, kimyasal kararsızlıklar bileşenlerin kimyasal doğasını ve tek başlarına veya diğer birleşenler ile kimyasal reaksiyonlara girme eğilimini yansıtmaktadır. Oksidasyon ve ışık-indüklü oksidasyon, gıda formülasyonlarındaki en önemli sorunlardır. Nanoemülsiyonlarda unutulmaması gereken bir şey, küçük damlacıkların toplam yüzey alanının artmasına neden olması ve bu nedenle oksidasyon hızının artmasıdır. Renk kaybı, istenmeyen kimyasal reaksiyonlar (karotenoidlerin oksidasyonu gibi) ve kompleks oluşturma (demir iyonlarının birçok polifenol ile) ile ilişkilidir ve kolloidal dispersiyon formunda ilgili bileşenin daha az reaktif veya daha az çözünen formları kullanılarak kontrol edilmektedir (İlyasoğlu ve El 2010).

3.7 NANOEMÜLSİYONUN AVANTAJLARI VE DEZAVANTAJLARI

- Damlacık boyutları çok küçük olduğundan, damlacıklar üzerine etki eden yerçekimi kuvveti azalır ve böylece Brown hareketleri yerçekimi kuvvetinin üstesinden gelebilir. Bu sebeple saklama süresince kremalaşma veya çökme gözlenmez.
- Damlacık boyutlarının çok küçük olması ve damlacıkların etrafındaki dayanıklı yüzey etkin madde filmi sayesinde damlacıkların flokülasyonu ve koalesensi önlenir.
- Nanoemülsiyonların düşük yüzey gerilimine ve çok küçük damlacık boyutlarına sahip olması, damlacıkların deride tek düze olarak yayılmalarına, sistemin büyük yüzey alanına sahip olmasına ve damlacıkların deriye kolayca penetre olabılmesine sebep olur. Bu sebeple nanoemülsiyonlar deri yoluyla etkin madde taşınmasında etkili sistemlerdir.
- Nanoemülsiyonlar hazırlanırken herhangi bir kıvam arttırıcı kullanılmaz ise ve de düşük yağ oranına sahip olurlarsa akışkan yapıda olurlar. Bu şeffaf yapıları sayesinde ciltte güzel bir his bırakırlar. Nanoemülsiyonlar kişisel bakım ürünlerinin hazırlanmasında kullanılır.
- Nanoemülsiyon damlacıkları etrafında lamellar sıvı kristal yapı oluşturarak sistemin stabilitesini arttırabilirler.
- Çözünürlük sıkıntısı olan maddelerde çözünürlüğün arttırılmasına yardımcı olur.
- Çok küçük damlacık boyutların sahip olduklarından, filtrasyonla sterilasyon işlemi yapılabilir.

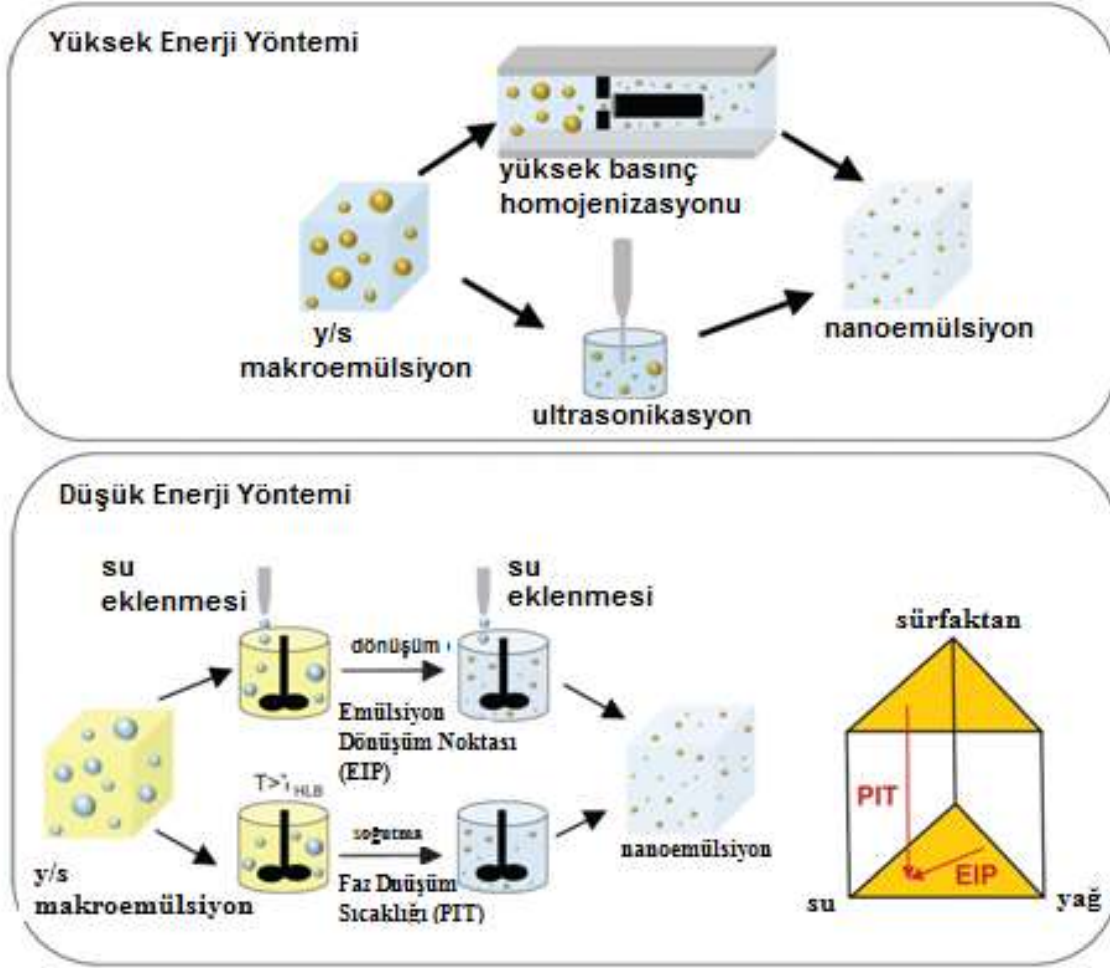
- Etkin maddeleri hapsedtikleri için çevre şartlarından korumuş olurlar.
- Oral yoldan uygulamada, küçük damlacık boyutları sebebiyle biyoyararlanımı arttırılır.
- Küçük damlacık boyutları ve sterilizasyona uygun olduklarından, parenteral uygulamalar için çok uygun sistemlerdir.
- Nanoemülsiyonların hazırlanabilmesi için özel hazırlama tekniklerinin gerekmesi ve oldukça pahalı olması, yüksek basınçlı homojenizatörler gibi özel cihazlar gerektirmektedir.
- Damlacık boyutunun çok küçük olması nedeniyle yüksek stabilite gösterirler. Ostwald damlacık büyümesi temel stabilite problemi (Ayata 2010).



BÖLÜM 4

NANOEMÜLSİYONLARIN HAZIRLANMASI

Nanoemülsiyon oluşum fiziğinin anlaşılması, nanoemülsiyon damlacık boyutunun kontrolü için büyük önem taşır. Nanoemülsiyonlar tipik olarak bir makroemülsiyonun önce hazırlandığı ve daha sonra ikinci bir aşama ile nanoemülsiyona dönüştürüldüğü iki aşamalı bir süreç içinde hazırlanır. Nanoemülsiyonların hazırlanmasında kullanılan yöntemler ikiye ayrılır. Bunlar yüksek enerjili ve düşük enerjili yöntemlerdir. Yüksek enerji gerektiren yöntemler, yüksek basınçlı homojenizatörler, yüksek ızda karıştırıcılar ve ultrasonik jeneratörler gibi yüksek mekanik enerji kullanılan yöntemleri kapsar. Düşük enerji gerektiren yöntemler, sistemlerin fizikokimyasal özelliklerinden ve bileşenlerin kimyasal enerjisinden yararlanılan yöntemlerdir. Düşük enerji gerektiren yöntemler; faz dönüşüm sıcaklığı (PIT) ve emülsiyon dönüşüm noktası (EIP) olmak üzere iki çeşittir (Gupta et al. 2016).



Şekil 4.1 Yağ/ su nanoemülsiyonlarının hazırlanması için yüksek enerjili ve düşük enerjili yöntemlere genel bakış (Gupta et al. 2016).

4.1 YÜKSEK ENERJİ GEREKTİREN YÖNTEMLER

Mikrometre aralığında damlacık boyutlarına sahip emülsiyonların hazırlanması yüksek enerji girişi içeren yüksek kesmeli karıştırma, yüksek basınçlı homojenizatörler veya ultrason jeneratörleri ile sağlanır. Nano emülsiyon oluşumu bu yöntemlerle oldukça basittir; çünkü enerji girişi yükseldikçe damlacık boyutu daha küçük olur. Yüksek enerji girişi, damlacıkları daha küçük parçalara bölebilen deforme kuvvetlere yol açarak laplace basıncının üstesinden gelir. Buna ek olarak, ara yüzeydeki yüzey aktif madde miktarının artması da laplace basıncını düşürür. Yani damlacık boyutunun daha küçük olması için daha fazla enerji ve surfaktan gereklidir (Fernandez et al. 2004). Bu yöntemde formülasyon parametreleri ve yöntemin uygulama parametreleri de çok önemlidir. Literatürde yağ/su veya yağ/yüzey etkin madde gibi oranların yöntemi etkilediği

sonuçlarına varılmıştır. Yüksek enerji gerektiren yöntemler çok küçük damlacıklar elde edilmek istendiğinde uygun bir yöntem değildir (Ayata 2010).

4.2 DÜŞÜK ENERJİ GEREKTİREN YÖNTEMLER

Faz Dönüşüm Sıcaklığı (PIT) ve Emülsiyon Dönüşüm Noktası (EIP) yöntemlerinde, temel olarak emülsiyonların faz değişimine sebep olan etmenlerden yararlanılır. Bir emülsiyonun faz değişimine sebep olan (su/yağ emülsiyonundan yağ/su emülsiyonuna veya yağ/su emülsiyonundan su/yağ emülsiyonuna değişimi) nedenler; fazların ilave sırası, yüzey etkin maddenin yapısı, faz hacim oranları, yüzey etkin maddenin çözünürlüğünün yüksek olduğu fazın dış faz olma eğilimidir. Emülsiyonların faz değişimine sebep olan etmenler; fazların ilave sırası, yüzey etkin maddenin yapısı, faz hacim oranları, yüzey etkin maddenin çözünürlüğünün yüksek olduğu fazın dış faz olma eğilimi, sıcaklığın değiştirilmesidir.

Fazların ilave sırasında aynı yüzey etkin madde kullanılarak, su fazı; yağ ve yüzey etkin madde karışımına eklenirse su/yağ, yağ fazı; su ve yüzey etkin madde karışımına ilave edilirse yağ/su emülsiyonu elde edilir. Yüzey etkin madde (sürfaktan); yağı seven yapıdaysa su/yağ, suyu seven yapıdaysa yağ/su tipinde emülsiyon oluşturma eğilimindedir. Suyun hacmi yağa göre daha fazla olursa yağ/su emülsiyonu, yağın hacmi suya göre daha fazla su/yağ emülsiyonu elde edilebilir. Yüzey etkin madde hidrofilik ise yağ/su, hidrofobikse su/yağ emülsiyonu elde edilebilir. Sıcaklığın değiştirilmesi emülsiyon stabilitesine, iki faz arasındaki yüzey gerilimine, ara yüzey filminin viskozitesine, yüzey etkin maddenin iki faz arasındaki çözünürlüğüne, fazların buhar basıncına ve viskozitesine ve dispers fazın termal olarak karışmasına etki eder.

İyonik olmayan polioksietilen (POE) yüzey etkin madde veya bazı iyonik yüzey etkin madde ilave edilen emülsiyonlar, yüzey etkin maddenin afinite karakterinin değişmesi ve sıcaklık artışı ile dönüşüme uğrar.

Elektrolit veya diğer ilaveler, iyonik yüzey etkin madde yapısının değişmesine ve dispers damlacıkların elektriksel potansiyelinin değişime uğramasına sebep olur ve böylece emülsiyonda dönüşüme sebep olabilirler. Uzun zincirli alkol veya yağ asitleri eklenmesi ile, yüzey etkin maddelerle etkileşebilir, bunun sonucunda yüzey etkin maddenin yapısı değişerek faz değişimine neden olabilirler (Ayata 2010).

4.2.1 Faz Dönüşüm Sıcaklığı Yöntemi (PIT)

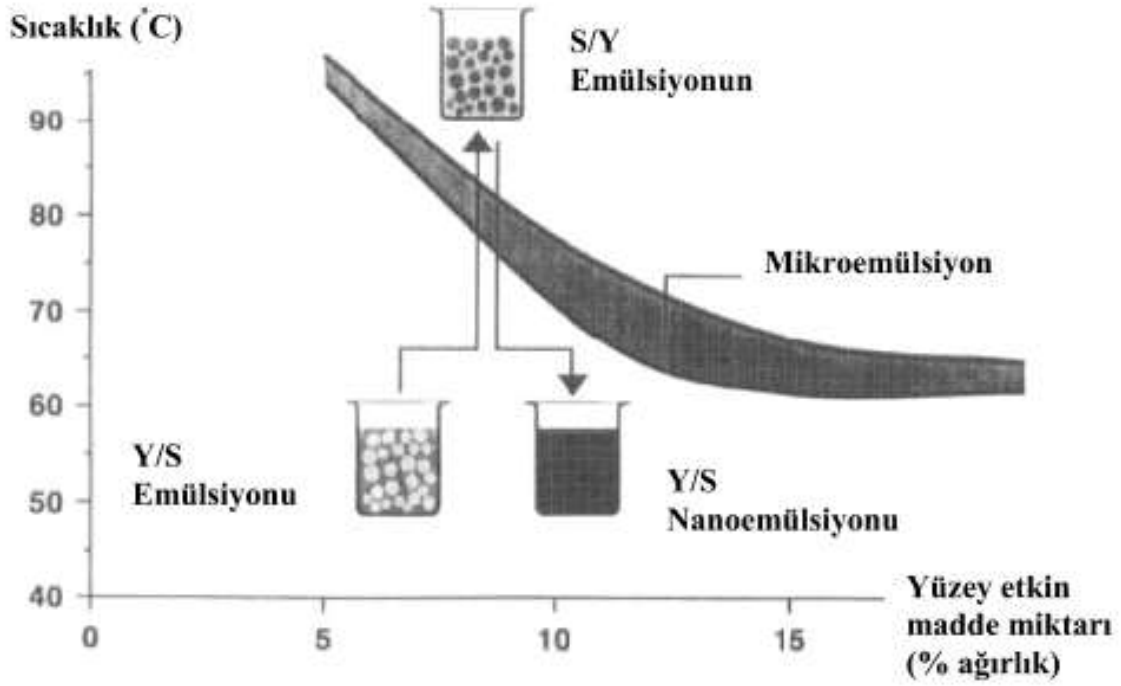
PIT emülsiyonlaşma yöntemi, 1968'de Shinoda ve Saito tarafından tanıtılmıştır. PIT emülsiyonlaşma yöntemi, sıcaklığın yol açtığı yüzey aktif madde eğriliğindeki değişime, veya bazı noniyonik sürfaktanların sıcaklık ile lipofilik-hidrofilik dengesindeki değişime (HLB-sıcaklık emülsiyonlaşma yöntemi) bağlıdır. Dolayısıyla bu yöntem sadece sıcaklıktaki değişikliklere karşı hassas sürfaktanlar, yani polioksietilen tipi noniyonik yüzey aktif cisimler için uygulanabilir.

Noniyonik sürfaktanların hidrofilikliği hidratizasyona bağlıdır. Noniyonik sürfaktanların sudaki çözünürlüğü, sıcaklık arttıkça azalır. Noniyonik sürfaktanın polar kısmına hidratlayan su moleküllerinin moleküler hareketi sıcaklık artışı ile birlikte artar. Yüzey aktif cismine hidrat yapan su moleküllerinin sayısı azalır ve hidrofilisitetik de azalır. İyonik olmayan bir sürfaktan çözeltisi yüksek sıcaklıkta bulanık hale (bulut noktası) gelir. PIT yöntemini kullanarak bir nano emülsiyon hazırlamak için, yağ, su ve iyonik olmayan yüzey aktif cisimleri oda sıcaklığında karıştırılır. Daha sonra karışım yavaş yavaş ısıtılır. Sonuç olarak, sürfaktan HLB'si kademeli olarak 7 den fazladan 7 den aza doğru değişir.

