ROSMARİNİK ASİT YÜKLÜ PLGA BAZLI NANOSİSTEMLERİN HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE ANTİOKSİDAN ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Yüksek Lisans Tezi

Büşra SOLAK

Eskişehir 2025

ROSMARİNİK ASİT YÜKLÜ PLGA BAZLI NANOSİSTEMLERİN HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE ANTİOKSİDAN ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Büşra SOLAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Kozmetoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. A. Alper ÖZTÜRK

Anadolu Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Şubat 2025

Eskişehir

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Büşra SOLAK'ın "Rosmarinik Asit Yüklü PLGA Bazlı Nanosistemlerin Hazırlanması, Karakterizasyonu ve Antioksidan Etkinliklerinin Belirlenmesi" başlıklı tezi 04.02.2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği" nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Kozmetoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	Ünvanı Adı Soyadı	**İmza**
Üye (Danışman)	**: Doç. Dr. A. Alper ÖZTÜRK**	**.....**
Üye	**: Prof. Dr. Ebru Başaran**	**.....**
Üye	**: Doç. Dr. Umay Merve GÜVEN BÖLGEN**	**.....**

Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ÖZET

ROSMARİNİK ASİT YÜKLÜ PLGA BAZLI NANOSİSTEMLERİN HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE ANTİOKSİDAN ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Büşra SOLAK

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Kozmetoloji Bilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Şubat 2025

Danışman: Doç. Dr. A. Alper ÖZTÜRK

Bu çalışmada, yaşlanma sürecine karşı etkili bir çözüm olarak rosmarinik asit kullanımı araştırılmıştır. Yaşlanma, serbest radikallerin vücutta oluşturduğu oksidatif stresle ilişkilidir ve bu süreçte antioksidanlar önemli bir rol oynamaktadır. Rosmarinik asit, güçlü antioksidan ve antimikrobiyal özellikleriyle dikkat çeken bir bileşiktir. Ancak, düşük lipit çözünürlüğü ve etkinliğinin sınırlı olması nedeniyle, bu çalışmada rosmarinik asidin etkinliğini artırmak amacıyla PLGA bazlı nanopartiküller geliştirilmiştir. Nanoçöktürme yöntemiyle hazırlanan bu nanopartiküller farmasötik teknoloji ve kozmetoloji açısından incelenip karakterize edilmiştir. Yapılan çeşitli analizler, rosmarinik asit yüklü nanopartiküllerin antioksidan etkinliğini artırırken, antimikrobiyal aktiviteleri de anlamlı şekilde geliştirdiğini ortaya koymuştur. Bu çalışma, kozmetik ve dermokozmetik sektöründe doğal antioksidanlar kullanılarak etkinliğin iyileştirilmesine yönelik önemli bir katkı sağlamaktadır.

Anahtar Sözcükler: Rosmarinik asit, PLGA, Nanopartikül, Antioksidan.

ABSTRACT

PREPARATION, CHARACTERIZATION AND DETERMINATION OF ANTIOXIDANT EFFECTS OF ROSMARINIC ACID LOADED PLGA BASED NANOSYSTEM

Büşra SOLAK

Department of Pharmaceutical Technology

Department of Cosmetology

Anadolu University, Institute of Postgraduate Education, February 2025

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. A. Alper ÖZTÜRK

In this study, the use of rosmarinic acid as an effective solution against the aging is associated with oxidative stres caused by free radicals in the body, and antioxidants play an important role in this process. Rosmarinic acid is a compound that draws attention with its strong antioxidant and antimicrobial properties. However, due to its low solubility in lipid and limited effectiveness, PLGA-based nanoparticles were developed in this study to increase the effectiveness of rosmarinic acid. These nanoparticles prepared by the nanoprecipitation method were examined and characterized in terms of pharmaceutical technology and cosmetology. Various analyzes revealed that rosmarinic acid loaded nanoparticles significantly improved antimicrobial activities while increasing antioxidant effectiveness. This study provides an important contribution to the improvement of effectiveness by using natural antioxidants in the cosmetics and dermocosmetics sector.

Keywords: Rosmarinic acid, PLGA, Nanoparticle, Antioxidant.

04/02/2025

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını ve hiçbir şekilde "intihal içermediğini" beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

.....

Büşra Solak

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezim boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana rehberlik eden, her aşamada yardımlarını esirgemeyen kıymetli danışman hocam Sayın Doç. Dr. A. Alper Öztürk'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, tez çalışmalarım süresince desteklerini hissettiğim ve değerli katkılarda bulunan Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nın kıymetli öğretim üyelerine, araştırma görevlilerine ve tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Biyolojik aktivite çalışmalarımda ve deneylerimde beni yönlendiren ve destekleyen Farmasötik Mikrobiyoloji Bölümü öğretim görevlisi Sayın Öğr. Gör. Pervin Soyer'e minnettarlığımı ifade etmek isterim. Tez sürecimde her zaman yanımda olan, varlığıyla beni güçlendiren, dostluğu ve desteğiyle çalışmalarıma katkı sağlayan canım arkadaşım, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Derya Osmaniye'ye gönülden teşekkür ederim.

Ve en büyük teşekkürüm, her zaman yanımda olan, sevgileri ve destekleriyle beni her an güçlendiren, her koşulda varlıklarını hissettiren canım ailemedir. Onlara sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

04/02/2025

ETİK KURUL BELGESİ BEYANNAMESİ

Bu tez çalışmasının hazırlanmasında, yürütülmesinde, verilerin analizinde Etik Kurul İzni'ne gerek yoktur.

Büşra Solak

ÜRETKEN YAPAY ZEKÂ KULLANIM BEYANI

Bu tezi hazırlarken (örneğin ChatGPT, Gemini, DALL-E vb.) üretken yapay zekâ programlarından destek aldığımı beyan ederim. Tezin hazırlığı aşamasında üretken yapay zekâ programlarından (örneğin çeviri, bilimsel makale vb.) desteği aldım. Üretken yapay zekâ programlarından aldığım bilgilerin doğruluğunu kontrol ettiğimi bildiririm.

Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Büşra Solak

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI i

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI ii

ÖZET iii

ABSTRACT iv

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ v

TEŞEKKÜR vi

ETİK KURUL BELGESİ BEYANNAMESİ vii

ÜRETKEN YAPAY ZEKÂ KULLANIM BEYANI viii

İÇİNDEKİLER ix

TABLOLAR DİZİNİ xv

ŞEKİLLER DİZİNİ xvii

GÖRSELLER DİZİNİ xxii

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xxiii

1 GİRİŞ 1

2 KAYNAK BİLGİSİ 2

2.1 Yaşlanma 2

2.1.1 Oksidatif stres ve yaşlanma 4

2.1.2 Antioksidan 6

2.2 Rosmarinik Asit 8

2.3 Nanopartiküller 12

2.3.1 Polimerik nanopartikül 12

2.3.2 Polimerik nanopartikül üretimi 15

2.3.2.1 Çözücü buharlaştırma yöntemi 15

2.3.2.2 Tuzla çöktürme yöntemi 17

2.3.2.3 Nanoçöktürme yöntemi 18

2.3.2.4 Diyaliz 19

2.3.2.5 Süperkritik sıvı teknolojisi 20

2.4 Nanopartiküllerin Karakterizasyonu 20

2.4.1 Parçacık boyutu ve dağılımı 20

2.4.2 Zeta potansiyel 21

2.4.3 Yapısal analiz 23

2.4.4 İlaç salım 24

2.4.4.1 Ultraviyole-Görünür Spektroskopi (UV-Vis) 24

2.5 Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler 24

2.5.1 Resomer RG 502H 26

3 GEREÇLER 27

3.1 Kullanılan Maddeler 27

3.2 Kullanılan Cihazlar 27

4 YÖNTEM 28

4.1 Analitik Miktar Tayini İçin Validasyon Çalışmaları 28

4.1.1 Rosmarinik asit için aseton: Su (1:1 h/h) ortamında validasyon çalışması 28

4.1.1.1 Absorbans belirleme çalışmaları 28

4.1.1.2 Doğrusallık 28

4.1.1.3 Kesinlik 28

4.1.1.4 Doğruluk 29

4.1.1.5 Duyarlılık 29

4.1.1.6 Seçicilik 29

4.1.2 Rosmarinik asit için PBS pH 7.4 ortamında validasyon çalışması 30

4.1.2.1 Absorbans belirleme çalışmaları 30

4.1.2.2 Doğrusallık 30

4.1.2.3 Kesinlik 30

4.1.2.4 Doğruluk 30

4.1.2.5 Duyarlılık 31

4.1.1.6 Seçicilik 31

4.2 Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması 31

4.2.1 B-Blank-NP kodlu boş/blank formülasyonun hazırlanması 32

4.2.2 B-RA-NP kodlu etkin madde içeren formülasyonun hazırlanması 32

4.3 Karakterizasyon Çalışmaları 32

4.3.1 Parçacık boyutu, parçacık boyutu dağılımı (PDI) ve zeta potansiyel belirleme çalışması 33

4.3.2 Dondurma ve liyofilizasyon işlemlerinde kullanılan trehaloz miktarı ve saklama koşulu belirleme çalışması 33

4.3.3 Enkapsülasyon etkinliği çalışması 34

4.3.4 *In vitro* dissolüsyon çalışması 34

4.3.5 Salım kinetiği çalışması 35

4.4 Katı Hal Karakterizasyonları 36

4.4.1 Termal (DSC) analizler 36

4.4.2 Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektrofotometre analizleri 36

4.4.3 Nükleer manyetik rezonans (1H-NMR) analizleri 36

4.5 Biyolojik Aktivite Çalışmaları 36

4.5.1 Antioksidan aktivitenin belirlenmesi 36

4.5.2 Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi 37

4.5.2.1 Agar Difüzyon yöntemi 37

4.5.2.2 Sıvı mikrodilüsyon yöntemi 37

5 BULGULAR 39

5.1 Analitik Miktar Tayini İçin Validasyon Çalışmaları 39

5.1.1 Rosmarinik asit için aseton: su (1:1 *h/h*) ortamında validasyon çalışması 39

5.1.1.1 Absorbans belirleme 39

5.1.1.2 Doğrusallık 39

5.1.1.3 Kesinlik 40

5.1.1.4 Doğruluk 42

5.1.1.5 Duyarlılık 42

5.1.1.6 Seçicilik 42

5.1.2 Rosmarinik asit için PBS pH 7.4 ortamında validasyon çalışması 44

5.1.2.1 Absorbans belirleme 44

5.1.2.2 Doğrusallık 45

5.1.2.3 Kesinlik 46

5.1.2.4 Doğruluk 47

5.1.2.5 Duyarlılık 48

5.1.2.6 Seçicilik 48

5.2 Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu 50

5.2.1 Parçacık boyutu, parçacık boyutu dağılımı (PDI) ve zeta potansiyel belirleme çalışması 50

5.2.1.1 Parçacık boyutu ve parçacık boyutu dağılımı (PDI) analiz sonuçları 50

5.2.1.2 Zeta potansiyel analiz sonuçları 52

5.2.2 Dondurma ve liyofilizasyon işlemlerinde kullanılan trehaloz miktarı ve saklama koşulu belirleme çalışması 54

5.2.2.1 Dondurma işleminin parçacık boyutuna etkisi 54

5.2.2.2 Liyofilizasyon işleminin parçacık boyutuna etkisi 57

5.2.3 Enkapsülasyon etkinliği çalışması 60

5.2.4 *In vitro* dissolüsyon çalışması 60

5.2.5 Salım kinetiği çalışması 64

5.3 Katı Hal Karakterizasyonları 77

5.3.1 Termal (DSC) analizler 77

5.3.2 Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektrofotometre analizleri 79

5.3.3 Nükleer manyetik rezonans (^{1}H-NMR) analizleri 81

5.4 Biyolojik Aktivite Çalışmaları 86

5.4.1 Antioksidan aktivitenin belirlenmesi 86

5.4.2 Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi 88

6 TARTIŞMA 90

6.1 Analitik Miktar Tayini İçin Validasyon Çalışmaları 90

6.1.1 Rosmarinik asit için aseton: Su (1:1 h/h) ortamında validasyon çalışması 90

6.1.2 Rosmarinik asit için PBS pH 7.4 ortamında validasyon çalışması 91

6.2 Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu 92

6.2.1 Parçacık boyutu, parçacık boyutu dağılımı (PDI) ve zeta potansiyel belirleme çalışması 93

6.2.2 Dondurma ve liyofilizasyon işlemlerinde kullanılan trehaloz miktarı ve saklama koşulu belirleme çalışması 94

6.2.3 Enkapsülasyon etkinliği çalışması 95

6.2.4 *In vitro* dissolüsyon çalışması 95

6.2.5 Salım kinetiği çalışması 96

6.3. Katı Hal Karakterizasyonları 96

6.3.1 Termal (DSC) analizler 97

6.3.2 Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektrofotometre analizleri 98

6.3.3 Nükleer manyetik rezonans (1H-NMR) analizleri 99

6.4 Biyolojik Aktivite Çalışmaları 100

6.4.1 Antioksidan aktivitenin belirlenmesi 100

6.4.2 Antimikrobiyal aktivite 101

7 SONUÇ 103

KAYNAKÇA 105

ÖZ GEÇMİŞ

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1 Antioksidanların Sınıflandırılması 7

Tablo 2.2 Nanopartikül Hazırlamada Kullanılan Polimerler 24

Tablo 4.1 Formülasyon Hazırlanması 31

Tablo 5.1 Aseton: Su (1:1, h/h) Ortamında Doğrusallık Sonuçları 40

Tablo 5.2 5.0 µg.mL^{-1} Derişim İçin Aseton: Su (1:1, h/h) Ortamında Kesinlik Sonuçları 41

Tablo 5.3 10.0 µg.mL^{-1} Derişim İçin Aseton: Su (1:1, h/h) Ortamında Kesinlik Sonuçları 41

Tablo 5.4 15.0 µg.mL^{-1} Derişim İçin Aseton: Su (1:1, h/h) Ortamında Kesinlik Sonuçları 41

Tablo 5.5 Yöntemin Aseton: Su (1:1, h/h) Ortamında Doğruluk Sonuçları 42

Tablo 5.6 PBS pH 7.4 Ortamında Doğrusallık Çalışması Sonuçları 45

Tablo 5.7 5.0 µg.mL^{-1} Derişim İçin PBS pH 7.4 Ortamında Kesinlik Sonuçları 46

Tablo 5.8 10.0 µg.mL^{-1} Derişim İçin PBS pH 7.4 Ortamında Kesinlik Sonuçları 47

Tablo 5.9 15.0 µg.mL^{-1} Derişim İçin PBS pH 7.4 Ortamında Kesinlik Sonuçları 47

Tablo 5.10 Yöntemin PBS pH 7.4 Ortamında Doğruluk Sonuçları 48

Tablo 5.11 Parçacık Boyutu Analiz Sonuçları 50

Tablo 5.12 Parçacık Boyutu Dağılımı (PDI) Analiz Sonuçları 51

Tablo 5.13 Zeta Potansiyel Analiz Sonuçları 52

Tablo 5.14 Dondurma İşleminin Parçacık Boyutuna Etkisi ve Trehaloz Miktarına Göre Değişim Sonuçları..... 54

Tablo 5.15 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin Dondurma İşleminin Parçacık Boyutuna Etkisinin ve Trehaloz Miktarının Tüm Koşullarda İstatistiksel Karşılaştırması 55

Tablo 5.16 Liyofilizasyon İşleminin Parçacık Boyutuna Etkisi ve Trehaloz Miktarına Göre Değişim Sonuçları..... 57

Tablo 5.17 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin Liyofilizasyon İşleminin Parçacık Boyutuna Etkisinin ve Trehaloz Miktarının Tüm Koşullarda İstatistiksel Karşılaştırması 58

Tablo 5.18 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin Enkapsülasyon Etkinliği (%EE) Sonuçları 60

Tablo 5.19 % Kümülatif Olarak Hesaplanmış Rosmarinik Asit İçin In Vitro Dissolüsyon Çalışması Sonuçları..... 60

Tablo 5.20 % Kümülatif Olarak Hesaplanmış B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin In Vitro Dissolüsyon Çalışması Sonuçları 60

Tablo 5.21 % Kümülatif Olarak Hesaplanmış Rosmarinik Asit ve B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin In Vitro Dissolüsyon Çalışması Sonuçlarının İstatistiksel Karşılaştırması 61

Tablo 5.22 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin 0-6. Saat Salım Kinetiği Sonuçları 64

Tablo 5.23 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin 6-72. Saat Salım Kinetiği Sonuçları ... 69

Tablo 5.24 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin 72 Saatlik Salım Kinetiği Sonuçları ... 74

Tablo 5.25 Antioksidan Etkinlik Testlerinde Belirlenen IC_{50} ($\mu g.mL^{-1}$) Değerleri..... 86

Tablo 5.26 Antimikrobiyal Etkinlik Milimetre Cinsinden Değerleri (ort± SS)..... 89

Tablo 5.27 Antimikrobiyal MİK Değerleri..... 89

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Oksidatif Stresin Özeti 6

Şekil 2.2 Rosmarinik asitin İnsan Sağlığı Üzerindeki Farmakolojik Etkileri 9

Şekil 2.3 (2 R)-3-(3,4-Dihidroksifenil)-2-[(E)-3-(3,4-Dihidroksifenil)Prop-2-Enoil]Oksipropanoik Asit 10

Şekil 2.4 Sentezlendikleri ve Sentez Sonrası Sahip Oldukları Morfolojiye Göre Nanopartiküllerin Sınıflandırılması 13

Şekil 2.5 Nanoküre ve Nanokapsül Yapısının Şematik Gösterimi 13

Şekil 2.6 Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanmasında Kullanılan Çeşitli Tekniklerin Şematik Gösterimi 15

Şekil 2.7 Çözücü Buharlaştırma Yönteminin Şematik Gösterimi 16

Şekil 2.8 Tuzla Çöktürme Yönteminin Şematik Gösterimi 17

Şekil 2.9 Nanoçöktürme Yöntemi Şematik Gösterim 18

Şekil 2.10 Diyaliz Yöntemi ile Nanopartikül Oluşumunun Şematik Gösterimi 19

Şekil 2.11 Sıvı İçinde Bulunan Parçacığın Zeta Potansiyel Şematik Gösterimi 22

Şekil 2.12 Poli(d,l-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) Polimer Kimyasal Yapısı 25

Şekil 5.1 Rosmarinik Asit'e ait 200-800 nm Arasında Aseton: Su (1:1, h/h) Ortamında Elde Edilen Spektrum (λ_{max} = 330.0 nm) 39

Şekil 5.2 Rosmarinik Asit 'in Aseton: Su (1:1, h/h) Ortamında Standart Eğrisi 40

Şekil 5.3 Rosmarinik Asit'e ait Aseton: Su (1:1, h/h) Ortamında Spektrum 43

Şekil 5.4 Blank (B-Blank-NP) Formülasyona ait Aseton: Su (1:1, h/h) Ortamında Spektrum 43

Şekil 5.5 Aseton: Su (1:1) ait spektrum 44

Şekil 5.6 Rosmarinik asit'e ait 200-800 nm Arasında PBS pH 7.4 Ortamında Elde Edilen Spektrum (λ_{max} = 324.0 nm) 45

Şekil 5.7 Rosmarinik Asit 'in PBS pH 7.4 Ortamında Standart Eğrisi 46

Şekil 5.8 Rosmarinik asit'e ait PBS pH 7.4 Ortamında Spektrum 48

Şekil 5.9 Blank (B-Blank-NP) Formülasyona ait PBS pH 7.4 Ortamında Spektrum 49

Şekil 5.10 PBS pH 7.4 ait Spektrum 49

Şekil 5.11 Parçacık Boyutu Analizlerinin İstatistiksel Karşılaştırması 50

Şekil 5.12 Parçacık Boyutu Dağılımı (PDI) Analizlerinin İstatistiksel Karşılaştırması. 51

Şekil 5.13 B-Blank-NP Kodlu Formülasyon İçin Zetasizer Nano ZS'den Alınan Parçacık Boyut Dağılım Raporu 51

Şekil 5.14 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin Zetasizer Nano ZS'den Alınan Parçacık Boyut Dağılım Raporu 52

Şekil 5.15 Zeta Potansiyel Analizlerinin İstatistiksel Karşılaştırması 53

Şekil 5.16 B-Blank-NP Kodlu Formülasyon İçin Zetasizer Nano ZS'den Alınan Zeta Potansiyel Dağılım Raporu 53

Şekil 5.17 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin Zetasizer Nano ZS'den Alınan Zeta Potansiyel Dağılım Raporu 54

Şekil 5.18 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin Dondurma İşleminin Parçacık Boyutuna Etkisi ve Trehaloz Miktarına Göre Değişim Grafiği 56

Şekil 5.19 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin Dondurma İşleminin Parçacık Boyutuna Etkisinin ve Trehaloz Miktarının Taze Formülasyona Göre İstatistiksel Karşılaştırması 56

Şekil 5.20 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin Liyofilizasyon İşleminin Parçacık Boyutuna Etkisi ve Trehaloz Miktarına Göre Değişim Grafiği 59

Şekil 5.21 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin Liyofilizasyon İşleminin Parçacık Boyutuna Etkisinin ve Trehaloz Miktarının Taze Formülasyona Göre İstatistiksel Karşılaştırması 59

Şekil 5.22 Rosmarinik Asit ve B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin 72 Saatlik % Kümülatif Olarak Hesaplanmış In Vitro Dissolüsyon Grafiği 62

Şekil 5.23 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin 24 Saatlik % Kümülatif Olarak Hesaplanmış In Vitro Dissolüsyon Grafiği 63

Şekil 5.24 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin Korsmeyer-Peppas Modeli (0-6. Saat) . 65

Şekil 5.25 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin Korsmeyer-Peppas (T_{lag}) Modeli (0-6. Saat) 65

Şekil 5.26 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin Korsmeyer-Peppas (F_0) Modeli (0-6. Saat) 66

Şekil 5.27 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin Peppas-Sahlin 1 Modeli (0-6. Saat) 66

Şekil 5.28 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin Peppas-Sahlin 2 Modeli (0-6. Saat) 67

Şekil 5.29 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin Weibull 1 Modeli (0-6. Saat) 67

Şekil 5.30 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin Weibull 2 Modeli (0-6. Saat) 68

Şekil 5.31 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin Weibull 3 Modeli (0-6. Saat) 68

Şekil 5.32 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin Weibull 4 Modeli (0-6. Saat) 69

Şekil 5.33 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin Birinci-Derece (T_{lag}) Modeli (6.-72. Saat) 70

Şekil 5.34 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin Higuchi (T_{lag}) Modeli (6.-72. Saat) 70

Şekil 5.35 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin Higuchi (F_0) Modeli (6.-72. Saat) 71

Şekil 5.36 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin Korsmeyer-Peppas Modeli (6.-72. Saat) 71

Şekil 5.37 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin Korsmeyer-Peppas (F_0) Modeli (6.-72. Saat) 72

Şekil 5.38 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin Hixson-Crowell (T_{lag}) Modeli (6.-72. Saat) 72

Şekil 5.39 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin Hopfenberg (T_{lag}) Modeli (6.-72. Saat) 73

Şekil 5.40 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin Baker-Lonsdale (T_{lag}) Modeli (6.-72. Saat) 73

Şekil 5.41 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin Korsmeyer-Peppas Modeli (72. Saat) .. 74

Şekil 5.42 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin Korsmeyer-Peppas (T_{lag}) Modeli (72. Saat) 74

Şekil 5.43 B-RA-NP kodlu Formülasyon İçin Korsmeyer-Peppas (F_0) Modeli (72. Saat) 75

Şekil 5.44 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin Peppas-Sahlin 1 Modeli (72. Saat)..... 75

Şekil 5.45 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin Weibull 1 Modeli (72. Saat)..... 76

Şekil 5.46 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin Weibull 3 Modeli (72. Saat)..... 76

Şekil 5.47 B-RA-NP Kodlu Formülasyon İçin Weibull 4 Modeli (72. Saat)..... 77

Şekil 5.48 Rosmarinik Asit İçin DSC Termogramı..... 77

Şekil 5.49 PLGA İçin DSC Termogramı..... 78

Şekil 5.50 B-Blank-NP İçin DSC Termogramı 78

Şekil 5.51 B-RA-NP İçin DSC Termogramı 79

Şekil 5.52 Rosmarinik Asit İçin FT-IR Spektrumu 79

Şekil 5.53 PLGA İçin FT-IR Spektrumu 80

Şekil 5.54 B-Blank-NP İçin FT-IR Spektrumu 80

Şekil 5.55 B-RA-NP İçin FT-IR Spektrumu 81

Şekil 5.56 Rosmarinik Asit İçin ^{1}H-NMR Spektrumu 82

Şekil 5.57 PLGA için^{1}H-NMR Spektrumu 83

Şekil 5.58 B-Blank-NP İçin ^{1}H-NMR Spektrumu..... 84

Şekil 5.59 B-RA-NP İçin ^{1}H-NMR Spektrumu..... 85

Şekil 5.60 DPPH % Inhibisyonkonstrasyon Sonuçları 62.5µg.mL^{-1}[**A**], 125µg.mL^{-1}[**B**], 250µg.mL^{-1} [**C**], 500µg.mL^{-1} [**D**], and 1000µg.mL^{-1} [**E**] 87

GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 4.1 RA ve B-RA-NP İçin *in vitro* Dissolüsyon Çalışması 35

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

(S/Y/S)	: Su içinde yağ -su içinde
% EE	: Enkapsülasyon etkinliği
°C	: Derece santigrat
a/h	: Ağırlık/hacim
AFM	: Atomik Kuvvet Mikroskobu
AIC	: Akaike Bilgi Kriteri
ATP	: Adenozin trifosfat
B-Blank-NP	: Boş nanopartikül formülasyonu
B-RA-NP	: Rosmarinik asit yüklü nanopartikül
CAT	: Katalaz
DLS	: Dinamik ışık saçılımı
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DPPH	: 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil radikali
DSC	: Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
FDA	: ABD Gıda ve İlaç Dairesi
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi
FTS	: Fizyolojik tuzlu su
FTS	: Fourier Dönüşümlü Spektroskopi
GPx	: Glutatyon peroksidaz
h/h	: Hacim/hacim
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
ICH	: Uluslararası Harmanizasyon Konseyi
LOD	: Tespit Sınırı
LOQ	: Ölçüm Sınırı

M : Korelasyon Eşitliğinin Eğimi

mg/mL : Miligram/mililitre

MHB : MuellerHinton Besiyeri

MİK : Minimum İnhibitör Konsantrasyon

MRSA : Metisiline dirençli Staphylococcusaureus

MSC : Model Seçim Kriteri

nm : Nanometre

NMR : Nükleer Manyetik Rezonans

NP : Nanopartikül

NP : Nanopartikül

OS : Oksidatif stres

PBS : Fosfat Tampon Çözeltisi

PCS : Foton korelasyon spektroskopisi

PDI : Parçacık Boyutu Dağılımı

PEG : Poli(etilen glikol)

PEO : Poli(etilen oksit)

PGA : Poliglikolik asit

PLA : Polilaktik asit

PLGA : Polilaktik-ko-glikolik asit

PPO : Poli(propilen oksit)

PVA : Polivinil alkol

R^2 : Korelasyon katsayısı

$R^2_{adjusted}$:Düzeltilmiş korelasyon satısı

RA : Rosmarinik Asit

ROS : Reaktif oksijen türleri

RSD %	: Varyasyon Katsayısı
S	: Y ekseni kesim noktasının standart sapması
SDA	: Sabouraud Dekstroz Agar
SLS	: Statik ışık saçılımı
SOD	: Süperoksit dismutaz
Tg	: Camsı geçiş sıcaklığı
TGA	: Termogravimetrik Analiz
UV	: Ultraviyole
UV-Vis	: UV Spektroskopisi
XRD	: X-ışını Kırınımı
Y/S	: Su içinde yağ
ZP	: Zeta Potansiyel
λ_{maks}	: Maksimum Dalga boyu
$\mu g.mL^{-1}$	: Mikrogram/mililitre

1 GİRİŞ

Yaşlanma, insanların biyolojik fonksiyonlarında ilerleyen bir düşüşe yol açan ve günümüzde çeşitli hastalıkların ve ölümün temel sebeplerinden biri olarak kabul edilmektedir. Yaşlanma süreci, serbest radikallerin ve oksidatif stresin vücutta hücresel ve genetik hasarlara yol açmasıyla başlar. Oksidatif stresin etkileri, özellikle yaşlanmayı hızlandıran ve sağlık problemlerini artıran bir faktör olarak öne çıkmaktadır. Bu nedenle, antioksidanlar, serbest radikallerin etkilerini engelleyerek yaşlanma sürecini yavaşlatmak ve hücresel hasarları onarmak için önemli bir çözüm sunmaktadır. Son yıllarda, doğal bileşenlerin, özellikle bitkisel etkin maddelerin, antioksidan özelliklerinin keşfi ve ilaç endüstrisindeki kullanımının artışı dikkat çekmektedir.

Bu çalışmanın amacı, rosmarinik asidin antioksidan özelliklerini ve etkinliğini artırmak için PLGA bazlı nanopartiküller kullanarak geliştirilmiş yeni bir formülasyonu incelemektir. Rosmarinik asit, antioksidan ve antimikrobiyal özellikleriyle bilinen, ancak sınırlı lipit çözünürlüğü nedeniyle etkinliği nispeten düşük olan bir bileşiktir. Bu çalışmada, rosmarinik asidin etkinliğini artırmayı hedefleyen nanopartiküller geliştirilmiş ve çeşitli fizikokimyasal özellikleri ile etkinlikleri ve yapıları değerlendirilmiştir. Yapılan analizler, bu yeni formülasyonun yaşlanma ve oksidatif stresle ilişkili durumlarda potansiyel bir kozmetik, dermokozmetik ya da kozmetik ham madde seçeneği olabileceğini ortaya koymaktadır.

2 KAYNAK BİLGİSİ

2.1 Yaşlanma

Yaşlanma kronolojik, psikolojik, toplumsal ve biyolojik yönleri olan kaçınılmaz bir süreçtir. Fizyolojik kapasitedeki ilerleyen azalma ve çevresel etkilere cevap verme yeteneğinde azalma, hastalıklara karşı artan duyarlılık ve hassasiyete yol açmaktadır. Tüm bu nedenlere bağlı olarak yaşlanmayla birlikte mortalite artmaktadır. Geçmişte birçok insan genç yaşta ölürken, 20. yüzyıldaki gelişmelerle birlikte insanlarda daha uzun yaşama isteği oluşmuştur, 'anti-yaşlanma/anti-aging' daha ilgi çeken bir konu haline gelmiş ve yaşlanmanın nedenlerini ortaya koymak, yaşlanmayı tedavi etmek ya da belirtilerini azaltmak için çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Sağlam ve Özdamar, 2012).

Yaşlanma, ilerleyen yaşa eşlik eden hastalık ve ölüme karşı giderek artan duyarlılıkla ilişkili veya bundan sorumlu olan değişikliklerin zamanla ilerleyen birikim sürecidir. Zamana bağlı bu değişiklikler yaşlanma sürecinin bir sonucudur. Bu süreç tüm canlılar için ortaktır, çünkü yaşlanma ve ölüm evrenseldir. Hem yaşlanma hem de yaşlanma sürecinin hızı bir dereceye kadar genetik kontrol altındadır. Ayrıca tüm kimyasallar ve kimyasal tepkimeler de yaşlanma ve yaşlanma sürecinde etkili olmaktadır (Harman, 1981).

Yaşlanma hücresel, doku, organ, organ sistemi ve organizma düzeyleri gibi çeşitli düzeylerde oluşur. Yaşlanmanın birçok belirtisi yaşlanma ile ilişkilendirilmiş ve 1960'ların başında Hayflick ve Moorhead yaşlanmayı hücre çoğalmasının kalıcı olarak durdurulması şeklinde açıklamıştır. Kök hücreler, kök hücrelere giden yolda yaşlanma ya da kök hücre yaşlanması sistemik yaşlanmanın başlıca etkenleridir. Dokuları, hem de işlevselliği ve rejenerasyon kapasitesini etkileyerek, dolayısıyla yaşlanmaya bağlı bozuklukları meydana getirir (Cai vd., 2022).

Hayflick ve Moorhead hücresel yaşlanmayı, normal hücrelerde birkaç hücre bölünmesinden sonra meydana gelen proliferatif duraklama olarak tanımlamıştır. Birçok hücre replikatif, mitokondriyal, oksidatif, metabolik veya genotoksik stres nedeniyle telomer kısalmasından bağımsız olarak yaşlanmaya uğrar. Yaşlanan hücreler, hasarlı bir genomun replikasyonunu önleyerek hücre döngüsü ilerlemesini aktif olarak baskılar (Yousefzadeh vd., 2021).

Yaşlanma biyokimyasının tek bir kuramla açıklanabilmesi mümkün olmadığı için yaşlanmanın açıklanabilirliğini arttırmak amacıyla yaşlanma etkenleri; iç etkenler (genetiksel) ve dış etkenler olarak iki ana başlıkta toplanabilir. Dış etkenler; mutasyon ve DNA hasarı, proteinlerin değişikliğe uğraması, serbest radikallerin sebep olduğu oksidatif hasar ve mitokondriyal DNA hasarı olarak açıklanabilir. İç etkenler daha çok kalıtsal olan uzun yaşam genleri, yaşlılık teorisi, hücresel yaşlılık gibi başlıklar altında toplanabilir (Taşkın ve Öğüt, 2024).

Yaşlanmayla birlikte organizmada sinir sistemi, kardiyovasküler sistem, solunum sistemi, sindirim sistemi, genito-üriner sistem, kas-iskelet sistemi, endokrin sistem, bağışıklık sistemi ve duyu fonksiyonlarında azalma meydana gelmekte ve deride makroskopik ve mikroskopik değişiklikler ortaya çıkmaktadır (Sağlam ve Özdamar, 2012).

Cilt yaşlanması, insan yaşlanmasının en belirgin belirtilerinden biridir. Yaşam süresi boyunca ciltte meydana gelen değişiklikler ince çizgiler ve kırışıklık, elastikiyet ve hacim kaybı, gevşeklik, pürüzlü görünüm ve solgunluk ile karakterize edilir. Buna karşılık, foto-yaşlanmış cilt düzensiz pigmentasyon (yaşlılık lekesi) ile ilişkilidir ve belirgin şekilde kırışmıştır. Hücresel ve moleküler düzeyde biyokimyasal reaksiyonlara, genetik programlara ve dış uyarımların oluşumuna dayanan, birbirine bağlı çok sayıda süreçten oluşur. Ciltte yaşlanmayı tetikleyen başlıca hücresel olay oksidatif dengenin değişmesidir. Kronolojik yaşlanmada, reaktif oksijen türleri (ROS) esas olarak glikozdan adenozin trifosfat (ATP) üretimi ve mitokondriyal disfonksiyon sırasında hücresel oksidatif metabolizma yoluyla üretilirken, ekstrinsik yaşlanmada redoks dengesinin kaybına ultraviyole radyasyon, kirlilik, sigara kullanımı ve yetersiz beslenme gibi çevresel faktörler neden olur. Yaşlanma sürecinde oksidatif stres hem ROS üretiminin artmasına hem de enzimatik ve enzimatik olmayan koruyucuların seviyelerinin azalmasına bağlanmaktadır (Papaccio vd., 2022).

Yaşlanma, geniş bir terim olarak, derinin kırışması, atrofi, saçların beyazlaması ve kserozis gibi gözle görülebilen çeşitli deri olaylarını kapsar. Ayrıca, deri yavaş yavaş yapısal ve işlevsel özelliklerini kaybettiğinden, deri yaşlanması viral, bakteriyel ve fungal enfeksiyonlar, otoimmünhastalıklar, egzama, kontakt dermatit, seboreik dermatit ve hem melanom hem de melanom dışı deri kanseri gibi diğer birçok süreçle ilişkilidir. ROS'un yaşa bağlı çeşitli belirtilerin ortaya çıkması veya kötüleşmesindeki rolüne genel

bir bakış sağlanmıştır. İlk olarak hem içsel hem de dışsal yaşlanmadaki önemini vurgulanmış ve ardından ciltteki redoks dengesinin kronik olarak bozulması, yaşlanmayı ve kalıcı enflamasyonu tetiklediği belirlenmiştir. Genel olarak, ROS oluşumu ve kontrastında rol oynayan moleküler mekanizmaların anlaşılması, fizyolojik cilt yaşlanmasını önlemek ve erken cilt yaşlanmasında rol oynayan fonksiyonel eksiklikleri telafi etmek için önemlidir. Bununla birlikte, asıl zorlayıcı nokta, kutanöz intrinsik savunma ağını sürdürebilecek önleyici stratejilerin tanımlanmasıdır. Redoks dengesini korumaya yönelik küçük kapasiteye göre, yaşlı popülasyonun aşırı ROS üretiminden kaçınmak için daha etkili bir şekilde tedavi edilmesi gerekmektedir. Öte yandan, antioksidan/oksidan dengesizliğinde rol oynayan spesifik sinyal yollarının farmakolojik olarak hedeflenmesi; otoimmün bozukluklar, kronik enflamasyon ve çoklu ardışık deri kanseri ortamı gibi sıklıkla yaşlanmayla ilişkili spesifik patofizyolojik durumlar için terapötik bir fırsat olabilir (Papaccio vd., 2022).

2.1.1 Oksidatif stres ve yaşlanma

Oksidatif stres, hücrelerde serbest radikallerin birikmesi sonucu meydana gelen biyolojik hasarı ifade eder. Bu durum normalde vücudun savunma sistemleriyle denetlenen bir süreçtir, ancak çeşitli çevresel faktörler (örneğin, sigara, kirli hava, aşırı alkol tüketimi, aşırı egzersiz vb.) bu dengenin bozulmasına yol açabilir. Oksidatif stresin uzun süre devam etmesi, hücresel yapıları, özellikle de DNA, protein ve lipitleri hasara uğratarak birçok hastalığın gelişimine yol açabilir. Oksidatif stres, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, nörolojik hastalıklar, inflamasyon ve yaşlanma gibi birçok hastalığın gelişiminde önemli bir rol oynar. Serbest radikaller, hücrelerdeki biyomolekülleri oksitleyerek fonksiyonlarını bozar, bu da doku hasarı ve hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilir. Oksidatif stresin etkileri, hücresel düzeyde proteinlerin denatürasyonu, lipid peroksidasyonu ve DNA hasarı gibi olumsuz değişikliklere yol açar. Bu süreçler, hücrede işlev kaybına ve hatta programlı hücre ölümü sürecine neden olabilir (Adresi vd., 2020).

Oksidatif stres, yaşlanma sürecinde de önemli bir faktördür. Serbest radikallerin birikmesi zamanla hücresel fonksiyonları bozar ve yaşlanmanın özelliklerinden olan dokuların elastikiyet kaybı, bağışıklık sistemi zayıflığı ve organ fonksiyonlarında azalma gibi belirtilere yol açar (Karakan ve Nazlıkul, 2017).

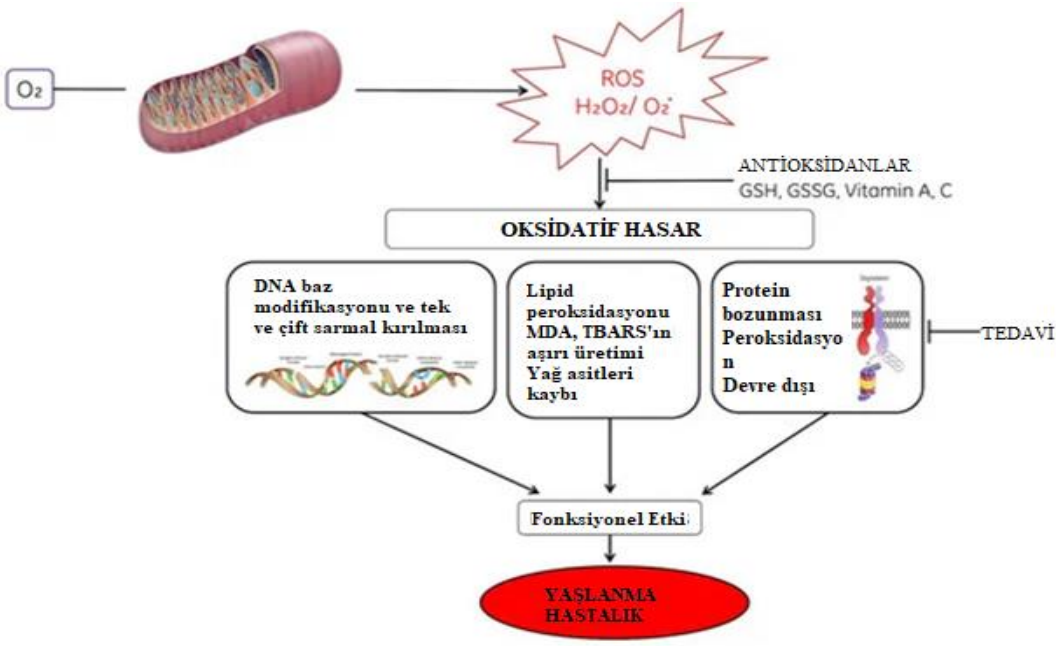
Oksidatif strese karşı koruyucu tedaviler genellikle antioksidan tedavileri ve yaşam tarzı değişikliklerini içerir. Ancak, bu tedavilerin etkinliği konusunda hâlâ tartışmalar bulunmaktadır. Ayrıca, bazı farmasötik maddeler ve doğal etkin maddeler üzerinde yapılan araştırmalar da oksidatif stresin etkilerini hafifletmeye yönelik potansiyel terapötik yaklaşımlar sunmaktadır (Aslankoç vd., 2019).

Serbest radikallerin üretimi ve ortadan kaldırılması arasındaki dengesizlik, insan vücudunda oksidatif strese yol açar; bu da oksidan seviyesinin antioksidan sisteme üstün geldiğini ve daha sonra bu oksidanların membranlar, proteinler, lipitler ve DNA dahil olmak üzere çeşitli hücresel yapıları olumsuz etkilediğini gösterir. Oksidatif stresin değerlendirmesi için iyi bilinen bir biyobelirteç lipid peroksidasyonudur (LPO). Serbest radikallerin çoklu doymamış lipid membranında neden olduğu peroksidatif hasar nedeniyle oksidatif stres sırasında lipid peroksidasyon oranı hızla artar. Ayrıca, oksidatif stres proteinlerde konformasyonel değişikliklere neden olarak fonksiyonel verimliliklerini azaltır ve enzim aktivitelerini değiştirir (Sağlam ve Özdamar, 2012).

Oksidatif stres tarafından indüklenen DNA hasarı ve mutasyonlar, kanser de dahil olmak üzere farklı patolojiler ile ilişkilidir. Oksidatif stres DNA'da lezyonları indükler, bu da ROS kaynaklı oksidatif stresin DNA çift iplikçik kırılmaları yoluyla gen ve kromozom mutasyonlarına yol açabileceğini ortaya koymaktadır. Oksidatif stres kaynaklı DNA hasarının, bir dokuda oksidatif stres için biyobelirteç görevi gören mutajenik baz8-okso-2′-deoksiguanozin seviyelerinin artmasına yol açtığı bildirilmiştir (Hajam vd., 2022). Şekil 2.1’de oksidatif stresin özeti sunulmuştur.

Şekil 2.1

Oksidatif Stresin Özeti



Kaynak: Hajam vd., 2022

ROS farklı endojen ve eksojen süreçler yoluyla üretilir. Oksidatif stres, ROS üretimi ile antioksidan savunma arasındaki dengesizlikten kaynaklanır ve yaşlanmayla birlikte ilerler. Oksidatif stres ayrıca diyabet, nöro-dejeneratif hastalıklar, obezite, kardiyak hipertrofi, hepato-renal hasar, üreme disfonksiyonu, DNA hasarı, mitokondriyal disfonksiyon ve son olarak hücrelerin yaşlanması gibi çeşitli kronik hastalıklar ve hasarlarla ilişkilidir. Oksidatif stres biyobelirteçleri tanı aracı veya terapötik hedef olarak faydalı olabilir. Oksidatif stresin neden olduğu patolojilerle mücadele etmek için antioksidan takviyelerin ve bitki parçalarından elde edilen doğal polifenoliklerin etkinliğini değerlendirmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (Hajam vd., 2022).

2.1.2 Antioksidanlar

Antioksidanlar, serbest oksijen radikallerine bağlanan ve bu radikallerin sağlıklı hücrelere zarar vermesini önleyen kimyasal bileşiklerdir. Antioksidan, başka bir molekülün oksidasyonunu engelleyebilen bir moleküldür. Kendileri serbest radikal olmadan, serbest radikalleri beslemek için kendi elektronlarını vererek serbest radikal reaksiyon zincirini kırar (Aslankoç vd., 2019).

Antioksidanlar, ROS veya serbest radikalleri hücrelere zarar vermeden önce etkisiz hale getirdikleri veya yok ettikleri için bugün hayatımızın önemli bir parçası haline gelmiştir. ROS'un neden olduğu oksidasyon, hücre zarının parçalanmasına, zar proteinlerinin

hasar görmesine ve DNA mutasyonlarına yol açarak yaşlanmaya neden olur ve damar sertliği, kanser, diabet, karaciğer hasarı, inflamasyon, cilt hasarları, koroner kalp hastalıkları ve artrit gibi birçok kronik hastalığın oluşumunu başlatır veya ilerletir (Akar ve Kaymak, 2024; Dontha, 2016).

Antioksidanlar kökenlerine göre "doğal antioksidanlar" ve "sentetik antioksidanlar" olarak iki gruba ayrılır. Sentetik antioksidanların çoğu fenolik tiptedir. Antioksidan aktivitelerindeki farklılıklar, uçuculuk, çözünürlük ve termal stabilite gibi fiziksel özelliklerini de etkileyen kimyasal yapılarıyla ilgilidir. Doğal fenolik bileşikler bitkilerde yaygın olarak bulunur ve gıdaların antioksidan aktivitelerine katkıda bulunurlar. Kanser, Parkinson ve Alzheimer hastalıkları, ateroskleroz veya kalp yetmezliği gibi birçok hastalık oksidatif stres ile bağlantılıdır. Bu nedenle, farklı doğal bileşiklerin antioksidan aktivitesinin aydınlatılmasına yönelik çalışmalara ilgi artmaktadır. Son yıllarda doğal antioksidanlara olan ilgi giderek artmakta ve literatüre bakıldığında; sentetik antioksidanların doğal olanlarla değiştirilmesinin çeşitli faydaları olabileceği kabul edilmekte ve doğal antioksidanlar üzerine yapılan araştırmaların çoğu, doğal antioksidanların potansiyel kaynakları olarak fenolik bileşiklere, özellikle de flavonoidlere odaklanmaktadır. Meyve, sebze ve besin takviyelerinde doğal olarak bulunan antioksidan bileşikler arasında askorbik asit, α-tokoferol, fenolik asitler (benzoik asit, trans-sinnamik asit ve hidroksisinnamik asit), kumarinler, lignanlar, stilbenler (glikosile formda), flavonoidler, izoflavonoidler ve fenolik polimerler (tanenler) sayılabilir (Dontha, 2016). Tablo 2.1'de özet olarak antioksidanların sınıflandırılmasına yer verilmiştir.

Tablo 2.1

Antiokasidanların Sınıflandırılması

ENDOJEN ANTİOKSİDANLAR	DOĞAL ANTİOKSİDANLAR
Poliaminler	Vitamin E
Melatonin	Vitamin C
Östrojen	Karotenoidler
Süperoksit Dismutaz	Polifenoller
Glutatyon Peroksidaz	Selenyum
Katalaz	Flavonoidler
Lipoik Asit	
Seruloplazm	
Albumin	
Laktoferrin	
Transferrin	

Kaynak: Dontha, 2016

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar ve bu olaya antioksidan savunma denir (Pınarlı, 2023).

Oksidanların organizmadaki düzeylerini arttırıcı etkenlerin ve risk faktörlerinin iyi belirlenmesi ve bunlardan uzak durulması ilk yapılması gereken olmalıdır. İkinci yapılması gereken ise oksidan moleküllerle tetiklenen biyokimyasal reaksiyonları ilk ya da diğer basamaklarda durdurmaktır. Üçüncü mücadele yolu ya da yapılması gereken ise oluşan mediyatörlerle aktive olan inflamatuvar hücrelerin lezyon yerine hücumunu ve orada aşırı birikimini önlemektir. Oksidan moleküllerle mücadelede üzerinde durulacak esas yöntem ise belirli düzeyi aşmış oksidanlara direkt olarak etki edip onları inaktif hale getiren antioksidan kullanımıdır. Antioksidan savunma elemanları hücre içi ve hücre dışı ortamda farklıdırlar. İnsan vücudunda belli başlı hücre içi antioksidanlar bulunmaktadır ve bunlara örnek olarak süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimleri verilebilir. Hücre içi ortamın aksine hücre dışı ortamda antioksidan savunmadan E ve C vitamini, transferrin, haptoglobin, seruloplasmin, albumin, bilirubin, P - karoten ve α-l antitripsin sorumludur (Çavdar vd., 1997).

