

BÜLENT SAMANCI

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2021

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**RESVERATROL İÇEREN TRANSDERMAL
MİKROEMÜLSİYONLARIN HAZIRLANMASI,
KARAKTERİZASYONU VE KATI MİKROİĞNELER İLE
UYGULANMASI**

BÜLENT SAMANCI

**DANIŞMAN
PROF. DR. FATMA. GÜLGÜN YENER**

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2021

İTHAF

Bu tez çalışmasını sevgili oğlum İhsan Deniz 'e ve kızım Arya Diren'e, değerli eşim Hatice Samancı'ya, değerli babam İhsan Samancı ve annem Enise Samancı'ya ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Tüm doktora tez çalışmamda değerli yardımlarını esirgemeyen danışman hocam **Prof.Dr. F.Gülgün Yener'e**, her ihtiyaç duyduğumda deneyimlerini ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam **Prof. Dr. İ. Tuncer Değim'e**, tez komitemde yer alan ve değerli katkıları ile tez çalışmamda bana destek olan **Prof.Dr. Ümit GÖNÜLLÜ'ye** ve **Prof. Dr. Oya Kerimoğlu'na**, Farmasötik Teknoloji Laboratuvarındaki cihazları kullanmam için gerekli imkanı sağlayan Anabilim Dalı Başkanı Sayın **Prof.Dr. Yıldız Erginer'e**, Dicle Üniversitesi Eczacılık Fakültesin'den HPLC kullanımı konusunda yardımlarını esirgemeyen **Dr. Öğr. Üyesi Diren Sarısaltık Yaşın'a** ve **Arş. Gör. Ecz. Cennet Duran'a**, laboratuvar malzemelerini kullanmam için izin veren **Doç. Dr. Mehmet Boğa'ya**, İstatistiksel verilerin hesaplanmasında yardımcı olan **Arş. Gör. Dr. M. Ozan Toksoy'a**, TEM görüntülerinin alınmasında bana yardımcı olan **Dr.Pelin Uğurlu'ya**, BezmiAlem Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden HPLC kolonu temini konusunda destek olan **Dr.Öğr. Üyesi Işıl Gazioğlu'na**, etkin madde temini için Biota Laboratuvarları Ar-Ge Müdürü Sayın **Hakan Sevinç'e**, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji lisansüstü öğrenci arkadaşlarım **Günay Husuzade, Rafael Abdulayev ve Hanım Hasanova'ya**, zor günlerimde yanımda olan dostlarıma, tüm hayatım boyunca varlıklarına şükrettiğim tüm kardeşlerime teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 35272

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xv
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xviii
ÖZET	xx
ABSTRACT.....	xxi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Deri Yapısı ve İşlevleri	4
2.2. Derinin Tabakaları	4
2.2.1. Canlı Epidermis.....	6
2.2.2. Dermis.....	6
2.2.3. Subcutis (Hipodermis)	6
2.3. Deriden Geçiş.....	7
2.4. Deriden Geçiş Yolları	8
2.4.1. Transepidermal Yol (İntraselüler Yol, Transselüler Yol).....	8
2.4.2. Yan Geçit Yol (Transappendageal Yol).....	8
2.4.3. İnterselüler Yol	9
2.5. Deriden Geçiş Etkileyen Faktörler	9
2.5.1. Biyolojik Faktörler.....	9
2.5.2. Maddeye Ait Fizikokimyasal Özellikler	10
2.6. Deriden Geçiş Artıran Mekanizmalar	10
2.6.1. Kimyasal Penetrasyon Artırıcılar.....	10
2.6.1.1. Sülfoksitler ve Benzeri Kimyasallar	10
2.6.1.2. Azonlar.....	11
2.6.1.3. Prolidonlar.....	11
2.6.1.4. Yağ Asitleri	11
2.6.1.5. Esansiyel Yağ, Terpenler ve Terpenoidler	11

2.6.1.6. Oksazolidinonlar	12
2.6.1.7. Üre.....	12
2.6.1.8. Su.....	12
2.6.1.9. Alkoller, Yağlı Alkoller ve Glikoller	12
2.6.1.10. Yüzey Etkin Maddeler	13
2.6.2. Fiziksel Penetrasyon Artırıcılar	13
2.6.2.1. Elektroporasyon	13
2.6.2.2. İyontoforez	14
2.6.2.3. Ultrason	14
2.6.2.4. Lazer Radyasyonu ve Fotomekanik Dalgalar	14
2.6.2.5. Manyetoforez	15
2.6.2.6. Termoforez	15
2.6.2.7. İğnesiz Enjeksiyon	15
2.6.2.8. Radio Frekans.....	16
2.6.2.9. Emme Ablasyonu	16
2.6.2.10. Deri Abrasyonu	16
2.6.2.11. Mikroİğneler.....	16
2.6.2.12. Taşıyıcı Sistemler	17
2.6.2.13. Veziküler Sistemler	18
2.7. Mikroİğneler	19
2.7.1. Mikroİğne Tipleri.....	21
2.7.1.1. Katı Mikroİğneler (Solid microneedles)	22
2.7.1.2. Kaplı Mikroİğneler (Coated microneedles)	23
2.7.1.3. Çözünebilir Mikroİğneler (Dissolving Microneedles)	23
2.7.1.4. İçi Boş Mikroİğneler (Hollow Microneedles).....	23
2.7.1.5. Hidrojel Yapılı Mikroİğneler (Hydrogel-Forming Microneedles).....	24
2.7.2. Mikroİğne Üretim Yöntemleri	24
2.7.3. Mikroİğne Üretiminde Kullanılan Materyaller	25
2.7.3.1. Silikon	25
2.7.3.2. Metal	26
2.7.3.3. Seramik	26
2.7.3.4. Silika Cam.....	26
2.7.3.5. Karbonhidrat	26

2.7.3.6. Polimer	27
2.7.4. Mikroigne Boyutu ve Şekli	27
2.7.5. Mikroigne Uygulama Alanları	27
2.7.5.1. İlaç Verilmesi	27
2.7.5.2. Aşı Uygulaması	28
2.7.5.3. Hasta İzleme ve Teşhis	28
2.7.5.4. Kozmetik Uygulama	29
2.7.5.5. Diğer Uygulama Alanları	30
2.8. Emülsiyonlar	30
2.9. Emülsiyon Tipleri	30
2.9.1. Emülsiyon Oluşturma Teorileri	31
2.9.1.1. Arayüz Gerilimini Düşürmek	32
2.9.1.2. Arayüz Filmi Oluşturmak	32
2.9.1.3. Elektriksel Çifte Tabaka Oluşturmak	32
2.9.2. Emülsiyonların Stabilitesi	32
2.9.2.1. Flokülasyon	33
2.9.2.2. Kremalaşma	33
2.9.2.3. Koalesans	33
2.9.2.4. Faz ayrışması	34
2.10. Mikroemülsiyonlar	34
2.10.1. Mikroemülsiyonların Yapısı	35
2.10.2. Mikroemülsiyonların Avantajları	36
2.10.3. Mikroemülsiyonların Dezavantajları	36
2.10.4. Mikroemülsiyonların Oluşum Teorileri	36
2.10.5. Mikroemülsiyonların Hazırlanması	37
2.10.5.1. Faz Titrasyon Metodu	37
2.10.5.2. Faz İnversiyon Sıcaklık Yöntemi (PIT)	38
2.10.6. Mikroemülsiyon Formülasyonuna Giren Bileşenler	38
2.10.6.1. Yağlı Faz (Organik Faz)	39
2.10.6.2. Sulu Faz	39
2.10.6.3. Yüzey Etkin Madde (YEM)	39
2.10.6.4. Yardımcı Yüzey Etkin Madde (YYEM)	40
2.10.7. Mikroemülsiyonların Karakterizasyonu	41

2.10.7.1. Damlacık Büyüklüğü Tayini	41
2.10.7.2. Mikroemülsiyonların Reolojisi	41
2.10.7.3. Mikroemülsiyonların İletkenlikleri	41
2.10.7.4. Morfolojik Görüntüleme (TEM)	42
2.10.7.5. Türbidite	42
2.10.7.6. Stabilitate Testleri	43
2.10.8. Mikroemülsiyonların Uygulama Alanları	43
2.10.8.1. Oral Mikroemülsiyonlar	43
2.10.8.2. Parenteral Mikroemülsiyonlar	43
2.10.8.3. İntranazal Mikroemülsiyonlar	44
2.10.8.4. Oküler Mikroemülsiyonlar	44
2.10.8.5. Topikal Mikroemülsiyonlar	44
2.10.8.6. Mikroemülsiyonların Kozmetik Uygulamaları	45
2.10.9. Mikroemülsiyonların Deriden Geçiş Artırma Mekanizması	45
2.11. Resveratrol	46
2.11.1. Resveratrol'ün Özellikleri	47
2.11.2. Resveratrol'ün Yapısı ve Fizikokimyasal Özellikleri	47
2.11.3. Resveratrol'ün Farmakolojik Özellikleri	48
2.11.4. Resveratrol'ün Topikal Kullanım Amaçları	49
2.11.5. Resveratrolün Topikal Uygulanması	49
2.11.5.1. Keratinosit Çoğalması ve Farklılaşması	49
2.11.5.2. Anti – UV	50
2.11.5.3. Antioksidan Savunma	50
2.11.5.4. Antikanser	51
2.11.5.5. Anti-Enflamasyon	51
2.11.5.6. Deri Yaraları	52
2.11.5.7. Diğerleri	52
2.12. <i>İn vitro</i> Salım ve Deriden Geçiş Kinetiği	53
2.12.1. Sıfırıncı Salım Kinetiği	53
2.12.2. Birinci Derece Salım Kinetiği	54
2.12.3. Higuchi Salım Kinetiği	55
3. GEREÇ VE YÖNTEM	56
3.1. Gereçler	56

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	56
3.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler	56
3.1.2.1. Kullanılan Aletler	56
3.1.2.2. Kullanılan Malzemeler	57
3.1.2.3. Kullanılan Bilgisayar Programları	57
3.2. Yöntem	57
3.2.1. Resveratolün Kantitatif Analiz Yönteminin Geliştirilmesi	57
3.2.1.1. Analiz Yönteminin Geliştirilme Aşamaları	57
3.2.2. Resveratrolün Kantitatif Analiz Yönteminin Validasyonu	60
3.2.2.1. Doğrusallık (linearity)	60
3.2.2.2. Doğruluk ve Geri Kazanım (accuracy)	60
3.2.2.3. Kesinlik (Precision)	61
3.2.2.4. Sistem Uygunluk Parametreleri	62
3.2.2.5. Seçicilik (Specificity)	62
3.2.2.6. Dayanıklılık (Stability)	62
3.2.3. Çözünürlük Çalışması	62
3.2.4. Ön Formülasyon Çalışmaları	63
3.2.5. Mikroemülsiyon Formülasyonları	63
3.2.5.1. Mikroemülsiyonların Hazırlanması	64
3.2.5.2. Mikroemülsiyonların Oluşumu ile İlgili Görsel Değerlendirme	65
3.2.5.3. Üçgen Faz Diyagramların Çizilmesi	65
3.2.6. Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Seçimi	70
3.2.7. Seçilen Mikroemülsiyonlara Resveratrolün Yüklenmesi	70
3.2.8. Seçilen Mikroemülsiyon Formülasyonlar Üzerinde Çalışmalar	71
3.2.8.1. Fiziksel Görünüş	71
3.2.8.2. Optik İzotropinin Değerlendirilmesi	71
3.2.8.3. Stabilitenin Değerlendirilmesi	71
3.2.8.4. Damlacık Büyüklüğü ve Polidispersite İndeksinin Değerlendirilmesi	72
3.2.8.5. Reolojik Özelliğin İncelenmesi	72
3.2.8.6. pH'ın İncelenmesi	73
3.2.8.7. İletkenliğin İncelenmesi	73
3.2.8.8. Mikroemülsiyonların TEM Görüntüleri	73
3.2.9. Makroemülsiyon Formülasyonları	73

3.2.9.1. Makroemülsiyonların Hazırlanması.....	73
3.2.9.2. Makroemülsiyonların Oluşumu ile İlgili Görsel Değerlendirme	74
3.2.9.3. Üçgen Faz Diyagramların Çizilmesi.....	74
3.2.10. Makroemülsiyonların Seçimi.....	74
3.2.11. Seçilen Makroemülsiyonlara Resveratrol Yüklenmesi.....	74
3.2.12. Seçilen Makroemülsiyonlar Üzerinde Çalışmalar	74
3.2.12.1. Fiziksel Görünüş	74
3.2.12.2. Stabilitenin Değerlendirilmesi	74
3.2.12.3. Damlacık Büyüklüğü ve Polidispersite İndeksi	75
3.2.12.4. Reolojik Özelliklerin İncelenmesi.....	75
3.2.12.5. pH'ın Değerlerin İncelenmesi	75
3.2.12.6. İletkenlik Değerlerin İncelenmesi	75
3.2.13. Resveratrol'ün <i>İn vitro</i> Salımı.....	75
3.2.13.1. Difüzyon Aygıtı	76
3.2.13.2. Difüzyon Ortamın Hazırlanması	76
3.2.13.3. <i>In Vitro</i> Salım Çalışmaların Yapılması	77
3.2.14. Resveratrol İçeren Çözelti, Makroemülsiyon ve Mikroemülsiyonların <i>Ex Vivo</i> Domuz Derisinden Geçışı	78
3.2.15. Katı Mikroigne ile İşlem Görmüş Deriden Etkin Madde Geçışı	78
3.2.16. Stabilitate Çalışmaları.....	79
3.2.17. İstatistiksel Değerlendirme	79
3.2.17.1. Aritmetik Ortalama ($\bar{x}$).....	79
3.2.17.2. Standart Sapma (SD).....	79
3.2.17.3. Bağlı Standart Sapma.....	80
3.2.17.4. Tek Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA).....	80
4. BULGULAR.....	81
4.1. Etkin Maddenin Miktar Tayini ve Validasyonu	81
4.1.1. Resveratrolün Miktar Tayini	81
4.1.2. Resveratrol Analiz Yönteminin Validasyonuna Ait Bulgular	82
4.1.2.1. Doğrusallık (Linearity) ve Aralık (Range).....	82
4.1.2.2. Doğruluk	82
4.1.2.3. Kesinlik	83
4.1.2.4. Sistem Uygunluğu (System Suitability).....	84

4.1.2.5. Seçicilik (Specificity).....	85
4.1.2.6. Dayanıklılık (Stability).....	86
4.2. Çözünürlük Çalışması.....	86
4.3. Ön Formülasyon Çalışmaları	87
4.4. Formülasyonlarının Hazırlanması ve Üçgen Faz Diyagramlarının Oluşturulması.....	87
4.5. Mikroemülsiyon Formülasyonunun Seçimi.....	89
4.6. Seçilen Mikroemülsiyon Formülasyonu Üzerinde Yapılan Çalışmalar	90
4.6.1. Fiziksel Görünüş Bulguları	90
4.6.2. Optik İzotropinin Değerlendirilmesi	91
4.6.3. Stabilitenin Değerlendirilmesi	91
4.6.3.1. Santrifüj Testi Bulguları.....	91
4.6.3.2. Termodinamik Test Değerlendirilmesi	91
4.6.3.3. Termal Stres Testi	91
4.6.4. Damlacık Boyutu ve Polidispersite İndeksinin Değerlendirilmesi	92
4.7. Mikroemülsiyon Formülasyonuna Resveratrol Yüklenmesi	95
4.7.1. Resveratrol Yüklü Formülasyonların Damlacık Boyutu ve Polidispersite İndeksi.....	95
4.7.2. Reolojik Özelliklerin Değerlendirilmesi.....	99
4.7.3. pH'ın Değerlendirilmesi	103
4.7.4. İletkenliğin Değerlendirilmesi	103
4.7.5. Mikroemülsiyon Formülasyonlarının TEM Görüntüleri	104
4.8. Makroemülsiyon Formülasyonlarının Seçimi.....	104
4.9. Seçilen Makroemülsiyon Formülasyonları Üzerinde Yapılan Çalışmalar	105
4.9.1. Fiziksel Görünüş Bulguları	105
4.9.2. Stabilitenin Değerlendirilmesi	106
4.9.2.1. Santrifüj Testi Bulguları.....	106
4.9.2.2. Termodinamik Test Bulguları	106
4.9.2.3. Termal Stres Testi Bulguları	106
4.9.3. Damlacık Boyutu ve Polidispersite İndeksinin Değerlendirilmesi.....	106
4.10. Makroemülsiyon Formülasyonuna Resveratrol Yüklenmesi.....	109
4.10.1. Resveratrol Yüklü Makroemülsiyonların Damlacık Boyutu ve Polidispersite İndeksi.....	109
4.10.2. Makroemülsiyonların Reolojik Özelliklerin Değerlendirilmesi	112

4.10.3. pH'ın Değerlendirilmesi	120
4.10.4. İletkenliğin Değerlendirilmesi	120
4.11. Resveratrol'ün <i>İn vitro</i> Salınımı	120
4.12. <i>Ex vivo</i> Deriden geçiş çalışmaları	122
4.13. Katı Mikro İğne İle İşlem Görmüş Deriden Mikroemülsiyon Formülasyonunda Resveratrol Salınımı.....	123
4.14. Uzun Süreli Stabilitenin Değerlendirilmesi	125
Soldan sağa sırasıyla $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık koşullarında muhafaza edilen ME9 formülasyonu	125
Soldan sağa sırasıyla $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık koşullarında muhafaza edilen E21 formülasyonu	125
5. TARTIŞMA	132
KAYNAKLAR	150
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	175

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Topikal krem, transdermal yama, hipoerdemik iğne ve mikroiğnelerin karşılaştırılması.....	20
Tablo 2-2: Farklı mikroiğnelerin üretim yöntemleri.....	24
Tablo 2-3: Mikroemülsiyonların emülsiyonlar ve nanoemülsiyonlar ile karşılaştırılması	34
Tablo 2-4: Resveratrolün fizikokimyasal özellikleri	48
Tablo 3-1: Gradient programa ait koşullar	58
Tablo 3-2: Miktar tayini yöntemine ait kromatografik koşullar	59
Tablo 3-3: Miktar tayini analizinde çalışma çözeltisine göre resveratrol (RES) yüzdelere karşılık gelen konsantrasyonlar	60
Tablo 3-4: Formülasyonda kullanılacak bileşenler.....	63
Tablo 3-5: Ön formülasyon çalışmalarında denenen yağ fazı, sürfaktan ve su fazı oranları	66
Tablo 4-1: RES için doğruluk sonuçları	82
Tablo 4-2: RES'in tekrarlanabilirlik sonuçları	83
Tablo 4-3: RES için ara kesinlik sonuçları	84
Tablo 4-4: Analiz yöntemine ait sistem uygunluk parametreleri	84
Tablo 4-5: RES çözeltisinin oda sıcaklığındaki dayanıklılık sonuçları.....	86
Tablo 4-6: Resveratrolün yağ fazı ve YEM içerisindeki çözünürlüğü (n=3)	86
Tablo 4-7: Mikroemülsiyon oluşum alanından seçilen formülasyon oranları ve görsel değerlendirmeleri	90
Tablo 4-8: ME8 formülasyonuna ait reolojik değerler	99
Tablo 4-9: ME9-RES formülasyonuna ait reolojik değerler	100
Tablo 4-10: ME8-RES formülasyonuna ait reolojik değerler	100
Tablo 4-11: ME9 formülasyonuna ait reolojik değerler	100
Tablo 4-12: Mikroemülsiyon formülasyonlarına ait pH ölçümleri	103
Tablo 4-13: Mikroemülsiyon formülasyonlarına ait iletkenlik bulguları	103
Tablo 4-14: Üçgen faz diyagramında makroemülsiyon oluşum alanından seçilen formülasyon oranları ve görsel değerlendirmeleri.....	104
Tablo 4-15: E19 formülasyonuna ait reolojik değerler.....	112

Tablo 4-16: E19-RES formülasyonuna ait reolojik değerler	113
Tablo 4-17: E21 formülasyonuna ait reolojik değerler	113
Tablo 4-18: E21-RES formülasyonuna ait reolojik değerler	114
Tablo 4-19: E23 formülasyonuna ait reolojik değerler	114
Tablo 4-20: E23-RES formülasyonuna ait reolojik değerler	114
Tablo 4-21: E24 formülasyonuna ait reolojik değerler	115
Tablo 4-22: E24-RES formülasyonuna ait reolojik değerler	115
Tablo 4-23: Makroemülsiyon formülasyonlarına ait pH değerleri	120
Tablo 4-24: Makroemülsiyon formülasyonlarına ait iletkenlik değerleri	120
Tablo 4-25: Resveratrol içeren formülasyonların <i>in vitro</i> salım testi sonucunda selüloz asetat membrandan geçen kümülatif etkin madde miktarları (n=3)	121
Tablo 4-26: <i>İn vitro</i> salım testi bulgularına göre resveratrolün formülasyonlardan salım kinetiklerine ait bulgular	121
Tablo 4-27: <i>İn vitro</i> çalışma sonuçlarına göre selüloz asetat membrandan 6 saat sonunda salınan kümülatif konsantrasyon (%), denge durumundaki akı (Jss), ve geçirgenlik katsayısı (P) değerleri	121
Tablo 4-28: Resveratrol'ün domuz kulağı derisinden geçen kümülatif madde miktarları (n=3)	122
Tablo 4-29: Domuz kulağı derisinden 24 saatte geçen kümülatif % konsantrasyon, denge durumundaki akı (Jss), ve geçirgenlik katsayısı (P) değerleri	123
Tablo 4-30: Resveratrol'ün katı mikroiğne ile işlem görmüş domuz kulağı derisinden geçen kümülatif madde miktarları (n=3)	124
Tablo 4-31: Katı mikroiğne ile işlem görmüş domuz kulağı derisinden 24 saatte geçen kümülatif (%) konsantrasyon, denge durumundaki akı (Jss) ve geçirgenlik katsayısı (P) değerleri	124
Tablo 4-32: Uzun süreli stabilite test bulguları	129
Tablo 4-33: 25 °C'de muhafaza edilen ME9 viskozite değerleri	129
Tablo 4-34: 40 °C'de muhafaza edilen ME9 viskozite değerleri	129
Tablo 4-35: 25 °C'de muhafaza edilen E21 viskozite değerleri	130
Tablo 4-36: 40 °C'de muhafaza edilen E21 akış değerleri	130
Tablo 4-37: 6 ay süresince $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de ve $\% 60 \pm 5$ bağıl nemde bekletilen etkin madde içeren ME9 mikroemülsiyonu ve E21 makro emülsiyonu formülasyonlarına ait miktar tayini bulguları	130

Tablo 4-38: 6 ay süresince $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de ve $\%75 \pm 5$ bağıl nemde bekletilen etkin madde içeren ME9 mikroemülsiyonu ve E21 makro emülsiyonu formülasyonlarına ait miktar tayini bulguları.....	131
--	-----



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Derinin yapısı	5
Şekil 2-2: Deriden geçiş yolları	8
Şekil 2-3: Topikal krem, hipodermik iğne, mikroiğne ve transdermal yamaların karşılaştırılması.....	21
Şekil 2-4: Mikroiğne türleri	22
Şekil 2-5: Emülsiyon tipleri	31
Şekil 2-6: Emülsiyon kararsızlıkları	33
Şekil 2-7: Resveratrolün kimyasal yapısı	47
Şekil 3-1: Formülasyon geliştirme aşamasında kullanılan çalışma planı	64
Şekil 3-2: Manyetik karıştırıcıda mikroemülsiyon hazırlama	65
Şekil 3-3: Üçgen faz diyagramı	66
Şekil 3-4: Üçgen faz diyagramlarında noktasal alan çalışması	70
Şekil 3-5: <i>In vitro</i> ve <i>ex vivo</i> çalışmalarda kullanılan Franz Difüzyon Hücresi	76
Şekil 4-1: Kalibrasyon doğrusu ve denklemi ($n=3$).....	81
Şekil 4-2: RES analiz kromatogramı	82
Şekil 4-3: Optimize edilen yöntemde gözlenen resveratrol piki.....	85
Şekil 4-4: Metanol enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram	85
Şekil 4-5: Asetik asit enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram	86
Şekil 4-6: Mikroemülsiyon oluşum alanı.....	87
Şekil 4-7: y/s makro emülsiyon alanı	88
Şekil 4-8: s/y makro emülsiyon alanları	88
Şekil 4-9: Jel oluşum alanı.....	89
Şekil 4-10: Mikroemülsiyon, makro emülsiyon ve jel formülasyonları olarak değerlendirilen formülasyonların görüntüleri	89
Şekil 4-11: Görsel değerlendirme sonucu ön stabilite testleri için seçilen formülasyonlar	91
Şekil 4-12: ME4 formülasyonun ait damlacık boyutu ve polidispersite indeksi değerleri	92
Şekil 4-13: ME5 formülasyonun ait damlacık boyutu ve polidispersite indeksi değerleri	93

Şekil 4-14: ME6 formülasyonun ait damlacık boyutu ve polidispersite indeksi değerleri	93
Şekil 4-15: ME8 formülasyonun ait damlacık boyutu ve polidispersite indeksi değerleri	94
Şekil 4-16: ME9 formülasyonun ait damlacık boyutu ve polidispersite indeksi değerleri	94
Şekil 4-17: ME10 formülasyonun ait damlacık boyutu ve polidispersite indeksi değerleri	95
Şekil 4-18: ME8 formülasyonuna ait zeta potansiyeli değeri	96
Şekil 4-19: ME9 formülasyonuna ait zeta potansiyeli değeri	96
Şekil 4-20: ME8-RES formülasyonuna ait damlacık boyutu ve polidispersite indeksi değerleri	97
Şekil 4-21: ME9-RES formülasyonuna ait damlacık boyutu ve polidispersite indeksi değerleri	98
Şekil 4-22: ME8-RES formülasyonuna ait zeta potansiyeli değeri	98
Şekil 4-23: ME9-RES formülasyonuna ait zeta potansiyeli değeri	99
Şekil 4-24: ME8 formülasyonuna ait akış diyagramı	101
Şekil 4-25: ME8-RES formülasyonuna ait akış diyagramı	102
Şekil 4-26: ME9 formülasyonuna ait akış diyagramı	102
Şekil 4-27: ME9-RES formülasyonuna ait akış diyagramı	103
Şekil 4-28: ME9 formülasyonuna ait TEM görüntüleri	104
Şekil 4-29: E19 formülasyonuna ait damlacık boyutu ve polidispersite indeksi değerleri	107
Şekil 4-30: E21 formülasyonuna ait damlacık boyutu ve polidispersite indeksi değerleri	107
Şekil 4-31: E23 formülasyonuna ait damlacık boyutu ve polidispersite indeksi değerleri	108
Şekil 4-32: E24 formülasyonuna ait damlacık boyutu ve polidispersite indeksi değerleri	108
Şekil 4-33: E21 formülasyonuna ait zeta potansiyeli değeri	109
Şekil 4-34: E19-RES formülasyonuna ait damlacık boyutu ve polidispersite indeksi değerleri	110

Şekil 4-35: E21-RES formülasyonuna ait damlacık boyutu ve polidispersite indeksi değerleri	110
Şekil 4-36: E23-RES formülasyonuna ait damlacık boyutu ve polidispersite indeksi değerleri	111
Şekil 4-37: E24-RES formülasyonuna ait damlacık boyutu ve polidispersite indeksi	111
Şekil 4-38: E21-RES formülasyonuna ait zeta potansiyeli değeri.....	112
Şekil 4-39: E19 formülasyonuna ait akış diyagramı.....	116
Şekil 4-40: E19-RES formülasyonuna ait akış diyagramı	116
Şekil 4-41: E21 formülasyonuna ait akış diyagramı.....	117
Şekil 4-42: E21-RES formülasyonuna ait akış diyagramı	117
Şekil 4-43: E23 formülasyonuna ait akış diyagramı.....	118
Şekil 4-44: E23-RES formülasyonuna ait akış diyagramı	118
Şekil 4-45: E24 formülasyonuna ait akış diyagramı.....	119
Şekil 4-46: E24-RES formülasyonuna ait akış diyagramı	119
Şekil 4-47: Zamana karşı serbestleşen resveratrol miktarları	122
Şekil 4-48: Zamana karşı deriden geçen etkin madde miktarı.....	123
Şekil 4-49: Zamana karşı katı mikroiğne ile işlem görmüş deriden geçen madde miktarı	124
Şekil 4-50: Stabilite testi sonucunda formülasyonların fiziksel görüntüleri.....	125
Şekil 4-51: 25°C’de muhafaza edilen E21 damlacık boyutu	126
Şekil 4-52: 25°C’de muhafaza edilen E21 zeta potansiyeli	126
Şekil 4-53: 40°C’de muhafaza edilen ME9 zeta potansiyeli	127
Şekil 4-54: 40°C’de muhafaza edilen ME9 damlacık boyutu.....	127
Şekil 4-55: 25°C’de muhafaza edilen ME9 damlacık boyutu.....	128
Şekil 4-56: 25°C’de muhafaza edilen ME9 zeta potansiyeli	128

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- a/a: Ağırlık / Ağırlık
ANOVA: Analysis of Variance (Varyans Analizi)
C: Konsantrasyon
cm. santimetre
cm²: Santimetrekare
Da: Dalton
dak. Dakika
E: Emülsiyon
g.: Gram
GI: Gastrointestinal
HLB: Hidrofilik – Lipofilik Denge
HPLC: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
h/h: Hacim / Hacim
J_{ss}: Kararlı durum akışı
Ko-Sürfaktan: Yardımcı Sürfaktant
K_p: Permeabilite katsayısı
L: Litre
ME: Mikroemülsiyon
mg: Miligram
mL: mililitre
N: Newton
nm: Nanometre
Ort: Ortalama
PCS: Foton korelasyon spektroskopisi
PDI: Polidispersite İndeksi
RES.: Resveratrol
ROS: Reaktif Oksijen Ürünleri
R²: Determinasyon Katsayısı

rpm.: Dakikadaki Dönüş Sayısı

RSD : Bağlı Standart Sapma

S: Sürfaktant

SC: Stratum Corneum

SD: Standart Sapma

S/Y: Yağ içinde Su

SLS: Sodyum Lauril Sülfat

TEWL: Transepidermal Su Kaybı

TEM: Transmisyon (Geçirimli) Elektron Mikroskobu

UV: Ultraviyole

VK: Varyasyon Katsayısı

YEM: Yüzey Etkin Madde

Y/S: Su İçinde Yağ

YYEM: Yardımcı Yüzey Etkin Madde

µg.: Mikrogram

ÖZET

Samancı, B. (2021). Resveratrol İçeren Transdermal Mikroemülsiyonların Hazırlanması, Karakterizasyonu ve Katı Mikroİğneler İle Uygulanması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi. İstanbul.

Resveratrol güçlü bir antioksidan olmasının yanı sıra anti-kanser, anti-anjiyojenik, kardiyoprotektif, anti-diyabetik, anti-viral ve nöroprotektif aktivitelere sahip doğal bir polifenoliktir. İnsan vücudunda hızlı emilime uğramasına rağmen, bağırsak ve karaciğer metabolizması, resveratrolün sistemik biyoyararlanımı düşürmektedir. Bu çalışmada, oral uygulama ile görülen olumsuzlukların üstesinden gelmek için resveratrolün optimum topikal bir formülasyonun geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Topikal uygulama için en yaygın ve güvenilir olan bileşenler seçilerek aynı miktarda resveratrol içeren (%0,05 (a/a) optimum mikroemülsiyon (ME9) ve makroemülsiyon (E21) formülasyonları geliştirilmiştir. Ayrıca geçiş miktarlarını kıyaslamak için bu formülasyonlar yanında aynı miktarda resveratrol içeren alkolün çözücü olarak kullanıldığı standart çözelti de hazırlanmış ve üç farklı formülasyonun *ex vivo* geçiş çalışmaları yürütülmüştür. Bu testler kapsamında 24 saat sonunda domuz kulağı derisinden geçen resveratrol miktarları saptanmıştır. İkinci aşamada, ideal bulunan formülasyonlar, katı mikroİğne ile işlem görmüş domuz kulağı derisinden geçen resveratrol miktarı açısından karşılaştırılmıştır. 24 saat sonunda reseptör ortama geçen resveratrol miktarı ME9’da $0,008 \pm 0,0002 \text{ mg/cm}^2$, E21’de $0,0027 \pm 0,0001 \text{ mg/cm}^2$ ve standart çözeltide $0,021 \pm 0,0001 \text{ mg/cm}^2$ olarak bulunmuştur. Mikroİğne ile yapılan çalışmada ME9, E21 ve standart çözeltiden 24 saat sonunda reseptör ortama geçen madde miktarları arasında anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). Katı mikroİğne uygulanan derilerden 24 saatin sonunda reseptör faza geçen etkin madde miktarı standart çözeltide 1,6 kat artarken, ME9 ve E21 formülasyonlarında sırasıyla 2,04 ve 1,8 kat artmıştır.

Bu verilere dayanarak katı mikroİğneler ile kombine edilmiş resveratrol içeren mikroemülsiyonun derinin bariyer tabakasını aşmada daha etkili olacağı ve böylece transdermal uygulamada daha etkin tedavilerin yapılmasına katkıda bulunacağı öngörülmüştür.

Anahtar Kelimeler : Deriden geçiş, Mikroemülsiyon, Resveratrol, Katı mikroİğne, Transdermal

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 35272

ABSTRACT

Samancı, B. (2021). Transdermal Microemulsions Containing Resveratrol Preparation, Characterization and Application with Solid Microneedles. İstanbul University, Institute of Health Science, Pharmaceutical Technology Department. Doktora Tezi. İstanbul.

Resveratrol is a natural polyphenolic with anti-cancer, anti-angiogenic, cardioprotective, anti-diabetic, anti-viral and neuroprotective activities as well as being a powerful antioxidant. Despite its rapid absorption, intestinal and hepatic metabolism reduces the systemic bioavailability of resveratrol. In this study, it was aimed to develop an optimum topical formulation of resveratrol to overcome the disadvantages of oral administration. Optimum micromulsion (ME9) and macroemulsion (E21) formulations containing the same amount of resveratrol (0.05% (w/w)) were developed. In addition, a standard alcohol solution containing the same amount of resveratrol was prepared. The amount of resveratrol penetrated through the pig ear skin at the end of 24 hours was determined within *ex vivo* studies. In the second stage, the ideal formulations were compared in terms of the amount of resveratrol penetrate through the solid microneedle treated pig ear skin. Resveratrol amount passed to the receptor medium was found to be 0.008 ± 0.0002 mg/cm² in ME9, 0.0027 ± 0.0001 mg/cm² in E21 and 0.021 ± 0.0001 mg/cm² in standart solution. There was a significant difference between the amount of resveratrol penetrate from the ME9, E21 and standard solution to the receptor medium at the end of 24 hours ($p < 0.05$). Resveratrol quantity found in the receptor medium was increased up to 1.6, 2.04 and 1.8 times in the standard solution, ME9 and E21 formulations, respectively.

In this study, it was assumed that the resveratrol-containing microemulsion combined with solid microneedles would be more effective to overcome barrier layer of the skin, thus contributing to more effective treatments.

Key Words: Mikroemulsion, Resveratrol, Skin penetration, Solid microneedle, Transdermal

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 35272



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Deri, yaklaşık 2 m²'lik alana ve toplam vücut ağırlığının %10'una sahip insan vücudunu kaplayan en büyük organdır. Derinin en önemli görevlerinden biri vücudu fiziksel, kimyasal ve mikroorganizma ve alerjenlere karşı korumaktır. Deri farklı katmanlardan oluşmaktadır. En dış katmanını, ölü hücrelerden oluşan ve deriye geçişi sınırlayan stratum corneum (SC) tabakasıdır. SC tabakası vücudu dış etkenlere karşı korurken aynı zamanda ilaçların geçişini de sınırlamaktadır. Bu bariyer tabakanın aşılıp daha fazla etkin maddenin topikal ilaç taşıyıcı sistemler ile kullanılabilmesi için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler arasında kimyasal geçiş artırıcıların kullanılması veya SC tabakasında boşluklar oluşturan veya bu tabakayı tamamen kaldırarak geçişi artıran fiziksel yöntemler bulunmaktadır. Bu fiziksel yöntemlerden birisi mikroiğnelerdir. Mikroiğnelerin; katı mikroiğneler, çözünebilir mikroiğneler, içi boşluklu mikroiğneler, kaplı mikroiğneler ve hidrojel mikroiğneler olmak üzere 5 çeşidi bulunmaktadır. Katı mikroiğneler; SC tabakasında delikler oluşturduktan sonra çözünmeden deriden çıkarılan mikroiğnelerdir.

Polifenoller, insan sağlığı üzerindeki potansiyel yararları nedeniyle büyük ilgi çekmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda, polifenollerin çok sayıda hastalık çeşidi için bir tedavi seçeneği olabileceği görülmektedir. Polifenollerin, yaygın kullanılan kimyasal ilaçlardan daha az yan etkiye sahip olması önemli avantajları arasındadır. Bu nedenle, gıda ve ilaç endüstrisinde kullanılan fenolik bileşiklerin miktarı her geçen yıl artmaktadır. Polifenol grubu içerisinde yer alan resveratrol antioksidan özelliğe sahip olup, kanser, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi oksidatif stres ile ilişkili birçok hastalığın önlenmesi ve tedavisinde önemli bir rol oynamaktadırlar. Suda çözünürlüğün düşük olması ve karaciğerde hızlıca metabolize olmasından kaynaklı olarak biyoyararlanımı düşüktür. Yüksek dozlarda alınmasında mide bulantısı ve ishal gibi gastrointestinal problemlere yol açar (Brown et al., 2010). Yüksek moleküler ağırlıklı (500 Da'dan büyük), iyonizasyon derecesi yüksek (log Pow ≤ -1 veya ≥ 4), topolojik polar yüzey alanı ($> 120 \text{ \AA}^2$), erime noktası yüksek ($> 200 \text{ }^\circ\text{C}$) ve düşük lipofilisiteye sahip eksojen moleküllerin SC bariyerini aşabilmesi neredeyse mümkün olmamaktadır (Ates, Steinmetz, Doktorova, Madden, & Rogiers, 2016; Ratz-Lyko, Arct, Majewski, & Pytkowska, 2015). Bilimsel veriler, resveratrolün moleküler ağırlığının 228,25 Da, log P n-oktanol / su = 3.32, polar yüzey alanı 60.69 $\text{\AA}^2$ ve erime

noktası 254 ° C olduğunu göstermektedir. Yukarıda bahsedilen verilere dayanarak, resveratrolün SC bariyerini aşabilen bir bileşik olduğu varsayılabilir. Resveratrolün noniyonik formunun, partisyon katsayısına göre yüksek lipofiliklik gösterdiği görülmektedir ($\log P$ n-oktanol / su = 3.32) (C. F. Hung, Y. K. Lin, Z. R. Huang, & J. Y. Fang, 2008; Timmers, Auwerx, & Schrauwen, 2012). Bu nedenle resveratrol, nötr durumda deriden uygulama için aday bir ilaç olarak uygundur.

Etkin maddelerin deri yolu ile verilmesi uygulama kolaylığı bakımından hem oral hem de parenteral yola göre daha çok avantajlı olmaktadır. Bu çalışmamızda resveratrol formülasyonları için, ana taşıyıcı sistem olarak mikroemülsiyon dozaj şekli seçilmiştir. Mikroemülsiyonlar, yüzeyler arası bir film ile stabilize edilmiş, termodinamik açıdan kararlı, saydam, izotropik, düşük viskoziteli, temel olarak yağ, su, sürfaktan bileşenlerinden oluşan kolloidal dispersiyonlardır. Mikroemülsiyonların seçilme nedeni, ilaçların deriden uygulanmasında avantaj sağlayan üç temel mekanizması ile açıklanabilir. Birincisi, mikroemülsiyon sistemler hem lipofilik hem de hidrofilik etkin maddeleri çözme kabiliyetine sahip olup etkin maddelerin deri boyunca termodinamik aktivitesini arttırabilir. İkincisi, mikroemülsiyon yapısını oluşturan bileşenlerin deriden geçişi artırıcı özellikleri ile SC yapısını değiştirerek deriden etkin maddenin geçişini arttırabilir. Üçüncüsü, etkin maddenin ara yüzeyde bulunması nedeniyle kontrollü bir salım elde edilebilir.

Bu çalışmada resveratrol içeren makroemülsiyon, mikroemülsiyon ve standart çözelti formülasyonlarının *in-vitro* ve *ex-vivo* deriden geçişleri karşılaştırıldı. Bu amaçla formülasyon çalışmalarında y/s makroemülsiyon ve mikroemülsiyon formülasyonları geliştirildi. Formülasyon karakterizasyon çalışmaları sonuçları değerlendirilerek ideal formülasyonlar seçildi. Makroemülsiyon ve mikroemülsiyonlardan optimum özelliklere sahip olanlar geçiş çalışmalarında kullanılmak üzere belirlendi. Difüzyon hücreleri kullanılarak *in vitro* ortamda etkin maddenin selüloz asetat membrandan geçişi, *ex-vivo* ortamda ise; domuz kulak derisinden etkin maddenin geçişi incelendi. *Ex vivo* çalışmalarda formülasyonlar katı mikroiğne ile işlem görmüş ve katı mikroiğne ile işlem görmemiş domuz kulak derisinde resvetarol salım miktarları karşılaştırıldı. Seçilen makroemülsiyon ve mikroemülsiyon formülasyonları 25°C ve 40°C’de, karanlıkta, 6 ay kararlılık çalışmasına tabi tutuldu.

Daha önce anlatıldığı gibi bu çalışma formülasyon geliştirme, *in-vitro* ve *ex-vivo* olmak üzere üç aşamada planlandı. Günümüzde, maliyetlerin çok yüksek olması

nedeniyle yeni bir ilaç molekülü keşfetmek yerine var olan molekülün etkinliğinin artırılması amaçlandı. Bu çalışmada, geliştirilen formülasyonlar ve deriden geçişi artırıcı katı mikroiğne sistemler ile resveratrolün deriden penetrasyon miktarı karşılaştırarak, tedavi için daha etkin olabilecek alternatif bir dozaj şeklini önerilmesi planlanmaktadır.



2. GENEL BİLGİLER

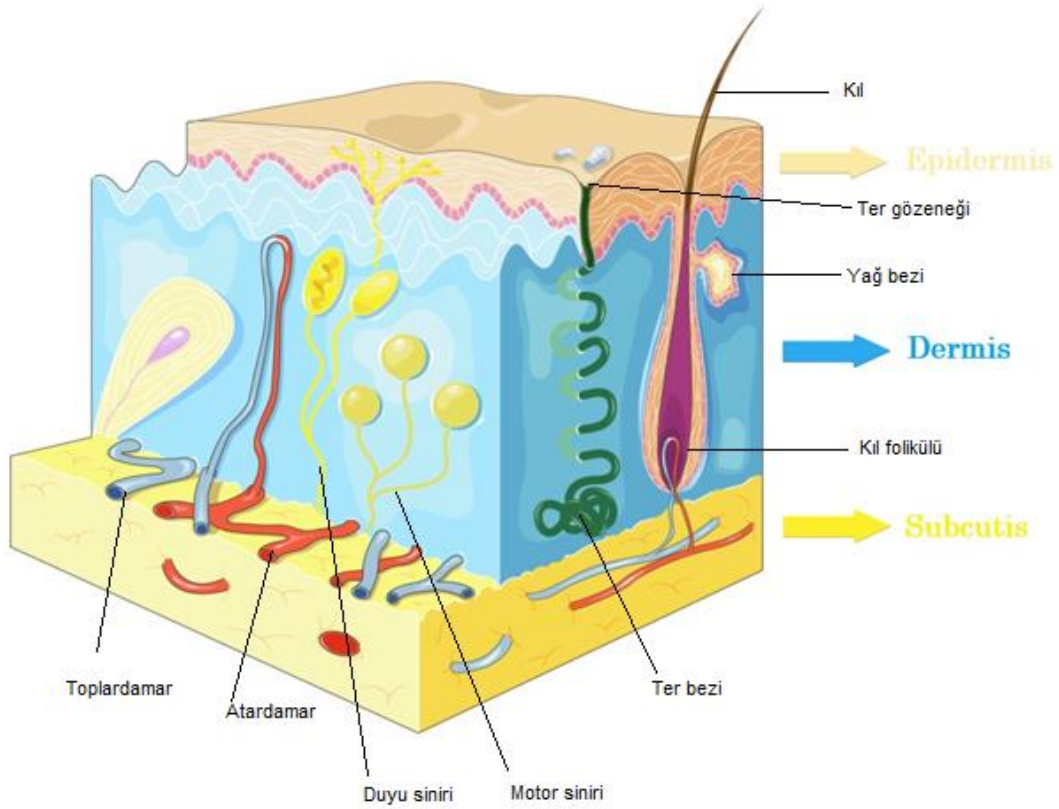
2.1. Deri Yapısı ve İşlevleri

Deri, insan vücudunun yaklaşık % 10'u ağırlığında ve 2 m² yüzey alanına sahip olmakla en büyük insan organı olarak bilinmektedir (Degim, 2006; McGrath, Eady, & Pope, 2004; Murdan, 2004). İnsan derisinin kalınlığı vücut bölgesine göre değişmekle birlikte genellikle 0,5 – 3 mm kalınlığındadır. İnsan derisinin pH'ı vücudun farklı bölgelerinde değişmekte olup genellikle 5,2 – 5,6 aralığındadır (Gniadecka, Faurskov Nielsen, Christensen, & Wulf, 1998). İnsan derisi vücut hareketleri sonucunda kıvrım oluşturmaya kadar esnek yapıdadır (Değim, 2007). Deri insan vücudunu sararak, hayati organların fizyolojik ortamda çalışmasını sağlamaktadır. Ayrıca, insan vücudu ile dış dünya arasında bir ara yüz görevi görmektedir. İnsan vücudu ile çevre arasındaki madde geçişleri doğrudan ve dolaylı olarak deri aracılığıyla olmaktadır. İnsan vücudu ile dış çevre arasındaki madde alışverişi deri yapısının bozulduğu durumlar dışında çok verimli bir şekilde yapılmaktadır. Hangi maddenin ne kadar miktarda vücuda alınması, hangi maddenin ne kadar miktarda dışarı atılması deri tarafından yüksek seçicilikte yapılmaktadır (Ng & Lau, 2015). Derinin bu yüksek seçicilik özelliğinden dolayı, bazı terapötik maddelerin deri yoluyla vücuda verilmesi, derinin bariyer özelliğinden dolayı büyük bir engel teşkil etmektedir. Deri insan dokunma duyu organı (Tsakovska et al., 2017) olmakla birlikte vücut ısının ayarlanması da derinin görevleri arasındadır (Sawasaki, Iwase, & Mano, 2001). Derinin bazı fonksiyonları aşağıdaki gibi sıralanabilir (Samanci, Yener, & Değim, 2021; Tsakovska et al., 2017).

- Vücudu istenmeyen toksin maddelerden ve patojenlerden korur
- Mekanik darbelere karşı koruma sağlar
- Vücudun su kaybını engeller
- İnflamasyon yapıcı maddelere karşı antienflamatuvar fonksiyonu aracılığıyla immünolojik aktivite gösterir.

2.2. Derinin Tabakaları

İnsan derisi, her bir doku katmanı farklı işlevleri yerine getiren farklı hücre tiplerinden oluşan tabakalı bir epitelidir. İnsan derisi üsten aşağıya doğru sırasıyla epidermis, dermis ve subcutis olmak üzere 3 temel tabakadan oluşmaktadır (Lai-Cheong & McGrath, 2013) (Şekil 2-1) (https://smart.servier.com/smart_image/skin/).



Şekil 2-1: Derinin yapısı

Epidermis tabakası en dış yüzeyden dermise doğru sırasıyla stratum corneum (boynuzsu tabaka), stratum granulosum (granular tabaka), stratum spinosum (dikenli hücre tabaka) ve stratum basal'dan (veya startum germinativum) oluşmaktadır.

SC epidermis tabakasının en dış tabakasıdır. 10-15 korneosit tabakasından oluşup, kalınlığı 10 – 20 μm civarındadır (Murdan, 2004). Korneositler, epiderminin daha derin katmanlarında yer alan keratinositlerin farklılaşmasıyla oluşan ölü hücrelerdir. Korneositler morfolojik 0.2 μm kalınlığında ve 40–60 μm genişliğinde yassılaşmış hücrelerdir (Kashibuchi, Hirai, O'Goshi, & Tagami, 2002). SC yapısı genellikle korneositlerin tuğlaya benzetildiği ve hücre dışı matrisin harca benzer olduğu "tuğla ve harç" modeli olarak ifade edilir (Peter M Elias, 1983; Larraneta, McCrudden, Courtenay, & Donnelly, 2016; Michaels, Chandrasekaran, & Shaw, 1975). Deriden geçişin büyük bir kısmı SC tabakasından difüzyonla gerçekleştiğinden, bariyer tabakasının yapısını aydınlatmak için çok fazla çalışma yapılmıştır. Hücre dışı matrisin büyük çoğunluğu lipid yapısında olduğundan, SC'un bariyer işlevi bu lipid yapıdan kaynaklandığı bilinmektedir (Bouwstra, Gooris, Dubbelaar, & Ponc, 2002). SC yapısındaki lipid yapının bozulmasıyla, deriden geçişin arttığı yapılan çalışmalarda

görülmüştür. Kimyasal penerasyon artırıcılar, SC'daki lipit yapıya bozarak penetrasyonu artırmaktadırlar (Adrian C Williams & Barry, 2012).

2.2.1. Canlı Epidermis

Epiderminin SC dışında geri kalan kısımları çekirdekli hücrelerden oluşur. Bu nedenle canlı epidermis olarak adlandırılır. Canlı epidermis sinir hücresi ve kılcal damar içermeyip, ortalama 50 – 100 µm kalınlığındadır (Agache, Humbert, & Fanian, 2017; Ng & Lau, 2015). Büyük bir bölümü keratinositlerden (% 95) oluşur ve geri kalanı Langerhans hücreleri, melanositler ve Merkel hücreleridir. Keratinositler, stratum bazalden başlayarak SC'a doğru farklılaşan hücrelerdir. Artan keratinleşme (keratin liflerinin hücre içi ağlarının oluşumu), SC lipidlerini salgılayan lamelli cisimlerin oluşumu ve hücre içi organellerin ve çekirdeklerin kaybı farklılaşmayı ifade etmektedir.

2.2.2. Dermis

Dermis tabakası derinin elastikiyet ve gerginliğinden sorumludur. Kalınlığı genellikle 1 mm'den büyüktür (Agache, 2004). Esas olarak, kolajen ve elastin gibi fibroblastlardan oluşur. Ayrıca, makrofaj ve dermal dendritik hücreler gibi bir dizi immün hücresi içerir. Dermis, papiller dermisteki kollajen liflerinin daha ince ve daha gevşek paketlenmesiyle mikroskobik olarak birbirinden ayırt edilebilen üst papiller dermis ve alt retiküler dermis olmak üzere iki alt bölüme ayrılabilir. Papiller dermis, dermo-epidermal birleşme noktasında epiderminin bazal tabakası ile iç içe geçmiş papilla içerir. Dermis, dermo-epidermal birleşmenin dermal tarafına uzanan kıl folikülleri, ter bezleri, yağ bezleri, duysal sinir uçları, lenfatik damarlar ve kılcal kan damarlarını içerir. Böylelikle, dermo-epidermal bağlantı boyunca difüzyon yoluyla vasküler epidermise besin ve oksijen iletiminin yanı sıra atıkların uzaklaştırılmasına da olanak sağlar (Nordstrom, Schmus, McGinley, & Leyden, 1986; Zouboulis, 2004; Zouboulis et al., 2016).

2.2.3. Subcutis (Hipodermis)

Subcutis diğer adıyla hipodermis derinin en alt tabakasıdır. Göz kapağı gibi bazı bölgelerde bu tabaka bulunmamaktadır. Hipodermis, esas olarak deri altı yağ tabakasından oluşur. Bu yağ hücreleri sayesinde vücuttaki en büyük enerji deposudur (Darlenski, Sassning, Tsankov, & Fluhr, 2009; Kolarsick, Kolarsick, & Goodwin, 2011; Wang, Wood, & Trayhurn, 2007). Bu deri tabakasına gömülü daha büyük lenfatik ve

kan damarları bulunmaktadır. Tabakanın kalınlığı hormonlarla düzenlenir ve bireyler arasında farklılık gösterir.

2.3. Deriden Geçiş

Deri, seçici olarak geçirgen bir bariyerdir. Bu nedenle, farklı maddeler deriye farklı oranlarda nüfuz eder. İlaç nüfuz etme oranı akış veya akı (J) olarak ifade edilir, yani birim zamandan birim alandan nüfuz eden ilaç miktarını gösterir (genellikle $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{saat}^{-1}$). Akı, derinin aktif maddeye olan geçirgenliği ve maddenin deriden geçen konsantrasyon gradyanı (ΔC) (genellikle μgmL^{-1}) ile belirlenir.

$$J = K_p \times \Delta C \quad (2-1)$$

Eşitlik 2-1'e göre derinin geçirgenliği permabilite katsayısı olan K_p , (cmh^{-1}) ve iki bölme arasındaki konsantrasyon gradientine (ΔC) bağlıdır. Pasif ilaç absorpsiyonunda, permeabilite katsayısı, partisyon katsayısı (P) (formülasyondan deriye ne kadar kolay geçiş yaptığını gösterir), difüzyon katsayısı (D), (maddenin deriye ne kadar kolay yayıldığını ölçen değer) birleşik bir ölçüsüdür ve zarın kalınlığına (h) bağlıdır.

$$K_p = \frac{PD}{h} \quad (2-2)$$

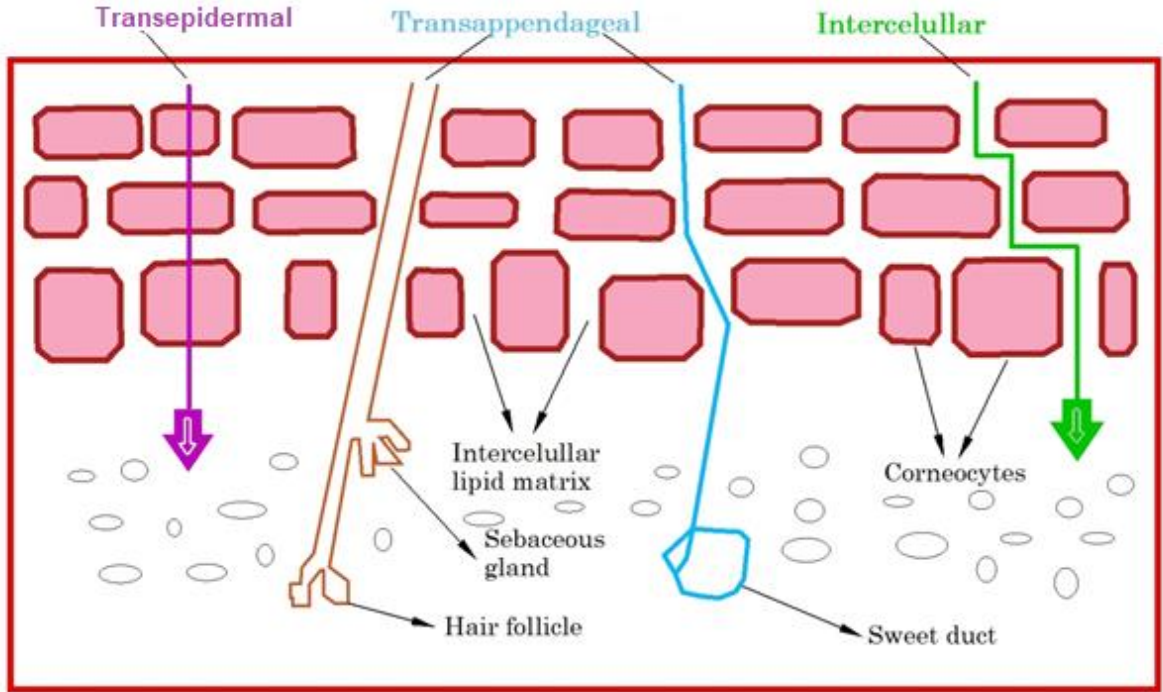
Partisyon katsayısı ve difüzyon katsayısı (ve dolayısıyla Eşitlik 2-2'ye göre deriden geçiş), geçen maddenin moleküler kütle ve hidrofiliklik gibi fizikokimyasal özelliklerine büyük ölçüde bağlıdır. Genel bir kural olarak, moleküller kütlesi <500 Da ve oktanol-su partisyon katsayısı ($\log P_{\text{octanol-su}}$) 1-3 olan (orta derecede hidrofilik olan) maddeler deriden en kolay geçen aktif maddelerdir. Deri permeabilitesi (K_p), moleküler kütle (MW) ve hidrofiliklik ($\log P_{\text{octanol-su}}$) arasındaki kantitatif ilişki, Eşitlik 2-3'e göre; (Potts & Guy, 1992)

$$K_p = 0,71 \log P_{\text{octanol-su}} - 0,0061 \times MW - 2,74 \quad (2-3)$$

Hidrojen bağı aktivitesi, moleküler hacim, erime noktası ve çözünürlük deriden geçirgenliği etkileyebilecek diğer faktörler arasında yer alır. Bu parametrelerin rolünü deri geçirgenliğiyle ilişkilendirmek için başka matematiksel modeller geliştirilmiştir (Magnusson, Pugh, & Roberts, 2004; Moss, Dearden, Patel, & Cronin, 2002).

2.4. Deriden Geçiş Yolları

Bir molekül deriye transepidermal yol (intraselüler, transselüler), interselüler yol ve yan geçit yol (transappendageal) olmak üzere üç farklı yoldan nüfuz edebilir (Marwah, Garg, Goyal, & Rath, 2016). Şekil 2-2’de deriden geçiş yolları gösterilmektedir (Samanci et al., 2021). Deriden geçen madde miktarı tüm yollaklardan geçen madde miktarların toplamıdır.



Şekil 2-2: Deriden geçiş yolları

2.4.1. Transepidermal Yol (İntraselüler Yol, Transselüler Yol)

Transepidermal yolda, aktif madde epidermisten hücre içi ve / veya hücre dışı boşluklardan geçerek dermise ve hipodermise ulaşır. Bu yoldan geçen madde hem hücre içinden geçer hem de hücre dışı matriksten geçmek zorundadır. Bu, dönüşümlü hidrofilik ve lipofilik alanlara partisyon ve difüzyon içerir. Genellikle hücre içi hücre dışı matriksten daha hidrofilik yapıdadır. Bu geçiş yolunda madde en kısa yoldan geçerek alt tabakalara varır. Fakat tüm tabakalardan geçtiği için oldukça yavaş olarak geçer.

2.4.2. Yan Geçit Yol (Transappendageal Yol)

Yan geçit yolunda, aktif madde ter kanallarından veya kıl foliküllerden geçerek dermise ve hipodermise ulaşır. Yan geçit yolu ile ilgili çalışmalar son zamanlarda önem kazanmıştır (Patzelt & Lademann, 2015). Büyük moleküllü polar yapıdaki moleküllerin

geçişine olanak sağladığı için “polar yol” olarak da tanımlanır. Ter kanallarından geçen hidrofilik yapıdaki maddeler için önemli bir yoldur (El Maghraby, Barry, & Williams, 2008).

2.4.3. İnterselüler Yol

Hücreler arası yolda, madde hücre içinden geçemediğinden hücre dışı matriksten dolambaçlı yoldan dolaşarak alt tabakalara ulaşır. Aktif madde lipit tabakaları içinden geçer. 500 Da’dan küçük molekül ağırlıklı ve iyonize olmayan yüksüz maddeler bu yolla geçerler. İlaç öncelikle derideki lipit faza geçmeli ve daha sonra difüze olmalıdır. Bunun için lipofilik maddeler için önemli bir geçiş yoludur. Oktanol/su dağılımının hücreler arası geçiş yolu için penetrasyonu etkileyen ana etken olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Adrian C Williams & Barry, 2012).

2.5. Deriden Geçiş Etkileyen Faktörler

2.5.1. Biyolojik Faktörler

Maddelerin deriden geçişi vücuttaki bölgeden bölgeye değişir. Yapılan bir çalışmada hidrokortizonun plantar ve skrotum bölgelerinde deriye nüfuz etme oranında 40 kattan fazla bir fark görülmüştür (Feldman, 1967; Nielsen, Benfeldt, & Holmgaard, 2016). Farklı vücut bölgelerindeki deriler arasındaki penetrasyon farklılığı, doğrudan deri kalınlığıyla ilişkili değil (P. M. Elias, Cooper, Korc, & Brown, 1981), daha çok folikül sayısı, SC'nin kalınlığı, sebum bileşimi ve kılcal damarlar arasındaki mesafe gibi deri yapısı bileşenleri etkili olmaktadır (Rougier et al., 1986).

Kan akışı, pH, deri kalınlığı, saç, gözenek yoğunluğu, proteinler, glikozaminoglikanlar, su oranı ve lipitlerin içeriği gibi deri ile ilgili faktörler, yaş ile birlikte değişmektedir. Yakın zamanda yapılan çalışmada, yaşa bağlı bu faktörlerin, ilaçların her iki yönde de perkütan penetrasyon oranını doğrudan veya dolaylı olarak etkileyebileceği sonucuna varılmıştır (Konda, Meier-Davis, Cayme, Shudo, & Maibach, 2012). Derinin kendini yenilenmesi yaşla birlikte daha az etkili hale gelip, bariyer hasarı ile penetrasyon oranının artması ile orantılı olması beklenirken, diğer bazı biyolojik faktörlerin penetrasyon hızı üzerindeki etkisinin analizleri, perkütan penetrasyonun yaşlı bireylerde daha yavaş olabileceğini göstermektedir (Konda et al., 2012).

Deri bütünlüğü perkütan penetrasyon oranını da önemli ölçüde etkiler. Bariyer işlevi esas olarak SC'nin bütünlüğüne bağlıdır. Kimyasal faktörler (deterjanlar, çözücüler), fiziksel faktörler (hava, yanma, mekanik hasar) ve patolojik faktörler (deri hastalıkları)

gibi nedenlerle deri yapısının değişmesi veya hasar görmesi sonucunda derinin bütünlüğü bozulur ve maddelerin deriden geçirgenliğini artırır (Benfeldt, Serup, & Menne, 1999; Bodenlenz et al., 2012; Kezic & Nielsen, 2009).

2.5.2. Maddeye Ait Fizikokimyasal Özellikler

Çoğu maddenin deriden geçişi pasif difüzyon olup Fick kanunları ile belirlenir. Moleküle ait özgü permeabilite katsayısı, K_p , deriden nüfuz etmeyi etkileyen bir dizi fizikokimyasal özelliği bütünleştirir. Bu nedenle, K_p esas olarak moleküler ağırlığa, oktanol-su partiyon katsayısı ($\log P_{ow}$) ve moleküler boyut (stereokimya) ile ifade edilen çözünürlük özelliklerine bağlı olarak değişmektedir. Genel olarak, daha küçük moleküler ağırlığa sahip ve $\log P_{ow}$ değerleri -2 ile $+2$ arasındaki maddeler ile optimal geçirgenlik oranları elde edilir (Bo Nielsen, Ahm Sorensen, & Nielsen, 2009). Ayrıca, buhar basıncı, iyonizasyon (pH'a bağlı olan) ve proteine bağlanma afinitesi, gibi faktörler de deri yüzeyindeki madde konsantrasyonunu değiştirerek deriden penetrasyonu etkilemektedir. Laboratuvar ortam koşulları dışında deri çevredeki bazı kimyasallara maruz kalabilir. Bundan dolayı, bilimsel deriden geçiş çalışmaları yapılırken, sonuç verileri etkileyecek olan bu riskler göz önünde bulundurulmalıdır.

2.6. Deriden Geçiş Artıran Mekanizmalar

2.6.1. Kimyasal Penetrasyon Artırıcılar

2.6.1.1. Sülfoksitler ve Benzeri Kimyasallar

Diemetilsülfoksit (DMSO) ilk ve en yaygın olarak kullanılan kimyasal penetrasyon artırıcı ajanlardan biridir. Renksiz, kokusuz ve hidroskopiktir. Farmasötik bilimlerin birçok alanında 'evrensel bir çözücü' olarak kullanılır. DMSO sistemik inflamasyon tedavisinde topical olarak uygulanmıştır. Penetrasyon artırıcı olarak çok hızlı etki göstermektedir. Çok hızlı etki göstermekle birlikte bazı sorunlara da neden olmaktadır. Penetrasyon artırıcı etkisi konsantrasyona bağlıdır ve optimum etkinlik için genellikle % 60'tan fazla DMSO içeren yardımcı çözücüler gereklidir. Yüksek konsantrasyon DMSO içeren çözeltiler deride eritem ve kabartıya neden olur. Derideki bazı proteinlerin denatüre olması eritem, ölçeklenme, kontakt ürtiker, batma ve yanma hissine neden olur (Kligman, 1965). Bilim insanları bu sorunların üstesinden gelmek için dimetilasetamid ve dimetilformamid (DMF) gibi kimyasal penetrasyon artırıcı çözücüleri araştırdılar. Ancak, DMF ile işlem gören deriye nüfuz eden kafein

miktarında 12 kat artış görülse de deride dönüşü olmayan zar hasarına neden olduğu sonucuna varıldı (Southwell & Barry, 1983). DMSO lipid yapıyı çözerek boynuzsu tabakayı daha geçirgen hale getirmektedir (Mathur, Satrawala, & Rajput, 2014; Menczel, 1995).

2.6.1.2. Azonlar

Azon (1-dodesilazasikloheptan-2-on veya laurokapran), penetrasyon artırıcı olarak özel tasarlanmış ilk moleküldür. Erime noktası -7°C olan renksiz, kokusuz, yağlı ama yine de yağlı olmayan bir his veren bir sıvıdır. Oldukça lipofilik bir maddedir (log p oktanol / su: 6,2 civarındadır). Alkol ve propilen glikol dahil çoğu organik çözücü içinde çözünür ve bunlarla uyumludur. Steroidler, antibiyotikler ve antiviral ajanlar dahil olmak üzere çok sayıda aktif maddenin deriden geçişini artırır. Azon en çok % 0,1 ila 5 aralığındaki düşük konsantrasyonlarda etkili olup, çoğunlukla % 1 ila 3 arasındaki konsantrasyonlarda kullanılır (Adrian C Williams & Barry, 2012). Azon SC'daki lipit yapısını bozarak deriden geçişini artırır.

2.6.1.3. Pirolidonlar

Pirolidonlar, hidrofilik (örneğin, mannitol ve 5-flurourasil) ve lipofilik (progesteron ve hidrokortizon) maddeler dahil olmak üzere çok sayıda molekül için penetrasyon artırıcı olarak kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada, N-metil-2-pirolidon, matris tipi bir transdermal yama içinde formüle edilen kaptopril için sınırlı olarak penetrasyon artırdığı görüldü (E.-S. Park, Chang, Rhee, & Chi, 2001).

2.6.1.4. Yağ Asitleri

Deriden ilaç emilimi, en yaygın kullanılanı oleik asit olan çeşitli uzun zincirli yağ asitleri tarafından artırılmıştır. Yağ asitleri, SC tabakasındaki lipitlerle etkileşerek etki gösterir. Azonlarda olduğu gibi lipit tabakaların geçiş sıcaklığını düşürerek lipit akışkanlığını artırır. Yapılan çalışmalarda oleik asidin, salisilik asidin deriden geçişini 28 kat, 5-florourasilin deriden geçişini ise 56 kat artırdığı görülmüştür (Funke et al., 2002; Pathan & Setty, 2009; Santoyo & Ygartua, 2000).

2.6.1.5. Esansiyel Yağ, Terpenler ve Terpenoidler

Terpenler, uçucu yağlarda bulunan, yalnızca karbon, hidrojen ve oksijen atomlarından oluşan, ancak aromatik olmayan bileşiklerdir. Çok sayıda terpen ilaçların yanı sıra aroma ve koku verici maddeler olarak kullanılmaktadır. Okaliptüs, Chenopodium ve

ylang-ylang uçucu yağlarının, *in vivo* insan derisinden 5-florourasil etkin maddesi için penetrasyon arttırıcılar olduğu bulunmuştur (A. Williams & Barry, 1989). L-mentol, morfin hidroklorürün *in vitro* tüysüz sıçan derisinden (Morimoto, Wada, Seki, & Sugibayashi, 2002), imipramin hidroklorürün sıçan derisinden difüzyonunda (Jain, Thomas, & Panchagnula, 2002) ve hidrokortizonun tüysüz fare derisinden geçişini kolaylaştırmak için kullanılmıştır (El-Kattan, Asbill, & Michniak, 2000).

2.6.1.6. Oksazolidinonlar

Oksazolidonlar birçok kozmetik ve kişisel bakım ürünlerinde kullanılan yeni kimyasal ajanlardır. Aktif maddenin daha çok derinin katmanlarına yerleşmesini sağladığından sistemik dolaşıma geçişi engellemektedir (Seth, 1999). Bu penetrasyon artıcıların yapısal özellikleri, üst deri katmanlarında doğal olarak bulunan sfingozin ve seramid lipidleri ile yakından ilgilidir. 4-desil oksazolidin-2-on gibi oksazolidinonların, retinoik asit ve diklofenak sodyum gibi birçok aktif maddenin deri katmanlarında lokalize ettiği yapılan çalışmalarda görülmüştür (Asbill & Michniak, 2000).

2.6.1.7. Üre

Üre, SC'un hidrasyonunu kolaylaştırarak ve bariyer tabakası içinde hidrofilik difüzyon kanalları oluşturarak penetrasyonunu artırır. Siklik üre penetrasyon arttırıcılar biyolojik olarak parçalanabilen, bir polar ana kısım ve bir uzun zincirli alkil ester grubundan oluşan toksik olmayan moleküllerdir. Penetrasyon arttırıcı özellik hem hidrofilik aktivitenin hem de lipid bozma mekanizmasının bir sonucu olabilir (Mathur et al., 2014).