PIT'nin altındaki sıcaklıklarda, üçlü sistem (su/noniyonik sürfaktan/yağ) bir makro emülsiyon oluşumundadır ve molekülün lipofilik kısmı ile karşılaştırıldığında nispeten büyük bir hacim kazanarak, çoğunlukla iyonik olmayan yüzey aktif maddenin hidrofilik kısmı hidratlanır. Sürfaktan tek tabaka olarak, bir yağ/su emülsiyonu oluşturur ve su fazı için büyük bir pozitif eğriliğe sahiptir. Sıcaklık arttıkça iyonik olmayan sürfaktan kurutulur. Şekil 4.2 de gösterilen eğrilik su fazı için negatif olur ve bir su/yağ emülsiyon oluşur. Sıcaklıktaki değişiklikler, yüzey aktif maddenin baş grubunun hidratasyonunda bir değişikliğe yol açtığı ve bunun sonucunda eğriliğinde bir değişikliğe neden olduğu anlamına gelir. PIT veya ara sıcaklıkta, her faz için amfifiller afinitesi benzerdir, arayüz eğriliği çok düşüktür (neredeyse sıfıra yakın) ve sıfır eğriliği olan termodinamik olarak kararlı bir düzlemsel yapı ortaya çıkar ve katmanlı sıvı kristaller veya sürekli mikroemülsiyonlar oluşur.

Saito ve Shinoda, sıcaklığın hem su hem de sürfaktan fazı arasındaki ara yüzey gerilimi üzerindeki etkisini ve sürfaktan fazı ile yağ arasındaki etkiyi araştırmıştır. Su ve yağ fazı arasındaki arayüzey gerginliğinin sıcaklık ile belirgin bir şekilde değiştiğini ve PIT'ın

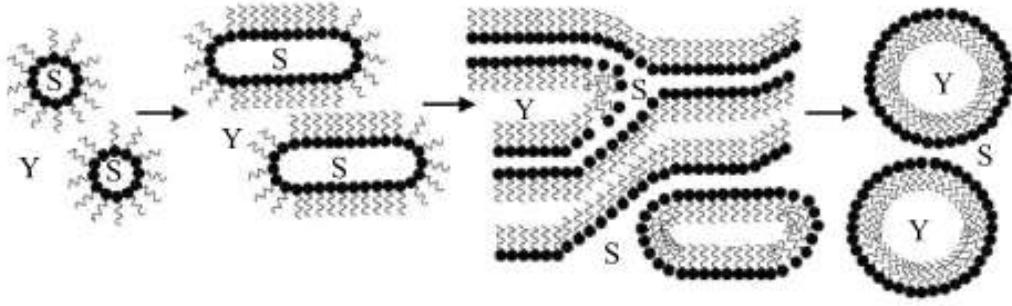
yakınında neredeyse sıfır olduğunu ve ortalama damlacık çapının da PIT'de küçük olduğunu, ancak sıcaklık ile arttığını ve emülsiyon damlacıklarının birleşim oranı, PIT'ye çok yakın olduğunu göstermişlerdir. Bu nedenle, bu yöntem kullanılarak hızlı soğutma veya ısıtma ile sıcaklığın hızlı bir şekilde PIT'den uzaklaşması gerekmekte olup, nikotinik emülsiyonlar elde etmek için bu yöntem kullanılmaktadır.



Şekil 4.2 Pıt yöntemi kullanılarak nanoemülsiyon hazırlanması (Ayata 2010).

4.2.2 Katastrofik Faz Ters Çevirme (CPI) veya Emülsiyon Dönüşüm Noktası (EIP)

PIC veya EIP yöntemi için temel kavram PIT yöntemine benzer. Yağ/su emülsiyonu PIC veya EIP yöntemleriyle hazırlandığında, surfaktan yağda çözülür ve daha sonra su kademeli olarak ilave edilir. Bu sistemde, yağ fazında bir su/yağ tipi emülsiyon oluşur. Su ilavesi ile su fazı hacmi kademeli olarak artar ve su/yağ emülsiyonu, kullanılan sistemin bileşimine göre belirlenen belirli bir bileşimde bir yağ/su emülsiyonuna dönüşür. Bir sistemin bileşimi uygun olduğunda, yağ/su nano emülsiyonu kolayca hazırlanır.



Şekil 4.3 EIP yönteminin uygulanışı sırasında sistemin lamellar sıvı kristal/veya sünger tip mikroemülsiyon fazından geçişi (Ayata 2010).

PIC veya EIP yöntemi için iyonik yüzey aktif maddeler düşük enerjili emülsifikasyon için kullanılabilirken sadece noniyonik yüzey aktif maddeler PIT yöntemi için kullanılabilir.

Solè ve ark. EIP emülsiyonlaşma yöntemi için bir su / potasyum oleat-oleik asit polioksietilen lauril eter / hekzadekan sistemi ile yüksek enerjili emülsiyonlaşma yöntemlerini (ultra sesli emülsifikasyon ve Ultra-Turrax emülsifikasyonu) karşılaştırmıştır. EIP yöntemi ile elde edilen damlacık boyutları, yüksek enerjili yöntemlerle elde edilenlerden çok daha düşüktür. Buna ek olarak daha küçük damlacık boyutlarının, geniş sıvı kristal bölgede ve yüksek su içeriklerine kadar genişletildiğinde oluştuğunu belirtmişlerdir. Bu durumda, emülsiyonlaşma işlemi sırasında, sistem, tüm yağın katılmasını sağlamak için sıvı kristal fazda yeterince uzun kalır.

Sadtler ve ark. EIP yöntemi ile hazırlanan nano emülsiyonların miniemülsiyon polimerizasyonu ile sentezlenen PEO kaplı polimer nanopartiküllerin hazırlanmasını araştırmıştır. Sürfaktan olarak Brij 98 (polioksietilen (20) stearil eter), yağ fazı için stiren ve hekzadekan kullanılmıştır. EIP yöntemi için uygun bölgeyi ve başlangıç noktasını (sürfaktan ile yağ oranını) belirlemek için su / Brij 98 / stiren sisteminin kısmi bir faz diyagramını hazırlamışlardır. Ayrıca, nano emülsiyonların hazırlanmasına su ilave etme oranının etkisi incelenmiştir. Polimerizasyondan sonra partikül boyutu 36 nm kadar düşmüştür. Nanopartikül sentezi için endüstriyel uygulamalarda EIP yönteminin çok çekici olabileceğini, çünkü nanoemülsiyon oluşumunda yüzey aktif madde yüksek konsantrasyona ihtiyaç duyulmadığı sonucuna varılmıştır (Gohtani and Prasert 2014).

Ayrıca, EIP yöntemi ile hazırlanan damlacık boyutunu, yüksek enerjili bir yöntemle (mikro akışkanlaştırma) hazırlanan damlacık boyutu ile karşılaştırmışlardır. Küçük damlacıkların ($d < 160$ nm) her iki yöntemle de üretilebileceği ancak yüksek enerji yöntemi ($SOR \geq 0.1$) için düşük enerjili yöntemden ($SOR \geq 0.7$) çok daha az sürfaktan gerektiğine işaret edilmiştir.

Sadtler ve ark. nanopartikül boyutlarının SOR'a bağlı olduğunu göstermiştir. Damlacık boyut dağılımının yalnızca su konsantrasyonundan ziyade sürfaktan ile yağ arasındaki ağırlık oranına bağlı olduğunu bildirmiştir.

Nanoemülsiyonlar genellikle oda sıcaklığında (ortam sıcaklığı) PIC ve EIP yöntemleriyle hazırlanır. Yu ve ark. yüksek sıcaklık etkisini araştırmıştır. Yu ve arkadaşları, PIC metoduyla hazırlanan su içinde yağ nanoemülsiyonu olan su/span80-tween 80 karışımı/ parafin yağı sisteminde yüksek sıcaklık etkisini araştırmıştır. Emülsiyon damlacık çapının hazırlanma sıcaklığının sıcaklığının 20°C ila 70°C arasında artmasıyla 10.3 mm'den 51 nm'ye düştüğünü bulmuşlardır. Su ve yüzey aktif madde-yağ-çözültisi arasındaki ara yüzey gerilimi sıcaklık artışı ile azalmıştır. Sıcaklık artışına karşı arayüzey gerginlik eğrisindeki azalma, damla büyüklüğüne benzemektedir. Damlacık hacim fraksiyonu ≤ 0.5 olduğunda, bu emülsiyonun boyut dağılımı, oda sıcaklığında beş aydan daha fazla stabil şekilde kalabilir. Bu sistemin HLB sıcaklığı 70°C 'nin üzerindedir.. Hazırlık sıcaklığındaki artışın yağ/su arayüzünde yüzey aktif maddenin adsorpsiyonunu arttırdığını ve yağ fazının viskoz direncini azalttığına karar verilmiştir. Yağ fazının sürekli fazdaki çözünmezliği Ostwald olgunlaşma sürecini engellemiştir (Gohtani and Prasert 2014).

Li ve vd., d-limonen nano emülsiyonları hazırlamıştır. Katastrofik faz ters çevirme (CPI) yöntemi adı verilen PIC yöntemi ile Tween 80 / yağ (d-limonen, zeytinyağı vb.) sistemi hazırlamışlardır. Nano emülsiyonlar, yağ fazı ve Tween 80'in bir karışımından, bir faz tersine çevirilinceye kadar yumuşak bir çalkantı ile yavaş yavaş su fazının eklenmesiyle hazırlanmıştır. SOR'un ve bitki yağlarının (zeytinyağı, mısırözü yağı, ayçiçeği yağı ve soya yağı) eklenmesinin bulanıklık, ortalama damla çapı ve ostwald olgunlaşması üzerine etkisini incelemiştir. Nanoemülsiyonlar yüksek yüzey aktif konsantrasyonda elde edilmiştir. ($SOR = 1.5$). Yağ fazı % 15'den az (w / w) zeytinyağı içerdiğinde, nanoemülsiyonlar hazırlanabilir. 28°C 'de saklanan D-limonen nanoemülsiyonları, 4°C 'de depolananlardan daha stabildir. Yağ fazına zeytinyağı eklenmesi zeytinyağının daha düşük çözünürlüğü nedeniyle nano emülsiyonların Ostwald olgunlaşmasına karşı stabilitesini arttırmıştır (Gohtani and Prasert 2014).



BÖLÜM 5

NANOEMÜLSİYONLARIN MEDİKAL ALANDA KULLANIMI

5.1 KOZMETİK

Nanoemülsiyonlar, kozmetiklerin kontrollü salımı için potansiyel araçlar olarak ve özellikle cilt katmanlarında aktif bileşenlerin optimum dağılımı için giderek daha da önem kazanmıştır. Lipofilik iç kısımları nedeniyle, nanoemülsiyonlar lipofilik bileşiklerin lipozomlara göre taşınması için daha uygundur. Lipozomlara benzer şekilde, aktif bileşenlerin deri penetrasyonunu desteklerler ve böylece derideki konsantrasyonlarını arttırırlar. Bir diğer avantaj ise, aktif maddenin cilde etkili bir şekilde taşınmasına izin veren, yüksek yüzey alanına sahip küçük boyutlu damlacık olmasıdır. Nanoemülsiyonlara kendi biyoaktif etkileri nedeniyle duyulan ilgi artmaktadır. Transepidermal su kaybını azaltabilir, bu da cildin bariyer işlevinin güçlendiğini gösterir. Nanoemülsiyonlarda, makroemülsiyonlarla gözlemlenen doğal kremalaşma, sedimentasyon, flokülasyon veya kaynaşma görülmez bu nedenle kozmetikte tercih edilir. Potansiyel olarak tahriş edici yüzey aktif maddelerin karışımı, üretim sırasında yüksek enerji ekipmanı kullanmak suretiyle genellikle engellenebilir.

New Jersey merkezli şirket, çok çeşitli cilt bakım ürünlerinin etkinliğini arttırmayı amaçlayan yeni bir nano bazlı jel üretmiştir. Nanojelin kolay formülasyon etrafında tasarlanmış benzersiz bir nanoemülsiyon taşıyıcı sistemi olduğu ve nanoteknoloji özelliklerinin getireceği ek avantajları olduğu belirtilmiştir. Nanojel teknolojisi, kullanımı kolay, su içinde yağ konsantrasyonundan mikron altı emülsiyonlar oluşturmak için basit bir işlem ve sistem sunar. Formül özellikle transepidermal su kaybını en aza indirmek, cilt üretimini arttırmak ve aktif maddenin penetrasyonunu sağlamak için uygundur. Bu özellikler, özellikle günümüzde piyasada bulunan bir dizi ürüne nanoteknolojinin dahil edildiği belirli alanlarda olduğu gibi nemlendirici ve yaşlanma karşıtı kremlerin yanı sıra güneş bakım ürünleri için de yararlı olacağını göstermektedir. Aynı şekilde, cilt bakım formülasyonlarına iyi bir cilt hissi,

formüleştiriciler için giderek daha önemli bir özellik kazandırmaya yardımcı olduğu da vurgulanmıştır. Nanoemülsiyonlar son yıllarda kişisel bakım ürünlerinde kozmetiklerin belirli deri katmanlarında aktif bileşenlerin optimum dağılımı olarak uygulanması amacıyla büyük ilgi görmüştür (Shah et al. 2010).

5.2 ANTİMİKROBİYEL NANOEMÜLSİYONLAR

Antimikrobik nanoemülsiyonlar, 200 ila 600 nm arasında değişen su içinde yağ damlalarıdır. Bunlar yağ ve sudan oluşur ve yüzey aktif maddeler ve alkol ile dengelenirler. Nanoemülsiyonlar, bakterilere (örneğin E. coil, Salmonella, S. aureus), zarflanmış virüslere (örneğin HIV, Herpes simplex'e), mantarlara (örn., Candida, Dermatophytes) ve sporlara (ör., Şarbon) karşı geniş spektrumlu bir faaliyete sahiptir. Nanoemülsiyon parçacıkları lipid içeren organizmalarla kaynaşmak için termodinamik olarak yönlendirilir. Nanoemülsiyonların cilt veya mukoza için tahriş edici olmayan konsantrasyonlarda mikroplara karşı seçici toksisitededir. Damlacıklar hedeflenen mikropları sağlıklı hücrelere zarar vermeden istikrarsızlaştırmak için yeterli enerjiye ve yüzey aktifliğe sahiptir. Sonuç olarak nanoemülsiyonlar daha önce sistemik antibiyotiklerle elde edilen belli bir topikal antimikrobiyalleri aktive edebilir (Shah et al. 2010).

5.3 MUKOZAL AŞI OLARAK NANOEMÜLSİYONLAR

Nanoemülsiyonlar, bağışıklık üretmek için rekombinant proteinleri veya inaktif organizmaları mukozal bir yüzeye vermek için kullanılmaktadır. İlk uygulamalar, bir influenza aşısı ve bir HIV aşısı olmuştur ve klinik araştırmalara devam edilmektedir. Nanoemülsiyonlar, mukozal yüzeye uygulanan proteinlerin adjuvanlaştırılmasına ve antijen sunan hücreler tarafından alınmayı kolaylaştırmasına neden olur. Bu, spesifik IgG ve IgA antikorunun yanı sıra hücresel bağışıklık üretimini içeren belirgin bir sistemik ve mukozal immün yanıt ile sonuçlanır. İnfluenzadaki ilk çalışma, hayvanların, emülsiyonla karışan virüse sadece tek bir mukozaya maruz kaldıktan sonra influenzaya karşı korunabildiğini göstermiştir (Shah et al. 2010).