Antioksidan maddelerin çalışma mekanizmaları başlıca şu şekildedir;

- Oluşan serbest radikalleri toplayıcı ve giderici etkileri ile bağlayarak veya kararlı hale getirerek,
- Zincir kırıcı etki ile serbest radikal üreten kimyasal reaksiyonları durdurarak,
- Baskılayıcı etki ile reaksiyon hızını azaltarak,
- Onarıcı etki ile lipit, protein ve DNA gibi yapılarda oluşmakta olan biyolojik moleküler hasarları rejenere ederek,
- Hücresel kinaz kayıplarını önleyip oksidasyon reaksiyonlarını durdurarak,
- Organizmadaki SOD gibi antioksidan enzimler ile enzimatik olmayan antioksidanların sentezini artırarak etki gösterirler (Çelik vd., 2020).

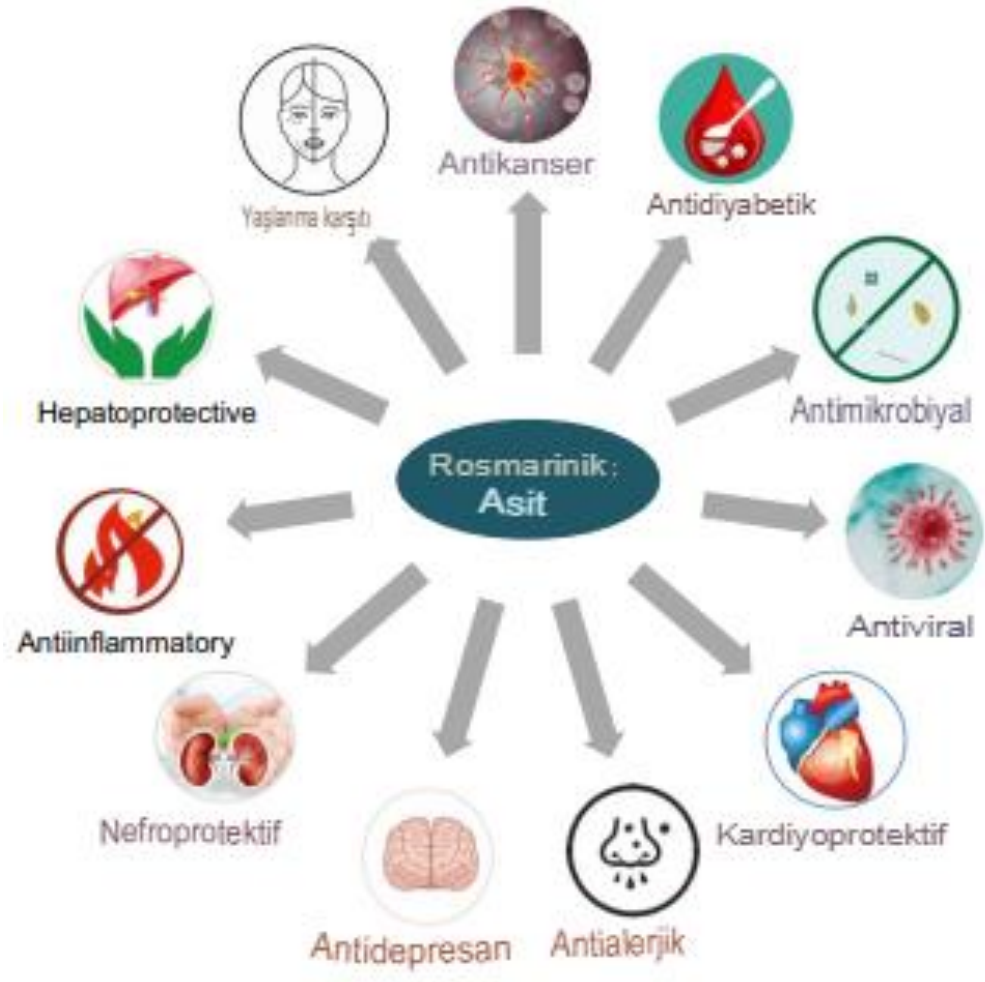
2.2 Rosmarinik Asit

Son yıllarda, bitkilerin derinlemesine incelenmesiyle birlikte, doğal ürünler birçok alanda araştırmacıların ilgisini giderek daha fazla çekmektedir. Rosmarinik asit ilginç ve iyi bilinen bir örnektir. Kimyasal yapısına bakıldığında, doğal olarak oluşan bu fenol

asit, bir kafeik asit ve bir 3,4-dihidroksifenil laktik asidin esterleşme ürünü olan bir ester olarak kabul edilir. Rosmarinik asit ilk olarak Scarpati ve Oriente adlı iki İtalyan bilim adamı tarafından *Rosmarinus officinalis L.*'den izole edilip tanımlanmış ve bu bitkinin adına göre isimlendirilmiştir. İlgili araştırmadan sonra rosmarinik asit, *Lamiaceae*, *Boraginaceae*, *Apiaceae* vb. bitki familyalarına ait 160'tan fazla bitkide art arda bulunmuştur. Ayrıca birçok *in vitro* ve *in vivo* çalışmada antioksidatif aktivite, antiinflamatuar aktivite, antiviral aktivite, antidiyabetik aktivite, antitümör aktivite ve nöroprotektif aktivite gibi çeşitli farmakolojik aktiviteleri araştırılmıştır (Guan vd., 2022). Şekil 2.2'de rosmarinik asidin insan sağlığı üzerindeki farmakolojik etkileri şematik olarak sunulmuştur. Şekil 2.3'te rosmarinik asidin kimyasal ismi ve yapısına yer verilmiştir.

Şekil 2.2

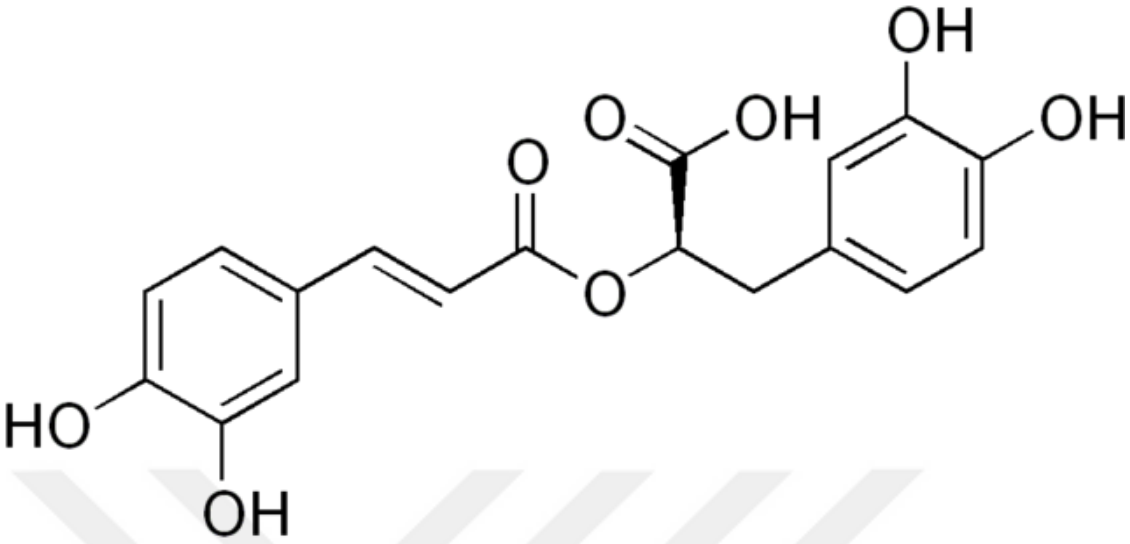
Rosmarinik asidin İnsan Sağlığı Üzerindeki Farmakolojik Etkileri



Kaynak: Noor vd., 2022

Şekil 2.3

(2 R)-3-(3,4-Dihidroksifenil)-2-[(E)-3-(3,4-Dihidroksifenil)Prop-2-Enoil]Oksipropanoik Asit



Kaynak: Vatan, 2019

Rosmarinik asidin kimyasal yapısı aydınlatılmadan önce bile, rosmarinik asit ve benzer bileşikler, *Lamiaceae* familyası türlerinden bilinen bir tanen türü olan "*Labiatengerbstoffe*" olarak biliniyordu. *Melissa officinalis*'ten elde edilen tanen benzeri bileşiğin ne yoğunlaştırılmış bir kateşin ne de bir gallo veya ellagitannin olduğu, ancak muhtemelen kafeik asit içerdiği tanımlanmıştır. Kısa bir süre sonra, iki İtalyan kimyager, Scarpati ve Oriente (1958), rosmarinik asidi ilk kez saf bir bileşik olarak izole etmiş ve bileşiği izole edildiği bitkiye (*Rosmarinus officinalis*) göre rosmarinik asit olarak adlandırmıştır. Yapı, kafeik asit ve 3,4-dihidroksifenillaktik asit esteri olarak açıklanmıştır (Scarpati ve Oriente, 1958). Biyogenetik çalışmalar 1970 yılında Ellis ve Towers'ın *Mentha* bitkilerine radyoaktif olarak işaretlenmiş aminoasitler vermesiyle başlamış ve iki aromatik aminoasit olan fenilalanin ve tirozinin rosmarinik aside dahil olduğunu göstermiştir. İlginç bir şekilde, kafeik asit kısmı sadece fenilalaninden ve 3,4-dihidroksifenillaktik asit kısmı sadece tirozinden oluşmaktadır (Ellis ve Towers, 1970). Bu sonuçlar *Coleusblumei* hücre kültürleri ile yapılan benzer besleme deneyleri ile doğrulanmıştır (Petersen ve Simmonds, 2003).

Rosmarinik asit, zayıf lipid çözünürlüğü, zayıf membran geçirgenliği ve düşük oral mutlak biyoyararlanımı ile karakterize edilen ve uygulamasını sınırlayan bir polifenolik asittir. Bazı lipozomların ve katı lipid nanopartiküllerin umut verici olduğu ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, yapısal modifikasyonun yanı sıra, gastrointestinal sistemde

rosmarinik asit bozunma moleküllerini önlemek ve rosmarinik asiti hedef dokulara taşımak için farmasötik formülasyonlar veya özel yardımcı maddelerle ilgili bazı sistematik çalışmalar yapılmalıdır. Başarılı çalışmalarla, sınırlı emilim, hızlı dağılım, hızlı metabolizma ve hızlı eliminasyon gibi eksikliklerinin üstesinden gelinebilir. Bu arada, rosmarinik asitin gıda bilimindeki araştırmaları antioksidasyon ve gıda renginin ve parlaklığının korunması üzerinedir (Guan vd., 2022).

Rosmarinik asit ve rosmarinik asit içeren bitki ekstraktlarının farmakolojik ve biyolojik aktiviteleri büyük ilgi görmüştür. Birçok bilimsel rapor ve patent, *in vitro* çalışmalardan klinik çalışmalara kadar değişen karmaşıklıktaki bu özellikleri araştırmıştır. Rosmarinik asitin olağanüstü antioksidan aktivitesi, hücre sinyal yolları ve gen ekspresyonu üzerindeki etkilerine paralel olarak biyolojik özelliklerin ve teknolojik uygulamaların çoğuna katkıda bulunur. Sonuç olarak, rosmarinik asitin antioksidan ve prooksidan profilleri çoklu testler yoluyla kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Dört fenolik hidrojen, rosmarinik asitin lipid çift katmanlarına nüfuz etmesi ve yapılarını bozmadan onları oksidasyona karşı koruması için uygun polariteyi sağlayan iki katekol bileşiği ile serbest radikal temizlemeyi modüle etme yeteneğinin altını çizer. Elektrokimyasal incelemeler, ilk oksidasyon adımının kafeik asit parçası ile ilişkili olduğunu, ikinci oksidasyon adımının ise 3,4-dihidroksifenil laktik asit kalıntısının oksidasyonuna karşılık geldiğini ortaya koymuştur. Bu yapısal özelliklerin kombinasyonu nedeniyle rosmarinik asitin antioksidan potansiyeli diğer hidroksisinnamik asit türevlerinden daha yüksektir (Amoah vd., 2016).

Rosmarinik asit antimikrobiyal aktivitesi ile ilgili olarak, *Staphylococcusaureus* (*S. aureus*) suşlarına karşı antibakteriyal etkiler göstermiş ve en düşük blokaj konsantrasyonu *S. aureus* ve metisiline dirençli *S. aureus*'a (MRSA) karşı sırasıyla 0.8 ve 10 $mg.mL^{-1}$ olarak bulunmuştur. Ayrıca, *S. aureus'*a karşı amoksisilin, ofloksasin ve vankomisin antibiyotikleri ile, MRSA'ya karşı ise sadece vankomisin ile sinerjik etki göstermiştir. Zamana bağlı öldürme analizleri, rosmarinik asit ile antibiyotik kombinasyonunun tek tek antibiyotik kullanımından daha etkili olduğunu göstermiştir. MRSAve *S. aureus*'ta yapışkan matris moleküllerini tanıyan mikrobiyal yüzey bileşenleri yapışma proteini ekspresyonu da tek başına rosmarinik asit yerine vankomisin ile rosmarinik asit kombinasyonu kullanılarak önemli ölçüde baskılanmıştır. Öte yandan, rosmarinik asit uygulaması biyofilm oluşumunu

konsantrasyona ve zamana bağlı bir şekilde azaltmıştır, bu da planktonik hücre aktivitesini öldürmek ve erken evre gelişimde biyofilm oluşum aktivitesini azaltmak için etkili bir antimikrobiyal ajan olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir (Nadeem vd., 2019).

Antik çağlardan beri rosmarinik asit, çeşitli formülasyonlarda antimikrobiyal, antifungal ve antialerjik madde olarak kullanılmıştır. Antioksidan ve antiinflamatuar özellikleri nedeniyle rosmarinik asit, kemoterapötik ajan olarakda kullanılmış ve tümörlerin büyümesini etkili bir şekilde kontrol etmiştir.Rosmarinik asit, protein agregasyonu, demir şelasyonu, nöronal apoptoz ve oksidatif stres dahil olmak üzere nörodejeneratif hastalığın çeşitli patolojik özelliklerini hafifletmede faydalı olmuştur. Rosmarinik asit, antioksidan özellikleri sayesinde hücreyi ROS aracılı hasardan koruyarak antioksidan/oksidan sistemi dengeler (Noor vd., 2022).

Topikal uygulama stratejileri, ilk geçiş metabolizmasını önleyerek ilacı etki yerinde serbest bırakır ve daha düşük yan etki riski ile sonuçlanır. Bu strateji, *Rosmarinus officinalis*'in antiinflamatuar aktivitesi ve serbest radikal süpürücü etkileri sayesinde kozmetik ürünlerin (örneğin UV maruziyeti, yaşlanma ve selülitle mücadele vb.) özelliklerini iyileştirmek için uygulanabilir. Topikal uygulama için yeni ürünlerin geliştirilmesinde nanopartiküllerin kullanımı, moleküllerin etki alanlarına daha etkili bir şekilde iletilmesini sağladığından ve tedaviye bağlılığı artırdığından daha fazla araştırılmalıdır (De-Macedo vd., 2020).

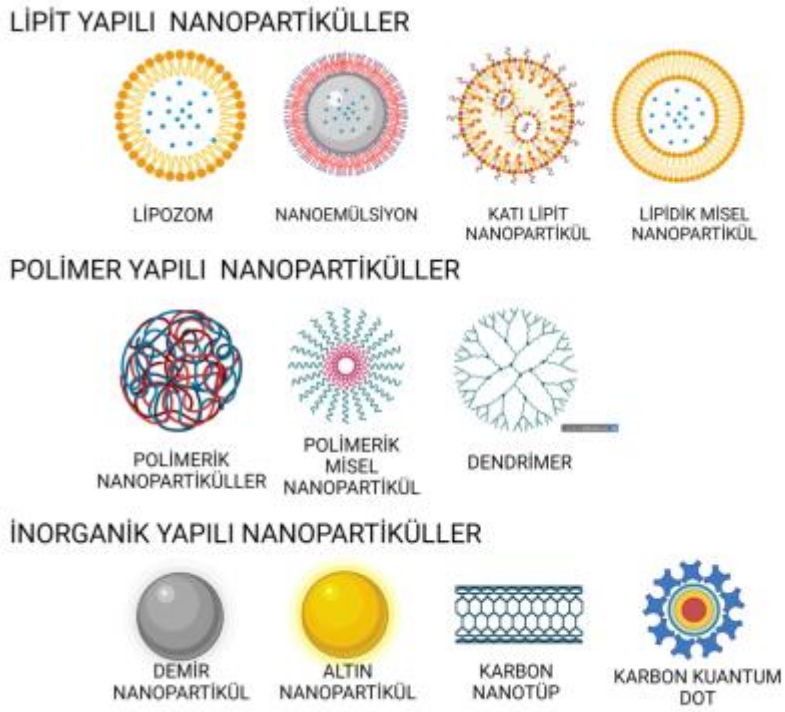
2.3 Nanopartiküller

2.3.1 Polimerik nanopartikül

Nanopartiküller doğal ya da sentetik yapıdaki polimerlerle hazırlanan, boyutları 10-1000 nm arasında değişen, hazırlama yöntemine göre nanoküre veya nanokapsül olarak adlandırılan ve etkin maddenin partikül içinde çözündürüldüğü, hapsedildiği ve/veya yüzeye adsorbe edildiği ya da bağlandığı matriks sistemlerdir. Polilaktik asit (PLA), Poliglikolik asit (PGA) ya da bunların kopolimeri olan Poli(d,l-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) gibi biyobozunur ve biyouyumlu polimerlerden üretilen nanopartiküller ilaç dağılım sistemleri için en yaygın olarak araştırılan sistemlerdir (Derman vd., 2013). Şekil 2.4’te nanopartiküllerin özet bir sınıflandırılması sunulmuştur. Şekil 2.5’te ise nanoküre veya nanokapsül şematik olarak gösterilmiştir.

Şekil 2.4

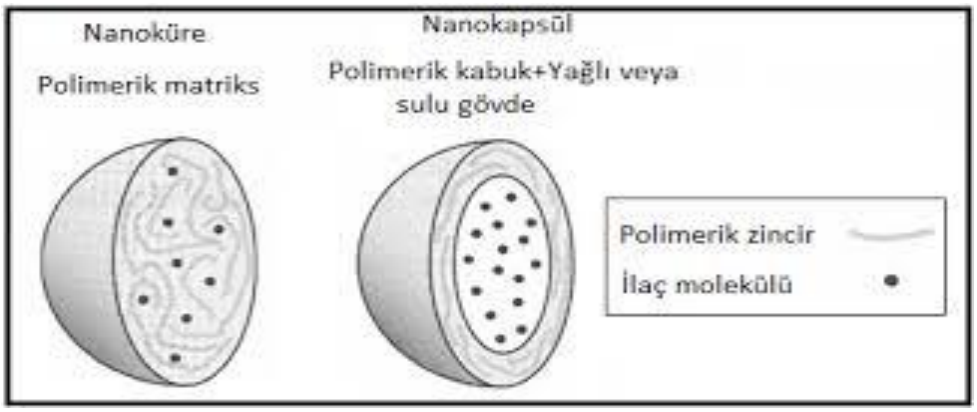
Sentezlendikleri ve Sentez Sonrası Sahip Oldukları Morfolojiye Göre Nanopartiküllerin Sınıflandırılması



Kaynak: Ertürk , 2022

Şekil 2.5

Nanoküre ve Nanokapsül Yapısının Şematik Gösterimi



Kaynak: Derman vd., 2013

Belirli hastalıkların karmaşıklığı, bazı tedavilerle ilişkili toksisite ve tedavi etkinliği düşüklüğü, ilaç dağıtımı için giderek daha fazla yeni yollar gerektirmektedir. Bir ilaç dağıtım sistemi, ilaç miktarını, zamanını ve etki alanındaki salımını kontrol ederek, terapötik hedefe ulaşmak için biyolojik membranları geçerek sadece etkinliklerini değil, aynı zamanda güvenliklerini de artırmak için aktif bileşenlerin vücuda girmesine izin

veren bir formülasyon veya cihazdır. Bu sadece terapötik ilaç uygulama yöntemlerini değil, aynı zamanda bunların uygulanmasını ve insan vücuduna yayılmasını kolaylaştırmak için vektörlerin kullanımını da içerir. Vektörlerin ve aktif bileşenlerin farklı kombinasyonları, belirli hastalıklara ve hastalara bağlı olarak kişiselleştirme için çok çeşitli olanaklara izin verebilir. Aktif maddeleri hedef dokuya uygulamak ve ulaştırmak için kullanılan yollar, bir hastalığı tedavi ederken önemli bir faktördür. Bu yollar, nasıl uygulandıklarına bağlı olarak farklı etkilere sahip olabilir. Uygulama normalde sistemiktir. Bazen, hastalığın ciddiyeti veya ilaca özgü toksisite nedeniyle, doğrudan etkilenen organa uygulanması gerekebilir. Tüm uygulama yolları, bir formülasyonun uygulanması sırasında sakıncalar doğurmaktadır. Aktif bileşenlere özgü potansiyel toksisite veya farmakolojik etki elde etmek için gereken yüksek dozaj, sistemik uygulama yolları tarafından sergilenen ortak bir dezavantajdır. Örneğin oral uygulama yolu, bağırsak epitel hücreleri tarafından gerekli emilimi sağlamak için pH'a dirençli veya yüksek hidrofilik ilaçların kullanımını sınırlar. Benzer şekilde, enjeksiyonların invaziv doğası yüksek enfeksiyon riski ile ilişkilendirilmiştir (Begines vd., 2020).

Son yıllarda, nanopartiküller sahip oldukları avantajlardan dolayı nanoteknoloji, tıp, biyoteknoloji ve diğer alanlarda yoğun olarak araştırılmaktadırlar. Tıp alanında özellikle antikanser ilaçlar, antiinflamatuvar ilaçlar, antiparaziter ilaçlar, peptit ve proteinler için taşıyıcı sistem olarak, ayrıca, aşılar ve tanı maddeleri olarak kullanılırken; veteriner hekimlikte de yaygın uygulama alanı bulmaktadır. Antijenik özellikteki molekülleri taşıyan nanopartiküllerin ise, immünolojide ümit verici sonuçlar oluşturduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Veterinerlikte özellikle, hayvanları parazitlere karşı korumak için içme suyu içinde verilen ve bağırsakta parçalanarak ilacı serbestleştiren nanopartiküller kullanılmaktadır. Nanopartiküllerin kozmetik sektöründe kullanılması da ilgileri üzerine çeken diğer bir araştırma alanıdır (Derman vd., 2013).

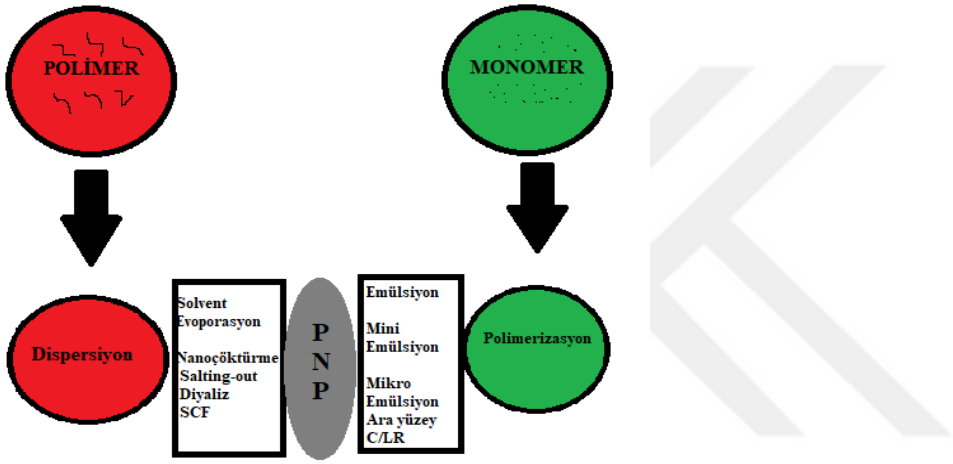
Sonuç olarak, her süreçte biyolojik sistemler adeta nanoteknolojik fabrikalar gibi çalışmaktadır. Nanopartiküllerin biyolojik sistemlerdeki davranışını anlamak, özellikle medikal alanda tedavi geliştirmek için yeni yollar açmakta ve bu da güvenli nanoteknolojinin geliştirilmesi için gerekmektedir. Bu bilgiler ışığında nanoteknoloji ile sağlanan ilerlemeler sayesinde vaat edilenden daha fazla avantaj elde edilmeye devam edilecektir (Yavuz vd., 2021).

2.3.2 Polimerik nanopartikül üretimi

Polimerik nanopartiküllerin üretimi, ilacın türüne ve belirli bir uygulama yolunun gerekliliklerine bağlı olarak farklı yöntemlerle yapılabilir. Genel olarak, iki ana strateji kullanılır. İlk strateji önceden oluşturulmuş polimerlerin dispersiyonu iken diğer strateji ise monomerlerin polimerizasyonu teknikleridir (Zielinska vd., 2020). Bu stratejiler şematik olarak Şekil 2.6'da sunulmuştur.

Şekil 2.6

Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanmasında Kullanılan Çeşitli Tekniklerin Şematik Gösterimi



Kaynak Derman vd., 2013

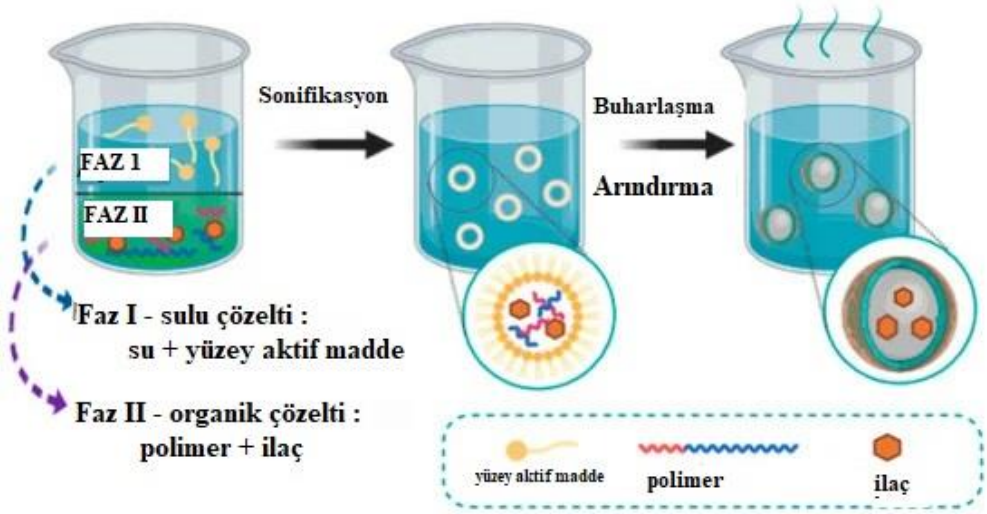
2.3.2.1 Çözücü buharlaştırma yöntemi

Çözücü buharlaştırma, önceden oluşturulmuş bir polimerden, polimerik nanopartiküller hazırlamak için geliştirilen ilk yöntemdir. Bu yöntemde, başlangıçta bir su içinde yağ (Y/S) emülsiyonunun hazırlanması gereklidir ve bu da nanoküre üretimine yol açar. İlk olarak, polimerin çözündüğü polar bir organik çözücüden oluşan bir organik faz hazırlanır ve aktif bileşen (örneğin, ilaç) çözünme veya dağılma yoluyla organik faza dahil edilir. Diklorometan ve kloroform, geçmişte daha sık olmakla birlikte yaygın olarak kullanılmıştır. Bu çözücüler toksisiteleri nedeniyle, daha iyi bir toksikolojik profil sergileyen etil asetat ile değiştirilmiştir ve bu nedenle biyomedikal uygulamalar için daha uygundur. Bu yöntemde ayrıca bir yüzey aktif madde içeren bir sulu faz da sıklıkla hazırlanmıştır. Organik çözelti, sulu fazda bir yüzey aktif madde ile emülsifiye edilir ve daha sonra tipik olarak yüksek hızlı homojenizasyon veya ultrasonikasyon kullanılarak işlenir ve nanodamlacıkların bir dispersiyonu elde edilir. Emülsiyonun sürekli fazı içinde yayılmasını sağlayan polimer çözücünün buharlaştırılmasıyla bir

nanopartikül süspansiyonu oluşturulur. Çözücü ya oda sıcaklığında sürekli manyetik karıştırma ile (daha polar çözücüler durumunda) ya da düşük basınçta yavaş bir işlemle (örneğin diklorometan ve kloroform kullanıldığında olduğu gibi) buharlaştırılır. Çözücü buharlaştıktan sonra, nanopartiküller yıkanabilir ve santrifüjleme yoluyla toplanabilir, ardından uzun süreli depolama için dondurularak kurutulabilir. Bu yöntem nanokürelerin oluşturulmasını sağlar (Zielinska vd., 2020). Çözücü buharlaştırma yöntemi şematik olarak Şekil 2.7'de sunulmuştur.

Şekil 2.7

Çözücü Buharlaştırma Yönteminin Şematik Gösterimi



Kaynak: Zielinska vd., 2020

Çözücü burharlaştırma yöntemi iki şekilde yapılabilir; Tekli Emülsiyon (s/y) Çözücü Buharlaştırma Yöntemi ve İkili Emülsiyon (s/y/s) Çözücü Buharlaştırma yöntemi şeklinde. Tekli Emülsiyon (s/y) Çözücü Buharlaştırma yönteminde, suda çözünmeyen etkin madde ve polimer için ortak olan çözücü seçilir ve her ikisi de ortak organik çözücüde çözündürülür. Yüzey aktif madde içeren sulu ortama karıştırılarak nanopartiküller üretilirler. İkili Emülsiyon (s/y/s) Çözücü Buharlaştırma Yöntemi, peptid- protein ya da hidrofilik moleküllerin yüklü olduğu nanopartiküllerin üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yöntemde ilk olarak etkin maddenin sulu çözeltisi polimer içeren organik faz içerisinde dağıtılır. Elde edilen s/y emülsiyonu dış sulu faz içerisinde emülsifiye edilerek s/y/s ikili emülsiyonu elde edilir. Elde edilen s/y/s emülsiyonu, etkin madde çözeltisini içeren polimer çözeltisi damlacıklarını oluşturur ve çözücü difüzyon ya da evaporasyon ile uzaklaştırıldıktan sonra, etkin maddenin sulu çözeltisini içeren nanopartikül süspansiyonu oluşturulur. Bu süspansiyon santrifüjlenerek nanopartiküller

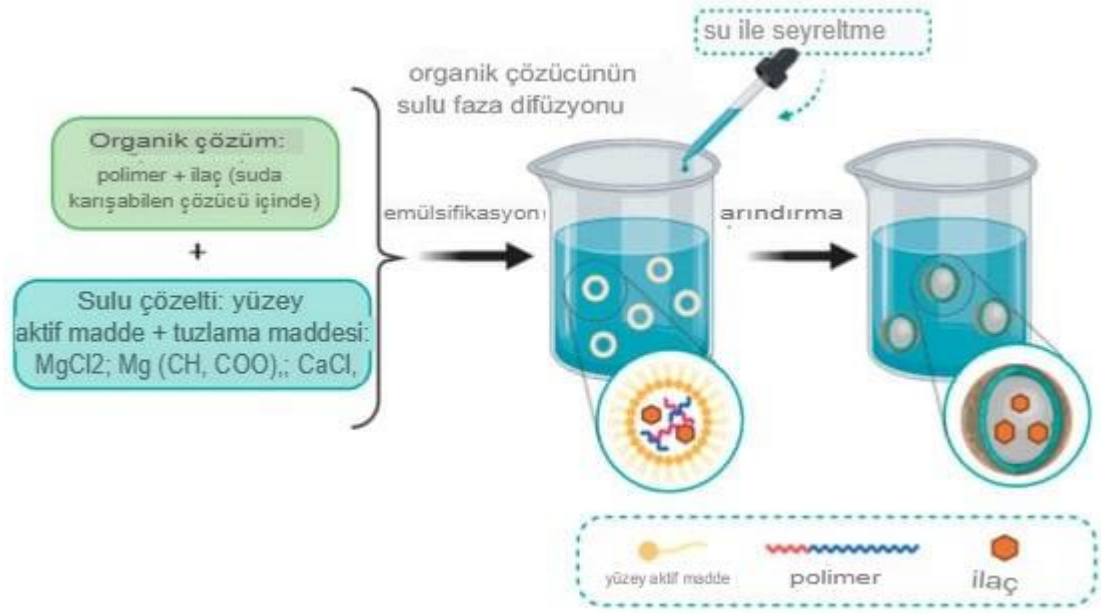
elde edilir, su ile yıkama yapıldıktan sonra kurutulan nanopartiküller liyofilize olarak kurutulur ve kullanılmak üzere dondurulur (Derman vd., 2013).

2.3.2.2 Tuzla çöktürme yöntemi

Bu üretim yöntemi, tuzun çöktürme potansiyelinden faydalanarak sulu çözeltiden suyla karışan çözücü fazın ayrışması temeline dayanır. Öncelikle, polivinilprolidon ya da hidroksietilselüloz gibi koloidal bir stabilizör ile magnezyum klorür, kalsiyum klorür vb. bir elektrolit veya sükroz gibi çöktürücü bir ajanı içeren sulu karışım içine emülsifiye edilen aseton vb. bir çözücü vasıtasıyla polimer ve ilaç molekülü çözdürülür. Elde edilen y/s emülsiyonu, sulu fazda asetonun difüze olmasını arttırmak için yeterli hacimde su veya sulu çözelti yardımıyla seyreltilebilir. Seyreltme süreci, emülsiyon damlacıklarının, reaksiyon ortamında çözünen polimerin çökelmesine neden olur. Bu aşamadan sonra nanokapsül oluşumu beklenmektedir. Reaksiyon ortamında çözücü ile tuz çöktürücü ajan, çapraz akışlı filtre ile ortamdan uzaklaştırılır. Bu metot ile yapılan sentezde, karıştırma hızı, elektrolit türü ile konsantrasyonu sulu faz stabilizörün türü, organik fazlardaki polimerin konsantrasyonu, iç ve dış faz oranı gibi birçok değerin sonucu nihai ürün üzerinde etkilidir (Ertürk , 2022). Tuzla çöktürme yöntemi şematik olarak Şekil 2.7'de sunulmuştur.

Şekil 2.8

Tuzla Çöktürme Yönteminin Şematik Gösterimi



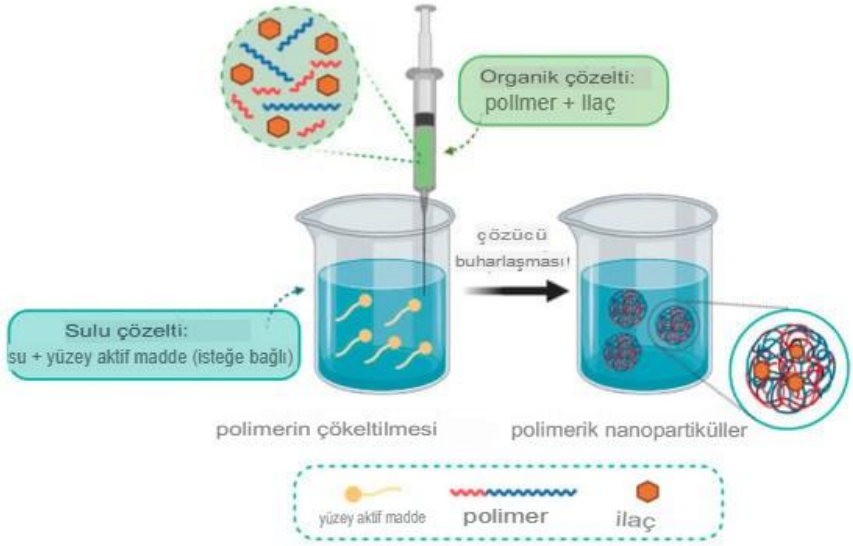
Kaynak: Zielinska vd., 2020

2.3.2.3 Nanoçöktürme yöntemi

Çözücü yer değiştirme yöntemi olarak bilinen bu teknik, iki uyumlu çözücü gerektirir. İç faz, aseton veya asetonitril gibi çözücülerde çözünmüş bir polimerden oluşur. Bu tekniğin prensibi, organik çözücünün lipofilik bir çözeltiden sulu faza yer değiştirmesinden sonra bir polimerin ara yüzey birikimine dayanır. Polimer, ara polariteye sahip suyla karışabilen bir çözücüde çözülür ve bu çözelti, karıştırma altında (damla damla veya kontrollü ekleme hızıyla) sulu bir çözeltiye kademeli olarak eklenir. Polimer çözeltisinin sulu faza hızlı spontan difüzyonu nedeniyle, nanopartiküller su moleküllerinden kaçınmak için anında oluşur. Çözücü nanodamlacıklardan dışarı difüze olurken, polimerik nanokapsüller veya nanoküreler şeklinde çöker. Genel olarak organik faz sulu faza eklenir, ancak protokol nanopartikül oluşumundan ödün vermeden tersine de çevrilebilir. Genellikle kolloidal süspansiyonun stabilitesini garanti için yüzey aktif maddeler sürece dahil edilebilir. Elde edilen nanopartiküller tipik olarak iyi tanımlanmış bir boyut ve emülsifikasyon sonucu buharlaştırma prosedürleriyle üretilenlerden daha iyi bir boyut dağılımı ile karakterize edilir.Nanoçöktürme, yaklaşık 170 nm boyutlarında polimerik nanopartiküllerin hazırlanması için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir, ancak aynı anda nanokürelerin veya nanokapsüllerin elde edilmesine de olanak sağlar (Zielinska vd., 2020). Bu tez çalışmasında nanoçöktürme yöntemi tercih edilmiştir ve nanoçöktürme yöntemi şematik olarak Şekil 2.9'da sunulmuştur.

Şekil 2.9

NanoçöktürmeYöntemi Şematik Gösterim



Kaynak: Zielinska vd., 2020

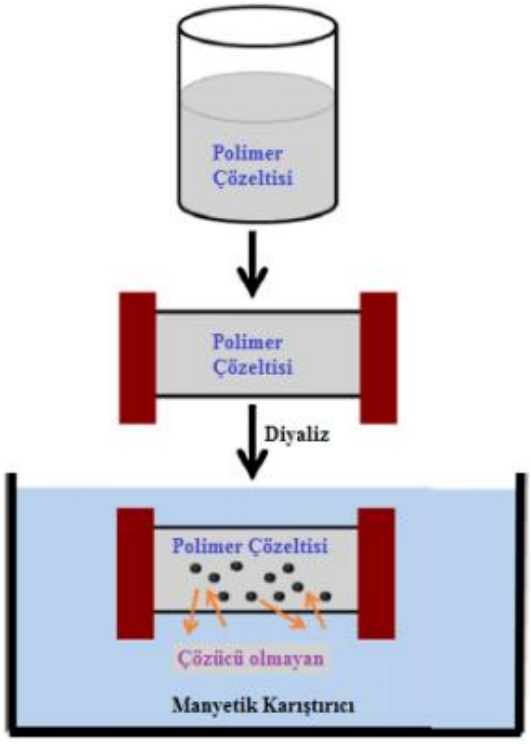
Nanopartikül oluşumunda dışarıdan enerji kullanmaya gerek olmaması ve yöntemin gerçekleştirilebilmesi için birçok cihaza gereksinim olmaması, düşük enerji ile çalışılması, hassas bir metot olması nanoçöktürme metodunun en büyük avantajıdır. Partikül sentezini, konsantrasyon üzerinde yapılan değişiklikler veya ortamda çözücünün bulunması ya da antisolvan ilave ederek modifiye etmek basittir. Çözücü buharlaştırmadan farklı olarak Dimetilsülfoksit (DMSO), Dimetilformamit (DMF) vb. uçucu olmayan solventler nanoçöktürme metodunda tercih edilebilir (Ertürk, 2022).

2.3.2.4 Diyaliz

Diyaliz küçük ve dar dağılımlı nanopartiküllerin oluşturulmasında kullanılan basit ve etkili bir yöntemdir. Bu yöntemde polimer organik bir çözücüde çözünür ve uygun molekül ağırlığına göre diyaliz yapan diyaliz tüpü içerisine yerleştirilir. Çözücünün diyaliz sonucu yer değiştirmesine bağlı olarak polimer çözünürlüğü kaybetmekte ve polimerin kademeli çökmesi meydana gelmekte ve böylece homojen nanopartikül süspansiyonu elde edilmektedir (Derman vd., 2013). Diyaliz yöntemi ile nanopartikül üretimi şematik olarak Şekil 2.9'da sunulmuştur.

Şekil 2.10

Diyaliz Yöntemi ile Nanopartikül Oluşumunun Şematik Gösterimi



Kaynak: Derman vd., 2013

2.3.2.5 Süperkritik sıvı teknolojisi

Polimerik nanopartiküller hazırlamak amacıyla kullanılan Süperkritik Sıvı Teknolojisi yönteminin en büyük avantajı çöktürülmüş ürünün çözücü içermemesidir. Süperkritik sıvılar genel olarak süperkritik sıcaklığı üzerinde, basıncın değişmesine rağmen faz değiştirmeyen sıvılar olarak tanımlanırlar. Süperkritik CO_2 en çok kullanılan süperkritik sıvıdır çünkü kritik olduğu durumlar uyumludur (Tc=31,1 ˚C, Pc=73.8 bar), toksik değildir, alev almaz ve ucuzdur. Çözücü buharlaştırma metodu polimerizasyon gibi temel metotlarda çözücü veya yüzey aktif materyallere ihtiyaç duymaktadır. Sentez sırasında ihtiyaç duyulan bu solvent ve yüzey aktif maddelerden kapsülasyon yapılan nanopartiküllerde kirlilik olarak kalan ve toksik etkilere neden olan etkin maddenin polimerik matrisde degrede olmasına sebep olur. Süper kritik akışkanlar, çevreye duyarlı ve yüksek saflıkta nanopartikül sentezi yapılmasında neden olduğu için önemli bir alternatif metottur (Ertürk, 2022 ; Derman vd., 2013).

2.4 Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

2.4.1 Parçacık boyutu ve dağılımı

Parçacık boyutu, nanopartiküllerin karakterizasyonunda en önemli parametrelerden biridir. Nanopartiküllerin başlıca uygulama alanı ilaç salımı ve ilaç hedeflemedir. Partikül boyutunun ilaç salımını etkilediği bulunmuştur. Daha küçük partiküller daha geniş yüzey alanı sunar. Sonuç olarak, yüklenen ilacın çoğu partikül yüzeyine maruz kalacak ve bu da hızlı ilaç salınımına yol açacaktır. Aksine, ilaçlar daha büyük partiküllerin içinde yavaşça yayılır. Bir dezavantaj olarak, daha küçük partiküller nanopartikül dispersiyonunun depolanması ve taşınması sırasında toplanma eğilimindedir. Bu nedenle, küçük boyut ile nanopartiküllerin maksimum stabilitesi arasında bir uzlaşma vardır. Polimer bozunması da partikül boyutundan etkilenebilir. Örneğin, poli (laktik-ko-glikolik asit) bozunma oranının *in vitro* ortamda artan partikül boyutu ile arttığı bulunmuştur (Lal vd., 2011).

Genel olarak, farklı yöntemlerle elde edilen polimerik nanopartiküllerin ortalama çapları 100 ila 300 nm arasında olabilir. Polidispersite mümkün olduğunca düşük (ideal olarak neredeyse sıfır) ve boyut dağılımı monodispers olmalıdır. Nanopartikül boyutu farklı teknikler kullanılarak ölçülebilir, en yaygın kullanılanları dinamik (DLS) ve statik (SLS) ışık saçılımıdır. Boyut ölçümleri kullanılan yönteme bağlı olarak değişebilir. Niteliksel bileşim gibi birçok faktör polimerik nanopartiküllerin boyutunu etkileyebilir;

buna bir örnek olarak, üretimleri sırasında partikül çapını etkileyen bir faktörün, farklı sıvı fazlar arasındaki viskozite, hidrofobiklik veya arayüzey gerilimindeki farklılıklar nedeniyle çekirdek olarak kullanılan yağın doğası olduğu nanokapsüller durumudur. Nanopartiküllerin ortalama çapını etkileyebilecek bir diğer faktör de daha geniş boyut dağılımına sahip daha büyük partiküllere yol açabilecek yüklenen ilaç miktarıdır (Zielinska vd., 2020).

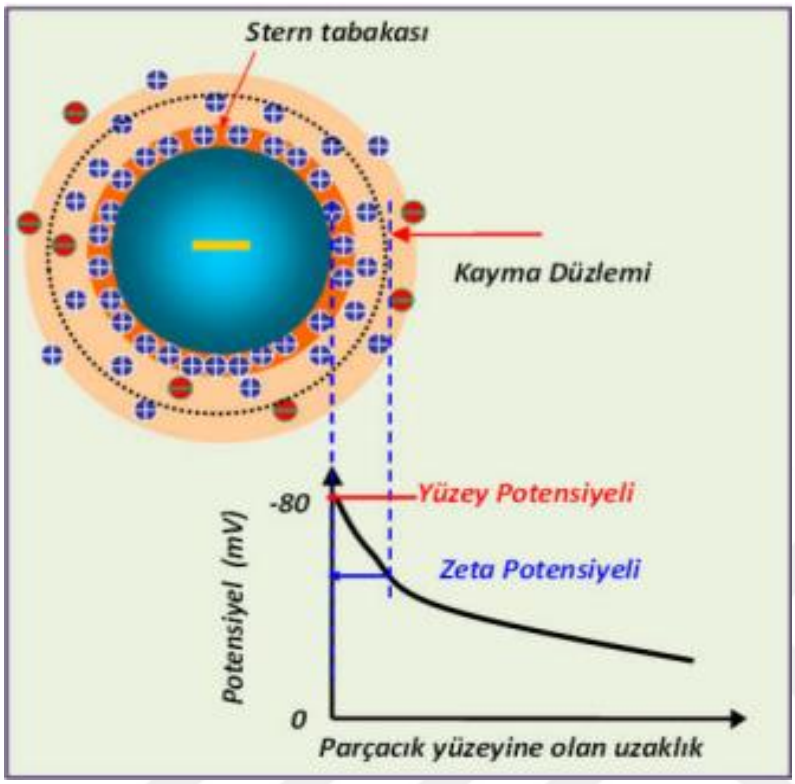
Günümüzde yapılan araştırmalar incelendiğinde partikül boyutunu belirlemenin en hızlı ve en popüler yöntemi foton korelasyon spektroskopisi (PCS) veya daha önce belirtildiği gibi dinamik ışık saçılımıdır (DLS). DLS, nano ve mikron altı aralıklardaki kolloidal süspansiyonlardaki Brownian nanopartiküllerinin boyutunu belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Tek renkli ışığın Brown hareketindeki küresel parçacıklardan oluşan bir çözelti üzerine tutulması, ışık hareketli parçacığa çarptığında Doppler kaymasına neden olarak gelen ışığın dalga boyunu değiştirir. Bu değişim parçacığın boyutuyla ilişkilidir. Parçacığın difüzyon katsayısını ölçerek ve otokorelasyon fonksiyonunu kullanarak boyut dağılımını çıkarmak ve parçacığın ortamdaki hareketinin bir tanımını vermek mümkündür. PCS, DLS'ye dayalı olarak partikül boyutunun ve boyut dağılımının doğru tahmini için en sık kullanılan tekniği temsil etmektedir (Lal vd., 2011).

2.4.2 Zeta potansiyel

Nanopartiküllerin yüzey yükünün doğası ve yoğunluğu, biyolojik çevre ile etkileşimlerinin yanı sıra biyoaktif bileşiklerle elektrostatik etkileşimlerini belirlediği için çok önemlidir. Kolloidal stabilite, nanopartiküllerin zeta potansiyel ölçümü ile analiz edilir. Bu potansiyel, yüzey yükünün dolaylı bir ölçüsüdür. Dış Helmholtz düzlemi ile kayma yüzeyi arasındaki potansiyel farka karşılık gelir. Zeta potansiyel ölçümü, kolloidal dispersiyonun depolama kararlılığı hakkında tahminler yapılmasına olanak tanır. Stabiliteyi sağlamak ve partiküllerin agregasyonunu önlemek için pozitif veya negatif yüksek zeta potansiyel değerleri elde edilmelidir. Yüzey hidrofobikliğinin derecesi daha sonra zeta potansiyel değerlerinden tahmin edilebilir. Zeta potansiyel ayrıca nanokapsüller içinde kapsüllenmiş veya yüzeye kaplanmış malzemenin doğası hakkında bilgi sağlayabilir (Lal vd., 2011.). Zeta potansiyel şematik olarak Şekil 2.11'de sunulmuştur.

Şekil 2.11

Sıvı İçinde Bulunan Parçacığın Zeta Potansiyel Şematik Gösterimi



Kaynak: mlabnmrl@metu.edu.tr

Zeta potansiyel, partikül yüzeyindeki fonksiyonel grupların ayrışması veya sulu dispersiyon ortamında bulunan iyonların adsorpsiyonu ve solvasyon etkisi nedeniyle dağıtıcı ortam ile arayüzeydeki değişikliklerden etkilenen partiküllerin yüzey yükünü yansıtır. Bu parametre, voltajın bir fonksiyonu olarak partikül hızını ölçmek için Doppler teknikleri kullanılarak belirlenir, böylece zeta potansiyel, ilgili bir çözücü içindeki partiküllerin elektroforetik hareketliliğinden hesaplanır. Fosfolipidler, poloksamerlerve polimerler, polimerik nanopartiküllerin ana bileşenleridir ve formülasyonlarda bulunduklarında zeta potansiyelini etkileyebilirler. Nispeten yüksek bir zeta potansiyel değeri olan ± 30 mV, kolloidal süspansiyonun iyi fizikokimyasal stabilitesi için önemlidir, çünkü büyük itici kuvvetler komşu nanopartiküllerle ara sıra çarpışmalar nedeniyle agregasyonu önleme eğilimindedir. Zeta potansiyel tayini, ilaçların nanopartiküllerle birleşme mekanizmasının aydınlatılmasında faydalıdır. Yapılan bir çalışmada zeta potansiyelin, kitosan ve etilen oksit ve propilen oksitten (PEO-PPO) oluşan bir diblok komponentten üretilen nanokürelere albümin yüklenmesini anlamak için etkili olduğunu bildirmiştir. Farklı formülasyonların bileşiminin zeta potansiyel değerleri üzerindeki etkilerini gözlemlemişlerdir. Böylece

nanopartiküllerin zeta potansiyeli, nanopartiküllerin yüzeyine yüzey aktif maddeler veya farklı moleküler ağırlıklara sahip polietilenglikol (PEG) gibi diğer kaplamalar eklenerek belirli bir uygulama için uyarlanabilir sonucuna ulaşılabilir (Zielinskavd, 2020).