2.6.1.8. Su

Genel olarak, artan doku hidrasyonunun hem hidrofilik hem de lipofilik maddelerin deriden geçişini artırmaktadır. Ancak, Bucks ve Maibach, bu tür bir genellemeye karşı uyarıda bulunarak, oklüzyonun perkütan absorpsiyonu her zaman artırmadığını ve hidrofilik bileşiklerin deriden geçişinin oklüzyonla artmayabileceğini belirttiler (Bucks, 1999). Ayrıca, oklüzyonun, transdermal ve topikal preparatlarda bazı lokal cilt tahrişine neden olabileceği konusunda uyardılar.

2.6.1.9. Alkoller, Yağlı Alkoller ve Glikoller

Etanol, birçok transdermal formülasyonda yaygın olarak kullanılmaktadır. Genellikle yamalarda tercih edilen bir çözücüdür. Ayrıca, *in vitro* geçiş deneyleri sırasında sink

koşullarını sağlamak için yaygın olarak suyla birlikte yardımcı çözücü olarak kullanılır. Suda olduğu gibi, etanol, yaklaşık $1 \text{ mg} / \text{cm}^2 / \text{sa}$ sabit durum akışı ile insan derisine hızla nüfuz eder (Berner et al., 1989). Etanol, sıçan derisinden levonorgestrel, estradiol, hidrokortizon ve 5-florourasil geçişini artırmak için kullanılmıştır (Friend, Catz, Heller, Reid, & Baker, 1988). Bununla birlikte, etanol ile su ortak çözücü aracı kullanıldığında, etanolün etkisi konsantrasyona bağlı olarak değişmektedir.

2.6.1.10. Yüzey Etkin Maddeler

Yüzey etkin maddeler önceki bölümlerde anlatılan penetrasyon artırıcılar (alkoller, propilen glikol) gibi çoğu ilaç, kozmetik ve zirai ürün formülasyonlarında bulunmaktadır. Yüzey etkin maddeler, genellikle lipofilik aktif bileşenleri çözündürmek için formülasyonlara eklenir. Bu nedenle, SC lipitleri çözündürme potansiyeline sahiptirler. Bir hidrofilik baş grubu ile bir lipofilik kuyruktan oluşan yüzey etkin maddeler, genellikle hidrofilik kısmına göre tarif edilirler. Sodyum lauril sülfat (SLS) anyonik yüzey aktif maddeler arasında yer alır, katyonik yüzey aktif maddeler arasında setiltrimetil amonyum bromür bulunur. Oksinol olmayan yüzey aktif maddeler iyonik olmayan yüzey etkin maddelerdir. Dodesil betain zwitter iyonik yüzey etkin maddeler grubunda yer alır. Anyonik ve katyonik yüzey etkin maddeler insan derisine zarar verme potansiyeline sahiptir. SLS güçlü bir tahriş edicidir ve gönüllü insan derilerinde transepidermal su kaybını artırmaktadır. Hem anyonik hem de katyonik yüzey aktif maddeler SC'ü şişirir ve hücreler arası keratin ile etkileşime girer. Noniyonik yüzey etkin maddeler genellikle güvenli olarak kabul edilmektedir. Yüzey etkin maddeler genellikle düşük kronik toksisiteye sahiptir ve çoğunun biyolojik membranlardan geçen madde miktarını arttırdığı gösterilmiştir (Tupker, Pinnagoda, & Nater, 1990).

2.6.2. Fiziksel Penetrasyon Artırıcılar

2.6.2.1. Elektroporasyon

Biyolojik bariyerlerden difüzyonu artırmanın bir yöntemi olarak elektro-geçirgenliğin kullanımı 100 yıl öncesine kadar dayanmaktadır (Helmstadter, 2001). Elektroporasyon, deriden geçişi indüklemek için yüksek voltajın ($\geq 100 \text{ V}$) kısa süreliğine (mili saniye) deriye uygulanmasıdır. Dalga biçimi, hız ve sayı gibi faktörler iletimi etkileyen diğer elektriksel parametrelerdir (Banga, Bose, & Ghosh, 1999). Bu teknoloji, iyontoforez için mevcut sınır olan 7 kDa'dan daha büyük moleküler ağırlığa sahip biyofarmasötikler dahil olmak üzere, farklı lipofiliteye ve boyuta sahip moleküllerin (yani küçük

moleküller, proteinler, peptitler ve oligonükleotitler) deriden geçirgenliğini artırmak için başarıyla kullanılmıştır (Denet, Vanbever, & Preat, 2004).

2.6.2.2. İyontoforez

Bu yöntemde, doğrudan deriye veya dolaylı olarak dozaj formu yoluyla düşük seviyeli bir elektrik akımının deriye uygulanmasıyla topikal olarak uygulanan bir terapötik ajanın penetrasyonunun artırılmasıdır (Guy et al., 2000; Subramony, Sharma, & Phipps, 2006). Elektrot tipi, akım yoğunluğu, sistemin pH'ı, rekabetçi iyon etkisi ve geçiş yapacak maddenin özellikleri bir iyontoforez sisteminin tasarımını etkileyen parametreler arasındadır (Banga et al., 1999). Phoresor™ cihazı (Iomed Inc., Salt Lake City, UT), 1970'lerin sonlarında Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından fiziksel bir tıbbi tedavi cihazı olarak onaylanan ilk iyontoforetik sistemdi. Ayrıca iyontoforez ve elektroporasyonun birlikte kullanımının, moleküllerin deriden verilmesinde tek başına kullanılan tekniklerden çok daha etkili olduğunu daha önce yapılan çalışmalarda görülmüştür (Badkar & Banga, 2002; Chang, Hofmann, Zhang, Deftos, & Banga, 2000). İnsanlarda kullanılabilen akım miktarı üzerindeki düzenleyici sınırlar (şu anda 0,5 mA / cm² olarak ayarlanmıştır) ve bu tür akımların deri bariyer özelliklerine verebileceği geri dönüşü olmayan hasarı iyontoforetik sistemlerin kullanımını sınırlandıran etmenlerdir. Ayrıca moleküler ağırlığı 7 kDa'dan büyük olan moleküllerin bu sistemle verilmesi başarısızlıkla sonuçlanmıştır (Kanikkannan, 2002).

2.6.2.3. Ultrason

Ultrason, diğer ismiyle sonoforez aynı anda veya ön işlem yoluyla çözünen maddelerin deriden geçişini artırmak için ultrasonik enerjinin kullanılmasını ifade eder. Ultrasona maruz kalan hücreler arasındaki lipidlerde hava boşlukları oluşur. Böylelikle SC yapısında bozulma meydana gelir (Samir Mitragotri, Blankschtein, & Langer, 1996). Uygulama süresi, yoğunluğu ve sıklığı gibi parametrelerin deriden absorpsiyonu etkilediği bilinmektedir (S. Mitragotri & Kost, 2004).

2.6.2.4. Lazer Radyasyonu ve Fotomekanik Dalgalar

Lazer uzun yıllardan beri klinik tedavilerde kullanılmaktadır. Bu nedenle biyolojik zarlar üzerindeki etkileri iyi bilinmektedir. Sıklıkla sivilce gibi dermatolojik durumların tedavisinde ve lazer radyasyonunun hedef hücreleri kısa bir zaman diliminde (300 ns) yok ettiği yüz gençleştirme işlemlerinde kullanılmaktadır. Derinin lazer radyasyonuna

bu şekilde doğrudan ve kontrollü olarak maruz bırakılması, altta yatan epidermise önemli bir hasar vermeden SC'un ablasyonu ile sonuçlanır. Bu yöntemle SC'un çıkarılmasının, lipofilik ve hidrofilik ilaçların deriden geçişi arttırdığı yapılan çalışmalarda görülmüştür (W. R. Lee, Shen, Kuo-Hsien, Hu, & Fang, 2003; W. R. Lee, Shen, Lai, Hu, & Fang, 2001). Dalga boyu, vuruş uzunluğu, vuruş enerjisi, vuruş sayısı ve vuruş tekrarlama gibi parametrelerle lazer işlemi kontrol edilir (Jacques, McAuliffe, Blank, & Parrish, 1987). Son zamanlarda, deride doğrudan ablatif etkilere neden olmadan yoğun lazer radyasyonu ile üretilen basınç dalgalarının da deriden geçirgenliği arttırdığı görülmüştür (Doukas & Kollias, 2004; S. Lee, Kollias, McAuliffe, Flotte, & Doukas, 1999). Lazerin basınç dalgaları ile SC 'daki lakuna alanlarının genişlemesiyle deride hidrofilik bir yol oluşturduğu düşünülmektedir. Tepe basıncı, yükselme süresi ve uygulama süresi gibi parametreler geçiş miktarını etkilemektedir (Shun Lee, McAuliffe, Kollias, Flotte, & Doukas, 2001). Basınç dalgalarının kullanımı, doğrudan lazer radyasyonu ile ilişkili problemlerden kaçınmanın bir yolu olabilir.

2.6.2.5. Manyetoforez

Bu yöntem, diyamanyetik çözünen bir maddenin deriden difüzyonunu arttırmak için bir itici güç görevi gören bir manyetik alanın uygulanmasını ifade eder. Derinin manyetik bir alana maruz kalması, geçirgenlikte artışa katkıda bulunabilecek yapısal değişikliklere neden olabilir.

2.6.2.6. Termoforez

İnsan derisinin yüzey sıcaklığı, bir dizi homeostatik kontrolle genellikle 32 °C'de tutulur. Yüksek sıcaklığın (fizyolojik olmayan) deriden emilim üzerinde etkisi olduğu bilinmektedir (Blank, Scheuplein, & MacFarlane, 1967). Isıl işlemin ardından artan lipid akışkanlığı nedeniyle deriden geçişte artış olduğu düşünülmektedir (Ogiso, Hirota, Iwaki, Hino, & Tanino, 1998). Deri sıcaklığındaki artışa homeostatik bir yanıt olarak deri altı kan damarlarının vazodilatasyonu da topikal olarak uygulanan bileşiklerin geçiş miktarının artırılmasında önemli bir rol oynar (Hull, 2002).

2.6.2.7. İğnesiz Enjeksiyon

İğnesiz enjeksiyon, deriye acısız ilaç verme yöntemidir. Bu yöntemle hipodermik iğnelerin kullanımıyla ilişkili güvenlik, ağrı ve korku sorunlarından kaçınabilir. Bu yöntemde, sıvı veya katı partiküllerin uygun bir enerji kaynağı kullanılarak derinin dış

katmanlarından süpersonik hızlarda ateşlenmesi ile sağlanır. Hem sıvı (Ped-O-Jet®, Iject®, Biojector2000®, Medijector® ve Intraject®) hem de toz (PMED™ cihazı, eski adıyla PowderJect® enjektör) sistemlerine ilişkin çok sayıda örnek mevcuttur (Giudice & Campbell, 2006).

2.6.2.8. Radio Frekans

Radyofrekans, derinin yüksek frekanslı alternatif akıma (~ 100 kHz) maruz kalmasından sonra lazer radyasyonu kullanıldığında olduğu gibi membranda ısı kaynaklı mikro kanalların oluşmasına neden olur. Aktif maddenin geçiş hızı, cihazda kullanılan mikroelektrotların özelliklerine bağlı olarak cihaz tarafından oluşturulan mikrokanalların sayısı ve derinliği ile kontrol edilir.

2.6.2.9. Emme Ablasyonu

Bir emme blisterinin oluşumu, bazal membranı bozmadan epidermisi çıkarmak için vakum veya negatif basınç uygulanmasını içerir. Cellpatch® (İsveç), bu mekanizmaya göre çalışan piyasada mevcut bir üründür. Bir vantuz, epidermatom (blister oluşturmak için) ve deriye tutturulacak cihazdan (morfin solüsyonu içeren) oluşur. Bu yöntemde ağrı ve kanamanın önüne geçilir.

2.6.2.10. Deri Abrasyonu

Dermatologlar tarafından akne ve cilt lekelerinin tedavisinde kullanılan tekniklere dayanan bu yöntem, topikal olarak uygulanan bileşiklerin deriden nüfuzunu artırmak için derinin üst katmanlarının doğrudan çıkarılmasını veya bozulmasını içerir. Bu yöntem aktif maddenin fizikokimyasal özellikleriyle sınırlandırılmamıştır. Önceki çalışmalar, bu yöntemin hidrofilik maddelerin, C vitamini, aşılari (W. R. Lee et al., 2003) ve biyofarmasötiklerin (WOAN-RUOH LEE et al., 2006) geçişini artırdığını ve kontrol ettiğini göstermiştir.

2.6.2.11. Mikroİğneler

Mikroİğneler, korneum tabakasından ilaç geçişini artırmak için benzersiz bir teknolojik yaklaşımı temsil eder. Mikroİğne tekniğinde, ilaç rezervuarına bağlanan mikro boyutta iğneler (10–200 µm yükseklik ve 10–50 µm genişlik) kullanılır. Mikroİğne uygulama cihazı, üst dermisen sinir uçlarına ulaşmadan derinin yüzeyine uygulanır. Mikroİğneler ağrı oluşturmada aktif maddeleri SC bariyerinden geçirerek derinin alt tabakalarına ulaştırabilir. (H. Trommer & R. H. Neubert, 2006). Mikro iğnelerin özel malzemelerle

tasarımı, SC yapısını bozmak ve penetrasyonu sağlamak için güçlü mekanik özelliklere sahip olabilir. Mikroığneler mikro boyutları nedeniyle hastalar tarafından görülemez ve iğne fobisini azaltır (Gill, Denson, Burris, & Prausnitz, 2008).

2.6.2.12. Taşıyıcı Sistemler

Mikro veya Nanokapsüller

Bunlar, genellikle hidrofilik madde içeren bir polar sıvı ortam ile ayrılmış çoklu eş merkezli çift tabakalı yüzey etkin maddeden oluşur. Lipid yapıdaki çekirdek kısmı, lipofilik maddelerinin kapsüllenmesine olanak sağlar ve çok katmanlı (lipit / su) yapıları, hidrasyon ve deriye nüfuz etmeyi artırır (Mathur et al., 2014).

Nanoemülsiyonlar / Mikron Altı Emülsiyonlar / Mini Emülsiyonlar

Bunlar, ortalama damlacık boyutu 100 ila 500 nm arasında değişen suda yağ emülsiyonlarıdır. Çok iyi bir stabiliteye sahiptirler ve depolama sırasında faz ayrılmasına uğramazlar. Sıvı lipofilik bir çekirdeğe sahiptirler ve lipofilik bileşiklerin taşınması için uygundur. Transepidermal su kaybını azaltarak geçişi arttırdıkları düşünülmektedir (Mathur et al., 2014).

Katı Lipit Nanopartiküller (SLN)

Katı lipid nanopartiküller (SLN'ler) son zamanlarda güneş kremleri, A ve E vitaminleri, triptolid ve glukokortikoidlerin deriye daha iyi uygulamalarını yapmak amacıyla yeni taşıyıcı sistemler olarak araştırılmıştır (Blum, Dingier, Gohla, Müller, & Niehus, 1999; Jennings, Gysler, Schäfer-Korting, & Gohla, 2000; Maia, Mehnert, & Schäfer-Korting, 2000; Mei, Chen, Weng, Yang, & Yang, 2003; Santos Maia et al., 2002; Wissing & Müller, 2002). SLN tarafından deri yüzeyinde oluşturulan film tabakası deri hidrasyonunu artırıp deriden emilimi artırdığı düşünülmektedir.

Çoklu Emülsiyonlar

Bu s/y/s emülsiyonları, çeşitli koşullar altında sulu bir fazda bir s/y emülsiyonunun dispersiyonundan oluşur (Tadros, 1992). Bu sistemler yüksek oranda yağı fazı (% 65, Trixera, Bain yumuşatıcı, Avène) içeriklerinden dolayı iyi hidrasyon sağlayabilir. Dermatolojide çatlakları tedavi etmek için etkinlikleri kanıtlanmıştır.

Mikroemülsiyonlar

Bu formülasyonların, diğer geleneksel taşıyıcı sistemler ile karşılaştırılmasında kutanöz uygulama için daha üstün oldukları yapılan çalışmalarda görülmüştür (Kreilgaard, 2002). Mikroemülsiyonlar su, yağ ve yüzey etkin madde karışımından oluşmuş şeffaf sistemlerdir. Mükemmel çözünürlük özelliklerinde dolayı transdermal ve dermal uygulamalar için etkili sistemlerdir. Yüksek çözündürücü özellikleri, biyolojik dağılılabilirliği artırır ve dolayısıyla etkin dozu düşürerek tolere edilebilirliği artırır. Ayrıca, deri ve saç üzerindeki onarıcı etkileri (yüksek lipit içeriği nedeniyle) mikroemülsiyon formülasyonlarının değişen deri ve saç koşullarına uyum sağlamasını sağlar (Mathur et al., 2014).

2.6.2.13. Veziküler Sistemler

Lipozomlar

Lipozomlar, ilaçları kapsülleyebilen eş merkezli biyomoleküler katmanlar olarak oluşturulan kolloidal partiküllerdir. Triamsinolon asetonidin bir lipozomal losyondan, aynı konsantrasyon içerikli bir merhemden dört ila beş kat daha fazla deriye geçtiğini ilk olarak 1980 yılında Mezei ve Gulasekharam tarafından yapılan bir çalışmada gösterildi (Mezei & Gulasekharam, 1980). Son zamanlarda lipozomlar elektropozyon yöntemi ile kombine edilerek deriden geçişin artırılması için bazı çalışmalar yapıldı (Babiuk et al., 2003).

Niozomlar

Niozomlar, çeşitli ilaç ve kozmetik uygulamalar için taşıyıcı olarak kullanılan noniyonik yüzey etkin maddelerden oluşan veziküller sistemlerdir (Manconi, Sinico, Valenti, Loy, & Fadda, 2002; Shahiwala & Misra, 2002).

Transferzomlar

Transferzomlar, ana bileşen olarak % 10 - 25 yüzey etkin madde (sodyum kolat gibi) ve % 3 - 10 arasında etanol içeren fosfolipitlerden oluşan veziküller sistemlerdir. Sürfaktan molekülleri, transferzomlara ultra-biçimlenebilme özelliği kazandırarak, boyutunun onda birinden küçük olan SC'daki kanallara sızmasına olanak sağlar (Cevc, 1996).

Etozomlar

Etozomlar, derin dokulara ve sistemik dolaşıma penetrasyonu artırabilen yüksek alkol içeriğine sahip lipozomlardır (Godin & Touitou, 2003; Touitou, Dayan, Bergelson, Godin, & Eliaz, 2000).

Aquazomlar

Aquazomlar, kovalent olmayan bağlar, iyonik bağlar ve Van der Waals kuvvetleriyle kendiliğinden bir araya gelen üç katmanlı (çekirdek, kaplama ve ilaç) yapılardır (Vyas & Khar, 2002). Daha çok uygulama yolu, fiziksel ve kimyasal dengesizlik, zayıf biyoyararlanım ve güçlü yan etki gibi olumsuzlukları olan protein ve peptit yapılı terapötik ajanların uygulanması için uygun sistemlerdir.

2.7. Mikroiğneler

Hipodermik iğneler ve topikal kremler aktif maddelerin deri yoluyla verilmesi söz konusu olduğunda en yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir. Hipodermik iğnelerin uygulama esnasında oluşturdıkları ağrı nedeniyle hastalar tarafından kabul edilebilirliğin az olması ve topikal kremlerin biyoyararlanımların düşük olması, bu yöntemlerin bazı dezavantajlarından. SC tabakası büyük bir bariyer görevi görüp sadece lipofilik ve düşük moleküler ağırlıklı belirli moleküllerin az miktarda geçişine olanak verir. Derideki bariyer tabakasını aşmak için nano taşıyıcılı topikal kremler, transdermal yamalar ve mikroiğneler gibi çeşitli topikal veya transdermal sistemler araştırılmıştır (M. Gupta, Agrawal, & Vyas, 2012; M. R. Prausnitz & Langer, 2008).

Mikroiğneler (MN'ler), transdermal yolla ilaç verilmesi ve geleneksel uygulama ile ilişkili sorunların üstesinden gelmek için araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Hipodermik iğne ve transdermal yamanın sorunları göz önüne alınarak küçük bir yama üzerine yerleştirilmiş mikron boyutundaki iğnelerden oluşan bir tasarımla mikroiğne cihazı geliştirildi. Daha hızlı etki başlangıcı, daha iyi hasta uyumu, kendi kendine uygulama, artırılmış geçiş miktarı ve etkinlik bu teknolojinin başlıca karakteristik özelliklerindendir (Bora, Kumar, & Bansal, 2008). Terapötik avantajlara ek olarak, mikroiğneler, deneklerde biyoyararlanımda minimum değişkenlikle son derece doğru tekrarlanabilir sonuçlar verir. Pek çok avantaja rağmen hassas derilerde tahriş ve alerji yapma olasılıkları bulunmaktadır. İğneler kıllardan daha küçük ve ince olduğu için mikroiğne uçları kırılabilir. Kırılan uçlar deri içinde kalırsa sorunlara neden olabilir. Bu sorunlar çok nadir meydana gelip, dayanıklı malzemeler ile geliştirilen mikroiğneler ile

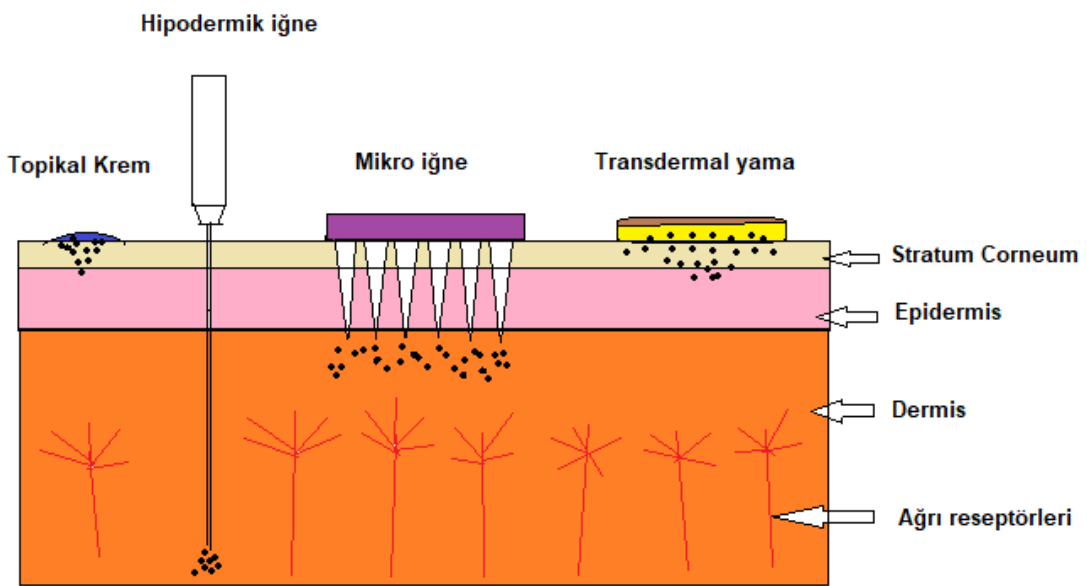
aşılabilir. Mikroigne teknolojisinde temel amaç moleküler boyuttan büyük ve hipodermik iğne tarafından oluşturulan porlardan küçük bir geçiş yolu oluşturarak deriden penetrasyonu artırmaktır (A. C. Williams & Barry, 2004). İyontoforez ve elektroporasyon gibi elektriksel yöntemler ve kimyasal penetrasyon artırıcılar gibi geleneksel yöntemler geçişi bir dereceye kadar artırsada büyük moleküller için yetersiz olan gözenekler oluşturmaktadırlar (D. Sharma, 2018). Farklı transdermal sistemlerin karşılaştırılması Tablo 2-1’de gösterilmektedir (Waghule et al., 2019).

Tablo 2-1: Topikal krem, transdermal yama, hipoerdemik iğne ve mikroignelerin karşılaştırılması

	Topikal krem	Transdermal yama	Hipodermik iğne	Mikroiğne
Açıklama	Emülsiyon/emüljel/krem/merhem	Deriye yapışan yama	Ucunda küçük bir delik bulunan keskin uçlu içi boş tüp	Küçük bir yamanın yüzeyinde hizalanmış mikron boyutundaki iğneler,
Etki başlangıcı	Yavaş	Yavaş	Hızlı	Hızlı
Ağrı	Ağrısız	Ağrısız	Ağrılı	Ağrısız
Biyoyararlanım	Zayıf	Yetersiz	Yeterli	Yeterli
Hasta uyumu	Daha az	Daha iyi	Daha az	Daha iyi
Kendiliğinden uygulama	Mümkün	Mümkün	Mümkün değil	Mümkün
Mekanizma	Derideki gözeneklerden geçiş	Aktif madde derideki SC tabakasını geçmek zorunda, büyük moleküller için düşük difüzyon	Aktif madde direk dermise ulaşır	SC tabakasını geçen aktif madde epidermise veya dermise ulaşır, permeabilite artar

Şekil 2-3’de topikal krem, transdermal yama, hipoerdemik iğne ve mikroigneler ile aktif maddelerin uygulanması gösterilmektedir (Waghule et al., 2019). Topikal kremler deri

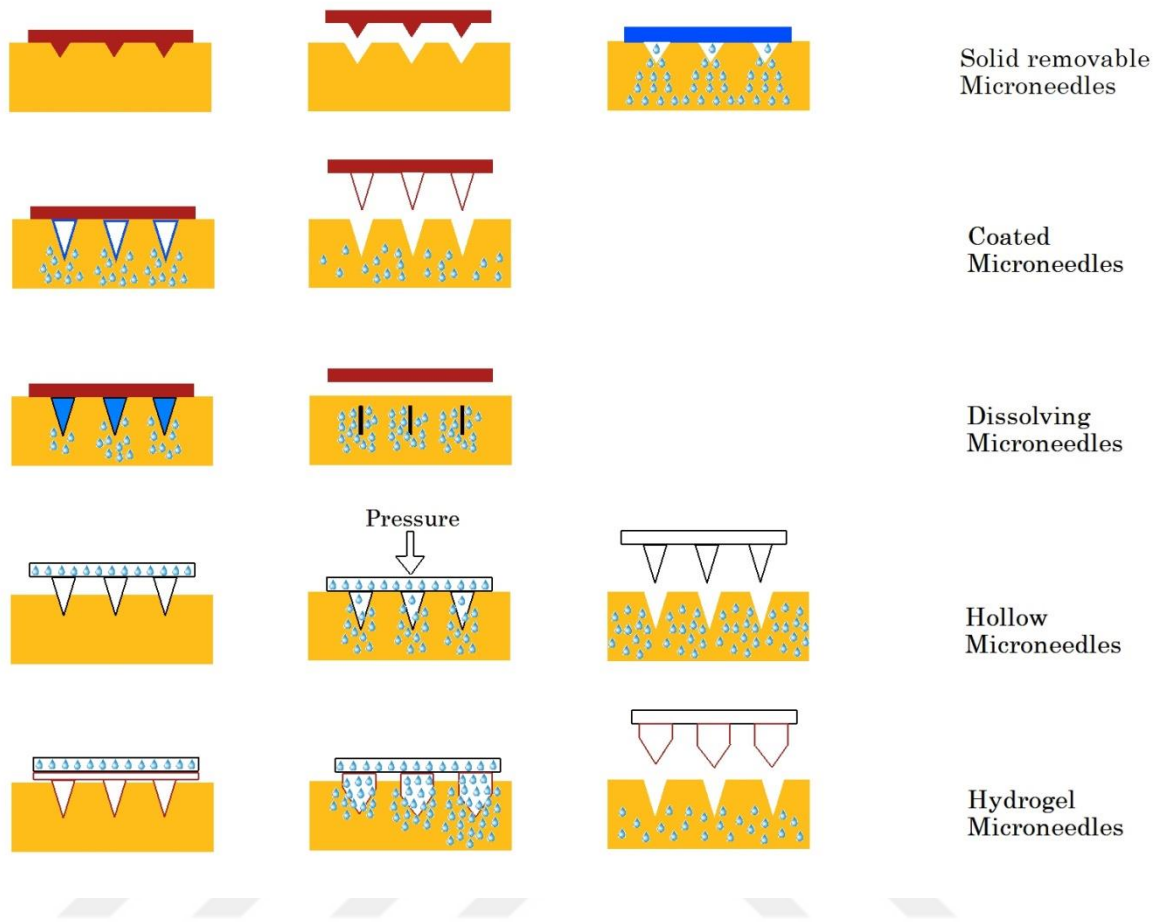
yüzeyine yayılır ve toplam etkin maddenin sadece % 10 - 20 deriden geçmektedir (M. R. Prausnitz & Langer, 2008). Transdermal yamaların penetrasyon artırıcılar ile combine edilesi durumunda ilaç geçişini iyileştirebilir, ancak bu çok sınırlı bir miktardır (M. Gupta et al., 2012). Hipodermik iğneler, ağrı reseptörlerinin bulunduğu dermisin derinliklerine kadar ulaşır. Böylece, yüklenen ilacın %90 - 100'ünü hedefe bölgeye verir, ancak çok ağrılı bir uygulama olduğundan, hasta uyuncu düşüktür. Mikro iğneler, SC bariyerini aşarak ve yüklenen ilacın %100'ünü ağrı olmadan epidermis ve dermisin üst tabakalarına geçmesine olanak sağlar.



Şekil 2-3: Topikal krem, hipodermik iğne, mikro iğne ve transdermal yamaların karşılaştırılması

2.7.1. Mikro iğne Tipleri

Transdermal ve intradermal uygulamalar için araştırılan ve üretilen mikro iğne türleri katı, kaplanmış, çözünen, içi boş ve hidrojel mikro iğnelerden oluşmaktadır. Şekil 2-4'de mikro iğne türleri gösterilmektedir (Samanci et al., 2021). Her mikro iğne türünün ilacı epidermise verme yöntemi farklıdır. Bazıları sadece SC'da gözenekler oluşturmak için kullanılır, bazıları yüzeylerinde ilaç solüsyonu ile önceden kaplanır, bazıları deri içerisinde çözünür ve bazıları ilaç solüsyonları ile doludur (J. Li, Zeng, Shan, & Tong, 2017; M. R. Prausnitz, 2017).



Şekil 2-4: Mikroiğne türleri

2.7.1.1. Katı Mikroiğneler (Solid microneedles)

Katı mikroiğneler çoğunlukla deriye ön işlem olarak uygulanarak deride geçiş gözenekleri oluşturmak amacıyla kullanılır. İğnelerin sivri uçları derinin SC tabakasını deler; katı mikroiğne çıkartıldıktan sonra ilacın geçebileceği mikron boyutunda kanallar oluşmuş olur. İlaç yüklü formülasyon bu bölgeye uygulanarak, penetrasyon artırılmış olur. Katı mikroiğneler aktif maddeyi pasif difüzyonla derinin alt tabakasına iletilmesini sağlar (K. Ita, 2015). Narayanan ve arkadaşları, tetrametilamonyum hidroksit aşındırma işlemi kullanarak ortalama 158 μm yüksekliğe ve 110,5 μm taban genişliğine sahip katı silikon uzun ve konik mikroiğneler ürettirler (S Pradeep Narayanan & Raghavan, 2017). Daha sonra 250 μm yüksekliğinde, 52,8 μm taban genişliğinde, 4,73 en boy oranında, 24,5 ° uç açısı ve 45 μm çapında mekanik direnci ve biyoyarlanımı artıran altın kaplı katı silikon mikroiğneler ürettirler (S. P. Narayanan & Raghavan, 2019). Li ve arkadaşları, 800 μm uzunluğa ve 256 MN/cm² sahip biyolojik olarak parçalanabilen polilaktik asit katı mikroiğnelerinin, SC'ü delmek için yeterli mekanik güce sahip

olduğunu ve ilacın emilimini artırabileceğini gösterdiler (Q. Y. Li, Zhang, Chen, Wang, & Guo, 2017). Kaptopril ve metoprolol tartaratın deriden geçişini artırmak için, paslanmaz çelikten yapılmış katı mikroiğneler ile çalışılmıştır (K. Ita, 2015).

2.7.1.2. Kaplı Mikroiğneler (Coated microneedles)

Kaplı mikroiğneler aktif madde içeren bir çözelti veya kolloidal sistemle ile kaplıdır (K. Ita, 2015). Derinin içine giren mikroiğnelerin etrafındaki tabaka çözünür. Böylece aktif madde hızlıca ortama salınır. İlaç yükleme kapasitesi kaplı tabakanın kalınlığına ve az da olsa mikroiğnelerin uzunluğuna bağlıdır (J. Li et al., 2017). Araştırmacılar aynı kaplı mikroiğne sisteminde farklı ilaç molekülleri deriden geçirmek için araştırmalar yaptılar. Li ve arkadaşları, her bir mikroiğneyi farklı etkin madde içeren farklı formülasyonlar ile kapladı. Böylece farklı özelliklere sahip birden fazla maddenin birlikte verilmesine olanak sağlandı (S. Li, Li, & Prausnitz, 2018).

2.7.1.3. Çözünebilir Mikroiğneler (Dissolving Microneedles)

İlacın biyolojik ortamda çözünebilen bir polimer içine hapsedildiği mikroiğnelerdir. Mikroiğneler deriye girdikten sonra çözünmeye başlar ve içerdikleri ilacı ortama salarlar. Mikroiğne, deriye yerleştirildikten sonra geri çıkarılmayacağından, tek adımlı uygulamadır. Polimerin biyoyouyumlu olması ve çözünmesi, uzun süreli tedavilerde hasta uyuncu açısından kolaylık sağlamaktadır (K. Ita, 2015). Deri içine giren biyo bozunan polimerler çözünme ile birlikte aktif maddenin kontrollü salınımı sağlar. Çözünebilir mikroiğneleri geliştirirken iğnelerin etkin bir şekilde dağılması en önemli faktördür. Bu nedenle, polimer-ilaç karışımı bu teknolojiye kritik basamaktır (M. R. Prausnitz, 2017). Çözünebilir mikroiğnelerin deriye yerleşmesi zor olup çözünmeleri zaman almaktadır. Zhu ve arkadaşları, mikroiğnelere yeterli mekanik mukavemet veren katı mikroiğneler üzerine monte edilmiş, deriye girdikten sonra hızla ayrılan ve 30 saniyede yaklaşık % 90 ilaç verilmesini sağlayan çözünebiler mikroiğneler geliştirdi (Zhu, Wang, Liu, & Guo, 2016).

2.7.1.4. İçi Boş Mikroiğneler (Hollow Microneedles)

İçerisinde ilaç dispersiyonu veya solüsyonu olan bir bölmeye sahip olan mikroiğnelerdir. İğnelerin ucunda ilacın sistemden çıkmasına olanak sağlayan delikler var. Deriye giren mikroiğneler ilacı doğrudan epidermise veya dermisin üst tabakalarına ulaşmasını sağlar. Bu teknoloji çoğunlukla proteinler, aşılarda ve oligonükleotidler gibi

yüksek moleküler ağırlıklı bileşikler için kullanılır (K. Ita, 2015). Bu mikroiğnelerin boş alanına çok miktarda ilaç yüklenebileceğinden, yüksek doz gerektiren dozaj uygulamaların yapılması mümkündür. Bu mikroiğne teknolojisinde sabit bir akış oranını sürdürmek önemlidir (Cheung, Han, & Das, 2014). İğne ucundaki deliğin artışı ile akış hızı artırılabilir, ancak mekanik dayanıklılık ve iğnelerin keskinliği azalabilir. Mekanik dayanıklılığı artırmak için mikroiğneler bir metal ile kaplanabilir, ancak bu iğneleri çok keskin hale getirebilir (K. Ita, 2015).

2.7.1.5. Hidrojel Yapılı Mikroiğneler (Hydrogel-Forming Microneedles)

Son zamanlarda süper şişebilen polimerler kullanılarak hidrojel yapılı mikroiğneler geliştirildi. Polimerler üç boyutlu polimerik ağlarına büyük miktarda su almasını sağlayan hidrofilik yapıya sahipler. Deriye giren mikroiğneler intertisyel sıvı varlığında şişerler. İğneler önce SC bariyerini bozarak görev yaparlar. Daha sonra şişen polimerler kontrollü aktif madde salınımını sağlarlar. Kolay steril edilebilmeleri ve bozulmadan deriden geri çıkartılabilmeleri bu tür mikroiğnelerin benzersiz özellikleridir (Donnelly et al., 2013). Hidrojel yapılı mikroiğnelerin üretilmesi için çapraz bağlı polimerler de kullanılır.

2.7.2. Mikroiğne Üretim Yöntemleri

Mikroiğnelerin üretim yöntemi mikroiğnenin türüne, şekline ve kullanılan malzemeye göre değişmektedir (J. Li et al., 2017). Tablo 2-2’de farklı mikroiğne türlerini üretmek için kullanılan yöntemler gösterilmiştir (Migdadi et al., 2018; Perennes et al., 2006; Yoon, Park, & Allen, 2006).

Tablo 2-2: Farklı mikroiğnelerin üretim yöntemleri

Mikro iğne türü	Üretim yöntemi
Katı mikroiğneler	
Silikon mikroiğne	Silikon kuru aşındırma işlemi, İzotropik aşındırma, Anizotropik ıslak aşındırma, Bir silikon substratın dilimlenmesi ve ardından asitle aşındırma.
Metal mikroiğne	Üç boyutlu lazer ablasyon, Lazer kesim, Islak aşındırma,

	Metal elektrokaplama yöntemleri
Polimer mikroiğne	Fotolitografi
Seramik mikroiğne	Seramik mikro kalıplama ve sinterleme litografi
Kaplı mikroiğneler	Kurutma sırasında daha fazla formülasyonu korumak için ve bir yüzey etkin madde, aktif madde ve bir stabilize edici ajan içeren mikroiğnelerin yüksek viskoziteli sulu bir solüsyona daldırılması veya püskürtülmesi. Mikroiğneler, bir kaplama çözeltisine bir kez veya birden fazla kez daldırılabilir, her bir mikroiğne, mikrokuyu içeren bir ilaç çözeltisine daldırılabilir veya daha önce silindirik üzerinde oluşturulmuş bir ilaç çözeltisi filmi uygulanabilir.
Çözünebilir mikroiğneler	Katman katman kaplama teknikleri Mikro kalıplama
İçi boş mikroiğneler	Mikro-elektromekanik sistemler (MEMS) teknikleri-lazer mikro işleme, silikonda derin reaktif iyon aşındırma, entegre bir litografik kalıplama tekniği, derin X-ışını fotolitografisi, ıslak kimyasal aşındırma ve mikro imalat.

2.7.3. Mikroiğne Üretiminde Kullanılan Materyaller

2.7.3.1. Silikon

İlk mikroiğne 1990'da silikondan yapıldı (D. Sharma, 2018). Silikon anizotropiktir bir madde olup kristal bir yapıya sahiptir. Özellikleri, farklı elastik modüller (50 ila 180 GPa) gösteren kristal yapıdaki hizalamaya bağlı olarak değişmektedir (Larraneta, Lutton, Woolfson, & Donnelly, 2016). Esnek yapısı farklı şekilde ve boyutta mikroiğnelerin üretilmesine olanak sağlar. Silikon substratlar hassas bir şekilde imal edilebilir ve seri üretimi yapılabilir. Silikonun maliyeti ve zaman alıcı karmaşık üretim süreci mikroiğnede kullanımını sınırlandırır. Buna ilaveten, silikon kırılgan olduğu için

bazı kısımları kırılıp ve deride kalabilir. Bu da sağlık sorunlarına yol açabilir (Larraneta, Lutton, et al., 2016).

2.7.3.2. Metal

Paslanmaz çelik ve titanium mikroiğne teknolojisinde kullanılan temel metal malzemelerdir. Paladyum, nikel, paladyum-kobalt alaşımları da kullanılmaktadır (Donnelly, Raj Singh, & Woolfson, 2010). İyi mekanik özelliklere sahip biyouyumlu malzemelerdir. Kırılmalara karşı dayanıklı olup mikroiğne üretimi için silikona kıyasla daha uygundur. Mikroiğne üretiminde kullanılan ilk metal paslanmaz çeliktir (Verbaan et al., 2007). Titanyum, paslanmaz çeliğe iyi bir alternatiftir (Niinomi & Nakai, 2011).

2.7.3.3. Seramik

Alümina (Al_2O_3) esas olarak kimyasal direnci nedeniyle kullanılmaktadır. Al ve O atomları arasındaki yüksek enerjili iyonik ve kovalent bağlar nedeniyle kararlı bir oksit oluşturur (Waghule et al., 2019). Kalsiyum sülfat dihidrat [Alçıtaşı ($CaSO_4 \cdot 0.2H_2O$)] ve kalsiyum fosfat dihidrat [Bruşit ($CaHPO_4 \cdot 2H_2O$)] kullanılan diğer seramik türleridir (A. C. Williams & Barry, 2004). Son yıllarda, Ormocer® adı verilen organik olarak modifiye edilmiş, üç boyutlu çapraz bağlı bir kopolimer olan seramik kullanılmıştır (Gittard et al., 2009). Polimerizasyon sırasında farklı organik moleküller kullanılarak farklı özelliklere sahip polimerler üretilebilir. Temelde mikro kalıplama tekniği kullanılarak üretilirler. Mikro kalıplama tekniği ucuz bir yöntem olup, büyük ölçekli hazırlanmaları mümkündür (Larraneta, Lutton, et al., 2016).

2.7.3.4. Silika Cam

Cam kullanılarak küçük ölçekte değişken geometriler üretilebilir. Silika cam fizyolojik olarak inertsiz ancak kırılabilir bir yapıya sahiptir (J. Gupta, Felner, & Prausnitz, 2009). Silika ve bor trioksitten oluşan borosilikat cam daha silika cama göre esnek bir yapıya sahiptir. Manuel olarak üretildiklerinden dolayı zamandan kayıp yaratırlar (McAllister et al., 2003). Cam mikroiğneler ticari olarak değil sadece deneysel amaçla kullanılmaktadır (Larraneta, Lutton, et al., 2016).

2.7.3.5. Karbonhidrat

Maltoz, en yaygın kullanılan karbonhidratlardan biridir (K. Lee, Lee, & Jung, 2011). Mannitol, trehaloz, sükröz, ksilitol ve galaktoz kullanılan diğer karbonhidrat türleridir

(Martin, Allender, Brain, Morrissey, & Birchall, 2012). İlaç yüklü karbonhidrat karışımı, mikroiğneleri elde etmek için silikon veya metal kalıplara dökülür (Miyano et al., 2005). Karbonhidratlar zamanla çözünerek ilacın deri içine salınmasını kontrol eder. Ucuz ve insan sağlığı için güvenli olmaları avantajlarındandır. Ancak yüksek sıcaklıklarda bozulmaları üretim sürecini zorlaştırır (Larraneta, Lutton, et al., 2016).

2.7.3.6. Polimer

Mikroiğnelerin hazırlanması için Poli (metil metakrilat) (PMMA), polilaktik asit (PLA), poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), poliglikolik asit (PGA), poli (karbonat), siklik-olefin kopolimer, poli (vinilpirolidon) (PVP), poli (vinil alkol) (PVA), polistiren (PS), poli (metil vinil eter komaleik anhidrit), SU-8 fotorezisti dahil olmak üzere çok çeşitli polimerler kullanılmıştır (Waghule et al., 2019). Çözünebilen ve hidrojel oluşturan mikroiğne dizileri çoğunlukla bu polimerlerden yapılır. Bu polimerlerle üretilen mikroiğneler diğer malzemelere göre daha az mukavemete sahiptir, ancak cam ve seramiklerden daha dayanıklıdır (X. Hong et al., 2013; Larraneta, Lutton, et al., 2016).

2.7.4. Mikroiğne Boyutu ve Şekli

Mikroiğneler genellikle birkaç yüz mikronluk bir çapa ve 1000 µm'ye kadar bir uzunluğa sahiptir (Donnelly, Singh, & Woolfson, 2010). Mikroiğnelerin uzunluğu, yoğunlukları, en-boy oranı, malzeme türü, yama boyutu ve uygulama süresi gibi çok çeşitli faktörler ilaç verilmesini etkileyebilir. Mikroiğneler farklı kullanım amaçlarına göre farklı boyut ve şekillerde araştırılmış. Mikroiğnelerin optimal uzunluklarını bulmak için kapsamlı araştırma yapılmıştır. 500-600 mikron aralığındaki mikroiğne uzunlukların ağrıyı, kanamayı ve enfeksiyon olasılığını azaltan optimal değerler olduğu bulunmuştur (K. Ita, 2015; Márquez-Graña, Bryan, Vucen, & O'Sullivan, 2017). Ayrıca, daha küçük uç çapları, mikroiğne dizisindeki mikroiğneler arasındaki geniş mesafe ve sekizgen piramit şeklin iğnenin deriye daha kolay yerleşmesini sağlayan bazı özellikler iken mikroiğne dizisindeki iğne sayısının buna katkısı bulunmamaktadır (Márquez-Graña et al., 2017).

2.7.5. Mikroiğne Uygulama Alanları

2.7.5.1. İlaç Verilmesi

Son yıllarda yapılan çalışmalarda mikroiğnelerin deriden ilaç geçişini artırıcı özelliklerinin kayda değer olduğu görüldü. Henry ve arkadaşları ilk olarak katı silicon

mikroiğneler kullanarak kalsein molekülünü deriden uyguladılar (Henry, McAllister, Allen, & Prausnitz, 1998). McAllister ve arkadaşları bovine serum albümini (BSA) ve insülin gibi makromoleküller dahil olmak üzere farklı moleküllerin deriden uygulanması için metal mikroiğneler ile çalıştılar. Diklofenak, ibuprofen, ketoprofen ve parasetamol gibi steroid olmayan anti-enflamatuar ilaçların deriden nüfuzunu artırmak için silindirik katı mikroiğneler kullanıldı (Stahl, Wohler, & Kietzmann, 2012). Bazı çalışmalarda mikroiğneler, iyontoforez veya sonoforez gibi diğer penetrasyon artırıcı yöntemlerle kombinasyon halinde kullanılarak ve makromoleküler bileşiklerin transdermal biyoyararlanımı artırıldı (Han & Das, 2013; X.-M. Wu, Todo, & Sugibayashi, 2007). İlaçlara ek olarak, kaplı mikroiğneler DNA transferi için kullanılmıştır. Bu amaçla, mikroiğneler DNA çözeltilerine daldırılarak kaplandı (Pearson et al., 2012). Çözünen mikroiğneler kullanılarak deriye verilen makromoleküller arasında insülin, düşük moleküler ağırlıklı heparin, ovalbümin, löprolid asetat, eritropoietin ve insan büyüme hormonu bulunur (Ito, Hirono, Fukushima, Sugioka, & Takada, 2012; Ito, Murano, Hamasaki, Fukushima, & Takada, 2011; Ito, Yoshimitsu, Shiroyama, Sugioka, & Takada, 2006; J. W. Lee, Choi, Felner, & Prausnitz, 2011; Matsuo et al., 2012; McCrudden et al., 2014; Naito et al., 2012).

2.7.5.2. Aşı Uygulaması

Adaptif immün yanıtı başlatmaktan sorumlu çeşitli immünolojik aktif hücreler ve antijen sunan hücreler (APC) ağı içeren canlı deri tabakası aşı uygulaması için ideal bir hedef olarak görülmektedir (Chong, Evrard, & Ng, 2013; Koutsonanos et al., 2009). Ayrıca, deride daha yüksek sayıda APC bulunması daha düşük antijen seviyeleri ile daha güçlü bağışıklık yanıtı oluşturduğundan deriden aşı uygulama geleneksel kas içi (İM) aşılama ile karşılaştırıldığında daha düşük dozlarda etkinlik sağlandığı yapılan çalışmalarda görüldü (Al-Zahrani et al., 2012).

2.7.5.3. Hasta İzleme ve Teşhis

Hasta izleme veya tanı amaçlı kan alımı, iğne fobisi, eğitimli sağlık personeli ihtiyacı ve geleneksel iğnelerle ilişkili enfeksiyon riski gibi bazı dezavantajlar içermektedir. Bu olumsuzların üstesinden gelmek için mikro iğnelerle çalışılmış. Hipodermik iğnelere benzer şekilde tasarlanan mikroiğneler ile derideki interstisyel sıvı çekilebilir (Donnelly et al., 2014). Bu sıvıdaki moleküllerin konsantrasyonu genellikle kan konsantrasyonları

ile doğru bir şekilde ilişkilendirilebildiğinden, analit izleme için iyi bir ortamı temsil eder. Bu nedenle mikroiğneler ağrısız ve kansız izleme / teşhis sistemi imkanı sunar.

Mikroiğnelerin ilk olarak bu amaçla kullanılması, interstisyel sıvının kılcal hareketine dayanıyordu. Yeni stratejiler, vakum veya ozmotik basınç gibi daha karmaşık ekstraksiyon mekanizmalarının kullanılmasını içerir (Donnelly et al., 2014). Mikroiğnelerin interstisyel sıvı ekstraksiyonuna bir alternative de kılcal kan ekstraksiyonu için daha uzun mikroiğnelerin (mikron ölçeğinin üst ucu) kullanılmasıdır. Bu yöntem, geleneksel hipodermik iğnelere göre daha az invaziv bir prosedür sunar. Li ve ekibi içi boş metalik mikroiğneler (1800 mm yükseklik, 60 mm iç çap, 120 mm uç çapı ve 150 eğim) kullanarak fare kuyruk damarından 20 µL kan aldılar. Çalışma sonunda cihazın ağrı oluşturma riskinin çok düşük olduğu bildirildi (C. G. Li, Lee, Lee, & Jung, 2013).

2.7.5.4. Kozmetik Uygulama

Mikroiğneler özellikle cilt lekelerinin tedavisinde ve aktif kozmetik bileşenlerin verilmesi için kullanılabilir. Bu nedenle kozmesötik endüstrisi mikroiğne teknolojisine büyük ilgi göstermiştir (Y. Park et al., 2015). Bununla birlikte, steril olmayan topikal ürünler kullanılarak granülomlar gibi bazı advers reaksiyonlar bildirildiğinden mikroiğnelerin ve ticari olarak temin edilebilen sağlam deriye uygulanması amaçlanan topikal ürünlerin kombinasyonu dikkatle tedavi edilmelidir (Soltani-Arabshahi, Wong, Duffy, & Powell, 2014).

Mikroiğne teknolojisi, farklı cilt yaralarını dermabrazyonla tedavi etmek için kullanılabilir (Larraneta, Lutton, et al., 2016). Mikroiğne dermabrazyonu, mikroiğnenin kollajen büyümesini indüklemek için cildi birçok kez delmek için kullanılmasından oluşur. Bugüne kadar, mikroiğnelerin cilt iyileştirme mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır, ancak mikroiğneler ile tedavinin kolajen ve elastin üretimini artırdığı varsayılmıştır. Ancak, bu tedavi iğne uzunluğu nedeniyle cilt kanamasına neden olduğu için optimal değildir (Larraneta, Lutton, et al., 2016).

Akne izlerinin tedavisi için silindirik katı mikroiğnelere (Dermoroller®) alternatif bir yaklaşım olan fraksiyonel radyofrekans mikroiğne sistemi geliştirilmiş. Yüz gençleştirme cihazı olarak bulunan bu sistem, epidermal hasar olmaksızın radyofrekans kaynaklı termal bölgeler oluşturarak çalışır. Retiküler dermisin hasar görmesinden sonra dermal kalınlaşma meydana gelir. Sivilce izlerinin tedavisi için gönüllerde yapılan

çalışmalarda, % 80 oranında akne izlerini azaltığı görüldü (Chandrashekar, Sriram, Mysore, Bhaskar, & Shetty, 2014).

2.7.5.5. Diğer Uygulama Alanları

Önceki bölümlerde açıklananların dışında mikroiğnelerin alternatif kullanımları da mevcuttur. Son zamanlarda deri grefti yapışmasını iyileştirmek için mikroiğne sistemlerin kullanıldığđ çalışmalar mevcuttur (S. Y. Yang et al., 2013). Bu amaçla, poli (stiren) ve poli (akrilik asit) polimerler kullanılarak şişmeyen bir çekirdek ve şişebilen bir uçtan oluşan konik şekilli mikroiğneler hazırlandı. Bu tıbbi cihaz, bu amaç için kullanılan geleneksel zımba sistemine kıyasla daha iyi doku yapışma güçleri yapmıştır. Mikroiğne sistemi, minimum kuvvetlerle yerleştirilebilir, kombine doku yapışması ve ilaç verme stratejisi için uçlara terapötik ajanların yüklenmesine olanak sağlar.

Bir çalışmada ısıyla yanıt veren poloksamer formüstasyonlarının tavşan sklerasına enjeksiyonu için içi boş mikroiğnelerin kullanımı araştırıldı (Thakur, Fallows, McMillan, Donnelly, & Jones, 2014). Bu mikroiğne bazlı sistem, geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında minimal invaziv bir şekilde intra-skleral enjeksiyona olanak sağlar.

2.8. Emülsiyonlar

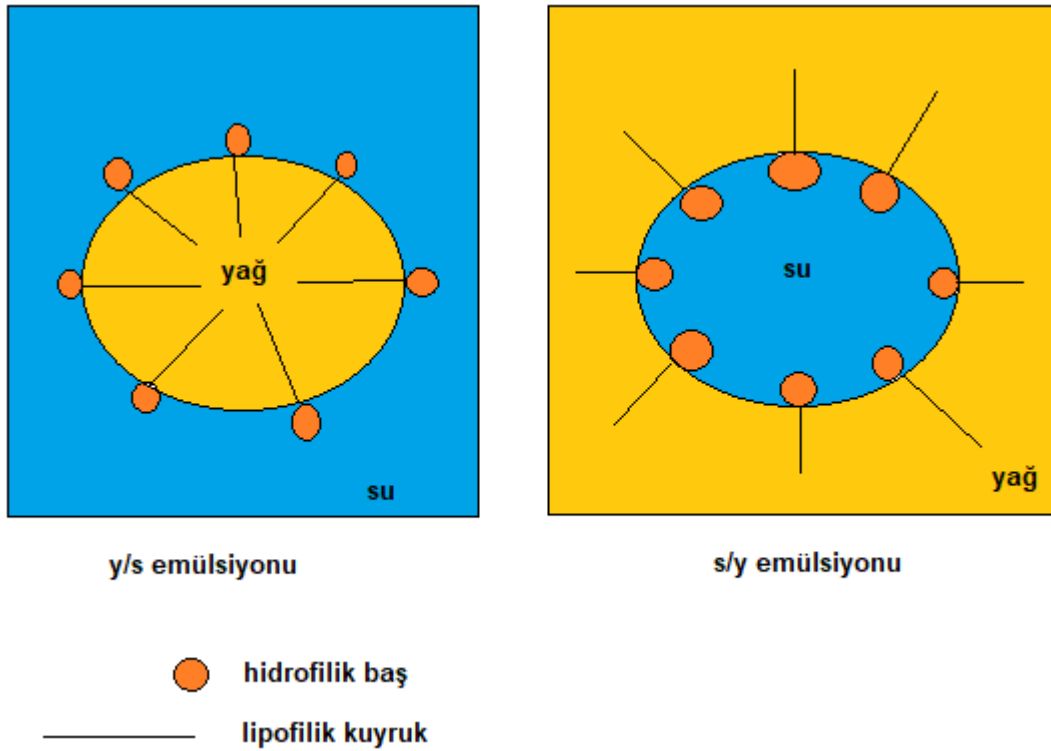
Farmasötik "emülsiyon" terimi, genellikle dahili kullanım için hazırlanan preparatları belirtmek için kullanılır. Harici kullanım için emülsiyonlara losyon, krem gibi her farklı bir başlık verilir ve odaklandıkları kullanımları gösterebilir (Khan et al., 2011). Birbiri ile karışmayan iki sıvıdan birinin (dispers faz) diğeri (sürekli faz, dispersiyon ortamı) içinde damlacıklar halinde daęıldığđ iki fazlı heterojen sistemlere emülsiyon denir. Emülsiyonlar termodinamik olarak kararsız bir sistem olduklarından, sistemi stabilize etmek için üçüncü bir ajan olarak YEM (emülgatör, sürfaktanemülsifiye edici ajan) kullanılır. Emülgatörler dispers damlacıkların etrafını ince bir film tabakası ile sararlar. Sistem içerisinde dağılmış olan damlacıkların boyutu genellikle 0.1 – 100 µm aralığındadır (Khan et al., 2011).

2.9. Emülsiyon Tipleri

Farmasötik emülsiyonlar genellikle sulu fazın çeşitli yağlar ve balmumlarıyla karışımından oluşur. Yağ damlacıkların sulu faz içerise daęıldığđ sistemler, su içinde yağ (y / s) olarak adlandırılır. Yağlı değildirler ve deri yüzeyinden kolayca

uzaklaştırılabilirler. Haricen uygulamalarda deride bir serinleme hissi sağlamak ve oral uygulamalarda yağın acı tadını gizlemek için kullanılırlar. Suda çözünen ilaçlar, y / s emülsiyonundan daha hızlı salınır.

Su damlacıklarının yağlı faz içerisinde dağıldığı sistemler, yağ içinde su (s / y) olarak adlandırılır. SC'ü hidratlayarak ve ekrin salgılarının buharlaşmasını önleyerek tıkaçıcı bir etkiye sahiptirler. s / y emülsiyonları, yağlı yapısı nedeniyle kozmetik olarak kabul edilebilir olmasa da, derinin yağda çözünen kirlerin temizlenmesi için de yararlıdır. Yağda çözünen ilaçlar, s / y emülsiyonundan daha hızlı salınır. Şekil 2-5'de emülsiyon tipleri görülmektedir.



Şekil 2-5: Emülsiyon tipleri

2.9.1. Emülsiyon Oluşturma Teorileri

Emülsifikasyon teorileri, emülsiyonların stabilize edilmesinde emülsifiye edici ajanların etkisini açıklar. Emülsifiye edici ajanlar, arayüzü kararlı emülsiyonlar elde edecek şekilde etkiler. Emülsiyonların stabilize edilmesinde emülsifiye edici ajanların etkisini açıklamak için önerilen birkaç teori vardır.

2.9.1.1. Arayüz Gerilimini Düşürmek

Bir sıvının içindeki moleküller, onu çevreleyen moleküller tarafından her yönden eşit olarak çekilir; ancak yüzeyde, çekici kuvvetlerin dengesizliği nedeniyle moleküllerin içe doğru çekilmesi vardır. Bu çekim nedeniyle, yüzey gerilimi olarak bilinen bir gerilim üretilir. İki karışmayan sıvı temas ettiğinde, her sıvının kırılmaya direnmesine neden olan kuvvet, arayüzey gerilimi olarak bilinir. Emülsifikasyonun yüzey gerilimi teorisine göre, emülsifiye edici maddeler, iki karışmayan sıvının ara yüzey geriliminde bir azalmaya neden olarak sıvılar arasındaki itici kuvveti azaltır ve sıvıların kendi molekülleri için çekiciliğini azaltır.

2.9.1.2. Arayüz Filmi Oluşturmak

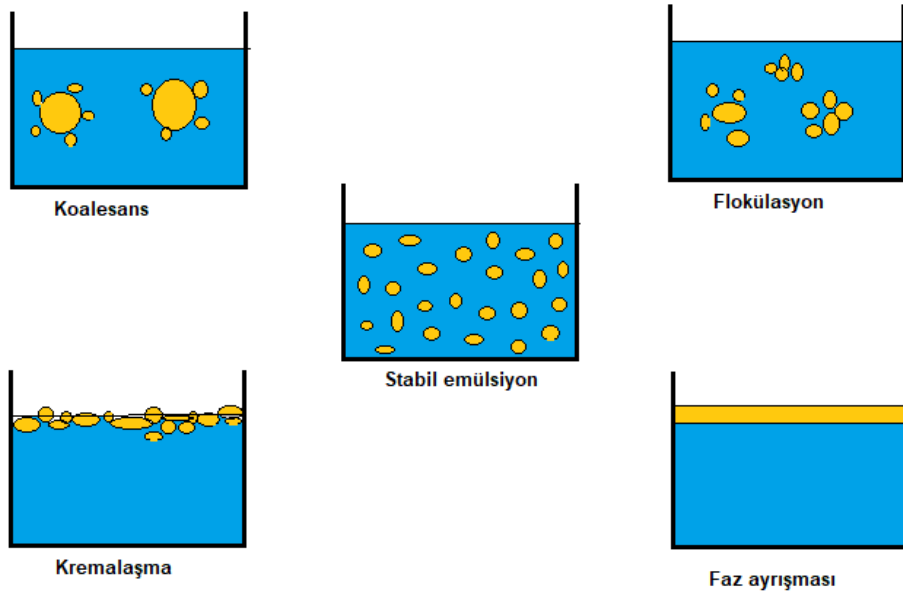
Arayüzey film teorisine göre, emülsifiye edici ajanların, iç fazın damlacıklarını ince bir film olarak çevreler ve emülsiyonun iki karışmaz fazı arasında bir arayüz oluşturmaktadır. Bu film, dispers faz damlacıkların birleşmesini önler.

2.9.1.3. Elektriksel Çifte Tabaka Oluşturmak

Damlacıkların yüzeyindeki elektriksel yük grupların artması ve elektriksel çifte tabaka damlacıkların birbirine itme kuvveti uygulamasına yol açar. Emülsifiye edici ajanların yalnız arayüzeyde konsantre olmaları değil, aynı zamanda polar yapıları da önemlidir. Bu teoriye göre, emülsifiye edici ajanların yağ benzeri veya polar olmayan uçları yağa, polar uçları ise polar sıvıya doğru dönmektedir. Emülsifiye edici ajanın polar olmayan ucu daha küçükse, emülsiyonun su içinde yağ (y / s) olacağı ve polar uç daha küçükse, emülsiyonun yağ içinde su (s / y) olacağıdır.

2.9.2. Emülsiyonların Stabilitesi

Stabilite emülsiyon formülasyonları için çok önemli bir parametredir; ancak, emülsiyon stabilitesinin değerlendirilmesi kolay değildir (Song, Jho, Kim, & Kim, 2000). Farmasötik emülsiyon stabilitesi, dağılmış faz damlacıkların birleşmesinin olmaması, kremalaşmanın olmaması ve koku, renk ve görünüm gibi fiziksel karakterlerinin korunması ile karakterize edilir. Emülsiyonun kararsızlığı, topaklanma, kremalaşma, birleşme ve kırılma olmak dört olaya sınıflandırılabilir (Şekil 2-6).



Şekil 2-6: Emülsiyon kararsızlıkları

2.9.2.1. Flokülasyon

Küçük emülsiyon damlacıkların biraraya gelerek oluşturdukları kümelemelerdir. Çalkalandıklarında küçük damlacıklar yeniden dağılırlar. Damlacıkların bozulmadan kaldığı tersine çevrilebilir bir olaydır. Flokülasyon, koalesansın başlangıcı olarak kabul edilir. Bir emülsiyonun sürekli fazında fazla yüzey etkin maddenin varlığı, emülsiyon damlacıklarının flokülasyonuna yol açabilmektedir.

2.9.2.2. Kremalaşma

Kremalaşma, dispers fazın ayrıldığı ve sürekli fazın üstünde bir katman oluşturduğu stabilite problemidir. Dispers faz kremalaşmada damlacık halinde kalmaya devam ettiği sürece, çalkalandığında tekrar dağılabilmesi mümkündür. Dispersiyon ortamının viskozitesi artırılarak kremalaşma önlenir. y / s emülsiyonları, dispers fazın damlacıkları sürekli fazdan daha az yoğun olduğunda genellikle yukarı doğru kremalaşma oluşur. s / y emülsiyonlarında ise dispers fazın yoğunluğu sürekli fazın yoğunluğundan yüksek olduğu için aşağı doğru kremalaşma meydana gelmektedir.

2.9.2.3. Koalesans

Emülsiyon sistemlerinde mekanik veya elektriksel bariyerin giderek daha büyük damlacıkların oluşumunu önlemek için yetersiz olduğu durumlarda koalesans meydana gelir. Koalesansı önlemek için sürekli faza yüksek kaynama noktası veya yüksek moleküler ağırlıklı bileşenler eklenebilir.

2.9.2.4. Faz ayrışması

Dispers faz ve sürekli fazın geri dönüşümsüz olarak birbirinden ayrılmasıdır. Bunun nedeni damlacıkların etrafındaki filmin yapının bozulmasıdır. Faz ayrışması damlacık büyüklüğüne, dispersiyon ortamın viskozitesine ve faz hacim oranından etkilenmektedir.

2.10. Mikroemülsiyonlar

Mikroemülsiyonlar, berrak, optik olarak izotropik ve genellikle yağ, su ve yüzey aktif madde (ler) in karışımından oluşan termodinamik olarak kararlı sistemlerdir (M. J. Lawrence & Rees, 2012). Mikroemülsiyonlar saydam veya yarı saydamdır görünümlü, bir damlacık boyutları genellikle 150 nm'nin altındadır (S. Heuschkel, A. Goebel, & R. H. H. Neubert, 2008). Emülsiyonlar ise genellikle mikrometre aralığında ve biraz altında damlacık boyutlarına sahip sütlü, kaba dispersiyonlardır. Öte yandan mikroemülsiyonlar termodinamik olarak kararlıdır ve doğru koşullar altında kendiliğinden (veya çok düşük enerji girişi ile) oluşur (M. J. Lawrence & Rees, 2012). Termodinamik stabiliteye sahip olmalarının nedeni emülsiyonlara kıyasla yüksek oranda yüzey etkin madde içermeleridir. Bu da tahriş potansiyelinin artmasına neden olabilir. Mikroemülsiyonlar ve emülsiyonlar arasındaki farklarla ilgili kafa karışıklığı, "nanoemülsiyon" teriminin tanıtılmasıyla daha da şiddetlendi. Nanoemülsiyonlar ve mikroemülsiyonlar benzer şekilde tanımlanmıştır: Her ikisi de 200-250 nm'den küçük damlacık boyutuna sahip düşük viskoziteli dispersiyonlardır (McClements, 2012). Bununla birlikte, nanoemülsiyonlar termodinamik olarak değil kinetik olarak kararlıdır. Nanoemülsiyonlar, daha küçük miktarlarda yüzey etkin maddelerle ile oluşturulabilirler, ancak kararlı nanoemülsiyonların hazırlanması genellikle pahalı yüksek enerji yöntemlerini gerektirir (McClements, 2012). Başka bir karışıklık, dispers fazın damlacık boyutu ile ilgilidir. "Mikro-" 10^{-6} anlamına gelirken, "nano-" 10^{-9} anlamına geldiğinden, bu, nanoemülsiyonların dispers fazının oluşturan damalcıkların mikroemülsiyonu oluşturan damlacıklarından daha küçük olduğu anlamına gelir. Pratikte ise bunun tersi doğrudur (McClements, 2012). Tablo 2-3'de bu sistemler arasındaki farklılıklar gösterilmektedir (Lopes, 2014).

Tablo 2-3: Mikroemülsiyonların emülsiyonlar ve nanoemülsiyonlar ile karşılaştırılması

Parametre	Mikroemülsiyon	Emülsiyon	Nanoemülsiyon
-----------	----------------	-----------	---------------

Dispersiyon tipi	Kolloidal	Kaba	Kolloidal
Damlacık boyutu (μm)	$\leq 0,15$	$\geq 0,5$	$\leq 0,15$
Termodinamik stabilite	Stabil	Stabil değil	Stabil değil
Oluşma teorisi	Kendiliğinden oluşan	Yüksek enerji gerektiren	Yüksek enerji gerektiren
Bileşenler	Yüksek miktarda sürfaktan ve ko-sürfaktan bileşimi gerekmektedir	Daha az sürfaktan gerekir	Daha az sürfaktan gerekir
Görsel özellikler			
Fiziksel hal	Sıvı	Sıvı/yarı katı	Sıvı
Türbüdite	Şeffaf	Süt görünümü	Değişken olabilir

2.10.1. Mikroemülsiyonların Yapısı

Mikroemülsiyonlar, ara yüzün sürekli ve kendiliğinden dalgalandığı dinamik sistemlerdir (Lam & Schechter, 1987). Yapı olarak y/s, s/y ve geçişli (bicontinuous) mikroemülsiyonlar olarak üç gruba ayrılır. Yağ damlacıkların su içerisinde dağıldığı sistemler y/s, su damlacıkların yağ içerisinde dağıldığı sistemler s/y mikroemülsiyon sistemleridir. Dağılan damlacıklar iç fazı oluştururken, sürekli diğer bir deyişle dağılım ortamı dış fazı oluşturur. Yağ fazı ve su fazı miktarların yüksek ve birbirine yakın olduğu sistemler ise geçişli mikroemülsiyonları oluşturur. Bu sistemler yağ miktarı daha yüksek iken s/y, yağ miktarı daha düşükse y/s tipinde geçişli mikroemülsiyon oluşturur (M. J. Lawrence & G. D. Rees, 2000). Arayüz, üç tip mikroemülsiyonda da uygun YEM'ler ve / veya YYEM'ler kombinasyonu ile stabilize edilir. Yağ, su ve YEM karışımları, bileşenlerin oranlarına bağlı olarak çok çeşitli yapılar ve fazlar oluşturabilir. Esnek bir YEM filmi, şekilli, küme damlacıklar ve geçişli yapılar gibi birkaç farklı yapının oluşmasını sağlayabilir. Çok sert bir YEM filmi ile geçişli yapıların oluşması mümkün olmamaktadır (Chauhan, Thakur, & Sharma, 2019). Bir mikroemülsiyon yapısı, fazların yayılması dolayısıyla ilgili fazlarda bir ilacın difüzyonu için çok önemlidir (Chauhan et al., 2019).