5.4 HÜCRE KÜLTÜR TEKNOLOJİSİNDE NANOEMÜLSİYONLAR

Hücre kültürleri in vitro deneylerde veya antikorlar veya rekombinant proteinler gibi biyolojik bileşikler üretmek için kullanılır. Hücre büyümesini optimize etmek için, kültür ortamı bir

takım tanımlanmış moleküllerle veya kan serumu ile takviye edilebilir. Şimdiye kadar, hücrelerin yağda çözünen maddelerle tamamlanması çok zor olmuş ve bu lipofilik bileşiklerin sadece küçük miktarları hücreler tarafından emilmiştir. Nanoemülsiyonlar, yağda çözünen maddelerin memeli hücre kültürlerine taşınması için yeni bir yöntemdir. Aktarım, fosfolipidlerle dengelenen bir nanoemülsiyona dayanır. Bu nanoemülsiyonlar şeffaftır ve sterilizasyon için 0,1 mm'lik filtrelerden geçirilebilir. Nanoemülsiyon damlacıkları hücreler tarafından kolayca alınır. Dolayısıyla, kapsüllenmiş yağda çözünebilir maddeler, kültür hücrelerinde yüksek bir biyoyararlanıma sahiptir. Hücre kültürü teknolojisinde nanomülsiyonları kullanmanın avantajları; hücre kültürlerinde yağda çözünen ek maddelerin daha iyi alınmasıdır. Kültürdeki hücrelerin büyümesini ve canlılığını geliştirir ve hücre kültürlerinde yağda çözünen ilaçların toksisite çalışmalarına izin verir (Shah et al. 2010).

5.5 KANSER TEDAVİSİNDE VE HEDEFLENEN İLAÇ DAĞITIMINDA NANOEMÜLSİYON

D1-179 melanoma taşıyan hamsterlerdeki intravenöz (IV) enjeksiyonundan sonra Gd'nin biyo-dağılımı üzerine lipid nanoemülsiyon (Gd-nanoLE) içeren gadolinyum (Gd) formülasyonunun ve parçacık bileşiminin etkileri kanser nötron yakalanması için uygulanması açısından değerlendirilmiştir. Biyolojik dağılım verileri, Brij 700 ve HCO-60'ın Gd'nin kandaki tutulumunu uzattığını ve tümörlerde birikimini arttırdığını ortaya koymuştur.

Her bir Gd-nanol, 24 saat arayla bir kez veya iki kez enjekte edildiğinde, tümördeki Gd konsantrasyonu toplam Gd dozu ile iyi korelasyon göstermiş ve maksimum 189 mg / g ıslak tümöre ulaşmıştır. Bu maksimum Gd seviyesi, nötron yakalama terapisinde tümör büyümesini önemli ölçüde bastırmak için gereken sınırın üzerindedir. Sistemik kaçıışı en aza indirirken Paclitaxel'in (PCL) daha derin deri katmanlarına nüfuz etmesini sağlamak için bir nanoemülsiyon formüle edilmiş ve in vivo farmakokinetik performansı değerlendirilmiştir.

Ayrıca, PCL'nin peroral biyoyararlanımı artırılması için aynı formülasyon araştırılmıştır. Bu araştırma, deride yüksek molekül ağırlıklı lipofilik ilaç olan PCL'nin lokalizasyonu hakkında doğrudan kanıt sağlamaktadır (Shah et al. 2010).

Dahası, nanoemülsiyon formülasyonu, peroral biyoyararlanımı önemli ölçüde% 70'den fazla arttırmıştır. Geliştirilen nanoemülsiyon formülasyonu PCL'nin hem peroral hem de dermal olarak verilmesi için güvenli ve etkilidir.

Kamptotesin, geniş bir kanser türüne karşı etki eden bir topoizomeras I inhibitörüdür. Ancak instabilitesi ve toksisitesi klinik uygulama sınırlı kalmasına sebep olmaktadır. Bu çalışmanın amacı, bu sorunları ortadan kaldırmak amacıyla kamptotesin kapsüllemesi için akustik olarak aktif nanoemülsiyonlar geliştirmektir. Nanoemülsiyonlar, iç fazın çekirdekleri olarak sıvı perflorokarbonlar ve hindistancevizi yağı kullanılarak hazırlanmıştır. Bu nanoemülsiyonlar fosfolipidler ve / veya Pluronic F68 (PF68) ile stabilize edilmiştir. Nanoemülsiyonlar ortalama 220-420 nm'lik bir damlacık çapıyla yaklaşık % 100'lük yüksek ilaç yüklemesi ile hazırlanmıştır. Bu sistemlerde kamptotesin, gecikmiş ilaç salınımı göstermiştir. Daha düşük bir yağ konsantrasyonuna sahip nanoemülsiyonlardaki kamptotesin melanomlara ve yumurtalık kanseri hücrelerine karşı sitotoksikite sergilemiştir. Konfokal lazer tarama mikroskopisi, nanoemülsiyonun hücrelere geçmesini doğrulamıştır. 1 MHz'lik bir ultrason kullanılarak, düşük bir yağ konsantrasyonuna sahip sistemden kamptotesinin salınımının artması, bir ilaç hedefleme etkisi göstermiştir (Shah et al. 2010).

Çeşitli lipofilik anti-kanser ilaçlarının mikron altı y/s emülsiyonunda formüle edilmesinin avantajları açıktır. Emülsiyon sistemlerinin yağ fazı, lipofilik bileşik için bir çözündürücü olarak işlev görebilir. Bu nedenle, lipofilik ilaçların çözünürlüğü, bir emülsiyon sisteminde önemli ölçüde arttırılabilir ve bu da sulu bir çözeltiye kıyasla daha düşük uygulama hacimlerine yol açar. Buna ek olarak, lipofilik ilaçlar en içteki yağ fazına dahil oldukları için vücut sıvıları ve dokuları ile doğrudan temastan kenetlenirler. Lipid emülsiyonları, damarları ilaçların daha düşük konsantrasyonlarına maruz bırakarak veya doku tahriş edici bir araçtan kaçınarak intravenöz olarak uygulanan ilaçlarla ilişkili ağrıyı en aza indirebilir. Bu, propofol, diazepam, metohexital, klaritromisin ve etomidat ile gösterilmiştir.

Bir başka çalışmada, yağ fazı olarak bir tokoferol ve emülsiyon yapıcılar olarak bir tokoferil polietilen glikol-1000 suksinat (TGPS) ve poloksamer 407 kullanılan paklitakselin filtre ile sterilize edilebilir emülsiyon formülasyonunun formülasyonunu rapor etmiştir. Formülasyon farelerde B16 melanom tümörü modelinde çalışıldığında tolere edilebildiğini ve iyi bir etkinlik gösterdiğini kanıtlamıştır. Emülsiyon formülasyonları ayrıca, kanser kemoterapisinde intramüsküler ve intratümöral enjeksiyondan (su / yağ sistemleri) sonra ilaç salınımını uzatmak

için ve anti-kanser ilaçlarının lenfatik sistem yoluyla taşınmasını arttırmanın bir aracı olarak kullanılmayı vaat etmektedir. Pozitif yüklü nanoemülsiyon sistemlerinin negatif yüklü hücre yüzeyi ile daha verimli etkileşime girmesi beklenir ve pozitif yüklü nanoemülsiyonların bu yönü, kanser hücrelerine oligonükleotid verilmesi ihtimali için araştırılmıştır (Shah et al. 2010).

5.6 ÇEşİTLİ HASTALIK DURUMLARININ TEDAVİSİNDE NANOEMÜLSİYON

ABD merkezli bir şirket, osteoartrit (OA) ağrısı için potansiyel bir tedavi olarak nanoemülsiyon topikal diklofenak kremi geliştirmiştir. OA, ABD'de 30 milyondan fazla insanı etkileyen ağrılı bir durumdur ve başta yaşlı olmak üzere yetişkinler arasında fiziksel engelliliğin en sık nedenidir. Topikal diklofenak ayrıca yumuşak doku yaralanmaları, burkulma ve suşlar için tedavi olarak düşünülmektedir. Oral NSAID'lerin (Steroidsiz iltihap giderici ağrı kesiciler) gastrointestinal yan etkileri ve COX-2 nleyicilerinin kardiyovasküler riski nedeniyle OA hastalarının% 20'sinde tedavi göremediği tahmin edilmektedir. Gelişmiş bir güvenlik profili ile yaralanma alanını hedef alan yeterli ağrı kesici sunan bir topikal NSAID, bu hastalar için bir tedavi alternatifi olabilir. ABD'de OA tedavisi için onaylanmış topikal NSAID'ler yoktur. Nanoemülsiyon teknolojisi, sulu bir fazda düzgün şekilde dağılmış 100 ila 200 nm arasında ortalama damlacık boyutuna sahip, su içinde yağ emülsiyonlarının kararlı, mikron altı parçacıklardaki etkin çözücü içermeyen topikal ilaç tutunmasını içerir. Nanoemülsiyon teknolojisinin benzersiz özelliklerinden biri, toplam parçacık hacminin yüksek yüzdesinin, damlacıkların içindeki hidrofobik yağ çekirdeği tarafından işgal edilmiş olmasıdır. Bu, lipozomlar gibi diğer lipoidal taşıyıcılarla karşılaştırıldığında lipofilik bileşikler için yüksek çözünürlük kapasitesi sağlar. Viskozite veren ajanlar, cilde uygulanmak üzere istenen yan katı kıvamda kremler üretmek üzere nanoemülsiyon kalınlaştırma için kullanılır. Çözücü içermeyen nanoemülsiyon verme teknolojisinin deriye nüfuz edici özellikleri ve düşük irritansı, bu yeni topikal nanofizik malzemeyi lipofilik ilaçların efektif olarak transkutanöz olarak verilmesi için umut verici bir aday haline getirir. Nanoteknolojinin topikal uygulamaları, hayvan modellerinde kas ve eklemlere lipofilik ilaçların mkemmek bir hedefleme ile verilmesi şeklinde kanıtlanmıştır. Klinik ncesi veriler hayvan modellerinde pençe demini kullanarak, ticari formülasyonlar ile karşılaştırıldığında, nanoemülsiyon kremlerinde kapsüllenmiş NSAID'ler ile arttırılmış anti-inflamatuar aktivite göstermiştir. Radyoaktif olarak işaretlenmiş diklofenak ve ketoprofen içeren nanoemülsiyon topikal kremleri kullanarak farmakokinetik çalışmalar, cilt yoluyla ilaç penetrasyonunu değerlendirmek ve lokal dokuyu (kas ve eklem) ve ilaçların plazma seviyelerini topikal

uygulama sonrasında belirlemek için gerçekleştirilmiştir. Oral uygulama ile karşılaştırıldığında diklofenak ve ketoprofen, nanoemülsiyon topikal kremler yoluyla uygulandığında, plazmada 4-6 kat daha düşük ilaç konsantrasyonu, kas dokusunda 60-80 kat daha fazla ilaç ve eklemlerde yaklaşık 9 kat daha fazla ilaç ortaya çıkmıştır (Shah et al. 2010).

Diklofenak içeren bir nanoemülsiyon topik krem ürünü, 25 sağlıklı gönüllü insanda, cilt tahriş çalışmasında test edilmiştir. Topikal uygulama sonrasında hiçbir tahriş veya alerji gözlemlenmemiştir. Nanoemülsiyon diklofenak kremi, 2006 yılında 16 sağlıklı erkek ve kadın gönüllüde daha test edilmiştir. Çalışma nanoemülsiyon diklofenak kreminin üç günlük verilisinin ardından 14 günlük takiple topikal kremin emniyeti, tolerabilitesi ve farmakokinetik profilini değerlendirmiştir. Farmakokinetik analiz, tekrarlanan günlük uygulamalardan sonra diklofenakın hiçbir ilaç birikimi olmadan düşük sisteme maruz kaldığını göstermiştir. Nanoemülsiyon teknolojisinin cilt nüfuz özelliği, düşük irritansı, lipofilik ilaçların artan transkutanöz ilaç penetrasyonunu sağlamak için umut vericidir (Shah et al. 2010).

5.7 AZ ÇÖZÜNEN İLAÇLARIN ORAL ALIM İÇİN NANOEMÜLSİYON FORMÜLASYONLARI İLE İYİLEŞTİRİLMESİ

Hidrofobik ilaçların oral biyoyararlanımını arttırmak için nanoemülsiyon formülasyonları geliştirilmiştir. Paklitaksel, bir model hidrofobik ilaç olarak seçilmiştir, iç yağ fazı olarak çam fıstığı yağı, birincil emülsiyonlaştırıcı olarak yumurta lesitini ve harici faz olarak su ile su içinde yağ (y / s) nanoemülsiyonlar yapılmıştır. Emülsiyonlara sırasıyla pozitif ve negatif yük vermek için stearylamin ve deoksikolik asit kullanılmıştır. Formüle edilmiş nanoemülsiyonlar, 90-120 nm'lik bir parçacık boyutu aralığına ve 134 mV'den 245 mV'ye kadar değişen bir zeta potansiyeline sahiptir. Oral uygulamayı takiben, kontrollü sulu çözeltiye göre nanoemülsiyonda uygulandığında, sistemik dolaşımda anlamlı ölçüde daha yüksek bir paklitaksel konsantrasyonu gözlemlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, nanoemülsiyonların hidrofobik ilaçların oral biyoyararlanımını artırabilecek yeni formülasyonlar vaat ettiğini göstermektedir (Shah et al. 2010).

Ubiquinone olarak da bilinen Coenzim Q10 (CoQ10), hücrelerdeki enerji üretiminde kullanılır ve bir anti-oksidan görevi görür. CoQ10 son derece lipofilik olduğundan topikal ve oral biyoyararlanım çok düşüktür. Absorpsiyonu iyileştirmek için çeşitli girişimler yapılmıştır. Son teknik gelişmeler, Co'ların dokulara nüfuz etmesinin biyoyararlanımı önemli

ölçüde arttırdığını ortaya koymaktadır. CoQ10'un uygulanması, bireysel nano damlacıklarda tokoferol ve CoQ10 içeren yeni CoQ10 çift nanoemülsiyonların geliştirilmesi ile daha da geliştirildi. Buna ek olarak, bu nanoemülsiyonlardaki CoQ10 konsantrasyonu, bir aşırı doymamış CoQ10 nanoemülsiyonun geliştirilmesiyle artırılabilir (Shah et al. 2010).

5.8 TRANSDERMAL AKTARIM İÇİN NANOEMÜLSİYONLARIN KULLANIMI

İn vitro ve in vivo verilerden, gelişmiş nanoemülsiyonların, aceklofenak'ın transdermal ilaç aktarımında büyük bir potansiyele sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Ketoprofen içeren sistemin nanoemülsiyonları yüksek derecede kararlılık göstermiştir. Ketoprofen yüklü nanoemülsiyonlar kontrol ile karşılaştırıldığında fare derileri vasıtası ile in vitro permeasyon oranını arttırmıştır. Çalışma, nanoemülsiyonun karvedilolün çözünürlüğünü ve in vitro transdermal iletimi artırma potansiyelini değerlendirmek için geliştirilmiştir. Hazırlanan nanoemülsiyonlar fiziksel denge testlerine tabi tutulmuştur. Karvedilolün sıçan karın derisinden transdermal geçirgenliği Keshary Chien difüzyon hücresi ile belirlenmiştir. Nanoemülsiyon formülasyonlarında, kontrol veya ilaç yüklü düzgün komponentlere kıyasla, sabit durum fluksunda (Jss) ve geçirgenlik katsayısında (Kp) belirgin bir artış (P, 0.05) gözlenmiştir. Tahriş çalışmaları, optimize edilmiş nanoemülsiyonun tahriş edici olmayan bir transdermal beslenme sistemi olduğunu göstermektedir (Shah et al. 2010).