2.4.3 Yapısal analiz

Polimerik nanopartiküllerin yapısal özelliklerini incelemek için en yaygın kullanılan yöntemler arasında termal analiz (TGA, DSC), FT-IR ve NMR yer almaktadır (Öztürk, 2017).

DSC tekniğinde analit ve iyi tanımlanmış bir referans numune aynı sıcaklığa getirilir, ardından numunenin ve referansın sıcaklığını artırmak için gereken ısı miktarı sıcaklığın bir fonksiyonu olarak ölçülür. Bu teknik erime noktalarını, kristalleşme noktalarını, yapısal faz geçiş noktalarını, gizli ısı kapasitesini, füzyon ısısını ve oksidatif kararlılığı ölçmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Joudeh ve Linke, 2022).

FT-IR tekniğinde absorbe edilen veya iletilen radyasyonun kaydedildiği bir malzemenin kızılötesi ışıkla ışınlanmasına dayanmaktadır. Elde edilen spektrum, numunenin kimyasal bağları, polarite ve numunenin oksidasyon durumu gibi bilgilerin elde edilebildiği benzersiz bir parmak izini temsil eder. Bu teknik esas olarak yüzey kimyasal bileşimi veya nanopartiküllerin işlevselleştirilmesi gibi organik malzemelerin karakterizasyonu için kullanılır. Ayrıca safsızlıkların tanımlanması için de kullanılır (Joudeh ve Linke, 2022).

NMR tekniği nanopartikül formülasyonlarının yapısal özelliklerini incelemek için en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. NMR spektroskopisi, nanosistemlerin yapısı, saflığı, işlevselliği, konformasyonel değişiklikleri ve etkin madde ile polimer arasındaki etkileşim gibi pek çok fizikokimyasal özelliği ortaya koyabilir. NMR, atom çekirdeklerinin manyetik özelliklerine dayalı fiziksel bir fenomendir. Bu yöntemin çalışma prensibi, atom numarası veya kütle numarası tek olan atom çekirdeklerinin (^{1}H ve ^{13}C), harici bir manyetik alan altındayken uygun bir radyo frekansındaki fotonlarla rezonansa girmesi esasına dayanır (Balcı, 2004).

NMR tekniği, bileşiklerdeki atomların bağlanma şekillerini ve kimyasal bağların niteliğini belirleme imkanı sunar. Örnekler, manyetik alandan etkilenmeyen döterodimetil sülfoksit veya döterokloroform gibi çözücülerle hazırlanır (Öztürk, 2017).

2.4.4 İlaç salım / Dissolüsyon

Nanopartiküllerden ilaçların salım şeklini ve derecesini anlamak, nanopartikül karakterizasyonunda önemli bir parametredir. Bu tür bilgileri elde etmek için çoğu salım yöntemi ilacın ve salım aracının ayrılmasını gerektirir. Nanopartiküllerin ilaç yüklemesi genellikle polimer kütlesi başına bağlanan ilaç miktarı olarak tanımlanır (genellikle mg polimer başına mol ilaç veya mg polimer başına mg ilaç); polimere göre yüzde olarak da verilebilir. Bu analiz için kullanılan teknik, ultrasantrifüj, ultrafiltrasyon, jel filtrasyon, santrifüjlü ultrafiltrasyon veya diyaliz yöntemleridir. Uygulanan teknik sonrası ortamda bulunan ilaç miktarını belirlemek için UV spektroskopisi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)ya da uygun analitik yöntemler kullanılabilir. İlaç salım deneyleri, ilaç salım mekanizmasını analiz etmek için belirli bir süre boyunca değerlendirilmelidir (Lal vd., 2011).

2.4.4.1 Ultraviyole-Görünür Spektroskopi (UV-Vis)

UV-Vis gibi absorpsiyon spektroskopisinde elektronların temel halden uyarılmış hale geçişi ölçülürken, fotolüminesans spektroskopisinde elektronların uyarılmış halden temel hale geçişi ölçülür. UV-Vis spektroskopisi, bir numunenin emilimini veya yansımasını ölçmek için görünür ve UV ışığı kullanır. Fotolüminesans spektroskopisinde, elektronu uyarmak ve ardından bir numunenin lüminesans veya floresans özelliklerini ölçmek için genellikle UV ışığı kullanılır. UV-Visspektrokopisi ucuz, kolay ve hızlı olduğu için ilaç ve kozmetik araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Joudeh ve Linke, 2022).

2.5 Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler

Biyolojik olarak parçalanabilen ve biyouyumlu polimerler olan polilaktid (PLA), poliglikolid (PLG) veya bunların kopolimerinden (PLGA) üretilen nanopartiküller, ilaç dağıtım sistemleri için en yoğun şekilde araştırılan polimerlerdir. Belirli bir kapsülleme yönteminin seçimi, esas olarak ilaç çözünürlüğü ve moleküler stabilite hususlarına göre belirlenir. Nanopartikül hazırlamak için yaygın olarak kullanılan teknikler nanoçöktürme tekniği, emülsifikasyon çözücü buharlaştırma, emülsifikasyon çözücü difüzyonu ve çift emülsiyon çözücü buharlaştırmadır (Cohen-Sela vd., 2009). Nanopartikül hazırlamak için kullanılan bazı polimerler Tablo 2.2'de sunulmuştur. Ayrıca bu tez çalışmasında kullanılan PLGA polimerinin kimyasal ismi ve yapısı Şekil 2.12.'de sunulmuştur.

Tablo 2.2

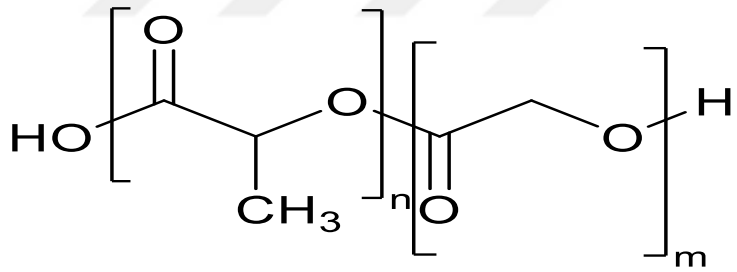
Nanopartikül Hazırlamada Kullanılan Polimerler

Polimer Tipleri	Polimer İsimleri
Sentetik Polimerler	Poli(laktid)
	Poli(laktid-ko-glikolid)
	Poli(ε-kaprolakton)
	Poli(izobütilsiyanoakrilat)
	Poli(izoheksilsiyanoakrilat)
	Poli(n-bütilsiyanoakrilat)
	Poli(akrilat)
	Poli(metakrilat)
Doğal Polimerler	Kitosan
	Aljinat
	Jelatin
	Albümin
Blok Kopolimerler	Poli(laktid)-poli(etilen glikol)(PLA-PEG)
	Poli(epsilon-kaprolakton)-poli(etilen glikol)(PCL-PEG)
	Poli(heksadesilsiyanoakrilat)-ko-poli(etilen glikol) (PHDCA-PEG)
Kolloidal Stabilizanlar	Dekstran
	Poli(vinil alkol)
	Tween 20 veya Tween 80

Kaynak: Cohen-Sela vd., 2009

Şekil 2.12

Poli(d,l-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) Polimer Kimyasal Yapısı



Kaynak: Taşkor ve Önel, 2023

PLGA; fizyolojik ortamda inert olması, biyolojik olarak parçalanabilmesi, biyouyumlu olması ve toksik olmayan ürünlere parçalanabilmesi nedeniyle,yeni ilaç taşıyıcı sistemlerde yaygın olarak kullanılan ve FDA tarafından da onaylanmış bir biyopolimerdir. PLGA kopolimerleri gerek yağda, gerekse suda çözünen etkin maddeler ile nanopartikül sistemlerin hazırlanmasında uygun taşıyıcılardır. PLGA vücutta laktik asit ve glikolik asit monomerlerine parçalanmakta, bunlar da sitrik asit döngüsüne girerek metabolize olarak karbondioksit (CO_2) ve suya (H_2O) parçalanmaktadır (Derman vd., 2013).

Biyomedikal uygulamalar için biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerin kullanılmasına yönelik ilgi hızla artmış ve yeni malzemeler tasarlamaya odaklanan

araştırmalar büyümeye devam etmiştir. Biyolojik olarak parçalanabilen polimerler, esterler, amidler, anhidritler ve diğerleri dahil olmak üzere çok sayıda fonksiyonel grup aracılığıyla kontrollü bozunma için uyarlanabilir. Bunlar arasında, laktid ve glikolid'den sentezlenen polyesterler, biyolojik sistemlerde iyi tolere edildikleri ve farklı ayarlanabilir fizikokimyasal ve mekanik özellikler gösterdikleri için özellikle ilgi çekicidir. Sentetik olarak, poli(glikolid) (PGA) ve poli(laktid) (PLA) tipik olarak sırasıyla laktid ve glikolidin halka açma polimerizasyonu yoluyla hazırlanır. Bozunma ürünleri ağırlıklı olarak sırasıyla glikolik asit ve laktik asittir (Jagur-Grodzinski, 2006).

2.5.1 Resomer RG 502H

Suyun varlığı Resomer polimerlerinin hidrolizine yol açmaktadır. İlk adımda su yüzeyi ıslatır ve polimerin içine difüze olur. Difüzyon hızı gözenekliliğe, gözenek boyutuna ve yüzey gerilimine bağlıdır. İkinci adımda, ester bağı hidrolizi zinciri daha küçük zincir uzunluklarına ayırır. Bozunma ilerledikçe, daha küçük zincir segmentleri çözünmeye başlar ve polimer erozyonu gerçekleşir. Çözünen monomerler/oligomerler daha sonra böbrek yoluyla atılır veya karbondioksit ve suya metabolize edilir. Sürecin sonunda polimer tamamen emilir ve vücuttan atılır. Biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerin yaşam döngüleri sonrasında tamamen yok olması oldukça istenen bir özelliktir. Tamamen kaybolma, monomerlerin yüksek suda çözünürlüğü nedeniyle Resomer polimerlerinin kendine özgü bir özelliğidir. Bunun aksine, polianhidritlerin hidrofobik monomerleri, zayıf çözünürlükleri nedeniyle polimer bozunduktan uzun süre sonra lokal olarak kalma eğilimindedir (Jagur-Grodzinski, 2006).

3 GEREÇLER

3.1 Kullanılan Maddeler

Madde adı	Firma adı
Aseton	:Merck, Almanya
Poloxamer 188	:Sigma-Aldrich, Almanya
Potasyum fosfat monobazik	:Sigma-Aldrich, Almanya
Resomer RG 502 H (PLGA)	:Sigma-Aldrich, Amerika
Rosmarinik Asit	: Sigma-Aldrich, St. Louis, A.B.D.
Sodyum hidroksit	:Sigma-Aldrich, Almanya
Span 60	:Sigma-Aldrich, Almanya
Trehalozdihidrat	:Sigma-Aldrich, Almanya

3.2 Kullanılan Cihazlar

Cihaz adı	Firma Adı
Buz Dolabı	:Arçelik, Türkiye
Derin Dondurucu	:Liebherr LGEX 3410 Medline, İsviçre
Distile su cihazı	:MiliQMilipore, Fransa
Hassas terazi	:Ohaus E1 2140, ABD
Liyofilizatör	:Scanvac-Coolsafe Pro, Danimarka
Manyetik karıştırıcı	:Jeiotech MS-53M, Güney Kore
Mikropipet seti	:Eppendorf, Almanya
pH metre	: WTW ProfiLab pH 597, Almanya
Su banyosu	: GFL, Tissuefloatbath 1052, Almanya
Ultrasonik banyo	:WisdLaboratory Instruments, Kore
UV-Spektrofotometre	:Shimadzu, Japonya
Vorteks	:JeoTech, Kore
Zetasizer	:Malvern Nano ZS, İngiltere

4 YÖNTEM

4.1 Analitik Miktar Tayini İçin Validasyon Çalışmaları

In vitro çalışmalarda rosmarinik asitin miktar tayini UV spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla enkapsülasyon etkinliği çalışmaları ve *in vitro* dissolüsyon çalışmaları için iki farklı validasyon çalışması yapılmıştır.

4.1.1 Rosmarinik asit için aseton: su (1:1, *h/h*) ortamında validasyon çalışması

Rosmarinik asit için aseton: su (1:1, *h/h*) ortamında yapılan çalışma doğrusallık, kesinlik ve doğruluk parametreleri dikkate alınarak istatiksel olarak incelenmiştir. Parametreler Uluslararası Harmanizasyon Birliği (ICH)'nin kriterlerine göre değer kontrol edilmiştir (Söğüt Ertaş ve Kayalı, 2005).

4.1.1.1 Absorbans belirleme çalışmaları

Enkapsülasyon etkinliği çalışmalarında kullanmak üzere rosmarinik asit için aseton: su (1:1, *h/h*) ortamında miktar tayini UV spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir. Maksimum absorbans (λ_{max}) değerinin bulunması için ilk olarak 25 mg rosmarinik asit tam olarak tartılmış ardından aseton: su (1:1, *h/h*) ile balon jojede 25 mL'e tamamlanmıştır. Bu çözelti on dakika ultrasonik banyoda tutulmuş ve sonuç stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözeltinin konsantrasyonun 1000.0 $\mu g.mL^{-1}$ olmasından hareketle farklı seyreltmeler ile daha düşük konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler UV spektrofotometrede maksimum absorbansın bulunabilmesi için 200-800 nm arasında taranmıştır (Kömür, 2023).

4.1.1.2 Doğrusallık

Validasyon çalışmasında doğrusallığın değerlendirilmesi için üç farklı stok çözeltiden 2.5 ile 15.0 $\mu g.mL^{-1}$ arasında 6 farklı konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. Her çözelti için analizler 3 kez olacak şekilde tekrarlanmıştır. Çözeltilerin 330 nm'de absorbans değerleri kaydedilmiştir. Bulunan absorbans değerleri ile regresyon analizi yapılıp rosmarinik asite ait kalibrasyon eğrisi, eğriye ait olan doğru denklemi ve korelasyon katsayısı değeri (r^2) elde edilmiştir. (Habib vd., 2021).

4.1.1.3 Kesinlik

Yöntemin kesinlik doğrulamasını yapmak için doğrusallık çalışmasında kullanılan konsantrasyonlar dikkate alınarak kalibrasyon aralığında bulunan 3 farklı

konsantrasyonda 3 farklı günde rosmarinik asit içeren stok çözeltiler hazırlanmış ve hazırlanan bu stok çözeltilerin seyreltilmesiyle 5.0 µg.mL^{-1} , 10.0 µg.mL^{-1} , 15.0 µg.mL^{-1} konsantrasyonda çözeltiler elde edilmiştir. Her bir konsantrasyon için 3 farklı gün analizler gerçekleştirilmiştir (Öztürk, 2017).

4.1.1.4 Doğruluk

Bir analitik metodun doğru olup olmadığını belirlemek için, kullanılan analitik metotla elde edilen sonucun gerçek değerlerle ne kadar uyumlu olduğuna bakılmaktadır. Bu analizlerde elde edilen sonuçlar yüzde verim ve her seri için bağıl standart sapma olarak sunulmaktadır. Analitik yöntemin doğru olup olmadığını belirlemek için 3 ayrı konsantrasyonda (5 µg.mL^{-1}, 10 µg.mL^{-1} ve 15 µg.mL^{-1}) üç kez tekrarlanan analizler yapılmıştır (Araújo vd., 2013).

4.1.1.5 Duyarlılık

Tespit sınırı (LOD), numunede tespit edilebilecek en düşük analit miktarıdır. Ölçüm sınırı (LOQ) uygun kesinlik ve doğrulukla kantitatif olarak belirlenebilen numune içindeki analit miktarlarının en düşük olmasıdır. Genel olarak bu sınırlar bir analitin tespit veya ölçümü için gerekli olan minimum konsantrasyonları ifade eder (Ferraz vd., 2015). LOD ve LOQ değerleri aşağıda verilen denklem 4.1 ve denklem 4.2 ile hesaplanmıştır. Denklem 4.1 ve Denklem 4.2'deki S, y ekseni kesim noktasının standart sapması, m ise korelasyon eşitliğinin eğimidir.

$$LOD = \frac{3{,}3 \times m}{S} \tag{4.1}$$

$$LOQ = \frac{10 \times m}{S} \tag{4.2}$$

4.1.1.6 Seçicilik

Rosmarinik asit, aseton: su(1:1, *h/h*) karışımı ve B-Blank-NP kodlu formülasyon için 200-800 nanometre aralığında alınan spektrumları arasındaki benzerlikler incelenerek seçicilik belirlenmiştir (Ferraz vd., 2015).

4.1.2 Rosmarinik asit için PBS pH 7.4 ortamında validasyon çalışması

4.1.2.1 Absorbans belirleme çalışmaları

In vitro dissolüsyon çalışmalarından önce rosmarinik asit için fosfat tamponu (PBS pH 7.4) ortamında validasyon çalışmaları UV spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir. Maksimum absorbans (λ_{max}) değerinin bulunması için ilk olarak 25 mg rosmarinik asit tam tartılmış ve balon jojede 25 mL'e PBS pH 7.4 ile tamamlanmıştır. Oluşan çözelti on dakika ultrasonik banyoda tutulmuş ve stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözeltinin konsantrasyonun 1000.0 $\mu g.mL^{-1}$ olmasından hareketle, seyreltmeler ile daha düşük konsantrasyondaki çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler UV spektrofotometrede maksimum absorbansın bulunabilmesi için 200-800 nm arasında taranmıştır (Pharma vd., 2023).

4.1.2.2 Doğrusallık

Validasyon çalışmasında doğrusallığın değerlendirilmesi için üç farklı stok çözeltiden 2.5 ile 15.0 $\mu g.mL^{-1}$ arasında 6 farklı konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. Çözeltilerin 324 nanometrede olacak şekilde absorbans değerleri ölçülmüştür ve bu değerler regresyon analizi için kullanılmıştır. Rosmarinik asitin kalibrasyon eğrisi oluşturularak eğriye ait doğru denkleminin ve korelasyonun hesaplaması yapılmıştır (Luna vd., 2022).

4.1.2.3 Kesinlik

Yöntemin kesinliğini doğrulamak için doğrusallık çalışmasında kullanılan konsantrasyonlar dikkate alınarak kalibrasyon aralığında bulunan 3 farklı konsantrasyonda 3 farklı günde (5.0 $\mu g.mL^{-1}$, 10.0 $\mu g.mL^{-1}$, 15.0 $\mu g.mL^{-1}$) rosmarinik asit içeren çözeltiler hazırlanmıştır ve hazırlanan bu çözeltilerin her bir konsantrasyonu için 3 farklı gün analizler gerçekleştirilmiştir (Öztürk, 2017).

4.1.2.4 Doğruluk

Bir analitik yöntemin doğruluğu, kullanılan analitik yöntem sonucunda elde edilen sonuçlarla gerçek değerlerin birbirine olan yakınlığıdır. Bu analizlerde elde edilen sonuçlar % verim ve her seri için bağıl standart sapma olarak verilmektedir. Analitik metodun doğruluğunu tespit etmek için analizler 3 farklı konsantrasyonda (5.0 $\mu g.mL^{-1}$, 10.0 $\mu g.mL^{-1}$, 15.0 $\mu g.mL^{-1}$) 3 kez tekrarlanmıştır (Araújo vd., 2013).

4.1.2.5 Duyarlılık

PBS pH 7.4 ortamında yapılan validasyon çalışması için LOD ve LOQ analizleri '4.1.1.5. Duyarlılık' başlığında yer verilen Denklem 4.1. ve 1 ve Denklem 4.2. yardımı ile hesaplanmıştır (Ferraz vd., 2015).

4.1.1.6 Seçicilik

Yöntemin seçiciliği, UV-Spektrofotometre'den elde edilen spektrumlar rosmarinik asit, PBS pH 7.4 ve B-Blank-NP kodlu formülasyon için 200-800 nm aralığında elde edilen numunelerin spektrumlarındaki örtüşmelere bakılarak belirlenmiştir (Pharma vd., 2023).

4.2 Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması

Rosmarinik asitin potansiyel biyolojik ve farmasötik aktivitelerine odaklanıldığı için rosmarinik asitin uzun vadeli stabilitesini tek adımda iyileştirmek amacıyla yüzey aktif madde moleküllerinin uyumlaştırıcı modifiye edici olarak görev yaptığı poli (laktik-koglikolik asit) (PLGA) bazlı nanopartikül hazırlanmıştır. Bu sebeple literatür araştırması sonucunda bu tez çalışması kapsamında hazırlanan PLGA nanopartiküllerinin 'Nanoçöktürme' yöntemi kullanılarak hazırlanmasına karar verilmiştir. Formülasyon ön deneme çalışmalarında sulu fazda Poloxamer 188 (P188) kullanılarak deneme çalışmaları yapılmış ve uygun sonuçlara göre optimum formülasyon seçilmiştir. İlgili çalışmada özel bir PLGA türevi olan Resomer RG 502 H isimli polimer ile çalışılmıştır. Bu çalışmada hazırlanan tüm nanopartikül formülasyonlarının hazırlama koşulları ve içerikleri Tablo 4.1.'de sunulmuştur (Vatankhah vd., 2020).

Tablo 4.1

Formülasyon İçerikleri ve Hazırlama Koşulları

Kod	PLGA (mg)	Span 60 (mg)	RA (mg)	Aseton (mL)	Sulu Faz Çözelti İçeriği
B-Blank-NP	60	20	-	3	10 mL, %1.5'lik (a/h) P188 çözeltisi
B-RA-NP	60	20	6	3	10 mL, %1.5'lik (a/h) P188 çözeltisi

4.2.1 B-Blank-NP kodlu boş/blank formülasyonun hazırlanması

B-Blank-NP kodlu boş formülasyonun hazırlanması için iki ayrı faz kullanılmıştır. Organik faz, 20 mg Span-60 ve 60 mg PLGA (Resomer RG 502 H) tartılarak 3 mL aseton içinde çözülerek hazırlanmıştır. Sulu faz ise %1.5 (*a/h*) oranında Poloksamer 188 içerecek şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan sulu fazdan 10 mL alınmış ve 3 mL asetonla çözdürülen organik faz, 5 mL.saat^{-1} hızda damla damla sulu faza manyetik karıştırıcı altında eklenmiştir. Daha sonra asetonun 4 saat boyunca manyetik karıştırma altında çeker ocakta oda sıcaklığında buharlaşmasına izin verilmiştir. Elde edilen sulu dispersiyon, nanopartikülleri toplamak için santrifüj edilmiştir (11.000 rpm, 45 dk, 4°C) (Hettich Rotina-420R, Tuttlingen, Almanya). Nanopartiküller toplandıktan sonra, nanopartikülleri yıkamak için 5 mL distile su partiküller üzerine eklenmiştir. Suda dağıtılan nanopartiküllerin tam olarak yıkanabilmesi için yukarıda belirtilen distile su ekleme ve santrifüjleme işlemi 3 kez uygulanmıştır (Ekinci, Öztürk ve İlem-Özdemir, 2022; Kurban vd., 2023; Öztürk, Ünver ve Kıyan, 2023).

4.2.2 B-RA-NPkodlu etkin madde içeren formülasyonun hazırlanması

Rosmarinik asit içeren etkin maddeli B-RA-NP kodlu nanopartikül formülasyonun hazırlanması için ilk olarak 6 mg rosmarinik asit içeren 20 mg Span 60 ve 60 mg PLGA (Resomer RG 502 H) tam tartım alınarak 3 mL aseton ile çözündürülmüş ve organik faz elde edilmiştir. Sulu faz olarak %1.5 (*a/h*) oranında Poloksamer 188 çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan sulu fazdan 10 mL alınmış ve 3 mL asetonla çözdürülen organik faz, 5 mL.saat^{-1} hızdadamla damla sulu faza manyetik karıştırıcı altında eklenmiştir. Daha sonra asetonun 4 saat boyunca manyetik karıştırma altında çeker ocakta oda sıcaklığında buharlaşmasına izin verilmiştir. Elde edilen sulu dispersiyon, nanopartikülleri toplamak için santrifüj edilmiştir (11.000 rpm, 45 dk, 4°C) (Hettich Rotina-420R, Tuttlingen, Almanya). Nanopartiküller toplandıktan sonra, nanopartikülleri yıkamak için 5 mL distile su partiküller üzerine eklenmiştir. Suda dağıtılan nanopartiküllerin tam olarak yıkanabilmesi için yukarıda belirtilen distile su ekleme ve santrifüjleme işlemi 3 kez uygulanmıştır (Ekinci, Öztürk ve İlem-Özdemir, 2022; Kurban vd., 2023; Öztürk, Ünver ve Kıyan, 2023).

4.3 Karakterizasyon Çalışmaları

4.3.1 Parçacık boyutu, parçacık boyutu dağılımı (PDI) ve zeta potansiyel belirleme çalışması

Nanopartiküllerin parçacık boyutu ve boyut dağılımı (PDI) değeri, ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments) cihazı kullanılarak dinamik ışık saçılımı yöntemiyle ölçülmüştür. Hazırlanan nanopartiküllerin parçacık boyutları ve PDI değerleri, taze formülasyonların distile suyla seyreltilmesi sonrası analiz edilmiştir. Zeta potansiyel ölçümleri, 25°C oda sıcaklığında, tek kullanımlık bir kılcal zeta hücresinde aynı cihaz ile yapılmıştır. Tüm formülasyon örnekleri üçer kopya olarak ölçülüp, ölçüm sonuçlarının ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanmıştır (Öztürk ve Gündüz, 2018; Öztürk, Güven ve Yenilmez, 2018).

4.3.2 Dondurma ve liyofilizasyon işlemlerinde kullanılan trehaloz miktarı ve saklama koşulu belirleme çalışması

Kriyoprotektan etki ve saklama koşullarının belirlenmesi için B-RA-NP kodlu formülasyon hazırlanmıştır. Hazırlanan taze formülasyonun parçacık boyutu ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Ardından hazırlanan B-RA-NP kodlu formülasyon üzerine santrifüj (11.000 rpm, 4°C, 30 dakika) işlemi uygulanmıştır. Bu aşamada trehaloz çözeltisi (%5, *a/h*) hazırlanmış ve 0.22 µm membran filtreden süzülmüştür. Santrifüje edilen partiküllerin yıkama proseslerinin ardından üzerine %5 (*a/h*) konsantrasyonunda hazırlanan trehaloz çözeltisinden 2 mL eklenip vortekslenmiştir. Trehaloz çözeltisi eklenen formülasyon eppendorf tüplerinde 7 eşit kısıma ayrılmış (7 tüp) ve bu tüplere sırasıyla %5 (*a/h*) konsantrasyondaki trehaloz çözeltisinden 1. tüpe 0 µL, 2. tüpe 100 µL, 3. tüpe 300 µL, 4. tüpe 450 µL, 5. tüpe 600 µL, 6. tüpe 750 µL, 7. Tüpe 900 µL eklenmiştir. Tüm tüpler -20°C'de buzdolabında dondurulmasının ardından liyofilizatörde liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon sonucu, liyofilize toz nanopartikül formülasyonlarının üzerine 1 mL distile su eklenip vortekslenerek dağıtılmıştır. Her tüp için parçacık boyutu analizi yapılmıştır. Benzer çalışma sadece dondurma işlemine tabi tutulan nanopartiküller üzerinde de gerçekleştirilmiştir.Sonuç olarak, bu analizlerde optimum trehaloz konsantrasyonu yalnızca dondurulup çözülen nanopartiküllerde ve dondurulup liyofilize edilen nanopartiküllerde belirlenmiştir (Öztürk vd., 2018; Öztürk vd., 2019; Öztürk ve Kırımloğlu, 2019).

4.3.3 Enkapsülasyon etkinliği çalışması

PLGA bazlı B-RA-NP kodlu nanopartikül formülasyonuna rosmarinik asit yüklemesi, '4.1.1. Rosmarinik asit için aseton: su (1:1, *h/h*) ortamında validasyon çalışması' bölümünde açıklanan UV spektrofotometre yöntemi ile belirlenmiştir. B-RA-NP kodlu rosmarinik asit yüklü PLGA bazlı nanopartikül formülasyonun rosmarinik asit içeriği doğrudan ilacın nanopartikül formülasyonundan ekstrakte edilmesi ile değerlendirilmiştir. Liyofilize nanopartikül yaklaşık 5 mg olacak şekilde hassas terazi ile tartılmıştır. Ardından üzerine 1 mL aseton: su (1:1, *h/h*) ilave edilmiş ve partikülleri çözmek için 5 dakika vortekslenmiştir. Vorteksleme işlemi sonrası hazırlanan çözelti 0.22 µm membran filtre ile süzülmüş, gerekli seyreltmeler ardından rosmarinik asit miktar tayini için UV spektrofotometrede 330 nm'de analiz edilmiştir. Enkapsülasyon etkinliği (% EE) olarak ifade edilmiş ve Denklem 4.3. ile hesaplanmıştır. Bu çalışma 3 set formülasyon üzerinden gerçekleştirilmiştir (Elmaskaya vd., 2019; Kaya-Tilki vd., 2024).

$$\%EE = \frac{Enkapsüle\ edilen\ RA\ miktarı}{Formülasyonda\ bulunan\ teorik\ RA\ miktarı} \times 100 \quad (4.3)$$

4.3.4 *In vitro* dissolüsyon çalışması

Rosmarinik asit yüklü B-RA-NP kodlu nanopartikül formülasyonlarının *in vitro* dissolüsyon profillerini belirlemek için 72 saatlik bir dissolüsyon çalışması yapılmıştır. B-RA-NP kodlu nanopartikül formülasyonundan rosmarinik asit dissolüsyonu diyaliz membran yöntemi kullanılarak test edilmiştir. Rosmarinik asit (5 mg) ve B-RA-NP (5 mg'a eşdeğer miktarda rosmarinik asit içeren miktarda) kodlu nanopartikül formülasyonu selüloz asetat diyaliz membranı (molekül ağırlığı:12-14 kDa) içerisine konulmuş ardından üzerlerine 3 mL çözündürme ortamı (PBS pH 7.4) eklendikten sonra diyaliz membran özel aparatlar ile kapatılmıştır. Hazırlanan diyaliz membranları, 100 rpm'de devamlı olarak karışan 37±0.5°C'de 80 mL hacimdeki çözünme ortamı içine atılmıştır. Dissolüsyon ortamı olarak fosfat tamponu (PBS) pH 7.4 kullanılmıştır. Analizlerde hata olmaması ve çözünme ortamının buharlaşmasını önlemek için reseptör kompartman alimünyum folyo ile sıkıca kapatılmıştır. Görsel 4.1'de yapılan çalışmanın bir görseli sunulmuştur.

Görsel 4.1

RA ve B-RA-NP için In Vitro Dissolüsyon Çalışması

Fotoğraf: Büşra Solak

1. saat, 2. saat, 3. saat, 4. saat, 5. saat, 6. saat, 7. saat, 9. saat, 12. saat, 24. Saat, 48. Saat ve 72. saat sonrası 3 mL numune alınmış ve aynı miktar hacim yerine taze çözünme ortamı (PBS pH 7.4) reseptör kompartımanına ilave edilmiştir. Ardından numuneler gerekli seyreltmelerin ardından 'PBS pH 7.4 ortamında validasyon çalışması' bölümünde açıklanan UV spektrofotometre yöntemi ile 324 nm'de analiz edilmiştir. Sonuçlar % kümülatif çözünen miktar-zaman grafiğine dönüştürülmüştür. Bu çalışma 3 seri saf rosmarinik asit ve 3 seri rosmarinik asit yüklü B-RA-NP kodlu formülasyonu için gerçekleştirilmiştir (Arınmış, Kıyan ve Öztürk, 2024).

4.3.5 Salım kinetiği çalışması

In vitro disolüsyon deneylerinden elde edilen verilerle, DDSolver yazılımı kullanılarak salım kinetikleri incelenmiştir. Hesaplama süresini azaltmak, hataları minimize etmek ve uygun salım profillerini belirlemek amacıyla, excel eklentisi olan DDSolver bilgisayar programı kullanılmıştır. Dissolüsyon profilleri oluşturulduktan sonra, veriler DDSolver programına aktarılmış ve en önemli 4 kriterin belirlenmesi sağlanmıştır. Bu kriterler arasında korelasyon katsayısı (r^2), düzeltilmiş korelasyon katsayısı ($r^2_{adjusted}$), Akaike bilgi kriteri (AIC) ve model seçim kriteri (MSC) bulunmaktadır. Kinetik modelleri değerlendirmek için en yüksek r^2, $r^2_{adjusted}$ ve MSC değerleri ile en düşük AIC değerleri seçim kriteri olarak kullanılmıştır (Zhang vd., 2010; Zuo vd., 2014; Öztürk vd., 2020; İsmailovi,Kıyan ve Öztürk, 2023).

4.4 Katı Hal Karakterizasyonları

4.4.1 Termal (DSC) analizler

Termal özellikler, ShimatzuScientific Instruments Colombia-MI marka DSC-60 diferansiyel tarama kalorimetresi kullanılarak belirlenmiştir. Yaklaşık 5 mg numune, alüminyum kreuzer içinde tartıldıktan sonra, 50 mL.dakika^{-1} hızında hava akımı ve 10°C.dakika^{-1} ısıtma hızıyla, 30°C ile 300°C arasındaki sıcaklık aralığında analiz edilmiştir. B-RA-NP kodlu rosmarinik asit yüklü nanopartikül formülasyonunun analizine ek olarak, referans ve karşılaştırma amacıyla saf rosmarinik asit, PLGA, B-Blank-NP kodlu formülasyonlar da incelenmiştir (Öztürk, Yenilmez ve Yazan, 2019; Öztürk vd., 2023).

4.4.2 Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektrofotometre analizleri

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometri (FT-IR) analizleri FT-IR cihazı (Shimadzu IR Prestige-21, Japonya) ile 4000-500 cm^{-1} dalga boyu aralığında saf rosmarinik asit, PLGA, B-Blank-NP kodlu formülasyon, rosmarinik asit yüklü B-RA-NP kodlu formülasyon için gerçekleştirilmiştir. Kullanılan FT-IR cihazının sıcaklık kontrol mekanizmalı DLATGS dedektörü, dinamik hizalama sistemi ile donatılmış otomatik kurutuculu sızdırmaz Michelson interferometresi (30° geliş açısı) özellikleri bulunmaktadır. Analizlerde kullanılan çözünürlük 0.5 cm^{-1} 'dir (Öztürk vd., 2023; Güven, Öztürk ve Yenilmez, 2020; Öztürk vd., 2020).

4.4.3 Nükleer manyetik rezonans (^{1}H-NMR) analizleri

Döteroaseton içinde çözündürülerek hazırlanan saf rosmarinik asit, PLGA, B-Blank-NP kodlu formülasyon ve rosmarinik asit yüklü B-RA-NP kodlu formülasyon^{1}H-NMR analizleri, NMR (Bruker 500 MHz UltraShield NMR, Almanya) cihazı kullanılarak yapılmıştır (Öztürk vd., 2017; Şenel ve Öztürk, 2019; Başaran vd., 2022).

4.5 Biyolojik Aktivite Çalışmaları

4.5.1 Antioksidan aktivitenin belirlenmesi

Antioksidan aktivitenin belirlenmesinde DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil radikali) testi kullanılmıştır (Arınmış vd., 2024; Ismailovi vd., 2023). Mikroplakadaki her kuyuya 100 µL metanol aktarılmıştır. Plakanın ilk kuyucuğuna numunelerden 4 mg.mL^{-1} konsantrasyonda 100 µL aktarılmıştır ve 100 µL alınarak seri dilüsyonu yapılmıştır.

Üzerine 100 µL DPPH (0.08 mg.mL^{-1}) çözeltisi ilave edilmiştir. Karışım yarım saat karanlıkta inkübe edildikten sonra mikroplaka okuyucuda 517 nm'de absorbans değerleri ölçülerek numunelerin serbest radikal yüzde inhibisyon değerleri tayin edilmiştir. Numunelerin serbest radikal süpürme etkisi inhibisyon yüzdesi olarak aşağıdaki verilen denklem 4.4.'e göre hesaplanmış ve IC_{50} (µg.mL^{-1}) değerleri belirlenmiştir.

$$\%\ Inhibisyon = \frac{Abs_{Kontrol} - Abs_{Numune}}{Abs_{Kontrol}} \quad (4.4)$$

4.5.2 Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

Antimikrobiyal akvitenin belirlenmesi için kullanılan standart mikroorganizma kültürleri; *Bacillussubtilis* NRRL B478, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichiacoli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Candida albicans* ATCC 90028 ve *Candida krusei* ATCC 6258 şeklindedir.

4.5.2.1 Agar Difüzyon yöntemi

Mikroorganizmalar McFarland yöntemine göre FTS (fizyolojik tuzlu su/serum fizyolojik, %0.9 NaCl) içerisinde süspansiyonları yapılıp hücre densitometresi cihazında hücre yoğunlukları McFarland 0.5 değerinde 1.5 x 108 kob.mL^{-1} olacak şekilde ayarlanmıştır. Bakteri kültürleri MHA (MuellerHintonAgar) ve maya kültürü SDA (Sabouraud Dekstroz Agar) besiyerine 100 µL hacimde ekilmiştir. Agar yüzeyine 6 mm çapında delikler açılarak ve maddelerden 4000 µg.mL^{-1} konsantrasyonda, 50 µL olacak şekilde kuyulara aktarılmıştır. Petriler 24 saat 37 °C'de inkübe edildikten sonra kuyucuk etrafında oluşan inhibisyon zon çapları mm cinsinden ölçülmüştür. Deneyde pozitif kontrol grubu olarak bakteriler için eritromisin ve maya için de flukonazol kullanılmıştır. Deney 3 tekrarlı şekilde yapılmıştır (Wayne, 2011; Öztürk vd, 2019; Öztürk ve Aygül, 2020).

4.5.2.2 Sıvı mikrodilüsyon yöntemi

Bu yöntem ile maddelerin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri belirlenmiştir. Standart mikroorganizmaların FTS içerisinde süspansiyonları McFarland0.5 değerine göre 1.5 x 10^8 kob.mL^{-1}olacak şekilde ayarlanmıştır. Maddelerin stok konsantrasyonları 4000 µg.mL^{-1} olacak şekilde hazırlanmıştır. Bakteri türleri için

MHB (MuellerHintonBroth), maya türü için ise SDB (Sabouraud Dekstroz Broth)'den 100 µL, 96 kuyucuklu mikroplakanın her kuyusuna aktarılmıştır. Maddelerden 100 µL plakadaki ilk sıraya aktarılarak 1000 ile 3.90 $\mu g.mL^{-1}$ arasında değişen konsantrasyonlarda iki kat seri dilüsyon işlemi yapılmıştır. Daha sonra her kuyucuğa mikroorganizma süspansiyonlarından eklenip, plakalar 24 saat, 37 °C'de inkübe edilmiştir. Pozitif kontrol grubu olarak antibiyotikler (bakteriler için eritromisin ve maya için flukonazol), negatif kontrol grubu olarak da besiyerleri kullanılmıştır. Deney 3 tekrarlı şekilde yapılmıştır. Plakalara 20 µL, % 0.01'lik resazürin eklenerek 2 saat, 37 °C'de inkübe edilmiştir. Plakalarda oluşan pembe renk canlılığı, mavi – mor renk ise canlılık olmadığını göstermekte olup, MİK değerleri bu renk değişimlerine göre belirlenmiştir (Wayne,2011; Öztürk vd., 2019; Öztürk ve Aygül, 2020; Öztürk vd., 2021).

5 BULGULAR

5.1 Analitik Miktar Tayini İçin Validasyon Çalışmaları

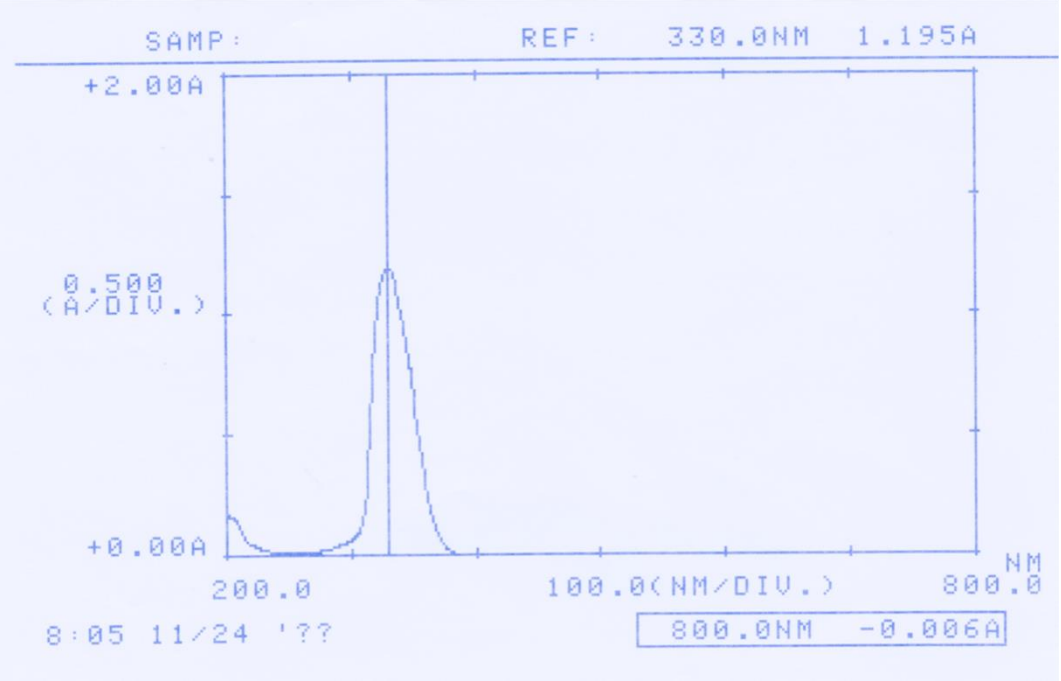
5.1.1 Rosmarinik asit için aseton: su (1:1 h/h) ortamında validasyon çalışması

5.1.1.1 Absorbans belirleme

Aseton: su (1:1, *h/h*) karışımı içinde 25.0 µg.mL^{-1} konsantrasyonda hazırlanmış olan rosmarinik asit çözeltisinin 330.0 nm'de maksimum absorbans (λ_{max}) göstermiş olduğu Şekil 5.1'de sunulmuştur.

Şekil 5.1

Rosmarinik asit'e ait Aseton: Su (1:1, h/h) ortamında 200-800 nm Arasında Elde Edilen Spektrum (λ_{max} = 330.0 nm)



5.1.1.2 Doğrusallık

Rosmarinik asitin aseton: su (1:1, *h/h*) içinde 2.5 - 15.0 µg.mL^{-1} konsantrasyonları aralığında altı farklı konsantrasyonda farklı stok çözeltilerden üç kalibrasyon seti hazırlanmış ve ardından UV-spektrofotometre ile 330.0 nm'de analiz edilmiştir. Konsantrasyona karşılık gelen absorbans değerleri her kalibrasyon seti için Tablo 5.1.'de sunulmuştur. Elde edilen absorbans değerleriyle çizilen kalibrasyon eğrisi, eğriye ait olan doğru denklemi ve korelasyon katsayısı değeri (r^2) Şekil 5.2.'de gösterilmiştir.

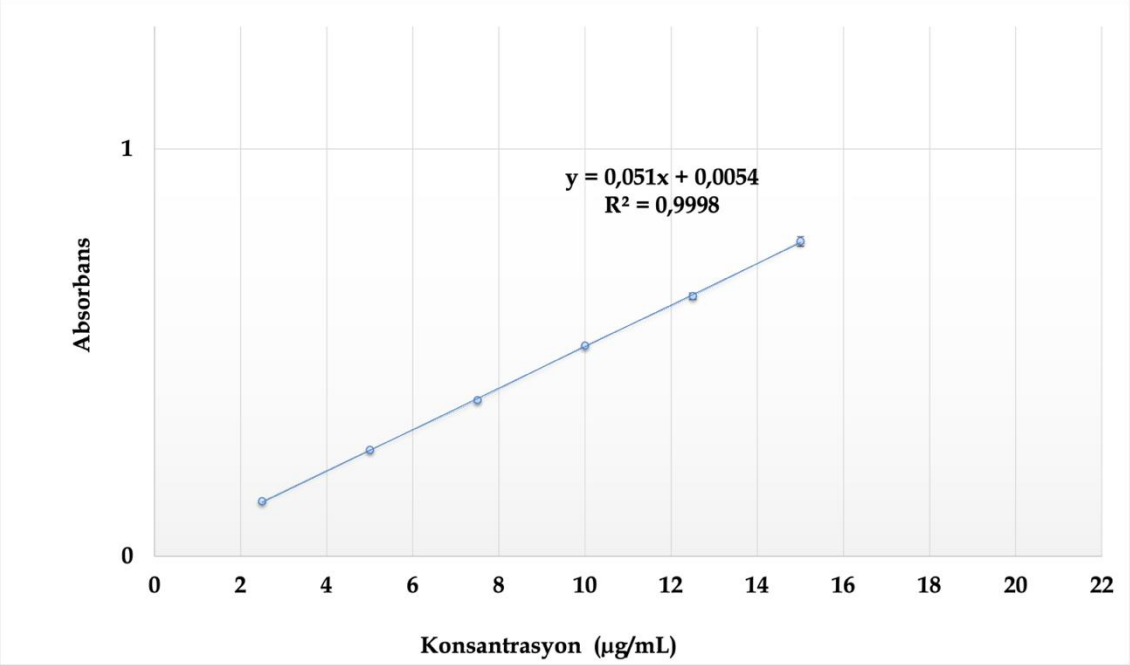
Tablo 5.1

Aseton: Su (1:1, h/h) Ortamında Doğrusallık Sonuçları

RA (µg/mL)	Absorbans Değerleri					
	Seri 1	Seri 2	Seri 3	Ortalama	Standart sapma	Standart hata
2.5	0.134	0.127	0.143	0.135	0.01	0.00
5.0	0.249	0.267	0.267	0.261	0.01	0.00
7.5	0.373	0.390	0.386	0.383	0.01	0.00
10.0	0.512	0.521	0.518	0.517	0.00	0.00
12.5	0.617	0.644	0.655	0.639	0.02	0.01
15.0	0.743	0.775	0.801	0.773	0.03	0.01

Şekil 5.2

Rosmarinik asitin Aseton: Su (1:1 h/h) Ortamında Standart Eğrisi



5.1.1.3 Kesinlik

Rosmarinik asit için 5.0 µg.mL^{-1} , 10.0 µg.mL^{-1} ve 15.0 µg.mL^{-1} konsantrasyonda üç adet farklı çözelti hazırlanmıştır. Tüm konsantrasyonlar için üç tekrar analizi, üç gün artarda yapılmıştır. Sonuçlar doğrusallık çalışmasında elde edilen regresyon denklemi yardımıyla hesaplanmış ve tam konsantrasyonlar ile karşılaştırılarak yöntemin kesinliği analiz edilmiştir. Kesinlik çalışması sonuçları 5.0 µg.mL^{-1} , 10.0 µg.mL^{-1} ve 15.0 µg.mL^{-1} konsantrasyonlar için sırasıyla Tablo 5.2, Tablo 5.3 ve Tablo 5.4'te gösterilmiştir.