2.10.2. Mikroemülsiyonların Avantajları

Topikal / transdermal uygulama sistemleri olarak mikroemülsiyonlara olan ilgi, aşağıda açıklandığı üzere, bu sistemlerin sunduğu birçok avantajdan kaynaklanmaktadır (G. M. El Maghraby, 2008; Kogan & Garti, 2006; M. J. Lawrence & Rees, 2012; Pepe et al., 2012).

- Termodinamik stabilite
- Hazırlanmaları kolay ve yüksek enerji gerektirmez
- Özel ekipman gerekmediğinden hazırlık maliyetleri genellikle düşüktür
- Hidrofilik ve lipofilik alanların varlığı nedeniyle hem hidrofilik hem de lipofilik ilaçların (aynı zamanda istenirse) yüklenebilmesi
- Yüzey etkin maddelerin çözündürebilme özelliklerinin yüksek olmasından dolayı, yüksek miktarda ilaç yüklenebilirler

2.10.3. Mikroemülsiyonların Dezavantajları

Mikroemülsiyonların diğer taşıyıcı sistemlere göre bazı avantajlara sahip olmasının yanı sıra bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Mikroemülsiyonların dezavantajlarını aşağıda anlatıldığı gibi özetleyebiliriz (Agrawal & Agrawal, 2012).

- Nano damlacıkları stabilize etmek için gerekli yüksek konsantrasyonda yüzey aktif madde ve yardımcı yüzey aktif madde kullanımı.
- Yüksek erime noktalı maddeler için sınırlı çözündürme kapasitesine sahip olmaları
- Farmasötik uygulamaları kullanmak için yüzey etkin madde toksik olmamalı
- Mikroemülsiyon stabilitesi, sıcaklık ve pH gibi çevresel faktörlerden etkilenir. Bu parametreler hastalara mikroemülsiyon verildikten sonra değişir.

2.10.4. Mikroemülsiyonların Oluşum Teorileri

Şimdiye kadar mikroemülsiyon oluşumunu ve stabilitesini açıklamak için üç yaklaşım kullanılmıştır. Bunlar aşağıdaki gibidir:

- Arayüzey veya karma film teorisi
- Çözünürlük teorisi
- Termodinamik teorisi

Düşük yüzey gerilimi mikroemülsiyonların stabilitelerinin ve oluşumların temelini oluşturur. Damlacık boyutların çok küçük olmasından dolayı su ve yağ arasındaki ara

yüz çok geniştir (M. J. Lawrence & G. D. Rees, 2000). Mikroemülsiyon oluşumunun serbest enerjisi, yüzey etkin maddenin yağ-su arayüzünün yüzey gerilimini ne ölçüde düşürdüğüne ve sistemin entropisindeki değişime bağlı olabilir (Eşitlik 2-4),

$$\Delta G_f = \gamma \Delta A - T \Delta S \quad (2-4)$$

Burada, ΔG_f = serbest oluşum enerjisi, ΔA = mikroemülsiyonun arayüzey alanındaki değişiklik, ΔS = sistemin entropisindeki değişim, T = sıcaklık, γ = yağ-su arayüzünün yüzey gerilimi ifade eder. Bir mikroemülsiyonun oluşması için (geçici) negatif değer gerekir. Bir mikroemülsiyonun oluşması için (geçici) negatif değerin gerekli olduğu, değerinin her zaman pozitif olmasına rağmen, çok küçük olduğu ve entropik bileşen tarafından dengelendiği kabul edilir. Entropik katkı, bir fazın diğerinde çok sayıda küçük damlacık şeklinde karıştırılmasından kaynaklanan çok büyük dağılım entropisidir. Bununla birlikte, ara yüzey tabakasında yüzey etkin madde difüzyonu ve monomer-misel yüzey etkin madde değişimi gibi diğer dinamik işlemlerden kaynaklanan uygun entropik katkıların olması da beklenmektedir. Böylelikle, yüzey gerilimindeki büyük azalmalara önemli ölçüde uygun entropi değişikliği eşlik ettiğinde, negatif serbest oluşum enerjisi elde edilir. Bu gibi durumlarda, mikroemülsiyon kendiliğinden oluşur ve ortaya çıkan dağılım termodinamik olarak kararlıdır (Talegaonkar et al., 2008).

2.10.5. Mikroemülsiyonların Hazırlanması

2.10.5.1. Faz Titrasyon Metodu

Belirli miktarda ilaç, ilacın çözünmesi için gerekli olan uygun yağ miktarı içinde dağıtılarak hazırlanır (Ghosh & Murthy, 2006). Karışım homojen haline getirildikten sonra doğru bir şekilde tartılan YEM : YYEM karışımı küçük kısımlar halinde ilave edilir (Jadhav, Shaikh, Ambade, & Kadam, 2006). Karışım, manyetik bir karıştırıcı kullanılarak iyice karıştırılır ve yaklaşık 10 dakika boyunca sürekli karıştırılarak damla damla damıtılmış su ilave edilir. Karıştırma hızı, damlacık boyutunun gerekliliğine göre optimize edilir (Santos, Watkinson, Hadgraft, & Lane, 2008).

Üçgen Faz Diyagramı

Mikroemülsiyonlar, yapılarının, ilaç salımlarını ve stabilitelerinin etkileyen bir dizi fiziksel özellik ile karakterize edilir. Üçgen faz diyagramları mikroemülsiyon oluşturmanın en önemli aşamasıdır. Üçgen faz diyagramları genellikle su, yağ ve YEM / YYEM bileşenlerinin bileşiminin bir fonksiyonu olarak farklı fazların sınırlarını

belirtmek için oluşturulur (Ita, 2017). Belirli miktarlarda yağ, YEM ve YYEM karışımları ortam sıcaklığında (25 °C) orta derecede çalkalama altında sulu çözelti ile seyreltilir. Dengeden sonra, görsel inceleme veya polarize ışık mikroskobu tespit edilen emülsiyonların bileşenlerinin kombinasyonları faz diyagramında haritalanır.

Noktasal Çalışma ile Mikroemülsiyon Bölgesinin Belirlenmesi

Yağ, su ve yüzey etkin madde bileşenleri ile oluşturulan üçgen faz diyagramı üzerinde belirlenen noktaların oranları saptanır. Bu oranlara göre hazırlanan formülasyonlardan şeffaf ve izotropik olanlar mikroemülsiyon olarak belirlenir. Bu noktalara göre mikroemülsiyon alanı çizilir.

Titrasyon yöntemi ile Mikroemülsiyon Bölgesinin Belirlenmesi

Yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin madde oranları belirlenir. Bu karışım yağ fazı ile karıştırılır. Bu karışım su fazı ile titre edilir. Su fazının ilavesinden sonra karışım şeffaflık yönünden gözlenir. Başlangıçta sulu fazının ilavesinde sistem bulanıklaşır, su titre edilmeye devam edilince sistem berraklaşır. Bu nokta mikroemülsiyonun olduğu noktadır. Daha sonra sistem tekrar bulanıklaşmaya kadar su titre edilmeye devam edilir. Sistemin bulanıklaştığı bu nokta mikroemülsiyonun bitiş noktasıdır.

2.10.5.2. Faz İnversiyon Sıcaklık Yöntemi (PIT)

Mikroemülsiyonların faz inversiyonu, y/s sistemin s/y sistemine dönüştürülmesi anlamına gelir. Faz inversiyonu sisteme aşırı miktarda iç fazın eklenmesi ile meydana gelebilir veya iyonik olmayan YEM kullanıldığında sıcaklığın artırılması sonucunda meydana gelebilir (Adnan Azeem et al., 2008; Gasco, Priano, & Zara, 2009; Karasulu, 2008; Mehta & Kaur, 2010). Bu yöntem, damlacık boyutundaki aşırı değişiklikleri gösterir, bu da *in vivo* ve *in vitro* ilaç salım modellerinde değişikliklere yol açar (Mehta & Kaur, 2010; D. Patel & Sawant, 2009).

2.10.6. Mikroemülsiyon Formülasyonuna Giren Bileşenler

Mikroemülsiyonlar bir sulu faz, bir YYEM, bir YEM ve bir organik fazdan (yağlı faz) oluşur. Ancak, yapılan bazı çalışmalarda YYEM'lerin, yapısal olarak birbirini tamamlayan yüksek ve düşük hidrofilik (HLB) YEM'lerin seçilmesiyle ortadan kaldırılabileceğini görüldü (Solans & Garcia-Celma, 1997).

2.10.6.1. Yağlı Faz (Organik Faz)

İlaçların çoğunun y/s mikroemülsiyonlarında çözündüğü göz önünde bulundurulduğunda, ilacın yağ ve YEM karışımında yüksek çözünürlüğe sahip olmasındandır. Çözünürlük kriteri, sadece sistemden ilaç salınımını arttırmakla kalmaz, aynı zamanda konsantrasyon gradyanını da yükseltir ve farklı biyolojik membranlardan ilaç penetrasyonunu artırır. Mikroemülsiyon bileşeni olarak kullanılmak üzere piyasada çok sayıda yağ bulunmaktadır, ancak bunların kullanımları, toksisiteye ve belirsiz etki mekanizmasına neden olan tahrişleri nedeniyle sınırlıdır. Agresif olmayan ve hafif olan mikroemülsiyonu elde etmek için seçilen yağ klinik olarak kabul edilebilir, toksik olmamalı ve biyouyumlu olmalıdır. Bitkisel yağlar, gıda endüstrilerinde mikroemülsiyon oluşumu için ideal olarak kabul edilmektedir. Ancak, mineral yağ, farklı dağılmış fazların oluşmasında daha etkili olduğu için yağ fazı olarak yaygın kullanılmaktadır (Friberg, Brancewicz, & Morrison, 1994).

2.10.6.2. Sulu Faz

Su, yağların çoğu ile karışmadığı ve yağ damlacıklarının oluşmasına neden olduğu için y/s mikroemülsiyonlarında dış fazı (sürekli fazı) oluşturur (Munir et al., 2017).

2.10.6.3. Yüzey Etkin Madde (YEM)

YEM seçimi yapılırken, yüzey etkin maddenin HLB'si göz önünde bulundurulmalıdır. s/y mikroemülsiyonu oluşturmak 3-6 aralığında HLB değerine sahip yüzey etkin maddeler seçilmesi, y/s mikroemülsiyonu oluşturmak için 8-18 aralığında HLB değerine sahip yüzey etkin maddelerin seçilmesi uygun olmaktadır. Mikroemülsiyonun dikkatlice tanımlanmış koşullar altında oluşturulması ve mikroemülsiyon oluşumu için bileşen seçiminde ilk adım olarak uygun HLB değeri sahip yüzey etkin maddeler göz önünde bulundurulmalıdır (M. J. Lawrence & G. D. Rees, 2000). Yüzey etkin maddeler hidrofilik bir baş ve lipofilik bir kuyruktan oluşmaktadır. Yüzey etkin maddeler iyonik yapılarına göre;

- Non iyonik yüzey etkin maddeler
- İyonik yüzey etkin maddeler

olmak üzere 2 temel gruba ayrılır.

Non İyonik Yüzey Etkin Maddeler

Non iyonik yüzey etkin maddelerin çoğu, iyonik yüzey etkin maddelerin yüklü olan baş grubunun yüksüz olması ile iyonik yüzey etkin maddelerden ayrılır. Non iyonik yüzey etkin maddeler, mikroemülsiyonların oluşumu için genellikle herhangi YYEM'ye ihtiyaç duymamaktadır. Non iyonik yüzey etkin maddeler biyouyumludurlar (Kolling, 2004). pH ve elektrolit konsantrasyonuna duyarlı olmayan mikroemülsiyonlar oluşturma özelliğine sahiptirler (M. J. Lawrence & G. D. Rees, 2000; Shafiq et al., 2007). Tween 80, Span 80 ve Tween 20, en yaygın kullanılan non iyonik yüzey etkin maddelerdir (M. J. Lawrence & G. D. Rees, 2000).

İyonik Yüzey Etkin Maddeler

Farmasötik preparatların hazırlanmasında nadiren kullanılmaktadırlar. Çoğu iyonik yüzey etkin madde, stabil mikroemülsiyon oluşturmak için tek başına yeterli olmamaktadır. Bu nedenle, stabilize olmaları için bazı katkı maddelerine ihtiyaç vardır. Katyonik yüzey etkin maddeler, anyonik yüzey etkin maddeler ve zwitter iyonik yüzey etkin maddeler olmak üzere üç gruba ayrılırlar.

2.10.6.4. Yardımcı Yüzey Etkin Madde (YYEM)

Genellikle, iyonik veya non-iyonik olmayan YEM'ler mikroemülsiyon oluşturmak için tek başına yeterli değildirler. Optimum bir mikroemülsiyon formülasyonun oluşturulması için YEM karışımları veya bazen YYEM gereklidir. Genellikle, tek zincirli yüzey etkin maddeleri, mikroemülsiyon formülasyonları oluşturmak için gereken çok düşük seviyelere kadar yüzey gerilimini azaltma kapasitesine sahip değildir. Butanol, etanol, pentanol, propilen glikol veya izopropanol gibi kısa ve orta alkoller genellikle YYEM'ler olarak kabul edilir (Giustini, Murgia, & Palazzo, 2004; M. J. Lawrence & G. D. Rees, 2000). YYEM'ler, yüzey geriliminde düşürmeye yardımcı olur ve YEM filmini akışkanlaştırarak sistemin bozunmasını hızlandırarak termodinamik olarak stabil hale getirir (Munir et al., 2017). YYEM'ler, mikroemülsiyon damlacığı çevresinde oluşan YEM filminin esnekliğini artırır (El Maghraby et al., 2008; Junyaprasert, Boonsaner, Leatwimonlak, & Boonme, 2007). YYEM mikroemülsiyon oluşturan bölgeyi artırabilir (El Maghraby et al., 2008). YYEM olarak orta zincirli alkollerin kullanılması bazı sorunlara neden olabilir. Alkollerin çoğu kronik olarak kullanıldığında biyolojik sistemi tahriş edebilir. Mikroemülsiyonlarda veya

farmasötik olarak kullanımını engelleyen kimyasalların toksisitesiyle ilgili ciddi sorunlar vardır (Shakeel et al., 2007).

2.10.7. Mikroemülsiyonların Karakterizasyonu

2.10.7.1. Damlacık Büyüklüğü Tayini

İlaç emilimini etkileyen faktörlerden biri damlacık büyüklüğü ve polidispersite indeksidir (dağılımı). Daha geniş yüzey alanına sahip küçük damlacık büyüklüğüne sahip sistemler ilaç absorpsiyonunu artırır (Gershanik & Benita, 2000).

Damlacık boyutu ve polidispersite indeksi, mikroskopik ve saçılma teknikleriyle belirlenebilir. Foton korelasyon spektroskopisi (PCS) olarak da adlandırılan dinamik ışık saçılımı, Brownian hareketine maruz kalan damlacıklar veya parçacıklardan geçerek gelen lazer ışığının yoğunluğundaki dalgalanmaları analiz etmek için kullanılır (Nastiti et al., 2017). Damlacık boyutunun (yaklaşık 1 nm'ye kadar), polidispersitenin (dinamik ışık saçılımının kümülatif analizinden türetilen boyut dağılımının genişliğinin bir ölçüsü: dağılımın kalitesini veya homojenliği gösterir) ve zeta potansiyelinin (yüzey yükü) hızlı analizini sağlayabilen bir dizi cihaz mevcuttur.

2.10.7.2. Mikroemülsiyonların Reolojisi

Mikroemülsiyonların reolojik özellikleri, mevcut agregatların türü, şekli ve yoğunluk sayısı yanı sıra bu agregatlar arasındaki etkileşimlere bağlıdır. Bu nedenle, küre-çubuk gibi mikro yapısal değişiklikler veya mikroemülsiyon tipi (s/y, y/s veya geçişli) mikroemülsiyon reolojisine etki eder. Viskozite tayini ayrıca koloidal sistemlerin ilaç salınımını nasıl etkileyebileceği konusunda yararlı bilgiler sağlar (Agrawal & Agrawal, 2012). İzotropik (küresel) sistemler olan mikroemülsiyonlar, akışa karşı daha az direnç gösterir ve düşük viskozite sergiler. Reolojik özellikler, mikroemülsiyonların tipi hakkında bilgi sağlayabilir. Hem y/s hem de s/y mikroemülsiyonlar, genellikle Newton tipi akış gösterirken, geçişli mikroemülsiyonlar, oldukça karmaşık olan non-Newtonian akış ve plastisite gösterebilir (N. Sharma, Antil, & Jain, 2013).

2.10.7.3. Mikroemülsiyonların İletkenlikleri

Elektriksel iletkenlik, mikroemülsiyonların karakterizasyonu için basit ve ucuz bir yöntemdir. Elektriksel iletken öncelikle dış fazın su veya yağ olduğunu veya geçişli olup olmadığını tespit etmek için yapılır. Mikroemülsiyon tipini belirlemek ve bileşim veya sıcaklıktaki değişikliklerden kaynaklanan faz sınırlarını tahmin etmek için

iletkenlik ölçüm tekniği kullanılmıştır (Lutz et al., 2007; Stubenrauch et al., 2008). Dış fazı su olan mikroemülsiyonlar yüksek iletkenlik değerleri gösterirken, dış fazı yağ olan sistemler zayıf iletkenliğe sahip veya hiç iletkenlik göstermezler (Rushforth et al., 1986). İki sürekli sistemler (bicontinuous), s/y tipi mikroemülsiyonlarla karşılaştırıldığında, geçişli sistemler büyük ölçüde daha yüksek iletkenliğe sahiptir (N. Sharma et al., 2013).

2.10.7.4. Morfolojik Görüntüleme (TEM)

Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM), mikroemülsiyonların mikro yapılarının incelenmesi için en önemli tekniktir. TEM analizi genelinde, bir elektron ışınının içinden geçebileceği şekilde ince bir film olarak bir numune hazırlamaktır. Görüntü, numunenin farklı bölgelerinden elektronların farklı absorpsiyon ve saçılmasından kaynaklanan kontrastla toplanır (Acharya & Hartley, 2012). Doğrudan yüksek çözünürlükte görüntüler sağlar ve birlikte var olan herhangi bir yapı ve mikroyapısal geçişleri yakalayabilir. Sıvı örnekleri için Kriyo-TEM (örnekler, soğuk mikroskopta hızlı dondurma ve freeze frakturezden sonra doğrudan görselleştirilir) ve Freeze Fracture TEM tekniği (Oda koşulları altında örnek görüntülerinin bir kopyası) olmak üzere TEM tekniğinin iki varyasyonu mevcuttur (N. Sharma et al., 2013).

Cryo-TEM tekniği, kriyojenik hazırlama tekniklerini geleneksel geçirimsiz elektron mikroskobu ile birleştirir. Burada, ince bir numune filmi, buz veya numune kristalizasyonu olmaksızın hızla vitrifiye edilir ve filmde yakalanan yapılar, doğrudan donmuş halde, yani doğal susuz hallerine çok yakın bir durumda gözlenir (Acharya & Hartley, 2012).

2.10.7.5. Türbidite

Mikroemülsiyonların damlacık büyüklükleri çok küçük olup bu sistemlerde bulunan damlacıklar ışığı geçirmekte ve saydam görünmektedirler. Su ve yağın relatif kırılma indislerine ve dispers fazın konsantrasyonuna bağlı olarak saydamlık değişmektedir (Lissant, 1975). y/s tipi mikroemülsiyonların ışık saçılımının ortaya konulması zordur. Bu sistemlerde saydamlık için yağ ağırlığının % 100'ünden fazla YEM'ye ihtiyaç vardır. Bununla birlikte, saydam bir s/y tipi mikroemülsiyon elde edebilmek için çok daha az YEM'ye ihtiyaç bulunmaktadır (Lissant, 1975).

2.10.7.6. Stabilit  Testleri

Bu alışmalar, ICH'a (International Conference on Harmonization) göre gerçekleştirilmektedir. Belli bir süre belli koşullar altında stabilit  kabinde tutulan formülasyonlar, görüntü, renk, ilaç içeriği, seyreltilmiş formülasyonun pH'ı ve çözünme profili açısından test edilir. Bu  zellikler ilk formülasyonlarla eşleşirse, kararlı bir formülasyon olarak değerlendirilebilir (Borhade, Nair, & Hegde, 2008).

2.10.8. Mikroemülsiyonların Uygulama Alanları

Mikroemülsiyonlar, oral, topikal, transdermal, oküler, intranazal ve parenteral uygulamalar için kontrollü ilaç salımına izin veren  mit verici taşıyıcı sistemlerdir. İlaçların emilimin artırılması, ilaç salım kinetiğinin modülasyonu ve düşük toksisite sistemin avantajlarındandır (Grampurohit, Ravikumar, & Mallya, 2011).

2.10.8.1. Oral Mikroemülsiyonlar

Oral mikroemülsiyon formülasyonları, geleneksel oral formülasyonlara kıyasla emilimin artması, geliştirilmiş klinik potens ve azalmış ilaç toksisitesi dahil olmak üzere çeşitli faydalar sunmaktadır. Bu nedenle mikroemülsiyonlar, steroidler, hormonlar, diüretik ve antibiyotik peptitleri ve proteinleri gibi ilaçların verilmesi için ideal oldukları bildirilmiştir (Chauhan et al., 2019). Ancak, bu gruptaki ilaçların çoğunun geleneksel oral (oral biyoyararlanımının <% 10) (yani mikroemülsiyon bazlı olmayan) formülasyonlarla uygulanması zordur, genellikle oral uygulama ile terapötik aktivite göstermemektedirler (Chauhan et al., 2019). Oral biyoyararlanımlarının düşük olması nedeniyle, çoğu protein ilacı yalnızca parenteral formülasyonlar olarak mevcuttur. Ancak, peptit ilaçları, parenteral olarak uygulandıklarında son derece kısa bir biyolojik yarı ömre sahip olduklarından çoklu dozlama gerektirir. Bu da hasta uyuncu gibi bazı sorunları tetikler.

2.10.8.2. Parenteral Mikroemülsiyonlar

Sınırlı çözünürlüğe sahip ilaçların özellikle intravenöz yoldan uygulanması, asıl hedeflenen bir bölgeye çok düşük miktarda ilaç iletilmesi nedeniyle endüstride büyük bir sorundur. Mikroemülsiyon formülasyonları parenteral uygulamada, nano boyutlu damlacıkları nedeniyle makroemülsiyon sistemlerine göre belirgin avantajlara sahiptir. Mikroemülsiyonlar, daha büyük damlacıklara sahip emülsiyonlara göre kandan daha yavaş temizlenir, bu nedenle vücutta kalış süreleri daha uzundur (Chauhan et al., 2019).

Hem y/s hem de s/ y mikroemülsiyonları parenteral uygulama için kullanılabilir (Ho, Hsiao, & Sheu, 1996).

2.10.8.3. İntranazal Mikroemülsiyonlar

İntranazal mikroemülsiyonlar, invazif olmayan bir şekilde sistemik dolaşıma ilaç verilmesi için odaklanmış uygulama seçeneklerinden biridir. Bir çalışmada, noniyonik sürfaktan bazlı mikroemülsiyonların intranazal uygulamasıyla nimodipinin beyine geçişi araştırıldı. Beyin dokularında ve beyin omurilik sıvısında üç kat daha yüksek nimodipin ve eğri altındaki alanın (AUC) daha yüksek olduğu görüldü (Q. Zhang et al., 2004). Tavşanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, sildenafil sitrat mikroemülsiyonlarının intranazal verilmesi, oral tabletlere kıyasla görece biyoyararlanımının (kısa t-max ve daha yüksek AUC) daha yüksek olduğunu göstermiştir (Elshafeey, Bendas, & Mohamed, 2009).

2.10.8.4. Oküler Mikroemülsiyonlar

İlacın düşük biyoyararlanımına ve atımlı salınımına rağmen oküler yolla en çok kullanılan dozaj şekli göz damlalarıdır. Bununla birlikte, mikroemülsiyonlar spesifik yapıları nedeniyle gözün doğal savunması için umut verici bir dozaj şeklidir. Özellikle de, mikroemülsiyon olduklarında hazırlanmaları ve sterilize edilebilmeleri kolaydır, ayrıca stabilite ve ilaçları çözme kapasiteleri yüksektir. Sağlıklı gönüllüler üzerinde yapılan ön çalışma ve in vivo sonuçlara göre, uzatılmış bir etki ve ilacın biyoyararlanımında bir artış görülmektedir (Chauhan et al., 2019). Oküler mikroemülsiyonların mekanizmaları, kornea üzerinde ilacın bir rezervuarını oluşturan ve daha sonra drenajlarını sınırlayan mikroemülsiyonların iç fazını oluşturan nano boyutlu damlacıkların adsorpsiyonuna dayanmaktadır (Vandamme, 2002).

2.10.8.5. Topikal Mikroemülsiyonlar

Geleneksel topikal ilaç uygulamasında amaç (topikal antibiyotikler, antibakteriyeller, yumuşatıcılar ve güneş koruyucu maddeler), derinin bariyer işlevini manipüle ederek veya SC tabakasını moleküler düzeyde bozarak, sistemik tedaviler kullanılmadan ilaçların canlı epidermal ve dermal tabakalara ulaştırmasını sağlamaktır. Topikal uygulama ile ilacın hepatik ilk geçiş etkisinden ve olası toksisite etkilerinden korunma gibi avantajları bulunmaktadır. Bir diğer avantajı, ilacın derinin veya gözlerin etkilenen bölgelerine doğrudan verilmesi ve hedeflenebilirliğidir. Mikroemülsiyonlar, deriye tek

başına su veya losyon, krem gibi diğer geleneksel taşıyıcılardan daha büyük miktarlarda su ve topikal olarak uygulanan ajanları verme kabiliyetine sahiptir (Chauhan et al., 2019). Çünkü mikroemülsiyonlar daha iyi çözündürme kapasiteleri sayesinde zayıf çözünür ilaçlar için daha iyi bir rezervuar görevi görürler (Derle, Sagar, & Pimpale, 2006). Mikroemülsiyonların yapısındaki amfifilik özelliğe sahip yüzey etkin maddelerin penetrasyon artırıcı etkileri ve ilacın taşıyıcı içindeki hareketliliği de mikroemülsiyonların dermal veya transdermal uygulanmasının genel performansına katkıda bulunur (Kreilgaard, 2002). Mikroemülsiyonlar, topikal olarak uygulandığında lipid tabaka yapısının düzenini değiştirerek SC'yi kolayca geçebilir ve böylece bu yolla ilacın nüfuzunu artırabilir. Diğer veziküler sistemlere kıyasla mikroemülsiyonlar ilaçların perkütan emilimini artırmaktadır. Dolayısıyla mikroemülsiyonlar, antifungal ajanlar, antiakne ve antiviral ajanların deriden uygulanmasında daha verimli sonuçlar elde etmek mümkündür (Munir et al., 2017). Şimdiye kadar ilacın deriye nüfuz etmesi konusunda çok sayıda çalışma yapılmıştır. Hem hidrofilik (5-flurourasil, apomorfin hidroklorür vb.) hem de lipofilik ilaçlar (estradiol, finasteride, ketoprofenetc) mikroemülsiyon formülasyonları ile kombine edilebilir (Sk, Sk, Konda, & Naik, 2020).

2.10.8.6. Mikroemülsiyonların Kozmetik Uygulamaları

İlaçların mikroemülsiyon sistemler ile verilmesine ek olarak kozmetik alanında mikroemülsiyonların potansiyel faydaları giderek daha fazla kabul görmektedir. Mikroemülsiyonlar, artırılmış ürün etkinliği, stabilite, görünüm ve minimum tahriş gibi üstün özelliklere sahip kişisel bakım ürünleri hazırlamak için artık geniş çapta araştırılmaktadır (Grampurohit et al., 2011). Nemlendirici ve yumuşatıcı maddeler, güneş kremleri, ter önleyiciler, vücut temizleme maddeleri, saç kremleri ve tıraş sonrası formülasyonlar gibi çeşitli kozmetik ürünlerin hazırlanması için çok uygundur (Grampurohit et al., 2011). Mikroemülsiyonlar, formülasyondaki organik çözücülerin miktarını en aza indirmek için parfümeride de uygundur (A. Azeem et al., 2008).

2.10.9. Mikroemülsiyonların Deriden Geçiş Artırma Mekanizması

Bölüm 2.6.'da deriden geçiş artıran çeşitli yöntemler anlatılmaktadır. Mikroemülsiyonlar geleneksel emülsiyonlara ve solüsyonlara göre aktif maddeleri deriden daha çok geçmesine olanak sağlayan sistemlerdir (H. Chen et al., 2004; Sintov & Shapiro, 2004). Mikroemülsiyonların deriden penetrasyonu artırıcı özelliklerini açıklayan bazı mekanizmalar:

- Yüksek çözünürlük gücü nedeniyle formülasyona büyük miktarda aktif madde yüklenebilir (DelgadoCharro et al., 1997).
- Mikroemülsiyonlardaki aktif maddenin termodinamik aktivitesi, SC'a dağılımı kolaylaştırmak için modifiye edilebildiğinden transdermal geçişte bir artış beklenebilir (DelgadoCharro et al., 1997).
- Mikroemülsiyonlardaki yüzey etkin maddeler SC'un difüzyon bariyerini azaltabilir (Changez & Varshney, 2000; DelgadoCharro et al., 1997).
- Mikroemülsiyonlar, yüklü aktif maddenin iç fazdan dış faza ve ardından deriye salındığı aktif maddenin rezervuarları olarak işlev görebilir (Peltola, Saarinen-Savolainen, Kiesvaara, Suhonen, & Urtti, 2003).
- Mikroemülsiyon damlacıkları, SC yüzeyinde parçalanabilir ve daha sonra içeriklerini deriye bırakabilir (Peltola et al., 2003).
- Yüklenen aktif maddenin nüfuz etmesi, mikroemülsiyon SC'a füzyonu olmaksızın doğrudan damlacıklardan SC'a meydana gelir veya başka bir deyişle penetrasyon artırıcı etkisi, mikroemülsiyonların dış fazında dağılan nano boyutlu damlacıklar ile açıklanabilir. Bu damlacıklar SC'dan kolayca geçer ve aktif maddeyi deri bariyerinden geçirir (Peltola et al., 2003; Sintov & Botner, 2006).
- Mikroemülsiyondaki su içeriği yeterince yüksekse, aktif maddelerin perkütan emilimi, SC'un hidrasyon etkisine bağlı olarak artabilir (Peltola et al., 2003).

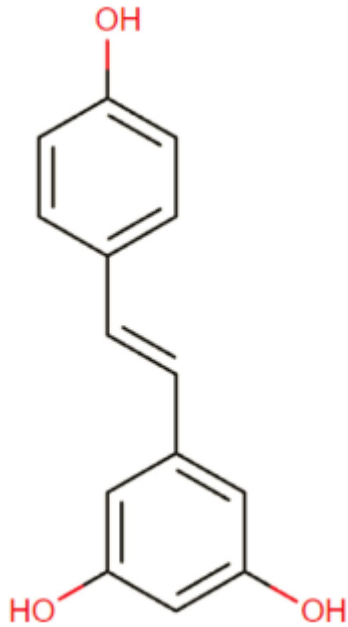
2.11. Resveratrol

Son yıllarda, resveratrol insan sağlığı üzerindeki olumlu etkilerinden dolayı araştırmacıların ilgisini çekmiştir (Tome-Carneiro et al., 2013). Fransız popülasyonunda doymuş yağların yüksek oranda tüketimine rağmen, kardiyovasküler hastalıkların neden olduğu düşük ölüm oranının yüksek resveratrol içeriğine sahip kırmızı şarap tüketiminin bağlanmıştır. Bu durum 'Fransız paradoksu' olarak bilinir (Catalgol, Batirel, Taga, & Ozer, 2012; Renaud & de Lorgeril, 1992). Resveratrol, anti-inflamasyon, anti-karsinogenez, anti-obezite, antidiyabet (tip 2), anti-aging, kardiyovasküler koruma ve nöroproteksiyon dahil olmak üzere çeşitli özellikleri için araştırılmıştır (Marques, Markus, & Morris, 2009; Smoliga, Baur, & Hausenblas, 2011; Timmers, Hesselink, & Schrauwen, 2013; Tome-Carneiro et al., 2013). Resveratrol, çok sayıda hastalıkla ilgili kapsamlı araştırmalara ek olarak, bakterilere, mantarlara ve virüslere karşı antimikrobiyal özellikleri açısından da incelenmiştir.

2.11.1. Resveratrol'ün Özellikleri

2.11.2. Resveratrol'ün Yapısı ve Fizikokimyasal Özellikleri

Resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben) stilben grubuna ait doğal olarak oluşan bir polifenolik antioksidandır. Stilben grubu, resveratrolün hidroksile bir türev olduğu bir C6 – C2 – C6 karbon iskeletinden (1,2-difeniletilen) oluşur (Şekil 2-7) (Niesen, Hessler, & Seeram, 2013). Resveratrol, yer fıstığı (*Arachis hypogea*), yaban mersini, kıvılcık (*Vaccinium spp.*), Japon madımağı (*Polygonum cuspidatum*) gibi çok sayıda bitkide ve en önemlisi insan tüketimi için doğal bir kaynak olan (*Vitis vinifera*) asmalarda mevcuttur (Aggarwal et al., 2004). Doğal bir fitoaleksin olan resveratrol, mantarların ve ultraviyole (UV) ışınlarının verdiği hasara yanıt olarak bitkiler tarafından sentezlenir (Langcake & Pryce, 1976). Resveratrol, hem cis hem de trans izomerde bulunur, trans izomer, kırmızı şarapta en bol bulunan formdur. Bulunabilirliğinin daha kolay ve stabilitesinin daha yüksek olması nedeniyle en çok araştırma yapılan formdur (Cottart, Nivet-Antoine, Laguillier-Morizot, & Beaudeau, 2010). Kırmızı şarap genellikle beyaz şaraptan daha fazla resveratrol konsantrasyonuna sahiptir (Pervaiz, 2003). Kırmızı şarap ortalama 1.9 mg / L trans-resveratrol içerir, ancak bu konsantrasyon 14.3 mg / L'ye ulaşabilir (Stervbo, Vang, & Bonnesen, 2007).



Şekil 2-7: Resveratrolün kimyasal yapısı

Resveratrole ait fizikokimyasal özellikler Tablo 2-4'de gösterilmiştir (Pangeni, Sahni, Ali, Sharma, & Baboota, 2014).

Tablo 2-4: Resveratrolün fizikokimyasal özellikleri

Bileşik adı	Resveratrol
CAS No	501-36-0
Kimyasal isim	3,4,5 Trihidroksi-trans-stilben; 3,4', 5-stilbene üçlüsü
Kimyasal sınıf	Stilben
Moleküler ağırlık	228,25
Moleküler formül	C ₁₄ H ₁₂ O ₃
Endikasyon	Antioksidan, kardiyoprotektif, immünomodülatör, antikanser, antihipertansif ve antiinflamatuvar aktivite
Görünüş	Beyaz / kirli beyaz toz, kendine özgü koku
Erime noktası	261 – 267 °C
pKa	8,1 – 11,4
Yarı ömür	8 – 14 dak.
Çözünürlük	Etanol içindeki çözünürlüğü, su ve DMSO bileşiklerinden daha yüksektir

2.11.3. Resveratrol'ün Farmakolojik Özellikleri

Reaktif oksijen türleri (ROS), çeşitli metabolik ve fizyolojik süreçlerin bir sonucu olarak vücutta sürekli olarak üretilir, ancak ROS üretimi ile doğal antioksidan aktivite arasındaki denge bozulduğunda, oksidatif stres ortaya çıkar. Resveratrol, bu oksidatif stresi engelleyen güçlü bir antioksidandır (Agarwal & Prabakaran, 2005). Bu nedenle antikanser (Cal et al., 2003), antianjiyojenik (Cao, Fu, Wang, Liu, & Han, 2005), antioksidan (Kim et al., 2002), antitumor (Harikumar et al., 2010) ve kardiyoprotektif (Hung, Chen, Huang, Lee, & Su, 2000) aktiviteler gibi farklı farmakolojik fonksiyonlar gösterir. Ayrıca nöroprotektif (Sahu, Madhyastha, & Rao, 2013), antidiyabetik (Palsamy & Subramanian, 2008), radyoprotektif (Sebastia et al., 2013), sitogenetik ve antiviral (Docherty et al., 2005) etkiler gibi başka terapötik etkiler de bildirilmiştir. Resveratrol, kemferol ve naringenin ile karşılaştırıldığında daha güçlü antiradikal aktivite sergilediği yapılan çalışmada görüldü. Ayrıca hastalık durumunda faydalı etkileri açıklanan a-tokoferol, kateşin, mirisetin ve naringenin'den daha etkili olduğu bulundu (Khanduja & Bhardwaj, 2003). Toksik olmaması ve vücut tarafından iyi tolere

edilebilme özellikleri ile tercih edilen bir bileşiktir. Hızlı absorpsiyonuna rağmen, intestinal ve hepatik metabolizma, resveratrolün sistemik biyoyararlanımı için hız sınırlayıcı adımdır. Resveratrolün yüksek lipofilisitesi, suda çözünürlüğünü düşürerek aynı zamanda, metabolik stabilitesi ile birlikte oral biyoyararlanımını bozar (Das, Lin, Ho, & Ng, 2008).

2.11.4. Resveratrol'ün Topikal Kullanım Amaçları

Resveratrol kimyasal özellikleri ve oksidatif stress kontrolündeki rolü ile cilt kanserleri dahil olmak üzere çeşitli deri hastalıkları ile ilgili çok sayıda *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar mevcuttur (Gruber & Holtz, 2010; Nichols & Katiyar, 2010; Packer & Valacchi, 2002). Genel olarak, polifenollerin oral yolla kullanılmasından kaynaklanan tüm biyoyararlanım sorunlarını ortadan kaldırmak topikal kullanımı önerilmiştir. Alonso ve ark. hem "*in vitro*" hem de "*in vivo*" resveratrolün topikal uygulamasında deriden penetrasyonu incelemişler. Topikal olarak uygulanan resveratrolün deriye gradyan tarzında nüfuz ettiğini ve penetrasyondan sonra resveratrolün antioksidan etkinliğini koruyabildiğini göstermişler.

2.11.5. Resveratrolün Topikal Uygulanması

Bölüm 2.12.3'de anlatıldığı gibi resveratrolün sağlık için faydaları, kardiyovasküler sistem, diyabet ve bağışıklık ve sinir sistemi dahil olmak üzere birçok sistem ve / veya organda gösterilmiştir. Resveratrolün deri üzerinde, keratinosit farklılaşması ve antimikrobiyal peptid ekspresyonunun uyarılması, keratinosit proliferasyonu ve kutanöz inflamasyonun inhibisyonu, UV koruması, antikanser, anti-aging ve melanogenez inhibisyonu gibi çok sayıda etkinliği bulunmaktadır.

2.11.5.1. Keratinosit Çoğalması ve Farklılaşması

Epiderminin, epidermal geçirgenlik bariyeri için gerekli bir yapı olan SC oluşumunun nihai amacına ulaşması için hem keratinosit çoğalması hem de farklılaşması gereklidir. Çeşitli çalışmalar, resveratrolün farklılaşmayı uyarırken keratinosit çoğalmasını inhibe ettiğini göstermiştir. Resveratrol, 2 μ M kadar düşük bir konsantrasyonda, keratinosit kültürlerinde DNA sentezini belirgin şekilde inhibe eder (Holian & Walter, 2001). Keratinosit çoğalması ve farklılaşmasının aktiviteleri ters bir şekilde koordine edilirken, terminal farklılaşması geçirgenlik bariyerinin oluşumu için çok önemlidir.

2.11.5.2. Anti – UV

Ultraviyole B ışınları (UVB), eritemojenik dozlar altında, epidermal geçirgenlik bariyer fonksiyonunda iyileştirme, epidermal lipid sentezinin ve keratinosit farklılaşmasının uyarma, ve antimikrobiyal savunma dahil epidermal fonksiyonu iyileştirmek gibi olumlu etkilere sahip iken, UV ışınlarına aşırı maruz kalma cilde zarar vererek güneş yanıklarına, cilt kanserlerine ve foto yaşlanmaya neden olabilir (S. P. Hong et al., 2008). Hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalar, resveratrolün deriyi UV ışınlarından koruduğunu göstermiştir. Başka bir çalışmada Ultraviyole A ışınlarına (UVA) maruz bırakılmış keratinositlerdeki hem süperoksit dismutaz (SOD) hem de glutatyon peroksidaz (GSH-Px) içerikleri resveratrol ile edilerek normalize edildi (M. L. Chen et al., 2006). UVA ışınlamasından önce veya sonra keratinositlerin resveratrol ile tedavisi lipid peroksidasyonunu azalttığı görüldü. Ancak, sadece resveratrol ile ön tedavi, SOD ve glutatyon S-transferaz (GST) protein seviyelerini artırdı (Liu et al., 2011). Resveratrolün UV ışınlarına karşı koruyucu etkileri *in vivo* çalışmalarda da olarak gösterilmiştir. Afag ve ark. yaptıkları bir çalışmada UVB ışınlarına maruziyetten 30 dakika önce ($180 \text{ mJ} / \text{cm}^2$) topikal $25 \mu\text{M}$ resveratrol uygulamasının, taşıyıcı ile tedavi edilen kontrol gruplarına kıyasla kulağın deri kalınlığını ve zımba ağırlığını sırasıyla % 50 ve 81'in üzerinde azalttığını bildirdi. Ayrıca, UVB ışınlamasından önce topikal resveratrol ile tedavi edilen fare derisinde kütanöz enflamatuvar infiltrasyon ve ornitin dekarboksilaz protein seviyeleri önemli ölçüde azaldı (Aziz, Afaq, & Ahmad, 2005). Yine de, UVB ışınlamasından sonra resveratrolün topikal uygulaması tüm cilt kalınlığını azaltırken, epidermal kalınlığı azaltmadı (Sirerol et al., 2015).

2.11.5.3. Antioksidan Savunma

Psikolojik stres, sigara dumanı, hava kirliliği ve UV ışınları gibi bir çok faktör, oksidatif strese neden olabilir. Oksidatif stres, yaşlılığın hızlanmasına, dermatoza, iltihaplanmaya, kardiyovasküler hastalıklara, kanser ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çok sayıda bozukluğa yol açabilir (R. K. Gupta et al., 2014; J. Kruk & Duchnik, 2014; Rajendran et al., 2014). Bundan dolayı, bazı bozuklukları önlemek ve tedavi etmek için antioksidanlar kullanılmıştır (Bala, Mondal, Halder, & Khandelwal, 2017; Gosselin, Chrapowiczky, & Rideout, 2019; F. Yang, Wolk, Hakansson, Pedersen, & Wirdefeldt, 2017). Glutathione peroxidase (GSH-Px), kinon dehidrojenaz (NQO), GST, SOD ve GSH dahil Faz II enzimleri, canlı organizmalardaki antioksidasyondan sorumludur.

Soeur ve ekibinin yaptıkları bir çalışmada 10 μ M resveratrolün, GSH-Px ve NQO1 için mRNA ekspresyon seviyelerinde 2 kattan fazla artışa neden olduğunu, daha da önemlisi keratinositlerde glutatyon sentezinde 1 katın üzerinde artışa sağlamakla birlikte yeniden yapılandırılmış insan derisinde GSH-Px ve NQO1 için mRNA'nın ekspresyon seviyelerinde 7 kat artışa neden olduğunu gösterdiler (Soeur, Eilstein, Lereaux, Jones, & Marrot, 2015). Vücut ile dış çevre arasında bir arayüz olan deri, oksidatif stres dahil çevresel tehlikelere karşı savunmasızdır. Bu da cilt yaşlanmasının hızlanmasına ve çeşitli cilt bozukluklarının gelişmesine yol açar (J. Kruk & Duchnik, 2014; Michniak-Kohn & Leonardi, 2017). Bu nedenle, derinin antioksidan savunmasının güçlendirilmesi, çeşitli kutanöz dermatozların tedavisine yardımcı olabilir. Krajka-Kuzniak ve ekibi bir çalışmada 4 saat boyunca 16 μ M topikal resveratrol ile tedavi edilen fare derisinin GST aktivitesini kontrollere göre % 63 ve GST içeriğini % 22 artırdığını gösterdiler (Krajka-Kuzniak et al., 2014).

2.11.5.4. Antikanser

Oksidatif stres, melanom gibi cilt kanserlerinin ortaya çıkmasına neden olan önemli bir faktördür (Obrador et al., 2019). Resveratrol dahil antioksidanlar cilt kanserlerin önlenmesi için kullanılmaktadır (Godic, Poljsak, Adamic, & Dahmane, 2014; Joanna Kruk & Y Aboul-Enein, 2017). Resveratrolün antimelanom etkileri hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak gösterilmiştir. Melanom hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda, resveratrolün 7 μ g / ml'lik bir konsantrasyonla melanom hücrelerinin proliferasyonunu % 50 inhibe ettiği görülmüştür (Fuggetta et al., 2004).

2.11.5.5. Anti-Enflamasyon

Enflamatuvar dermatozlar, dermatolojide en yaygın klinik problemlerdendir. Glukokortikoidler ve takrolimus gibi immün modülatörlerin ciddi yan etkileri nedeniyle, güvenli ve etkili alternatifler oldukça ilgi çekmektedir. Çalışmalar, resveratrolün hem hayvanlarda hem de insanlarda güvenli olduğunu, ancak hem *in vitro* hem de *in vivo* inflamasyonu etkili bir şekilde engelleyebileceğini göstermiştir (Boocock et al., 2007; Crowell, Korytko, Morrissey, Booth, & Levine, 2004). Keratinositlerin 50 μ M resveratrol ile 3 saat inkübasyonu, IL-6, IL-8, TNF- α ve makrofaj enflamatuvar protein 1 (MIF-1) için mRNA'nın ekspresyon seviyelerini % 50'nin üzerinde düşürdüğü yapılan çalışmada görüldü (Potapovich et al., 2011). Resveratrolün insanlarda deri iltihabını inhibe edebileceğine dair hala çok az kanıt

olmasına veya hiç kanıt olmamasına rağmen, resveratrolün anti-enflamatuvar faydaları, enflamatuvar dermatozların murin modellerinde iyi gösterilmiştir (Potapovich et al., 2011). Kang ve ekibinin yaptığı bir çalışmada, topikal dinitroklorobenzen ile indüklenen bir dermatit modelinde, beş hafta boyunca % 2.5 resveratrol veya resveratrol ile zenginleştirilmiş pirinç özütünün topikal uygulamalarının, dermatit skorunu ve serum IgE seviyelerini önemli ölçüde azalttığı gösterildi (Kang et al., 2019). Yapılan çalışmalar resveratrolün hem topikal hem de sistemik uygulanmasının kutanöz inflamasyonu hafifletebileceğini göstermektedir.

2.11.5.6. Deri Yaraları

Deri yarası iyileşmesi, hem fibroblast hemde keratinositlerin çoğalmasının yanı sıra kolajen birikimini içerir. Bir dizi gözlem sonunda, murin modellerindeki tam kalınlıktaki yaranın, resveratrolün hücre çoğalmasını ve kolajeni uyardığı ve deri yarasının iyileştirmesini hızlandırıldığı görüldü. Resveratrol içeren yara sargılarının tam kalınlıktaki deri yaralarına uygulanmasında kontrol grubundakilere kıyasla yara alanlarında belirgin azalmalar sağlamıştır (Berce et al., 2018). Diyabet hastalarında yara iyileşmesinin zor bir tedavidir. Çalışmalar resveratrolün topikal veya sistemik uygulamalarının diyabet hayvan modelinde deri yarası iyileşmesini kolaylaştıracağını göstermektedir. Ayrıca, yara iyileşmesi için topikal resveratrol merheminin etkinliği, geleneksel yara iyileştirme ürünü olan topikal β -sitosterole göre daha üstün bulundu (Wen, Zhang, Yang, Elias, & Man, 2020). Bununla birlikte, diğer çalışmalar, diyabetik sıçanlarda tek bir uygulamayı takiben yara iyileşmesinde resveratrolün çok az yararı olduğunu veya hiç yararı olmadığını göstermiştir (E. H. Gokce et al., 2017). Bu nedenle, resveratrolün diyabetik modellerde yara iyileşmesindeki potansiyel faydalarının hala doğrulanması için daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

2.11.5.7. Diğerleri

Hem insanlarda hem de fare modellerinde yapılan çalışmalarda, resveratrolün cilt yaşlanması, melanojenez ve antimikrobiyal savunma dahil olmak üzere diğer kutanöz fonksiyonları da düzenlediği görülmektedir. İnsan keratinosit kültürlerinde yapılan bir çalışmada, oksidatif stresin neden olduğu bir yaşlanma modelinde, resveratrolün yaşlanmanın bir biyobelirteci olan beta-galaktozidaz ekspresyon seviyelerinde % 90 azalma sağladığı görüldü (Yasuo Ido et al., 2012; Y. Ido et al., 2015). Katelisidin antimikrobiyal peptidler (CAMP), antibakteriyel, antifungal ve antiviral aktivite

gösteren, keratinositler, makrofajlar ve polimorfonükleer lökositler tarafından üretilen bir polipeptid grubudur. Yapılan bir çalışmada keratinositlerin resveratrol ile 24 saat inkübasyonunun CAMP mRNA ekspresyon seviyesini 4 kattan fazla artırdığı görülmüştür (K. Park et al., 2013). Resveratrolün, 1.25 mg/ml gibi düşük inhibitör konsantrasyonlarla *S. pyogenes*, *S. aureus*, *C. glabrata* ve *C. albicans* dahil olmak üzere çeşitli patojenlere karşı bakterisidal ve bakteriyostatik aktivite sergilediği yapılan çalışmalarda görülmüştür (Vitonyte et al., 2017). Bir çalışmada, herpes simpleks enfeksiyonlu fare modelinde, lezyon skorlarını azaltma açısından % 25 resveratrol içeren kremin topikal uygulamasının, % 5 asiklovir içeren merhem ile karşılaştırılabilir bir etkinliğe sahip olduğu görüldü (Docherty, Smith, Fu, Stoner, & Booth, 2004). Diğer çalışmalar, topikal resveratrolün, sodyum dodesil sülfat hasarlı insan derisinde epidermal geçirgenlik bariyer fonksiyonunu ve SC hidrasyonunu iyileştirdiğini göstermiştir (Wagemaker, Campos, Shimizu, Kyotani, & Yoshida, 2017). Ayrıca, hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalar, resveratrolün transkripsiyon faktörü (MITF) ekspresyonu ile ilişkili tirozinaz aktivitesini, sitokin üretimini ve melanositik mikroftalmi inhibisyonu yoluyla cilt pigmentasyonunu azalttığını göstermiştir (Na, Shin, Choi, Kwon, & Park, 2019). Tüm bunlara rağmen, resveratrolün deri fonksiyonu için varsayılan tüm bu faydaları hala yeterli klinik doğrulama gerekmektedir. Bu nedenle, resveratrolün klinik ortamlarda yaygın olarak kullanılabilmesi için iyi tasarlanmış klinik araştırmalara hala ihtiyaç vardır.

2.12. *İn vitro* Salım ve Deriden Geçiş Kinetiği

Çözünme veya salım testlerinden elde edilen değerlerin kantitatif analizi, çözünme/salım sonuçlarını bazı dozaj formu özelliklerinin bir fonksiyonu olarak ifade eden matematiksel formüller kullanıldığında daha kolaydır.

2.12.1. Sıfıncı Salım Kinetiği

Etkin maddenin dağılmayan ve ilacı yavaşça salmayan bir dozaj formundan çözünmesi, yani ilaç salım hızının konsantrasyonundan bağımsız olduğu dozaj şekilleri için geçerli olan salım kinetiğidir. Belirli bir zamanda salınan etkin madde miktarı sabittir, reaksiyonun hızı reaksiyona giren bileşenlerin konsantrasyonundan bağımsız olarak ilerler (2-5).

$$A_0 - A_t = kt \quad (2-5)$$

A_0 : Etkin maddenin dozaj şekil içindeki başlangıç miktarı (konsantrasyon x hacim)

A_t : Etkin maddenin dozaj şekil içindeki t anındaki miktarı (konsantrasyon x hacim)

k: Hız sabiti (konsantrasyon / zaman)

t: Zaman

Eşitlik 2-5'in her iki tarafı A_0 'ya bölündüğünde Eşitlik 2-6 elde edilir.

$$1 - (A_t/A_0) = k_t/A_0$$

$$\text{Veya } 1 - A_t/A_0 = k_0 t \quad (2-6)$$

$1 - A_t/A_0$: t anında çözünen etkin madde fraksiyonu

k_0 : Sıfırıncı derece çözünme hız sabiti

Zamana karşı çözünen etkin madde fraksiyonu grafiği doğrusal olacaktır. Bu ilişki, bazı transdermal sistemler, düşük çözünür ilaçlara sahip matris tabletler (Varelas, Dixon, & Steiner, 1995), kaplı formlar ve ozmotik sistemler gibi çeşitli tipte modifiye edilmiş salım dozaj formlarının ilaç çözünmesini belirlemek için kullanılabilir. Bu profile göre salım yapan dozaj formları, birim zamanda aynı miktarda ilacı salar ve uzun süreli farmakolojik etki elde etmek için ideal ilaç salımı yöntemidir (Kalam et al., 2007).

2.12.2. Birinci Derece Salım Kinetiği

Birinci derece kinetik ilk olarak 1967'de Gibaldi ve Feldman (Gibaldi & Feldman, 1967) tarafından ve daha sonra 1969'da Wagner (Wagner, 1969) tarafından ilaç çözünme çalışmaları için uygulandı. Birinci derece kinetikte ilaç salım hızı konsantrasyona bağlıdır; ondalık logaritmada şu şekilde gösterilebilir (2-7):

$$\text{Log } A_t = \text{Log } A_0 + k_1 t / 2.303 \quad (2-7)$$

A_t : t zaman içinde salınan ilaç miktarı

A_0 : Etkin maddenin çözeltideki başlangıç miktarı

k_1 : Birinci derece kinetik çözünme hız sabiti

Burada, salınan ilacın zamana karşı ondalık logaritmasının grafiği doğrusal olacaktır.

Gözenekli bir matris içinde suda çözünür etkin madde içeren dozaj şekilleri (Mulye & Turco, 1995) bu profili izler, birim zaman azalmasıyla salınan ilaç miktarı ile orantılı olarak ilacı serbest bırakır.

2.12.3. Higuchi Salım Kinetiği

Higuchi 1961'de (Higuchi, 1961) ve 1963'te (Higuchi, 1963) yarı katı ve katı matrislerde bulunan suda çözünür ve düşük çözünürlüğe sahip ilaçların salınımını incelemek için modeller geliştirdi.

Homojen bir matrise sahip bir planya sistemden çözünmeyi incelemek için elde edilen eşitlik (2-8);

$$A = [D (2C - C_s) C_s t]^{1/2} \quad (2-8)$$

A: Birim alandan salınan ilaç miktarı

C: Etkin maddenin başlangıç konsantrasyonu

C_s : Matris ortamdaki ilacın çözünürlüğü

D: Etkin maddenin difüzyon katsayısı

Matristeki ilaç konsantrasyonunun çözünürlüğünden daha düşük olduğu ve salınımın matristeki gözenekler yoluyla gerçekleştiği küresel bir heterojen matris sistemi incelendiğinde, elde edilen eşitlik (2-9);

$$A = D\varepsilon/\tau (2C - \varepsilon C_s) C_s t \quad (2-9)$$

ε : Matris porozitesi

τ : Kılcal sistemin kıvrımlılık faktörü

Genel olarak Higuchi modeli aşağıdaki gibi basitleştirilebilir (2-10) (genellikle basitleştirilmiş Higuchi modeli olarak bilinir)

$$A = K_H t^{1/2} \quad (2-10)$$

K_H : Higuchi hız salım sabiti

Higuchi ilaç salımını Fick kanuna dayanan difüzyon işlemine göre açıklar. Bazı transdermal sistemler ve suda çözünen etkin madde içeren matris tabletlerde (Desai, Singh, Simonelli, & Higuchi, 1966) olduğu gibi modifiye edilmiş salım dozaj formlarından ilaç çözünmesi, yukarıdaki eşitliğe göre gerçekleşmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Resveratrol (Biota labartuvarları, İstanbul)

Tween 80 (Polietilen glikol sorbitan monooleat) (*Sigma-Aldrich*)

Tween 20 (Polietilen glikol sorbitan monolaurat) (*Sigma-Aldrich*)

Zeytin yağı (*Sigma-Aldrich*)

Asetik asit (*Sigma-Aldrich*)

Metanol (*Sigma-Aldrich*)

Etanol (*Sigma-Aldrich*)

3.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler

3.1.2.1. Kullanılan Aletler

Damlacık Büyüklüğü Ölçüm Aleti (*Malvern Zetasizer-Nano ZS*)

Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (*Shimadzu, Model LC 20AT*)

Kolon (*Insertil, ACE C18 (4,6×250 mm, 5µm)*)

Franz Difüzyon Sistemi (*PermeGear, V3A Stirrer, 4G-01-00-15-12-VDOC*)

pH Metre (*HANNA Edge HI2020*)

Kondüktometre (*Eutech Instruments, PC 2700*)

Viskozimetre (*Brookfield DV3T*)

Polarize ışık mikroskobu (*Olympus CX31-P*)

Distile Su Aleti (*PureLab UV/UF lonpure*)

Nutche Erleni süzme sistemi (*Sartorius D-3400*)

Manyetik karıştırıcı (*Wise Stir®*)

Hassas Terazî (*AND GR-200*)

Ultrasonik banyo (*WiseClean®*)

Santrifüj (*Hettich, D-7200, Type 2041*)

Çalkalamalı su banyosu (*Wisebath*)

TEM (*Jeol Jem 1010*)

İklimlendirme kabini (*Nüve*)

3.1.2.2. Kullanılan Malzemeler

Zetasizer Küveti (disposable)

HPLC Vialleri

Cam Malzeme (Beher, Erlen, Mezür, Cam şişe, Pipet, Balon joje, vs.)

Eppendorf (1,5- 2 mL)

Domuz kulağı derisi

0,45µm Membran Filtre (Sartorius Stedium Biotech)

0,45 µm Şırınga ucu filtreler (Sartorius Minisart RC 25

Parafilm®

3.1.2.3. Kullanılan Bilgisayar Programları

Microsoft Office Word 2016

Microsoft Office Excel 2016

Microsoft Power Point 2016

Chemix School 4.00

Mind The GRAPH

Bio RENDER

3.2. Yöntem

3.2.1. Resveratolün Kantitatif Analiz Yönteminin Geliştirilmesi

3.2.1.1. Analiz Yönteminin Geliştirilme Aşamaları

Kolon Seçimi

Resveratrol etkin maddesinin HPLC ile analizlerinin yapıldığı makaleler incelendiğinde en çok kullanılan kolonun ters faz C18, 5µm, 250 mm x 4.6 mm kolonu olduğu tespit

edildi (Alonso et al., 2017; Evren H Gokce et al., 2012; C.-F. Hung, Y.-K. Lin, Z.-R. Huang, & J.-Y. Fang, 2008; Mamadou et al., 2017; Pandita, Kumar, Poonia, & Lather, 2014; S. N. Park, Jo, & Jeon, 2014; Mariarenata Sessa et al., 2014; Singh, Pai, & Pandit, 2012; Sun, Zhao, Ni, & Xia, 2014).

Dedektör ve Dalgaboyu Seçimi

Laboratuvar ortamında mevcut olan HPLC sisteminde PDA dedektör bulunmaktadır. PDA dedektör birden fazla dalga boyuyla aynı anda çalışma imkanı sağlamaktadır. Dalga boyu olarak, litaretür taraması sonucunda bulunan makaledeki 310 nm ile çalışıldı (Mariarenata Sessa et al., 2014).

Mobil Faz Seçimi

Çalışmada çözücü ve seyreltme çözeltisi olarak birçok çözücü ve bunların çeşitli oranlardaki karışımları araştırıldı. Bunlar arasında metanol, asetonitril, ultra saf su, asetik asit ve çeşitli tamponlar bulunmaktadır.

HPLC kullanılarak RES miktar tayini yapılan makaledeki kayıtlı yöntemle göre, Metanol (MeOH):Asetik Asit (AcOH) :Ultra Saf Su (45:5:50 h/h/h) içeren A çözeltisi ve AcOH:MeOH (1,2:98,8, h/h) içeren B çözeltisi mobil faz çözeltisi olarak kullanıldı (Mariarenata Sessa et al., 2014). Bu HPLC yönteminde gradient programı kullanıldı. Gradient programa ait koşul Tablo 3-1 verilmektedir.

Tablo 3-1: Gradient programa ait koşullar

Hacim (%)	Mobil faz	Süre (dak.)
% 0-10	B Çözeltisi	10
% 10-100	B Çözeltisi	2,5
%100	B Çözeltisi	2,5
%100 - %100	B Çözeltisi – A Çözeltisi	2,5
%100	A Çözeltisi	5

Sonuç olarak, bu HPLC yöntemi tez çalışmamıza uyarlanarak mikroemülsiyon formülasyonlarındaki etkin madde miktarı, *in vitro* salım ve permeasyon çalışmalarında örneklerdeki etkin maddenin tayini için kullanıldı. Uygulanan yöntemle ait kromatografik koşullar Tablo 3-2’te verilmektedir

Tablo 3-2: Miktar tayini yöntemine ait kromatografik koşullar

Kolon	Inertsil, C ₁₈ , 5 µm, 250 x 4,6 mm
Dedektör	PDA
Dalga boyu	310 nm
Sıcaklık	Oda sıcaklığı
Akış hızı	0,8 mL/dak
Enjeksiyon hacmi	10 µL
Mobil faz	A çözücüsü: Metanol : Asetik Asit : Ultra Saf Su (45 : 5 : 50, h/h/h) B çözücüsü: Asetik asit : Metanol (1,2 : 98,8 h/h)
Analiz süresi	12,5 dak.

Mobil faz hazırlama: Gradient programı ile uygulanacak olan mobil fazlardan A çözeltisini hazırlamak için 450 mL MeOH ve 500 mL ultra saf su karışımı üzerine 50 mL AcOH ilave edilerek 1000 mL'lik balon jojede karıştırıldı. Mobil fazlardan bir diğeri olan B çözeltisi için 12 mL asetik asit 1000 mL'lik balon jojede MeOH ile hacmine tamamlandı. A ve B çözeltileri ayrı olacak şekilde 15 dakika manyetik karıştırıcı (WiseStir® - SMHS-6) üzerinde homojen olmaları için karıştırıldı. Mobil fazlar hidrofilik özellikteki filtrelerden süzüldü ve HPLC cihazına verilmeden önce 20 dak. süre ile ultrasonik banyoda degaze edildi.

Seyreltme Çözeltisi: Metanol seyreltme çözeltisi olarak kullanıldı.

Stok Çözelti: 5 mg resveratrol tartılarak 50 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Metanol ile hacmine tamamlandı. Ultrasonik banyoda 10 dak karıştırıldı. Elde edilen çözelti 0,1 mg/mL resveratrol ihtiva etmektedir.

Çalışma çözeltisi: Stok çözeltiden 1,25 mL alınarak 25 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Çözücü ile 25 mL hacme tamamlama yapıldı. Hazırlanan bu çözelti 0,005 mg/mL resveratrol ihtiva etmektedir. Bu çözelti validasyonda %100'lük çözelti olarak değerlendirildi.

3.2.2. Resveratrolün Kantitatif Analiz Yönteminin Validasyonu

Bir analiz yönteminin performans özelliklerini istenilen analitik uygulamada, belirlenen gerekli koşullarda sağladığını göstermek için uygulanan işlemlerin tümü analitik yöntem validasyonu olarak tanımlanır (USP XXIII/NF).

3.2.2.1. Doğrusallık (linearity)

Belirlenen aralıkta elde edilen sonuçların numunedeki konsantrasyonlar ile orantılı olma yeteneği bu analitik yöntemin doğrusallığını ifade eder. En az 5 konsantrasyon doğrusallığın kurulması için kullanılmalıdır ("ICH Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology ", 2005). Regresyon doğrusu elde edilen sonuçlara göre çizilir ve regresyon doğrusunun eğimi ve determinasyon katsayısı (R^2) hesaplanır.

Stok çözeltiden seyreltilerek 8 farklı derişimde örnekler hazırlandı. Konsantrasyon aralığı 0,1-50 µg/mL olarak belirlendi. Bu değerler çalışma çözeltisinin % 2-1000 konsantrasyon aralığına denk gelmektedir. %100'lük potens değerine resveratrol için Tablo 3-3'da verilen konsantrasyonlar seçildi.

Tablo 3-3: Miktar tayini analizinde çalışma çözeltisine göre resveratrol (RES) yüzdelerine karşılık gelen konsantrasyonlar

	RES (µg/mL)
%2	0,1
%10	0,5
%20	1
%40	2
%100	5
%200	10
%600	30
%1000	50

Determinasyon katsayısı ve doğrunun eğimi, bu konsantrasyonlara karşı elde edilen absorbands değerlerinin ortalamalarına göre çizilen doğrunun regresyon analizi yapılarak hesaplandı. R^2 değerinin 0,999'dan daha düşük olmaması ölçüt kabul edildi.

3.2.2.2. Doğruluk ve Geri Kazanım (accuracy)

Bir analitik yöntem kullanılarak elde edilen sonuçların gerçek değere yakınlığı analitik yöntemin doğruluğu olarak ifade edilir. Konsantrasyonu bilinen numunelerin analiz

edilmesiyle elde edilen sonuçlardan geri kazanım yüzdesi ile doğruluk belirlenebilir ("ICH Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology ", 2005). Doğruluk ölçütü hesaplamak için etkin maddelerin bilinen düşük, orta ve yüksek konsantrasyonda (%10, %100 ve %600) çözeltileri hazırlandı ve geliştirilen kromatografik yöntem kullanılarak çalışma 3 er defa yapıldı ve geri kazanım yüzdesi tayin edildi. Geri kazanım yüzdelерinin %98-102 arasında olması ve %VK'nin %2'den küçük olması ölçüt olarak kabul edildi.

3.2.2.3. Kesinlik (Precision)

Bir analitik yöntemde numunenin tekrar edilen ölçümlerin birbirine yakınlığı, yöntemin kesinliğini ifade eder (ERTAŞ & KAYALI, 2005; Shabir, 2003). Sayısal bir değeri yoktur, standartma sapma (SS), standart hata (SH), veya yüzde varyasyon katsayısı (%VK) İle ifade edilir. İstatiksel açıdan yeterli değeri lenmenin yapılacağı sayıda, aynı konsantrasyonda örnek, art arda ölçülerek aritmetik ortalama ($\bar{x}$), SH ve %VK hesaplanması ile değerlendirilir. Üç aşamadan oluşur. Bunlar: Tekrarlanabilirlik, Tekrar elde edilebilirlik ve Ara kesinliktir ("ICH Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology ", 2005).

Tekrarlanabilirlik (Repeatability)

Bir diğer ifade ile deney içi kesinlik olarak bilinir. Bir örneğin aynı şahıs tarafından aynı şartlarda kısa zaman aralıklarıyla yapılan ölçümlerinin yakınlığı ile ifade edilir. Çalışma çözeltilisi örneğinin (0,5 mg/mL) 10 kez art arda ölçümünün yapılmasıyla tekrarlanabilirlik ölçütü incelendi. %VK'nin %2'den küçük olması ölçüt kabul edildi.

Ara Kesinlik (Intermediate Precision)

Bir diğer ifade ile laboratuvar içi kesinlik olarak bilinir. Farklı günler, farklı kişi ve farklı ekipmanı kapsayan varyasyonlar ile tanımlanır. Yöntemin ara kesinliğini ölçmek için 3 farklı günde düşük ve yüksek derişimde hazırlanan numuneler (0,5 µg/mL ve 30 µg/mL) analiz edilerek sonuçlar değerlendirildi. %VK'nin %2'den küçük olması hedeflendi.

Tekrar Elde Edilebilirlik (reproducibility)

Bir diğer ifade ile laboratuvarlar arası kesinlik olarak bilinir. Uygulanan yöntem ile farklı laboratuvarlarda yakın sonuçların elde edilebilirliğinin göstergesidir. Bu parametre tez çalışmasında incelenmemiştir.

3.2.2.4. Sistem Uygunluk Parametreleri

%100 konsantrasyondaki çalışma çözeltisi, sistem uygunluğunu incelemek için sisteme 6 defa art arda enjekte edildi. Ortaya çıkan piklerin alanı, alıkonma zamanı, kuyruklanma faktörü, plaka sayısı ve resolüsyon değeri incelendi. Hedef spesifikasyonları olarak, pik alanlarının varyasyon katsayısının (%VK) değeri 2'den küçük, kuyruklanma faktörünün 1,5'ten küçük, teorik plaka sayısının 3000'den büyük ve resolüsyon değerinin 3'ten büyük olması ölçüt olarak belirlendi.

3.2.2.5. Seçicilik (Specificity)

Analiz edilecek maddeleri ortamdaki diğer maddelerin varlığında doğru olarak ayırt edebilme yeteneği seçicilik olarak tanımlanır. Yöntemin seçiciliğini tayin etmek amacıyla çözücü veya mobil faz çözeltilerinden ileri gelebilecek herhangi bir girişimin olup olmadığı incelendi. Bunun için RES içermeyen mikroemülsiyon formülasyonu 10 µL hacimde kolona enjekte edildi. Ortamdaki bileşenlerden kaynaklı pik oluşup oluşmadığı gözlemlendi.