Selektif bir siklo-oksijenaz 2 inhibitörü olan selekoksib artrit ve osteoartrit tedavisinde oral olarak önerilmiştir. Uzun süreli selekoksibin oral yoldan verilmesi ciddi gastrointestinal yan etkilere neden olur. Selekoksibin cilt nüfuz etme mekanizması FTIR spektral analizi, DSC termogramı, aktivasyon enerjisi ölçümü ve histopatolojik inceleme ile değerlendirilmiştir. Optimize edilmiş nanoemülsiyon, Wistar erkek sıçanlar üzerinde farmakokinetik (biyoyararlanım) çalışmalarına tabi tutulmuştur. Bir cilt numunesinin fotomikrografisi, lipid bilayerleri farklı boşluklar olarak parçaladığını ve boş alanların epidermal bölgede görülebildiğini göstermiştir. Transdermal olarak uygulanan nanoemülsiyon ve nanoemülsiyon jel ile selekoksit emilimi, oral kapsül formülasyonuna kıyasla biyoyararlanımda 3.30 ve 2.97 kat artma ile sonuçlanmıştır. Cilt nüfuz etme mekanizması ve farmakokinetik çalışmaların sonuçları, nanoemülsiyonların zayıf çözünür ilaçların deri geçirgenliğini ve biyoyararlanımını arttırmak için potansiyel araçlar olarak başarıyla kullanılabileceğini göstermiştir (Shah et al. 2010).



BÖLÜM 6

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Ozonlanmış zeytinyağı Aktifoks Ozonid'den (İzmir, Türkiye) satın alınmıştır. Ozonlanmış yağın peroksit değeri, iyot değeri ve asitliği sırasıyla 247.01 meqO₂ / kg, 10.21 Wijs ve % 36.07 (oleik asit) olarak belirlenmiştir (TÜBİTAK-MAM ile analiz edilmiştir). Tween®40 ve Tween®80 Sigma-Aldrich (Almanya) 'dan satın alınmıştır.

6.1 EMÜLSİYON HAZIRLAMA

Nanoemülsiyon oluşumu daha önce tarif edilen EIP yöntemine göre hazırlanmıştır (Ayata, 2010). Kısaca, kendiliğinden emülsiyonlaştırma organik faza manyetik karıştırma ile su eklenerek gerçekleştirilmiştir. İlk olarak; organik faz, yüzey aktif madde ve yağın 30 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmasıyla elde edilmiştir. Daha sonra sulu faz 60 dakika boyunca, manyetik karıştırıcı ile sistem karışmaya devam ederken, organik faza eklenmiştir.

Emülsiyonlar farklı SOR oranlarında surfaktan ve su miktarı değiştirilerek hazırlanmıştır. Örneğin; SOR= 2 olan bir sistemi hazırlamak için, 10 g surfaktan ve 5 g yağ karıştırılır. Daha sonra 35 g su 1 saat boyunca eklenir.

6.1.1 İncelenen Özellikler

4 ana değişken test edilmiştir. SOR oranı, surfaktan konsantrasyonu, karıştırma hızı, surfaktan tipinin nanoemülsiyon boyutu üzerine etkisi incelenmiştir.

6.1.1.1 Sor Oranı Etkisi

Toplam surfaktan içeriği % 5 oranında sabit tutularak yağ ve su oranları değiştirilerek, SOR oranı 0.5, 1, 2, 2.5 olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

6.1.1.2 Surfaktan Konsantrasyonu Etkisi

Belirlenen en iyi iki SOR oranlarında surfaktan oranları % 1, % 3 ve % 5 şeklinde değiştirilerek gerçekleştirilmiştir.

6.1.1.3 Karıştırma Hızı Etkisi

Manyetik karıştırıcı 750 rpm ve 1500 rpm olacak şekilde iki farklı şekilde gerçekleştirilmiştir.

6.1.1.4 Surfaktan Tipi Etkisi

Surfaktan tween 40 ve tween 80 olacak şekilde iki farklı şekilde gerçekleştirilmiştir.

Aşağıda hazırlanan nanoemülsiyonlarda kullanılan surfaktan cinsi, karıştırma hızı, SOR oranı ve yağ, yüzey aktif madde, su yüzdeleri verilmiştir.

Çizelge 6.1 Farklı nanoemülsiyon sistemlerinde kullanılan bileşenlerin yüzdeleri.

Formülasyon	Surfaktan	Karıştırma hızı (rpm)	SOR	Bileşen Yüzdesi (%) (v/v)		
				Yağ	Surfaktan	Su
F1	Tween 40	750	0.5	10	5	85
F2	Tween 40	750	1	5	5	90
F3	Tween 40	750	2	2.5	5	92.5
F4	Tween 40	750	2.5	2	5	93
F5	Tween 40	750	2	0.5	1	98.5
F6	Tween 40	750	2	1.5	3	95.5
F7	Tween 40	750	2.5	0.4	1	98.6
F8	Tween 40	750	2.5	1.2	3	95.8
F9	Tween 40	1500	2	1.5	3	95.5
F10	Tween 40	1500	2	2.5	5	92.5
F11	Tween 40	1500	2.5	1.2	3	95.8
F12	Tween 40	1500	2.5	2	5	93
F13	Tween 80	750	2	1.5	3	95.5
F14	Tween 80	750	2	2.5	5	92.5
F15	Tween 80	750	2.5	1.2	3	95.8
F16	Tween 80	750	2.5	2	5	93

6.2 EMÜLSİYON KARAKTERİZASYONU

6.2.1 Termodinamik Stabilite

Seçilen formülasyonların fiziksel stabilitesini değerlendirmek için farklı termodinamik kararlılık testlerine tabi tutulmuştur.

6.2.1.1 Isıtma Soğutma Döngüsü

Her bir sıcaklıkta 48 saat bekletilen bir inkübatör (Nüve, Almanya) içinde buzdolabı sıcaklığı (4 °C) ile 45 °C arasında altı döngü yapılmış ve bulanıklık ve faz ayrımı göstermeyen formülasyonlar bu sıcaklıklar santrifüje tabi tutulmuştur.

6.2.1.2 Santrifüjleme

Formülasyonlar, 1500 rpm'de 30 dakika santrifüje tabi tutulmuş ve faz ayrımı gözlemlenmiştir. Dondurarak-çözülme döngüsü için görsel gözlem ile teyit edilen herhangi bir faz ayrımını göstermeyen formülasyonlar alınmıştır.

6.2.1.3 Dondurarak Çözülme Döngüsü

Bu devirler 48 saat boyunca -20°C ile 25°C arasındaki formülasyonlar için gerçekleştirilmiştir. Bir dondurma-çözme döngüsü, -20 °C'de 24 saat süreyle nanoemülsiyonun depolanmasını, ardından 24 sat süreyle 25 °C'de saklanmasını içermektedir. Bu üç buz eritme döngüsü gerçekleştirilmiştir ve nanoemülsiyonun fiziksel stabilitesi gözlemlenmiştir (Gupta et al. 2010).

6.2.2 Partikül Büyüklüğü

Ortalama parikül boyutu ve polidispersite indeksi Malvern Mastersizer 2000 kullanılarak ölçülmüştür. Hazırlanan her biri 20 µL örnekler, 1 ml saf su içinde seyreltilmiştir.

6.2.3 Zeta Potansiyel

Emülgatörler sadece mekanik bir bariyer olarak değil aynı zamanda yaklaşan yağ damlacıkları arasında itici elektrik kuvvetleri üretebilen ve kaynaşmaya engel olan yüzey yükleri olan zeta potansiyeli yardımı ile oluşurlar. Negatif zeta potansiyeli ne kadar yüksekse, damlacıkların net yükü o kadar yüksek olur ve emülsiyon daha kararlıdır. Zeta potansiyel değerleri -30 mv'den düşükse genel olarak yüksek bir fiziksel kararlılık derecesine işaret eder. Emülsiyon kararlılığının kontrolünde damlacık ebadı ve zeta potansiyeli belirgin parametrelerdir (Gupta et al. 2010). Aşağıda anlatılan prosedüre göre zeta potansiyel incelenmiştir.

Ortalama parikül boyutu ve polidispersite indeksi Malvern Mastersizer 2000 kullanılarak ölçülmüştür. Hazırlanan her biri 20 µL örnekler, 1 ml saf su içinde seyreltilmiştir (Araújo et al. 2010). Emülsiyon kararlılığını değerlendirmek için bu özellikler 3 ay boyunca izlenmiştir.

6.2.4 Kinetik Stabilité- Kremleşme Testi

Kremleşme, dağınık faz ve dispersiyon ortamı arasındaki belirgin yoğunluk farkına dayanan emülsiyon fazlarının ayrıştırılmasıdır. Kremleşme istenmeyen bir süreçtir. bununla birlikte, düzgün sarsıldığında geri döndürülebilir bir süreçtir. Kremleşmeyi önlemek için, dağınık fazın ve dispersiyon ortamının yoğunluk farkı çok yüksek olmamalıdır (Ali vd. 2013).

Termodinamik stabiliteden geçen formülasyonlar, kremleşme testi kullanılarak kinetik stabilite çalışmalarına tabi tutulmuştur. Nanoemülsiyon numuneleri (10 mL) test tüplerine (13 mm iç çap ve 100 mm yükseklik) aktarılmıştır ve daha sonra oda sıcaklığında 30 gün boyunca depolanmıştır. Depolamadan sonra, seçilen zaman aralıklarında, üstte bir krem tabakasına ve altta şeffaf (veya bulanık) bir serum tabakasına ayrılıp ayrılmaması halinde nanoemülsiyonlar gözlemlenmiştir. Daha sonra, yerçekimine karşı fiziksel görünüşlerine göre kararlı ya da kararsız olarak kategorize edilmiştir.

6.2.5 Sıcaklık Kontrollü Stabilité- pH ve Viskozite Ölçümleri

Nanoemülsiyonlar 30 gün süreyle 25 °C ve 4 °C'de depolanmış ve önceden belirlenmiş zaman aralıklarında viskozite ve pH değerleri belirlenmiştir. Nano emülsiyonların viskozitesi

Fungilab Smart L Viskometre (Fungilab, İspanya) ile bir AISI 316 mili kullanılarak belirlenmiştir. Formülasyonların görünür pH'sı bir pH metre ile ölçülmüştür (Hanna HI 2020, UK).

6.2.6 Partikül Büyüklüğü ve Morfoloji

Nanoemülsiyonların boyut, boyut dağılımı ve zeta potansiyeli, Zetasizer Nano-S (Malvern, İngiltere) ile dinamik ışık saçılması (DLS) ile analiz edilmiştir. Analiz, 25 ° C'lik bir sıcaklıkta üç kez gerçekleştirilmiştir ve emülsiyonlar analizden önce bir oran (1: 100 v / v) oranında damıtılmış su ile seyreltilmiştir. Polidispersite indeks aralığı 0-1 arasındadır. Nanoemülsiyon morfolojisi, alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (FESEM, FEG450, Quanta) ile 5 ila 10 kV arasındaki çalışma voltajı ile görüntülenmiştir. Bir damla seyreltik nano emülsiyon bir karbon filmine damlatılmıştır ve örnekler altın ile argon atmosferi altında kaplanmıştır.

6.2.7 ¹³C- NMR Analizi

Zeytinyağı ve nanoemülsiyonların (taze ve 30 günlük depolamadan sonra) nükleer manyetik rezonans (¹³C NMR) spektrumları, 300 MHz / 54 mm Ultra Shield Plus NMR kullanarak bir tetrametilsilan dahili standardı ile 17 ° C'de CDCl₃ içinde analiz edilmiştir (Burker, Ultra long hold time).

6.2.8 Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR)

Zeytinyağı ve nano emülsiyonların kızılötesi spektrumu(taze ve 30 günlük depolama sonrası) 400-4000 cm⁻¹ aralığında Fourier transform infrared spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, ABD) kullanılarak ozonun nanoemülsiyonlar içinde varlığını doğrulamak üzere belirlenmiştir.

6.2.9 Antimikrobiyal Aktivite Testi- Zon Testi

Ozonlanmış yağ ve ozonlanmış yağ nanoemülsiyonlarının bakteri suşlarında seyreltmelerle (1:1) (v/v) oluşan antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. Ozonlanmış yağ ve ozonlanmış yağ nanoemülsiyonları sırasıyla zeytinyağı ve su ile seyreltilmiştir. Negatif kontrol zeytinyağıdır. Test edilen suşların hassasiyetini belirlemek için pozitif referans standartları

olarak Gentamisin (5 mg / ml) kullanılmıştır. Numuneler (5 uL), Gram pozitif *Staphylococcus aureus*'a (Amerikan Tipi Kùltür Koleksiyonu No.6538) ve Gram-negatif *Escherichia coli*'ye (American Type Culture Collection No.25922) karşı inhibisyon yöntemi kullanılarak değeriendirilmiştir. Tryptic Soy Broth, bakteri suşlarının büyütülmesi için (gece boyunca 37 °C'de ve aerobik koşullar altında) kullanılmıştır. Daha sonra agar seyreltme yöntemi bakteri suşları ile 37 °C'de (pH = 7.4) 24 saat boyunca değeriendirilmiştir. İnhibisyon bölgesinin çapı (D, mm) ölçülmüştür. Tüm deneyler üçer defa yapılmıştır.

6.2.10 İstatiksel Analiz

Tüm veriler, üç benzer deneyin ortalama $\pm$ standart sapmaları olarak ifade edilmiştir.



BÖLÜM 7

BULGULAR VE TARTIŞMALAR

7.1 OZONLANMIŞ YAĞ SİSTEMLERİNİN HAZIRLANMASI

Ozonlanmış yağ nanoemülsiyon sistemlerinin optimum formülasyonu, nanoemülsiyon sistemleri su, yüzey aktif madde ve yağ ile uygun oranlarda formüle edilebildiğinden yağ-surfaktan-su kombinasyonlarının değerlendirilmesi ile belirlenmiştir. Ozonlanmış nanoemülsiyon formülasyonları Çizelge 6.1’de gösterilmiştir. Bu çalışmada, temelde, bir nanoemülsiyonun uygun tasarımı göz önüne alınarak dört önemli faktör araştırılmıştır. Ozonlanmış zeytinyağına en uygun bileşimleri değerlendirmek için surfaktan / yağ oranının (SOR), surfaktan konsantrasyonunun, karıştırma hızının ve surfaktan türünün partikül çapı ve emülsiyon stabilitesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

7.2 TERMODİNAMİK STABİLİTE

Nanoemülsiyonlar, birbiri içine gerekli yüzey aktif madde içeren ara yüz tabakasına sahip küçük küresel damlacıklar şeklinde dağılmış iki fazdan oluşur (McClements and Rao 2011). Bu sistemle temel olarak termodinamik kararlılıklarından farklı olan nanoemülsiyon ve mikron altı emülsiyonlar hazırlamak mümkündür. Nanoemülsiyonlar termodinamik olarak kararlı iken, submikronlar termodinamik olarak kararsızdır ve bu da toplanmaya, topaklaşma, birleşmeye ve nihai faz ayrılmasına neden olur (Uluata vd. 2016).Başlangıçta, ozonlanmış yağ nanoemülsiyonları, Çizelge 6.1’de (F1 ila F4) listelenen SOR (0.5, 1, 2 ve 2.5) değişimi açısından formüle edilmiştir.

Çizelge 7.1 750 rpm'de Tween 40 ile formüle edilen ozonlanmış yağ nanoemülsiyonlarının termodinamik stabilitesi.

Nanoemülsiyon Formülasyonu	SOR	Sürfaktan (%) (v/v)	Termodinamik Stabilite		
			Isıtma-Soğutma Döngüsü	Santrifüj	Dondurma-Çözme Döngüsü
F1	0.5	5	X	X	X
F2	1.0	5	X	X	X
F3	2.0	5	√	√	√
F4	2.5	5	√	√	√
F5	2.0	1	X	X	X
F6	2.0	3	√	√	√
F7	2.5	1	X	X	X
F8	2.5	3	√	√	√

Formülasyonlar (F1 ila F4) için termodinamik kararlılık testleri kullanılmış ve sonuçlar Çizelge 7.1'de gösterilmiştir. Çizelge 6.1 de görüldüğü gibi F3 ve F4, formülasyonlarında 2 ve 2.5 SOR ile hazırlanan testlerden geçirilmiştir.

Yüzey aktif madde konsantrasyonunun termodinamik kararlılık üzerindeki etkisini değerlendirmek için, termodinamik olarak geçirilmiş ozonlanmış yağ nanoemülsiyonları Çizelge 6.1'de listelenen farklı yüzey aktif madde konsantrasyonu yüzdeleri (% 1 ve % 3) ile yeniden formüle edilmiştir. Sonuçlar, % 1 (v / v) yüzey aktif cismi ile formüle edilen ozonlanmış yağ nanoemülsiyonları (F5 ve F7) termodinamik olarak kararsızdır (Çizelge 7.1). Böylece, daha iyi analizler, SOR'ların (2 ve 2.5) ve sürfaktan konsantrasyonlarının (% 3 ve % 5 (v/v)) optimize edilmiş termodinamik olarak stabil ozonlanmış yağ nanoemülsiyon formülasyonları ile gerçekleştirilmiştir.