Tablo 5.2

5.0 µg.mL^{-1}Derişim için Aseton: Su (1:1, h/h) Ortamında Kesinlik Sonuçları

5.0 µg.mL^{-1}			
	Gün 1 (Absorbans)	**Gün 2 (Absorbans)**	**Gün 3 (Absorbans)**
	0.259	0.261	0.261
	0.258	0.263	0.262
	0.261	0.258	0.259
	Gün 1 (Derişim)	**Gün 2 (Derişim)**	**Gün 3 (Derişim)**
	4.978	5.017	5.017
	4.958	5.056	5.037
	5.017	4.958	4.978
Ortalama	4.984	5.010	5.010
Standart sapma (SS)	0.030	0.049	0.030
Varyasyon Katsayısı (%RSD)	0.601	0.986	0.598

Tablo 5.3

10.0 µg.mL^{-1}Derişim için Aseton: Su (1:1, h/h) Ortamında Kesinlik Sonuçları

10.0 µg.mL^{-1}			
	Gün 1 (Absorbans)	**Gün 2 (Absorbans)**	**Gün 3 (Absorbans)**
	0.522	0.521	0.516
	0.523	0.518	0.519
	0.513	0.516	0.518
	Gün 1 (Derişim)	**Gün 2 (Derişim)**	**Gün 3 (Derişim)**
	10.139	10.119	10.021
	10.159	10.060	10.080
	9.962	10.021	10.060
Ortalama	10.087	10.067	10.054
Standart sapma (SS)	0.108	0.049	0.030
Varyasyon Katsayısı (%RSD)	1.072	0.491	0.298

Tablo 5.4

15.0 µg.mL^{-1}Derişim için Aseton: Su (1:1, h/h) Ortamında Kesinlik Sonuçları

15.0 µg.mL^{-1}			
	Gün 1 (Absorbans)	**Gün 2 (Absorbans)**	**Gün 3 (Absorbans)**
	0.768	0.771	0.773
	0.769	0.763	0.780
	0.774	0.768	0.770
	Gün 1 (Derişim)	**Gün 2 (Derişim)**	**Gün 3 (Derişim)**
	14.967	15.026	15.065
	14.986	14.869	15.202
	15.084	14.967	15.006
Ortalama	15.012	14.954	15.091
Standart sapma	0.063	0.079	0.101
Varyasyon Katsayısı	0.420	0.530	0.667

5.1.1.4 Doğruluk

Analitik yöntemin doğruluğunun kanıtlanması amacıyla üç farklı konsantrasyonda (5.0 $\mu g.mL^{-1}$, 10.0 $\mu g.mL^{-1}$, 15.0 $\mu g.mL^{-1}$) rosmarinik asit içeren çözeltiler hazırlanmış ve her bir konsantrasyon için 3 adet analizi yapılmıştır. Elde edilen veriler doğrusallık çalışmasında elde edilen regresyon denklemi kullanılarak hesaplanmış ve stok çözelti konsantrasyonları ile karşılaştırılmış, ardından yöntemin doğruluğu '% geri kazanım' olarak bulunmuştur. Rosmarinik asit için doğruluk çalışması veri sonuçları Tablo 5.5'te sunulmuştur.

Tablo 5.5

Yöntemin Aseton: Su (1:1, h/h) Ortamında Doğruluk Sonuçları

	Derişim		
	5.0 $\mu g.mL^{-1}$	**10.0 $\mu g.mL^{-1}$**	**15.0 $\mu g.mL^{-1}$**
Elde edilen absorbanslar	0.259	0.514	0.764
	0.260	0.511	0.771
	0.262	0.519	0.770
Bulunan Derişimler	4.978	9.982	14.888
	4.997	9.923	15.026
	5.037	10.080	15.006
% Geri Kazanım	99.554	99.820	99.254
	99.946	99.231	100.170
	100.731	100.801	100.039
Ortalama Geri Kazanım (%)	100.077	99.951	99.821
Standart sapma (SS)	0.600	0.793	0.495
Varyasyon Katsayısı (%RSD)	0.599	0.794	0.496
Standart hata (SH)	0.346	0.458	0.286

5.1.1.5 Duyarlılık

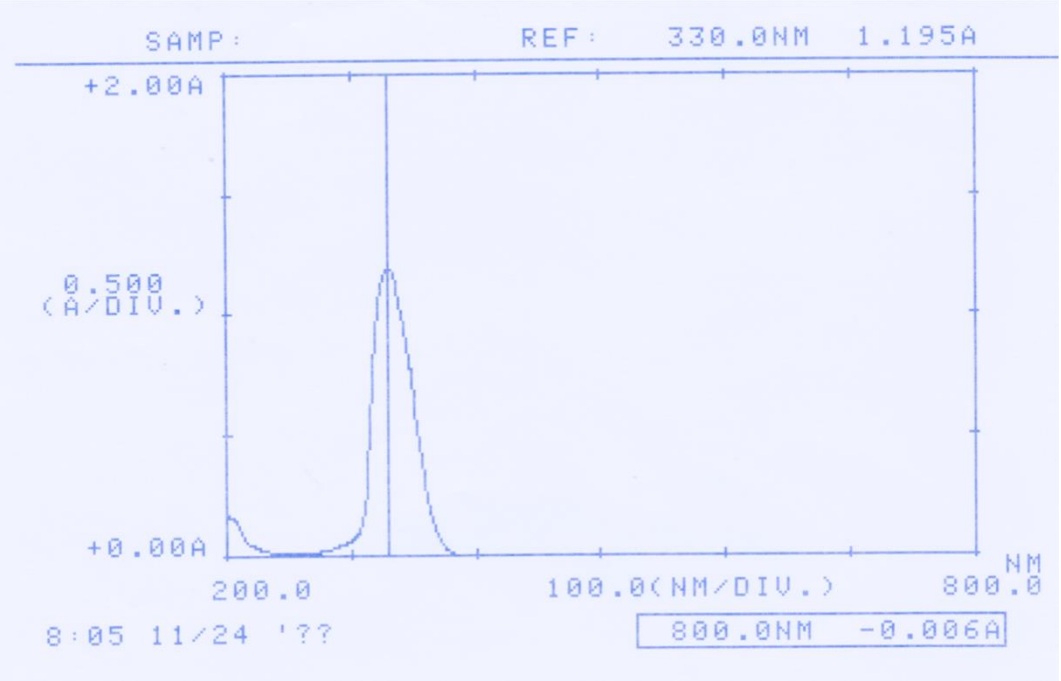
LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.220 $\mu g.mL^{-1}$ ve 0.668 $\mu g.mL^{-1}$ olarak elde edilmiştir.

5.1.1.6 Seçicilik

Seçicilik çalışması için UV-Spektrofotometre'den elde edilen spektrumlar rosmarinik asit, B-Blank-NP kodlu formülasyon ve aseton: su (1:1, *h/h*) karışımı için sırasıyla Şekil 5.3, Şekil 5.4 ve Şekil 5.5'te gösterilmiştir.

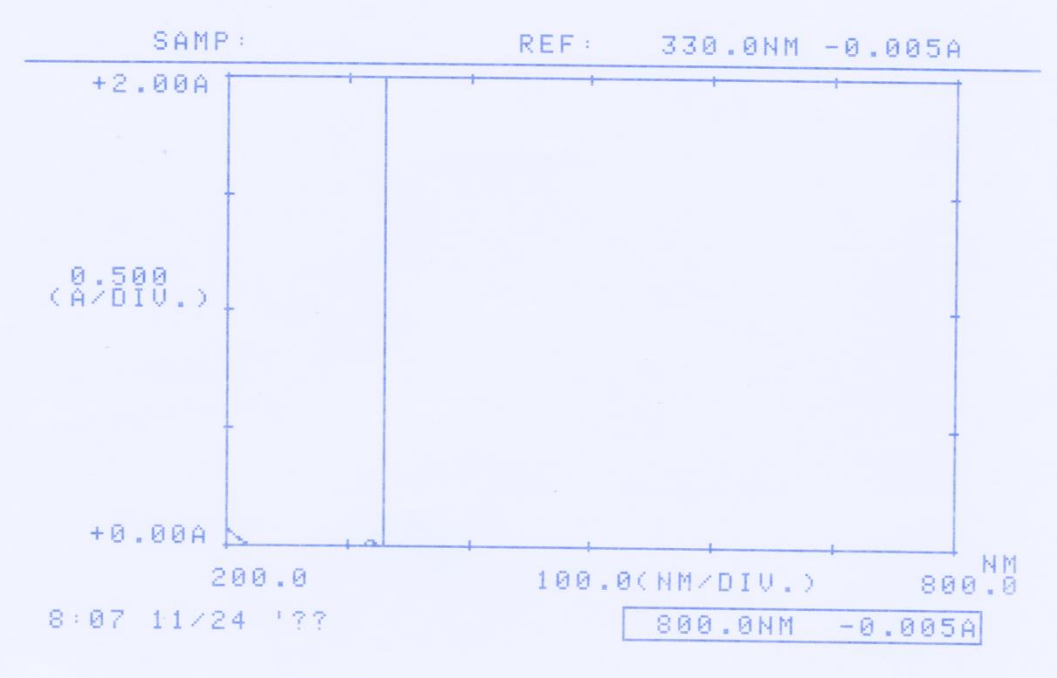
Şekil 5.3

Rosmarinik asit'e ait Aseton: Su (1:1, h/h) Ortamında Spektrum



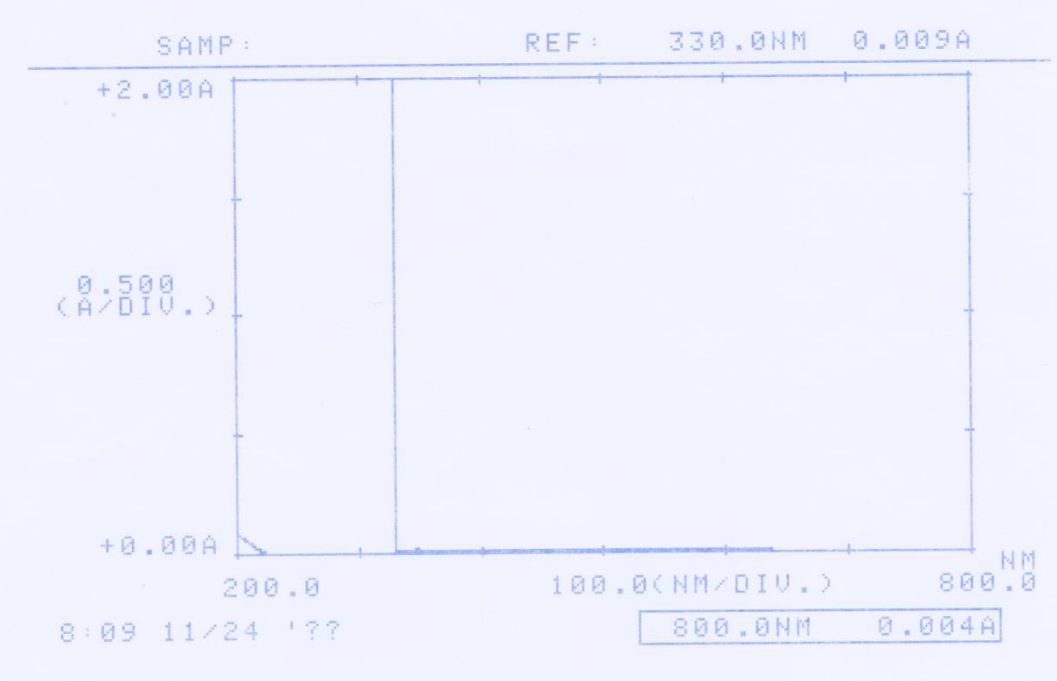
Şekil 5.4

Blank (B-Blank-NP) Formülasyona ait Aseton: Su (1:1, h/h) Ortamında Spektrum



Şekil 5.5

Aseton: Su (1:1, h/h) karışımına ait spektrum



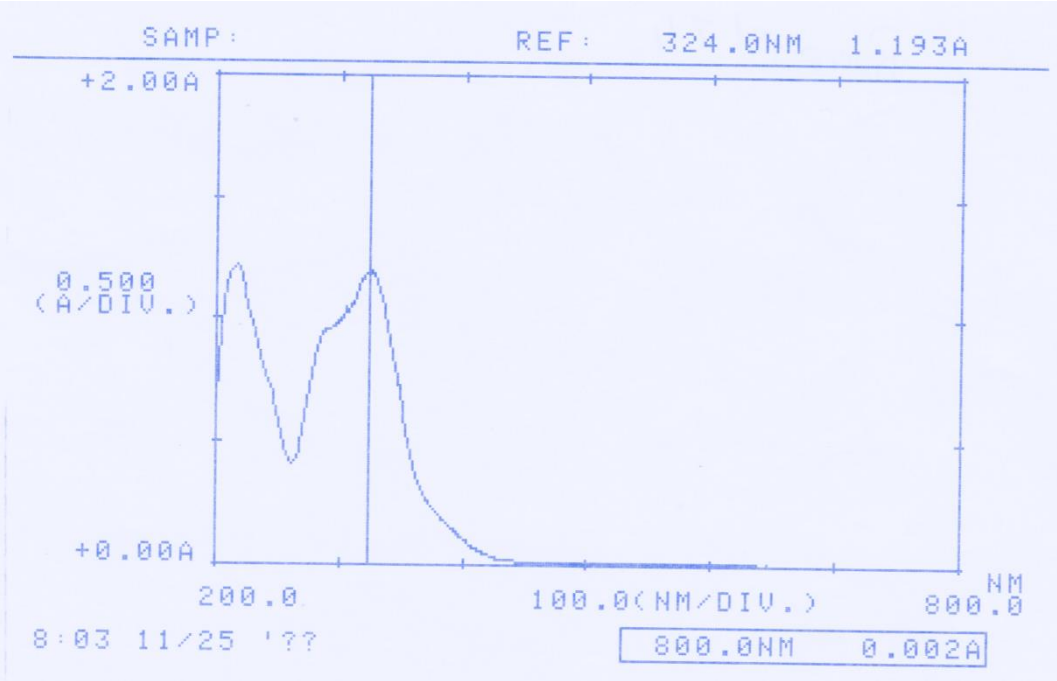
5.1.2 Rosmarinik asit için PBS pH 7.4 ortamında validasyon çalışması

5.1.2.1 Absorbans belirleme

PBS pH 7.4 ortamı içinde 25.0 µg.mL^{-1} konsantrasyonda hazırlanmış olan rosmarinik asit çözeltisinin 324.0 nm'de maksimum absorbans (λ_{max}) göstermiş olduğu Şekil 5.6'da sunulmuştur.

Şekil 5.6

Rosmarinik asit'e ait PBS pH 7.4 Ortamında 200-800 nm Arasında Elde Edilen Spektrum (λ_{max} = 324.0 nm)



5.1.2.2 Doğrusallık

Rosmarinik asitin PBS pH 7.4 ortamında 2.5 - 15.0 µg.mL^{-1} konsantrasyonları aralığında altı farklı konsantrasyonda farklı stok çözeltilerden üç kalibrasyon serisi hazırlanmış ve ardından UV-spektrofotometre ile 324 nm'de analiz ölçümü yapılmıştır. Konsantrasyona denk gelen absorbans değerleri her kalibrasyon seti için Tablo 5.6'da sunulmuştur. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrisi, eğriye ait olan doğru denklemi ve korelasyon katsayısı değeri (r^2) Şekil 5.7'de sunulmuştur.

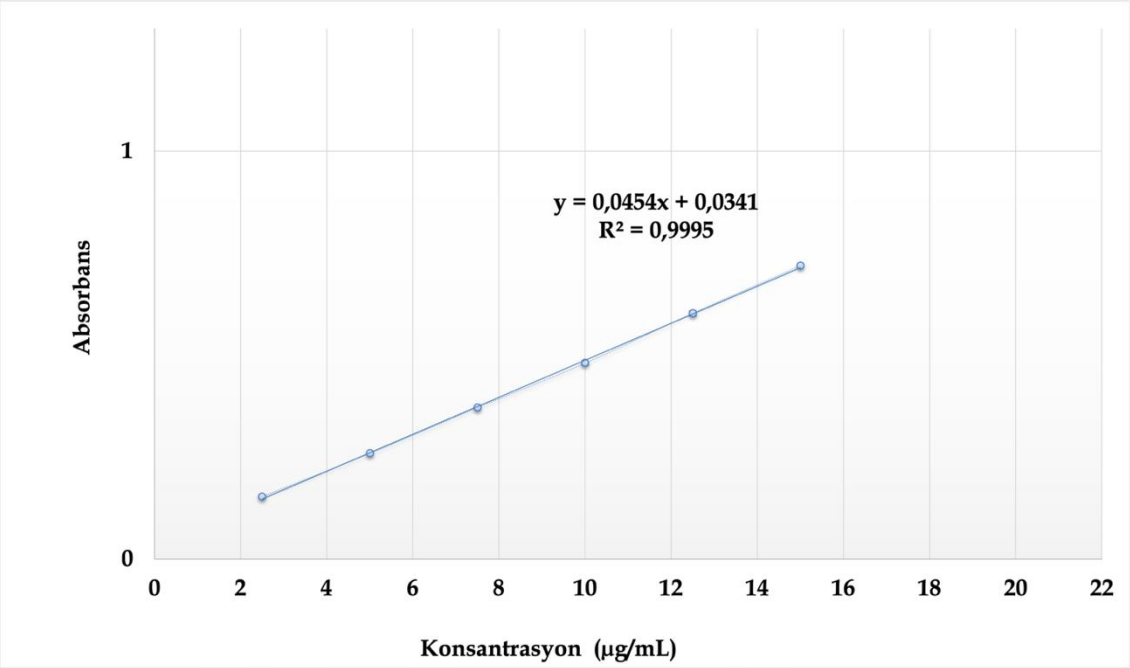
Tablo 5.6

PBS pH 7.4 Ortamında Doğrusallık Çalışması Sonuçları

RA (µg/mL)	Absorbans Değerleri					
	Seri 1	Seri 2	Seri 3	Ortalama	Standart sapma	Standart hata
2.5	0.148	0.162	0.149	0.153	0.01	0.00
5.0	0.261	0.259	0.258	0.259	0.00	0.00
7.5	0.364	0.379	0.371	0.371	0.01	0.00
10.0	0.468	0.493	0.481	0.481	0.01	0.01
12.5	0.585	0.612	0.611	0.603	0.02	0.01
15.0	0.712	0.725	0.720	0.719	0.01	0.00

Şekil 5.7

Rosmarinik asit'in PBS pH 7.4 Ortamında Standart Eğrisi



5.1.2.3 Kesinlik

Rosmarinik asit için 5.0 µg.mL^{-1} , 10 µg.mL^{-1} ve 15 µg.mL^{-1} konsantrasyonda üç farklı çözelti hazırlanmıştır. Tüm konsantrasyonlar için üç sefer tekrar analizi, üç gün artarda yapılmıştır. Analiz sonuçları doğrusallık çalışmasında elde edilen regresyon denklemi yardımıyla hesaplanmış ve tam konsantrasyonlar ile karşılaştırılarak yöntemin kesinliği incelenmiştir. Kesinlik çalışması sonuçları 5 µg.mL^{-1}, 10 µg.mL^{-1} ve 15 µg.mL^{-1} konsantrasyonlar için sırasıyla Tablo 5.7, Tablo 5.8 ve Tablo 5.9'da gösterilmiştir.

Tablo 5.7

5.0 µg.mL^{-1}Derişim için PBS pH 7.4 Ortamında Kesinlik Sonuçları

5.0 µg.mL^{-1}			
	Gün 1 (Absorbans)	**Gün 2 (Absorbans)**	**Gün 3 (Absorbans)**
	0.259	0.261	0.259
	0.260	0.263	0.261
	0.265	0.260	0.263
	Gün 1 (Derişim)	**Gün 2 (Derişim)**	**Gün 3 (Derişim)**
	4.958	5.003	4.958
	4.980	5.047	5.003
	5.091	4.980	5.047
Ortalama	5.010	5.010	5.003
Standart sapma (SS)	0.071	0.034	0.044
Varyasyon Katsayısı (%RSD)	1.414	0.672	0.881

Tablo 5.8

10.0 µg.mL^{-1}Derişim için PBS pH 7.4 Ortamında Kesinlik Sonuçları

10.0 µg.mL^{-1}			
	Gün 1 (Absorbans)	**Gün 2 (Absorbans)**	**Gün 3 (Absorbans)**
	0.492	0.488	0.490
	0.490	0.486	0.492
	0.491	0.487	0.488
	Gün 1 (Derişim)	**Gün 2 (Derişim)**	**Gün 3 (Derişim)**
	10.095	10.007	10.051
	10.051	9.962	10.095
	10.073	9.984	10.007
Ortalama	10.073	9.984	10.051
Standart sapma (SS)	0.022	0.022	0.044
Varyasyon Katsayısı (%RSD)	0.219	0.221	0.429

Tablo 5.9

15.0 µg.mL^{-1}Derişim için PBS pH 7.4 Ortamında Kesinlik Sonuçları

15.0 µg.mL^{-1}			
	Gün 1 (Absorbans)	**Gün 2 (Absorbans)**	**Gün 3 (Absorbans)**
	0.718	0.717	0.715
	0.716	0.713	0.716
	0.711	0.714	0.711
	Gün 1 (Derişim)	**Gün 2 (Derişim)**	**Gün 3 (Derişim)**
	15.077	15.055	15.010
	15.033	14.966	15.033
	14.922	14.988	14.922
Ortalama	15.010	15.003	14.988
Standart sapma (SS)	0.079	0.046	0.058
Varyasyon Katsayısı (%RSD)	0.530	0.306	0.389

5.1.2.4 Doğruluk

Analitik yöntemin doğruluğun kanıtlanması amacıyla üç farklı konsantrasyonda (5.0 µg.mL^{-1} , 10.0 µg.mL^{-1} , 15.0 µg.mL^{-1}) rosmarinik asit içeren çözeltiler hazırlanmış ve her bir derişim için üç farklı analizi yapılmıştır. Elde edilen değerler doğrusallık çalışmasında elde edilen regresyon denklemi kullanılarak hesaplanmış ve stok çözelti konsantrasyonları ile karşılaştırılmış, ardından yöntemin doğruluğu '% geri kazanım' olarak hesaplanmıştır. Rosmarinik asit için doğruluk çalışması sonuç verileri Tablo 5.10'da sunulmuştur.

Tablo 5.10

Yöntemin PBS pH 7.4 Ortamında Doğruluk Sonuçları

	Derişim		
	5.0 µg.mL^{-1}	**10.0 µg.mL^{-1}**	**15.0 µg.mL^{-1}**
Elde edilen absorbanslar	0.261	0.491	0.714
	0.262	0.487	0.716
	0.260	0.486	0.715
Bulunan Derişimler	5.003	10.073	14.988
	5.025	9.984	15.033
	4.980	9.962	15.010
% Geri Kazanım	100.050	100.726	99.923
	100.491	99.845	100.217
	99.610	99.624	100.070
Ortalama % Geri Kazanım	100.050	100.065	100.070
Standart sapma	0.441	0.583	0.147
Varyasyon Katsayısı	0.441	0.583	0.147

5.1.2.5 Duyarlılık

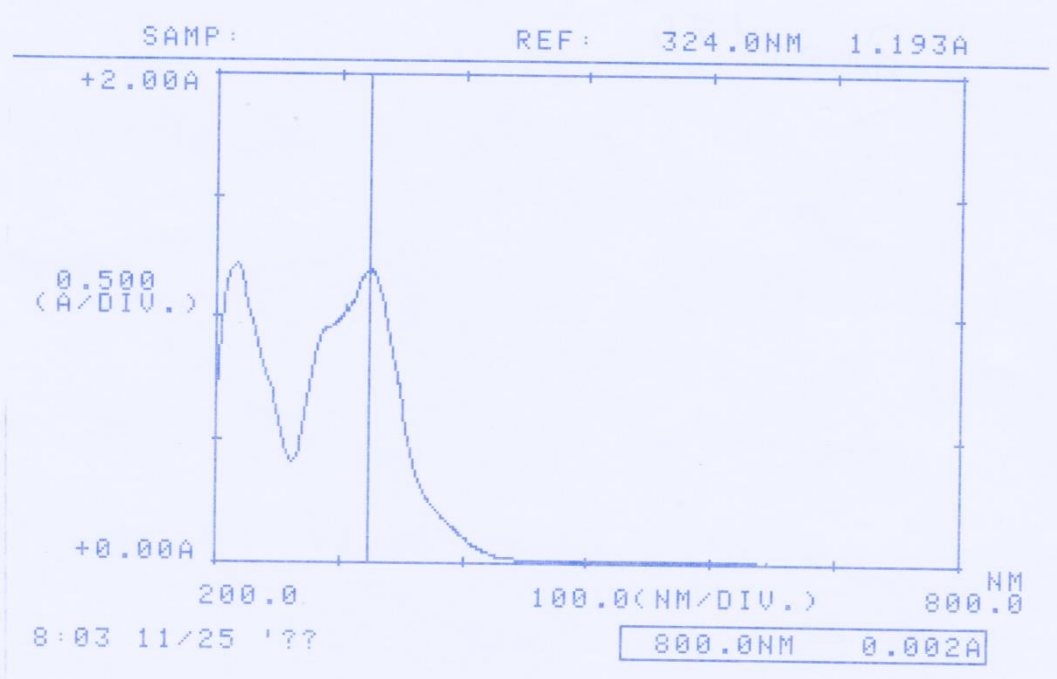
LOD ve LOQ değerleri sırayla 0.361 µg.mL^{-1} ve 1.094 µg.mL^{-1} olarak elde edilmiştir.

5.1.2.6 Seçicilik

Seçicilik çalışması için UV-Spektrofotometre'den elde edilen spektrumlar rosmarinik asit, B-Blank-NP kodlu formülasyon ve PBS pH 7.4 için sırasıyla Şekil 5.8, Şekil 5.9 ve Şekil 5.10'da gösterilmiştir.

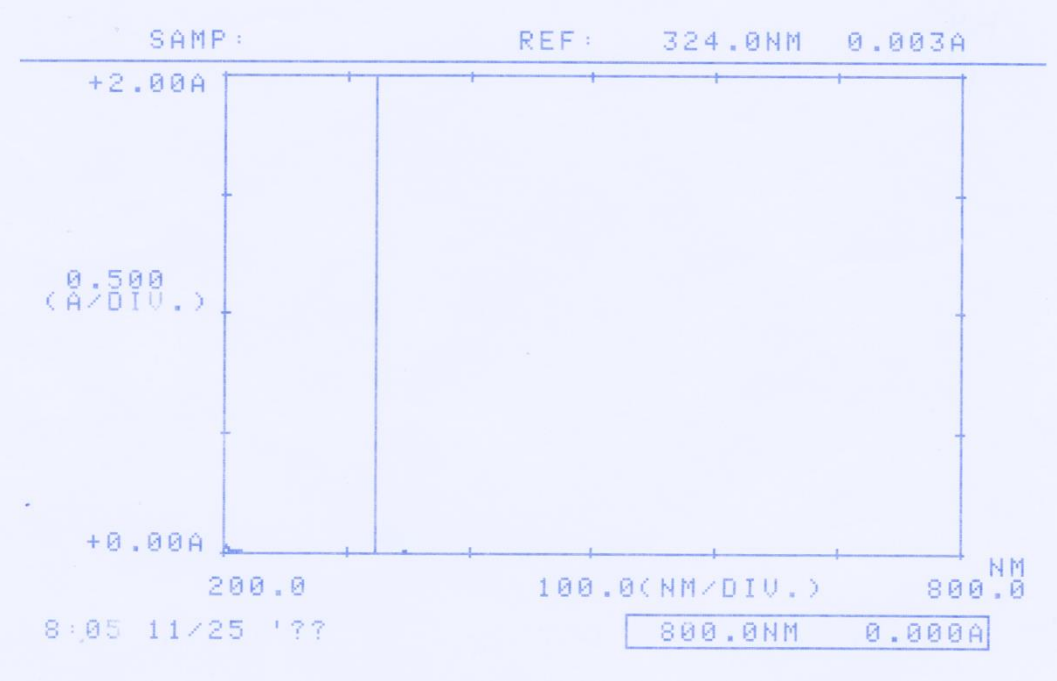
Şekil 5.8

Rosmarinik asit'e ait PBS pH 7.4 Ortamında Spektrum



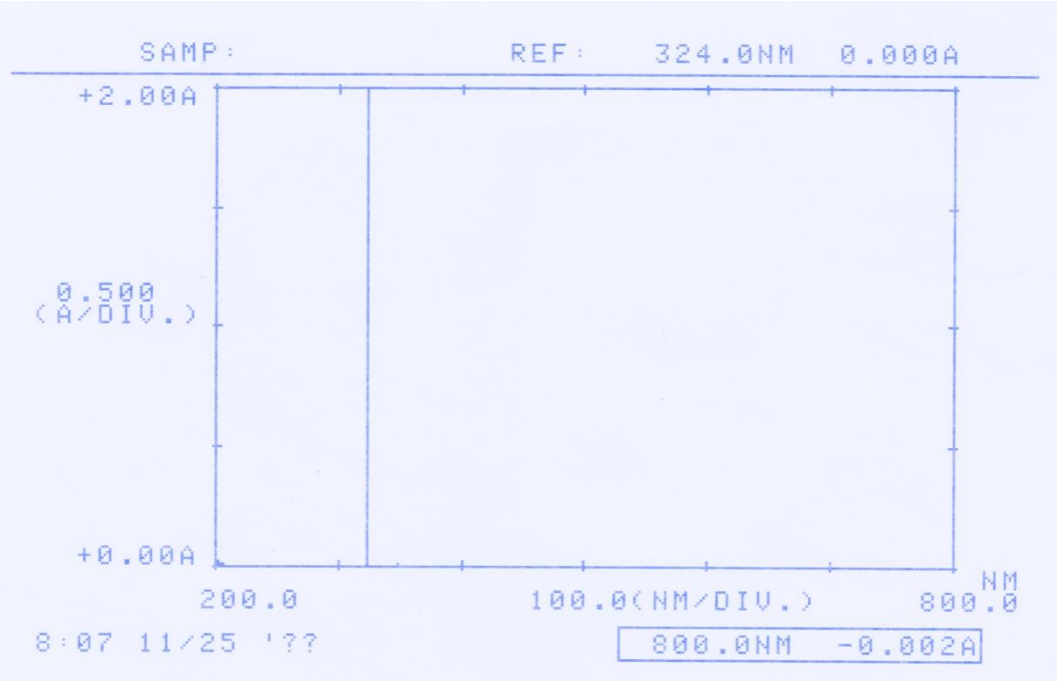
Şekil 5.9

Blank (B-Blank-NP) Formülasyona ait PBS pH 7.4 Ortamında Spektrum



Şekil 5.10

PBS pH 7.4 ait Spektrum



5.2 Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu

5.2.1 Parçacık boyutu, parçacık boyutu dağılımı (PDI) ve zeta potansiyel belirleme çalışması

5.2.1.1 Parçacık boyutu ve parçacık boyutu dağılımı (PDI) analiz sonuçları

Bu tez çalışmasında formüle edilen Blank ve rosmarinik asit yüklü nanopartikül formülasyonlarının parçacık boyutu ve parçacık boyutu dağılım (PDI) değerleri Tablo 5.11 ve Tablo 5.12 ‘de sırasıyla sunulmuştur. Daha net anlaşılabilmesi ve karşılaştırma yapılabilmesi amacıyla Şekil 5.11. ve Şekil 5.12’de sırasıyla elde edilen parçacık boyutu ve parçacık boyutu dağılımı (PDI) sonuçları grafik olarak gösterilmiştir. Zetasizer Nano ZS cihazından alınan parçacık boyut dağılım verileri ise B-Blank-NP ve B-RA-NP Şekil 5.13, Şekil 5.14’te sunulmuştur.

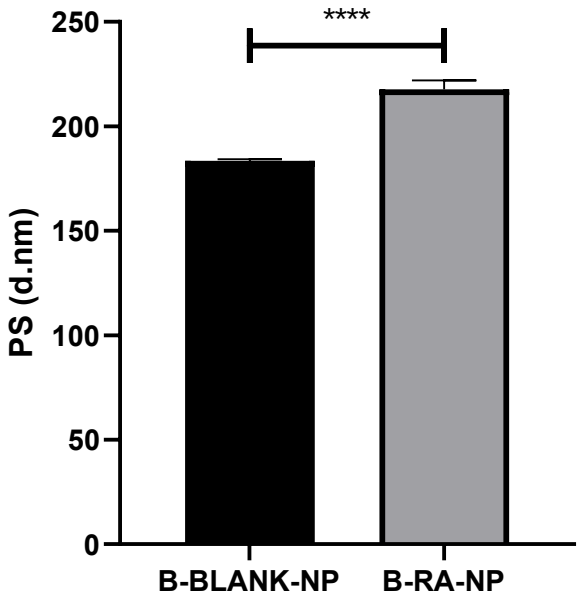
Tablo 5.11

Parçacık Boyutu Analiz Sonuçları

Kod	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama	SS	Sonuç
B-Blank-NP	182.7	184.0	184.6	183.8	1.0	**183.8 ± 1.0**
B-RA-NP	213.1	218.6	221.5	217.7	4.3	**217.7 ± 4.3**

Şekil 5.11

Parçacık Boyutu Analizlerinin İstatistiksel Karşılaştırması



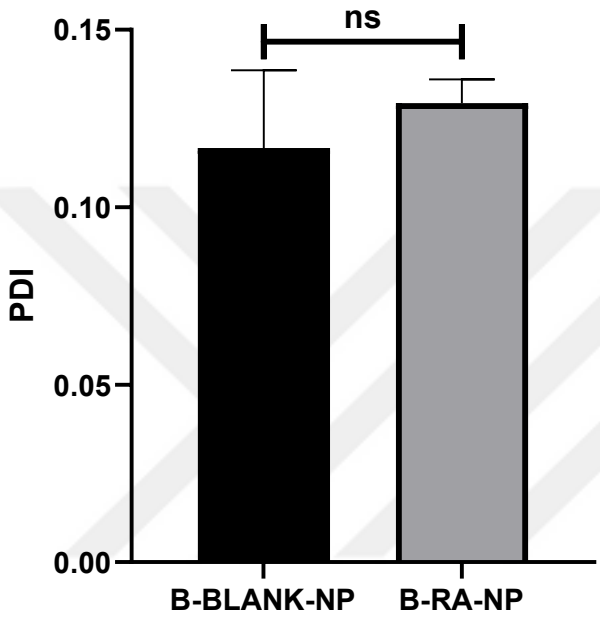
Tablo 5.12

Parçacık Boyutu Dağılımı (PDI) Analiz Sonuçları

Kod	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama	SS	Sonuç
B-Blank-NP	0.103	0.105	0.142	0.117	0.022	**0.117 ± 0.022**
B-RA-NP	0.125	0.126	0.137	0.129	0.007	**0.129 ± 0.007**

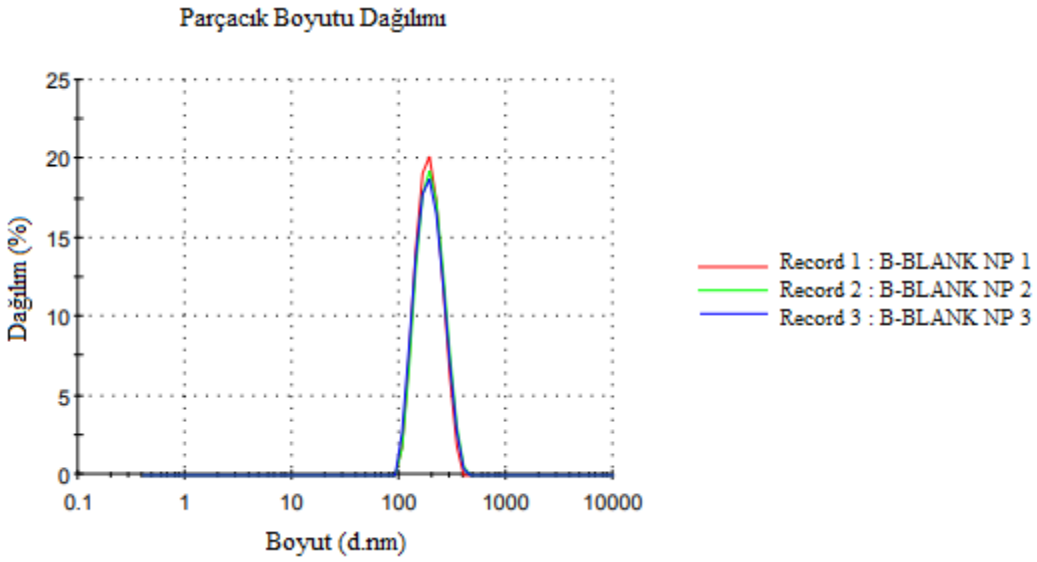
Şekil 5.12

Parçacık Boyutu Dağılımı (PDI) Analizlerinin İstatistiksel Karşılaştırması



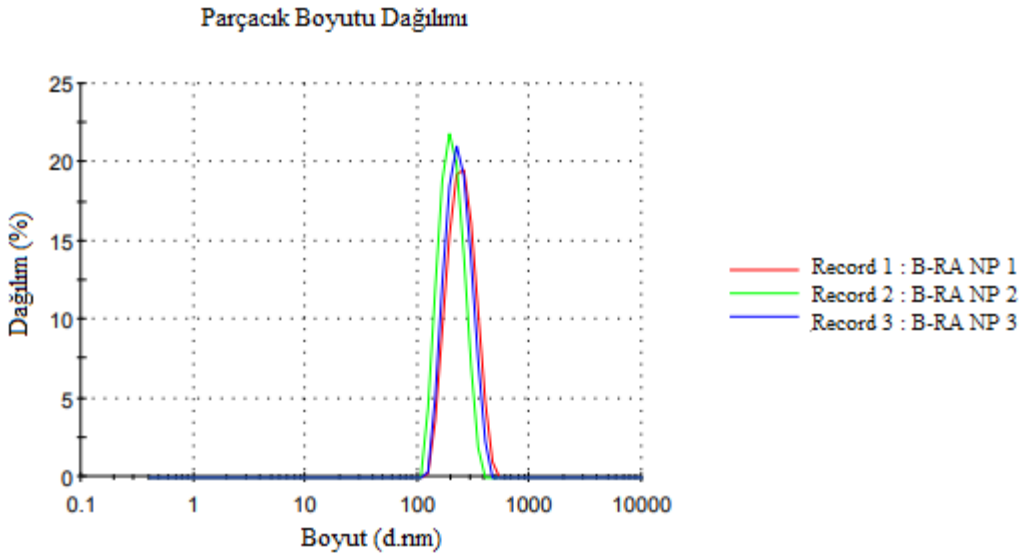
Şekil 5.13

B-Blank-NP Kodlu Formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den Alınan Parçacık Boyut Dağılım Raporu



Şekil 5.14

B-RA-NP Kodlu Formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den Alınan Parçacık Boyut Dağılım Raporu



5.2.1.2 Zeta potansiyel analiz sonuçları

Hazırlanan blank ve rosmarinik asit yüklü nanopartikül formülasyonlarının zeta potansiyel analiz sonuçları Tablo 5.13'te sunulmuştur. Elde edilen değerlerin daha net anlaşılabilmesi ve karşılaştırma yapılabilmesi için zeta potansiyel değerleri istatistiksel grafik olarak Şekil 5.15'te gösterilmiştir. Zetasizer Nano ZS cihazından alınan zeta potansiyel değerlerinin gösterildiği raporlar ise B-Blank-NP ve B-RA-NP kodlu formülasyonlar için Şekil 5.16. ve Şekil 5.17'de sunulmuştur.

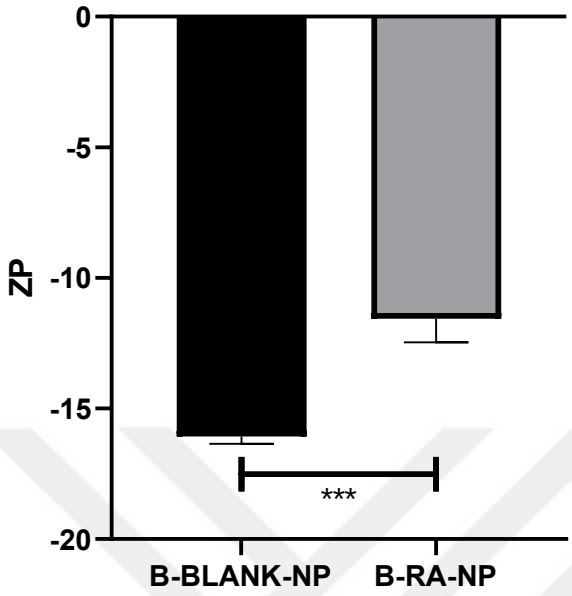
Tablo 5.13

ZetaPotansiyel Analiz Sonuçları

Kod	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama	SS	Sonuç
B-Blank-NP	-15.9	-15.9	-16.4	-16.1	0.3	**-16.1 ± 0.3**
B-RA-NP	-12.6	-11.1	-11.0	-11.6	0.9	**-11.6 ± 0.9**

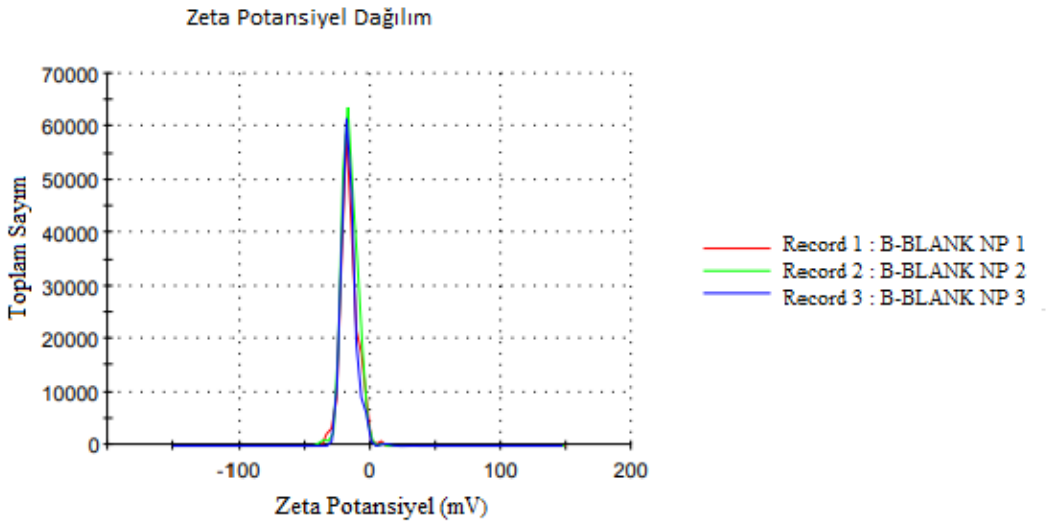
Şekil 5.15

ZetaPotansiyel Analizlerinin İstatistiksel Karşılaştırması



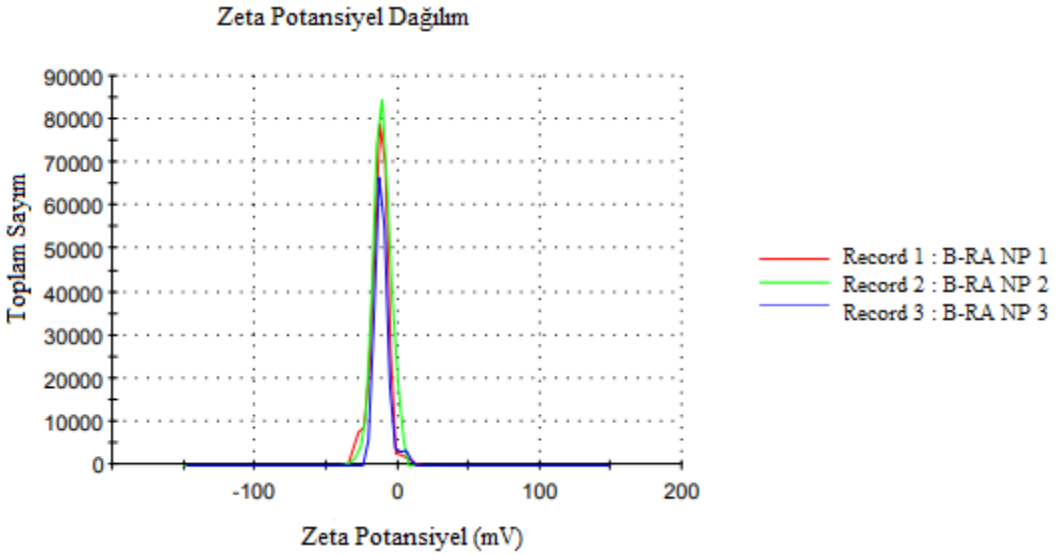
Şekil 5.16

B-Blank-NP Kodlu Formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den Alınan Zeta Potansiyel Dağılım Raporu



Şekil 5.17

B-RA-NP Kodlu Formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den Alınan Zeta Potansiyel Dağılım Raporu



5.2.2 Dondurma ve liyofilizasyon işlemlerinde kullanılan trehaloz miktarı ve saklama koşulu belirleme çalışması

5.2.2.1 Dondurma işleminin parçacık boyutuna etkisi

B-RA-NP kodlu nanopartikül formülasyonu için gerçekleştirilen kriyoprotektan (trehaloz) etkinin belirleme çalışmalarından elde edilen parçacık boyutuna (nm) etkisi sonuçları Tablo 5.14'te ve istatistiksel karşılaştırılması Tablo 5.15'te verilmiştir. Elde edilen sonuçların daha net anlaşılabilmesi için Şekil 5.18'de ve Şekil 5.19'da parçacık boyutuna etkisinin istatistiksel verileri sırasıyla grafik olarak gösterilmiştir.

Tablo 5.14

Dondurma İşleminin Parçacık Boyutuna Etkisi ve Trehaloz Miktarına Göre Değişim Sonuçları

	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama	SS	Sonuç
Taze formülasyon	213.1	218.6	221.5	217.7	4.3	**217.7 ± 4.3**
0 µL Trehaloz Çözeltisi	294.2	305.4	314.1	304.6	10.0	**304.6 ± 10.0**
100 µL Trehaloz Çözeltisi	298.0	309.1	318.8	308.6	10.4	**308.6 ± 10.4**
300 µL Trehaloz Çözeltisi	289.1	298.2	299.1	295.5	5.5	**295.5 ± 5.5**
450 µL Trehaloz Çözeltisi	282.1	289.7	291.1	287.6	4.8	**287.6 ± 4.8**
600 µL Trehaloz Çözeltisi	275.2	290.6	290.5	285.4	8.9	**285.4±8.9**
750 µL Trehaloz Çözeltisi	222.1	245.9	250.6	239.6	15.2	**239.6 ± 15.2**
900 µL Trehaloz Çözeltisi	214.3	218.9	220.7	218.0	3.3	**218.0 ± 3.3**

Tablo 5.15

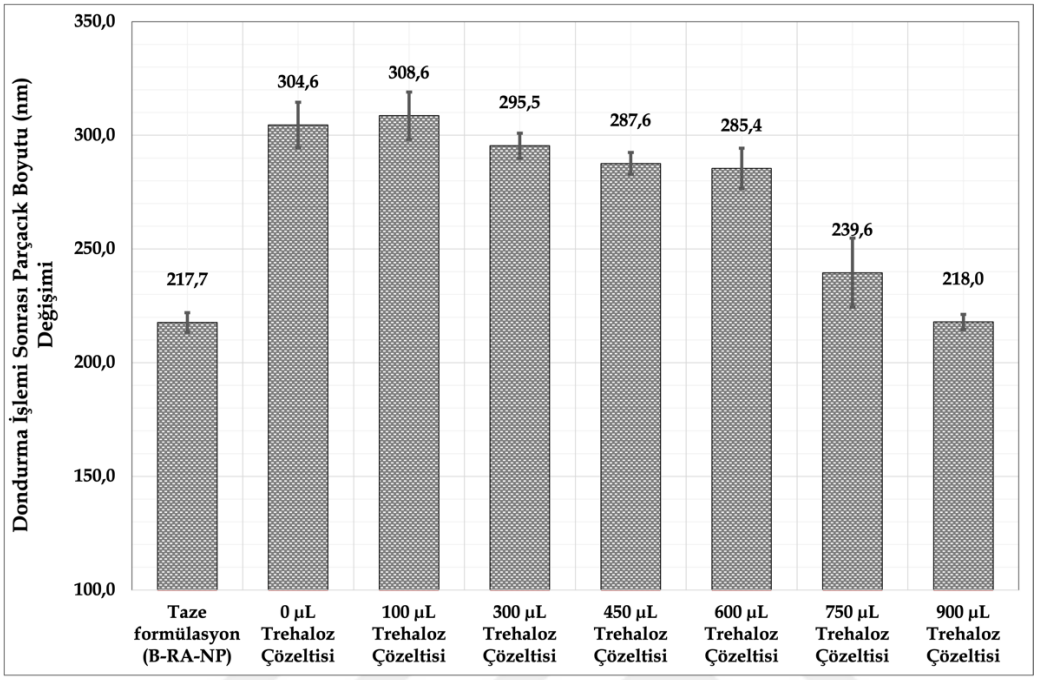
B-RA-NP Kodlu Formülasyon için Dondurma İşleminin Parçacık Boyutuna Etkisinin ve Trehaloz Miktarının Tüm Koşullarda İstatistiksel Karşılaştırması

Tukey's çoklu karşılaştırma testi	Fark	Özet	Ayarlanmış p değeri
Taze formülasyon vs. 0 µL TS	Evet	****	<0.0001
Taze formülasyon vs. 100 µL TS	Evet	****	<0.0001
Taze formülasyon vs. 300 µL TS	Evet	****	<0.0001
Taze formülasyon vs. 450 µL TS	Evet	****	<0.0001
Taze formülasyon vs. 600 µL TS	Evet	****	<0.0001
Taze formülasyon vs. 750 µL TS	Hayır	ns	0.1014
Taze formülasyon vs. 900 µL TS	Hayır	ns	>0.9999
0 µL TS vs. 100 µL TS	Hayır	ns	0.9988
0 µL TS vs. 300 µL TS	Hayır	ns	0.8922
0 µL TS vs. 450 µL TS	Hayır	ns	0.3090
0 µL TS vs. 600 µL TS	Hayır	ns	0.1921
0 µL TS vs. 750 µL TS	Evet	****	<0.0001
0 µL TS vs. 900 µL TS	Evet	****	<0.0001
100 µL TS vs. 300 µL TS	Hayır	ns	0.5946
100 µL TS vs. 450 µL TS	Hayır	ns	0.1235
100 µL TS vs. 600 µL TS	Hayır	ns	0.0710
100 µL TS vs. 750 µL TS	Evet	****	<0.0001
100 µL TS vs. 900 µL TS	Evet	****	<0.0001
300 µL TS vs. 450 µL TS	Hayır	ns	0.9465
300 µL TS vs. 600 µL TS	Hayır	ns	0.8377
300 µL TS vs. 750 µL TS	Evet	****	<0.0001
300 µL TS vs. 900 µL TS	Evet	****	<0.0001
450 µL TS vs. 600 µL TS	Hayır	ns	>0.9999
450 µL TS vs. 750 µL TS	Evet	****	<0.0001
450 µL TS vs. 900 µL TS	Evet	****	<0.0001
600 µL TS vs. 750 µL TS	Evet	***	0.0002
600 µL TS vs. 900 µL TS	Evet	****	<0.0001
750 µL TS vs. 900 µL TS	Hayır	ns	0.1074

*Not.******, **TS:**Trehaloz çözeltisi, **ns:** fark gözlenmemiştir.