3.2.2.6. Dayanıklılık (Stability)

Stok çözelti hazırlamak için 10 mg resveratrol tartılarak balon jode 100 mL'ye metanol ile tamamlandı. Bu stok çözeltilerden metanol ile seyreltme yapılarak 30 µg/mL konsantrasyonda örnek hazırlandı. Hazırlanan örnek 72 saat boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Başlangıçta ve 24 saat aralıklarla alınan örnekler analiz edildi. Analiz süresi boyunca etkin maddelerin çözelti içerisindeki dayanıklılığı araştırıldı.

3.2.3. Çözünürlük Çalışması

Resveratrolün mikroemülsiyon ve makroemülsiyon formülasyonu bileşiminde kullanılacak yağ ve YEM içerisindeki çözünürlüğü araştırıldı. Bunun için, mikroemülsiyon ve emülsiyon formülasyonlarında yüzey etkin madde olarak kullanılacak Tween 80 ve yağ fazı olarak kullanılacak zeytinyağından 10'er ml alınarak üzerlerine aşırı miktarda resveratrol ilave edildi. Karışımlar ortam koşulları sıcaklığında ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de) çalkalamalı su banyosu içerisinde 72 saat boyunca 300 rpm'de çalkalandı. Süre sonunda her karışım 15 dak. 6000 rpm'de santrifüj edilerek çözünmeden kalan resveratrolün çökmesi sağlandı. Üste kalan çözüntüden 1 ml alınarak metanol ile 100 ml'ye seyreltmeler yapıldı. Bu işlem her bir örnek için 3'er defa yapıldı. 0,45µm şırınga

ucu filtreler ile süzöldükten sonra HPLC cihazında miktar tayini 3 kez tekrarlı olarak yapıldı.

3.2.4. Ön Formölasyon Çalışmaları

Mikroemölşiyon ve makroemölşiyon formölasyonları geliştirilirken şekil 3.4’de göröldüğü gibi zeytinyağı, tween 80 ve distile su sırasıyla yağ fazı, YEM ve su fazı olarak kullanıldı.

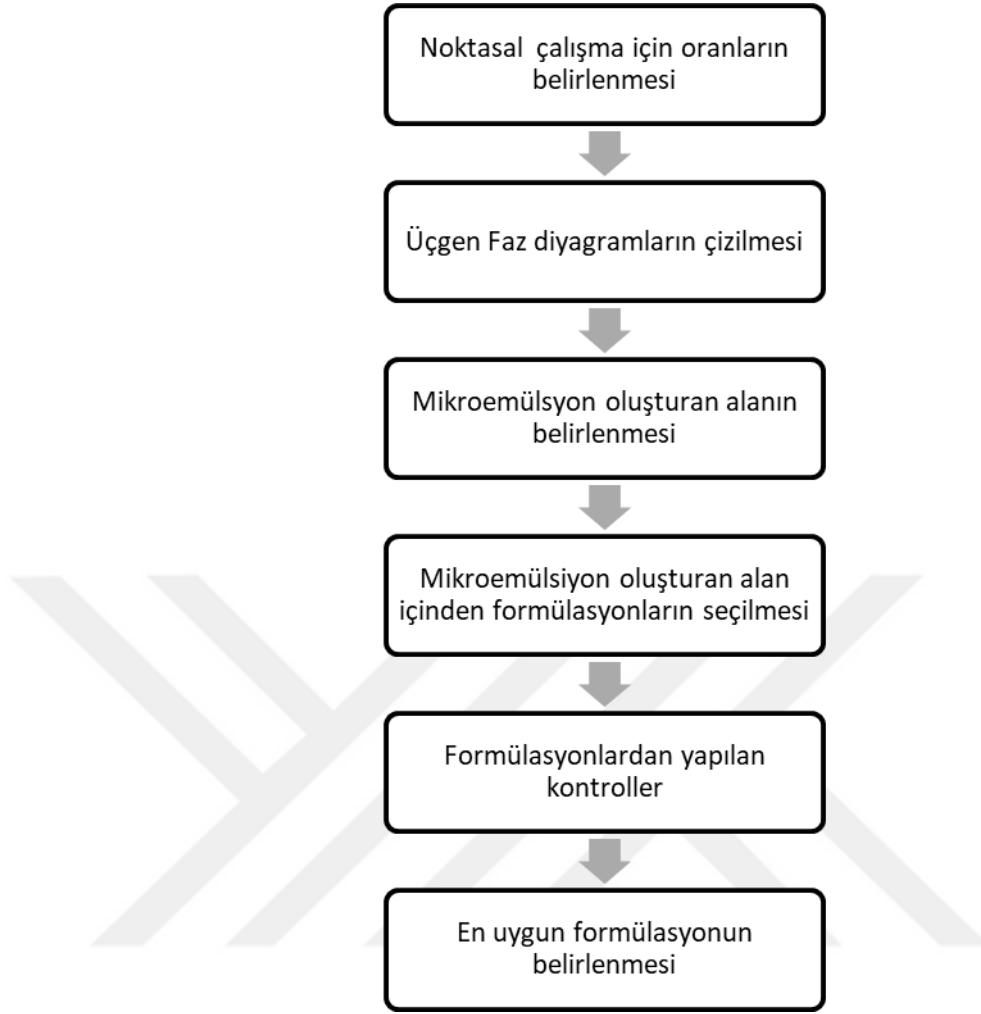
Tablo 3-4: Formölasyonda kullanılacak bileşenler

Yağı faz	Sulu Faz	YEM
Zeytinyağı	Distile su	Tween 80

Ön formölasyon çalışmalarında mikroemölşiyon ve makroemölşiyonun alanın tespit edilmesi için noktasal çalışma yöntemi kullanıldı. Bu maddelerin farklı oranlardaki karışımları ile ön formölasyon çalışmaları yapıldı. Bu çalışma için öncellikle cam bir beher belirli orandaki yağ fazının üzerine belli oranda sürfaktan damla damla şeklinde ilave edildi. Cam beherdeki karışım ağız bir parafilm yardımıyla kapatıldı. Yağ fazı ve YEM karışımını homojen hale getirmek için karışım manyetik karıştırıcı ile bir süre karıştırıldı. Homojen görüntü elde edilene kadar karışıma devam edildi. Daha sonra bu karışım üzerine belirli orandaki distile su fazı damla damla ilave edildi. Elde edilen formölasyonlar berraklık ve bulanık durumuna göre değeriendirildi.

3.2.5. Mikroemölşiyon Formölasyonları

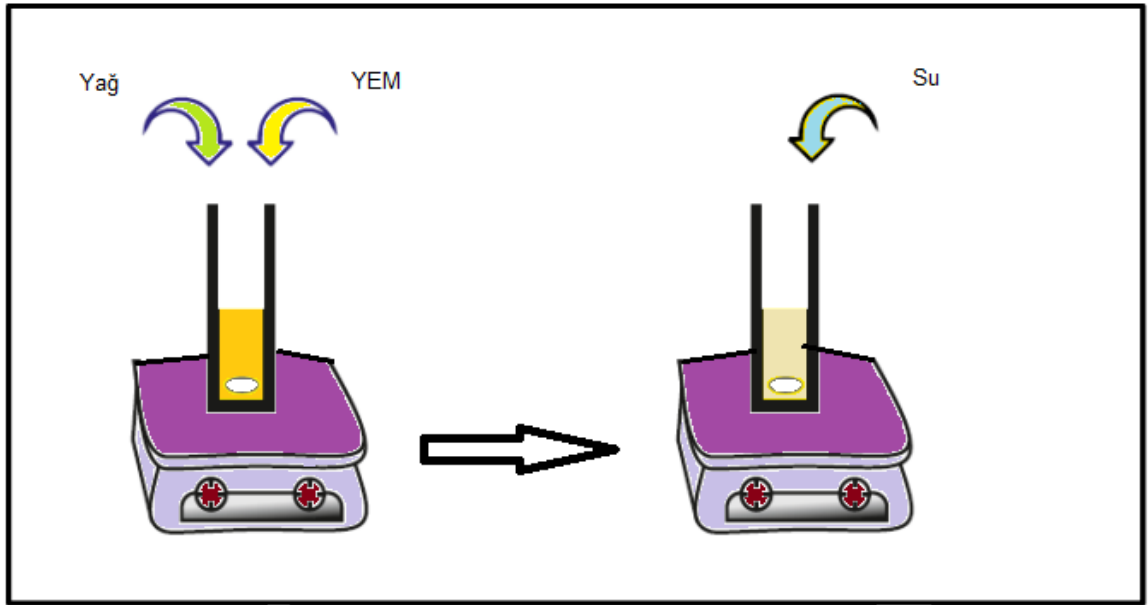
Resveratrol içermeyen mikroemölşiyon formölasyonlarını geliştirmek için şekil 3-1 gösterildiği gibi bir çalışma planı yapıldı.



Şekil 3-1: Formülasyon geliştirme aşamasında kullanılan çalışma planı

3.2.5.1. Mikroemülsiyonların Hazırlanması

Formülasyon geliştirme çalışmaları kapsamında formülasyonlar hazırlanırken Şekil 3-2’de gösterildiği gibi yağ fazını oluşturan zeytinyağı ve yüzey etkin madde olarak kullanılan Tween 80 hassas terazide tartıldıktan sonra 600 rpm’de manyetik karıştırıcıda 40°C sıcaklıkta homojen bir görüntü elde edilene kadar karıştırıldı. Aynı sıcaklığa getirilen su fazını oluşturan distile su bu karışımın üzerine damla damla ilave edildi. Sulu faz damla damla ilave edilirken manyetik karıştırıcı hızı 1250 rpm kadar kademli olarak çıkartıldı.



Şekil 3-2: Manyetik karıştırıcıda mikroemülsiyon hazırlama

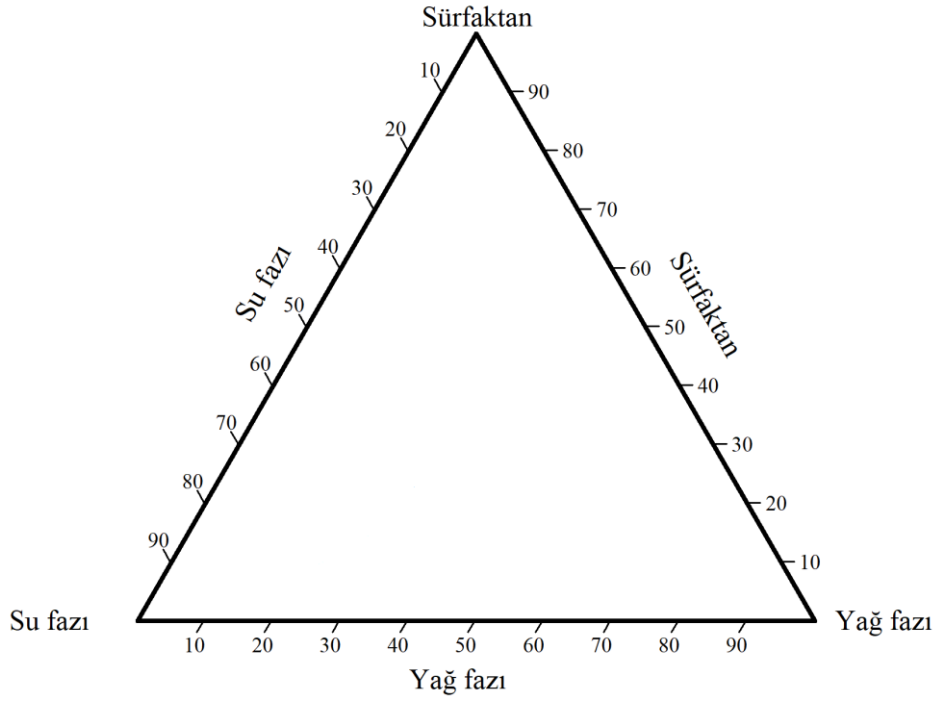
3.2.5.2. Mikroemülsiyonların Oluşumu ile İlgili Görsel Değerlendirme

Yağ fazı ve su fazı karışımından sonra meydana gelen karışım gözlemsel olarak değerlendirildi. Meydana gelen karışımlardan, şeffaf / yarı saydam ve kolay akabilen sıvı olanlar mikroemülsiyon, süt görünümünde veya bulanık sıvı olanlar makroemülsiyon, 90°'lik açı ile eğildiklerinden içinden bulundukları kabdan serbest akmayanlar ise jel olarak tanımlandı.

3.2.5.3. Üçgen Faz Diyagramlarının Çizilmesi

Üçgen faz diyagramları üç bileşenli (YEM ve YYEM tek kabul edilir) farmasötik dozaj şekillerinin geliştirilmesi aşamasında kullanılan yöntemlerdir. Üçgen faz diyagramları, üçgenin herbir köşesine üç farklı bileşenin yerleştirildiği ve bu köşelerde bulunan bileşenin ağırlıkça %100 oranda olduğu diyagramlardır (Şekil 3-3).

Üçgen Faz diyagramı



Şekil 3-3: Üçgen faz diyagramı

Yağ fazı bir bileşen, YEM veya YEM/YYEM bir bileşen ve su fazı bir bileşen olarak kabul edilmektedir. Bu üç bileşenin toplamı 100 olarak kabul edilmektedir. Bileşenlerden birinin miktarı artarken diğer bileşenlerin miktarı azalmaktadır. Mikroemülsiyon formülasyonları geliştirilirken, mikroemülsiyonların oluştuğu alanın belirlenmesi için üçgen faz diyagramından faydalanıldı (Cheng et al., 2007). Üçgen faz diyagramı yağ fazı, YEM ve su fazının mikroemülsiyonun oluştuğu alandaki yüzde (%) değerlerini belirlemek için kullanıldı. Şeffaf, berrak görüntüsü olan formülasyonların oluştuğu alan mikroemülsiyon alanı olarak belirlendi. Elde edilen veriler doğrultusunda hangi oranlarda yağ fazı ve YEM karışımı yapılacağına karar verildi. Yağ fazı, YEM ve su fazı tabloda verilen değerler oranında karıştırıldı.

Tablo 3-5: Ön formülasyon çalışmalarında denenen yağ fazı, sürfaktan ve su fazı oranları

Sayı	Yağ fazı	Sürfaktan	Su fazı
1.	5	80	15
2.	10	80	10
3.	15	80	5
4.	5	70	25

5.	10	70	20
6.	15	70	15
7.	20	70	10
8.	25	70	5
9.	5	60	35
10.	10	60	30
11.	15	60	25
12.	20	60	20
13.	25	60	15
14.	30	60	10
15.	35	60	5
16.	5	50	45
17.	10	50	40
18.	15	50	35
19.	20	50	30
20.	25	50	25
21.	30	50	20
22.	35	50	15
23.	40	50	10
24.	45	50	5
25.	5	40	55
26.	10	40	50
27.	15	40	45
28.	20	40	40
29.	25	40	35
30.	30	40	30
31.	35	40	25
32.	40	40	20
33.	45	40	15
34.	50	40	10
35.	5	30	65
36.	10	30	60
37.	15	30	55
38.	20	30	50
39.	25	30	45
40.	30	30	40
41.	35	30	35

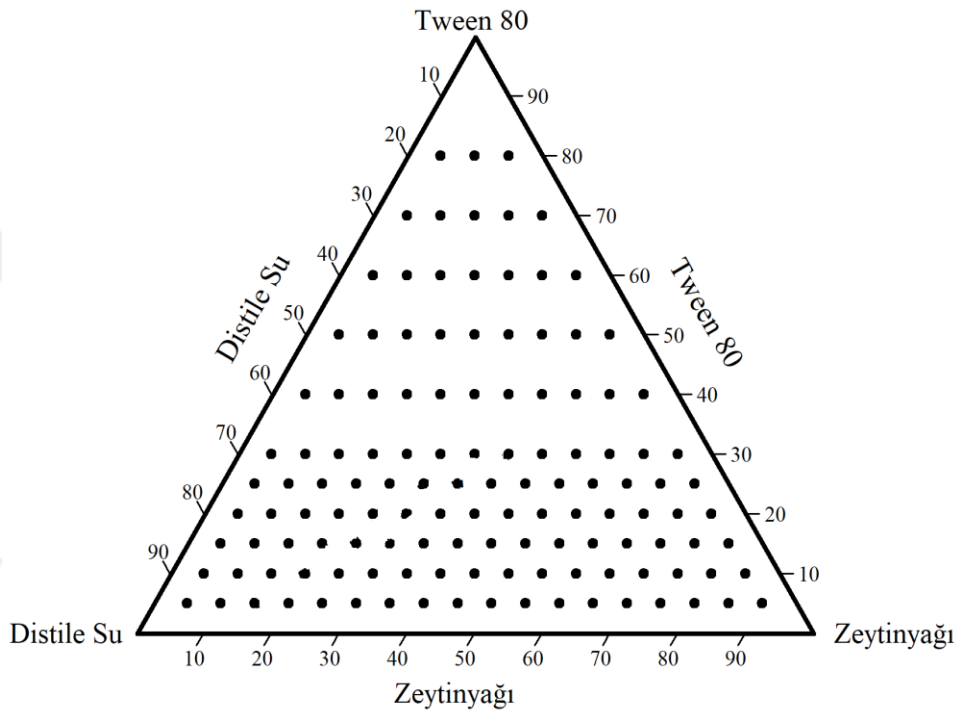
42. 40	30	30
43. 45	30	25
44. 50	30	20
45. 55	30	15
46. 60	30	10
47. 65	30	5
48. 5	25	70
49. 10	25	65
50. 15	25	60
51. 20	25	55
52. 25	25	50
53. 30	25	45
54. 35	25	40
55. 40	25	35
56. 45	25	30
57. 50	25	25
58. 55	25	20
59. 60	25	15
60. 65	25	10
61. 70	25	5
62. 5	20	75
63. 10	20	70
64. 15	20	65
65. 20	20	60
66. 25	20	55
67. 30	20	50
68. 35	20	45
69. 40	20	40
70. 45	20	35
71. 50	20	30
72. 55	20	25
73. 60	20	20
74. 65	20	15
75. 70	20	10
76. 75	20	5
77. 5	15	80
78. 10	15	75

79. 15	15	70
80. 20	15	65
81. 25	15	60
82. 30	15	55
83. 35	15	50
84. 40	15	45
85. 45	15	40
86. 50	15	35
87. 55	15	30
88. 60	15	25
89. 65	15	20
90. 70	15	15
91. 75	15	10
92. 80	15	5
93. 5	10	85
94. 10	10	80
95. 15	10	75
96. 20	10	70
97. 25	10	65
98. 30	10	60
99. 35	10	55
100. 40	10	50
101. 45	10	45
102. 50	10	40
103. 55	10	35
104. 60	10	30
105. 65	10	25
106. 70	10	20
107. 75	10	15
108. 80	10	10
109. 85	10	5

Mikroemülsiyonların oluştuğu alanı üçgen faz diyagramında belirlemek için noktasal çalışma yöntemi kullanıldı. Tabloda verilen değerler doğrultusunda öncelikle yağ fazı ve YEM belli oranlarda karıştırıldı. Karışımı homojen halde getirmek için manyetik karıştırıcıda belli bir süre karışımına devam edildi. Su fazı damla damla olacak şekilde çok yavaş bir şekilde eklendi. Yağ fazı, su fazı ve YEM içeren karışım homojen hale

gelmesi için manyetik karıştırıcı üzerinde bir süre karıştırmaya bırakıldı. Şeffaf, berrak ve faz ayrımı olmayan örnekler mikroemülsiyon olarak değerlendirildi. Mikroemülsiyon oluşturan değerler kullanılarak her bir köşesinde YEM, su ve yağ bileşenleri olan üçgen faz diyagramları çizildi (Şekil 3-4).

Noktasal Alan Çalışması



Şekil 3-4: Üçgen faz diyagramlarında noktasal alan çalışması

3.2.6. Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Seçimi

Üçgen faz diyagramından yararlanarak hazırlanan formülasyonlar arasından etkin madde yüklenecek olanlar, ön stabilite testleri, damlacık boyutları, polidispersite indeksleri ve fiziksel görünümleri değerlendirilerek seçildi.

3.2.7. Seçilen Mikroemülsiyonlara Resveratrolün Yüklenmesi

Damlacık boyutu ve polidispersite indeksi verilerine göre seçilen formülasyonlara resveratrolün eklenmesi, resveratrolün zeytinyağı ve Tween 80 karışımında çözülmesi ile gerçekleştirildi. Önceden hesaplanan su miktarı damla damla yağ, yüzey aktif madde ve çözünmüş resveratrol karışımına eklendi. Böylece, resveratrol içeren optimize edilmiş bileşim ME formüle edildi (ME-RES). Kardiyovasküler hastalık, antioksidan, anti-inflamatuar, kolorektal kanser hücrelerine karşı anti-tümör aktivitesi için yetişkin

bireylerin resveratrol dozu 20-50 mg civarındadır (Langcake & Pryce, 1976; Walle, Hsieh, DeLegge, Oatis, & Walle, 2004). Bu nedenle, ME'deki resveratrolün hedef içeriği %0.05 (a/a) olarak ayarlandı. Formülasyon, herhangi bir bulanıklık, faz ayrılması veya jelleşme belirtisi olup olmadığını incelemek için 72 saat boyunca ortam sıcaklığında tutuldu.

3.2.8. Seçilen Mikroemülsiyon Formülasyonlar Üzerinde Çalışmalar

Seçilen formülasyonların ön stabiliteleri, fiziksel görünüşü, damlacık boyutu, polidispersite indeksi (PDI), değerlendirildi.

3.2.8.1. Fiziksel Görünüş

Mikroemülsiyon formülasyonları oda sıcaklığında, homojenite, renk, şeffalık ve genel fiziksel görüntü bakımında değerlendirildi.

3.2.8.2. Optik İzotropinin Değerlendirilmesi

Olympus CX31-P polarize ışık mikroskobu kullanılarak mikroemülsiyonların optik izotropisi değerlendirildi. Formülasyonlar bir damlalık yardımıyla lam üzerine üzerine damlatılıp aradada hava kalmaması için lamel 45° lik açıyla tutulup yavaş yavaş lamın üzerine bırakıldı Işık mikroskobun objektifi 10x ayarlanıp (30 W) görüntü değerlendirildi.

3.2.8.3. Stabilitenin Değerlendirilmesi

Hızlandırılmış Stabilitate Testleri

Santrifüj Testi

Mikroemülsiyonlar, Hettich Zentrifügen D-7200 santrifüj cihazı kullanılarak 15000 rpm'de 15 dak. santrifüj edilerek fiziksel stabilite değerlendirildi. Görsel olarak faz ayrımının gerçekleşip gerçekleşmediği değerlendirildi.

Termodinamik Dayanıklılık Testi

Dayanıklı olan mikroemülsiyonlar sıcaklık değişimi testine tabi tutuldu. Sıcaklık değişiminin mikroemülsiyonlar üzerindeki etkisini incelemek üzere formülasyonlar 12 saat -20°C'de takiben 12 saat oda sıcaklığında bekletildi. Bu işlem arka arkaya 2 defa tekrarlandı (Figueiredo, Neves, Silva, Freitas, & Carvalho, 2016). Formülasyonlar homojenite, faz ayrımı ve bulanıklık bakımından incelendi.

Termal Stres Testi

Termal stres testi hızlandırılmış stabilite çalışmalarının diğer bir aşamasıdır. Mikromemülasyonlardan şeffaf olanlar termal stres testine tabi tutuldu. Santrifüj testi ve termodinamik testi geçen formülasyonlar öncelikle 40°C'lik WiseBath® su banyosuna bırakıldı. Daha sonra her yarım saatte bir sıcaklık 5°C arttırılarak maksimum 80°C'ye kadar ısıtıldı (Figueiredo et al., 2016). Çökme, faz ayrımı, çeperde birikme gibi stabilite sorunları göstermeyen formülasyonlarla diğer çalışmalara devam edildi.

3.2.8.4. Damlacık Büyüklüğü ve Polidispersite İndeksinin Değerlendirilmesi

Dinamik ışık saçılımı esasına dayanan Malvern Zetasizer Nano-ZS cihazı kullanılarak mikroemülasyonların damlacık boyutu ölçüldü. Ölçümler için tek kullanımlık ölçüm küvetleri kullanıldı. Bu yöntemde Malvern Zetasizer Nano-ZS cihazı, damlacıklar tarafından yayılan ışığın açisal dağılımını ölçme esasına göre ölçümleri yapmaktadır. Mikroemülasyonların 1 mL' sinin üzerine 100 mL bidistile su eklenerek 1:100 oranında olacak şekilde örnekler seyrelti (Tang, Xiang, Li, Zhou, & Kuang, 2019). Ölçüm sıcaklığı 25°C olarak ayarlandı. Resveratrol yüklü olmayan ve resveratrol yüklü olan mikroemülasyonların damlacık boyutları tespit edildi. Her bir formülasyon için yaklaşık 10 tarama olmak üzere ölçümler her formülasyon için 3 kez tekrarlandı, sonuçların aritmetik ortalaması alınarak SD değerleri hesaplandı.

Mikroemülasyonların polidispersite indeksi dinamik ışık saçılımı esasına dayanan Malvern Zetasizer Nano-ZS cihazı kullanılarak ve damlacık boyutu ölçümü ile eşzamanlı olarak ölçüldü. Boş ve resveratrol yüklü mikroemülasyonların polidispersite indeksleri belirlendi. Ölçümler her formülasyon için 3 kez tekrarlandı, sonuçların aritmetik ortalaması alınarak SD değerleri hesaplandı.

3.2.8.5. Reolojik Özelliğin İncelenmesi

Brookfield DV3T Reometre kullanılarak formülasyonların viskoziteleri ölçülerek akış özellikleri tespit edilmeye çalışıldı. Santrifüj testinden geçen ve damlacık boyutu kabul edilebilen aralıkta olan formülasyonlar için ölçüm yapıldı. Formülasyondan 0,5 mL alınarak plak üzerine bir plastik damlalıkla damlatıldı. Ölçümler CP 40 plağı ile 25 ± 2°C'de ortam koşullarında gerçekleştirildi. Formülasyonların viskoziteleri 70 rpm, 75 rpm, 80 rpm, 85 rpm, 90 rpm, 95 rpm, 100 rpm, 105 rpm, 110 rpm ve 115 rpm'de ölçüldü.

3.2.8.6. pH'ın İncelenmesi

HANNA Edge HI2020 series pH metre kullanılarak seçilen mikroemülsiyonların pH ölçümleri yapıldı. pH tespit çalışmasına başlamadan önce kalibrasyon işlemi için pH 4, 7 ve 10 kullanılarak kalibrasyon işlemi yapıldı. pH metre probu, boş ve resveratrol yüklü formülasyonların bulunduğu beherlere koyuldu ve pH değeri sabitlenene kadar beklendi. pH ölçümleri 3 kez tekrarlandı. Ölçümlerin aritmetik ortalaması alınarak SD değerleri hesaplandı.

3.2.8.7. İletkenliğin İncelenmesi

Formülasyonların iletkenlik değerlerini ölçmek için Eutech Instruments PC2700 serisi kullanılarak mikrosiemens (μ S) olarak ölçüldü. Resveratrol içermeyen ve resveratrol içeren formülasyonlar için iletkenlik değerleri tespit edildi. Elektrot probu formülasyonların bulunduğu beherlere uygun olarak yerleştirildi ve değerler sabitlenmesi için beklendi. İletkenlik ölçümleri 3 kez tekrarlandı. Ölçümlerin aritmetik ortalaması alınarak SD değerleri hesaplandı.

3.2.8.8. Mikroemülsiyonların TEM Görüntüleri

Formülasyon örneğinden bir damla alınarak 200 mesh'lik bakır ızgaraların üzerine damlatıldı. Filtre kağıdındaki aşırı sıvının uçması için 5 dakika boyunca beklemeye bırakıldı. Uranil asetat boya kullanıldıktan sonra 10 dakika boyunca bekletildi. Formülasyondaki damlacıklar elektron mikroskopunda incelendi.

3.2.9. Makroemülsiyon Formülasyonları

Resveratrol içermeyen makroemülsiyon formülasyonların geliştirmek için Şekil 3-1'de gösterilen çalışma planı makro emülsiyon formülasyonları için uyarlandı.

3.2.9.1. Makroemülsiyonların Hazırlanması

Makroemülsiyon formülasyonlar hazırlanırken yağ fazını oluşturan zeytinyağı ve yüzey etkin madde olarak kullanılan Tween 80'nin yarısı hassas terazide tartıldıktan sonra 600 rpm'de oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda homojen bir görüntü elde edilene kadar karıştırıldı. Aynı işlem su fazını oluşturan distile su ve geriye kalan YEM için yapıldı. Karışım hızı ve sıcaklık sabit tutularak su fazı yağ fazı üzerine damla damla ilave edildi. Beher içerisindeki karışım ağzı kapatılarak 2 saat boyunca karıştırıldı. Hazırlanan formülasyonlar 48 saat boyunca ortam koşullarında dengeye gelmesi için bekletildi.

3.2.9.2. Makroemülsiyonların Oluşumu ile İlgili Görsel Değerlendirme

Yağ fazı ve su fazı karışımından sonra ortaya çıkan sistemler, süt görünümünde veya bulanık sıvılar olarak görünüyorsa emülsiyon olarak tanımlandı. Karışımlar 90°'lik açı ile eğildiklerinden içinden bulundukları kaptan akıyorsa jel olarak tanımlandı.

3.2.9.3. Üçgen Faz Diyagramlarının Çizilmesi

Bölüm 3.2.5.3'te anlatıldığı şekilde üçgen faz diyagramları çizildi. Formülasyonlara hazırlandıktan sonra süt görünümünde veya bulanık sıvı görünümündeki yapıların meydana geldiği alan makroemülsiyon alanı olarak belirlendi.

3.2.10. Makroemülsiyonların Seçimi

Bölüm 3.2.5.3'te anlatıldığı şekilde yapılan üçgen faz diyagramından yararlanarak hazırlanan formülasyonlar arasından etkin madde yüklenecek olanlar, ön stabilite testleri, damlacık boyutları, polidispersite indeksleri ve fiziksel görünimleri değerlendirilerek seçildi.

3.2.11. Seçilen Makroemülsiyonlara Resveratrol Yüklenmesi

Makroemülsiyonlara resveratrol yüklenmesi Bölüm 3.2.7.'de anlatıldığı şekilde yapıldı.

3.2.12. Seçilen Makroemülsiyonlar Üzerinde Çalışmalar

3.2.12.1. Fiziksel Görünüş

Makroemülsiyon formülasyonları oda sıcaklığında, homojenite, renk, genel fiziksel görüntü bakımında değerlendirildi.

3.2.12.2. Stabilitenin Değerlendirilmesi

Hızlandırılmış Stabilite Testleri

Santrifüj Testi

Makroemülsiyonlar, Hettich Zentrifüger D-7200 santrifüj cihazı kullanılarak 15000 rpm'de 5 dak. santrifüj edilerek fiziksel stabilite değerlendirildi. Görsel olarak faz ayrımının gerçekleşip gerçekleşmediği değerlendirildi.

Termodinamik Dayanıklılık Testi

Dayanıklı olan makroemülsiyonlar sıcaklık değişimi testine tabi tutuldu. Sıcaklık değişiminin makroemülsiyonlar üzerindeki etkisini incelemek üzere formülasyonlar 1

saat 4°C’de takiben 1 saat 40°C sıcaklıkta bekletildi. Bu işlem arka arkaya 2 defa tekrarlandı. Formülasyonlar homojenite ve faz ayrımı bakımından incelendi.

Termal Stres Testi

Santrifüj testi ve termodinamik testi geçen formülasyonlar öncelikle 40°C’lik WiseBath® su banyosuna bırakıldı. Daha sonra her yarım saatte bir sıcaklık 5°C arttırılarak maksimum 80°C’ye kadar ısıtıldı Çökme, faz ayrımı, çeperde birikme gibi stabilite sorunları göstermeyen formülasyonlarla diğer çalışmalara devam edildi.

3.2.12.3. Damlacık Büyüklüğü ve Polidispersite İndeksi

Bölüm 3.2.8.4.’te anlatıldığı şekilde makro emülsiyonların damlacık boyutları ve polidispersite indekslerine bakıldı.

3.2.12.4. Reolojik Özelliklerin İncelenmesi

Brookfield DV3T Reometre kullanılarak formülasyonların viskoziteleri ölçülerek akış özellikleri tespit edilmeye çalışıldı. Santrifüj testinden geçen ve damlacık boyutu kabul edilebilen aralıkta olan formülasyonlar için ölçüm yapıldı. Formülasyondan 0,5 mL alınarak plak üzerine bir plastik damlalıkla damlatıldı. Ölçümler CP 40 plağı ile $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ’de ortam koşullarında gerçekleştirildi. Formülasyonların viskoziteleri 1 rpm, 3 rpm, 5 rpm, 7 rpm, 9 rpm, 11 rpm, 14 rpm, 16 rpm, 18 rpm ve 20 rpm’de ölçüldü

3.2.12.5. pH’ın Değerlerin İncelenmesi

Makroemülsiyonların pH’ın incelenmesinde Bölüm 3.2.8.6.’da anlatıldığı şekilde yapıldı.

3.2.12.6. İletkenlik Değerlerin İncelenmesi

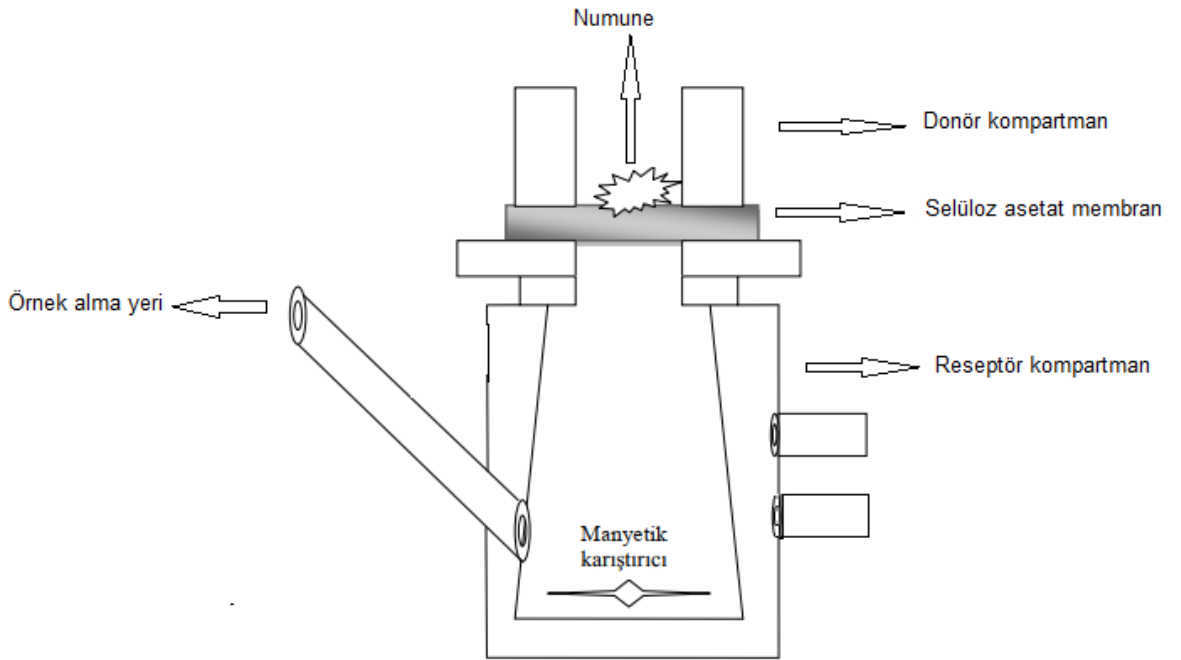
Makroemülsiyonların İletkenliklerin incelenmesinde Bölüm 3.2.8.7.’de anlatıldığı şekilde yapıldı.

3.2.13. Resveratrol’ün *In vitro* Salımı

Formülasyonlarının deriden geçişini değerlendirmek için *in vitro* salım çalışmaları yapıldı. Salım çalışmalarında kullanılmak üzere seçilen resveratrol yüklü formülasyonlar sentetik membrandan geçiş (permeasyon) çalışması difüzyon hücresi kullanılarak yapıldı.

3.2.13.1. Difüzyon Aygıtı

Salım çalışmalarında inert camdan yapılmış, donör ve reseptör kompartmandan oluşan bir difüzyon hücresi kullanıldı. 15 mm şeffaf görünümlü, düz tabanlı, ceketli, manyetik karıştırıcılı, reseptör kompartman hacmi 12 mL, difüzyon alanı 1,77 cm² ve yandan yukarıya doğru çıkan örnek alma kolu olan üçlü difüzyon hücresi kullanıldı (Şekil 3-5). Difüzyon hücreleri dönme hızı 500 rpm olan PermeGear Franz Difüzyon Sistemine yerleştirilerek kullanıldı. 0.45 µm por açıklığı olan bir selüloz asetat membranı ağzı açık olan reseptör fazın üzerine yerleştirildi. Cam malzemeden yapılmış donör kompartmanı da membran üzerine yerleştirilerek reseptör-membran-donör sistemi oluşturuldu. Reseptör kompartmanda olan difüzyon ortamı da sürekli manyetik olarak karıştırıldı. PermeGear Franz Difüzyon Sistemi sirkülasyonlu su banyosu ile entegre edilerek, su banyosu sıcaklığı 32 °C'ye sabitlendi.



Şekil 3-5: *In vitro* ve *ex vivo* çalışmalarda kullanılan Franz Difüzyon Hücresi

3.2.13.2. Difüzyon Ortamının Hazırlanması

RES hidrofobik bir madde olduğu için, salım deneylerinde kullanılacak difüzyon ortamı belirlemeden önce RES ile yapılan salım çalışmaları incelendi. Bu *in vitro* salım çalışması için reseptör ortamı olarak 5 g/L Tween 20® içeren Etanol su çözeltisi (1:1) kullanıldı (Scalia, Trotta, Iannuccelli, & Bianchi, 2015; Sharkawy, Casimiro, Barreiro, & Rodrigues, 2020).

3.2.13.3. *In Vitro* Salım Çalışmaların Yapılması

Her bir difüzyon hücresinin reseptör kompartmanının sürekli karışmasını sağlayan manyetik balık yerleştirildi. Reseptör ortamı için 3.2.13.2. bölümünde anlatılan çözelti hazırlandı. Çözelti reseptör kompartmanına koyulmadan önce 30 dak. boyunca ultrasonik su banyosunda degaze edildi. Reseptör ortamı degaze edilen çözelti ile dolduruldu. Selüloz asetat membran reseptör kompartmanı üzerine yerleştirilmeden önce reseptör ortam çözeltisi ile bir müddet doyuruldu. Membranlar reseptör kompartmanı üzerine yerleştirilirken hava kalmayacak ve gergin olacak şekilde oturtulmalıdır. Donör kompartman membran üzerinde sabit olacak şekilde sıkı bir şekilde yerleştirilmelidir. Difüzyon alanından taşan membran kısımları ince uçlu bir makas ile kesildi. RES çabuk oksidasyona uğradığı için donör kompartmanın etrafı ışık almayacak şekilde alüminyum folyo ile kapatıldı. Oksidasyon tetikleyici tehditlerden korunmak amacıyla pencerelerdeki perdeler kapatılarak laboratuvar ortamı ışısız hale getirildi.

Kontrol çözeltisi (standart çözelti) olarak RES içeren hidroalkolik çözelti (%20 etanol, h/h) kullanıldı. Her bir donör kompartmanı mikropipet yardımıyla aynı miktarda RES (%0,05) içeren 300 µl mikroemülsiyon, makro emülsiyon ve standart çözeltisi ile dolduruldu. Difüzyon hücresi olası buharlaşmaları minimum seviyeye indirmek için parafilm ile kapatıldı. Herbir formülasyon için 3 hücre ile çalışıldı. 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 'ncı saatlerde 1 mL örnek alındı ve yerine aynı miktarlarda reseptör faz ilave edildi. Reseptör ortamından çekilen örnekler seyreltilmeden 0,45 µm por açıklığına sahip Sartorius Minisart RC 25 filtrelerden süzildükten sonra HPLC cihazında analiz edildi. Ortamdaki derişimi doygunluğun çok altında olduğu yani '*sink koşul*' sağlandığı için; $C_0 \gg C_i$;

Fick'in birinci yasasına göre (3-1 ve 3-2);

$$(J) = k_p \times C_i \quad (3-1)$$

$$(k_p) = \frac{KD}{h} \quad (3-2)$$

(k_p ; permeabilite katsayısıdır, birimi cm/h)

Bu eşitlikte C uygulanan formülasyondaki ilaç miktarını, J kümülatif ilaç miktarını veren eğrinin lineer iken eğimini, k_p permeasyon katsayısını ifade eder (Hadgraft & Guy, 2002).

3.2.14. Resveratrol İçeren Çözelti, Makroemülsiyon ve Mikroemülsiyonların *Ex Vivo* Domuz Derisinden Geçiş

Ex vivo deriden geçiş çalışmaları için domuz kulağı kullanıldı. Domuz kulakları kullanılıncaya kadar dondurucuda muhafaza edildi. Kullanılmadan bir gün önce cerrahi bisturi ile deri kulaktan dikkatli bir çalışma ile ayrıldı. Derinin yağ katmanları SC tabakasına zarar verilmeden pens ve cerrahi makas ile temizlendi.

Ex vivo çalışmada kullanılacak deri deneylerin gerçekleştirileceği gün derin dondurucudan alınarak bir müddet oda sıcaklığında çözünmeye bırakıldı, daha sonra doygunluğa ulaşması için deri kesitleri 30 dakika süresince reseptör faz içinde bekletildi. Hücrelerinin hacmi 12 mL, difüzyon alanı 1,77 cm² ve dönme hızı 500 rpm olan PermeGear Franz Difüzyon Sistemi kullanılarak (Şekil 3-5) *ex vivo* geçiş çalışması gerçekleştirildi. Reseptör ortamı olarak 3.2.13.2 bölümünde olan çözelti kullanıldı. SC kısmı üstte kalacak şekilde domuz kulağı derileri Franz Difüzyon hücrelerine yerleştirildi. Hava kabarcıkların hücreler üzerinde oluşmaması için çaba sarf edildi. Hücrelerin etrafında kalan deri parçaları kesildi. Su banyosu 32 °C’de sabitlendi. Donör faz olarak %0,05 resveratrol içeren mikroemülsiyon, makro emülsiyon ve referans çözelti formülasyonlarından mikropipet yardımıyla 300 µl uygulandı ve üzerleri parafilm ile kapatıldı. Her bir formülasyon için 3’er hücre ile çalışıldı. 1, 2, 3, 6, 8 ve 24 ’üncü saat sonunda reseptör fazdan bir defa 1000 µl örnek alındı ve yerine aynı miktarlarda reseptör faz ilave edildi. Reseptör ortamından çekilen örnekler seyreltilmeden 0,45 µm por açıklığına sahip Sartorius Minisart RC 25 filtrelerden süzöldükten sonra HPLC cihazında analiz edildi.

3.2.15. Katı Mikroigne ile İşlem Görmüş Deriden Etkin Madde Geçiş

Domuz derisinde mikro kanallar oluşturmak için katı mikroigne dermoroller kullanıldı. Dermoroller silindiri 2 mm yüksekliğe ve 0,2 mm çapında paslanmaz çelik mikroignelere sahiptir. Rulonun çevresel yönünde 20, sıra başına 9 iğne vardı. Mikroigne dermoroller mikro kanalların sayısını arttırmak için her deri numunesine uygulandı. Deri örnekleri temiz yatay zemin üzerine SC tabakası üstte kalacak şekilde koyuldu. Fazla ağır bir baskı uygulanmadan mikroigne ile derilerin üzerinden silindirik hareketler üç kez yapıldı. Mikroigne ile işlem görmüş deriler franz difüzyon hücresine monte edildi. Donör faz olarak %0,05 resveratrol içeren mikroemülsiyon, makro emülsiyon ve referans çözelti formülasyonlarından mikropipet yardımıyla 300 µl uygulandı ve donör fazdaki maddenin buharlaşmasını engellemek için üzerleri parafilm

ile kapatıldı. Her bir formülasyon için 3'er hücre ile çalışıldı. 1, 2, 3, 6, 8 ve 24 'üncü saat sonunda reseptör fazdan bir defa 1000 µl örnek alındı ve yerine aynı miktarlarda reseptör faz ilave edildi. Reseptör ortamından çekilen örnekler seyreltilmeden 0,45 µm por açıklığına sahip Sartorius Minisart RC 25 filtrelerden süzöldükten sonra HPLC cihazında analiz edildi. Eksize edilmiş tam kalınlıkta domuz derisine nüfuz eden her bir ilacın kümülatif miktarı, zamanın bir fonksiyonu olarak grafiğe döküldü.

3.2.16. Stabilité Çalışmaları

İn vitro ve *ex vivo* çalışmalarında kullanılan ME9 mikroemülsiyon ve E21 emülsiyon formülasyonları fiziksel kararlılık testlerine tabi tutularak, cam tüpler içerisine alınarak ağzı sıkıca kapalı olacak şekilde beklemeye bırakıldı. Bu amaçla, hazırlanan formülasyonlar $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ve $40 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve $\%60 \pm 5$ ve $\%70 \pm 5$ bağıl nem koşullarında 6 ay boyunca iklimleme kabinlerinde tutuldu. 6 ay sonunda formülasyonların fiziksel görünimleri, pH, iletkenlik, damlacık boyutları ve zeta potansiyelleri ve etkin madde tayinleri değerlendirildi.

3.2.17. İstatiksel Değerlendirme

3.2.17.1. Aritmetik Ortalama ($\bar{x}$)

Bu tez çalışmasında elde edilen verilerin aritmetik ortalamalarını hesaplamak için Eşitlik 3-3 kullanıldı.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

(3-3)

3.2.17.2. Standart Sapma (SD)

Bu tez çalışmasında elde edilen verilerin aritmetik ortalamalarını hesaplamak için Eşitlik 3-4 kullanıldı.

$$SD = \pm \frac{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}}{n - 1}$$

(3-4)

n: Örnek sayısı (örnek sayısı 30'dan küçük olduğunda n-1 olarak kullanıldı)

x_i : Örnek numarası

$\bar{x}$: Örnek ortalaması

3.2.17.3. Bağlı Standart Sapma

Bu tez çalışmasında elde edilen verilerin aritmetik ortalamalarını hesaplamak için Eşitlik 3-5 kullanıldı.

$$\% RSD = \frac{SD}{\bar{x}} 100$$

(3-5)

3.2.17.4. Tek Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA)

Bu tez çalışmasında ikiden fazla bağımsız grubun ortalamaları arasında (bu tezde formülasyon grupları) veya içinde farklılığının olup olmadığını test etmek için kullanılan ANOVA değerlendirme testinden yararlanıldı. Ortalamalar, bütün gruplar genelinin meydana getirdiği dağılım özelliği çerçevesinde önce bir bütün olarak değerlendirilir. Gruplar arasında fark yoksa işlemler sonlandırılır. Gruplar arasında arasında anlamlı bir fark bulunursa, gruplar arasında karşılaştırmalar için uygun çoklu karşılaştırma yöntemleri kullanılır.

Herbir formülasyon grubu için *in vitro* salım, *ex vivo* deriden geçiş çalışmalarında elde edilen sonuçlar dikkate alınarak, tüm formülasyon grupların birbiri ile mukayese edildi. Değerlendirmeler sonucunda; istatistiksel olarak anlamlı fark bulunan gruplarda $p < 0.05$ ifadesi kullanıldı. Anlamlı fark bulunmayan gruplarda ise $p > 0.05$ ifadesi kullanıldı.

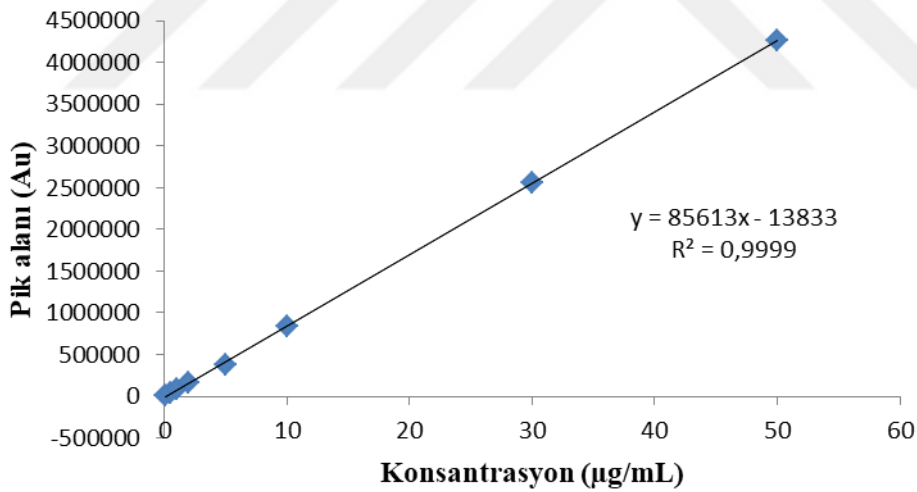
4. BULGULAR

Bu araştırma sonucunda elde edilen bulgular üç temel bölüme ayrıldı. Birinci bölümde resveratrolün analitik yöntemine ait bulgular verildi. İkinci bölümde formülasyon geliştirmeye ait çalışmaların sonuçları verildi. Üçüncü bölümde Resveratrol içeren mikroemülsiyon formülasyonlarının *in vitro* ve *ex vivo* salım çalışmalarına ait sonuçlar verildi.

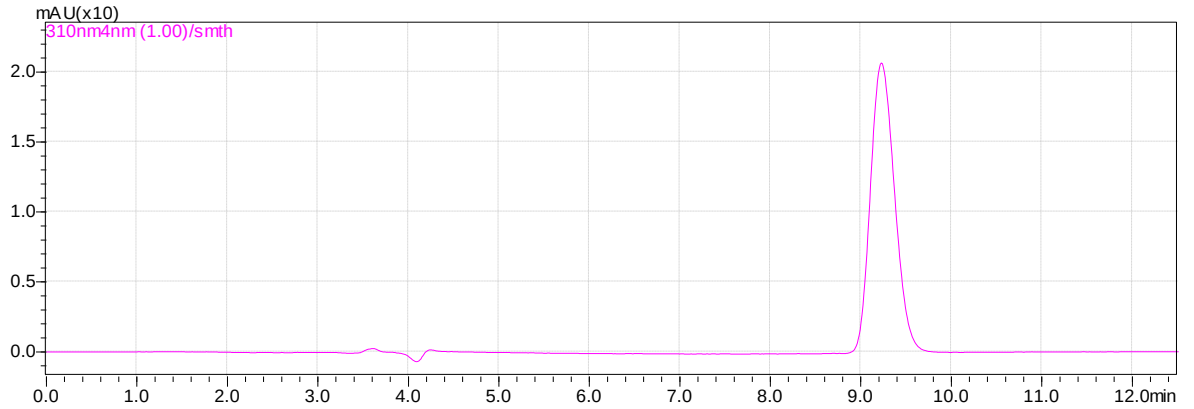
4.1. Etkin Maddenin Miktar Tayini ve Validasyonu

4.1.1. Resveratrolün Miktar Tayini

Bölüm 3.2.1’de belirtilen kromatografik koşullar kullanılarak geliştirilen resveratrol HPLC analiz yöntemine ait kalibrasyon doğrusu ve denklemi Şekil 4-1’de verilmiştir. Bu yöntem ile gözlenen piklere ait kromatogram ise Şekil 4-2’de verildi. Alıkonma zamanı Resveratrol için 9,2 dak. olarak kaydedildi.



Şekil 4-1: Kalibrasyon doğrusu ve denklemi (n=3)



Şekil 4-2: RES analiz kromotogramı

4.1.2. Resveratrol Analiz Yönteminin Validasyonuna Ait Bulgular

4.1.2.1. Doğrusallık (Linearity) ve Aralık (Range)

Doğrusallık için Bölüm 3.2.2’de anlatıldığı şekilde işlemler gerçekleştirildi. Kalibrasyon doğruları maddelerin konsantrasyonlarına karşı pik alanları temel alınarak çizildi. Resveratrol için determinasyon katsayısı (R^2) 0,9999 olarak hesaplandı. Kalibrasyon doğrusu Şekil 4-1’de gösterildi.

4.1.2.2. Doğruluk

Doğruluk ölçütü hesaplanırken çalışma konsantrasyonunun %10, %100 ve %600’sine denk gelen çözeltiler hazırlanarak, optimize edilen yöntem ile analiz edildiğindeki geri kazanım yüzdeleri saptandı. Etkin maddenin geri kazanım yüzdesi %98 - 102 arasında bulundu. Elde edilen sonuçlar Tablo 4-1’de verildi.

Tablo 4-1: RES için doğruluk sonuçları

RES						
No	0,5 µg/ml	% geri elde etme	5 µg/ml	% geri elde etme	30 µg/ml	% geri elde etme
1	0,494	98,8000	4,940	98,8000	29,660	98,8667
2	0,496	99,2000	5,100	102	29,610	98,7000
3	0,490	98,0000	4,982	99,6400	29,730	99,1000
Ort.	0,4933	98,6667	5,055	100,1467	29,6667	98,8889
SS	0,0031	0,6110	0,0830	1,6591	0,0603	0,2009
%VK	0,6193	0,6193	1,6575	1,6566	0,2032	0,2032

4.1.2.3. Kesinlik

Uygulanan HPLC yöntemin kesinliğini değerlendirmek için tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik parametreleri incelendi.

Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik ölçütü hesaplamak için %100 konsantrasyondaki çalışma çözeltisi 10 kez art arda enjeksiyon edildi. Analiz sonuçlarına göre %VK değerleri 1'den küçük bulundu. Sonuçlar Tablo 4-2'de verilmektedir:

Tablo 4-2: RES'in tekrarlanabilirlik sonuçları

No	RES 5 µg/ml
1	4,755
2	4,749
3	4,753
4	4,765
5	4,773
6	4,767
7	4,788
8	4,788
9	4,801
10	4,806
Ort	4,775
SS	0,02028
VK%	0,4247

Ara Kesinlik (Intermediate Precision)

HPLC yöntemin ara kesinliğini tespit etmek için üç farklı günde çalışma konsantrasyonun %10 ve %600'üne denk gelen çözeltiler analiz edildi. Sonuçlar Tablo 4-3'te verilmektedir:

Tablo 4-3: RES için ara kesinlik sonuçları

Konsantrasyon	RES	
	0,5 µg/ml	30 µg/ml
1. Gün	0,494	29,660
	0,496	29,610
	0,490	29,730
	0,488	29,298
2. Gün	0,486	28,933
	0,487	29,227
	0,489	28,574
	0,479	28,773
3. Gün	0,467	28,420
	0,482666667	28,87083333
	0,008685876	0,35046336
	1,799559975	1,213901088
Ort		
SS		
%VK		

4.1.2.4. Sistem Uygunluğu (System Suitability)

%100 konsantrasyondaki çalışma çözeltisi HPLC sisteminde 6 kez art arda enjeksiyon edildi. İşlem sonunda gözlenen piklerin alanı, alıkonma zamanı, kuyruklanma faktörü, plaka sayısı ve resolüsyon değeri Tablo 4-4’de verildi.

Tablo 4-4: Analiz yöntemine ait sistem uygunluk parametreleri

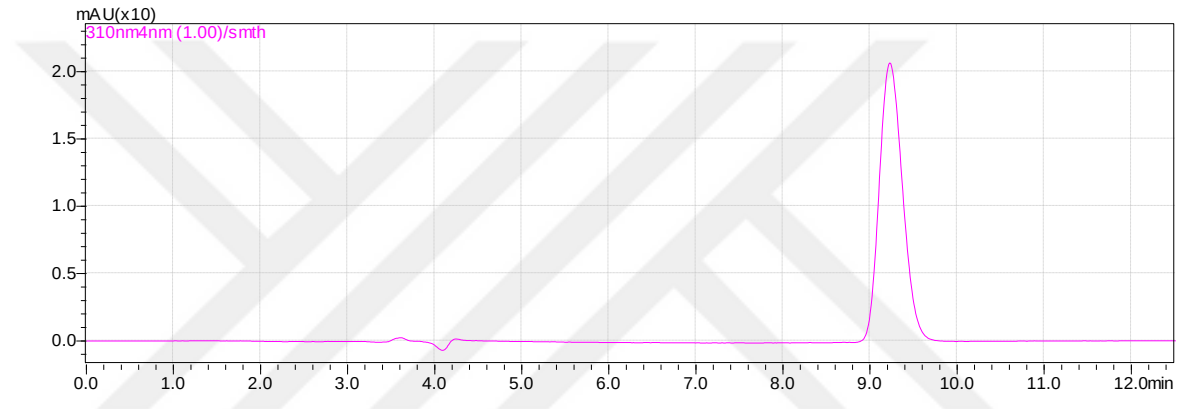
	RES				
	tR	A	T	N	Rs
1	9,295	386696,000	1,208	5493,960	9,736
2	9,285	386996,000	1,205	5449,008	9,598
3	9,216	386894,000	1,205	5502,707	9,568
4	9,174	388020,000	1,202	5456,854	9,676
5	9,254	388185,000	1,202	5463,324	9,671
6	9,124	386738,000	1,209	5435,830	9,689
Ort	9,224666667	387254,8333	1,205166667	5466,947167	9,656333333
SS	0,066668333	667,4274243	0,002926887	26,12871967	0,062002151
%VK	0,722718075	0,172348378	0,242861584	0,477939861	0,642087927

(tR: alıkonma zamanı; A: pik alanı; T: kuyruklanma faktörü; N: plaka sayısı; Rs: resolüsyon)

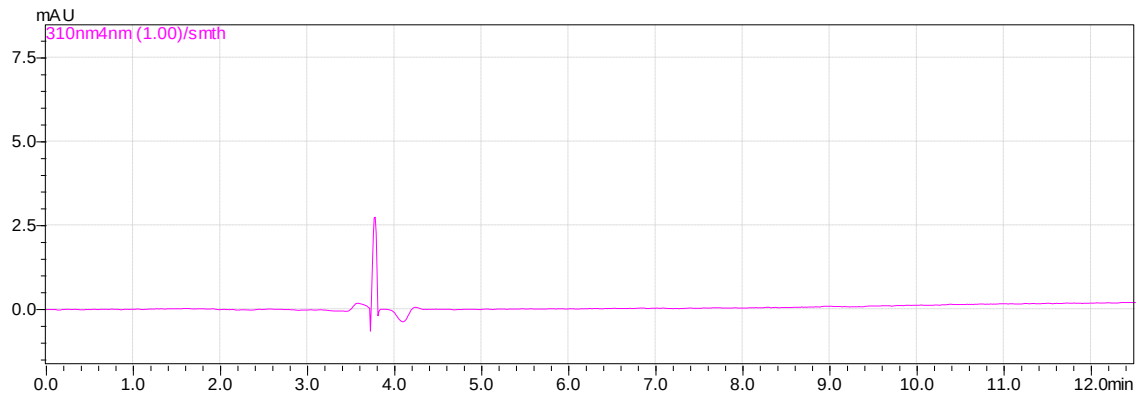
Analiz sonuçlarına pik alanlarının %VK değeri 2'den küçük, kuyruklanma faktörü 1,5'ten küçük, teorik plaka sayısının 3000'den büyük ve resolüsyon değeri 3'ten büyük olduğu ve spesifikasyonların karşılandığı görülmektedir.

4.1.2.5. Seçicilik (Specificity)

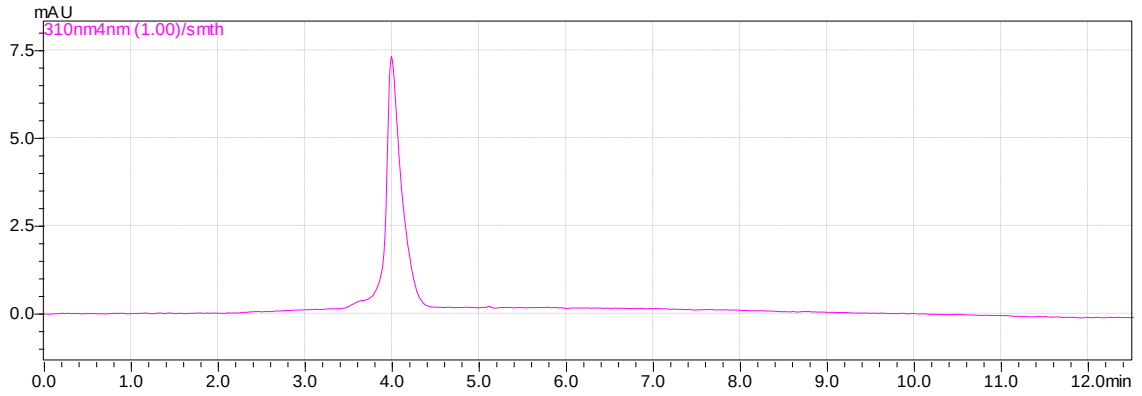
HPLC sistemine seyreltme çözeltisi olan metanol ve mobil fazı oluşturan metanol ve asetik asit enjekte edildiğinde resveratrol pikinin elde edildiği sürede herhangi pik gözlenmedi Şekil 4-3'de %100 konsantrasyondaki çalışma çözeltisinin analizine ait kromatogram görülmektedir. Şekil 4-4 ve 4-5'de ise mobil fazı oluşturan çözücülere ait pikler görülmektedir.



Şekil 4-3: Optimize edilen yöntemde gözlenen resveratrol piki



Şekil 4-4: Metanol enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram



Şekil 4-5: Asetik asit enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram

4.1.2.6. Dayanıklılık (Stability)

Dayanıklılık ölçümü için etkin madde içeren çözeltiler oda sıcaklığında 72 saat boyunca bekletilerek 24 saatte bir alınan örnekler incelendi. Analiz süresi boyunca etkin maddelerin çözelti içerisindeki dayanıklı olduğu gözlemlendi. Sonuçlar Tablo 4-5'te verilmektedir:

Tablo 4-5: RES çözeltisinin oda sıcaklığındaki dayanıklılık sonuçları

	Başlangıç (µg/ml)	24.saat (µg/ml)	48.saat (µg/ml)	72.saat (µg/ml)	ORT	SS	VK (%)
30 µg/ml	29,66	29,298	28,574	28,77	29,0755	0,4953	1,7035
0,5 µg/ml	0,494	0,488	0,489	0,479	0,4875	0,0066	1,281

4.2. Çözünürlük Çalışması

Resveratrolün Zeytinyağı ve Tween 80 içerisindeki çözünürlüğünü tespit etmek için bölüm 3.2.3'te anlatıldığı şekilde çözünürlük çalışması yapıldı. Tablo 4-6'te elde edilen çözünürlük verileri verilmiştir.

Tablo 4-6: Resveratrolün yağ fazı ve YEM içerisindeki çözünürlüğü (n=3)

Faz türü	Yardımcı madde	Çözünürlük (mg/ml)
Yağ fazı	Zeytinyağı	30,45 ± 0,03
YEM	Tween 80	0,15 ± 0,0004

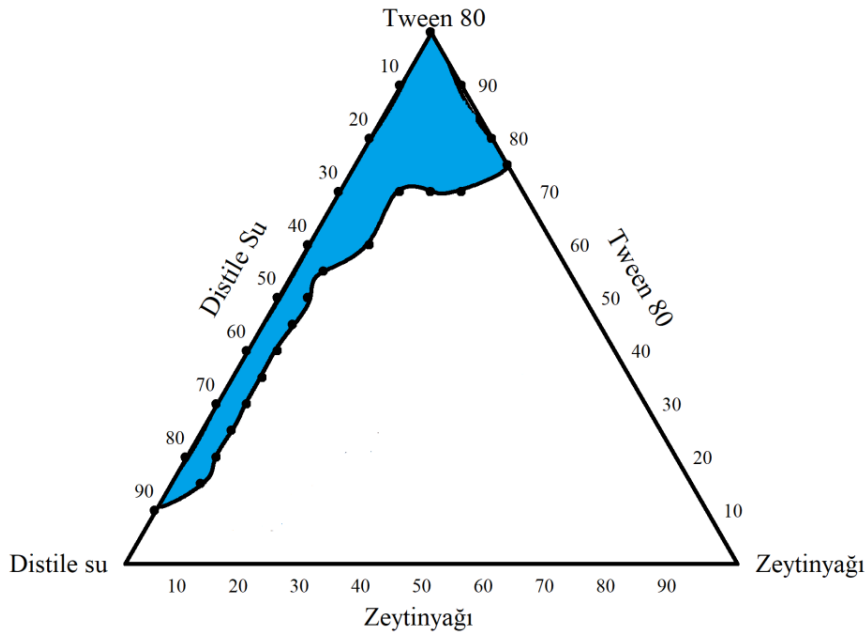
4.3. Ön Formülasyon Çalışmaları

Yağ, yüzey etkin madde ve su fazının farklı oranlardaki karışımları ile ön formülasyon çalışmaları yapıldı. Su fazı oranının yüksek olduğu formülasyonlar ile denemeler yapılarak su içinde yağ mikroemülsiyonları ve makroemülsiyonları geliştirildi. Su fazı oranının yüksek olduğu formülasyonlar damlacık boyutu ve polidispersite indeksi açısından değerlendirildi.

Bu doktora tez çalışmasında laboratuvarında mevcut olan zeytinyağı ve Tween 80 sırasıyla yağ fazı ve YEM olarak kullanıldı.

4.4. Formülasyonlarının Hazırlanması ve Üçgen Faz Diyagramlarının Oluşturulması

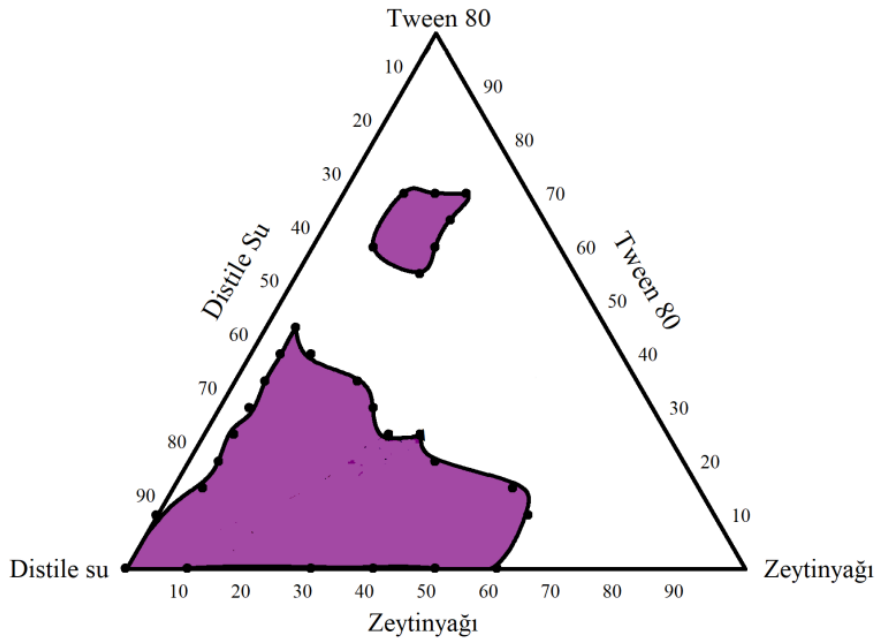
Bölüm 3.2.5.3’de anlatıldığı gibi üçgen faz diyagramı ile mikroemülsiyon oluşan alanlar belirlendi. Üçgen faz diyagramı üzerinde şeffaf görünüme sahip mikromülsiyonların olduğu alan çok dar bir bölgede ile sınırlıdır (Şekil 4-6).



Şekil 4-6: Mikroemülsiyon oluşum alanı

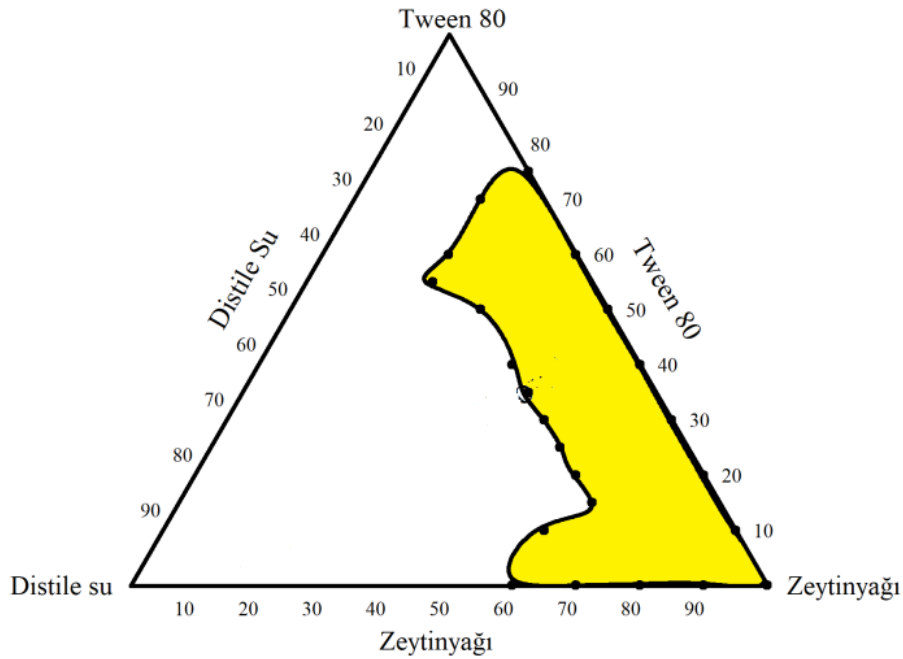
Üçgen faz diyagramı üzerinde yağ fazı ve su fazının düşük oranda, YEM oranının yüksek olduğu bölgede yarı saydam, şeffaf formülasyonlar meydana geldi.

Üçgen faz diyagramında su oranının yüksek olduğu ve YEM düşük olduğu sol bölgelerinde y / s makro emülsiyonu meydana geldiği görüldü (Şekil 4-7).