7.3 PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜ, DAĞILIM VE ZETA POTANSİYELİ

7.3.1 Sürfaktan- Yağ Oranının (SOR) Etkileri

Başlangıçta, 750 rpm karıştırma oranında yüzey aktif madde olarak Tween 40 ile üretilen emülsiyonların ortalama parçacık çapı, parçacık boyutu dağılımı ve zeta-potansiyeli üzerindeki SOR etkisi araştırılmıştır.

Çizelge 7.2 Seçilen ozonlanmış yağ nanoemülsiyonlarının, 750 rpm'de Tween 40 ile formüle edilmiş partikül boyutu analizi ve 30 gün sonraki stabilitesi (kremleşme testi).

	0. GÜN			30. GÜN			
Nanoemülsiyon Formülasyonu	d(nm)	pdI	Zeta potansiyeli (mV)	d(nm)	pdI	Zeta potansiyeli (mV)	Kremleşme Testi
F6	212.7±0.2	0.040	-28.3±0.1	238±0.8	0.176	-18.4±1.2	√
F3	225.2±0.3	0.091	-21.5±0.2	276±1.5	0.127	-12.8±0.9	√
F8	158.3±0.4	0.074	-21.2±0.3	244±1.3	0.124	-16.3±1.3	√
F4	155.1±0.2	0.063	-18.5±0.5	262±0.9	0.291	-13.5±1.1	√

Çizelge 7.2 de görüldüğü gibi, ortalama partikül boyutu SOR'a oldukça bağlıdır, artan SOR ile parçacık boyutu azalmıştır. Artan SOR ile parçacık boyutunun azaltılması, daha önce başka araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir (Ostertag et al. 2012, Polychniatou et al. 2014, Uluata et al. 2016, Komaiko and McClements. 2015).

Damlacıkların emülsiyonda nasıl dağıldığını değerlendirmek için, ozonlanmış yağ nanoemülsiyonlarının PDI'sı belirlenmiştir (Çizelge 7.2). Sonuçlar, yüksek kararlılıkla monodispers emülsiyonları gösteren düşük PDI değerlerini (<0.1) göstermektedir (Çizelge 7.2). İncelenmesi gereken bir başka önemli parametre, karşılıklı elektrostatik itme nedeniyle emülsiyonların stabilitesine karşılık gelen nanotermilerin zeta potansiyelidir (ζ potansiyeli). Z-potansiyelindeki (sıfıra doğru) artış, hızlı sedimentasyona neden olacak daha büyük partiküllerin oluşumunu gösterir (Polychniatou, 2014). Çizelge 7.2’de görüldüğü gibi, yüksek SOR'larda (2.5) ortalama parçacık boyutunda bir azalma olmasına rağmen, bu nano emülsiyonların ζ-potansiyelinde hafif bir artış tespit edilmiştir.

7.3.2 Karıştırma Hızının Etkisi

Yüzey aktif cismi olarak Tween 40 vasıtasıyla üretilen emülsiyonların ortalama parçacık çapı, parçacık boyutu dağılımı ve zeta-potansiyeli üzerindeki karışma hızının etkisi 1500 rpm'de karıştırma hızının artırılmasıyla araştırılmıştır.

Çizelge 7.3 1500 rpm'de Tween 40'a göre seçilmiş ozonlanmış yağ. nanoemülsiyonlarının partikül boyutu ve 30 gün sonraki stabilitesi (kremleşme testi).

	0 GÜNLÜK			30 GÜNLÜK			
	d(nm)	PdI	Zeta	d(nm)	pdI	zeta	Kremleşme testi
F9	240.4±0.5	0.163	-25.2±0.2	216.2±1.0	0.182	-20.1±0.6	X
F10	315.4±0.2	0.283	-26.0±0.1	372.0±0.9	0.298	-19.6±0.8	X
F11	250.5±0.2	0.270	-23.9±0.3	246.2±1.3	0.232	-21.7±0.3	X
F12	318.2±0.4	0.331	-22.9±0.4	336.7±1.5	0.348	-17.8±1.2	X

Çizelge 7.3’de görüldüğü gibi, yüksek stabiliteye sahip (yüksek ζ -potansiyeli) düzensiz emülsiyonları belirten yüksek PDI değerleri (> 0.1) olan her iki SOR (2 ve 2.5) için nano emülsiyonların ortalama partikül çapları hafifçe artmaktadır (~ 300 nm'ye kadar). Daha önce, düşük enerjili yöntemin, yeterince yüksek sürfaktan düzeyleri (SOR'lar) kullanıldığında, sofistike veya pahalı üretim ekipmanına ihtiyaç duymadan nanoemülsiyonlar üretmek için uygun olduğu gösterilmiştir. (Ostertag ve McClements. 2012). Bununla birlikte, sürfaktan konsantrasyonundaki artış (% 3 ila % 5) ortalama çapı hafifçe artırır (Çizelge 7.3), bu da yüksek karışım hızlarında çok daha az sürfaktan gerektiğinden bir avantajdır.

7.3.3 Yüzey Aktif Madde Türünün Etkisi

Birçok çalışma, spontan emülsifikasyonla oluşan damlacıkların boyutunun, sürfaktan türünün büyük ölçüde etkilendiğini bildirmiştir (Ostertag and McClements. 2012, Polychniatou et al. 2014, Komaiko and McClements 2015). Sonuçlar, sürfaktanların ara HLB değerlerinin yaklaşık 15 olduğu zaman (Komaiko and McClements 2015, Pouton 1997) en küçük parçacık boyutuna ulaşıldığını göstermiştir. Yüzey aktif maddenin hidrofobik fazdaki afinitesi, nanoemülsiyon oluşumunda önemli bir rol oynadığından, ozonlanmış yağ nanoemülsiyonu oluşumu için iki surfaktan (Tween 40 ve Tween 80: HLB yaklaşık 15) seçilmiştir.

Çizelge 7.4 Tween 80 vasıtasıyla 750 rpm'de formüle edilmiş seçilmiş ozonlanmış yağ nanoemülsiyonlarının partikül boyutu ve 30 gün sonraki stabilitesi (kremleşme testi).

	0 GÜNLÜK			30 GÜNLÜK			
	d(nm)	pdI	zeta	d(nm)	pdI	Zeta	Kremleşme testi
F13	216.9	0.234	-21.6	214.5	0.212	3.97	X
F14	311.6	0.412	-19.7	293	0.213	-17.4	X
F15	275.9	0.439	-17.1	253.9	0.319	-28.3	X
F16	303.8	0.419	-22.6	281.9	0.234	-18.5	X

Çizelge 7.4, her iki SOR için nanomemülsiyonların ortalama tanecik çaplarının, Tween 80 ile formüle edilen yaklaşık 200 nm olduğunu ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, Tween 80 ile hazırlanan nano emülsiyonlar Tween 40'a kıyasla daha yüksek PDI değerlerine sahip gibi gözükmemektedir (Çizelge 7.4). Bu sonuç emülgatör tipinin PDI üzerine olan etkisini göstermekte ve bu da önceki çalışmalarla doğrudan korelasyon göstermektedir (Polychniatou et al. 2014).

7.4 DEPOLAMA, KİNETİK VE SICAKLIK STABİLİTESİ

Nanoemülsiyon sistemleri, faz ayrımına karşı kendiliğinden bir eğilime sahip olsalar da, uzun kinetik kararlılığa sahip olabilirler ve damlacıkların nispeten küçük boyutlarından dolayı kümülyasyona veya çökelmeye karşı makul derecede dirençlidirler (Polychniatou et al. 2014). Damlacık boyutunun azaltılması yerçekimi ayrımına kararlılığı büyük ölçüde artırabilir; çünkü Brown hareket kuvvetleri yerçekimi kuvvetleri ile aynı düzende bulunur ve nanoemülsiyonların parçacık yığılmasına olan kararlılığını artırır (Tadros 2004). Bu çalışmada, ozonlanmış yağ nanoemülsiyonları oda sıcaklığında 30 günlük kremleşme testine tabi tutulmuş ve yer çekim direncine bağlı olarak kararlılıkları değerlendirilmiştir.

30 gün sonra, 750 rpm'de Tween 40 ile formüle edilen ozonlanmış yağ nanoemülsiyonları kararlılık testinden geçmiş, çökme ya da herhangi bir kremli tabaka görülmemiştir. (Çizelge 7.2). Bununla birlikte, ozonlanmış yağ nanoemülsiyonlarının ortalama parçacık çapları, daha yüksek SOR'larda (2.5) artmıştır ve ayrıca SOR değeri 2 olan nanoemülsiyonlar için hafif bir artış tespit edilmiştir (Çizelge 7.2). Dahası, 30 gün sonra, yüksek PDI değerleri (> 0.1) ve düşük zeta potansiyelleri (Çizelge 7.2), parçacıkların bir araya toplanmaya başladığını ve stabilitesini kaybetme eğilimine sahip olabileceklerini göstermiştir.

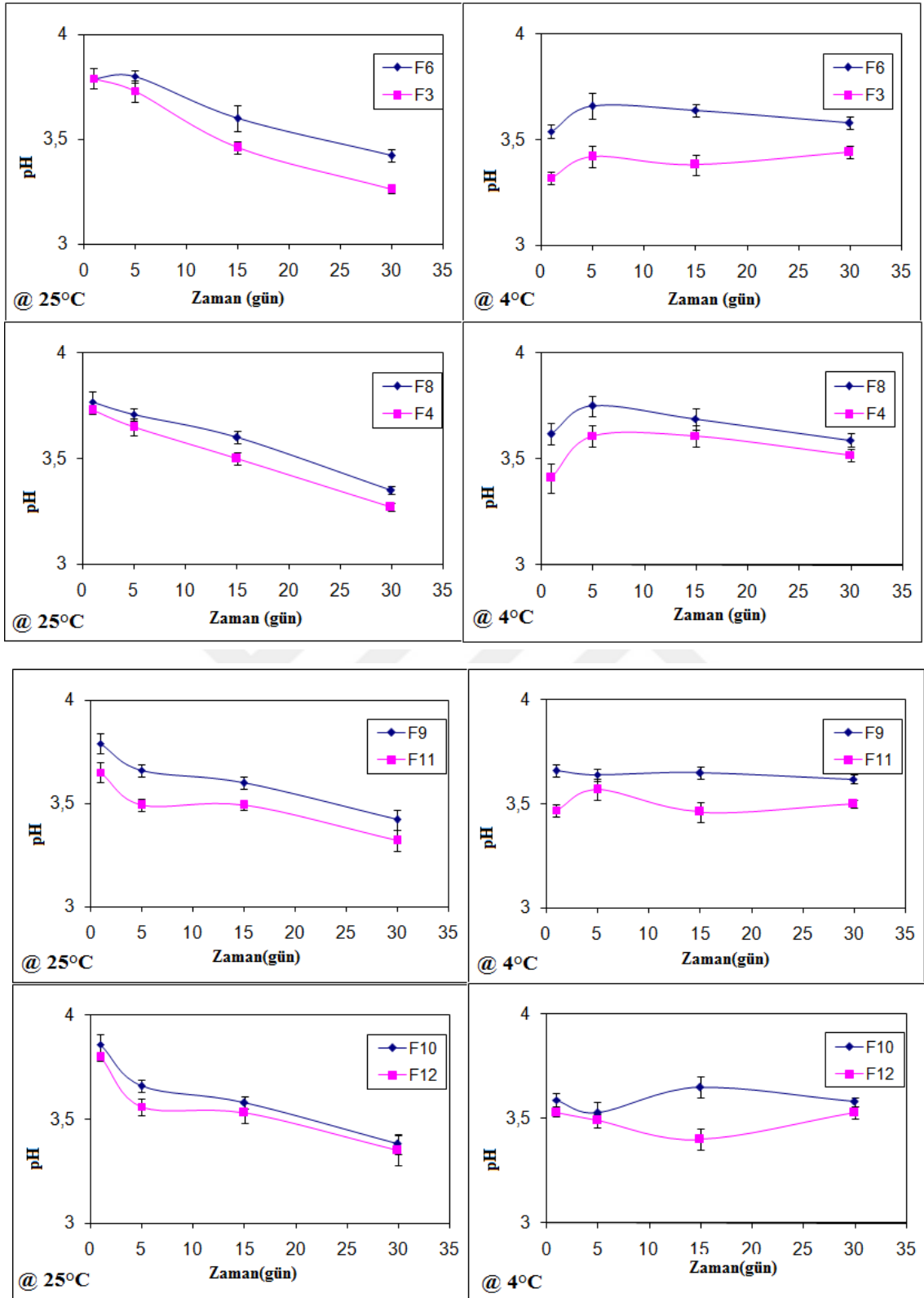
Çizelge 7.3 ve Çizelge 7.4'den görüleceği üzere, 1500 rpm karıştırma hızında form verilen ozonlanmış yağ nanoemülsiyonları ve Tween 80 ile formüle edilen ozonlanmış yağ nanoemülsiyonlarının kremleşme testi başarısız olmuştur (çökeltme ve faz ayrımı gözlemlenmiştir).

Çizelge 7.5 Ozonlanmış yağ nanoparçacıklarının kinetik stabilitesi.

	Zaman			
	1. Gün	5. Gün	15. Gün	30. Gün
F6	√	√	√	√
F3	√	√	√	√
F8	√	√	√	√
F4	√	√	√	√
F9	√	√	x	x
F11	√	√	x	x
F10	√	√	x	x
F12	√	√	x	x
F13	√	x	x	x
F15	√	x	x	x
F14	√	X	x	x
F16	√	x	x	x

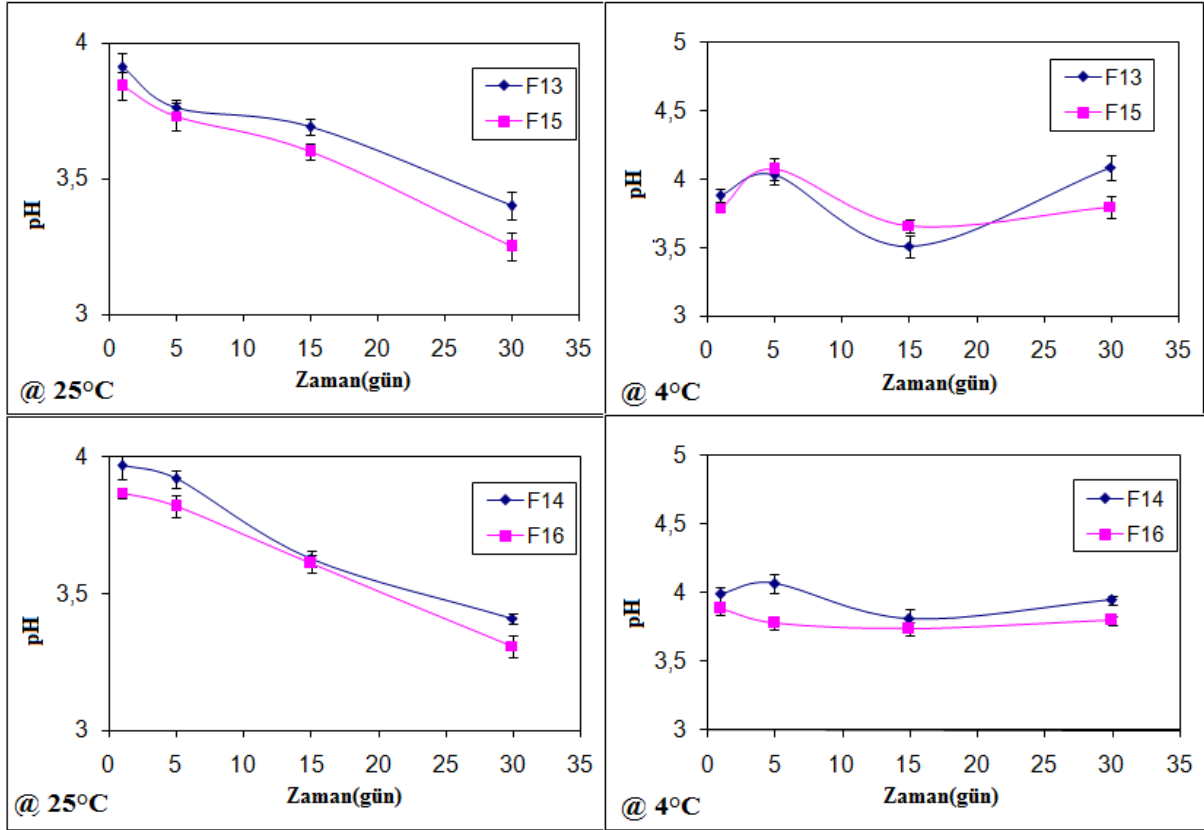
Çizelge 7.5, formüle edilmiş ozonlanmış yağ nanoemülsiyonlarının kinetik stabilitesini göstermektedir. Çizelge 7.5'den görüleceği üzere, Tween 80 ile formüle edilen ozonlanmış yağ nanoemülsiyonları ve 1500 rpm'lik karıştırma oranında formüle edilmiş ozonlanmış yağ nanoemülsiyonları sırasıyla 5 gün ve 15 gün sonra kararlılıklarını kaybederler.