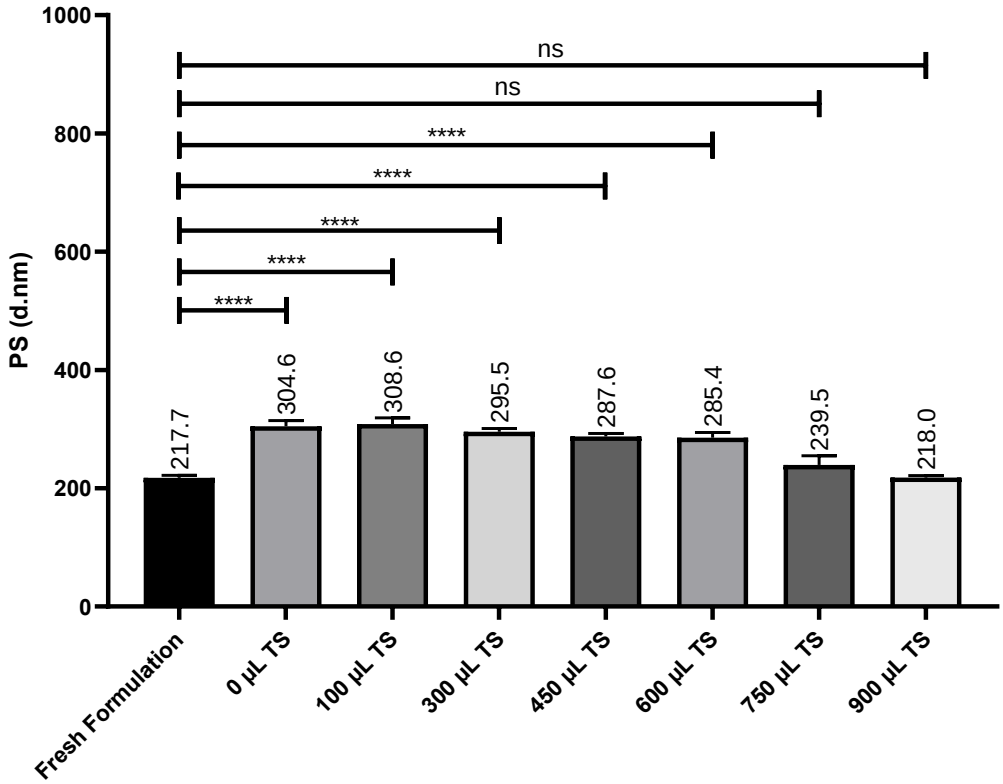
Şekil 5.18

B-RA-NP Kodlu Formülasyon için Dondurma İşleminin Parçacık Boyutuna Etkisi ve Trehaloz Miktarına Göre Değişim Grafiği



Şekil 5.19

B-RA-NP Kodlu Formülasyon için Dondurma İşleminin Parçacık Boyutuna Etkisinin ve Trehaloz Miktarının Taze Formülasyona Göre İstatistiksel Karşılaştırması



5.2.2.2 Liyofilizasyon işleminin parçacık boyutuna etkisi

B-RA-NP kodlu formülasyonu için gerçekleştirilen liyofilizasyon işlemi üzerindeki kriyoprotektan (trehaloz) etkinin belirleme çalışmalarından elde edilen parçacık boyutu (nm) sonuçları Tablo 5.16'da ve istatistiksel karşılatırılması Tablo 5.17'de sunulmuştur. Değerlerin daha net anlaşılabilmesi ve karşılaştırılabilmesi amacıyla Şekil 5.20 ve Şekil 5.21'de parçacık boyutu istatistiksel karşılaştırma verileri sırasıyla grafik olarak gösterilmiştir.

Tablo 5.16

Liyofilizasyon İşleminin Parçacık Boyutuna Etkisi ve Trehaloz Miktarına Göre Değişim Sonuçları

	Analiz 1	**Analiz 2**	**Analiz 3**	**Ortalama**	**SS**	**Sonuç**
Taze formülasyon	213.1	218.6	221.5	217.7	4.3	**217.7 ± 4.3**
0 µL Trehaloz Çözeltisi	309.8	312.3	318.6	313.6	4.2	**313.6± 4.5**
100 µL Trehaloz Çözeltisi	309.8	318.1	325.6	317.8	7.9	**317.8 ± 7.9**
300 µL Trehaloz Çözeltisi	305.3	320.0	322.4	315.9	9.3	**315.9 ± 9.3**
450 µL Trehaloz Çözeltisi	241.4	255.4	257.9	251.6	8.9	**251.6 ± 8.9**
600 µL Trehaloz Çözeltisi	246.4	244.5	245.7	245.5	1.0	**245.5 ± 1.0**
750 µL Trehaloz Çözeltisi	237.3	222.4	226.5	228.7	7.7	**228.7 ± 7.7**
900 µL Trehaloz Çözeltisi	219.4	219.4	216.2	218.3	1.8	**218.3 ± 1.8**

Tablo 5.17

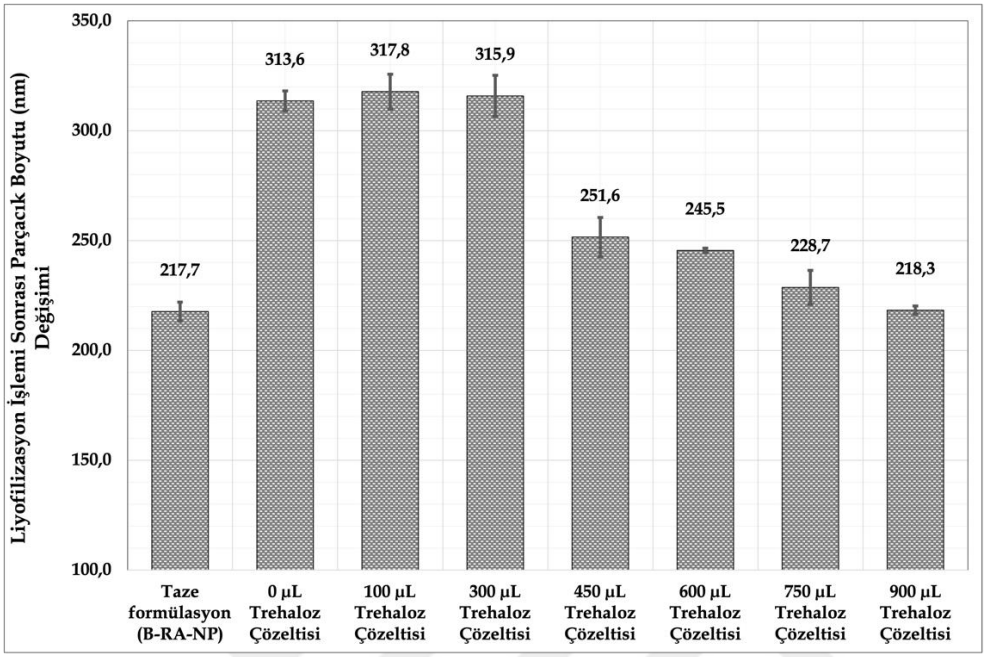
B-RA-NP Kodlu Formülasyon için Liyofilizasyon İşleminin Parçacık Boyutuna Etkisinin ve Trehaloz Miktarının Tüm Koşullarda İstatistiksel Karşılaştırması

Tukey's çoklu karşılaştırma testi	Fark	Özet	Ayarlanmış p değeri
Taze Formülasyonvs. 0 µL TS	Evet	****	<0.0001
Taze Formülasyon vs. 100 µL TS	Evet	****	<0.0001
Taze Formülasyonvs. 300 µL TS	Evet	****	<0.0001
Taze Formülasyon vs. 450 µL TS	Evet	***	0.0002
Taze Formülasyon vs. 600 µL TS	Evet	**	0.0014
Taze Formülasyon vs. 750 µL TS	Hayır	ns	0.4564
Taze Formülasyon vs. 900 µL TS	Hayır	ns	>0.9999
0 µL TS vs. 100 µL TS	Hayır	ns	0.9906
0 µL TS vs. 300 µL TS	Hayır	ns	0.9998
0 µL TS vs. 450 µL TS	Evet	****	<0.0001
0 µL TS vs. 600 µL TS	Evet	****	<0.0001
0 µL TS vs. 750 µL TS	Evet	****	<0.0001
0 µL TS vs. 900 µL TS	Evet	****	<0.0001
100 µL TS vs. 300 µL TS	Hayır	ns	>0.9999
100 µL TS vs. 450 µL TS	Evet	****	<0.0001
100 µL TS vs. 600 µL TS	Evet	****	<0.0001
100 µL TS vs. 750 µL TS	Evet	****	<0.0001
100 µL TS vs. 900 µL TS	Evet	****	<0.0001
300 µL TS vs. 450 µL TS	Evet	****	<0.0001
300 µL TS vs. 600 µL TS	Evet	****	<0.0001
300 µL TS vs. 750 µL TS	Evet	****	<0.0001
300 µL TS vs. 900 µL TS	Evet	****	<0.0001
450 µL TS vs. 600 µL TS	Hayır	ns	0.9351
450 µL TS vs. 750 µL TS	Evet	**	0.0090
450 µL TS vs. 900 µL TS	Evet	***	0.0002
600 µL TS vs. 750 µL TS	Hayır	ns	0.0810
600 µL TS vs. 900 µL TS	Evet	**	0.0018
750 µL TS vs. 900 µL TS	Hayır	ns	0.5215

*Not.**TS:**Trehaloz çözeltisi, **ns:** fark gözlenmemiştir.

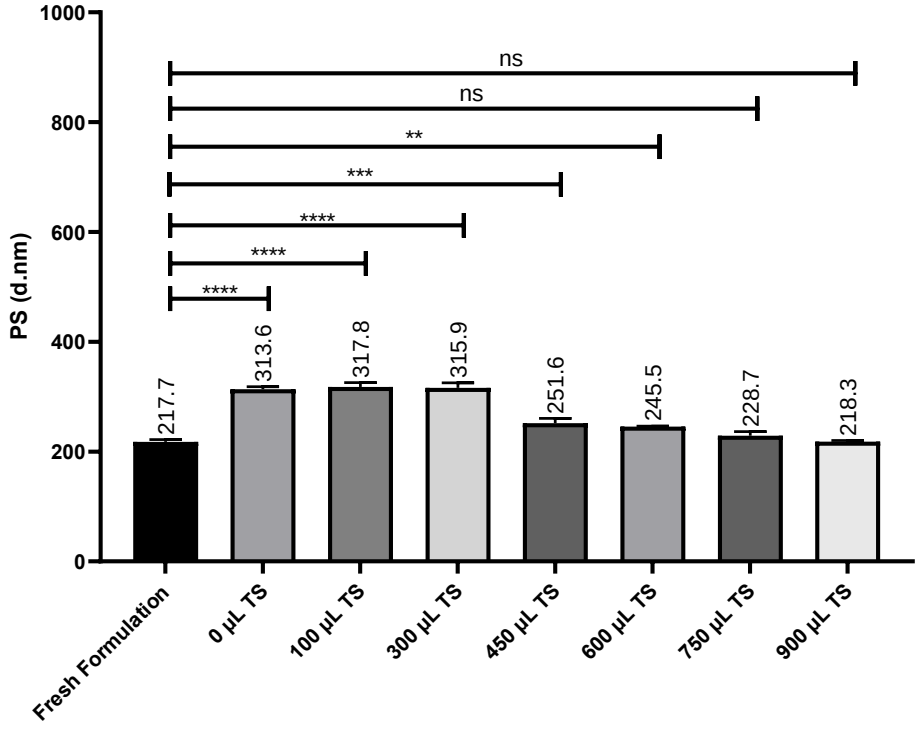
Şekil 5.20

B-RA-NP Kodlu Formülasyoniçin Liyofilizasyon İşleminin Parçacık Boyutuna Etkisi ve Trehaloz Miktarına Göre Değişim Grafiği



Şekil 5.21

B-RA-NP Kodlu Formülasyoniçin Liyofilizasyon İşleminin Parçacık Boyutuna Etkisinin ve Trehaloz Miktarının Taze Formülasyona Göre İstatistiksel Karşılaştırması



5.2.3 Enkapsülasyon etkinliği çalışması

Bölüm '4.3.3. Enkapsülasyon etkinliği' çalışmasında belirtilen Denklem 4.3 ile hesaplanan enkapsülasyon etkinliği sonucu %72.8 ± 3.0 (Ortalama ± standart sapma) olarak elde edilmiştir (n=3). B-RA-NP kodlu formülasyon için enkapsülasyon etkinliği sonuçları Tablo 5.18'de sunulmuştur.

Tablo 5.18

B-RA-NP Kodlu Formülasyoniçin Enkapsülasyon Etkinliği (%EE) Sonuçları

Kod	Analiz 1 (%EE)	Analiz 2 (%EE)	Analiz 3 (%EE)	Ortalama	SS	Sonuç (%EE)
B-RA-NP	%70.8	%71.4	%76.3	%72.8	3.0	**%72.8± 3.0**

5.2.4 *In vitro* dissolüsyon çalışması

Rosmarinik asit ve rosmarinik asit yüklü B-RA-NP kodlu nanopartikül formülasyonuna ait zamana karşı kümülatif çözünen rosmarinik asit miktarı değerleri 'ortalama ± standart sapma' olarak Tablo 5.19 ve Tablo 5.20'de sunulmuştur. Tablo 5.21'de Rosmarinik asit ve rosmarinik asit yüklü B-RA-NP arasındaki istatistiksel karşılaştırma sonuçları sunulmuştur. Analizler sonrası elde edilen tüm dissolüsyon verileri kullanılarak rosmarinik asit ve B-RA-NP kodlu nanopartikül formülasyonuna ait 72 saatlik *in vitro* dissolüsyon grafiği Şekil 5.22'de sunulmuştur. B-RA-NP kodlu formülasyonuna ait 24 saatlik dissolüsyon grafiği Şekil 5.23'te sunulmuştur.

Tablo 5.19

% Kümülatif Olarak Hesaplanmış Rosmarinik Asit için In Vitro Dissolüsyon Çalışması Sonuçları

Zaman	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama	SS	Sonuç
1. saat	%94.2	%94.6	%98.8	%95.9	2.5	%95.9± 2.5
2. saat	%97.9	%99.5	%99.7	%99.0	1.0	%99.0± 1.0

Tablo 5.20

% Kümülatif Olarak Hesaplanmış B-RA-NP Kodlu Formülasyon için In Vitro Dissolüsyon Çalışması Sonuçları

Zaman	Analiz 1	Analiz 2	Analiz 3	Ortalama	SS	Sonuç
1. saat	%26.2	%27.3	%30.6	%28.0	2.3	%28.0± 2.3
2. saat	%30.4	%31.9	%34.7	%32.3	2.2	%32.3± 2.2
3. saat	%34.7	%35.8	%37.4	%36.0	1.4	%36.0± 1.4
4. saat	%38.6	%39.7	%40.9	%39.7	1.2	%39.7± 1.2
5. saat	%43.0	%41.9	%44.4	%43.1	1.3	%43.1± 1.3
6. saat	%45.5	%47.2	%47.8	%46.8	1.2	%46.8± 1.2
9. saat	%49.9	%52.3	%54.2	%52.1	2.2	%52.1± 2.2
12. saat	%52.8	%55.5	%55.6	%54.6	1.6	%54.6± 1.6
24. saat	%56.4	%58.4	%63.8	%59.5	3.8	%59.5± 3.8
48. saat	%71.7	%73.5	%76.8	%74.0	2.6	%74.0± 2.6
72. saat	%77.8	%82.6	%85.4	%81.9	3.7	%81.9± 3.7

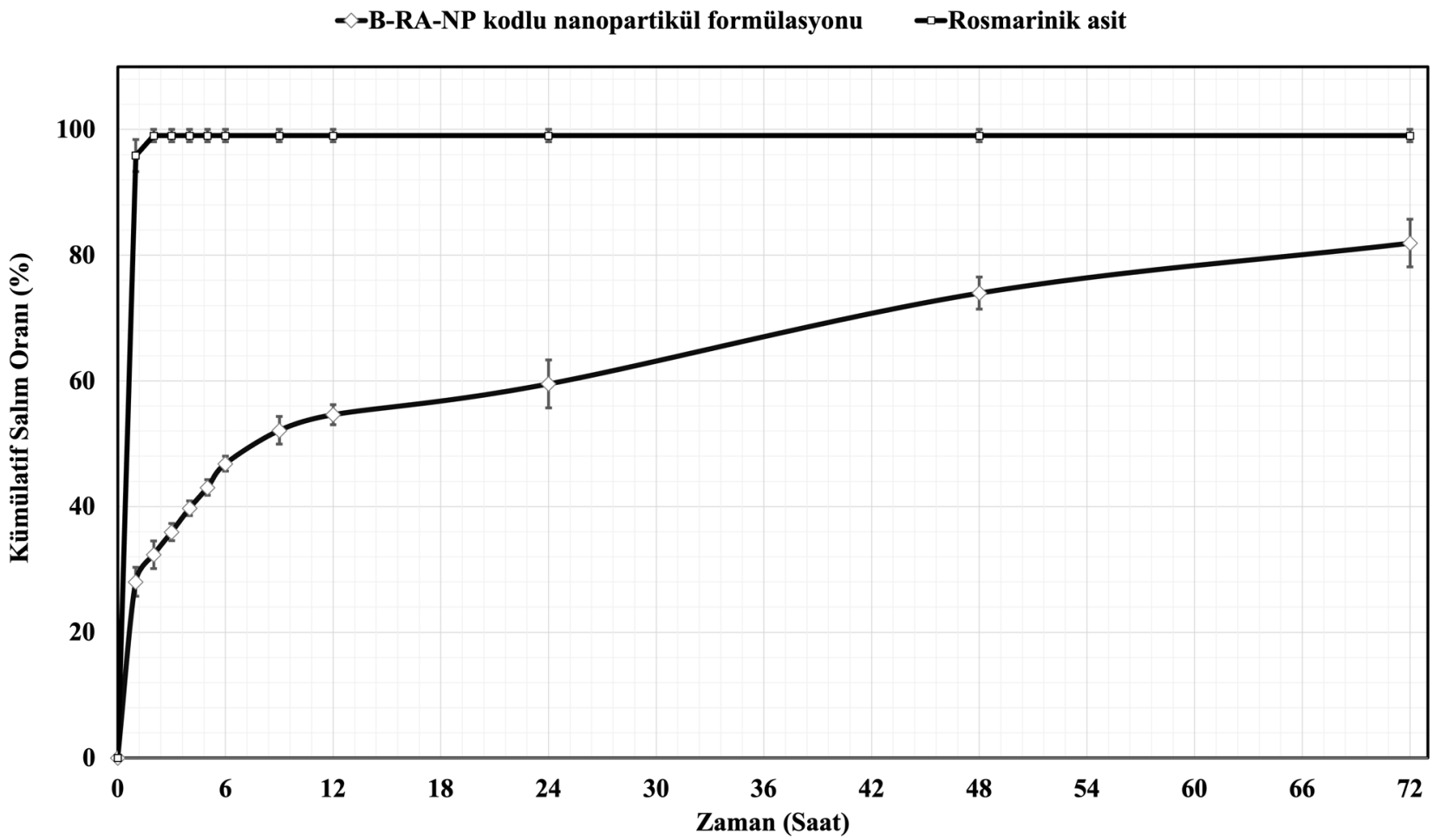
Tablo 5.21

% Kümülatif Olarak Hesaplanmış RosmarinikAsit ve B-RA-NP Kodlu Formülasyon için In Vitro Dissolüsyon Çalışması Sonuçlarının İstatistiksel Karşılaştırması

Sidak's çoklu karşılaştırma testi	Fark	Özet	Ayarlanmış p değeri
1. saat	Evet	****	<0.0001
2. saat	Evet	****	<0.0001
3. saat	Evet	****	<0.0001
4. saat	Evet	****	<0.0001
5. saat	Evet	****	<0.0001
6. saat	Evet	****	<0.0001
9. saat	Evet	****	<0.0001
12. saat	Evet	****	<0.0001
24. saat	Evet	****	<0.0001
48. saat	Evet	****	<0.0001
72. saat	Evet	****	<0.0001

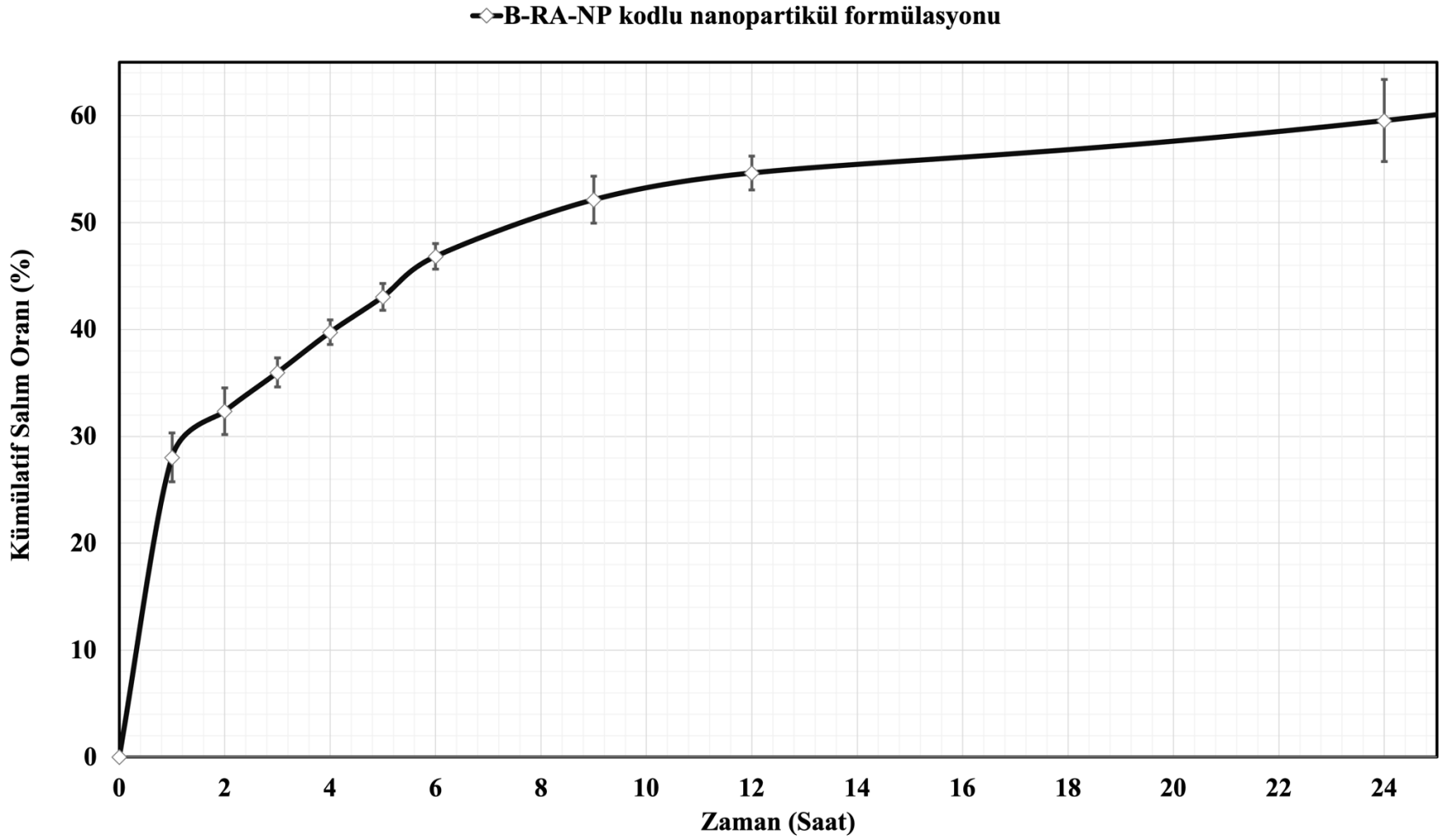
Şekil 5.22

Rosmarinik Asit ve B-RA-NP Kodlu Formülasyon için 72 Saatlik % Kümülatif Olarak Hesaplanmış In Vitro Dissolüsyon Grafiği



Şekil 5.23

B-RA-NP Kodlu Formülasyon için 24 Saatlik % Kümülatif Olarak Hesaplanmış In Vitro Dissolüsyon Grafiği



5.2.5 Salım kinetiği çalışması

Korsmeyer-Peppas, Korsmeyer-Peppas (T_{lag}), Korsmeyer-Peppas (F_0), Peppas-Sahlin 1, Peppas-Sahlin 2, Weibull 1, Weibull 2, Weibull 3 ve Weibull 4 modelleri için 6 saatlik r^2 , $r^2_{adjusted}$, MSC ve AIC değerleri, ilgili modellerin denklemleri ile Tablo 5.22'de sunulmuştur.

DDSolver programından otomatik olarak alınan Korsmeyer-Peppas, Korsmeyer-Peppas (T_{lag}), Korsmeyer-Peppas (F_0), Peppas-Sahlin 1, Peppas-Sahlin 2, Weibull 1, Weibull 2, Weibull 3 ve Weibull 4 modelleri için salım kinetik grafikleri sırasıyla Şekil 5.24 – Şekil 5.32'de sunulmuştur.

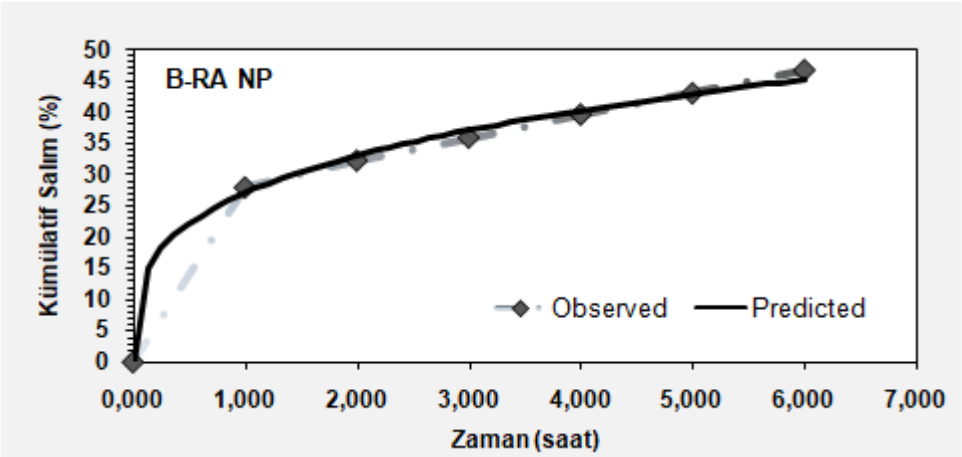
Tablo 5.22

B-RA-NP Kodlu Formülasyon için 0-6. Saat Salım Kinetiği Sonuçları

Model	r^2	$r^2_{adjusted}$	MSC	AIC
Korsmeyer-Peppas $F=k_{KP}*t^n$	0.996	0.995	3.748	15.973
Korsmeyer-Peppas (T_{lag}) $F=k_{KP}*(t-T_{lag})^n$	0.993	0.989	2.811	22.530
Korsmeyer-Peppas (F_0) $F=F_0+k_{KP}*t^n$	0.996	0.994	3.462	17.973
Peppas-Sahlin 1 $F=k_1*t^m+k^2*t^{(2*m)}$	0.992	0.988	2.733	23.079
Peppas-Sahlin 2 $F=k_1*t^{0.5}+k_2*t$	0.989	0.987	2.694	23.349
Weibull 1 $F=100*\{1-Exp[-((t-Ti)^\beta)/\alpha]\}$	0.991	0.987	2.637	23.753
Weibull 2 $F=100*\{1-Exp[-(t^\beta)/\alpha]\}$	0.995	0.994	3.494	17.754
Weibull 3 $F=F_{max}*\{1-Exp[-(t^\beta)/\alpha]\}$	0.985	0.978	2.116	27.399
Weibull 4 $F=F_{max}*\{1-Exp[-((t-Ti)^\beta)/\alpha]\}$	0.980	0.960	1.522	31.557

Şekil 5.24

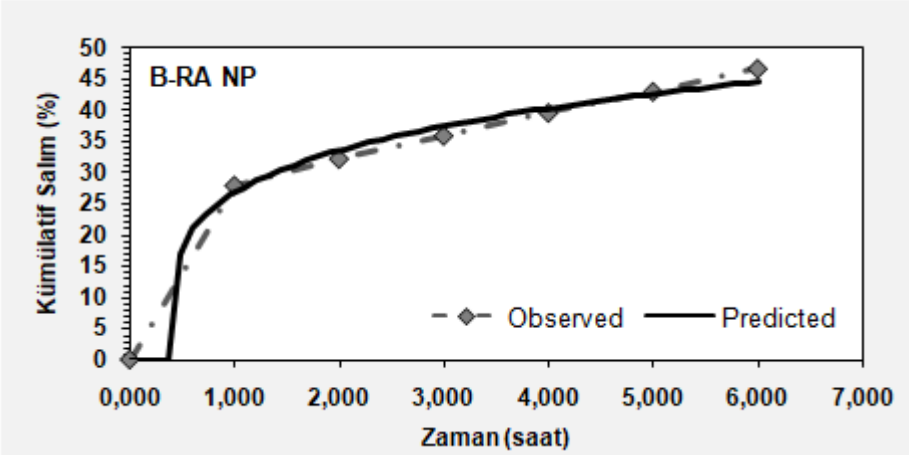
B-RA-NP Kodlu Formülasyon için Korsmeyer-Peppas Modeli(0-6. Saat)



*Not.***Observed:** Elde edilen salım profili,**Predicted:** Beklenen salım profili**.**

Şekil 5.25

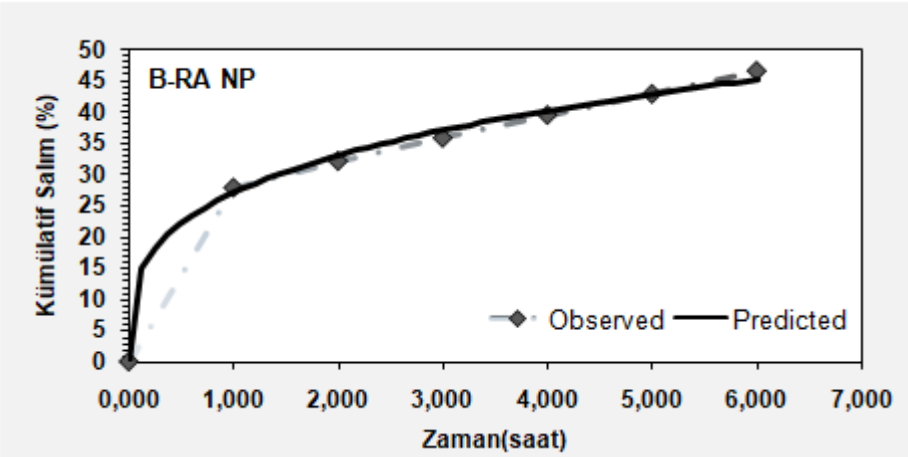
B-RA-NP Kodlu Formülasyon için Korsmeyer-Peppas (T_{lag}) Modeli (0-6. Saat)



*Not.****Observed:*** *Elde edilen salım profili,****Predicted:*** *Beklenen salım profili.*

Şekil 5.26

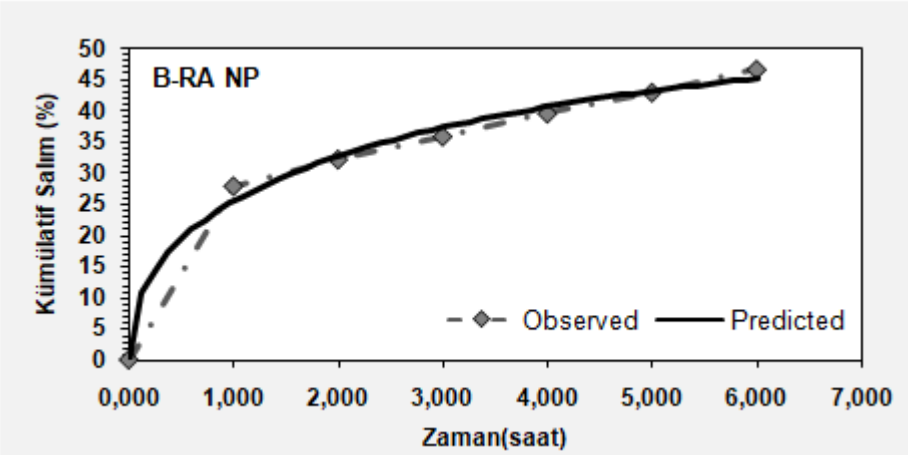
B-RA-NP Kodlu Formülasyon için Korsmeyer-Peppas (F_0)Modeli(0-6. Saat)



*Not.**Observed:** Elde edilen salım profili,**Predicted:** Beklenen salım profili.*

Şekil 5.27

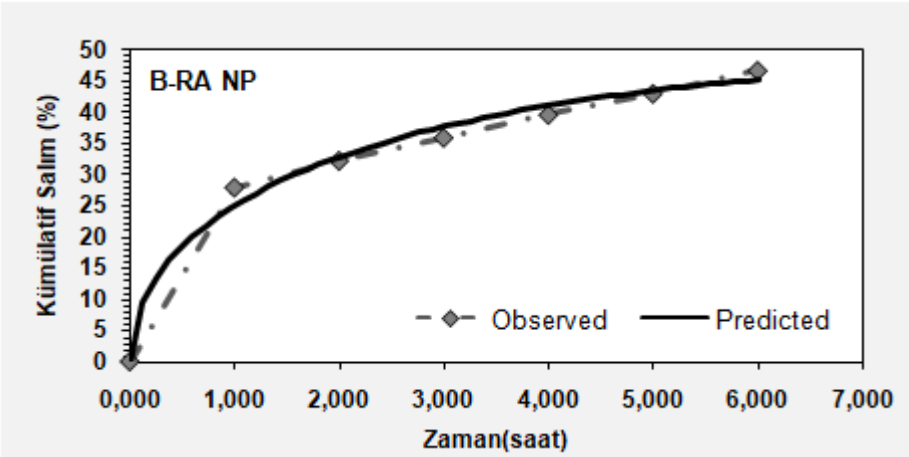
B-RA-NP Kodlu Formülasyon için Peppas-Sahlin1 Modeli (0-6. Saat)



*Not.**Observed:** Elde edilen salım profili,**Predicted:** Beklenen salım profili.*

Şekil 5.28

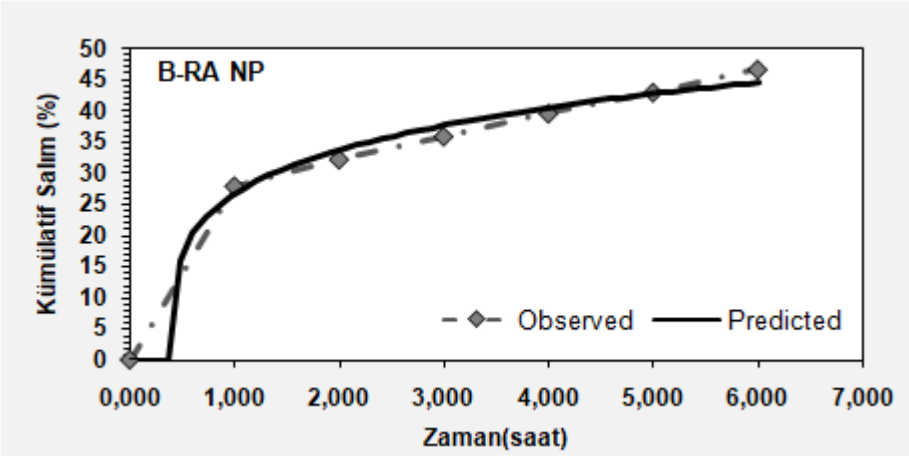
B-RA-NP Kodlu Formülasyon için Peppas-Sahlin 2 Modeli (0-6. Saat)



*Not.**Observed:** Elde edilen salım profili,**Predicted:** Beklenen salım profili.*

Şekil 5.29

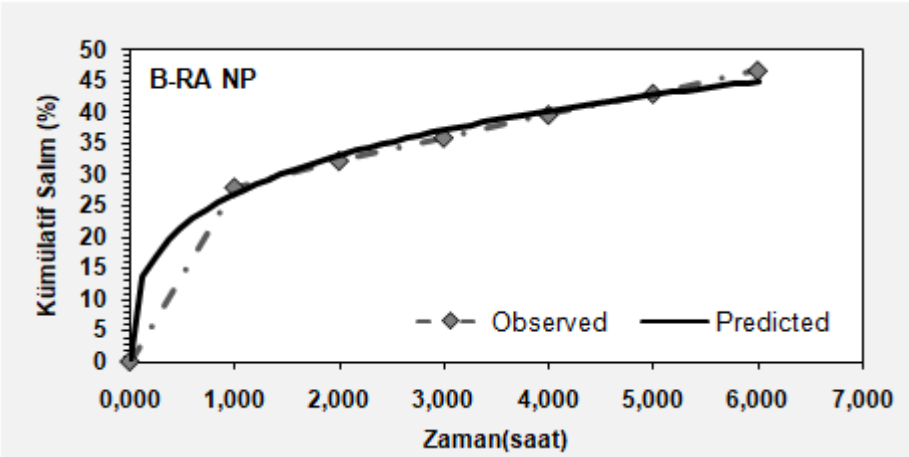
B-RA-NP Kodlu Formülasyon için Weibull1 Modeli (0-6. Saat)



*Not.**Observed:** Elde edilen salım profili,**Predicted:** Beklenen salım profili.*

Şekil 5.30

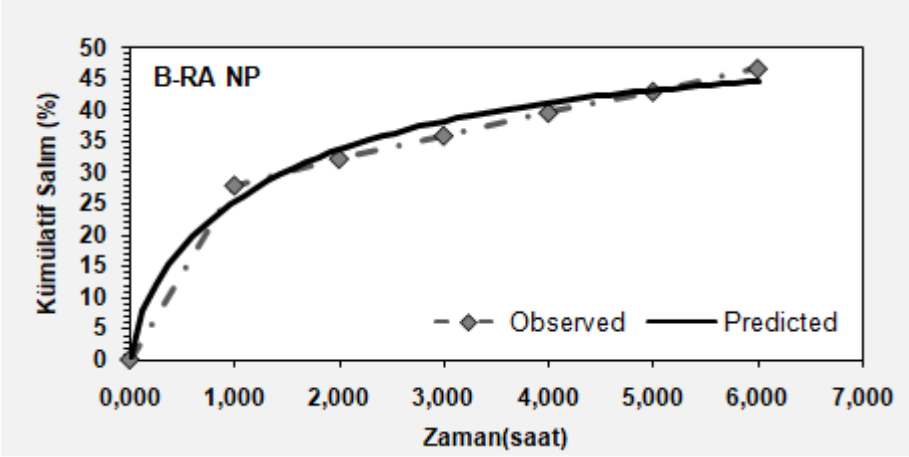
B-RA-NP Kodlu Formülasyon için Weibull 2 Modeli (0-6. Saat)



*Not.***Observed:** Elde edilen salım profili,**Predicted:** Beklenen salım profili**.**

Şekil 5.31

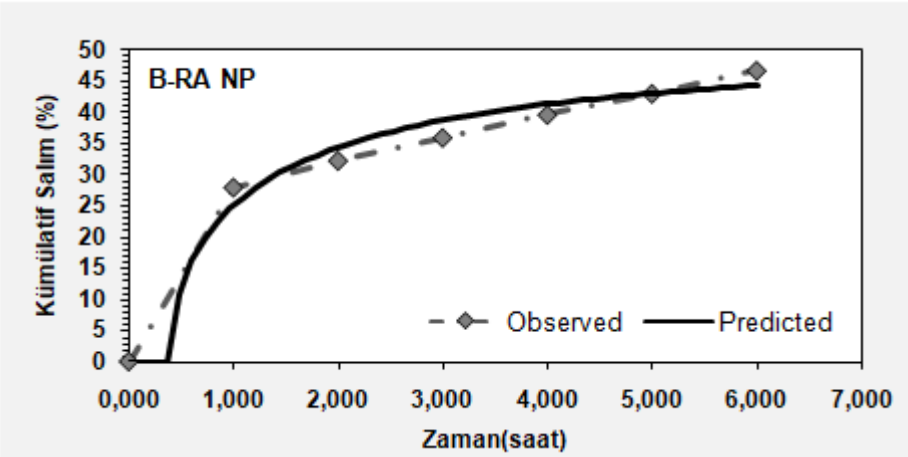
B-RA-NP Kodlu Formülasyon için Weibull 3 Modeli (0-6. Saat)



*Not.***Observed:** Elde edilen salım profili,**Predicted:** Beklenen salım profili**.**

Şekil 5.32

B-RA-NP Kodlu Formülasyon için Weibull 4 Modeli (0-6. Saat)



*Not.**Observed:** Elde edilen salım profili,**Predicted:** Beklenen salım profili.*

Birinci-derece (T_{lag}), Higuchi (T_{lag}), Higuchi (F_0), Korsmeyer-Peppas, Korsmeyer-Peppas (F_0), Hixson-Crowell (T_{lag}), Hopfenberg (Tlag), Baker-Lonsdale (T_{lag})modelleri için 6-72 saat arası r^2 , $r^2_{adjusted}$, MSC ve AIC değerleri, ilgili modellerin denklemleri ile beraber Tablo 5.23'te sunulmuştur.

DDSolver programından otomatik olarak alınan Birinci-derece (T_{lag}), Higuchi (T_{lag}), Higuchi (F_0), Korsmeyer-Peppas, Korsmeyer-Peppas (F_0), Hixson-Crowell (T_{lag}), Hopfenberg (T_{lag}), Baker-Lonsdale (T_{lag}) modelleri için salım kinetik grafikleri sırasıyla Şekil 5.33 – Şekil 5.40'da sunulmuştur.

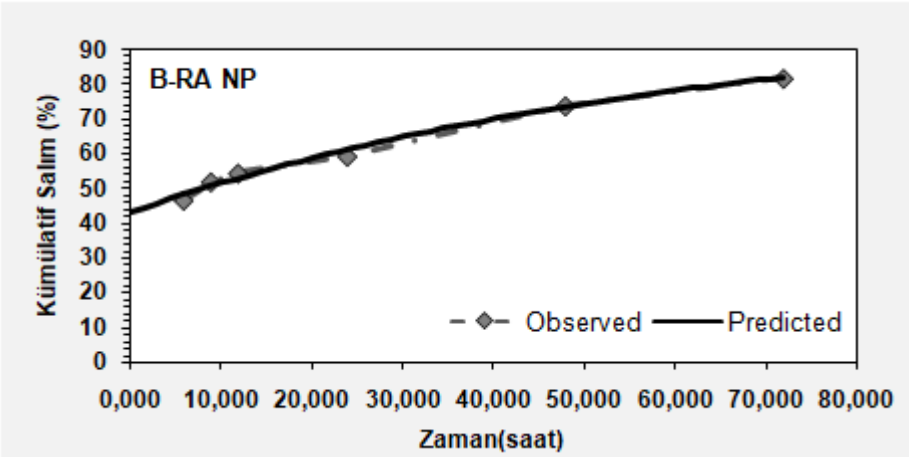
Tablo 5.23

B-RA-NP Kodlu Formülasyon için 6-72. Saat Salım Kinetiği Sonuçları

Model	r^2	$r^2_{adjusted}$	MSC	AIC
Birinci-derece (T_{lag}) $F=100*\{1-Exp[-k_1*(t-T_{lag})]\}$	0.989	0.987	3.888	17.671
Higuchi (T_{lag}) $F=k_H*(t-T_{lag})^{0.5}$	0.986	0.983	3.626	16.243
Higuchi (F_0) $F=F_0+k_H*t^{0.5}$	0.990	0.988	3.978	17.134
Korsmeyer-Peppas $F=k_{KP}*t^n$	0.981	0.976	3.288	21.272
Korsmeyer-Peppas (F_0) $F=F_0+k_{KP}*t^n$	0.986	0.976	3.243	21.544
Hixson-Crowell (T_{lag}) $F=100*\{1-[1-k_{HC}*(t-T_{lag})]^3\}$	0.988	0.985	3.784	18.297
Hopfenberg (T_{lag}) $F=100*\{1-[1-k_{HB}*(t-T_{lag})]^n\}$	0.988	0.981	3.451	20.297
Baker-Lonsdale (T_{lag}) $3/2*[1-(1-F/100)^{(2/3)}]-F/100=k_{BL}*(t-T_{lag})$	0.990	0.987	3.890	17.659

Şekil 5.33

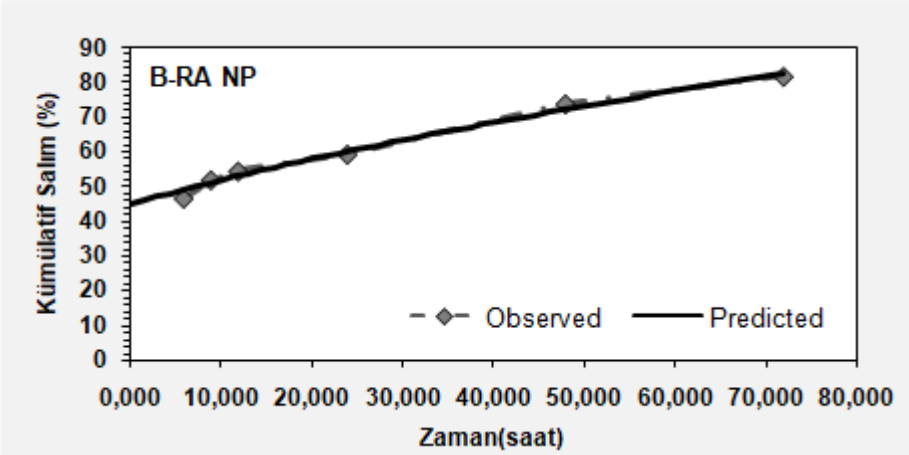
B-RA-NP Kodlu Formülasyon için Birinci-Derece (T_{lag}) Modeli (6.-72. Saat)



*Not.***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.

Şekil 5.34

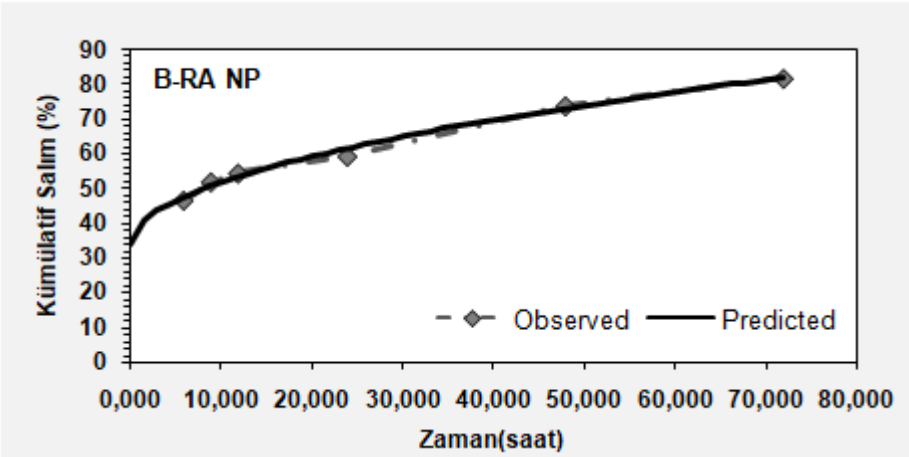
B-RA-NP Kodlu Formülasyon için Higuchi (T_{lag})Modeli (6.-72. Saat)



*Not.***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.

Şekil 5.35

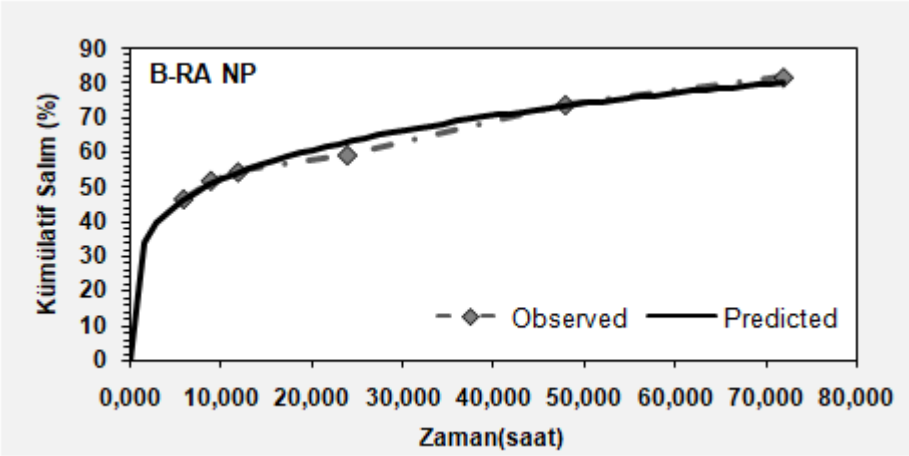
B-RA-NP Kodlu Formülasyon için Higuchi (F_0)Modeli (6.-72. Saat)



*Not.***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.