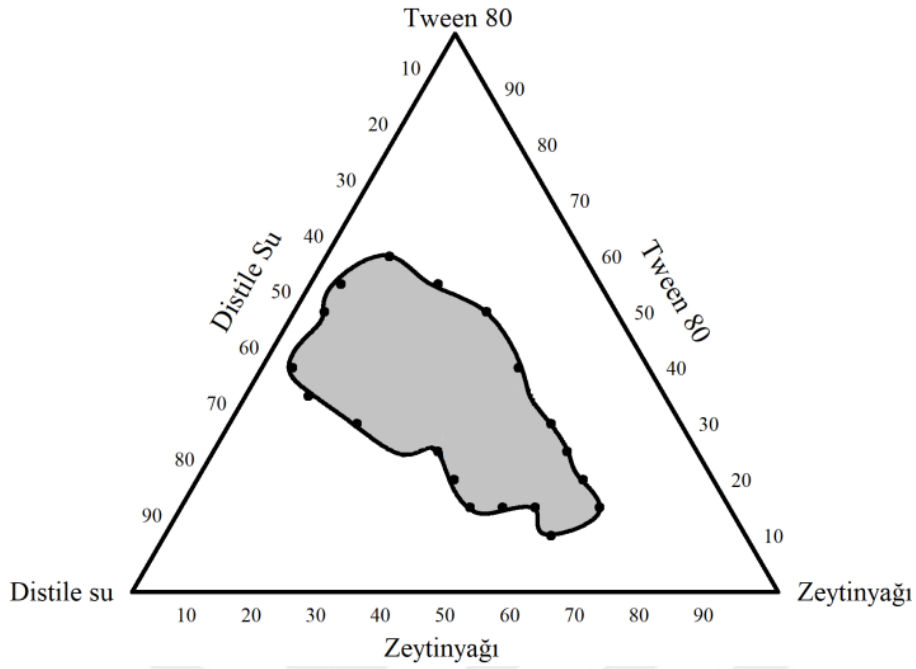
Şekil 4-7: y/s makro emülsiyon alanı

Üçgen faz diyagramının sağ tarafı yağ fazı oranının yüksek olmasından kaynaklı s/y makro emülsiyonların oluştuğu görüldü (Şekil 4-8).

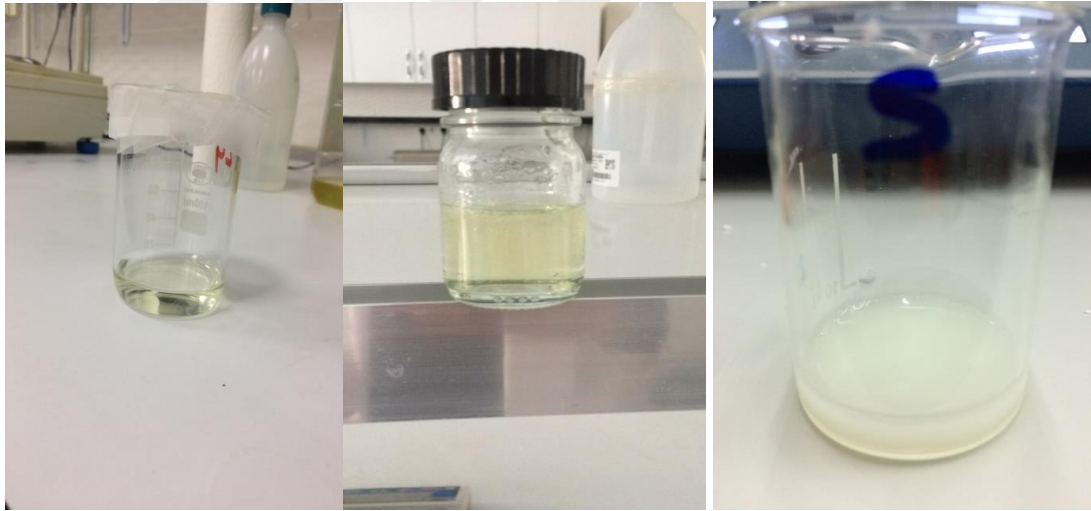


Şekil 4-8: s/y makro emülsiyon alanları

Üçgen faz diyagramının orta taraflarında jel yapısında emülsiyonların oluştuğu görülmektedir (Şekil 4-9).



Şekil 4-9: Jel oluşum alanı



Şekil 4-10: Mikroemülsiyon, makro emülsiyon ve jel formülasyonları olarak değerlendirilen formülasyonların görüntüleri

4.5. Mikroemülsiyon Formülasyonunun Seçimi

Elde edilen üçgen faz diyagramının eğri içerisinde kalan mikroemülsiyon alanından (Şekil 4-6), 18 adet formülasyon seçilerek (Tablo 4-7) Bölüm 3.2.5'te anlatıldığı şekilde formülasyonlar hazırlandı ve 72 saat oda sıcaklığında bekletilip fiziksel görüntülerine göre değerlendirildi.

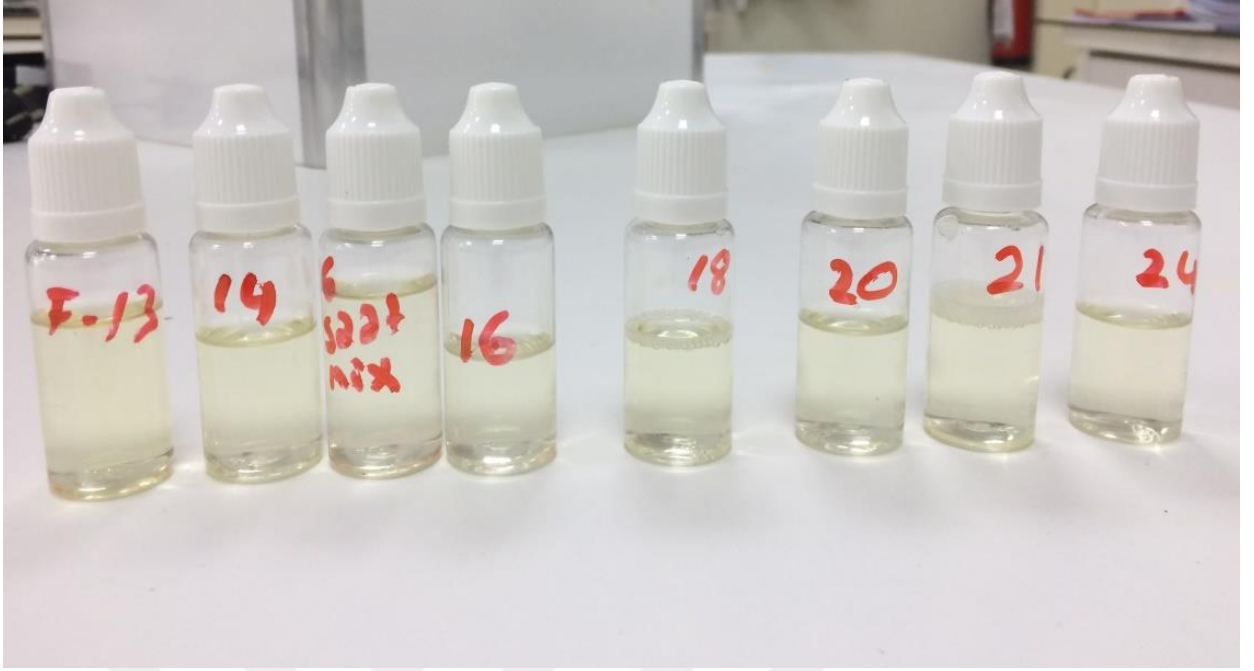
Tablo 4-7: Mikroemülsiyon oluşum alanından seçilen formülasyon oranları ve görsel değerlendirmeleri

Kod	Tween 80 (g)	Zeytinyağı (g)	Distile su (g)	Fiziksel durumu
ME1	16	4	80	Yarı saydam
ME2	18	2	80	Yarı saydam
ME3	20	2	78	Yarı saydam
ME4	20	1,4	78,6	Şeffaf
ME5	20	1,3	78,7	Şeffaf
ME6	23	1,8	75,2	Şeffaf
ME7	20	1,6	78,4	Şeffaf
ME8	20,4	1,6	77,9	Şeffaf
ME9	20,8	1,6	77,6	Şeffaf
ME10	21	1,2	77,8	Şeffaf
ME11	22,6	1,8	75,6	Şeffaf
ME12	24	2	74	Akış iyi değil
ME13	24,2	2,8	73	Akış iyi değil
ME14	28	2	70	Akış iyi değil
ME15	32	2	66	Akış iyi değil
ME16	34	2	64	Akış yok
ME17	36	2	62	Akış yok
ME18	40	2	58	Akış yok

4.6. Seçilen Mikroemülsiyon Formülasyonu Üzerinde Yapılan Çalışmalar

4.6.1. Fiziksel Görünüş Bulguları

Fiziksel görüntülerine göre şeffaf özelliklere sahip olan ME4, ME5, ME6, ME7, ME8, ME9, ME10 ve ME11 kod numaralı formülasyonlar (Şekil 4-11), santrifüj, termodinamik ve thermal stres gibi testlere tabi tutularak dayanıklılıkları incelendi.



Şekil 4-11: Görsel değerlendirme sonucu ön stabilite testleri için seçilen formülasyonlar

4.6.2. Optik İzotropinin Değerlendirilmesi

Bölüm 3.2.8.2’de anlatıldığı şekilde yapılan optik izotropi çalışmalarında polarize ışık mikroskobu görüntülerine göre formülasyonların karanlık görünümde olduğu yani optik açıdan izotropik olduğu görüldü.

4.6.3. Stabilitenin Değerlendirilmesi

4.6.3.1. Santrifüj Testi Bulguları

Bölüm 3.2.12.2 anlatıldığı şekilde seçilen formülasyonlara santrifüj testi yapıldı. Santrifüj testi sonucunda yapılan değerlendirme neticesinde formülasyonlarda faz ayrımının görülmeyeceği tespit edildi.

4.6.3.2. Termodinamik Test Değerlendirilmesi

Termodinamik dayanıkları için test edilen formülasyonlardan ME7 ve M11 kod numaralı formülasyonların fiziksel görünüşlerinin bozulduğu ve hafif bir bulanmanın görüldüğü tespit edildi.

4.6.3.3. Termal Stres Testi

Bölüm 3.2.12.2’te anlatıldığı şekilde termal testine tabi tutulan formülasyonların tümünün zorlayıcı koşullara dayanıklı olduğu görüldü. Formülasyonların 75 °C’ye kadar kenara yapışma, faz ayrışması ve bulanma gibi stabilite sorunu göstermediği

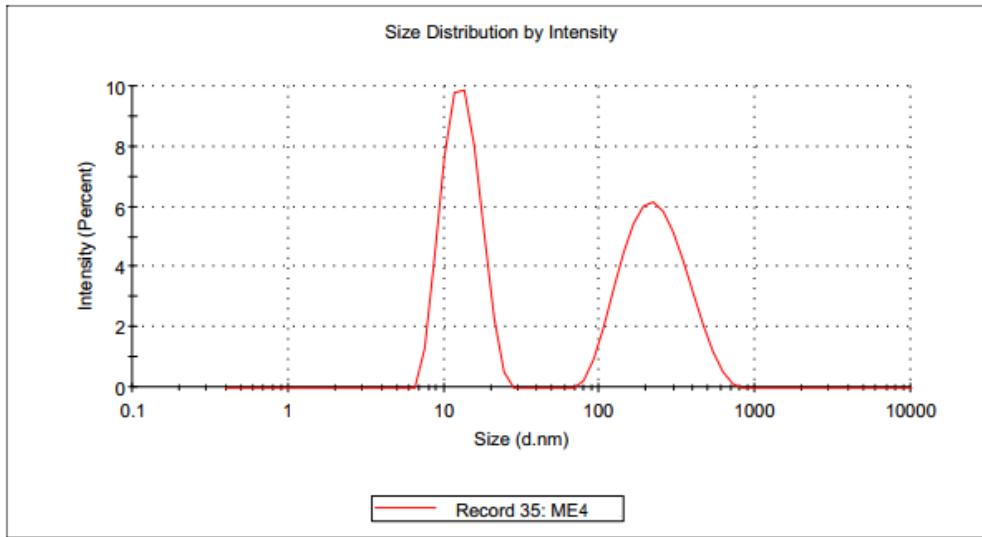
görüldü. Fakat 80 °C’de yarım saat tutulan formülasyonların tümünde bulanmanın başladığı tespit edildi.

4.6.4. Damlacık Boyutu ve Polidispersite İndeksinin Değerlendirilmesi

Hızlandırılmış stabilite test sonuçlarına göre belirlenen ME4, ME5, ME6, ME8, ME9 ve ME10 kod numaralı formülasyonların damlacık boyutları ve polidispersite indeksleri bölüm 3.2.8.4’te anlatıldığı şekilde çalışıldı. Mikroemülsiyonların damlacık boyutu ölçümlerine ait grafikler Şekil 4-12 ve Şekil 4-17 aralığında gösterildi.

Results

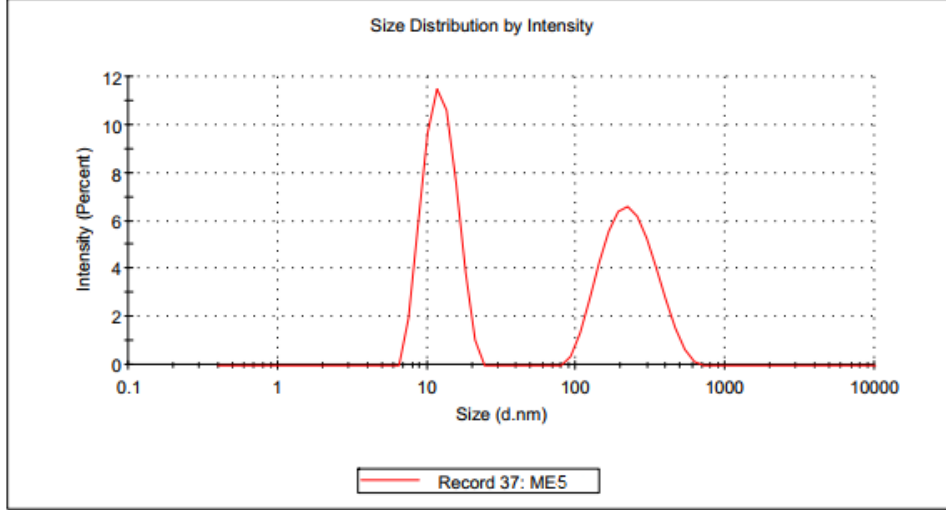
	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 25,42	Peak 1: 245,5	51,1	113,2
Pdl: 0,722	Peak 2: 13,35	48,9	3,528
Intercept: 0,848	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality	Refer to quality report		



Şekil 4-12: ME4 formülasyonun ait damlacık boyutu ve polidispersite indeksi değerleri

Results

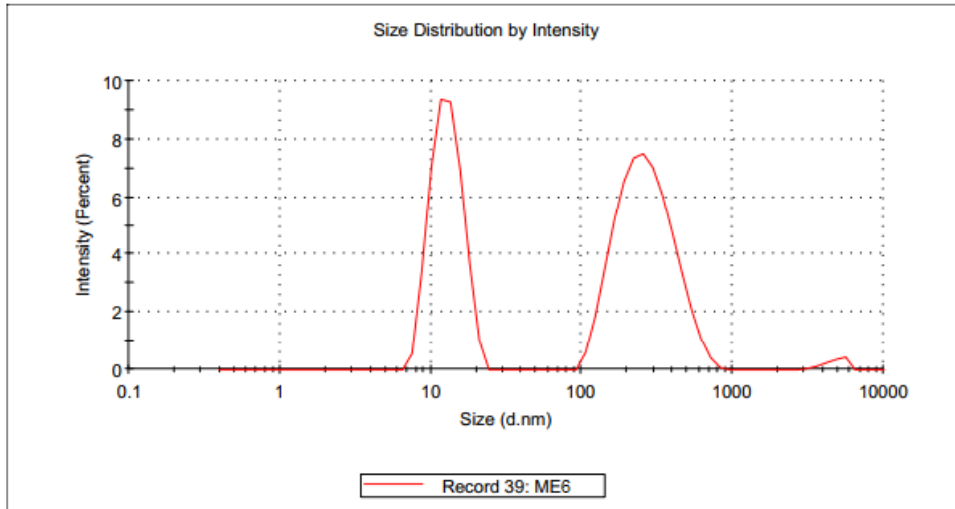
	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 23,28	Peak 1: 12,54	52,0	3,053
Pdl: 0,688	Peak 2: 239,3	48,0	96,04
Intercept: 0,873	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality Good			



Şekil 4-13: ME5 formülasyonun ait damlacık boyutu ve polidispersite indeksi değerleri

Results

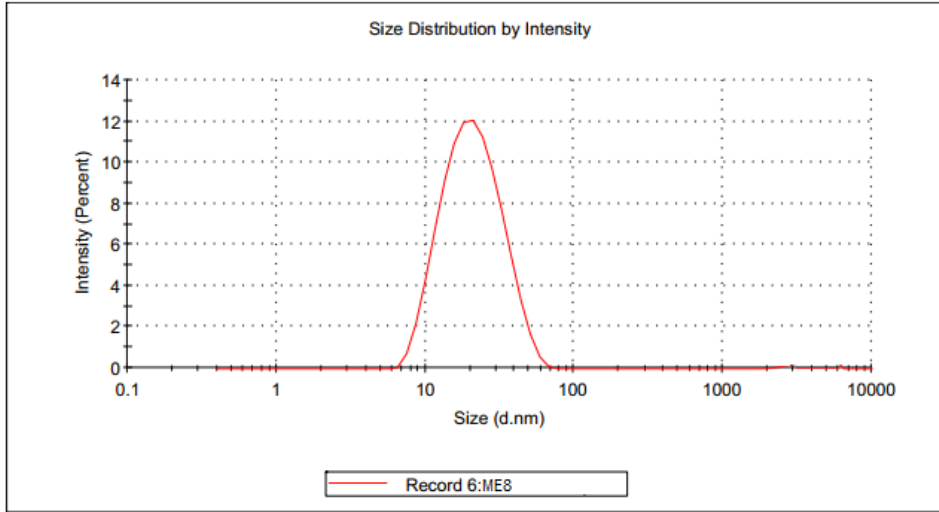
	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 30,48	Peak 1: 281,2	57,6	121,0
Pdl: 0,902	Peak 2: 13,02	41,2	2,999
Intercept: 0,765	Peak 3: 4738	1,2	757,2
Result quality Refer to quality report			



Şekil 4-14: ME6 formülasyonun ait damlacık boyutu ve polidispersite indeksi değerleri

Results

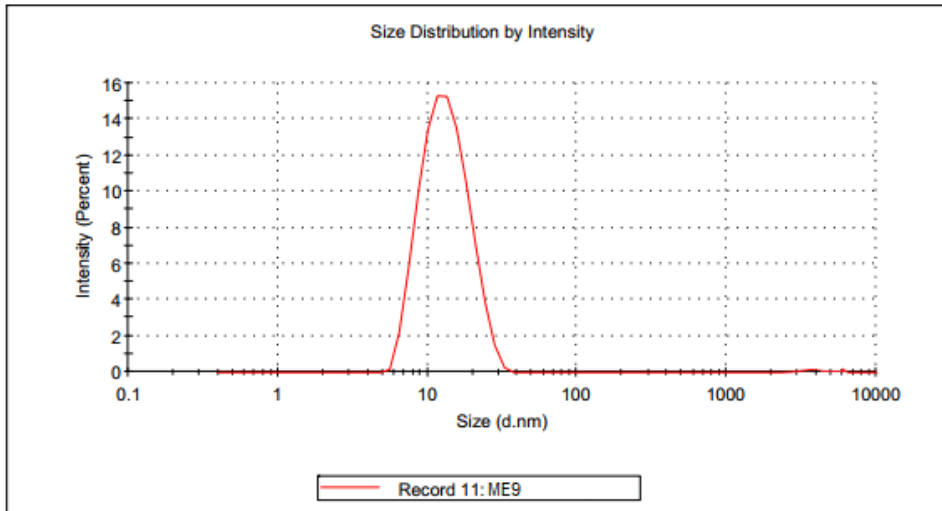
	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 19,22	Peak 1: 22,35	100	9,977
Pdl: 0,200	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,689	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality Good			



Şekil 4-15: ME8 formülasyonun ait damlacık boyutu ve polidispersite indeksi değerleri

Results

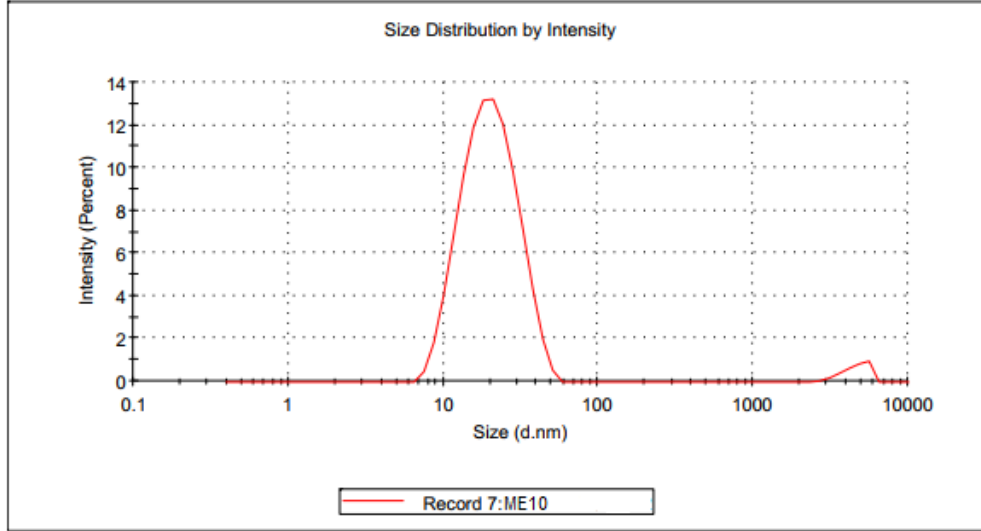
	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 12,42	Peak 1: 13,80	100	4,860
Pdl: 0,145	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,865	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality Good			



Şekil 4-16: ME9 formülasyonun ait damlacık boyutu ve polidispersite indeksi değerleri

Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 19,11	Peak 1: 21,21	96,9	8,371
Pdl: 0,207	Peak 2: 4597	3,1	828,3
Intercept: 0,694	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality Good			



Şekil 4-17: ME10 formülasyonun ait damlacık boyutu ve polidispersite indeksi değerleri

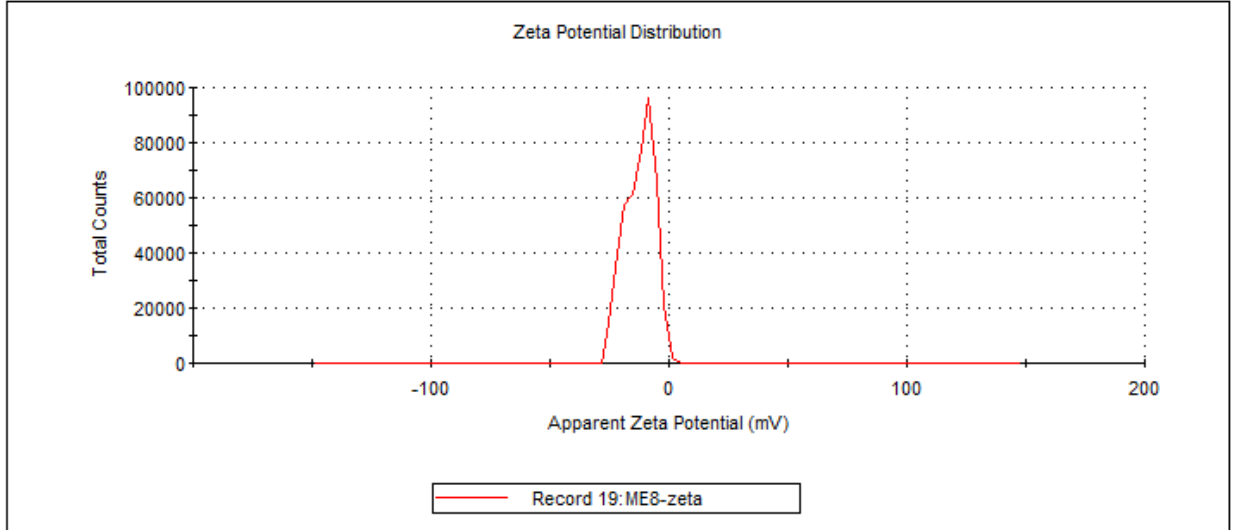
4.7. Mikroemülsiyon Formülasyonuna Resveratrol Yüklenmesi

Damlacık boyutu ve polidispersite indeksi sonuçlarına göre seçilen ME8 ve ME9 kodlu formülasyonlara Bölüm 3.2.7’de belirtildiği şekilde çalışılarak %0,05 oranında resveratrol yüklendi. Etkin maddenin tam olarak çözünmesi ve sistemin dengeye gelmesi için bir süre beklendi. Bu süre sonunda formülasyonlarda herhangi bir faz ayrışması, bulanma veya jelleşme gözlenmedi.

4.7.1. Resveratrol Yüklü Formülasyonların Damlacık Boyutu ve Polidispersite İndeksi

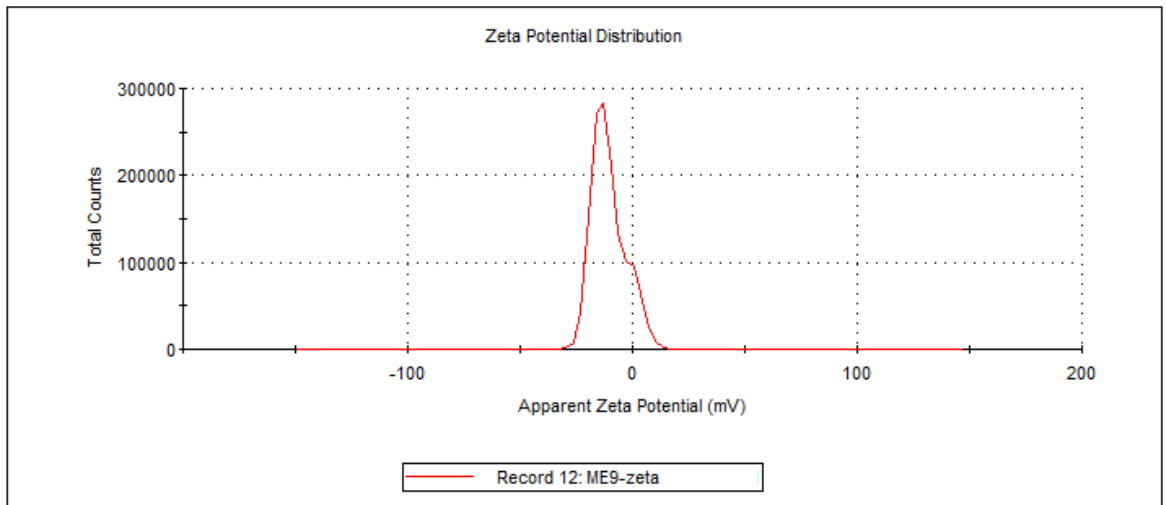
Resveratrol yüklemek için seçilen ME8 ve ME9 kodlu formülasyonların ait zeta potansiyelleri ve etkin madde yüklendikten sonra damlacık boyutları ve polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri Şekil 4-18 ve Şekil 4-23 aralığında gösterildi.

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -12,2	Peak 1: -12,2	100,0	6,08
Zeta Deviation (mV): 6,08	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0251	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality : Good			



Şekil 4-18: ME8 formülasyonuna ait zeta potansiyeli değeri

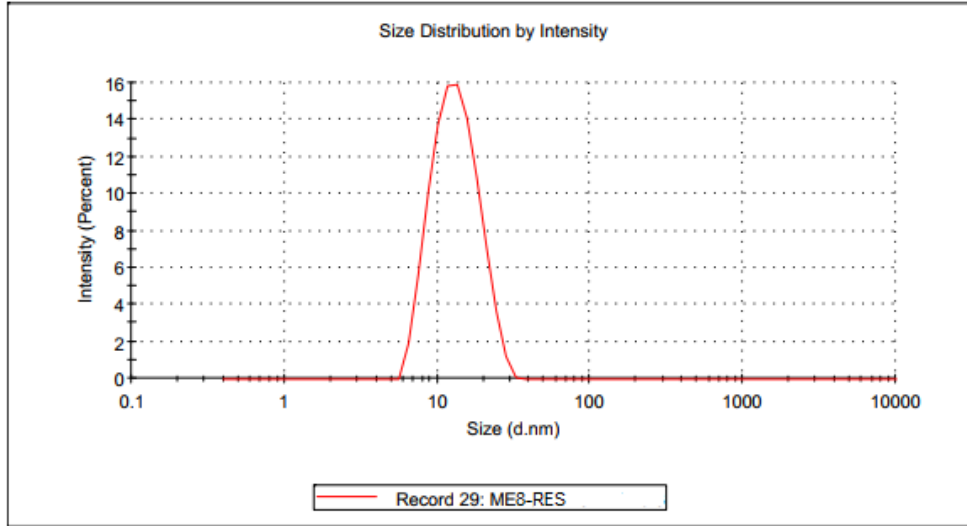
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -10,6	Peak 1: -10,6	100,0	7,45
Zeta Deviation (mV): 7,45	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00965	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality : Good			



Şekil 4-19: ME9 formülasyonuna ait zeta potansiyeli değeri

Results

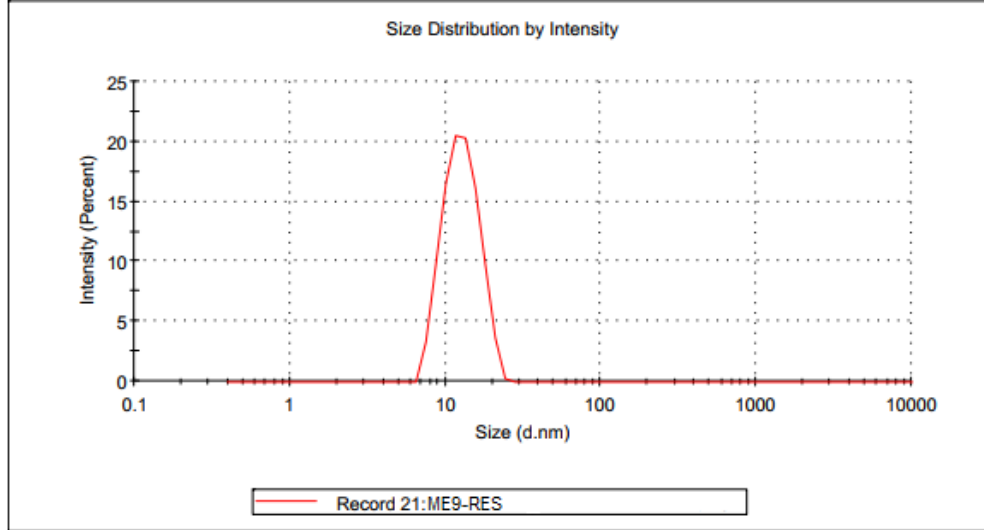
	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 12,34	Peak 1: 13,76	100,0	4,656
Pdl: 0,103	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,898	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality Good			



Şekil 4-20: ME8-RES formülasyonuna ait damlacık boyutu ve polidispersite indeksi değerleri

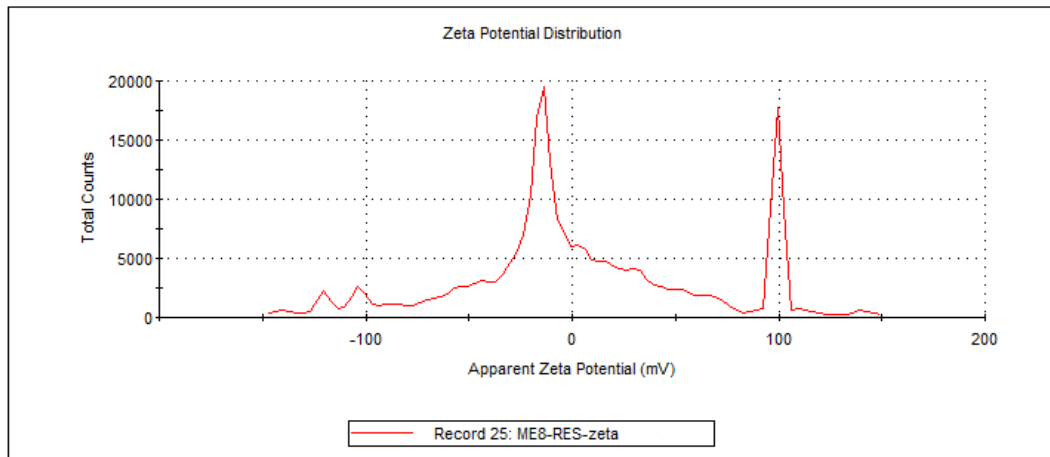
Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 12,27	Peak 1: 13,02	100,0	3,322
Pdl: 0,046	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,889	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality Good			

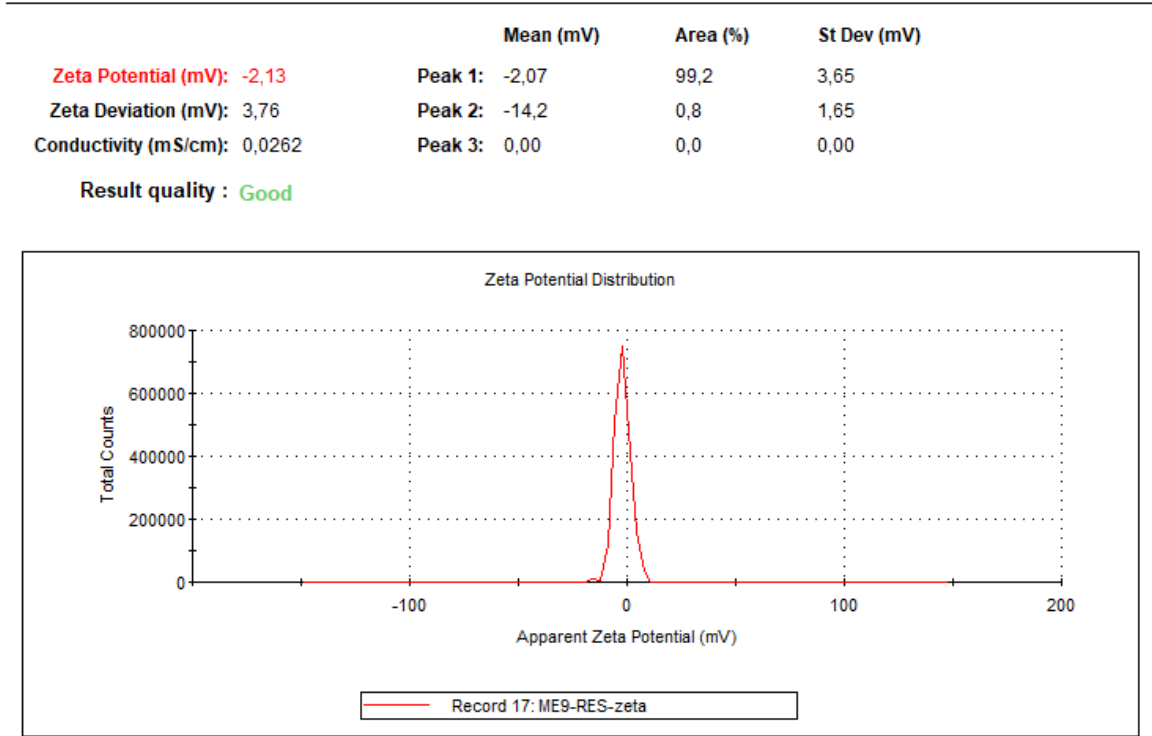


Şekil 4-21: ME9-RES formülasyonuna ait damlacık boyutu ve polidispersite indeksi değerleri

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -1,31	Peak 1: -16,0	36,2	8,95
Zeta Deviation (mV): 71,3	Peak 2: 11,6	15,4	8,56
Conductivity (mS/cm): 0,0155	Peak 3: 46,7	14,1	15,6
Result quality : See result quality report			



Şekil 4-22: ME8-RES formülasyonuna ait zeta potansiyeli değeri



Şekil 4-23: ME9-RES formülasyonuna ait zeta potansiyeli değeri

4.7.2. Reolojik Özelliklerin Değerlendirilmesi

Damlacık boyutu ve polidispersite indeksi değerlerine göre seçilen ME8 ve ME9 kodlu formülasyonların akış özellikleri yöntem 3.2.8.5.'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Belirlenen hızlarda yapılan reolojik incelemede mikroemülsiyonlara ait akış parametreler ve değerleri sırasıyla Tablo 4-8'de - Tablo 4-11'de gösterilmiştir. Her bir formülasyona ait Şekil 4-24 ve Şekil 4-27 aralığında gösterilen akış diyagramlarına göre tüm formülasyonlar kayma gerilimi ve kayma oranının orantılı olduğundan newtonian akışa çok yakın non-newtonian akış göstermiştir.

Tablo 4-8: ME8 formülasyonuna ait reolojik değerler

Hız (rpm)	Kayma gerilimi (dyn/cm ²)	Kayma oranı (1/sn)	Sıcaklık (°C)	Viskozite (cP)
70	62,29	525,000	22,8	11,87
75	66,22	562,500	22,8	11,77
80	70,63	600,000	22,9	11,77
85	74,07	637,500	22,9	11,62
90	77,99	675,000	22,9	11,55
95	82,40	712,500	23	11,57

100	88,78	750,000	23	11,84
105	94,18	787,500	23	11,96
110	98,10	825,000	23	11,89
115	102,5	862,500	23	11,89

Tablo 4-9: ME9-RES formülasyonuna ait reolojik değerler

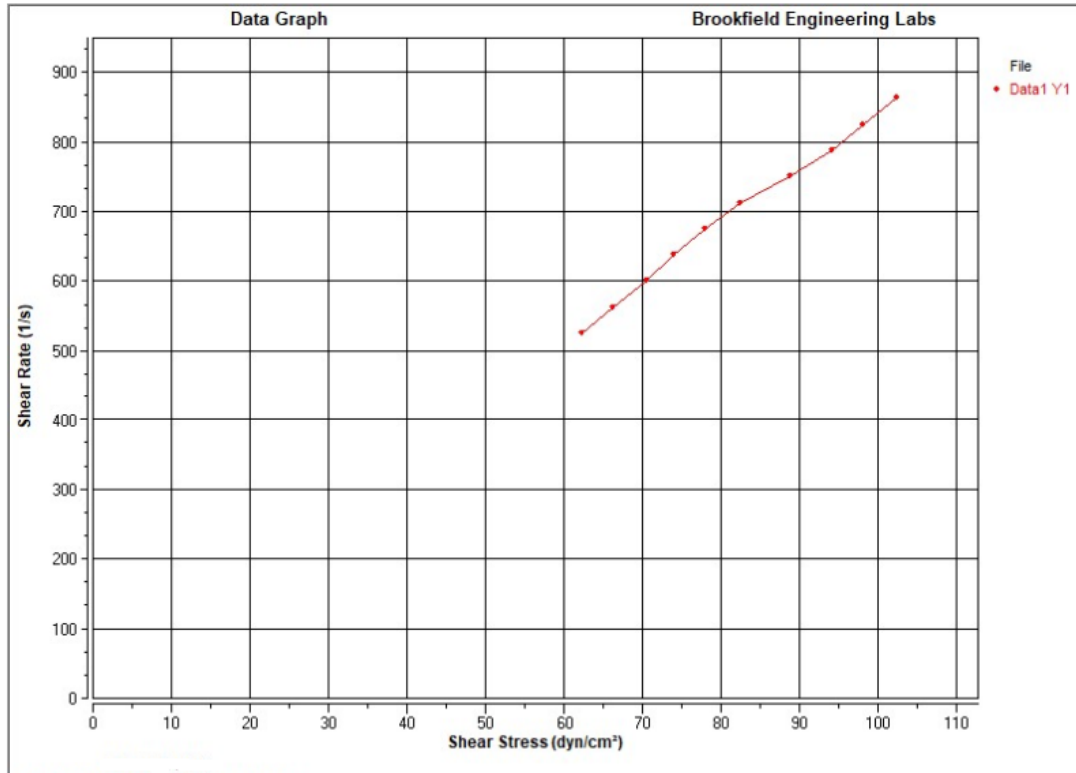
Hız (rpm)	Kayma gerilimi (dyn/cm ²)	Kayma (1/sn)	oranı	Sıcaklık (°C)	Viskozite (cP)
70	75,05	525,000	22,7		14,29
75	81,91	562,500	22,8		14,56
80	91,72	600,000	22,9		15,29
85	104,5	637,500	22,9		16,39
90	114,3	675,000	23		16,93
95	124,1	712,500	23		17,42
100	131,0	750,000	23,1		17,46
105	137,8	787,500	23,1		17,50
110	142,7	825,000	23,1		17,30
115	145,2	862,500	23,2		16,83

Tablo 4-10: ME8-RES formülasyonuna ait reolojik değerler

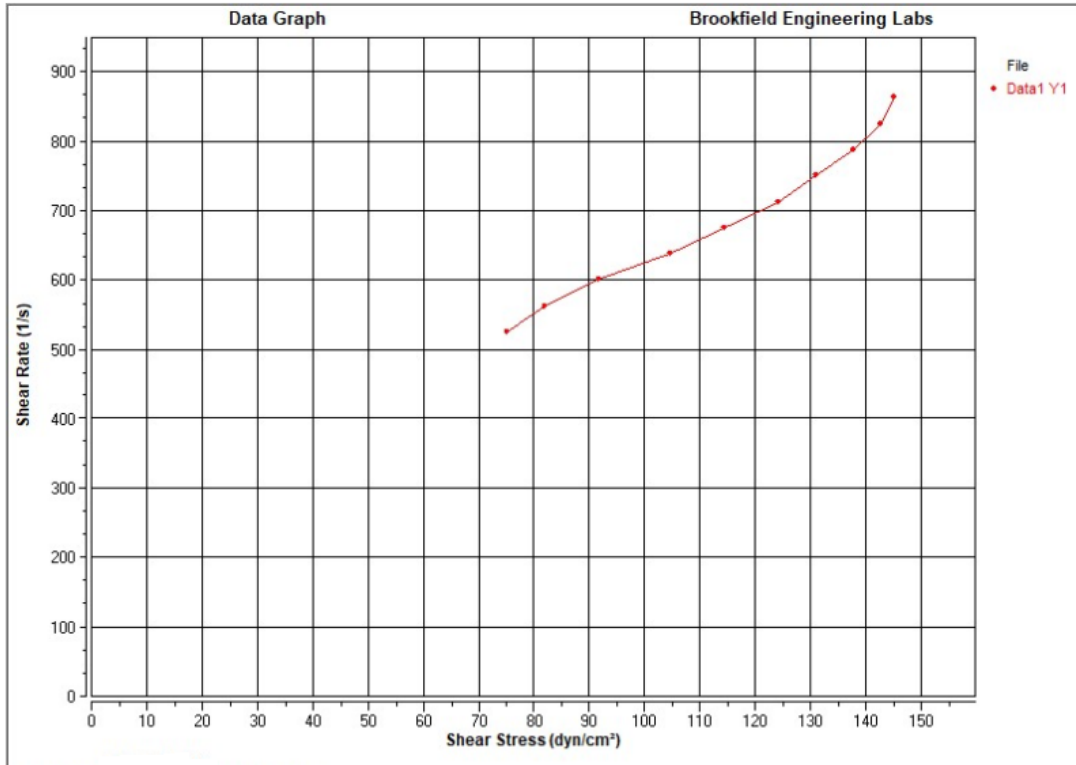
Hız (rpm)	Kayma gerilimi (dyn/cm ²)	Kayma (1/sn)	oranı	Sıcaklık (°C)	Viskozite (cP)
70	82,40	525,000	21,1		15,70
75	86,33	562,500	21,1		15,35
80	91,23	600,000	21,1		15,21
85	96,14	637,500	21,1		15,08
90	101,50	675,000	21,1		15,04
95	107,90	712,500	21,1		15,15
100	112,30	750,000	21,1		14,98
105	117,70	787,500	21,1		14,95
110	122,60	825,000	21,1		14,86
115	128	862,500	21,1		14,84

Tablo 4-11: ME9 formülasyonuna ait reolojik değerler

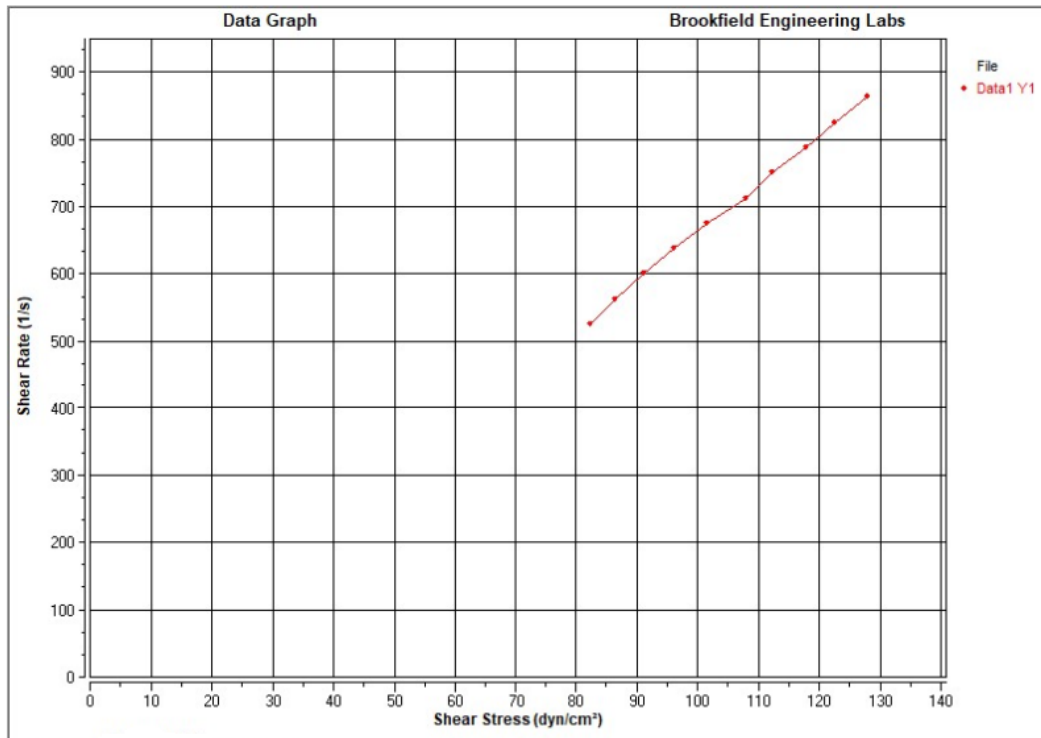
Hız (rpm)	Kayma gerilimi (dyn/cm ²)	Kayma oranı (1/sn)	Sıcaklık (°C)	Viskozite (cP)
70	62,29	525,000	22,8	11,87
75	68,67	562,500	22,8	12,21
80	73,57	600,000	22,8	12,26
85	77,99	637,500	22,8	12,23
90	81,91	675,000	22,8	12,14
95	85,84	712,500	22,8	12,05
100	91,23	750,000	22,8	12,16
105	94,67	787,500	22,8	12,02
110	98,59	825,000	22,8	11,95
115	102	862,500	22,8	11,83



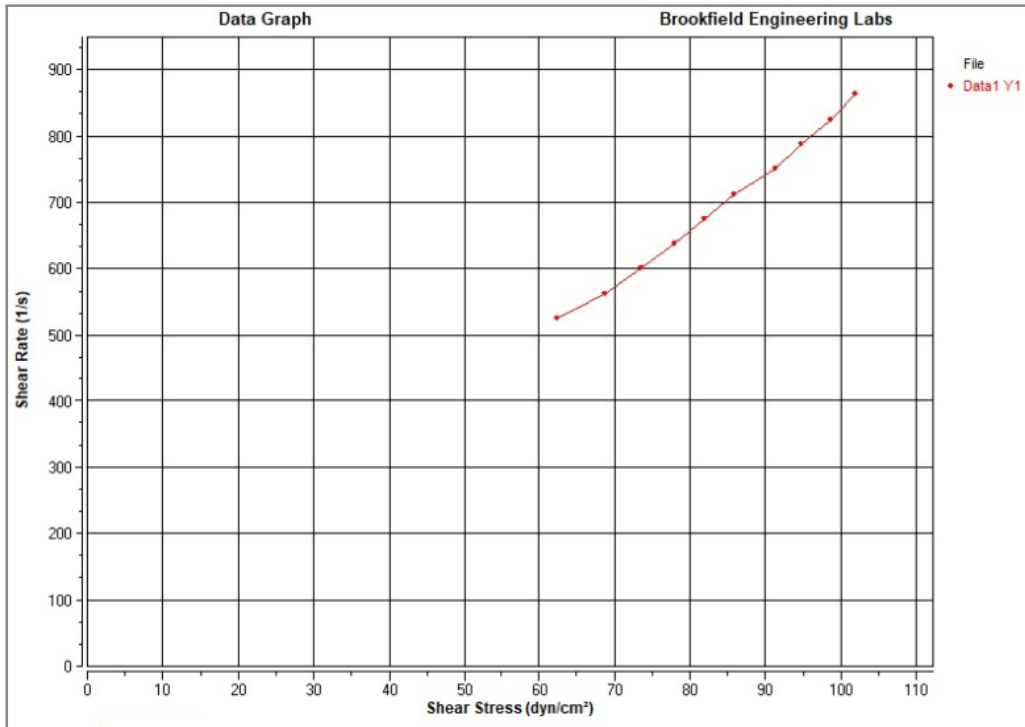
Şekil 4-24: ME8 formülasyonuna ait akış diyagramı



Şekil 4-25: ME8-RES formülasyonuna ait akış diyagramı



Şekil 4-26: ME9 formülasyonuna ait akış diyagramı



Şekil 4-27: ME9-RES formülasyonuna ait akış diyagramı

4.7.3. pH'ın Değerlendirilmesi

Bölüm 3.2.8.6'te de anlatıldığı şekilde hem resveratrol içeren hem de resveratrol içermeyen formülasyonların pH ölçümlerinde elde edilen değerler Tablo 4-12'de gösterilmiştir.

Tablo 4-12: Mikroemülsiyon formülasyonlarına ait pH ölçümleri

Formülasyon	pH	Sıcaklık (°C)
ME8	6,36 ± 0,03	22,3
ME8-RES	6,30 ± 0,17	22,3
ME9	6,28 ± 0,01	22,3
ME9-RES	6,22 ± 0,007	22,3

4.7.4. İletkenliğin Değerlendirilmesi

Bölüm 3.2.8.7'te belirtildiği şekilde resveratrol içeren ve resveratrol içermeyen formülasyonların iletkenlik değerleri ölçüldü. İletkenlik değerleri Tablo 4-13'de gösterilmiştir.

Tablo 4-13: Mikroemülsiyon formülasyonlarına ait iletkenlik bulguları

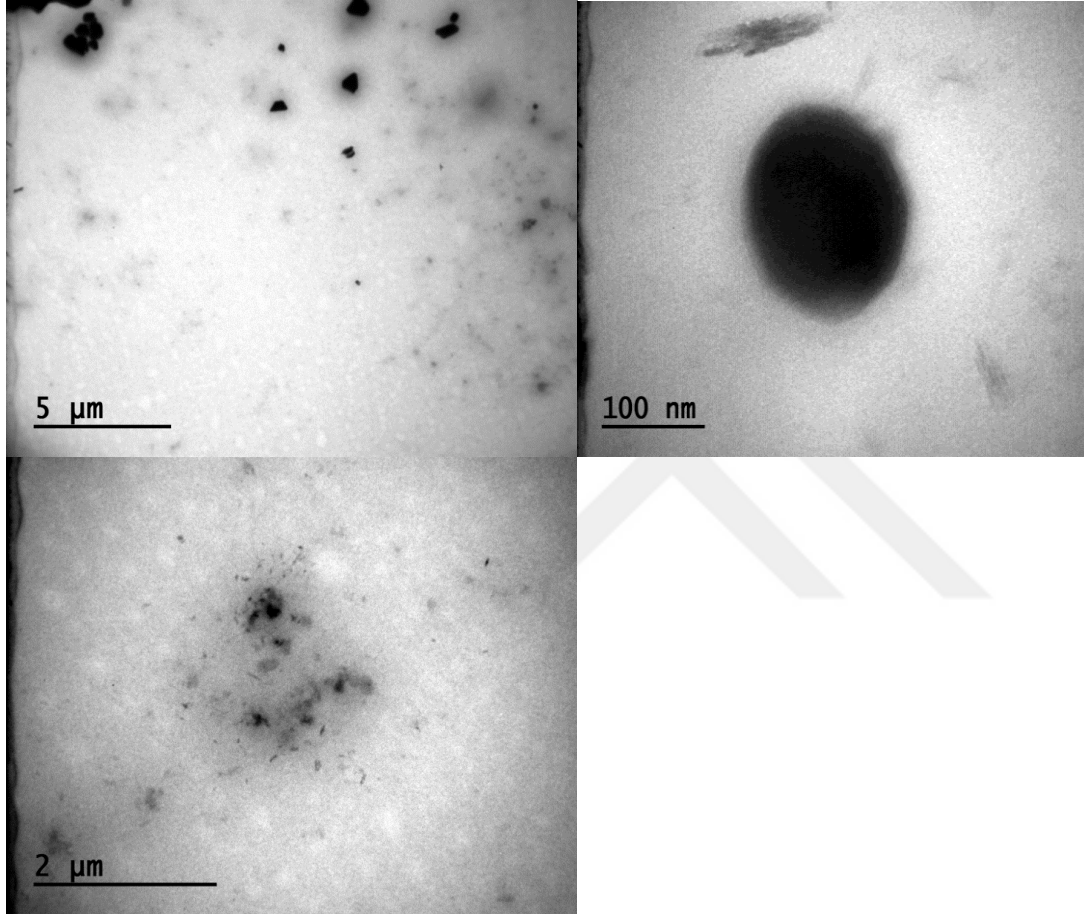
Formülasyon	İletkenlik (μS)	Sıcaklık (°C)
ME8	127,7 ± 0,10	25,9

ME8-RES	123,4 ± 0,05	25,6
ME9	124,3 ± 0,08	26
ME9-RES	122,8 ± 0,06	25,7

4.7.5. Mikroemülsiyon Formülasyonlarının TEM Görüntüleri

Formülasyonların TEM çalışması bölüm 3.2.8.8’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi.

Elde edilen görüntüler Şekil 4-28’de gösterilmiştir.



Şekil 4-28: ME9 formülasyonuna ait TEM görüntüleri

4.8. Makroemülsiyon Formülasyonlarının Seçimi

Elde edilen üçgen faz diyagramının eğri içerisinde kalan makroemülsiyon alanından (Şekil 4-7), su içeriği oranın yüksek olduğu 24 adet formülasyon seçilerek (Tablo 4-14) Bölüm 3.2.9.1’de anlatıldığı şekilde formülasyonlar hazırlandı ve 72 saat oda sıcaklığında bekletilip fiziksel görüntülerine göre değerlendirildi.

Tablo 4-14: Üçgen faz diyagramında makroemülsiyon oluşum alanından seçilen formülasyon oranları ve görsel değerlendirmeleri

Kod	Tween 80 (g)	Zeytinyağı (g)	Distile su (g)	Fiziksel
-----	--------------	----------------	----------------	----------

				durumu
E1	35	10	55	Kıvamlı
E2	30	20	50	Kıvamlı
E3	20	20	60	İyi
E4	20	30	50	Faz ayrımı
E5	15	20	65	Faz ayrımı
E6	15	15	70	Faz ayrımı
E7	15	10	75	İyi
E8	5	10	85	Faz ayrımı
E9	10	20	70	İyi
E10	25	6	69	Faz ayrımı
E11	30	6	64	Kıvamlı
E12	27	6	67	İyi
E13	26	6	68	İyi
E14	22	6	72	İyi
E15	28	10	62	Faz ayrımı
E16	30	8	62	Kıvamlı
E17	28	8	64	İyi
E18	27	7	66	İyi
E19	29	8	63	İyi
E20	27	10	63	Faz ayrımı
E21	28	7	65	İyi
E22	28,5	8	63,5	İyi
E23	29	7	64	İyi
E24	28,5	7	64,5	İyi

4.9. Seçilen Makroemülsiyon Formülasyonları Üzerinde Yapılan Çalışmalar

4.9.1. Fiziksel Görünüş Bulguları

Fiziksel görüntülerine göre homojen görünüme sahip, faz ayrımı gözükmeyen özelliklere sahip olan E3, E7, E9, E12, E13, E14, E17, E18, E19, E21, E22, E23, E24 kod numaralı formülasyonlar, santrifüj, termodinamik ve thermal stres gibi ön stabilite testlere tabi tutularak dayanıklılıkları incelendi.

4.9.2. Stabilitenin Değerlendirilmesi

4.9.2.1. Santrifüj Testi Bulguları

Bölüm 3.2.12.2.'de anlatıldığı şekilde seçilen formülasyonlara santrifüj testi yapıldı. Santrifüj testi sonucunda yapılan değerlendirme neticesinde E9, E12, E13 kodlu formülasyonlarda faz ayrımının görüldüğü tespit edildi.

4.9.2.2. Termodinamik Test Bulguları

Bölüm 3.2.12.2'de anlatıldığı şekilde E3, E7, E14, E17, E18, E19, E21, E22, E23, E24 kodlu formülasyonlar termodinamik testine tabi tutuldu. Test sonucunda E3, E14 kodlu formülasyonlarda homojen görüntüde bozulma tespit edildi.

4.9.2.3. Termal Stres Testi Bulguları

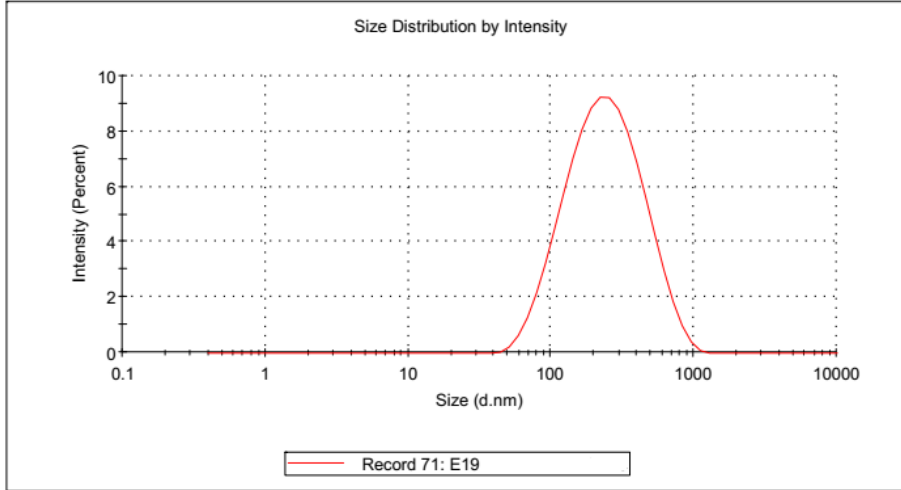
Bölüm 3.2.12.2.'de anlatıldığı şekilde termal testine tabi tutulan formülasyonlardan E19, E21, E23 ve E24 zorlayıcı koşullara dayanabildiği görüldü. Formülasyonların 50°C'ye kadar faz ayrışması gibi stabilite sorunu göstermediği görüldü. Fakat 50 °C'de yarım saat tutulan formülasyonların tümünde kısmi faz ayrışmasının başladığı tespit edildi. Sonraki aşamalar için bu dört formülasyon üzerinden devam edildi.

4.9.3. Damlacık Boyutu ve Polidispersite İndeksin Değerlendirilmesi

Hızlandırılmış stabilite test sonuçlarına göre belirlenen E19, E21, E23, E24 kod numaralı formülasyonların damlacık boyutları ve polidispersite indeksleri Bölüm 3.2.12.3'de anlatıldığı şekilde çalışıldı. Makroemülsiyonların damlacık boyutu ölçümlerine ait grafikler Şekil 4-29 ve Şekil 4-32 aralığında gösterildi. Ayrıca E21 kod numaralı formülasyona ait zeta potansiyeli değeri Şekil 4-33'da gösterildi.

Results

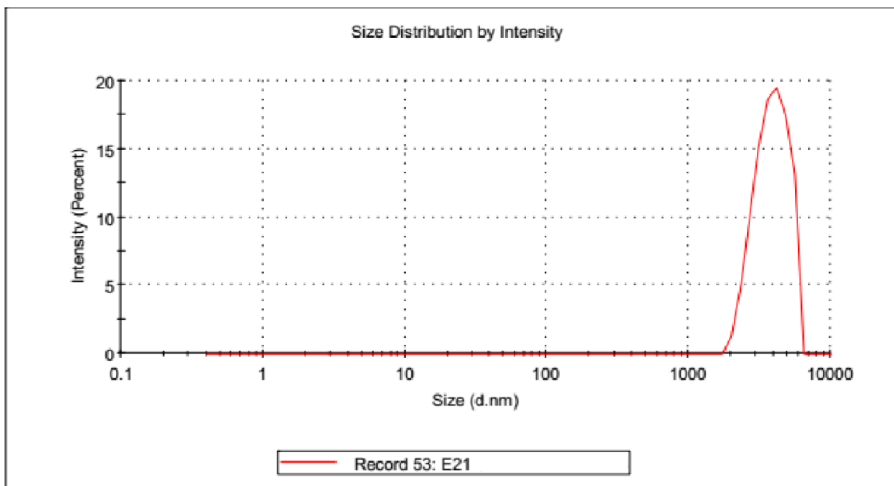
	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 193,1	Peak 1: 275,0	100,0	165,2
Pdl: 0,283	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,919	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality Good			



Şekil 4-29: E19 formülasyonuna ait damlacık boyutu ve polidispersite indeksi değerleri

Results

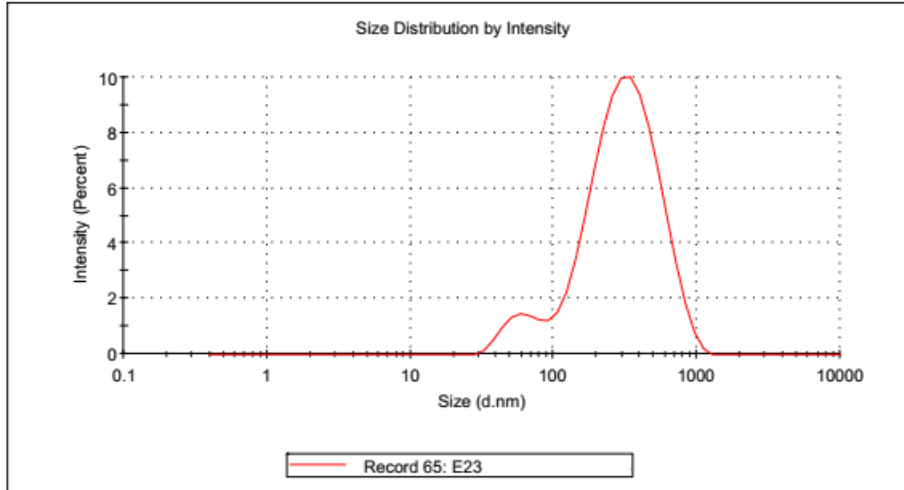
	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 3429	Peak 1: 3915	100,0	977,9
Pdl: 0,212	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,899	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality Good			



Şekil 4-30: E21 formülasyonuna ait damlacık boyutu ve polidispersite indeksi değerleri

Results

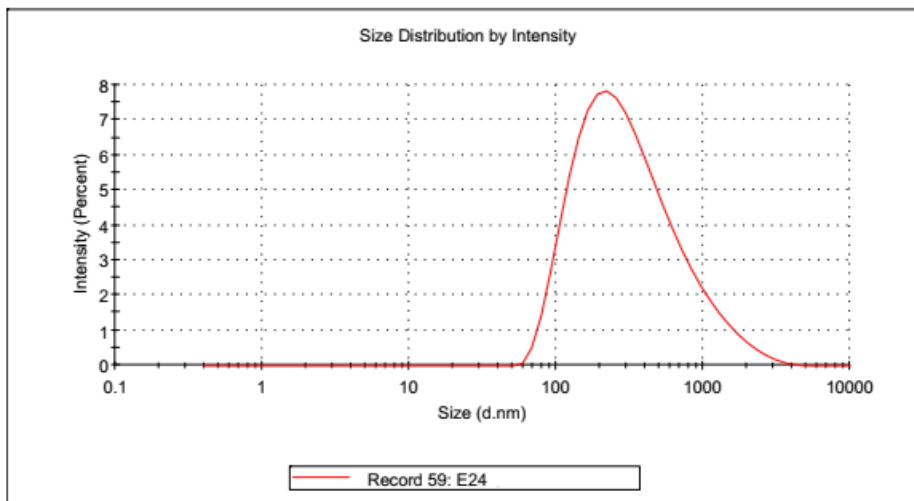
	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 224,7	Peak 1: 351,7	91,7	179,7
Pdl: 0,305	Peak 2: 63,23	8,3	16,92
Intercept: 0,920	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality Good			



Şekil 4-31: E23 formülasyonuna ait damlacık boyutu ve polidispersite indeksi değerleri

Results

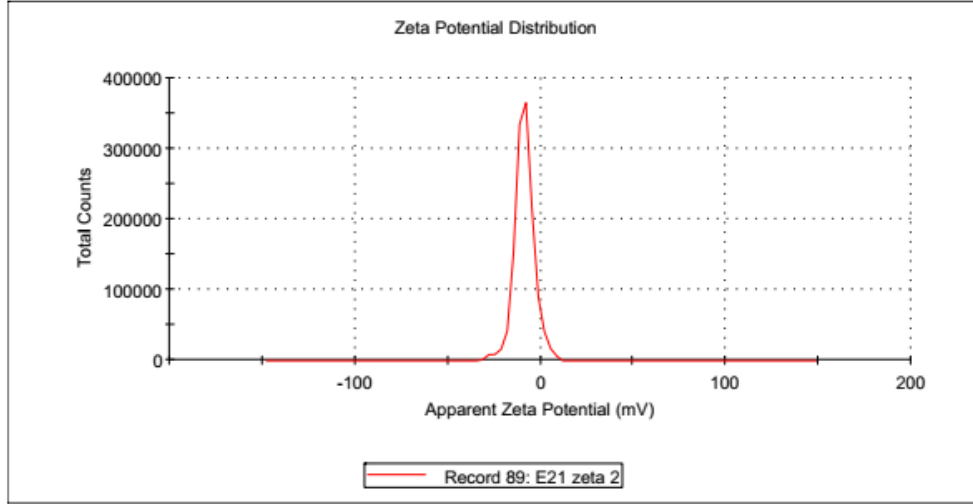
	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 212,8	Peak 1: 410,0	100,0	415,9
Pdl: 0,386	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,931	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality Good			



Şekil 4-32: E24 formülasyonuna ait damlacık boyutu ve polidispersite indeksi değerleri

Results

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -8,67	Peak 1: -8,67	100,0	5,47
Zeta Deviation (mV): 5,47	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0201	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality Good			



Şekil 4-33: E21 formülasyonuna ait zeta potansiyeli değeri

4.10. Makroemülsiyon Formülasyonuna Resveratrol Yüklenmesi

Seçilen E19, E21, E23 ve E24 kodlu formülasyonlara yöntem 3.2.11’de belirtildiği şekilde çalışılarak %0,05 oranında resveratrol yüklendi. Etkin maddenin tam olarak çözünmesi ve sistemin dengeye gelmesi için bir süre boyunca beklendi.

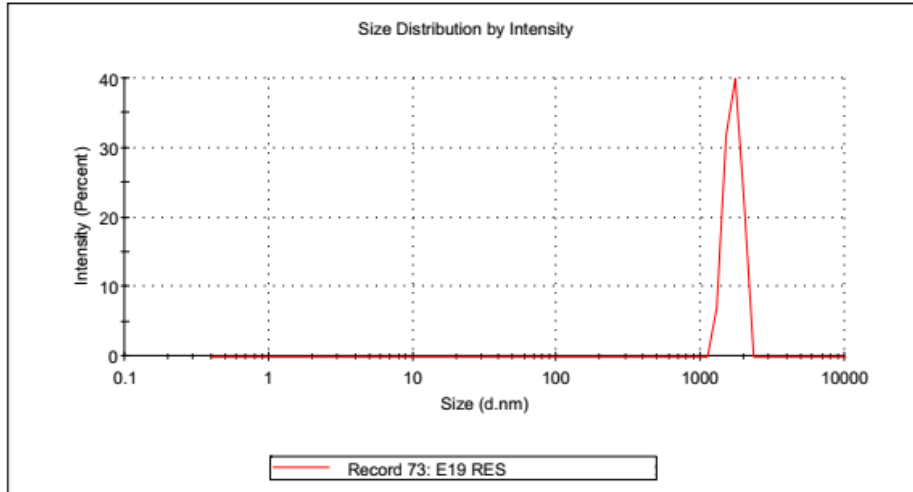
4.10.1. Resveratrol Yüklü Makroemülsiyonların Damlacık Boyutu ve Polidispersite İndeksi

Resveratrol yüklemek için seçilen E19, E21, E23 ve E24 kodlu formülasyonların etkin madde yüklendikten sonra damlacık boyutları ve polidispersite indeksleri değerleri Şekil 4-34 ve Şekil 4-37 aralığında gösterilmektedir. Ayrıca damlacık boyutu ve polidispersite indkesi sonucuna göre optimum formülasyon olmaya en yakın olan E21 kodlu formülasyonun zeta potansiyeli değeri Şekil 4-38’de gösterildi.

Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 5774	Peak 1: 1671	100,0	210,6
Pdl: 0,462	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,860	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality Refer to quality report

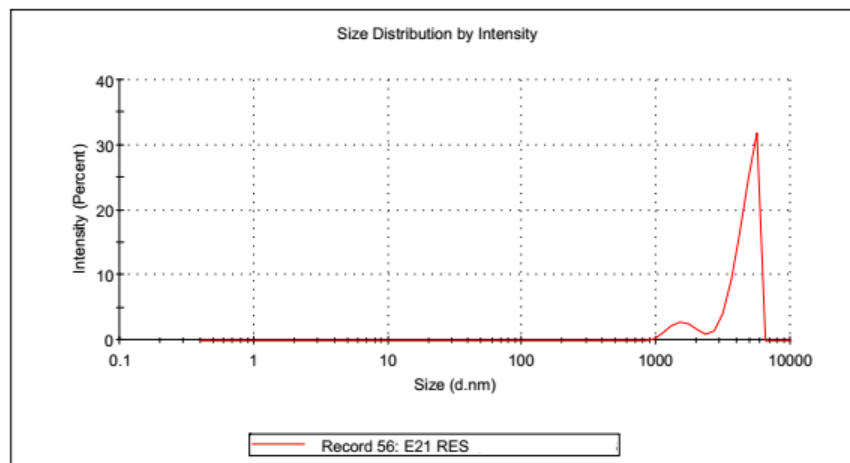


Şekil 4-34: E19-RES formülasyonuna ait damlacık boyutu ve polidispersite indeksi değerleri

Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 4965	Peak 1: 4679	88,2	840,7
Pdl: 0,210	Peak 2: 1588	11,8	348,9
Intercept: 0,915	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality Good

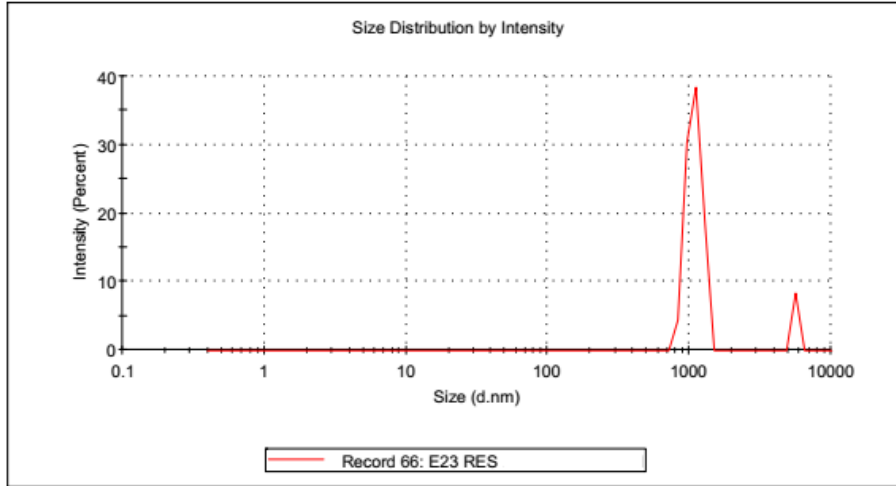


Şekil 4-35: E21-RES formülasyonuna ait damlacık boyutu ve polidispersite indeksi değerleri

Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 6555	Peak 1: 1078	91,6	129,5
Pdl: 0,306	Peak 2: 5560	8,4	6,104e-5
Intercept: 0,917	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality Refer to quality report

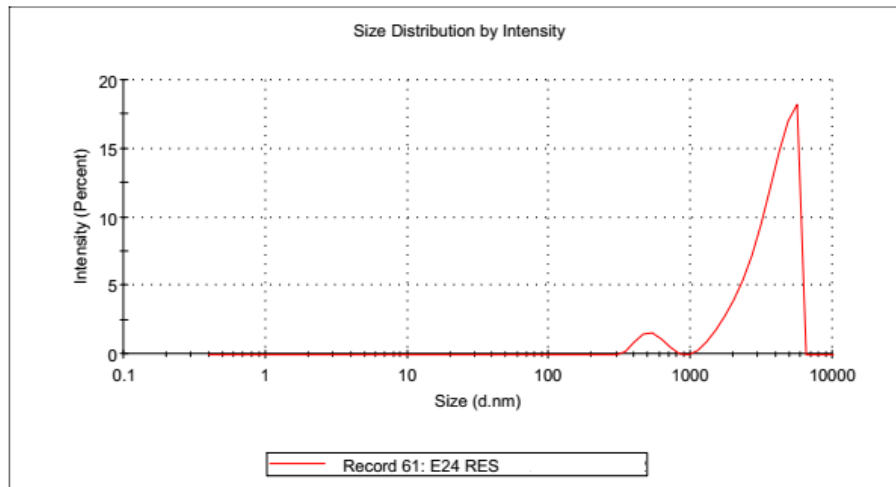


Şekil 4-36: E23-RES formülasyonuna ait damlacık boyutu ve polidispersite indeksi değerleri

Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 3590	Peak 1: 3886	94,0	1239
Pdl: 0,304	Peak 2: 522,3	6,0	104,0
Intercept: 0,889	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

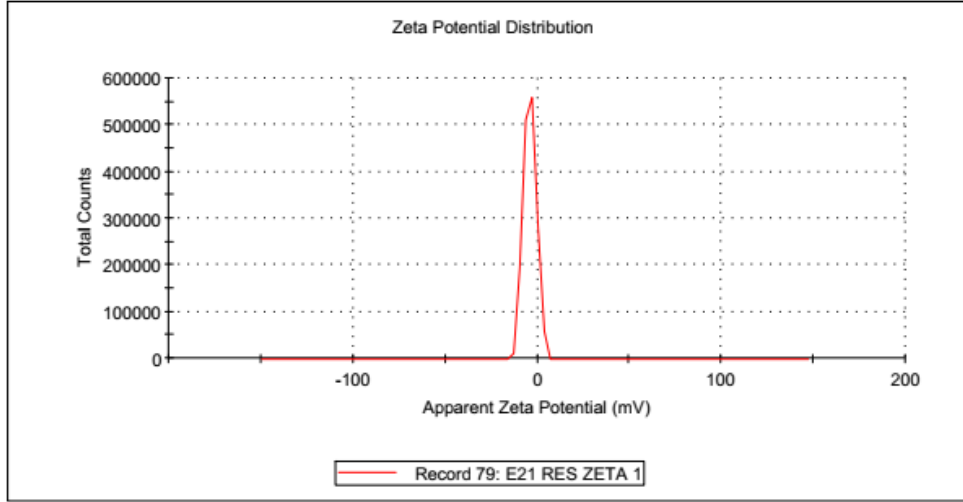
Result quality Good



Şekil 4-37: E24-RES formülasyonuna ait damlacık boyutu ve polidispersite indeksi

Results

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -3,95	Peak 1: -3,95	100,0	3,46
Zeta Deviation (mV): 3,46	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0314	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality Good			



Şekil 4-38: E21-RES formülasyonuna ait zeta potansiyeli değeri

4.10.2. Makroemülsiyonların Reolojik Özelliklerin Değerlendirilmesi

Seçilen formülasyonların akış özellikleri yöntem 3.2.12.4.'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Belirlenen hızlarda yapılan reolojik incelemede makroemülsiyonlara ait akış parametreler ve değerleri sırasıyla Tablo 4-15 - Tablo 4-22 aralığında gösterilmiştir. Her bir formülasyona ait Şekil 4-39 ve Şekil 4-46 aralığında gösterilen akış diyagramlarına göre tüm formülasyonlar kayma gerilimi ve kayma oranının orantılı olduğu newtonian akışa çok yakın non-newtonian akış göstermiştir.

Tablo 4-15: E19 formülasyonuna ait reolojik değerler

Hız (rpm)	Kayma gerilimi (dyn/cm ²)	Kayma oranı (1/sn)	Sıcaklık (°C)	Viskozite (cP)
1	14,22	7,500	22,3	189,7
3	59,35	22,50	22,4	263,8
5	104,0	37,50	22,5	277,3
7	148,1	52,50	22,5	282,2
9	193,3	67,50	22,6	283,4
11	235,4	82,50	22,7	285,4
14	288,4	105,0	22,7	274,7
16	319,8	120,0	22,8	266,5

18	346,3	135,0	22,9	256,5
20	371,8	150,50	22,9	247,9

Tablo 4-16: E19-RES formülasyonuna ait reolojik değerler

Hız (rpm)	Kayma gerilimi (dyn/cm ²)	Kayma (1/sn)	oranı	Sıcaklık (°C)	Viskozite (cP)
1	7,85	7,500		24,8	104,6
3	38,75	22,50		24,8	172,2
5	70,14	37,50		24,8	187,0
7	96,14	52,50		24,8	183,1
9	122,6	67,50		24,8	181,7
11	146,7	82,50		24,8	177,8
14	184,9	105,0		24,8	176,1
16	214,3	120,0		24,7	178,6
18	240,8	135,0		24,7	178,4
20	268,8	150,50		24,7	179,2

Tablo 4-17: E21 formülasyonuna ait reolojik değerler

Hız (rpm)	Kayma gerilimi (dyn/cm ²)	Kayma (1/sn)	oranı	Sıcaklık (°C)	Viskozite (cP)
1	10,30	7,500		23,2	137,3
3	32,86	22,50		23,3	146,1
5	62,29	37,50		23,3	166,1
7	99,08	52,50		23,4	188,7
9	129,0	67,50		23,4	191,1
11	163,8	82,50		23,4	198,6
14	215,8	105,0		23,5	205,5
16	236,9	120,0		23,5	197,4
18	263,4	135,0		23,5	195,1
20	286,9	150,50		23,5	191,3

Tablo 4-18: E21-RES formülasyonuna ait reolojik değerler

Hız (rpm)	Kayma gerilimi (dyn/cm ²)	Kayma (1/sn)	oranı	Sıcaklık (°C)	Viskozite (cP)
1	11,28	7,500		24,6	150,4
3	40,22	22,50		24,6	178,8
5	67,69	37,50		24,6	180,5
7	95,16	52,50		24,6	181,3
9	127,0	67,50		24,6	188,2
11	157,5	82,50		24,6	190,8
14	194,7	105,0		24,6	185,5
16	224,6	120,0		24,6	187,2
18	252,1	135,0		24,6	186,8
20	276,2	150,50		24,6	184,1

Tablo 4-19: E23 formülasyonuna ait reolojik değerler

Hız (rpm)	Kayma gerilimi (dyn/cm ²)	Kayma (1/sn)	oranı	Sıcaklık (°C)	Viskozite (cP)
1	8,83	7,500		23,5	117,7
3	34,83	22,50		23,6	154,8
5	70,14	37,50		23,6	187,0
7	97,12	52,50		23,7	185,0
9	127,0	67,50		23,7	188,2
11	152,5	82,50		23,7	184,9
14	195,7	105,0		23,8	186,4
16	222,2	120,0		23,8	185,2
18	245,7	135,0		23,8	182,0
20	270,3	150,50		23,8	180,2

Tablo 4-20: E23-RES formülasyonuna ait reolojik değerler

Hız (rpm)	Kayma gerilimi (dyn/cm ²)	Kayma (1/sn)	oranı	Sıcaklık (°C)	Viskozite (cP)
1	14,71	7,500		25,1	196,2
3	46,11	22,50		25,1	204,9
5	75,54	37,50		25,1	201,4
7	105,9	52,50		25,1	201,8

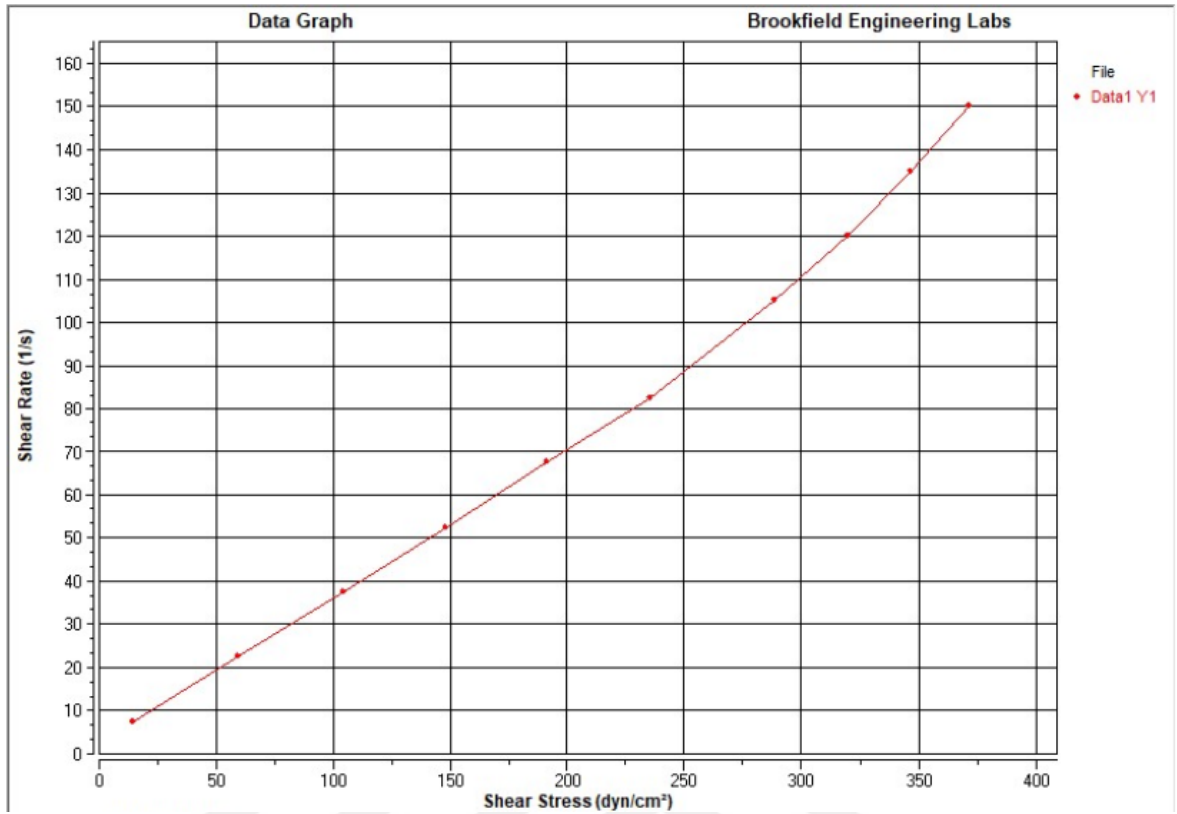
9	138,3	67,50	25,1	204,9
11	171,2	82,50	25,2	207,5
14	219,7	105,0	25,2	209,3
16	248,2	120,0	25,2	206,8
18	273,7	135,0	25,2	202,7
20	299,7	150,50	25,2	199,8

Tablo 4-21: E24 formülasyonuna ait reolojik değerler

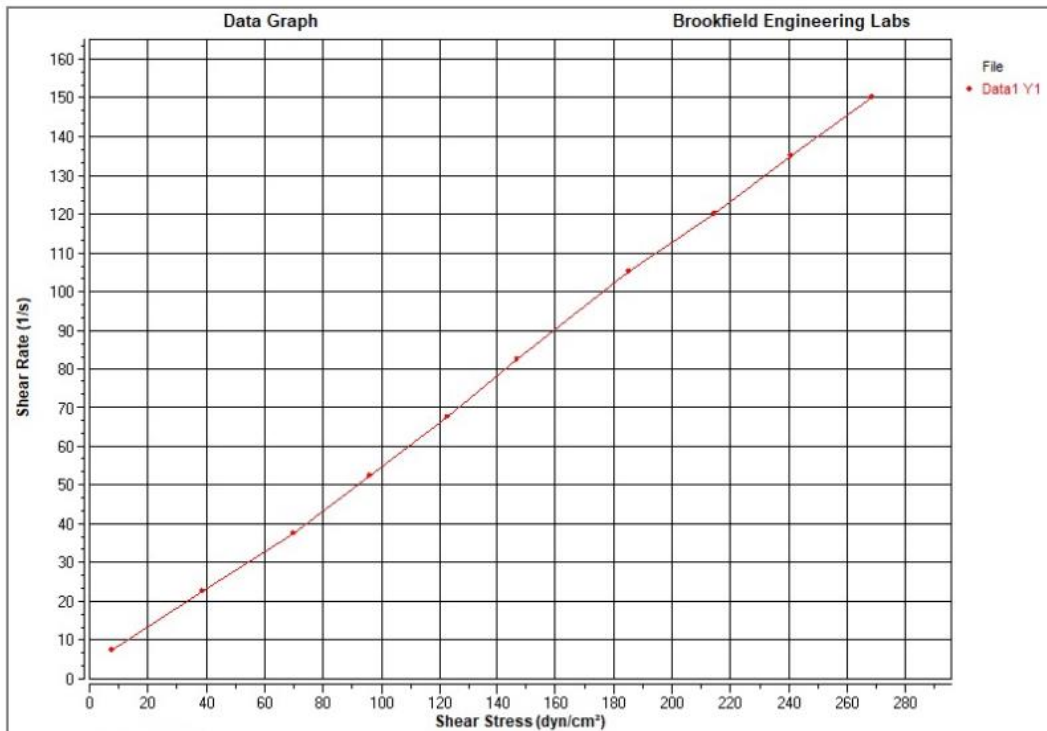
Hız (rpm)	Kayma gerilimi (dyn/cm ²)	Kayma (1/sn)	oranı	Sıcaklık (°C)	Viskozite (cP)
1	13,73	7,500		24,6	183,1
3	48,56	22,50		24,6	215,8
5	80,44	37,50		24,6	214,5
7	118,2	52,50		24,6	225,2
9	152,1	67,50		24,5	225,3
11	189,3	82,50		24,5	229,5
14	247,7	105,0		24,5	235,9
16	277,6	120,0		24,5	231,4
18	309,0	135,0		24,5	228,9
20	341,4	150,50		24,5	227,6

Tablo 4-22: E24-RES formülasyonuna ait reolojik değerler

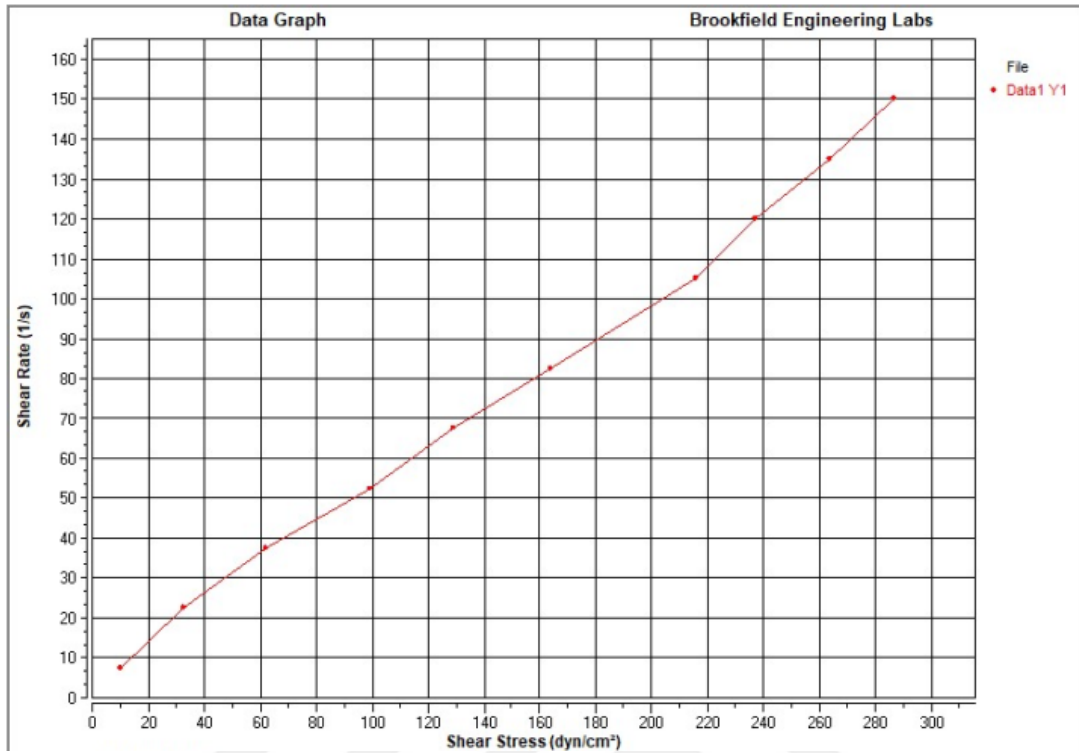
Hız (rpm)	Kayma gerilimi (dyn/cm ²)	Kayma (1/sn)	oranı	Sıcaklık (°C)	Viskozite (cP)
1	15,21	7,500		26	202,7
3	36,79	22,50		26,1	163,5
5	70,63	37,50		26,1	188,4
7	100,6	52,50		26,1	191,5
9	125,6	67,50		26,2	186,0
11	161,9	82,50		26,3	196,2
14	200,6	105,0		26,3	191,1
16	217,8	120,0		26,3	181,5
18	237,4	135,0		26,3	175,9
20	253,6	150,50		26,4	169,1



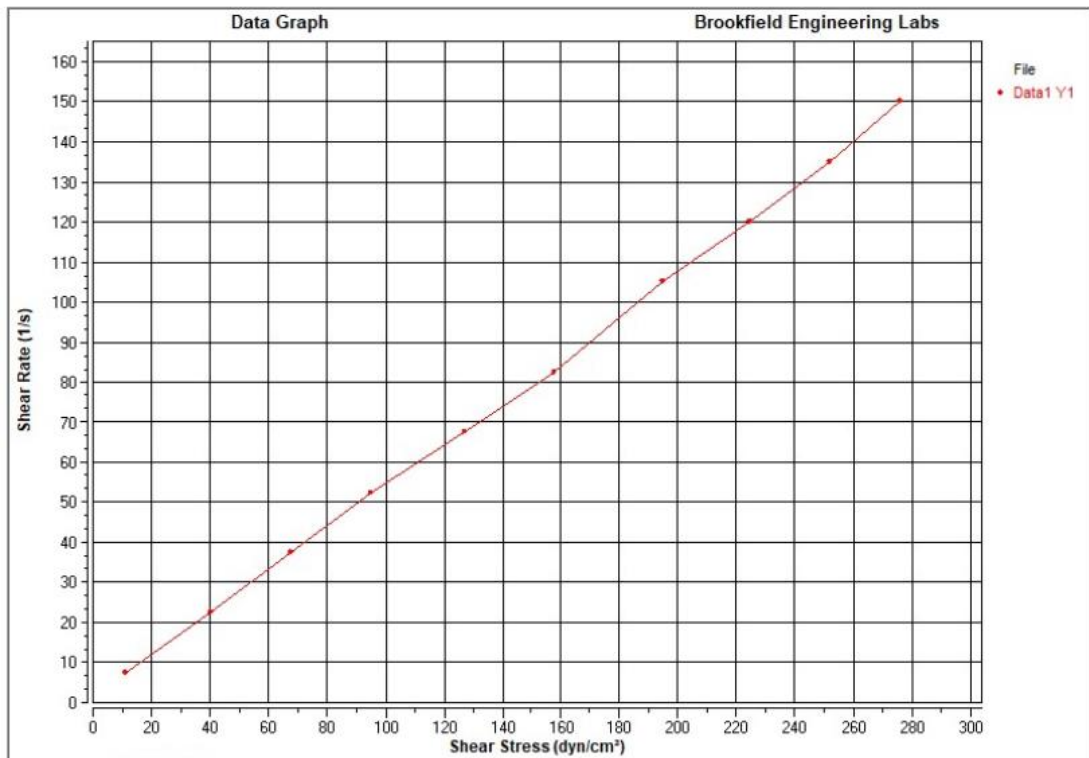
Şekil 4-39: E19 formülasyonuna ait akış diyagramı



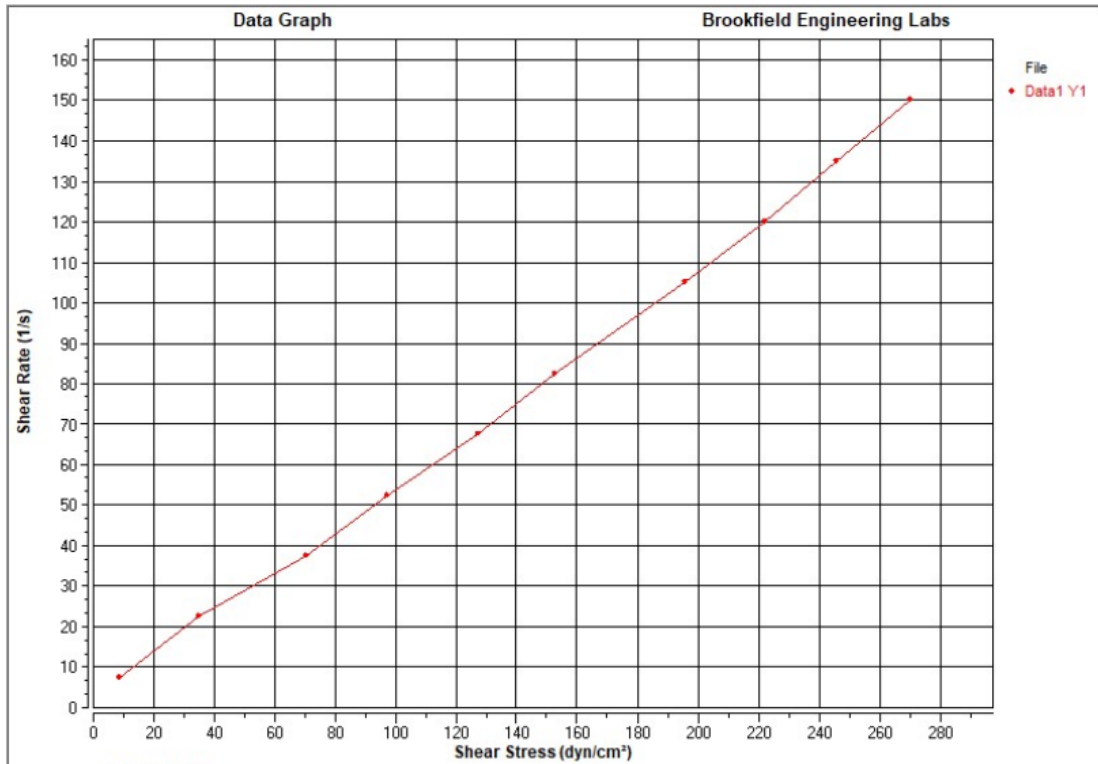
Şekil 4-40: E19-RES formülasyonuna ait akış diyagramı



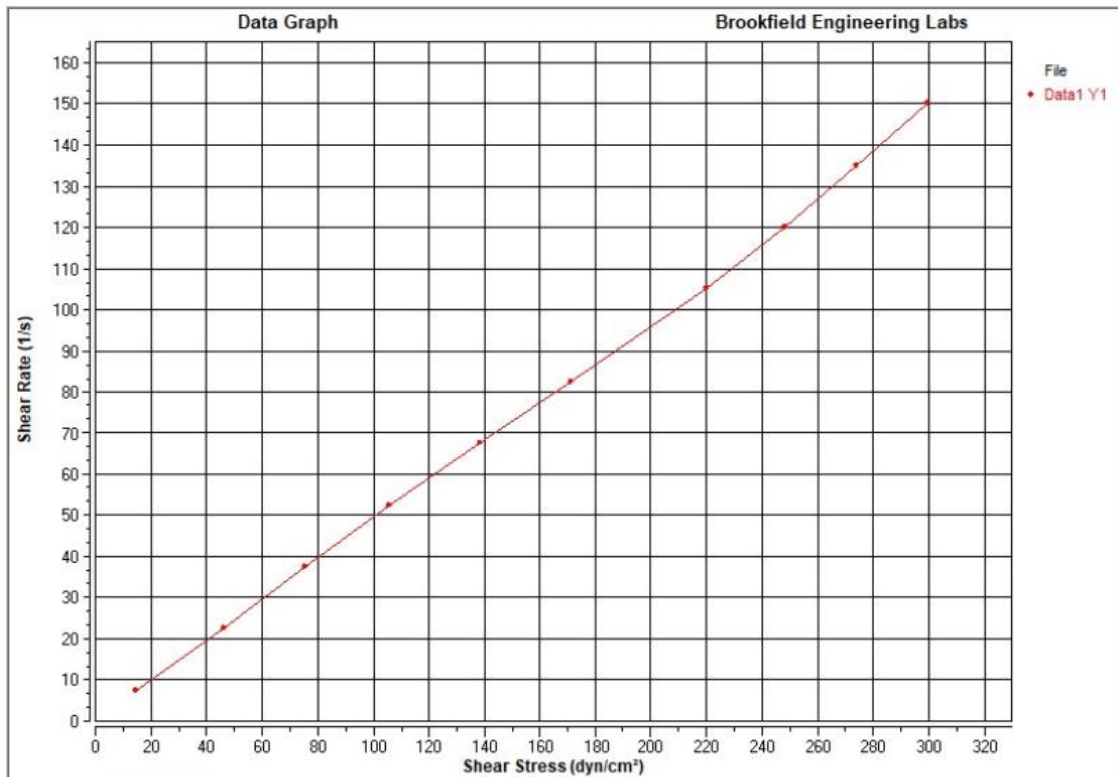
Şekil 4-41: E21 formülasyonuna ait akış diyagramı



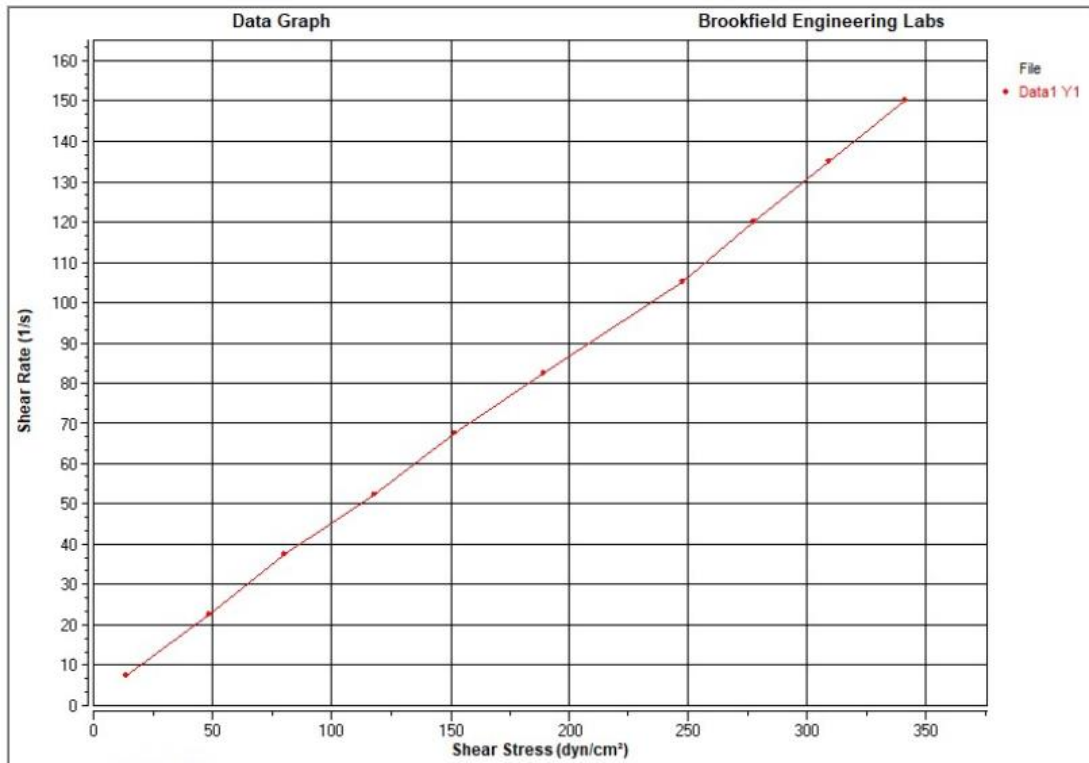
Şekil 4-42: E21-RES formülasyonuna ait akış diyagramı



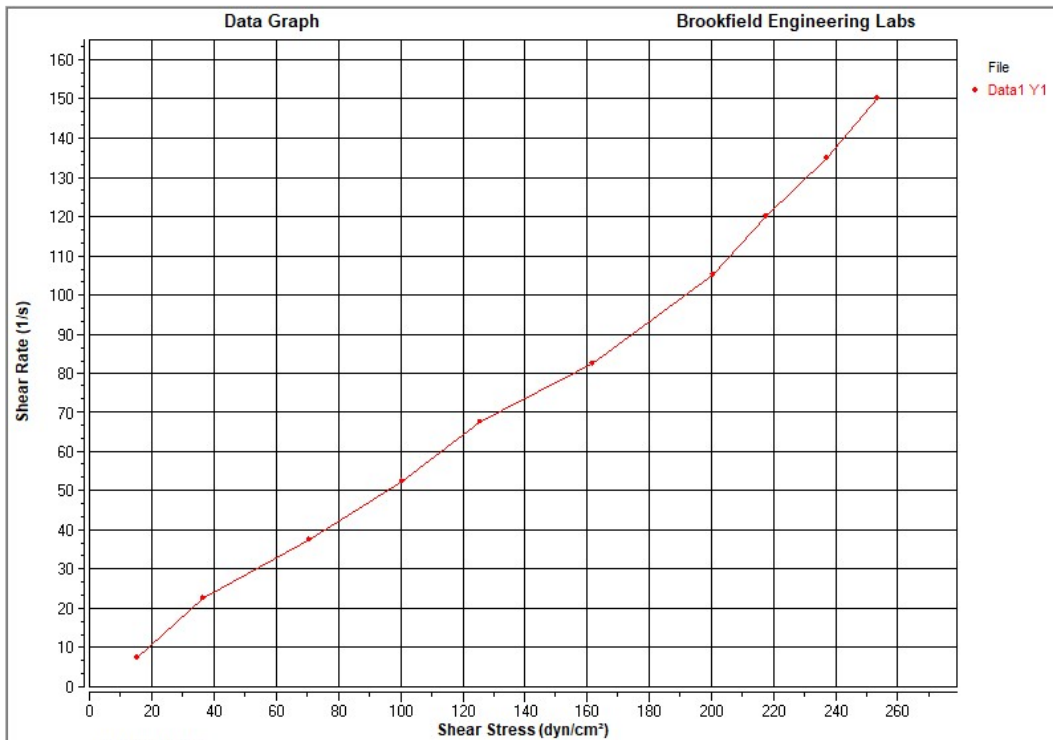
Şekil 4-43: E23 formülasyonuna ait akış diyagramı



Şekil 4-44: E23-RES formülasyonuna ait akış diyagramı



Şekil 4-45: E24 formülasyonuna ait akış diyagramı



Şekil 4-46: E24-RES formülasyonuna ait akış diyagramı

4.10.3. pH'ın Değerlendirilmesi

Bölüm 3.2.12.5'te de anlatıldığı şekilde hem resveratrol içeren hem de resveratrol içermeyen makro emülsiyonların formülasyonların pH ölçümlerinde elde edilen değerler Tablo 4-23'de gösterilmiştir.

Tablo 4-23: Makroemülsiyon formülasyonlarına ait pH değerleri

Formülasyon	pH	Sıcaklık (°C)
E19	4,74 ± 0,006	21,5
E19-RES	4,59 ± 0,01	22,1
E21	4,61 ± 0,006	21,5
E21-RES	4,56 ± 0,006	22,7
E23	4,63 ± 0,01	21,5
E23-RES	4,58 ± 0,006	22,2
E24	4,62 ± 0,006	21,9
E24-RES	4,57 ± 0,006	22,8

4.10.4. İletkenliğin Değerlendirilmesi

Bölüm 3.2.12.6'da belirtildiği şekilde resveratrol içeren ve resveratrol içermeyen formülasyonların iletkenlik değerleri ölçüldü. İletkenlik değerleri Tablo 4-24'da gösterilmiştir.

Tablo 4-24: Makroemülsiyon formülasyonlarına ait iletkenlik değerleri

Formülasyon	İletkenlik (μS)	Sıcaklık (°C)
E19	129,8 ± 0,25	26
E19-RES	141,6 ± 0,15	25,5
E21	136,9 ± 0,15	25,5
E21-RES	143,9 ± 0,1	26
E23	133,3 ± 0,1	25,8
E23-RES	141,8 ± 0,15	27,5
E24	136,7 ± 0,1	25,8
E24-RES	142,1 ± 0,1	27,4

4.11. Resveratrol'ün *In vitro* Salınımı

Bölüm 3.2.13'de anlatıldığı biçimde aynı miktarda resveratrol içeren mikroemülsiyon, makroemülsiyon ve referans çözeltisinden *in vitro* salım incelendi. Salım profilleri Sıfırıncı derece (0. derece) kinetik, Birinci derece (1.derece) kinetik ve Higuchi kinetik modele göre değerlendirildi. Franz difüzyon hücrelerinde gerçekleştirilen *in vitro* salım deneylerinde, resveratrol yüklü ME9 kodlu mikroemülsiyon, E21 kodlu

makroemülsiyon formülasyonları kullanılmıştır. Bu formülasyonların bileşenleri Tablo 4-7 ve Tablo 4-14’de verilmiştir. Her bir formülasyondan 6 saat süre ile cm^2 ‘den serbestleşen kümülatif resverarol miktarları ile ilgili veriler Tablo 4-25 gösterildi. *In vitro* salım çalışması sonucu hesaplanan salım kinetikleri Tablo 4-26’da ve selüloz asetat membrandan 6 saat sonunda salınan kümülatif konsantrasyon (%), denge durumundaki akı (Jss), geçirgenlik katsayısı (P) sonuçları Tablo 4-27’de gösterildi. Ayrıca serbestleşen kümülatif resveratrol miktarının zamana karşı grafikleri Şekil 4-47 gösterildi.

Tablo 4-25: Resveratrol içeren formülasyonların *in vitro* salım testi sonucunda selüloz asetat membrandan geçen kümülatif etkin madde miktarları (n=3)

Zaman (saat)	RES Çözelti		Makroemülsiyon		Mikroemülsiyon	
	mg/cm ²	SD (±)	mg/cm ²	SD (±)	mg/cm ²	SD (±)
1	0,022	0,001	0,011	0,0001	0,011	0,0002
2	0,032	0,002	0,013	0,0003	0,021	0,0002
3	0,039	0,002	0,016	5,08x10 ⁻⁵	0,033	0,0003
4	0,041	0,003	0,017	3,65x10 ⁻⁵	0,039	0,0001
5	0,042	0,001	0,017	6,25x10 ⁻⁵	0,046	0,0003
6	0,042	0,002	0,017	1,24x10 ⁻⁵	0,046	0,0001

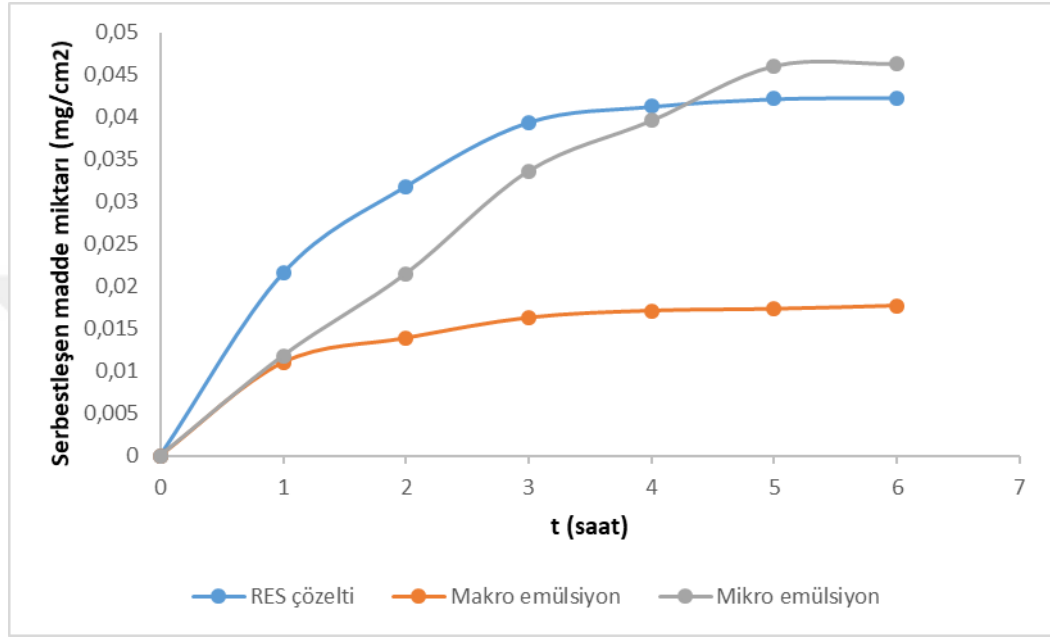
Tablo 4-26: *In vitro* salım testi bulgularına göre resveratrolün formülasyonlardan salım kinetiklerine ait bulgular

		RES Çözelti	Makroemülsiyon	Mikroemülsiyon
Sıfırıncı derece	r ²	0,7792	0,831	0,9335
	k ₀	4,6025	1,5104	8,4917
Birinci derece	r ²	0,7312	0,796	0,8529
	k ₁	0,1215	0,0884	0,2647
Higuchi	r ²	0,8713	0,9108	0,9737
	D	16,935	5,5022	30,178

Tablo 4-27: *In vitro* çalışma sonuçlarına göre selüloz asetat membrandan 6 saat sonunda salınan kümülatif konsantrasyon (%), denge durumundaki akı (Jss), ve geçirgenlik katsayısı (P) değerleri

Formülasyon	Kümülatif salınan konsantrasyon	SD (±)	Jss (mg/cm ² .saat)	SD (±)	P (cm/saat)	SD (±)
-------------	---------------------------------------	--------	-----------------------------------	--------	----------------	--------

	(%)					
RES Çözelti	49,951	2,237	0,06	0,0007	0,017	0,0015
Makroemülsiyon	20,957	0,365	0,0025	0	0,005	0
Mikroemülsiyon	54,647	0,188	0,011	0,0005	0,021	0,001



Şekil 4-47: Zamana karşı serbestleşen resveratrol miktarları

4.12. Ex vivo Deriden geçiş çalışmaları

Ex vivo geçiş çalışmaları bölüm 3.2.14'te anlatıldığı şekilde yapıldı. Domuz kulağı derisinden geçen kümülatif resveratrol miktarı Tablo 4-28'de, deriden geçen kümülatif konsantrasyon (%), denge durumundaki akı (Jss) ve geçirgenlik katsayısı (P) sonuçları Tablo 4-29'da verildi. Ayrıca, Resveratrolün deriden geçen miktarının zamana karşı değişim profili Şekil 4-48' da gösterildi.

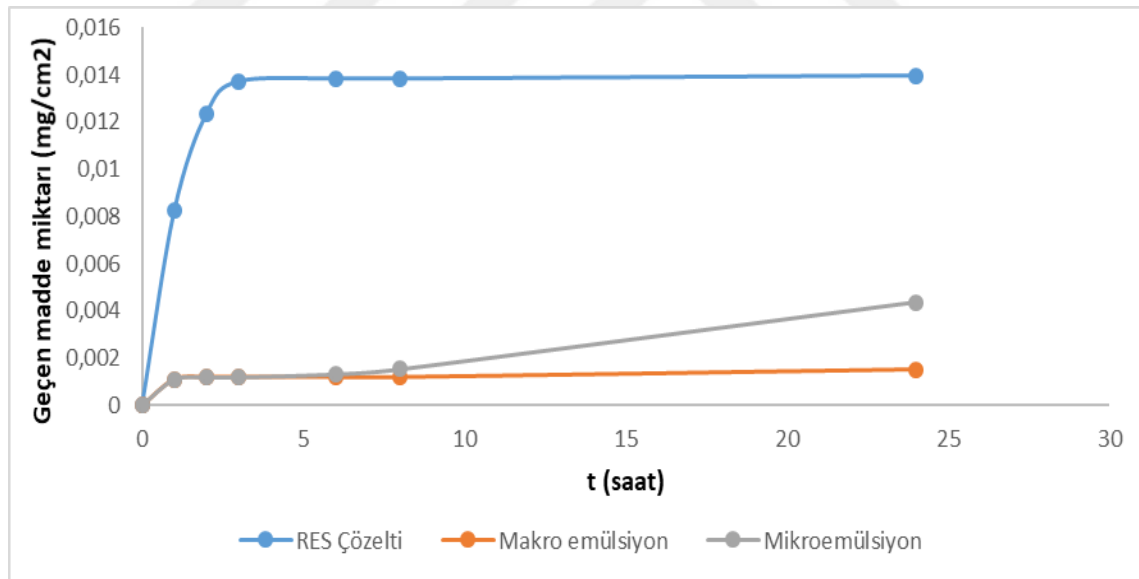
Tablo 4-28: Resveratrol'ün domuz kulağı derisinden geçen kümülatif madde miktarları (n=3)

Zaman (saat)	RES Çözelti		Makroemülsiyon		Mikroemülsiyon	
	mg/cm ²	SD (±)	mg/cm ²	SD (±)	mg/cm ²	SD (±)
1	0,0082	0,0008	0,0010	0	0,0010	0
2	0,0123	0,0003	0,0011	0	0,0011	0

3	0,0137	0,0003	0,0011	0	0,0011	0
6	0,0138	0,0002	0,0011	0	0,0013	$2,48 \times 10^{-5}$
8	0,0138	0,0003	0,0011	0	0,0015	$6,42 \times 10^{-5}$
24	0,0139	0,0001	0,0015	$6,67 \times 10^{-5}$	0,0043	0,0002

Tablo 4-29: Domuz kulağı derisinden 24 saatte geçen kümülatif % konsantrasyon, denge durumundaki akı (Jss), ve geçirgenlik katsayısı (P) değerleri

Formülasyon	Kümülatif salınan konsantrasyon (%)	SD (±)	Jss (mg/cm ² .saat)	SD (±)	P (cm/saat)	SD (±)
RES Çözelti	37,08	0,2810	0,0027	0,0002	0,0054	0,0005
Makroemülsiyon	1,77	0,0780	$1,92 \times 10^{-5}$	$4,21 \times 10^{-6}$	$3,84 \times 10^{-5}$	$8,42 \times 10^{-6}$
Mikroemülsiyon	5,14	0,2500	0,000172	$1,2 \times 10^{-5}$	0,0003	$2,41 \times 10^{-5}$



Şekil 4-48: Zamana karşı deriden geçen etkin madde miktarı

4.13. Katı Mikro İğne İle İşlem Görmüş Deriden Mikroemülsiyon Formülasyonunda Resveratrol Salınımı

Bölüm 3.2.15'te anlatıldığı şekilde uygun prosedürle hazırlanan domuz kulağı derisine katı mikro iğne ile işlem yapılarak deri üzerinden kanalcıklar oluşturuldu. 24 saat boyunca katı mikro iğne ile işlem görmüş domuz kulağı derisinden geçen her bir formülasyona ait kümülatif resveratrol miktarları Tablo 4-30'da ve 24 saatte geçen

kümülatif % konsantrasyon, denge durumundaki akı (Jss) ve geçirgenlik katsayısı (P) değerleri Tablo 4-31’de verildi.

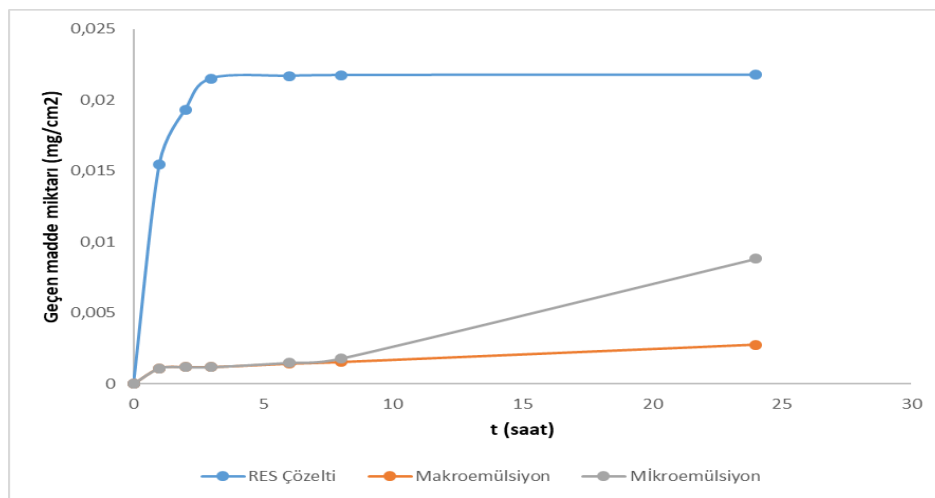
Deriden geçen resveratrol miktarının zamana karşı değişim profilleri Şekil 4-49’de gösterildi.

Tablo 4-30: Resveratrol’ün katı mikroiğne ile işlem görmüş domuz kulağı derisinden geçen kümülatif madde miktarları (n=3)

Zaman (saat)	RES Çözelti		Makroemülsiyon		Mikroemülsiyon	
	mg/cm ²	SD (±)	mg/cm ²	SD (±)	mg/cm ²	SD (±)
1	0,0154	0,0002	0,0017	0	0,0010	0
2	0,0184	0,0005	0,0019	0	0,0011	0
3	0,0214	0,0001	0,0019	0	0,0011	0
6	0,0217	0,0002	0,0022	0,0001	0,0013	2,39x10 ⁻⁵
8	0,0217	0,0001	0,0024	2,98x10 ⁻⁵	0,0016	3,91x10 ⁻⁵
24	0,0217	0,0001	0,0027	0,0001	0,0088	0,000280157

Tablo 4-31: Katı mikroiğne ile işlem görmüş domuz kulağı derisinden 24 saatte geçen kümülatif (%) konsantrasyon, denge durumundaki akı (Jss) ve geçirgenlik katsayısı (P) değerleri

Formülasyon	Kümülatif salınan konsantrasyon (%)	SD (±)	Jss (mg/cm ² .saat)	SD (±)	P (cm/saat)	SD (±)
RES Çözelti	57,8100	0,324	0,0030	0,0001	0,0060	0,0002
Makroemülsiyon	3,2580	0,135	6,94x10 ⁻⁵	8,70x10 ⁻⁶	0,0001	1,74x10 ⁻⁵
Mikroemülsiyon	10,3920	0,330	0,000418	1,45x10 ⁻⁵	0,0008	2,89x10 ⁻⁵



Şekil 4-49: Zamana karşı katı mikroiğne ile işlem görmüş deriden geçen madde miktarı

4.14. Uzun Süreli Stabilitenin Değerlendirilmesi

Bölüm 3.2.16’da belirtildiği gibi uzun süreli stabilite testleri tabi tutulan ME9 mikroemülsiyon ve E21 makro emülsiyon formülasyonlarının 6 ay sonundaki kararlılık durum değerlendirilmesi sonunda elde edilen veriler Tablo 4-32 ile Tablo 4-38 aralığında ve Şekil 4-50 ile Şekil 4-60 aralığında gösterildi.



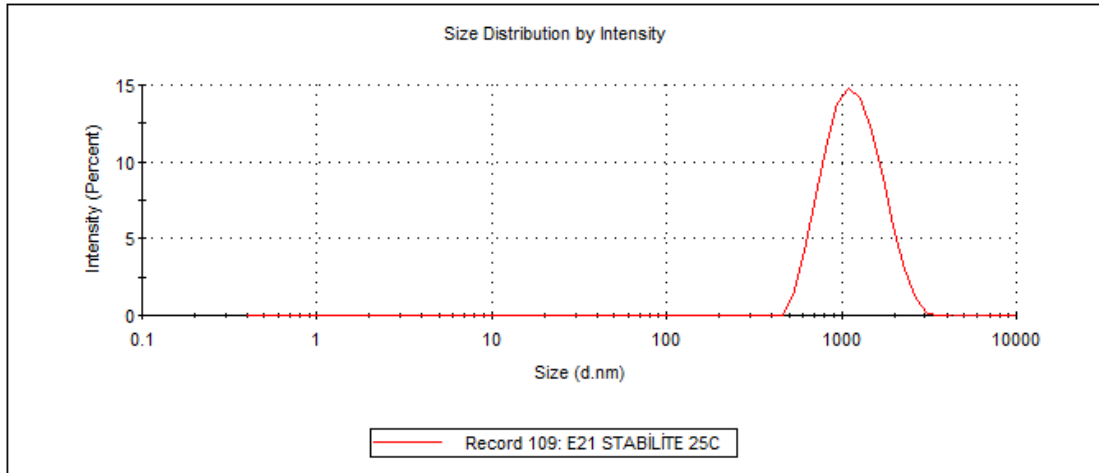
Soldan sağa sırasıyla $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık koşullarında muhafaza edilen ME9 formülasyonu



Soldan sağa sırasıyla $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık koşullarında muhafaza edilen E21 formülasyonu

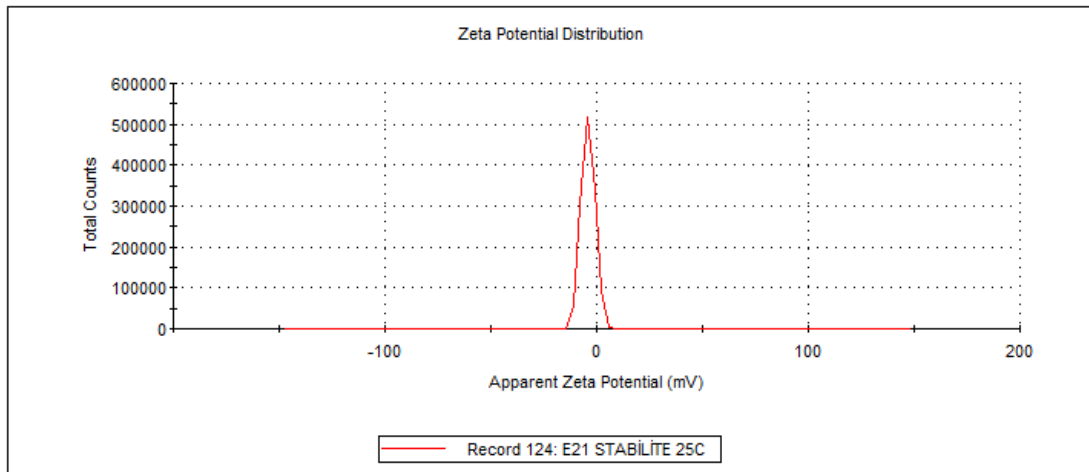
Şekil 4-50: Stabilite testi sonucunda formülasyonların fiziksel görüntüleri

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 1134	Peak 1: 1230	98,6	451,5
Pdl: 0,211	Peak 2: 5362	1,4	333,1
Intercept: 0,928	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality : Good			



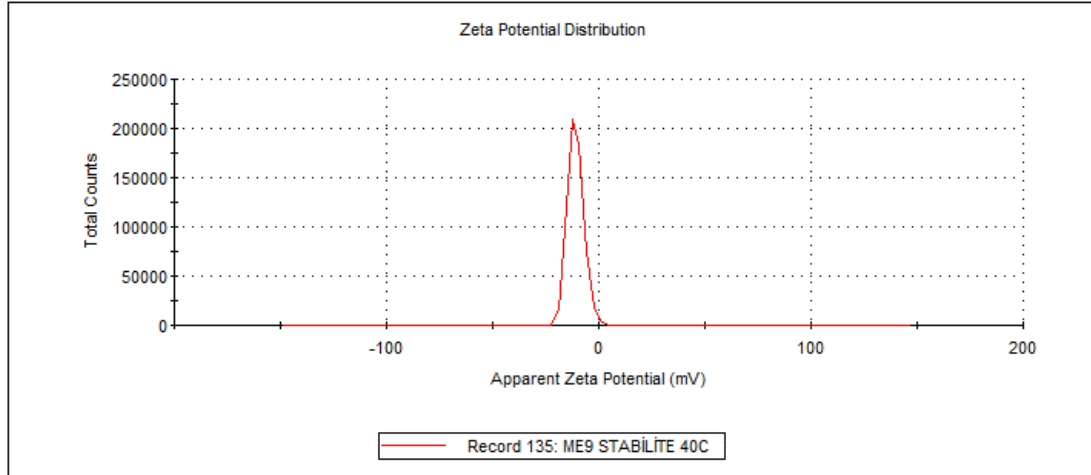
Şekil 4-51: 25°C’de muhafaza edilen E21 damlacık boyutu

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -4,07	Peak 1: -4,07	100,0	3,23
Zeta Deviation (mV): 3,23	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,103	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality : Good			



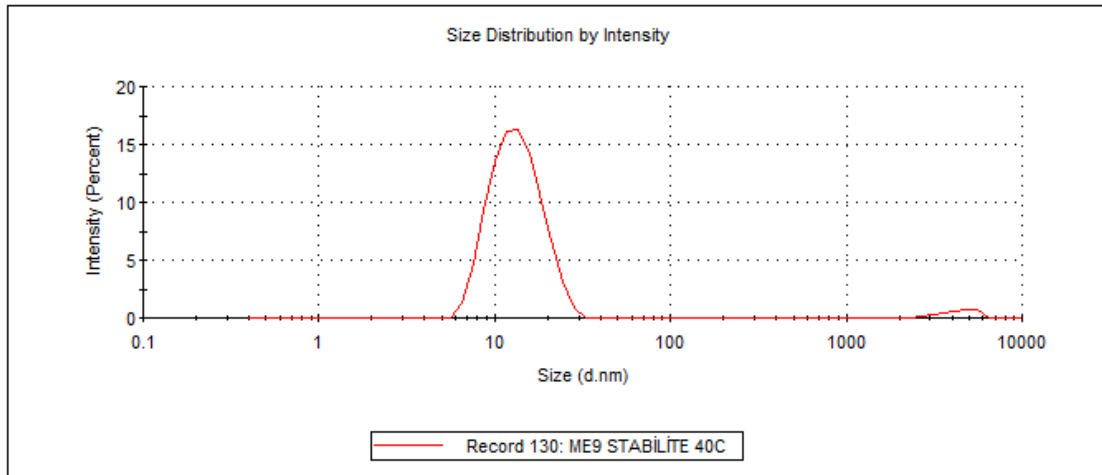
Şekil 4-52: 25°C’de muhafaza edilen E21 zeta potansiyeli

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -10,9	Peak 1: -10,9	100,0	3,72
Zeta Deviation (mV): 3,72	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0171	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality : Good			



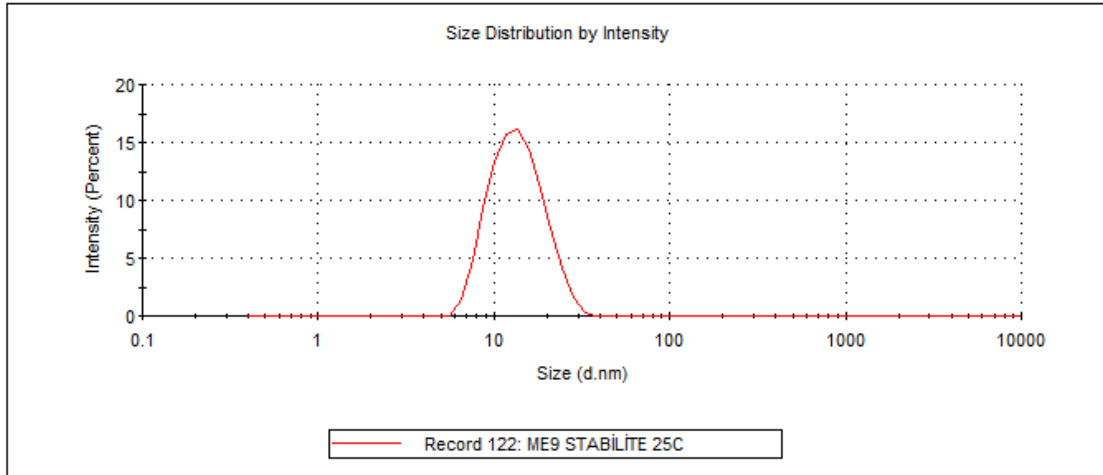
Şekil 4-53: 40°C’de muhafaza edilen ME9 zeta potansiyeli

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 12,92	Peak 1: 13,74	97,0	4,409
Pdl: 0,179	Peak 2: 4402	3,0	919,5
Intercept: 0,907	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality : Good			



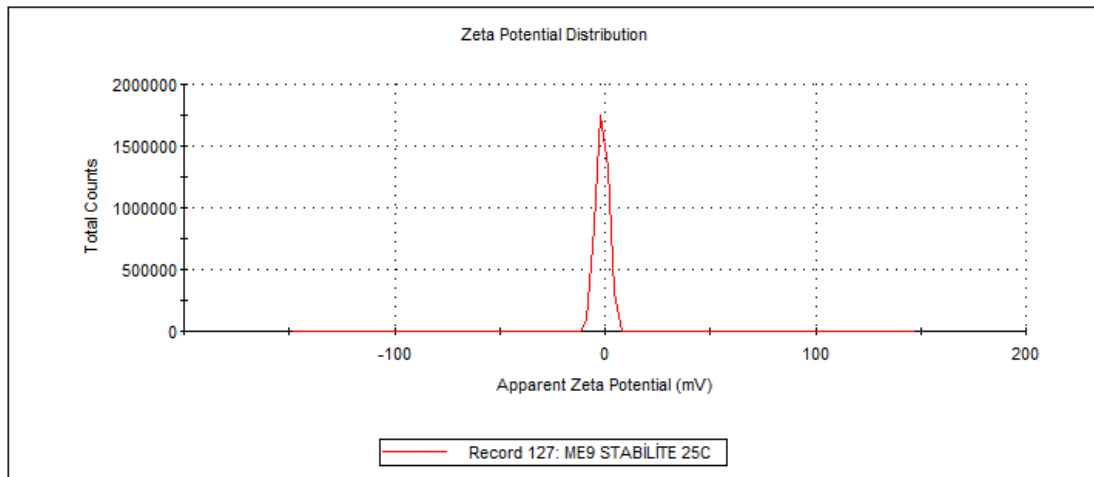
Şekil 4-54: 40°C’de muhafaza edilen ME9 damlacık boyutu

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 12,76	Peak 1: 14,06	100,0	4,769
Pdl: 0,139	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,909	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality : Good			



Şekil 4-55: 25°C’de muhafaza edilen ME9 damlacık boyutu

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -1,29	Peak 1: -1,29	100,0	3,02
Zeta Deviation (mV): 3,02	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,433	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality : Good			



Şekil 4-56: 25°C’de muhafaza edilen ME9 zeta potansiyeli

Tablo 4-32: Uzun süreli stabilite test bulguları

Formülasyonlar	İklimlendirme kabini (Sıcaklık – Nem)	pH	İletkenlik (μ S)
ME9	25°C $\pm$ 2 - %60 $\pm$ 5	5,09 $\pm$ 0,02	181,6
ME9	40°C $\pm$ 2 - %75 $\pm$ 5	5,88 $\pm$ 0,05	234
E21	25°C $\pm$ 2 - %60 $\pm$ 5	5,73 $\pm$ 0,01	130
E21	40°C $\pm$ 2 - %75 $\pm$ 5	5,91 $\pm$ 0,01	140,9

Tablo 4-33: 25 °C’de muhafaza edilen ME9 viskozite değerleri

Hız (rpm)	Kayma gerilimi (dyn/cm ²)	Kayma oranı (1/sn)	Sıcaklık (°C)	Viskozite (cP)
70	82,40	525,0	25,0	15,70
75	87,31	562,5	25,1	15,52
80	90,74	600,0	25,1	15,12
85	96,63	637,5	25,2	15,16
90	102,0	675,0	25,2	15,11
95	103,0	712,5	25,2	14,46
100	107,4	750,0	25,3	14,32
105	114,3	787,5	25,3	14,51
110	118,2	825,0	25,3	14,33
115	121,2	862,5	25,3	14,05

Tablo 4-34: 40 °C’de muhafaza edilen ME9 viskozite değerleri

Hız (rpm)	Kayma gerilimi (dyn/cm ²)	Kayma oranı (1/sn)	Sıcaklık (°C)	Viskozite (cP)
70	254,1	525,0	25,5	48,40
75	149,1	562,5	25,5	26,51
80	174,6	600,0	25,5	29,10
85	293,3	637,5	25,6	46,01
90	286,0	675,0	25,6	42,36
95	207,5	712,5	25,6	29,12
100	235,4	750,0	25,6	31,39
105	242,8	787,5	25,6	30,83
110	242,3	825,0	25,6	29,37
115	298,2	862,5	25,6	34,58

Tablo 4-35: 25 °C’de muhafaza edilen E21 viskozite değerleri

Hız (rpm)	Kayma gerilimi (dyn/cm ²)	Kayma oranı (1/sn)	Sıcaklık (°C)	Viskozite (cP)
1	51,50	7,500	25,1	686,7
3	30,90	22,50	25,1	137,3
5	87,31	37,50	25,1	232,8
7	65,24	52,50	25,1	124,3
9	138,3	67,50	25,1	204,9
11	179,0	90,0	25,1	198,9
14	172,7	105,0	25,2	164,4
16	163,8	120,0	25,2	136,5
18	173,1	135,0	25,2	128,3
20	181,5	150,00	25,2	121,0

Tablo 4-36: 40 °C’de muhafaza edilen E21 akış değerleri

Hız (rpm)	Kayma gerilimi (dyn/cm ²)	Kayma oranı (1/sn)	Sıcaklık (°C)	Viskozite (cP)
1	59,35	7,500	25,3	791,3
3	169,2	22,50	25,3	752,1
5	264,9	37,50	25,4	706,3
7	352,7	52,50	25,4	671,8
9	434,6	67,50	25,4	643,8
11	EEEE	90,0	25,4	EEEE
14	EEEE	105,0	25,4	EEEE
16	EEEE	120,0	25,4	EEEE
18	EEEE	135,0	25,4	EEEE
20	EEEE	150,00	25,4	EEEE

Tablo 4-37: 6 ay süresince 25 ± 2°C’de ve % 60 ± 5 bağıl nemde bekletilen etkin madde içeren ME9 mikroemülsiyonu ve E21 makro emülsiyonu formülasyonlarına ait miktar tayini bulguları

Formülasyonlar	Miktar tayini (%)	
	6. ay	SD (±)
ME9	72,63	0,0003
E21	61,58	4,66 x 10 ⁻⁵

Tablo 4-38: 6 ay süresince $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de ve $\%75 \pm 5$ bağıl nemde bekletilen etkin madde içeren ME9 mikroemülsiyonu ve E21 makro emülsiyonu formülasyonlarına ait miktar tayini bulguları

Formülasyonlar	Miktar tayini (%)	
	6. ay	SD ($\pm$)
ME9	57,28	$8,38 \times 10^{-5}$
E21	EEEE	EEEE

EEEE: Örnekte faz ayrımı gerçekleştiği için ölçülmedi

5. TARTIŞMA

İlaç topikal yolla, intradermal veya transdermal amaçla uygulanabilir (Bhowmik, 2012). Bir ilaç taşıyıcı sistemde, dozlanan ilacın hedeflendiği etki bölgesi derinin yüzeysel katmanları olduğunda genel ismiyle topikal olarak kabul edilir (Bhowmik, 2012; Tadwee, Gore, & Giradkar, 2012). Öte yandan, ilaç deri yoluyla sistemik dolaşıma verildiğinde bu ilaç taşıyıcı sistemler transdermal gruba girer (Benson, 2005). Amaçlanan hedef bölge, dermis gibi derinin daha alt katmanları içinde olduğunda bu ilaç taşıyıcı sistemler intradermal olarak kabul edilir (H. Trommer & R. Neubert, 2006). Transdermal ve intradermal ilaç verilmesi ile ilgili araştırmalar son yirmi yılda artsada, topikal ilaç verme sistemleri geleneksel dozaj şekilleri içinde uzun yıllardan beri kullanılmaktadır (Roberts et al., 2021).

Mikroemülsiyonların termodinamik dayanıklılıkları, şeffaf görünümleri, hedeflendirmeye uygun olmaları, kendiliğinden oluşabilmeleri ve çözünürlüğü az olan maddelerin çözünürlüğünü arttırmaları, hem lipofilik hem de hidrofilik ilaçların uygulanmasına olanak sağlaması gibi avantajlarından dolayı resveratrol yüklü mikroemülsiyon formülasyonu geliştirmek bu çalışmada amaçlanmıştır. (Chauhan et al., 2019; Ghosh & Murthy, 2006; Grampurohit et al., 2011; Jadhav et al., 2006; Karasulu, 2008; Kogan & Garti, 2006; M. J. Lawrence & Rees, 2012; Mehta & Kaur, 2010; Munir et al., 2017; N. Sharma et al., 2013).