Nanoemülsiyonların stabilitesi doğrudan depolama koşullarına bağlıdır ve depolama sıcaklığı özelliklerinden dolayı kararlılığı kaybetme eğilimi vardır (Kadam et al. 2014). Dolayısıyla, depolama sıcaklığının, pH ve viskozite değerlendirmeleri ile formüle edilmiş ozonlanmış yağ nanoemülsiyonlarının stabilitesi üzerindeki etkisini araştırmak düşünülebilir. Daha önce, pH'daki değişikliklerin emülsiyonlarda flokülasyonu teşvik edebileceği bildirilmiştir (Midmore 1999). Dahası, bir nano emülsiyonun zeta-potansiyeli pH değerine bağlıdır (Poluri 2011).

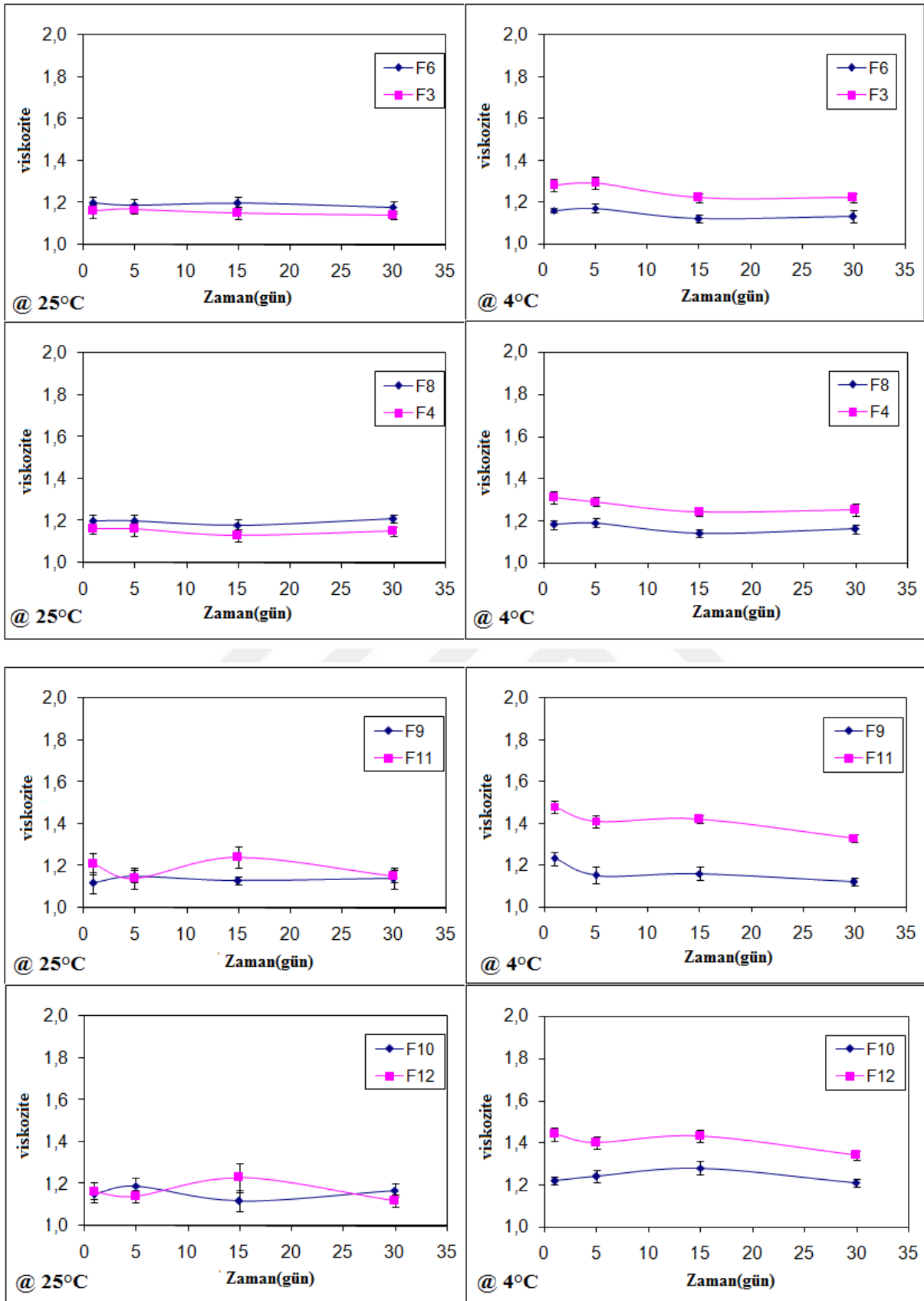


Şekil 7.1 Formüle edilmiş ozonlanmış yağ nanoemülsiyonlarının pH değerleri ve sıcaklık kararlılığı.

Şekil 7.1 (devam ediyor)

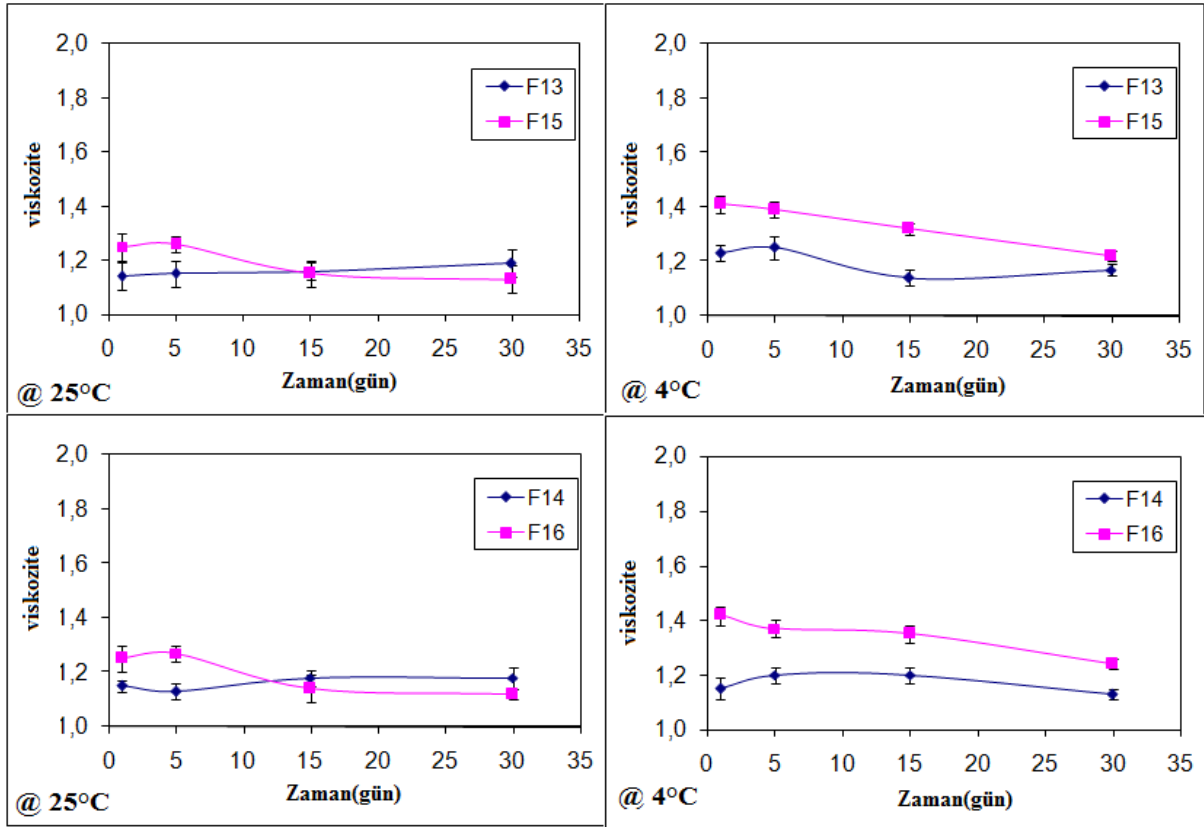


Şekil 7.1'de gösterildiği gibi, tüm nanoemülsiyon formülasyonlarının pH'i depolama sıcaklığına oldukça bağımlıdır. Tüm nanoemülsiyonların pH'ı, 25°C'lik depolamadan 30 gün sonra azalmıştır. Ayrıca, emülsiyonların 25 ° C'de depolanması üzerine negatif zeta potansiyel değerlerinde düşüşler tespit edilmiştir (Çizelge 7.2-7.4). Şekil 7.1'de görüldüğü gibi, tüm nano emülsiyonların pH değerleri neredeyse sabit kalmıştır, bu da nanoemülsiyonların 4°C depolama sıcaklığında oldukça kararlı olduğunu göstermektedir.



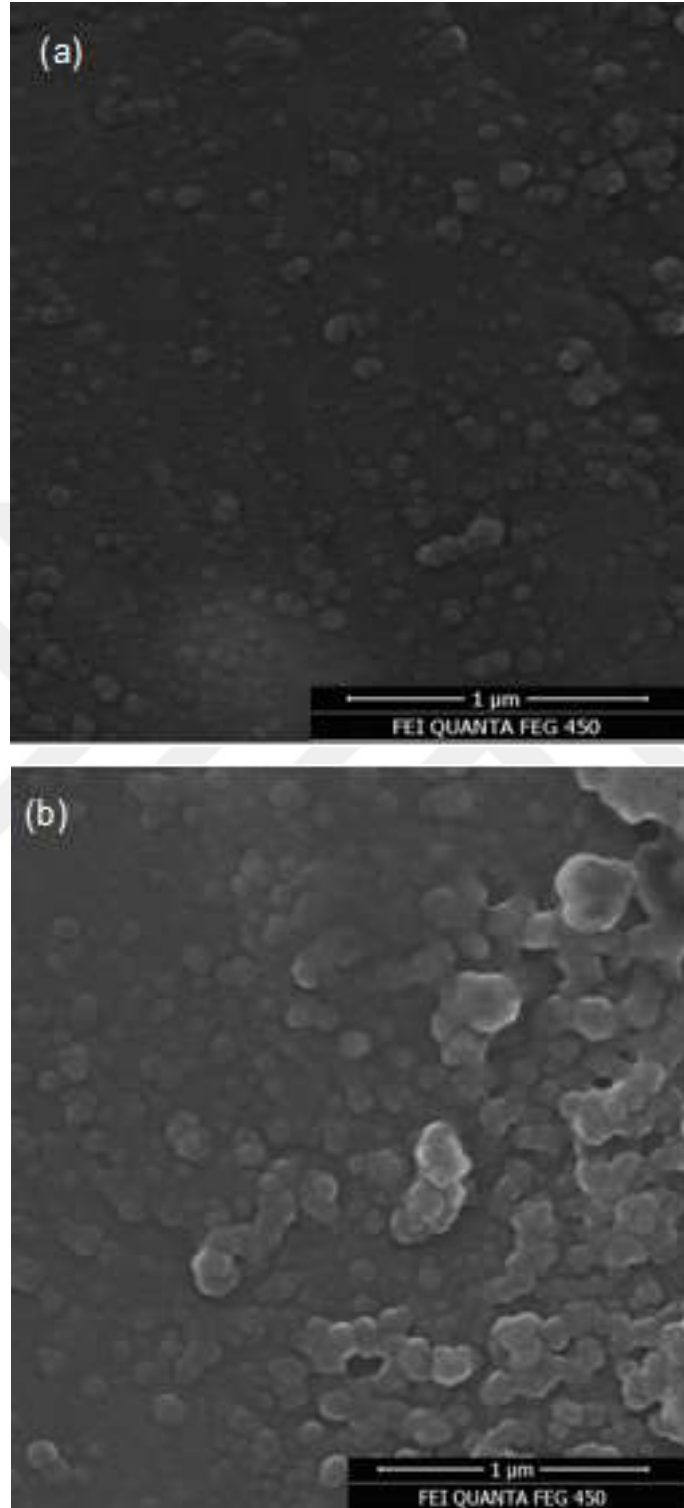
Şekil 7.2 Formüle edilmiş ozonlanmış yağ nanoemülsiyonlarının viskozite değerleri ve sıcaklık kararlılığı.

Şekil 7.2 (devam ediyor)



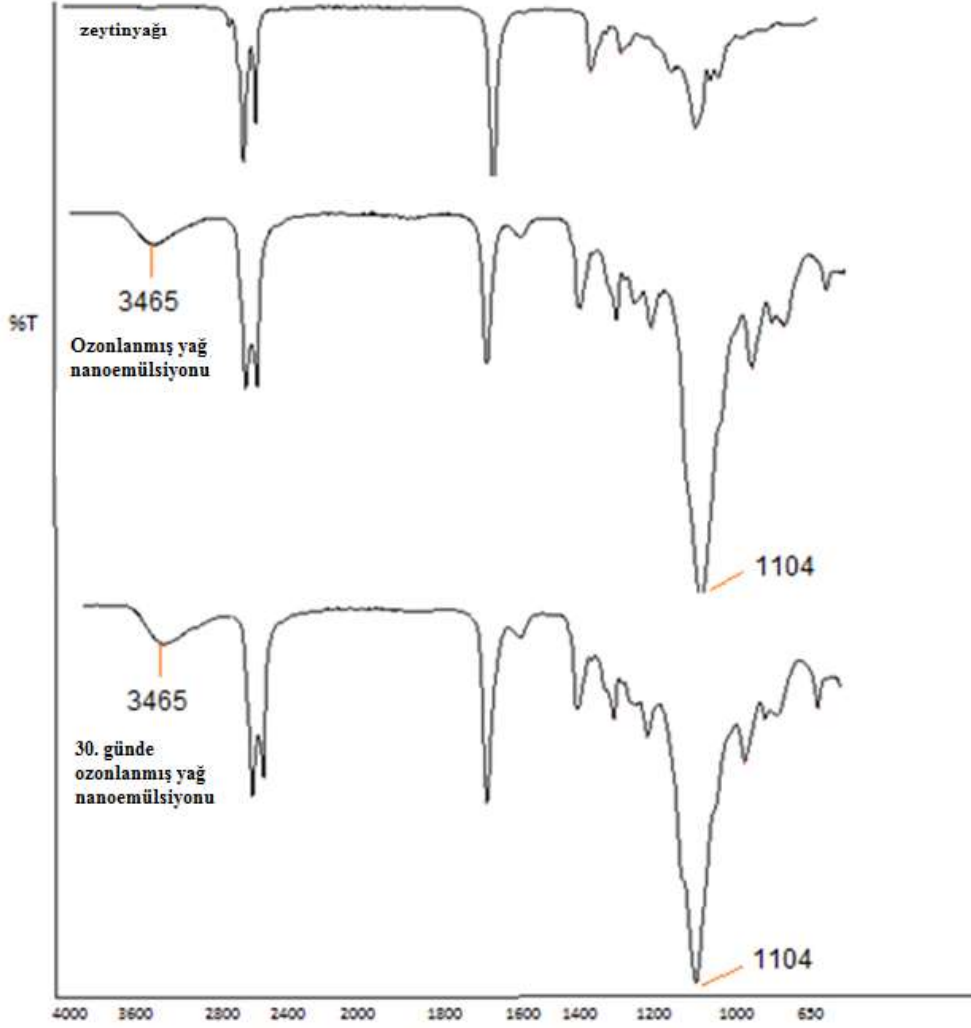
Şekil 7.2, 25°C'de ve 4°C'de 30 gün depolanan nanoemülsiyonların viskozitelerini göstermektedir. Tween 40 vasıtasıyla 750 rpm'de (F6, F3, F8 ve F4) formüle edilen ozonlanmış yağ nanoemülsiyonlarının viskozite değerleri her iki saklama sıcaklığı için kesinlikle değişmemiştir (Şekil 7.2). Bununla birlikte, formülize edilmiş nanoemülsiyonların geri kalan kısmı için 25°C'de küçük değişiklikler belirlenirken, değerler 4°C'de neredeyse sabit kalmıştır. Sonuç olarak, 750 rpm'de Tween 40 ile formülize edilen ozonlanmış yağ nanoemülsiyonları, stabilite çalışmalarına göre tüm formülasyonlara kıyasla oda sıcaklığında daha kararlı olarak değerlendirilmiştir. Böylece, seçilen nanoemülsiyon formülasyonu ile daha fazla yapısal ve antimikrobiyal aktivite çalışmaları yürütülmüştür; F6, en düşük ortalama parçacık çapına ve PDI'nin en yüksek ζ -potansiyeline sahiptir.