Şekil 5.36

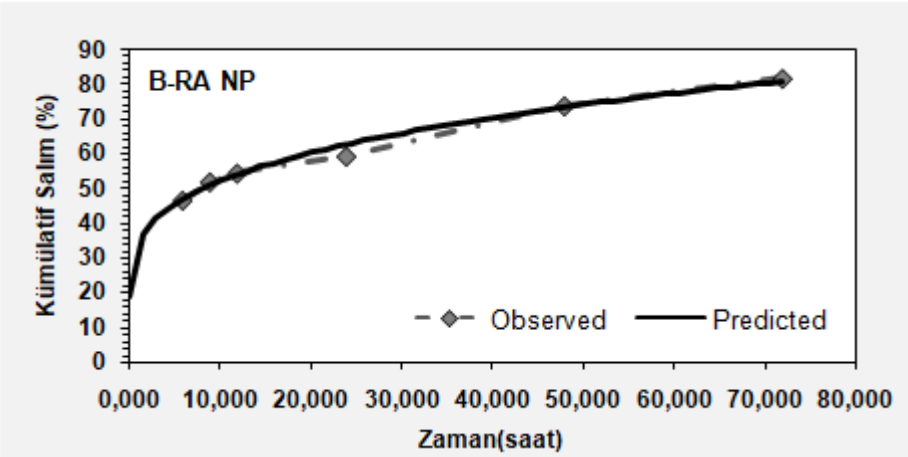
B-RA-NP Kodlu Formülasyon için Korsmeyer-Peppas Modeli (6.-72. Saat)



*Not.***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.

Şekil 5.37

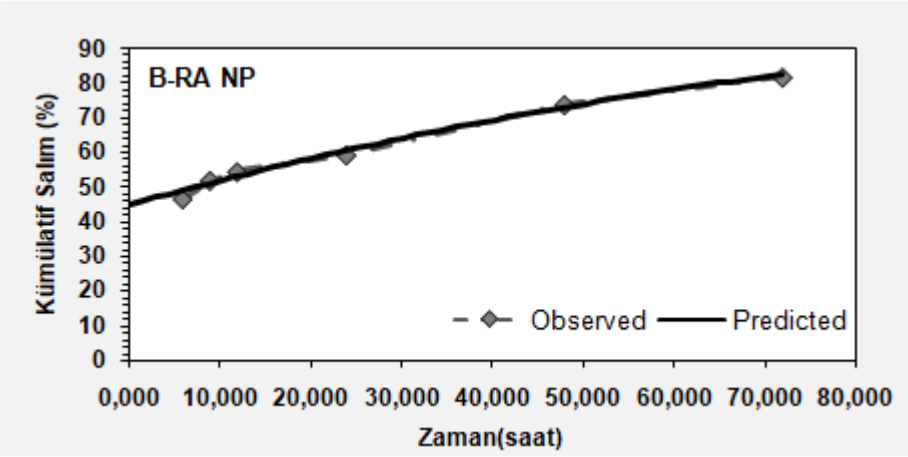
B-RA-NP Kodlu Formülasyon için Korsmeyer-Peppas (F_0) Modeli (6.-72. Saat)



*Not.***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.

Şekil 5.38

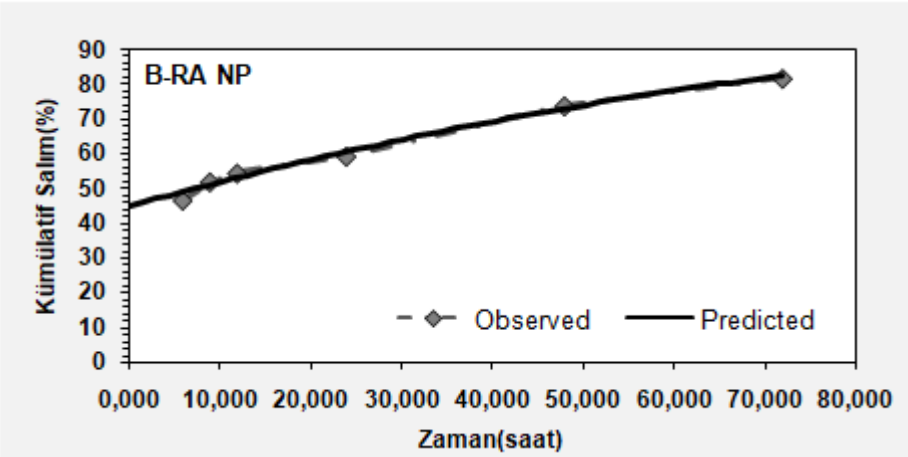
B-RA-NP Kodlu Formülasyon için Hixson-Crowell (T_{lag}) Modeli (6.-72. Saat)



*Not.***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.

Şekil 5.39

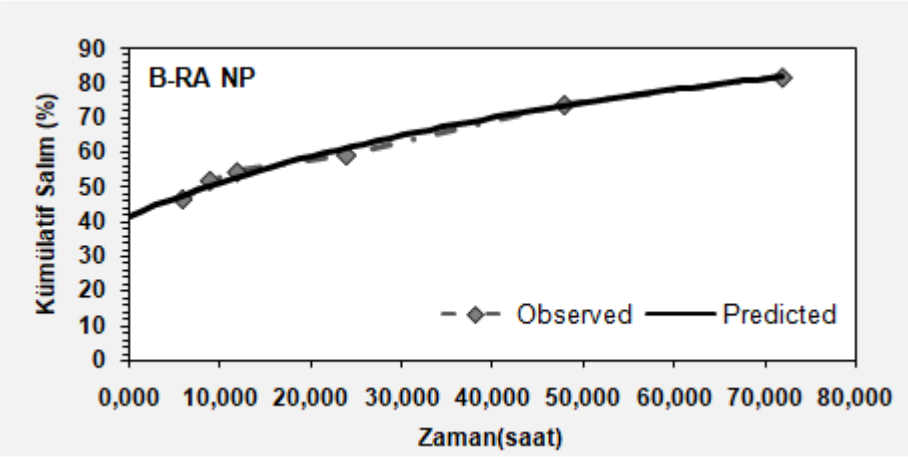
B-RA-NP Kodlu Formülasyon için Hopfenberg (T_{lag}) Modeli (6.-72. Saat)



*Not.***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.

Şekil 5.40

B-RA-NP Kodlu Formülasyon için Baker-Lonsdale(T_{lag})Modeli (6.-72. Saat)



*Not.***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.

Korsmeyer-Peppas, Korsmeyer-Peppas (T_{lag}), Korsmeyer-Peppas (F_0), Peppas-Sahlin 1, Weibull 1, Weibull 3 ve Weibull 4 modelleri için 72 saatlik r^2, $r^2_{adjusted}$, MSC ve AIC değerleri, ilgili modellerin denklemleri ile beraber Tablo 5.24'te sunulmuştur.

DDSolver programından otomatik olarak alınan Korsmeyer-Peppas, Korsmeyer-Peppas (T_{lag}), Korsmeyer-Peppas (F_0), Peppas-Sahlin 1, Weibull 1, Weibull 3 ve Weibull 4 modelleri için Şekil 5.41 - Şekil 5.47'de sunulmuştur.

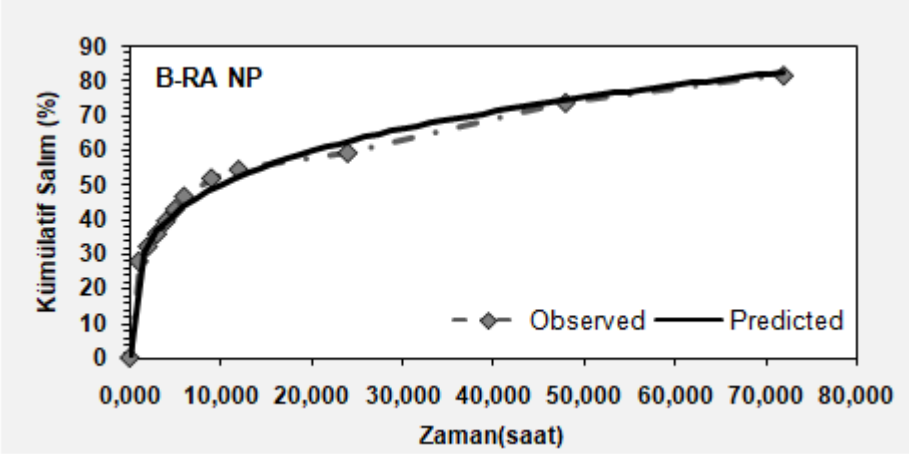
Tablo 5.24

B-RA-NP Kodlu Formülasyoniçin 72 Saatlik Salım Kinetiği Sonuçları

Model	r^2	$r^2_{adjusted}$	MSC	AIC
Korsmeyer-Peppas $F=k_{KP}*t^n$	0.993	0.992	4.127	46.773
Korsmeyer-Peppas (T_{lag}) $F=k_{KP}*(t-T_{lag})^n$	0.994	0.993	4.155	46.435
Korsmeyer-Peppas (F_0) $F=F_0+k_{KP}*t^n$	0.993	0.992	3.960	48.773
Peppas-Sahlin 1 $F=k_1*t^m+k^2*t^{(2*m)}$	0.986	0.983	3.246	57.344
Weibull 1 $F=100*\{1-Exp[-((t-Ti)^\beta)/\alpha]\}$	0.989	0.986	3.475	54.593
Weibull 3 $F=F_{max}*\{1-Exp[-(t^\beta)/\alpha]\}$	0.986	0.983	3.255	57.238
Weibull 4 $F=F_{max}*\{1-Exp[-((t-Ti)^\beta)/\alpha]\}$	0.981	0.974	2.764	63.136

Şekil 5.41

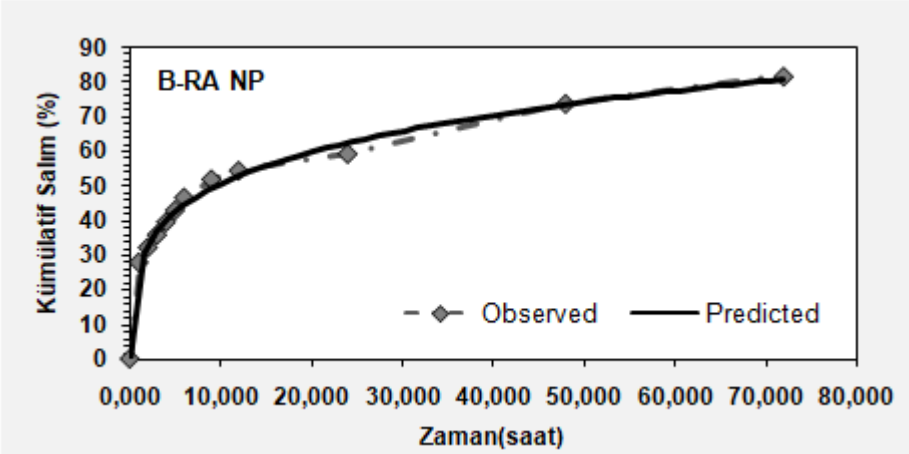
B-RA-NP Kodlu Formülasyon için Korsmeyer-Peppas Modeli (72. Saat)



*Not.***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.

Şekil 5.42

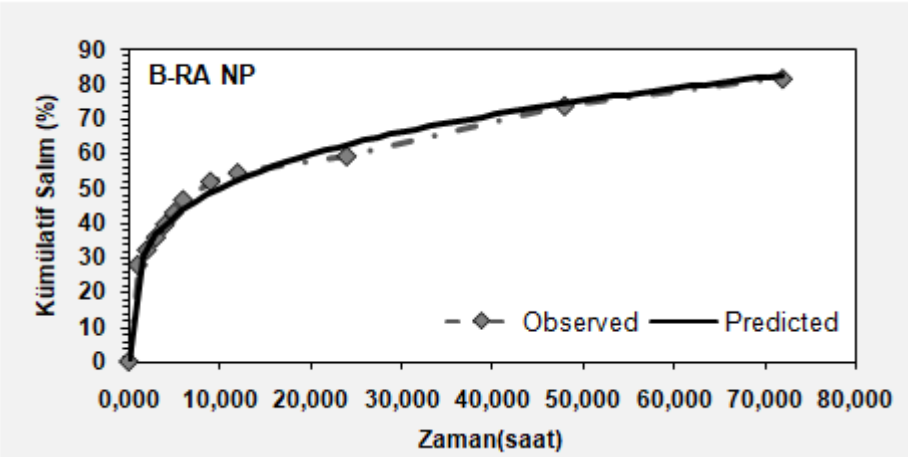
B-RA-NP Kodlu Formülasyoniçin Korsmeyer-Peppas (T_{lag}) Modeli (72. Saat)



*Not.***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.

Şekil 5.43

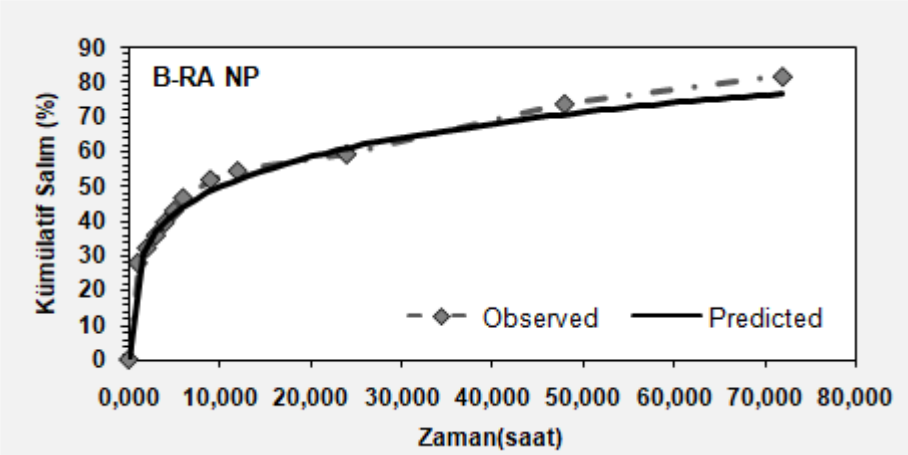
B-RA-NP kodlu Formülasyon için Korsmeyer-Peppas (F_0) Modeli (72. Saat)



*Not.***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.

Şekil 5.44

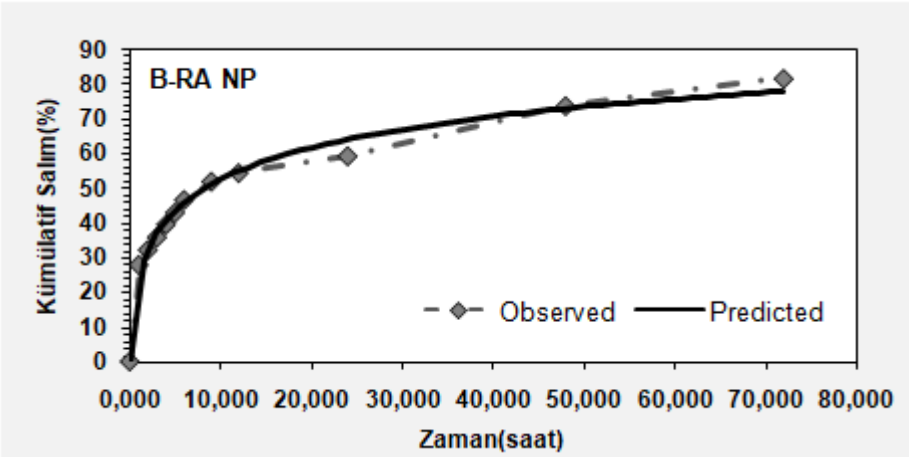
B-RA-NP Kodlu Formülasyon için Peppas-Sahlin 1 Modeli (72. Saat)



*Not.***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.

Şekil 5.45

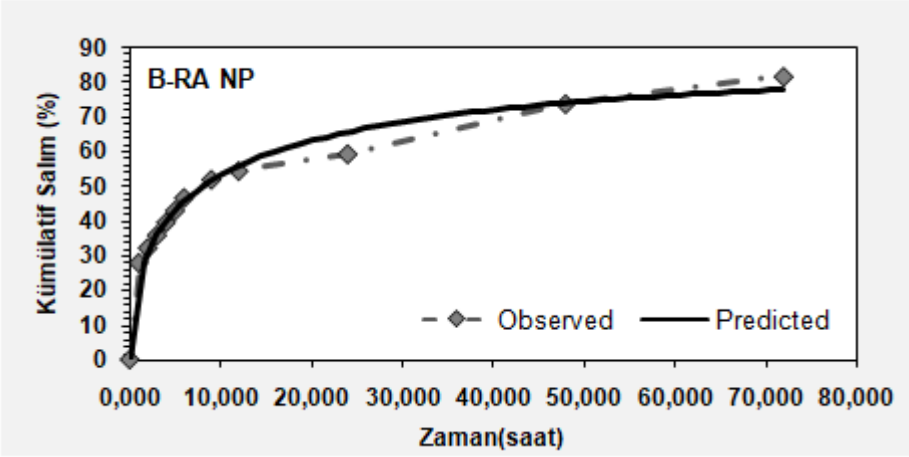
B-RA-NP Kodlu Formülasyon için Weibull 1 Modeli (72. Saat)



*Not.***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.

Şekil 5.46

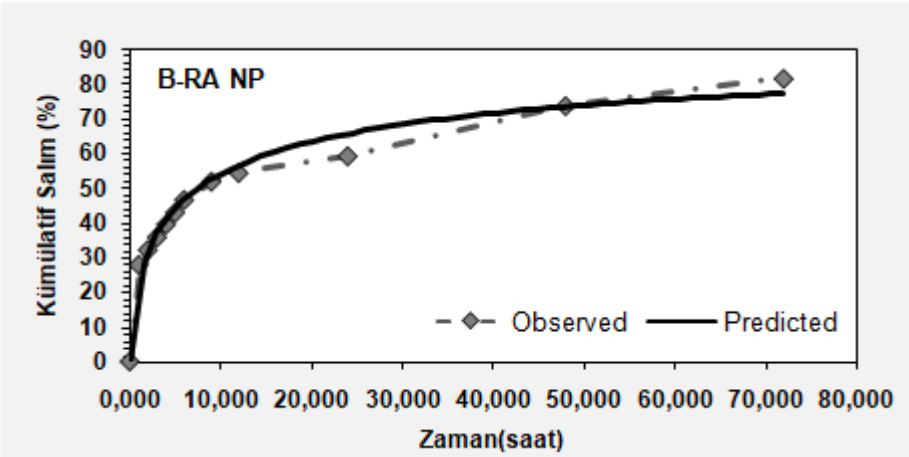
B-RA-NP Kodlu Formülasyon için Weibull 3 Modeli (72. Saat)



*Not.***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.

Şekil 5.47

B-RA-NP Kodlu Formülasyon için Weibull 4 Modeli (72. Saat)



*Not.***Observed:** Elde edilen salım profili, **Predicted:** Beklenen salım profili.

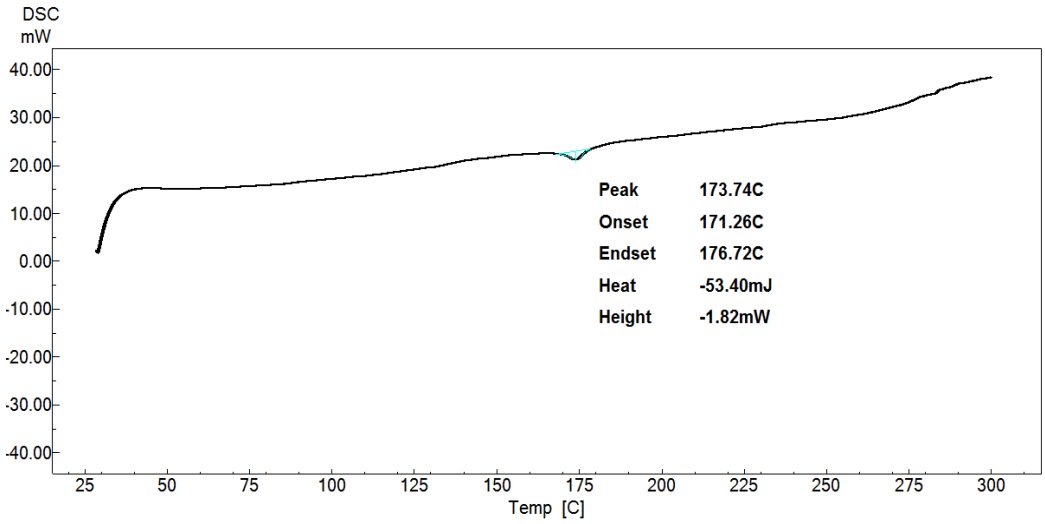
5.3 Katı Hal Karakterizasyonları

5.3.1 Termal (DSC) analizler

Rosmarinik asit, PLGA, B-Blank-NP kodlu formülasyon ve rosmarinik asit yüklü B-RA-NP kodlu formülasyona ait termogramlar / DSC eğrileri sırasıyla Şekil 5.48, Şekil 5.49, Şekil 5.50 ve Şekil 5.51'de sunulmuştur.

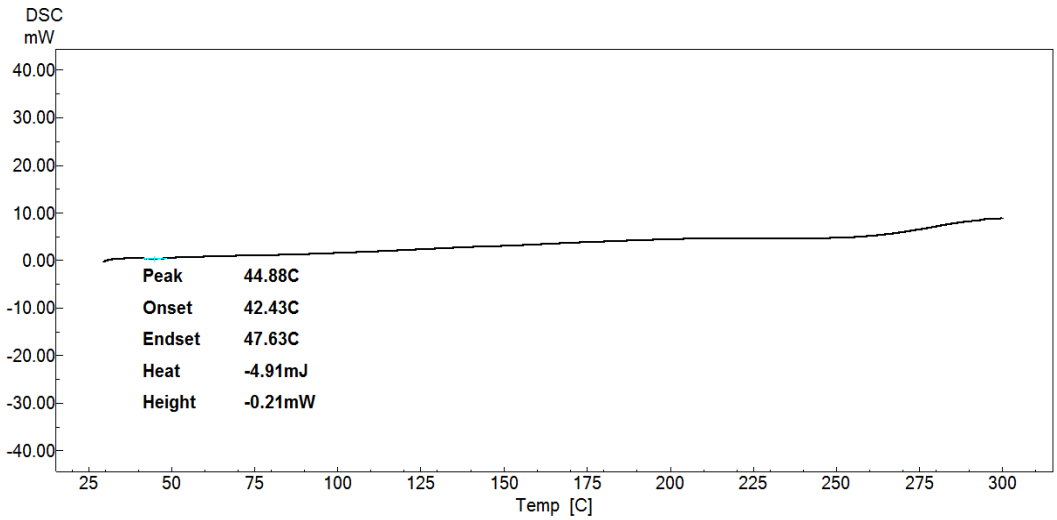
Şekil 5.48

Rosmarinik asit için DSC Termogramı



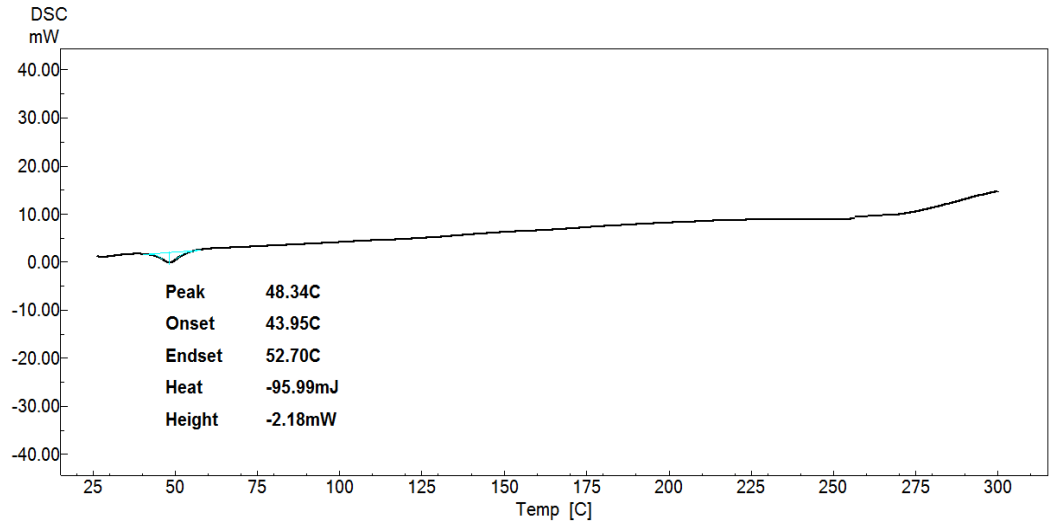
Şekil 5.49

PLGA için DSC Termogramı



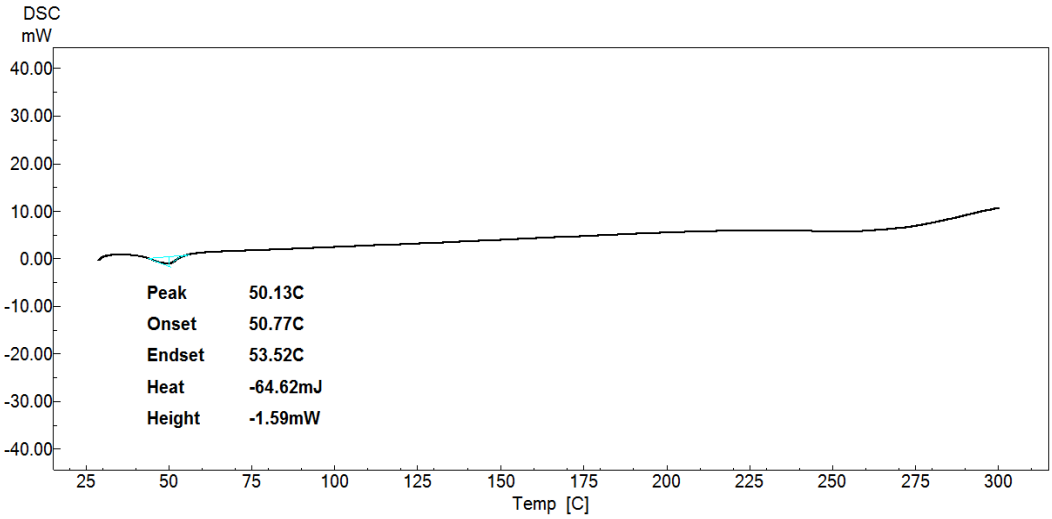
Şekil 5.50

B-Blank-NP için DSC Termogramı



Şekil 5.51

B-RA-NP için DSC Termogramı

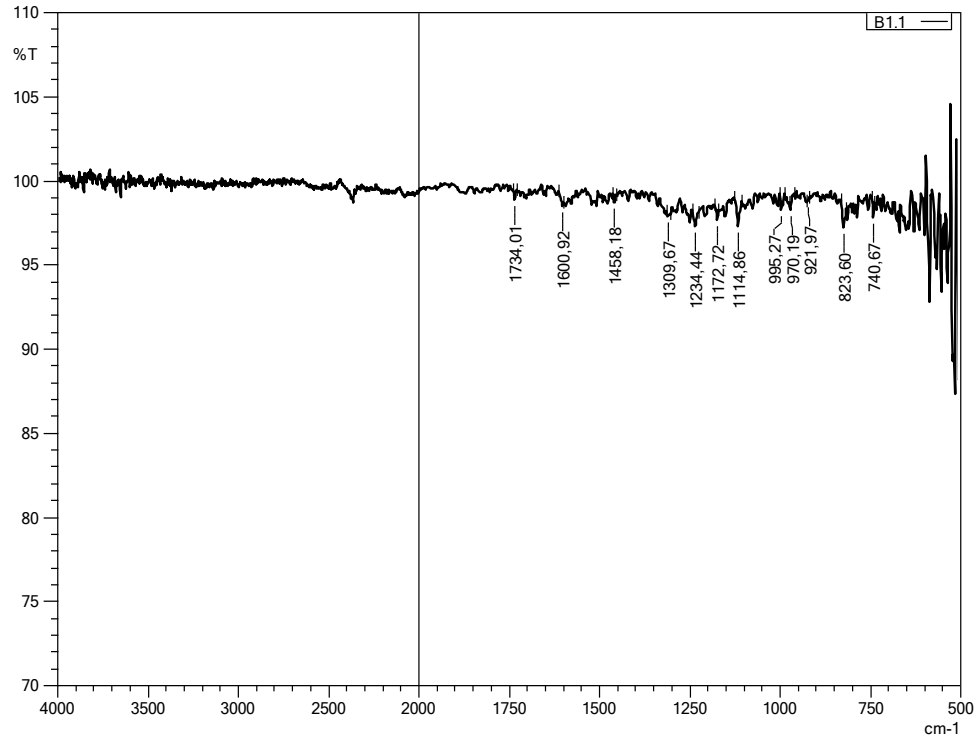


5.3.2 Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektrofotometre analizleri

Rosmarinik asit, PLGA, B-Blank-NP kodlu formülasyon ve rosmarinik asit yüklü B-RA-NP kodlu formülasyona ait FTIR spektrumları sırasıyla Şekil 5.52, Şekil 5.53, Şekil 5.54 ve Şekil 5.55'te sunulmuştur.

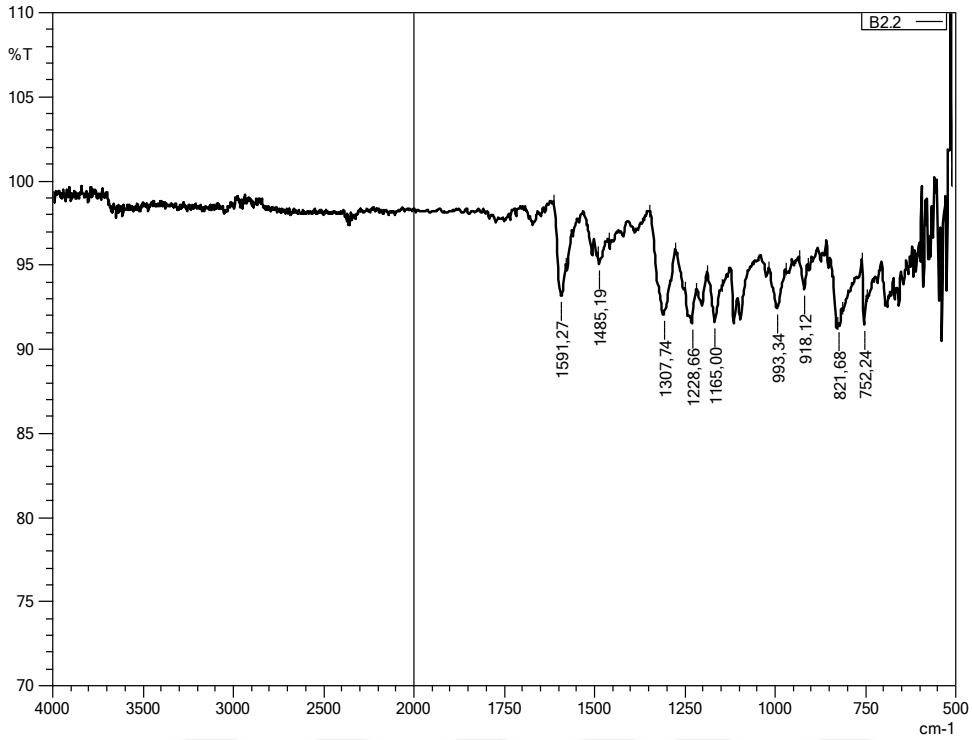
Şekil 5.52

Rosmarinik asit için FT-IR Spektrumu



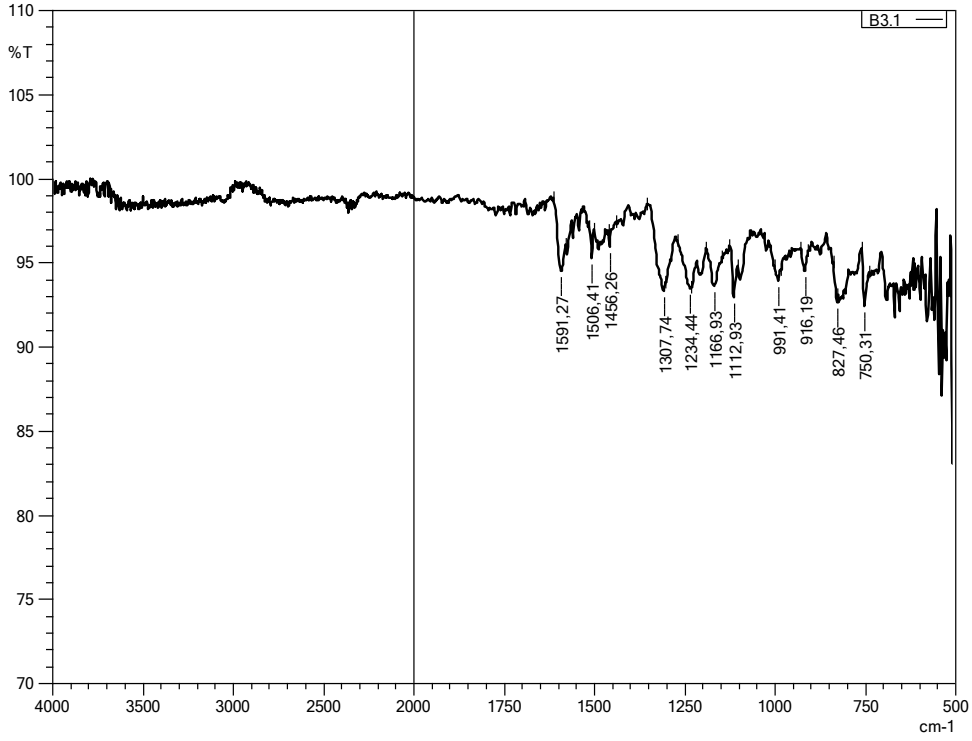
Şekil 5.53

PLGA için FT-IR Spektrumu



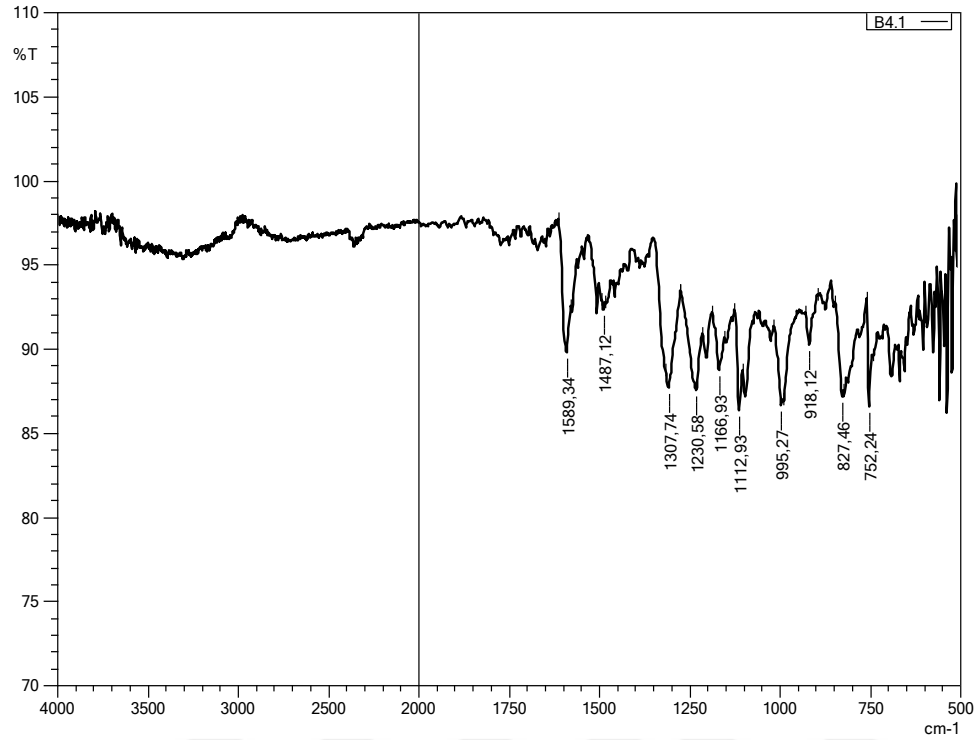
Şekil 5.54

B-Blank-NP için FT-IR Spektrumu



Şekil 5.55

B-RA-NP için FT-IR Spektrumu

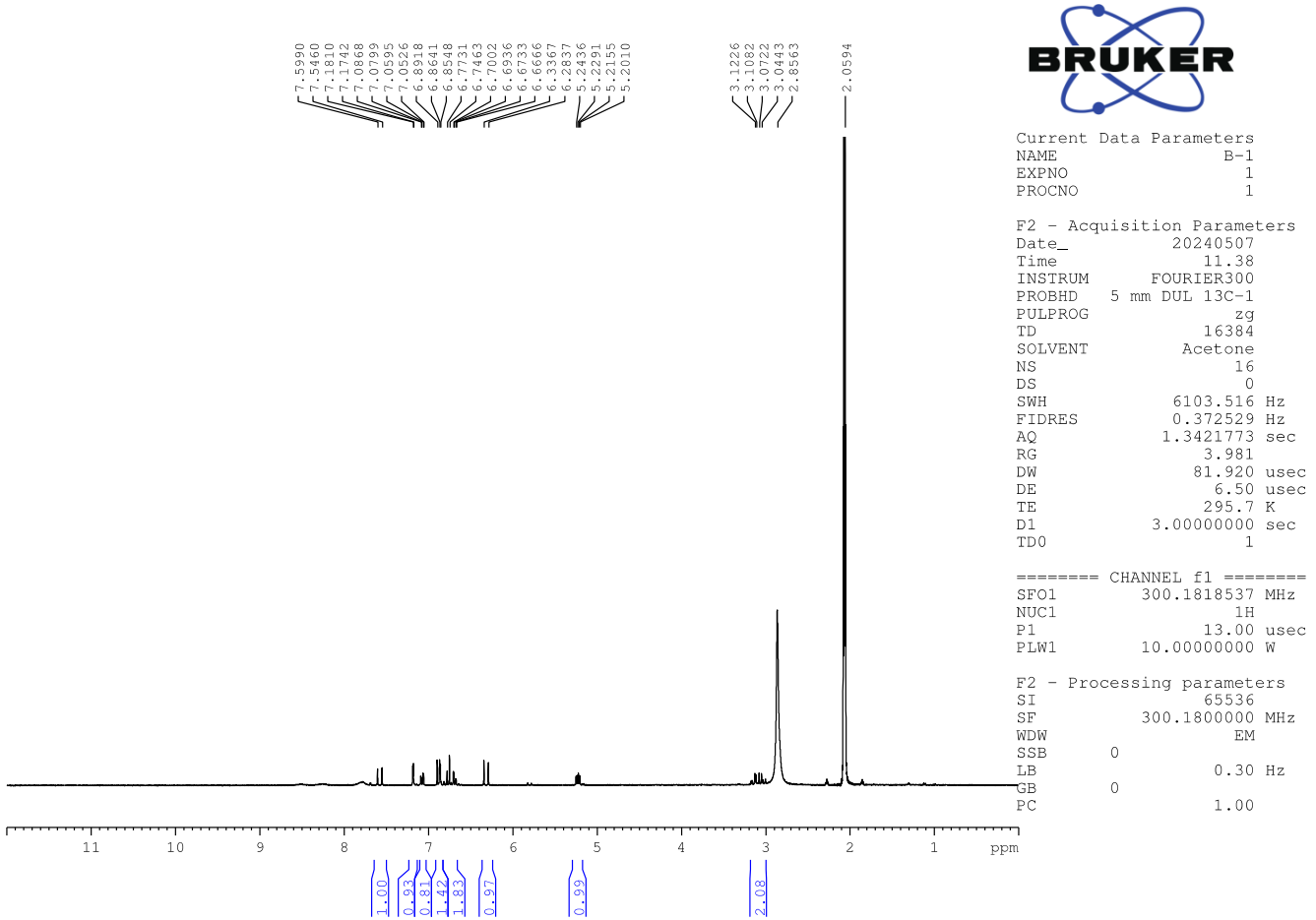


5.3.3 Nükleer manyetik rezonans (^{1}H-NMR) analizleri

Rosmarinik asit, PLGA, B-Blank-NP kodlu formülasyon ve rosmarinik asit yüklü B-RA-NP kodlu formülasyona ait ^{1}H-NMR spektrumları sırasıyla Şekil 5.56, Şekil 5.57, Şekil 5.58 ve Şekil 5.59'da sunulmuştur.

Şekil 5.56

Rosmarinik asit için ^{1}H-NMR Spektrumu

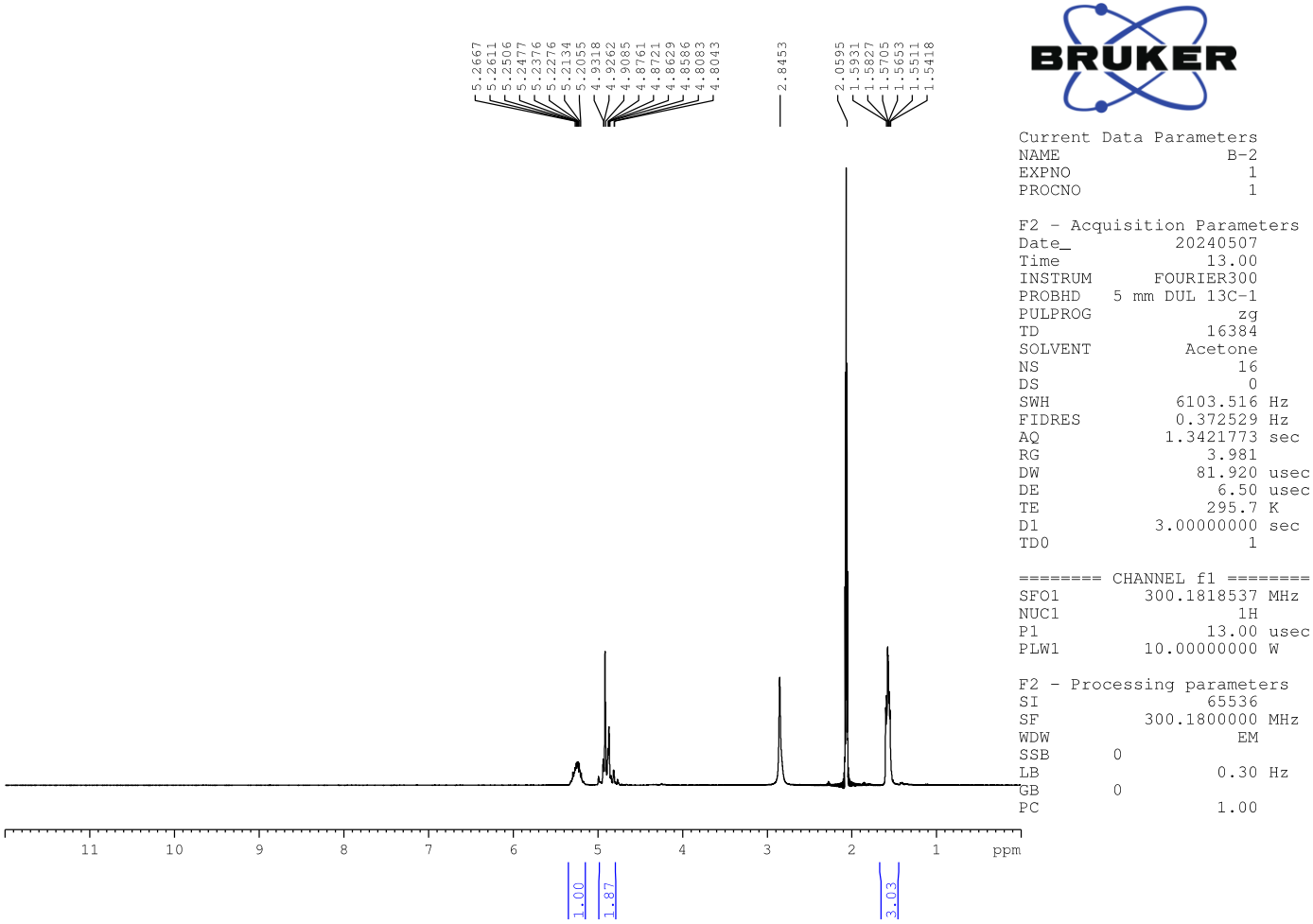


BRUKER

```
Current Data Parameters
NAME                  B-1
EXPNO                   1
PROCNO                  1

F2 - Acquisition Parameters
Date_            20240507
Time                11.38
INSTRUM       FOURIER300
PROBHD    5 mm DUL 13C-1
PULPROG                zg
TD                  16384
SOLVENT           Acetone
NS                     16
DS                      0
SWH              6103.516 Hz
FIDRES           0.372529 Hz
AQ              1.3421773 sec
RG                  3.981
DW                 81.920 usec
DE                  6.50 usec
TE                 295.7 K
D1              3.00000000 sec
TD0                     1

======== CHANNEL f1 ========
SFO1          300.1818537 MHz
NUC1                    1H
P1                  13.00 usec
PLW1         10.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI                  65536
SF            300.1800000 MHz
WDW                    EM
SSB       0
LB                   0.30 Hz
GB        0
PC                   1.00
```

Şekil 5.57

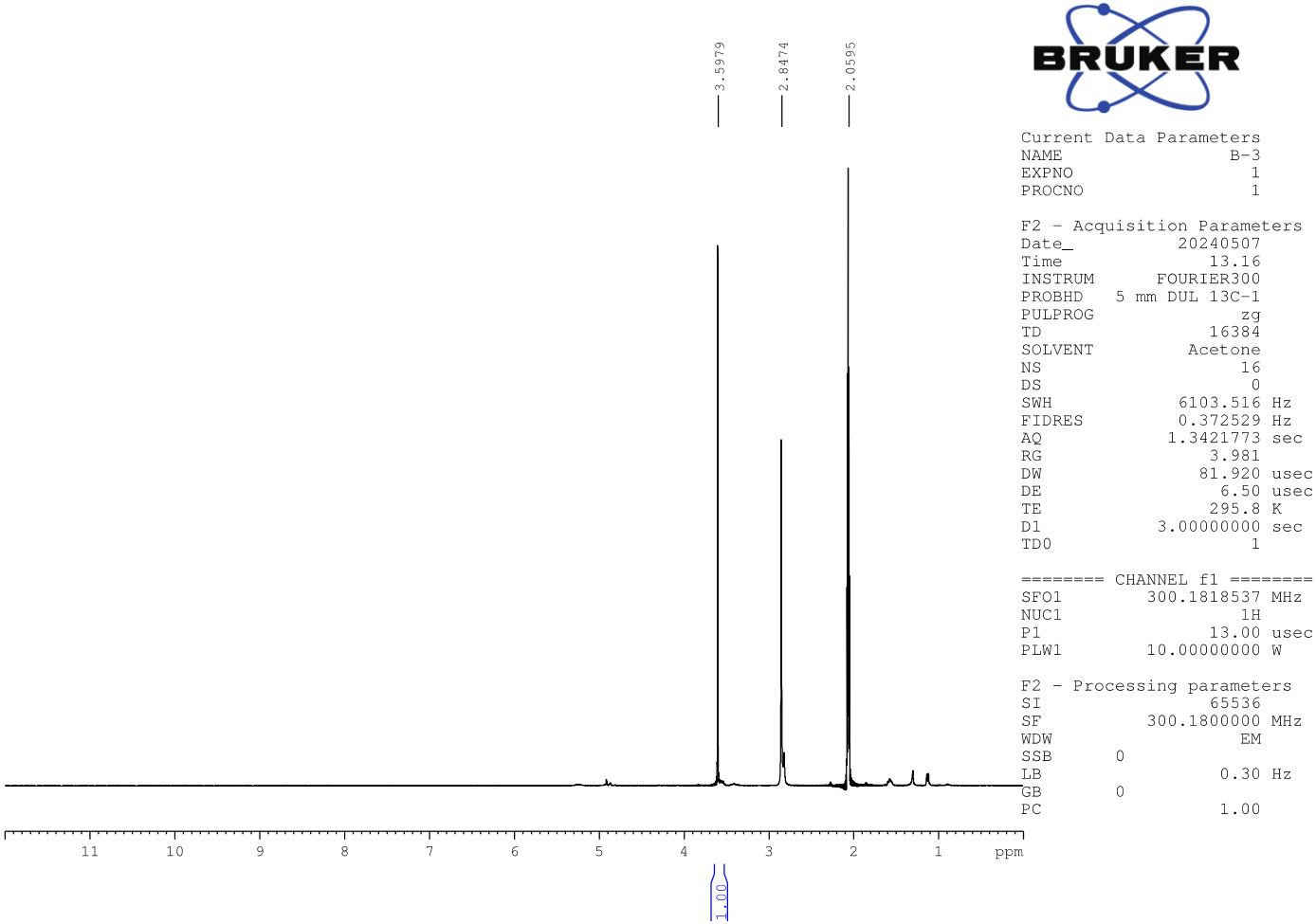
PLGA için ^{1}H-NMR Spektrumu




```
Current Data Parameters
NAME                  B-2
EXPNO                   1
PROCNO                  1

F2 - Acquisition Parameters
Date_           20240507
Time               13.00
INSTRUM       FOURIER300
PROBHD    5 mm DUL 13C-1
PULPROG                zg
TD                 16384
SOLVENT          Acetone
NS                    16
DS                     0
SWH             6103.516 Hz
FIDRES          0.372529 Hz
AQ             1.3421773 sec
RG                 3.981
DW                81.920 usec
DE                 6.50 usec
TE                295.7 K
D1            3.00000000 sec
TD0                    1

======== CHANNEL f1 ========
SFO1         300.1818537 MHz
NUC1                   1H
P1                 13.00 usec
PLW1         10.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI                 65536
SF            300.1800000 MHz
WDW                   EM
SSB       0
LB                 0.30 Hz
GB        0
PC                 1.00
```

Şekil 5.58

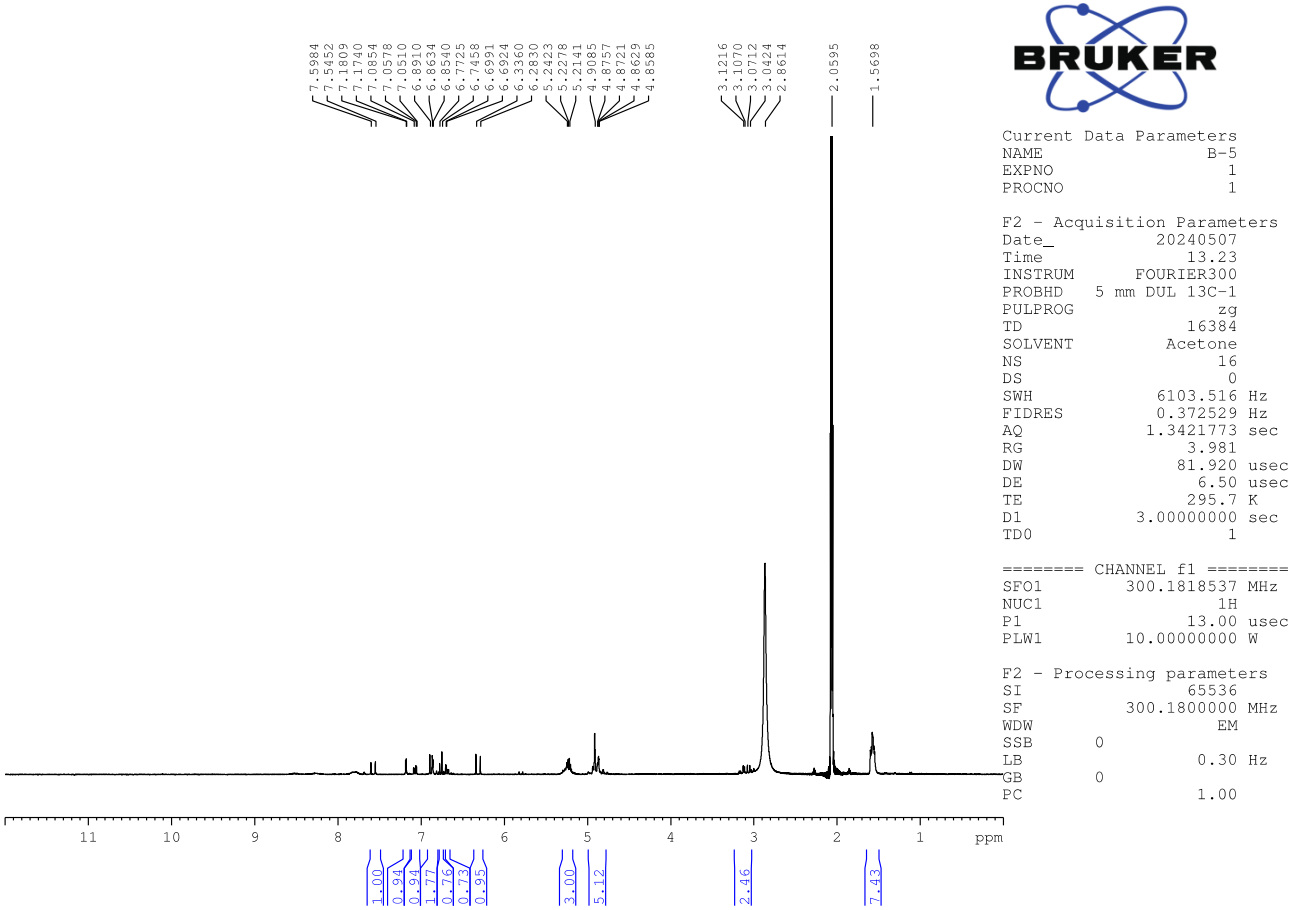
B-Blank-NP için ^{1}H-NMR Spektrumu




```
Current Data Parameters
NAME                  B-3
EXPNO                   1
PROCNO                  1

F2 - Acquisition Parameters
Date_           20240507
Time               13.16
INSTRUM       FOURIER300
PROBHD    5 mm DUL 13C-1
PULPROG                zg
TD                 16384
SOLVENT          Acetone
NS                     16
DS                      0
SWH             6103.516 Hz
FIDRES          0.372529 Hz
AQ             1.3421773 sec
RG                 3.981
DW                81.920 usec
DE                 6.50 usec
TE                295.8 K
D1           3.00000000 sec
TD0                     1

======== CHANNEL f1 ========
SFO1         300.1818537 MHz
NUC1                   1H
P1                 13.00 usec
PLW1         10.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI                  65536
SF           300.1800000 MHz
WDW                    EM
SSB       0
LB                  0.30 Hz
GB        0
PC                  1.00
```

Şekil 5.59

B-RA-NP için ^{1}H-NMR Spektrumu




```
Current Data Parameters
NAME                  B-5
EXPNO                   1
PROCNO                  1

F2 - Acquisition Parameters
Date_            20240507
Time                13.23
INSTRUM       FOURIER300
PROBHD    5 mm DUL 13C-1
PULPROG                zg
TD                  16384
SOLVENT          Acetone
NS                     16
DS                      0
SWH              6103.516 Hz
FIDRES           0.372529 Hz
AQ               1.3421773 sec
RG                 3.981
DW                81.920 usec
DE                 6.50 usec
TE                 295.7 K
D1             3.00000000 sec
TD0                     1

======== CHANNEL f1 ========
SFO1          300.1818537 MHz
NUC1                   1H
P1                  13.00 usec
PLW1         10.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI                  65536
SF            300.1800000 MHz
WDW                    EM
SSB       0
LB                  0.30 Hz
GB        0
PC                  1.00
```

5.4 Biyolojik Aktivite Çalışmaları

5.4.1 Antioksidan aktivitenin belirlenmesi

Rosmarinik asit, B-Blank-NP ve B-RA-NP için yapılan antioksidan etkinlik testlerinin IC_{50} sonuçları Tablo 5.25'te sunulmuştur. Rosmarinik asit, B-Blank-NP ve B-RA-NP için DPPH % inhibisyon sonuçları Şekil 5.60'ta istatiksel karşılaştırma olarak sunulmuştur.