Resveratrol polifenolik anti-oksidan bir etkin maddedir. Güçlü antioksidan özelliğe sahip olmanın yanı sıra anti-kanser, anti-anjiyojenik, kardiyoprotektif, antidiyabetik, anti-viral ve nöroprotektif aktiviteye sahip olup birçok hastalığın tedavisinde oral yoldan kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda resveratrolün, a-tokoferol, kateşin, mirisetin ve naringenin gibi antioksidan moleküllere göre daha etkili olduğu bulunmuştur (Khanduja & Bhardwaj, 2003). Toksik olmaması ve vücut tarafından tolere edilebilir olması, resveratrolün ilaç molekülü olarak kullanılmasını artırmaktadır. Hızlı emilmesine rağmen bağırsak ve karaciğer metabolizması, resveratrolün sistemik biyoyararlanımı için hız sınırlayıcı adımdır. Ayrıca, resveratrolün yüksek lipofilitesi suda çözünürlüğünü düşürür ve metabolik stabilitesi ile birlikte oral biyoyararlanımını azaltır. Bu nedenle oral yolla kullanım sonrası gelişen bu dezavantajlarından dolayı topikal olarak kullanılmasından daha çok yararlanılacağı öngörülebilir. Yukarıdaki bilgilere dayanarak bu tez çalışmasında oral kullanımdan farklı olarak topikal yoldan

kullanılabilen bir formülasyon geliştirmesi amaçlanmıştır. Formülasyonun topikal yoldan verilmesinin seçilme nedeni; topikal yolun uygulama kolaylığı, gastrointestinal yan etkilerinin ve ilk geçiş etkisinin olmaması, hedeflenen bölgeye doğrudan uygulanması, uygulanmasının kolay ve hasta uyuncunun yüksek olması açısından oral ve diğer yollara göre bir avantaj taşımaktadır. Yapılan literatür taramalarında, transdermal amaçla kullanılabilen ve bu çalışmada seçilen yağlı faz ve YEM fazı kullanılarak hazırlanan resveratrol içeren bir mikroemülsiyon formülasyonuna rastlanmamıştır. Ancak, suda çözünürlüğünün çok düşük olması resveratrolün topikal formülasyonlarının hazırlanmasının kolay olmadığını göstermektedir. Ayrıca, lipofilik bir etkin madde olduğundan dolayı topikal uygulamanın ardından SC ‘un yüzeyinde birikmekte ve etkin bir tedavi için daha alt tabakalara geçişi sınırlanmaktadır. Bu da resveratrol ile transdermal tedavinin etkinliğini azaltan önemli bir faktördür. Işık ortamında bozunmaya uğraması ve geleneksel topikal formülasyonlarının uygulanmasının ardından görülen lokal yan etkileri de topikal uygulamadaki diğer sorunlarından (Amri, Chaumeil, Sfar, & Charrueau, 2012; Intagliata, Modica, Santagati, & Montenegro, 2019).

Etkin maddelerin deriden uygulanmasında geçişi ve emilimi arttırmak amacıyla derinin bariyer yapısını aşmak için, güvenli ve etkili deriden geçişi arttıran maddelere ihtiyaç vardır (Bouwstra et al., 2002; Peter M Elias, 1983; P. M. Elias et al., 1981; Funke et al., 2002; Kreilgaard, 2002; Nielsen et al., 2016; Adrian C Williams & Barry, 2012). Mikroemülsiyonları oluşturan bileşenlerden bazıları deriden penetrasyonunu artırarak etkin maddelerin deriden geçişini arttırılabilmektedir. Bununla birlikte düşük viskoziteye sahip oldukları için mikroemülsiyonların deriden geçişleri diğer formülasyonlara göre daha kolaydır. Bu nedenle mikroemülsiyonlar doğal olarak deriden geçişi arttırıcı madde görevi yapmaktadırlar. Mikroemülsiyonların yapısında yer alan lipofilik maddeler deriye uygulandığında SC’da depo görevi yapmaktadır. Böylelikle lipofilik yapıdaki derinin en dış tabakasına yüksek afinite gösteren mikroemülsiyonlar deri tabakalarından kolay geçmektedir. Ancak SC bariyeri hidrofilik ilaçların deriden geçişine izin vermemektedir. Mikroemülsiyonların temel bileşenlerinden olan YEM’ler hem hidrofilik bir baş hemde lipofilik bir kuyruk kısmından oluştuğundan dolayı etkin maddelerin bu deri bariyerlerinden geçmesini kolaylaştırır (Bo Nielsen et al., 2009; Bouwstra et al., 2002; Peter M Elias, 1983; P. M. Elias et al., 1981; Funke et al., 2002; Kreilgaard, 2002; Tsakovska et al., 2017).

Mikroemülsiyonlar SC'dan hücreler arası yol ile geçmektedir. Ayrıca, alternatif bir mekanizma olarak SC tabakanın hidrasyonu ile de etkin maddelerin deriden geçişini arttırdıkları bilinmektedir. Anlatılan tüm nedenlerden dolayı mikroemülsiyonlar etkin maddelerin topikal yoldan uygulanması için tercih edilmektedir.

Katı mikroiğneler, SC tabakasında ilaç moleküllerin geçebileceği gözenekler açarak, fiziksel penetrasyon artırıcı özelliği ile etkin maddenin derinin alt tabakalarına geçişini artırır (Mark R Prausnitz, 2004; Samanci et al., 2021). Böylelikle terapötik etkinlik için sistemik dolaşıma veya hedeflenen dermal tabakalara yeterince ulaşmayan etkin maddelerin geçişini artırarak istenilen tedavi sağlanmaktadır. En önemli avantajı ise sinir uçlarına ulaşmayan mikron boyutlu iğneler sayesinde, acı hissi oluşmadan etkin madde derinin alt tabakalarına ulaşmaktadır ve hastalar kullanım kolaylığı sayesinde bu sistemleri kullanmaya daha kolay adapte olmaktadır (Kevin Ita, 2015; Mark R Prausnitz, 2004).

Tüm bu bilgilerden yola çıkarak bu çalışmada, günümüzde oral yol ile yaygın olarak kullanılan resveratrolün transdermal uygulamaya yönelik y/s tipi mikroemülsiyon ve makromeülsiyon formülasyonlarının geliştirilmesi, hazırlanan formülasyonların karakterizasyonu yapılarak optimize formülasyonların *in vitro* selüloz asetat mebrandan ve *ex vivo* katı mikroiğne ile işlem görmüş ve katı mikroiğne ile işlem görmemiş domuz kulağı derisinden geçişlerinin incelenmesi ve geçiş miktarların karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Bu doktora tez çalışmasında ilk olarak *in vitro* ve *ex vivo* penetrasyon çalışmalarında örneklerdeki resveratrolün miktar tayini analizlerinde kullanılması planlanan literatürde kayıtlı (M. Sessa et al., 2014) yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) metodu kullanıldı ve bu metoda ait validasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Validasyon çalışması kapsamında metodun doğrusalılığı, kesinliği (tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik), doğruluğu, seçiciliği, sistem uygunluğu ve stabilitesi araştırıldı ("ICH Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology ", 2005).

Doğrusallık çalışmasından elde edilen standart eğrinin (Şekil 4-1) determinasyon katsayısının ($R^2 = 0,9999$) yüksek bir değerde olması ve %VK değerinin $<2\%$ olması nedeniyle doğru denkleminin miktar tayininde kullanılabileceği sonucuna varıldı. Tekrarlanabilir (Tablo 4-2) ve ara kesinlik (Tablo 4-3) çalışmalarında elde edilen %VK değerleri $<2\%$ olarak bulundu. Doğruluk çalışması için çalışma konsantrasyonun 10% , 100% ve 600% 'ne denk gelen numuneler ile çalışıldı (Tablo 4-1). Geri kazanma

değerleri 0,5 µg/ml çözeltisi için (%98,800 - 99,200), 5 µg/ml çözeltisi için (%98,800 - 102) ve 30 µg/ml çözeltisi için (%98,700 - 99,100) hesaplandı. Seçicilik çalışması sonuçlarına göre metanol ve asetik asitli mobil fazların ve formülasyonda kullanılan yardımcı maddenin alıkonma zamanların resveratrolün alıkonma zamanında girişim yapmadığı saptandı (Şekil 4-3 – Şekil 4-5). Ayrıca son olarak dayanıklılık testi kapsamında resveratrolün mobil faz ile hazırlanmış çözeltilerinin 72 saat süre ile bozunmadığı tespit edildi (Tablo 4-5).

Sonuç olarak, HPLC ile resveratrol miktar tayini yönteminin belirli koşullar altında sürekli olarak bekleneni gerçekleştirdiği görülmüştür.

Mikroemülsiyon formülasyonlarında kullanılacak olan bileşenler seçilirken, seçilecek olan maddelerin fizikokimyasal yapıları optimum formülasyon geliştirmek için önemli faktördür. Ancak, bileşenlerin biraraya gelirken çoklu etkileşimlerin mekanizmasını anlamak güçtür (Kreilgaard, 2002).

Mikroemülsiyon formülasyonları geliştirme çalışmalarında, etkin maddenin formülasyona giren bileşenlerdeki çözünürlüğüne göre yağ fazını oluşturacak bileşenler seçilmektedir (Lopes, 2014). Bitkisel yağlar, sıvılaştırma ve gevşetme mekanizması ile SC lipid yapısını bozarak aktif bileşenlerin SC'nin alt katmanlarına geçişini artırıp penetrasyon artırıcı özellik gösterebilir (Lane, 2013). Zeytinyağı, deriden penetrasyonu artıran oleik asit içerdiğinden yağlı fazı olarak seçilmiştir (Cicero et al., 2018) Emülsiyon sistemlerinde oleik asit ve izopropil miristat en çok tercih edilen yağlı fazlardır (Gamal M El Maghraby, 2008; Hathout et al., 2010; S. Heuschkel, A. Goebel, & R. H. Neubert, 2008). Ancak, izopropil miristat komodojenik yapısından dolayı bu çalışmada yağlı faz olarak tercih edilmemiştir (Nguyen, Dang, & Maibach, 2007). Bununla birlikte yapılan literatür taramasında, etkin maddenin deriden penetrasyonu ve yağlı faz içindeki çözünürlüğüyle arasında doğrudan bir ilişki olmadığını, penetrasyon değerlerindeki değişikliklerin yağ fazının deri üzerindeki etkilerinden kaynaklandığı görülmüştür (Lopes, 2014). Çözünürlük çalışması sonucunda, resveratrolün zeytin yağı içerisindeki çözünürlüğü 0,14 mg /ml olarak saptandı. Resveratrolün zeytin yağı içerisindeki çözünürlüğü ile ilgili yapılan diğer çalışmalarda bu değer 0,20 mg/g olarak tespit edildiği görülmektedir (Herneisey et al., 2016; Juskaite, Ramanauskiene, & Briedis, 2015). Değerlerin birbiri ile uyumlu olduğu ve aradaki farkın ortam sıcaklığın farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Resveratrolün çözünürlüğü ortam sıcaklık değeri düştüğünde azalmaktadır (Das, Lee,

Chow, & Macbeath, 2020). Resveratrolün Tween 80 içerisindeki çözünürlüğü ise 30 mg/ml olarak saptandı. Bulunan değer daha önce yapılan çalışmalar ($46,27 \pm 5,21$ mg/ml) ile uyumlu olup aradaki farkın ortam sıcaklığından kaynaklandığı düşünülmektedir (B. Sharma, Iqbal, Kumar, Ali, & Baboota, 2019). Bu çalışmada formülasyonlara yüklenecek resveratrol miktarının çok az olması (%0,05 g/g) ve kullanılan sürfaktan çözünürlük artırıcı özelliklerinden dolayı etkin maddenin çözünürlüğünden çok, mikroemülsiyon bileşenlerinin optimum formülasyon oluşturabilmeleri değerlendirildi.

Resveratrolün çözünürlük tayini sonrasında formülasyonların tasarımı ile alakalı kararlı topikal formülasyonların tespiti için ön çalışmalar yapılmıştır. y/s tipi mikroemülsiyon, y/s tipi makro emülsiyon formülasyonları etkin madde eklenmeksizin hazırlanarak yardımcı maddelerin oranları ve kararlı formülasyon oluşturabilmeleri incelenmiştir.

Farklı oranlarda yağ fazı, su fazı ve YEM karışımları ile çeşitli farklı yapılar oluşabilmektedir. YEM maddenin, yağlı fazın ve sulu fazın konsantrasyonuna ve bileşenlerin oranına bağlı olarak mikroemülsiyon, makroemülsiyon, jelimsi yapıların meydana gelmesi mümkündür. Yağ ile uyumlu kimyasal YEM tipini bulmak önemlidir, çünkü bir YEM ile yağın zincir uzunluğu uyumluluğu emülsiyon sistemlerinin oluşumu için kritik bir aşamadır. YEM tipi, sistemlerin reolojik özelliklerinin ve damlacık boyutunun belirlenmesinde önemli bir rol oynar (Syed & Peh, 2014). y/s ME'lerinde faz stabilizasyonu sağlamak için, HLB değeri ≥ 12 olan bir yüzey aktif madde kullanmak daha uygundur (Rani, Rana, Saraogi, Kumar, & Gupta, 2019; L. Zhang et al., 2015). Bu tez çalışmasında HLB değeri 15 olan Tween 80 YEM fazı olarak seçildi. Tween 80 iyonik olmayan YEM olup özellikle deri olmak üzere tüm biyolojik dokular için güvenilir bir maddedir. Emülsiyon hazırlanmada kullanılan birçok madde ile geçimli olup ortam pH'dan etkilenmemektedir. Ayrıca, hidrofilik bir madde olup, y/s tipi emülsiyonların hazırlanmasında etkili olmaktadır. Bu avantajlarından dolayı, topikal formülasyonların hazırlanmasında çoğunlukla Tween 80 sürfaktan fazı olarak tercih edilmektedir (Lémery et al., 2015) Formülasyon bileşenleri ve oranlarına karar verilebilmesi için farklı oranlarda yağ, YEM kullanılarak formülasyon çalışmaları yapıldı. Yapılan bu formülasyon çalışmaları sonucu hazırlanan formülasyonların bazılarında jelleşme meydana geldiği, bazılarının su ilavesi ile bulanıklaştığı ve bulanıklığın su ilavesine devam edildikçe arttığı, bazılarında ise su ilavesine rağmen bulanıklık seviyesinin değişmediği görüldü (Şekil 4-10). Farklı fazların tayin edilmesi

basit bir görsel değerlendirme ile yapılabilmektedir. Mikroemülsiyonlar şeffaf ve berrak bir görüntü sergilerken, makroemülsiyonlar bulanık veya süt görünümünde olup belli bir süre sonra faz ayırımına uğrayabilir (Alany, Tucker, Davies, & Rades, 2001).

Mikroemülsiyon formülasyonların hazırlanması esnasında, karıştırma hızı, faz ortamı sıcaklıkları, fazların eklenme sırası gibi faktörler önemli olmaktadır. Ancak, termodinamik olarak kararlı olan bu yapıların hazırlanmasında fazların eklenme önceliği önemli değildir (Rosano, Cavallo, Chang, & Whittam, 1988). Bu çalışmamızda su fazının akıcılığının iyi olmasından dolayı olası madde kayıpların önüne geçmek için daha önceden karıştırılan yağ fazı ve YEM karışımı üzerine damla damla su fazı ilave edildi. Öncelikle oda sıcaklığında yapılan karışırtırmalarda berrak görüntüye sahip mikroemülsiyonların elde edilmediği görülüp yağ fazı ve su fazı sıcakları ayrı ayrı 40°C getirilerek mikroemülsiyonların oluştuğu gözlemlendi. Manyetik karıştırıcıda 300 rpm ile karıştırılan fazların berrak görüntü oluşturmadığı tespit edildi. Manyetik karıştırıcı hızı 600 rpm hıza çıkarılarak öncelikle yağ fazı ve YEM karışımı homojen hale getirildi. Aynı hızla karıştırılmaya devam edilerek sulu fazın damla damla eklenmesi sonunda berrak görüntünün elde edilemediği tespit edildi. Daha sonra su fazı damla damla eklenirken manyetik karıştırıcı hızı 1250 rpm kadar çıkartıldı ve bu işlem süreç sonunda şeffaf görünümlü mikroemülsiyon formülasyonların oluştuğu görüldü. Böylelikle mikroemülsiyon hazırlama metodu belirlendi.

Formülasyon çalışmalarında formülasyonların akışkanlığının iyi ve berrak görünümde olması gibi bulgulara dayanarak çalışmamızda hazırlanacak mikroemülsiyonlardaki formülasyon bileşenlerin oranları için seçim yapıldı (Tablo 4-7). Üçgen faz diyagramları çizilerek noktasal çalışma ile mikroemülsiyon, emülsiyon ve jel formülasyonların meydana geldiği alanlar belirlendi. Formülasyonumuzda YYEM'nin kullanılmaması ve tek çeşit yağ ve YEM'nin kullanılması ile zamandan tasarruf sağlanarak daha hızlı deneylerin yapılması sağlandı.

Oleik asidin uzun zincirli trigliseridleri zeytinyağını oluşturmaktadır. Zeytinyağı uzun zincirli trigliserid yapısından dolayı yüksek moleküler ağırlığına (1382.2 g/mol) sahiptir. Bu özelliği zeytinyağı ile mikroemülsiyon oluşumunu zorlaştırır (Garti, Yaghmur, Leser, Clement, & Watzke, 2001; Syed & Peh, 2014). Mikroemülsiyon formülasyonlarında tek başına yağ fazı olarak kullanıldığında suda dağılma oranının oldukça düşük olduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür (Djekic & Primorac, 2008; Z. Wu, Joo, Lee, & Lee, 2005).

Derinin bariyer görevini gören SC'un yapısında yer alan korneosit hücreleri membranın su tutma miktarını düzenler. Formülasyondaki su oranının yüksek olması derinin hidrasyonunu artırarak, SC yapısındaki korneosit hücrelerin şişmesine neden olup, hücreler arasında ilacın geçebilmesini sağlayan yollar oluşturarak etkin maddenin geçişini artırır (Yuan, Li, Mo, & Zhong, 2006). Böylelikle, topikal uygulanan formülasyonların su içeriği deriden geçişlerde önemli faktör olmaktadır.

YEM, SC lipidlerinin artan bozulmasını kolaylaştırırken formülasyon stabilitesinin korunmasına katkıda bulunur (Lane, 2013). Deri tahrişi, yüksek konsantrasyonda yüzey etkin madde içeren topikal bir formülasyonla indüklenebilir. Bu nedenle, topikal formülasyonda yüksek konsantrasyonda yüzey aktif madde kullanmaktan kaçınılmalıdır (Djekic & Primorac, 2008; Kreilgaard, 2002). Bu nedenle üçgen faz diyagramları üzerindeki alanlardan YEM içerik oranı en düşük olanlar seçilmeye dikkat edildi. Bu çalışmada YEM olarak kullanılan Tween 80 uzun zincir yapısına sahip olduğundan tek başına y/s mikroemülsiyonlarını oluşturabilmektedir (M Jayne Lawrence, 1994; Malcolmson & Lawrence, 1993, 1995; Tenjarla, 1999). Bununla birlikte, YYEM'ler, arayüzey bölgesinden dış faza partisionundan dolayı seyreltmeden kaynaklı mikroemülsiyonun bozulmasına neden olabilir (Warisnoicharoen, Lansley, & Lawrence, 2000).

Bu çalışmada etkin madde olarak kullanılan resveratrol suda çözünmeyip yağda çözünen bir madde olduğu için formülasyondaki yağ oranının da yeterli miktarda olması önemli bir durumdur. Daha önce de belirtildiği gibi, düşük miktarda resveratrol (% 0,05 g/g) içeren berrak görümlü formülasyonlardan düşük miktarda yağ ve yüksek miktarda su içeren formülasyonlar seçildi.

Üçgen faz diyagramları mikroemülsiyon formülasyonların hazırlanmasını kolaylaştırmaktadır (Rani et al., 2019). Ayrıca nano boyutlu emülsiyonların oluşumunu kolaylaştıran ekspanyanların konsantrasyon aralığının belirlenmesi bu faz diyagram sistemleri ile sağlanmaktadır (İbrahim, Abdallah, El-Megrab, & El-Nahas, 2018). Üçgen faz diyagramı üzerinde y/s tipi berrak görüntüye sahip mikroemülsiyonların çok dar bir alana sahip olduğu görülmektedir (Şekil 4-6). Mikroemülsiyonların dar bir alanda meydana gelmesinin nedenlerinden biri de formülasyonda YYEM kullanılmamasına bağlandı (M Jayne Lawrence & Gareth D Rees, 2000).

Faz diyagramı incelendiğinde y/s emülsiyonun üçgen faz diyagramının orta yukarı ve sol bölgelerinde (su içeriği yüksek olan bölgeler) meydana gelirken, üçgen faz

diyagramının sağında (yağ içeriğ yüksek bölgeler) s/y tipi emülsiyonların meydana geldiği görülmektedir. (Şekil 4 -7 ve Şekil 4-8). YEM olarak kullanılan Tween 80'nin HLB değeri yüksek olduğundan dolayı (HLB: 15) üçgen faz diyagramı üzerinde geniş bir alanda y/s emülsiyonların oluştuğu görülmektedir (Şekil 4-7). Su fazı içeriğinin %20 - 60 aralığında olduğu formülasyonların jel yapıda olduğu saptandı (Şekil 4-9). Su içeriğinin %60'tan yüksek olması şişmiş olan jel yapısını dağıtıp dispers sistem oluşturdu görüldü. Su fazı oranının %20'den düşük olması jel yapısını oluşturmak için yeterli olmadığı belirlendi. Bu durum, yüzey etkin madde zincirlerinin şişmesi için kritik olan polioksietilen gruplarını hidratlamak için dispersiyon sistemlerinde %20'den fazla su içeriğine ihtiyaç duyulduğuna bağlanmıştır (Syed & Peh, 2014). Sulu faz içeriğinin %75'ten büyük olduğu şeffaf formülasyonların daha iyi bir akıcılığa sahip olduğu tespit edildi. Şeffaf görünümlü mikroemülsiyon formülasyonların elde edilmesi için YEM'nin yağ fazı oranının 12:1'den büyük olması gerektiği saptandı.

Mikroemülsiyon oluşum alanından, optimum olduğu ön görülen şeffaf görünümlü 18 adet formülasyon 72 saat boyunca ortam sıcaklığında bekletildi. Daha sonra fiziksel görüntü ve akıcılık özelliğine göre değerlendirilen formülasyonlardan 7 tanesi olumlu olarak değerlendirildi. Bu formülasyonlar Bölüm 3.2.8.3'te anlatıldığı biçimde ön stabilite testlerine tabi tutuldu. Hızlandırılmış stabilite yöntemleri, zorlayıcı koşulların uyguladıkları stres sebebiyle emülsiyonların uzun süreli stabilite durumlarının değerlendirilmesinde kolaylık sağlamak amaçlı kullanılabilir. Ön stabilite testlerinde sonucunda bazı formülasyonlarda faz ayrımı, çepere yapışma, kremalaşma gibi sorunlar gözlemlenirken, kararlılığı bozulmayan ME4, ME5, ME6, ME8 ve ME9 kodlu formülasyonlar Bölüm 3.2.8.4'te anlatıldığı biçimde damlacık boyutu ve damlacık boyutu dağılımları incelendi. Damlacık boyutu büyüklüğü, stabiliteyi ve etkin madde salınımı etkilemesi nedeniyle mikroemülsiyonların en önemli karakterizasyon testlerinden biri olarak kabul edilir (Zaichik et al., 2018). Damlacık boyutu büyüklüğünün küçültülmesi, aktif bileşenlerin deri yoluyla penetrasyonunun artmasına katkıda bulunur (Kaur & Ajitha, 2019). Damlacık boyutları 140 nm'nin altında olan şeffaf görünümlü termodinamik olarak stabil formülasyonlar mikroemülsiyon olarak kabul edilmektedir (Kreuter, 2014). Bu tez çalışmasında hazırlanan etkin madde içermeyen mikroemülsiyonların ortalama damlacık boyutlarının 12,42 – 30,48 nm arasında olduğu görüldü (Şekil 4-12 – Şekil 4-17).

Formülasyonların damlacık boyutların homojen bir dağılıma sahip olup olmadığının tespit etmek için polidispersite indeksi değerlendirildi. Transdermal ilaç taşıyıcı sistemleri için geliştirilmiş olan polimer bazlı nanopartiküller ($PDI \leq 0.2$) ve lipid bazlı taşıyıcı sistemler ($PDI < 0.3$) dışında dermal taşıyıcı sistemler için sabit PDI değerleri aralığı yoktur (van Staden, du Plessis, & Viljoen, 2020). Dinamik ışık saçılımı tekniği, kümelenmiş küçük parçacıkları tek bir büyük parçacık olarak algılayabilir, bu nedenle mikroskopik teknikler, genel olarak farmasötik aralık olarak kabul edilen PDI değerleri aralığının (0.05 - 0.7) aşılması durumlarında daha uygun olabilir (Danaei et al., 2018). PDI değerleri sırasıyla 0,722, 0,688, 0,902 olan ME4, ME5 ve ME6 kodlu formülasyonların damlacık boyut dağılımı homojen olmayıp büyük olasılıkla uzun süreli stabilite testlerinde damlacık birleşmesi ve sonunda faz ayrımı gözükmesi olacağı tahmin edildiğinden, sonraki çalışma aşamaları için kullanılmadı. PDI değerleri sırasıyla 0,200, 0,145 ve 0,207 olan ME8, ME9 ve ME10 kodlu formülasyonlar damlacık boyutu dağılımı bakımında kabul edilebilir aralıktaki olduğu görüldü. Yapılan literatür taramasında daha önce yapılan çalışmaların PDI değerleri ile uyumlu oldukları görülmektedir (Tang et al., 2019). ME8 ve ME9 kodlu formülasyonlar etkin madde yüklenecek formülasyonlar olarak belirlendi.

Nanopartiküllerin kararlılığı ayrıca kısmen olarak, partiküller arasındaki elektrostatik itici etkileşimlerin büyüklüğünü veren bir parametre olan yüzey zeta potansiyeline de bağlıdır (Doane, Chuang, Hill, & Burda, 2012). Yüksek zeta-potansiyeli, yüklü yüzeyler elektrostatik itme ile nanoparçacıkların toplanmasını ve kaynaşmasını engellediği için iyi dağılım kararlılığını gösterir. Zeta potansiyeli -10 ile +10 mV arasında olan nanopartiküller yaklaşık olarak nötr olarak kabul edilirken, zeta potansiyeli +30 mV'den büyük veya -30 mV'den az olan nanopartiküller sırasıyla kuvvetli katyonik ve kuvvetli anyonik olarak kabul edilir (Clogston & Patri, 2011). Çoğu hücresel membran negatif yüklü olduğundan, zeta potansiyeli bir nanoparçacığın membranlara nüfuz etme eğilimini etkileyebilir, katyonik parçacıklar genellikle hücre duvarı bozulması ile ilişkili daha fazla etki gösterir (Carter, Narasimhan, & Wang, 2019; Clogston & Patri, 2011; "Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics," 2017). Elde edilen negatif yüklü zeta-potansiyel değerleri, yağ fazında serbest yağ asitlerinin varlığından kaynaklanmaktadır (Umerska et al., 2016). Serbest yağ asitleri, dermal ilaç penetrasyonu arttırmak için SC lipidlerinin bozulması ve akışkanlaştırılmasıyla işlev gören penetrasyon arttırıcılar sınıfına girmektedir (Lane, 2013; van Zyl, du Preez,

Gerber, du Plessis, & Viljoen, 2016; Vaughn, Clark, Sivamani, & Shi, 2018; Viljoen, Cowley, du Preez, Gerber, & du Plessis, 2015). Bu nedenle, negatif yüklü formülasyonlar, pozitif yüklü formülasyonlara kıyasla dermal ilaç penetrasyonda daha az etkili olmaktadır (Carter et al., 2019). ME8 ve ME9 kodlu mikroemülsiyonların zeta potansiyellerin sırasıyla -12,2 mV ve -10,6 mV olduğundan nötr ve hafif anyonik olarak saptandı (Şekil 4-18 ve Şekil 4-19). Yapılan literatür taramasında bu çalışmada elde edilen zeta potansiyeli değerlerin daha önce yapılan çalışmadan daha yüksek olduğu görülmektedir (Y. Chen, Zhang, Yang, & Sun, 2015).

Formülasyonların kararlılığını ve etkinliğini destekleyen fiziksel karakterizasyon testleri kapsamında ME8, ME9 kodlu formülasyonların pH, iletkenlik ve viskoziteleri değerlendirildi.

Emülsiyon tipi preparatların faz sistemlerine göre tip tayini yapılabilmesi için iletkenlik ölçüm testleri kullanılmaktadır (Peltola et al., 2003). Formülasyonların içerisindeki su içeriği arttıkça iletkenlik değeri artmaktadır. Formülasyonların iletkenlik değerlerinin 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ye yakın olması, bunların su içinde yağ tipi emülsiyonlar olduğunu göstermektedir (Barot, Parejiya, Patel, Gohel, & Shelat, 2012; M. R. Patel, Patel, Parikh, Solanki, & Patel, 2009; Salimi, Zadeh, & Moghimipour, 2013). ME8 ve ME9 kodlu formülasyonların iletkenlik değerleri sırasıyla $127,7 \pm 0,10$ ve $124,3 \pm 0,08$ olarak ölçüldüğünden mikroemülsiyon tiplerinin y/s olduğu saptandı (Tablo 4-13). Ayrıca su içeriğinin artması ile iletkenliğin arttığı gözlemlendi. Bu durum daha önce yapılan bilimsel çalışmalar ile uyumlu olmaktadır (Kalaitzaki, Pouloupoulou, Xenakis, & Papadimitriou, 2014).

Formülasyonun pH değeri etkin maddelerin iyonizasyon derecesi açısından önem arz etmektedir. 5.0–9.0, dermal ilaç uygulamaları için uygun bir pH değeri aralığıdır (Rastogi & Yadav, 2014). Bununla birlikte, dermal ilaç uygulama sistemleri için optimal pH, doğal deri pH değerlerine yakın olan 4-5 aralığıdır. ME8 ve ME9 kodlu formülasyonların pH değerleri sırasıyla $6,36 \pm 0,03$ ve $6,28 \pm 0,01$ oldukları saptandı (Tablo 4-12). Resveratrol içermeyen formülasyonların hafif asidik yapıda olduğu bunun da yağ fazının yağ asitleri yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Reolojik ölçümler sonunda ME8 ve ME9 mikroemülsiyonların düşük viskozite gösterdikleri görüldü (Tablo 4-8 – Tablo 4-11). Yapılan literatür taramasında viskozite değerlerinin daha önce yapılan çalışmalar ile uyumlu oldukları görüldü (M. R. Patel et al., 2009).

ME9 kodlu formülasyonun TEM görüntüleri, iç faz damlacıkların uygun bir yapıda olduğunu gösterdi (Şekil 4-28).

Resveratrol yüklenecek makro emülsiyonların belirlenmesi için üçgen faz diyagramı üzerinde makro emülsiyon oluşum alanından, optimum olduğu ön görülen bulanık ve süt görünümlü 24 adet formülasyon 72 saat boyunca ortam sıcaklığında bekletildi. Daha sonra fiziksel görüntü ve akıcılık özelliklerine ve faz ayrımı olup olmamalarına göre değerlendirilen formülasyonlardan 13 tanesi olumlu olarak değerlendirildi. (Tablo 4-14) Bu formülasyonlar Bölüm 3.2.12.2’de anlatıldığı biçimde ön stabilite testlerine tabi tutuldu. Ön stabilite testlerinde kararlılığı bozulmayan E19, E21, E23 ve E24 kodlu formülasyonlar Bölüm 3.2.8.4’te anlatıldığı biçimde damlacık boyutu ve damlacık boyutu dağılımları incelendi. Makroemülsiyonlar damlacık boyutları 200 – 10000 nm arasında olan bulanık veya süt görünümlü kinetik olarak stabil olan kolloidal sistemlerdir (Prince, 2012). Resveratrol içermeyen makro emülsiyon formülasyonların ortalama damlacık boyutları 193,1 – 3429 nm arasında saptandı (Şekil 4-29 – Şekil 4-32).

Makro emülsiyon formülasyonların PDI değerlerinin 0,212 – 0,386 aralığında olduğu saptandı (Şekil 4-29 – Şekil 4-32). PDI değerlerin daha önce de belirtilen farmasötik emülsiyon sistemler için kabul edilebilir aralıktadır. Ortalama damlacık boyutları farklı olan formülasyonların PDI değerleri arasında büyük fark bulunmadığından dolayı en kararlı formülasyonu tespit etmek için bu formülasyonlar etkin madde yüklenecek formülasyonlar olarak belirlendi. Ayrıca, PDI değeri 0,212 olan ve ortalama damlacık boyutu 3429 nm olan E21 kodlu formülasyon optimum en yakın formülasyon olarak öngörüldüğünden dolayı zeta potansiyeli değerlendirildi. Zeta potansiyeli -8,67 mV olarak ölçülen emülsiyon nötr formülasyon olarak değerlendirildi (Şekil 4-33).

Fiziksel karakterizasyon çalışmaları kapsamında E19, E21, E23 ve E24 kodlu formülasyonların pH, iletkenlik ve viskozite ölçümleri değerlendirildi. İletkenlik ölçüm değerleri ($129,8 \pm 0,25$ – $136,8 \pm 0,1$) bunların y/s tipi emülsiyon olduklarını göstermektedir (Tablo 4-24). pH ölçümlerin 4,62 – 4,74 aralığında saptanması hafif asidik olduklarını göstermektedir (Tablo 4-23). Bu pH değerleri sağlıklı deri pH yakını olduğundan dolayı deriden uygulamalar için uygun olarak değerlendirildi.

Emülsiyonların bekletilmesi sırasında damlacık boyutunda veya sayısında veya emülsifiye edici ajanın migrasyonunda bir değişiklik, görünür viskozitedeki bir değişiklik ile tespit edilebilir. Emülsiyonlar genelde non-Newtonian akış göstermektedir

(Khan et al., 2011). y/s emülsiyonlarında meydana gelen flokülasyon formülasyonlarda ani bir viskozite artışına neden olmaktadır (Khan et al., 2011). Viskozite ölçüm değerleri ile formülasyonların non- Newtonian akış gösterdikleri belirlendi (Tablo 4-15 – Tablo 4-22).

Emülsiyon tipi kolloidal sistemlere iki farklı şekilde etkin madde yüklenebilmektedir. Birinci yöntemde, etkin madde çözündüğü faza eklenerek daha sonra iki farklı fazın karıştırılması yapılmaktadır. İkinci yöntemde ise formülasyonlar hazırlandıktan sonra etkin madde yüklenmesi yapılmaktadır. Yapılan çalışmalarda etkin maddenin çözündüğü faza eklendikten sonra mikroemülsiyonun hemen oluştuğu, mikroemülsiyon oluşturulduktan sonra etkin maddenin yüklenebilmesi için 48 veya 72 saat karıştırılarak dengeye gelmesi için beklenilmesi gerektiği görülmüştür (H. Chen et al., 2006; Peltola et al., 2003). Bu çalışmada etkin madde olan resveratrol yağ fazı ve YEM karışımında çözülerek, daha sonra üzerine su fazı ilave edilerek formülasyonlara yüklendi.

Belirlenen mikroemülsiyon ve makroemülsiyon formülasyonlarının fizikokimyasal özellikleri ile ilgili değerlendirmeler yapıldı. Bu kapsamda, mikroemülsiyonların ve makroemülsiyonların damlacık boyutu, damlacık boyutu dağılımı (PDI), zeta potansiyelleri, pH, iletkenlik ve reolojik özellikleri incelendi.

ME8 ve ME9 kodlu formülasyonlara etkin madde yüklenmesi sonrası, formülasyonlarda faz ayrışması, kremalaşma gibi kararsız hal durumları gözlenmedi. Etkin madde içeren formülasyonların damlacık boyutlarında etkin madde içermeyen formülasyonlara göre büyük bir değişiklik (12,27 - 12,34 nm) gözlenmedi. Formülasyonda bulunan yağlı fazın etkin maddenin tümünü çözebilecek miktarda olmasından dolayı, YEM'nin resveratrolün çözünürlüğünü artırma etkisine rağmen, etkin maddenin büyük olasılıkla yüzeyler arası tabakaya geçmesini ve damlacık boyutunda büyüme meydana gelmesini engellemiştir (Juškaitė, Ramanauskienė, & Briedis, 2015; Saribey, Kahraman, ERDAL, & GÜNGÖR, 2021). Bu çalışmada daha az miktarda YEM (20,8 g) kullanılmasına rağmen daha önce yapılan çalışmaya göre (YEM: 33,8 g, damlacık boyutu: 70,3 – 74,0 nm)) ortalama damlacık boyutunun daha küçük olduğu saptandı (Cho, Kim, Bae, Mok, & Park, 2008).

RES-ME8 formülasyonun PDI değeri 0,103 iken RES-ME9 formülasyonun PDI değeri 0,046 olarak saptandı. RES-ME9 mikromeülsiyon formülasyonun zeta potansiyel değeri -2,13 mV olarak saptandı. Yapılan literatür taramasında zeta potansiyel değerinin daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu olduğu görüldü (Y. Chen et al., 2015; Tang et al.,

2019). ME8-RES mikroemülsiyon formülasyonu kararlılık göstermediğinden zeta potansiyeli değeri homojen olarak değerlendirilmedi (Şekil 4-22).

Etkin madde yüklenen makro emülsiyon formülasyonların damlacık boyutların arttığı görüldü (Şekil 4-34 – 4-37). Optimum formülasyon olarak öngörülen E21-RES kodlu formülasyonun ortalama damlacık boyutunun 4965 nm ve PDI değerinin 0,210 olduğu saptandı. Damlacık boyutu ve PDI değerleri emülsiyon tipi formülasyonlar için daha önce belirtilen değer aralığındadır. Zeta potansiyeli değerinin -3,95 mV olduğu ve nötr formülasyon olarak kabul edilen formülasyonun etkin madde yüklendikten sonra zeta değerinin düşük oranda azaldığı saptandı.

Etkin madde yüklü ME8-RES ve ME9-RES kodlu formülasyonların pH, iletkenlik ve viskoziteleri değerlendirildi. Etkin madde yüklendikten sonra formülasyonların fiziksel özelliklerini koruduğu görüldü.

Makro emülsiyon formülasyonları etkin madde yüklendikten sonra pH, iletkenlik ve viskozite ölçümü değerlendirildi. E19, E21, E23 ve E24 makro emülsiyon formülasyonların, etkin madde ile yüklendikten sonra da fiziksel özelliklerini koruduğu görüldü. Resveratrol içermeyen makro emülsiyonlara göre büyük bir değişiklik saptanmadı.

Difüzyon hücresi kullanılarak *in vitro* ortamda etkin maddenin selüloz asetat membrandan (0,45 µm) geçişi, *ex-vivo* ortamda ise; domuz kulağı derisinden (doğal membran) etkin maddenin geçişinin araştırıldığı çalışmalarda resöptör faz olarak derişimde etanol su karışımı (1:1) kullanıldı. Ayrıca sink koşulunu sağlamak için 5 g/L derişimde Tween 20 içeren etanol distile su karışımına eklenmiştir (Scalia et al., 2015).

Resveratrolün geliştirilen mikroemülsiyon, makro emülsiyon formülasyonlarından ve standart çözeltiden *in-vitro* ortamda önce selüloz asetat membrandan geçişi incelendi. Elde edilen sonuçları r^2 ve difüzyon katsayısına göre değerlendirildiğinde (Tablo 4-26) formülasyonların salım profillerin Higuchi kinetik modeline göre daha uygun olduğu saptandı. ME9 formülasyonundan etkin maddenin salınımın yavaş olduğu ama 6 saatin sonunda en çok madde geçişin olduğu görüldü (Tablo 4-25). Standart çözeltiden resveratrol salınımın hızlı bir şekilde başladığı tespit edildi. Standart çözeltinin viskozitesinin görsel olarak değerlendirildiğinde mikroemülsiyon ve makro emülsiyondan daha düşük olduğu görüldü. Viskozitesi daha düşük olan sistemlerden etkin madde salımı daha hızlıdır (Tas, Ozkan, Okyar, & Savaser, 2007). Ayrıca makro emülsiyon formülasyonuna göre daha çok madde salınımın olması standart çözelti

içerisinde yer alan etanolün yüksek çözebilme kabiliyetine bağlandı. Makro emülsiyon formülasyonlarından etkin madde salınımının daha düşük olması damlacık boyutunun büyüklüğünden kaynaklandığı düşünülmektedir. Damlacık boyutunun küçük olması penetrasyon için etkilidir (Paolino, Ventura, Nistico, Puglisi, & Fresta, 2002). Emülsiyon bazlı sistemlerden etkin madde salınımı, çözünürlüğe ve sulu faz ve yağlı faz arasındaki partiyon katsayısına bağlı değişebilmektedir (Hu, Yen, Wang, & Chu, 2018). Resveratrolün sudaki çözünürlüğü yağdaki çözünürlüğünden daha düşük olduğundan, standart çözeltiden salınımı daha hızlı olmaktadır. ME9 mikroemülsiyonu, E21 makroemülsiyonu ve standart çözeltiden etkin maddelerin selüloz asetat membrandan geçen miktarları tek yönlü varyans analizi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. *İn vitro* çalışmada tüm formülasyonların 6 saat sonunda salım yaptıkları etkin madde miktarları anlamlı fark göstermiştir ($p<0,05$). ME9 mikroemülsiyonu, E21 makro emülsiyonu ve standart çözelti formülasyonların 6 saat sonunda selüloz asetat membrandan yaptıkları salım miktarların ortalamaları ikişerli gruplar halinde karşılaştırıldı ve t-Testi ile değerlendirildi. *İn vitro* çalışmada 6 saat sonunda ME9 mikroemülsiyonu, standart çözelti ve E21 makro emülsiyonu formülasyonların ikişerli gruplar halinde karşılaştırılmasında tüm grupların birbirinden istatistiksel olarak anlamlı bir fark gösterdiği saptandı ($p<0,05$).

Bundan sonraki aşamada ise bu formülasyonlar ile *ex vivo* ortamda resveratrolün domuz kulağı derisinden geçiş çalışması yapılmıştır. Topikal kozmetikler söz konusu olduğunda, etkin maddenin diğer deri katmanlarında tutulabilmesi için SC içinden nüfuz etmesinin artırılması önemlidir. Etkin maddenin deride istenilen etkiyi gösterebilmesi sistemik dolaşıma geçmeden derinin kan damarı içermeyen tabakalarda tutulması gerekmektedir (Marto, Ascenso, Simoes, Almeida, & Ribeiro, 2016). Daha önceki çalışmalarda 3 μ m'den küçük damlacıklara sahip formülasyonların difüzyon yoluyla ve kıl folikülleri yoluyla deriye nüfuz ettiği, 3 μ m - 10 μ m arasında değişen büyüklükteki damlacıklara sahip formülasyonların ise kıl foliküllerinden deriye nüfuz ettiği belirtilmiştir (Marto et al., 2019). Damlacık boyutları >10 μ m olan formülasyonlar deri yüzeyinde kalma eğilimindedir ve aktif madde sonunda damlacıklardan deriye yayılır. Makroemülsiyonun damlacık boyutundan dolayı topikal kozmetikler için, mikroemülsiyonların ise hem damlacık boyutu hem de salım süresi bakımında sistemik dolaşım için daha uygun olabileceği öngörülmektedir. Standart çözeltiden resveratrolün

hızlı ve çok miktarda geçmesi topikal uygulamalar için uygun olmadığını göstermektedir.

Zamana karşı kümülatif deriden geçen resveratrol grafiğinde doğrusal kısmının eğiminden etkin maddenin deriden geçişinin kararlı duruma ulaştığı kabul edilerek, akı değerleri hesaplandı. Çalışmada donör fazda uygulanan formülasyondaki resveratrol konsantrasyonuna göre formülasyonlardan resveratrol'ün geçirgenlik katsayısı değerleri hesaplandı (Tablo 4-29). Öncelikle 24 saat sonunda, katı mikroiğne ile işlem görmemiş domuz kulağı derisinden geçen resveratrol miktarı, ME9 formülasyonunda $0,004 \pm 0.0002 \text{ mg/cm}^2$, E21 formülasyonunda $0,001 \pm 6,67 \times 10^{-5} \text{ mg/cm}^2$ ve standart çözeltiden formülasyonunda $0,013 \pm 0.0001 \text{ mg/cm}^2$ olarak bulunmuştur. Sonuç olarak geliştirilen ME9 formülasyonu katı mikroiğne ile işlem görmemiş domuz kulağı derisinden E21 formülasyona göre 24 saatin sonunda daha iyi geçiş göstermiştir (Tablo 4-28). Standart çözeltinin içeriğindeki etil alkolün derinin yapısını bozarak geçişi artırdığı ve hızlı bir salım gösterdiği saptandı (Şekil 4-48). ME9 mikroemülsiyonu, E21 makroemülsiyonu ve standart çözeltiden etkin maddelerin domuz kulağı derisinden geçen miktarları tek yönlü varyans analizi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. *Ex vivo* çalışmada tüm formülasyonlardan 24 saat sonunda reseptör ortama geçen etkin madde miktarları anlamlı fark göstermiştir ($p < 0,05$). ME9 mikroemülsiyonu, E21 makro emülsiyonu ve standart çözelti formülasyonların 24 saat sonunda domuz kulağı derisinden yaptıkları resvetratrol geçiş miktarların ortalamaları ikişerli gruplar halinde karşılaştırıldı ve t-testi ile değerlendirildi. *Ex vivo* çalışmada 24 saat sonunda ME9 mikroemülsiyonu, E21 makromeülsiyonu ve standart çözelti formülasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p < 0,05$).

Ayrıca bu formülasyonlar Bölüm 3.2.15 'te anlatıldığı şekilde *ex-vivo* ortamda katı mikroiğne işlem görmüş domuz kulağı derisinden yapılan geçiş çalışmaları karşılaştırılmıştır (Tablo 4-30). Katı mikroiğne ile işlem görmüş domuz kulağı derisinden 24 saat sonunda geçen resveratrol miktarı ME9 formülasyonunda $0,008 \pm 0.0002 \text{ mg/cm}^2$, E21 formülasyonunda $0,0027 \pm 0,0001 \text{ mg/cm}^2$ ve standart çözelti formülasyonunda $0,021 \pm 0,0001 \text{ mg/cm}^2$ olarak bulunmuştur. Katı mikroiğnelerin deriden geçişi artırma oranı, mikroiğnelerin deri üzerinde oluşturdukları gözenek sayısına ve çapına bağlıdır. Ayrıca mikroiğnelerin uygulama sayısı da dolaylı olarak deriden permeasyonu etkileyen faktörlerdendir (Mojeiko, de Brito, Salata, & Lopes, 2019). Daha önce yapılan bir çalışmada 8 kez domuz derisine uygulanan katı

mikroiğneler, büyük miktarda etkin maddenin deriden geçişini artırmıştır (Mojeiko et al., 2019). Bu çalışmamızda mikroiğneler 3 kez deriye uygulandığında, daha önce yapılan çalışmalarda gibi yüksek oranlarda (%550,9) artışların meydana gelmediği görüldü (Paleco, Vučen, Crean, Moore, & Scalia, 2014). Katı mikroiğne uygulanan derilerden 24 saatin sonunda reseptör faza geçen etkin madde miktarı standart çözeltide 1,6 kat artarken, ME9 mikroemülsiyonu ve E21 makro emülsiyonu formülasyonlarından sırasıyla 2,04 ve 1,8 kat artmıştır. Bununla birlikte katı mikroiğne uygulanmamış deride 24 saatin sonunda reseptör fazda etkin madde tespit edilirken, mikroiğne uygulanmış deride 6. saatin sonundan itibaren etkin maddenin tespit edildiği görülmektedir. Bu da mikroiğnelerin etkin maddenin deriden geçmeye başlamasını hızlandırdığını göstermektedir. Daha sonra yapılacal transdermal çalışmalarda biyoyararlanımı sorunu üstesinden gelmek için iyi bir yöntem olarak düşünülebilir.

Mikroemülsiyon formülasyonu, makro emülsiyon formülasyonu ve standart çözeltiden elde edilen sonuçlar tek yönlü varyans analiziyle (ANOVA) istatistiksel olarak değerlendirildi. Katı mikroiğne ile yapılan *ex vivo* çalışmada ME9, E21 ve standart çözelti formülasyonlarında 24 saat sonunda deriden geçen madde miktarları arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p < 0,05$). Bu formülasyonların 24 saat sonunda katı mikroiğne ile işlem görmüş domuz kulağı derisinden yaptıkları resvetratrol geçiş miktarların ortalamaları ikişerli gruplar halinde karşılaştırıldı ve t-testi ile değerlendirildi. İkişerli gruplar halinde yapılan t-testine göre 24 saat sonunda ME9 mikroemülsiyonu, E21 makroemülsiyonu ve standart çözelti formülasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p < 0,05$).

Bu çalışmadan elde edilen salım verileri değerlendirildiğinde; selüloz asetat membran ve domuz derisi ile yapılan salım çalışmalarına ait sonuçlar karşılaştırıldığı zaman formülasyonlardan etkin maddenin salım hızı ile deriden geçiş hızları arasında (akı) farklılık olduğu gözlemlendi (Tablo 4-27 ve Tablo 4-29). Bu durum formülasyon bileşenlerinin SC'un bariyer etkisini sağlayan yapısındaki lipit tabaka ile etkileşimine bağlı olabileceği düşünülmektedir (S. Heuschkel et al., 2008).

Katı mikroiğne işlem görmüş derilerden geçen resveratrol miktarların tüm formülasyonlarda artığı saptandı. 24 sonunda katı mikroiğne ile işlem görmüş ve katı mikroiğne ile işlem görmemiş derilerden geçen ortalama etkin madde miktarları her bir formülasyon için t-testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. ME9 mikroemülsiyonu, E21 makroemülsiyonu ve standart çözelti formülasyonlarından 24 saat sonunda reseptör

ortamına geçen ortalama etkin madde miktarların anlamlı olarak arttığı saptandı ($p < 0,05$).

Uzun süreli stabilite çalışmalarında resveratrol içeren ME9 mikroemülsiyonu ve E21 makro emülsiyonu formülasyonların fiziksel görünüşleri, damlacık büyüklükleri, polidispersite indeksleri, zeta potansiyelleri, viskoziteleri ve etkin madde miktar tayini sonuçları değerlendirilmiştir.

6 ay boyunca $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ sıcaklık ve $\%60 \pm 5$ nem ortamında muhafaza edilen ME9 mikroemülsiyonun, fiziksel görünüş, damlacık büyüklüğü, PDI, zeta potansiyeli, pH, iletkenlik ve viskozite değerlerinde önemli bir değişiklik olmadığı, etkin madde miktar tayinin de ise $\%72,63$ 'ün bozulmadığı saptandı. Etkin madde kaybının, formülasyon içerisine herhangi bir antioksidan madde olmamasına bağlandı.

ME9 mikroemülsiyonun $40^{\circ}\text{C} \pm 2$ sıcaklık $\%75 \pm 5$ nem koşullarında 6 ay sonunda fiziksel görüntüsünde, damlacık boyutu, PDI değeri, zeta potansiyeli ve pH değerlerinde önemli bir değişiklik belirlenmezken, İletkenlik ve viskozite değerlerinde bir artışın meydana geldiği saptandı. Bu artışın mikroemülsiyonlar için kabul edilebilir bir aralıkta olduğu bilinmektedir. Ayrıca bozunmadan kalan etkin madde oranının $\%57,28$ olduğu saptandı.

E21 makroemülsiyonun 6 ay boyunca 25°C sıcaklık ve $\%60 \pm 5$ nem ortamında muhafaza edilmesinden sonra yapılan değerlendirmede fiziksel görüntüde faz ayrımının olmadığı, damlacık boyutu büyüklüğünün azaldığı ama kabul edilebilir aralıkta olduğu, PDI, zeta potansiyeli, iletkenlik, pH ve viskozitede önemli bir değişiklik olmadığı saptandı. Bozunmadan kalan etkin madde oranının $\%61,58$ olduğu görüldü.

E21 makroemülsiyonunda 40°C sıcaklık $\%60$ nem koşullarında 6 ay sonunda fiziksel faz ayrımı ve katılaşma meydana geldiğinden dolayı diğer ölçümler yapılmamış ve E21 formülasyonunun bu sıcaklıkta dayanıklı olmadığı ve bozunduğu kanısına varılmıştır.

Uzun süreli stabilite çalışmalarında resveratrol yüklü ME9 mikromeülsiyonun ve E21 makroemülsiyonun fiziksel görünüş (Şekil 4-50), damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksleri (Şekil 4-51 ve Şekil 4-55) zeta potansiyeli (Şekil 4-52 ve Şekil 4-56), viskozite (Tablo 4-33 ve Tablo 4-35), pH, iletkenlik (Tablo 4-32) ve etkin madde miktar değerlerinin (Tablo 4-37 ve Tablo 4-38) incelenmesi sonucunda formülasyonların $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ sıcaklık $\%60 \pm 5$ nem ortamında daha dayanıklı oldukları kanısına varılmıştır.

Uzun süreli stabilite test sonuçları değerlendirildiğinde resveratrolün fiziksel stabilitesinin mikroemülsiyon formülasyonları ile artırılabilceği saptandı. Bu çalışmada

elde edilen sonuçların, önceki çalışmalarda elde edilen kanılarla uyumlu olduğu saptandı (Y. Chen et al., 2015). Ayrıca, nano boyutlu emülsiyonların resveratrolün kimyasal stabilitesini artırdığı ve aktif olmayan izomerlerine dönüşmesini engellediğini daha önce yapılan bir çalışmada belirtilmiştir (Sessa, Tsao, Liu, Ferrari, & Donsi, 2011).

Sonuç olarak bu çalışmada resveratrolün topikal mikroemülsiyon ve makroemülsiyon formülasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyonlar aynı oranda resveratrol içeren standart çözelti ile *in vitro* ve *ex vivo* ortamda karşılaştırılarak incelenmiştir. *In vitro* salım çalışması sonunda standart çözeltideki resveratrolün çok hızlı bir şekilde reseptör faza geçiş yaptığı görülmüş olup, 6 saatin sonunda en yüksek miktarda geçişin ise mikroemülsiyon formülasyonu ile gerçekleştiği saptanmıştır. Bunu sırasıyla standart çözelti ve makroemülsiyon formülasyonları izlemiştir. Katı mikroiğnelerle işlem görmüş deride resveratrol içeren formülasyonlar uygulandıktan sonra domuz kulağı derisinden geçen en yüksek resveratrol miktarının mikroemülsiyon formülasyonu ile gerçekleştirildiği görülmüştür. Bu verilere dayanarak katı mikroiğneler ile kombine edilmiş resveratrol içeren mikroemülsiyonun derinin bariyer tabakasını aşmada daha etkili olacağı ve böylece transdermal uygulamada daha etkin tedavilerin yapılmasına katkıda bulunacağı öngörülmüştür. Sonraki dönem çalışmalarında ME9 formülasyonun *in vivo* ortamda transdermal uygulanmasının araştırılması ve oral uygulamada görülen biyoyararlanım sorunun, transdermal yol ile aşılmaya çalışılması planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- Acharya, D. P., & Hartley, P. G. (2012). Progress in microemulsion characterization. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 17(5), 274-280. doi:10.1016/j.cocis.2012.07.002
- Agache, P. (2004). The human skin: an overview. *Agache's Measuring the Skin: Non-invasive Investigations, Physiology, Normal Constants*: Springer International Publishing.
- Agache, P., Humbert, P., & Fanian, F. (2017). *Agache's Measuring the Skin: Non-invasive Investigations, Physiology, Normal Constants*: Springer International Publishing.
- Agarwal, A., & Prabakaran, S. A. (2005). Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian J Exp Biol*, 43(11), 963-974. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16315393>
- Aggarwal, B. B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R. S., Seeram, N. P., Shishodia, S., & Takada, Y. (2004). Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res*, 24(5A), 2783-2840. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15517885>
- Agrawal, O. P., & Agrawal, S. (2012). An overview of new drug delivery system: microemulsion. *Asian J Pharm Sci Tech*, 2(1), 5-12.
- Al-Zahrani, S., Zaric, M., McCrudden, C., Scott, C., Kissenpfennig, A., & Donnelly, R. F. (2012). Microneedle-mediated vaccine delivery: harnessing cutaneous immunobiology to improve efficacy. *Expert opinion on drug delivery*, 9(5), 541-550.
- Alany, R. G., Tucker, I. G., Davies, N. M., & Rades, T. (2001). Characterizing colloidal structures of pseudoternary phase diagrams formed by oil/water/amphiphile systems. *Drug development and industrial pharmacy*, 27(1), 31-38.
- Alonso, C., Martí, M., Barba, C., Carrer, V., Rubio, L., & Coderch, L. (2017). Skin permeation and antioxidant efficacy of topically applied resveratrol. *Archives of dermatological research*, 309(6), 423-431.
- Amri, A., Chaumeil, J., Sfar, S., & Charrueau, C. (2012). Administration of resveratrol: what formulation solutions to bioavailability limitations? *Journal of Controlled Release*, 158(2), 182-193.
- Asbill, C. S., & Michniak, B. B. (2000). Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity. *Pharm Sci Technol Today*, 3(1), 36-41. doi:10.1016/s1461-5347(99)00225-4
- Ates, G., Steinmetz, F. P., Doktorova, T. Y., Madden, J. C., & Rogiers, V. (2016). Linking existing in vitro dermal absorption data to physicochemical properties: Contribution to the design of a weight-of-evidence approach for the safety evaluation of cosmetic ingredients with low dermal bioavailability. *Regul Toxicol Pharmacol*, 76, 74-78. doi:10.1016/j.yrtph.2016.01.015
- Azeem, A., Rizwan, M., Ahmad, F. J., Khan, Z. I., Khar, R. K., Aqil, M., & Talegaonkar, S. (2008). Emerging role of microemulsions in cosmetics. *Recent patents on drug delivery & formulation*, 2(3), 275-289.
- Azeem, A., Rizwan, M., Ahmad, F. J., Khan, Z. I., Khar, R. K., Aqil, M., & Talegaonkar, S. (2008). Emerging role of microemulsions in cosmetics. *Recent Pat Drug Deliv Formul*, 2(3), 275-289. doi:10.2174/187221108786241624

- Aziz, M. H., Afaq, F., & Ahmad, N. (2005). Prevention of Ultraviolet-B Radiation Damage by Resveratrol in Mouse Skin Is Mediated via Modulation in Survivin[¶]. *Photochemistry and photobiology*, 81(1), 25-31.
- Babiuk, S., Baca-Estrada, M. E., Foldvari, M., Baizer, L., Stout, R., Storms, M., . . . Babiuk, L. (2003). Needle-free topical electroporation improves gene expression from plasmids administered in porcine skin. *Mol Ther*, 8(6), 992-998. doi:10.1016/j.ymthe.2003.09.008
- Badkar, A. V., & Banga, A. K. (2002). Electrically enhanced transdermal delivery of a macromolecule. *J Pharm Pharmacol*, 54(7), 907-912. doi:10.1211/002235702760089018
- Bala, A., Mondal, C., Haldar, P. K., & Khandelwal, B. (2017). Oxidative stress in inflammatory cells of patient with rheumatoid arthritis: clinical efficacy of dietary antioxidants. *Inflammopharmacology*, 25(6), 595-607. doi:10.1007/s10787-017-0397-1
- Banga, A. K., Bose, S., & Ghosh, T. K. (1999). Iontophoresis and electroporation: comparisons and contrasts. *Int J Pharm*, 179(1), 1-19. doi:10.1016/s0378-5173(98)00360-3
- Barot, B. S., Parejiya, P. B., Patel, H. K., Gohel, M. C., & Shelat, P. K. (2012). Microemulsion-Based Gel of Terbinafine for the Treatment of Onychomycosis: Optimization of Formulation Using D-Optimal Design. *AAPS PharmSciTech*, 13(1), 184-192. doi:10.1208/s12249-011-9742-7
- Benfeldt, E., Serup, J., & Menne, T. (1999). Effect of barrier perturbation on cutaneous salicylic acid penetration in human skin: in vivo pharmacokinetics using microdialysis and non-invasive quantification of barrier function. *The British journal of dermatology*, 140(4), 739-748.
- Benson, H. A. (2005). Transdermal drug delivery: penetration enhancement techniques. *Current drug delivery*, 2(1), 23-33.
- Berce, C., Muresan, M.-S., Soritau, O., Petrushev, B., Tefas, L., Rigo, I., . . . Tomuleasa, C. (2018). Cutaneous wound healing using polymeric surgical dressings based on chitosan, sodium hyaluronate and resveratrol. A preclinical experimental study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 163, 155-166.
- Berner, B., Mazzenga, G. C., Otte, J. H., Steffens, R. J., Juang, R. H., & Ebert, C. D. (1989). Ethanol: water mutually enhanced transdermal therapeutic system II: skin permeation of ethanol and nitroglycerin. *J Pharm Sci*, 78(5), 402-407. doi:10.1002/jps.2600780512
- Bhowmik, D. (2012). Recent advances in novel topical drug delivery system. *The Pharma Innovation*, 1(9).
- Blank, I. H., Scheuplein, R. J., & MacFarlane, D. J. (1967). Mechanism of percutaneous absorption. 3. The effect of temperature on the transport of non-electrolytes across the skin. *The Journal of investigative dermatology*, 49(6), 582-589.
- Blum, R., Dingier, A., Gohla, S., Müller, R., & Niehus, H. (1999). Solidlipid nanoparticles (SLN/Lipopearls)-a pharmaceutical and cosmetic carrier for the application of vitamin E in dermal products. *J. Microencapsul*, 16, 751-767.
- Bo Nielsen, J., Ahm Sorensen, J., & Nielsen, F. (2009). The usual suspects-influence of physicochemical properties on lag time, skin deposition, and percutaneous penetration of nine model compounds. *J Toxicol Environ Health A*, 72(5), 315-323. doi:10.1080/15287390802529872
- Bodenlenz, M., Hofferer, C., Magnes, C., Schaller-Ammann, R., Schaupp, L., Feichtner, F., . . . Pieber, T. R. (2012). Dermal PK/PD of a lipophilic topical

- drug in psoriatic patients by continuous intradermal membrane-free sampling. *Eur J Pharm Biopharm*, 81(3), 635-641. doi:10.1016/j.ejpb.2012.04.009
- Boocock, D. J., Faust, G. E., Patel, K. R., Schinas, A. M., Brown, V. A., Ducharme, M. P., . . . Brenner, D. E. (2007). Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 16(6), 1246-1252. doi:10.1158/1055-9965.EPI-07-0022
- Bora, P., Kumar, L., & Bansal, A. K. (2008). Microneedle technology for advanced drug delivery: Evolving vistas. *Review Article, Department of Pharmaceutical Technology, NIPER, CRIPS*, 9(1).
- Borhade, V., Nair, H., & Hegde, D. (2008). Design and evaluation of self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) of tacrolimus. *AAPS PharmSciTech*, 9(1), 13-21. doi:10.1208/s12249-007-9014-8
- Bouwstra, J. A., Gooris, G. S., Dubbelaar, F. E., & Ponc, M. (2002). Phase behavior of stratum corneum lipid mixtures based on human ceramides: the role of natural and synthetic ceramide 1. *J Invest Dermatol*, 118(4), 606-617. doi:10.1046/j.1523-1747.2002.01706.x
- Brown, V. A., Patel, K. R., Viskaduraki, M., Crowell, J. A., Perloff, M., Booth, T. D., . . . Brenner, D. E. (2010). Repeat dose study of the cancer chemopreventive agent resveratrol in healthy volunteers: safety, pharmacokinetics, and effect on the insulin-like growth factor axis. *Cancer Res*, 70(22), 9003-9011. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2364
- Bucks, D. (1999). Occlusion does not uniformly enhance penetration in vivo. *Percutaneous absorption*, 97, 81-105.
- Cal, C., Garban, H., Jazirehi, A., Yeh, C., Mizutani, Y., & Bonavida, B. (2003). Resveratrol and cancer: chemoprevention, apoptosis, and chemoimmunosensitizing activities. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 3(2), 77-93.
- Cao, Y., Fu, Z. D., Wang, F., Liu, H. Y., & Han, R. (2005). Anti-angiogenic activity of resveratrol, a natural compound from medicinal plants. *J Asian Nat Prod Res*, 7(3), 205-213. doi:10.1080/10286020410001690190
- Carter, P., Narasimhan, B., & Wang, Q. (2019). Biocompatible nanoparticles and vesicular systems in transdermal drug delivery for various skin diseases. *International journal of pharmaceutics*, 555, 49-62. doi:10.1016/j.ijpharm.2018.11.032
- Catalgol, B., Batirel, S., Taga, Y., & Ozer, N. K. (2012). Resveratrol: French paradox revisited. *Front Pharmacol*, 3, 141. doi:10.3389/fphar.2012.00141
- Cevc, G. (1996). Transfersomes, liposomes and other lipid suspensions on the skin: permeation enhancement, vesicle penetration, and transdermal drug delivery. *Critical reviews™ in therapeutic drug carrier systems*, 13(3-4).
- Chandrashekar, B. S., Sriram, R., Mysore, R., Bhaskar, S., & Shetty, A. (2014). Evaluation of microneedling fractional radiofrequency device for treatment of acne scars. *Journal of cutaneous and aesthetic surgery*, 7(2), 93.
- Chang, S. L., Hofmann, G. A., Zhang, L., Deftos, L. J., & Banga, A. K. (2000). The effect of electroporation on iontophoretic transdermal delivery of calcium regulating hormones. *J Control Release*, 66(2-3), 127-133. doi:10.1016/s0168-3659(99)00262-x

- Changez, M., & Varshney, M. (2000). Aerosol-OT microemulsions as transdermal carriers of tetracaine hydrochloride. *Drug development and industrial pharmacy*, 26(5), 507-512. doi:Doi 10.1081/Ddc-100101261
- Chauhan, L., Thakur, P., & Sharma, S. (2019). Microemulsions: New vista in novel drug delivery system.
- Chen, H., Chang, X., Du, D., Li, J., Xu, H., & Yang, X. (2006). Microemulsion-based hydrogel formulation of ibuprofen for topical delivery. *Int J Pharm*, 315(1-2), 52-58. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.02.015
- Chen, H., Chang, X., Weng, T., Zhao, X., Gao, Z., Yang, Y., . . . Yang, X. (2004). A study of microemulsion systems for transdermal delivery of triptolide. *J Control Release*, 98(3), 427-436. doi:10.1016/j.jconrel.2004.06.001
- Chen, M. L., Li, J., Xiao, W. R., Sun, L., Tang, H., Wang, L., . . . Xie, H. F. (2006). Protective effect of resveratrol against oxidative damage of UVA irradiated HaCaT cells. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 31(5), 635-639. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17062920>
- Chen, Y., Zhang, H., Yang, J., & Sun, H. (2015). Improved antioxidant capacity of optimization of a self-microemulsifying drug delivery system for resveratrol. *Molecules*, 20(12), 21167-21177.
- Cheng, S., Fu, X., Liu, J., Zhang, J., Zhang, Z., Wei, Y., & Han, B. (2007). Study of ethylene glycol/TX-100/ionic liquid microemulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 302(1-3), 211-215.
- Cheung, K., Han, T., & Das, D. B. (2014). Effect of force of microneedle insertion on the permeability of insulin in skin. *J Diabetes Sci Technol*, 8(3), 444-452. doi:10.1177/1932296813519720
- Cho, Y. H., Kim, S., Bae, E. K., Mok, C., & Park, J. (2008). Formulation of a cosurfactant-free o/w microemulsion using nonionic surfactant mixtures. *Journal of Food Science*, 73(3), E115-E121.
- Chong, S. Z., Evrard, M., & Ng, L. G. (2013). Lights, camera, and action: vertebrate skin sets the stage for immune cell interaction with arthropod-vectored pathogens. *Frontiers in immunology*, 4, 286.
- Cicero, N., Albergamo, A., Salvo, A., Bua, G. D., Bartolomeo, G., Mangano, V., . . . Dugo, G. (2018). Chemical characterization of a variety of cold-pressed gourmet oils available on the Brazilian market. *Food Res Int*, 109, 517-525. doi:10.1016/j.foodres.2018.04.064
- Clogston, J. D., & Patri, A. K. (2011). Zeta potential measurement. In *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery* (pp. 63-70): Springer.
- Cottart, C. H., Nivet-Antoine, V., Laguillier-Morizot, C., & Beaudeau, J. L. (2010). Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. *Mol Nutr Food Res*, 54(1), 7-16. doi:10.1002/mnfr.200900437
- Crowell, J. A., Korytko, P. J., Morrissey, R. L., Booth, T. D., & Levine, B. S. (2004). Resveratrol-associated renal toxicity. *Toxicol Sci*, 82(2), 614-619. doi:10.1093/toxsci/kfh263
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Davarani, F. H., Javanmard, R., Dokhani, A., . . . Mozafari, M. R. (2018). Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, 10(2). doi:ARTN 57