7.5 MORFOLOJİK VE YAPISAL DEĞERLENDİRME



Şekil 7.3 F6 nanoemülsiyonlarının SEM görüntüleri (a) (x100.000), (b) 30 gün sonra (x100.000).

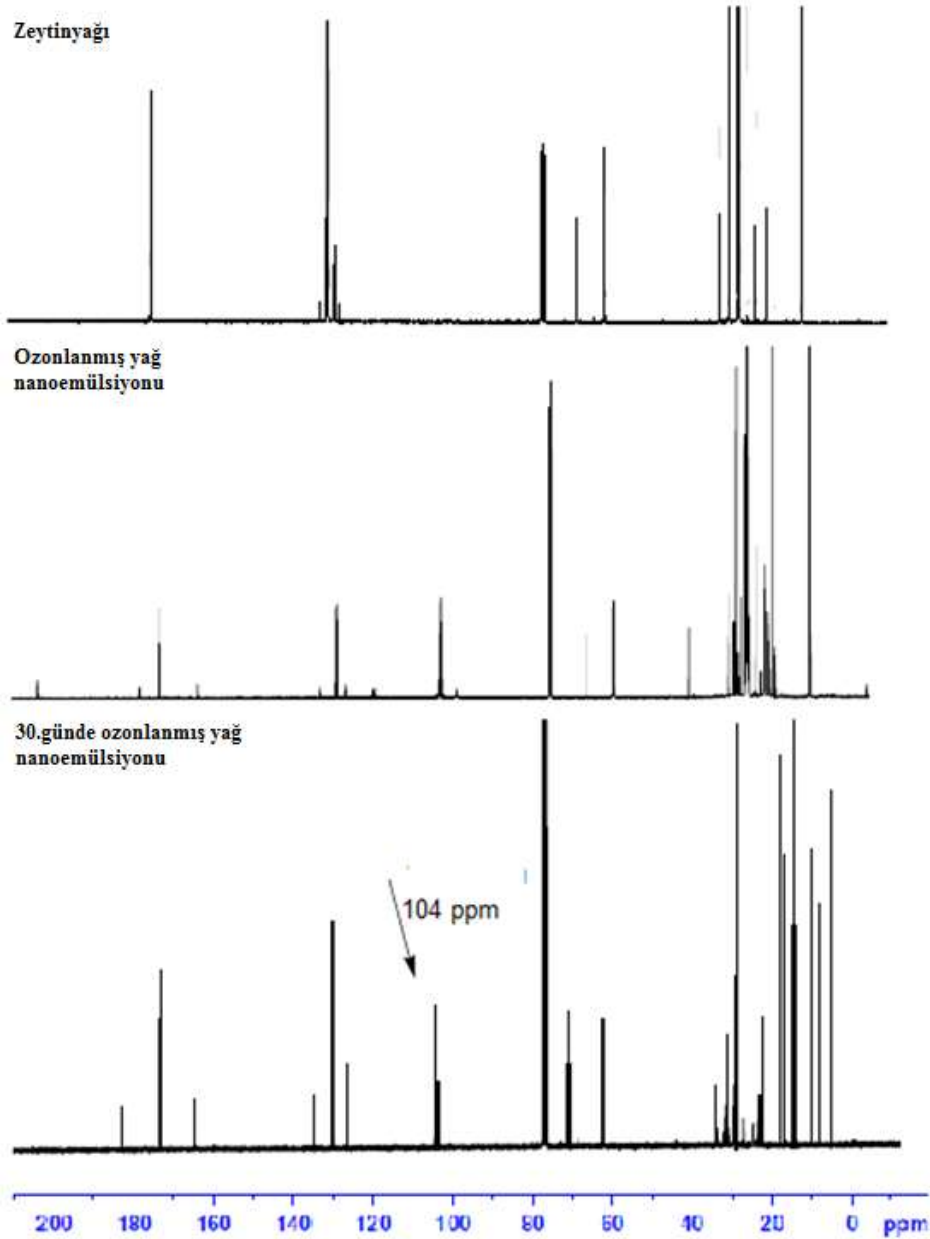
Şekil 7.3, taze hazırlanmış (Şekil 7.3a) ve 30 günlük depolamadan sonra nanoemülsiyonların (F6) SEM görüntülerini göstermektedir (Şekil 7.3b). Şekil 7.3'te görüldüğü gibi, nanoemülsiyonlar düzgün küresel şeklindedir (Şekil 7.3a). Bununla birlikte, nanoemülsiyon dağılımı biraz değişmiş ve 30 günden sonra bir parçacık aglomerasyonu oluşmuştur (Şekil 7.3b). FESEM görüntüleri, hazırlanan nanoparçacıkların boyut ve boyut dağılımlarının DLS ölçümleri ile iyi uyum içinde olduğunu göstermiştir.



Şekil 7.4 Zeytinyağı, ozonlanmış yağ nanoemülsiyonu ve 30. Günde ozonlanmış yağ nanoemülsiyonun FTIR spektrumları.

Zeytinyağının, ozonlanmış yağ nanoemülsiyonlarının ve ozonlanmış yağ nanoemülsiyonlarının 30 gün sonra FTIR spektrumu Şekil 7.4 de verilmiştir. Şekil 7.4 den görüleceği üzere, ozonlanmış yağ nanoemülsiyonlarının FTIR'ı 3466, 1745 ve 1104 cm⁻¹'de pik yaparak ozonoliz reaksiyonu sırasında yağ asidi zincirinde meydana gelen kimyasal değişiklikleri göstermektedir (John 2004). Ozonlanmış yağ nanoemülsiyonlarının

spektrumunda yağlı asit zincirlerinin, C = C bağlarındaki zincir parçalanmasına bağlı olarak 2923 cm^{-1} ve 2855 cm^{-1} 'deki (hem $-\text{CH}_2-$ hem de $-\text{CH}_3-$ 'de C-H asimetrik gerilmede) tepelerin yoğunluğu beklendiği gibi azalmıştır. Böylece, 1104 cm^{-1} 'deki (ozonit CO germe) pik, ozonitin varlığını göstermiştir. 30 gün sonra, spektrumda bulunan ozonit zirvesi ozonun halen nano emülsiyon yapısında olduğunu göstermiştir. Üstelik, 3465 cm^{-1} 'deki zirve, araştırılan ozonlanmış yağ nanoemülsiyonlarının her ikisinde de hidroksil gruplarının varlığına işaret etmektedir.



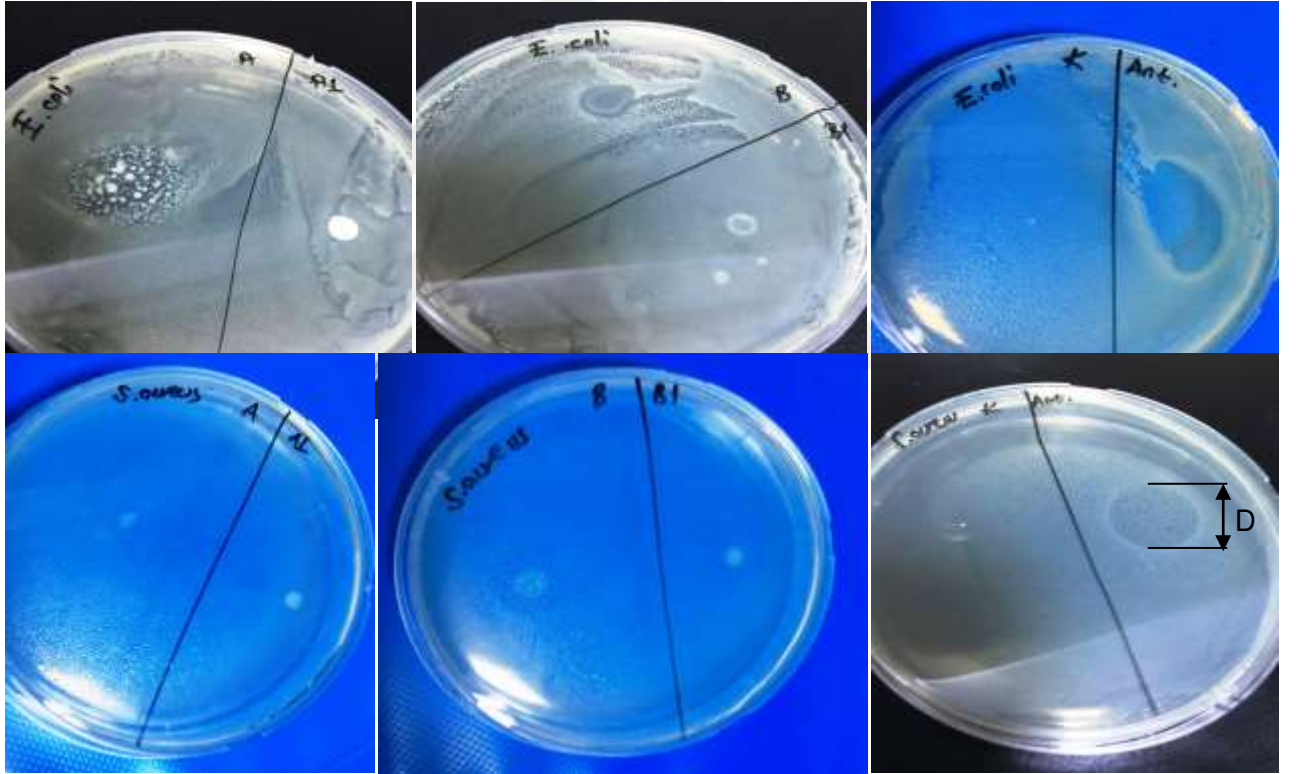
Şekil 7.5 30 gün sonra zeytinyağı, ozonlanmış yağ nanoemülsiyonu ve ozonlanmış yağ nanoemülsiyonun ^{13}C NMR spektrumları.

30 günlük depolamadan sonra zeytinyağı, ozonlanmış yağ nanoemülsiyonu ve ozonlanmış yağ nanoemülsiyonu ^{13}C NMR spektrumu Şekil 7.5'de gösterilmektedir. NMR analizleri, ozonlama sırasında 104 ppm'lik bir sinyalle zeytinyağı tarafından yapılan yapısal

değişiklikleri teyit etmiştir (1,2 karbon halkası, 4-trioksolan) (Şekil 7.5). Daha önce başka araştırmacılar tarafından bildirilen ozonlanmış yağ nanoemülsiyonlarının spektrumunda bulunmuştur (Zanardi 2008). Ayrıca, ozonun 30 gün sonra nanoemülsiyon yapısından ayrılmadığı da teyit edilmiştir.

7.5 ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTE

Ozonlanmış yağlar, Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler de dahil olmak üzere geniş bir mikroorganizma grubunda geniş çapta ispatlanmış olan antibakteriyel etkinlikleri nedeniyle araştırılmıştır (Serio 2010, Montevecchi 2013, Sechi 2001, Diaz 2005, Almeida 2013).



A: ozonlanmış yağ A1: seyreltilmiş ozonlanmış yağ (1:1) (v/v), B: Zeytin, B1: seyreltilmiş özler (1:1) (v/v), K: Kontrol, Ant: Gentamisin. D (mm): İnhibisyon bölgesinin çapı.

Şekil 7.6 A, A1, B, B1, Kontrol ve antibiyotiğin antibakteriyel aktivitesi.

Bu çalışmada, ozonlanmış yağ ve ozonlanmış yağ nanoemülsiyonlarının antimikrobiyal etkinliklerini değerlendirmek için bölge inhibisyon testi yapılmıştır (Şekil 7.6).

Çizelge 7.6 Ozonlanmış yağın ve ozonlanmış yağ nanoemülsiyonlarının antibakteriyel etkisini gösteren inhibisyon zonlarının çapı (mm).

Bakteri	Ozonlanmış yağ	Seyreltilmiş Ozonlu Yağ (1:1) (v/v)	Ozonlanmış Yağ Nanoemülsiyonu	Seyreltilmiş Ozonlu Yağ Nanoemülsiyonu (1:1) (v/v)	Kontrol	Gentamisin (5 mg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i>	11	9	9.6	9	-	20.3
<i>Escherichia coli</i>	-	-	9.6	-	-	22.6

İnhibisyon bölgesinin çapı Şekil 7.6'dan ölçülmüştür ve *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* için sonuçlar Çizelge 7.6'da gösterilmiştir. *Staphylococcus aureus*'a karşı olan tüm numuneler, kontrol numuneleri haricinde bir inhibisyon zonuna neden olmaktadır. Seyreltme yoluyla ozon konsantrasyonu düştükçe, inhibisyon bölgesi alanı azalır (Çizelge 7.6). Sonuçlar ozonlanmış yağların antibakteriyel etkilerini nanoemülsiyon formlarında da koruduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, ozonlanmış yağ nanoemülsiyonları numuneleri haricinde *Escherichia coli*'ye karşı herhangi bir inhibisyon zonu tespit edilmemiştir. Bu sonuç, bu iki mikroorganizmanın hücre zarı bileşiminin farklılıklarına bağlı olabilir (Guerra-Rosas 2017). Gram negatif bakteriler kompleksdir ve hidrofobik bileşiklerin lipopolisakkarid tabakası boyunca difüzyonunu sınırlarken, Gram pozitif bakterilerde hidrofobik moleküller kalın peptidoglikan tabakasına kolayca nüfuz edebilir (Alboofetileh 2014, Wu 2014). Nano aralıktaki damlalarla emülsiyonların *Escherichia coli*'nin dış zarından etkin bir şekilde taşınabileceği ve yağların etkili bir şekilde verilmesini sağlayarak daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye neden olduğu bildirilmiştir (Guerra-Rosas 2017). Bu çalışma, ozonlanmış yağ nanoemülsiyonlarının hem *Staphylococcus aureus* hem de *Escherichia coli*'ye karşı antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğunu göstermektedir.