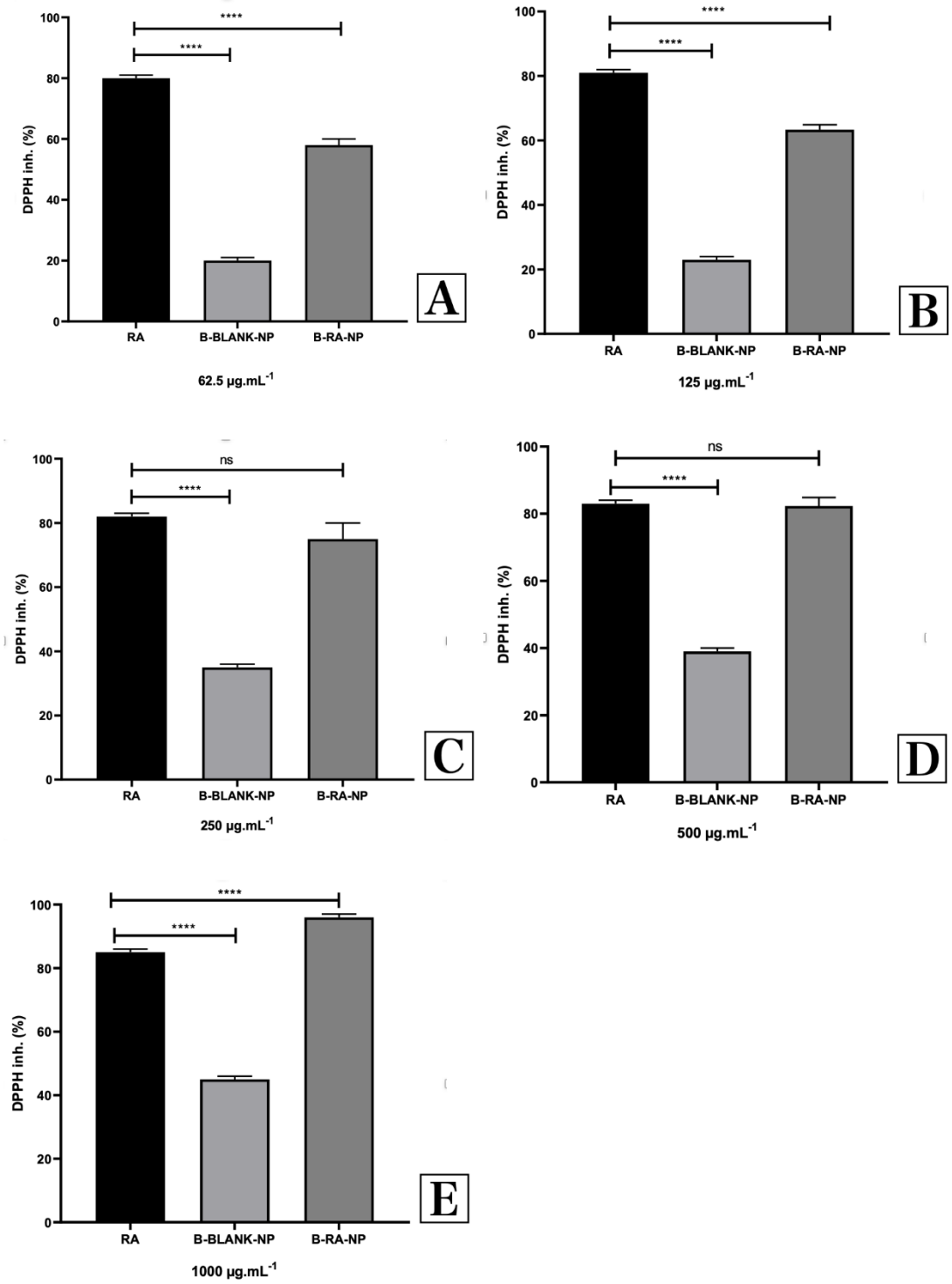
Tablo 5.25

Antioksidan Etkinlik Testlerinde Belirlenen IC_{50} ($\mu g.mL^{-1}$) Değerleri

Kod	**IC_{50}**
Rosmarinik asit	7.9 $\mu g.mL^{-1}$
B-Blank-NP	1088.0 $\mu g.mL^{-1}$
B-RA-NP	61.0 $\mu g.mL^{-1}$

Şekil 5.60

*DPPH % İnhibisyonkonstrasyon Sonuçları 62.5µg.mL^{-1}[**A**], 125µg.mL^{-1}[**B**], 250µg.mL^{-1} [**C**], 500µg.mL^{-1} [**D**], ve 1000µg.mL^{-1} [**E**]*



5.4.2 Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

Rosmarinik asit, B-RA-NP, B-Blank-NP, Eritromisin ve Flukonazol için antimikrobiyal etkinlik değerleri Tablo 5.26 ve Tablo 5.27'de sunulmuştur.

Tablo 5.26

Antimikrobiyal Etkinlik Milimetre Cinsinden Değerleri (ort± SS)

	Bacillussubtilis **NRRL B478**	***Staphylococcusaureus*** **ATCC 29213**	***Escherichiacoli*** **ATCC 25922**	***Pseudomonasaeruginosa*** **ATCC 27853**	***Candidaalbicans*** **ATCC 90028**	***Candidakrusei*** **ATCC 6258**
Rosmarinik asit	12.0 mm ±0.4	12.0 mm±0.2	18.0 mm±0.2	10.0 mm±0.3	10.0 mm ±0.3	6.0 mm±0.3
B-RA-NP	16.0 mm ±0.5	16.0 mm ±0.5	24.0 mm ±0.6	12.0 mm±0.2	12.0 mm±0.3	8.0 mm±0.5
B-Blank-NP	2.0 mm±0.4	2.0 mm ±0.4	4.0 mm±0.2	2.0 mm±0.2	2.0 mm±0.1	2.0 mm±0.1
Eritromisin	34.0 mm±0.5	28.0 mm±0.2	22.0 mm±0.2	24.0 mm±0.3	-	-
Flukonazol	-	-	-	-	22.0 mm±0.5	20.0 mm ±0.5

Tablo 5.27

Antimikrobiyal MİK Değerleri

	Bacillussubtilis **NRRL B478**	***Staphylococcusaureus*** **ATCC 29213**	***Escherichiacoli*** **ATCC 25922**	***PseudomonasaeruginosaATCC*** **27853**	***Candidaalbicans*** **ATCC 90028**	***Candidakrusei*** **ATCC 6258**
Rosmarinik asit	125.0 µg.mL^{-1}	125.0 µg.mL^{-1}	62.5 µg.mL^{-1}	250.0 µg.mL^{-1}	250.0 µg.mL^{-1}	250.0 µg.mL^{-1}
B-RA-NP	250.0 µg.mL^{-1}	250.0 µg.mL^{-1}	125.0 µg.mL^{-1}	250.0 µg.mL^{-1}	500.0 µg.mL^{-1}	500.0 µg.mL^{-1}
B-Blank-NP	>1000.0 µg.mL^{-1}	>1000.0 µg.mL^{-1}	>1000.0 µg.mL^{-1}	>1000.0 µg.mL^{-1}	>1000.0 µg.mL^{-1}	>1000.0 µg.mL^{-1}
Eritromisin	62.5 µg.mL^{-1}	125.0 µg.mL^{-1}	125.0 µg.mL^{-1}	125.0 µg.mL^{-1}	-	-
Flukonazol	-	-	-	-	31.3 µg.mL^{-1}	31.3 µg.mL^{-1}

6 TARTIŞMA

6.1 Analitik Miktar Tayini İçin Validasyon Çalışmaları

Tüm çalışma boyunca rosmarinik asit miktarının belirlenmesinde UV spektrofotometre yöntemi kullanılmıştır. Çalışmanın validasyon sonuçları '6.1.1. Rosmarinik asit için aseton: su(1:1, *h/h*)ortamında validasyon çalışması' ve '6.1.2. Rosmarinik asit için PBS pH 7.4 ortamında validasyon çalışması' başlıklı bölümlerde detaylı olarak açıklanarak tartışılmıştır.

6.1.1 Rosmarinik asit için aseton: su (1:1, *h/h*) ortamında validasyon çalışması

Enkapsülasyon etkinliği çalışmasından önce, rosmarinik asit için özgün ve seçici bir UV spektrofotometrik yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntem, UV-360A Shimadzu Japonya marka UV-Vis cihazı kullanılarak 330 nm dalga boyunda ve kuvars hücre ile optimize edilmiştir. Çalışmada rosmarinik asit için kullanılan bu yöntem, doğrusallık, kesinlik ve doğruluk parametreleri açısından başarılı bir şekilde doğrulanmıştır. Standardize çözelti hazırlanırken, 25 mg rosmarinik asit özenle tartılıp, 25 ml'lik ölçülü bir balona aktarılmış ve son konsantrasyon 1000.0 $\mu g.mL^{-1}$ olacak şekilde aseton:su (1:1, *h/h*) karışımında çözülmüştür. Kalibrasyon eğrisi, stok çözeltinin 2.5 - 15.0 $\mu g.mL^{-1}$ konsantrasyon aralığında 6 farklı konsantrasyon ile bulunmuştur. Çözeltiler 3 set olarak hazırlanmış ve analizleri yapılmıştır. Doğrusallık, en küçük kareler yöntemiyle uygulanan doğrusal regresyon analiziyle değerlendirilmiştir. Kesinlik parametresi, tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik analizleriyle incelenmiştir. Tekrarlanabilirlik, aynı gün içerisinde aynı konsantrasyona sahip numunelerin analiz edilmesiyle belirlenmiştir. Ara kesinlik ise farklı günlerde yapılan üç günlük test sonuçlarının karşılaştırılmasıyla değerlendirilmiştir. Her konsantrasyon (5, 10 ve 15 $\mu g.mL^{-1}$) için üç ayrı numune çözeltisi hazırlanmış ve analiz edilmiştir. Doğruluk, belirli miktarlarda rosmarinik asit referans standardının numunelere eklenmesi ve geri kazanım oranlarının hesaplanmasıyla ölçülmüştür. Bu amaçla, 10 mg rosmarinik asit dikkatlice tartılarak 100 mL'lik ölçülü bir balona aktarılmış ve aseton: su (1:1, *h/h*) karışımında çözülmüştür. Doğruluk çalışmaları için bu çözeltiden 5, 10 ve 15 $\mu g.mL^{-1}$ konsantrasyonlarında numuneler hazırlanmış ve analiz edilmiştir.Bu yöntem, rosmarinik asit analizi için güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar sunarak, ilerleyen çalışmalara sağlam bir temel oluşturmuştur (Luna vd., 2022).

Rosmarinik asitin miktar tayini için kullanılan UV spektrometre yönteminde gerçekleştirilen doğrusallık çalışmalarının sonucunda, determinasyon katsayısı r^2 değeri 0.9998 olarak bulunmuştur ve yöntemin doğrusallığı kanıtlanmıştır (Bkz. Tablo 5.1 ve Şekil 5.2). Kesinlik çalışmalarının üç günlük bir süre boyunca yapılması sonucunda, yöntemin hem tekrar edilebilirliği hem de tekrarlanabilirliği incelenmiş ve varyasyon katsayısının %2'nin altında olduğu tespit edilerek yöntemin güvenilirliği ortaya konmuştur. Ayrıca, üç farklı konsantrasyonda yapılan doğruluk ve geri kazanım çalışmaları neticesinde elde edilen veriler, yöntemin doğruluğunu kanıtlamıştır (Bkz. Tablo 5.5). Üç farklı gün boyunca yapılan kesinlik çalışması sonucunda 5.0 $\mu g.mL^{-1}$ konsantrasyondaki rosmarinik asit için 1. gün, 2. gün ve 3. gün sonunda alınan değerler (Bkz. Tablo 5.2) ; 10.0 $\mu g.mL^{-1}$ konsantrasyondaki rosmarinik asit için 1. gün, 2. gün ve 3. gün sonunda alınan değerler (Bkz. Tablo 5.3); 15.0 $\mu g.mL^{-1}$ konsantrasyondaki rosmarinik asit için 1. gün, 2. gün ve 3. gün sonunda alınan değerler (Bkz. Tablo 5.4); ile elde edilen RSD (%varyasyon katsayısı) değerleri %2'den düşüktür. Rosmarinik asitin her bir kesinlik seviyesinde üç tekrarlı çözeltisi için hesaplanan %RSD'nin %2'den az olduğu tespit edildiğinden, yöntemin kesin olduğu sonucuna varılmıştır. Doğruluk çalışmasında 5.0 $\mu g.mL^{-1}$, 10.0 $\mu g.mL^{-1}$ ve 15.0 $\mu g.mL^{-1}$ konsantrasyon için elde edilen geri kazanımlar yöntemin doğruluğunu kanıtlamaktadır (Bkz. Tablo 5.5.)(Habib vd., 2021; Pharma vd., 2023.

LOD ve LOQ sırasıyla 0.220 $\mu g.mL^{-1}$ ve 0.668 $\mu g.mL^{-1}$ olarak elde edilmiştir ve uygunluğunu doğrusallıkta çalışılan en düşük konsantrasyonda daha düşük olması ile kanıtlamıştır (Ferraz vd., 2015).

6.1.2 Rosmarinik asit için PBS pH 7.4 ortamında validasyon çalışması

Rosmarinik asit için özgün ve seçici bir UV spektrofotometrik analiz yöntemi, *in vitro* dissolüsyon analizlerinden önce geliştirilmiştir. Ölçümler, 324 nm dalga boyunda ve kuvars hücre kullanılarak Shimadzu UV-160A spektrofotometresi ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma kapsamında, rosmarinik asit için geliştirilen UV spektrofotometrik yöntem, doğrusallık, kesinlik ve doğruluk açısından doğrulanmıştır. Stok çözeltisi hazırlanırken, 25 mg rosmarinik asit hassas bir şekilde tartıldı ve 25 ml'lik ölçülü balona aktarılıp, son konsantrasyon için 1000 $\mu g.mL^{-1}$ seviyesine getirilmek üzere PBS pH 7.4'te çözülmüştür. Bu çözelti kullanılarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve analizler doğrusallık, kesinlik ve doğruluk olarak sonuçlar elde etmek

amacıyla yapılmıştır. Kalibrasyon eğrisi, rosmarinik asit stok çözeltisinden elde edilen 2.5 - 15 $\mu g.mL^{-1}$ arasındaki 6 farklı konsantrasyonla oluşturulmuştur. Çözeltiler üçer set halinde hazırlanmış ve her bir setin analizleri yapılmıştır. Doğrusallık, doğrusal regresyon analizi kapsamında en küçük kareler yöntemiyle değerlendirilmiştir. Validasyon sürecinde kesinlik, tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik parametreleri de analiz edilmiştir. Tekrarlanabilirlik, aynı konsantrasyondaki numunelerin aynı gün içinde incelenmesiyle belirlenirken, ara kesinlik farklı günlerde elde edilen test sonuçlarının karşılaştırılması yoluyla değerlendirilmiştir. Her konsantrasyon için 5, 10 ve 15 $\mu g.mL^{-1}$ seviyelerinde üçer set çözelti hazırlanmış ve bu çözeltilerin analizleri gerçekleştirilmiştir. Doğruluk, numunelere eklenen bilinen miktardaki rosmarinik asit referans standardının geri kazanım oranı ile belirlenmiştir. Bu amaçla, 10 mg rosmarinik asit dikkatlice tartılıp 100 mL'lik ölçülü balona aktarılmış ve son konsantrasyonu 1000 $\mu g.mL^{-1}$ olacak şekilde PBS pH 7.4 içinde çözündürülmüştür. Bu çözeltilerden doğruluk çalışması için 5, 10 ve 15 $\mu g.mL^{-1}$ derişimlerinde çözeltiler hazırlanmış ve analiz edilmiştir.

25.0 $\mu g.mL^{-1}$ konsantrasyonda rosmarinik asit çözeltisinin UV aralığında (200-800 nm) taranmasıyla elde edilen maksimum absorbans 324.0 nm olarak bulunmuş (Bkz. Şekil 5.6 ve Şekil 5.8) ve PBS pH 7.4 (Bkz. Şekil 5.9), RA içermeyen B-Blank-NP kodlu boş formülasyon (Bkz. Şekil 5.10) 324.0 nm'de herhangi bir absorbans vermemiştir. Bu sonuçlar yöntemin seçiciliğini kanıtlar niteliktedir.

Rosmarinik asit miktarının belirlenmesinde UV-spektrofotometri yöntemi kullanılarak yapılan lineer çalışma sonucunda determinasyon katsayısı $r^2 = 0.9995$ olarak hesaplanmış ve miktarın doğrusallığı onaylanmıştır (Bkz. Tablo 5.6 ve Şekil 5.2). Üç günlük kesinlik çalışmalarının sonucunda yöntemin tekrarlanabilirliği ve güvenilirliği % 2'nin altındaki varyasyon katsayısıyla gösterilmiştir (Bkz.Tablo 5.7, Tablo 5.8 ve Tablo 5.9). Üç ayrı derişim seviyesinde gerçekleştirilen doğruluk ve gerileme çalışmalarından elde edilen verilerle yöntemin doğru olduğu tespit edilmiştir (Bkz. Tablo 5.10)(Habib vd., 2021; Pharma vd., 2023).

LOD ve LOQ sırasıyla 0.361 $\mu g.mL^{-1}$ ve 1.094 $\mu g.mL^{-1}$ olarak elde edilmiştir ve uygunluğunu doğrusallıkta çalışılan en düşük konsantrasyonda daha düşük olması ile kanıtlamıştır (Ferraz vd., 2015).

Sonuç olarak, bu çalışmada önerilen iki analitik yöntem, basit ve ekonomik bir yöntem olup, rutin ve eş zamanlı rosmarinik asit tayini için kullanılabilir (Rapalli vd., 2020; Enggi vd., 2022; Migues vd., 2022; Yenilmez, Öztürk ve Başaran, 2023).

6.2 Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu

6.2.1 Parçacık boyutu, parçacık boyutu dağılımı (PDI) ve zeta potansiyel belirleme çalışması

Nanopartiküllerin iki temel kriteri, parçacık boyutu ve boyut dağılımıdır. Bu faktörler, ilaç çözünme hızı, mukoadhezyon, biyolojik dağılım ve hücresel alım gibi özelliklere etki ederek, dar bir boyut dağılımına sahip nanopartiküllerin tercih edilmesini sağlar. Böylelikle farmakolojik etkinlik artırılarak klinik sonuçlar iyileştirilebilir (Öztürk vd., 2018).

Parçacık boyutu analizlerine göre B-Blank-NP ve B-RA-NP için sırasıyla 183.8nm ± 1.0 ve 217.7nm ± 4.3 olarak belirlenmiştir (Bkz. Tablo 5.11). Rosmarinik asit yüklü nanopartiküllerin, boş formülasyonlara kıyasla daha büyük parçacık boyutlarına sahip olduğu belirlenmiştir. Önceki araştırmalar, ilaç yüklü nanopartiküllerin, polimerlerin aktif maddeyi kapsülleme sürecinden dolayı boş formülasyonlara göre daha büyük boyutlarda olabileceğini göstermektedir. Bu durum, kapsülleme nedeniyle parçacık boyutunda artışa yol açabilir (Vatankhah vd., 2020).

Parçacık boyut dağılımı sonucuna (PDI) göre; B-Blank-NP için 0.117 ± 0.022 ve B-RA-NP için ise 0.129 ± 0.007 değerleri tespit edilmiştir (Bkz. Tablo 5.12). Belirli bir nanosistemde parçacık boyut dağılımının homojenliğini gösteren PDI, sıfır ile bir arasında bir değer alarak nanopartikül dispersiyonunun kalitesini yansıtır. Çoğu araştırmacı, nanopartikül sistemlerinde PDI değerinin 0.3'ten düşük olmasını ideal kabul ederken, literatürde 0.5'ten küçük değerlerin de kabul edilebilir olduğu ifade edilmektedir (Büyükköroğlu vd., 2016).

PLGA nanopartiküllerinde zeta potansiyel değerleri negatif olarak belirlenmiştir (Bkz. Tablo 5.13). Zeta potansiyel değeri -16.1 ± 0.3 mV olan B-Blank-NP kodlu nanopartikülde ve rosmarinik asit yüklü B-RA-NP kodlu nanopartikül üzerinde-11.6 ± 0.9 mV olarak belirlendi. Nötr bir ortamda PLGA'nın negatif yüzey potansiyeline sahip olduğu terminal karboksil gruplarından kaynaklanmaktadır. Zeta potansiyeli +/- 30 mV olan bir sistemde kararlı bir formülasyon olduğu düşünülmektedir. Nanopartikül

sistemlerde elde edilen -5.0 ile -15.0 mV arasındaki zeta potansiyel değerleri nanopartikül sistemin flokülasyonun sınır bölgesinde olduğunu göstermektedir. Bu nedenle bu tezde hazırlanan nanopartikülleri nispeten kararlı olduğu söylenebilir. Ayrıca düşük partikül boyutuna sahip monodispers sistemlerin kararlılığının yüksek olduğu çünkü kendiliğinden oluşan brownian hareketleri ile agregasyonun önlendiği bildirilmiştir. Sonuç olarak rosmarinik asit yüklü nanopartiküllerin uygun boyut, düşük PDI ve yeterli zeta potansiyel değerleri ile kozmesötik ve farmasötik uygulamalarda kullanılabileceği söylenebilir (Öztürk vd., 2019).

6.2.2 Dondurma ve liyofilizasyon işlemlerinde kullanılan trehaloz miktarı ve saklama koşulu belirleme çalışması

Dondurarak kurutma/liyofilizasyon, nanopartiküllerin uzun vadeli kararlılığını iyileştirmek için iyi bir teknik olarak kabul edilir. Nanopartiküllerin sulu ortamlardaki düşük kararlılığı, nanopartiküllerin klinik kullanımına bir engel teşkil etmektedir. Nanopartiküller sulu ortamlarda saklandığında, avantajlarının neredeyse tamamını kaybederler ve fiziksel instabilite ve/veya kimyasal instabilite gibi dezavantajlarla karşılaşılaşılabilir. Bu nedenle, suyun ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Liyofilizasyon sürecinde, nanopartiküllerin kurutma stresinden (liyoprotektan) veya donma stresinden (kriyoprotektan) etkilenmesini önlemek ve depolama sırasında kararlılıklarını artırmak için bazı özel maddeler eklenir. Şeker türevleri, dondurarak kurutulmuş nanopartiküller için en çok kullanılan kriyoprotektanlardır. Bu maddeler arasında mannitol, trehaloz, sakaroz ve glikoz bulunur (Chacon vd., 1999; Abdelwahed vd.,2006).

Çalışmada, dondurma ve dondurmanın ardından liyofilizasyon işlemlerinin parçacık boyutuna etkileri ile trehaloz miktarının bu süreçlerdeki rolü detaylı olarak incelenmiştir. Taze formülasyonun başlangıç parçacık boyutu 217.7 ± 4.3 nm olarak ölçülmüştür. Dondurma işlemi sırasında, trehaloz miktarına bağlı olarak parçacık boyutunda belirgin değişiklikler gözlenmiştir. Trehaloz eklenmeyen çözeltide parçacık boyutu 304.6 ± 10.0 nm'e çıkarken, 900 µL trehaloz çözeltisi ile bu değer 218.0 ± 3.3 nm olarak ölçülmüştür (Bkz. Tablo 5.14).Dondurma ardından liyofilizasyonişlemi sırasında trehaloz eklenmeyen formülasyonda parçacık boyutu 313.6 ± 4.5 nm'ye yükselirken, 900 µL trehaloz çözeltisi ile 218.3 ± 1.8 nm'ye kadar düşmüştür (Bkz. Tablo 5.16). Bu çalışmada yapılan analizler sonucunda, dondurarak kurutma/liyofilizasyon işleminden sonra parçacık boyutunu sabit tutmak için 900 µL

trehaloz çözeltisinin matematiksel olarak yeterli olduğu sonucuna varılmıştır. 900 µL trehaloz çözeltisi eklenen analizde, parçacık boyutu değerinin taze formülasyondaki değerlere yakın olduğu görülmüş ve taze formülasyonun özelliklerinde değişiklik olmaması için 900 µL trehaloz çözeltisinin kullanılmasının yeterli olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca, sadece dondurma işlemi yapılacaksa 900 µL trehaloz çözeltisi kullanılmasının yeterli olacağı sonucuna varılmıştır. Bu sonuçların aksine, elde edilen değerler istatistiksel olarak incelendiğinde, 750 µL trehaloz çözeltisi eklenen örnek ile taze formülasyon arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığı görülmüştür. Bu nedenle, 750 µL trehaloz çözeltisinin istatistiksel açıdan yeterli olduğu sonucuna varılabilir (Bkz. Şekil 5.18 - Şekil 5.21). Bu veriler, trehalozun kriyoprotektan etkisini ve dondurma ile liyofilizasyon süreçlerinde partikül stabilitesini artırıcı rolünü ortaya koymaktadır (Bjelošević vd., 2020).

6.2.3 Enkapsülasyon etkinliği çalışması

Enkapsülasyon etkinliği çalışmasında, B-RA-NP kodlu formülasyon için elde edilen %EE değeri, %72.8 ± 3.0 olarak hesaplanmıştır (Bkz. Tablo 5.18). Bu sonuç, literatürde yer alan benzer çalışmalarla uyumludur ve enkapsülasyon verimliliğinin yüksek olduğunu göstermektedir. Enkapsülasyon etkinliği, aktif bileşenin nanopartikül içinde ne kadar iyi hapsedildiğini ve formülasyonun taşıma kapasitesini belirleyen önemli bir parametredir. Bu sonuçlar, B-RA-NP kodlu formülasyonunun etkin bir taşıyıcı olarak kullanılabileceğini ve hedeflenen biyolojik etkiyi elde etmek için uygun bir aday olduğunu göstermektedir (Murray vd., 2024).

%EE hazırlanan nanopartikül formülasyonları için kritik bir parametredir, çünkü daha yüksek kapsülleme ve yükleme verimliliği, belirli bir ilaç dozu için hastaya ya da kullanıcıya daha az nanopartikül verilmesine olanak tanır. Literatüre göre, bu tez çalışmasında B-RA-NP kodlu formülasyon için %72.8 ± 3.0 elde edilen % EE değeri ilaç ve nano-kozmetik uygulamaları için ideal olarak kabul edilebilir (Panyam vd., 2004; Martin-Banderas, 2012).

6.2.4 *In vitro* dissolüsyon çalışması

Rosmarinik asit için yapılan *in vitro* dissolüsyon çalışmamızın sonuçları, literatürdeki benzer çalışmalarla uyumlu olarak, PLGA bazlı nanoparçacıklarla gerçekleştirilen salım profillerinin genel eğilimlerini yansıtmaktadır. Bu tez çalışmasında dissolüsyon ortamı olarak pH 7.4 PBS literatüre göre seçilmiştir (Garcia-Melero,2022).

Saf rosmarinik asit salımı 2 saat içinde %99.0 ± 1.0 oranına ulaşmışken, B-RA-NP'den rosmarinik asit salımı 24 saatin sonunda %59.5 ± 3.8 ve 72 saatin sonunda %81.9 ± 3.7 olmuştur (Bkz.Tablo 5.20 ve Tablo 5.21). 72 saatlik süre boyunca, B-RA-NP formülasyonundaki rosmarinik asidin sürekli bir salım gösterdiği gözlenmiştir. 24 saatlik daha kısa bir süre için detaylandırıldığında, saf rosmarinik asite göre nanopartikül formülasyonundan daha yavaş salım görülmüştür. Bu, PLGA'nın sürekli salınım mekanizmasındaki rolünü ve nanopartikül taşıyıcı sisteminin etkinliğini ortaya koymaktadır. Ayrıca bu durum rosmarinik asidin yüksek kapsülleme verimliliği ile PLGA polimerik ağı içinde tutulduğunu ve nanopartikül formülasyonunun rosmarinik asidi sürekli bir şekilde saldığını göstermektedir. Sonuç olarak bu bulgular, B-RA-NP formülasyonunun RA'nın daha yavaş ve kontrollü salınımı nedeniyle terapötik etkinlik açısından potansiyel bir avantaj sağladığını göstermektedir (Fonseca, Simoes ve Gaspar, 2002; Lecaroz vd., 2006; García-Melero vd., 2022; Simitcioglu vd., 2022).

6.2.5 Salım kinetiği çalışması

B-RA-NP kodlu formülasyon için 72 saatlik çözünme oranları ve kümülatif salım profilleri elde edildikten sonra, çözünme kinetiğinin belirlenmesinde en önemli ve yaygın dört kriteri saptamak için DDSolver programına aktarıldı. Bu kriterler, Akaike bilgi kriteri (AIC), korelasyon katsayısı (r^2) , düzeltilmiş korelasyon katsayısı ($r^2_{adjusted}$) ve model seçme kriteri (MSC) olarak belirlendi. Değerlendirmede en yüksek r^2, düzeltilmiş r^2 ve MSC değerleri ile en düşük AIC değerleri dikkate alındı (Zhang vd., 2010).

Programda farklı kinetik modeller incelenmiştir. İlk olarak, 0-6 saatlik patlama salım aralığı, ardından 6-72 saatlik sürekli salım aralığı ve son olarak toplam salım süresini içeren 0-72 saatlik analiz sonuçları belirlenmiştir, tüm sonuçlar şu şekilde Tablo 5.22, Tablo 5.23 ve Tablo 5.24'te sunulmuştur. İlk 0-6 saatlik periyotta Korsmeyer-Peppas modeli en yüksek r^2 (0.996) ve $r^2_{adjusted}$ (0.995) değerleri ile formülasyona en iyi uyumu göstermiştir. Bu sonuç salım mekanizmasının difüzyon kontrollü bir süreç olduğunu ve nanopartiküllerin matris yapısının sürekli salım üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. 6-72 saatlik salım sonuçlarında ise Korsmeyer-Peppas modeli ve Peppas-Sahlin modelleri yine yüksek uyum değerleri ile öne çıkmıştır. Özellikle Peppas-Sahlin modeli difüzyon ve çözünme süreçlerinin birlikte etkili olduğu karışık mekanizmaları açıklamaktadır. Ayrıca Weibull modelinin B-RA-NP formülasyonunda

yüksek uyum değerleri sağladığı görülmüştür (r^2: 0.986, özellikle 72 saatlik periyotta). Bu model salım kinetiğinin genellikle karmaşık olduğunu ve hem difüzyonun hem de polimer matrisin bozunmasının sürece katkıda bulunduğunu açıklamaktadır. Sonuç olarak, B-RA-NP formülasyonu için elde edilen salınım kinetiği parametreleri, literatürde bildirilen kontrollü ve sürekli salınım mekanizmalarıyla uyumludur ve formülasyonun terapötik etkinliği artırabilecek bir tasarıma sahip olduğunu göstermektedir (Karademir,2015; Ojsteršek, Vrečer ve Hudovornik, 2024; Igbokwe vd., 2025; Pinal vd., 2025).

6.3. Katı Hal Karakterizasyonları

6.3.1 Termal (DSC) analizler

Termal analizlerin DSC (Diferansiyel Taramalı Kalorimetri) cihazıyla elde edilen sonuçlarına göre yapılan değerlendirme, rosmarinik asit ve farklı formülasyonların termal özelliklerini anlamak açısından önemlidir. Rosmarinik asitin DSC termogramında 173.74°C'de tespit edilen pik, maddenin erime noktasını temsil etmektedir (Bkz. Şekil 5.48). Bu, rosmarinik asitin kristal yapıda olduğunu ve belirgin bir erime sıcaklığına sahip olduğunu göstermektedir ve literatürle uyumludur (Sik vd., 2019; Noor vd., 2022).

PLGA'nın DSC termogramında 44.88°C'de gözlemlenen pik, polimerin camsı geçiş sıcaklığı (Tg) ile ilişkilidir (Bkz. Şekil 5.49). Bu sıcaklık, PLGA'nın amorf yapısını ve termal stabilitesini temsil eder. Literatüre göre, PLGA'nın Tg değeri kullanılan laktik asit ve glikolik asit oranlarına bağlı olarak değişiklik gösterebilir, ancak bu sıcaklık aralığı, kabul edilen değerler arasındadır. B-Blank-NP formülasyonunda gözlemlenen 48.34°C'lik pik, PLGA'ya kıyasla bir sıcaklık artışı göstermektedir (Bkz. Şekil 5.50). Bu artış, boş nanopartikül formunun yüzey alanındaki değişim ve formülasyondaki stabilize edici ajanların etkisiyle açıklanabilir. Bu durum, nanopartiküllerin Tg değerinde küçük bir kaymaya neden olur ve bu da formülasyonun stabilitesini arttırabilir. B-RA-NP formülasyonunda, DSC termogramında pik 50.13 °C'de gözlemlenmiştir (Bkz. Şekil 5.51). Bu değer, PLGA ve B-Blank-NP termogramlarından daha yüksektir ve rosmarinik asidin yüklenmesiyle ortaya çıkan bir etkileşim olduğunu göstermektedir. Rosmarinik asit ve polimer matriks arasında hidrojen bağları ya da diğer fiziksel etkileşimler oluşmuş olabilir. Bu etkileşimler, formülasyonun termal stabilitesini artırarak Tg değerini yükseltebilir. Sonuçlar, rosmarinik asidin amorf

yapıya entegre edildiğinde formülasyonun termal stabilitesini artırdığını göstermektedir. Rosmarinik asitin kristal yapısı, formülasyon içinde tamamen kaybolmuş ve bu, DSC termogramında daha yüksek bir Tg değerine yol açmıştır. PLGA'nın Tg'sine kıyasla B-RA-NP formülasyonunun Tg'sindeki bu artış, aktif madde ile taşıyıcı matriks arasındaki güçlü fiziksel ve kimyasal etkileşimleri işaret etmektedir. Bu da formülasyonun etkin bir ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Anderson ve Shive, 1997).

Ayrıca B-RA-NP kodlu formülasyonun termogramında rosmarinik asidin belirgin erime pikinin bulunmaması, ilacın amorf bir formda kapsüllendiğini ve polimer matrisi boyunca moleküler olarak dağıldığını gösterir (Alsulays vd., 2024; Bhargava, Dewangan ve Deshmukh, 2024; Wang vd., 2024).

6.3.2 Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektrofotometre analizleri

FT-IR spektrumları, moleküllerin kimyasal bağları ve fonksiyonel gruplarını tanımlamak için kullanılan bir analiz yöntemidir. Spektrumu yorumlarken, farklı dalga boylarındaki absorpsiyon piklerine bakılarak molekülün yapısı hakkında bilgi edinilir. Rosmarinik asit, PLGA, B-Blank-NP kodlu formülasyon ve rosmarinik asit yüklü B-RA-NP kodlu formülasyon ait FT-IR spektrumları sırasıyla Şekil 5.52, Şekil 5.53, Şekil 5.54 ve Şekil 5.55'de sunulmuştur.

Rosmarinik asit, FT-IR spektrumunda karakteristik tepe noktaları sergileyen çeşitli fonksiyonel gruplara sahiptir. Alifatik C-H gerilme titreşimleri νC−H(alifatik) ≈2800-3000 cm^{-1} aralığında görülür. Karboksilik asit grubunun C=O gerilme titreşimi genellikle νC=O ≈1680-1720 cm^{-1} aralığında keskin bir tepe noktası olarak görülürken, aromatik C=C çift bağlarının titreşimleri νC=C(aromatik) ≈1450-1600 cm^{-1} aralığında görülür. Ek olarak, C-O gerilme titreşimleri νC−O ≈ 1000-1300 cm-1 aralığında bulunur (Schiera vd., 2024).

PLGA'nın FT-IR spektrumunda ester gruplarına ve alifatik yapıya özgü belirgin tepe noktalarına sahiptir. Ester karbonil (C=O) grupları νC=O ≈1740-1760 cm^{-1} aralığında güçlü ve keskin bir tepe olarak gözlenir. Alifatik C-H gerilme titreşimleri νC−H ≈2800-3000 cm^{-1} aralığında görülürken, C-H deformasyon titreşimleri (CH_3 ve CH_2) νC−H ≈1350-1470 cm^{-1} arasında bulunur. Ester gruplarındaki C-O gerilme titreşimleri νC−O ≈1050-1300 cm^{-1} arasında çoklu tepeler olarak görülür. Ek olarak, C-C ve C-O-C

gerilme titreşimleri νC−C,C−O−C ≈1000–1150 cm^{-1} aralığında tanımlanabilir (Alhudaithi vd., 2024).

B-RA-NP kodlu formülasyondaki tipik rosmarinik asit piklerini azalan gücü, rosmarinik asidin kristalinitesinde amorf bir duruma doğru bir kaymaya işaret etmektedir. Bu bulgular, rosmarinik asidin polimer matris içinde moleküler düzeyde yer aldığını ve yayıldığını göstermektedir. FT-IR analizleri, rosmarinik asidin PLGA polimer matrisinde etkili bir şekilde yer aldığını ve formülasyon boyunca düzgün bir dağılıma sahip olduğunu doğrulamaktadır. Ek olarak, rosmarinik asidin amorf bir formda var olduğu ve DSC sonuçlarıyla birlikte analiz edildiğinde polimer matris içinde kimyasal bütünlüğünü koruduğu fikrini desteklemektedir (Tawfeeq vd., 2018; Kırımlıoğlu ve Öztürk, 2020; Yuan vd., 2024; Sinha ve Rupachandra, 2024).

6.3.3 Nükleer manyetik rezonans (^{1}H-NMR) analizleri

Bu tez çalışması kapsamında saf rosmarinik asit, PLGA, B-Blank-NP kodlu boş formülasyon ve rosmarinikasit yüklü B-RA-NP kodlu formülasyon için ^{1}H-NMR analiz incelemesi yapılmış ve ^{1}H-NMR spektrumları elde edilmiştir (Bkz. Şekil 5.56-5.59).

Rosmarinik asidin kimyasal yapısındaki aromatik halkalar, alifatik zincirler ve hidroksil grupları nedeniyle ^{1}H-NMR spektrumunda karakteristik kimyasal kaymalar sergiler. Fenolik protonlar genellikle δOH ≈9.0-10.0 ppm civarında geniş bir sinyal olarak gözlenir. Aromatik halkadaki protonlar $\delta aromatik$ ≈6.0-8.0 ppm arasında çoklu sinyaller verir. Karboksilik asit grubuna bağlı protonlar $\delta COOH$ ≈11.0-12.0 ppm arasında gözlenir. Alifatik bölgede, sp3-hibridize metilen protonları δCH_2≈2.0-3.0 ppm arasında sinyaller verir. Vinil protonlar $\delta CH{=}CH$ ≈5.5-6.5 ppm arasında tanımlanabilir (Kola vd., 2024).

PLGA, laktid ve glikolid birimlerinden kaynaklanan ^{1}H-NMR spektrumunda karakteristik kimyasal kaymalar sergiler. Laktid birimindeki metil grubu protonları $\delta CH3$ ≈1.4-1.6 ppm arasında keskin bir sinyal verir. Glikolid birimindeki metilen protonları $\delta CH2$ ≈ 4.8-5.0 ppm arasında gözlenir. Laktid birimindeki metin (sp3-hibridize karbon) protonları δCH ≈5.2-5.4 ppm arasında tanımlanabilir. Ek olarak, polimer zincir uçlarına bağlı hidroksil grupları δOH ≈9.0-10.0 ppm civarında geniş ve zayıf bir sinyal olarak görünebilir (Sun vd., 2022).

B-RA-NP kodlu formülasyonun ^{1}H-NMR analizi sonuçlarında rosmarinik asidin karakteristik ppm değerlerinde tepe noktalarının gözlemlenmesi, rosmarinik asidin polimerik yapıda moleküler olarak dağıldığını göstermektedir. Bu ayrıca rosmarinik asidin nanopartiküllere başarılı bir şekilde kapsüllenmesi ve polimer matrisinde homojen bir şekilde dağılması olarak da yorumlanabilir (Exarchou vd., 2001; Garms vd., 2021; Wang vd., 2023).

6.4 Biyolojik Aktivite Çalışmaları

6.4.1 Antioksidan aktivitenin belirlenmesi

Çalışmamızda, rosmarinik asit, B-Blank-NP ve B-RA-NP için DPPH radikal süpürme kapasitesi farklı konsantrasyonlarda (% inhibisyon) değerlendirilmiştir. DPPH % inhibisyon sonuçları Şekil 5.60'da ve IC_{50} değerleri Tablo 5.25'de verilmiştir. Tüm konsantrasyon seviyelerinde, rosmarinik asit en yüksek DPPH radikal süpürme kapasitesine sahip olmuştur. Bu, serbest radikal süpürücü özelliklere sahip fenolik bir bileşik olarak rosmarinik asitin güçlü antioksidan aktivite sergilediğini doğrulamaktadır. B-RA-NP, serbest rosmarinik asite kıyasla genellikle benzer veya biraz daha düşük DPPH inhibisyon seviyeleri göstermiştir. Ancak, bu inhibisyon değerleri 250 $\mu g.mL^{-1}$ ve 500 $\mu g.mL^{-1}$ konsantrasyonlarında rosmarinik asit ile istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar göstermemiştir. Bu da rosmarinik asitin nanopartikül formülasyonunda korunarak antioksidan etkisini koruduğunu ve sürekli salım ile etkinliğinin arttırılabileceğini göstermektedir. B-Blank-NP'nin DPPH radikal süpürme kapasitesi oldukça düşük bulunmuştur. Bu, nanopartikül taşıyıcılarının kendilerinin önemli bir antioksidan aktivite sergilemediğini, ancak aktif bileşen yüklendiğinde etkinliğin önemli ölçüde arttığını göstermektedir. 62.5 $\mu g.mL^{-1}$ konsantrasyonu için rosmarinik asit ve B-RA-NP kodlu formülasyon arasında anlamlı bir fark bulunmuştur, ancak her iki grup da B-Blank-NP kodlu formülasyondan çok daha yüksek inhibisyon göstermiştir. 125 $\mu g.mL^{-1}$ konsantrasyonu için rosmarinik asitin inhibisyon oranı neredeyse aynı kalırken, B-RA-NP'nin etkisinde bir artış gözlenmiştir. 250 $\mu g.mL^{-1}$ ve 500 $\mu g.mL^{-1}$ konsantrasyonları için rosmarinik asit ve B-RA-NP arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir; ancak, B-RA-NP'nin etkisi yüksek konsantrasyonlarda sabit kalmış ve bu da taşıyıcı sistemin stabilitesini göstermiştir. B-RA-NP, 1000 $\mu g.mL^{-1}$ konsantrasyonlarında rosmarinik asitin etkisini %100'e yakın bir inhibitör kapasite ile tamamen korumuş ve bu da taşıyıcı sistemin başarısını

göstermiştir. Rosmarinik asidin IC_{50} değeri 7.9 $\mu g.mL^{-1}$ olarak belirlenerek yüksek antioksidan kapasitesi açıkça gösterilmiştir. Bununla birlikte, B-RA-NP için IC_{50} değeri 61.0 $\mu g.mL^{-1}$ olarak ölçülmüştür. Bu değer rosmarinik asidin serbest formundan daha yüksek olmasına rağmen, nanopartikül formülasyonunun antioksidan aktivite sağladığını göstermektedir. Boş NP formülasyonunun (B-Blank-NP) IC_{50} değeri 1088.0 $\mu g.mL^{-1}$ olarak belirlenmiştir, bu da boş formülasyonun önemli bir antioksidan aktivite göstermediğini göstermektedir. Elde edilen veriler rosmarinik asitin güçlü bir antioksidan olduğunu ve etkisinin nanopartikül formülasyonunda korunduğunu göstermektedir. Bu da B-RA-NP'nin etkili bir antioksidan sistem olarak kullanılabileceğini ortaya koymaktadır (Bkz. Şekil.5.60). Bu sonuçlar, serbest rosmarinik asit molekülünün doğrudan DPPH radikaliyle etkileşime geçmesine izin veren kimyasal yapısı nedeniyle daha güçlü bir antioksidan aktivite sergilediğini göstermektedir. Bunun aksine, nanopartikül formülasyonunda rosmarinik asitin kapsüllenmiş olması, antioksidan moleküllerin tam kapasitede serbest radikallerle etkileşime geçme yeteneğini kısıtlayabilir. Ancak nanopartikül formülasyonu, serbest rosmarinik asite göre sürekli salımı ve uzun süreli stabilite gibi avantajlar sunabilir (Erkan vd., 2008; García-Melero vd., 2022).