- Darlenski, R., Sassning, S., Tsankov, N., & Fluhr, J. W. (2009). Non-invasive in vivo methods for investigation of the skin barrier physical properties. *Eur J Pharm Biopharm*, 72(2), 295-303. doi:10.1016/j.ejpb.2008.11.013
- Das, S., Lee, S. H., Chow, P. S., & Macbeath, C. (2020). Microemulsion composed of combination of skin beneficial oils as vehicle: Development of resveratrol-loaded microemulsion based formulations for skin care applications. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 194. doi:ARTN 111161
10.1016/j.colsurfb.2020.111161
- Das, S., Lin, H. S., Ho, P. C., & Ng, K. Y. (2008). The impact of aqueous solubility and dose on the pharmacokinetic profiles of resveratrol. *Pharm Res*, 25(11), 2593-2600. doi:10.1007/s11095-008-9677-1
- Degim, I. T. (2006). New tools and approaches for predicting skin permeability. *Drug discovery today*, 11(11-12), 517-523.
- Değim, T. (2007). Deriden emilim ve deriye uygulanan yarı katı preparatlar. *Modern Farmasötik Teknoloji, Ankara: Türk Eczacıları Birliği Eczacılık Akademisi Yayını*, s, 337-364.
- DelgadoCharro, M. B., IglesiasVilas, G., BlancoMendez, J., LopezQuintela, M. A., Marty, J. P., & Guy, R. H. (1997). Delivery of a hydrophilic solute through the skin from novel microemulsion systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 43(1), 37-42. doi:Doi 10.1016/S0939-6411(96)00016-1
- Denet, A. R., Vanbever, R., & Preat, V. (2004). Skin electroporation for transdermal and topical delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 56(5), 659-674. doi:10.1016/j.addr.2003.10.027
- Derle, D., Sagar, B., & Pimpale, S. (2006). Microemulsion as a vehicle for transdermal permeation of nimesulide. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 68(5).
- Desai, S. J., Singh, P., Simonelli, A. P., & Higuchi, W. I. (1966). Investigation of factors influencing release of solid drug dispersed in inert matrices III. Quantitative studies involving the polyethylene plastic matrix. *Journal of pharmaceutical sciences*, 55(11), 1230-1234.
- Djekic, L., & Primorac, M. (2008). The influence of cosurfactants and oils on the formation of pharmaceutical microemulsions based on PEG-8 caprylic/capric glycerides. *International journal of Pharmaceutics*, 352(1-2), 231-239.
- Doane, T. L., Chuang, C. H., Hill, R. J., & Burda, C. (2012). Nanoparticle zeta-Potentials. *Accounts of Chemical Research*, 45(3), 317-326. doi:10.1021/ar200113c
- Docherty, J. J., Fu, M. M., Hah, J. M., Sweet, T. J., Faith, S. A., & Booth, T. (2005). Effect of resveratrol on herpes simplex virus vaginal infection in the mouse. *Antiviral Res*, 67(3), 155-162. doi:10.1016/j.antiviral.2005.06.008
- Docherty, J. J., Smith, J. S., Fu, M. M., Stoner, T., & Booth, T. (2004). Effect of topically applied resveratrol on cutaneous herpes simplex virus infections in hairless mice. *Antiviral Res*, 61(1), 19-26. doi:10.1016/j.antiviral.2003.07.001
- Donnelly, R. F., Mooney, K., Caffarel-Salvador, E., Torrisi, B. M., Eltayib, E., & McElnay, J. C. (2014). Microneedle-mediated minimally invasive patient monitoring. *Therapeutic Drug Monitoring*, 36(1), 10-17.
- Donnelly, R. F., Raj Singh, T. R., & Woolfson, A. D. (2010). Microneedle-based drug delivery systems: microfabrication, drug delivery, and safety. *Drug Deliv*, 17(4), 187-207. doi:10.3109/10717541003667798

- Donnelly, R. F., Singh, T. R., Alkilani, A. Z., McCrudden, M. T., O'Neill, S., O'Mahony, C., . . . Woolfson, A. D. (2013). Hydrogel-forming microneedle arrays exhibit antimicrobial properties: potential for enhanced patient safety. *Int J Pharm*, 451(1-2), 76-91. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.04.045
- Donnelly, R. F., Singh, T. R. R., & Woolfson, A. D. (2010). Microneedle-based drug delivery systems: microfabrication, drug delivery, and safety. *Drug delivery*, 17(4), 187-207.
- Doukas, A. G., & Kollias, N. (2004). Transdermal drug delivery with a pressure wave. *Adv Drug Deliv Rev*, 56(5), 559-579. doi:10.1016/j.addr.2003.10.031
- El-Kattan, A. F., Asbill, C. S., & Michniak, B. B. (2000). The effect of terpene enhancer lipophilicity on the percutaneous permeation of hydrocortisone formulated in HPMC gel systems. *International journal of pharmaceuticals*, 198(2), 179-189.
- El Maghraby, G. M. (2008). Transdermal delivery of hydrocortisone from eucalyptus oil microemulsion: effects of cosurfactants. *International journal of Pharmaceuticals*, 355(1-2), 285-292.
- El Maghraby, G. M. (2008). Transdermal delivery of hydrocortisone from eucalyptus oil microemulsion: effects of cosurfactants. *Int J Pharm*, 355(1-2), 285-292. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.12.022
- El Maghraby, G. M., Barry, B. W., & Williams, A. C. (2008). Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes. *Eur J Pharm Sci*, 34(4-5), 203-222. doi:10.1016/j.ejps.2008.05.002
- Elias, P. M. (1983). Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *Journal of Investigative Dermatology*, 80.
- Elias, P. M., Cooper, E. R., Korc, A., & Brown, B. E. (1981). Percutaneous transport in relation to stratum corneum structure and lipid composition. *J Invest Dermatol*, 76(4), 297-301. doi:10.1111/1523-1747.ep12526137
- Elshafeey, A. H., Bendas, E. R., & Mohamed, O. H. (2009). Intranasal microemulsion of sildenafil citrate: in vitro evaluation and in vivo pharmacokinetic study in rabbits. *AAPS PharmSciTech*, 10(2), 361-367. doi:10.1208/s12249-009-9213-6
- ERTAŞ, Ö. S., & KAYALI, A. (2005). ANALİTİK YÖNTEM GEÇERLİLİĞİNE GENEL BİR BAKIŞ.
- Feldman, R. J. (1967). Regional variation in percutaneous penetration of ¹⁴C cortisol in man. *J Inves Dermatol*, 48, 181-183.
- Figueiredo, K. A., Neves, J. K. O., Silva, J. A. d., Freitas, R. M. d., & Carvalho, A. L. M. (2016). Phenobarbital loaded microemulsion: development, kinetic release and quality control. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 52(2), 251-264.
- Friberg, S. E., Brancewicz, C., & Morrison, D. S. (1994). O/W microemulsions and hydrotropes: the coupling action of a hydrotrope. *Langmuir*, 10(9), 2945-2949.
- Friend, D., Catz, P., Heller, J., Reid, J., & Baker, R. (1988). Transdermal delivery of levonorgestrel I: Alkanols as permeation enhancers in vitro. *Journal of controlled release*, 7(3), 243-250.
- Fuggetta, M. P., D'Atri, S., Lanzilli, G., Tricarico, M., Cannavo, E., Zambruno, G., . . . Ravagnan, G. (2004). In vitro antitumour activity of resveratrol in human melanoma cells sensitive or resistant to temozolomide. *Melanoma Res*, 14(3), 189-196. doi:10.1097/01.cmr.0000130007.54508.b2
- Funke, A. P., Schiller, R., Motzkus, H. W., Gunther, C., Muller, R. H., & Lipp, R. (2002). Transdermal delivery of highly lipophilic drugs: in vitro fluxes of

- antiestrogens, permeation enhancers, and solvents from liquid formulations. *Pharm Res*, 19(5), 661-668. doi:10.1023/a:1015314314796
- Garti, N., Yaghmur, A., Leser, M. E., Clement, V., & Watzke, H. J. (2001). Improved oil solubilization in oil/water food grade microemulsions in the presence of polyols and ethanol. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(5), 2552-2562.
- Gasco, M. R., Priano, L., & Zara, G. P. (2009). Solid lipid nanoparticles and microemulsions for drug delivery: the CNS. *Progress in brain research*, 180, 181-192.
- Gershanik, T., & Benita, S. (2000). Self-dispersing lipid formulations for improving oral absorption of lipophilic drugs. *Eur J Pharm Biopharm*, 50(1), 179-188. doi:10.1016/s0939-6411(00)00089-8
- Ghosh, P., & Murthy, R. (2006). Microemulsions: a potential drug delivery system. *Current drug delivery*, 3(2), 167-180.
- Gibaldi, M., & Feldman, S. (1967). Establishment of sink conditions in dissolution rate determinations. Theoretical considerations and application to nondisintegrating dosage forms. *J Pharm Sci*, 56(10), 1238-1242. doi:10.1002/jps.2600561005
- Gill, H. S., Denson, D. D., Burris, B. A., & Prausnitz, M. R. (2008). Effect of microneedle design on pain in human volunteers. *Clin J Pain*, 24(7), 585-594. doi:10.1097/AJP.0b013e31816778f9
- Gittard, S. D., Narayan, R. J., Jin, C., Ovsianikov, A., Chichkov, B. N., Monteiro-Riviere, N. A., . . . Chisholm, B. (2009). Pulsed laser deposition of antimicrobial silver coating on Ormocer (R) microneedles. *Biofabrication*, 1(4). doi:Artn 041001
10.1088/1758-5082/1/4/041001
- Giudice, E. L., & Campbell, J. D. (2006). Needle-free vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 58(1), 68-89. doi:10.1016/j.addr.2005.12.003
- Giustini, M., Murgia, S., & Palazzo, G. (2004). Does the Schulman's titration of microemulsions really provide meaningful parameters? *Langmuir*, 20(18), 7381-7384.
- Gniadecka, M., Faurskov Nielsen, O., Christensen, D. H., & Wulf, H. C. (1998). Structure of water, proteins, and lipids in intact human skin, hair, and nail. *J Invest Dermatol*, 110(4), 393-398. doi:10.1046/j.1523-1747.1998.00146.x
- Godic, A., Poljsak, B., Adamic, M., & Dahmane, R. (2014). The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 860479. doi:10.1155/2014/860479
- Godin, B., & Touitou, E. (2003). Ethosomes: new prospects in transdermal delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 20(1), 63-102. doi:10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v20.i1.20
- Gokce, E. H., Korkmaz, E., Deller, E., Sandri, G., Bonferoni, M. C., & Ozer, O. (2012). Resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles versus nanostructured lipid carriers: evaluation of antioxidant potential for dermal applications. *International journal of nanomedicine*, 7, 1841.
- Gokce, E. H., Tuncay Tanriverdi, S., Eroglu, I., Tsapis, N., Gokce, G., Tekmen, I., . . . Ozer, O. (2017). Wound healing effects of collagen-laminin dermal matrix impregnated with resveratrol loaded hyaluronic acid-DPPC microparticles in diabetic rats. *Eur J Pharm Biopharm*, 119, 17-27. doi:10.1016/j.ejpb.2017.04.027

- Gosselin, L. E., Chrapowitzky, L., & Rideout, T. C. (2019). Metabolic effects of alpha-lipoic acid supplementation in pre-diabetics: a randomized, placebo-controlled pilot study. *Food Funct*, 10(9), 5732-5738. doi:10.1039/c9fo00390h
- Grampurohit, N., Ravikumar, P., & Mallya, R. (2011). Microemulsions For Topical Use-A Review. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 45(1), 100-107. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000291214700015
- Gruber, J. V., & Holtz, R. (2010). Examining the genomic influence of skin antioxidants in vitro. *Mediators Inflamm*, 2010. doi:10.1155/2010/230450
- Gupta, J., Felner, E. I., & Prausnitz, M. R. (2009). Minimally Invasive Insulin Delivery in Subjects with Type 1 Diabetes Using Hollow Microneedles. *Diabetes Technology & Therapeutics*, 11(6), 329-337. doi:10.1089/dia.2008.0103
- Gupta, M., Agrawal, U., & Vyas, S. P. (2012). Nanocarrier-based topical drug delivery for the treatment of skin diseases. *Expert Opin Drug Deliv*, 9(7), 783-804. doi:10.1517/17425247.2012.686490
- Gupta, R. K., Patel, A. K., Shah, N., Chaudhary, A. K., Jha, U. K., Yadav, U. C., . . . Pakuwal, U. (2014). Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(11), 4405-4409. doi:10.7314/apjcp.2014.15.11.4405
- Guy, R. H., Kalia, Y. N., Delgado-Charro, M. B., Merino, V., Lopez, A., & Marro, D. (2000). Iontophoresis: electrorepulsion and electroosmosis. *J Control Release*, 64(1-3), 129-132. doi:10.1016/s0168-3659(99)00132-7
- Hadgraft, J., & Guy, R. H. (2002). Feasibility assessment in topical and transdermal delivery: mathematical models and in vitro studies. In *Transdermal drug delivery* (pp. 1-23): CRC Press.
- Han, T., & Das, D. B. (2013). Permeability enhancement for transdermal delivery of large molecule using low-frequency sonophoresis combined with microneedles. *Journal of pharmaceutical sciences*, 102(10), 3614-3622.
- Harikumar, K. B., Kunnumakkara, A. B., Sethi, G., Diagaradjane, P., Anand, P., Pandey, M. K., . . . Aggarwal, B. B. (2010). Resveratrol, a multitargeted agent, can enhance antitumor activity of gemcitabine in vitro and in orthotopic mouse model of human pancreatic cancer. *International journal of cancer*, 127(2), 257-268.
- Hathout, R. M., Woodman, T. J., Mansour, S., Mortada, N. D., Geneidi, A. S., & Guy, R. H. (2010). Microemulsion formulations for the transdermal delivery of testosterone. *European journal of pharmaceutical sciences*, 40(3), 188-196.
- Helmstadter, A. (2001). The history of electrically-assisted transdermal drug delivery ("iontophoresis"). *Pharmazie*, 56(7), 583-587. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11487981>
- Henry, S., McAllister, D. V., Allen, M. G., & Prausnitz, M. R. (1998). Microfabricated microneedles: a novel approach to transdermal drug delivery. *Journal of pharmaceutical sciences*, 87(8), 922-925.
- Herneisey, M., Williams, J., Mirtic, J., Liu, L., Potdar, S., Bagia, C., . . . Janjic, J. M. (2016). Development and characterization of resveratrol nanoemulsions carrying dual-imaging agents. *Therapeutic delivery*, 7(12), 795-808.
- Heuschkel, S., Goebel, A., & Neubert, R. H. (2008). Microemulsions—modern colloidal carrier for dermal and transdermal drug delivery. *Journal of pharmaceutical sciences*, 97(2), 603-631.

- Heuschkel, S., Goebel, A., & Neubert, R. H. H. (2008). Microemulsions - Modern colloidal carrier for dermal and transdermal drug delivery. *Journal of pharmaceutical sciences*, 97(2), 603-631. doi:10.1002/jps.20995
- Higuchi, T. (1961). Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. *J Pharm Sci*, 50, 874-875. doi:10.1002/jps.2600501018
- Higuchi, T. (1963). Mechanism of Sustained-Action Medication. Theoretical Analysis of Rate of Release of Solid Drugs Dispersed in Solid Matrices. *J Pharm Sci*, 52, 1145-1149. doi:10.1002/jps.2600521210
- Ho, H. O., Hsiao, C. C., & Sheu, M. T. (1996). Preparation of microemulsions using polyglycerol fatty acid esters as surfactant for the delivery of protein drugs. *Journal of pharmaceutical sciences*, 85(2), 138-143. doi:DOI 10.1021/js950352h
- Holian, O., & Walter, R. J. (2001). Resveratrol inhibits the proliferation of normal human keratinocytes in vitro. *J Cell Biochem Suppl, Suppl 36*, 55-62. doi:10.1002/jcb.1085
- Hong, S. P., Kim, M. J., Jung, M. Y., Jeon, H., Goo, J., Ahn, S. K., . . . Choi, E. H. (2008). Biopositive effects of low-dose UVB on epidermis: coordinate upregulation of antimicrobial peptides and permeability barrier reinforcement. *J Invest Dermatol*, 128(12), 2880-2887. doi:10.1038/jid.2008.169
- Hong, X., Wei, L., Wu, F., Wu, Z., Chen, L., Liu, Z., & Yuan, W. (2013). Dissolving and biodegradable microneedle technologies for transdermal sustained delivery of drug and vaccine. *Drug Des Devel Ther*, 7, 945-952. doi:10.2147/DDDT.S44401
- Hu, J.-W., Yen, M.-W., Wang, A.-J., & Chu, I.-M. (2018). Effect of oil structure on cyclodextrin-based Pickering emulsions for bupivacaine topical application. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 161, 51-58.
- Hull, W. (2002). Heat enhanced transdermal drug delivery: a survey paper. *J Appl Res*, 2(1).
- Hung, C.-F., Lin, Y.-K., Huang, Z.-R., & Fang, J.-Y. (2008). Delivery of resveratrol, a red wine polyphenol, from solutions and hydrogels via the skin. *Biological and pharmaceutical Bulletin*, 31(5), 955-962.
- Hung, C. F., Lin, Y. K., Huang, Z. R., & Fang, J. Y. (2008). Delivery of resveratrol, a red wine polyphenol, from solutions and hydrogels via the skin. *Biol Pharm Bull*, 31(5), 955-962. doi:10.1248/bpb.31.955
- Hung, L. M., Chen, J. K., Huang, S. S., Lee, R. S., & Su, M. J. (2000). Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovasc Res*, 47(3), 549-555. doi:10.1016/s0008-6363(00)00102-4
- Ibrahim, T. M., Abdallah, M. H., El-Megrab, N. A., & El-Nahas, H. M. (2018). Upgrading of dissolution and anti-hypertensive effect of Carvedilol via two combined approaches: self-emulsification and liquisolid techniques. *Drug development and industrial pharmacy*, 44(6), 873-885.
- ICH Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (2005).
- Ido, Y., Duranton, A., Lan, F., Cacicedo, J. M., Chen, T. C., Breton, L., & Ruderman, N. B. (2012). Acute activation of AMP-activated protein kinase prevents H₂O₂-induced premature senescence in primary human keratinocytes. *PloS one*, 7(4), e35092.
- Ido, Y., Duranton, A., Lan, F., Weikel, K. A., Breton, L., & Ruderman, N. B. (2015). Resveratrol prevents oxidative stress-induced senescence and proliferative dysfunction by activating the AMPK-FOXO3 cascade in cultured primary

- human keratinocytes. *PloS one*, 10(2), e0115341.
doi:10.1371/journal.pone.0115341
- Intagliata, S., Modica, M. N., Santagati, L. M., & Montenegro, L. (2019). Strategies to improve resveratrol systemic and topical bioavailability: An update. *Antioxidants*, 8(8), 244.
- Ita, K. (2015). Transdermal Delivery of Drugs with Microneedles-Potential and Challenges. *Pharmaceutics*, 7(3), 90-105. doi:10.3390/pharmaceutics7030090
- Ita, K. (2015). Transdermal delivery of drugs with microneedles—potential and challenges. *Pharmaceutics*, 7(3), 90-105.
- Ita, K. (2017). Progress in the use of microemulsions for transdermal and dermal drug delivery. *Pharmaceutical development and technology*, 22(4), 467-475.
- Ito, Y., Hirono, M., Fukushima, K., Sugioka, N., & Takada, K. (2012). Two-layered dissolving microneedles formulated with intermediate-acting insulin. *International journal of pharmaceutics*, 436(1-2), 387-393.
- Ito, Y., Murano, H., Hamasaki, N., Fukushima, K., & Takada, K. (2011). Incidence of low bioavailability of leuprolide acetate after percutaneous administration to rats by dissolving microneedles. *International journal of pharmaceutics*, 407(1-2), 126-131.
- Ito, Y., Yoshimitsu, J.-I., Shiroyama, K., Sugioka, N., & Takada, K. (2006). Self-dissolving microneedles for the percutaneous absorption of EPO in mice. *Journal of drug targeting*, 14(5), 255-261.
- Jacques, S. L., McAuliffe, D. J., Blank, I. H., & Parrish, J. A. (1987). Controlled removal of human stratum corneum by pulsed laser. *Journal of Investigative Dermatology*, 88(1), 88-93.
- Jadhav, K., Shaikh, I., Ambade, K., & Kadam, V. (2006). Applications of microemulsion based drug delivery system. *Current drug delivery*, 3(3), 267-273.
- Jain, A. K., Thomas, N. S., & Panchagnula, R. (2002). Transdermal drug delivery of imipramine hydrochloride. I. Effect of terpenes. *J Control Release*, 79(1-3), 93-101. doi:10.1016/s0168-3659(01)00524-7
- Jenning, V., Gysler, A., Schäfer-Korting, M., & Gohla, S. H. (2000). Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 49(3), 211-218.
- Junyaprasert, V. B., Boonsaner, P., Leatwimonlak, S., & Boonme, P. (2007). Enhancement of the skin permeation of clindamycin phosphate by Aerosol OT/1-butanol microemulsions. *Drug Dev Ind Pharm*, 33(8), 874-880. doi:10.1080/03639040600975097
- Juskaite, V., Ramanauskiene, K., & Briedis, V. (2015). Design and Formulation of Optimized Microemulsions for Dermal Delivery of Resveratrol. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 540916. doi:10.1155/2015/540916
- Juškaitė, V., Ramanauskienė, K., & Briedis, V. (2015). Design and formulation of optimized microemulsions for dermal delivery of resveratrol. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.
- Kalaitzaki, A., Pouloupoulou, M., Xenakis, A., & Papadimitriou, V. (2014). Surfactant-rich biocompatible microemulsions as effective carriers of methylxanthine drugs. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 442, 80-87.

- Kalam, M. A., Humayun, M., Parvez, N., Yadav, S., Garg, A., Amin, S., . . . Ali, A. (2007). Release kinetics of modified pharmaceutical dosage forms: a review. *Cont J Pharm Sci*, 1(1), 30-35.
- Kang, M. C., Cho, K., Lee, J. H., Subedi, L., Yumnam, S., & Kim, S. Y. (2019). Effect of Resveratrol-Enriched Rice on Skin Inflammation and Pruritus in the NC/Nga Mouse Model of Atopic Dermatitis. *Int J Mol Sci*, 20(6). doi:10.3390/ijms20061428
- Kanikkannan, N. (2002). Iontophoresis-based transdermal delivery systems. *BioDrugs*, 16(5), 339-347. doi:10.2165/00063030-200216050-00003
- Karasulu, H. Y. (2008). Microemulsions as novel drug carriers: the formation, stability, applications and toxicity. *Expert opinion on drug delivery*, 5(1), 119-135.
- Kashibuchi, N., Hirai, Y., O'Goshi, K., & Tagami, H. (2002). Three-dimensional analyses of individual corneocytes with atomic force microscope: morphological changes related to age, location and to the pathologic skin conditions. *Skin Res Technol*, 8(4), 203-211. doi:10.1034/j.1600-0846.2002.00348.x
- Kaur, R., & Ajitha, M. (2019). Transdermal delivery of fluvastatin loaded nanoemulsion gel: Preparation, characterization and in vivo anti-osteoporosis activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 136. doi:ARTN 104956 10.1016/j.ejps.2019.104956
- Kezic, S., & Nielsen, J. B. (2009). Absorption of chemicals through compromised skin. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 82(6), 677-688. doi:10.1007/s00420-009-0405-x
- Khan, B. A., Akhtar, N., Khan, H. M. S., Waseem, K., Mahmood, T., Rasul, A., . . . Khan, H. (2011). Basics of pharmaceutical emulsions: A review. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(25), 2715-2725.
- Khanduja, K., & Bhardwaj, A. (2003). Stable free radical scavenging and antiperoxidative properties of resveratrol compared in vitro with some other bioflavonoids.
- Kim, H. J., Chang, E. J., Cho, S. H., Chung, S. K., Park, H. D., & Choi, S. W. (2002). Antioxidative activity of resveratrol and its derivatives isolated from seeds of *Paeonia lactiflora*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 66(9), 1990-1993.
- Kligman, A. M. (1965). Topical pharmacology and toxicology of dimethyl sulfoxide—Part 1. *Jama*, 193(10), 796-804.
- Kogan, A., & Garti, N. (2006). Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 123, 369-385. doi:10.1016/j.cis.2006.05.014
- Kolarsick, P. A., Kolarsick, M. A., & Goodwin, C. (2011). Anatomy and physiology of the skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, 3(4), 203-213.
- Kolling, W. M. (2004). Handbook of pharmaceutical excipients. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 68(1-5), BF1.
- Konda, S., Meier-Davis, S. R., Cayme, B., Shudo, J., & Maibach, H. I. (2012). Age-related percutaneous penetration part 1: skin factors. *Skin Therapy Lett*, 17(5), 1-5. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22622279>
- Koutsonanos, D. G., del Pilar Martin, M., Zarnitsyn, V. G., Sullivan, S. P., Compans, R. W., Prausnitz, M. R., & Skountzou, I. (2009). Transdermal influenza immunization with vaccine-coated microneedle arrays. *PloS one*, 4(3), e4773.

- Krajka-Kuzniak, V., Szafer, H., Stefanski, T., Sobiak, S., Cichocki, M., & Baer-Dubowska, W. (2014). The effect of resveratrol and its methylthio-derivatives on the Nrf2-ARE pathway in mouse epidermis and HaCaT keratinocytes. *Cell Mol Biol Lett*, 19(3), 500-516. doi:10.2478/s11658-014-0209-1
- Kreilgaard, M. (2002). Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 54 Suppl 1, S77-98. doi:10.1016/s0169-409x(02)00116-3
- Kreuter, J. (2014). *Colloidal drug delivery systems* (Vol. 66): CRC Press.
- Kruk, J., & Duchnik, E. (2014). Oxidative stress and skin diseases: possible role of physical activity. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(2), 561-568. doi:10.7314/apjcp.2014.15.2.561
- Kruk, J., & Y Aboul-Enein, H. (2017). Reactive oxygen and nitrogen species in carcinogenesis: implications of oxidative stress on the progression and development of several cancer types. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 17(11), 904-919.
- Lai-Cheong, J. E., & McGrath, J. A. (2013). Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine*, 41(6), 317-320.
- Lam, A. C., & Schechter, R. S. (1987). The theory of diffusion in microemulsion. *Journal of colloid and interface science*, 120(1), 56-63.
- Lane, M. E. (2013). Skin penetration enhancers. *International journal of Pharmaceutics*, 447(1-2), 12-21.
- Langcake, P., & Pryce, R. (1976). The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology*, 9(1), 77-86.
- Larraneta, E., Lutton, R. E. M., Woolfson, A. D., & Donnelly, R. F. (2016). Microneedle arrays as transdermal and intradermal drug delivery systems: Materials science, manufacture and commercial development. *Materials Science & Engineering R-Reports*, 104, 1-32. doi:10.1016/j.mser.2016.03.001
- Larraneta, E., McCrudden, M. T., Courtenay, A. J., & Donnelly, R. F. (2016). Microneedles: A New Frontier in Nanomedicine Delivery. *Pharm Res*, 33(5), 1055-1073. doi:10.1007/s11095-016-1885-5
- Lawrence, M. J. (1994). Surfactant systems: microemulsions and vesicles as vehicles for drug delivery. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, 19(3), 257-269.
- Lawrence, M. J., & Rees, G. D. (2000). Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*, 45(1), 89-121. doi:10.1016/s0169-409x(00)00103-4
- Lawrence, M. J., & Rees, G. D. (2000). Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced drug delivery reviews*, 45(1), 89-121.
- Lawrence, M. J., & Rees, G. D. (2012). Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced drug delivery reviews*, 64, 175-193. doi:10.1016/j.addr.2012.09.018
- Lee, J. W., Choi, S. O., Felner, E. I., & Prausnitz, M. R. (2011). Dissolving microneedle patch for transdermal delivery of human growth hormone. *Small*, 7(4), 531-539.
- Lee, K., Lee, C. Y., & Jung, H. (2011). Dissolving microneedles for transdermal drug administration prepared by stepwise controlled drawing of maltose. *Biomaterials*, 32(11), 3134-3140. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.01.014
- Lee, S., Kollias, N., McAuliffe, D. J., Flotte, T. J., & Doukas, A. G. (1999). Topical drug delivery in humans with a single photomechanical wave. *Pharm Res*, 16(11), 1717-1721. doi:10.1023/a:1018954015441

- Lee, S., McAuliffe, D. J., Kollias, N., Flotte, T. J., & Doukas, A. G. (2001). Permeabilization and recovery of the stratum corneum in vivo: the synergy of photomechanical waves and sodium lauryl sulfate. *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*, 29(2), 145-150.
- Lee, W. R., Shen, S. C., Kuo-Hsien, W., Hu, C. H., & Fang, J. Y. (2003). Lasers and microdermabrasion enhance and control topical delivery of vitamin C. *J Invest Dermatol*, 121(5), 1118-1125. doi:10.1046/j.1523-1747.2003.12537.x
- Lee, W. R., Shen, S. C., Lai, H. H., Hu, C. H., & Fang, J. Y. (2001). Transdermal drug delivery enhanced and controlled by erbium:YAG laser: a comparative study of lipophilic and hydrophilic drugs. *J Control Release*, 75(1-2), 155-166. doi:10.1016/s0168-3659(01)00391-1
- LEE, W. R., TSAI, R. Y., FANG, C. L., LIU, C. J., HU, C. H., & FANG, J. Y. (2006). Microdermabrasion as a novel tool to enhance drug delivery via the skin: an animal study. *Dermatologic surgery*, 32(8), 1013-1022.
- Lémery, E., Briançon, S., Chevalier, Y., Bordes, C., Oddos, T., Gohier, A., & Bolzinger, M.-A. (2015). Skin toxicity of surfactants: Structure/toxicity relationships. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 469, 166-179.
- Li, C. G., Lee, C. Y., Lee, K., & Jung, H. (2013). An optimized hollow microneedle for minimally invasive blood extraction. *Biomedical Microdevices*, 15(1), 17-25.
- Li, J., Zeng, M., Shan, H., & Tong, C. (2017). Microneedle patches as drug and vaccine delivery platform. *Current medicinal chemistry*, 24(22), 2413-2422.
- Li, Q. Y., Zhang, J. N., Chen, B. Z., Wang, Q. L., & Guo, X. D. (2017). A solid polymer microneedle patch pretreatment enhances the permeation of drug molecules into the skin. *Rsc Advances*, 7(25), 15408-15415. doi:10.1039/c6ra26759a
- Li, S., Li, W., & Prausnitz, M. (2018). Individually coated microneedles for co-delivery of multiple compounds with different properties. *Drug Deliv Transl Res*, 8(5), 1043-1052. doi:10.1007/s13346-018-0549-x
- Lissant, K. (1975). Emulsions and emulsion technology. *Soil Science*, 120(2), 160.
- Liu, Y., Chan, F., Sun, H., Yan, J., Fan, D., Zhao, D., . . . Zhou, D. (2011). Resveratrol protects human keratinocytes HaCaT cells from UVA-induced oxidative stress damage by downregulating Keap1 expression. *European journal of pharmacology*, 650(1), 130-137.
- Lopes, L. B. (2014). Overcoming the cutaneous barrier with microemulsions. *Pharmaceutics*, 6(1), 52-77. doi:10.3390/pharmaceutics6010052
- Lutz, R., Aserin, A., Wachtel, E. J., Ben-Shoshan, E., Danino, D., & Garti, N. (2007). A study of the emulsified microemulsion by SAXS, cryo-TEM, SD-NMR, and electrical conductivity. *Journal of dispersion science and technology*, 28(8), 1149-1157.
- Magnusson, B. M., Pugh, W. J., & Roberts, M. S. (2004). Simple rules defining the potential of compounds for transdermal delivery or toxicity. *Pharm Res*, 21(6), 1047-1054. doi:10.1023/b:pham.0000029295.38564.e1
- Maia, C. S., Mehnert, W., & Schäfer-Korting, M. (2000). Solid lipid nanoparticles as drug carriers for topical glucocorticoids. *International journal of pharmaceutics*, 196(2), 165-167.

- Malcolmson, C., & Lawrence, M. J. (1993). A comparison of the incorporation of model steroids into non-ionic micellar and microemulsion systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 45(2), 141-143.
- Malcolmson, C., & Lawrence, M. J. (1995). Three-component non-ionic oil-in-water microemulsions using polyoxyethylene ether surfactants. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 4(2), 97-109.
- Mamadou, G., Charrueau, C., Dairou, J., Nzouzi, N. L., Eto, B., & Ponchel, G. (2017). Increased intestinal permeation and modulation of presystemic metabolism of resveratrol formulated into self-emulsifying drug delivery systems. *International journal of pharmaceutics*, 521(1-2), 150-155.
- Manconi, M., Sinico, C., Valenti, D., Loy, G., & Fadda, A. M. (2002). Niosomes as carriers for tretinoin. I. Preparation and properties. *International journal of pharmaceutics*, 234(1-2), 237-248.
- Marques, F. Z., Markus, M. A., & Morris, B. J. (2009). Resveratrol: cellular actions of a potent natural chemical that confers a diversity of health benefits. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41(11), 2125-2128.
- Márquez-Graña, C., Bryan, K., Vucen, S., & O'Sullivan, C. (2017). Development of a novel single-use microneedle design platform for increased patient compliance. *Procedia Manufacturing*, 13, 1352-1359.
- Martin, C. J., Allender, C. J., Brain, K. R., Morrissey, A., & Birchall, J. C. (2012). Low temperature fabrication of biodegradable sugar glass microneedles for transdermal drug delivery applications. *J Control Release*, 158(1), 93-101. doi:10.1016/j.jconrel.2011.10.024
- Marto, J., Ascenso, A., Simoes, S., Almeida, A. J., & Ribeiro, H. M. (2016). Pickering emulsions: challenges and opportunities in topical delivery. *Expert opinion on drug delivery*, 13(8), 1093-1107.
- Marto, J., Duarte, A., Simões, S., Gonçalves, L. M., Gouveia, L. F., Almeida, A. J., & Ribeiro, H. M. (2019). Starch-based pickering emulsions as platforms for topical antibiotic delivery: In vitro and in vivo studies. *Polymers*, 11(1), 108.
- Marwah, H., Garg, T., Goyal, A. K., & Rath, G. (2016). Permeation enhancer strategies in transdermal drug delivery. *Drug Deliv*, 23(2), 564-578. doi:10.3109/10717544.2014.935532
- Mathur, V., Satrawala, Y., & Rajput, M. S. (2014). Physical and chemical penetration enhancers in transdermal drug delivery system. *Asian Journal of Pharmaceutics (AJP): Free full text articles from Asian J Pharm*, 4(3).
- Matsuo, K., Yokota, Y., Zhai, Y., Quan, Y.-S., Kamiyama, F., Mukai, Y., . . . Nakagawa, S. (2012). A low-invasive and effective transcutaneous immunization system using a novel dissolving microneedle array for soluble and particulate antigens. *Journal of controlled release*, 161(1), 10-17.
- McAllister, D. V., Wang, P. M., Davis, S. P., Park, J. H., Canatella, P. J., Allen, M. G., & Prausnitz, M. R. (2003). Microfabricated needles for transdermal delivery of macromolecules and nanoparticles: fabrication methods and transport studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(24), 13755-13760. doi:10.1073/pnas.2331316100
- McClements, D. J. (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, 8(6), 1719-1729. doi:10.1039/c2sm06903b
- McCrudden, M. T., Alkilani, A. Z., McCrudden, C. M., McAlister, E., McCarthy, H. O., Woolfson, A. D., & Donnelly, R. F. (2014). Design and physicochemical

- characterisation of novel dissolving polymeric microneedle arrays for transdermal delivery of high dose, low molecular weight drugs. *Journal of controlled release*, 180, 71-80.
- McGrath, J., Eady, R., & Pope, F. (2004). Anatomy and organization of human skin. *Rook's textbook of dermatology*, 1, 3.2-3.80.
- Mehta, S. K., & Kaur, G. (2010). Microemulsions as carriers for therapeutic molecules. *Recent patents on drug delivery & formulation*, 4(1), 35-48.
- Mei, Z., Chen, H., Weng, T., Yang, Y., & Yang, X. (2003). Solid lipid nanoparticle and microemulsion for topical delivery of triptolide. *Eur J Pharm Biopharm*, 56(2), 189-196. doi:10.1016/s0939-6411(03)00067-5
- Menczel, E. (1995). Delipidization of the cutaneous permeability barrier and percutaneous penetration. *Smith EW, Maibach HI.(eds) Percutaneous penetration enhancers*, CRC Press, Boca Raton FL, 383-392.
- Mezei, M., & Gulasekharam, V. (1980). Liposomes-a selective drug delivery system for the topical route of administration I. Lotion dosage form. *Life Sciences*, 26(18), 1473-1477.
- Michaels, A., Chandrasekaran, S., & Shaw, J. (1975). Drug permeation through human skin: theory and in vitro experimental measurement. *AIChE Journal*, 21(5), 985-996.
- Michniak-Kohn, B., & Leonardi, G. R. (2017). An overview about oxidation in clinical practice of skin aging. *Anais brasileiros de dermatologia*, 92(3), 367-374.
- Migdad, E. M., Courtenay, A. J., Tekko, I. A., McCrudden, M. T. C., Kearney, M. C., McAlister, E., . . . Donnelly, R. F. (2018). Hydrogel-forming microneedles enhance transdermal delivery of metformin hydrochloride. *J Control Release*, 285, 142-151. doi:10.1016/j.jconrel.2018.07.009
- Mitragotri, S., Blankschtein, D., & Langer, R. (1996). Transdermal drug delivery using low-frequency sonophoresis. *Pharmaceutical research*, 13(3), 411-420.
- Mitragotri, S., & Kost, J. (2004). Low-frequency sonophoresis: a review. *Adv Drug Deliv Rev*, 56(5), 589-601. doi:10.1016/j.addr.2003.10.024
- Miyano, T., Tobinaga, Y., Kanno, T., Matsuzaki, Y., Takeda, H., Wakui, M., & Hanada, K. (2005). Sugar micro needles as transdermic drug delivery system. *Biomedical Microdevices*, 7(3), 185-188. doi:10.1007/s10544-005-3024-7
- Mojeiko, G., de Brito, M., Salata, G. C., & Lopes, L. B. (2019). Combination of microneedles and microemulsions to increase celecoxib topical delivery for potential application in chemoprevention of breast cancer. *International journal of pharmaceutics*, 560, 365-376. doi:10.1016/j.ijpharm.2019.02.011
- Morimoto, Y., Wada, Y., Seki, T., & Sugibayashi, K. (2002). In vitro skin permeation of morphine hydrochloride during the finite application of penetration-enhancing system containing water, ethanol and l-menthol. *Biological and pharmaceutical Bulletin*, 25(1), 134-136.
- Moss, G. P., Dearden, J. C., Patel, H., & Cronin, M. T. (2002). Quantitative structure-permeability relationships (QSPRs) for percutaneous absorption. *Toxicol In Vitro*, 16(3), 299-317. doi:10.1016/s0887-2333(02)00003-6
- Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics. (2017). *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics*, 1-356. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000439410000021
- Mulye, N., & Turco, S. (1995). A simple model based on first order kinetics to explain release of highly water soluble drugs from porous dicalcium phosphate dihydrate matrices. *Drug development and industrial pharmacy*, 21(8), 943-953.

- Munir, R., Syed, H. K., Asghar, S., Khan, I. U., Rasul, A., Irfan, M., & Sadique, A. (2017). Microemulsion: promising and novel system for drug delivery. *J Toxicol Pharmaceut Sci*, 1(2), 128-134.
- Murdan, S. (2004). Transdermal and Topical Drug Delivery. From Theory to Clinical Practice. *Pharmacy Education*, 4(1).
- Na, J.-I., Shin, J.-W., Choi, H.-R., Kwon, S.-H., & Park, K.-C. (2019). Resveratrol as a multifunctional topical hypopigmenting agent. *International journal of molecular sciences*, 20(4), 956.
- Naito, S., Ito, Y., Kiyohara, T., Kataoka, M., Ochiai, M., & Takada, K. (2012). Antigen-loaded dissolving microneedle array as a novel tool for percutaneous vaccination. *Vaccine*, 30(6), 1191-1197.
- Narayanan, S. P., & Raghavan, S. (2017). Solid silicon microneedles for drug delivery applications. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 93(1), 407-422.
- Narayanan, S. P., & Raghavan, S. (2019). Fabrication and characterization of gold-coated solid silicon microneedles with improved biocompatibility. *International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 104(9-12), 3327-3333. doi:10.1007/s00170-018-2596-3
- Nastiti, C., Ponto, T., Abd, E., Grice, J. E., Benson, H. A. E., & Roberts, M. S. (2017). Topical Nano and Microemulsions for Skin Delivery. *Pharmaceutics*, 9(4). doi:10.3390/pharmaceutics9040037
- Ng, K. W., & Lau, W. M. (2015). Skin deep: the basics of human skin structure and drug penetration. In *Percutaneous penetration enhancers chemical methods in penetration enhancement* (pp. 3-11): Springer.
- Nguyen, S. H., Dang, T. P., & Maibach, H. I. (2007). Comedogenicity in rabbit: some cosmetic ingredients/vehicles. *Cutaneous and ocular toxicology*, 26(4), 287-292.
- Nichols, J. A., & Katiyar, S. K. (2010). Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch Dermatol Res*, 302(2), 71-83. doi:10.1007/s00403-009-1001-3
- Nielsen, J. B., Benfeldt, E., & Holmgaard, R. (2016). Penetration through the skin barrier. *Skin Barrier Function*, 49, 103-111.
- Niesen, D. B., Hessler, C., & Seeram, N. P. (2013). Beyond resveratrol: A review of natural stilbenoids identified from 2009–2013. *Journal of Berry Research*, 3(4), 181-196.
- Niinomi, M., & Nakai, M. (2011). Titanium-based biomaterials for preventing stress shielding between implant devices and bone. *International journal of biomaterials*, 2011.
- Nordstrom, K. M., Schmus, H. G., McGinley, K. J., & Leyden, J. J. (1986). Measurement of sebum output using a lipid absorbent tape. *Journal of Investigative Dermatology*, 87(2), 260-263.
- Obrador, E., Liu-Smith, F., Dellinger, R. W., Salvador, R., Meyskens, F. L., & Estrela, J. M. (2019). Oxidative stress and antioxidants in the pathophysiology of malignant melanoma. *Biol Chem*, 400(5), 589-612. doi:10.1515/hsz-2018-0327
- Ogiso, T., Hirota, T., Iwaki, M., Hino, T., & Tanino, T. (1998). Effect of temperature on percutaneous absorption of terodiline, and relationship between penetration and fluidity of the stratum corneum lipids. *International journal of pharmaceutics*, 176(1), 63-72.

- Packer, L., & Valacchi, G. (2002). Antioxidants and the response of skin to oxidative stress: vitamin E as a key indicator. *Skin pharmacology and physiology*, 15(5), 282-290.
- Paleco, R., Vučen, S. R., Crean, A. M., Moore, A., & Scalia, S. (2014). Enhancement of the in vitro penetration of quercetin through pig skin by combined microneedles and lipid microparticles. *International journal of pharmaceutics*, 472(1-2), 206-213.
- Palsamy, P., & Subramanian, S. (2008). Resveratrol, a natural phytoalexin, normalizes hyperglycemia in streptozotocin-nicotinamide induced experimental diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 62(9), 598-605.
- Pandita, D., Kumar, S., Poonia, N., & Lather, V. (2014). Solid lipid nanoparticles enhance oral bioavailability of resveratrol, a natural polyphenol. *Food Research International*, 62, 1165-1174.
- Pangeni, R., Sahni, J. K., Ali, J., Sharma, S., & Baboota, S. (2014). Resveratrol: review on therapeutic potential and recent advances in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, 11(8), 1285-1298. doi:10.1517/17425247.2014.919253
- Paolino, D., Ventura, C. A., Nistico, S., Puglisi, G., & Fresta, M. (2002). Lecithin microemulsions for the topical administration of ketoprofen: percutaneous adsorption through human skin and in vivo human skin tolerability. *International journal of Pharmaceutics*, 244(1-2), 21-31.
- Park, E.-S., Chang, S.-J., Rhee, Y.-S., & Chi, S.-C. (2001). Effects of adhesives and permeation enhancers on the skin permeation of captopril. *Drug development and industrial pharmacy*, 27(9), 975-980.
- Park, K., Elias, P. M., Hupe, M., Borkowski, A. W., Gallo, R. L., Shin, K. O., . . . Uchida, Y. (2013). Resveratrol stimulates sphingosine-1-phosphate signaling of cathelicidin production. *J Invest Dermatol*, 133(8), 1942-1949. doi:10.1038/jid.2013.133
- Park, S. N., Jo, N. R., & Jeon, S. H. (2014). Chitosan-coated liposomes for enhanced skin permeation of resveratrol. *Journal of industrial and engineering chemistry*, 20(4), 1481-1485.
- Park, Y., Park, J., Chu, G. S., Kim, K. S., Sung, J. H., & Kim, B. (2015). Transdermal delivery of cosmetic ingredients using dissolving polymer microneedle arrays. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 20(3), 543-549.
- Patel, D., & Sawant, K. K. (2009). Self micro-emulsifying drug delivery system: formulation development and biopharmaceutical evaluation of lipophilic drugs. *Curr Drug Deliv*, 6(4), 419-424. doi:10.2174/156720109789000519
- Patel, M. R., Patel, R. B., Parikh, J. R., Solanki, A. B., & Patel, B. G. (2009). Effect of formulation components on the in vitro permeation of microemulsion drug delivery system of fluconazole. *Aaps Pharmscitech*, 10(3), 917-923.
- Pathan, I. B., & Setty, C. M. (2009). Chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery systems. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8(2).
- Patzelt, A., & Lademann, J. (2015). The increasing importance of the hair follicle route in dermal and transdermal drug delivery. In *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement* (pp. 43-53): Springer.
- Pearton, M., Saller, V., Coulman, S. A., Gateley, C., Anstey, A. V., Zarnitsyn, V., & Birchall, J. C. (2012). Microneedle delivery of plasmid DNA to living human skin: Formulation coating, skin insertion and gene expression. *Journal of controlled release*, 160(3), 561-569.

- Peltola, S., Saarinen-Savolainen, P., Kiesvaara, J., Suhonen, T. M., & Urtti, A. (2003). Microemulsions for topical delivery of estradiol. *Int J Pharm*, 254(2), 99-107. doi:10.1016/s0378-5173(02)00632-4
- Pepe, D., Phelps, J., Lewis, K., Dujack, J., Scarlett, K., Jahan, S., . . . Lopes, L. B. (2012). Decylglucoside-based microemulsions for cutaneous localization of lycopene and ascorbic acid. *Int J Pharm*, 434(1-2), 420-428. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.06.016
- Perennes, F., Marmioli, B., Matteucci, M., Tormen, M., Vaccari, L., & Di Fabrizio, E. (2006). Sharp beveled tip hollow microneedle arrays fabricated by LIGA and 3D soft lithography with polyvinyl alcohol. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 16(3), 473-479. doi:10.1088/0960-1317/16/3/001
- Pervaiz, S. (2003). Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *FASEB J*, 17(14), 1975-1985. doi:10.1096/fj.03-0168rev
- Potapovich, A. I., Lulli, D., Fidanza, P., Kostyuk, V. A., De Luca, C., Pastore, S., & Korkina, L. G. (2011). Plant polyphenols differentially modulate inflammatory responses of human keratinocytes by interfering with activation of transcription factors NFkappaB and AhR and EGFR-ERK pathway. *Toxicol Appl Pharmacol*, 255(2), 138-149. doi:10.1016/j.taap.2011.06.007
- Potts, R. O., & Guy, R. H. (1992). Predicting skin permeability. *Pharm Res*, 9(5), 663-669. doi:10.1023/a:1015810312465
- Prausnitz, M. R. (2004). Microneedles for transdermal drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 56(5), 581-587.
- Prausnitz, M. R. (2017). Engineering Microneedle Patches for Vaccination and Drug Delivery to Skin. *Annu Rev Chem Biomol Eng*, 8, 177-200. doi:10.1146/annurev-chembioeng-060816-101514
- Prausnitz, M. R., & Langer, R. (2008). Transdermal drug delivery. *Nat Biotechnol*, 26(11), 1261-1268. doi:10.1038/nbt.1504
- Prince, L. (2012). *Microemulsions theory and practice*: Elsevier.
- Rajendran, P., Nandakumar, N., Rengarajan, T., Palaniswami, R., Gnanadhas, E. N., Lakshminarasiah, U., . . . Nishigaki, I. (2014). Antioxidants and human diseases. *Clin Chim Acta*, 436, 332-347. doi:10.1016/j.cca.2014.06.004
- Rani, S., Rana, R., Saraogi, G. K., Kumar, V., & Gupta, U. (2019). Self-emulsifying oral lipid drug delivery systems: advances and challenges. *AAPS PharmSciTech*, 20(3), 1-12.
- Rastogi, V., & Yadav, P. (2014). Transdermal drug delivery system: An overview. *Asian Journal of Pharmaceutics (AJP): Free full text articles from Asian J Pharm*, 6(3).
- Ratz-Lyko, A., Arct, J., Majewski, S., & Pytkowska, K. (2015). Influence of polyphenols on the physiological processes in the skin. *Phytother Res*, 29(4), 509-517. doi:10.1002/ptr.5289
- Renaud, S., & de Lorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 339(8808), 1523-1526. doi:10.1016/0140-6736(92)91277-f
- Roberts, M. S., Cheruvu, H. S., Mangion, S. E., Alinaghi, A., Benson, H. A., Mohammad, Y., . . . Grice, J. E. (2021). Topical drug delivery: History, percutaneous absorption, and product development. *Advanced drug delivery reviews*, 113929.
- Rosano, H. L., Cavallo, J. L., Chang, D. L., & Whittam, J. H. (1988). Microemulsions: a commentary on their preparation. *J Soc Cosmet Chem*, 39(June), 201-209.

- Rougier, A., Dupuis, D., Lotte, C., Roguet, R., Wester, R. C., & Maibach, H. I. (1986). Regional variation in percutaneous absorption in man: measurement by the stripping method. *Arch Dermatol Res*, 278(6), 465-469. doi:10.1007/BF00455165
- Rushforth, D., Sanchez-Rubio, M., Santos-Vidals, L., Wormuth, K., Kaler, E., Cuevas, R., & Puig, J. (1986). Structural study of one-phase microemulsions. *The Journal of Physical Chemistry*, 90(25), 6668-6673.
- Sahu, S. S., Madhyastha, S., & Rao, G. M. (2013). Neuroprotective effect of resveratrol against prenatal stress induced cognitive impairment and possible involvement of Na(+), K(+)-ATPase activity. *Pharmacol Biochem Behav*, 103(3), 520-525. doi:10.1016/j.pbb.2012.09.012
- Salimi, A., Zadeh, B. S. M., & Moghimipour, E. (2013). Preparation and characterization of cyanocobalamin (Vit B12) microemulsion properties and structure for topical and transdermal application. *Iranian journal of basic medical sciences*, 16(7), 865.
- Samancı, B., Yener, F. G., & Değim, İ. T. (2021). Enhancing Skin Penetration: The Role of Microneedles. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46(1), 105-120.
- Santos Maia, C., Mehnert, W., Schaller, M., Korting, H., Gysler, A., Haberland, A., & Schäfer-Korting, M. (2002). Drug targeting by solid lipid nanoparticles for dermal use. *Journal of drug targeting*, 10(6), 489-495.
- Santos, P., Watkinson, A., Hadgraft, J., & Lane, M. (2008). Application of microemulsions in dermal and transdermal drug delivery. *Skin pharmacology and physiology*, 21(5), 246-259.
- Santoyo, S., & Ygartua, P. (2000). Effect of skin pretreatment with fatty acids on percutaneous absorption and skin retention of piroxicam after its topical application. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50(2), 245-250.
- Saribey, G., Kahraman, E., ERDAL, M., & GÜNGÖR, S. (2021). Design and characterisation of colloidal nanocarriers for enhanced skin delivery of etodolac.
- Sawasaki, N., Iwase, S., & Mano, T. (2001). Effect of skin sympathetic response to local or systemic cold exposure on thermoregulatory functions in humans. *Auton Neurosci*, 87(2-3), 274-281. doi:10.1016/S1566-0702(00)00253-8
- Scalia, S., Trotta, V., Iannuccelli, V., & Bianchi, A. (2015). Enhancement of in vivo human skin penetration of resveratrol by chitosan-coated lipid microparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 135, 42-49.
- Sebastia, N., Almonacid, M., Villaescusa, J. I., Cervera, J., Such, E., Silla, M. A., . . . Montoro, A. (2013). Radioprotective activity and cytogenetic effect of resveratrol in human lymphocytes: an in vitro evaluation. *Food Chem Toxicol*, 51, 391-395. doi:10.1016/j.fct.2012.10.013
- Sessa, M., Balestrieri, M. L., Ferrari, G., Servillo, L., Castaldo, D., D'Onofrio, N., . . . Tsao, R. (2014). Bioavailability of encapsulated resveratrol into nanoemulsion-based delivery systems. *Food Chemistry*, 147, 42-50. doi:10.1016/j.foodchem.2013.09.088
- Sessa, M., Balestrieri, M. L., Ferrari, G., Servillo, L., Castaldo, D., D'Onofrio, N., . . . Tsao, R. (2014). Bioavailability of encapsulated resveratrol into nanoemulsion-based delivery systems. *Food chemistry*, 147, 42-50.

- Sessa, M., Tsao, R., Liu, R., Ferrari, G., & Donsì, F. (2011). Evaluation of the stability and antioxidant activity of nanoencapsulated resveratrol during in vitro digestion. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(23), 12352-12360.
- Seth, B. (1999). Transdermal delivery using decycloxazolidin-2-one. *Arzeim-forsch. Drug Res* 1999; 42: 120, 122.
- Shabir, G. A. (2003). Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of chromatography A*, 987(1-2), 57-66.
- Shafiq, S., Shakeel, F., Talegaonkar, S., Ahmad, F. J., Khar, R. K., & Ali, M. (2007). Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation. *Eur J Pharm Biopharm*, 66(2), 227-243. doi:10.1016/j.ejpb.2006.10.014
- Shahiwala, A., & Misra, A. (2002). Studies in topical application of niosomally entrapped Nimesulide. *J Pharm Pharm Sci*, 5(3), 220-225. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12553889>
- Shakeel, F., Baboota, S., Ahuja, A., Ali, J., Aqil, M., & Shafiq, S. (2007). Nanoemulsions as vehicles for transdermal delivery of aceclofenac. *AAPS PharmSciTech*, 8(4), 191-199.
- Sharkawy, A., Casimiro, F. M., Barreiro, M. F., & Rodrigues, A. E. (2020). Enhancing trans-resveratrol topical delivery and photostability through entrapment in chitosan/gum Arabic Pickering emulsions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 147, 150-159. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.01.057
- Sharma, B., Iqbal, B., Kumar, S., Ali, J., & Baboota, S. (2019). Resveratrol-loaded nanoemulsion gel system to ameliorate UV-induced oxidative skin damage: from in vitro to in vivo investigation of antioxidant activity enhancement. *Archives of dermatological research*, 311(10), 773-793. doi:10.1007/s00403-019-01964-3
- Sharma, D. (2018). Microneedles: an approach in transdermal drug delivery: a Review. *PharmaTutor*, 6(1), 7-15.
- Sharma, N., Antil, V., & Jain, S. (2013). Microemulsion: A review. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 23-36.
- Singh, G., Pai, R. S., & Pandit, V. (2012). Development and validation of a HPLC method for the determination of trans-resveratrol in spiked human plasma. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 3(2), 130.
- Sintov, A. C., & Botner, S. (2006). Transdermal drug delivery using microemulsion and aqueous systems: Influence of skin storage conditions on the in vitro permeability of diclofenac from aqueous vehicle systems. *International journal of pharmaceuticals*, 311(1-2), 55-62. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.12.019
- Sintov, A. C., & Shapiro, L. (2004). New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability in vivo. *J Control Release*, 95(2), 173-183. doi:10.1016/j.jconrel.2003.11.004
- Sirerol, J. A., Feddi, F., Mena, S., Rodriguez, M. L., Sirera, P., Aupí, M., . . . Estrela, J. M. (2015). Topical treatment with pterostilbene, a natural phytoalexin, effectively protects hairless mice against UVB radiation-induced skin damage and carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 85, 1-11.

- Sk, A., Sk, N. M., Konda, R. K., & Naik, V. (2020). Micro Emulsions: An Overview And Pharmaceutical Applications. *World Journal of Current Medical and Pharmaceutical Research*, 201-205.
- Smoliga, J. M., Baur, J. A., & Hausenblas, H. A. (2011). Resveratrol and health--a comprehensive review of human clinical trials. *Mol Nutr Food Res*, 55(8), 1129-1141. doi:10.1002/mnfr.201100143
- Soeur, J., Eilstein, J., Lereaux, G., Jones, C., & Marrot, L. (2015). Skin resistance to oxidative stress induced by resveratrol: from Nrf2 activation to GSH biosynthesis. *Free Radic Biol Med*, 78, 213-223. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.510
- Solans, C., & Garcia-Celma, M. J. (1997). Surfactants for microemulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2(5), 464-471.
- Soltani-Arabshahi, R., Wong, J. W., Duffy, K. L., & Powell, D. L. (2014). Facial allergic granulomatous reaction and systemic hypersensitivity associated with microneedle therapy for skin rejuvenation. *JAMA dermatology*, 150(1), 68-72.
- Song, M. G., Jho, S. H., Kim, J. Y., & Kim, J. D. (2000). Rapid Evaluation of Water-in-Oil (w/o) Emulsion Stability by Turbidity Ratio Measurements. *J Colloid Interface Sci*, 230(1), 213-215. doi:10.1006/jcis.2000.7090
- Southwell, D., & Barry, B. W. (1983). Penetration enhancers for human skin: mode of action of 2-pyrrolidone and dimethylformamide on partition and diffusion of model compounds water, n-alcohols, and caffeine. *Journal of Investigative Dermatology*, 80(6), 507-514.
- Stahl, J., Wohler, M., & Kietzmann, M. (2012). Microneedle pretreatment enhances the percutaneous permeation of hydrophilic compounds with high melting points. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 13(1), 1-7.
- Stervbo, U., Vang, O., & Bonnesen, C. (2007). A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chemistry*, 101(2), 449-457.
- Stubenrauch, C., Tessendorf, R., Salvati, A., Topgaard, D., Sottmann, T., Strey, R., & Lynch, I. (2008). Gelled polymerizable microemulsions. 2. Microstructure. *Langmuir*, 24(16), 8473-8482. doi:10.1021/la800918g
- Subramony, J. A., Sharma, A., & Phipps, J. B. (2006). Microprocessor controlled transdermal drug delivery. *Int J Pharm*, 317(1), 1-6. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.03.053
- Sun, R., Zhao, G., Ni, S., & Xia, Q. (2014). Lipid based nanocarriers with different lipid compositions for topical delivery of resveratrol: comparative analysis of characteristics and performance. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 24(6), 591-600.
- Syed, H. K., & Peh, K. K. (2014). Identification of phases of various oil, surfactant/co-surfactants and water system by ternary phase diagram. *Acta Pol Pharm*, 71(2), 301-309.
- Tadros, T. F. (1992). Future developments in cosmetic formulations. *Int J Cosmet Sci*, 14(3), 93-111. doi:10.1111/j.1467-2494.1992.tb00045.x
- Tadwee, I. K., Gore, S., & Giradkar, P. (2012). Advances in topical drug delivery system: a review. *Int. J. of Pharm. Res. & All. Sci*, 1(1), 14-23.
- Talegaonkar, S., Azeem, A., Ahmad, F. J., Khar, R. K., Pathan, S. A., & Khan, Z. I. (2008). Microemulsions: a novel approach to enhanced drug delivery. *Recent Pat Drug Deliv Formul*, 2(3), 238-257. doi:10.2174/187221108786241679

- Tang, H., Xiang, S., Li, X., Zhou, J., & Kuang, C. (2019). Preparation and in vitro performance evaluation of resveratrol for oral self-microemulsion. *Plos One*, 14(4), e0214544.
- Tas, C., Ozkan, Y., Okyar, A., & Savaser, A. (2007). In vitro and ex vivo permeation studies of etodolac from hydrophilic gels and effect of terpenes as enhancers. *Drug delivery*, 14(7), 453-459.
- Tenjarla, S. (1999). Microemulsions: an overview and pharmaceutical applications. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 16(5).
- Thakur, R. R. S., Fallows, S. J., McMillan, H. L., Donnelly, R. F., & Jones, D. S. (2014). Microneedle-mediated intrascleral delivery of in situ forming thermoresponsive implants for sustained ocular drug delivery. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 66(4), 584-595.
- Timmers, S., Auwerx, J., & Schrauwen, P. (2012). The journey of resveratrol from yeast to human. *Aging (Albany NY)*, 4(3), 146-158. doi:10.18632/aging.100445
- Timmers, S., Hesselink, M. K., & Schrauwen, P. (2013). Therapeutic potential of resveratrol in obesity and type 2 diabetes: new avenues for health benefits? *Ann N Y Acad Sci*, 1290, 83-89. doi:10.1111/nyas.12185
- Tome-Carneiro, J., Larrosa, M., Gonzalez-Sarrias, A., Tomas-Barberan, F. A., Garcia-Conesa, M. T., & Espin, J. C. (2013). Resveratrol and clinical trials: the crossroad from in vitro studies to human evidence. *Curr Pharm Des*, 19(34), 6064-6093. doi:10.2174/13816128113199990407
- Toutou, E., Dayan, N., Bergelson, L., Godin, B., & Eliaz, M. (2000). Ethosomes - novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. *J Control Release*, 65(3), 403-418. doi:10.1016/s0168-3659(99)00222-9
- Trommer, H., & Neubert, R. (2006). Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. *Skin pharmacology and physiology*, 19(2), 106-121.
- Trommer, H., & Neubert, R. H. (2006). Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. A review. *Skin Pharmacol Physiol*, 19(2), 106-121. doi:10.1159/000091978
- Tsakovska, I., Pajeva, I., Al Sharif, M., Alov, P., Fioravanzo, E., Kovarich, S., . . . Cronin, M. T. D. (2017). Quantitative structure-skin permeability relationships. *Toxicology*, 387, 27-42. doi:10.1016/j.tox.2017.06.008
- Tupker, R. A., Pinnagoda, J., & Nater, J. P. (1990). The transient and cumulative effect of sodium lauryl sulphate on the epidermal barrier assessed by transepidermal water loss: inter-individual variation. *Acta Derm Venereol*, 70(1), 1-5. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1967864>
- Umerska, A., Cassisa, V., Matougui, N., Joly-Guillou, M. L., Eveillard, M., & Saulnier, P. (2016). Antibacterial action of lipid nanocapsules containing fatty acids or monoglycerides as co-surfactants. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 108, 100-110. doi:10.1016/j.ejpb.2016.09.001
- van Staden, D., du Plessis, J., & Viljoen, J. (2020). Development of a Self-Emulsifying Drug Delivery System for Optimized Topical Delivery of Clofazimine. *Pharmaceutics*, 12(6). doi:ARTN 523
- 10.3390/pharmaceutics12060523
- van Zyl, L., du Preez, J., Gerber, M., du Plessis, J., & Viljoen, J. (2016). Essential Fatty Acids as Transdermal Penetration Enhancers. *Journal of pharmaceutical sciences*, 105(1), 188-193. doi:10.1016/j.xphs.2015.11.032

- Vandamme, T. F. (2002). Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. *Progress in Retinal and Eye Research*, 21(1), 15-34. doi:Pii S1350-9462(01)00017-9
- Doi 10.1016/S1350-9462(01)00017-9
- Varelas, C. G., Dixon, D. G., & Steiner, C. A. (1995). Zero-Order Release from Biphasic Polymer Hydrogels. *Journal of controlled release*, 34(3), 185-192. doi:Doi 10.1016/0168-3659(94)00085-9
- Vaughn, A. R., Clark, A. K., Sivamani, R. K., & Shi, V. Y. (2018). Natural Oils for Skin-Barrier Repair: Ancient Compounds Now Backed by Modern Science. *American Journal of Clinical Dermatology*, 19(1), 103-117. doi:10.1007/s40257-017-0301-1
- Verbaan, F. J., Bal, S. M., van den Berg, D. J., Groenink, W. H., Verpoorten, H., Luttge, R., & Bouwstra, J. A. (2007). Assembled microneedle arrays enhance the transport of compounds varying over a large range of molecular weight across human dermatomed skin. *J Control Release*, 117(2), 238-245. doi:10.1016/j.jconrel.2006.11.009
- Viljoen, J. M., Cowley, A., du Preez, J., Gerber, M., & du Plessis, J. (2015). Penetration enhancing effects of selected natural oils utilized in topical dosage forms. *Drug development and industrial pharmacy*, 41(12), 2045-2054. doi:10.3109/03639045.2015.1047847
- Vitonyte, J., Manca, M. L., Caddeo, C., Valenti, D., Peris, J. E., Usach, I., . . . Manconi, M. (2017). Bifunctional viscous nanovesicles co-loaded with resveratrol and gallic acid for skin protection against microbial and oxidative injuries. *Eur J Pharm Biopharm*, 114, 278-287. doi:10.1016/j.ejpb.2017.02.004
- Vyas, S., & Khar, R. (2002). Introduction to parenteral drug delivery. Targeted and controlled drug delivery. In: New Delhi: CBS Publishers and Distributors.
- Wagemaker, T. A., Campos, P. M. M., Shimizu, K., Kyotani, D., & Yoshida, D. (2017). Antioxidant-based topical formulations influence on the inflammatory response of Japanese skin: a clinical study using non-invasive techniques. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 117, 195-202.
- Waghule, T., Singhvi, G., Dubey, S. K., Pandey, M. M., Gupta, G., Singh, M., & Dua, K. (2019). Microneedles: A smart approach and increasing potential for transdermal drug delivery system. *Biomed Pharmacother*, 109, 1249-1258. doi:10.1016/j.biopha.2018.10.078
- Wagner, J. G. (1969). Interpretation of percent dissolved-time plots derived from in vitro testing of conventional tablets and capsules. *J Pharm Sci*, 58(10), 1253-1257. doi:10.1002/jps.2600581021
- Walle, T., Hsieh, F., DeLegge, M. H., Oatis, J. E., & Walle, U. K. (2004). High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug metabolism and disposition*, 32(12), 1377-1382.
- Wang, B., Wood, I. S., & Trayhurn, P. (2007). Dysregulation of the expression and secretion of inflammation-related adipokines by hypoxia in human adipocytes. *Pflugers Arch*, 455(3), 479-492. doi:10.1007/s00424-007-0301-8
- Warisnoicharoen, W., Lansley, A., & Lawrence, M. (2000). Nonionic oil-in-water microemulsions: the effect of oil type on phase behaviour. *International journal of Pharmaceutics*, 198(1), 7-27.

- Wen, S., Zhang, J., Yang, B., Elias, P. M., & Man, M.-Q. (2020). Role of resveratrol in regulating cutaneous functions. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020.
- Williams, A., & Barry, B. (1989). Essential oils as novel human skin penetration enhancers. *International journal of pharmaceuticals*, 57(2), R7-R9.
- Williams, A. C., & Barry, B. W. (2004). Penetration enhancers. *Adv Drug Deliv Rev*, 56(5), 603-618. doi:10.1016/j.addr.2003.10.025
- Williams, A. C., & Barry, B. W. (2012). Penetration enhancers. *Advanced drug delivery reviews*, 64, 128-137.
- Wissing, S., & Müller, R. (2002). Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration. *Journal of controlled release*, 81(3), 225-233.
- Wu, X.-M., Todo, H., & Sugibayashi, K. (2007). Enhancement of skin permeation of high molecular compounds by a combination of microneedle pretreatment and iontophoresis. *Journal of controlled release*, 118(2), 189-195.
- Wu, Z., Joo, H., Lee, T. G., & Lee, K. (2005). Controlled release of lidocaine hydrochloride from the surfactant-doped hybrid xerogels. *J Control Release*, 104(3), 497-505. doi:10.1016/j.jconrel.2005.02.023
- Yang, F., Wolk, A., Hakansson, N., Pedersen, N. L., & Wirdefeldt, K. (2017). Dietary antioxidants and risk of Parkinson's disease in two population-based cohorts. *Mov Disord*, 32(11), 1631-1636. doi:10.1002/mds.27120
- Yang, S. Y., O'Cearbhaill, E. D., Sisk, G. C., Park, K. M., Cho, W. K., Villiger, M., . . . Karp, J. M. (2013). A bio-inspired swellable microneedle adhesive for mechanical interlocking with tissue. *Nature communications*, 4(1), 1-10.
- Yoon, Y. K., Park, J. H., & Allen, M. G. (2006). Multidirectional UV lithography for complex 3-D MEMS structures. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 15(5), 1121-1130. doi:10.1109/Jmems.2006.879669
- Yuan, Y., Li, S. M., Mo, F. K., & Zhong, D. F. (2006). Investigation of microemulsion system for transdermal delivery of meloxicam. *Int J Pharm*, 321(1-2), 117-123. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.06.021
- Zaichik, S., Steinbring, C., Menzel, C., Knabl, L., Orth-Holler, D., Ellemunter, H., . . . Bernkop-Schnurch, A. (2018). Development of self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for ciprofloxacin with improved mucus permeating properties. *International journal of pharmaceuticals*, 547(1-2), 282-290. doi:10.1016/j.ijpharm.2018.06.005
- Zhang, L., Zhang, L., Zhang, M., Pang, Y., Li, Z., Zhao, A., & Feng, J. (2015). Self-emulsifying drug delivery system and the applications in herbal drugs. *Drug delivery*, 22(4), 475-486.
- Zhang, Q., Jiang, X., Jiang, W., Lu, W., Su, L., & Shi, Z. (2004). Preparation of nimodipine-loaded microemulsion for intranasal delivery and evaluation on the targeting efficiency to the brain. *International journal of pharmaceuticals*, 275(1-2), 85-96.
- Zhu, D. D., Wang, Q. L., Liu, X. B., & Guo, X. D. (2016). Rapidly separating microneedles for transdermal drug delivery. *Acta Biomater*, 41, 312-319. doi:10.1016/j.actbio.2016.06.005
- Zouboulis, C. C. (2004). Acne and sebaceous gland function. *Clin Dermatol*, 22(5), 360-366. doi:10.1016/j.clindermatol.2004.03.004
- Zouboulis, C. C., Picardo, M., Ju, Q., Kurokawa, I., Torocsik, D., Biro, T., & Schneider, M. R. (2016). Beyond acne: Current aspects of sebaceous gland biology and

function. *Rev Endocr Metab Disord*, 17(3), 319-334. doi:10.1007/s11154-016-9389-5



İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

RESVERATROL İÇEREN TRANSDERMAL MİKROEMÜLSİYONLARIN HAZIRLANMASI KARAKTERİZASYONU VE KATI MİKROİĞNELER İLE UYGULANMASI

ORJİNALLIK RAPORU

% 3	% 3	% 1	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
2	dergi.fabad.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
3	acikerisim.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
4	dspace.gazi.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
5	d397b70a-dbdf-4a9f-b3af-66ce20541d9e.filesusr.com İnternet Kaynağı	<% 1
6	www.tandfonline.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	Kanerva s Occupational Dermatology, 2012. Yayın	<% 1
8	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1