BÖLÜM 8

SONUÇLAR

Ozonlanmış yağ nanoemülsiyon sistemlerinin optimum formülasyonu, nanoemülsiyon sistemleri su, yüzey aktif madde ve yağdan uygun oranlarda formüle edilebildiğinden yağ-surfaktan-su kombinasyonlarının değerlendirilmesi ile belirlenmiştir. Çalışmada yağ olarak ozonlanmış zeytinyağı, surfaktan olarak tween 80 ve tween 40 içeren emülsiyonların formülasyonu üzerinde çalışılmıştır. Formülasyonların hazırlanması sırasında düşük hızda üretim yöntemlerinden EIP kullanılmıştır. Bu çalışmada, temelde, bir nanoemülsiyonun uygun tasarımı göz önüne alınarak dört önemli faktör araştırılmıştır. Ozonlanmış zeytinyağına en uygun bileşimleri değerlendirmek için surfaktan/yağ oranının (SOR), surfaktan konsantrasyonunun, karıştırma hızının ve surfaktan türünün partikül çapı ve emülsiyon stabilitesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu emülsiyon formülasyonları ile ilgili aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

- Ortalama partikül boyutu SOR'a oldukça bağlıdır, artan SOR ile parçacık boyutu azalmıştır. Damlacıkların emülsiyonda nasıl dağıldığını değerlendirmek için, ozonlanmış yağ nanoemülsiyonlarının PDI'sı belirlenmiştir. Sonuçlar, yüksek kararlılıkla monodispers emülsiyonları gösteren düşük PDI değerlerini (<0.1) göstermektedir. Yüksek SOR'larda (2.5) ortalama parçacık boyutunda bir azalma olmasına rağmen, bu nano emülsiyonların ζ -potansiyelinde hafif bir artış tespit edilmiştir.
- Yüksek stabiliteye sahip (yüksek ζ -potansiyeli) düzensiz emülsiyonları belirten yüksek PDI değerleri (> 0.1) olan her iki SOR (2 ve 2.5) için nano emülsiyonların ortalama partikül çapları hafifçe artmaktadır (~ 300 nm'ye kadar) . Bununla birlikte, surfaktan konsantrasyonundaki artış (% 3 ila % 5) ortalama çapı hafifçe arttırmıştır, bu da yüksek karışım hızlarında çok daha az surfaktan gerektiğinden bir avantajdır.

- Tween 80 vasıtasıyla formüle edilen her iki SOR için nanoemülsiyonların ortalama parçacık çaplarının yaklaşık 200 nm olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, Tween 80 ile hazırlanan nano emülsiyonların, Tween 40'a kıyasla daha yüksek PDI değerlerine sahip olduğu görülmüştür.
- 30 gün sonra, 750 rpm'de Tween 40 ile formüle edilen ozonlanmış yağ nanoemülsiyonları kararlılık testinden geçmiş, çökme ya da herhangi bir kremse tabaka görülmemiştir. Bununla birlikte, ozonlanmış yağ nanoemülsiyonlarının ortalama parçacık çapları, daha yüksek SOR'larda (2.5) artmıştır ve ayrıca SOR değeri 2 olan nanoemülsiyonlar için hafif bir artış tespit edilmiştir. Dahası, 30 gün sonra, yüksek PDI değerleri (> 0.1) ve düşük zeta potansiyelleri, parçacıkların bir araya toplanmaya başladığını ve stabilitesini kaybetme eğilimine sahip olabileceklerini göstermiştir.
- 1500 rpm karıştırma hızında form verilen ozonlanmış yağ nanoemülsiyonları ve Tween 80 ile formüle edilen ozonlanmış yağ nanoemülsiyonlarının kremleşme testi başarısız olmuştur (çökme ve faz ayrımı gözlemlenmiştir).
- Tween 80 ile formüle edilen ozonlanmış yağ nanoemülsiyonları ve 1500 rpm'lik karıştırma oranında formüle edilmiş ozonlanmış yağ nanoemülsiyonları sırasıyla 5 gün ve 15 gün sonra kararlılıklarını kaybetmişlerdir.
- Tüm nanoemülsiyonların pH'ı, 25°C'lik depolamadan 30 gün sonra azalmıştır. Ayrıca, emülsiyonların 25°C'de depolanması üzerine negatif zeta potansiyel değerlerinde düşüşler tespit edilmiştir. Tüm nano emülsiyonların pH değerleri neredeyse sabit kalmıştır, bu da nanoemülsiyonların 4°C depolama sıcaklığında oldukça kararlı olduğunu göstermektedir.
- Tween 40 kullanılarak 750 rpm'de (F6, F3, F8 ve F4) formüle edilen ozonlanmış yağ nano emülsiyonlarının viskozite değerleri 4°C ve 25°C de değişmemiştir. Bununla birlikte, formüle edilmiş nano emülsiyonların geri kalan kısmı için 25°C'de küçük değişiklikler belirlenirken, değerler 4°C'de neredeyse sabit kalmıştır.
- Sonuç olarak, 750 rpm'de Tween 40 ile formüle edilen ozonlanmış yağ nanoemülsiyonları, stabilite çalışmalarına göre tüm formülasyonlara kıyasla oda sıcaklığında daha kararlı olarak değerlendirilmiştir. Böylece, seçilen nanoemülsiyon formülasyonu ile yapısal ve antimikrobiyal aktivite çalışmaları yürütülmüştür; F6, en düşük ortalama parçacık çapına ve PDI'nin en yüksek ζ -potansiyeline sahiptir.
- Nanoemülsiyonların (F6) SEM görüntüleri incelendiğinde düzgün küresel şeklinde olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, nanoemülsiyon dağılımı biraz değişmiş ve 30

günden sonra bir parçacık aglomerasyonu oluşmuştur. FESEM görüntüleri, hazırlanan nanoparçacıkların boyut ve boyut dağılımlarının DLS ölçümleri ile iyi uyum içinde olduğunu göstermiştir.

- Zeytinyağının, ozonlanmış yağ nanoemülsiyonlarının ve ozonlanmış yağ nanoemülsiyonlarının 30 gün sonra FTIR spektrumu incelendiğinde, ozonitin varlığını gözlenmiştir. 30 gün sonra, spektrumda bulunan ozonit piki ozonun halen nano emülsiyon yapısında olduğunu göstermiştir. Üstelik araştırılan ozonlanmış yağ nanoemülsiyonlarının her ikisinde de hidroksil gruplarının varlığına işaret etmektedir.
- 30 günlük depolamadan sonra zeytinyağı, ozonlanmış yağ nanoemülsiyonu ve ozonlanmış yağ nanoemülsiyonu ^{13}C NMR spektrumu incelendiğinde, NMR analizleri, ozonlama sırasındaki sinyalle zeytinyağı tarafından yapılan yapısal değişiklikleri teyit etmiştir. Ayrıca, ozonun 30 gün sonra nanoemülsiyon yapısından ayrılmadığı da teyit edilmiştir.
- *Staphylococcus aureus*'a karşı değerlendirilen tüm numuneler, kontrol numuneleri haricinde bir inhibisyon zonuna neden olmaktadır. Seyreltme yoluyla ozon konsantrasyonu düştükçe, inhibisyon bölgesi alanı azalmıştır. Sonuçlar ozonlanmış yağların antibakteriyel etkilerini nanoemülsiyon formlarında da koruduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, ozonlanmış yağ nanoemülsiyonları numuneleri haricinde *Escherichia coli*'ye karşı herhangi bir inhibisyon zonu tespit edilmemiştir. Bu çalışma, ozonlanmış yağ nanoemülsiyonlarının hem *Staphylococcus aureus* hem de *Escherichia coli*'ye karşı antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğunu göstermiştir.



KAYNAKLAR

- Alboofetileh M, Rezaei M, Hosseini H and Abdollahi M** (2014) Antimicrobial activity of alginate/clay nanocomposite films enriched with essential oils against three common foodborne pathogens. *Food Control*, 36 (1): 1-7.
- Ali M S, Alam M S, Anwer T and Safhi M M A** (2013) Accelerated Stability Testing of a Clobetasol Propionate-Loaded Nanoemulsion as per ICH Guidelines. *Scientia Pharmaceutica*, 81 (4): 1089–1100.
- Almeida N R, Beatriz A and Micheletti A C** (2013) Ozonized vegetable oils and therapeutic properties: A review. *Orbital Elec. J. Chem.*, 4:313-326.
- Altınok Yipel F** (2014) Kedilerde Kulak Uyuzu Sağaltımında Ozonlanmış Zeytinyağı ve Bazı Esansiyel Yağların Etkileri. Doktora Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Afyonkarahisar, 60 s.
- Araujo F A, Kelmann R G, Araujo B V, Finatto R B, Teixeira H F and Koaster L S** (2010) Development and Characterization of parenteral nanoemulsions containing thalidomide. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, (8): 238-245.
- Ayata R E** (2010) Alfa-lipoik Asit İçeren Topikal Nanoemülsiyon Formülasyonlarının Tasarımı ve Değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kozmetoloji Programı, 135 s.
- Campanati A, De Blasio S, Giuliano A, Ganzetti G, Giuliadori K, Pecora T, Consales V, Minnetti I and Offidani A** (2013) Topical ozonated oil versus hyaluronic gel for the treatment of partial- to full-thickness second-degree burns: A prospective, comparative, single-blind, non-randomised, controlled clinical trial. *Burns.*, 39 (6):1178-83.
- Chithrani B D, Ghazani A A and Chan W C W** (2006) Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano letters*, (6): 662-668
- Díaz MF, Núñez N, Quincose D, Diaz W and Hernandez F** (2005) Study of Three Systems of Ozonized Coconut Oil. *Ozone Sciences Engineering*; 27:153–157.
- Erdem E** (2010) Bitkisel Yağların Ozonlanması ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa, 58 s.
- Gohtani S and Prasert W** (2014) Nano-Emulsions; Emulsification Using Low Energy Methods. *Japan Journal of Food Engineering*, 12: 119-130.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Guerra-Rosas M I, Morales-Castro J, Cubero-Márquez M A, Salvia- Trujillo L and Martin-Belosso O** (2017) Antimicrobial activity of nanoemulsions containing essential oils and high methoxyl pectin during long-term storage. *Food Control*, 77: 131-138.
- Gupta A, Eral H B, Hatton E A and Doyle P S** (2016) Nanoemulsions: Formation and Applications. *Royal Society of Chemistry*, 12 (11): 2826-41.
- Gupta P K, Pandit J K, Kumar A, Swaroop P and Gupta S** (2010) Pharmaceutical Nanotechnology Novel Nanoemulsion- High Energy Emulsification Preparation and Application. *The Pharma Research*, (22): 117-138.
- İlyasoğlu H ve El S N** (2010) Nanoemülsiyonlar: Oluşumları, yapıları ve koloidal salınım sistemleri olarak gıda sektöründe kullanım alanları. *Gıda*, 35 (2): 143-150.
- John J, Bhattacharya M and Raynor P C** (2004) Emulsions containing vegetable oils for cutting fluid application. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.*, 237 (1-3): 141-150.
- Kadam A N, Najlah M and Wan K-W** (2014) Stability of parenteral nanoemulsions loaded with paclitaxel: the influence of lipid phase composition, drug concentration and storage temperature. *Pharmaceutical Development and Technology*, 19: 999-1004.
- Kim S K, Noh S U, Han Y W, Kim K M, Kang H, Kim H O and Park Y M** (2008) Therapeutic of Topical Application of Ozone on Acute Cutaneous Wound Healing. *The Korean Academy of Medical Sciences*, 24: 368-74.
- Komaiko J and Mc Clements D J** (2015) Low-energy formation of edible nanoemulsions by spontaneous emulsification: Factors influencing particle size. *Journal of Food Engineering*, 146: 122–128.
- Matsumoto A, Sakurai S, Shinriki N, Suzuki S and Miura T** (1998) Therapeutic Effects of Ozonized Olive Oil in the Treatment of Intractable Fistula and Wound after Surgical Operation, in Proceedings of the 15th Ozone World Congress, London, UK, 11th-15th September 2001, Medical Therapy Conference, 8 p.
- Mc Clements D J and Rao J** (2011) Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 51: 285–330.
- Midmore B R** (1999) Effect of aqueous phase composition on the properties of a silica-stabilized W/O emulsion. *J Colloid Interface Sci.*, 213: 352–359.
- Montevecchi M, Dorigo A, Cricca M and Checchi L** (2013) Comparison of the Antibacterial Activity of an Ozonated Oil with Chlorhexidine Digluconate and Povidone-Iodine. *A Disk Diffusion Test. The New Microbiologica*; 36: 289–302.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- O’Sullivan S M, Woods J A and O’Brien N M** (2004) Use of Tween 40 and Tween 80 to deliver a mixture of phytochemicals to human colonic adenocarcinoma cell (CaCo-2) monolayers. *British Journal of Nutrition*, (8): 757-764.
- Ostertag F, Weiss J and McClements D J** (2012) Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. *J Colloid Interface Sci.*, 15: 388 (1): 95-102.
- Öcal E** (2013) Ozon Yağının Kapsül Formasyonu Üzerindeki Etkisi. Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı, Ankara, 65 s.
- Özler Ö, Öter Ş ve Korkmaz A** (2009) Ozon Gazının Tıbbi Amaçla Kullanılması. *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 8 (1): 59-64
- Poluri K, Sistla R, Veerareddy P, Narasu L, Raje A and Hebsiba M** (2011) Formulation, characterization and pharmacokinetic studies of carvedilol nanoemulsions. *Curr Trends Biotechnol Pharm.*, 5: 1110-1122.
- Polychniatou V and Tzia C** (2014) Study of Formulation and Stability of Co-surfactant Free Water-in-Olive Oil Nano- and Submicron Emulsions with Food Grade Non-ionic Surfactants. *J Am Oil Chem Soc.*, 91:79–88.
- Pouton C W** (1997) Formulation of self-emulsifying drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 25: 47-58.
- Rodriguez Z B Z, Alvarez R G, Guanche D, Merino N, Rosales F H, Cepero S M, Gonzalez Y A and Schulz S** (2007) Antioxidant Mechanism is Involved in the Gastroprotective Effects of Ozonized Sunflower Oil in Ethanol- Induced Ulcers in Rats. *Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation*, Vol. 2007, Article ID 65873, 6 p.
- Sechi L A, Lezcano I, Nunez N, Espin M, Dupre I, Pinna A, Mollicotti P, Fadda G and Zanetti S** (2001) Antibacterial Activity of Ozonized Sunflower Oil (Oleozone). *Journal of Applied Microbiology*, 90 (2): 279-84.
- Serio F, Pizzolante G, Cozzolino G, D’Alba M, Bagordo F, Giorgi M, Grassi T, Idolo A, Guido M and Donno A** (2017) A New Formulation Based on Ozonated Sunflower Seed Oil: In Vitro Antibacterial and Safety Evaluation. *Ozone: Science & Engineering*, 39: 139-147.
- Shah P, Bhalodia D and Shelat P** (2010) Nanoemulsion: A Pharmaceutical Review. *Systematic Reviews In Pharmacy*, 1 (1): 24-32.
- Tadros T, Izquierdo P and Esquena J** (2004) Formation and stability of nano-emulsions. *Adv Colloid Interf Sci.*, 303–318.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Thakkar K N, Mhatre S S and Parikh R Y** (2010) Biological synthesis of metallica nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, (6): 257-262.
- Uluata S, Decker E A and Mc Clements D J** (2016) Optimization of Nanoemulsion Fabrication Using Microfluidization: Role of Surfactant Concentration on Formation and Stability. *Food Biophysics*, 11: 52–59.
- Valacchi G, Lim Y, Belmonte G, Miracco C, Zanardi L, Bocci V and Travagli V** (2011) Ozonated sesame oil enhances cutaneous wound healing in SKH1 mice. *Wound Repair and Regeneration*, 19 (1): 107–115.
- Yıldırım S T** (2015) Formulation, characterization and antimicrobial effect of cinnamon oil nanoemulsions. Yüksek Lisans Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Gıda Mühendisliği, 105 s.
- Zanardi I, Travagli V, Gabbrielli A, Chiasserini L and Bocci V** (2008) Physico-Chemical Characterization of Sesame Oil Derivatives. *Lipids*, 43 (9): 877-886.

ÖZGEÇMİŞ

Fusun KAZANCI, 1991 yılında Zonguldak'da doğmuştur. İlköğretim ve lise öğrenimini TED Zonguldak Koleji'nde tamamlamıştır. 2014 yılında Gazi Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü'nden mezun olmuş, 2014 yılında Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanoteknoloji Mühendisliği'nde yüksek lisans eğitimine başlamıştır.

ADRES BİLGİLERİ:

Adres: Tepebaşı Mah. Taşocağı sok. Kazancı-Tepe Sitesi B blok Kat:7 No:24 ZONGULDAK

Tel: (+90) 544 644 12 91

E-posta: fsnozz@gmail.com