6.4.2 Antimikrobiyal aktivite

Bu çalışmada, rosmarinik asit ve B-RA-NP'nin antimikrobiyal aktivitesi değerlendirilmiş ve standart antimikrobiyal ajanlar olan eritromisin ve flukonazol ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca, boş nanopartikül formülasyonu B-Blank-NP'nin etkinliği kontrol grubu olarak test edilmiştir. Antimikrobiyal çap değerleri (mm) Tablo 5.26 'te ve antimikrobiyal MİK değerleri Tablo 5.27'de sunulmuştur. Antimikrobiyal çap değerleri (mm) açısından rosmarinik asitin *B. subtilis, S. aureus, E. coli, P. aeruginosa* ve *Candida* türleri (*C. albicans* ve *C. krusei*) üzerinde belirli bir düzeyde etkili olduğu görülmüştür. Bu durum rosmarinik asitin saf formunda sınırlı bir aktiviteye sahip olduğunu gösterebilir. Buna karşılık, rosmarinik asitin nanopartikül formülasyonu (B-RA-NP) aynı mikroorganizmalar üzerinde daha yüksek çap değerleri sergilemiştir. Boş nanopartikül formülasyonu (B-Blank-NP) tüm mikroorganizmalar üzerinde çok düşük çap değerleri (≤2.0 mm) göstererek gözlemlenen aktivitenin rosmarinik asit varlığına bağlı olduğunu doğrulamıştır. Ayrıca, çalışmamızda nanopartikül formülasyonunun *C. albicans* (12.0 ± 0.3 mm) ve *C. krusei* (8.0 ± 0.5 mm) üzerinde antifungal aktivitesi

gözlenmiştir. Buna karşılık, orijinal rosmarinik asit formunun bu türler üzerindeki inhibisyon zon değerleri daha düşük bulunmuştur (10.0 ± 0.3 mm ve 6.0 ± 0.3 mm). Antifungal aktivite literatürde yeterince vurgulanmamış bir alandır ve bu bulgu çalışmamızı özgün ve katkı sağlayıcı kılmaktadır.

Mikroorganizmalar üzerindeki minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri antimikrobiyal aktivitenin daha fazla değerlendirilmesine olanak sağlamıştır. Rosmarinik asitin *B. subtilis, S. aureus* ve *E. coli* üzerindeki MİK değerleri 125.0 $\mu g.mL^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Ancak, B-RA-NP formülasyonu bu mikroorganizmalar üzerindeki MİK değerlerini önemli ölçüde azaltmıştır. Bu bulgular, nanopartikül formülasyonunun rosmarinik asitin etkinliğini artırarak antimikrobiyal aktiviteyi geliştirdiğini göstermektedir. Boş nanopartikül formülasyonunun (B-Blank-NP) MİK değerleri >1000.0 $\mu g.mL^{-1}$ olarak ölçülmüş ve herhangi bir antimikrobiyal aktivite göstermediği görülmüştür (Bkz. Tablo 5.27).

Bulgular, rosmarinik asitin saf formunun belirli bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu, ancak bu aktivitenin nanopartikül formülasyonu ile önemli ölçüde arttığını ortaya koymuştur. Nanopartikül formu bu artışı rosmarinik asitin stabilitesini artırarak, etkinliğini geliştirerek ve sürekli salım sağlayarak sağlamış olabilir. Sonuç olarak, rosmarinik asitin B-RA-NP formülasyonu ile özellikle bakteriyel enfeksiyonlara karşı alternatif bir antimikrobiyal ajan olarak kullanılabileceği öne sürülebilir. Bununla birlikte, standart antimikrobiyal ajanlar eritromisin ve flukonazolün hala daha güçlü aktivite sergilediği, ancak doğal bileşiklerin daha az yan etki ve toksisite potansiyeli ile öne çıkabileceği unutulmamalıdır. Ayrıca, gözlemlenen antifungal aktivite rosmarinik asitin potansiyel uygulama alanlarını genişleterek literatüre benzersiz bir katkı sağlamaktadır (Nadeem vd., 2019).

7 SONUÇ

Bu çalışmada, yaşlanma sürecinin temel etkenlerinden biri olarak serbest radikallerin vücutta yol açtığı oksidatif stres ele alınmıştır. Oksidatif stres, hücresel yapılar üzerinde zarar yaratırken, yaşlanma, hastalıkların gelişimi ve erken ölüm gibi sağlık sorunlarına yol açmaktadır. Bu bağlamda, serbest radikalleri inhibe edebilen antioksidanlar, yaşlanmayı yavaşlatmak ve sağlık problemlerini önlemek adına büyük bir öneme sahiptir. Günümüzde, yaşlanma karşıtı tedavi ve tedavi stratejileri geliştirilirken, doğal bileşiklere yönelik ilgi artmış ve ilaç sektöründe doğal antioksidanlar kullanılmaya başlanmıştır.

Çalışmamızda, doğal bir antioksidan olan rosmarinik asit, güçlü antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri nedeniyle tercih edilmiştir. Rosmarinik asit, vücutta serbest radikalleri etkili bir şekilde temizleyerek oksidatif stresi azaltmakta ve bunun sonucu olarak yaşlanma sürecini yavaşlatmaktadır. Ancak, rosmarinik asitin etkinliği sınırlıdır çünkü lipit çözünürlüğü düşüktür. Bu sorunu aşmak etkinliği artırmak amacıyla PLGA (polilaktik glikolik asit) kullanarak nanopartiküller formüle edilmiştir.

Nanoçöktürme yöntemiyle yapılan bu formülasyonlar, rosmarinik asitin etkinliğini artırırken, aynı zamanda sürekli salımını sağlamıştır. Elde edilen nanopartiküllerin partikül boyutu, partikül boyutudağılımı (PDI) ve zeta potansiyeli detaylı bir şekilde incelenmiş ve rosmarinik asit yüklü nanopartiküllerin beklenen özelliklere sahip olduğu doğrulanmıştır. Boş formülasyonla karşılaştırıldığında, rosmarinik asit yüklü nanopartiküllerin partikül boyutunun daha büyük olduğu gözlemlenmiştir.

Saklama koşullarının belirlendiği çalışmada, nanopartiküllerin saklama sürecinde stabil kalmasını sağlamak adına önemli veriler sunmuş ve optimum trehaloz miktarı saptanmıştır. Enkapsülasyon etkinliği analiz edilmiş ve rosmarinik asit yüklü nanopartiküllerin %72.8'lik bir enkapsülasyon etkinliği gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca, *in vitro* salım çalışmaları, rosmarinik asit yüklü nanopartiküllerin zaman içinde sürekli bir salım gösterdiğini, bu sayede biyolojik etkinliğin daha uzun süre devam edebileceğini ortaya koymuştur. DSC, ^{1}H-NMR ve FTIR analizleri ile başarılı nanopartikül formülasyonlarının hazırlandığı kanıtlanmıştır.

Biyolojik aktivite testleri, rosmarinik asit ve rosmarinik asit yüklü nanopartiküllerin yüksek antioksidan etkinliğe sahip olduğunu ve farklı bakteri türleri üzerindeki antimikrobiyal etkilerini göstermiştir. DPPH testi, rosmarinik asit yüklü

nanopartiküllerin antioksidan etkinliğinin yüksek olduğunu, ancak nanopartikül taşıyıcısının etkisiyle bu etkinliğin biraz azaldığını ortaya koymuştur. Antimikrobiyal testlerde, rosmarinik asit ve nanopartikül formülasyonunun, eritromisin ve flukonazolle karşılaştırıldığında daha geniş bir etki spektrumuna sahip olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle rosmarinik asit yüklü nanopartiküller, bütün bakteri türleri üzerinde etkili olmuştur.

Sonuç olarak, bu çalışma, rosmarinik asitin etkinliğini artırmak için PLGA nanopartiküller kullanılarak geliştirilen formülasyonların geliştirilmiş özelliklerini ortaya koymaktadır. Rosmarinik asit yüklü nanopartiküller, yüksek antioksidan ve antimikrobiyal etkileriyle yaşlanma karşıtı tedavilerde potansiyel bir çözüm sunmaktadır. Bu formülasyon, ilaç ve kozmetik sektöründe doğal antioksidan tedavilerinin ve kullanımlarının geliştirilmesine katkı sağlayabilecek önemli bir adım olarak değerlendirilmektedir. Ayrıca, bu çalışma, nanopartikül teknolojilerinin biyolojik sistemlerdeki etkinliğini artırmak ve doğal bileşenleri daha etkili hale getirmek için önemli bir temel oluşturmaktadır. Bu çalışmanın ilerleyen aşamalarında ICH kılavuzlarına uygun olarak yapılacak kararlılık testleri ve jel ya da krem gibi yarı-katı bir sisteme nanopartikül formülasyonlarının eklenmesi ve karakterizasyonu yapılabilir. Ayrıca bu yenilikçi formülasyonların terapötik etkilerini ve güvenlik profillerini tam olarak anlamak için *in vivo* değerlendirmelere odaklanmalıdır.

KAYNAKÇA

Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S. veFessi, H. (2006). Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process, andstorageconsiderations. *Advanced Drug Delivery Reviews, 58*, 1688–1713.

Akar, G.,Kaymak, G. (2024). Oksidatif Stresin Gölgesinde: Kardiyovasküler Sistem, Kanser ve Diyabet,Bidge Yayınları

Alhudaithi, S. S., Kalam, M. A., Binobaid, L., Ali, R., Almutairi, M. M., Qamar, W., Bin Hithlayn, H., Almutairi, A. veAlshememry, A. K. (2024). Sorafenibandpiperineco-loaded PLGA nanoparticles: Development, characterization, and anti-canceractivityagainsthepatocellularcarcinomacellline. *SaudiPharmaceuticalJournal*, *32*, 102064.

Alsulays, B. B., Aodah, A. H., Ahmed, M. M. veAnwer, M. K. (2024). Preparationandevaluation of chitosan-coated PLGA nanoparticlesencapsulatingivosidenibwithenhancedcytotoxicityagainsthumanliver cancercells. *International Journal of Nanomedicine*, 3461–3473.

Amoah, S. K. S., Sandjo, L. P., Kratz, J. M. ve Biavatti, M. W. (2016). Rosmarinicacid -pharmaceuticalandclinicalaspects. Inplantamedica. *GeorgThiemeVerlag 82*(5), 388–406. https://doi.org/10.1055/s-0035-1568274

Anderson, J. M. ve Shive, M. S. (1997). Biodegradationandbiocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *In Advanced Drug Delivery Reviews,28.*

Araújo, L. B. D. C., Silva, S. L., Galvão, M. A. M., Ferreira, M. R. A., Araújo, E. L., Randau, K. P. ve Soares, L. A. L. (2013). Total phytosterolcontent in drugmaterialsandextractsfromroots of a canthospermumhispidumby UV-VIS spectrophotometry. *RevBrasFarmacogn 23*(2013), 736-742.

Arınmış, K. N., Kıyan, H. T. ve Özturk, A. A. (2024). Preparation, characterization, antioxidantactivities, anddetermination of anti-alzheimereffects of PLGA-based DDS scontainingferulicacid. *ACS Omega, 9*(10), 11321–11338.

Arınmış, N., Kıyan, H. T. ve Öztürk, A. A. (2024). Preparation, characterization, antioxidantactivities, anddetermination of anti-Alzheimer effects of PLGA-basedDDSscontainingferulicacid. *ACS Omega, 9*, 11321–11338.

Aslankoç, R., Demirci ,D., İnan, Ü., Yıldız, M., Öztürk, A., Çetin, M., Savran, E.Ş., Yılmaz, B.(2019) The Role Of AntioxidantEnzymes İn OxidativeStress - SuperoxideDismutase (Sod), Catalase (Cat) AndGlutathionePeroxidase (Gpx). Med J SDU 2019; 26(3): 362-369.

Aydın, Ö. ve Ünlüel, İ. (2022). Enkapsülasyon teknikleri ve kontrollü salım. *EuropeanJournal of ScienceandTechnology.* https://doi.org/10.31590/ejosat.1039736

Ayşe Çelik, S. ve Ayran, İ. (2020). Antioksidan kaynağı olarak bazı tıbbi ve aromatik bitkiler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 13*(2), 115–125.

Balcı, M., & Spektroskopisi, N. M. R. (2004). ikinci basım. *ODTÜ Yayıncılık*.

Begines, B., Ortiz, T., Pérez-Aranda, M., Martínez, G., Merinero, M., Argüelles-Arias, F. ve Alcudia, A. (2020). Polymericnanoparticlesfordrugdelivery:

Recentdevelopmentsandfutureprospects. *InNanomaterials, 10*(7), 1–41. https://doi.org/10.3390/nano10071403

Bhargava, S., Dewangan, H. K. veDeshmukh, R. (2024). Targetedpolymericprimaquinenanoparticles: Optimization, evaluation, and in vivoliveruptakeforimprovedmalariatreatment. *Journal of BiomaterialsScience, Polymer Edition, 35*, 2867–2883.

Bjelošević, M., ZvonarPobirk, A., Planinšek, O. ve AhlinGrabnar, P. (2020). Excipients in freezedriedbiopharmaceuticals: Contributionstowardformulationstabilityandlyophilisationcycleoptimisation. *In International Journal of Pharmaceutics, 576*. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119029

Blois, M. S. (1958). Antioxidantdeterminationsbytheuse of a stablefreeradical. *Nature, 181*(4617), 1199–1200.

Büyükköroğlu, G., Şenel, B., Başaran, E., Yenilmez, E. ve Yazan, Y. (2016). Preparationand in vitro evaluation of vaginalformulationsincludingsi RNA andpaclitaxel-loaded SLN sforcervicalcancer. *EuropeanJournal of PharmaceuticsandBiopharmaceutics, 109*, 174–183. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.10.017

Cai, Y., Song, W., Li, J., Jing, Y., Liang, C., Zhang, L., Zhang, X., Zhang, W., Liu, B., An, Y., Li, J., Tang, B., Pei, S., Wu, X., Liu, Y., Zhuang, C. Le, Ying, Y., Dou, X., Chen, Y., … Liu, G. H. (2022). Thelandscape of aging. *InScienceChina Life Sciences, 65*(12), 2354–2454. https://doi.org/10.1007/s11427-022-2161-3

Chacon, M., Molpeceres, J., Berges, L., Guzman, M. veAberturas, M. R. (1999). Stabilityandfreeze-drying of cyclosporine-loadedpoly (D, L lactide–glycolide) carriers. *EuropeanJournal of PharmaceuticalSciences, 8*, 99–107.

Cohen-Sela, E., Chorny, M., Koroukhov, N., Danenberg, H. D. ve Golomb, G. (2009). A newdoubleemulsion solvent diffusiontechniqueforencapsulatinghydrophilicmolecules in PLGA nanoparticles. *Journal of ControlledRelease, 133*(2), 90–95. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.09.073

Çavdar, C., Sifil, A. veÇamsarı, T. (1997). Reaktif oksijen partikulleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji, Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi, 6*(3-4).

deMacedo, L. M., Dos Santos, É. M., Militão, L., Tundisi, L. L., Ataide, J. A., Souto, E. B. ve Mazzola, P. G. (2020). Rosemary (Rosmarinusofficinalis L., synsalviarosmarinusspenn.) anditstopicalapplications: A review. *InPlants, 9*(5). https://doi.org/10.3390/plants9050651

Derman S.,Kızılbey K.,Akdeste Z.M. (2013).PolymericNanoparticles.*Journal of EngineeringandScience (31) 107-120*

Dontha, S. (2016). A review on antioxidantmethods. *InAsianJournal of PharmaceuticalandClinicalResearch, 9*, 14–32. https://doi.org/10.22159/ajpcr.2016.v9s2.13092

Ekinci, M., Öztürk, A.A. ,İlem-Özdemir, D.(2022), Preparation, radiolabelingandcellculturestudies of chitosancoated PLGA nanoparticles as a

potentialcancerdiagnosticagent, Journal of Research in Pharmacy 26 1636–1645.

Elmaskaya, A., Öztürk, A. Alper, Büyükköroğlu, G. ve Yenilmez, E. (2019). Spray-dried ketoprofen lysine-incorporated PLGA nanoparticles: Formulation, characterization, evaluation, andcytotoxic profile. *IndianJournal of PharmaceuticalSciences, 81*.

Enggi, C. K., Isa, H. T., Wijaya, S., Ardika, K. A. R., Asri, R. M., Donnelly, R. F. ve Permana, A. D. (2022). Validation of spectrophotometricmethodtoquantifycabotegravir in simulatedvaginalfluidandporcinevaginaltissue in exvivopermeationandretentionstudiesfromthermosensitiveandmucoadhesivegels. *SpectrochimicaActaPart A: MolecularandBiomolecularSpectroscopy, 267*, 120600.

Erkan, N., Ayranci, G. ve Ayranci, E. (2008). Antioxidantactivities of rosemary (RosmarinusOfficinalis L.) extract, blackseed (Nigellasativa L.) essentialoil, carnosicacid, rosmarinicacidandsesamol. *FoodChemistry, 110*(1), 76–82. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.058

Ertürk S.,(2022),Akciğer Kanserinde miRNA Transfeksiyon Etkinliğinin PLGA Tabanlı Nanopartiküller ile Arttırılması,*SelçukÜinversitesi*

Exarchou, V., Troganis, A., Gerothanassis, I. P., Tsimidou, M. ve Boskou, D. (2001). Identificationandquantification of caffeicandrosmarinicacid in complex plan textractsbytheuse of variable-temperature two-dimensionalnuclearmagneticresonancespectroscopy. *Journal of AgriculturalandFoodChemistry*, *49*(1), 2–8. https://doi.org/10.1021/jf990928e

Ferraz, R. S., Mendonça, E. A. M., Silva, J. P. A., Cavalcanti, I. M. F., Lira-Nogueira, M. C. B., Galdino, S. L., Pitta, I. R., Lima, M. D. C. A. ve Santos-Magalhães, N. S. (2015). Validation of a UV-spectrophotometricanalyticalmethodfordetermination of LPSF/AC04 frominclusioncomplexandliposomes. *BrazilianJournal of PharmaceuticalSciences, 51*(1), 183–191. https://doi.org/10.1590/S1984-82502015000100018

Fonseca, C., Simões, S. veGaspar, R. (2002). Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: Preparation, physicochemicalcharacterization, and in vitro anti-tumoralactivity. *Journal of ControlledRelease, 83*, 273–286.

García-Melero, J., López-Mitjavila, J. J., García-Celma, M. J., Rodriguez-Abreu, C., ve Grijalvo, S. (2022a). Rosmarinicacid-loadedpolymericnanoparticlespreparedbylow-energy nano-emulsiontemplating: Formulation, biophysicalcharacterization, and in vitro studies. *Materials, 15*(13). https://doi.org/10.3390/ma15134572

García-Melero, J., López-Mitjavila, J.-J., García-Celma, M. J., Rodriguez-Abreu, C. veGrijalvo, S. (2022). Rosmarinicacid-loadedpolymericnanoparticlespreparedbylow-energy nano-emulsiontemplating: Formulation, biophysicalcharacterization, and in vitro studies. *Materials, 15*, 4572.

Garms, B. C., Poli, H., Baggley, D., Han, F. Y., Whittaker, A. K., Anitha, A. veGrøndahl, L. (2021). Evaluatingtheeffect of synthesis, isolation, andcharacterizationvariables on reportedparticle size anddispersity of drug-loaded PLGA nanoparticles. *MaterialsAdvances*, *2*, 5657–5671.

Guan, H., Luo, W., Bao, B., Cao, Y., Cheng, F., Yu, S., Fan, Q., Zhang, L., Wu, Q. ve Shan, M. (2022). A comprehensivereview of rosmarinicacid: Fromphytochemistrytopharmacologyanditsnewinsight. *InMolecules*, *27*(10). MDPI. https://doi.org/10.3390/molecules27103292

Güven, U. M., Öztürk, A. A. ve Yenilmez, E. (2020). Evaluation of carvedilol-loadedEudragit® nanoparticles. *Journal of Research in Pharmacy*, *24*, 71–81.

Habib, H., Fatima, S. ve Arnold, S. (2021). Earlyechocardiographicdetection of leftventriculardiastolicdysfunction in patientswithsystemic lupus erythematosusasymptomaticforcardiovasculardisease. *InJournal of PhysicalChemistry&Biophysics*, *11*(1).

Hajam, Y. A., Rani, R., Ganie, S. Y., Sheikh, T. A., Javaid, D., Qadri, S. S., Pramodh, S., Alsulimani, A., Alkhanani, M. F., Harakeh, S., Hussain, A., Haque, S. ve Reshi, M. S. (2022). Oxidativestress in humanpathologyandaging: Molecularmechanismsandperspectives. *Cells*, *11*(3). https://doi.org/10.3390/cells11030552

Harman, D. (1981). Theagingprocess. *Proc. NatiAcad. Sci.*, *78*(11). https://www.pnas.org

Igbokwe, N. N., Ismail, E. A., Obakachi, V. A., Ntsethe, A., Gamede, M., Karpoormath, R. ve Faya, M. A. (2025). Development of water-solublenanoformulations of novelpyrazolonederivativesandtheevaluation of theirantibacterialandantioxidantactivities. *Bionanoscience*, *15*, 1–20.

Ismailovi, N., Kıyan, H. T. ve Öztürk, A. A. (2023). A novelphytotherapyapplication: Preparation, characterization, antioxidantactivities, anddetermination of anti-inflammatoryeffectsby in vivo HET-CAM assay of chitosan-basedDDSscontainingendemic*Helichrysumpamphylicum* PH Davis &Kupichamethanolicextract. *CurrentDrug Delivery*.

Ismailovi, N., Kıyan, H. T. ve Öztürk, A. A. (2023). *A novelphytotherapyapplication: preparation, characterization, antiox-idantactivitiesanddetermination of anti-inflammatoryeffectsby in vivohet-cam assay of chitosan-basedddsscontainingendemichelichry-sumpamphylicumphdavis&kupichamethanolicextract*. CurrentDrug Delivery.

Jagur-Grodzinski, J. (2006). Polymersfortissueengineering, medicaldevices, andregenerativemedicine. Concise general review of recentstudies. *Polymersfor Advanced Technologies*, *17*(6), 395–418. https://doi.org/10.1002/pat.729

Joudeh, N. ve Linke, D. (2022). Nanoparticleclassification, physicochemicalproperties, characterization, andapplications: A comprehensivereviewforbiologists. *Journal of Nanobiotechnology*, *20*(1). https://doi.org/10.1186/s12951-022-01477-8

Karademir, S. (2015). Polimer İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması Karakterizsyonu ve İlaç Salım Kinetiğinin İncelenmesi,(2015),*İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*

Karakan, M. ve Nazlıkul,H.(2017).Oksidatif stres ve sebestradikalerin vücut üzerindeki etkisi, Bilimsel Tamamlayıcı Tıp, Regülasyon ve Nöralterapi Dergisi. Cilt 11, Sayı 2 : 2017

Kaya-Tilki, E., Öztürk, A. A., Engür-Öztürk, S. ve Dikmen, M. (2024). Enhanced anti-angiogeniceffects of aprepitant-loadednanoparticles in humanumbilicalveinendothelialcells. *ScientificReports, 14*, 19837.

Kernou, O. N., Azzouz, Z., Madani, K. ve Rijo, P. (2023). Application of rosmarinicacidwithitsderivatives in thetreatment of microbialpathogens. *Molecules, 28*(10). https://doi.org/10.3390/molecules28104243

Kırımlıoğlu, G. Y. ve Öztürk, A. A. (2020). Levocetirizinedihydrochloride-loadedchitosannanoparticles: Formulationand in vitro evaluation. *TurkishJournal of PharmaceuticalSciences, 17*, 27.

Kola, G., Vigni, S., Lamponi, S. ve Valensin, D. (2024). Protectivecontribution of rosmarinicacid in rosemaryextractagainstcopper-inducedoxidativestress. *Antioxidants, 13*, 1419.

Kömür M.,Donepezil Hidroklorür Yüklü PLGA Bazlı NanosistemlerinHazırlanması,Karakterizasyonu ve Anti-Alzheimer Etkinliklerinin Test Edilmesi,(2023),*Anadolu Üniversitesi*

Kurban, B. , Tuncel , Görgülü ,Ş., Kar,F., Öztürk ,A., Özek,T.(2023) Elemi essentialoilnanocapsulateddrugamelioratesлungcancerviaoxidativestress, apoptosis andinflammationpathway, J Cell Mol Med 27 1887–1899.

Lal, S., Jana, U., Manna, P. K., Mohanta, G. P., Manavalan, R. ve Pal, S. L. (t.y.). Nanoparticle: An overview of preparationandcharacterization. *Journal of AppliedPharmaceuticalScience, 2011*(06), 228–234.

Lecaroz, C., Gamazo, C., Renedo, M. J. ve Blanco-Prieto, M. J. (2006). Biodegradablemicro- andnanoparticles as long-termdeliveryvehiclesforgentamicin. *Journal of Microencapsulation, 23*, 782–792.

Luna, V. da S., Randau, K. P., Ferreira, M. R. A. ve Soares, L. A. L. (2022a). Development andvalidation of analyticalmethodbyspectrophotometry UV-V is forquantification of flavonoidsin leaves of sennaoccidentalis link. *Research, Societyand Development, 11*(1), e14411118584. https://doi.org/10.33448/rsd-v11i1.18584

Luna, V. da S., Randau, K. P., Ferreira, M. R. A. ve Soares, L. A. L. (2022b). Development andvalidation of analyticalmethodbyspectrophotometry UV-V is forquantification of flavonoids in leaves of sennaoccidentalis link. *Research, Societyand Development, 11*(1), e14411118584. https://doi.org/10.33448/rsd-v11i1.18584

Martín-Banderas, L., Álvarez-Fuentes, J., Durán-Lobato, M., Prados, J., Melguizo, C., Fernández-Arévalo, M. veHolgado, M. Á. (2012). Cannabinoidderivative-loaded PLGA nanocarriersfor oral administration: Formulation, characterization, andcytotoxicitystudies. *International Journal of Nanomedicine, 7*, 5793.

Migues, V. H., David, J. M., Gomes, A. F. ve David, J. P. (2022). Determination of soybeanisoflavoneby HPLC/DAD andsimple UV spectroscopicanalysis: A comparativestudy. *FoodAnalyticalMethods, 15*, 367–376.

Murray, A., Kilbride, P. ve Gibson, M. I. (2024). Trehalose in cryopreservation. Applications, mechanismsandintracellulardeliveryopportunities. *In RSC MedicinalChemistry. RoyalSociety of Chemistry.* https://doi.org/10.1039/d4md00174e

Nadeem, M., Imran, M., Gondal, T. A., Imran, A., Shahbaz, M., Amir, R. M., Sajid, M. W., Qaisrani, T. B., Atif, M., Hussain, G., Salehi, B., Ostrander, E. A., Martorell, M., Sharifi-Rad, J., Cho, W. C. ve Martins, N. (2019a). Therapeuticpotential of rosmarinicacid: A comprehensivereview. *InAppliedSciences, 9*(15). https://doi.org/10.3390/app9153139

Nadeem, M., Imran, M., Gondal, T. A., Imran, A., Shahbaz, M., Amir, R. M., Sajid, M. W., Qaisrani, T. B., Atif, M., Hussain, G., Salehi, B., Ostrander, E. A., Martorell, M., Sharifi-Rad, J., Cho, W. C. ve Martins, N. (2019b). Therapeuticpotential of rosmarinicacid: A comprehensivereview. *InAppliedSciences, 9*(15). https://doi.org/10.3390/app9153139

Noor, S., Mohammad, T., Rub, M. A., Raza, A., Azum, N., Yadav, D. K., Hassan, M. I. veAsiri, A. M. (2022). Biomedicalfeaturesandtherapeuticpotential of rosmarinicacid. *Archives of PharmacalResearch, 45*, 205–228.

Noor, S., Mohammad, T., Rub, M. A., Raza, A., Azum, N., Yadav, D. K., Hassan, M. I. ve Asiri, A. M. (2022). Biomedicalfeaturesandtherapeuticpotential of rosmarinicacid. *InArchives of PharmacalResearch, 45*(4), 205–228. https://doi.org/10.1007/s12272-022-01378-2

Ojsteršek, T., Vrečer, F. veHudovornik, G. (2024). Comparativefitting of mathematicalmodelstocarvedilolreleaseprofilesobtainedfromhypromellosematrix tablets. *Pharmaceutics, 16*, 498.

Öztürk ,A.A., Ünver,H., Kıyan,H.T.(2023) AntioxidantandAntiangiogenicEffect of Homoleptic Palladium (II) Car-boxamideComplexLoadedChitosanModified PLGA Nanoparticles: In vitro Evaluation andInvivoChickEmbryoChorioallantoicMembrane (CAM) Assay, LettDrugDesDiscov 20 1158–1170.

Öztürk, A. A. (2017). *Deksketoprofentrometamol yüklü kontrollü salım gösteren nanoboyutta ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmesi ve in vitro/in vivo değerlendirilmesi* [Yayımlanmamış Doktora Tezi].

Öztürk, A. A. ve Aygül, A. (2020). Design of cefaclormonohydratecontainingnanoparticleswithextendedantibacterialeffectby Nano-Spraydryer: A nanoenglobingstudy. *Journal of Research in Pharmacy, 24*(1), 1–12. https://doi.org/10.35333/jrp.2020.115

Öztürk, A. A. veKırımlıoğlu, G. Y. (2019). Preparationand*in vitro*characterization of lamivudine-loadednanoparticlespreparedbyacid- or ester-terminated PLGA foreffective oral antiretroviral therapy. *Journal of Research in Pharmacy, 23*, 897–913.

Öztürk, A. A., Aygül, A. ve Şenel, B. (2019). Influence of glycerylbehenate, tripalmitinandstearicacid on theproperties of clarithromycin in corporatedsolid lipid nanoparticles (SLNs): Formulation, characterization, antibacterialactivityandcytotoxicity. *Journal of Drug Delivery ScienceandTechnology, 54,* 101240.

Öztürk, A. A., Banderas, L. M., CayeroOtero, M. D., Yenilmez, E. ve Yazan, Y. (2018). New approachtohypertensiontreatment: Carvedilol-loaded PLGA nanoparticles, preparation, in vitro characterization, andgastrointestinalstability. *Latin AmericanJournal of Pharmacy, 37,* 1730–1771.

Öztürk, A. A., Banderas, L. M., CayeroOtero, M. D., Yenilmez, E., Şenel, B.,ve Yazan, Y. (2019). Dexketoprofentrometamol-loadedpoly-lactic-co-glycolicacid (PLGA) nanoparticles: Preparation, *in vitro*characterization, andcytotoxicity. *TropicalJournal of PharmaceuticalResearch, 18,* 1–11. https://doi.org/10.4314/tjpr.v18i1.1

Öztürk, A. A., Banderas, L. M., CayeroOtero, M. D., Yenilmez, E. ve Yazan, Y. (2018). Characterizationandgastrointestinalstability. *Am. J. Pharm, 37*(9), 1730–1771.

Öztürk, A. A., Başaran, E., Şenel, B., Demirel, M. ve Sarıca, Ş. (2023). Synthesis, characterization, andantioxidantactivity of quercetin, rutin, andquercetin-rutin incorporated β-cyclodextrininclusioncomplexesanddetermination of theiractivity in NIH-3T3, MDA-MB-231, and A549 celllines. *Journal of MolecularStructure, 1282,* 135169

Öztürk, A. A., Gündüz, A. B. veOzisik, O. (2018). Supervisedmachinelearningalgorithmsforevaluation of solid lipid nanoparticlesandparticle size. *CombinatorialChemistry& High ThroughputScreening, 21,* 693–699.

Öztürk, A. A., Güven, U., Yenilmez, E. ve Şenel, B. (2018). Effects of differentderivatives of Eudragitpolymer on entrapmentefficiency, in vitro dissolution, releasekinetics, andcellviabilityresults on extendedreleaseflurbiprofen-loadednanomedicines. *Latin AmericanJournal of Pharmacy, 37,* 1981–1992.

Öztürk, A. A., Namlı, İ., Güleç, K. ve Görgülü, Ş. (2020). Design of lamivudine-loadednanoparticlesfor oral applicationby nano spray-dryingmethod: A newapproachtouse an antiretroviral drugforlungcancertreatment. *CombinatorialChemistry& High ThroughputScreening, 23,* 1064–1079.

Öztürk, A. A., Yenilmez, E. ve Yazan, Y. (2019). Dexketoprofentrometamol-loadedEudragit® RL 100 nanoparticleformulation, characterization, andreleasekinetics. *ActaPharmaceuticaSciencia, 57.* https://doi.org/10.23893/1307-2080.APS.05705

Öztürk, A. A., Yenilmez, E., Arslan, R., Şenel, B. ve Yazan, Y. (2017). Dexketoprofentrometamol-loadedKollidon® SR andEudragit® RS 100 polymericnanoparticles: Formulationand in vitro-in vivoevaluation. *Latin AmericanJournal of Pharmacy, 36*.

Öztürk, A. A., Yenilmez, E., Arslan, R., Şenel, B. ve Yazan, Y. (2020). Dexketoprofentrometamol-loadedsolid lipid nanoparticles (SLNs): Formulation, in vitro and in vivoevaluation. *Journal of Research in Pharmacy, 24*.

Öztürk, A., Namlı, İ. ve Aygül, A. (2021). Cefaclormonohydrate-loadedcolon-targetednanoparticlesforuse in covıd-19 dependentcoinfectionsand intestinal symptoms: Formulation, characterization, releasekinetics, andantimicrobialactivity. *ASSAY andDrug Development Technologies, 19*(3), 156–175.

Panyam, J., Williams, D., Dash, A., Leslie-Pelecky, D. veLabhasetwar, V. (2004). Solid-statesolubilityinfluencesencapsulationandrelease of hydrophobicdrugsfrom PLGA/PLA nanoparticles. *Journal of PharmaceuticalSciences, 93*, 1804–1814.

Papaccio, F., D'arino, A., Caputo, S. ve Bellei, B. (2022). Focus on thecontribution of oxidativestress in skin aging. *InAntioxidants, 11*(6). MDPI. https://doi.org/10.3390/antiox11061121

Petersen, M. ve Simmonds, M. S. J. (t.y.).(2003)*Molecules of interestrosmarinicacid.* www.elsevier.com/locate/phytochem

Pharma, D., Rahmani, A. ve Dahaghin, M. (2023). ISSN 0975-413X Coden (Usa): PCHHAX UV spectrophotometricmethoddevelopmentandvalidationforthequantitativemeasurement of rosmarinicacid. *15*(3), 1–4. https://doi.org/10.4172/0975-413X.15.3.1-4

Pınarlı, Ç. (2023). E, A ve C Vitaminlerinin Antioksidan Olarak İmmün Sistem Üzerine Etkileri. Journal of Kocaeli HealthandTechnologyUniversity, 1(1), 39-47.

Pinal, C., Ghate, V. M., Kodoth, A. K., Birangal, S. ve Lewis, S. A. (2025). Drug-silica-celluloseternarymatrixforthe oral delivery of cyclosporine A: In vitro and in vivoevaluation. *Pharmaceutical Development andTechnology*, 1–17.

Rapalli, V. K., Kaul, V., Gorantla, S., Waghule, T., Dubey, S. K., Pandey, M. M. veSinghvi, G. (2020). UV spectrophotometricmethodforcharacterization of curcumin-loadednanostructured lipid nanocarriers in simulatedconditions: Methoddevelopment, in-vitro, andex-vivoapplications in topicaldelivery. *SpectrochimicaActaPart A: MolecularandBiomolecularSpectroscopy, 224*, 117392.

Sağlam, E. Özdamar, E.N. Yaşlanma Teorileri ve Tedavi Yaklaşımları. Maltepe tıp derg. 2012;4(1):56-61.

Schiera, V., CarfiPavia, F., La Carrubba, V., Brucato, V. veDintcheva, N. T. (2024). Poly-L-lacticacidscaffoldsadditivatedwithrosmarinicacid: A multi-analyticalapproachtoassessthemorphology, thermalbehavior, andhydrophilicity. *Polymers (Basel), 16*, 1672.

Sik, B., Kapcsándi, V., Székelyhidi, R., Hanczné, E. L. veAjtony, Z. (2019). Recentadvances in theanalysis of rosmarinicacidfromherbs in theLamiaceaefamily. *Natural Product Communications, 14*, 1934578X19864216.

Simitcioglu, B., Karagoz, I. D., Ilbasmis-Tamer, S. ve Tamer, U. (2022). Effect of differentmolecularweightand terminal group PLGA on docetaxelnanoparticles: Characterizationandcytotoxicactivity of castration-resistantprostatecancercells.

Pharmaceutical Development andTechnology, 27(7), 794–804. https://doi.org/10.1080/10837450.2022.2120004

Sinha, A. veRupachandra, S. (2024). Preparationandcharacterization of papainloadedphosphatidylcholine-PLGA hybridnanoparticles as noveldrugdeliverysystems. *Journal of Polymersandthe Environment,* 1–10.

Söğüt Ertaş, Ö. , Kayalı, A., (2005).Analitik yöntem geçerliliğine genel bakış. Ankara Ecz. Fak. Derg. J. Fac. Pharm, Ankara 34 (1) 41 – 57.

Sun, J., Walker, J., Beck-Broichsitter, M. veSchwendeman, S. P. (2022). Characterization of commercialPLGAsby NMR spectroscopy. *Drug Delivery andTranslationalResearch, 12*, 720–729.

Şenel, B. ve Öztürk, A. A. (2019). New approachestotumortherapywithsiRNA-decoratedandchitosan-modified PLGA nanoparticles. *Drug Development andIndustrialPharmacy, 45*, 1835–1848.

Taşkın D.,Öğüt S.(2024),*SAĞLIK& BİLİM 2024: Yaşlanma Biyolojisi ve Sağlık,s.92*

Taşkor Önel, G. (2023). SynthesisandCharacterization of Poly(lactic-co-glycolicacid) DerivedwithLGlutamicAcidand L-AsparticAcid. Erzincan UniversityJournal of ScienceandTechnology, 16(1), 155-168. https://doi.org/10.18185/erzifbed.1235522

Tawfeeq, A. A., Mahdi, M. F., Abaas, I. S. ve Alwan, A. H. (2018). Isolation, quantification, andidentification of rosmarinicacid, gaschromatography-massspectrometryanalysis of essentialoil, cytotoxiceffect, andantimicrobialinvestigation of rosmarin us officinal is leaves. *AsianJournal of PharmaceuticalandClinicalResearch, 11*(6), 126–132. https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i6.24134

Vatan, Ö. (2019).Rosmarinik asidin Cisplatine karşı antisitotoksik ve antigenotoksik etkisinin A549 ve Beas-2B hücre hatlarında araştırılması. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 45 (3) 263-270. https://doi.org/10.32708/uutfd.613912

Vatankhah, E., Hamedi, S. ve Ramezani, O. (2020). Surfactant-assisted in corporation of rosmarinicacidintoelectrosprayedpoly (lactic-co-glycolicacid) microparticleswithpotentialforcosmeticandpharmaceuticalapplications. *PolymerTesting, 81*. https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2019.106180

Wang, R., Zou, L., Yi, Z., Zhang, Z., Zhao, M. veShi, S. (2023). PLGA nanoparticlesloadedwithcurcuminproducedluminescenceforcellbioimaging. *International Journal of Pharmaceutics, 639*, 122944.

Wang, X., Gadhave, D., Chauhan, G. veGupta, V. (2024). Development andcharacterization of inhalednintedanib-loaded PLGA nanoparticlesusingscalablehigh-pressurehomogenizationtechnique. *Journal of Drug Delivery ScienceandTechnology, 91*, 105233.

Wayne, P. A. (2011). Clinicalandlaboratorystandardsinstitute. Performancestandardsforantimicrobialsusceptibilitytesting.

Yavuz, İ., Fen, G. Ü. F. ve Yılmaz, E. Ş. (2021). Biyolojik sistemli nanopartiküller. *Dergisi, 1*, 93–108. https://doi.org/10.5281/zenodo.4843592

Yener, B. N., Kar, F., Gül, A., Oğraş, A., Fidan, K., Gümüş, N. ve Akyüz, F. (2020). Kafein bir antioksidan madde midir? Oksidatif Stres ve Kafein. *Türk Tıp Öğrencileri Araştırma Dergisi*, 2(2).

Yenilmez, E., Öztürk, A. ve Başaran, E. (2023). Preparationand in vitro, exvivoevaluation of benzidaminehydrochloride-loadedfastdissolving oral stripformulations: Treatment of oral mucositisduetosideeffects of chemotherapyandradiotherapy. *Letters in Drug Design &Discovery, 20*.

Yousefzadeh, M., Henpita, C., Vyas, R., Soto-Palma, C., Robbins, P. ve Niedernhofer, L. (2021). Dnadamage—how andwhyweage? *E Life, 10*, 1–17. https://doi.org/10.7554/eLife.62852

Yuan, H., Gui, H., Chen, S., Zhu, L., Wang, C., Jing, Q., Lv, H., Wan, Q., Wang, S. ve Zhou, S. (2024). Regulatingtumor-associatedmacrophagepolarizationbycyclodextrin-modified PLGA nanoparticlesloadedwith R848 fortreatingcoloncancer. *International Journal of Nanomedicine*, 3589–3605.

Zhang, J., Xia, W., Liu, P., Cheng, Q., Tahirou, T., Gu, W. ve Li, B. (2010). Chitosanmodificationandpharmaceutical/biomedicalapplications. *In Marine Drugs*, *8*(7), 1962–1987. https://doi.org/10.3390/md8071962

Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C. veXie, S. (2010). DDSolver: An add-in program formodelingandcomparison of drugdissolutionprofiles. *AAPS Journal*, *12*, 263–271.

Zielinska, A., Carreiró, F., Oliveira, A. M., Neves, A., Pires, B., NagasamyVenkatesh, D., Durazzo, A., Lucarini, M., Eder, P., Silva, A. M., Santini, A. ve Souto, E. B. (2020a). PolymericNanoparticles: Production, characterization, toxicologyandecotoxicology. *InMolecules*, *25*(16). https://doi.org/10.3390/molecules25163731

Zielinska, A., Carreiró, F., Oliveira, A. M., Neves, A., Pires, B., NagasamyVenkatesh, D., Durazzo, A., Lucarini, M., Eder, P., Silva, A. M., Santini, A. ve Souto, E. B. (2020b). Polymericnanoparticles: Production, characterization, toxicologyandecotoxicology. *InMolecules*, *25*(16). https://doi.org/10.3390/molecules25163731

Zuo, J., Gao, Y., Bou-Chacra, N. veLöbenberg, R. (2014). Evaluation of theDDSolversoftwareapplications. *BiomaterialsResearch International, 2014*.

ÖZ GEÇMİŞ

Adı Soyadı **:** Büşra SOLAK

Yabancı Dil **:** İngilizce

Doğum Yeri **:** BURSA

E-Posta **:**

ORCID Numarası **:**

Eğitim Bilgileri:

2015, Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi

Mesleki Deneyim:

2017, Eczacı, Büşra Eczanesi/ Bursa

2016, İkinci Eczacı, Bengisu Eczanesi/ Bursa

Yayınları:

Solak, B., Soyer, P., Kaya-Tilki, E., Öztürk, A.A (2025). Evaluation of antimicrobial properties and antioxidant activity of rosmarinic acid loaded Resomer RG 502 H based nanoparticles against tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress: A detailed formulation, characterization and efficacy determination study, Journal of Drug Delivery Science and Technology, Volume 106, 106721, ISSN 1773-2247. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2025.106721

Mesleki Birlik/Dernek/Kuruluş Üyelikleri:

2016, Bursa Eczacı Odası, Bursa

Journal of Drug Delivery Science and Technology 106 (2025) 106721

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Drug Delivery Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jddst

Evaluation of antimicrobial properties and antioxidant activity of rosmarinic acid loaded Resomer RG 502 H based nanoparticles against tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress: A detailed formulation, characterization and efficacy determination study

Büşra Solak [a], Pervin Soyer [b], Elif Kaya-Tilki [c], A. Alper Öztürk [a,*]

[a] Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Anadolu University, Eskişehir, Türkiye
[b] Department of Pharmaceutical Microbiology, Faculty of Pharmacy, Anadolu University, Eskişehir, Türkiye
[c] Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Anadolu University, Eskişehir, Türkiye

ARTICLE INFO

Keywords:
Antioxidant
Nanoparticle
Nanoprecipitation
Oxidative stress
PLGA
Rosmarinic acid

ABSTRACT

This study investigates the innovative application of rosmarinic acid (RA)-loaded Resomer RG 502 H-based nanoparticles (NPs) in enhancing therapeutic efficacy against oxidative stress and microbial infections. Rosmarinic acid, a natural polyphenol with significant pharmacological properties, has demonstrated potential in treating various diseases, including cancer, diabetes, and inflammatory disorders. However, its clinical utility is hampered by poor water solubility and bioavailability. To address these challenges, we employed a nanoprecipitation technique to create biodegradable PLGA-based NPs that encapsulate RA effectively. The formulation showed uniformity with a particle size of 217.7 nm ± 4.3 and a PDI of 0.129 ± 0.007. A study was conducted with trehalose to ensure stability during storage. The resultant NPs not only exhibit high encapsulation efficiency (≈72.8 %) but also provide sustained release profiles for 72 h, which are crucial for maximizing RA's therapeutic effects. DSC, FT-IR, and ^{1}H-NMR analyses confirmed the encapsulation and structural integrity of the formulation. Pharmacological evaluations, including the effects of RA and B-RA-NP on NIH/3T3 cell viability, the evaluation of optimal tBHP concentration, and exposure time for assessing antioxidant activity, reveal that these NPs significantly enhance the antioxidant activity of RA while exhibiting potent antimicrobial effects against a spectrum of pathogenic microorganisms. By leveraging nanotechnology for drug delivery, we present a promising strategy to improve the bioavailability and efficacy of RA, thus advancing its application in therapeutic formulations. The findings underscore the transformative potential of nanotechnology in enhancing the clinical relevance of natural compounds, paving the way for novel therapeutic strategies in pharmaceutical applications.

1. Introduction

An ester of caffeic acid and (R)-(+)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)lactic acid, rosmarinic acid (RA) is a phenolic chemical. Plants in the *Boraginaceae* and *Lamiaceae* family, including borage, mint, lemon balm, rosemary, lavender, thyme, basil, sage, savory, and many more, frequently contain the chemical. In addition to being found in culinary herbs, RA is widely utilized in herbal remedies, dietary supplements, and natural cosmetics [1]. Studies have identified multiple therapeutic benefits of RA in various diseases including cancer, diabetes, inflammatory disorders, neurodegenerative disorders, and liver diseases. Similarly, studies suggest that RA can be used as an antiplasmodic, anti-viral, and anti-bacterial drug. Furthermore, due to its high antioxidant capacity, this natural polyphenol has recently attracted attention for its possible application as a nutraceutical compound. RA has anti-inflammatory, antiviral, photoprotective, antimelanogenic and wound healing effects. In conclusion, the excellent effects of RA, such as anti-inflammatory, antiviral, photoprotective, antimelanogenic and wound healing, offer opportunities for its evaluation as a therapeutic or cosmeceutical [2–4]. Despite such excellent properties, its inability to effectively pass through biological barriers and its poor bioavailability due to its poor water solubility negatively affect its therapeutical or

* Corresponding author.
E-mail

https://doi.org/10.1016/j.jddst.2025.106721
Received 14 January 2025; Received in revised form 7 February 2025; Accepted 16 February 2025
Available online 17 February 2025
1773-2247/© 2025 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.